

Aus dem Robert Koch-Institut

**„Identifizierung eines Indikators für die Verbreitung des  
Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus und  
Entwicklung einer RNA-Interferenz-Strategie gegen  
Frühsommer-Meningoenzephalitis“**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)



Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Dipl.-Biol. Katharina Achazi**

Berlin 2011



Die Promotion wurde im Robert Koch Institut im Zentrum für biologische Sicherheit 1 (ZBS1) Hochpathogene virale Erreger unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias Niedrig von September 2006 bis Oktober 2010 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Niedrig (RKI/HUB)

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel (FUB)

Tag der Disputation: 15.02.2011



# Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung</b> .....	<b>15</b>
<b>A.1 Das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus</b> .....	<b>15</b>
<b>A.2 Virologie und zelluläre Physiologie des FSME-Virus</b> .....	<b>16</b>
<b>A.3 Phylogenie, Epidemiologie und Ökologie des FSME-Virus</b> .....	<b>20</b>
<b>A.4 Verbreitung des FSME-Virus und Ausweisung von FSME-Risikogebieten</b> .....	<b>25</b>
<b>A.5 Krankheitsverlauf und Diagnose der FSME</b> .....	<b>27</b>
<b>A.6 Strategien zur Kontrolle einer FSME-Virusinfektion</b> .....	<b>30</b>
A.6.1 Mechanismus der RNA-Interferenz .....	30
A.6.2 Einsatz der RNAi zur Inhibition von flaviviralen Infektionen .....	33
<b>A.7 Zielsetzung</b> .....	<b>35</b>
<b>B. Material und Methoden</b> .....	<b>37</b>
<b>B.1 Methoden zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen</b> .....	<b>37</b>
B.1.1 Kultivierungsbedingungen .....	37
B.1.2 Zellkultivierung .....	37
B.1.3 Bestimmung der Zellzahl .....	38
<b>B.2 Virologische und serologische Methoden</b> .....	<b>39</b>
B.2.1 Virusanzucht .....	39
B.2.2 Virusanzucht aus Organen .....	40
B.2.3 Direkter FSME-Virusnachweis durch Fluoreszenzmikroskopie und Immunofluoreszenztest .....	40
B.2.4 Bestimmung des FSME-Virustiters mit Hilfe des Plaquetests .....	42
B.2.5 Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen das FSME-Virus mittels Neutralisationstest .....	42
<b>B.3 Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>44</b>
B.3.1 Isolierung von Membranproteinen aus mit FSME-Virus infizierten, eukaryotischen Zellen .....	44
B.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung .....	44
B.3.3 SDS-PAGE und Western Blot .....	44
B.3.3.1 Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE .....	44

B.3.3.2	Transfer der Proteine auf eine Membran (Blotten) .....	46
B.3.3.3	Proteindetektion.....	46
<b>B.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>48</b>
B.4.1	Isolierung von Nukleinsäuren .....	48
B.4.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe.....	48
B.4.1.2	Isolierung von viraler RNA aus zellfreiem Material .....	48
B.4.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Vollblut.....	49
B.4.1.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus gefrorenem Vollblut .....	49
B.4.1.5	Isolierung von Gesamt-DNA und -RNA aus Zecken.....	50
B.4.2	Nachweis und Sequenzierung von Nukleinsäuren .....	50
B.4.2.1	Spektralphotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren ..	50
B.4.2.2	cDNA-Synthese .....	50
B.4.2.3	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	50
B.4.2.4	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR (RT-qPCR).....	52
B.4.2.5	Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	54
B.4.2.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	55
B.4.2.7	Sequenzierung von DNA-Fragmenten .....	55
B.4.2.8	<i>Pyrosequencing</i> zur Differenzierung der FSME- Virussubtypen .....	55
B.4.3	Klonierung von PCR-Fragmenten und Herstellung von PCR RNA- und DNA-Standards.....	57
B.4.3.1	Klonierung eines PCR-Fragments.....	57
B.4.3.2	Restriktionsverdau zur Linearisierung eines Plasmids .....	59
B.4.3.3	<i>In vitro</i> -Transkription .....	59
<b>B.5</b>	<b>Methoden zur Identifizierung eines Indikators für die Verbreitung des     FSME-Virus .....</b>	<b>61</b>
B.5.1	Untersuchung über Organtropismus und Persistenz des FSME- Virus in Feldmäusen ( <i>Microtus arvalis</i> ).....	61
B.5.2	Fangen und Sezieren von Nagern.....	61
B.5.3	Sammeln von Zecken .....	61
<b>B.6</b>	<b>Methoden zur Entwicklung einer RNA-Interferenz-Strategie gegen     FSME .....</b>	<b>63</b>
B.6.1	Design und Herstellung von siRNA-Plasmiden.....	63
B.6.2	Transfektion der siRNA-Plasmide in eukaryotische Zellen .....	64
B.6.3	Infektion der mit siRNA-Plasmiden transfizierten Zellen .....	65

<b>B.7</b>	<b>Statistische Methoden zur Auswertung der Daten .....</b>	<b>66</b>
<b>B.8</b>	<b>Lösungen, Materialien und Chemikalien .....</b>	<b>67</b>
<b>C.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>73</b>
<b>C.1</b>	<b>Etablierung von Methoden für den Nachweis des FSME-Virus .....</b>	<b>73</b>
C.1.1	Etablierung einer Immunofluoreszenzfärbung zum Nachweis des FSME-Virus in Zellen .....	73
C.1.2	Etablierung eines Western Blots zum Nachweis des E-Proteins des FSME-Virus.....	76
C.1.3	Etablierung eines Plaquetests zum Nachweis von infektiösen FSME-Viruspartikeln .....	77
C.1.4	Etablierung eines Neutralisationstests zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen das FSME-Virus in humanen und tierischen Seren sowie Liquor.....	79
C.1.5	Etablierung quantitativer <i>real-time</i> RT-PCR-Systeme zum Nachweis und zur Quantifizierung von FSME-Virus-RNA aus verschiedenen Probenmaterialien .....	81
C.1.5.1	Austestung der Effizienz der cDNA-Synthese für die RT-qPCR-Systeme .....	81
C.1.5.2	Primerdesign für die RT-qPCR-Systeme.....	82
C.1.5.3	Spezifität der RT-qPCR-Systeme.....	84
C.1.5.4	Einführung einer internen Kontrolle für die NS1-Protein-RT-qPCR .....	87
C.1.5.5	Etablierung der NS1-Protein-RT-qPCR als <i>one-step</i> -Anwendung.....	88
C.1.5.6	Eigenschaften der RT-qPCR-Systeme.....	91
C.1.6	Etablierung der <i>Pyrosequencing</i> -Methode zur Bestimmung des FSME-Virussubtyps in RT-qPCR-positiven Proben .....	96
<b>C.2</b>	<b>Identifizierung eines Indikators für die Verbreitung des FSME-Virus .....</b>	<b>98</b>
C.2.1	Nachweis des FSME-Virus in Zecken.....	98
C.2.2	Organtropismus und Persistenz des FSME-Virus in Feldmäusen ( <i>Microtus arvalis</i> ).....	100
C.2.3	Studie zur Prävalenz des FSME-Virus in Nagern aus Brandenburg ..	101
<b>C.3</b>	<b>Entwicklung einer RNA-Interferenz-Strategie gegen FSME.....</b>	<b>105</b>
C.3.1	Auswahl und Herstellung der siRNA-Konstrukte sowie Entwicklung der Versuchsbedingungen.....	105

C.3.1.1	Auswahl der siRNA-Sequenzen .....	106
C.3.1.2	Herstellung der siRNA-Plasmide .....	107
C.3.1.3	Austestung der Versuchsbedingungen zur Testung der siRNAs in eukaryotischen Zellen.....	108
C.3.1.4	Transfektionseffizienz und siRNA-Expression in Abhängigkeit von der verwendeten siRNA- Plasmidkonzentration.....	112
C.3.1.5	Wirkung der siRNA-Plasmidkonzentration auf die Transfektionseffizienz .....	112
C.3.1.6	Wirkung der siRNA-Plasmidkonzentration auf die siRNA- Expression.....	113
C.3.2	Wirkung der entworfenen siRNAs auf eine FSME-Virusinfektion in eukaryotischen Zellen .....	116
C.3.2.1	Wirkung von siRNAs auf die Virus-RNA-Menge in eukaryotischen Zellen .....	117
C.3.2.2	Wirkung der siRNAs auf andere FSME-Virusstämme bzw. - subtypen .....	119
C.3.2.3	Wirkung von siRNAs auf den Virusproteingehalt eukaryotischer Zellen.....	121
C.3.2.4	Wirkung von siRNAs auf die Infizierbarkeit eukaryotischer Zellen.....	122
C.3.2.5	Wirkung von siRNAs auf die Menge infektiöser Viruspartikel in eukaryotischen Zellen.....	123
<b>D.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>125</b>
<b>D.1</b>	<b>Etablierung von Methoden für den FSME-Virus Nachweis.....</b>	<b>125</b>
D.1.1	Nachweis des FSME-Virus in Zellen mittels Immunofluoreszenztest und Western Blot .....	125
D.1.2	Nachweis von infektiösen FSME-Viruspartikeln und neutralisierenden Antikörpern gegen das FSME-Virus mittels Plaquetest bzw. Neutralisationstest.....	126
D.1.3	Nachweis und Quantifizierung von FSME-Virus-RNA mittels <i>real-     time</i> RT-PCR-Systemen sowie Bestimmung des FSME- Virussubtyps mittels der <i>Pyrosequencing</i> -Methode.....	127
<b>D.2</b>	<b>Identifizierung eines Indikators für die Verbreitung des FSME-Virus.....</b>	<b>130</b>
D.2.1	Nachweis des FSME-Virus in Zecken .....	131

D.2.2	Organtropismus und Persistenz des FSME-Virus in Feldmäusen ( <i>Microtus arvalis</i> ).....	133
D.2.3	Studie zur Prävalenz des FSME-Virus in Nagern aus Brandenburg ..	135
D.3	<b>Entwicklung einer RNA-Interferenz-Strategie gegen FSME.....</b>	<b>141</b>
	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>148</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>150</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>153</b>
	<b>Verzeichnis erfolgter Publikationen .....</b>	<b>165</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>167</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>169</b>
	<b>Bescheinigung .....</b>	<b>171</b>



## Abkürzungsverzeichnis

<b>% (v/v)</b>	Volumenprozent
<b>% (w/v)</b>	Gewichtsprozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>μ</b>	Mikro-
<b>A</b>	Adenin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b><i>aqua bidest.</i></b>	destilliertes Wasser
<b><i>aqua mol.</i></b>	molekularbiologisches Wasser
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BBQ</b>	<i>BlackBerry Quencher</i>
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C</b>	Cytosin
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Kalziumchlorid
<b>cDNA</b>	<i>copy</i> DNA
<b>CMC</b>	Carboxymethylzellulose Natriumsalz
<b>CPE</b>	zytopathischer Effekt
<b>C-Protein</b>	Kapsid-Protein
<b>C<sub>q</sub></b>	Schwellenwertzyklus
<b>Cy5</b>	Cyanin Fluoreszenzfarbstoff
<b>d</b>	Desoxy-
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DDR</b>	Deutsche Demokratische Republik
<b>DI50</b>	50 %ige Virusinhibition
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagles-Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>dpi</b>	Tage nach der Infektion ( <i>days post infection</i> )
<b>dsRNA</b>	doppelsträngige RNA
<b>DTT</b>	Dithiothreolin
<b>E</b>	europäischer Subtyp

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>
<b>E-Protein</b>	Envelope-Protein
<b>ER</b>	Endoplasmatischen Retikulum
<b>et al.</b>	und andere ( <i>et aliter</i> )
<b>F</b>	fernöstlicher Subtyp
<b>FAM</b>	6-FAM-Phosphoramidit
<b>FCV</b>	Felines Calicivirus
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FSME</b>	Frühsommer-Meningoenzephalitis
<b>FSME-Virus</b>	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
<b>FUB</b>	Freie Universität Berlin
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>G</b>	Guanidin
<b>g</b>	Gramm
<b>GFP</b>	grün fluoreszierendes Protein
<b>GGEV</b>	Greek-Goat-Enzephalitis-Virus
<b>gi</b>	<i>GenInfo Identifier Number</i>
<b>GTC</b>	Guanidinthiocyanat
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HRP</b>	Meerrettich-Peroxidase ( <i>Horseradish Peroxidase</i> )
<b>HUB</b>	Humboldtuniversität Berlin
<b>IF</b>	Immunofluoreszenzfärbung
<b>IFT</b>	Immunofluoreszenztest
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IgM</b>	Immunglobulin M
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosidase
<b>ivRNA</b>	<i>in vitro</i> -transkribierte RNA
<b>k</b>	Kilo-
<b>K23-ivRNA</b>	<i>in vitro</i> -transkribierte RNA des FSME-Virusstammes K23
<b>KAc</b>	Kaliumacetat
<b>KCl</b>	Kaliumchloride
<b>l</b>	Liter
<b>L-15</b>	Leibowitz 15-Medium
<b>LIV</b>	Louping III-Virus
<b>m</b>	Meter
<b>M</b>	Mol
<b>m</b>	Milli-

<b>MAB</b>	monoklonaler Antikörper
<b>MEPP</b>	Mercaptoethanol-Probenpuffer
<b>MGB</b>	<i>Minor groove binder</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>MGFP</b>	modifiziertes GFP
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Magnesiumsulfid
<b>min</b>	Minute
<b>MIQE</b>	<i>minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments</i>
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>MMLV</b>	Moloney-Murine-Leukemia-Virus
<b>MOI</b>	Vielfachheit der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
<b>mol</b>	Molar
<b>M-Protein</b>	Membran-Protein
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>n</b>	Nano-
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NS</b>	Nichtstrukturprotein
<b>NT</b>	Neutralisationstest
<b>nt</b>	Nukleotid
<b>ORF</b>	Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
<b>p</b>	Wahrscheinlichkeit
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PFU</b>	Plaquebildende Einheit ( <i>plaque forming units</i> )
<b>pH</b>	<i>potentia hydrogenii</i>
<b>PPi</b>	Pyrophosphat
<b>pre-miRNA</b>	Vorläufer-miRNA
<b>pri-miRNA</b>	Primär-miRNA
<b>prM-Protein</b>	M-Vorläuferprotein
<b>qPCR</b>	quantitative <i>real-time</i> PCR
<b>R<sup>2</sup></b>	Bestimmtheitsmaß
<b>RCL</b>	<i>red cell lysis buffer</i>
<b>RISC</b>	<i>RNA-induced silencing complex</i>
<b>RKI</b>	Robert Koch-Institut
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNAi</b>	RNA-Interferenz

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>RT-qPCR</b>	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR
<b>S</b>	sibirischer Subtyp
<b>s</b>	Sekunde
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide</i> )
<b>shRNA</b>	<i>short hairpin</i> RNA
<b>siRNA</b>	<i>small interfering</i> RNA
<b>SSEV</b>	Spanish-Sheep-Enzephalitis-Virus
<b>SSII</b>	Superscript II
<b>T</b>	Tyrosin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA
<b>TEMED</b>	N',N',N',N'-Tetramethylethylenediamin
<b>TP</b>	Triphosphat
<b>Tris</b>	Tris-Hydroxymethylaminomethan
<b>TSEV</b>	Turkish-Sheep-Enzephalitis-Virus
<b>U</b>	Uridin
<b>Ü/N</b>	über Nacht
<b>WB</b>	Western Blot
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>ZBS1</b>	Zentrum für biologische Sicherheit 1
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem
<b>β-MeETOH</b>	β-Mercaptoethanol

## A. Einleitung

### A.1 Das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus

Das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus) verursacht eine der am häufigsten in Europa und Asien vorkommenden Infektionen des zentralen Nervensystems (ZNS). Das Virus gehört gemeinsam mit dem Gelbfieberevirus, dem Dengue-Virus, dem Japanische-Enzephalitis-Virus und weiteren Erregern zur Familie der *Flaviviridae* und wird hauptsächlich durch Zecken auf den Menschen übertragen (Gritsun *et al.*, 2003b).

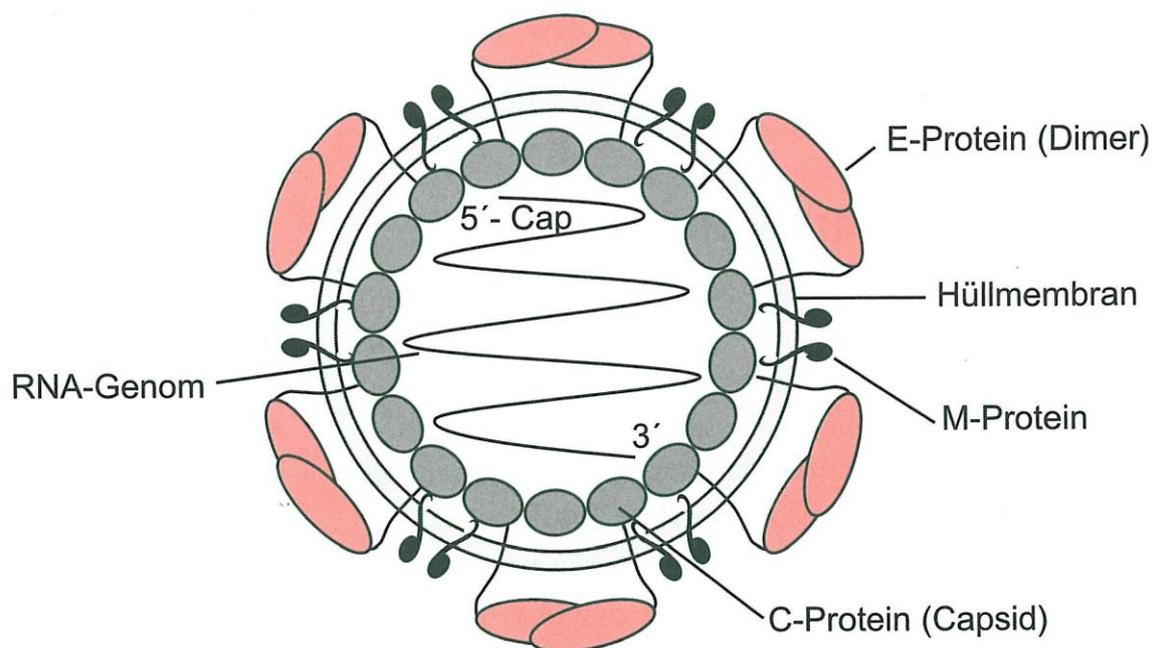
In den letzten Jahren ist in ganz Europa sowohl ein deutlicher Anstieg der FSME-Fallzahlen als auch eine Ausweitung der Verbreitungsgebiete des FSME-Virus beobachtet worden. Dieser Anstieg kann durch klimatische, sozioökonomische und politische Veränderungen erklärt werden (Donoso Mantke *et al.*, 2008; Sumilo *et al.*, 2008; Süss, 2008).

In Deutschland kommt das FSME-Virus vor allem in Süddeutschland vor, breitet sich aber zusehends nach Norden aus. Auch in Brandenburg, das seit den 1980igern als FSME-freies Gebiet galt, sind seit 2006 wieder einzelne FSME-Fälle aufgetreten (Süss, 2008; Süss *et al.*, 1996). Jedoch ist die Anzahl der Fälle zu gering, um Aufschluss über die Verbreitung und damit das humane Infektionsrisiko geben zu können. In dieser Arbeit sollte daher ein Indikator identifiziert werden, mit dem die Verbreitung des Virus sowohl unabhängig von humanen Fällen als auch in Gebieten mit geringer Viruszirkulation ermittelt werden kann. Die Eignung des Indikators sollte durch Bestimmung der Verbreitung des FSME-Virus im Land Brandenburg getestet werden.

Eine Infektion mit dem Virus kann durch eine präventive Impfung verhindert werden. Eine bereits erfolgte Infektion kann jedoch nur symptomatisch behandelt werden, da es gegen das FSME-Virus bisher keine Medikamente gibt. Daher sollte in einem zweiten Teil der Arbeit, basierend auf der RNA-Interferenz, eine antivirale Substanz entwickelt und *in vitro* getestet werden, welche die Replikation des Virus hemmt.

### A.2 Virologie und zelluläre Physiologie des FSME-Virus

FSME-Viren sind wie alle Flaviviren kleine, icosaedrische, lipidumhüllte Viren mit einem Durchmesser von ca. 50 nm (Murphy, 1980). Innerhalb der Virushülle liegt das von basischen C-Proteinen (Kapsid-Protein) gebildete Nukleokapsid, welches ein ca. 11 kb großes, einzelsträngiges RNA-Genom enthält (Heinz und Allison, 2003). Auf der Oberfläche des Viruspartikels, verankert in der Lipiddoppelmembran, befinden sich zwei Proteine, das glykosylierte, ca. 53 kDa bis 54 kDa große E-Protein (Envelope-Protein) und das kleinere ca. 24 kDa bis 27 kDa große M-Protein (Membran-Protein). Das M-Protein ist ein proteolytisches Fragment des M-Vorläuferproteins (prM-Protein), welches während der Reifung der Viruspartikel entsteht. Das prM-Protein übernimmt die Aufgaben eines Chaperons und ist z.B. dafür zuständig, dass das E-Protein in der richtigen Weise gefaltet wird (Heinz, 1986; Heinz und Allison, 2003; Lorenz *et al.*, 2002). In Abb. 1 ist der Aufbau des FSME-Virus schematisch dargestellt.



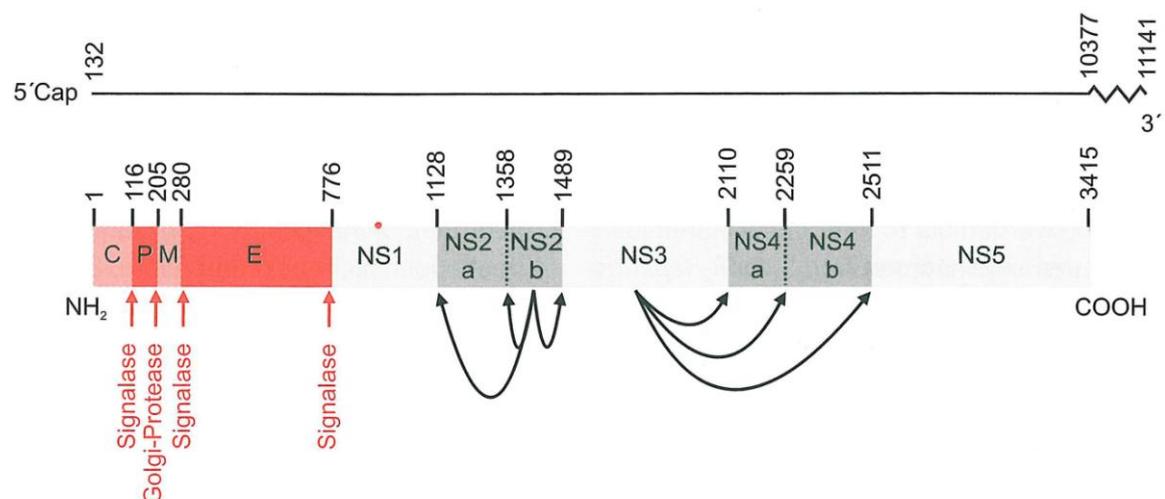
**Abb. 1: Schematischer Aufbau eines FSME-Viruspartikels.**

Das icosaedrische Kapsid, welches das RNA-Genom enthält, wird von den C-Proteinen (Kapsid-Proteinen) gebildet. Das Kapsid ist von einer Lipidmembran umgeben, in welche die E-Proteine (Envelope-Proteine) und M-Proteine (Membran-Proteine) eingelagert sind. (Quelle: Modrow *et al.* (2010)).

Das E-Protein ist das wichtigste Antigen des Virus (Heinz und Allison, 2003). Es vermittelt die Adsorption des Virus an die Zelle und die rezeptorvermittelte Endozytose. Außerdem induziert es die Fusion mit der Wirtszelle und besitzt drei distinkte Domänen

(Heinz, 1986; Rey *et al.*, 1995). Im reifen Virus liegen die E-Proteine als Dimere vor (Abb. 2). Jeder Viruspartikel enthält 90 E-Proteindimere. Diese liegen flach auf der Virusoberfläche auf, so dass der Teil des Proteins verdeckt ist, der für die Fusion des Virus mit der Membran der Wirtszelle zuständig ist - das Fusionspeptid. Das Virus gelangt durch Endozytose in die Wirtszelle, wobei ein Endosom gebildet wird, welches das Virus enthält. Der pH des Endosoms wird im weiteren Verlauf angesäuert, wodurch es zu einer unumkehrbaren Konformationsänderung der E-Proteine kommt und das Fusionspeptid an der Spitze des Proteins zu liegen kommt. Dadurch wird die Fusion der Virusmembran mit dem Endosom ausgelöst und das Nukleokapsid wird ins Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Dort zerfällt dieses und setzt die virale RNA frei (Heinz und Allison, 2003; Lindenbach und Rice, 2001; Rey *et al.*, 1995).

Das RNA-Genom liegt in Plusstrangorientierung vor und agiert im Prinzip als infektiöse messenger-RNA mit einem einzigen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), welcher beim FSME-Virus für ein 3415 Aminosäuren großes Vorläuferprotein kodiert (Abb. 2). Das Vorläuferprotein wird während und nach der Translation von viralen und zellulären Proteasen in drei Strukturproteine (C, prM und E) sowie sieben Nichtstrukturproteine (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) gespalten (Heinz und Allison, 2003).



**Abb. 2: Genomorganisation des FSME-Virus.**

In der nichttranslatierten Region am 5'-Ende befindet sich eine CAP-Gruppe. Das Genom des FSME-Virus umfasst einen einzigen Leserahmen, welcher für ein 3415 Aminosäuren großes Vorläuferprotein kodiert. Das Vorläuferprotein wird proteolytisch in die drei Strukturproteine (rot; E: Envelope-Protein, C: Kapsid-Protein, PM: Vorläuferprotein des Membran-Proteins) und die sieben Nichtstrukturproteine (grau) gespalten. Dies geschieht zum Teil autokatalytisch wie auch durch zelluläre Proteasen und Signalasen (Pfeile). Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen im Vorläuferprotein, an welchen die Spaltungen erfolgen. (Quelle: Modrow *et al.* (2010)).

Die Nichtstrukturproteine NS3 (Helikase) und NS5 (RNA-abhängige RNA-Polymerase) bilden während des Infektionszyklus Polymerasekomplexe, die mit den Glykoproteinen

## Einleitung

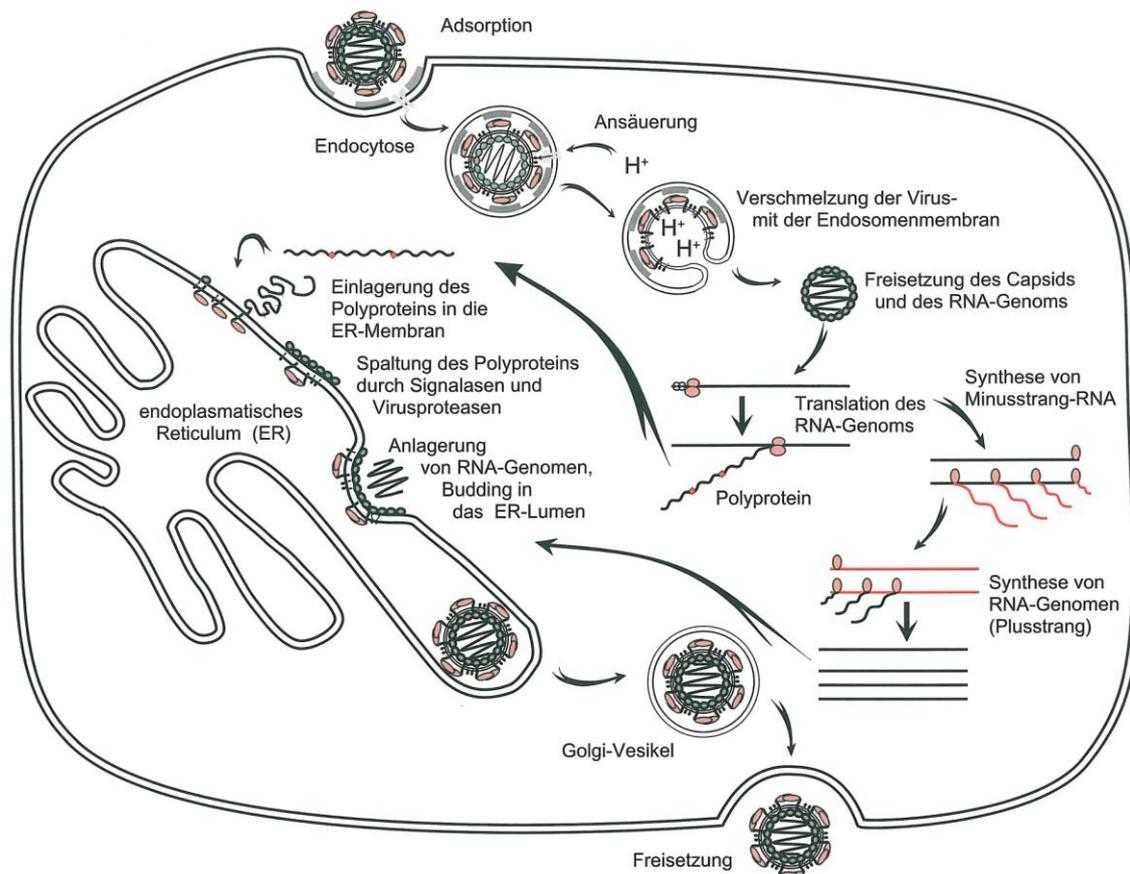
---

NS1 und NS2a assoziiert sind (Lindenbach und Rice, 2001). Weiterhin kann das NS1-Protein membranassoziierte, ringförmige Partikel formen, die ca. 10 nm groß sind und unter denaturierenden Bedingungen stabile Dimere bilden (Flamand *et al.*, 1999; Gritsun *et al.*, 1988; Gritsun *et al.*, 1990; Gritsun *et al.*, 1989; Winkler *et al.*, 1988). Außerdem induziert das NS1-Protein, zusätzlich zum E-Protein, ebenfalls eine protektive Immunantwort (Cane und Gould, 1988; Gould *et al.*, 1986; Jacobs *et al.*, 1992; Schlesinger *et al.*, 1986). Das NS3-Protein besitzt zusammen mit dem NS4b-Protein eine virusspezifische Serinproteaseaktivität, welche für die Spaltung der neu synthetisierten Viruspolyproteine verantwortlich ist. Es wird vermutet, dass die Proteine NS4a und NS4b für die richtige Orientierung des Polyproteins in der interzellulären Membran zuständig sind sowie für die korrekte Spaltung und Funktion des Polymerasekomplexes (Lindenbach und Rice, 2001). Das ORF wird von 3'- und 5'-nichttranslatierten Regionen flankiert, welche Sekundärstrukturen (*stem loops*) bilden. Diese könnten als Cis-Elemente die Amplifikation, Translation und Verpackung des Virusgenoms regulieren (Gritsun *et al.*, 2003b). Das 5'-Ende besitzt eine CAP-Struktur, welche mit den zellulären Ribosomen interagiert (Modrow *et al.*, 2010).

Nachdem die virale RNA ins Zytoplasma freigesetzt wurde, beginnt die Virusreplikation mit der Translation der viralen RNA an den Ribosomen, vermittelt durch die CAP-Struktur am 5'-Ende der RNA (Abb. 3). Ist der erste Teil des Proteins bis zum C-Protein translatiert, wirkt dieses als Signalpeptid und der Komplex wird zum endoplasmatischen Reticulum (ER) transportiert. Dort erfolgen die weitere Translation und der Einbau der Strukturproteine in die Membran des ER sowie die gleichzeitige Prozessierung der Proteine, zuerst durch zelleigene, später durch virale Proteasen (Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach und Rice, 2001; Modrow *et al.*, 2010).

Nach der Translation der viralen RNA startet die Replikation des viralen Genoms durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase. Das Genom wird zuerst in Minusstrang-RNA umgeschrieben, welche dann als Vorlage für die Synthese von neuer, viraler Plusstrang-RNA dient. Während der Polyproteinsynthese gelangen das E- und das prM-Protein in das Lumen des ERs. Auf der zytoplasmatischen Seite des ERs erfolgt die Verpackung der neu synthetisierten viralen RNAs durch die basischen C-Proteine in Nukleokapside. Gleichzeitig findet durch das Einknospen des Nukleokapsids ins ER die Bildung der Virushülle durch die E- und prM-Proteine statt, welche als Heterodimere vorliegen. Damit kommt es zur Bildung noch nicht infektiöser Viruspartikel. Diese Viruspartikel gelangen über das ER und den Golgi-Apparat in die späten Vesikel des Trans-Golgi Apparates. Dort spaltet die zelleigene Protease Furin das prM-Protein und das fertige M-Protein entsteht. Die Bildung des M-Proteins führt zur Umorganisation der

Oberflächenproteine durch Bildung von E-Protein-Homodimeren. Die nun reifen, infektiösen Viruspartikel werden durch Fusion der Transportvesikel mit der Wirtszellmembran freigesetzt (Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach und Rice, 2001; Modrow *et al.*, 2010).



**Abb. 3: Verlauf einer FSME-Virusinfektion in der Zelle.**

Das Virus adsorbiert an einen unbekanntem Rezeptor der Zytoplasmamembran und wird über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Durch Ansäuern des Endosomeninneren kommt es zur Fusion des Virus mit der Endosomenmembran und das Nukleokapsid wird ins Zytoplasma freigesetzt. Von der viralen RNA erfolgt nun die Translation des Vorläuferproteins an den Ribosomen des endoplasmatischen Reticulums (ER), in welches die Strukturproteine auch direkt eingelagert werden. Nach der proteolytischen Spaltung des Vorläuferproteins liegen nun auch die Nichtstrukturproteine vor. Diese sind teilweise an der autokatalytischen Spaltung wie auch an der Replikation der viralen RNA beteiligt. Die neue virale RNA kann als Matrize für weitere virale RNAs verwendet werden oder lagert sich an die ER-Membran an, in der bereits Virusproteine in großer Zahl eingelagert sind. Danach kommt es zur Bildung von Viruspartikeln durch Knospung. Die Viruspartikel werden dann über ER und Golgi-Vesikel zur Zelloberfläche transportiert. (Quelle: Modrow *et al.* (2010)).

### A.3 Phylogenie, Epidemiologie und Ökologie des FSME-Virus

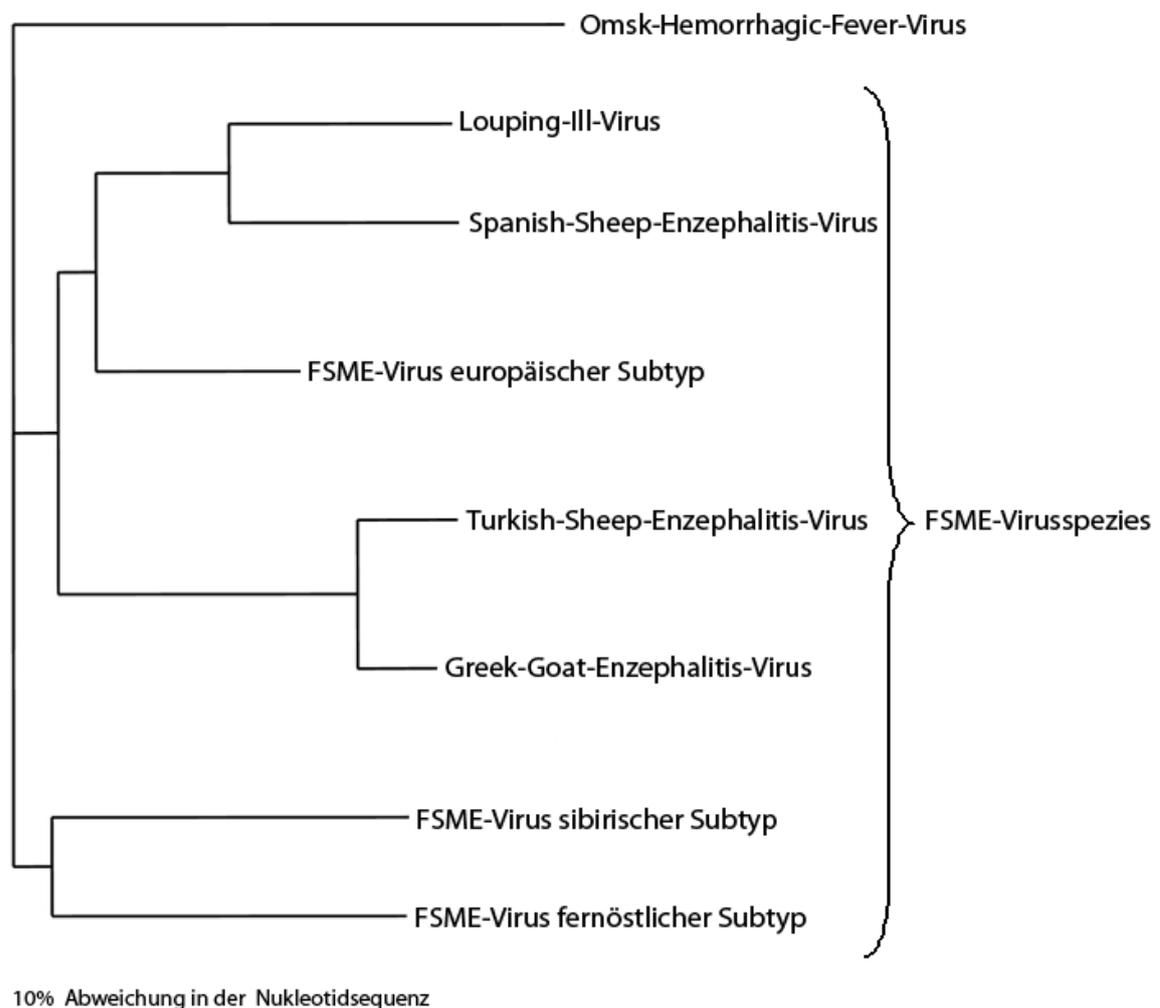
Die Übertragung des FSME-Virus auf den Menschen und andere natürliche Wirtstiere wie Nager und Kleinsäuger erfolgt hauptsächlich durch Zecken. Das Virus gehört daher zur Gruppe der von Zecken übertragenen Flaviviren, einer der drei großen Gruppen der Gattung Flavivirus. Diese umfasst weiterhin die Gruppe der von Mücken übertragenen Viren (z.B. das Gelbfieberevirus, das Dengue-Virus und das Japanische-Enzephalitis-Virus) und die Gruppe der Viren mit unbekanntem Vektor. Die Gruppe der von Zecken übertragenen Viren wird in die Gruppe der Seevogelviren und die der Säugetierviren unterteilt. Zu letzterer gehört auch das FSME-Virus. Weitere humanpathogene Säugetierviren sind das Omsk-Hemorrhagic-Fever-Virus, das Powassan-Virus und das Kyasanur-Forest-Disease-Virus. Diese bilden zusammen mit dem FSME-Virus einen Serokomplex (Gritsun *et al.*, 2003b).

Die Spezies FSME-Virus umfasst drei vorwiegend humanpathogene Subtypen, den europäischen, den sibirischen und den fernöstlichen Subtyp. Diese verursachen ein breites Spektrum von Symptomen, angefangen bei subklinischen Infektionen und biphasischem Fieber bis hin zu Enzephalitiden und Meningoenzephalitiden. Beim sibirischen Subtyp kann es außerdem zu chronischen Verläufen kommen (Grard *et al.*, 2007; Gritsun *et al.*, 2003b; Gritsun *et al.*, 2003c; Lindquist und Vapalahti, 2008; Mansfield *et al.*, 2009).

Neben den drei zuvor beschriebenen, hauptsächlich humanpathogenen FSME-Virussubtypen, gehören das Louping III-Virus (LIV), das Spanish-Sheep-Enzephalitis-Virus (SSEV), das Turkish-Sheep-Enzephalitis-Virus (TSEV) und das Greek-Goat-Enzephalitis-Virus (GGEV) ebenfalls zur Spezies der FSME-Viren. Diese vier Viren kommen überwiegend bei Schafen, Ziegen und anderen Wiederkäuern vor und spielen als Humanpathogene nur eine untergeordnete Rolle (Grard *et al.*, 2007).

Phylogenetische Untersuchungen zeigen, dass der fernöstliche und sibirische Subtyp die engste Verwandtschaft miteinander aufweisen (Abb. 4). Der europäische Subtyp ist dagegen mit dem LIV, dem SSEV, dem TSEV und dem GGEV am nächsten verwandt (Grard *et al.*, 2007; Gritsun *et al.*, 2003b; Gritsun *et al.*, 2003c; Lindquist und Vapalahti, 2008; Mansfield *et al.*, 2009). Dennoch weisen auch die drei humanpathogenen FSME-Virussubtypen eine enge genetische Verwandtschaft auf. Weiterhin zeigten Holzmann *et al.* (1992), dass die verschiedenen FSME-Virusstämme stabil sind und untereinander eine hohe Antigenhomologie aufweisen. Innerhalb eines Subtyps betragen die

Unterschiede in der Aminosäuresequenz bis zu 2,2 % und zwischen den Subtypen bis zu 5,6 % (Ecker *et al.*, 1999).



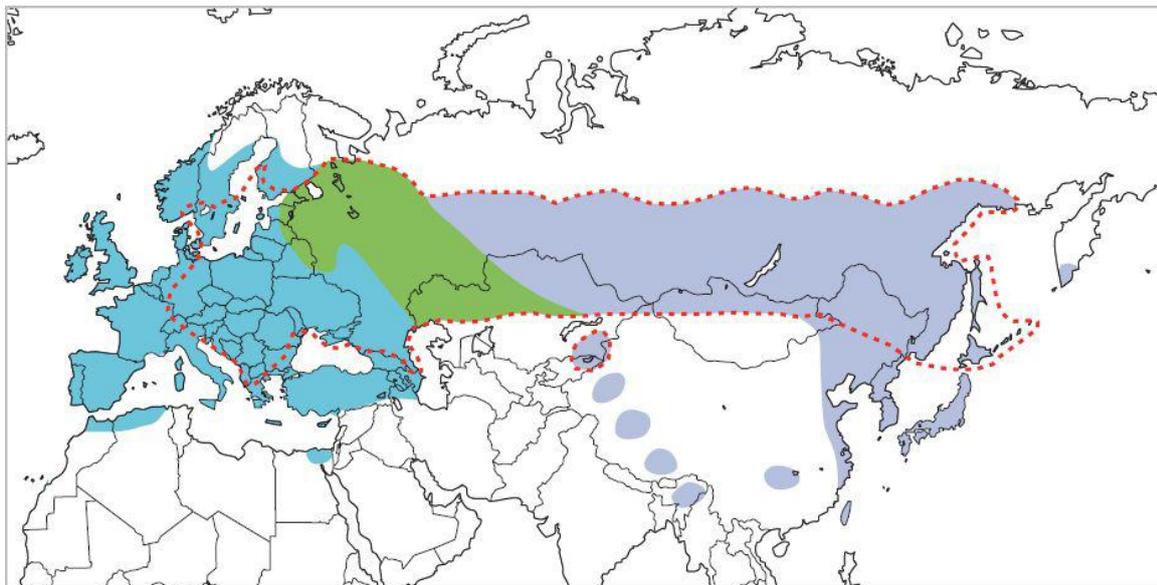
**Abb. 4: Stammbaum der FSME-Viruspezies.**

Zur FSME-Viruspezies gehören die drei hauptsächlich humanpathogenen FSME-Virussubtypen – der europäische Subtyp, der fernöstliche Subtyp und der sibirische Subtyp – sowie das Louping III-Virus, das Spanish-Sheep-Enzephalitis-Virus, das Turkish-Sheep-Enzephalitis-Virus und das Greek-Goat-Enzephalitis-Virus. Das Omsk-Hemorrhagic-Fever-Virus ist das am nächsten mit der FSME-Viruspezies verwandte Virus, gehört aber nicht mehr zur FSME-Viruspezies. (Quelle: Veränderte Grafik nach Papa *et al.* (2008)).

Die Übertragung des europäischen Subtyps findet hauptsächlich durch die Zecke *Ixodes ricinus* statt, während der Hauptvektor für den fernöstlichen und den sibirischen Subtyp die Zecke *Ixodes persulcatus* ist. Die Verbreitungsgebiete der beiden Zecken decken sich weitgehend mit dem Vorkommen der FSME-Virussubtypen (Abb. 5). Für *Ixodes ricinus* reicht das Verbreitungsgebiet von Westeuropa über Mitteleuropa nach Osteuropa bis hin zur Türkei, dem Iran und dem Kaukasus. *Ixodes persulcatus* dagegen kommt vor allem in Russland, China und Japan, jedoch auch in Osteuropa vor (Jaenson *et al.*,

1994). In einigen Gebieten Nordosteuropas überlappen sich die Verbreitungsgebiete beider Arten, so dass im russischen Teil Kareliens, um St-Petersburg, in Estland und in Lettland alle drei Subtypen nachgewiesen werden konnten (Golovljova *et al.*, 2004; Haglund *et al.*, 2003). Zecken der Gattungen *Haemaphysalis spp.* und *Dermacentor spp.* sowie weitere Arten der Gattung *Ixodes ssp.* wurden ebenfalls als Überträger des Virus beschrieben (Gritsun *et al.*, 2003c; Kim *et al.*, 2008).

Eine Ansteckung mit dem Virus kann in seltenen Fällen ebenfalls durch den Verzehr von Rohmilchprodukten infizierter Säugetiere, vor allem Ziegen, aber auch Schafe und Kühe, erfolgen (Dumpis *et al.*, 1999; Holzmann *et al.*, 2009). Das Virus wird während der Blutmahlzeit über den Speichel der Zecke innerhalb von Minuten auf den Wirt übertragen. Eine Zecke bleibt, ist sie einmal infiziert, lebenslanglich Träger des Virus und kann in jedem Stadium - als Larve, Nymphe und adultes Weibchen - neue Wirte infizieren.

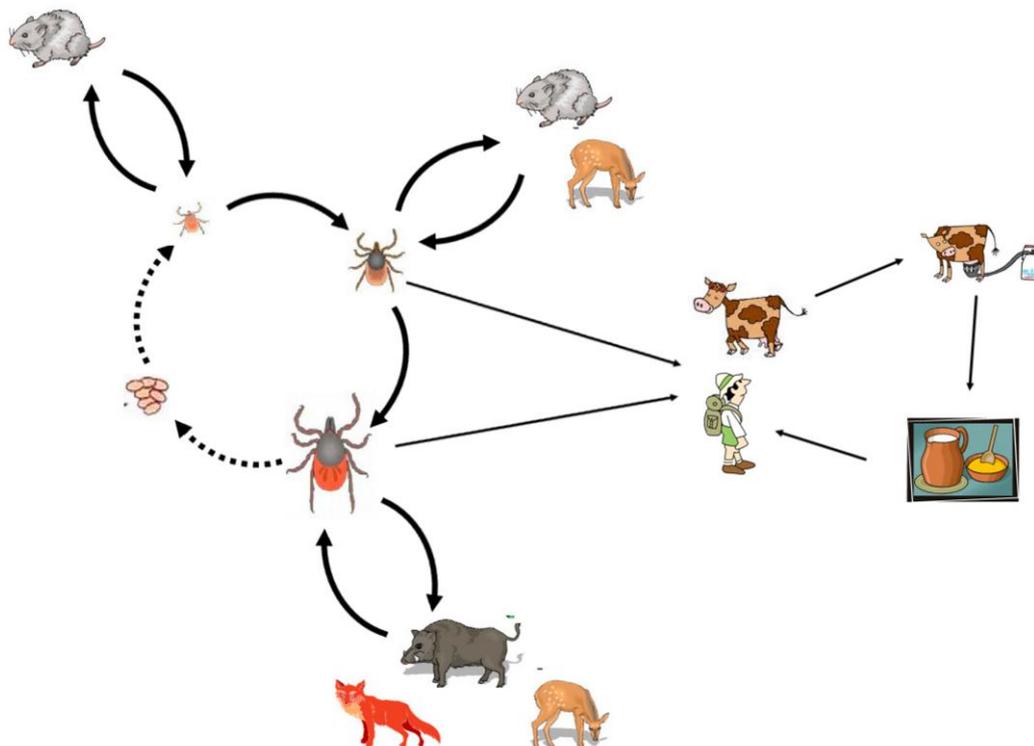


**Abb. 5: Geographische Verbreitung des FSME-Virus und seiner Hauptvektoren.**

Das Verbreitungsgebiet des FSME-Virus (rote Markierung) erstreckt sich von Westeuropa, über Mitteleuropa nach Osteuropa bis hin zur Türkei, dem Iran, dem Kaukasus, Russland, China und Japan und deckt sich mit dem Verbreitungsgebiet der Hauptvektoren *Ixodes ricinus* (blau) und *Ixodes persulcatus* (violett). In Osteuropa überlappen sich die Verbreitungsgebiete der beiden Zeckenarten (grün). (Quelle: Veränderte Grafik nach [http://www.infekt.ch/updown/images/jpg/Map\\_FSME.JPG](http://www.infekt.ch/updown/images/jpg/Map_FSME.JPG), 28.06.2010).

Als Wirtstiere dienen den Zecken während ihres Lebenszyklus neben großen Säugetieren vor allem kleine Nagetiere und Insektivoren, aber auch in seltenen Fällen Vögel (Mansfield *et al.*, 2009; Pfeffer und Dobler, 2010; Waldenstrom *et al.*, 2007). Zecken infizieren sich mit dem Virus, wenn sie an infizierten, virämischen Wirten saugen. Adulte Zecken können das Virus ebenfalls an ihre Geschlechtspartner sowie transovarial

an ihre Nachkommen weitergeben (Abb. 6). Die Transmission des Virus erfolgt jedoch vor allem über das sogenannte *Cofeeding*. Beim *Cofeeding* wird das Virus indirekt über ein Wirtstier (vor allem kleine Nagetiere) von einer Zecke auf eine andere Zecke übertragen, ohne dass der Zwischenwirt virämisch ist. Durch gleichzeitiges Saugen von infizierten und nicht infizierten Zecken in räumlicher Nähe an dem Wirtstier wird das Virus dabei über in die Wunde einwandernde und dann migrierende Hautzellen des Wirtes auf die nicht infizierten Zecken übertragen (Labuda *et al.*, 1996; Labuda *et al.*, 1993; Labuda *et al.*, 1997). Beim *Cofeeding* spielen vor allem kleine Nagetiere eine Rolle, da diese von den in großer Zahl auftretenden Larven und Nymphen als Wirte bevorzugt werden. Kleine Nagetiere entwickeln meist keine ausgeprägte oder überhaupt keine Virämie und erkranken nicht an dem Virus (Bakhvalova *et al.*, 2009; Danielova *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2009; Nuttall *et al.*, 1994).



**Abb. 6: Übertragungszyklus des FSME-Virus.**

Die Übertragung des FSME-Virus auf Säugetiere geschieht hauptsächlich über einen Zeckenbiss, jedoch kann eine Infektion auch über Rohmilchprodukte infizierter Tiere erfolgen. Eine Zecke bleibt ihr gesamtes Leben lang Träger des Virus und kann in jedem Stadium neue Wirte infizieren. Zecken infizieren sich mit dem Virus, wenn sie an infizierten, virämischen Wirten saugen oder über *Cofeeding*, beim gleichzeitigen Saugen von mehreren infizierten und nicht infizierten Zecken an einem Wirt in räumlicher Nähe. Adulte Zecken können das Virus ebenfalls an ihre Geschlechtspartner sowie transovarial an ihre Nachkommen weitergeben. (Quelle: Veränderte Grafik nach Pepper und Dobler (2010)).

Das Persistieren des FSME-Virus wird durch die zyklische Übertragung des Virus von Zecken auf Säugetiere, vor allem auf kleine Nager, gesichert. Zecken dienen dem Virus dabei als Vektor, Nagetiere sowohl als Reservoir als auch als Verstärker, da angenommen wird, dass sie maßgeblich zur Verbreitung des Virus beitragen. Zecken können sich an virämischen Nagetieren infizieren und diese können eine persistierende FSME-Virusinfektion ausbilden (Bakhvalova *et al.*, 2006; Charrel *et al.*, 2004; Süss, 2003).

Die Epidemiologie des FSME-Virus ist maßgeblich mit dem Übertragungszyklus des Virus und damit der Ökologie und Biologie seiner Wirte verbunden. Da die ökologischen Faktoren schon bei geringen Entfernungen sehr verschieden sein können, kommt das Virus nur in geographisch meist eng begrenzten *natural foci* vor. Der Begriff der *natural foci* wurde von Evgeny Pavlovsky (1966) geprägt und besagt, dass jeder biologische Erreger nur in einem Ökosystem mit idealen Bedingungen persistiert. Die *natural foci* des FSME-Virus sind dadurch gekennzeichnet, dass sie dem Virus durch ausreichend Wirtstiere (Zecken, Nager und andere Säugetiere), welche dem Virus ein erfolgreiches Zirkulieren und Replizieren ermöglichen, sowie durch ein passendes Mikroklima ein optimales Umfeld bieten (Gritsun *et al.*, 2003c; Lindquist und Vapalahti, 2008; Süss, 2003; Zeman, 1997).

Zecken benötigen ein relativ feuchtes Klima von mindestens 80 % Luftfeuchtigkeit, damit sie nicht austrocknen. Adulte Zecken sind außerdem erst ab Temperaturen über 10°C aktiv, Nymphen dagegen schon ab 7°C. Für ein effizientes *Cofeeding* und eine daraus resultierende hohe FSME-Virusprävalenz in den Zecken ist daher unter anderem ein warmes, feuchtes Frühjahr von Vorteil (Gray *et al.*, 2009). Weiterhin steigt die Zeckenpopulation, wenn z.B. die Biodiversität sinkt und dadurch geeignete Wirtstiere eine hohe Populationsdichte erreichen (Dobson *et al.*, 2006). Das Infektionsrisiko für ein Gebiet ergibt sich daher aus der Zeckendichte, der Infektionsrate der Zecken und der Virusmenge in den Zecken und kann von Jahr zu Jahr und Gebiet zu Gebiet stark variieren (Alekseev und Chunikhin, 1990; Gritsun *et al.*, 2003b; Korenberg und Kovalevskii, 1999).

Größere Säugetiere, wie Schafe, Rinder oder auch der Mensch spielen bei der Verbreitung und Weitergabe des Virus keine Rolle. Sie sind Fehlwirte, da sie zu niedrige Virustiter entwickeln und sich Zecken daher an ihnen nicht anstecken können (Pfeffer und Dobler, 2010). Für Zugvögel konnten Waldenstrom *et al.* (2007) dagegen zeigen, dass sie zur Ausbreitung des Virus beitragen, wenn sie infizierten Zecken als Transportwirt dienen.

## A.4 Verbreitung des FSME-Virus und Ausweisung von FSME-Risikogebieten

Bisher ist das FSME-Virus in 16 Staaten Europas heimisch. Jedoch wurde in Europa in den letzten Jahren ein Anstieg der FSME-Fälle von über 400 % zwischen 1974 bis 2003 und eine Ausweitung der Verbreitungsgebiete beobachtet. (Charrel *et al.*, 2004; Donoso Mantke *et al.*, 2008; Fomsgaard *et al.*, 2009; Haglund, 2002; Haglund *et al.*, 2003; Süss, 2008). Die Ausbreitung und der Anstieg der Fallzahlen werden auf verschiedene Faktoren zurückgeführt. Diskutiert werden vor allem der Klimawandel, soziale und politische Veränderungen sowie landwirtschaftliche Umstrukturierungen. (Randolph, 2004; Süss, 2008). Jedes Jahr werden ca. 11.000 neue humane FSME-Fälle bekannt. Die meisten davon treten in Russland auf, jedoch kommen auch in der Tschechischen Republik jährlich ca. 400 bis 1.000 humane Fällen vor (Anonymous, 2010; Donoso Mantke *et al.*, 2008; Gritsun *et al.*, 2003c; Růžek *et al.*, 2008; Süss *et al.*, 2008).

In Deutschland treten jedes Jahr zwischen 200 bis 600 humane FSME-Fälle mit steigender Tendenz auf. Von 2008 auf 2009 stiegen die FSME-Fallzahlen um ca. 8 %. Über 95 % der FSME-Fälle in Deutschland treten in den südlichen Bundesländern Baden-Württemberg, Bayern, Thüringen und Hessen auf. Hier sind allein im letzten Jahr über 300 humane Fälle gemeldet worden. Jedoch treten auch immer wieder Fälle in Gebieten auf, die nicht als Endemiegebiete für das FSME-Virus eingestuft sind. So wurden seit 2006 fünf FSME-Erkrankungen in Brandenburg gemeldet (Anonymous, 2009; 2010; Becker *et al.*, 2006; Donoso Mantke *et al.*, 2008; Süss, 2008; Süss *et al.*, 1996).

Bisher werden in Deutschland Gebiete, die ein FSME-Infektionsrisiko für den Menschen bergen, vom Robert Koch-Institut nur auf Grund gemeldeter humaner Fallzahlen ausgewiesen. Jedoch führt eine steigende FSME-Impfrate in Deutschland dazu, dass eine Risikoanalyse über humane Fälle zu verfälschten Ergebnissen führen kann. Da Menschen als Fehlwirte gelten, ist davon auszugehen, dass humane Fälle fast ausschließlich in Gebieten mit hoher FSME-Viruszirkulation auftreten (Pfeffer und Dobler, 2010). Darum werden Gebiete mit einer sehr geringen FSME-Virusdurchseuchung, wie z.B. Brandenburg, möglicherweise von dieser Methode nicht erfasst.

In der Literatur gibt es zahlreiche Studien zur Prävalenz des FSME-Virus in verschiedenen Wirtstieren. Jedoch wird die Untersuchung von Wirtstieren auf das Virus

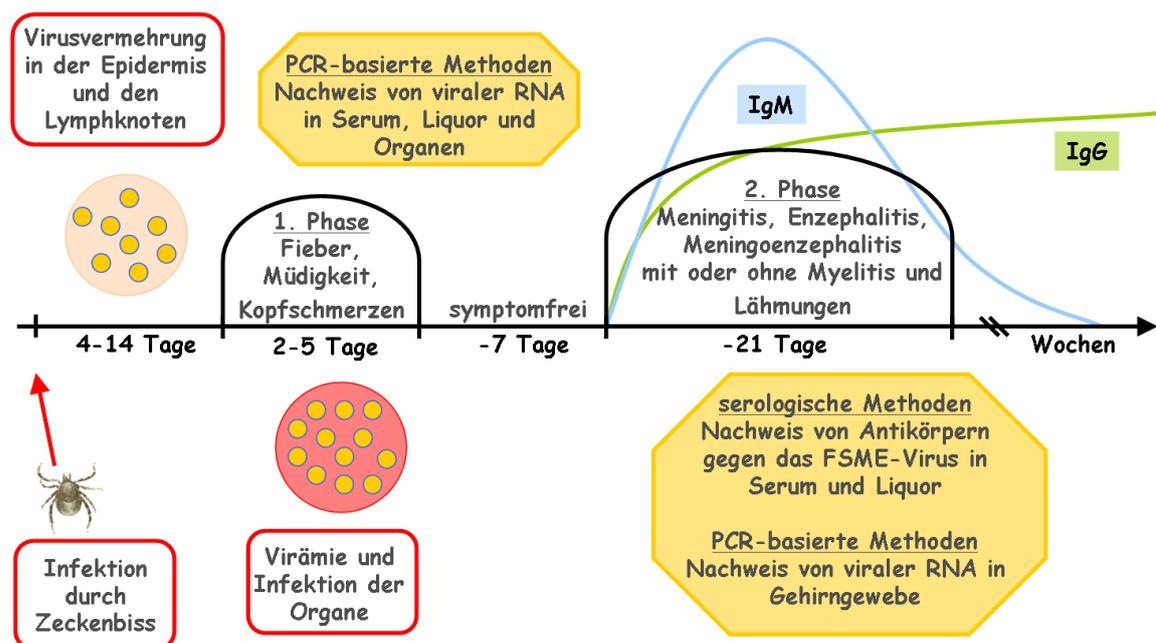
bisher nicht für eine systematische Analyse des FSME-Risikos verwendet, da auch dabei Schwierigkeiten auftreten. Vögel und Säugetiere wie Rotwild oder Füchse besiedeln relativ große Territorien und haben eine Lebenserwartung von einigen Jahren, so dass eine genaue geografische und zeitliche Analyse der FSME-Virusverbreitung an Hand dieser Arten nicht möglich ist. Außerdem gelten große Säugetiere ebenfalls als Fehlwirte für das Virus, da das Virus sich in Ihnen nur kurz nachweisen lässt (Pfeffer und Dobler, 2010). Für diese Tiere kommt daher nur ein serologischer Nachweis der FSME in Frage, der jedoch ebenfalls keine Aussage über den genauen Zeitpunkt einer Infektion zulässt (Han *et al.*, 2001; Holzmann *et al.*, 2009; Pfeffer und Dobler, 2010; Wurm *et al.*, 2000).

Im Gegensatz dazu bietet die Untersuchung von kleinen Nagetieren und Zecken eine Alternative, da diese einen relativ kleinen Aktionsradius besitzen und in der Natur eine kurze Lebenserwartung aufweisen, die meist deutlich unter einem Jahr liegt. Weiterhin kann ein direkter Virusnachweis in Zecken- und Nagerproben erfolgen. (Bakhvalova *et al.*, 2007; Fomsgaard *et al.*, 2009; Jääskeläinen *et al.*, 2006; Klaus *et al.*, 2010; Kozuch *et al.*, 1990; Kozuch *et al.*, 1963; Ramelow *et al.*, 1993; Schrader und Süss, 1999; Süss *et al.*, 1996; Süss *et al.*, 2002; Süss *et al.*, 1992).

In der vorliegenden Arbeit sollten daher Methoden analysiert werden, die sich für die Untersuchung der FSME-Verbreitung eignen, um so einen Indikator zu identifizieren, der sich sowohl zur Abschätzung des FSME-Infektionsrisikos unabhängig von humanen Fällen als auch für Gebiete mit geringer Viruszirkulation eignet. Die Eignung des Indikators sollte durch eine beispielhafte Risikoanalyse für das Land Brandenburg getestet werden. Die Untersuchung von Wirtstieren auf das FSME-Virus könnte dann als neue Methode zur Risikoabschätzung Anwendung finden (Anonymous, 2010; Randolph, 2002).

## A.5 Krankheitsverlauf und Diagnose der FSME

Das FSME-Virus gelangt über einen Zeckenstich in den Körper des Wirtes. Nur in seltenen Fällen wird es z.B. durch den Verzehr roher Milchprodukte aufgenommen (Dumpis *et al.*, 1999; Holzmann *et al.*, 2009). Bei Übertragung durch einen Zeckenstich vermehrt sich das Virus zuerst an der Eintrittsstelle in den Langerhansschen Zellen der Epidermis und in den nahe gelegenen Lymphknoten (Albrecht, 1968; Haglund *et al.*, 2003). Nach der Virusreplikation in den Lymphknoten kommt es zu einer einige Tage dauernden Virämie, während der viele andere Gewebe wie Milz, Leber und Knochenmark infiziert werden (Abb. 7) (Albrecht, 1968; Fields *et al.*, 2007; Haglund und Gunther, 2003). In dieser Phase kann das Virus auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden und infolgedessen eine Entzündung des ZNS und des Gehirns hervorrufen (Dumpis *et al.*, 1999).



**Abb. 7: Verlauf und Diagnostik einer FSME-Virusinfektion.**

Nach einem Zeckenbiss vermehrt sich das FSME-Virus zunächst in der Epidermis und in den nahe der Einstichstelle gelegenen Lymphknoten. Nach einer Inkubationsphase von vier bis 14 Tagen treten im Mittel zwei bis fünf Tage Symptome wie Fieber und Müdigkeit auf. Bei einem biphasischen Verlauf kann es nach einer durchschnittlich sieben Tage langen symptomfreien Phase, zu einer Beteiligung des zentralen Nervensystems kommen. Das Virus kann zu Krankheitsbeginn in Serum, Liquor und Organen nachgewiesen werden, später jedoch nur noch in Gehirngewebe. Antikörper gegen das FSME-Virus bilden sich erst zu Beginn der zweiten Krankheitsphase. IgG: Immunoglobulin G, IgM: Immunoglobulin M.

Der Krankheitsverlauf einer FSME-Virusinfektion ist abhängig vom Subtyp und kann auch symptomfrei sein. Während der fernöstliche Subtyp meist einen einphasigen Krankheitsverlauf zeigt und eine Mortalitätsrate von 20 % bis 40 % aufweist, kommt es bei einer Infektion mit dem europäischen Subtyp normalerweise zu einem biphasischen Verlauf mit einer Mortalitätsrate von 1 % bis 2 %. Dagegen kann der sibirische Subtyp eine chronische Form der FSME hervorrufen mit einer Mortalitätsrate von 2 % bis 3 % (Atrasheuskaya *et al.*, 2003; Dumpis *et al.*, 1999; Gritsun *et al.*, 2003b; Gritsun *et al.*, 2003c; Mandl, 2005). Nach einer Inkubationszeit von im Mittel vier bis 14 Tagen kann es in einer ersten Krankheitsphase zu Unwohlsein, hohem Fieber, Müdigkeit, Kopfschmerzen sowie Nacken- und Rückenschmerzen kommen (Abb. 7). Diese Symptome bleiben in der Regel zwei bis fünf Tage bestehen. Nach einer symptomfreien Phase, die nur bei einem biphasischen Verlauf auftritt und bis zu sieben Tage dauern kann, kommt es bei 20 % bis 30 % der Patienten zu einer zweiten Phase. Diese ist durch eine Beteiligung des ZNS gekennzeichnet und kann bis zu 21 Tage andauern. In dieser Phase kann es zur Entwicklung einer Meningitis, Enzephalitis, Meningoenzephalitis mit oder ohne Myelitis und Lähmungen kommen (Gritsun *et al.*, 2003b; Kaiser, 1999). Die chronische Form der FSME äußert sich durch eine langsame Entwicklung von Parkinson-ähnlichen neurologischen Symptomen oder der sogenannten Kozshevnikovs Epilepsie (Frolova und Pogodina, 1984; Gritsun *et al.*, 2003a; Gritsun *et al.*, 2003b; Pogodina *et al.*, 1985).

In der ersten Phase der Krankheit kann das Virus nur mit PCR-basierten Methoden in Serum, Liquor und Organen nachgewiesen werden, da Antikörper gegen das Virus erst in der zweiten Phase gebildet werden (Abb. 7). Die zur Zeit verwendeten PCR-basierten Methoden können jedoch oft nicht alle Virussubtypen nachweisen und haben ein hohes Kontaminationsrisiko oder eine zu geringe Sensitivität (Donoso Mantke *et al.*, 2007a). Daher wird die Diagnose einer FSME-Virusinfektion meist mit serologischen Methoden gestellt, die FSME-Virus-spezifische Antikörper, Immunglobulin M (IgM) und Immunglobulin G (IgG), detektieren. Jedoch haben auch diese Methoden Nachteile. Kommerziell erhältliche serologische Tests, wie der ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) und der Immunofluoreszenztest (IFT), welche einfach durchzuführen sind und eine standardisierte Auswertung ermöglichen, weisen in der Regel Kreuzreaktionen zu anderen Flaviviren auf. Kreuzreaktionen treten auf, da verschiedene Flaviviren sich die gleichen Antigenepitope teilen (Calisher *et al.*, 1989; Gould *et al.*, 1986; Gould *et al.*, 1985; Heinz, 1986; Niedrig *et al.*, 1994; Schlesinger *et al.*, 1985). Antigenepitope befinden sich vor allem im Envelope-Protein (E-Protein), welches für die Adsorption und Rezeptorbindung des Virus an die Zelle zuständig ist,

sowie in konservierten Bereichen des Nichtstrukturproteins NS1 (Calisher *et al.*, 1989; Gould *et al.*, 1986; Gould *et al.*, 1985; Heinz, 1986; Niedrig *et al.*, 1994; Schlesinger *et al.*, 1985). Daher kann mit diesen Tests bei einem positiven Ergebnis eine Infektion mit einem anderen Flavivirus nicht ausgeschlossen werden. Auch können IgM-Antikörper nach einer Impfung gegen das FSME-Virus noch bis zu zehn Monate im Blut zirkulieren (Hofmann *et al.*, 1983). In der Flavivirusdiagnostik werden daher serologische Nachweismethoden bevorzugt, die keine Kreuzreaktionen zeigen, wie der Neutralisationstest (NT). Dieser weist neutralisierende Antikörper im Serum oder Liquor infizierter Patienten nach, die speziesspezifisch sind. Jedoch können auch mit diesem Verfahren die FSME-Virussubtypen nicht unterschieden werden (Chiles und Reisen, 1998; Donoso Mantke *et al.*, 2007b; Holzmann *et al.*, 1996; Mayr *et al.*, 1977; Niedrig *et al.*, 1994). Auch dauert die Durchführung eines NT sehr lange, so dass ein Ergebnis erst nach einigen Tagen vorliegt und der Test ist, da er auf einem lebenden Zellkultursystem basiert, sehr arbeitsintensiv. Die Standardbedingungen müssen genau eingehalten, die verwendeten Zellen regelmäßig überprüft und passagiert und eine Reihe von Kontrollen mitgeführt werden. Weiterhin muss der NT, da er kein kommerzieller Test ist, in jedem Labor neu etabliert und evaluiert werden, wie generell andere nicht kommerzielle serologische und virologische Methoden auch.

Auf Grund dieser Problematik sollten in der vorliegenden Arbeit die entsprechenden serologischen und virologischen Methoden zum Nachweis des FSME-Virus bzw. einer FSME-Virusinfektion im Labor etabliert werden, so dass sie für eine FSME-Diagnostik im Rahmen des RKI-Konsiliarlabors für FSME angewendet werden können und auch der Forschung zur Verfügung stehen. Weiterhin sollten quantitative *real-time* RT-PCR-basierte Methoden entwickelt werden, welche einen sensitiven, schnellen Nachweis sowie eine Subtypisierung des Virus in Serum und Liquor sowie in Gewebeproben erlauben.

### A.6 Strategien zur Kontrolle einer FSME-Virusinfektion

Eine FSME-Virusinfektion kann durch eine aktive Impfung verhindert werden, die einen Schutz gegen alle Subtypen vermittelt (Demicheli *et al.*, 2000; Hayasaka *et al.*, 2001; Holzmann *et al.*, 1992). Allerdings gibt es bisher keine spezielle Therapie bei einer akuten FSME und die Behandlung kann nur symptomatisch durch intensivmedizinische Maßnahmen erfolgen (Lindquist und Vapalahti, 2008). Die erfolgreiche Behandlung mit Corticosteroiden und Plasmaaustausch ist für einen Fall mit fortschreitender Symptomatik beschrieben, jedoch wird der weitere Einsatz dieser Behandlungsstrategie durch keine kontrollierte Studie belegt (Mickiene *et al.*, 2002). Für andere Flaviviren, die eine Enzephalitis verursachen, wurde beschrieben, dass Virus-spezifische *small interfering RNAs* den Verlauf einer ZNS-Infektion zumindest im Tiermodell positiv beeinflussen können (Kumar *et al.*, 2006). Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit stellte daher die Entwicklung und Testung einer antiviral wirkenden Substanz auf Basis der RNA-Interferenz dar, welche die Replikation des Virus in Zellen hemmen kann.

#### A.6.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine universelle Zellantwort, welche bei allen Eukaryoten, von den Hefen bis zu den Säugetieren, vorkommt. Sie beruht auf einer angeborenen Immunantwort gegen fremde Nukleinsäuren von Transposons, Viren und anderen Krankheitserregern wie Bakterien (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2006). Die RNAi verhindert die Translation von mRNA und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. Ihr Wirkmechanismus wurde von Andrew Z. Fire und Craig C. Mello entdeckt, die dafür 2006 den Nobelpreis erhielten. Sie wiesen nach, dass in *Caenorhabditis elegans* injizierte doppelsträngige RNA spezifisch mit einem endogenen Gen interferiert und dessen Funktion, Proteine zu exprimieren, beeinträchtigt (Fire *et al.*, 1998). Diese Entdeckung revolutionierte die Genomforschung, die nun ein leistungsfähiges Werkzeug besaß, Gene sequenzspezifisch auszuschalten. 2001 konnte gezeigt werden, dass die RNA-Interferenz auch in Säugetierzellen vorkommt und hier von den siRNAs vermittelt wird (Elbashir *et al.*, 2001). Seither wurden eine Reihe natürlich vorkommende kleine RNAs entdeckt, unter anderem die microRNAs (miRNAs), welche vielfältige regulatorische Aufgaben in biologischen Systemen übernehmen.

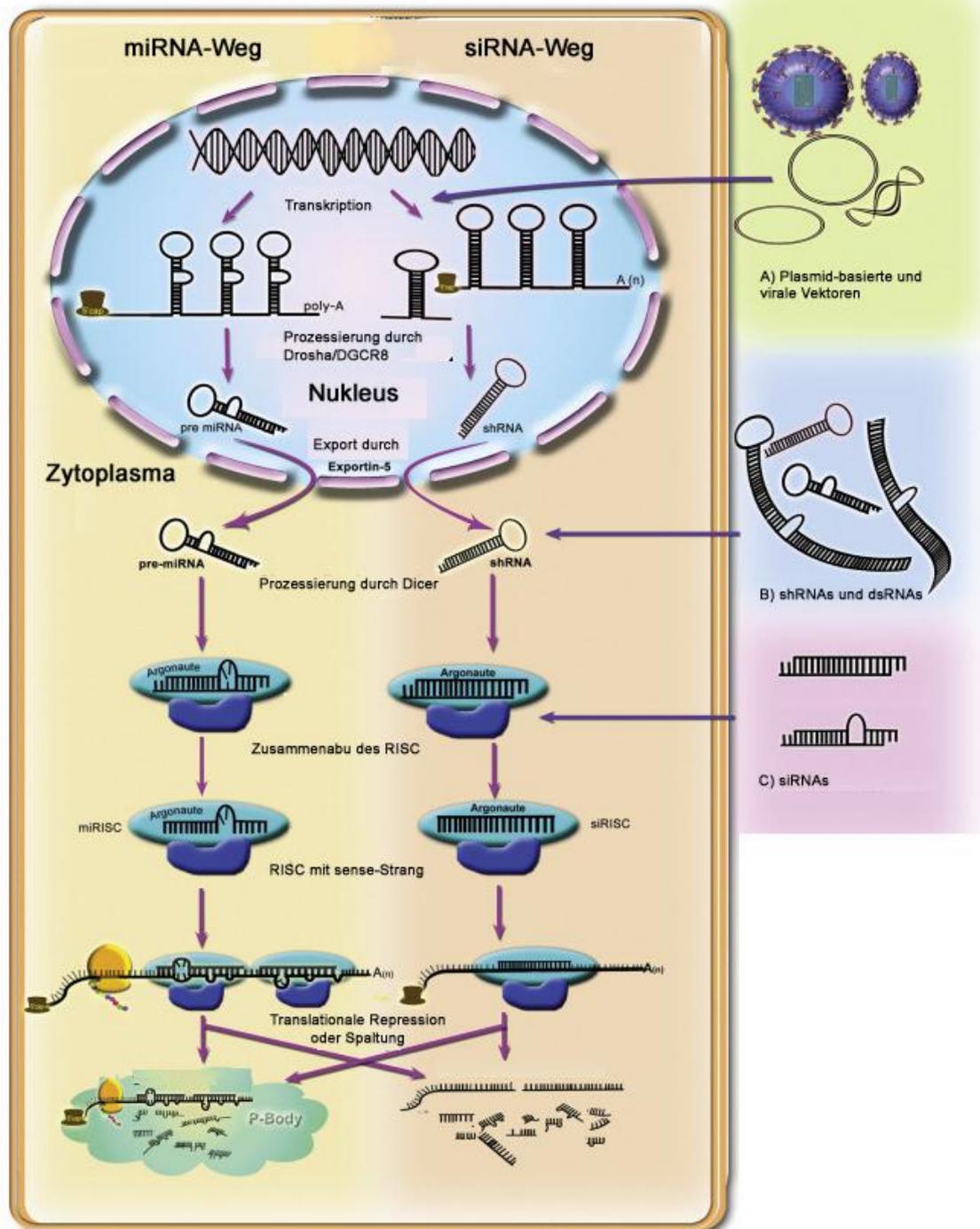
Der Hauptunterschied zwischen der miRNA und der siRNA liegt in ihrer Herkunft. So wird miRNA in der Zelle durch eigene Primär-miRNA- (pri-miRNAs-) Gene codiert, die

siRNA hingegen entsteht aus längeren doppelsträngigen RNAs, die z.B. von Transposons oder von Viren stammen. Der RNAi-Signalweg ist komplex und umfasst neben den kleinen RNAs auch mehrere Protein-Komplexe (Hajeri und Singh, 2009).

In der Zelle natürlicherweise vorkommende miRNAs spielen eine unverzichtbare Rolle bei der Regulierung und Optimierung der Genexpression. Die miRNAs stammen aus endogenen haarnadelförmigen Transkripten (Abb. 8) und sind in intra- und intergenischen Regionen zu finden. Ihre Transkription wird durch eigene Promotoren oder durch Promotoren nahe gelegener Gene reguliert, und erfolgt entweder durch RNA-Polymerase II oder durch RNA-Polymerase III. Die pri-miRNAs werden durch einen Enzymkomplex, den Mikroprozessor-Komplex, prozessiert. Anschließend erfolgt die Reifung der miRNA im Zytosol durch eine spezifische Helikase, den Dicer. Der Mikroprozessor-Komplex besteht aus dem RNA-bindenden Protein Pasha (*Drosophila melanogasta*, *C. elegans*) bzw. DGCR 8 (Vertebraten) und der RNase III Drosha. Pasha bzw. DGCR 8 binden die pri-miRNAs und helfen Drosha (RNase III-Typ-Protein) diese zu spalten. Dabei entstehen Vorläufer-miRNAs (pre-miRNA) mit einem 2 bp langen 3'-Überhang. Die haarnadelförmigen pre-miRNAs werden durch Exportin-5 in Gegenwart von Ran-GTP aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert (Yi *et al.*, 2003).

Im Zytoplasma interagiert Dicer unter anderem mit einem an doppelsträngige RNA-bindenden Protein, um die pre-miRNA-Haarnadelstrukturen in kleine 21 bis 23 Nukleotide (nt) lange RNA-Duplexe mit 2 bp langen 3'-Überhängen zu spalten (Singh *et al.*, 2008). Dicer und R2D2 sowie weitere Proteine binden an die kleinen RNA-Duplexe und bilden den RISC-Lade-Komplex. Dieser trägt dazu bei die Duplex-RNAs in den RISC (*RNA-induced silencing complex*) zu integrieren, dessen Hauptbestandteil das Argonaut-Protein ist. Nur der sogenannte Führungs-Strang (*miRNA*) der miRNA verbleibt im RISC. Der sogenannte Passage-Strang (*miRNA\**) der miRNA wird abgebaut. Es werden zwar sowohl *miRNA*-RISC- als auch *miRNA\**-RISC-Komplexe gebildet, jedoch unterscheiden sich diese in der Häufigkeit ihres Vorkommens. Die Entscheidung, welcher Strang der Führungs-Strang bzw. der Passage-Strang wird, hängt von den thermodynamischen und strukturellen Eigenschaften der *miRNA-miRNA\**-Duplexe ab.

Der reife miRISC-Komplex bindet an seine komplementäre Ziel-RNA und spaltet diese oder unterdrückt deren Expression (Mathonnet *et al.*, 2007; Valencia-Sanchez *et al.*, 2006). Einige miRNAs können auch die DNA-Methylierung und Histon-Modifikation regulieren, ohne dass die Translation der Ziel-RNA-Sequenz inhibiert oder die Ziel-RNA-Sequenz gespalten wird (Guil und Esteller, 2009). Die siRNAs arbeiten nach einem ähnlichen Mechanismus wie die miRNAs und nutzen viele Komponenten des miRNA-Weges (Abb. 8).



**Abb. 8: Mechanismus der RNA-Interferenz sowie verschiedene Methoden zur Induktion von RNA-Interferenz.**

(A) RNAi kann durch die Verwendung von viralen Vektoren oder Plasmid-basierten Vektoren induziert werden. Im Zellkern werden doppelsträngige RNAs (dsRNAs) oder *short hairpin* RNAs (shRNAs), die Vorläufer der *small interfering* RNAs (siRNAs), von den Vektoren transkribiert. (B) dsRNAs und shRNAs können auch direkt in die Zellen transfiziert werden. Sie werden vom Dicer gespalten und anschließend im Zytoplasma in den RISC (*RNA-induced silencing complex*) integriert. (C) siRNAs können ebenfalls direkt in die Zellen transfiziert werden. Sie werden direkt in den RISC integriert, der dann die Ziel-RNA spaltet oder deren Expression unterdrückt. (Quelle: Veränderte Grafik nach Hajeri und Singh (2009)).

### A.6.2 Einsatz der RNAi zur Inhibition von flaviviralen Infektionen

Der Mechanismus der RNAi kann durch verschiedene Methoden gezielt induziert werden und stellt heute eine wichtige Methode in der Forschung zur Beeinflussung der Genexpression und in der Humanmedizin zur Behandlung von z.B. Krebs, viralen und neurodegenerativen Erkrankungen dar (Hajeri und Singh, 2009). Die Ansatzpunkte zur Induktion der RNAi durch künstlich in die Zelle eingeschleuste dsRNAs, siRNAs, Plasmid-basierte Vektoren oder virale Vektoren sind in Abb. 8 dargestellt. Vektoren gelangen durch Transfektion oder auf natürliche Weise in die Zelle und dann in den Zellkern. Im Zellkern exprimieren die Vektoren *short hairpin* RNAs (shRNAs), welche dann über den natürlichen miRNA- bzw. siRNA-Weg weiter prozessiert werden und ihre Wirkung entfalten. Die dsRNAs und siRNAs werden nach der Transfektion im Zytoplasma direkt vom Dicer bzw. RISC gebunden und dann ebenfalls dort über den natürlichen miRNA- bzw. siRNA-Weg weiter prozessiert.

Von zentraler Bedeutung bei der therapeutischen Anwendung von RNAi sind die Fragen nach der Art der Verabreichung, der Zielfindung und der Toxizität der kleinen RNAs. So konnte RNAi lange nur in niederen Modellorganismen wie *C. elegans* angewandt werden, da die verwendeten dsRNAs bei Säugetieren eine unspezifische Interferonantwort des Immunsystems auslösen. Dieses Problem konnte erst in den 1990igern von Fire und Mello gelöst werden. Diese konnten zeigen, dass kleine 21 bis 23 nt lange RNAs, die siRNAs, keine Immunantwort in Säugetierzellen auslösen und somit auch für therapeutische Anwendungen in der Humanmedizin geeignet sind (DeVincenzo, 2008; Fire *et al.*, 1998). Ein weiteres Problem ist die begrenzte Wirkungsdauer der siRNAs in den Zellen. Dieses lässt sich dadurch lösen, dass Vektoren zur Anwendung kommen, von denen shRNAs exprimiert werden. Beispiele dafür sind lentivirale, adenovirale und adeno-assoziierte virale Vektoren, die für Gentherapien eingesetzt werden, da sie stabil und kontinuierlich shRNAs exprimieren sowie *in vivo* gut zu verabreichen sind. Klinische Studien mit RNAi-basierten Therapien werden derzeit schon für altersbedingte Makuladegeneration und Infektionen mit dem Humanen Respiratorischen Synzytial-Virus durchgeführt (Kim und Rossi, 2007).

Bei flaviviralen Erkrankungen werden ebenfalls meist shRNA-exprimierende Vektoren verwendet, jedoch kommen auch synthetisch hergestellte siRNAs zum Einsatz (Stein und Shi, 2008). Die erfolgreiche Inhibition der Flavivirusreplikation *in vitro* und *in vivo* (Mausmodell) konnte von Kumar *et al.* (2006) für das Japanische-Enzephalitis-Virus und das West-Nil-Virus mit shRNA-exprimierenden lentiviralen Vektoren gezeigt werden. Murakami *et al.* (2005) verwendeten für die Inhibition der Replikation des Japanische-

## Einleitung

---

Enzephalitis-Virus sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Mausmodell) shRNA-exprimierende Plasmidvektoren. Die gleiche Methode wendeten auch Pacca *et al.* (2009) an, um die Replikation des Gelbfiebervirus in Mäusen zu unterdrücken. Die Injektion von „nackten“ siRNAs direkt in Mäuse zur erfolgreichen Behandlung von West-Nil-Fieber wurde von Bai *et al.* (2005) beschrieben.

Aus diesen Studien kann geschlossen werden, dass eine Anwendung von siRNAs bei einer Frühsommer-Meningoenzephalitis ebenfalls erfolgversprechend ist. Zur Überprüfung dieser Theorie sollten daher in dieser Arbeit siRNAs gegen das FSME-Virus designet und *in vitro* getestet werden.

## A.7 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten in einem ersten Teil verschiedene Methoden analysiert werden, die zur Untersuchung der Verbreitung des FSME-Virus eingesetzt werden können, um einen geeigneten Indikator für die FSME-Virusverbreitung zu identifizieren.

In einem zweiten Teil sollte getestet werden, ob mit Hilfe einer RNA-Interferenz-Strategie eine antivirale Wirkung gegen das FSME-Virus erzielt werden kann, die Ansätze für eine spätere Therapie bietet.

Als Voraussetzung für die Identifizierung eines Indikators für die FSME-Virusverbreitung und die Entwicklung einer RNA-Interferenzstrategie gegen das Virus mussten zunächst Nachweismethoden etabliert und evaluiert werden, mit deren Hilfe die verschiedenen FSME-Virussubtypen detektiert und ggf. unterschieden werden können. Die Methoden sollten infektiöse Viren, Virusprotein, virale RNA und Antikörper gegen das Virus spezifisch und sensitiv nachweisen und quantifizieren. Etabliert werden sollten daher ein Immunofluoreszenztest, ein Western Blot, ein Plaquetest, ein Neutralisationstest, quantitative *real-time* RT-PCR-Systeme und das *Pyrosequencing*.

Mittels der neu etablierten Methoden sollte durch Untersuchung verschiedener Wirtstiere ein Indikator identifiziert werden, mit dessen Hilfe die Verbreitung des FSME-Virus analysiert und FSME-Risikogebiete ermittelt werden können. Daher sollte zunächst getestet werden, ob sich das FSME-Virus in infizierten Zecken und Nagern, welche als Hauptwirte bzw. -vektoren für das Virus bekannt sind, nachweisen lässt und wie eine FSME-Virusinfektion in Nagern verläuft.

Zur Überprüfung der Eignung des ermittelten Indikators sollte anschließend die FSME-Virusverbreitung für das Land Brandenburg im Vergleich zu anderen Risikogebieten und FSME-freien Gebieten in Deutschland analysiert werden.

Für die Austestung der RNA-Interferenz-Strategie sollten an Hand von Sequenzanalysen siRNA-Sequenzen ausgewählt und dann so modifiziert werden, dass diese spezifisch an die RNA-Sequenzen aller FSME-Virussubtypen binden können.

Die ausgewählten siRNA-Moleküle sollten dann mit verschiedenen molekularbiologischen, proteinbiochemischen und serologischen Methoden in *in vitro*-Studien auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden, die Replikation von FSME-Viren zu hemmen.



## B. Material und Methoden

### B.1 Methoden zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen

#### B.1.1 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung der für die Arbeit verwendeten Zelllinien (Tab. 1) wurde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung in *Dulbecco's Modified Eagles-Medium* (DMEM) mit 5 % bis 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 25 units/ml Penicillin und 25 units/ml Streptomycin durchgeführt. Eine Ausnahme bildeten die PS-Zellen, die in Leibowitz 15- (L-15-) Medium, versetzt mit 5 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 25 units/ml Penicillin und 25 units/ml Streptomycin, ohne CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert wurden. Für die Lagerung wurde das Zellpellet in Einfriermedium (FKS + 10 % DMSO) aufgenommen und zunächst, zum langsamen Abkühlen, bei -80°C eingefroren. Nach einer Woche wurden die Zellen in einen Stickstoffcontainer zur langfristigen Lagerung überführt. Alle Zelllinien wurden vor und nach dem Einfrieren mittels PCR auf Mykoplasmen untersucht (Kapitel B.4.2.3).

**Tab. 1: Für die Experimente verwendete Zelllinien.** <sup>a</sup>

Zelllinie	Zellart (Spezies)	Referenz	Medium	Temperatur/CO <sub>2</sub>
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	ATCC CRL-11268	D-MEM	37°C/5 %
BHK-21	Hamsternierenzelllinie ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	ATCC CCL 10	D-MEM	37°C/5 %
PS	Schweinenierenzelllinie ( <i>Sus scrofa</i> )	RKI-Stammsammlung	L15	37°C/0 %
VeroE6	Affennierenzelllinie ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	ATCC CRL-1586	D-MEM	37°C/5 %

<sup>a</sup> Alle Zelllinien stammen aus der Sammlung des Robert Koch-Instituts. Die Medien enthalten Phenolrot als Säure-Indikator.

#### B.1.2 Zellkultivierung

Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei ca. 50°C aufgetaut, um schädigende Eiskristallbildung zu verhindern, und anschließend in 9 ml frischem Medium aufgenommen. Nach 5 min Zentrifugation bei 800 x g wurde das entstandene Zellpellet in 20 ml frischem Medium resuspendiert und in eine große Zellkulturflasche (175 cm<sup>2</sup>)

## Material und Methoden

---

überführt. Die Zellen wurden anschließend drei bis fünf Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bildeten die Zellen einen geschlossenen Zellrasen, wurde das alte Medium entfernt, die Zellen mit 2 ml bis 5 ml Diluent-Lösung gewaschen, mit 1 ml Trypsin-Lösung versetzt und 5 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen erneut in Zellkulturmedium resuspendiert, danach 5 min bei 800 x g zentrifugiert und in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurde ein Drittel bis ein Zehntel der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit 25 ml frischem Medium überführt und weiter kultiviert.

Erfolgte die Kultivierung in kleineren Zellkulturflaschen, wurde die Menge der eingesetzten Zellen und des Mediums der zur Verfügung stehenden Zellkulturflaschengröße angepasst. Tab. 2 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien und -Lösungen.

**Tab. 2: Zusammensetzung der Medien und Lösungen für die Zellkultur.**

Lösung	Zusammensetzung
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle-Medium</i> )	135,4 g DMEM 37 g NaHCO <sub>3</sub> ad 10 l <i>aqua bidest.</i> pH 7,2 mit HCl
Diluent-Lösung (1 l)	8 g NaCl 0,4 g KCl 0,06 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,06 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g Glucose 0,375 g NaHCO <sub>3</sub> auf pH 7,0 einstellen Zugabe von 0,2 % (v/v) Versen

### B.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Für den Plaquetest, den Neutralisationstest sowie die Transfektionsexperimente erfolgte die genaue Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer. Hierzu wurden die Zellen nach dem Resuspendieren mit Zellkulturmedium eins zu zehn verdünnt. 10 µl der Verdünnung wurden in eine Neubauerzählkammer überführt und 4 x 16 Felder ausgezählt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Gesamtzellzahl} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4.$$

## B.2 Virologische und serologische Methoden

### B.2.1 Virusanzucht

Die Arbeiten zur Virusanzucht erfolgten unter Sicherheitsstufe 2- oder Sicherheitsstufe 3-Bedingungen, je nach Klassifikation des entsprechenden Virus.

**Tab. 3: Für die Experimente verwendete Virusstämme.** <sup>a</sup>

Virusstamm	Herkunft/Beschreibung
FSME-Virus K23 (E)	RKI-Stammsammlung/Niedrig <i>et al.</i> (1994)
FSME-Virus Aina (S)	RKI-Stammsammlung/Niedrig <i>et al.</i> (1994)
FSME-Virus Sofjin (F)	RKI-Stammsammlung/Niedrig <i>et al.</i> (1994)
FSME-Virus Neudörfel (E)	RKI-Stammsammlung/Puchhammer-Stöckl <i>et al.</i> (1995)
FSME-Virus Absettarov (E)	RKI-Stammsammlung/Niedrig <i>et al.</i> (1994)
FSME-Virus Hypr (E)	Parasitologisches Institut Budweis/Ruzek <i>et al.</i> (2007)
FSME-Virus Klodobok (E)	RKI-Stammsammlung/Niedrig <i>et al.</i> (1994)
FSME-Virus Dobrostan (E)	RKI-Stammsammlung/Niedrig <i>et al.</i> (1994)
FSME-Virus Petracova (E)	RKI-Stammsammlung/Niedrig <i>et al.</i> (1994)
FSME-Virus Trypsorski (E)	RKI-Stammsammlung/Niedrig <i>et al.</i> (1994)
FSME-Virus 2741/II (E)	RKI-Stammsammlung/Niedrig <i>et al.</i> (1994)
FSME-Virus Gbelce (E)	RKI-Stammsammlung/Niedrig <i>et al.</i> (1994)
FSME-Virus 79 (S)	RKI-Stammsammlung/Moskau
Gelbfieberevirus 17D	RKI-Stammsammlung/Impfstamm (#142/94/1)
Felines-Calicivirus	RKI-Stammsammlung/Schulze (2010)
Louping III-Virus	RKI-Stammsammlung
Coxsackie-Virus Typ B5	RKI-Stammsammlung
Echo-Virus Typ 2 und 30	RKI-Stammsammlung
Masern-Virus C2, D6 und D7	RKI-Stammsammlung
Herpes-Simplex-Virus 1 und 2	RKI-Stammsammlung
Japanische-Enzephalitis-Virus	RKI-Stammsammlung
West-Nil-Virus New York	RKI-Stammsammlung
West-Nil-Virus Kunjin	RKI-Stammsammlung
Dengue-Virus 1, 2, 3 und 4	RKI-Stammsammlung
Saint-Louis-Enzephalitis-Virus	RKI-Stammsammlung

<sup>a</sup> FSME: Frühsommer-Meningoenzephalitis, E: europäischer Subtyp, S: sibirischer Subtyp, F: fernöstlicher Subtyp.

Für die Virusanzucht wurden VeroE6-Zellen mit einer virushaltigen Lösung inkubiert. Bei einer Viruslösung mit bekannter Virusmenge wurde mit einer multiplicity of infection (MOI, dt.: Vielfachheit der Infektion) von 1 infiziert. War diese nicht bekannt, wurden 50 bis 500 µl der Viruslösung für die Infektion verwendet. Die mit Virus vermengten VeroE6-Zellen wurden in eine mittlere Zellkulturflasche sowie in einer Quadripermschale auf vier Objektträgern ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach drei Tagen wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob die Zellen einen zytopathischen Effekt aufwiesen. Außerdem wurde der Grad der Infektion mittels Immunofluoreszenztest (Kapitel B.2.3) ermittelt. Für den Immunofluoreszenztest wurde jeweils einer der mitgeführten Objektträger verwendet. Waren mehr als 80 % der Zellen infiziert, wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, 5 min bei 4.600 x g zentrifugiert und der zellfreie Überstand bei -80°C eingefroren. Der Virustiter wurde ggf. pro Plaquetest (Kapitel B.2.4) bestimmt. Die für die Arbeit verwendeten Virusstämme sind in Tab. 3 aufgeführt.

### **B.2.2 Virusanzucht aus Organen**

Für die Virusisolation aus Organproben wurden ca. 125 mg Gewebe in 300 µl Zellkulturmedium (DMEM + 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 25 units/ml Penicillin, 25 units/ml Streptomycin und 25 units/ml Nystatin) mit einem Pistill in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 3.000 x g 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand auf 90 % konfluente VeroE6-Zellen in einer 6-Loch-Platte überführt. Nach vier Tagen wurde überprüft, ob die Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten und der Zellkulturüberstand mit einer quantitativen RT-qPCR auf Virus-RNA getestet. Die Virusanzucht wurde über sechs Passagen fortgeführt. Der Zellkulturüberstand wurde regelmäßig mittels RT-qPCR (Kapitel 0) untersucht sowie die Zellen auf einen zytopathischen Effekt hin überprüft.

### **B.2.3 Direkter FSME-Virusnachweis durch Fluoreszenzmikroskopie und Immunofluoreszenztest**

Die Infektion von Zellen wurde mit der Immunofluoreszenzfärbung überprüft. Hierzu wurden auf einem Objektträger gewachsene infizierte Zellen mit Aceton fixiert und mit einem primären Antikörper, der spezifisch das E-Protein des FSME-Virus bindet, eine halbe Stunde inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschriff von 5 min mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung: 140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,2 % Tween 20 und eine 30 min Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten

sekundären Antikörper, der an den primären Antikörper bindet. Anschließend wurde einmal 5 min in PBS + 0,2 % Tween 20 gewaschen. Vor dem Mikroskopieren wurden die Präparate luftgetrocknet und mit DAPI versetztem Eindeckmedium oder Glycerin eingedeckt. Die Analyse erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop oder einem konfokalen Laserscanmikroskop. Die Methode wurde für die verschiedenen in den Versuchen verwendeten Zelllinien durch Anpassung der Antikörperkonzentrationen optimiert. Die verwendeten Antikörper und Antikörperkonzentrationen sind in Tab. 4 und Tab. 5 aufgelistet.

**Tab. 4: Für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendete primäre Antikörper. <sup>a</sup>**

Name	Target (Antigen)	Spezies	Verdünnung	Herkunft (Bestellnummer)
MAB 1367; (0,7 mg/ml)	E-Protein des FSME-Virus	Maus	1:40	RKI, Niedrig <i>et al.</i> (1994)
MAB 1786; (1,2 mg/ml)	E-Protein des FSME-Virus	Maus	1:10	RKI, Niedrig <i>et al.</i> (1994)

<sup>a</sup> MAB: monoklonaler Antikörper.

**Tab. 5: Für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendete sekundäre Antikörper. <sup>a</sup>**

Spezifität	Farbstoff	Spezies	Verdünnung	Herkunft	Bestellnummer
Anti-Maus	FITC	Ziege	1:200	Bethyl, Montgomery, USA	A90-216F
Anti-Maus	Cy5	Ziege	1:100	Dianova, Hamburg	115-175-146
Anti-Maus	Rhodamin	Ziege	1:200	Dianova, Hamburg	115-295-146
Anti-Maus	Alexa594	Ziege	1:500	Invitrogen, Karlsruhe	A11005

<sup>a</sup> FITC: Fluoresceinisothiocyanat, HRP: Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase).

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde ebenfalls die Transfektion der siRNA-Plasmide überprüft und ggf. die Effizienz der Transfektion durch Auszählen der Zellen bestimmt. Dies ist möglich, da die siRNA-Plasmide das modifizierte grün fluoreszierende Protein (MGFP) der Qualle *Aequorea victoria* exprimieren, welches bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert.

Bei der Immunfluoreszenzfärbung von HEK293T-Zellen wurde bei Verwendung von FITC-gekoppeltem, sekundärem Antikörper eine Gegenfärbung mit 0,5 % Evansblue-Lösung durchgeführt, um die Autofluoreszenz der HEK293T-Zellen auszugleichen.

### B.2.4 Bestimmung des FSME-Virustiters mit Hilfe des Plaquetests

Der Plaquetest dient der Bestimmung der Anzahl infektiöser Partikel in einer virushaltigen Lösung. Der Test beruht darauf, dass FSME-Virus-sensitive Zellen nach einer FSME-Virusinfektion absterben und dabei sichtbare Löcher im Zellrasen entstehen.

Der Plaquetest wurde mit PS-Zellen durchgeführt. In 24-Loch-Platten wurden zehnfach-Verdünnungen der Virussuspension (K23) vorbereitet, zu denen die PS-Zellen gegeben wurden ( $2 \times 10^6$  Zellen/l). Nach vier Stunden Inkubation wurde die Suspension mit Carboxymethylzellulose-Überschichtungsmedium (CMC-Überschichtungsmedium: 1,6 g CMC in 100 ml L-15-Medium) überschichtet. Dieses wurde am Tag zuvor angesetzt und Ü/N gerührt. Das viskose CMC-Überschichtungsmedium verhindert, dass das Virus in den Zellkulturüberstand gelangt und sich über die gesamte Zellkultur verbreitet. Somit kann jedes Loch im Zellrasen (Plaque) auf einen einzigen infektiösen Viruspartikel zurückgeführt werden. Nach fünftägiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgenommen und die Infektion mit 37 % Formaldehyd-Lösung inaktiviert. Die Zellen wurden mit 3 M Naphtalinblack-Lösung (1 g Naphtalinblack (Amidoschwarz), 13,6 g Natriumacetat, 60 ml Eisessig, ad 1.000 ml Wasser) gefärbt und die infektiösen Einheiten pro ml Viruslösung (Plaquebildende Einheiten, *plaque forming units*; PFU) mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{PFU/ml} = \text{Plaques} \times \text{reziproke Verdünnung} / \text{reziprokes Volumen der Viruslösung (ml)}.$$

### B.2.5 Nachweis von neutralisierenden Antikörpern gegen das FSME-Virus mittels Neutralisationstest

Zur Bestimmung von FSME-Virus-neutralisierenden Antikörpern im Serum wird der Neutralisationstest (NT) eingesetzt. Dieser basiert, ähnlich wie der Plaquetest, auf der Bildung von Plaques im Zellrasen infizierter Zellen. Die Infektion der Zellen kann durch Zugabe von neutralisierenden Antikörpern, die z.B. im Serum infizierter bzw. geimpfter Personen oder Tiere vorhanden sind, verhindert werden. Die Antikörper lagern sich dabei an die Oberflächenproteine der Viren an. Je höher die Konzentration der neutralisierenden Antikörpertiter im Serum ist, desto weniger Plaques werden gebildet. Für den NT wird eine Viruslösung eingesetzt, deren Konzentration an infektiösen Partikeln zur Bildung von ca. 20 zählbaren Plaques pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte führt. Durch Zugabe von Serum in verschiedenen Konzentrationen wird der Antikörpertiter (d.h. die Menge neutralisierender Antikörper) einer Probe ermittelt.

Zur Durchführung des Neutralisationstests wurde am Vortag das CMC-Überschichtungsmedium (1,6 g CMC in 100 ml L-15-Medium) angesetzt und Ü/N gerührt. Am folgenden Tag wurden je 300 µl PS-Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml je Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät. In der Zwischenzeit wurden je 120 µl zu untersuchendes Serum, Positivserum und Negativserum mit 480 µl L-15-Medium gemischt (1:5 Verdünnung) und 30 min bei 56°C zum Inaktivieren der Komplementfaktoren inkubiert. Das Serum wurde danach immer zu gleichen Teilen mit L-15-Medium verdünnt (je 250 µl Serum + 250 µl Medium), so dass die Verdünnungsstufen 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 erhalten wurden. Mit dem FSME-Virusstamm K23 wurde daraufhin eine Viruslösung mit  $1,67 \times 10^2$  PFU/ml hergestellt. Anschließend wurden je 250 µl des verdünnten Serums mit 250 µl Viruslösung gemischt, dadurch wurden die endgültigen Serumverdünnungen von 1:10 bis 1:360 erhalten. Das Serum-Virus-Gemisch wurde eine halbe Stunde bei 37°C im Brutschrank ohne CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl des Serum-Virus-Gemisches zu den ausgesäten Zellen und eine Inkubation bei 37°C im Brutschrank ohne CO<sub>2</sub>. Nach vier Stunden wurden die Zellen mit 500 µl CMC-Überschichtungsmedium überschichtet und bei 37°C im feuchten Brutschrank ohne CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach vier Tagen wurde der NT durch eine halbstündige Inkubation in 37 %iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Zum Anfärben wurden die Zellen mit 500 µl Naphthalenblack-Lösung (Kapitel B.2.4) für 30 min inkubiert und danach mit Wasser wieder abgespült. Die Berechnung des Antiköpertiters für eine 90 %ige Plaquereduktion erfolgte nach Reed und Münch (1938).

### B.3 Proteinbiochemische Methoden

#### B.3.1 Isolierung von Membranproteinen aus mit FSME-Virus infizierten, eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von Membranproteinen aus eukaryotischen Zellen wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit 200 µl eiskaltem PBS (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen. Durch das eiskalte PBS wird der Zellmetabolismus abgestoppt und so der Abbau der Proteine durch frei werdende Proteasen verhindert. Zum Lysieren wurden je ca. 10<sup>6</sup> Zellen in 100 µl RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1 % Igepal CA-630, 0,5 % Natrium Desoxycholat, 0,1 % SDS, 50 mM Tris; pH 8, 1 mM PMSF, 1 % Protease Inhibitor Cocktail III, 25 units/ml Benzonase®, 1 mM DTT) aufgenommen, um sie dann bei 4°C für 10 min bei 15.000 x g zu zentrifugieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### B.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem *Invitrogen Quant-iT™ Protein Assay Kit* mit dem Qubit Fluorometer von Invitrogen nach Angabe des Herstellers.

#### B.3.3 SDS-PAGE und Western Blot

Ein spezifischer Nachweis für Proteine innerhalb eines Proteingemisches erfolgte mittels eines Western Blots. Die Nachweisreaktion beinhaltet drei Schritte: die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine, den Transfer der Proteine aus dem Trenngel auf eine Trägermembran (Blotten) und die Proteindetektion.

##### B.3.3.1 Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE

In der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch durch eine Polyacrylamidmatrix aufgetrennt. SDS ist ein anionisches Detergenz, das Proteine denaturiert und deren Eigenladung effektiv überdeckt, so dass Proteine mit konstanter negativer Ladung pro Masseinheit entstehen (1,4 g SDS/1 g Protein in 1 %

SDS Lösung). Dieser Effekt wird durch ein Aufkochen der Probe verstärkt. Zusätzlich werden durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken aufgespalten. Mittels SDS-PAGE/Western Blot soll das E-Protein des FSME-Virus detektiert werden. Das E-Protein ist ca. 50 bis 60 kDa groß. Um eine möglichst gute Auftrennung in diesem Bereich zu gewährleisten, wurde ein 12 %iges Acrylamid-Trenngel mit 0,1 % SDS verwendet. Vor dem Trenngel befindet sich ein Sammelgel, so dass sich die Proteine an der Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel zu einer scharfen Bande sammeln, bevor sie in das eigentliche Trenngel einwandern. Dies ermöglicht eine gute Auftrennung und eine hohe Schärfe der Proteinbanden, so dass eine genaue Proteingrößenbestimmung möglich ist.

**Tab. 6: Zusammensetzung der für die Proteinauftrennung verwendeten Lösungen.**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
MEPP (Mercaptoethanol-Probenpuffer) 4 x	50 mM Tris, pH 6,8 40 % Glycerin 8 % $\beta$ -MeETOH (bei Verwendung zugeben) 4 g/l Bromphenol Blau 80 g/l SDS
Sammelgel (für ein 12 % Polyacrylamidgel)	3,5 ml H <sub>2</sub> O bidest 1 ml 0,5 M Tris (pH 6,8) 37,5 $\mu$ l SDS (20 %) 1,25 ml PAA 100 $\mu$ l APS (10 %) 10 $\mu$ l TEMED
Trenngel (für ein 12 % Polyacrylamidgel)	3,76 ml H <sub>2</sub> O bidest 2,10 ml 2 M Tris (pH 8,8) 50 $\mu$ l SDS (20 %) 3,96 ml PAA 1,75 ml Sukrose (60 %) 120 $\mu$ l APS (10 %) 15 $\mu$ l TEMED
Western Blot- (WB-) Laufpuffer (5x)	15 g/l Tris 72 g/l Glycin 5 g/l SDS

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteine zur vollständigen Denaturierung mit vierfachem Mercaptoethanol-Probenpuffer (MEPP) gemischt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Der MEPP wurde frisch mit 8 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Die

## Material und Methoden

---

gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V in Western Blot- (WB-) Laufpuffer bis der im MEPP enthaltene Farbstoff (Bromphenolblau) aus dem Gel ausgelaufen war. Von einem Proteinstandard (*MultiMarkTMMulti-Colored Standard*) wurden 5 µl aufgetragen. Danach wurde das Gel in PBS (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + 0,1 % Tween 20 aufbewahrt. Die verwendeten Lösungen sind in Tab. 6 aufgeführt.

### B.3.3.2 Transfer der Proteine auf eine Membran (Blotten)

Nach der Auftrennung der Proteine im Gel mittels SDS-PAGE wurden die Proteine in einer Semi-Dry-Blottingapparatur auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) übertragen und dort immobilisiert. Dazu wurden zunächst Filterpapier (Whatman-Paper), Membran und Gel für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Es erfolgte nun die Schichtung in folgender Reihenfolge: Kathode, Filterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier und Anode. Nun wurde eine Stromstärke von 200 mA für ca. 2 h angelegt. Auf Grund der negativen Ladung der Proteine durch das SDS erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran. Nach dem Transfer wurde der Blot abgebaut. Zur Absättigung der Bindungsstellen wurde die Membran Ü/N bei 4°C in Blockpuffer inkubiert. Am nächsten Tag konnte die Membran weiterverarbeitet werden. Die verwendeten Lösungen sind in Tab. 7 aufgeführt.

**Tab. 7: Zusammensetzung der für den Proteintransfer verwendeten Lösungen.**

Lösung	Zusammensetzung
Blockpuffer (Western Blot)	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 10 % Milchpulver (w/v)
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % Methanol

### B.3.3.3 Proteindetektion

Die Membran wurde bei 4°C Ü/N mit einem gegen das nachzuweisende Protein gerichteten primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde sie drei Mal für je 5 min in Waschpuffer gewaschen und danach mit einem gegen den primären Antikörper gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten, sekundären Antikörper für 1 h inkubiert. Die Antikörper wurden hierzu in Verdünnungspuffer verdünnt. Schließlich

wurde die Membran dreimal für je 10 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend 5 min mit *SuperSignal® West Femto Chemiluminescent*-Substrat inkubiert. Der Blot wurde anschließend in einer Folie eingeschweißt und in einer Fotokassette fixiert. Unter Rotlicht wurde für 1 min bis 10 min ein Röntgenfilm aufgelegt und danach in einem Entwicklerautomaten entwickelt. Die ideale Verdünnung des primären Antikörpers wurde ausgetestet, indem isoliertes Gesamtprotein in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurde. Die Membran wurde dann in Streifen geschnitten und die Streifen mit unterschiedlichen Verdünnungen des primären Antikörpers, wie beschrieben, inkubiert und weiterverarbeitet. Die verwendeten Antikörper und Antikörperkonzentrationen sind in den Tab. 8 aufgelistet, die verwendeten Lösungen in Tab. 9.

**Tab. 8: Für den Western Blot verwendete primäre und sekundäre Antikörper.** <sup>a</sup>

Spezifität/Name	Target (Antigen)	Spezies	Verdünnung	Herkunft (Bestellnummer)
Anti-β-Actin	N-Terminus des β-Actin	Maus	1:5.000	Sigma-Aldrich, München (A 5316)
MAB 1367; (0,7 mg/ml)	E-Protein des FSME-Virus	Maus	1:1.000	RKI, Niedrig <i>et al.</i> (1994)
MAB 1786; (1,2 mg/ml)	E-Protein des FSME-Virus	Maus	1:500	RKI, Niedrig <i>et al.</i> (1994)
Anti-Maus	HRP	Ziege	1:30.000	Pierce, Rockford, USA (31450)

<sup>a</sup> WB: Western Blot, MAB: monoklonaler Antikörper. FITC: Fluoresceinisothiocyanat, HRP: Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish Peroxidase*).

**Tab. 9: Zusammensetzung der für die Proteindetektion verwendeten Lösungen.**

Lösung	Zusammensetzung
Verdünnungspuffer (Western Blot)	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 1 % Milchpulver (w/v)
Waschpuffer	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )

### B.4 Molekularbiologische Methoden

#### B.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

##### B.4.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

50 mg gefrorenes Gewebe wurden in ein Reaktionsgefäß mit Keramikugeln (1,4 mm) überführt und in 500 µl eiskalter Denaturierungslösung (4 M GTC, 5 mM NaCitrat pH 7,0, 0,5 % Sarcosin) im *Fast Prep* 30 s bei 400 Hz homogenisiert. Darauf wurde die Probe 5 min bei 4°C und 15.000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand (ca. 500 µl) wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zum Entfernen von Proteinen und sonstigen Zellbestandteilen erfolgte die Zugabe von 50 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,0), 500 µl Aqua-Phenol und 100 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1). Die Probe wurde gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 11.600 x *g* zentrifugiert. Der wässrige, RNA enthaltende Überstand (ca. 500 µl) wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit einem gleichen Volumenteil Isopropanol gemischt. Die Lösung wurde gemischt, 30 min bei -20°C inkubiert und dann 20 min bei 4°C und 10.000 x *g* zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 300 µl Denaturierungslösung aufgenommen, 300 µl Isopropanol zugegeben, erneut gemischt, 30 min bei -20°C inkubiert und 20 min bei 4°C und 10.000 x *g* zentrifugiert. Das Pellet wurde zwei Mal mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 4°C, 10.000 x *g*), getrocknet und dann in 100 µl *aqua mol.* gelöst. Die extrahierte RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

##### B.4.1.2 Isolierung von viraler RNA aus zellfreiem Material

Die Isolierung von viraler RNA aus zellfreiem Material, z.B. Zellkulturüberstand oder Serum, erfolgte mit dem *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers. Für die RNA-Extraktion wurde das zellfreie Material in einem Lysepuffer (AVL) aufgenommen, um die Virushülle zu lysieren. Der Lysepuffer wirkt denaturierend, so dass RNasen inaktiviert werden und ist zur Stabilisierung der RNA mit sogenannter *carrier* RNA versetzt. Im nächsten Schritt wurde das Lysat auf eine Säule mit einer Silikagelmembran aufgetragen, welche die RNA bindet. Nach zwei Waschschr

Waschpuffer AW1 und AW2 wurde die RNA in AVE-Puffer eluiert. Die extrahierte RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **B.4.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Vollblut**

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen oder frischem Blut erfolgte mit dem *RNeasy Kit* von Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers.

Vollblut (ca. 5 ml) wurde zunächst bei 1.600 x *g* zentrifugiert. Die zwischen Serum und Erythrozyten entstandene Schicht aus Leukozyten wurde mit einer Pipette abgenommen und zur Lyse der restlichen Erythrozyten mit 10 ml RCL-Puffer (*red cell lysis buffer*, 8,29 g Ammoniumchlorid, 1 g Kaliumhydrogencarbonat, 0,372 g EDTA, add H<sub>2</sub>O 1 l) versetzt, für 5 min bei RT inkubiert und schließlich 5 min bei 4°C und 1.500 x *g* zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis das entstandene Leukozytenpellet frei von Erythrozyten war. Das Leukozytenpellet wurde dann für die weitere RNA-Extraktion verwendet.

Zellen aus Zellkultur wurden vor der RNA-Extraktion einmal mit eiskaltem PBS (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen.

Die Zellen wurden zum Lysieren in RLT-Puffer, versetzt mit β-Mercaptoethanol, aufgenommen und durch Zentrifugation durch eine *QIAshredder* Säule homogenisiert. Der RLT-Puffer enthält Guanidinthiocyanat und wirkt stark denaturierend, so dass RNasen inaktiviert und Zell- wie auch Virusmembranen lysiert werden. Darauf erfolgte die Bindung der RNA an die Silikagelmembran einer Säule. Die RNA wurde dann mit RW1- und RPE-Waschpuffer gewaschen und anschließend in *aqua mol.* eluiert. Die extrahierte RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **B.4.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus gefrorenem Vollblut**

RNA aus gefrorenem Blut wurde mit dem *PeqGOLD Blood RNA Kit* nach dem Herstellerprotokoll für gefrorenes Blut aufgereinigt. Das Einfrieren von Blut bewirkt eine vorzeitige Lyse der Erythrozyten, wodurch Produkte frei werden, die spätere Anwendungen wie eine PCR stören können. Aus diesem Grund kann nur 150 µl gefrorenes Blut pro Extraktion verwendet werden. Die Probe wurde in einem denaturierenden Puffer aufgenommen, der zusätzlich zum β-Mercaptoethanol mit Proteinase K versetzt wurde. Nach 10 min Inkubation bei 70°C und 3 min Zentrifugation bei 10.000 x *g* wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit

Ethanol versetzt. Nun erfolgte eine Bindung der RNA an die Silikagelmembran einer Säule, das Waschen mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 und die Elution in *aqua mol.* Die extrahierte RNA wurde im Eisschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **B.4.1.5 Isolierung von Gesamt-DNA und -RNA aus Zecken**

Zur Isolierung von RNA aus Zecken wurde das *rapidStripe Tick DNA/RNA Extraction Kit* von analytic jena nach Angaben des Herstellers verwendet. Die extrahierte RNA wurde im Eisschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## **B.4.2 Nachweis und Sequenzierung von Nukleinsäuren**

### **B.4.2.1 Spektralphotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Zur Bestimmung der Nukleinsäuremenge wurden die Nukleinsäuren in *aqua mol.* 1:50 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm photometrisch bestimmt. Eine  $\text{OD}_{260}$  von 1 entspricht 50 mg DNA/ml bzw. 40 mg RNA/ml.

### **B.4.2.2 cDNA-Synthese**

Die Umschreibung der extrahierten RNA in cDNA erfolgte durch eine Reverse Transkriptase (RT). Hierzu wurde die RNA separat 10 min auf  $65^{\circ}\text{C}$  erhitzt und danach 5 min auf Eis inkubiert, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu unterbinden. Darauf wurden Reverse Transkriptase (wenn nicht anders beschrieben Superscript II), randomisierte Hexamerprimer, DDT, dNTPs und RNase-Inhibitor zugegeben und alles 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5 min Erhitzen auf  $93^{\circ}\text{C}$  gestoppt.

### **B.4.2.3 Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)**

Definierte DNA-Fragmente wurden mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Hierzu wurde isolierte DNA in einem speziellen PCR-Puffer zusammen mit  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs, sequenzspezifischen *Forward*- und *Reverse*-Primern (Oligonukleotide, die am Anfang und am Ende der zu amplifizierenden Sequenz binden) und Taq-Polymerase inkubiert. Im ersten Schritt wurde die DNA bei  $94^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Im zweiten

Schritt erfolgte die Bindung der Primer (*Annealing*) an die zu amplifizierende DNA-Sequenz, je nach GC-Gehalt bei 50°C bis 68°C. Darauf folgte die DNA-Synthese (*Extension*) durch eine hitzestabile Taq-Polymerase, beginnend an den Primern bei 72°C. Dieser Zyklus wurde 30 Mal wiederholt, wobei die DNA exponentiell amplifiziert wurde. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Gelelektrophorese. Sequenzen verwendeter Primer sowie *Annealing*-Temperaturen und Primerkonzentrationen sind in Tab. 10 dargestellt.

**Tab. 10: Sequenzen der für die PCRs verwendeten Oligonukleotide sowie deren Konzentrationen in der PCR-Reaktion und *Annealing*-Temperaturen. <sup>a</sup>**

PCR-System	Sonde bzw. Orientierung	Sequenz (5'→3'); ggf. Quencher	Farbstoff und gi	Konz. (nm)	AT (°C)
FSMEV NS1 Klon	For	GAGATGGCCATGTGGAGRA	975237	300	60
	Rev	GTACTTCCATGGYCCTTTCA		300	
FSMEV E Klon	For	ACCATYYTgACYATgggWgANTAYggAgA	134802137	300	60
	Rev	TTTTCYAgTCCNACYTCgCAKgTCAC		300	
M13	For	gTAAAACgACggCCAgT	114848842	200	50
	Rev	AACAgCTATgACCATg		200	
SP6	For	ATTTAggTgACACTATAg	114848842	200	60
T7	Rev	TAATACgACTCACTATAggg	114848842	200	60
Myk	For	gggAgCAAACaggAtTagATACCCT	192763644	200	60
	Rev	TgCACCATCTgTCACTCTgTTAACCTC		200	

<sup>a</sup> gi: GenInfo Identifier Number, For: Primer in *sense*-Orientierung (Forward-Primer), Rev: Primer in *antisense*-Orientierung (Reverse-Primer), Konz.: einzusetzende Oligonukleotid-Konzentration, AT: *Annealing*-Temperatur.

Die PCR wurde in einem Biometra *Thermocycler* durchgeführt. Danach wurden die Proben bei 4°C gekühlt. Der Standardansatz und das Standardprogramm für eine PCR sind in Tab. 11 dargestellt.

**Tab. 11: Standardansatz und Standardprogramm für eine PCR.**

Reagenz	µl	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Zyklen
DNA	0,5-2,5	180	94	1
10 x PCR-Puffer	2,5	20	94	
dNTPs (jedes 2,5 mM)	0,5	25	50-60	30
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0	30	72	
<i>Forward</i> -Primer (10 µM)	0,5-1,5	600	72	1
<i>Reverse</i> -Primer (10 µM)	0,5-1,5			
Taq-Polymerase	0,2			
Wasser	add 25			
Gesamtvolumen	25			

### B.4.2.4 Quantitative *real-time* RT-PCR (RT-qPCR)

Zur direkten Quantifizierung der RNA wird nach der cDNA-Synthese eine quantitative *real-time* RT-qPCR durchgeführt. Die Reaktion erfolgt nach dem Prinzip einer herkömmlichen PCR, jedoch gibt es ein weiteres Oligonukleotid (Hydrolysesonde) in der Reaktion, welches in der Sequenz zwischen dem verwendeten Primerpaar bindet. Die Hydrolysesonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert und am 3'-Ende mit einem *Dark Quencher* („Farblöcher“), der die Anregungsenergie des Fluoreszenzfarbstoffs absorbiert und in Wärme umwandelt, so lange sich dieser in räumlicher Nähe befindet. Anstatt eines *Dark Quenchers* kann auch ein weiterer *Quencher*-Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden, der die Energie des Reporter-Farbstoffes ebenfalls absorbiert, aber in Form von Licht mit einer höheren Wellenlänge wieder abgibt. Die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs als *Quencher* kann daher zu einem störenden Hintergrund führen. Ein *Quencher*-Fluoreszenzfarbstoff kann auch innerhalb der Sonde eingebaut werden, so dass ein freies 3'-Ende mit einer Hydroxylgruppe entsteht. Die freie 3' Hydroxylgruppe wird dann durch eine Phosphat-Modifikation gegen eine Verlängerung durch die Polymerase blockiert.

Die Sonde kann zur besseren Bindung an die DNA mit einem Molekül gekoppelt sein, welches in der großen Furche der DNA bindet (*Minor groove binder*-Sonde, MGB-Sonde). Wird nun die DNA amplifiziert, wird die angelagerte Sonde von der Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut und der Farbstoff wird frei. Durch Anregung der Probe mit einem Laser kann die Fluoreszenz des nun freien Farbstoffs in jedem Zyklus der PCR gemessen werden. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert mit der Zunahme des amplifizierten DNA-Fragments, so dass durch die Messung von RNA- oder DNA-Standards mit bekannter Kopienzahl auf die RNA- bzw. DNA-Konzentration einer unbekannt Probe zurückgeschlossen werden kann. Die Reaktion wird mit einem 10 min 95°C-Schritt zur Aktivierung der Taq-Polymerase gestartet. Darauf folgen 45 Zyklen: 15 Sekunden bei 95°C (Denaturierung) und 30 Sekunden bei 60°C bis 68°C (*Annealing* und *Extension*). Standardmäßig wurde die Reaktion in einem Volumen von 25 µl durchgeführt.

Zur Beschleunigung des Nachweises und Verminderung der Kontaminationsgefahr kann die cDNA-Synthese zusammen mit der PCR mit einem entsprechenden quantitativen RT-PCR-*one-step-Kit* in nur einer Reaktion durchgeführt werden, als sogenannte *one-step*-Applikation. Für die cDNA-Synthese muss hierbei den PCR-Zyklen ein 15 min Schritt bei 50°C vorangestellt werden.

Die Konzentrationen der verwendeten Reagenzien, Primer und Sonden von neu etablierten RT-qPCR-Systemen sowie die *Annealing*-Temperatur wurden in Vorversuchen ausgetestet. Ebenfalls wurde die Spezifität der neuen RT-qPCR-Systeme anhand passender Kontrollen, z.B. RNA aus Zellkulturüberstand nah verwandter Virusfamilien, ausgetestet. Die Sensitivität und Effizienz der PCR wurde an Hand von Verdünnungsreihen mit *in vitro*-transkribierter RNA bekannter Konzentration überprüft und ggf. statistisch mit einer Probit-Analyse ausgewertet. Zur Quantifizierung wurden Standardkurven erstellt. Sequenzen verwendeter Primer und Sonden sowie *Annealing*-Temperaturen und Primer-/ Sondenkonzentrationen sind in Tab. 12 dargestellt.

**Tab. 12: Sequenzen der für die qPCRs verwendeten Oligonukleotide sowie deren Konzentrationen in der PCR-Reaktion und *Annealing*-Temperaturen. <sup>a</sup>**

PCR-System	Sonde bzw. Orientierung	Sequenz (5'→3'); ggf. Farbstoff und <i>Quencher</i>	gi	Konz. (nm)	AT (°C)
FSMEV NS1	For	TggAYTTYAgACAggAAYCAACACA		600	
	Rev	TCCAgAgACTYTgRTCDgTgTggA	975237	600	60
	Sonde	FAM-CCCATCACTCCWgTgTCAC-MGB-BBQ		200	
FSMEV E	For	TRTgCAgRGTHgCYAgYggYgTYgA		600	
	Rev	ggYARRgCCARRTCATTgAACCA	134802137	600	60
	Sonde	FAM-ACRgCNTggCAggTNCA-MGB-NFQ		100	
FCV	For	CgTTACCgCCACACCCAT		300	
	Rev	gAgTTCACgAAAgATTTCAgACCAT	49458073	300	60
	Sonde	Cy5-ACCCATCATTCTAACACTCCCgCCAAT-BBQ		100	
PBGD	For	CCCTTgTgATgCTgTTgTCT		300	
	Rev	TgTAGCTgAgCCACTCTCCT	159110430	300	60
	Sonde	FAM-CCTTgCCAgAgAAAATgCCgTgTXT-P		100	
Tub	For	TggAACCCACAgTCATTgATgA		200	
	Rev	TgATCTCCTTgCCAATggTgTA	37491	200	68
	Sonde	FAM-AgATgCTgCCAATAACXTATgCCCgAgg-P		120	
MGFP	For F	gTgTACAAAATCCgCTTCgAC		300	
	Rev R	CTTggCTTTgTAggTggTCTTgA		300	
	For S	gAgCCCAGTACCgAgAAgATgTA	53829088	300	60
	Rev A	gTAgTggCCgCCTCCCTC		300	
	Sonde	FAM-AgCAgTgCCATATTAACATCgCCCTTC-BBQ		100	

<sup>a</sup> gi: *GenInfo Identifier Number*, For: Primer in *sense*-Orientierung (*Forward*-Primer), Rev: Primer in *antisense*-Orientierung (*Reverse*-Primer), Konz.: einzusetzende Oligonukleotid-Konzentration, AT: *Annealing*-Temperatur, P: Phosphat, XT: TAMRA markiertes T, FAM: 6-FAM-Phosphoramidit, Cy5: Cyanin Fluoreszenzfarbstoff, BBQ (*BlackBerry Quencher*): *Dark Quencher*, MGB: *Minor groove binder*.

## Material und Methoden

---

Die PCR wurde in einem Stratagene MX3000P oder MX3005P *real-time*-Gerät durchgeführt. Der Standardansatz und das Standardprogramm für eine quantitative PCR sind in Tab. 13 dargestellt.

**Tab. 13: Standardansatz und Standardprogramm für eine quantitative PCR.**

Reagenz	µl	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Zyklen
DNA	0,5-2,5	600	94	1
10 x PCR-Puffer	2,5	20	94	45
dNTPs (jedes 2,5 mM)	0,5	25	60-68	
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,5			
Forward-Primer (10 µM)	0,5-1,5			
Reverse-Primer (10 µM)	0,5-1,5			
Sonde (10 µM)	0,25-0,5			
10xROX	0-0,25			
Taq-Polymerase	0,1-0,2			
Wasser	add 25			
Gesamtvolumen	25			

Für die *one-step*-RT-qPCR wurde das Invitrogen *Superscript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit* verwendet. Die Primerkonzentration wurde für die *one-step*-RT-qPCR verdoppelt, dem PCR-Programm wurde für die cDNA-Synthese eine 15 min Inkubation bei 50°C vorangestellt und die Reaktion fand in einem ABI7500 *real-time*-Gerät statt.

### B.4.2.5 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA nach der Größe erfolgte mittels Elektrophorese in 1 % bis 2 % Agarosegelen, je nach Größe der aufzutrennenden DNA. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen des Gels auf ca. 60°C wurden 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (100 mg/ml) pro 100 ml zugegeben. Das noch flüssige Gel wurde in die Gelkammer gegossen und ein Kamm für die Ausformung der Taschen hineingesteckt. Als Größenstandards wurden 100 bp und 1 kb-DNA-Leitern verwendet. Die DNA wurde vor der Zugabe mit 6fachem Ladepuffer (40 mg Bromphenolblau, 5 ml Glycin, gelöst in 5 ml TBE-Puffer) versetzt, dann in die Geltaschen gefüllt und mit einer Spannung von 100 V 20 bis 30 min aufgetrennt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einem Geldokumentationsgerät unter UV-Licht.

#### B.4.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die aufzureinigende Bande unter UV-Licht aus dem Gel möglichst sauber ausgeschnitten und gewogen. Danach wurde die DNA mit dem *Qiagen Gel Extraction Kit* nach Angabe des Herstellers aufgereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit *aqua mol.* und die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

#### B.4.2.7 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem *ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*. Die Sequenzierung erfolgt hierbei nach dem Kettenabbruchsystem nach der Sanger-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977). Die daraus resultierenden unterschiedlich langen Fragmente wurden in einer hoch auflösenden Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 10 bis 20 ng DNA pro Ansatz verwendet, für DNA aus PCR und RT-qPCR-Ansätzen 4 µl. Der Standardansatz und das Standardprogramm für die Sequenzierungs-PCR sind in Tab. 14 dargestellt.

**Tab. 14: Standardansatz und Standardprogramm für die Sequenzierungs-PCR.**

Reagenz	µl	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Zyklen
DNA	1,0-4,0	120	96	1
5 x BigDye-Puffer	1,5	10	96	
Sequenzierungsprimer (10 µM)	0,5	5	50-60	25
BigDye	1,0	240	60	
Wasser	add 10			
Gesamtvolumen	10			

Die Sequenzreaktionen wurden im Biometra T Gradientencycler durchgeführt. Nach der Reaktion wurden die Ansätze durch Gelfiltration aufgereinigt und anschließend in einem Kapillarelektrophorese-Sequenzierautomaten aufgetrennt.

#### B.4.2.8 Pyrosequencing zur Differenzierung der FSME-Virusstypen

Zur Differenzierung zwischen den verschiedenen FSME-Virusstypen wurde die *Pyrosequencing*-Methode verwendet. Das *Pyrosequencing* erlaubt es, direkt nach der RT-qPCR eine Sequenzierung, basierend auf dem Prinzip der Strangverlängerung,

## Material und Methoden

---

durchzuführen. Die PCR findet dabei mit einem biotinylierten FSMEV Rev-Primer (Tab. 12) statt, der dazu dient das entstandene PCR-Produkt mit Hilfe von Sepharose-Beads aufzureinigen. Das aufgereinigte, einzelsträngige PCR-Produkt wird mit einem *Pyrosequencing*-Primer (PS4, Tab. 15) hybridisiert und zusammen mit den Enzymen DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase sowie Apyrase und den Substraten Adenosin-5'-Phosphosulfat und Luciferin inkubiert.

**Tab. 15: Sequenz des *Pyrosequencing*-Primers sowie sein Konzentration und *Annealing*-Temperatur.**<sup>a</sup>

PCR-System	Sonde bzw. Orientierung	Sequenz (5'→3'); ggf. Farbstoff und Quencher	gi	Konz. (nm)	AT (°C)
PS4	For	gTgACACWggAgTgATggg	975237	250	60

<sup>a</sup> gi: *GenInfo Identifier Number*, For: Primer in *sense*-Orientierung (*Forward*-Primer), Konz.: einzusetzende Oligonukleotid-Konzentration, AT: *Annealing*-Temperatur.

Zu diesem Gemisch werden nacheinander die vier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) dATP, dGTP, dTTP und dCTP gegeben, in immer der gleichen Reihenfolge. Ein zur Sequenz komplementäres Nukleotid wird eingebaut und darauf Pyrophosphat (PPi) stöchiometrisch freigesetzt. Die ATP-Sulfurylase wandelt das PPi mit Hilfe des Adenosin-5'-Phosphosulfat in ATP um. Unter Verbrauch des ATP wandelt nun die Luciferase das Luciferin zu Oxyluciferin um, welches sichtbares Licht emittiert. Dieses Licht ist proportional zur ATP-Menge und somit auch zur PPi-Menge. Der Lichtimpuls wird aufgenommen und die Lichtintensität analysiert. Anhand der Lichtintensität kann darauf geschlossen werden, wie viel des jeweiligen Nukleotids in einem Schritt eingebaut wurde. Nichteingebaute Nukleotide werden von der Apyrase vor Zugabe des nächsten Nukleotids abgebaut, so dass die Reaktion darauf mit Zugabe des nächsten Nukleotids von neuem starten kann. Hierbei wird ein DNA-Abschnitt von ca. 30 bis 50 Basenpaaren sequenziert. Diese kurze Sequenz lässt es zu, die Subtypen zu unterscheiden. Die Methode wurde mit verschiedenen FSME-Virusstämmen evaluiert. Das *Pyrosequencing* erfolgte mit dem *Pyromark Kit* von Biotage nach den Angaben des Herstellers.

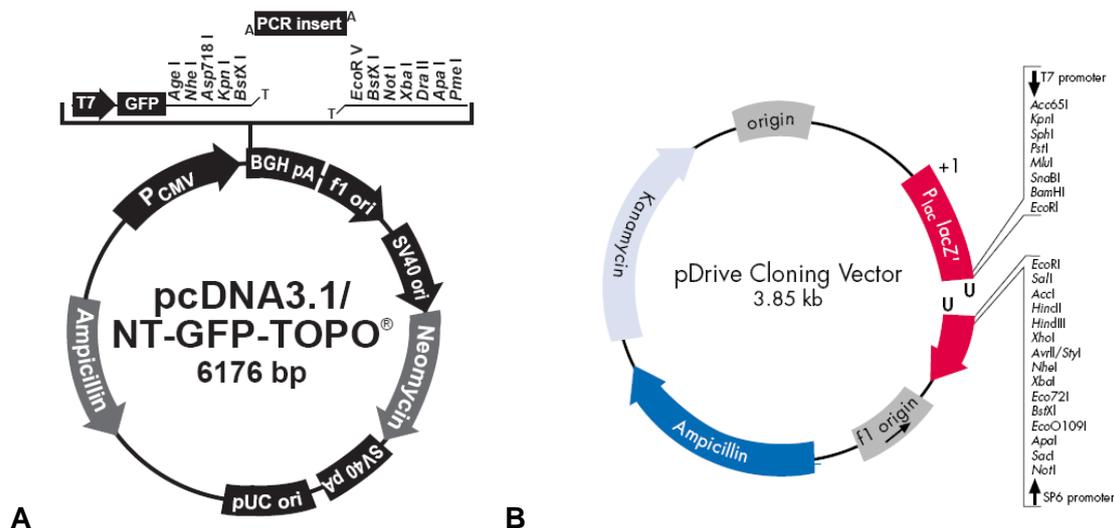
### B.4.3 Klonierung von PCR-Fragmenten und Herstellung von PCR RNA- und DNA-Standards

#### B.4.3.1 Klonierung eines PCR-Fragments

Zur Sequenzierung eines PCR-Produkts oder zur Herstellung von DNA- und RNA-PCR-Standards wird ein PCR-Fragment in einen Vektor (Tab. 16 und Abb. 9) kloniert.

**Tab. 16: Für die Klonierung verwendete Plasmide und ihre Herkunft.**

Name	Typ	Herkunft
pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO-Vektor	eukaryotischer Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
pDrive Cloning-Vektor	eukaryotischer Vektor	Qiagen, Hilden



**Abb. 9: Vektorkarte des pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO-Vektors (A) und des pDrive Cloning-Vektors (B).**

Zur Kontrolle der Spezifität der PCR wird das PCR-Produkt auf ein Gel aufgetragen. Ist mehr als ein PCR-Produkt entstanden, muss die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA aufgereinigt werden. Die Ligation des so erhaltenen PCR-Fragments erfolgt mit dem *Qiagen PCR Cloning Kit* oder dem *Invitrogen TOPO Cloning Kit* nach dem Protokoll des Herstellers mit einem halben Ansatz (Tab. 17).

Nach der Ligation erfolgt die Transformation des Plasmids in *E. coli* Bakterien zur Amplifikation des Plasmids. 50 µl chemisch kompetente *One Shot Top10 E. colis* wurden auf Eis aufgetaut und mit 450 µl kaltem CaCl<sub>2</sub> versetzt. 100 µl des Bakteriengemisches wurden zum Ligationsansatz gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine

## Material und Methoden

---

Hitzeschockbehandlung für 45 s bei 44°C. Durch den Hitzeschock wird die Zellmembran der Bakterien durchlässig, so dass die Plasmide von den Bakterien aufgenommen werden können. Anschließend wurden die Bakterien 5 min auf Eis inkubiert, mit 200 µl SOC-Medium versetzt und eine halbe Stunde bei 37°C geschüttelt. Je 50 µl und 200 µl der Bakteriensuspension wurden auf LB-Agar-Platten (10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Bactohefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 1,5 % (w/v) Agar, pH 7,5), versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, ausplattiert. Die LB-Agar-Platten wurden für ein Blau-Weiß-Screening vorher mit 10 µl 0,1 M IPTG und 40 µl X-Gal in einer Konzentration von 20mg/ml bestrichen. Über Nacht wurden die Platten bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag die gewachsenen Kolonien mittels Kolonie-PCR analysiert.

**Tab. 17: Standardansätze für eine Ligation.**

<i>Qiagen Cloning Kit</i>		<i>Invitrogen Cloning Kit</i>	
Reagenz	µl	Reagenz	µl
PCR-Produkt	2,0	PCR-Produkt	2,0
pDrive Cloning Vektor (50 ng/µl)	0,5	TOPO Vektor (50 ng/µl)	0,5
2 x Ligation Master Mix	2,5	Salt Solution	0,5
Gesamtvolumen	5	Gesamtvolumen	3

Für die Kolonie-PCR wurden ca. 10 (weiße) Kolonien ausgewählt. Mit einer Pipettenspitze wurde die Kolonie auf eine neue Agar-Platte und in den PCR-Mix überführt. Die PCR erfolgte mit Primern, die im Vektor bzw. im Insert binden. Mit positiven Klonen wurde eine Übernachtskultur in LB-Flüssigmedium (10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Bactohefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, pH 7,5), versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin, angesetzt. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem Invisorb *Spin Plasmid Mini Kit* und danach wurde die Plasmidkonzentration mittels Photometer bestimmt. Zur Überprüfung der Sequenz wurde eine Sequenzierungsreaktion (Kapitel B.4.2.7) mit dem *BigDye Kit* von Applied Biosystems angesetzt. Die Sequenzierung erfolgte einmal vom 5'-Ende und einmal vom 3'-Ende her. Als Sequenzierungsprimer dienten ebenfalls Primer, die in der Sequenz des Plasmids binden (M13-, SP6- oder T7-Primer, Tab. 10).

Die Plasmidkonzentration wurde bei 260 nM mit dem Photometer bestimmt. Zur Herstellung von Plasmidstandards wurde die Anzahl der Kopien pro µl anhand der gemessenen DNA-Konzentration und der bekannten Größe des Plasmids berechnet. Das Plasmid wurde auf eine Konzentration von  $10^{10}$  Kopien pro µl mit molekularem Wasser verdünnt. Anschließend erfolgte die Herstellung einer Plasmidstandardreihe mit den Konzentrationen  $10^0$  bis  $10^6$  Kopien pro µl. Diese konnten für die Evaluation und Erstellung von Standardkurven der RT-qPCR verwendet werden.

#### **B.4.3.2 Restriktionsverdau zur Linearisierung eines Plasmids**

Für die Herstellung von *in vitro*-transkribierter RNA wird das als Vorlage dienende Plasmid linearisiert, so dass später Transkripte mit bekannter Länge vorliegen. Zur Linearisierung wurde jeweils ein Restriktionsenzym gewählt, welches in der Sequenz hinter dem Insert bindet und keine 3'-Überhänge hinterlässt. Verwendete Restriktionsenzyme sind in Tab. 20 aufgelistet. Der Restriktionsverdau wurde bei 37°C für eine Stunde durchgeführt.

Der einzusetzende 10xPuffer ist nach dem verwendeten Restriktionsenzym zu wählen (Datenblatt des Herstellers). Bei einigen Restriktionsenzymen müssen 0,3 µl 100x BSA zugesetzt werden (nach Angaben des Herstellers). Für einen Restriktionsverdau wurden 2 ng bis 3 ng Plasmid mit 1 µl Restriktionsenzym 1 h verdaut. Zur Inaktivierung des Restriktionsenzym und zur Aufreinigung des Plasmids wurde das Invitex *DNA Repace Kit* verwendet. Zur Kontrolle der Linearisierung wurden jeweils 2 µl des Plasmids auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Im Vergleich mit dem ungeschnittenen Plasmid durfte nur eine distinkte Bande zu erkennen sein, die etwas höher als die Bande des ungeschnittenen Plasmids liegt. Mehrere Banden deuten auf einen unvollständigen Restriktionsverdau hin. Die Plasmidkonzentration wurde bei 260 nm mit dem Photometer bestimmt.

#### **B.4.3.3 *In vitro*-Transkription**

Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit dem Promega *Riboprobe in vitro Transcription Systems* nach Angaben des Herstellers bei 37°C. Es wurden jeweils ca. 200ng linearisiertes Plasmid eingesetzt. Nach der *in vitro*-Transkription folgte ein DNase-Verdau mit dem *Turbo DNase Kit* von Ambion, um das Plasmid-Template abzubauen. Für den DNase-Verdau wurde die Probe auf 25 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, 3 µl 10xPuffer sowie 1,5 µl Turbo-DNase zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine weitere Zugabe von 1,5 µl DNase und 30 min Inkubation bei 37°C. Zur Inaktivierung der DNase wurden 6 µl Inaktivierungsreagenz zugegeben, unter gelegentlichem Mischen 2 min bei RT inkubiert und 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand, welcher die *in vitro*-transkribierte RNA (ivRNA) enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA-Konzentration bei 260 nm bestimmt. Darauf wurde eine ca. 10<sup>6</sup> RNA-Kopien enthaltende Verdünnung pro PCR, ohne vorangegangene cDNA-Synthese, auf evtl. verbliebene DNA-Rückstände getestet. Bei noch vorhandener *Template*-DNA wurde der DNase-Verdau wiederholt. War die ivRNA DNA-frei, wurde die RNA-Konzentration

## Material und Methoden

---

erneut mit dem *Quant-it Kit* von Invitrogen bestimmt und eine Verdünnungsreihe in Wasser von  $10^0$  bis  $10^6$  RNA-Kopien pro  $\mu\text{l}$  hergestellt. Die ivRNAs wurden zur Evaluation und Erstellung von Standardkurven der RT-qPCRs verwendet.

## **B.5 Methoden zur Identifizierung eines Indikators für die Verbreitung des FSME-Virus**

### **B.5.1 Untersuchung über Organotropismus und Persistenz des FSME-Virus in Feldmäusen (*Microtus arvalis*)**

Zur Identifizierung eines Indikators für die Verbreitung des FSME-Virus wurde untersucht, wie eine FSME-Virusinfektion in Nagern verläuft. Hierzu wurden jeweils zwei bis drei weibliche Feldmäuse (*Microtus arvalis*) im Parasitologischen Institut Budweis (Tschechische Republik) 0, 5, 20, 30, 50 und 100 Tage nach einer Infektion mit dem FSME-Virusstamm Hypr seziiert und Milz, Leber, Herz, Niere, Gehirn sowie Blut entnommen. Die Organ- und Blutproben wurden auf Trockeneis zum RKI transportiert, bei -80°C gelagert und mittels RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA-Kopien getestet.

### **B.5.2 Fangen und Sezieren von Nagern**

Zur Untersuchung der FSME-Virusverbreitung in Brandenburg wurden Gehirn- und Milzproben von Nagern aus Deutschland auf FSME-Virus-RNA untersucht. Die Proben wurden vom Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“ bereitgestellt, welches das Fangen von Nagern im Freiland und die Analyse der Nager auf Pathogene für ganz Deutschland organisiert. Die Nager wurden in den Jahren 2004, 2005, 2006, 2007 und 2009 gefangen. Nach der Bestimmung der Spezies, des Alters und des Geschlechts wurden die Nager direkt bei 4°C gekühlt und seziiert. Die Proben wurden bei -80°C gelagert. Der Transport der Organe erfolgte auf Trockeneis. Die Nagerspezies von FSME-Virus-positiven Nagern wurde mit Hilfe einer PCR-basierten Cytochrom B-Analyse, die vom Netzwerk „Nagetier-übertragene Pathogene“ durchgeführt wurde, bestätigt (Essbauer *et al.*, 2006).

### **B.5.3 Sammeln von Zecken**

FSME-Virus-RNA lässt sich mittels RT-qPCR direkt in infizierten Zecken nachweisen. Jedoch ist die Inzidenz von FSME-Viren in Zecken, selbst in Hochrisikogebieten, sehr gering (ca. 1 %), so dass für eine statistische Auswertung mindestens 1.000 Zecken

## Material und Methoden

---

getestet werden müssen. Um einen Überblick über den Aufwand des Zeckensammelns zu bekommen und um abschätzen zu können, ob sich diese Methode für die Region Berlin-Brandenburg eignet, wurden *Ixodes ricinus* Zecken in Lettland vom Kooperationspartner Dr. Jelena Storozenko vom *Infectology Center of Latvia* gesammelt. Hierzu wurde ein ca. 1 x 2 m großes weißes Baumwolltuch über den Waldboden gezogen und auf eventuell darin verfangene Zecken untersucht. Die *Ixodes ricinus* Zecken wurden nach Entwicklungsstadien (Adulte, Nymphe, Larve) und Geschlecht getrennt in Reaktionsgefäßen gesammelt und anschließend bei -80°C für weitere Untersuchungen gelagert.

## B.6 Methoden zur Entwicklung einer RNA-Interferenz-Strategie gegen FSME

### B.6.1 Design und Herstellung von siRNA-Plasmiden

Die Sequenzen der siRNAs wurden mit Hilfe des *siRNA Target Designers 1.6* von Promega (<http://www.promega.com/siRNADesigner/program>) passend für den FSME-Virusstamm K23 entworfen. Die Auswahl der siRNAs erfolgte nach den Kriterien, dass

1. am 5'-Ende des *sense*-Stranges ein G oder C vorkommt,
2. am 5'-Ende des *antisense*-Stranges ein A bzw. U vorkommt,
3. fünf der sieben Basen am 5'-Ende des *antisense*-Stranges ein A bzw. U sind und
4. nicht mehr als neun Gs und Us hintereinander in der Sequenz vorkommen dürfen.

Die erhaltenen siRNA-Sequenzen wurden darauf einem BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) gegen das humane und das murine Genom unterzogen, um auszuschließen, dass die siRNAs bei ggf. weiterführenden Tier- oder Humanversuchen unspezifisch andere RNAs binden. Es wurden nur solche siRNA-Sequenzen weiter verwendet, die mehr als drei Basenpaare Unterschied zum humanen und murinen Genom zeigten. Im nächsten Schritt wurden die verbliebenen siRNA-Sequenzen mit den Sequenzen anderer FSME-Virusstämme verglichen. Die siRNA-Sequenzen, die möglichst große Übereinstimmungen zu Sequenzen anderer FSME-Virusstämme bzw. -Virussubtypen aufwiesen, wurden für die weiteren Versuche ausgewählt (Tab. 18). Synthetisch hergestellte siRNA-Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Promegakits *siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System-hMGFP* in den eukaryotischen psiStrike™ hMGFP-Vektor (Promega, Madison, USA, Abb. 10) nach dem Protokoll des Herstellers kloniert, um sie in eukaryotischen Zellen als shRNAs exprimieren zu können.

**Tab. 18: Komplementäre Sequenzen der verwendeten siRNAs.** <sup>a</sup>

Name	siRNA-Sequenz (5'→3')	nt (gi:9628431)
siRNA SC1	gCggTAgCgCCCATATTAT	
siRNA 1	gggACTggTTCAATgATCT	1623-1640
siRNA 2	ggTCTTACgTACACAATgT	1874-1891
siRNA 3	gAggTggCTTCATAgAgAT	2076-2093

<sup>a</sup> nt: Nukleotide, gi: *GenInfo Identifier Number*.

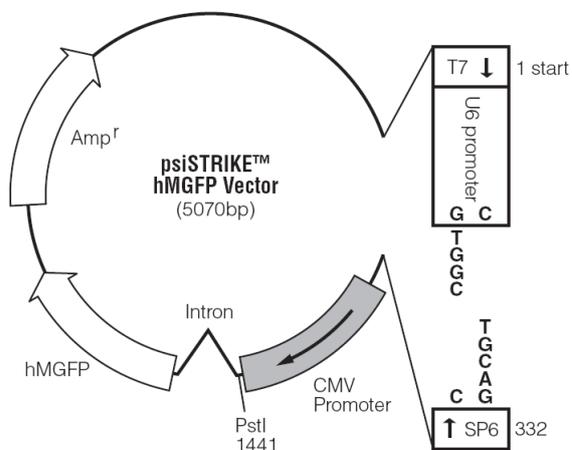
## Material und Methoden

Die siRNA-Plasmide wurden in *E. coli* Top10 Bakterien vermehrt und mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

Zur Ligation in den Vektor psiStrike des *siStrike U6 Hairpin Cloning System (Human) hMGFP Kits* müssen der ausgewählten siRNA-Sequenz Anker- und *Loop*-Sequenzen sowie die komplementäre siRNA-Sequenz hinzugefügt werden:

**5'-ACCG-siRNA-TTCAAGAGA-komplementäre siRNA-TTTTTC-3'.**

Die im Plasmid enthaltene siRNA wird erst nach der Transfektion der siRNA-Plasmide in der Zelle prozessiert.



**Abb. 10: Vektorkarte des psiStrike hMGFP-Vektors.**

### B.6.2 Transfektion der siRNA-Plasmide in eukaryotische Zellen

Die Transfektion der siRNA-Plasmide erfolgte mit Lipofectamin 2000, einem kationischen Lipid-Reagenz. Kationische Lipide bestehen aus einem positiv geladenen Kopf mit ein oder zwei Kohlenwasserstoffketten. Der positive Kopf bindet die negativ geladene DNA und bildet dann sogenannte Liposomen, welche die DNA umschließen. Die Liposomen fusionieren mit der Zellmembran und schleusen auf diesem Weg die DNA in die Zelle ein.

Zur Transfektion der siRNA-Plasmide wurden HEK293T-Zellen verwendet. Diese wurden einen Tag vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte in 200  $\mu$ l Medium ohne Antibiotika ausgesät, so dass die Zellen nach 24 h eine Konfluenz von ca. 90 % aufwiesen. Die Zellkulturplatten mussten zuvor mit Poly-L-Lysin (200  $\mu$ l/Vertiefung, 5 min bei RT) beschichtet werden. Anschließend

wurde das Poly-L-Lysin wieder abgenommen und jede Vertiefung zwei Mal mit 200  $\mu$ l PBS (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden je 1  $\mu$ g siRNA-Plasmid in 20  $\mu$ l Opti-Mem (reduziertes Zellkulturmedium) und 1  $\mu$ l Lipofectamin 2000 in 25  $\mu$ l Opti-Mem aufgenommen. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Lipofectaminlösung mit der Plasmidlösung gemischt und weitere 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 160  $\mu$ l Opti-Mem wurden 200  $\mu$ l des Plasmid-Lipofectamin-Gemisches auf die Zellen gegeben, von denen zuvor das ursprüngliche Medium entfernt worden war. Die Zellen wurden 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde die Transfektionseffizienz am Fluoreszenzmikroskop durch Auszählen der transfizierten und nicht transfizierten Zellen bestimmt.

Die angegebenen Werte beziehen sich auf eine 24-Loch-Platte und wurden für andere Formate entsprechend der den Zellen zur Verfügung stehenden Wachstumsfläche angepasst.

### **B.6.3 Infektion der mit siRNA-Plasmiden transfizierten Zellen**

Zur Überprüfung der Wirksamkeit und Funktionalität der siRNAs wurden die transfizierten Zellen mit FSME-Virus infiziert. Hierzu wurde das Transfektionsmedium nach 48 h abgenommen und 200  $\mu$ l virushaltiges Medium zugegeben. Zur Infektion wurden die FSME-Virusstämme K23, Neudörfel, Aina und Sofjin verwendet. Der verwendete Virusüberstand wurde zuvor in Zellkulturmedium so verdünnt, dass mit einer MOI (*multiplicity of infection*, dt.: Vielfachheit der Infektion) von 0,1 infiziert wurde. Eine Ausnahme bildete der FSME-Virusstamm Sofjin, bei dem eine MOI von 0,01 gewählt wurde, da der zur Verfügung stehende Virusüberstand einen zu niedrigen Titer aufwies. Nach einer halben Stunde Inkubation bei 37°C wurde das virushaltige Medium abgenommen, die Zellen zwei Mal mit 200  $\mu$ l PBS (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen und 200  $\mu$ l frisches Medium zugegeben. Nach 20 h Inkubation wurden Zellen und/oder Virusüberstände geerntet, um sie auf das FSME-Virus mittels RT-qPCR oder Western Blot zu überprüfen.

### **B.7 Statistische Methoden zur Auswertung der Daten**

Die statistischen Tests und Häufigkeitsuntersuchungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS 17 durchgeführt.

Zum Vergleich verschiedener Gruppen wurde der t-Test verwendet. Gruppen galten als signifikant unterschiedlich, wenn  $p < 0,05$  war. Die Varianzgleichheit für den t-Test wurde mit dem Levene-Test überprüft. Lag keine Varianzgleichheit vor ( $p > 0,05$ ), wurde der p-Wert des t-Tests für nicht homogene Gruppen gewählt.

Die Nachweiswahrscheinlichkeit für ein RT-qPCR-System wurde anhand einer Probit-Analyse bestimmt.

## B.8 Lösungen, Materialien und Chemikalien

**Tab. 19: Für die Experimente verwendete Chemikalien.**

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose (NuSieve®3:1)	Biozym, Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
<i>Aqua dest.</i>	Millipore, RKI
<i>Aqua mol. (molecular grade)</i>	Eppendorf, Hamburg
Aqua-Phenol	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Bromphenol blau	Roth, Karlsruhe
Carboxymethylzellulose Natriumsalz (CMC)	BDH, Poole, UK
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreolin (DTT)	Sigma-Aldrich, München
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagles-Medium</i> )	GIBCO, Karlsruhe
dNTP Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (99,9 %) reinst	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Evansblue	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Ficoll-paque Plus	Amersham, Freiburg
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
FuGENE® HD <i>transfection reagent</i>	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Glukose	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidinthiocyanat	Merck, Darmstadt
Immu-Mount	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl $\beta$ -D-thiogalaktosidase (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Jodacetamid	Sigma-Aldrich, München

## Material und Methoden

---

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Kalciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat (KAc)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchloride (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
L-15-Medium (Leibowitz 15-Medium)	GIBCO, Karlsruhe
Laktose	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumsulfid (MgSO <sub>4</sub> )	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Trade Service Int., Zeven, Niederlande
MOPS	Sigma-Aldrich, München
N',N',N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Naphthalenblack	Sigma-Aldrich, München
Natriumcarbonat Anhydrat	Roth, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Opti-Mem	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyacrylamid (Rotiphorese® Gel 30; 37.5:1)	Roth, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Propan-1,2,3,-triol (Glycerin)	Merck, Darmstadt
Protease-Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, San Diego, USA
Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Sarcosin (N-Methylglycin)	Sigma-Aldrich, München
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sample buffer	EUROIMMUN, Lübeck
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Linde, Berlin
Sukrose	Sigma-Aldrich, München

Chemikalie	Hersteller
SuperSignal® West Dura Extended Chemiluminescent-Substrate (Luminol)	Pierce, Rockford, USA
SuperSignal® West Femto Chemiluminescent Substrate (Luminol)	Pierce, Rockford, USA
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Luminol)	Pierce, Rockford, USA
TBE- (Tris-Borat-EDTA-) Puffer	Eppendorf, Hamburg
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, München
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, München
Tris-Hydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Tween® 20	Merck, Darmstadt
Urea	Sigma-Aldrich, München
β-Cyclodextrin	Sigma-Aldrich, München
β-Mercaptoethanol (β-MeETOH)	Sigma-Aldrich, München

**Tab. 20: Für die Experimente verwendete Enzyme.**

Enzym	Hersteller
Benzonase®	Novagen, Madison, USA
BstXI	Fermentas, St. Leon-Rot
DNase	Ambion, Huntingdon, UK
EcoRI	New England Biolabs, Frankfurt
Lysozym	Sigma-Aldrich, München
NotI	New England Biolabs, Frankfurt
Platinum® Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München
RNase A	Roth, Karlsruhe
RNase Inhibitor <i>RNase out</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Sspl	Fermentas, St. Leon-Rot
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe

## Material und Methoden

---

**Tab. 21: Für die Experimente verwendete DNA- und Proteinstandards.**

Name	Herkunft
100 bp Extended Range Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb PLUS Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
MultiMark™ Multi-Colored Standard	Invitrogen, Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
TrackIt™ 100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe

**Tab. 22: Für die Experimente verwendete Verbrauchsmaterialien.**

Materialien	Hersteller
CL-Xposure™ Film (18 x 24 cm)	Pierce, Rockford, USA
Deckgläschen (12 mm, rund)	Roth, Karlsruhe
Einmalkuvetten	Eppendorf, Hamburg
ELISA Maxisorb 96-Loch	Nunc, Wiesbaden
Microcon® Centrifugal Filter (5 kDa, 10 kDa)	Millipore, Billerica, USA
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
PCR Platten (96-Loch)	Applied Biosystems, , Foster City, USA
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 100 µl, 1.000 µl)	Biozym, Oldenburg
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Nunc, Wiesbaden
Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm BioMax MR (18 x 24 cm)	Kodak, Stuttgart
Seropipetten (1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml)	Nunc, Wiesbaden
Skalpell	B. Braun Aesculap, Tuttlingen
Whatman blotting Papier (102 mm x 133 mm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>3</sup> ; 75 cm <sup>3</sup> ; 175 cm <sup>3</sup> )	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch)	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Nunc, Wiesbaden
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml; 8-Streifen)	Biozym, Oldenburg
PVDF-Membranen/Westran® S (0,2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterile Filter (0,22 µm)	Millipore, Billerica, USA
Nitrocellulosemembran (0,2 µm, 0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Keramikügelchen 1,4 mm	PeqLab, Fürth
Cryotubes (1.8 ml)	Nunc, Wiesbaden

**Tab. 23: Für die Experimente verwendete Geräte.**

Geräte	Hersteller
Autoklav Automat 21/2	Webeco, Bad Schwartau
Autoklav Varioklav®	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
-20°C Schrank	Bosch, Stuttgart
-20°C Schrank C	Liebherr, Biberach a.d. Riß
-70°C Schrank	Heraeus, Hanau
Entwickler (Röntgenfilm) <i>Curix 60</i>	Agfa-Gevaert Group, Mortsel, Belgien
Fast Prep FP120	eubio, Wien, Österreich
Fluoreszenzmikroskop <i>Axioskop 20</i>	Zeiss, Jena
Gel Dokumentation <i>CN-3000 WL/LC</i>	Peqlab, Erlangen
Gel Elektrophorese Kammer <i>Mini Protean® 3</i>	Bio-Rad, München
Glaswaren (Glasflaschen, etc.)	Schott Glas, Mainz
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	Heraeus, Hanau
Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inversmikroskop <i>Axiovert 25</i>	Zeiss, Jena
Konfokales Lasermikroskop <i>cLSM 510 Meta</i>	Zeiss, Jena
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop <i>Televal 3</i>	Zeiss, Jena
Magnetrührer <i>IKA® RH basic 2</i>	IKA® Werke, Staufen
Netzteil Model 200/2.0	Bio-Rad, München
Netzteil Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Photometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pinzetten	Roth, Karlsruhe
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe <i>Accujet® pro</i>	Brand, Wertheim
Qubit Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe
Real Time Gerät <i>ABI7500</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Real Time Gerät Stratagene MX3000P und 3005P	Agilent Technologies, La Jolla, USA
Sequenzierautomat <i>ABI PRISM® 3100</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sicherheitswerkbank <i>Antair BSK</i>	Kendro, Langenselbold
Sicherheitswerkbank <i>BioCard Hood</i>	The Baker Company, Sanford, USA
Stickstoff Behälter <i>KGW isotherm</i>	Roth, Karlsruhe
Spatel	Roth, Karlsruhe
Stickstoff Truhe	Union Carbide, Houston, USA
Thermo Drucker <i>DPU-414</i>	Seiko Instruments Inc., Japan
Thermocycler Biometra T gradient cycler	Biometra, Göttingen
Thermocycler Biometra T personal	Biometra, Göttingen

## Material und Methoden

---

Geräte	Hersteller
UV-Tisch Transilluminator TC-312A	Spectroline, Westbury, USA
Vertikalschüttler <i>Model 3013</i>	FL, Burgwedel
Vertikalschüttler <i>RS-PL 28-10</i>	Heto, Alerød, Denmark
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage BP 310 p	Sartorius, Göttingen
Waage L 610 D	Sartorius, Göttingen
Wasserbad <i>Typ 1013</i>	GFL, Burgwedel
Western Blot Ausrüstung <i>Fastblot B 34</i>	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Sigma 2K15 Centrifuge	B. Braun, Melsungen
Zentrifuge <i>Sigma 3K30C</i>	B. Braun, Melsungen

**Tab. 24: Für die Experimente verwendete Kits.**

Kit	Hersteller
<i>Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Invitrogen Onestep Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Invitrogen TA Cloning Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>MSP Spin Repace</i>	Invitek, Berlin
<i>PeqGold RNA Blood Kit</i>	PeqLab Fürth
<i>Promega in vitro Transcription Kit</i>	Promega, Mannheim
<i>Promega siRNA Kit</i>	Promega, Mannheim
<i>Qiagen Cloning Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Qiagen Quantitect One-Step Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Quant-it Protein Assay Kit</i> für das Qubit Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Quant-it RNA Assay Kit</i> für das Qubit Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe

## C. Ergebnisse

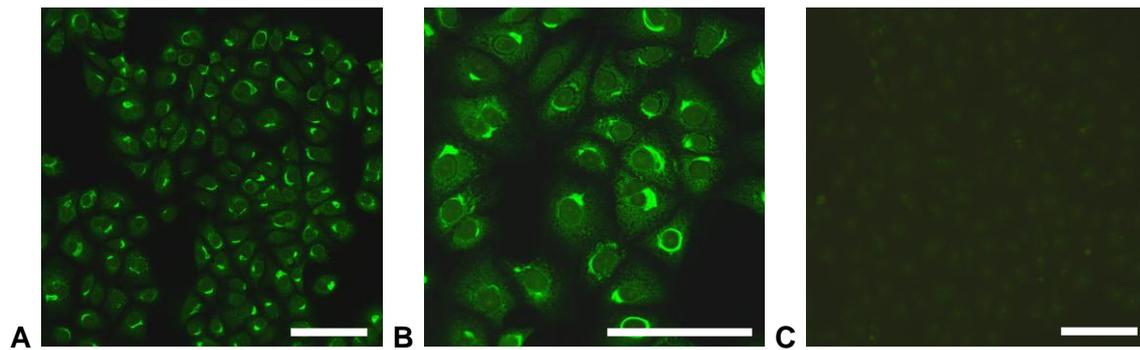
### C.1 Etablierung von Methoden für den Nachweis des FSME-Virus

Für die Identifizierung eines Indikators zur Untersuchung der FSME-Virusverbreitung und der Entwicklung und Testung von siRNAs gegen das FSME-Virus mussten zu allererst Methoden zum Nachweis des FSME-Virus und von FSME-Virus-spezifischen Antikörpern etabliert und evaluiert werden. Die etablierten und optimierten Methoden wurden anschließend zum Nachweis des FSME-Virus in Nagern und Zecken sowie siRNA-exprimierenden Zellen eingesetzt.

#### C.1.1 Etablierung einer Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis des FSME-Virus in Zellen

Die Immunfluoreszenzfärbung (IF) wurde standardmäßig zur Bestimmung des Infektionsgrades einer mit FSME-Virus infizierten Zellkultur verwendet, da sie einfach und schnell durchzuführen ist. Die verschiedenen FSME-Virusstämme wurden auf VeroE6-Zellen angezüchtet. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde als primärer Antikörper ein gegen das E-Protein des FSME-Virus gerichteter, monoklonaler Antikörper aus der Maus MAB 1367 von Niedrig *et al.* (1994) getestet. Bisher wurden anstatt eines monoklonalen, primären Antikörpers Seren FSME-geimpfter Personen verwendet, die Antikörper gegen das Virus enthalten. Der Einsatz eines monoklonalen Antikörpers in definierter Konzentration führte zu einer besseren Standardisierung der Methode und einer besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Als sekundärer Antikörper diente ein FITC-gekoppelter anti-Maus-IgG-Antikörper.

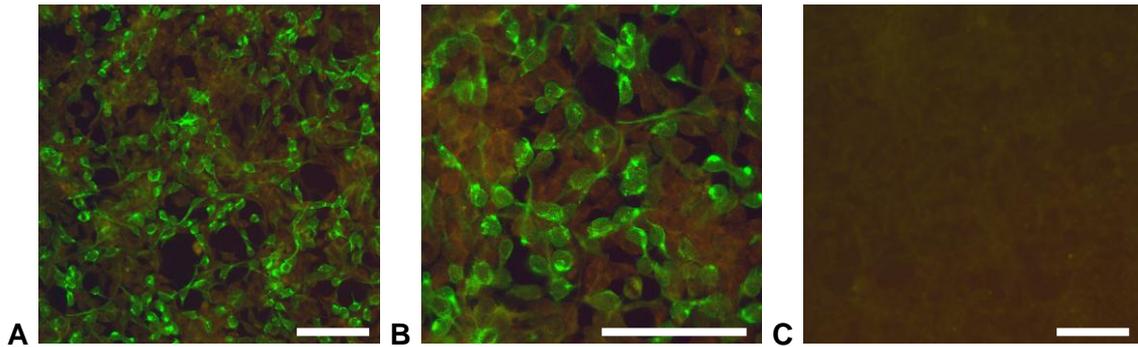
Die verwendete Antikörperkombination erwies sich als geeignet zum Nachweis des FSME-Virus auf Einzelzellniveau. Infizierte Zellen zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop eine grüne Färbung und grün angefärbte „Einschlusskörper“, im Gegensatz zu nicht infizierten Zellen, die keine Färbung aufwiesen (Abb. 11). Die Einschlusskörper markieren die Orte in der Zelle, an denen Virus repliziert und zusammengebaut wird.



**Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen zum Test des primären Antikörpers MAB 1367 in VeroE6-Zellen.**

Fluoreszenzmikroskopaufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung von mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten VeroE6-Zellen in 20facher Vergrößerung (A) und 40facher Vergrößerung (B) sowie nicht infizierter VeroE6-Zellen in 20facher Vergrößerung (C) mit dem primären Antikörper MAB 1367 und einem FITC-gekoppelten, sekundären anti-Maus-IgG-Antikörper. Die grün fluoreszierenden FSME-Viren sind in den infizierten Zellen deutlich zu erkennen. Nicht infizierte Zellen zeigen keine grüne Fluoreszenz. Die stark grün fluoreszierenden Stellen in den Zellen markieren die Orte, an denen das Virus repliziert und gebildet wird und werden als „Einschlusskörper“ bezeichnet. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ .

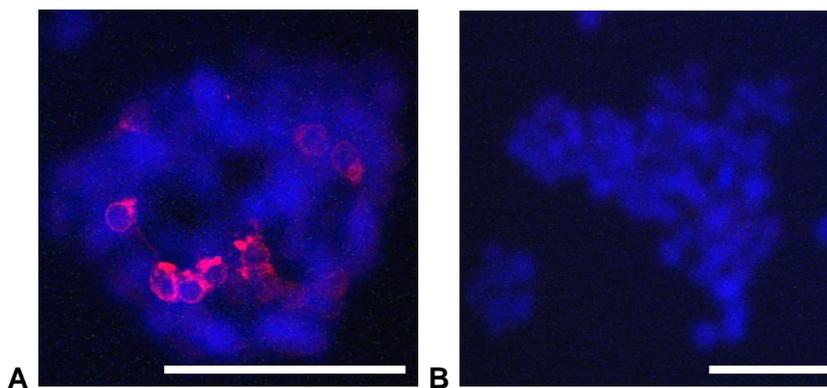
Mit der Immunfluoreszenzfärbung sollte weiterhin eine FSME-Virusinfektion in HEK293T-Zellen überprüft werden, welche für die siRNA-Versuche verwendet wurden. Es zeigte sich jedoch, dass HEK293T-Zellen eine unspezifische, gleichmäßige grüne Färbung aufwiesen, wenn sie, wie für VeroE6-Zellen oben beschrieben, behandelt wurden. Daher wurde ein zweiter gegen das E-Protein des FSME-Virus gerichteter, monoklonaler Antikörper MAB 1786 von Niedrig *et al.* (1994) getestet, mit dem jedoch ebenfalls die Hintergrundfärbung zu stark war, so dass infizierte Zellen nicht erkannt werden konnten. Daraufhin wurde eine Gegenfärbung mit Evansblue vorgenommen. Diese reduzierte den störenden Hintergrund so weit, dass nur die FSME-Viruspartikel eindeutig grün fluoreszierten (Abb. 12).



**Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen zum Test eines FITC-gekoppelten, sekundären Antikörpers in HEK293T-Zellen.**

Fluoreszenzmikroskopaufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung von mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten HEK293T-Zellen in 20facher Vergrößerung (A) und 40facher Vergrößerung (B) sowie nicht infizierter HEK293T-Zellen in 20facher Vergrößerung (C) mit dem primären Antikörper 1367 (1:40 verdünnt), versetzt mit Evansblue zur Reduzierung des Hintergrunds, und einen FITC-gekoppelten, sekundären anti-Maus-IgG-Antikörper. Die grün fluoreszierenden FSME-Viren sind in den infizierten Zellen deutlich zu erkennen. Nicht infizierte Zellen zeigen keine grüne Fluoreszenz. Der Hintergrund fluoresziert durch die Evansblue-Färbung leicht rötlich. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ .

Für die Überprüfung von siRNA-transfizierten HEK293T-Zellen wurde ein mit Alexa594-gekoppelter, sekundärer anti-Maus-IgG-Antikörper getestet. Dieser fluoreszierte rot, so dass die durch eine MGFP- (modifiziertes GFP-) Kontrolle grün fluoreszierenden transfizierten Zellen ebenfalls auf FSME-Viruspartikel überprüft werden konnten. Auch diese Färbung erwies sich als spezifisch, da die Viruspartikel unter dem Fluoreszenzmikroskop rot fluoreszierten (Abb. 13).



**Abb. 13: Mikroskopaufnahmen mit dem konfokalen Laserscanmikroskop von Immunfluoreszenzfärbungen zum Test eines Alexa594-gekoppelten, sekundären Antikörpers in HEK293T-Zellen.**

Konfokale Laserscanmikroskopaufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung von mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten HEK293T-Zellen in 40facher Vergrößerung (A) sowie nicht infizierter HEK293T-Zellen in 40facher Vergrößerung (B) mit dem primären Antikörper 1367 (1:40 verdünnt) und einem Alexa594-gekoppelten, sekundären anti-Maus-IgG-Antikörper. Der Balken entspricht einer Länge von 100  $\mu\text{m}$ .

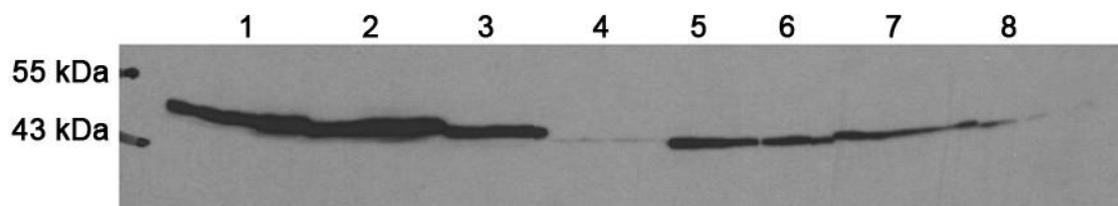
Die Auswertung der Fluoreszenzfärbung der siRNA-exprimierenden Zellen erfolgte mit dem konfokalen Laserscanmikroskop. Unter dem konfokalen Laserscanmikroskop bestand nicht die Möglichkeit die Zellen im Weißlicht zu betrachten, so dass stattdessen die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt wurden.

Mit dem IFT wurde zwar eine FSME-Virusinfektion auf Einzelzellniveau nachgewiesen, jedoch konnte nur eine Aussage über die Anzahl infizierter Zellen, nicht jedoch über den Virusgehalt getroffen werden. Zur relativen Quantifizierung von Virusprotein in Zellen oder Zellkulturüberstand wurde daher nachfolgend ein Western Blot etabliert.

### C.1.2 Etablierung eines Western Blots zum Nachweis des E-Proteins des FSME-Virus

Als weiteres Nachweisverfahren für das FSME-Virus wurde ein Western Blot etabliert. Dieser diente während der Doktorarbeit vor allem zur Überprüfung der Virusproteinreduktion in siRNA-exprimierenden Zellen. Zum Nachweis von FSME-Virusprotein wurden zwei verschiedene, gegen das E-Protein des FSME-Virus gerichtete, monoklonale Antikörper aus der Maus, MAB 1367 und MAB 1786 von Niedrig *et al.* (1994), in verschiedenen Konzentrationen im Western Blot getestet.

Bei Verwendung beider Antikörper ließ sich eine spezifische Bande bei ca. 50 kDa erkennen, die dem E-Protein des FSME-Virus zugeordnet werden kann (Abb. 10). Der Antikörper MAB 1367 zeigte das deutlichste Signal bei einer Verdünnung von 1:500 und 1:1.000. Das Signal des Antikörpers MAB 1786 war für alle Verdünnungen schwächer als das Signal des Antikörpers MAB 1367.



**Abb. 14: Röntgenfilmaufnahme des Western Blots zur Austestung der monoklonalen anti-FSME-Virus-Antikörper MAB 1367 und MAB 1786.**

Im Zellkulturüberstand von FSME-Virus-infizierten VeroE6-Zellen enthaltene Proteine wurden in einer SDS-PAGE nach der Größe aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ) übertragen (geblottet). Der spezifische Nachweis von E-Protein des FSME-Virus erfolgte mit Hilfe der Antikörper MAB 1367 (Reihe 1 bis 4) und MAB 1786 (Reihe 5 bis 8) in den Verdünnungen 1:500 (Reihen 1 und 5), 1:1.000 (Reihe 2 und 6), 1:2.000 (Reihen 3 und 7) und 1:5.000 (Reihen 4 und 8). Beide Antikörper binden an das ca. 50 kDa große E-Protein des FSME-Virus, wie an den distinkten Banden auf dem Röntgenfilm zu erkennen ist.

Für den Nachweis des E-Proteins des FSME-Virus in den folgenden Versuchen wurde der Antikörper MAB 1367 in der niedrigsten Verdünnung von 1:1.000 verwendet, um Unterschiede im Proteingehalt erkennen zu können. Die Intensität der Banden im Western Blot spiegelt die Proteinkonzentration wieder, so dass durch den Vergleich der Bandenintensität verschiedener Banden auf die relative Virusproteinmenge zurückgeschlossen werden kann. Eine Aussage über die tatsächliche Menge infektiöser Viren ist jedoch nicht möglich. Hierzu wurde ein Plaquetest entwickelt.

### **C.1.3 Etablierung eines Plaquetests zum Nachweis von infektiösen FSME-Viruspartikeln**

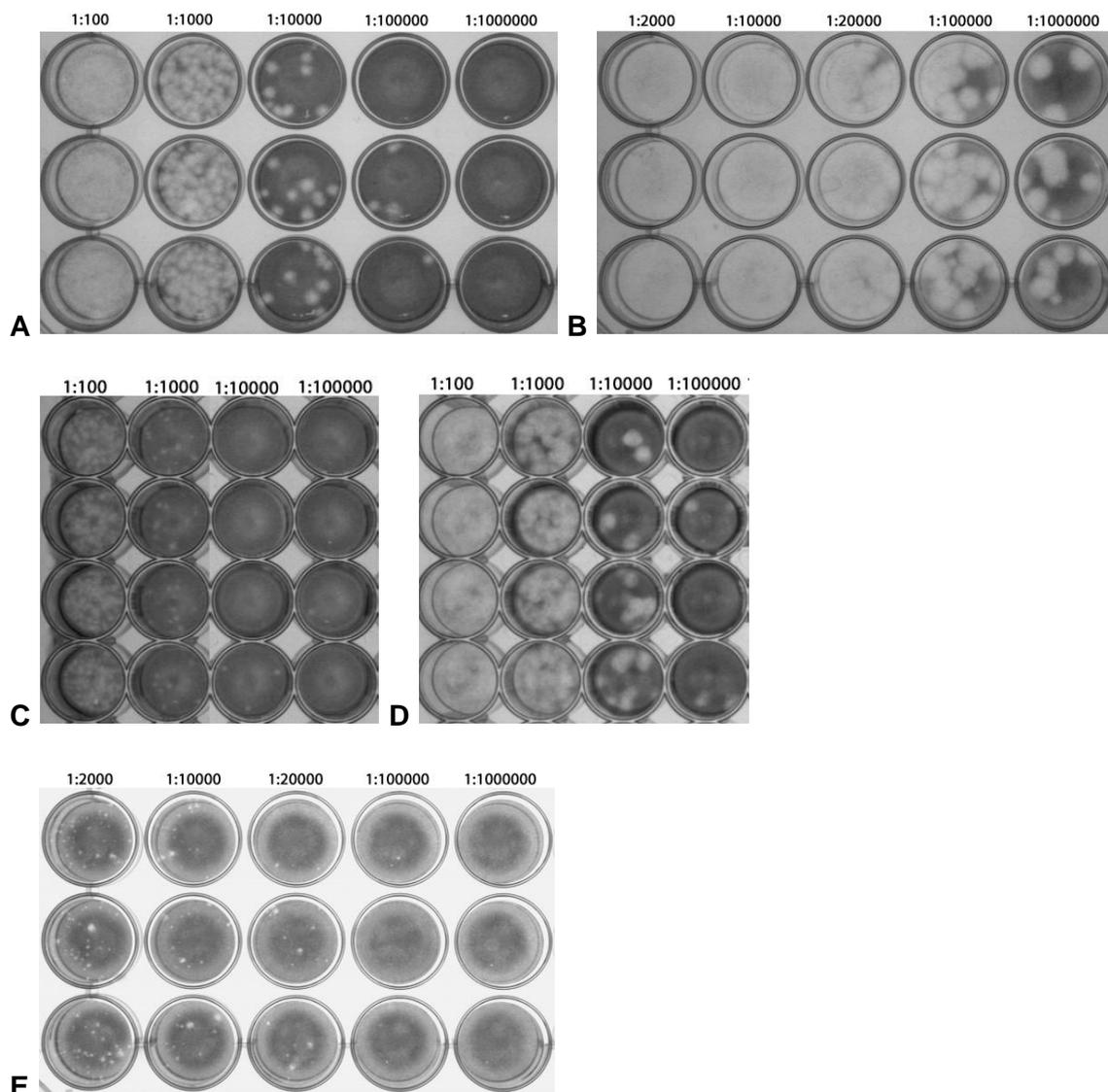
Zur Bestimmung der Anzahl infektiöser Partikel (Viren) in Zellen oder eines Zellkulturüberstandes (Virustiter) wurde ein Plaquetest etabliert. Als Vorlage für den Plaquetest diente ein Protokoll von De Madrid und Porterfield (1969) für Gruppe B-Flaviviren, zu denen das FSME-Virus ebenfalls zählt. Bei dieser Methode wird eine Zellkultur mit dem Virus infiziert und nach kurzer Zeit mit einem viskosen Medium überschichtet. Dieses verhindert, dass sich das Virus über den Zellkulturüberstand ausbreitet. Es werden daher nur direkt benachbarte Zellen infiziert. Nach einer mehrtägigen Exposition bilden sich dabei gut sichtbare Plaques im Zellrasen. Die Plaques können sich jedoch - je nach Virus und verwendeter Zelllinie - unterschiedlich schnell entwickeln und daher in Form und Größe variieren (Danes und Benda, 1960; De Madrid und Porterfield, 1969; Libikova, 1959; Libikova und Vilcek, 1959; Zasukhina und Levkovich, 1957). Zur differentiellen Diagnose war es daher erforderlich, die genauen Bedingungen der Plaqueentstehung sowie die Inkubationsdauer, Größe und Form der Plaques für die verschiedenen Zelllinien zu bestimmen.

Als erstes wurde nach geeigneten Zelllinien gesucht, bei denen eine Infektion mit dem FSME-Virus Löcher im Zellrasen, sogenannte Plaques, hervorruft. Als Zelllinien wurden VeroE6- und PS-Zellen verwendet, da diese sich mit dem FSME-Virus infizieren lassen, einfach zu kultivieren sind und in der Literatur bereits beschrieben ist, dass diese bei einer FSME-Virusinfektion Plaques bilden (Danes und Benda, 1960; De Madrid und Porterfield, 1969; Libikova, 1959; Libikova und Vilcek, 1959; Vene *et al.*, 1998; Zasukhina und Levkovich, 1957). Bei beiden Zelllinien bildeten sich nach drei bis fünf Tagen Plaques aus. Daraufhin wurde die optimale Inkubationszeit sowie das geeignete Format in Tests ermittelt. Bei einer zu kurzen Inkubationszeit lassen sich die Plaques mit dem bloßen Auge nur schlecht erkennen. Ist die Inkubationszeit zu lang, werden die

## Ergebnisse

Plaques so groß, dass benachbarte Plaques miteinander verschmelzen und eine Auszählung nicht mehr erfolgen kann.

Es zeigte sich, dass die optimale Inkubationszeit für PS-Zellen im 48-Loch-Format drei Tage und im 24-Loch-Format vier Tage sowie für VeroE6-Zellen im 24-Loch-Format sechs Tage beträgt (Abb. 15).



**Abb. 15: Vergleich der Inkubationszeiten eines FSME-Plaquetests mit verschiedenen Formaten und Zelllinien.**

Plaquetest mit PS-Zellen in einer 24-Loch-Platte nach vier Tagen Inkubation (A) und fünf Tagen Inkubation (B), in einer 48-Loch-Platte nach drei Tagen Inkubation (C) und vier Tagen Inkubation (D) und mit VeroE6-Zellen in einer 24-Loch-Platte nach sechs Tagen Inkubation (E).

Die PS-Zellen bildeten gleichmäßige, klar abgrenzbare, gut erkennbare Plaques und zeigten somit eine bessere Eignung für den Plaquetest als VeroE6-Zellen (Abb. 15). Auch war der Test mit PS-Zellen schneller auswertbar. Die Plaques der PS-Zellkultur

ließen sich im 24-Loch-Format besser auszählen, so dass für alle weiteren Versuche PS-Zellen im 24-Loch-Format für den Plaquetest verwendet wurden. Die Verwendung eines kleineren Formats (48-Loch Platte) war nicht möglich. Zwar wurde weniger Probenmaterial verbraucht, die Plaques waren aber entweder zu klein oder es waren bei einer auszählbaren Größe zu wenige Plaques für eine sinnvolle Auswertung vorhanden (Abb. 15).

Die optimierten Bedingungen wurden als Grundlagen für die folgende Etablierung eines Neutralisationstests zum Nachweis von Antikörpern gegen das FSME-Virus verwendet.

### **C.1.4 Etablierung eines Neutralisationstests zum Nachweis neutralisierender Antikörper gegen das FSME-Virus in humanen und tierischen Seren sowie Liquor**

Zur Bestimmung des Titers neutralisierender Antikörper gegen das FSME-Virus in Serum oder Liquor wurde ein FSME-Neutralisationstest (NT) etabliert. Neutralisierende Antikörper sind spezifisch für ein Virus und zeigen keine Kreuzreaktionen. In anderen serologischen Tests (IFT oder ELISA) treten dagegen häufig Kreuzreaktionen mit nahe verwandten Viren auf. Mit dem Nachweis neutralisierender Antikörper wird überprüft, ob eine Person eine FSME-Virusinfektion hat bzw. hatte oder erfolgreich gegen das FSME-Virus geimpft wurde.

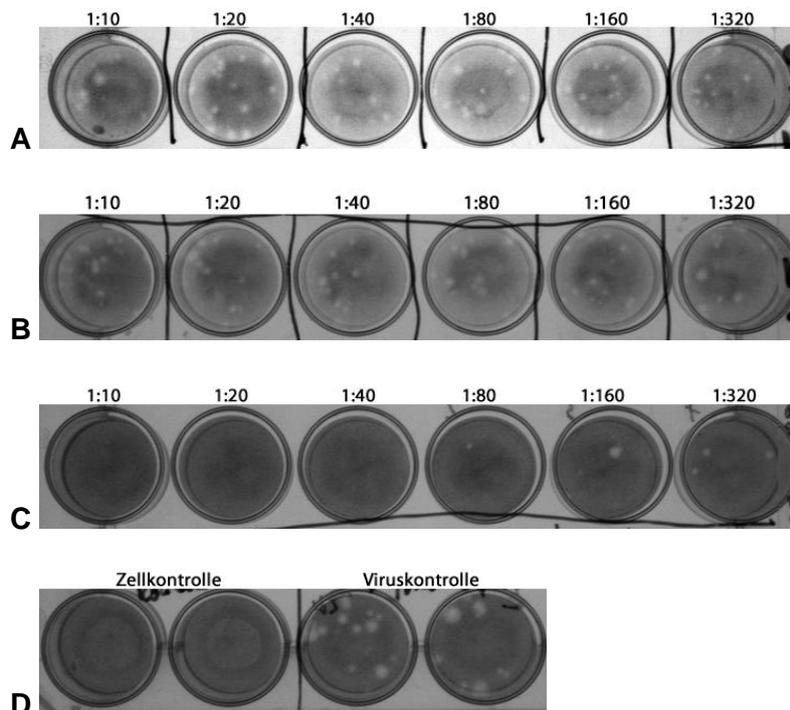
Als Vorlage für das Protokoll des FSME-NTs dienten Protokolle von Niedrig *et al.* (1999) und Reinhardt *et al.* (1998) für den Gelbfieber-NT sowie die Ergebnisse der Etablierung des FSME-Plaquetests. Zunächst wurde mit Hilfe des FSME-Plaquetests die FSME-Viruskonzentration bestimmt, bei der sich ca. 20 Plaques je Vertiefung einer 24-Loch-Platte bilden und welche daher als Ausgangskonzentration für den NT-Test dienen sollte. Diese betrug für den im NT-Test verwendeten FSME-Virusstamm K23  $1,67 \times 10^2$  PFU/ml.

Zur Überprüfung des Neutralisationstests wurden Seren FSME-geimpfter Personen als Positivkontrollen und Seren ungeimpfter Personen als Negativkontrollen verwendet. Bei geimpften Personen, die neutralisierende Antikörper gegen das FSME-Virus im Serum besitzen, binden die Antikörper die Viruspartikel und verhindern oder reduzieren so eine Plaquebildung. Mit steigender Verdünnung des Serums steigt daher auch die Anzahl der Plaques. Bei Personen ohne neutralisierende Antikörper ändert sich die Anzahl der gebildeten Plaques mit steigender Verdünnung des Serums nicht. Zum Ausschluss einer Kreuzreaktivität des FSME-NTs mit Antikörpern gegen andere Flaviviren, wurde auch

## Ergebnisse

---

Serum von Personen untersucht, die eine Gelbfieberimpfung jedoch keine FSME-Impfung erhalten hatten.



**Abb. 16: Austestung der Spezifität des FSME-Neutralisationstests.**

Neutralisationstest auf PS-Zellen in einer 24-Loch-Platte nach vier Tagen Inkubation mit Serum einer FSME-negativen Person (A), mit Serum einer gegen das Gelbfiebertvirus geimpften FSME-negativen Person (B) und mit Serum einer gegen FSME-Virus geimpften Person (C) und der Zell- und Viruskontrolle (D).

Die Ergebnisse in Abb. 16 (A bis D) zeigten, dass der Neutralisationstest spezifisch neutralisierende Antikörper gegen das FSME-Virus bis zu einem Titer von 1:10 nachwies. Die Seren der ungeimpften bzw. nur gegen das Gelbfiebertvirus geimpften Personen zeigten keinen Effekt auf die Anzahl der Plaques, dagegen wurde die Plaquebildung durch das Serum einer gegen das FSME-Virus geimpften Person verhindert bzw. reduziert, je nach Verdünnung des Serums. Auf Grund der Spezifität des NTs wurde dieser für den diagnostischen Nachweis einer FSME-Virusinfektion oder zur Überprüfung einer erfolgreichen Impfung gegen das FSME-Virus verwendet.

Allerdings sind in der frühen Phase einer FSME-Virusinfektion noch keine Antikörper gegen das Virus vorhanden, das Virus kann unter Umständen jedoch direkt in Serum (Blut) oder Liquor nachgewiesen werden. Zum direkten diagnostischen Nachweis von Virus-RNA in Liquor oder Serum wurden daher im folgenden quantitative *real-time* RT-PCR-Systeme (RT-qPCR) etabliert.

### **C.1.5 Etablierung quantitativer *real-time* RT-PCR-Systeme zum Nachweis und zur Quantifizierung von FSME-Virus-RNA aus verschiedenen Probenmaterialien**

Zum direkten Virusnachweis und zur absoluten Quantifizierung von FSME-Virus-RNA wurden zwei quantitative *real-time* RT-PCR- (RT-qPCR-) Systeme etabliert. Die RT-qPCR-Systeme wurden mit dem Ziel entwickelt und optimiert, dass sie alle FSME-Virussubtypen und -stämme spezifisch und sensitiv nachweisen, ohne jedoch verwandte Flaviviren oder andere Viren zu detektieren. Die Möglichkeit zur Quantifizierung erlaubte es z.B. die genaue Anzahl von FSME-Viren in Zellen und Zellkulturüberständen wesentlich sensitiver, schneller und einfacher als mit dem Plaquetest zu bestimmen. Die Spezifität der beiden Systeme wurde sowohl für humane Serum- bzw. Liquorproben als auch für Zecken- und Nagerproben nachgewiesen, so dass sie für die Diagnostik mit Humanproben wie auch für Forschungszwecke mit anderen Organismen einsetzbar sind.

#### **C.1.5.1 Austestung der Effizienz der cDNA-Synthese für die RT-qPCR-Systeme**

FSME-Viren besitzen ein RNA-Genom, welches vor der Amplifikation durch eine PCR in cDNA umgeschrieben werden muss. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgt mit einer Reversen Transkriptase (RT). In der humanen Diagnostik ist es erforderlich geringe Mengen RNA nachweisen zu können. Es wurden daher zwei verschiedene Reverse Transkriptasen ausgewählt, um sie auf ihre Eignung zu überprüfen, auch kleine RNA-Mengen in cDNA umzuschreiben. Für diesen Zweck wurde neben einer herkömmlichen Reversen Transkriptase, die ursprünglich aus dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MMLV) stammt, eine genetisch modifizierte Reverse Transkriptase, die Superscript II (SSII), ausgewählt. Diese SSII kann bei höheren Temperaturen verwendet werden und weist eine verminderte RNase H-Aktivität auf.

*In vitro*-transkribierte FSME-Virus-RNA (FSME-Virus-ivRNA) in drei Konzentrationen wurde in Doppelbestimmungen parallel mit der MMLV-RT und der SSII-RT umgeschrieben und die erhaltene cDNA mittels quantitativer NS1-Protein-PCR überprüft. Dabei zeigte sich, dass die SSII-RT sogar eine einzige Kopie RNA in cDNA umschrieb, während bei Verwendung der MMLV-RT zehn Kopien ivRNA nicht mehr nachgewiesen werden konnten (Tab. 25).

**Tab. 25: Vergleich der Reversen Transkriptasen MMLV RT und SSII. <sup>a</sup>**

Kopien ivRNA pro Ansatz	C <sub>q</sub> Mittelwert (SD)	
	MMLV RT	SSII
10 <sup>1</sup>	negativ	41,65 (4,74)
10 <sup>3</sup>	35,64 (0,27)	35,04 (0,99)
10 <sup>5</sup>	29,68 (0,01)	31,23 (0,11)

<sup>a</sup> FSME ivRNA wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Konzentration wurde mittels quantitativer NS1-Protein-PCR bestimmt. Die Ermittlung der C<sub>q</sub> Werte erfolgte in Doppelbestimmungen. C<sub>q</sub>: Schwellenwertzyklus, SD: Standardabweichung. MMLV RT: Reversen Transkriptasen des Moloney-Murine-Leukemia-Virus, SSII: Reverse Transkriptase Superscript II.

Für die weiteren Versuche und die Austestung der RT-qPCR-Systeme wurde die SSII RT verwendet.

### C.1.5.2 Primerdesign für die RT-qPCR-Systeme

Für den spezifischen Nachweis und zur Quantifizierung von FSME-Virus-RNA aller FSME-Virussubtypen mit einem Primerpaar und einer Sonde wurden zwei quantitative *real-time* RT-qPCR-Systeme etabliert. Die Auswahl der Oligonukleotide (Primer und Sonden) erfolgte anhand von zwei Alignments mit Sequenzen der *National Center for Biotechnology Information*- (NCBI-) Genbank für das FSME-Virus und das Louping Ill-Virus sowie mit Sequenzen nahe verwandter Viren, z.B. dem Powassan-Virus und dem Gelbfieberevirus. Für das erste Alignment wurden 44 Vollgenomsequenzen verwendet, für das zweite Alignment 169 Sequenzen des E-Proteins. Für das E-Protein stand eine höhere Anzahl von Sequenzen zur Verfügung, da dieses routinemäßig für die Typisierung von FSME-Viren verwendet wird.

Die Alignments zeigten, dass zwischen den verschiedenen FSME-Virusstämmen und vor allem zwischen den Subtypen große Sequenzunterschiede bestehen, so dass die zwei aus den Alignments ausgewählten Primerpaare und entsprechenden Hydrolysesonden je bis zu fünf degenerierte Positionen (*Wobble*-Basen) enthalten. Primer mit degenerierten Positionen bestehen aus einem Primergemisch. Z.B. würde der Primer BSP mit der Sequenz ATTA<sub>g</sub>CCTYAAAT aus einem eins zu eins Primergemisch der Primer BSP 1 und BSP 2 mit den Sequenzen ATTA<sub>g</sub>CCTTAAAT und ATTA<sub>g</sub>CCTCAAAT bestehen. Auf Grund der *Wobble*-Basenpaare war es nicht möglich, die Primer und Sonden mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) auf mögliche Bindungen zu nahe verwandten Viren und anderen Organismen zu überprüfen, da die *Wobble*-Basen zu so vielen neuen möglichen Primersequenzen führten, dass die

Datenmenge von den zur Verfügung stehenden Computerprogrammen nicht verarbeitet werden konnte.

Das erste Primerpaar und die dazugehörige Sonde binden in der für das NS1-Protein-kodierenden Sequenz und amplifizieren ein 98 bp großes Fragment. Die NS1-Sequenz weist eine hohe Homologie zwischen allen FSME-Virusstämmen auf und eignet sich daher für einen spezifischen Nachweis des Virus. Das zweite Primerpaar mit dazugehöriger Sonde bindet in der für das E-Protein-kodierenden Sequenz, die ebenfalls eine hohe Homologie zwischen den verschiedenen FSME-Virusstämmen zeigt. Die Sonden wurden mit einem *Minor groove binder*- (MGB-) Molekül konzipiert, welches in der kleinen Furche der DNA bindet. Durch Verwendung des MGB-Moleküls konnte eine kürzere Sondensequenz verwendet werden, außerdem wurde die Schmelztemperatur der Sonde erhöht. Dadurch nahm die Spezifität der PCR zu.

Zur Überprüfung der Funktionalität der Primerpaare und der Sonden wurden PCR-Plasmidstandards für alle drei Subtypen in verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Hierzu wurden die zwei Primerpaare FSMEV NS1 Klon For und Rev und FSMEV E Klon For und Rev verwendet (Tab. 10). Diese umschließen den Genombereich, in dem die Primer für die jeweilige RT-qPCR binden. RNA bzw. cDNA der FSME-Virusstämme K23, Aina und Sofjin dienten als Referenz für den entsprechenden Subtyp. Die Testung der beiden RT-qPCR-Systeme mit den Plasmidstandards ergab, dass mit beiden Primerpaaren und Sonden FSME-Virus-RNA nachgewiesen werden konnte (Tab. 26).

**Tab. 26: Primer- und Sondentest der RT-qPCR-Systeme.** <sup>a</sup>

Plasmid des FSME-Virusstammes	C <sub>q</sub> -Mittelwert (SD)	
	NS1-Protein-RT-qPCR	E-Protein-RT-qPCR
K23	23,27 (0,05)	27,76 (0,11)
Aina	22,48 (0,50)	25,50 (0,01)
Sofjin	24,31 (0,07)	27,27 (0,12)

<sup>a</sup> Alle Proben wurden in Doppelbestimmungen gemessen. Die eingesetzte Plasmidkopienzahl betrug bei der NS1-Protein-RT-qPCR 100.000 Kopien pro Ansatz und bei der E-Protein-RT-qPCR 200.000 Kopien pro Ansatz. C<sub>q</sub>: Schwellenwertzyklus, SD: Standardabweichung.

Zur Optimierung der RT-qPCR-Systeme wurden die Primer-, Sonden- und MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen sowie die *Annealing*-Temperaturen mit K23-cDNA oder Plasmidstandards ausgetestet. Eine Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration führte dazu, dass die Primer weniger spezifische Bindungen eingingen und besser an geringfügig abweichende Sequenzen banden. Durch eine zu starke Erhöhung der MgCl<sub>2</sub>-

## Ergebnisse

Konzentration begannen die Primer jedoch unspezifisch zu binden. Als Beispiel sind in Tab. 27 und Tab. 28 die Ergebnisse für die Austestung der  $MgCl_2$ - und Primerkonzentration der E-Protein-RT-qPCR gezeigt. Für die weiteren Parameter erfolgte die Austestung analog.

**Tab. 27: Ergebnisse der Optimierungsversuche für die  $MgCl_2$ -Konzentration der E-Protein-RT-qPCR. <sup>a</sup>**

Verdünnung der K23-cDNA	C <sub>q</sub> -Mittelwert (SD) bei folgender $MgCl_2$ -Konzentration			
	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM
10 <sup>-1</sup>	22,95 (0,66)	22,48 (0,21)	22,46 (0,25)	22,56 (0,78)
10 <sup>-2</sup>	26,53 (0,45)	26,15 (0,15)	26,06 (0,12)	25,91 (0,18)
10 <sup>-4</sup>	33,13 (0,77)	32,51 (0,20)	32,30 (0,76)	31,86 (0,47)

<sup>a</sup> Alle Proben wurden in Doppelbestimmungen gemessen. C<sub>q</sub>: Schwellenwertzyklus, SD: Standardabweichung.

**Tab. 28: Ergebnisse der Optimierungsversuche für die Primerkonzentration der E-Protein-RT-qPCR. <sup>a</sup>**

Verdünnung der K23-cDNA	C <sub>q</sub> -Mittelwert (SD) bei folgender Primerkonzentration				
	300 nm	600 nm	900 nm	1.500 nm	1.800 nm
10 <sup>-1</sup>	23,65 (0,23)	22,48 (0,01)	22,40 (0,35)	22,45 (0,46)	22,20 (0,18)
10 <sup>-2</sup>	27,64 (0,11)	26,02 (0,33)	25,62 (0,17)	26,25 (0,00)	25,88 (0,09)
10 <sup>-4</sup>	34,36 (0,04)	32,16 (0,30)	32,50 (0,04)	33,16 (0,69)	32,41 (0,06)

<sup>a</sup> Alle Proben wurden in Doppelbestimmungen gemessen. C<sub>q</sub>: Schwellenwertzyklus, SD: Standardabweichung.

Eine optimale  $MgCl_2$ -Konzentration von 5 mM ergab sich für die NS1- wie auch für die E-Protein-RT-qPCR, da höhere Konzentrationen zu keiner deutlichen Abnahme des Schwellenwertzyklus führten (Tab. 27). Die optimalen Primerkonzentrationen lagen bei 600 nm je Primer und die optimale *Annealing*-Temperatur bei 60°C (Tab. 28). Für die E-Protein-RT-qPCR betrug die optimale Sondenkonzentration 100 nm, für die NS1-Protein-RT-qPCR 200 nm. Für weitere Versuche wurden diese Konzentrationen verwendet. Die optimalen Primer- und Sondenkonzentrationen sowie *Annealing*-Temperaturen sind ebenfalls in Tab. 12 dargestellt.

### C.1.5.3 Spezifität der RT-qPCR-Systeme

Im nächsten Schritt wurde die Spezifität der RT-qPCR-Systeme überprüft. Damit wurde sichergestellt, dass nur FSME-Viren und keine anderen Erreger mit den Systemen nachgewiesen wurden. Außerdem wurde überprüft, ob alle FSME-Virusstämme und FSME-Virusstypen mit der gleichen Sensitivität nachgewiesen werden können.

Zur Überprüfung der Spezifität der RT-qPCR-Systeme für das FSME-Virus wurden RNAs verschiedener FSME-Virusstämme als Positivkontrollen und RNAs sowie DNAs anderer dem Genus *Flavivirus* angehörender Viren sowie Enzephalitis verursachender Viren als Negativkontrollen verwendet. Die E-Protein-RT-qPCR zeigte eine schwache Kreuzreaktivität mit dem Japanische-Enzephalitis-Virus, wies jedoch die verschiedenen FSME-Virusstämme und -subtypen spezifisch nach. Die NS1-Protein-RT-qPCR zeigte eine hohe Spezifität für FSME-Viren und wies keine Kreuzreaktivitäten zu anderen Viren auf (Tab. 29). RNA des zum FSME-Viruskomplex gehörenden Louping Ill-Virus wurde von beiden RT-qPCR-Systemen nachgewiesen.

**Tab. 29: Spezifität der NS1- und E-Protein-RT-qPCR.** <sup>a</sup>

Virus	Ergebnisse der RT-qPCR-Systeme	
	NS1-Protein-RT-qPCR	E-Protein-RT-qPCR
FSME-Virus K23 (E) <sup>b</sup>	positiv	positiv
FSME-Virus Aina (S) <sup>b</sup>	positiv	positiv
FSME-Virus Sofjin (F) <sup>b</sup>	positiv	positiv
FSME-Virus Neudörfl (E) <sup>b</sup>	positiv	-
FSME-Virus Absettarov (E) <sup>b</sup>	positiv	-
FSME-Virus Petracova (E) <sup>b</sup>	positiv	-
FSME-Virus Trypsorski (E) <sup>b</sup>	positiv	-
FSME-Virus Klodobok (E) <sup>b</sup>	positiv	-
FSME-Virus 2741 II (E) <sup>b</sup>	positiv	-
FSME-Virus Gbelce (E) <sup>b</sup>	positiv	-
FSME-Virus Dobrostan(E) <sup>b</sup>	positiv	-
FSME-Virus 79 (S) <sup>b</sup>	positiv	-
Louping Ill-Virus <sup>b</sup>	positiv	positiv
Coxsackie-Virus B5 <sup>b</sup>	negativ	negativ
Echo-Virus 2 und 30 <sup>b</sup>	negativ	negativ
Masern-Virus C2, D6 und D7 <sup>b</sup>	negativ	negativ
Herpes-Simplex-Virus 1 und 2 <sup>c</sup>	negativ	negativ
Varizella-Zoster-Virus <sup>c</sup>	-	negativ
Gelbfieberevirus 17D <sup>b</sup>	negativ	negativ
Japanische-Enzephalitis-Virus <sup>b</sup>	negativ	positiv (schwach)
West-Nil-Virus New York und Kunjin <sup>b</sup>	negativ	negativ
Dengue-Virus 1, 2, 3 und 4 <sup>b</sup>	negativ	-
Saint-Louis-Encephalitis-Virus <sup>b</sup>	-	negativ

<sup>a</sup> Die Proben wurden in Doppelbestimmungen mit den RT-qPCR-Systemen gemessen.

<sup>b</sup> Nukleinsäuren wurden aus Zellkulturüberstand infizierter Zellen extrahiert.

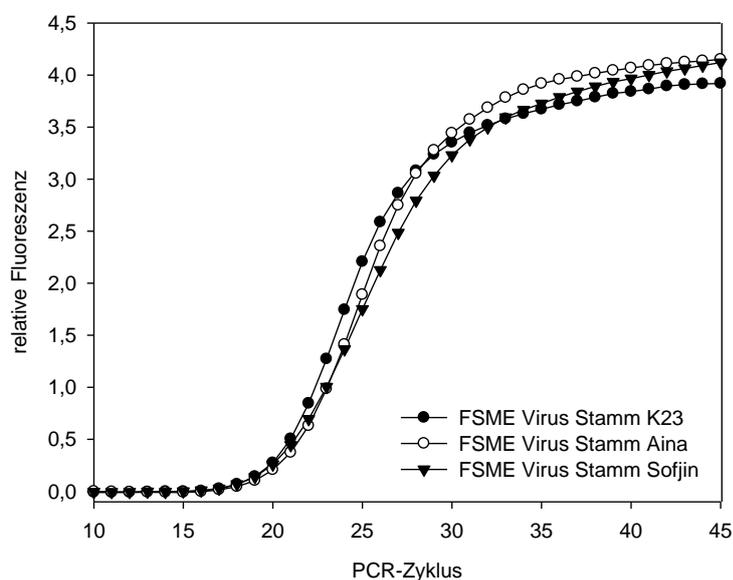
<sup>c</sup> Nukleinsäuren wurden aus positiv getesteten Seren extrahiert. E: europäischer Subtyp, S: sibirischer Subtyp, F: fernöstlicher Subtyp, -: nicht getestet.

## Ergebnisse

Da die Primer und die Sonde für die NS1-Protein-RT-qPCR das FSME-Virus spezifischer nachwies, wurden diese zur Etablierung eines RT-qPCR-Systems für die Humandiagnostik ausgewählt. Die E-Protein-RT-qPCR dagegen wurde im weiteren nur für die Forschung als *two-step*-Anwendung ohne interne Kontrolle verwendet.

Für die Humandiagnostik wurde das RT-qPCR-System als *one-step*- und *two-step*-Anwendung etabliert, eine interne Kontrolle zur Überprüfung der RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und qPCR eingeführt, sowie eine im Anschluss mögliche *Pyrosequencing*-Reaktion zur Unterscheidung der verschiedenen FSME-Virussubtypen entwickelt. Die Etablierung der NS1-Protein-RT-qPCR als diagnostische PCR wird in den Kapiteln C.1.5.4, C.1.5.5 und C.1.5.6 beschrieben.

Plasmidstandards aller drei Subtypen (Kapitel C.1.5.2) wurden in drei verschiedenen Konzentrationen (zwischen  $10^1$  bis  $10^6$  Plasmidkopien) verwendet, um zu überprüfen, ob die RT-qPCR-Systeme alle drei humanpathogenen FSME-Virussubtypen mit der gleichen Sensitivität nachweisen. Abb. 17 zeigt beispielhaft die in der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR gemessene relative Fluoreszenz für jeden Subtyp bei einer eingesetzten Plasmidkonzentration von 1.000 Kopien.



**Abb. 17:** In der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR gemessene relative Fluoreszenzen aufgetragen gegen den PCR-Zyklus zum Vergleich der Subtypspezifität.

Jeweils 1.000 Kopien der Standardplasmide der drei Subtypen (FSME-Virus K23, Aina und Sofjin) wurden simultan in einem Ansatz in Dreifachbestimmungen gemessen. Die gemessene relative Fluoreszenz wurde gegen den jeweiligen PCR-Zyklus aufgetragen, um die Spezifität und Sensitivität des RT-qPCR-Systems für die verschiedenen Subtypen miteinander zu vergleichen. Anhand der Kurven wurde dann der sogenannte Schwellenwertzyklus bestimmt, ab dem eine relative Fluoreszenz gemessen werden konnte.

Die gemessene relative Fluoreszenz wurde gegen den jeweiligen PCR-Zyklus aufgetragen. Anhand der Kurven wurde dann derjenige Schwellenwertzyklus ( $C_q$ ) bestimmt, ab dem eine relative Fluoreszenz gemessen werden konnte. Jede Plasmidkonzentration wurde in Dreifachbestimmungen in der qPCR gemessen. Anschließend wurde die Standardabweichung der  $C_q$ -Varianz für jede Konzentration über alle Subtypen bestimmt (Tab. 30).

**Tab. 30: Subtypspezifität der NS1- und E-Protein-RT-qPCR.** <sup>a</sup>

Plasmidkonzentration	SD für die $C_q$ -Varianz	
	<i>NS1-Protein-RT-qPCR</i>	<i>E-Protein-RT-qPCR</i>
niedrig	0,63	0,81
mittel	0,82	0,33
hoch	0,85	0,78

<sup>a</sup> Standardplasmide aller drei Subtypen (FSME-Virus K23, Aina und Sofjin) wurden simultan in drei Verdünnungsstufen in einem Ansatz in Dreifachbestimmungen gemessen, um zu zeigen, dass alle Subtypen mit vergleichbarer Sensitivität detektiert werden. Für die Schwellenwertzyklus- ( $C_q$ -) Varianz wurden die Standardabweichungen (SD) für jede Verdünnungsstufe über alle drei Subtypen hinweg bestimmt.

Für beide RT-qPCR-Systeme betragen die Werte für die Standardabweichungen nicht mehr als 0,85. Dies zeigte, dass die drei Subtypen mit vergleichbarer Sensitivität von allen RT-qPCR-Systemen detektiert wurden.

#### C.1.5.4 Einführung einer internen Kontrolle für die NS1-Protein-RT-qPCR

Zur Überprüfung der einzelnen Arbeitsschritte – der RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und cDNA-Amplifikation – wurde eine interne Kontrolle für die NS1-Protein-RT-qPCR eingeführt. Durch die interne Kontrolle wird verhindert, dass es zu falsch-negativen Ergebnissen kommt. Als interne Kontrolle wurde das Feline Calicivirus (FCV) verwendet, welches, wie das FSME-Virus, ebenfalls ein RNA-Virus ist. Vor der RNA-Extraktion wurden den Proben ca. 50 Kopien FCV zugesetzt, die dann in der PCR mit FCV-spezifischen Primern und einer FCV-spezifischen Sonde nachgewiesen werden konnten.

Die NS1-Protein-RT-qPCR wurde als Multiplex-System etabliert, so dass der Nachweis von FSME-Virus und FCV in einer Reaktion stattfinden konnte. Die Sensitivität des Multiplex-Systems für das FSME-Virus und FCV wurde mit den Uniplex-RT-qPCR-Systemen beider Viren verglichen, da die Sensitivität der RT-qPCR-Systeme durch Konkurrenz um die Reagenzien in der Reaktion abnehmen kann. Aus diesem Grund wurde allen Proben nur eine geringe Menge FCV zugesetzt. Der FCV-Nachweis ist

## Ergebnisse

besonders wichtig, wenn bei einem negativen Ergebnis für das FSME-Virus eine Überprüfung des PCR-Ablaufs erforderlich wird.

Zum Austesten des Multiplex-Systems wurde Serum mit FSME-Virus-enthaltendem Zellkulturüberstand in verschiedenen Verdünnungsstufen und mit FCV-enthaltendem Zellkulturüberstand in immer der gleichen Konzentration versetzt. Die Konzentration des zugegebenen FCV-Zellkulturüberstandes wurde niedrig gewählt, so dass die  $C_q$ -Werte für FCV etwa zwischen 30 und 33 lagen. Eine Störung der RT-qPCR für das FSME-Virus wurde dadurch minimiert. Nach der RNA-Extraktion und der cDNA-Synthese, wurden die Proben in den verschiedenen Uniplex- und Multiplex-Systemen gemessen.

**Tab. 31: Vergleich der Sensitivität des NS1-Protein-Multiplex-Systems für das FSME-Virus und FCV mit den Uniplex-Systemen für beide Viren.<sup>a</sup>**

Verdünnung des FSME-Virus Zellkulturüberstands	C <sub>q</sub> -Mittelwert (SD) der FSME-Virus-PCR		C <sub>q</sub> -Mittelwert (SD) der FCV-PCR	
	Uniplex-System	Multiplex-System	Uniplex-System	Multiplex-System
10 <sup>-1</sup>	22,75 (0,08)	22,88 (0,07)	34,58 (2,09)	34,05 (0,81)
10 <sup>-2</sup>	25,82 (0,07)	25,87 (0,30)	32,96 (0,12)	32,24 (0,44)
10 <sup>-3</sup>	29,01 (0,10)	29,28 (0,06)	33,17 (0,21)	32,75 (0,26)
10 <sup>-4</sup>	32,55 (0,42)	32,96 (0,93)	33,39 (0,08)	32,95 (0,14)
10 <sup>-5</sup>	negativ	34,61 (1,37)	32,57 (0,32)	33,21 (0,28)
0	negativ	negativ	33,09 (0,59)	32,93 (0,01)
Negativkontrolle	negativ	negativ	negativ	negativ

<sup>a</sup> Zellkulturüberstand von mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten Zellen wurde in 1:10 Verdünnungen vor der RNA-Extraktion humanen Seren zugesetzt. Als interne Kontrolle diente Zellkulturüberstand von mit FCV infizierten Zellen, der ebenfalls vor der RNA-Extraktion den humanen Seren zugesetzt wurde. Alle Proben wurden in Vierfachbestimmungen gemessen.  $C_q$ : Schwellenwertzyklus, SD: Standardabweichung.

Es zeigte sich, dass das Multiplex-System eine den Uniplex-Systemen vergleichbare Sensitivität besaß (Tab. 31). FSME-Virus-RNA wurde im Multiplex- etwas besser als im Uniplex-System nachgewiesen. FCV-RNA ließ sich ebenfalls in beiden RT-qPCR-Systemen nachweisen, die  $C_q$ -Werte stiegen allerdings mit hohen FSME-Viruskonzentrationen an. Die Ergebnisse zeigten, dass die NS1-Protein-RT-qPCR als Multiplex-System für die Humandiagnostik mit interner Kontrolle geeignet war.

### C.1.5.5 Etablierung der NS1-Protein-RT-qPCR als *one-step*-Anwendung

Für die Humandiagnostik eignet sich eine *one-step*-Anwendung besser als eine *two-step*-Anwendung, da das Kontaminationsrisiko durch Zusammenfassen des cDNA-

Syntheseschritts mit dem cDNA-Amplifikationsschritt reduziert wird und ein Ergebnis schneller vorliegt. Zur Etablierung der *one-step*-Anwendung wurden verschiedene *one-step-Kits*, Magnesium- und Primerkonzentrationen sowie *real-time*-Geräte ausgetestet, um eine optimale Sensitivität zu erreichen. Für die Tests wurden aus Zellkultur extrahierte FSME-Virus-RNA und -cDNA bzw. FCV-RNA und -cDNA verwendet. Getestet wurde das intern verfügbare *Qiagen Quantitect Onestep Kit* gegen das *Invitrogen Onestep Kit* nach Protokollen des Herstellers mit den für das *two-step*-System ermittelten Primer- und Sonden-Konzentrationen. Es zeigte sich, dass das *Invitrogen Kit* FSME-Virus-RNA und cDNA sowie FCV-RNA und cDNA wesentlich besser detektierte als das *Qiagen Kit*. Außerdem führte das *Qiagen Kit* im Gegensatz zum *Invitrogen Kit* teilweise zu falsch-negativen oder -positiven Ergebnissen (Tab. 32).

**Tab. 32: Vergleich der *one-step-Kits* von Invitrogen und Qiagen mit der NS1-Protein-RT-qPCR.** <sup>a</sup>

Probe	C <sub>q</sub> -Mittelwert für FSME-Virus-PCR (SD)		C <sub>q</sub> -Mittelwert für FCV-PCR (SD)	
	<i>Invitrogen</i>	<i>Qiagen</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>Qiagen</i>
FSME-Virus-RNA	29,94 (0,41)	33,26	negativ	negativ
FCV-RNA	negativ	42,38	29,50 (0,46)	29,33 (0,40)
FSME-Virus und FCV-RNA	29,63 (0,41)	31,17 (3,87)	29,95 (0,23)	30,02 (0,35)
FSME-Virus-cDNA	32,38 (1,17)	27,86 (0,84)	negativ	33,35
FCV-cDNA	negativ	negativ	32,51 (0,53)	negativ
FSME-Virus und FCV-cDNA	31,20 (1,30)	44,67	32,07 (0,47)	35,68

<sup>a</sup> FSME-Virus-RNA und -cDNA bzw. FCV-RNA und -cDNA wurden in Doppelbestimmungen mit dem *one-step-Kits* von Invitrogen und Qiagen gemessen. C<sub>q</sub>: Schwellenwertzyklus, SD: Standardabweichung.

Aus diesem Grund wurde das *Invitrogen Kit* für die weitere Optimierung verwendet. Das *Invitrogen Kit* verfügt über die Möglichkeit die MgSO<sub>4</sub>-Konzentration zu verändern, um die Spezifität und Sensitivität der PCR zu erhöhen. Ebenso kann die Primerkonzentration angepasst werden. Die PCR-Primer werden in einer *one-step*-Anwendung zusätzlich zur Amplifikation der cDNA auch noch für die cDNA-Synthese verwendet. Deshalb wurde überprüft, ob die Primerkonzentration erhöht werden musste. In Tab. 33 und Tab. 34 sind die Ergebnisse der Austestung zu sehen.

## Ergebnisse

**Tab. 33: Optimierung der Primerkonzentration des *one-step-Kits* von Invitrogen für die NS1-Protein-RT-qPCR. <sup>a</sup>**

FSME-Virus- verdünnung	C <sub>q</sub> -Mittelwert die FSME-Virus-PCR			C <sub>q</sub> -Mittelwert für die FCV-PCR		
	<i>Primerkonzentration</i>					
	<i>300 nm</i>	<i>600 nm</i>	<i>1.200 nm</i>	<i>300 nm</i>	<i>600 nm</i>	<i>1.200 nm</i>
10 <sup>-1</sup>	25,55	25,54	25,62	32,65	17,37	32,42
10 <sup>-2</sup>	29,43	28,48	28,25	30,1	31,9	32,73
10 <sup>-3</sup>	35,88	34,16	32,96	23,66	32,43	31,86

<sup>a</sup> Mit FSME-Virus bzw. FCV versetzte Proben wurden mit dem *one-step-Kit* von Invitrogen bei drei verschiedenen Primerkonzentrationen gemessen. C<sub>q</sub>: Schwellenwertzyklus.

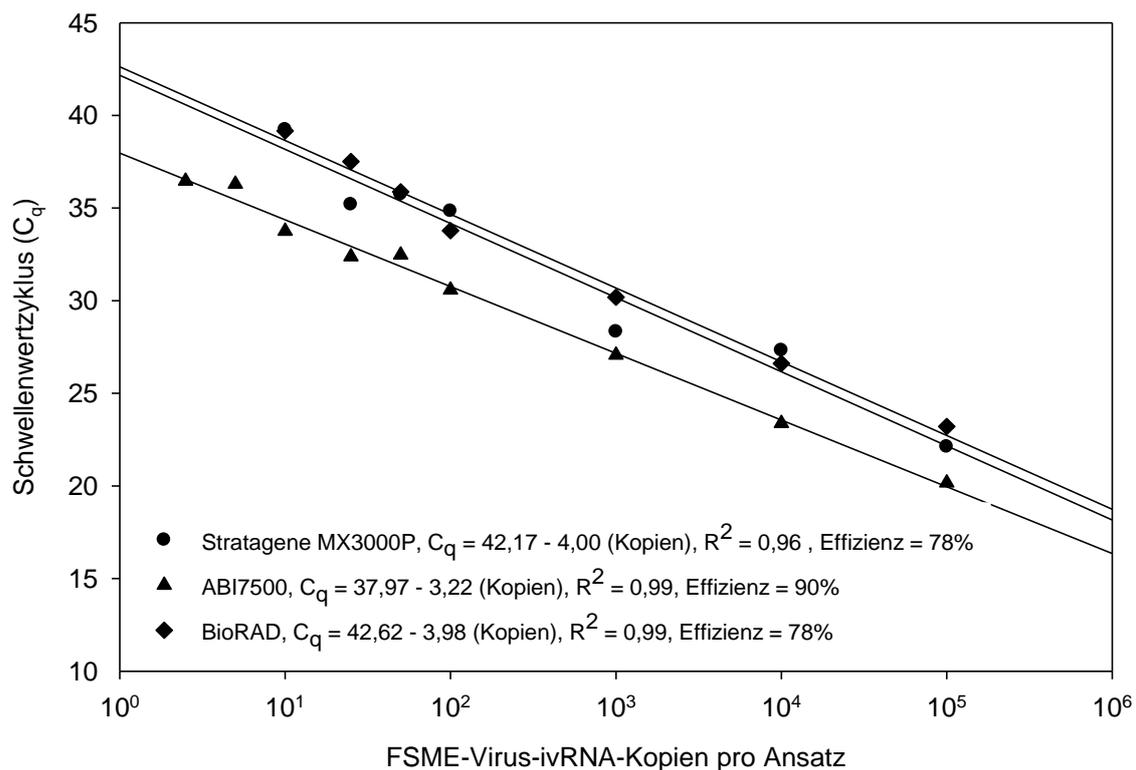
**Tab. 34: Optimierung der MgSO<sub>4</sub>-Konzentration des *one-step-Kits* von Invitrogen für die NS1-Protein-RT-qPCR. <sup>a</sup>**

FSME-Virus- verdünnung	C <sub>q</sub> -Mittelwert die FSME-Virus-PCR			C <sub>q</sub> -Mittelwert für die FCV-PCR		
	<i>MgSO<sub>4</sub>-konzentration</i>					
	<i>3 mM</i>	<i>4 mM</i>	<i>5 mM</i>	<i>3 mM</i>	<i>4 mM</i>	<i>5 mM</i>
10 <sup>-1</sup>	25,96	25,65	25,21	negativ	negativ	negativ
10 <sup>-2</sup>	28,94	28,66	28,86	34,17	negativ	negativ
10 <sup>-3</sup>	33,37	33,31	34,43	31,72	36,81	25,99

<sup>a</sup> Mit FSME-Virus bzw. FCV versetzte Proben wurden mit dem *one-step-Kit* von Invitrogen bei drei verschiedenen MgSO<sub>4</sub>-Konzentrationen gemessen. C<sub>q</sub>: Schwellenwertzyklus.

Eine MgSO<sub>4</sub>-Konzentration von 3 mM und eine Verdopplung der Primerkonzentration auf 1200 nm erwiesen sich als optimal. Diese Konzentrationen wurden für die weitere Evaluierung verwendet.

Die Geräteabhängigkeit der RT-qPCR-Systeme wurde mit drei *real-time*-Geräten überprüft, dem *MX3000 Cycler* von Stratagene, dem *ABI7500 Cycler* von Applied Biosystems und dem *SFX96 Cycler* von Bio-Rad. Hierzu wurde ivRNA des FSME-Virusstammes K23 in verschiedenen Konzentrationen mit allen drei Geräten gemessen. Aus den Ergebnissen wurde für jedes Gerät eine Standardkurve erstellt (Abb. 18).



#### Abb. 18: Geräteabhängigkeit der NS1-Protein-RT-qPCR.

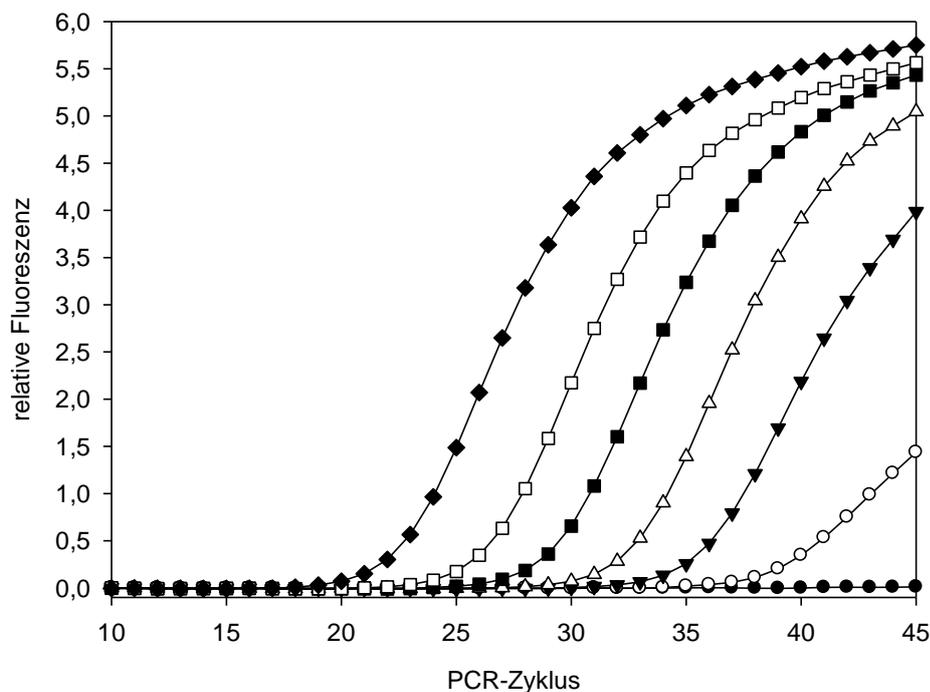
Die Standardkurven (Linie) basieren auf einer Verdünnungsreihe von K23-ivRNA. Der jeweilige Schwellenwertzyklus für jede Verdünnungsstufe wurde gegen die Kopienzahl der Verdünnungsstufe aufgetragen (Punkte, Karos, Dreiecke). Jede Verdünnungsstufe wurde in Doppelbestimmung gemessen. Die RT-qPCR-Effizienz wurde mit der Formel  $\text{Effizienz} = 10^{[-1/\text{Steigung}]} - 1$  bestimmt.  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß.

Der *ABI7500 Cycler* erbrachte die besten Ergebnisse, da sich mit ihm noch kleinere RNA-Mengen als mit den anderen beiden *Cycler* nachweisen ließen und auch die Standardkurve eine bessere Effizienz zeigte. Die weiteren Untersuchungen zu den Eigenschaften der RT-qPCR-Systeme wurden aus diesem Grund in einem *ABI7500 Cycler* durchgeführt.

#### C.1.5.6 Eigenschaften der RT-qPCR-Systeme

Die Eigenschaften und Charakteristika der RT-qPCR-Systeme wurden mittels *in vitro*-transkribierter RNA des FSME-Virusstammes K23 (K23-ivRNA) ermittelt. Die Auswertung und Bewertung der Ergebnisse erfolgte nach den MIQE- (*minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments*-) Richtlinien nach Bustin *et al.* (2009).

Abb. 19 zeigt beispielhaft die in der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR gemessenen relativen Fluoreszenzen für eine K23-ivRNA-Verdünnungsreihe. Die relative Fluoreszenz wurde gegen den jeweiligen PCR-Zyklus aufgetragen. Anhand der Kurven wurde dann der sogenannte Schwellenwertzyklus ( $C_q$ ) bestimmt, ab dem eine relative Fluoreszenz gemessen werden konnte.

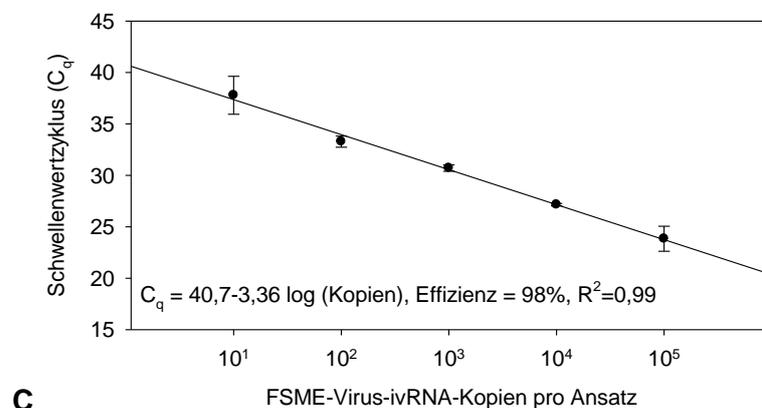
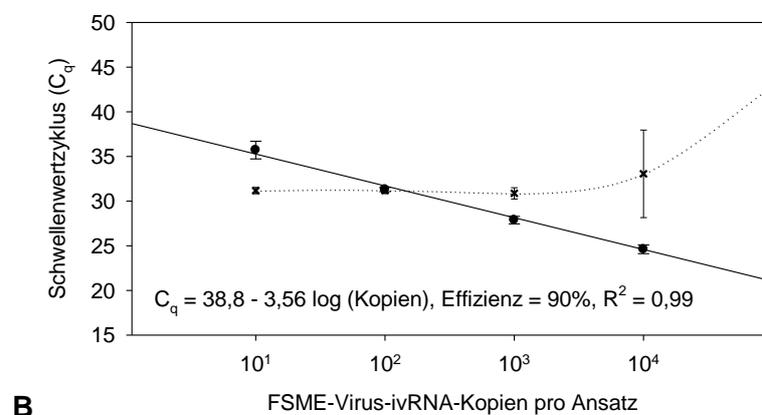
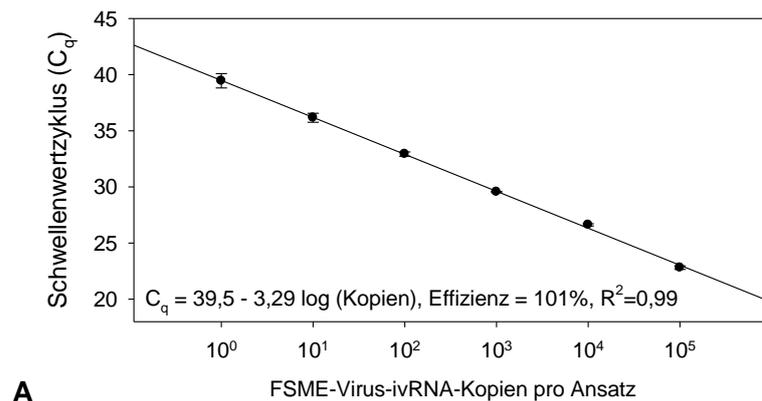


**Abb. 19:** In der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR gemessene relative Fluoreszenzen aufgetragen gegen den PCR-Zyklus zur Ermittlung einer Standardkurve.

Die Abbildung zeigt beispielhaft die in der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR gemessenen relativen Fluoreszenzen für eine ivRNA-Verdünnungsreihe. Die relative Fluoreszenz wurde gegen den jeweiligen PCR-Zyklus aufgetragen. Anhand der Kurven wurde dann der sogenannte Schwellenwertzyklus ( $C_q$ ) bestimmt, ab dem eine relative Fluoreszenz gemessen werden konnte.

Zur Erzeugung einer Standardkurve wurde die K23-ivRNA-Konzentration gegen die ermittelten  $C_q$ -Werte aufgetragen. Mit Hilfe der Standardkurven wurden die Standardgleichungen, die Effizienzen der RT-qPCR-Systeme und das Bestimmtheitsmaß ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle RT-qPCR-Systeme eine hohe Effizienz von über 90 % und ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,99$  aufweisen. Abb. 20 B zeigt außerdem, dass die gleichzeitige Amplifikation von FCV und FSME-Virus keinen Einfluss auf die FSME-Virusdetektion und die Effizienz der *one-step*-NS1-Protein-RT-qPCR hat. Die  $C_q$ -Werte für FCV steigen jedoch etwas mit zunehmender FSME-Viruskonzentration.

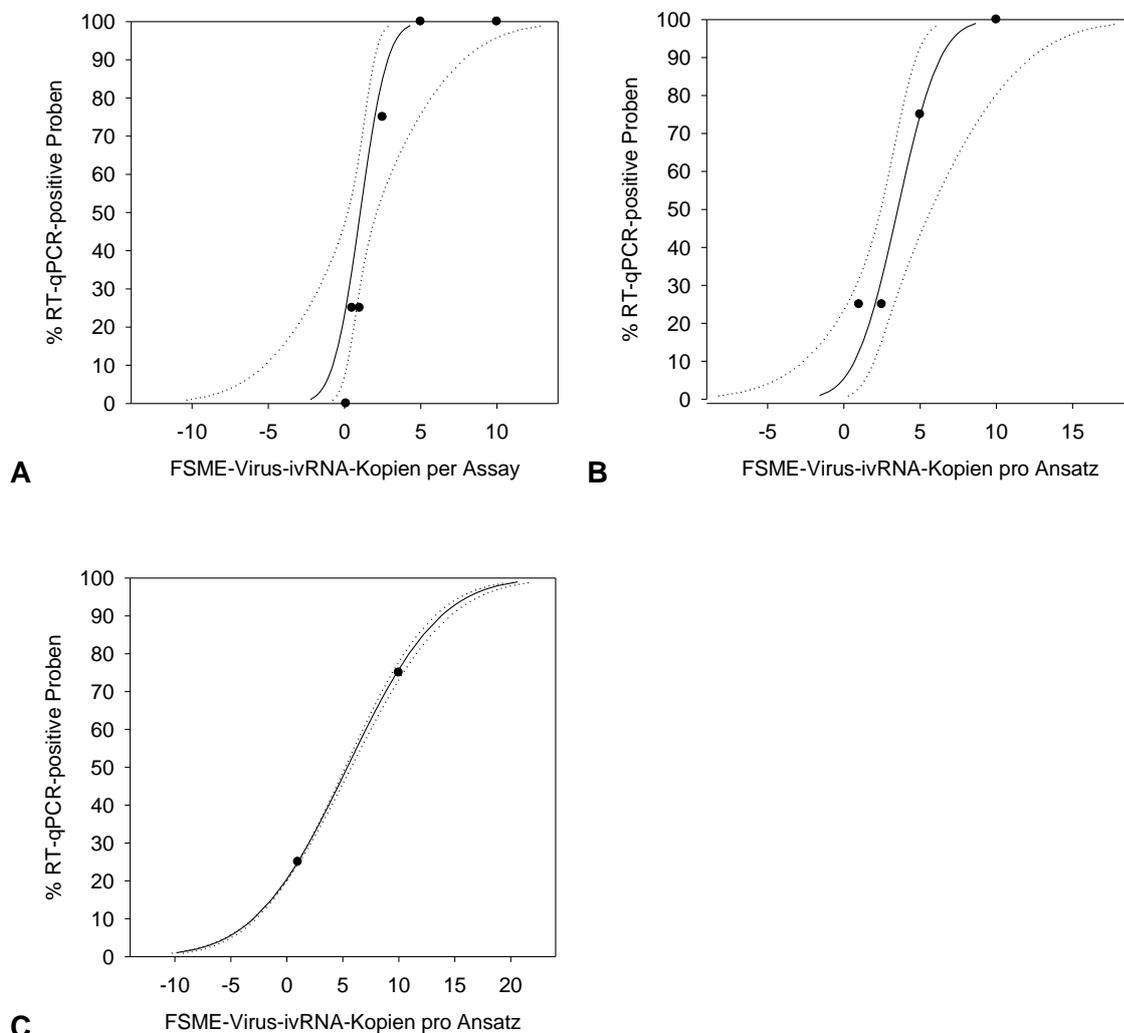


**Abb. 20: Standardkurven für die *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR (A), die *one-step*-NS1-Protein-RT-qPCR (B) und die E-Protein-RT-qPCR.**

Die Standardkurve (Linie) basiert auf einer Verdünnungsreihe von K23-ivRNA. Der jeweilige Schwellenwertzyklus für jede Verdünnungsstufe wurde gegen die Kopienzahl der Verdünnungsstufe aufgetragen (Punkte). Jede Verdünnungsstufe wurde in acht Wiederholungen gemessen. Die RT-qPCR-Effizienz wurde mit der Formel  $10^{[-1/\text{Steigung}]} - 1$  bestimmt.  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß. Für die *one-step*-NS1-Protein-RT-qPCR wurden die Proben jeweils mit ca. 50 Kopien FCV-RNA versetzt, um den Ablauf der RT-qPCR zu überprüfen. Die für FCV erhaltenen  $C_q$ -Werte sind als gepunktete Linie dargestellt. Die RT-qPCR-Effizienz wurde mit der Formel  $\text{Effizienz} = 10^{[-1/\text{Steigung}]} - 1$  bestimmt.  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß.

## Ergebnisse

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze bei 50 %- bzw. 95 %-Nachweiswahrscheinlichkeit wurde eine Probit-Analyse für jedes RT-qPCR-System durchgeführt. Hierzu wurde der Prozentsatz PCR-positiver getesteter Proben für eine bestimmte ivRNA-Kopienzahl gegen die entsprechende ivRNA-Kopienzahl aufgetragen (Abb. 21).



**Abb. 21: Probit-Analysen der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR (A), *one-step*-NS1-Protein-RT-qPCR (B) und E-Protein-RT-qPCR (C).**

Die Probit-Analyse wurde mit einer K23-ivRNA-Verdünnungsreihe in jeweils acht Wiederholungen für die *one-step*- und *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR durchgeführt und für die E-Protein-RT-qPCR in jeweils vier Wiederholungen. Die Grafik zeigt den erwarteten Anteil positiver Ergebnisse für eine bekannte ivRNA-Konzentration (Linie), die 95 %-Konfidenzintervalle (gepunktete Linie) und den beobachteten Anteil positiver Ergebnisse (Punkte). Für die *one-step*-NS1-Protein-RT-qPCR wurden die Proben jeweils mit ca. 50 Kopien FCV-RNA versetzt.

Die 50 %- bzw. 95 %-Nachweiswahrscheinlichkeit lag bei der *one-step*-NS1-RT-qPCR bei vier bzw. sieben RNA-Kopien, bei der *two-step*-RT-qPCR bei einer bzw. drei und bei der E-Protein-RT-qPCR bei fünf bzw. 16 RNA-Kopien pro Ansatz. Als Nachweisgrenze für Anwendungen in der Humandiagnostik wurde die Kopienzahl gewählt, bei der eine

95 %-Nachweiswahrscheinlichkeit gewährleistet ist. Für die Forschung wurde die Kopienzahl als Nachweisgrenze gewählt, bei der eine 50 %-Nachweiswahrscheinlichkeit gegeben ist.

Die *Intra*- und *Interassay*-Präzision wurde ebenfalls bestimmt. Durch diese wurde auf die Reproduzierbarkeit der RT-qPCR-Systeme geschlossen. Hierzu wurden Proben an mehreren Tagen bzw. mehrere Aufreinigungen des gleichen Ausgangsmaterials gemessen. Die Standardabweichung der  $C_q$ -Varianz für alle RT-qPCR-Systeme lag zwischen 1,74 und 0,16 (Tab. 35).

**Tab. 35: *Intra*- und *Interassay* der RT-qPCR-Systeme. <sup>a</sup>**

		NS1-Protein-RT-qPCR						E-Protein-RT-qPCR		
		<i>one-step-System</i>			<i>two-step-System</i>			<i>two-step-System</i>		
<i>RNA-Kopien</i>		$10^2$	$10^4$	$10^5$	$10^2$	$10^4$	$10^6$	$10^2$	$10^4$	$10^6$
<i>Intra-assay</i>	<i>SD der <math>C_q</math>-Varianz</i>	0,40	0,31	0,43	0,32	0,16	0,20	1,34	0,96	1,27
	<i>n detektiert/gesamt</i>	8/8	8/8	8/8	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9	9/9
<i>Inter-assay</i>	<i>SD der <math>C_q</math>-Varianz</i>	0,46	0,60	0,59	1,74	0,82	0,68	0,93	0,37	1,11
	<i>n detektiert/gesamt</i>	16/16	16/16	16/16	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12

<sup>a</sup> Die Proben für die NS1-Protein-RT-qPCR wurden je Ansatz mit ca. 50 Kopien FCV-RNA versetzt. n: Anzahl,  $C_q$ : Schwellenwertzyklus, SD: Standardabweichung.

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Probenmaterialien auf die NS1-Protein-RT-qPCR wurden Zecken-, humane Serum- und Mäusegehirnproben mit FSME-Virus enthaltenden Zellkulturüberständen in verschiedenen Verdünnungen versetzt und mit der PCR getestet. Die  $C_q$ -Werte sind in Tab. 36 abgebildet und zeigten keine Hinweise auf inhibitorische Effekte.

**Tab. 36: Einfluss von unterschiedlichem Probenmaterial auf die NS1-Protein-RT-qPCR. <sup>a</sup>**

Viruskonzentration (PFU/ $\mu$ l)	$C_q$ Mittelwert (SD)		
	<i>Zecke</i>	<i>Mäusegehirn</i>	<i>humanes Serum</i>
$10^3$	25,37 (0,33)	26,19 (0,37)	25,82 (0,22)
$10^2$	29,87 (0,25)	28,16 (0,29)	28,76 (0,16)
$10^1$	32,93 (0,17)	33,35 (0,24)	32,32 (0,02)

<sup>a</sup> Zellkulturüberstand von mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten Zellen wurde in drei verschiedenen Verdünnungsstufen vor der RNA-Extraktion den Proben zugesetzt. Die Proben wurden in Dreifachansätzen mit der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR gemessen. PFU: *plaque forming units*,  $C_q$ : Schwellenwertzyklus, SD: Standardabweichung.

Zur Validierung der Methode wurden außerdem 34 humane Liquorproben von Patienten mit neurologischen Symptomen und bestätigter FSME-Virusserologie aus dem

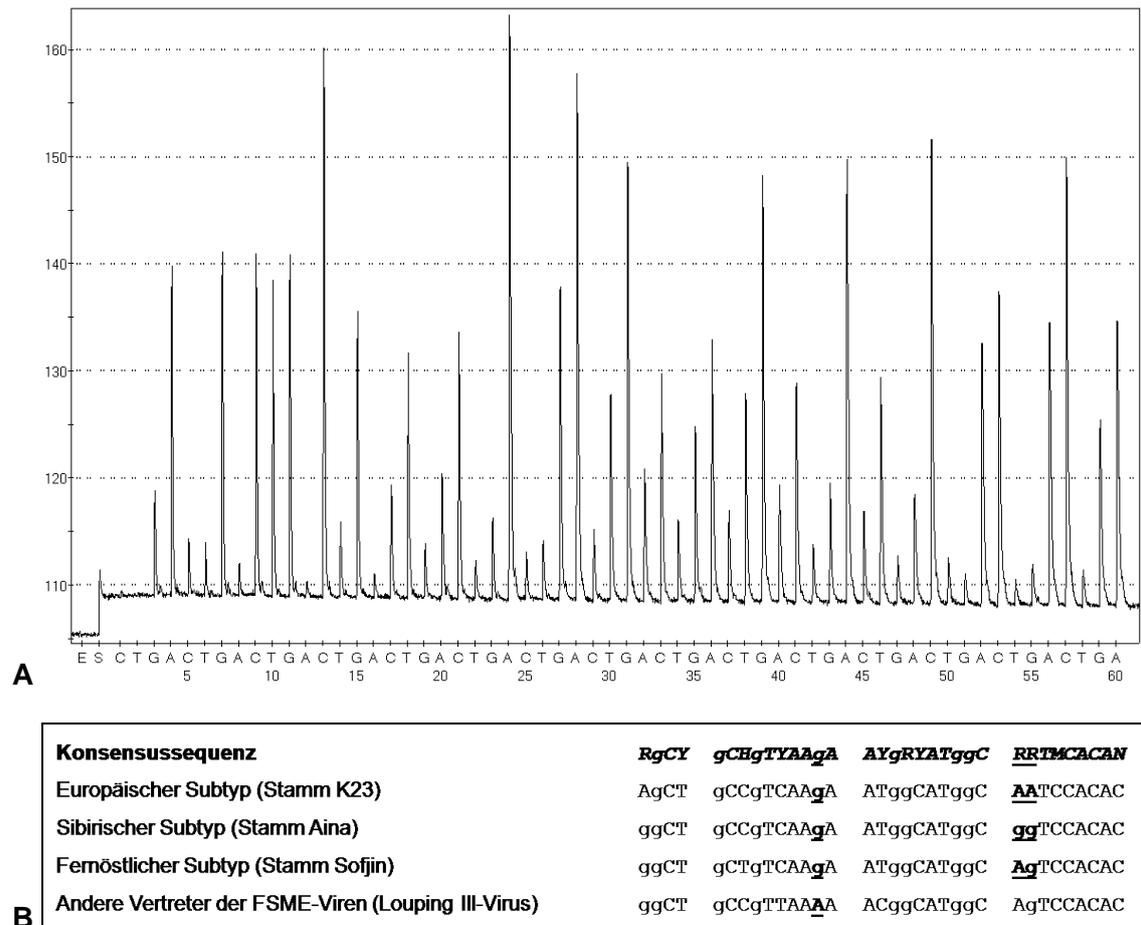
Universitätsklinikum Freiburg mittels der *one-step*-NS1-Protein-RT-qPCR getestet. FSME-Virus-RNA konnte in einer von 34 Proben nachgewiesen werden.

Mit den etablierten RT-qPCR-Systemen ließen sich alle FSME-Virussubtypen spezifisch, sensitiv und reproduzierbar in verschiedenen Probenmaterialien und klinischen Proben nachweisen und quantifizieren, jedoch konnte die Bestimmung des genauen Virussubtyps nur über eine anschließende Sequenzierung PCR-positiver Proben erfolgen.

### **C.1.6 Etablierung der *Pyrosequencing*-Methode zur Bestimmung des FSME-Virussubtyps in RT-qPCR-positiven Proben**

Die Methode des *Pyrosequencings* ermöglicht es festzustellen, welcher FSME-Virussubtyp vorliegt. Das *Pyrosequencing* kann im Anschluss an die NS1-Protein-RT-qPCR für PCR-positive Proben durchgeführt werden. Hierfür wurde die NS1-Protein-RT-qPCR mit einem biotinylierten FSMEV NS1 Rev-Primer durchgeführt. Für die *Pyrosequencing*-Reaktion wurde ein *Pyrosequencing*-Primer entworfen, von dem die Sequenzierung nach dem Prinzip der Strangverlängerung startet. Das *Pyrosequencing* ergibt eine bis zu 30 bp lange Sequenz in weniger als einer Stunde, an Hand derer der FSME-Virussubtyp bestimmt werden kann.

Zur Überprüfung der Methode wurden in der PCR amplifizierte Plasmide aller drei Subtypen in verschiedenen Konzentrationen und amplifizierte cDNA des Louping III-Virus (LIV) getestet. Die erhaltenen Sequenzen und ein Beispielpyrogramm für den FSME-Virusstamm K23 sind in Abb. 22 dargestellt. Die Bestimmung des jeweiligen FSME-Virussubtyps war bis zu einer Menge von 100 in die PCR eingesetzten Kopien möglich. Das LIV konnte ebenfalls detektiert und typisiert werden.



**Abb. 22: Pyrogramm für den Virusstamm K23 (europäischer Subtyp) (A) sowie Alignment der aus dem *Pyrosequencing* erhaltenen Sequenzen für die drei humanpathogenen FSME-Virussubtypen und andere Vertreter der FSME-Viren (B). Fettgedruckte, unterstrichene Basen dienen der Subtypidentifizierung.**

### **C.2 Identifizierung eines Indikators für die Verbreitung des FSME-Virus**

Nach Etablierung der Nachweismethoden für das FSME-Virus konnte damit begonnen werden, einen Indikator zu identifizieren, mit dessen Hilfe eine Untersuchung der FSME-Virusverbreitung möglich ist und mittels dem festgelegt werden kann, ob einem Gebiet der Status eines Risikogebietes für das FSME-Virus zukommt.

Die Ermittlung von FSME-Risikogebieten erfolgt in Deutschland anhand von erfassten humanen Fällen durch das Robert Koch-Institut. Eine steigende Impfrate und eine niedrige Bevölkerungsdichte können daher zu Problemen bei der Ausweisung eines Gebietes als Risikogebiet für das FSME-Virus führen. Die Mehrzahl der Risikogebiete liegt im Süden Deutschlands, jedoch sind in den letzten Jahren auch in nördlicheren Regionen, z.B. in Brandenburg, vereinzelt Fälle von FSME aufgetreten.

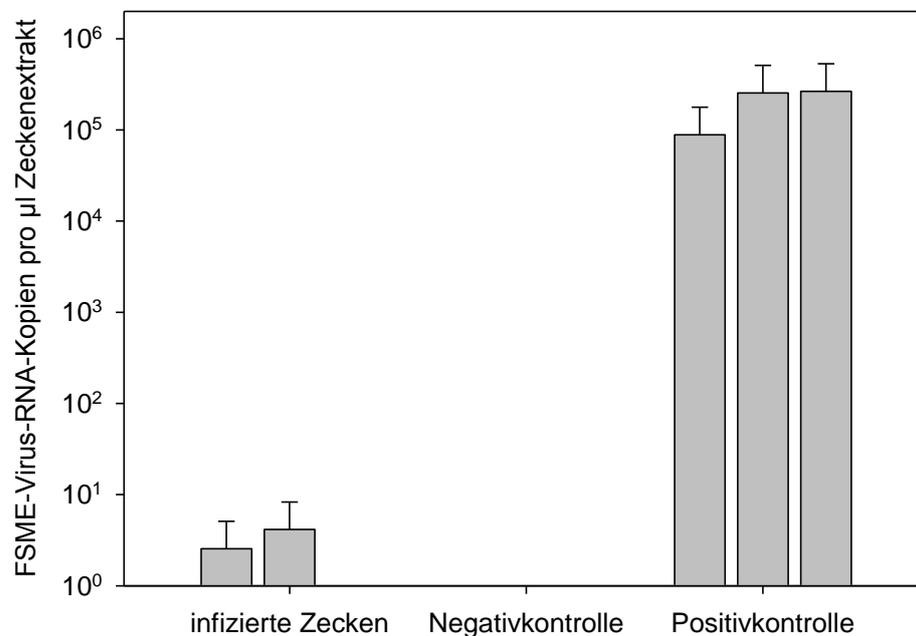
Zur Verbesserung der Datenlage für die Ausweisung von Risikogebieten wurde überprüft, ob die Untersuchung von Zecken und Nagern, welche als Vektoren bzw. Hauptwirte gelten, sich für eine Verbreitungsstudie eignen. In diesem Zusammenhang wurde analysiert, ob sich das FSME-Virus in im Labor infizierten Zecken und Nagern nachweisen lässt. Weiterhin wurde der Verlauf einer FSME-Virusinfektion in Nagern untersucht sowie in welchen Organen das Virus repliziert und ggf. persistiert, um für die eine Untersuchung geeignete Organe zu identifizieren. Zur Überprüfung der Eignung des ermittelten Indikators sollte anschließend die FSME-Virusverbreitung für das Bundesland Brandenburg anhand von Nager- oder Zeckenproben analysiert werden.

#### **C.2.1 Nachweis des FSME-Virus in Zecken**

Zecken sind die Hauptvektoren des FSME-Virus und können deshalb mittels PCR auf FSME getestet werden. Zunächst wurde daher untersucht, ob sich das FSME-Virus mit der neu etablierten NS1-Protein-RT-qPCR in mit FSME-Virus infizierten Zecken nachweisen lässt. Hierzu wurden im Labor gezüchtete *Ixodes ricinus* Nymphen mit der NS1-Protein-RT-qPCR getestet. Die Nymphen wurden durch Saugen an FSME-Virus-positiven Mäusen infiziert. Als Negativkontrolle dienten im Labor gezüchtete nicht infizierte Zecken. Für die Positivkontrolle wurden Zecken vor der RNA-Extraktion mit Zellkulturüberstand einer mit FSME-Virus infizierten Zellkultur versetzt.

Die Ergebnisse in Abb. 23 zeigen, dass die nachweisbaren Virusmengen in den infizierten Zecken sehr gering sind (<10 RNA-Kopien/ $\mu$ l Zeckenextrakt) und in einer der

infizierten Zecken keine FSME-Virus-RNA nachgewiesen werden konnte. Mit Zellkulturüberstand versetzte Proben waren eindeutig positiv, die nicht infizierten Kontrollzecken negativ.



**Abb. 23: Untersuchung von mit FSME-Virus infizierten *Ixodes ricinus* Zecken.** <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Aus neun mit FSME-Virus infizierten *Ixodes ricinus* Nymphen aufgereinigte RNA wurde mit der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmungen. Als Negativkontrolle dienten im Labor gezüchtete nicht infizierte Zecken. Für die Positivkontrolle wurde nicht infizierten Zecken vor der RNA-Extraktion FSME-Virus enthaltender Zellkulturüberstand zugesetzt. Jeder Balken stellt den Virusgehalt von einer der neun untersuchten Zecken dar (Balken von Zecken, in denen keine FSME-Virus-RNA nachgewiesen werden konnte, sind daher nicht vorhanden).

Weiterhin wurden 193 Zecken aus Lettland, einem Hochendemiegebiet für das FSME-Virus, mit der NS1-Protein-RT-qPCR untersucht, um abzuschätzen, inwieweit sich die Testung von Zecken für die Untersuchung der FSME-Virusverbreitung in Brandenburg eignet. In 5,7 % (11 von 193) der Zecken aus Lettland konnte FSME-Virus-RNA nachgewiesen werden. Allerdings lagen die Virusmengen im Mittel mit zwei RNA-Kopien pro µl Zeckenextrakt nur knapp über der Nachweisgrenze der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR.

### C.2.2 Organtropismus und Persistenz des FSME-Virus in Feldmäusen (*Microtus arvalis*)

Nager gelten als einer der Hauptwirte des FSME-Virus. Sie können eine persistierende Infektion entwickeln und so als Reservoir für das Virus dienen. Sie kommen daher ebenfalls als Kandidaten für eine Verbreitungsstudie des FSME-Virus in Frage. Aus der wissenschaftlichen Literatur ist wenig über die Persistenz des FSME-Virus in Nagern bekannt.

Zur Ermittlung von Persistenz und Zeitverlauf der Infektion wurden Nager der Spezies *Microtus arvalis* (Feldmäuse) im Labor kontrolliert mit dem FSME-Virus infiziert. Nach 0, 5, 20, 30, 50 und 100 Tagen wurden jeweils zwei bis drei Nager getötet und Gehirn, Herz, Leber, Milz und Nieren sowie Blut entnommen. Mittels der NS1-Protein-RT-qPCR wurden die Proben auf FSME-Virus-RNA untersucht.

Die Nager zeigten nach der Infektion keinerlei klinische Symptome einer Infektion oder Enzephalitis. Mit Hilfe der PCR ließ sich jedoch in einem Großteil der Organe FSME-Virus-RNA nachweisen (Tab. 37).

**Tab. 37: Untersuchung von mit FSME-Virus infizierten Feldmäusen (*Microtus arvalis*).<sup>a</sup>**

Organ	Anzahl positiv getesteter Proben / Gesamtanzahl Proben (Mittelwert der ermittelten Kopienzahl / mg Organ bzw. ml Blut)					
	0 dpi	5 dpi	20 dpi	30 dpi	50 dpi	100 dpi
Blut	0/1 (0)	1/2 (6 x 10 <sup>2</sup> )	0/3 (0)	0/4 (0)	1/3 (8 x 10 <sup>2</sup> )	0/3 (0)
Gehirn	0/1 (0)	1/2 (3 x 10 <sup>6</sup> )	1/3 (9 x 10 <sup>4</sup> )	0/4 (0)	2/3 (2 x 10 <sup>2</sup> )	2/3 (4 x 10 <sup>1</sup> )
Herz	n. d.	0/2 (0)	1/3 (3 x 10 <sup>1</sup> )	n. d.	1/3 (8 x 10 <sup>1</sup> )	2/3 (7 x 10 <sup>1</sup> )
Leber	n. d.	1/2 (7 x 10 <sup>1</sup> )	2/3 (6 x 10 <sup>1</sup> )	n. d.	1/3 (2 x 10 <sup>2</sup> )	3/3 (6 x 10 <sup>2</sup> )
Milz	0/1 (0)	1/2 (4 x 10 <sup>0</sup> )	1/3 (5 x 10 <sup>1</sup> )	1/4 (1 x 10 <sup>0</sup> )	1/3 (1 x 10 <sup>2</sup> )	2/3 (5 x 10 <sup>2</sup> )
Nieren	0/1 (0)	0/2 (0)	0/3 (0)	0/4 (0)	2/3 (6 x 10 <sup>1</sup> )	3/3 (1 x 10 <sup>2</sup> )

<sup>a</sup> RNA wurde aus Organen von mit FSME-Virus infizierten Feldmäusen extrahiert und mit der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmungen. dpi: Tage nach der Infektion (*days post infection*).

Die Viruslast schwankte zwischen den unterschiedlichen, untersuchten Organen und auch zwischen den verschiedenen Tieren über sechs Log-Stufen. Virus-RNA war in verschiedensten Organen über den gesamten Untersuchungszeitraum nachweisbar. Zu Beginn der Infektion war die Viruslast im Gehirn am höchsten, wobei die Nager keinerlei Anzeichen einer Hirnhautentzündung zeigten. Im Verlauf der Infektion ließ sich Virus-RNA in allen untersuchten peripheren Organen detektieren. Eine Virämie im Blut der Tiere war sowohl an Tag 5 als auch an Tag 50 nachweisbar.

Eine Virusanzucht von drei verschiedenen in der PCR-positiv getesteten Proben (Gehirn von Tag 5 und 100, sowie Leber von Tag 100) wurde durchgeführt, um infektiöses Virus nachzuweisen (Tab. 38). Aus allen drei Organen ließ sich Virus anzüchten, jedoch dauerte die Virusanzucht bei den Proben mit niedrigerer Viruslast bis zu 28 Tage.

**Tab. 38: Virusanzucht von FSME-Virus-PCR-positiv getesteten Organen. <sup>a</sup>**

Organ	dpi	Kopien/ml	FSME-Virus-PCR-positiv an Tag	Zell-Passagen
Gehirn	5	$6 \times 10^5$	5	0
Gehirn	100	$7 \times 10^2$	8	0
Leber	100	$1 \times 10^3$	28	2

<sup>a</sup> VeroE6-Zellen wurden mit einem Homogenisat der zu untersuchenden Organe inkubiert, der Überstand wieder abgenommen und die Zellen dann weiter kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde nach verschiedenen Zeiten mit der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht. dpi: Tage nach der Infektion (*days post infection*).

Die Viruslast der meisten positiv getesteten Nagerorgane schwankte zwischen zehn und 1.000 FSME-Virus-RNA-Kopien pro mg Organ und lag damit weitaus höher, als die Viruslast der zuvor in Kapitel C.2.1 untersuchten Zecken. Für die Untersuchung der FSME-Virusverbreitung in Brandenburg wurden daher Gehirn- und Milzproben von im Freiland gefangenen Nagern verwendet. Milz- und Gehirngewebe wurden gewählt, da sich in diesen Geweben über den gesamten Untersuchungszeitraum Virus nachweisen ließ, bzw. die höchsten Virusmengen gemessen wurden (Tab. 37).

### C.2.3 Studie zur Prävalenz des FSME-Virus in Nagern aus Brandenburg

Zur Untersuchung des FSME-Risikos in Brandenburg wurden über 100 Nagergehirne und 300 Nagermilzen auf FSME-Virus-RNA mit der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR untersucht. Diese stammten von Nagern, die in Brandenburg und umliegenden Bundesländern, sowie zum Vergleich in ausgewiesenen Risikogebieten oder FSME-freien Gebieten an verschiedenen Sammelorten im Freiland gefangenen wurden. Insgesamt wurden für die Studie über 400 Nager auf das FSME-Virus getestet.

Die Ergebnisse der NS1-RTqPCR zeigten, dass der Anteil an positiv getesteten Milzproben bei 11 % (30 von 317), jener der Gehirnproben ebenfalls bei 10 % (11 von 107) lag. Der Gesamtanteil positiver Nager lag damit bei rund 10 % (41 von 424). Eine Testung der Ergebnisse mit dem t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede (t-Test  $p > 0,05$ ) in der Verteilung positiver und negativer Ergebnisse bezogen auf die beiden untersuchten Organe. Für die weitere Auswertung und Erstellung einer

## Ergebnisse

Verbreitungskarte wurden daher die Daten der untersuchten Milz- und Gehirnproben gemeinsam betrachtet.

Das FSME-Virus konnte in *Apodemus agrarius* (Brandmaus), *Apodemus flavicollis* (Gelbhalsmaus), *Apodemus sylvaticus* (Waldmaus), *Microtus agrestis* (Erdmaus), *Microtus arvalis* (Feldmaus) und *Myodes glareolus* (Rötelmaus) nachgewiesen werden (Tab. 39).

**Tab. 39: Verteilung FSME-positiv und -negativ getesteter Proben bezogen auf die Spezies.<sup>a</sup>**

Spezies	Anzahl FSME-Virus-positiver Nager / Gesamtzahl untersuchter Nager (%)
<i>Apodemus agrarius</i> (Brandmaus)	3 / 24 (13 %)
<i>Apodemus flavicollis</i> (Gelbhalsmaus)	8 / 116 (7 %)
<i>Apodemus sylvaticus</i> (Waldmaus)	2 / 6 (33 %)
<i>Microtus agrestis</i> (Erdmaus)	7 / 101 (7 %)
<i>Microtus arvalis</i> (Feldmaus)	2 / 21 (10 %)
<i>Mus musculus</i> (Hausmaus)	0 / 4 (0 %)
<i>Myodes glareolus</i> (Rötelmaus)	19 / 152 (13 %)
<b>Gesamt</b>	<b>41 / 424 (10 %)</b>

<sup>a</sup> Aus Nagerproben extrahierte RNA wurde mit der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmungen. Die erhaltenen Daten wurden statistisch mit SPSS ausgewertet.

Die Durchseuchung der Spezies mit dem FSME-Virus schwankte zwischen 7 % und 33 %. In *Mus musculus* (Hausmaus) konnte das FSME-Virus nicht nachgewiesen werden, jedoch lag hier nur eine sehr kleine Probenmenge von vier Tieren vor.

Zwischen den Geschlechtern konnte ein Unterschied von FSME-Virus-positiven bzw. -negativen Tieren festgestellt werden, der jedoch im t-Test nicht signifikant war (t-Test  $p > 0,05$ ). So ließ sich das FSME-Virus in 11 % (24 von 192) der männlichen und in 8 % (17 von 190) der weiblichen Tiere nachweisen.

Bei Betrachtung des Alters zeigte sich, dass vor allem subadulte Nager (11 %, 11 von 91), welche die Geschlechtsreife noch nicht erreicht hatten, mit dem Virus infiziert waren. Wohingegen juvenile (6 %, 5 von 81) und adulte (4 %, 3 von 68) Nager eine geringere FSME-Virusdurchseuchung aufwiesen. Der Unterschied in der Prävalenz zwischen subadulten sowie adulten und juvenilen Nagern war dabei signifikant (t-Test  $p < 0,05$ ).

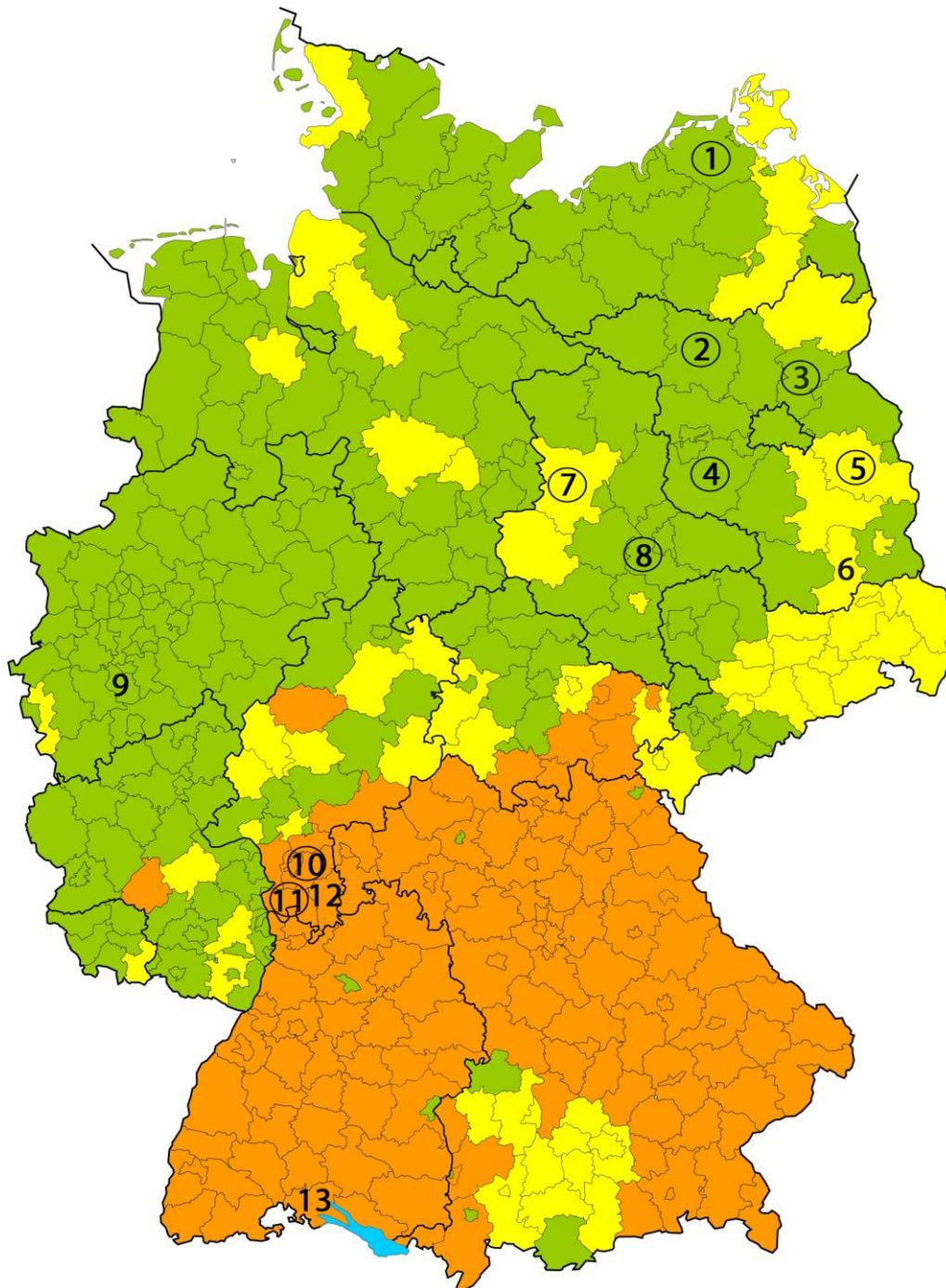
Der Anteil an FSME-positiven Nagern war in ausgewiesenen Risikogebieten signifikant höher (14 %, t-Test  $p < 0,05$ ) als in Regionen, die nicht als Risikogebiet ausgewiesen sind (8 %) (Tab. 40). Bei Aufschlüsselung der Ergebnisse nach Landkreisen zeigte sich

allerdings, dass die Durchseuchung der Nager mit dem FSME-Virus von Landkreis zu Landkreis stark schwankte (Tab. 40). Anhand der Karte (Abb. 24) ist zu erkennen, dass Landkreise, in denen FSME-positive Mäuse gefangen wurden, immer in Risikogebieten (orange) oder in Gebieten mit einzelnen, beobachteten FSME-Fällen (gelb) liegen oder an diese grenzen. In Köln, welches weit entfernt von allen Risikogebieten liegt und wo als Fanggebiet der Stadtpark diente, konnten keine FSME-positiven Mäuse gefunden werden. Allerdings wurden auch nicht in allen untersuchten Risikogebieten mit FSME-Virus infizierte Nager nachgewiesen. Für diese Gebiete lagen jedoch nur vergleichsweise kleine Probenmengen (<15) vor. Der Nachweis von FSME-Virus-RNA in Nagern aus bisher als FSME-frei geltenden Gebieten macht deutlich, wie wichtig es ist nach neuen Indikatoren für das FSME-Virus zu suchen.

**Tab. 40: Verteilung FSME-positiv und -negativ getesteter Proben bezogen auf den Fangort.**<sup>a</sup>

	Position auf der Landkarte und Landkreis, Bundesland	Anzahl FSME-Virus-positiver Nager / Gesamtzahl untersuchter Nager (%)
<b>nicht als FSME-Risikogebiete ausgewiesene Landkreise</b>	(1) Nordvorpommern, MVP	1 / 5 (20 %)
	(2) Ostprignitz-Ruppin, BB	4 / 60 (7 %)
	(3) Barnim, BB	10 / 98 (10,%)
	(4) Potsdam-Mittelmark, BB	4 / 69 (6 %)
	(5) Oder-Spree, BB	1 / 29 (3%)
	(6) Oberspreewald-Lausitz, BB	0 / 3 (0 %)
	(7) Börde, SA	2 / 19 (11 %)
	(8) Anhalt-Bitterfeld, SA	2 / 11 (18 %)
	(9) Köln, NRW	0 / 10 (0 %)
	<b>total</b>	<b>24 / 304 (8 %)</b>
<b>als FSME-Risikogebiete ausgewiesene Landkreise</b>	(10) Darmstadt-Dieburg, HE	1 / 22 (20 %)
	(11) Bergstraße, HE	16 / 79 (5 %)
	(12) Odenwaldkreis, HE	0 / 12 (0 %)
	(13) Konstanz, BW	0 / 7 (0 %)
	<b>total</b>	<b>17 / 120 (14 %)</b>

<sup>a</sup> Aus Nagerproben extrahierte RNA wurde mit der *two-step*-NS1-Protein-RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmungen. Die erhaltenen Daten wurden statistisch mit SPSS ausgewertet. BB: Brandenburg, BW: Baden-Württemberg, HE: Hessen, MVP: Mecklenburg-Vorpommern, NRW: Nordrheinwestfalen, SA: Sachsen.



**Abb. 24: Deutschlandkarte mit ausgewiesenen FSME-Risikogebieten auf Basis der vom RKI veröffentlichten Daten mit den Fangorten der untersuchten Nagetiere.**

Risikogebiete sind orange, Gebiete mit einzelnen beobachteten FSME-Fällen gelb und FSME-freie Gebiete grün unterlegt. Landkreise, aus denen Nagerproben untersucht wurden, sind mit einer Nummer versehen. In Landkreisen, in denen FSME positive Nager gefunden wurden, ist die Nummer mit einem Kreis umgeben. (1) Nordvorpommern, (2) Ostprignitz-Ruppin, (3) Barnim, (4) Potsdam-Mittelmark, (5) Oder-Spree, (6) Oberspreewald-Lausitz, (7) Börde, (8) Anhalt-Bitterfeld, (9) Köln, (10) Darmstadt-Dieburg, (11) Bergstraße, (12) Odenwaldkreis, (13) Konstanz.

### C.3 Entwicklung einer RNA-Interferenz-Strategie gegen FSME

In Europa und Asien verursacht das FSME-Virus eine der am häufigsten vorkommenden flaviviralen Infektionen des zentralen Nervensystems. Die durchgeführte FSME-Virusverbreitungsstudie in Brandenburg und Studien anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass in den letzten Jahren FSME-Virusinfektionen zugenommen haben und in Gebieten auftreten, die bisher als FSME-frei galten. Bisher gibt es keine Möglichkeit eine FSME-Virusinfektion gezielt zu behandeln. Bei einer Infektion mit dem FSME-Virus steht derzeit nur eine symptomatische Behandlung zur Verfügung. Die Entwicklung einer antiviralen Substanz ist daher wünschenswert.

siRNAs sind kleine ca. 21 bis 23 nt lange RNA-Moleküle, die bei Bindung an eine komplementäre RNA-Sequenz dazu führen, dass diese zerschnitten und abgebaut wird. Mit passenden siRNAs kann daher die Replikation eines RNA-Virus unterbunden bzw. reduziert werden. In Zukunft könnte ein derartiges Molekül z.B. die Virusreplikation in einem infizierten Organismus reduzieren, wie es bereits für die Japanische Enzephalitis in Mäusen gezeigt wurde. Für die Arbeit wurden siRNA-Moleküle entwickelt, welche komplementär zum RNA-Genom des FSME-Virus sind. Deren Wirksamkeit wurde in einem Zellkultursystem überprüft. Der in Deutschland als Impfvirus verwendete europäische FSME-Virustamm K23 diente in den Versuchen als Referenzstamm.

#### C.3.1 Auswahl und Herstellung der siRNA-Konstrukte sowie Entwicklung der Versuchsbedingungen

siRNAs können auf verschiedenen Wegen in Zellen eingebracht werden. Sie können sowohl direkt als auch als indirekt über Plasmide in die Zelle transfiziert oder durch virale Vektoren in die Zelle verbracht werden. Für die Entwicklung und Testung von siRNAs gegen das FSME-Virus wurde das Plasmid-basierte *siStrike U6 Hairpin Cloning System* von Promega ausgewählt, da das System einfach zu handhaben ist, eine hohe Transfektionseffizienz gewährleistet, nur kleine Mengen an synthetisch hergestellten siRNA-Molekülen gebraucht werden und die für die Versuche benötigten siRNA-Plasmidmengen in ausreichender Menge selbst produziert werden können. Außerdem enthält das *psiStrike*-Plasmid das Reportergen MGFP, mit dem die Transfektionseffizienz sowie die Anzahl von Zellen, die das Plasmid enthalten und damit siRNAs exprimieren, überprüft und bestimmt werden kann.

### C.3.1.1 Auswahl der siRNA-Sequenzen

Mit Hilfe des *siRNA Target Designers* von Promega wurden 50 siRNA-Sequenzen ermittelt, die komplementär zum FSME-Virusstamm K23 sind. Diese Sequenzen wurden einem BLAST gegen das humane und das murine Genom unterzogen. Es wurden nur solche Sequenzen berücksichtigt, die mehr als drei Basenpaare Unterschied zum humanen bzw. murinen Genom zeigten. Weiterhin wurde überprüft, welche siRNA-Sequenzen mit Sequenzen möglichst vieler verschiedener FSME-Virusstämme übereinstimmten. Für die weiteren Versuche wurden die drei in Tab. 41 aufgeführten siRNA-Sequenzen ausgewählt.

**Tab. 41: Alignments der komplementären siRNA-Sequenzen mit den Sequenzen der für die Versuche verwendeten FSME-Virusstämme.**<sup>a</sup>

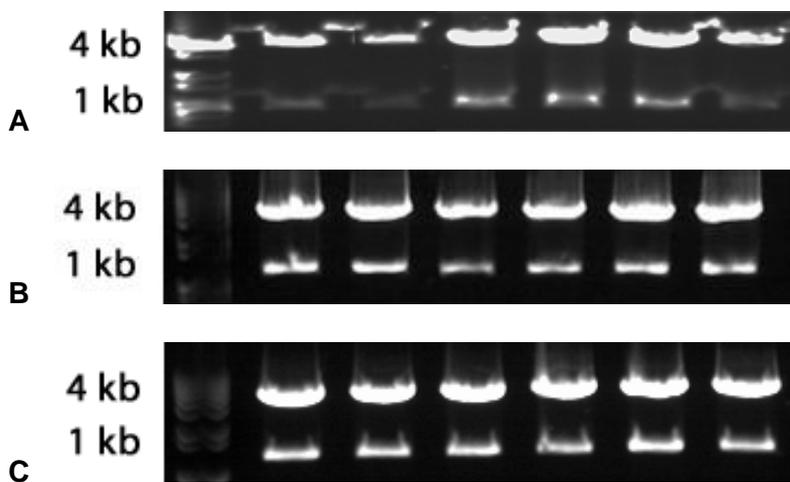
Virus bzw. siRNA	Sequenz (5' → 3')	Bindungsregion
<b>siRNA 1</b>	<b>gggACTggTTCAATgATCT</b>	E-Protein-kodierende Region
K23	gggACTggTT <u>T</u> AATg <u>A</u> CT	
Neudörfl	gggACTggTTCAATgATCT	
Aina	gggACTggTTCAATgATCT	
Sofjin	gggACTggTTCAATgATCT	
<b>siRNA 2</b>	<b>ggTCTTACgTACACAATgT</b>	E-Protein-kodierende Region
K23	ggTCTTACgTACACAATgT	
Neudörfl	ggTCTTACgTACACAATgT	
Aina	ggTCT <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> TACACAATgT	
Sofjin	ggTCTTAC <u>A</u> TACACAATgT	
<b>siRNA 3</b>	<b>gAggTggCTTCATAgAgAT</b>	E-Protein-kodierende Region
K23	gAggTggCTTCATAgAgAT	
Neudörfl	gAggTggCTTCATAgAgAT	
Aina	gAgg <u>A</u> ggCTTCATAgAgAT	
Sofjin	g <u>C</u> ggTggCTTCATAg <u>A</u> AT	

<sup>a</sup> Die entworfenen siRNA-Sequenzen sind in fettgedruckter Schrift dargestellt. Unterstrichene Buchstaben in den dazugehörigen Sequenzen der Virusstämme weisen auf Unterschiede zur siRNA-Sequenz hin.

Bei der Sequenz der siRNA 1 wurde an Position 11 ein T durch ein C ausgetauscht, da hierdurch die siRNA 1-Sequenz mit mehr Sequenzen anderer FSME-Virusstämme übereinstimmte. Tab. 41 zeigt ein Alignment der ausgewählten siRNA-Sequenzen mit den für die weiteren Versuche verwendeten Virusstämmen K23, Neudörfl, Aina und Sofjin. Unterschiede in den Sequenzen der siRNAs und der FSME-Virusstämme sind durch unterstrichene, fett gedruckte Buchstaben gekennzeichnet.

### C.3.1.2 Herstellung der siRNA-Plasmide

Die entworfenen siRNA-Sequenzen und die entsprechenden komplementären Sequenzen wurden nach Angaben des Promega *siStrike U6 Hairpin Cloning System Kits* als Oligonukleotide synthetisiert und in den psiStrike-Vektor kloniert. Der Einbau der siRNA in das Plasmid wurde mit einem PstI-Verdau überprüft. Wurde die siRNA erfolgreich eingebaut, entsteht eine zweite PstI-Restriktionsstelle. Bei einem Verdau wird ein Plasmid mit siRNA daher in zwei Teile zerschnitten und zwei Banden werden im Agarosegel sichtbar. Für jede siRNA wurden sechs Klone auf Einbau der siRNA überprüft. Der Restriktionsverdau der siRNA-Plasmide zeigte, dass alle untersuchten Plasmide eine siRNA enthalten (Abb. 25).



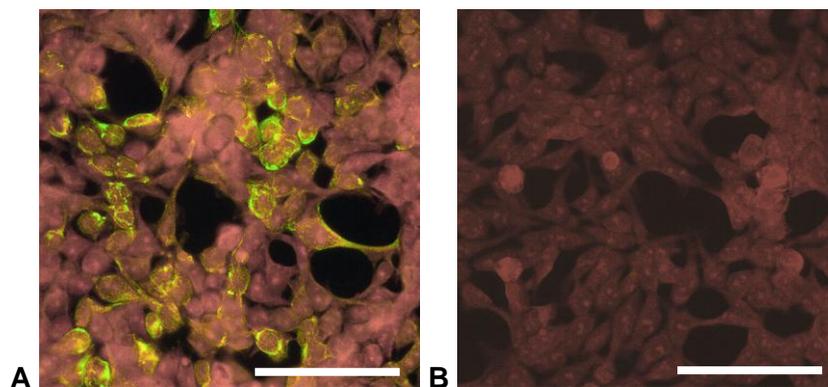
**Abb. 25: Agarosegel des Restriktionsverdaus der siRNA-Plasmide.**

Es wurden jeweils sechs siRNA-Plasmide für jede siRNA hergestellt. Die Plasmide wurden einem Restriktionsverdau mit dem Enzym PstI unterzogen und anschließend auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen: siRNA-Plasmide 1 (A), siRNA-Plasmide 2 (B) und siRNA-Plasmide 3 (C).

Durch eine Sequenzierung mit dem T7-Primer wurden die in den Plasmiden enthaltenen siRNA-Sequenzen auf Fehler überprüft, da die richtige siRNA-Sequenz wichtig für die spätere Bindung der siRNA an ihre Ziel-RNA ist. Zu Fehlern in der Sequenz kann es z.B. durch die Vermehrung der Plasmide in *E. coli* kommen. Die Sequenzierung des siRNA-Plasmids 3 erbrachte mit dem T7-Primer keine Ergebnisse, so dass ein SP6-Primer verwendet wurde, der die siRNA aus der Gegenrichtung des T7-Primers sequenziert. Mit diesem gelang die Sequenzierung. Es wurden jeweils sechs Klone für jedes siRNA-Plasmid sequenziert und jeweils ein Klon mit richtiger Sequenz ausgewählt und für die weiteren Versuche vermehrt und aufgereinigt. Mit den aufgereinigten siRNA-Plasmiden wurden eukaryotische Zellen transfiziert, die dadurch die siRNAs und MGFP exprimierten. Transfizierte Zellen können dann mit FSME-Virus infiziert werden, um die Wirkung der siRNAs auf die Infektion zu untersuchen.

### C.3.1.3 Austestung der Versuchsbedingungen zur Testung der siRNAs in eukaryotischen Zellen

In mit siRNA-Plasmiden transfizierten, eukaryotischen Zellen wurde überprüft, ob die entworfenen siRNAs die Replikation des FSME-Virus inhibieren. Für die Versuche wurden HEK293T-Zellen ausgewählt, da sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, dass diese mit hoher Effizienz transfiziert werden können. Die Sensitivität (Indizierbarkeit) der HEK293T-Zellen für das FSME-Virus wurde mit einem Immunfluoreszenztest überprüft. Dieser ergab, dass das Virus bereits nach 24 Stunden in den Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 26).

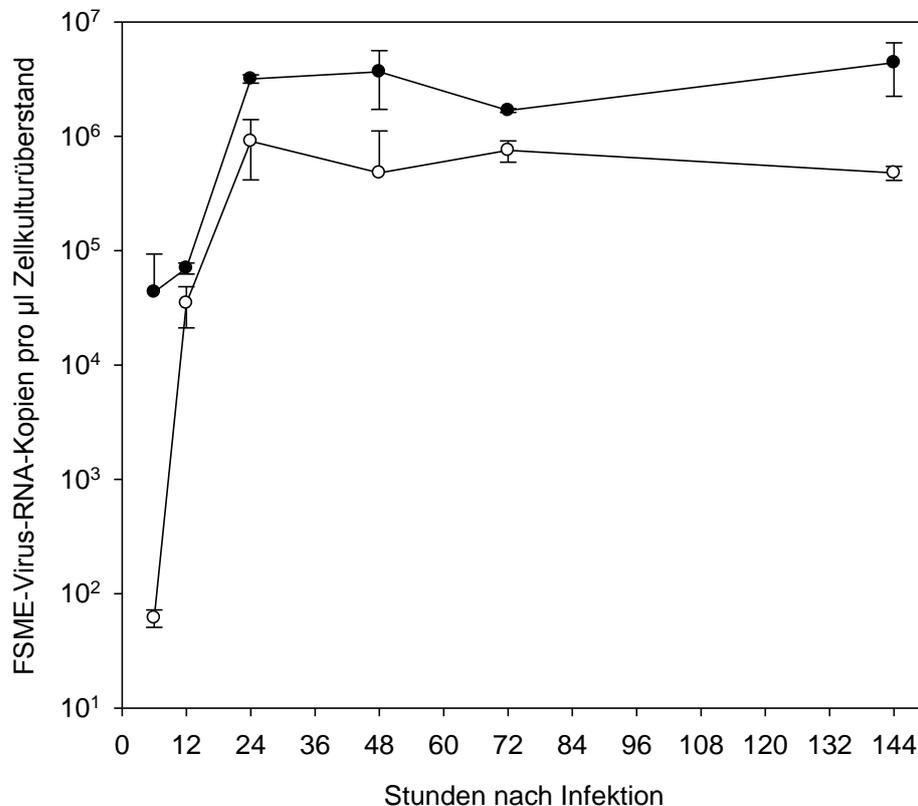


**Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopaufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung.** Fluoreszenzmikroskopaufnahmen einer Immunfluoreszenzfärbung von mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten HEK293T-Zellen (A) sowie von nicht infizierten HEK293T-Zellen (B) mit dem primären Antikörper 1367 (1:40 verdünnt), versetzt mit Evansblue zur Reduzierung des Hintergrunds, und einem FITC-gekoppelten, sekundären anti-Maus-Antikörper. Der Balken entspricht einer Länge von 50  $\mu\text{m}$ .

In einem weiteren Versuch wurde der Verlauf einer Infektion in HEK293T-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit dem FSME-Virusstamm K23 infiziert und der Zellkulturüberstand alle 12, 24, 48, 72 und 144 Stunden abgenommen und mit der E-Protein-RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA überprüft (Abb. 27). Die cDNA-Synthese erfolgte hierbei abweichend vom normalen Protokoll nicht nur mit unspezifischen randomisierten Hexamerprimern, welche die gesamte RNA in cDNA umschreiben, sondern ebenfalls mit einem spezifischen Primer (FSMEV Rev), der nur an die Minusstrang-RNA des FSME-Virus bindet. Mit dem spezifischen Primer wird dadurch nur in der Zelle selbst replizierte RNA in cDNA umgeschrieben.

Abb. 11 zeigt, dass sowohl die gesamte Virus-RNA als auch die frisch replizierte Virus-RNA bereits nach 24 Stunden ihre maximale Konzentration im Zellkulturüberstand von HEK293T-Zellen erreichte und danach kein Anstieg mehr zu beobachten war. Die Kopienzahl der replizierten Virus-RNA lag dabei immer unter der Gesamt-RNA-

Kopienzahl und war vor allem zu Beginn der Untersuchung (sechs Stunden nach der Infektion) fast drei Log-Stufen niedriger.



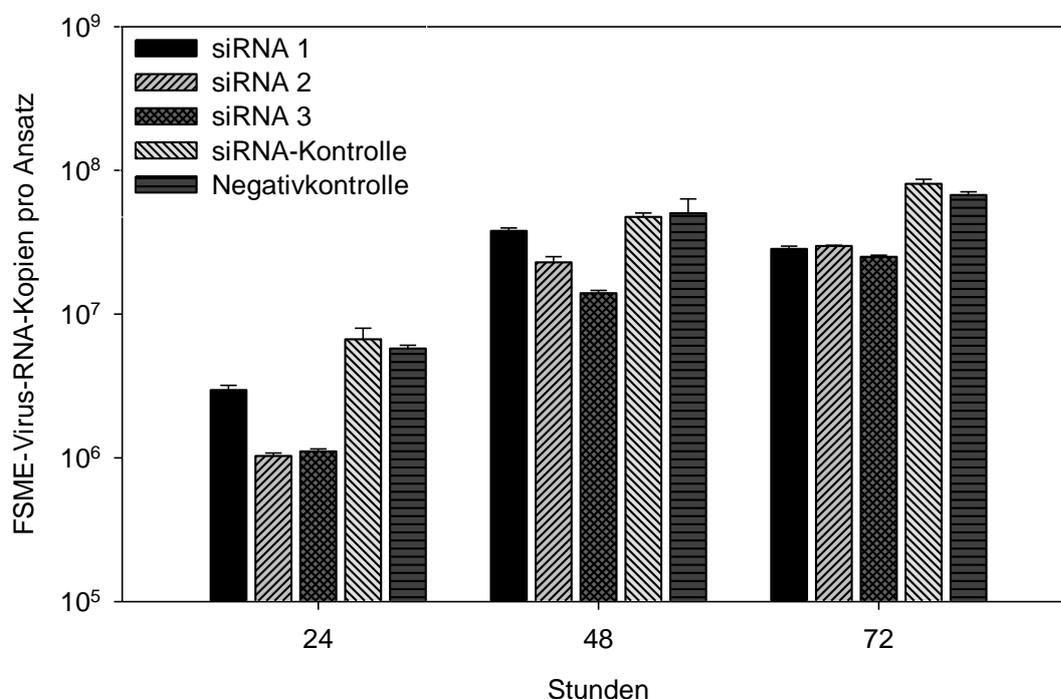
**Abb. 27: Anstieg der FSME-Virus-RNA-Kopien im Zellkulturüberstand von mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten HEK293T-Zellen.**

Zur Untersuchung des FSME-Virusinfektionsverlaufs in HEK293T-Zellen wurde RNA aus abgenommenem Zellkulturüberstand extrahiert und mit Hilfe der E-Protein-RT-qPCR untersucht. Die cDNA-Synthese erfolgte hierbei abweichend vom normalen Protokoll nicht nur mit Hexamerprimern, welche die gesamte RNA in cDNA umschreiben, sondern ebenfalls mit dem FSMEV E Rev-Primer, der nur Minusstrang-RNA des FSME-Virus und damit nur in der Zelle replizierte RNA umschreibt. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen.

Für die eigentlichen Wirksamkeitsuntersuchungen der siRNAs wurde der Virusgehalt in den Zellen und nicht im Zellkulturüberstand untersucht, da die siRNAs ihre Wirkung in der Zelle entfalten.

Bei den Versuchen dienten HEK293T-Zellen, die mit einem unspezifischen siRNA-Kontroll-Plasmid transfiziert wurden oder nur mit Lipofectamin behandelt wurden als Kontrollen. Zunächst wurde analysiert, ob sich Unterschiede im Infektionsverlauf von mit siRNA-Plasmiden transfizierten HEK293T-Zellen gegenüber dem der Kontrollen ergeben. Hierzu wurden die transfizierten bzw. nur mit Lipofectamin behandelten HEK293T-Zellen mit dem FSME-Virusstamm K23 infiziert, 24, 48 und 72 Stunden später

geerntet und die Menge der FSME-Virus-RNA mittels RT-qPCR bestimmt (Abb. 28). Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde die ermittelte FSME-Virus-RNA-Kopienmenge auf das Referenzgen Tubulin bezogen. Die Tubulin-RNA-Menge wurde mit der Tubulin RT-qPCR von Radonic *et al.* (2004) gemessen.



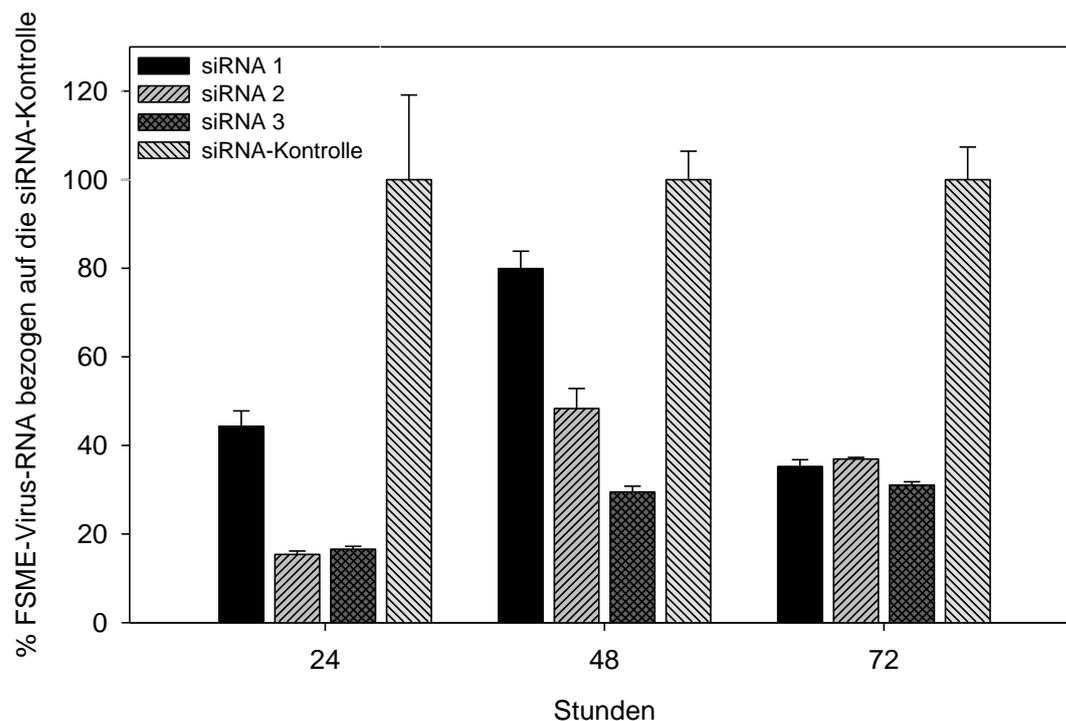
**Abb. 28: FSME-Virus-RNA-Kopien in mit siRNA-Plasmiden (1, 2, 3 und siRNA-Kontrollplasmid) transfizierten und nicht transfizierten sowie mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten HEK293T-Zellen.**

Virus-RNA wurde aus HEK293T-Zellen extrahiert und mit Hilfe der NS1-Protein-RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht. Die Extraktion der RNA erfolgte jeweils aus den gesamten Zellen, die sich in der Vertiefung einer 24-Loch-Platte befanden. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die FSME-Virus-RNA-Kopienmenge wurde auf das Referenzgen Tubulin bezogen.

Die FSME-Virus-RNA-Menge lag zwischen  $10^6$  und  $10^8$  Kopien pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte. In den HEK293T-Zellen zeigte sich ein Anstieg der FSME-Virus-RNA-Kopien um ca. eine Log-Stufe zwischen 24 auf 48 Stunden. Zwischen 48 und 72 Stunden war kein deutlicher Anstieg mehr zu erkennen. Die mit den gegen das FSME-Virus gerichteten siRNA-Plasmiden transfizierten Zellen wiesen, verglichen mit den Kontrollen, einen um ca. eine halbe Log-Stufe niedrigeren Virusgehalt auf. Bereits nach 24 Stunden war ein deutlicher Unterschied in der Viruslast zwischen siRNA-exprimierenden und Kontroll-Zellen zu beobachten, der im weiteren Verlauf abnahm. Zwischen dem Virusgehalt der nur mit Lipofectamin behandelten und der mit dem siRNA-Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen konnte zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied

festgestellt werden, so dass in den folgenden Experimenten nur die siRNA-Kontrolle mitgeführt wurde.

Zur besseren Vergleichbarkeit der siRNA-Wirkung in den Zellen, wurde der Virusgehalt der siRNA 1-, siRNA 2- und siRNA 3-exprimierenden Zellen prozentual auf den Virusgehalt der Kontroll-siRNA-exprimierenden Zellen bezogen (Abb. 29).



**Abb. 29: Wirkung der siRNA 1, siRNA 2 und siRNA 3 auf die Replikation des FSME-Virus (Stamm K23) in HEK293T-Zellen.**

Virus-RNA wurde aus HEK293T-Zellen extrahiert und mit Hilfe der NS1-Protein-RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht. Die Extraktion der RNA erfolgte jeweils aus den gesamten Zellen, die sich in der Vertiefung einer 24-Loch-Platte befanden. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Der Virusgehalt der mit den siRNA-Plasmiden 1, 2 und 3 transfizierten Zellen wurde prozentual auf den Virusgehalt der mit dem siRNA-Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen bezogen. Die FSME-Virus-RNA-Kopienmenge wurde auf das Referenzgen Tubulin bezogen.

Hierbei wiesen siRNA 2 und siRNA 3 die beste Wirkung nach 24 Stunden auf. siRNA 3 jedoch zeigte nach 72 Stunden eine um ca. 10 % bessere Wirkung als nach 24 Stunden. 48 Stunden nach der Infektion zeigten alle siRNAs die schlechteste Wirkung, verglichen mit den Werten nach 24 und 72 Stunden.

Für die weiteren Versuche wurden die Zellen nach 24 Stunden geerntet, da die siRNAs für diesen Zeitpunkt, gesamt betrachtet, die beste Wirkung zeigten (Abb. 29) und auch in den Zellkulturüberständen nach 24 Stunden keine Änderung des Virusgehaltes mehr zu erkennen war (Abb. 28).

### **C.3.1.4 Transfektionseffizienz und siRNA-Expression in Abhängigkeit von der verwendeten siRNA-Plasmidkonzentration**

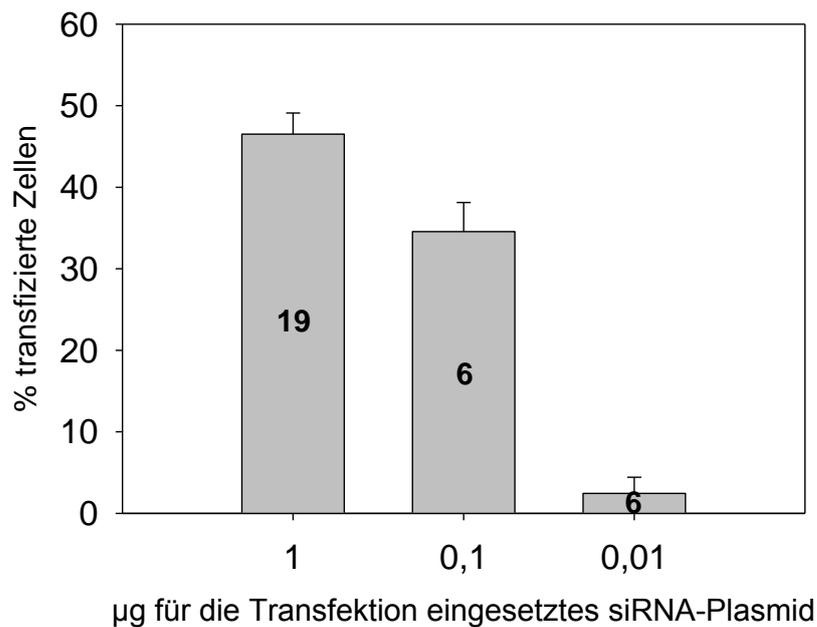
Die Transfektionseffizienz von Zellen, das heißt die Anzahl von Zellen, die nach einer Transfektion die entsprechende Plasmid-DNA enthalten, hängt von verschiedenen Faktoren ab: z.B. von der Transfektionsmethode, der verwendeten Zelllinie, der eingesäten Zellzahl, der Transfektionszeit, der Anzahl der Zellpassagen, der DNA-Länge, der DNA-Beschaffenheit (z.B. Plasmid, Einzelstrang- oder Doppelstrang-DNA), dem Medium u.v.m. Vor Beginn der eigentlichen siRNA-Versuche wurden daher Vorversuche durchgeführt, um die optimalen Transfektionsbedingungen für die HEK293T-Zellen und die verwendeten siRNA-Plasmide zu ermitteln. Die Versuche zeigten, dass eine zu große Menge an Plasmid-DNA oder Transfektionsreagenz zytotoxisch wirken. Die für die siRNA-Plasmid-Transfektion der HEK293T-Zellen optimalen Transfektionsbedingungen sind in Kapitel B.6.2 beschrieben.

### **C.3.1.5 Wirkung der siRNA-Plasmidkonzentration auf die Transfektionseffizienz**

Für jeden durchgeführten Versuch wurde die Transfektionseffizienz einzeln für jedes siRNA-Plasmid bestimmt, um auftretende Schwankungen in der Transfektionseffizienz zu erkennen. Anschließend wurde der Mittelwert über alle Versuche für jedes siRNA-Plasmid gebildet. Die Transfektionseffizienz ließ sich durch Auszählen der transfizierten und nicht transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermitteln, da die verwendeten siRNA-Plasmide MGFP exprimierten.

Bei einer optimalen siRNA-Plasmidkonzentration von 1 µg lag die Transfektionseffizienz bei allen siRNAs bei ca. 47 % (Abb. 30). Ein durchgeführter t-Test ergab, dass die Transfektionseffizienz zwischen den siRNAs und den verschiedenen Versuchen nicht signifikant (t-Test  $p > 0,05$ ) schwankte.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Reduzierung der eingesetzten siRNA-Plasmidkonzentration zu einer Abnahme der Transfektionseffizienz führt. Bei einer Reduzierung der siRNA-Plasmidkonzentration um das Zehnfache ergab sich eine Abnahme der Transfektionseffizienz auf ca. 34 %, bei einer Reduzierung um das Hundertfache auf ca. 2,5 % (Abb. 30). Ein durchgeführter t-Test ergab, dass die Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Transfektionsmengen signifikant (t-Test  $p < 0,05$ ) abnahm.



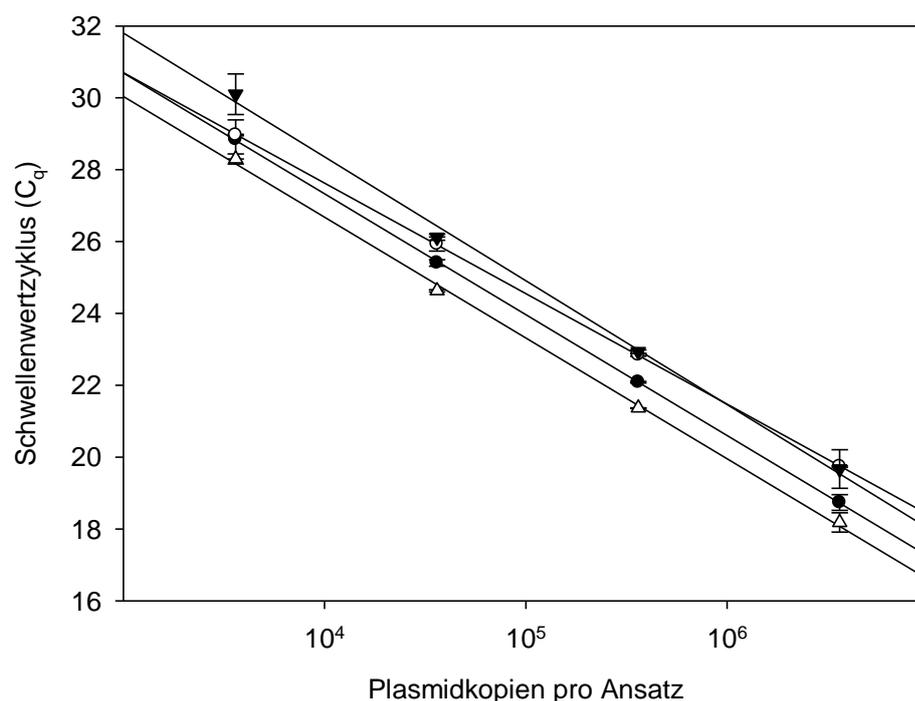
**Abb. 30: Vergleich der Transfektionseffizienz von HEK293T-Zellen bei Reduzierung der eingesetzten siRNA-Plasmidkonzentration.**

Die Transfektionseffizienz für jeden Versuch und für jedes siRNA-Plasmid wurde durch Auszählen der transfizierten und nicht transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Zahlen in den Säulen stehen für die Anzahl Versuche, die durchgeführt wurden und in die Berechnung eingeflossen sind. Ein durchgeführter t-Test ergab, dass die Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Transfektionsmengen signifikant (t-Test  $p < 0,05$ ) abnimmt. Die in der Abbildung angegebene siRNA-Plasmidmenge bezieht sich auf die Menge siRNA-Plasmid, welche zur Transfektion von Zellen jeweils einer Vertiefung einer 24-Loch-Platte verwendet wurde.

### C.3.1.6 Wirkung der siRNA-Plasmidkonzentration auf die siRNA-Expression

Die Ermittlung der Transfektionseffizienz durch Zählen der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop erlaubte keine Aussage darüber, ob die grün fluoreszierenden und damit transfizierten Zellen nur ein siRNA-Plasmid oder mehrere enthielten. Daher wurde zur Ermittlung der MGFP-Transkription eine MGFP-spezifische RT-qPCR etabliert. Die MGFP-Transkription steht in einem linearen Verhältnis zur Anzahl der in den Zellen enthaltenen siRNA-Plasmide und damit zur Expression der siRNAs.

Für die MGFP-RT-qPCR wurden vier Primer und eine Sonde von der Firma TIB MOLBIOL designt. Die Standardkurven für jede mögliche Primerpaarkombination wurden mit einer Plasmidverdünnungsreihe des siRNA-Plasmids 1 nach dem Standardprotokoll in der RT-qPCR ermittelt (Abb. 31).



**Abb. 31: Standardkurven für die jeweiligen Primerpaarkombinationen der MGFP-RT-qPCR.**

Die Standardkurve (Linie) basiert auf einer Verdünnungsreihe von siRNA-Plasmid 1. Der jeweilige Schwellenwertzyklus für jede Verdünnungsstufe wurde gegen die Kopienzahl der Verdünnungsstufe aufgetragen (Punkte). Jede Verdünnungsstufe wurde in Duplikaten gemessen.

Aus den Standardkurven wurde das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) und die Effizienz mit der Formel „Effizienz =  $10^{[-1/\text{Steigung}] - 1}$ “ errechnet (Tab. 42). Das Primerpaar R und S wies mit 98,3 % die höchste Effizienz auf und wurde daher für die Ermittlung der MGFP-Transkription verwendet.

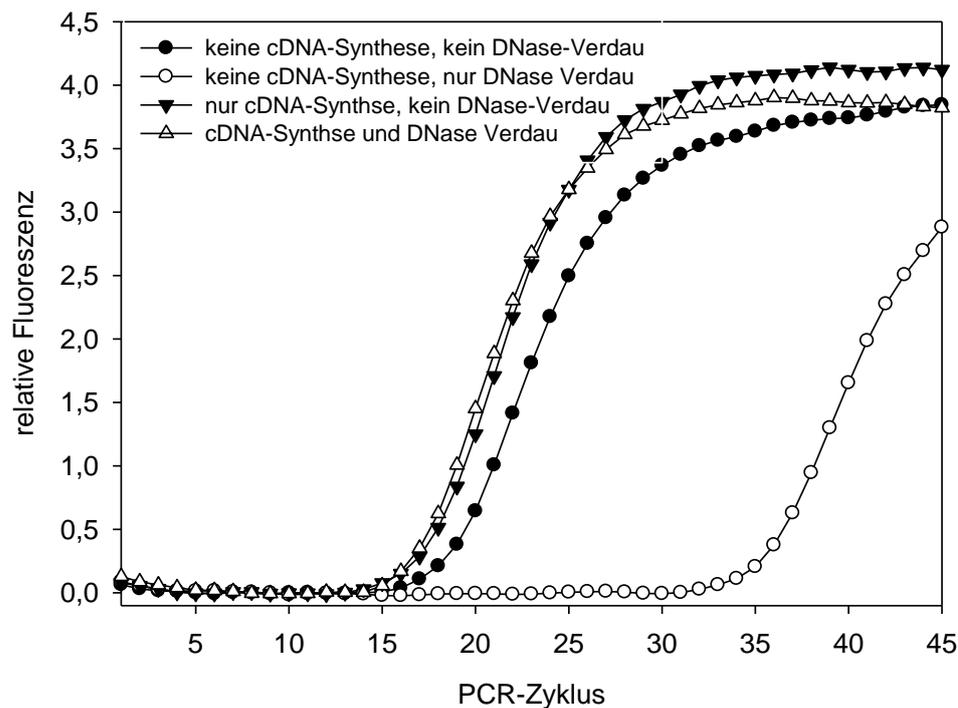
**Tab. 42: Standardgleichung, Bestimmtheitsmaß und Effizienz der MGFP-Primerpaare.**<sup>a</sup>

Primerpaar MGFP	Standardgleichung	$R^2$	Effizienz
F und R	$C_q = 40,8 - 3,37 \text{ Log (Kopien)}$	0,99	98,2 %
S und A	$C_q = 39,9 - 3,08 \text{ Log (Kopien)}$	0,99	111,3 %
F und A	$C_q = 42,2 - 3,45 \text{ Log (Kopien)}$	0,99	95,0 %
S und R	$C_q = 40,1 - 3,36 \text{ Log (Kopien)}$	0,99	98,3 %

<sup>a</sup>  $C_q$ : Schwellenwertzyklus,  $R^2$ : Bestimmtheitsmaß.

In einem weiteren PCR-Lauf wurde überprüft, ob die MGFP-RT-qPCR RNA-spezifisch ist bzw. ob ein DNase-Verdau mit Turbo-DNase (Ambion) ausreicht, um die in der RNA-Extraktion vorhandene Rest-DNA abzubauen. Dazu wurde aus mit FSME-Virus

infizierten und mit siRNA-Plasmid transfizierten Zellen RNA extrahiert und diese zum Teil mit DNase verdaut und/oder einer cDNA-Synthese unterzogen. Es zeigte sich, dass die MGFP-RT-qPCR nicht RNA-spezifisch ist. Jedoch reichte der Verdau mit Turbo-DNase aus, die noch verbliebene DNA-Menge um ca. sechs Log-Stufen auf eine vernachlässigbare Menge zu reduzieren (Abb. 32). Vor jeder MGFP-RT-qPCR wurde die RNA daher einem DNase-Verdau unterzogen.



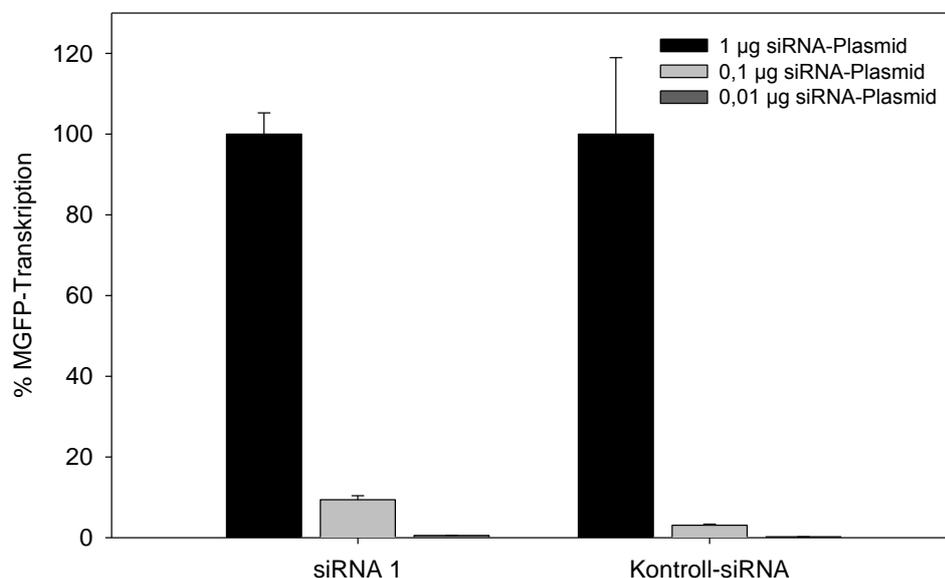
**Abb. 32: Test der RNA-Spezifität der MGFP-RT-qPCR.**

Die gemessene relative Fluoreszenz von mit DNase verdauter und/oder einer cDNA-Synthese unterzogener RNA aus mit FSME-Virus infizierten und mit siRNA-Plasmid transfizierten Zellen wurde gegen den jeweiligen PCR-Zyklus aufgetragen, um die RNA-Spezifität des RT-qPCR-Systems zu ermitteln bzw. den DNase-Verdau zu testen.

Die MGFP-Transkription wurde in mit siRNA-Plasmiden transfizierten HEK293T-Zellen in sechs unabhängigen Versuchen gemessen, um die Expression der verschiedenen siRNAs auf molekularer Ebene zu vergleichen. Dabei zeigte sich, dass die MGFP-Transkription für alle siRNA-Plasmide vergleichbar ist. Im Mittel wurden  $7 \times 10^6$  MGFP-Kopien je Vertiefung einer 24-Loch-Platte gemessen. Ein durchgeführter t-Test zeigte keine signifikanten (t-Test  $p > 0,05$ ) Unterschiede zwischen den siRNA-Plasmiden und zwischen den verschiedenen Ansätzen.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Reduzierung der eingesetzten siRNA-Plasmidkonzentration auch zu einer Abnahme der MGFP-Transkription führt. Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von siRNA-Plasmid

transfiziert. siRNA-Plasmid 1 und das siRNA-Kontrollplasmid wurden hierbei repräsentativ für alle siRNA-Plasmide verwendet.



**Abb. 33: Wirkung verschiedener siRNA-Plasmidkonzentrationen auf die MGFP-Transkription.**

Die MGFP-Kopienzahl wurde in zwei unabhängigen Versuchen für jede siRNA-Plasmidkonzentration und jedes siRNA-Plasmid mittels der MGFP-RT-qPCR bestimmt. Aus den MGFP-Kopienzahlen wurde die prozentuale Abnahme der MGFP-Transkription, verglichen mit der Ausgangs-siRNA-Plasmidkonzentration, ermittelt. Die MGFP-Virus-RNA-Kopienmenge wurde auf das Referenzgen Tubulin bezogen. Die in der Abbildung angegebene siRNA-Plasmidmenge bezieht sich auf die Menge siRNA-Plasmid, welche zur Transfektion von Zellen jeweils einer Vertiefung einer 24-Loch-Platte verwendet wurde.

Bei einer Reduzierung der siRNA-Plasmidkonzentration um das Zehnfache ergab sich eine Abnahme der MGFP-Kopienzahl um ein Zehntel, bei einer Reduzierung um das Hundertfache um ein Hundertstel der bei der Ausgangskonzentration gemessenen MGFP-Kopienzahl (Abb. 33). Die MGFP-Transkription und damit die siRNA-Expression nahmen linear zur Reduktion der verwendeten siRNA-Plasmidmenge ab.

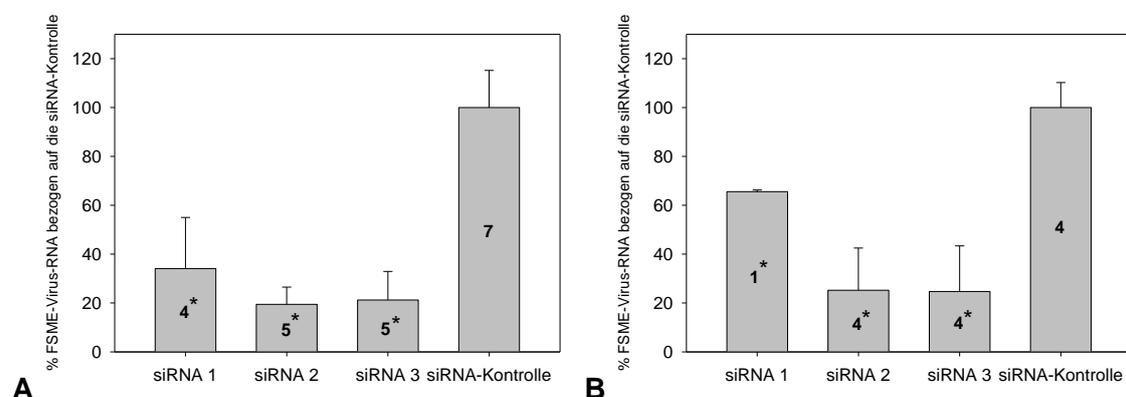
### **C.3.2 Wirkung der entworfenen siRNAs auf eine FSME-Virusinfektion in eukaryotischen Zellen**

Nach dem Optimieren der Versuchsbedingungen und dem Analysieren der Transfektionseffizienz bzw. siRNA-Expression, wurde die Wirkung der siRNAs auf eine FSME-Virusinfektion in eukaryotischen HEK293T-Zellen mit molekularbiologischen, immunologischen und virologischen Methoden untersucht. Die Versuche wurden

exemplarisch für alle FSME-Virusstämme mit dem europäischen Prototyp K23 durchgeführt. Die Untersuchung anderer FSME-Virusstämme erfolgte ausschließlich auf molekularer Ebene. Die RNA-Kopienmengen wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf das Referenzgen Tubulin bezogen. Zur Messung der Tubulin-RNA wurde die RT-qPCR von Radonic et al (2004) verwendet. Für die Versuche wurden HEK293T-Zellen mit siRNA-Plasmiden transfiziert und anschließend mit FSME-Virus infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und RNA, Protein sowie Virus zur weiteren Analyse isoliert.

### C.3.2.1 Wirkung von siRNAs auf die Virus-RNA-Menge in eukaryotischen Zellen

Die Messung der FSME-RNA-Kopienzahl mit der NS1-Protein-RT-qPCR ergab, dass alle drei siRNAs die Virus-RNA-Menge in den infizierten HEK-293T-Zellen im Vergleich zur siRNA-Kontrolle senkten. Dabei verursachte siRNA 1 eine Reduktion der Virus-RNA um ca. 65 % und siRNA 2 und siRNA 3 um ca. 80 % (Abb. 34). Die E-Protein-RT-qPCR erbrachte vergleichbare Ergebnisse für siRNA 2 und siRNA 3. Für siRNA 1 zeigte sich aber nur eine Reduktion der Virusmenge auf ca. 65 % (Abb. 34). Ein durchgeführter t-Test ergab, dass in den siRNA-exprimierenden Zellen die Virus-RNA-Menge signifikant niedriger war (t-Test  $p < 0,05$ ), verglichen mit Zellen, die die Kontroll-siRNA exprimieren.

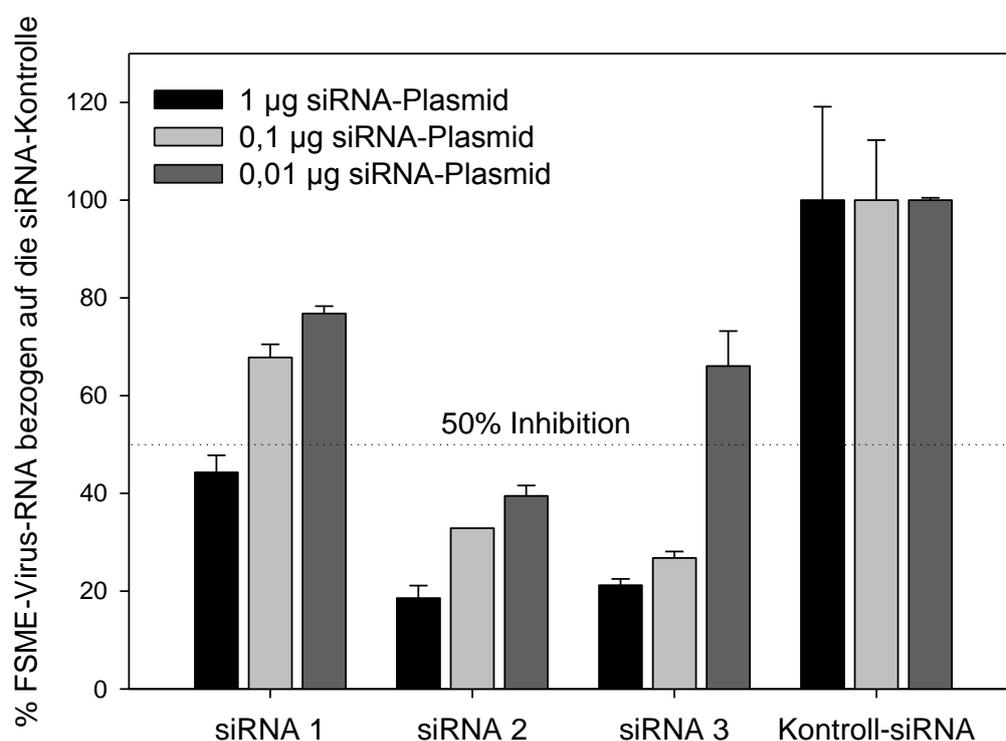


**Abb. 34: Wirkung der siRNA 1, siRNA 2 und siRNA 3 auf die FSME-Virus-RNA-Menge in mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten HEK293T-Zellen.**

Virus-RNA wurde aus HEK293T-Zellen extrahiert und mit Hilfe der NS1-Protein- (A) und E-Protein- (B) RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht. Die Extraktion der RNA erfolgte jeweils aus den gesamten Zellen, die sich in der Vertiefung einer 24-Loch-Platte befanden. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Der Virusgehalt der mit den siRNA-Plasmiden 1, 2 und 3 transfizierten Zellen wurde prozentual auf den Virusgehalt der mit dem siRNA-Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen bezogen. Die FSME-Virus-RNA-Kopienmenge wurde auf das Referenzgen Tubulin bezogen. Zahlen in den Säulen stehen für die Anzahl Versuche, die durchgeführt wurden und in die Berechnung einfließen sind. Sternchen (\*) markieren die siRNAs, welche im Vergleich zur Kontroll-siRNA die FSME-Virus-RNA-Menge signifikant reduzierten (t-Test  $p < 0,05$ ).

Die zuvor durchgeführten Versuche (Kapitel C.3.1.5 und C.3.1.6) ergaben, dass die Zahl transfizierter Zellen und die Stärke der siRNA-Expression mit einer Reduzierung der eingesetzten siRNA-Plasmidkonzentration abnimmt. Jedoch nimmt die siRNA-Expression stärker ab, als die Zahl transfizierter Zellen. Dies könnte daran liegen, dass eine Zelle mehrere Plasmide enthalten kann. Sinkt die in der Transfektion eingesetzte siRNA-Plasmidmenge, führt dies nicht zwingend zu entsprechend weniger transfizierten Zellen, sondern unter Umständen nur zu einer entsprechend geringeren Plasmidzahl in den Zellen.

Es wurde daher auch untersucht, welche Auswirkung eine verminderte siRNA-Plasmidmenge auf eine FSME-Virusinfektion hat (Abb. 35). Hierzu wurden HEK293T-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen siRNA-Plasmid transfiziert wurden, mit dem FSME-Virusstamm K23 infiziert und anschließend die FSME-RNA-Kopienzahl mittels NS1-Protein-RT-qPCR bestimmt.



**Abb. 35: Wirkung verschiedener siRNA-Plasmidkonzentrationen auf eine FSME-Virusinfektion (Stamm K23) in HEK293T-Zellen bezogen auf die siRNA-Kontrolle.**

Virus-RNA wurde aus HEK293T-Zellen extrahiert und mit Hilfe der NS1-Protein-RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht. Die Extraktion der RNA erfolgte jeweils aus den gesamten Zellen, die sich in der Vertiefung einer 24-Loch-Platte befanden. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Der Virusgehalt der mit den siRNA-Plasmiden 1, 2 und 3 transfizierten Zellen wurde prozentual auf den Virusgehalt der mit dem siRNA-Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen bezogen. Die in der Abbildung angegebene siRNA-Plasmidmenge bezieht sich auf die Menge siRNA-Plasmid, welche zur Transfektion von Zellen jeweils einer Vertiefung einer 24-Loch-Platte verwendet wurde.

Die Ergebnisse in Abb. 35 zeigen, dass mit steigender siRNA-Plasmidkonzentration und damit zunehmender siRNA-Expression die FSME-Virus-RNA-Kopienzahl sank. Eine Reduktion der FSME-Virus-RNA-Menge war sogar noch bei einer Transfektion mit nur 0,01 µg siRNA-Plasmid für alle siRNAs gegenüber der Kontrolle zu erkennen.

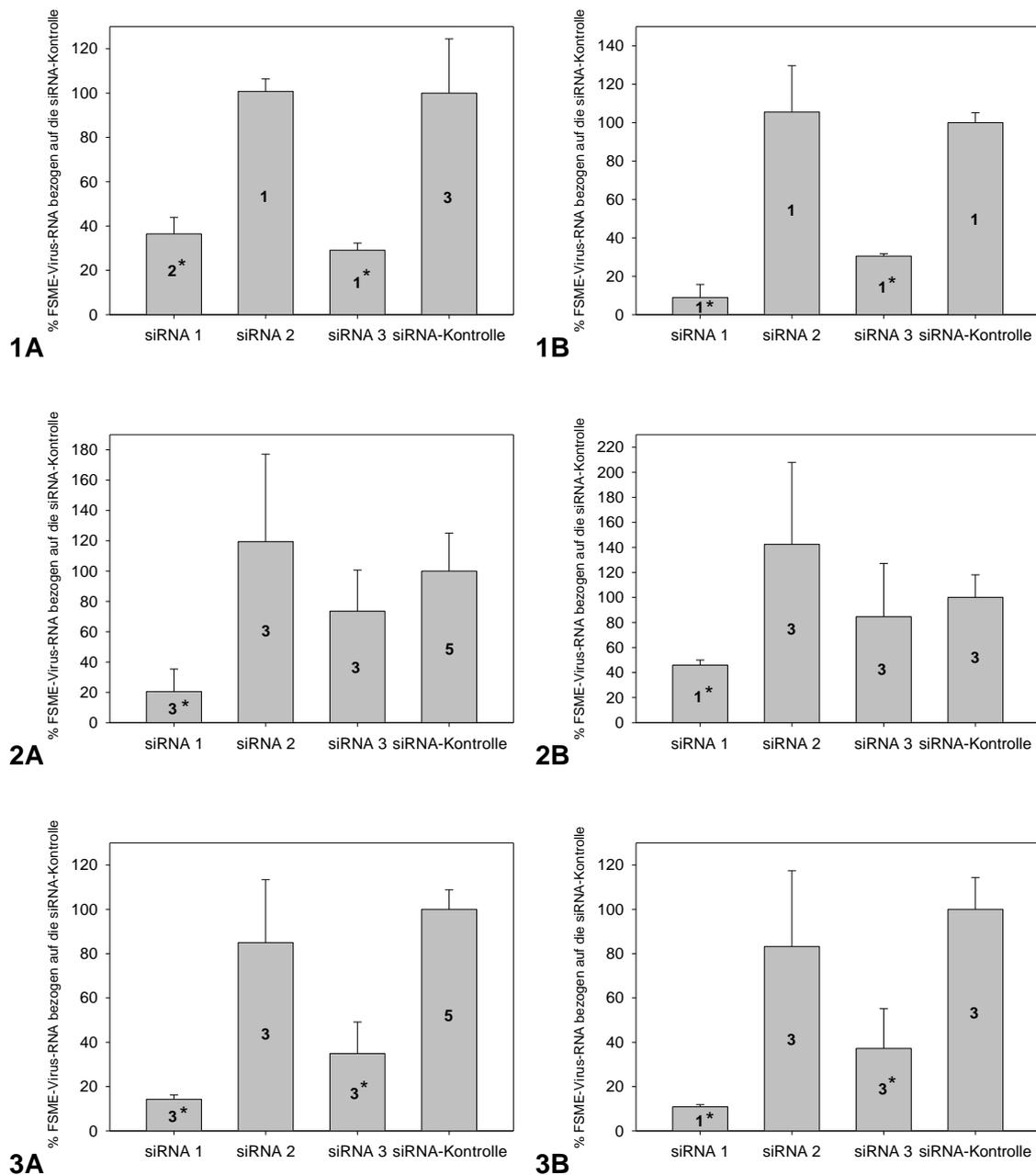
Die beste Wirkung der drei siRNAs ergab sich bei einer eingesetzten Plasmidkonzentration von 1 µg pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte. Den größten Effekt bei FSME-Virusstamm K23 verursachten siRNA 2 und siRNA 3. Sie konnten eine 50 %ige Inhibition der Virusreplikation schon bei einer Menge von 0,001 bzw. 0,03 µg siRNA-Plasmid bewirken. Jedoch führte auch siRNA 1 zu einer Reduktion der Viruslast. Für eine 50 %ige Inhibition mussten hier allerdings 0,6 µg siRNA-Plasmid eingesetzt werden.

### **C.3.2.2 Wirkung der siRNAs auf andere FSME-Virusstämme bzw. -subtypen**

Verschiedene FSME-Virusstämme zeigen Unterschiede in Ihren Sequenzen, so dass die siRNAs so entworfen wurden, dass sie an die Sequenz möglichst vieler FSME-Virusstämme binden können. Jedoch war es nicht möglich die siRNAs so zu designen, dass sie mit der Sequenz aller Stämme zu 100 % übereinstimmen. Daher wurden die siRNAs ebenfalls an anderen zur Verfügung stehenden Virusstämmen getestet. Als weiterer FSME-Virusstamm europäischen Subtyps wurde Neudörfl gewählt, als Vertreter des sibirischen Subtyps Virusstamm Aina und als fernöstlicher Subtyp Virusstamm Sofjin. Die Messung der FSME-RNA-Kopienzahl erfolgte auch hier mit den NS1- und E-Protein-RT-qPCR-Systemen.

Abb. 36 zeigt, dass siRNA 1 bei der Infektion mit allen drei Virusstämmen (Neudörfl, Aina und Sofjin) und damit Virussubtypen eine signifikante (t-Test  $p < 0,05$ ) Reduktion der RNA-Menge in den Zellen zwischen 95 % und 60 % verglichen mit der siRNA-Kontrolle hervorrief. siRNA 2 zeigte bei keinem der Virusstämme (Neudörfl, Aina und Sofjin) eine signifikante (t-Test  $p > 0,05$ ) Wirkung, während siRNA 3 nur beim Virusstamm Aina keine signifikante Reduktion der RNA-Menge hervorrief.

## Ergebnisse

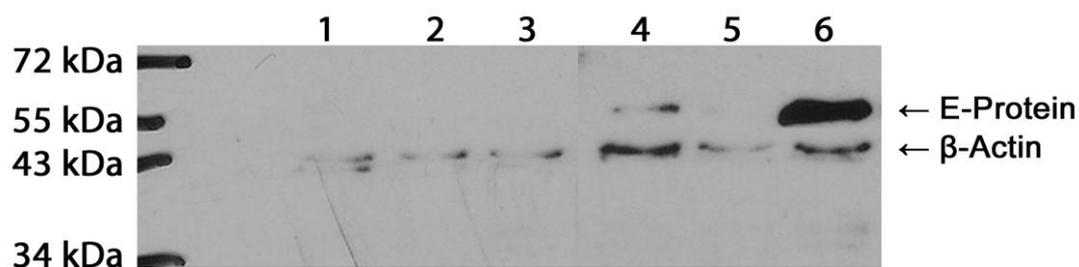


**Abb. 36: Wirkung der siRNAs auf die FSME-Virusstämme Neudörfel, europäischer Subtyp (1), Aina, sibirischer Subtyp (2) und Sofjin, fernöstlicher Subtyp (3).**

Virus-RNA wurde aus HEK293T-Zellen extrahiert und mit Hilfe der NS1-Protein- (A) und E-Protein- (B) RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht. Die Extraktion der RNA erfolgte jeweils aus den gesamten Zellen, die sich in der Vertiefung einer 24-Loch-Platte befanden. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Der Virusgehalt der mit den siRNA-Plasmiden 1, 2 und 3 transfizierten Zellen wurde prozentual auf den Virusgehalt der mit dem siRNA-Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen bezogen. Die FSME-Virus-RNA-Kopienmenge wurde auf das Referenzgen Tubulin bezogen. Zahlen in den Säulen stehen für die Anzahl Versuche, die durchgeführt wurden und in die Berechnung eingeflossen sind. Sternchen (\*) markieren die siRNAs, welche im Vergleich zur Kontroll-siRNA die FSME-Virus-RNA-Menge signifikant reduzierten (t-Test  $p < 0,05$ ).

### C.3.2.3 Wirkung von siRNAs auf den Virusproteingehalt eukaryotischer Zellen

Zur Bestätigung der auf molekularer Ebene erhaltenen Ergebnisse wurde ein Western Blot durchgeführt, mittels dem die Wirkung der siRNAs auf die Virusproteinproduktion untersucht wurde. Der FSME-Virusstamm K23 wurde auch hier exemplarisch für alle FSME-Virusstämme verwendet. Im Western Blot wurden beispielhaft nur siRNA 2 und siRNA 3 getestet, da diese die beste Wirkung auf molekularer Ebene gezeigt hatten, sowie die Kontroll-siRNA. Für den Western Blot wurde das aus den Zellen extrahierte Protein aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit dem primären Antikörper MAB 1367, der gegen das E-Protein des FSME-Virus gerichtet ist, sowie einem sekundären, gegen  $\beta$ -Actin gerichteten Antikörper, inkubiert.



**Abb. 37: Wirkung der siRNA 2 und siRNA 3 auf die E-Protein-Menge in mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten HEK293T-Zellen.**

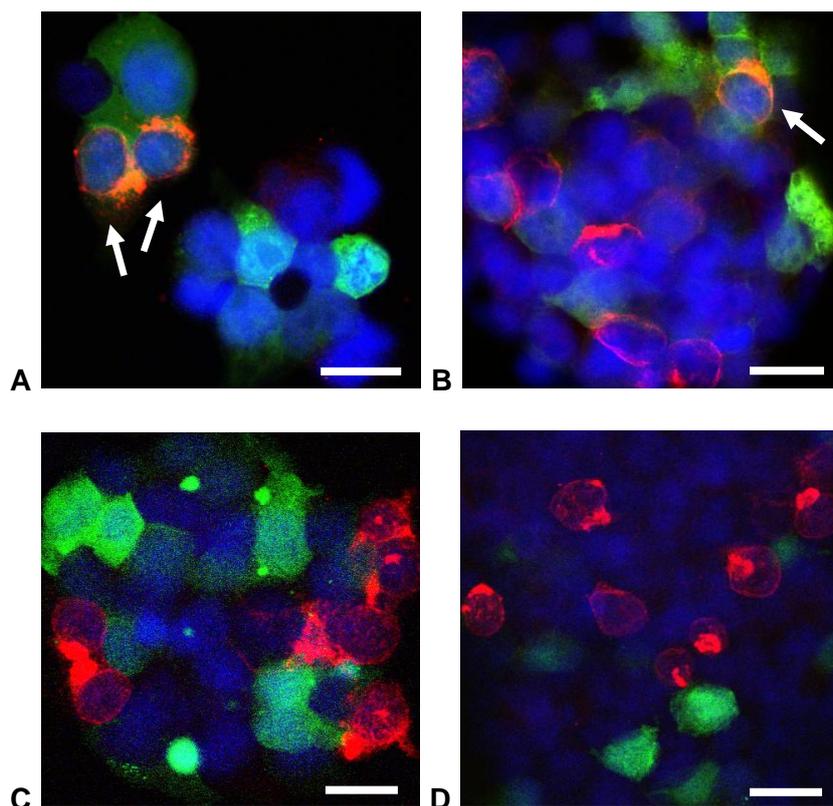
Membranprotein wurde aus HEK293T-Zellen extrahiert, in einer SDS PAGE aufgetrennt, im Western Blot auf eine Membran geblottet und mit einem Antikörper gegen das E-Protein des FSME-Virus (MAB 1367) und einem Antikörper gegen  $\beta$ -Actin inkubiert. Das E-Protein ist ca. 55 kDa groß,  $\beta$ -Actin ca. 44 kDa. In den Reihen 1 bis 3 wurde Protein aus nicht infizierten Zellen aufgetragen, in den Reihen 4 bis 6 Protein aus mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten Zellen. Die Zellen der Reihen 1 und 4 exprimieren siRNA 2, die der Reihen 2 und 5 siRNA 3 und die der Reihen 3 und 6 Kontroll-siRNA. Der Röntgenfilm wurde 1 min auf die Membran aufgelegt und dann entwickelt.

Auf dem Röntgenfilm zeigten alle Proben Banden für  $\beta$ -Actin bei ca. 44 kDa (Abb. 37). Für die Proben der nicht infizierten Zellen (Reihen 1 bis 3) waren keine Banden für das E-Protein des FSME-Virus zu erkennen, während für die Proben der mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten Zellen (Reihen 4 bis 6) Banden bei ca. 55 kDa zu sehen waren. Diese waren dem E-Protein des FSME-Virus zuzuordnen. Die Bande der siRNA-Kontrolle (Reihe 6) war jedoch wesentlich stärker als die Banden für siRNA 2 (Reihe 4) und siRNA 3 (Reihe 5).

Die in der RT-qPCR und im Western Blot erhaltenen Ergebnisse zeigten eine Reduktion der Virus-RNA und Virusproteine in siRNA transfizierten Zellen. Die Daten ließen jedoch keinen Schluss darüber zu, ob generell weniger Zellen einer Zellkultur infiziert waren oder nur die Virusreplikation reduziert war. Aus diesem Grund wurde im folgenden die Wirkung der siRNAs mittels Immunofluoreszenzfärbung untersucht.

### C.3.2.4 Wirkung von siRNAs auf die Infizierbarkeit eukaryotischer Zellen

Die Versuche mit unterschiedlichen siRNA-Plasmidkonzentrationen haben gezeigt, dass bereits kleine siRNA-Mengen die Viruslast in den Zellen senken. Daher wurde mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung untersucht, ob siRNA-exprimierende Zellen sich mit dem FSME-Virus infizieren lassen. Außerdem sollte geklärt werden, ob eine transfizierte Zellkultur weniger FSME-Virus-infizierte Zellen aufweist oder die Reduktion des Virusgehaltes auf eine verringerte Virusreplikation zurückzuführen ist. Die Versuche wurden mit dem FSME-Virusstamm K23 exemplarisch für alle FSME-Virusstämme mit allen siRNAs durchgeführt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde das FSME-Virus in den Zellen spezifisch mit dem Antikörper MAB 1367 und einem sekundären Alexa594-gekoppelten Antikörper markiert. Das Virus fluoreszierte daher unter dem Fluoreszenzmikroskop rot, die siRNA-exprimierenden und damit auch MGFP-exprimierenden Zellen grün. Die Zellen wurden unter dem konfokalen Laserscanmikroskop betrachtet und fotografiert.



**Abb. 38: Wirkung der siRNA 1, siRNA 2 und siRNA 3 auf die FSME-Virusmenge in mit FSME-Virus (Stamm K23) infizierten HEK293T-Zellen.**

Immunfluoreszenzbilder von mit FSME-Virus infizierten und siRNA-Plasmid transfizierten HEK293T-Zellen. Die Zellen exprimierten das siRNA-Kontrollplasmid (A), siRNA 1 (B), siRNA 2 (C) und siRNA 3 (D). Angefärbtes Virus ist rot dargestellt, siRNA-exprimierende Zellen grün und die Zellkerne blau (DAPI). Zellen, die sowohl siRNAs exprimierten als auch Virus enthielten sind orange und mit einem weißen Pfeil markiert. Der Balken entspricht einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ .

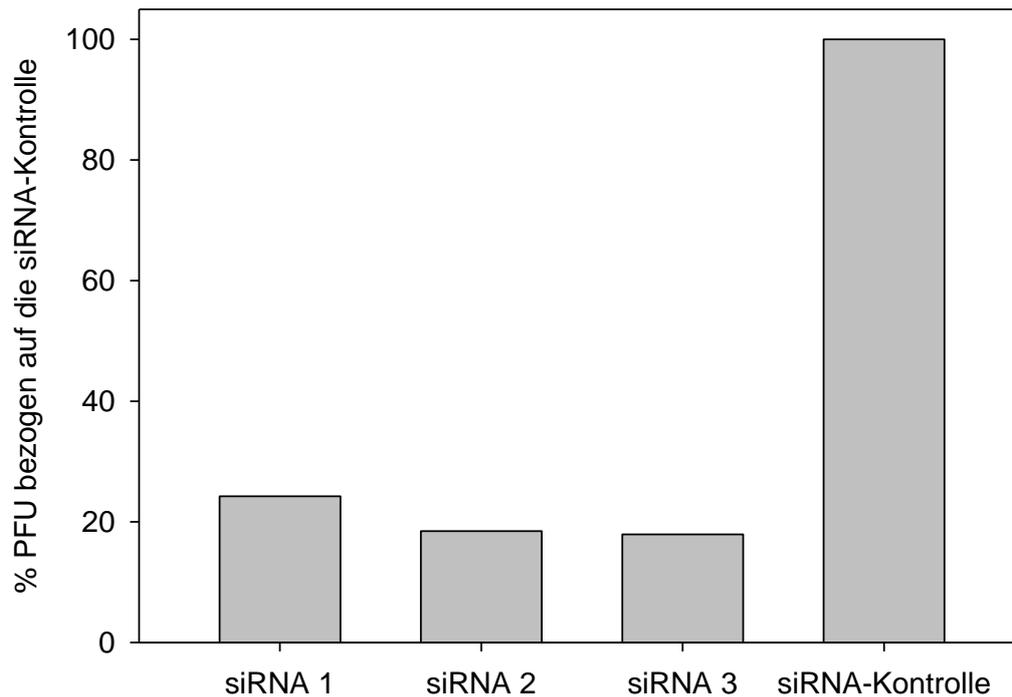
Unter dem Mikroskop war zu erkennen, dass bei den mit dem Kontroll-siRNA-Plasmid transfizierten Zellen wesentlich mehr Zellen infiziert waren als bei mit siRNA-Plasmid transfizierten Zellen. Außerdem waren von den siRNA 2- und siRNA 3-exprimierenden Zellen keine mit FSME-Virus infiziert (Abb. 38 C und D). Einige mit siRNA-Plasmid 1 transfizierte Zellen und sogar wesentlich mehr mit dem Kontroll-Plasmid transfizierte Zellen wiesen eine Infektion auf, obwohl sie MGFP exprimierten, und zeigten daher eine orangefarbene Färbung (Abb. 38 A und B).

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung weisen darauf hin, dass siRNA-exprimierende Zellen vor einer Infektion mit dem FSME-Virus geschützt wurden. Jedoch konnte nicht geklärt werden, ob es insgesamt auch weniger infektiöse Partikel in der gesamten Zellkultur gab oder nur die Menge infizierter Zellen reduziert war. Zur Klärung wurde ein Plaquetest durchgeführt.

### **C.3.2.5 Wirkung von siRNAs auf die Menge infektiöser Viruspartikel in eukaryotischen Zellen**

Die bisher angewandten Methoden ließen keinen Schluss über die tatsächliche Menge an replikationsfähigem Virus in der infizierten und transfizierten Zellkultur zu. Daher wurde in einem letzten Versuch die Menge infektiöser Partikel (*plaque forming units*, PFU) in den Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte mit Hilfe eines Plaquetests ermittelt. Der FSME-Virusstamm K23 wurde auch im Plaquetest exemplarisch für alle FSME-Virusstämme verwendet. Der Versuch wurde für alle siRNAs durchgeführt. Die Ergebnisse des Plaquetests bestätigten die Ergebnisse der vorangegangenen Tests.

Alle drei siRNAs senkten die Virusmenge in den Zellen verglichen mit der Kontroll-siRNA um ca. 80 % (Abb. 39). siRNA 2 und siRNA 3 zeigten hier ebenfalls eine bessere Wirkung als siRNA 1, wenn auch der Unterschied mit etwa 5 % nicht so groß war wie auf molekularer Ebene.



**Abb. 39: Wirkung der siRNA 1, siRNA 2 und siRNA 3 auf die Menge infektiöser FSME-Viren (Stamm K23) in infizierten HEK293T-Zellen.**

Virus wurde aus HEK293T-Zellen extrahiert und mit Hilfe eines Plaquetests die Menge infektiöser Partikel (PFU) pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte ermittelt. Der Virusgehalt der mit den siRNA-Plasmiden 1, 2 und 3 transfizierten Zellen wurde prozentual auf den Virusgehalt der mit dem siRNA-Kontroll-Plasmid transfizierten Zellen bezogen.

Zusammengefasst zeigten alle Versuche, dass gegen das FSME-Virus gerichtete siRNAs in der Lage waren konzentrationsabhängig die Menge von mit FSME-Virus infizierten Zellen, FSME-Viruspartikeln, FSME-Virus-RNA und FSME-Virusprotein zu reduzieren und damit die FSME-Viruslast in Zellkultur deutlich zu senken.

## D. Diskussion

### D.1 Etablierung von Methoden für den FSME-Virus Nachweis

Für eine verlässliche und exakte FSME-Diagnostik, zur Durchführung von Verbreitungsstudien sowie anderer virusbezogener Forschungsvorhaben sind Nachweismethoden erforderlich, mit denen die verschiedenen FSME-Virussubtypen zuverlässig und schnell erkannt und differenziert werden können. Bisher verwendete molekularbiologische Methoden können in der Regel entweder nicht alle Subtypen nachweisen oder sind fehler- und kontaminationsanfällig und zudem meist zeitaufwendig (Donoso Mantke *et al.*, 2007a). Daher wurden im Rahmen der Arbeit zuverlässige und schnelle molekularbiologische Methoden entwickelt und evaluiert, welche die vorhandenen serologischen und virologischen Methoden zum Virusnachweis ergänzen. Neben den molekularbiologischen Methoden wurden für bestimmte Fragestellungen, z.B. die Quantifizierung von Virusprotein, die Anfärbung von Virus auf mikroskopischer Ebene und den Nachweis von replizierfähigem Virus, weitere virologische Methoden etabliert.

#### D.1.1 Nachweis des FSME-Virus in Zellen mittels Immunofluoreszenztest und Western Blot

Eine mit FSME-Virus infizierte Zellkultur zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellen einen zytopathischen Effekt (CPE) zeigen. Da dieser jedoch nicht spezifisch für das FSME-Virus ist, wurde darüber hinaus zum sicheren und direkten Virusnachweis ein Immunofluoreszenztest (IFT) etabliert (Danes und Benda, 1960; Libikova, 1959; Libikova und Vilcek, 1959; Zasukhina und Levkovich, 1957). Bei der Entwicklung des Tests wurde darauf geachtet einen primären Antikörper zu verwenden, der alle FSME-Virussubtypen nachweisen kann und zu einem spezifischen Signal führt. Der monoklonale Antikörper MAB 1367 besitzt diese Eigenschaften und wies bei allen Anwendungen die höchste Spezifität für alle Virussubtypen auf, wie bereits von Niedrig *et al.* (1994) beschrieben.

Ein Problem ergab sich bei der Anfärbung der Zelllinie HEK293T, da diese im IFT eine starke Eigenfluoreszenz aufwies. Diese wurde auf eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers zurückgeführt, da die Hintergrundfärbung durch Verwendung eines anderen sekundären Antikörpers reduziert werden konnte. Eine Gegenfärbung der

Zellen mit Evansblue nach Closs und Aarli (1974) führte ebenfalls zu einer Reduzierung der Hintergrundfärbung.

Zur Quantifizierung der Virusproteine in Zellen oder im Zellkulturüberstand wurde ein Western Blot entwickelt. Die Austestung ergab, dass auch hier der monoklonale Antikörper MAB 1367 die besten Ergebnisse erbringt, da er in einer sehr hohen Verdünnung von 1:5.000 noch spezifisch an das E-Protein des FSME-Virus band.

### **D.1.2 Nachweis von infektiösen FSME-Viruspartikeln und neutralisierenden Antikörpern gegen das FSME-Virus mittels Plaquetest bzw. Neutralisationstest**

Für den Nachweis der tatsächlichen Anzahl infektiöser Partikel wurde als Standardmethode ein Plaquetest etabliert. Die besten Ergebnisse für den Test wurden mit PS-Zellen erzielt, die bereits von De Madrid und Porterfield (1969) für Plaquetests verwendet wurden. Diese besaßen gegenüber den ebenfalls getesteten VeroE6-Zellen den Vorteil, dass sie sich als sensitiver für das Virus erwiesen und der Test daher im Mittel zwei Tage früher auswertbar war. Dies deckt sich mit Untersuchungen von Vene *et al.* (1998), die für einen FSME-Virus-Plaquereduktions-Neutralisations-Test mit Vero-Zellen eine vergleichbare Inkubationsdauer von sieben Tagen beschreiben.

Ein Problem aller serologischen Tests sind Kreuzreaktionen, die zwischen verschiedenen Vertretern der Flaviviren auftreten können, da diese die gleichen Antigenepitope aufweisen (Kunze, 2007; Niedrig *et al.*, 1999; Reinhardt *et al.*, 1998; Weingartl *et al.*, 2003). Für die serologische Diagnostik wurde daher ein Neutralisationstest nach Protokollen von Niedrig *et al.* (1999) und Reinhardt *et al.* (1998) basierend auf den Ergebnissen des FSME-Plaquetests etabliert, da dieser spezifisch für einen Virusserokomplex ist und keine Kreuzreaktionen aufweist (Chiles und Reisen, 1998; Donoso Mantke *et al.*, 2007b; Holzmann *et al.*, 1996; Mayr *et al.*, 1977; Niedrig *et al.*, 1994). Die Resultate der durchgeführten Tests zeigen, dass der neu etablierte FSME-NT keine Kreuzreaktivität zum nahe verwandten Gelbfiebervirus aufweist und sich mit ihm neutralisierende Antikörper im Serum FSME-geimpfter Personen zuverlässig bis zu einem Titer von 1:10 nachweisen lassen.

Der Test kann in Zukunft im Rahmen des FSME-Konsiliarlabors dafür eingesetzt werden, mit anderen serologischen Tests erhaltene Laborergebnisse zu verifizieren und vor allem andere flavivirale Infektionen auszuschließen.

### **D.1.3 Nachweis und Quantifizierung von FSME-Virus-RNA mittels *real-time* RT-PCR-Systemen sowie Bestimmung des FSME-Virussubtyps mittels der *Pyrosequencing*-Methode**

Eine weitere direkte Nachweismethode für das FSME-Virus ist die quantitative *real-time* RT-PCR (RT-qPCR). Diese Methode erlaubt es, Virus-RNA noch in sehr kleinen Mengen zu erfassen und exakt zu quantifizieren. RT-qPCRs werden daher oft in der Diagnostik viraler Erreger eingesetzt (Fields *et al.*, 2007).

Derzeit beruht die FSME-Labordiagnostik hauptsächlich auf dem Nachweis von spezifischen IgG- und IgM-Antikörpern mit serologischen Methoden wie ELISA, IFT oder NT (Holzmann, 2003). Die Unsicherheit dieser Methoden besteht darin, dass Antikörper gegen das FSME-Virus in der frühen Phase einer FSME-Virusinfektion nicht nachgewiesen werden können (Niedrig *et al.*, 2001). Auch bei Personen, deren Impfung gegen FSME nur kurz zurück liegt, sind serologische Methoden problematisch, da IgM-Antikörper noch bis zu zehn Monate nach einer FSME-Impfung im Blut nachgewiesen werden können (Hofmann *et al.*, 1983). Im Gegensatz dazu kann die Virus-RNA des FSME-Erregers schon in der ersten Phase der Infektion in Serum und Cerebrospinalflüssigkeit mittels PCR nachgewiesen werden. Eine Einschränkung des Nachweises besteht darin, dass die Viruslast mit dem Auftreten von IgM-Antikörpern sinkt. Die PCR-basierte Diagnostik ist daher vor allem in den frühen Stadien der Erkrankung eine wichtige Ergänzung zu serologischen Methoden (Holzmann, 2003; Saksida *et al.*, 2005; Schwaiger und Cassinotti, 2003).

Der gleichzeitige Nachweis der verschiedenen FSME-Virussubtypen mit PCR-basierten Methoden in einem Durchgang ist nicht trivial, da die verschiedenen FSME-Viren in ihrem Genom Abweichungen von 15 % bis 20 % aufweisen (Lin *et al.*, 2003). Dies erschwert die Auswahl geeigneter Regionen für das Design von FSME-Virus-spezifischen Primern und Sonden (Vernet, 2004). Bisher verwendete PCR-Systeme erkennen daher oft nicht alle FSME-Virussubtypen oder können geringe Mengen von FSME-Virus-RNA nicht nachweisen (Donoso Mantke *et al.*, 2007a).

Zur Lösung dieses Problems wurden daher für den Nachweis aller FSME-Virussubtypen zwei neue RT-qPCR-Systeme mit jeweils einem spezifischen Primerpaar und einer *Minor groove binder*- (MGB-) Sonde entwickelt. Eines der Primerpaare bindet in der für das NS1-Protein kodierenden Region und amplifiziert ein 98 bp langes Fragment, das andere Primerpaar bindet in der für das E-Protein kodierenden Region und umschließt ein 123 bp langes Fragment. Die Primer und Sonden enthalten jeweils eine bis sechs Wobble-Basen, damit alle FSME-Virussubtypen und -stämme mit ihren

unterschiedlichen Sequenzen mit einem einzigen Primerpaar nachgewiesen werden können. Die Sonden wurden außerdem mit einer MGB-Gruppe versehen, welche die Spezifität der RT-qPCR, trotz kurzer SONDENSEQUENZEN, erhöht. Die MGB-Sonde bildet eine extrem stabile Bindung mit einzelsträngiger DNA und erlaubt daher den Einsatz kürzerer Sonden mit höherer Schmelztemperatur (Kutyavin *et al.*, 2000).

Die Überprüfung zeigte, dass beide RT-qPCR-Systeme eine hohe Spezifität für das FSME-Virus aufweisen, während andere nah verwandte Flaviviren nicht, oder im Falle der E-Protein-RT-qPCR, nur in Einzelfällen detektiert werden. Für die Diagnostik wurde daher die NS1-Protein-RT-qPCR ausgewählt und zusätzlich eine *one-step*-Anwendung mit FCV als interner Kontrolle etabliert und an 34 klinischen Liquorproben von FSME-Patienten erfolgreich getestet. Erwartungsgemäß war die Nachweisbarkeit von FSME-Virus-RNA in den zur Verfügung stehenden Liquorproben schlecht (in nur einer der 34 Proben wurde FSME-Virus-RNA nachgewiesen), da sie von Patienten stammten, die bereits FSME-spezifische Antikörper aufwiesen. Bei solchen Patienten ist das Virus in Blut und Liquor meist nicht mehr nachweisbar (Holzmann, 2003; Saksida *et al.*, 2005; Schwaiger und Cassinotti, 2003).

Beide RT-qPCR-Systeme weisen jedoch eine Nachweisgrenze von unter 16 Kopien bei 95 %iger Nachweiswahrscheinlichkeit und unter fünf Kopien bei 50 %iger Nachweiswahrscheinlichkeit auf. Probitanalysen ergaben, dass beide Systeme eine verlässliche Quantifizierung der FSME-Virus-RNA über mehr als fünf Logstufen zulassen. Im Gegensatz zu den bisher meist verwendeten RT-qPCRs, zeigen beide in dieser Arbeit entwickelten RT-qPCR-Systeme eine höhere Reproduzierbarkeit und sind spezifisch für das FSME-Virus (Schwaiger und Cassinotti, 2003).

Ringversuche zur Qualität von PCR-basierter FSME-Diagnostik zeigen, dass es bei *nested* PCR-Systemen im Vergleich mit *one-step*-RT-qPCR-Systemen doppelt so häufig zu falsch-positiven Ergebnissen kommt (Donoso Mantke *et al.*, 2007a). Die hier erfolgte Etablierung einer *one-step*-Anwendung bietet neben der hohen Nachweissicherheit auch eine schnelle und einfache Handhabung und minimiert das Kontaminationsrisiko, da es sich um ein geschlossenes System handelt. Ein weiterer Vorteil der *one-step*-Anwendungen gegenüber den *two-step*-Anwendungen ist, dass größere Volumina und damit höhere RNA-Mengen verwendet werden können und dadurch eine höhere Sensitivität erreicht wird. *Two-step*-Anwendungen bieten jedoch andere Vorteile, z.B. bei phylogenetischen Analysen, da durch Verwendung von randomisierten Primern in der hier von der PCR getrennt laufenden cDNA-Synthese die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben wird und nicht nur das in der PCR amplifizierte Fragment. Dadurch können verschiedenste PCRs mit dieser cDNA durchgeführt und Proben z.B. auf

verschiedene Erreger getestet werden. Beide Systeme bieten außerdem den Vorteil, dass nicht nur Serum- und Liquorproben sondern auch Gewebeproben und Zecken untersucht werden können.

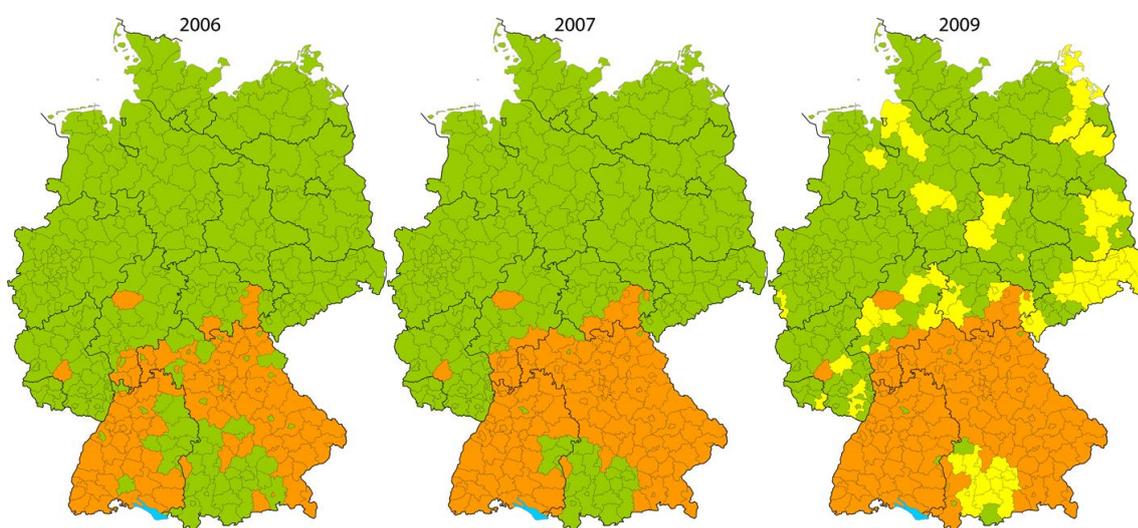
Die für die Diagnostik eingeführte interne Kontrolle ermöglicht außerdem die Überprüfung der verschiedenen Schritte, von der RNA-Extraktion über die cDNA-Synthese bis zur cDNA-Amplifikation. Vor allem bei einem negativen Ergebnis kann so nachvollzogen werden, ob alle Schritte optimal funktioniert haben. Die etablierte NS1-Protein-RT-qPCR genügt damit Qualitätsstandards und steht somit dem Konsiliarlabor-FSME des RKI zur Verfügung.

Für eine schnelle Subtypisierung des Virus in einer PCR-positiven Probe wurde die Methode des *Pyrosequencings* etabliert (Ronaghi *et al.*, 1996; Ronaghi *et al.*, 1998). Diese kann direkt im Anschluss an die NS1-Protein-RT-qPCR durchgeführt werden. Die schnelle Bestimmung des Subtyps durch *Pyrosequencing* direkt im Anschluss an die PCR ist eine wichtige Neuerung, da das bisher meist für den FSME-Virusnachweis verwendete RT-qPCR-System nicht zwischen den verschiedenen Subtypen unterscheiden kann (Schwaiger und Cassinotti, 2003). Sie bietet auch große Vorteile im Vergleich zu anderen Systemen, die bisher für eine Differenzierung des Subtyps verwendet werden, wie z.B. der klassische Sequenzierung nach Sanger (1977) oder Multiplex-PCR-Systemen mit mehreren Primerpaaren (Růžek *et al.*, 2007). Diese nehmen wesentlich mehr Zeit in Anspruch, haben eine geringere Sensitivität und ein erhöhtes Kontaminationsrisiko. Auch kann die Sanger-Sequenzierung für durch RT-qPCR generierte Fragmente nicht oder nur sehr eingeschränkt eingesetzt werden, da diese Fragmente für eine klassische Sequenzierung zu kurz sind. Das neu etablierte System verbindet damit die hohe Sensitivität und das geringe Kontaminationsrisiko einer RT-qPCR mit einer schnellen Identifizierung des Subtyps durch *Pyrosequencing*.

Die Verwendung des neuen Systems ermöglicht es in Zukunft schneller eine genauere Diagnose zu stellen, um den Patienten optimal zu betreuen und ggf. eine dem identifizierten Subtyp entsprechende Behandlung einleiten zu können. Es gestattet ebenfalls eine einfachere Durchführung von Verbreitungs- und Phylogeniestudien für das FSME-Virus und seiner verschiedenen Subtypen, die als Grundlage von Risikoabschätzungen dienen können. Dadurch lassen sich die Verbreitungswege des Virus besser verfolgen und ggf. geeignete Präventionsmaßnahmen zum Schutz der Bevölkerung entwickeln.

### D.2 Identifizierung eines Indikators für die Verbreitung des FSME-Virus

In den vergangenen Jahren ist nicht nur die Zahl der FSME-Fälle gestiegen, sondern es traten auch Fälle in zuvor als FSME-frei geltenden Regionen auf (Anonymous, 2009; 2010; Bröker und Gniel, 2003; Donoso Mantke *et al.*, 2008; Haglund, 2002; Kerbo *et al.*, 2005; Kunze, 2007; Sumilo *et al.*, 2008; Süss, 2008; Zimmermann und Koch, 2005). Eines der Gebiete mit neu aufgetretenen FSME-Fällen ist Brandenburg. In den 1970igern kam das FSME-Virus dort noch vor und verursachte zahlreiche Infektionen bei Menschen. In den 1980igern gingen die beobachteten humanen FSME-Fälle zurück und das Virus ließ sich nicht mehr nachweisen (Süss *et al.*, 1996). Erst seit 2006 sind wieder einzelne autochthone (Infektion erfolgte am Ort des Auftretens) Fälle von FSME in Brandenburg aufgetreten (Abb. 40) (Anonymous, 2009; 2010; Becker *et al.*, 2006). Jedoch können die wenigen humanen Fälle keinen Aufschluss über das FSME-Risiko für Brandenburg geben. Aus diesem Grund wurden in der Arbeit verschiedene Methoden untersucht, um einen Indikator zu identifizieren, mit dessen Hilfe die Verbreitung des FSME-Virus unabhängig von humanen Fällen und für Gebiete mit geringer Viruszirkulation untersucht werden kann.



**Abb. 40: Zunahme der Risikogebiete von 2006 bis 2009.**

Risikogebiete sind orange, Gebiete mit einzelnen beobachteten FSME-Fällen gelb und FSME-freie Gebiete grün unterlegt. (Quelle: die Karten wurden nach Daten des RKI erstellt (Anonymous, 2009; 2010).

Vögel und größere Säugetiere wie Rotwild oder Füchse kommen wegen ihrer relativ ausgedehnten Territorien und ihrer Lebenserwartung von einigen Jahren nicht als Indikator für das FSME-Virus in Betracht. Auch lässt sich das Virus in diesen Tieren nur

indirekt durch serologische Methoden nachweisen, so dass keine genaue geografische und zeitliche Analyse der FSME-Virusverbreitung möglich ist (Han *et al.*, 2001; Holzmann *et al.*, 2009; Pfeffer und Dobler, 2010; Wurm *et al.*, 2000). Von größerem Informationsgehalt ist die Untersuchung von kleinen Nagetieren und Zecken, da diese einen kleinen Aktionsradius haben und unter natürlichen Bedingungen nur eine kurze Lebenserwartung aufweisen. Außerdem kann in Zecken- und Nagetierproben ein direkter Virusnachweis erfolgen (Bakhvalova *et al.*, 2007; Fomsgaard *et al.*, 2009; Jääskeläinen *et al.*, 2006; Klaus *et al.*, 2010; Kozuch *et al.*, 1990; Kozuch *et al.*, 1963; Ramelow *et al.*, 1993; Schrader und Süss, 1999; Süss *et al.*, 1996; Süss *et al.*, 2002; Süss *et al.*, 1992).

### D.2.1 Nachweis des FSME-Virus in Zecken

Die Prävalenz der FSME in einem bestimmten Gebiet wird bisher vor allem durch die Untersuchung von im Freiland gesammelten Zecken abgeschätzt (Fomsgaard *et al.*, 2009; Jääskeläinen *et al.*, 2006; Klaus *et al.*, 2010; Ramelow *et al.*, 1993; Schrader und Süss, 1999; Süss *et al.*, 1996; Süss *et al.*, 2002; Süss *et al.*, 1992). In europäischen Zecken, die noch keine Blutmahlzeit zu sich genommen haben, liegt die durch RT-PCR-Methoden bestimmte Prävalenz für das FSME-Virus zwischen 0,1 % und 5 % (Süss *et al.*, 2004). Eine aktuelle Studie, die die Prävalenz des FSME-Virus in 62.343 Zecken aus Endemiegebieten der Schweiz untersucht hat, kommt auf eine Rate von nur 0,46 % (Gaumann *et al.*, 2010). Die Untersuchung von 2.150 Zecken zwischen 2005 und 2008 aus einem FSME-Focus im Südosten Deutschlands erbrachte sogar eine Prävalenz-Rate von nur 0,23 % (Kupča *et al.*, 2010). Für eine aussagekräftige Studie über die Prävalenz des FSME-Virus in als endemisch angesehenen Regionen sollten daher mindestens 500 bis 1.000 Zecken je Gebiet untersucht werden, für Gebiete mit unbekanntem Endemiestatus sogar einige tausend.

Für Brandenburg stellte sich daher die Frage, ob eine Untersuchung von Zecken mit molekularbiologischen Methoden einen Aufschluss über die FSME-Virusverbreitung geben kann, da Zecken aus diesem Gebiet vermutlich nur eine geringe Virusprävalenz aufweisen. Daher musste evaluiert werden, ob die etablierte RT-qPCR sich zur Untersuchung von Zecken eignet. Die Eignung dieser Methode wurde dadurch überprüft, dass im Labor infizierte Zecken sowie in Lettland gesammelte Zecken, die noch keine Blutmahlzeit zu sich genommen hatten, mit der zuvor etablierten RT-qPCR auf FSME-Virus-RNA untersucht wurden. Die Zecken aus Lettland wurden deshalb für die Experimente ausgewählt, da Lettland als Hochendemiegebiet gilt und bei den dort

gefangenen Zecken eine deutlich höhere FSME-Virusprävalenz erwartet wurde als bei Zecken aus Deutschland (Süss *et al.*, 2004).

Von den in dieser Arbeit untersuchten Zecken aus Lettland waren im Mittel 5,7 % positiv für das FSME-Virus. Untersuchungen zwischen 1991 und 2002 zeigten, dass die FSME-Prävalenz in lettischen Zecken im Durchschnitt 7,9 % betrug, mit einer Schwankung von 1,4 % bis 28,4 % (Bormane *et al.*, 2004; Süss *et al.*, 2004). Die hier gefundene Rate liegt also im erwarteten Bereich der Untersuchungen der letzten Jahre.

Ebenfalls konnten zwei von drei im Labor infizierte Zecken positiv auf FSME-Virus-RNA getestet werden. Allerdings waren die ermittelten Virusmengen mit weniger als 10 FSME-Virus-RNA-Kopien pro  $\mu\text{l}$  Zeckenextrakt sowohl bei den lettischen als auch bei den im Labor infizierten Zecken sehr gering. Trotz sensitiver Nachweismethoden kann es auf Grund dieses niedrigen Virusgehaltes leicht zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Die hier beobachteten geringen Virustiter in den untersuchten Zecken decken sich mit Angaben aus der Literatur, in denen beschrieben wird, dass die Viruslast von Zecken vor einer Blutmahlzeit niedrig ist (Gritsun *et al.*, 2003c). Dafür sprechen auch Studien von Bormane *et al.* (2004) und Süss *et al.* (2006; 2004), in denen gezeigt werden konnte, dass Zecken vor der Blutmahlzeit eine 10- bis 20-mal niedrigere FSME-Virusinfektionsrate aufweisen als Zecken nach der Blutmahlzeit. Die Erhöhung der Infektionsrate wird dadurch erklärt, dass sich das FSME-Virus während der Blutmahlzeit in den sekretorischen Zellen des Darms und den Epithelzellen der Malpighischen Gefäße vermehrt und erst dadurch einen nachweisbaren Titer erreicht (Pavlovsky, 1966; Perez-Eid *et al.*, 1992). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Viruslast im Speichel der Zecke nach der Blutmalzeit um das Zehnfache bis Hundertfache ansteigt und Zecken, die wegen ihres geringen Virusgehaltes vor der Blutmahlzeit negativ getestet werden, nach einer Blutmahlzeit so viel Virus enthalten, dass ein Test positiv ausfällt (Alekseev und Chunikhin, 1990; Lindquist und Vapalahti, 2008). Dazu kommt, dass sich Zecken vor der Blutmahlzeit in einer Diapause befinden, in der ihr Stoffwechsel herunter reguliert ist und daher nur wenige Zellteilungen stattfinden. Viren vermehren sich jedoch in sich teilenden Zellen, so dass auch dadurch ein niedriger Virusgehalt in nüchternen Zecken, und ein Anstieg des Virusgehaltes nach der Blutmahlzeit, also nach Beendigung der Diapause, erklärt werden kann (Calisher *et al.*, 1989; Mishaeva und Erofeeva, 1979; Mishaeva und Votjakov, 1978; Naumov, 1982).

Die vorliegenden Daten zeigen also, dass die neu entwickelte RT-qPCR für den Virusnachweis bei Zecken geeignet ist. Allerdings mit der Einschränkung, dass eine FSME-Risikoabschätzung mit nüchternen Zecken nur für Endemiegebiete mit entsprechend hoher Viruszirkulation vorgenommen werden kann. Nur dort ist die Zahl

FSME-Virus-infizierter Zecken mit ausreichendem Virusgehalt hoch genug für eine statistische Auswertung.

### **D.2.2 Organtropismus und Persistenz des FSME-Virus in Feldmäusen (*Microtus arvalis*)**

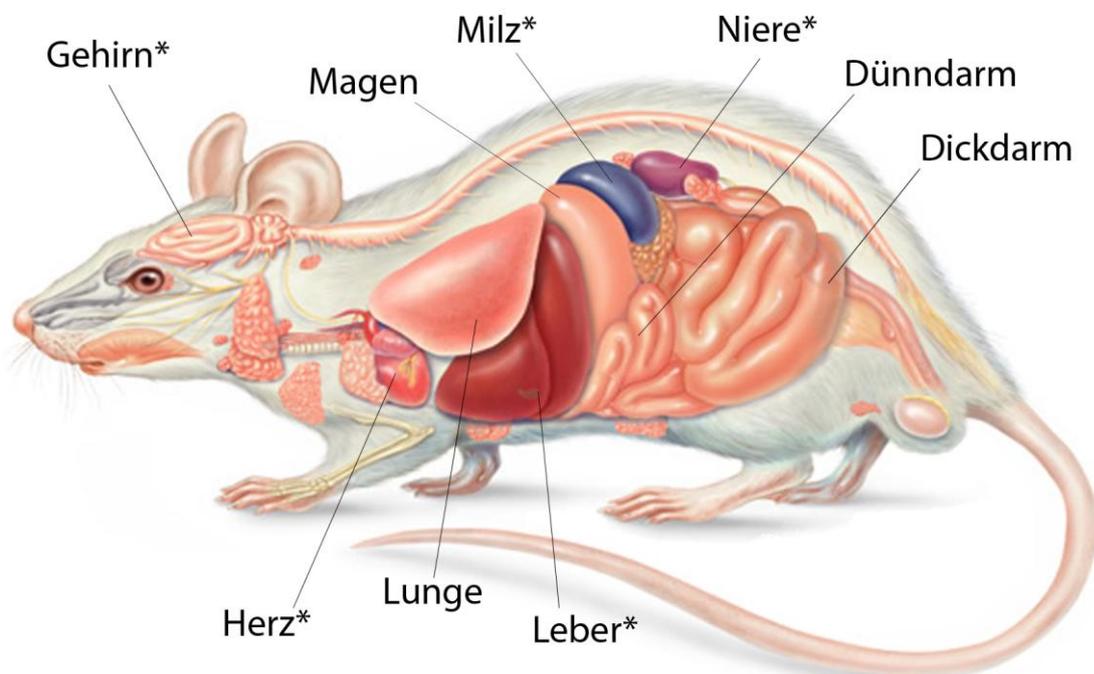
Der Nachweis von FSME-Virus in kleinen Säugetieren (hauptsächlich in Nagern und Insektivoren) wird in der Literatur als eine weitere Methode zur Analyse des FSME-Risikos beschrieben (Bakhvalova *et al.*, 2007; Kozuch *et al.*, 1990; Kozuch *et al.*, 1963). Generell sind alle Nagetierarten als Untersuchungsobjekte zur Analyse der FSME-Virusverbreitung geeignet, da sich ein Virusbefall bei allen untersuchten an Land lebenden Kleinsäugetieren beobachten ließ (Ernek *et al.*, 1963; Kozuch *et al.*, 1981; Kozuch *et al.*, 1963; Mornsteinova und Albrecht, 1957; Radda *et al.*, 1969). Genauere Studien zum Infektionsverlauf und dem Organtropismus bei Nagern wurden jedoch nur in Einzelfällen durchgeführt (Bakhvalova *et al.*, 2007; Naumov *et al.*, 1985). Die Kenntnis dieser beiden Parameter ist jedoch wichtig, um entscheiden zu können, ob und welche Nagerorgane sich für eine Detektion von FSME-Virus-RNA eignen. Darüber hinaus sind die Untersuchungen zur Persistenz des FSME-Virus in Nagern in der Regel älteren Datums (Chunikhin *et al.*, 1981; Ernek *et al.*, 1963; Heigl und von Zeipel, 1966; Smetana und Malkova, 1966). Daten, die mit neueren und daher RNA-spezifischen sowie sensitiveren Virusnachweismethoden, wie der RT-qPCR generiert wurden, liegen dagegen kaum vor (Bakhvalova *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurden Feldmäuse (*Microtus arvalis*), die als Wirtstiere für das FSME-Virus beschrieben werden, im Labor mit dem FSME-Virus infiziert (Kozuch *et al.*, 1981; Kozuch *et al.*, 1995; Nosek und Grulich, 1967). Anschließend wurden wichtige Organe (Leber, Niere, Herz, Milz, Gehirn) und Blut zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und auf FSME-Virus-RNA untersucht.

Die durchgeführte Untersuchung zeigte überzeugend, dass das FSME-Virus in Feldmäusen persistiert, auch wenn die Belastung mit Virus stark variiert. Die hier verwendeten Nager stammen ursprünglich von Feldmäusen, die in der freien Wildbahn gefangen wurden. Obgleich diese Feldmäuse seit mehreren Generationen im Labor gezüchtet wurden, ist daher eine höhere genetische Variabilität zu erwarten als bei üblichen Labormäusen. Die Variabilität im Infektionsverlauf zwischen den einzelnen Tieren kann auf deren unterschiedliche Abstammung zurückgeführt werden. Die meistens im Labor verwendeten Hausmauslinien (z.B. Swiss Albino oder BALB/c) eignen sich wegen einer Mutation im zur interferoninduzierenden Proteinfamilie gehörenden

Gen Oas 1b nicht zur Untersuchung einer FSME-Virusinfektion. Auf Grund dieser Mutation sterben sie an einer FSME-Virusinfektion innerhalb von ein bis drei Wochen (Lindenbach und Rice, 2001; Mandl, 2005; Růžek *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse bestätigen, dass die Feldmaus (*Microtus arvalis*) eine persistierende Form der Infektion entwickelt, obwohl sie keine klinischen Anzeichen dieser Infektion aufweist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Virus in den untersuchten Organen (Milz, Leber, Herz, Gehirn und Nieren) bis zu drei Monate lang nachweisbar ist (Abb. 41).

Exemplarisch wurde eine Virusanzucht für drei Organproben (Gehirn Tag 5 und Tag 100 sowie Leber Tag 100) durchgeführt. Aus allen drei Organen konnte erfolgreich Virus angezüchtet werden. Dadurch wurde nachgewiesen, dass das Virus auch in den Organen persistiert und dass nicht nur virale RNAs sondern replizierfähige Viren nachgewiesen wurden. Weiterhin konnte in einigen Tieren noch bis zu 50 Tage nach der Infektion Virus im Blut detektiert werden. Die Dauer der Virämie variiert also individuell. Diese Unterschiede beruhen vermutlich ebenfalls auf dem genetisch heterogenen Hintergrund der Tiere. Auf Grund dieser Ergebnisse, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Tiere genetisch prädisponierter Populationen eine wichtigere Rolle bei der Viruszirkulation spielen als Tiere genetisch nicht prädisponierter Populationen.



**Abb. 41: Anatomie der Maus mit Bezeichnung wichtiger Organen.** Die Organe, in denen FSME-Virus-RNA nachgewiesen wurde, sind mit einem Stern (\*) markiert. (Quelle: Veränderte Grafik nach <http://www.laurieokeefe.com>)

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass Feldmäuse in der Natur ein Reservoir für das FSME-Virus bilden (Nosek *et al.*, 1970). Zudem unterstützen sie Studien, die nachweisen, dass viele Nager eine persistierende FSME-Virusinfektion entwickeln (Bakhvalova *et al.*, 2006; Bakhvalova *et al.*, 2007; Kozuch *et al.*, 1967; Kozuch *et al.*, 1966; Kozuch *et al.*, 1963; Naumov *et al.*, 1984; Smith, 1994). Sie zeigen auch, dass das Virus mindestens drei Monate in Organen und über einen Monat im Blut infizierter Nager persistiert. Darüber hinaus unterstützen sie ältere Studien mit Rötel- und Gelbhalsmäusen von Ernek *et al.* (1963), Chunikhin *et al.* (1981) sowie Smetana und Malkova *et al.* (1966), die das FSME-Virus im Blut von Nagern bis zu fünf Tage und in den Organen bis zu einem Monat nach der Infektion nachweisen konnten. Die zeitlichen Unterschiede in der Nachweisbarkeit von Virus können hierbei sowohl auf die verschiedenen untersuchten Nagerarten zurückgeführt werden als auch auf die in den älteren Studien verwendeten weniger sensitiven Methoden.

Für die Prävalenzstudie in Brandenburg wurden Nagerorgane (Milz und Gehirn) untersucht, da in diesen die Viruslast deutlich höher (zwischen 10 und 1.000 FSME-Virus-RNA-Kopien pro mg Organ) lag, als in den untersuchten Zecken (durchschnittlich zwei RNA-Kopien pro  $\mu$ l Zeckenextrakt). Milz- und Gehirngewebe wurden ausgewählt, da sich in diesen Geweben über den gesamten Untersuchungszeitraum Virus nachweisen ließ, bzw. in diesen Organen die höchsten Virusmengen vorkamen.

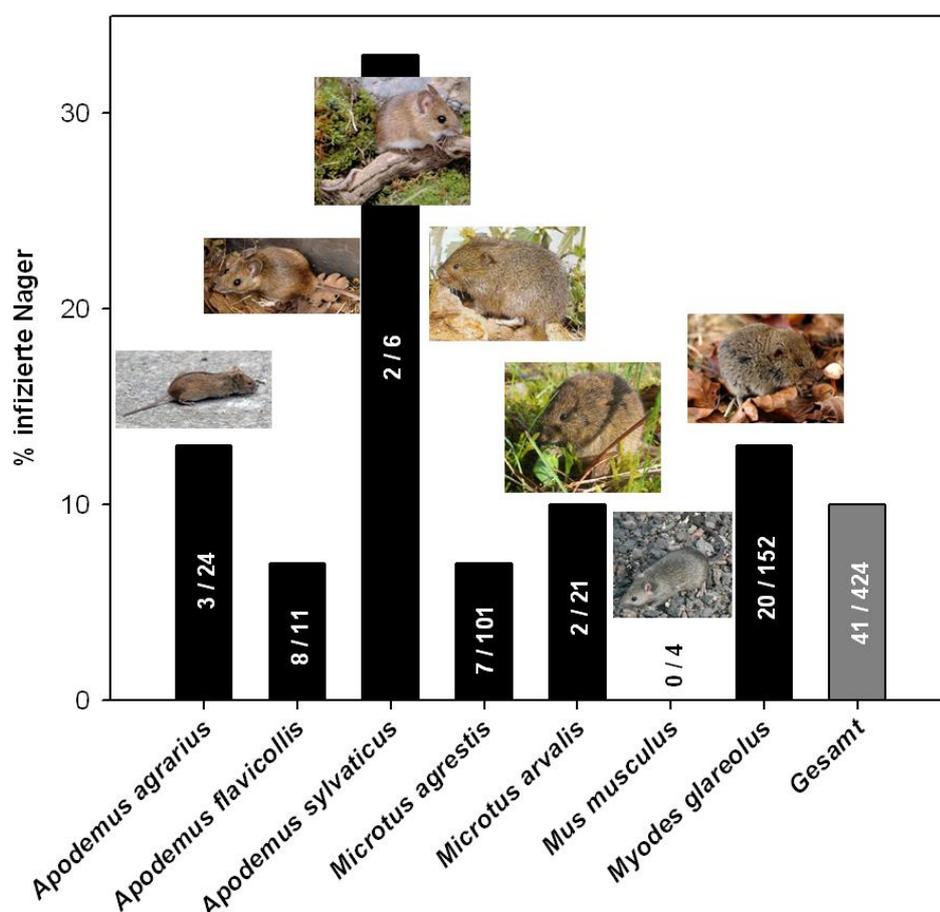
### **D.2.3 Studie zur Prävalenz des FSME-Virus in Nagern aus Brandenburg**

Zur Ermittlung der Prävalenz des FSME-Virus im Land Brandenburg wurden Milz- und Gehirnproben von Nagern verschiedener Standorte in Brandenburg mit der RT-qPCR untersucht und ihre Viruslast wurde mit der von Nagern aus Risikogebieten und aus FSME-freien Gebieten verglichen. In der Untersuchung ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Rate positiver Milz- und Gehirnproben feststellen, daher wurden bei der weiteren Datenauswertung alle Nagerproben gemeinsam betrachtet.

Insgesamt wurden 10 % der untersuchten Nager aus ganz Deutschland positiv für das FSME-Virus getestet. Verglichen mit einer Studie von Bakhvalova *et al.* (2006), in der Nager aus Hochendemiegebieten in Sibirien eine Prävalenz für das FSME-Virus von bis zu 61 % aufwiesen, bestätigt diese geringe Durchseuchung deutscher Nager die Ansicht, dass Deutschland kein Hochendemiegebiet ist.

## Diskussion

Das FSME-Virus wurde in den sechs Nagerarten *Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Microtus agrestis*, *Microtus arvalis*, *Myodes glareolus* nachgewiesen (Abb. 42). Nur in Hausmäusen (*Mus musculus*) konnte kein Virus detektiert werden. Jedoch lagen nur vier Hausmausproben vor, so dass keine Aussage über die Prävalenz des FSME-Virus in dieser Spezies getroffen werden konnte. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass im Prinzip alle Nagetierarten als Wirtstiere für das FSME-Virus zu betrachten sind, wie es von Kozuch *et al.* (1981) postuliert wurde.



**Abb. 42: Infektionsraten der verschiedenen Nagerspezies.**

Die Zahlen in den Balken geben an, wie viele der insgesamt untersuchten Tiere positiv auf FSME-Virus-RNA getestet wurden. (Quelle: Veränderte Grafiken nach <http://commons.wikimedia.org>).

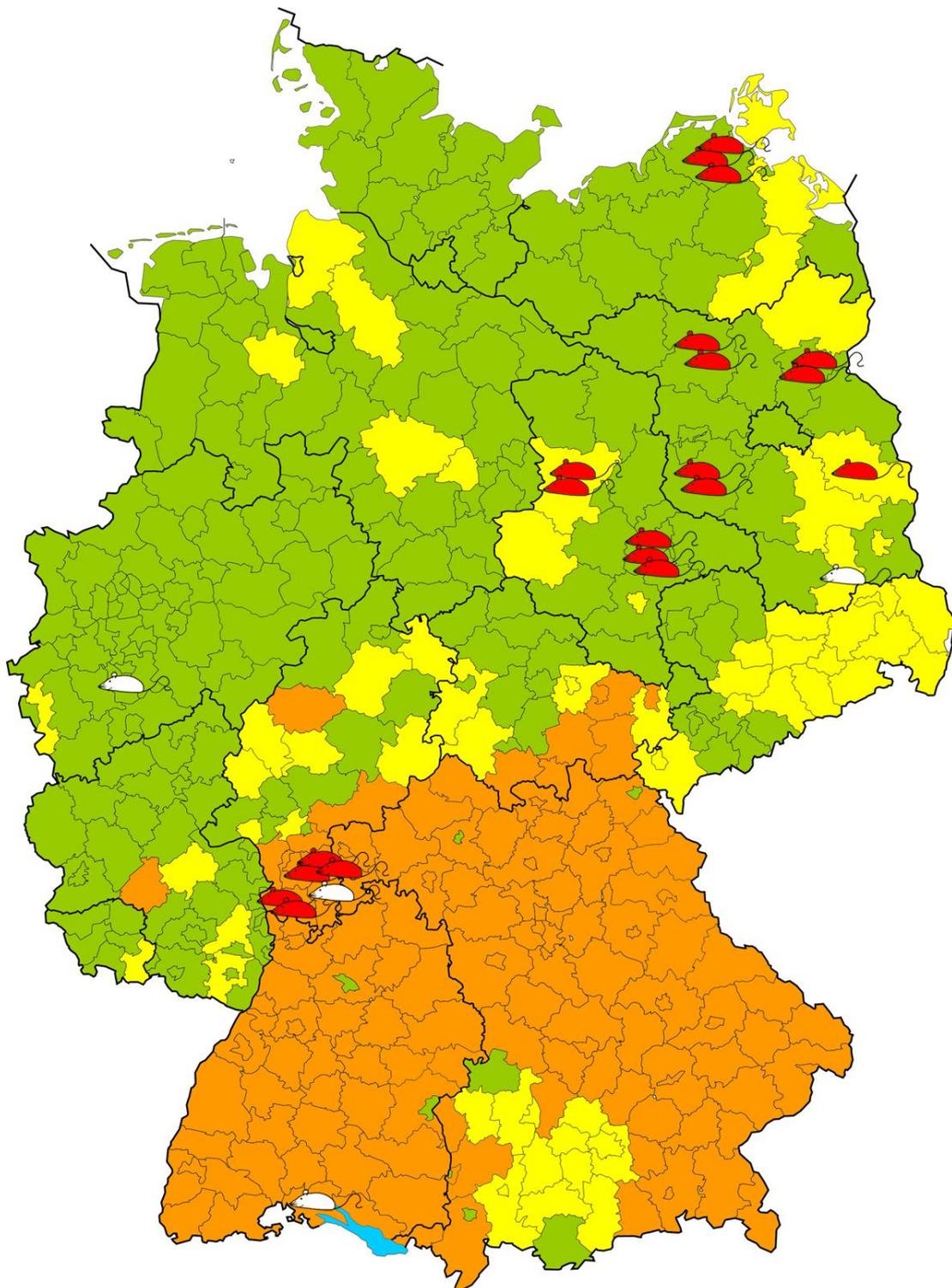
Bakhvalova *et al.* (2006) zeigten, dass in der Umgebung von Novosibirsk Polarrötelmäuse (*Myodes rutilus*) eine höhere FSME-Virusinfektionsrate als Brandmäuse (*Apodemus agrarius*) aufweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Durchseuchungsrate von Rötelmäusen (*Myodes glareolus*), die nach Kotlik *et al.* (2006) eine nah verwandte Art der Polarrötelmäuse sind, und Brandmäusen

(*Apodemus agrarius*) nachgewiesen werden. Beide Spezies wiesen mit 13 % die höchste Prävalenz für das FSME-Virus aller untersuchten Nagerarten auf. Nur die Waldmaus (*A. sylvaticus*) bildete eine Ausnahme, da von dieser nur sechs Exemplare untersucht wurden, so dass keine Prävalenz berechnet werden konnte (Abb. 42). Das Ergebnis legt nahe, dass in Deutschland Rötel- und Brandmaus die wichtigsten Wirte für das FSME-Virus sind. Gelbhalsmaus, Erdmaus und Feldmaus wiesen im Mittel eine Infektionsrate von ca. 8 % auf. Allerdings waren die Unterschiede in der Durchseuchung zwischen den Spezies nicht signifikant.

In der Infektionsrate der Geschlechter ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachweisen. Dahingegen waren signifikant mehr subadulte Nager (11 %) im Vergleich zu juvenilen (6 %) und adulten (4 %) Nagern mit dem FSME-Virus infiziert. Die hohe Prävalenz für das FSME-Virus in subadulten Nagern, also in Tieren vor der Geschlechtsreife, kann dadurch erklärt werden, dass diese Tiere auf Grund ihres höheren Alters von einer größeren Anzahl von Zecken befallen werden als juvenile, und sich dadurch eher eine FSME-Virusinfektion zuziehen. Die geringere Prävalenz in den adulten Nagern kann durch eine eventuell ausgeheilte Infektion und eine damit einhergehende Immunität gegen das Virus erklärt werden. Weiterhin könnte die geringe Infektionsrate adulter Tiere darauf zurückzuführen sein, dass vom Virus geschwächte Jungtiere vor Erreichen der Geschlechtsreife sterben oder Opfer von Räufern werden.

Viele Regionen, in denen mit FSME-Virus infizierte Nager gefunden wurden und die damit potentielle FSME-Risikogebiete sind, wurden bislang nicht als FSME-Risikogebiete eingestuft, da dort nur wenige autochthone Fälle nachgewiesen wurden (Anonymous, 2009; 2010). Aus einem Lagevergleich wird klar, dass die bisher als FSME-frei eingestuften Landkreise mit positiv getesteten Nagern immer an Risikogebiete (orange) oder an Gebiete mit autochthonen FSME-Fällen (gelb) grenzen (Abb. 43).

Im Gegensatz zum Land Brandenburg wurden im Stadtpark Köln, welcher weit entfernt von allen Risikogebieten mitten in der Stadt liegt, keine für das FSME-Virus positiven Mäuse gefunden. Der Vergleich von Risikogebieten mit anderen ländlichen, bisher als FSME-frei geltenden Gebieten, zeigt auch, dass in Risikogebieten signifikant mehr Nager positiv für das FSME-Virus sind (14 %) als in als FSME-frei geltenden Gebieten (8 %). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das FSME-Risiko in vielen Gebieten bisher nicht erkannt wurde und das FSME-Virus in Brandenburg wieder vorkommt.



**Abb. 43: Deutschlandkarte mit ausgewiesenen FSME-Risikogebieten auf Basis der vom RKI veröffentlichten Daten mit den Fangorten der untersuchten Nagetiere.**

Risikogebiete sind orange, Gebiete mit einzelnen beobachteten FSME-Fällen gelb und FSME-freie Gebiete grün unterlegt. Landkreise, aus denen Nagerproben untersucht wurden, sind mit einer Maus versehen. Landkreise, in denen FSME-positive Nager gefunden wurden, sind mit einer roten Maus gekennzeichnet, Landkreise, in denen keine positiven Mäuse gefunden wurden, mit einer weißen Maus (1 rote Maus: 1-4 % FSME-Virus-infizierte Mäuse, 2 rote Mäuse: 5-14 % FSME-Virus-infizierte Mäuse, 3 rote Mäuse: über 15 % FSME-Virus-infizierte Mäuse).

Somit deutet das Wiederauftreten der FSME in Brandenburg daraufhin, dass das Virus sich auch in Deutschland, wie allgemein in Europa beobachtet, weiter nach Norden ausbreitet (Bröker und Gniel, 2003; Donoso Mantke *et al.*, 2008; Fomsgaard *et al.*, 2009; Jääskeläinen *et al.*, 2006; Kerbo *et al.*, 2005; Randolph, 2004; Süss *et al.*, 2008).

Generell schwankt die Durchseuchung von Landkreis zu Landkreis bzw. von Sammelort zu Sammelort sehr stark (Abb. 43). Diese Schwankungen können darauf zurückgeführt werden, dass das FSME-Virus immer in *natural foci* auftritt, welche auf einige Quadratmeter bis Quadratkilometer begrenzt sind. Das Konzept der *natural foci* wurde von Evgeny Pavlovsky (1966) entwickelt (siehe Kapitel A.3).

Die ermittelte Prävalenz des FSME-Virus in Nagern für Landkreise in Brandenburg liegt zwischen 0 % und 10 %. Die Studie liefert den ersten direkten FSME-Virusnachweis für das Land Brandenburg seit den 1980igern (Süss, 2008; Süss *et al.*, 1996). Die Daten bestätigen ebenfalls eine in 2008 durchgeführte Studie zur FSME-Seroprävalenz bei Forstarbeitern aus Brandenburg. In der Studie wiesen 11 % der nicht gegen FSME geimpften Waldarbeiter IgG-Antikörper gegen das FSME-Virus auf (Wohlfarth *et al.*, 2009). Der alleinige Nachweis von IgG-Antikörpern lässt jedoch keine sichere Aussage darüber zu, wann und wo die Forstarbeiter mit dem Virus in Kontakt gekommen sind.

Das Wiederauftreten des FSME-Virus in Brandenburg kann durch verschiedene Faktoren erklärt werden. Ein verändertes Klima könnte dazu geführt haben, dass die Wirtstiere des Virus bessere Bedingungen vorfinden und sich daher das Virus stärker vermehrt. Für das Verschwinden des Virus in den 80ziger Jahren könnte der exzessive Einsatz von Pflanzenschutzmitteln (Insektizide, Fungizide, Herbizide) in der Landwirtschaft der Deutschen Demokratischen Republik (DDR) verantwortlich sein, der sowohl die Populationsdichte der Nager als auch die der Zecken reduzierte. Das Wiederauftreten des Virus wäre dann eine Folge des Zusammenbruchs der DDR und der nach 1990 folgenden Erholung der Natur (Randolph, 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen eindeutig, dass das FSME-Virus in Brandenburg wieder vorkommt und das Risiko besteht, sich in Brandenburg mit dem Virus zu infizieren. Darüber hinaus belegt die Untersuchung, dass sich Nagetiere auch in Gebieten mit nur geringem FSME-Risiko als Indikator für das FSME-Virus eignen.

Groß angelegte systematische Verbreitungsstudien mit Nagern als Indikatoren, wie sie bereits für andere Erreger, z.B. das Hantavirus, durchgeführt werden, könnten in der Zukunft eine bessere Risikoabschätzung sowohl für alle Regionen Deutschlands als auch für andere Länder ermöglichen und so die Ausweisung von Risikogebieten erleichtern (Ulrich *et al.*, 2008). Dadurch wäre es ebenfalls möglich, gezielt präventive

## Diskussion

---

Maßnahmen zum Schutz der Bevölkerung zu entwickeln bzw. Empfehlungen und Warnungen auszusprechen. Wünschenswert wären Studien unter Einschluss möglichst aller Kleinsäugerarten, um eine Übersicht darüber zu gewinnen, welche Arten als Hauptvektoren für die Verbreitung des Virus deutschland- und europaweit verantwortlich sind und so unser Verständnis für die Vektorökologie des FSME-Virus im Allgemeinen zu verbessern. Mit diesem Wissen wäre es ggf. möglich mit Hilfe einer gezielten Vektorkontrolle, die Verbreitung des FSME-Virus und damit der Frühsommer-Meningoenzephalitis zu kontrollieren. Diese Studien würden u.a. auch Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang zwischen der geographischen Ausbreitung des Virus und dem Klimawandel sowie sozioökonomischen, sozialen und politischen Bedingungen geben.

### D.3 Entwicklung einer RNA-Interferenz-Strategie gegen FSME

Eine FSME-Virusinfektion kann zwar durch eine aktive Impfung verhindert werden, jedoch steht für die Therapie einer akuten Infektion nur eine symptomatische Behandlung zur Verfügung (Demicheli *et al.*, 2000; Hayasaka *et al.*, 2001; Holzmann *et al.*, 1992; Lindquist und Vapalahti, 2008). Aus diesem Grund sollte ein antiviraler Wirkstoff entwickelt und *in vitro* getestet werden, welcher die Replikation des FSME-Virus hemmt.

Für die Entwicklung von siRNA-Molekülen, die an die RNA aller drei humanpathogenen FSME-Virusstypen binden sollten, wurde eine sorgfältige Sequenzanalyse aller verfügbaren FSME-Virussequenzen durchgeführt. Da jedoch die verschiedenen FSME-Viren in ihrem Genom Abweichungen von 15 % bis 20 % aufweisen, konnten keine siRNA-Sequenzen ermittelt werden, die auf alle Subtypen perfekt passten und den in der Literatur beschriebenen Anforderungen einer siRNA genügten (Amarzguioui und Prydz, 2004; Lin *et al.*, 2003).

Aus diesem Grund wurden zunächst in Frage kommende siRNA-Sequenzen für einen Referenzstamm des europäischen Subtyps (K23) ermittelt und dann mit den Sequenzen anderer FSME-Virusstämme und -subtypen verglichen. Drei potentielle siRNAs wurden ausgewählt, die jedoch in Abhängigkeit vom Virusstyp bis zu zwei Fehlpaarungen der Basen aufwiesen. Allerdings konnten diese dennoch verwendet werden, da Du *et al.* (2005) und Holen *et al.* (2005) nachweisen konnten, dass siRNAs auch wirksam sind, wenn in bestimmten Bereichen der Sequenz Fehlpaarungen vorkommen. Die ausgewählten siRNA-Sequenzen sind komplementär zu Regionen der für das E-Protein kodierenden Sequenz, welche als Zielregion für RNAi schon in siRNA-Studien mit anderen Flaviviren beschrieben wurde (Kumar *et al.*, 2006; Murakami *et al.*, 2005; Pacca *et al.*, 2009).

Die Sequenzen der siRNA-Plasmide wurden mittels Sequenzierung überprüft, da es bei der Klonierung der siRNA-Sequenzen in die Plasmide und der anschließenden Vermehrung der siRNA-Plasmide in *E. coli* zu Mutationen in diesen kommen kann. Beim siRNA-Plasmid 3 brach die Sequenzierung mit dem T7-Primer jedoch am Beginn der siRNA-Sequenz ab, so dass keine vollständige Sequenz erhalten wurde. Die Sequenzierung wurde daher mit einem anderen Primer (SP6-Primer) wiederholt, der in Gegenrichtung an das Plasmid bindet. Mit diesem konnte die komplette siRNA-Sequenz überprüft und je ein korrektes siRNA-Plasmid für die weiteren Versuche ausgewählt

werden. Das Abbrechen der Sequenzierung kann damit erklärt werden, dass die siRNAs in Form von shRNAs exprimiert werden, um im Zytosol zu siRNAs prozessiert zu werden. Daher weisen die in die siRNA-Plasmide klonierten Sequenzen ebenfalls eine Sequenz auf, die eine Haarnadelstruktur bilden kann. Es ist bekannt, dass Haarnadelstrukturen die zur Überprüfung der richtigen Sequenz durchgeführte Sequenzierung stören können (McIntyre und Fanning, 2006).

Für die Überprüfung der Wirksamkeit der ausgewählten siRNAs *in vitro* wurde die Zelllinie HEK293T ausgewählt, da diese sich in Vorversuchen als sehr gut transfizierbar erwiesen hatte. Eine hohe Transfektionsrate ist für eine optimale Wirkung der siRNAs entscheidend, da die siRNAs nur in Zellen mit siRNA-Plasmid exprimiert werden und ihre Wirkung entfalten können. Bisher war jedoch nicht bekannt, ob sich die HEK293T-Zellen mit dem FSME-Virus infizieren lassen und wie eine Infektion in diesen Zellen verläuft. Wie gezeigt werden konnte, repliziert das FSME-Virus in HEK293T-Zellen erfolgreich. Die Zellkultur war bereits nach 24 Stunden komplett infiziert. Ebenso konnte virale Minusstrang-RNA, welche erst im Laufe der Virusreplikation entsteht, nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass sich HEK293T-Zellen mit dem FSME-Virus infizieren lassen und dieses in den Zellen repliziert.

Die ersten Versuche zur Testung des gewählten Zellkultur- und Transfektionssystems ließen darauf schließen, dass alle drei siRNAs die Replikation des europäischen FSME-Virusstyps K23 über den gesamten Versuchszeitraum von 72 Stunden deutlich hemmen und daher eine längerfristige Wirkung zu erwarten ist. Dieses Ergebnis wird durch die Arbeit einer anderen Gruppe gestützt, die nachwies, dass die Effekte der siRNAs mehrere Wochen nachweisbar sind (Bartlett und Davis, 2006).

Bei diesen ersten Versuchen ließen sich bereits Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen siRNAs beobachten. Im Vergleich zeigte die siRNA-Kontrolle keinen signifikanten Unterschied in der FSME-Virusmenge zu nicht transfizierten Zellen, so dass es keine Hinweise auf unspezifische Reaktionen der Zellen auf die siRNA-Plasmide oder die Transfektionsmethode, sogenannte Nicht-Ziel- (*off-target*-) Effekte, gibt.

Von großer Bedeutung ist auch, dass die Transfektionseffizienz zwischen den verschiedenen Versuchen und verwendeten siRNA-Plasmiden nicht signifikant schwankte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese keinen Einfluss auf die Wirkung der siRNAs hat. Eine Reduzierung der verwendeten siRNA-Plasmidmenge bei der Transfektion führte zu einer proportionalen Abnahme der Rate transfizierter Zellen sowie der MGFP-Expression und damit der siRNA-Expression. Eine

dosisabhängige Wirkung der siRNAs kann somit über die Verminderung der verwendeten siRNA-Plasmidmenge analysiert werden. Dagegen ist es nicht möglich die Dosisabhängigkeit über eine Erhöhung der siRNA-Plasmidmenge nachzuweisen, da die der Arbeit vorangegangenen Experimente zeigten, dass eine zu hohe Menge an siRNA-Plasmid zytotoxisch wirkt.

Bei der Analyse der Ergebnisse zeigte sich ebenfalls, dass die Rate der transfizierten Zellen im Gegensatz zur siRNA-Expression nicht linear mit der Reduktion der Plasmidmenge abnimmt, sondern nur jeweils um etwa ein Drittel. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei einer höheren Plasmidmenge eine größere Anzahl von Zellen mehrere Plasmide enthalten, so dass bei einer Verminderung der Menge zwar die Zellen weniger Kopien der Plasmide enthalten, aber die Menge an transfizierten Zellen nicht im gleichen Umfang abnimmt.

Zur weiteren Charakterisierung der verschiedenen siRNAs und zum besseren Verständnis ihrer Wirkung auf das FSME-Virus wurden Versuche mit allen drei humanpathogenen FSME-Virussubtypen sowie mit unterschiedlichen siRNA-Plasmidkonzentrationen durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine Inhibition der FSME-Virusreplikation durch siRNAs nachgewiesen werden. Die Ergebnisse beweisen eindeutig, dass siRNAs die Replikation des FSME-Virus *in vitro* hemmen. Die verschiedenen siRNAs zeigten bei jedem Subtyp eine unterschiedliche Wirkung, die teilweise auf Fehlpaarungen der Basen in der Sequenz zurückzuführen ist (Tab. 43). siRNA 1 hatte insgesamt die wenigsten Fehlpaarungen zu allen Subtypen und wies insgesamt betrachtet die signifikant beste Wirkung auf. Zum Virusstamm K23 (europäischer Subtyp) lag eine Fehlbasenpaarung vor, die sich in einer verminderten Wirkung der siRNA 1 bei diesem Virusstamm zeigte. siRNA 3 konnte beim europäischen und fernöstlichen Subtyp ebenfalls eine signifikante Reduktion der FSME-Virusmenge hervorrufen, wies allerdings zum fernöstlichen Subtyp zwei Fehlpaarungen der Basen auf. Auch beim sibirischen Subtyp lagen Fehlpaarungen zu siRNA 3 vor, so dass diese nur eine statistisch nicht absicherbare Wirkung bei diesem Subtyp erzeugte. siRNA 2 konnte nur beim europäischen Subtyp, dessen Sequenz keine Fehlpaarungen zu der Sequenz der siRNA 2 aufwies, eine signifikante Reduktion der Viruslast bewirken. Allerdings zeigte sie beim Virusstamm Neudörfel (europäischer Subtyp) keine signifikante Wirkung. Für diesen Stamm wurde der Versuch jedoch nur einmal durchgeführt.

**Tab. 43: Alignments der komplementären siRNA-Sequenzen mit den Sequenzen der für die Versuche verwendeten FSME-Virusstämme.<sup>a</sup>**

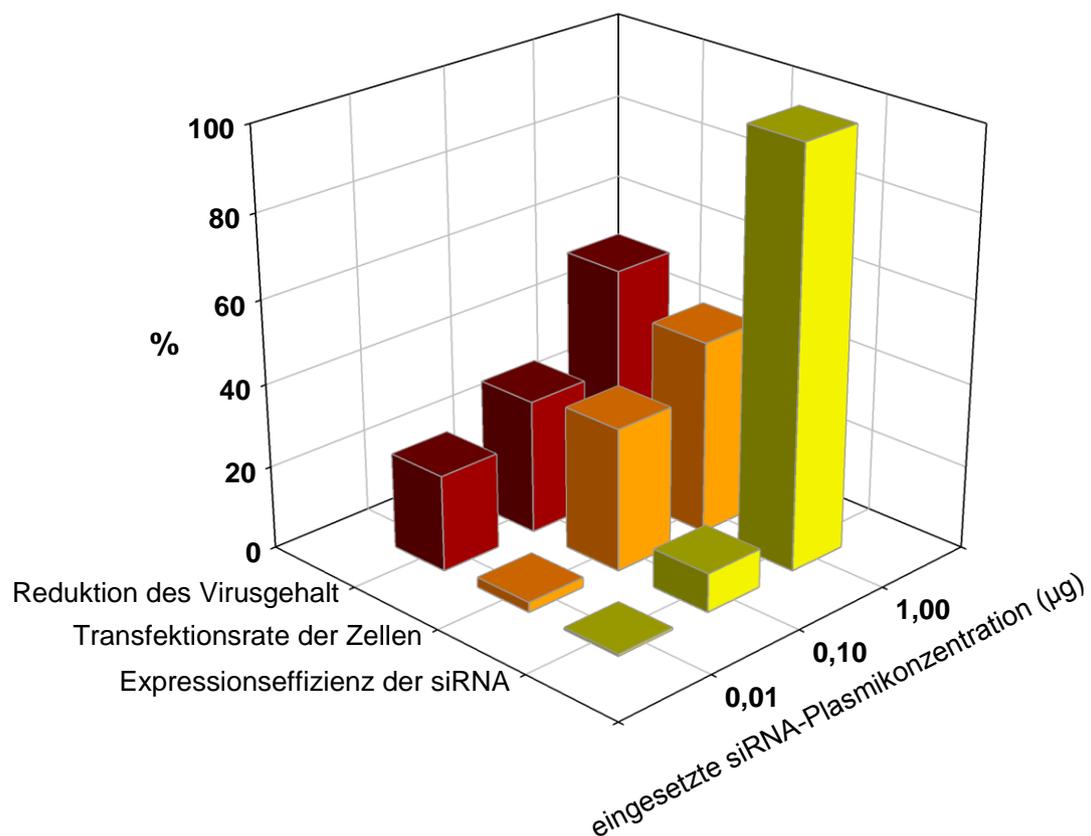
Virus bzw. siRNA	Sequenz (5' → 3')
<b>siRNA 1</b>	<b>gggACTggTTCAATgATCT</b>
K23	gggACTggTT <b>T</b> AATgA <b>C</b> CT
Neudörfl	gggACTggTTCAATgATCT
Aina	gggACTggTTCAATgATCT
Sofjin	gggACTggTTCAATgATCT
<b>siRNA 2</b>	<b>ggTCTTACgTACACAATgT</b>
K23	ggTCTTACgTACACAATgT
Neudörfl	ggTCTTACgTACACAATgT
Aina	ggTCT <b>C</b> A <b>C</b> ATACACAATgT
Sofjin	ggTCTTAC <b>A</b> TACACAATgT
<b>siRNA 3</b>	<b>gAggTggCTTCATAgAgAT</b>
K23	gAggTggCTTCATAgAgAT
Neudörfl	gAggTggCTTCATAgAgAT
Aina	gAgg <b>A</b> ggCTTCATAgAgAT
Sofjin	g <b>C</b> ggTggCTTCATAg <b>A</b> AT

<sup>a</sup> Die entworfenen siRNA-Sequenzen sind gelb dargestellt. Rot hinterlegte Buchstaben in den dazugehörigen Sequenzen der Virusstämme weisen auf Unterschiede zur siRNA-Sequenz hin.

Die Hemmung der Virusreplikation durch die siRNAs lag zwischen 60 % und 95 % (Abb. 34 und Abb. 36), die Reduktion des Virusgehaltes in den Zellen selbst um die 80 % (Abb. 39). Diese Werte zeigen eine gute Vergleichbarkeit mit Studien zur Wirkung von siRNAs auf das Gelbfieberevirus von Pacca *et al.* (2009) bzw. das Japanische-Enzephalitis-Virus von Murakami *et al.* (2005), in denen ebenfalls eine Verminderung des Virusgehaltes, hier zwischen 12 % und 97 % in Abhängigkeit der verwendeten siRNAs, gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse ließen sich auf Proteinebene mit Hilfe eines Western Blots bestätigen.

Einen dosisabhängigen Effekt, wie ihn Murakami *et al.* (2005) für die Wirkung von siRNAs auf das Japanische-Enzephalitis-Virus zeigten, konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Eine 50 %ige Virusinhibition (DI50) für den Referenzstamm (K23) konnte für die am besten wirkende siRNA bereits bei Verwendung von 0,001 µg siRNA-Plasmid pro Transfektion bzw. Vertiefung einer 24-Loch-Platte erreicht werden. Für die anderen beiden siRNAs lag die DI50 bei 0,03 µg bzw. 0,6 µg. Da hohe siRNA-Mengen *in vivo* toxisch wirken oder eine unspezifische Immunantwort auslösen, ist es aus medizinischer Sicht wichtig mit möglichst geringen siRNA-Mengen zu arbeiten (Hornung *et al.*, 2005; Sioud, 2004). Für ein Therapeutikum ist daher siRNA 2 der geeignetste Kandidat.

Die Verminderung der siRNA-Plasmidmenge führte zu einer verminderten Inhibition der Virusreplikation in den Zellen, verglichen mit der normalerweise verwendeten siRNA-Plasmidmenge. Der Anstieg des Virusgehaltes korrelierte besser mit der Abnahme der Transfektionsrate der Zellen als mit der Verminderung der siRNA-Expression (Abb. 44, vergleiche Abb. 35 mit Abb. 30 und Abb. 33). Dies führt zu der Annahme, dass Zellen, die siRNAs exprimieren, die Replikation des Virus hemmen und so nicht zur weiteren Verbreitung des Virus beitragen können. Nicht transfizierte Zellen schienen jedoch durch ihre benachbarten transfizierten Zellen nur indirekt geschützt zu sein. Diese Annahme unterstützen auch die Immunfluoreszenzbilder, auf denen zu erkennen ist, dass in Zellen, die wirksame siRNAs exprimieren, kein Virus nachweisbar ist. Zellen mit unwirksamen siRNAs hingegen können Virus enthalten. Allerdings sind generell weniger Zellen infiziert, wenn einige Zellen wirksame siRNAs exprimieren.



**Abb. 44: Einfluss der siRNA 1-Expressionseffizienz und der Transfektionsrate der Zellen auf den Virusgehalt.**

Die Reduktion des Virusgehaltes korreliert besser mit der Abnahme der Transfektionsrate der Zellen als mit der Verminderung der siRNA-Expression. Die in der Abbildung angegebene siRNA-Plasmidmenge bezieht sich auf die Menge siRNA-Plasmid, welche zur Transfektion von Zellen jeweils einer Vertiefung einer 24-Loch-Platte verwendet wurde.

Die erfolgreiche Hemmung der Replikation von Flaviviren wurde bereits in einigen *in vivo* Untersuchungen (Mausmodell) gezeigt, so dass die hier entworfenen siRNAs ebenfalls *in vivo* getestet werden sollten. Gegen viele andere Viren, wie das Hepatitis C Virus oder HIV und andere Erkrankungen wie Krebs oder Alzheimer, wurden bereits erfolgreiche Therapieansätze entwickelt (Bai *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006; Murakami *et al.*, 2005; Pacca *et al.*, 2009; Ray und Shi, 2006; Stein und Shi, 2008). siRNAs gegen das Humane Respiratorische Synzytial-Virus sowie altersbedingte Makuladegeneration befinden sich bereits in der klinischen Phase II bzw. III (Federici *et al.*, 2007; Kim und Rossi, 2007).

Das größte Problem im lebenden Organismus ist die gezielte Einschleusung der siRNAs an den Ort, an dem diese Ihre Wirkung entfalten sollen. Zur Therapie einer Frühsommer-Meningoenzephalitis müssen die siRNA-Moleküle ins Gehirn verbracht werden, um dort die Virusreplikation hemmen zu können. Für die Applikation im lebenden Organismus wurden bereits verschiedene Ansätze entwickelt. Bei Mäusen können siRNAs direkt ins Gehirn injiziert werden, um eine Virusenzephalitis zu verhindern (Kumar *et al.*, 2006). In der Humanmedizin scheint allerdings eine solche Applikation nicht geeignet. Jedoch können siRNA Moleküle an Aptamere gekoppelt werden, die spezifisch an bestimmte Zelltypen binden und so die siRNA-Moleküle zu diesen führen (Chu *et al.*, 2006; McNamara *et al.*, 2006). siRNA kann auch mittels lentiviraler Virusvektoren gezielt ins Gehirn transportiert werden (Harper *et al.*, 2005; Van den Haute *et al.*, 2003). Dies birgt jedoch weitere Gefahren für den Wirt, da lentivirale Virusvektoren sowohl zytotoxisch wirken als auch auf Grund interner Mutationen Nebenwirkungen hervorrufen können (De Jonge *et al.*, 2006; Grimm *et al.*, 2006; Witting *et al.*, 2008). Eine andere Möglichkeit ist die gezielte Einschleusung von siRNAs in neuronale Zellen durch Kopplung der siRNAs an ein Glykoprotein des Tollwutvirus (Rabies). Hierfür konnte bereits gezeigt werden, dass das Glykoprotein dazu führt, dass die siRNAs die Blut-Gehirn-Schranke überwinden können und spezifisch von neuronalen Zellen aufgenommen werden (Kumar *et al.*, 2007).

Verlaufen *in vivo*-Studien mit den siRNAs und mit geeigneten nicht toxischen und nicht pathogenen Vektorsystemen oder Applikationsmöglichkeiten im Tiermodell erfolgreich, ist eine Anwendung der siRNAs in der Humanmedizin denkbar. Durch ein Therapeutikum auf siRNA-Basis könnte es dann gelingen, eine Infektion erfolgreich zu behandeln und die Anzahl letaler FSME-Fälle und schwerer Komplikationen zu reduzieren.



# Zusammenfassung

Das Fröhsommer-Meningoenzephalitis- (FSME-) Virus verursacht eine der am häufigsten in Asien und Europa vorkommenden Infektionen des zentralen Nervensystems. Eine präventive Impfung schützt vor einer Erkrankung, eine bereits erfolgte Infektion kann jedoch nur symptomatisch behandelt werden.

Das Virus gehört zur Familie der *Flaviviridae* und wird hauptsächlich durch Zecken übertragen. Natürliche Wirtstiere des FSME-Virus sind Nagetiere und andere Kleinsäuger. In Deutschland kommt das Virus vor allem in Süddeutschland vor, breitet sich aber zusehends nach Norden aus. Auch in Brandenburg, welches bisher als FSME-freies Gebiet galt, sind einzelne FSME-Fälle aufgetreten. Jedoch ist die Anzahl der Fälle zu gering, als dass sie Aufschluss über die Verbreitung und damit das humane Infektionsrisiko geben könnten.

Diese Dissertation verfolgte zwei Ziele: (a) Zum einen sollten verschiedene Methoden analysiert werden, die zur Untersuchung der Verbreitung des FSME-Virus eingesetzt werden können. (b) Zum anderen sollte ein antivirales Molekül identifiziert und *in vitro* getestet werden, welches als Grundlage für die Entwicklung eines Medikaments zur Behandlung infizierter Personen dienen kann.

(a) Etablierung von Methoden zur Untersuchung der Verteilung des FSME-Virus

Es wurde untersucht, ob die FSME-Virusverbreitung in Brandenburg an Hand der Infektionsrate von im Freiland lebenden Wirtstieren ermittelt werden kann und welche Wirtstiere (Zecken oder Nager) sich hierfür eignen.

In einem ersten Schritt wurden sensitive und spezifische Methoden (Immunofluoreszenztest, Western Blot, Plaquetest, Neutralisationstest und RT-qPCR mit anschließendem *Pyrosequencing*) zum Nachweis einer FSME-Virusinfektion am RKI etabliert und evaluiert.

Die Analyse der Infektionsrate von im Labor infizierten *Ixodes ricinus* Zecken und Zecken aus Lettland, einer Region mit hoher FSME-Viruszirkulation, durch RT-qPCR zeigte, dass Zecken wegen ihrer geringen Infektionsrate und ihrem niedrigem Virustiter nur in Regionen mit hoher Viruszirkulation als Risikoindikator in Betracht kommen.

Laboruntersuchungen unter kontrollierten Bedingungen wurden eingesetzt, um zu beweisen, dass das Virus zuverlässig in infizierten Feldmäusen (*Microtus arvalis*)

nachweisbar ist, und dass diese Tiere eine persistierende FSME-Virusinfektion ohne Symptome einer Erkrankung entwickeln.

Basierend auf diesen Informationen wurden im Freiland gefangene Nager verwendet, um die Verbreitung und Häufigkeit des FSME-Virus in deutschen als FSME-frei geltenden Gebieten und FSME-Risikogebieten zu beurteilen. FSME-Virus-RNA konnte in sechs Nagerspezies nachgewiesen werden: *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *Microtus agrestis*, *M. arvalis* und *Myodes glareolus*. In Brandenburg wurden ebenfalls Nager positiv auf das Virus getestet. Jedoch war die Infektionsrate der Nager dort niedriger als die in Risikogebieten. Es konnte damit erstmals eindeutig nachgewiesen werden, dass das FSME-Virus in Brandenburg wieder vorkommt. Darüber hinaus belegt die Untersuchung, dass sich Nagetiere auch in Gebieten mit nur geringem FSME-Risiko als Indikator eignen.

### (b) Entwicklung eines antiviralen Moleküls gegen das FSME-Virus

Basierend auf *in vivo*-Untersuchungen, die belegen, dass siRNAs die Replikation nahe verwandter Flaviviren hemmen, wurden neuartige siRNAs gegen das FSME-Virus entwickelt und *in vitro* auf ihre Wirksamkeit hin überprüft.

Anhand einer *in silico*-Sequenzanalyse mit allen derzeit verfügbaren FSME-Virus-Gesamtom-Genom-Sequenzen wurden drei vielversprechende siRNAs ausgewählt und nach Literaturangaben so modifiziert, dass sie an die Sequenzen aller drei humanpathogenen FSME-Virussubtypen binden.

*In-vitro*-Untersuchungen mit serologischen, molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden beweisen, dass die drei ausgewählten siRNAs eine FSME-Virusinfektion konzentrationsabhängig hemmen. In Abhängigkeit vom verwendeten siRNA-Konstrukt und vom verwendeten Virusstamm wurde die Virusreplikation zwischen 60% bis 95% inhibiert und die Viruslast in den Zellen um bis zu 80% reduziert. Das effektivste siRNA-Konstrukt bewirkte eine 50%ige Hemmung der Virusvermehrung (DI50) bei Einsatz von nur 0,001 µg siRNA-Plasmid pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte. Für die anderen beiden siRNAs lag die DI50 bei 0,03 µg bzw. 0,6 µg. Der hier verfolgte neue Ansatz bietet daher vielversprechende Möglichkeiten zur Kontrolle des FSME-Virus nach erfolgter Infektion.

## Summary

Tick-borne encephalitis (TBE) virus causes one of the most important flaviviral infections of the central nervous system in humans in Europe and Asia. The disease is prevented by vaccination but an already existing infection can only be treated symptomatically.

The virus belongs to the family *Flaviviridae* and is mainly transmitted by ticks. Natural host animals are rodents and other small mammals. In Germany, the TBE virus is abundant mainly in southern Germany, but it is spreading rapidly to the north. Recently, single human cases of TBE have been reported for Brandenburg, an area previously considered as TBE-free. So far the number of human cases has been too small to provide information about the distribution and thus risk of infection in humans in Brandenburg.

This work has two objectives: (a) On the one hand, methods should be established to investigate the distribution and abundance of the TBE virus in regions of low virus circulation such as Brandenburg. (b) On the other hand, an antiviral molecule should be identified and tested *in vitro*, to provide a basis for the development of medication for people already infected.

(a) Establishment of methods to investigate the distribution and abundance of TBE virus

The objective of this part of the investigation was to assess if the TBE distribution and abundance in Brandenburg could be based on the infection rate of free living host animals. The initial task was to resolve which of the known vectors, ticks or rodents, are suited for the detection of TBE in their natural habitat.

In a first step promising methods of high specificity and sensitivity (immunofluorescence, Westernblot, plaque test neutralization test, and RT-qPCR followed by Pyrosequencing) for the detection of TBE virus infection were established at the RKI and evaluated.

The analysis of the infection rate of lab infected *Ixodes ricinus* ticks and ticks from Latvia, a region with high TBE virus circulation, by RT-qPCR revealed that ticks could only be used as sentinels in regions with high virus circulation, due to their low infection rates and virus titers.

Laboratory investigations in controlled condition were used to prove, that the virus can be reliably detected in infected *Microtus arvalis* voles that had developed a persistent TBE infection without any obvious symptoms of disease.

Based on this information free-living rodents were used to assess the TBE virus distribution and abundance TBE-free and TBE risk areas in Germany. TBE virus RNA could be identified in six rodent species; *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *Microtus agrestis*, *M. arvalis* and *Myodes glareolus*. In Brandenburg rodents also were tested positive for the virus, although the rate of infection was lower than the rate in risk areas. Thus, for the first time it could be demonstrated definitively that TBE virus reemerged in Brandenburg. In addition, the study could confirm the status of rodents as sentinels in areas of low TBE risk.

### (b) Development of an antiviral molecule against TBE

In the second part of this study novel siRNAs against the TBE virus were designed and tested *in vitro* based on *in vivo* investigations proving that siRNAs are potent inhibitors of the replication of closely related flaviviruses.

Three promising siRNAs were chosen based on *in silico* sequence analysis performed with all TBE virus whole genome sequences currently available. siRNA sequences were modified according to the literature in order to bind to the sequences of all three TBE subtypes.

*In vitro* investigations using serologic, molecular and protein biochemistry methods confirmed the ability of the three siRNAs to inhibit a TBE virus infection in a concentration dependent manner. The inhibition of virus replication by siRNAs ranged between 60% and 95%, the reduction of virus load in the cells was up to 80%, depending on the siRNA and virus strain chosen. A 50% inhibition of virus replication (DI50) could be achieved by only 0.001 µg siRNA plasmid per well of a 24-well plate for the siRNA with the best effect. For the other two siRNAs DI50 was 0.03 µg and 0.6 µg, respectively. This novel approach can constitute a suitable tool for controlling infections by TBE virus.



---

## Literaturverzeichnis

- Albrecht, P., 1968. Pathogenesis of neurotropic arbovirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 43, 44-91.
- Alekseev, A.N. und Chunikhin, S.P., 1990. [The experimental transmission of the tick-borne encephalitis virus by ixodid ticks (the mechanisms, time periods, species and sex differences)]. *Parazitologija* 24, 177-85.
- Amarzguioui, M. und Prydz, H., 2004. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 1050-8.
- Anonymous, 2009. FSME: Risikogebiete in Deutschland, Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. *Epidemiologisches Bulletin (RKI)* 18, 165-172.
- Anonymous, 2010. FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: April 2010), Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. *Epidemiologisches Bulletin (RKI)* 17, 147-155.
- Atrasheuskaya, A.V., Fredeking, T.M. und Ignatyev, G.M., 2003. Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis. *Clin Exp Immunol* 131, 148-54.
- Bai, F., Wang, T., Pal, U., Bao, F., Gould, L.H. und Fikrig, E., 2005. Use of RNA interference to prevent lethal murine west nile virus infection. *J Infect Dis* 191, 1148-54.
- Bakhvalova, V.N., Dobrotvorsky, A.K., Panov, V.V., Matveeva, V.A., Tkachev, S.E. und Morozova, O.V., 2006. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6, 32-41.
- Bakhvalova, V.N., Panov, V.V., Potapova, O.F., Matveeva, V.A., Matveev, L.E. und Morozova, O.V., 2007. Persistence of tick-borne encephalitis virus in organisms of wild small mammals and in permissive tissue cultures (in Russian) *Far Eastern Journal of Infectious Pathology* 11, 79-86.
- Bakhvalova, V.N., Potapova, O.F., Panov, V.V. und Morozova, O.V., 2009. Vertical transmission of tick-borne encephalitis virus between generations of adapted reservoir small rodents. *Virus Res* 140, 172-8.
- Bartlett, D.W. und Davis, M.E., 2006. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 34, 322-33.
- Becker, H., Wohlfarth, K., Petri, E. und Süss, J., 2006. Autochthone FSME Erkrankungen 2006 im Bundesland Brandenburg. *Berliner Ärzteblatt (Rotes Blatt)* 119, 2-4.
- Bormane, A., Lucenko, I., Duks, A., Mavtchoutko, V., Ranka, R., Salmina, K. und Baumanis, V., 2004. Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993-2002. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 36-47.
- Bröker, M. und Gniel, D., 2003. New foci of tick-borne encephalitis virus in Europe: consequences for travellers from abroad. *Travel Med Infect Dis* 1, 181-4.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. und Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611-22.

- Calisher, C.H., Karabatsos, N., Dalrymple, J.M., Shope, R.E., Porterfield, J.S., Westaway, E.G. und Brandt, W.E., 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70 ( Pt 1), 37-43.
- Cane, P.A. und Gould, E.A., 1988. Reduction of yellow fever virus mouse neurovirulence by immunization with a bacterially synthesized non-structural protein (NS1) fragment. *J Gen Virol* 69 ( Pt 6), 1241-6.
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R. und Rice, C.M., 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44, 649-88.
- Charrel, R.N., Attoui, H., Butenko, A.M., Clegg, J.C., Deubel, V., Frolova, T.V., Gould, E.A., Gritsun, T.S., Heinz, F.X., Labuda, M., Lashkevich, V.A., Loktev, V., Lundkvist, A., Lvov, D.V., Mandl, C.W., Niedrig, M., Papa, A., Petrov, V.S., Plyusnin, A., Randolph, S., Süss, J., Zlobin, V.I. und de Lamballerie, X., 2004. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect* 10, 1040-55.
- Chiles, R.E. und Reisen, W.K., 1998. A new enzyme immunoassay to detect antibodies to arboviruses in the blood of wild birds. *J Vector Ecol* 23, 123-35.
- Chu, T.C., Twu, K.Y., Ellington, A.D. und Levy, M., 2006. Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res* 34, e73.
- Chunikhin, S.P., Kurenkov, V.B., Leonova, G.N., Korotkov Iu, S. und Reshetnikov, I.A., 1981. [Differentiation of tick-borne encephalitis virus strains according to the levels of viremia produced in bank voles]. *Med Parazitol (Mosk)* 50, 76-81.
- Closs, O. und Aarli, J.A., 1974. Evans blue as counterstain in the demonstration of muscle antibodies by immunofluorescence in myasthenia gravis. *J Clin Pathol* 27, 162-7.
- Danes, L. und Benda, R., 1960. Study of the possibility of preparing a vaccine against tick-borne encephalitis, using tissue culture methods. I. Propagation of tick-borne encephalitis virus in tissue cultures for vaccine preparation. *Acta Virol* 4, 25-36.
- Danielova, V., Holubova, J., Pejcoch, M. und Daniel, M., 2002. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitol (Praha)* 49, 323-5.
- De Jonge, J., Holtrop, M., Wilschut, J. und Huckriede, A., 2006. Reconstituted influenza virus envelopes as an efficient carrier system for cellular delivery of small-interfering RNAs. *Gene Ther* 13, 400-11.
- De Madrid, A.T. und Porterfield, J.S., 1969. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull World Health Organ* 40, 113-21.
- Demicheli, V., Graves, P., Pratt, M. und Jefferson, T., 2000. Vaccines for preventing tick-borne encephalitis. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000977.
- DeVincenzo, J.P., 2008. RNA interference strategies as therapy for respiratory viral infections. *Pediatr Infect Dis J* 27, S118-22.
- Dobson, A., Cattadori, I., Holt, R.D., Ostfeld, R.S., Keesing, F., Krichbaum, K., Rohr, J.R., Perkins, S.E. und Hudson, P.J., 2006. Sacred cows and sympathetic squirrels: the importance of biological diversity to human health. *PLoS Med* 3, e231.
- Donoso Mantke, O., Aberle, S.W., Avsic-Zupanc, T., Labuda, M. und Niedrig, M., 2007a. Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick-borne encephalitis virus infections. *J Clin Virol* 38, 73-7.

- Donoso Mantke, O., Achazi, K. und Niedrig, M., 2007b. Serological versus PCR methods for the detection of tick-borne encephalitis virus infections in humans. *Future Medicine Ltd* 2, 565-572.
- Donoso Mantke, O., Schädler, R. und Niedrig, M., 2008. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Euro Surveill* 13.
- Du, Q., Thonberg, H., Wang, J., Wahlestedt, C. und Liang, Z., 2005. A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res* 33, 1671-7.
- Dumpis, U., Crook, D. und Oksi, J., 1999. Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* 28, 882-90.
- Ecker, M., Allison, S.L., Meixner, T. und Heinz, F.X., 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol* 80 ( Pt 1), 179-85.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. und Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
- Ernek, E., Kozuch, O., Lichard, M., Nosek, J. und Albrecht, P., 1963. Experimental Infection of *Clethrionomys Glareolus* and *Apodemus Flavicollis* with Tick-Borne Encephalitis Virus. *Acta Virol* 7, 434-6.
- Essbauer, S., Schmidt, J., Conraths, F.J., Friedrich, R., Koch, J., Hautmann, W., Pfeffer, M., Wolfel, R., Finke, J., Dobler, G. und Ulrich, R., 2006. A new Puumala hantavirus subtype in rodents associated with an outbreak of Nephropathia epidemica in South-East Germany in 2004. *Epidemiol Infect* 134, 1333-44.
- Federici, T., Liu, J.K., Teng, Q., Yang, J. und Boulis, N.M., 2007. A means for targeting therapeutics to peripheral nervous system neurons with axonal damage. *Neurosurgery* 60, 911-8; discussion 911-8.
- Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. und Griffin, D.E., 2007. *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. und Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11.
- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F.A. und Deubel, V., 1999. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 73, 6104-10.
- Fomsgaard, A., Christiansen, C. und Bodker, R., 2009. First identification of tick-borne encephalitis in Denmark outside of Bornholm, August 2009. *Euro Surveill* 14.
- Frolova, M.P. und Pogodina, V.V., 1984. Persistence of tick-borne encephalitis virus in monkeys. VI. Pathomorphology of chronic infection in central nervous system. *Acta Virol* 28, 232-9.
- Gaumann, R., Muhlemann, K., Strasser, M. und Beuret, C.M., 2010. High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 76, 4241-9.
- Golovljova, I., Vene, S., Sjolander, K.B., Vasilenko, V., Plyusnin, A. und Lundkvist, A., 2004. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. *J Med Virol* 74, 580-8.

- Gould, E.A., Buckley, A., Barrett, A.D. und Cammack, N., 1986. Neutralizing (54K) and non-neutralizing (54K and 48K) monoclonal antibodies against structural and non-structural yellow fever virus proteins confer immunity in mice. *J Gen Virol* 67 ( Pt 3), 591-5.
- Gould, E.A., Buckley, A., Cammack, N., Barrett, A.D., Clegg, J.C., Ishak, R. und Varma, M.G., 1985. Examination of the immunological relationships between flaviviruses using yellow fever virus monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 66 ( Pt 7), 1369-82.
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R.N., Lemasson, J.J., Gonzalez, J.P., Gallian, P., Gritsun, T.S., Holmes, E.C., Gould, E.A. und de Lamballerie, X., 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* 361, 80-92.
- Gray, J.S., Dautel, H., Estrada-Pena, A., Kahl, O. und Lindgren, E., 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009, 593232.
- Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F. und Kay, M.A., 2006. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537-41.
- Gritsun, T.S., Frolova, T.V., Zhankov, A.I., Armesto, M., Turner, S.L., Frolova, M.P., Pogodina, V.V., Lashkevich, V.A. und Gould, E.A., 2003a. Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J Virol* 77, 25-36.
- Gritsun, T.S., Lashkevich, V.A. und Gould, E.A., 2003b. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res* 57, 129-46.
- Gritsun, T.S., Liapustin, V.N., Karganova, G.G. und Lashkevich, V.A., 1988. [Nonvirion (soluble) antigen of the tick-borne encephalitis virus]. *Vopr Virusol* 33, 217-27.
- Gritsun, T.S., Liapustin, V.N., Shatalov, A.G. und Lashkevich, V.A., 1990. [Multiple forms of the NS1 protein as the main component of the nonvirion ("soluble") antigen of the tick-borne encephalitis virus]. *Vopr Virusol* 35, 471-4.
- Gritsun, T.S., Lisak, V.M., Liapustin, V.N., Korolev, M.B. und Lashkevich, V.A., 1989. [Slowly-sedimenting hemagglutinin of the tick-borne encephalitis virus]. *Vopr Virusol* 34, 449-54.
- Gritsun, T.S., Nuttall, P.A. und Gould, E.A., 2003c. Tick-borne flaviviruses. *Adv Virus Res* 61, 317-71.
- Guil, S. und Esteller, M., 2009. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 87-95.
- Haglund, M., 2002. Occurrence of TBE in areas previously considered being non-endemic: Scandinavian data generate an international study by the International Scientific Working Group for TBE (ISW-TBE). *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 33, 50-4.
- Haglund, M. und Gunther, G., 2003. Tick-borne encephalitis--pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* 21 Suppl 1, S11-8.
- Haglund, M., Vene, S., Forsgren, M., Gunther, G., Johansson, B., Niedrig, M., Plyusnin, A., Lindquist, L. und Lundkvist, A., 2003. Characterisation of human tick-borne encephalitis virus from Sweden. *J Med Virol* 71, 610-21.
- Hajeri, P.B. und Singh, S.K., 2009. siRNAs: their potential as therapeutic agents--Part I. Designing of siRNAs. *Drug Discov Today* 14, 851-8.

- Han, X., Aho, M., Vene, S., Peltomaa, M., Vaheri, A. und Vapalahti, O., 2001. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *J Med Virol* 64, 21-8.
- Harper, S.Q., Staber, P.D., He, X., Eliason, S.L., Martins, I.H., Mao, Q., Yang, L., Kotin, R.M., Paulson, H.L. und Davidson, B.L., 2005. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5820-5.
- Hayasaka, D., Goto, A., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H. und Takashima, I., 2001. Evaluation of European tick-borne encephalitis virus vaccine against recent Siberian and far-eastern subtype strains. *Vaccine* 19, 4774-9.
- Heigl, Z. und von Zeipel, G., 1966. Experimental infection with tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus* and *mus musculus*. 1. Virological studies. *Acta Pathol Microbiol Scand* 66, 489-509.
- Heinz, F.X., 1986. Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv Virus Res* 31, 103-68.
- Heinz, F.X. und Allison, S.L., 2003. Flavivirus structure and membrane fusion. *Adv Virus Res* 59, 63-97.
- Hofmann, H., Kunz, C., Heinz, F.X. und Dippe, H., 1983. Detectability of IgM antibodies against TBE virus after natural infection and after vaccination. *Infection* 11, 164-6.
- Holen, T., Moe, S.E., Sorbo, J.G., Meza, T.J., Ottersen, O.P. und Klungland, A., 2005. Tolerated wobble mutations in siRNAs decrease specificity, but can enhance activity in vivo. *Nucleic Acids Res* 33, 4704-10.
- Holzmann, H., 2003. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21 Suppl 1, S36-40.
- Holzmann, H., Aberle, S.W., Stiasny, K., Werner, P., Mischak, A., Zainer, B., Netzer, M., Koppi, S., Bechter, E. und Heinz, F.X., 2009. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis* 15, 1671-3.
- Holzmann, H., Kundi, M., Stiasny, K., Clement, J., McKenna, P., Kunz, C. und Heinz, F.X., 1996. Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J Med Virol* 48, 102-7.
- Holzmann, H., Vorobyova, M.S., Ladyzhenskaya, I.P., Ferenczi, E., Kundi, M., Kunz, C. und Heinz, F.X., 1992. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine* 10, 345-9.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S. und Hartmann, G., 2005. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11, 263-70.
- Jääskeläinen, A.E., Tikkaoski, T., Uzcategui, N.Y., Alekseev, A.N., Vaheri, A. und Vapalahti, O., 2006. Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerg Infect Dis* 12, 1568-71.
- Jacobs, S.C., Stephenson, J.R. und Wilkinson, G.W., 1992. High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: protection elicited in a murine model. *J Virol* 66, 2086-95.
- Jaenson, T.G., Talleklint, L., Lundqvist, L., Olsen, B., Chirico, J. und Mejlom, H., 1994. Geographical distribution, host associations, and vector roles of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) in Sweden. *J Med Entomol* 31, 240-56.

- Kaiser, R., 1999. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain* 122 ( Pt 11), 2067-78.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Jr., Zhu, J.K., Staskawicz, B.J. und Jin, H., 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18002-7.
- Kerbo, N., Donchenko, I., Kutsar, K. und Vasilenko, V., 2005. Tickborne encephalitis epidemiology in Estonia, 1950-2004. *Euro Surveill* 10, E050630 7.
- Kim, D.H. und Rossi, J.J., 2007. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 8, 173-84.
- Kim, S.Y., Yun, S.M., Han, M.G., Lee, I.Y., Lee, N.Y., Jeong, Y.E., Lee, B.C. und Ju, Y.R., 2008. Isolation of tick-borne encephalitis viruses from wild rodents, South Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8, 7-13.
- Klaus, C., Hoffmann, B., Hering, U., Mielke, B., Sachse, K., Beer, M. und Süss, J., 2010. Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clin Microbiol Infect* 16, 238-44.
- Korenberg, E.I. und Kovalevskii, Y.V., 1999. Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia. *Zentralbl Bakteriol* 289, 525-39.
- Kotlik, P., Deffontaine, V., Mascheretti, S., Zima, J., Michaux, J.R. und Searle, J.B., 2006. A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14860-4.
- Kozuch, O., Chunikhin, S.P., Gresikova, M., Nosek, J., Kurenkov, V.B. und Lysy, J., 1981. Experimental characteristics of viraemia caused by two strains of tick-borne encephalitis virus in small rodents. *Acta Virol* 25, 219-24.
- Kozuch, O., Gresikova, M., Nosek, J., Lichard, M. und Sekeyova, M., 1967. The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis. *Bull World Health Organ* 36, Suppl 1:61-6.
- Kozuch, O., Grulich, I. und Nosek, J., 1966. Serological survey and isolation of tick-borne encephalitis virus from the blood of the mole (*Talpa europaea*) in a natural focus. *Acta Virol* 10, 557-60.
- Kozuch, O., Gurycova, D., Lysy, J. und Labuda, M., 1995. Mixed natural focus of tick-borne encephalitis, tularemia and haemorrhagic fever with renal syndrome in west Slovakia. *Acta Virol* 39, 95-8.
- Kozuch, O., Labuda, M., Lysy, J., Weismann, P. und Krippel, E., 1990. Longitudinal study of natural foci of Central European encephalitis virus in West Slovakia. *Acta Virol* 34, 537-44.
- Kozuch, O., Nosek, J., Ernek, E., Lichard, M. und Albrecht, P., 1963. Persistence of Tick-Borne Encephalitis Virus in Hibernating Hedgehogs and Dormice. *Acta Virol* 7, 430-3.
- Kumar, P., Lee, S.K., Shankar, P. und Manjunath, N., 2006. A single siRNA suppresses fatal encephalitis induced by two different flaviviruses. *PLoS Med* 3, e96.
- Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Kim, M.H., Davidson, B.L., Lee, S.K., Shankar, P. und Manjunath, N., 2007. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448, 39-43.

- Kunze, U., 2007. Tick-borne encephalitis: from epidemiology to vaccination recommendations in 2007. New issues--best practices. *Wien Med Wochenschr* 157, 228-32.
- Kupča, A., Essbauer, S., Zoeller, G., de Mendonça, P.G., Brey, R., Rinder, M., Pfister, K., Spiegel, M., Doerrbecker, B., Pfeffer, M. und Dobler, G., 2010. Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany *Ticks and Tick-borne Diseases* 1, 44-51
- Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B. und Hedgpeth, J., 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28, 655-61.
- Labuda, M., Austyn, J.M., Zuffova, E., Kozuch, O., Fuchsberger, N., Lysy, J. und Nuttall, P.A., 1996. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219, 357-66.
- Labuda, M., Jones, L.D., Williams, T., Danielova, V. und Nuttall, P.A., 1993. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *J Med Entomol* 30, 295-9.
- Labuda, M., Kozuch, O., Zuffova, E., Eleckova, E., Hails, R.S. und Nuttall, P.A., 1997. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* 235, 138-43.
- Libikova, H., 1959. Viruses of the tick-borne encephalitis group in HeLa cells. *Acta Virol* 3(Suppl), 41-50.
- Libikova, H. und Vilcek, J., 1959. A simple neutralization test for viruses of the tick-borne encephalitis group, depending on a complete cytopathic effect in HeLa cells. (Preliminary report). *Acta Virol* 3, 181-4.
- Lin, D., Li, L., Dick, D., Shope, R.E., Feldmann, H., Barrett, A.D. und Holbrook, M.R., 2003. Analysis of the complete genome of the tick-borne flavivirus Omsk hemorrhagic fever virus. *Virology* 313, 81-90.
- Lindenbach, B.D. und Rice, C.M. 2001. *Flaviviridae. The viruses and their replication*. In: Knippe, D.M. und Howley, P.M. (Eds), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, London, New York, Tokyo, S. 991-1042.
- Lindquist, L. und Vapalahti, O., 2008. Tick-borne encephalitis. *Lancet* 371, 1861-71.
- Lorenz, I.C., Allison, S.L., Heinz, F.X. und Helenius, A., 2002. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 76, 5480-91.
- Mandl, C.W., 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res* 111, 161-74.
- Mansfield, K.L., Johnson, N., Phipps, L.P., Stephenson, J.R., Fooks, A.R. und Solomon, T., 2009. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol* 90, 1781-94.
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., Filipowicz, W., Duchaine, T.F. und Sonenberg, N., 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764-7.
- Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. und Wittmann, G., 1977. *Virologische Arbeitsmethoden: Band II Serologie*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

- McIntyre, G.J. und Fanning, G.C., 2006. Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. *BMC Biotechnol* 6, 1.
- McNamara, J.O., 2nd, Andrechek, E.R., Wang, Y., Viles, K.D., Rempel, R.E., Gilboa, E., Sullenger, B.A. und Giangrande, P.H., 2006. Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 24, 1005-15.
- Mickiene, A., Laiskonis, A., Gunther, G., Vene, S., Lundkvist, A. und Lindquist, L., 2002. Tickborne encephalitis in an area of high endemicity in lithuania: disease severity and long-term prognosis. *Clin Infect Dis* 35, 650-8.
- Mishaeva, N.P. und Erofeeva, N.I., 1979. [Effect of the diapause in the *Ixodes ricinus* (Ixodidae) tick on the multiplication of the tick-borne encephalitis virus in its body]. *Parazitologija* 13, 218-22.
- Mishaeva, N.P. und Votjakov, V.I., 1978. [Effect of the physiological state of ticks on the intensity of tick-borne encephalitis virus replication in them]. *Vopr Virusol*, 232-8.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. und Schätzl, H., 2010. *Molekulare Virologie*, 3 ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Mornsteinova, D. und Albrecht, P., 1957. [Experimental infection of the mouse *Micromys minutus* with the virus of Czechoslovakian tickborne encephalitis.]. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol* 6, 157-61.
- Murakami, M., Ota, T., Nukuzuma, S. und Takegami, T., 2005. Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication in vitro and in vivo. *Microbiol Immunol* 49, 1047-56.
- Murphy, F.A. 1980. Togavirus morphology and morphogenesis. In: Schlesinger, R.W. (Ed), *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*, Academic Press, New York, S. 5573-80.
- Naumov, R.L., 1982. [Abundance levels of populations of the virus carriers and vectors in a focus of tick-borne encephalitis]. *Parazitologija* 16, 395-403.
- Naumov, R.L., Chunikhin, S.P. und Gutova, V.P., 1984. [Experimental study of the interrelation of vertebrates with the tick-borne encephalitis virus. 2. Small mammals]. *Med Parazitol (Mosk)*, 83-6.
- Naumov, R.L., Gutova, V.P., Stepanov, A.I., Nikulina, E.S. und Nemiro, T.V., 1985. [Changes in the incidence of tick-borne encephalitis in the Krasnoyarsk region over many years]. *Med Parazitol (Mosk)*, 72-7.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. und Jones, J.D., 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312, 436-9.
- Niedrig, M., Klockmann, U., Lang, W., Roeder, J., Burk, S., Modrow, S. und Pauli, G., 1994. Monoclonal antibodies directed against tick-borne encephalitis virus with neutralizing activity in vivo. *Acta Virol* 38, 141-9.
- Niedrig, M., Lademann, M., Emmerich, P. und Lafrenz, M., 1999. Assessment of IgG antibodies against yellow fever virus after vaccination with 17D by different assays: neutralization test, haemagglutination inhibition test, immunofluorescence assay and ELISA. *Trop Med Int Health* 4, 867-71.
- Niedrig, M., Vaisviliene, D., Teichmann, A., Klockmann, U. und Biel, S.S., 2001. Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies. *J Clin Virol* 20, 179-82.

- Nosek, J. und Grulich, I., 1967. The relationship between the tick-borne encephalitis virus and the ticks and mammals of the Tribec mountain range. *Bull World Health Organ* 36, Suppl 1:31-47.
- Nosek, J., Kožuch, O. und Grulich, I., 1970. The structure of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Central Europe. *Oecologia* 5, 61-73.
- Nuttall, P.A., Jones, L.D., Labuda, M. und Kaufman, W.R., 1994. Adaptations of arboviruses to ticks. *J Med Entomol* 31, 1-9.
- Pacca, C.C., Severino, A.A., Mondini, A., Rahal, P., D'Avila S, G., Cordeiro, J.A., Nogueira, M.C., Bronzoni, R.V. und Nogueira, M.L., 2009. RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and in vivo. *Virus Genes* 38, 224-31.
- Papa, A., Pavlidou, V. und Antoniadis, A., 2008. Greek goat encephalitis virus strain isolated from *Ixodes ricinus*, Greece. *Emerg Infect Dis* 14, 330-2.
- Pavlovsky, Y.N., 1966. Natural nidity of transmissible diseases with special reference to the landscape epidemiology of zoonthroponoses. University of Illinois Press, Urbana.
- Perez-Eid, C., Hannoun, C. und Rodhain, F., 1992. The Alsatian tick-borne encephalitis focus: presence of the virus among ticks and small mammals. *Eur J Epidemiol* 8, 178-86.
- Pfeffer, M. und Dobler, G., 2010. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors* 3, 35.
- Pogodina, V.V., Meierova, R.A., Bochkova, N.G. und Koreshkova, G.V., 1985. [Characteristics of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with chronic diseases of the central nervous system]. *Vopr Virusol* 30, 427-33.
- Puchhammer-Stockl, E., Kunz, C., Mandl, C.W. und Heinz, F.X., 1995. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin Diagn Virol* 4, 321-6.
- Radda, A., Hofmann, H. und Pretzmann, G., 1969. Threshold of viraemia in *Apodemus flavicollis* for infection of *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol* 13, 74-7.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W. und Nitsche, A., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 856-62.
- Ramelow, C., Süß, J., Berndt, D., Roggendorf, M. und Schreier, E., 1993. Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ticks (*Ixodes ricinus*) by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 45, 115-9.
- Randolph, S., 2002. Predicting the risk of tick-borne diseases. *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 33, 6-10.
- Randolph, S.E., 2004. Evidence that climate change has caused 'emergence' of tick-borne diseases in Europe? *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 5-15.
- Ray, D. und Shi, P.Y., 2006. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 1, 45-55.
- Reed, C.J. und Münch, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27, 493-497.
- Reinhardt, B., Jaspert, R., Niedrig, M., Kostner, C. und L'Age-Stehr, J., 1998. Development of viremia and humoral and cellular parameters of immune

- activation after vaccination with yellow fever virus strain 17D: a model of human flavivirus infection. *J Med Virol* 56, 159-67.
- Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C. und Harrison, S.C., 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291-8.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. und Nyren, P., 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242, 84-9.
- Ronaghi, M., Uhlen, M. und Nyren, P., 1998. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281, 363, 365.
- Růžek, D., Gritsun, T.S., Forrester, N.L., Gould, E.A., Kopecky, J., Golovchenko, M., Rudenko, N. und Grubhoffer, L., 2008. Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 374, 249-55.
- Růžek, D., Stastna, H., Kopecky, J., Golovljova, I. und Grubhoffer, L., 2007. Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. *J Virol Methods* 144, 133-7.
- Saksida, A., Duh, D., Lotric-Furlan, S., Strle, F., Petrovec, M. und Avsic-Zupanc, T., 2005. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. *J Clin Virol* 33, 331-5.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., Cropp, C.B. und Monath, T.P., 1986. Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J Virol* 60, 1153-5.
- Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W. und Walsh, E.E., 1985. Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48. *J Immunol* 135, 2805-9.
- Schrader, C. und Süß, J., 1999. A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. *Zentralbl Bakteriol* 289, 319-28.
- Schulze, M., Nitsche, A., Schweiger, B. und Biere, B., 2010. Diagnostic approach for the differentiation of the pandemic influenza A(H1N1)v virus from recent human influenza viruses by real-time PCR. *PLoS One* 5, e9966.
- Schwaiger, M. und Cassinotti, P., 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol* 27, 136-45.
- Singh, S.K., Pal Bhadra, M., Girschick, H.J. und Bhadra, U., 2008. MicroRNAs--micro in size but macro in function. *FEBS J* 275, 4929-44.
- Sioud, M., 2004. Ribozyme- and siRNA-mediated mRNA degradation: a general introduction. *Methods Mol Biol* 252, 1-8.
- Smetana, A. und Malkova, D., 1966. [Relation of *Clethrionomys glareolus* Schr. and *Apodemus flavicollis* Melch. to the virus of tick-borne encephalitis in 2 different biotopes]. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol* 15, 229-33.
- Smith, G.L., 1994. Virus strategies for evasion of the host response to infection. *Trends Microbiol* 2, 81-8.

- Stein, D.A. und Shi, P.Y., 2008. Nucleic acid-based inhibition of flavivirus infections. *Front Biosci* 13, 1385-95.
- Sumilo, D., Bormane, A., Asokliene, L., Vasilenko, V., Golovljova, I., Avsic-Zupanc, T., Hubalek, Z. und Randolph, S.E., 2008. Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in Central and Eastern Europe. *Rev Med Virol* 18, 81-95.
- Süss, J., 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 21 Suppl 1, 19-35.
- Süss, J., 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond--the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 13.
- Süss, J., Beziat, P., Rohr, H.P., Treib, J. und Haass, A., 1996. Detection of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in several federal "Länder" of Germany by means of the polymerase chain reaction (PCR)--characterization of the virus. *Infection* 24, 403-4.
- Süss, J., Klaus, C., Diller, R., Schrader, C., Wohanka, N. und Abel, U., 2006. TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in *Ixodes ricinus* removed from humans. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl 40, 63-8.
- Süss, J., Klaus, C., Gerstengarbe, F.W. und Werner, P.C., 2008. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *J Travel Med* 15, 39-45.
- Süss, J., Schrader, C., Abel, U., Bormane, A., Duks, A. und Kalnina, V., 2002. Characterization of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Germany and Latvia (1997-2000). *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 33, 34-42.
- Süss, J., Schrader, C., Falk, U. und Wohanka, N., 2004. Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany--epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 69-79.
- Süss, J., Sinnecker, H., Sinnecker, R., Berndt, D., Zilske, E., Dedek, G. und Aпитzsch, L., 1992. Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the eastern part of Germany between 1960 and 1990 and studies on the dynamics of a natural focus of tick-borne encephalitis. *Zentralbl Bakteriol* 277, 224-35.
- Ulrich, R.G., Schmidt-Chanasit, J., Schlegel, M., Jacob, J., Pelz, H.J., Mertens, M., Wenk, M., Buchner, T., Masur, D., Sevke, K., Groschup, M.H., Gerstengarbe, F.W., Pfeffer, M., Oehme, R., Wegener, W., Bemann, M., Ohlmeyer, L., Wolf, R., Zoller, H., Koch, J., Brockmann, S., Heckel, G. und Essbauer, S.S., 2008. Network "Rodent-borne pathogens" in Germany: longitudinal studies on the geographical distribution and prevalence of hantavirus infections. *Parasitol Res* 103 Suppl 1, S121-9.
- Valencia-Sanchez, M.A., Liu, J., Hannon, G.J. und Parker, R., 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 20, 515-24.
- Van den Haute, C., Eggermont, K., Nuttin, B., Debyser, Z. und Baekelandt, V., 2003. Lentiviral vector-mediated delivery of short hairpin RNA results in persistent knockdown of gene expression in mouse brain. *Hum Gene Ther* 14, 1799-807.
- Vene, S., Haglund, M., Vapalahti, O. und Lundkvist, A., 1998. A rapid fluorescent focus inhibition test for detection of neutralizing antibodies to tick-borne encephalitis virus. *J Virol Methods* 73, 71-5.
- Vernet, G., 2004. Diagnosis of zoonotic viral encephalitis. *Arch Virol Suppl*, 231-44.

- Waldenstrom, J., Lundkvist, A., Falk, K.I., Garpmo, U., Bergstrom, S., Lindegren, G., Sjostedt, A., Mejlom, H., Fransson, T., Haemig, P.D. und Olsen, B., 2007. Migrating birds and tickborne encephalitis virus. *Emerg Infect Dis* 13, 1215-8.
- Weingartl, H.M., Drebot, M.A., Hubalek, Z., Halouzka, J., Andonova, M., Dibernardo, A., Cottam-Birt, C., Larence, J. und Marszal, P., 2003. Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum. *Can J Vet Res* 67, 128-32.
- Winkler, G., Randolph, V.B., Cleaves, G.R., Ryan, T.E. und Stollar, V., 1988. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology* 162, 187-96.
- Witting, S.R., Brown, M., Saxena, R., Nabinger, S. und Morral, N., 2008. Helper-dependent adenovirus-mediated short hairpin RNA expression in the liver activates the interferon response. *J Biol Chem* 283, 2120-8.
- Wohlfarth, K., Niederstraßer, O., Dobler, G., Mertens, M., Ulrich, R.G., Donoso-Mantke, O., Niedrig, M., Werdermann, S. und Petri, E., 2009. Seroprevalence for tick-borne encephalitis virus (TBEV) in forestry workers in the federal state of Brandenburg, Germany. Abstract book: X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, 70.
- Wurm, R., Dobler, G., Peters, M. und Kiessig, S.T., 2000. Serological investigations of red foxes (*Vulpes vulpes* L.) for determination of the spread of tick-borne encephalitis in Northrhine-Westphalia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47, 503-9.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. und Cullen, B.R., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-6.
- Zasukhina, G.D. und Levkovich, E.N., 1957. [Cytopathogenic effect of tick-borne encephalitis virus in human fibroblast tissue culture.]. *Vopr Virusol* 2, 234-8.
- Zeman, P., 1997. Objective assessment of risk maps of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis based on spatial patterns of located cases. *Int J Epidemiol* 26, 1121-9.
- Zimmermann, H. und Koch, D., 2005. [Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Switzerland 1984 to 2004]. *Ther Umsch* 62, 719-25.

## Verzeichnis erfolgter Publikationen

Liste der aus dieser Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen und weitere eigene Publikationen:

Achazi, K., Růžek, D., Donoso Mantke, O., Schlegel, M., Sheikh Ali, H., Wenk, M., Schmidt-Chanasit, J., Ohlmeyer, L., Rühle, F., Kiffner, C., Kallies, R., Ulrich, R. und Niedrig, M., Wild Rodents: Surrogate Marker for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus? *Submitted.*

Donoso-Mantke, O., Domingo, C., Radonic, A., Hagedorn, P., Achazi, K. und Niedrig, M. 2010. Tick-Borne Encephalitis Virus. In: Liu, D. (Ed), Molecular Detection of Human Viral Pathogens, CRC Press.

Achazi, K., Nitsche, A., Patel, P., Radonic, A., Mantke, O.D. und Niedrig, M., 2010. Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing. *J Virol Methods.*

Kramski, M., Achazi, K., Klempa, B. und Kruger, D.H., 2009. Nephropathia epidemica with a 6-week incubation period after occupational exposure to Puumala hantavirus. *J Clin Virol* 44, 99-101.

Donoso Mantke, O., Achazi, K. und Niedrig, M., 2007. Serological versus PCR methods for the detection of tick-borne encephalitis virus infections in humans. *Future Medicine Ltd* 2, 565-572.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Freien Universität Berlin, vertreten durch Herrn Prof. Mutzel, vorab veröffentlicht.



# Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version

aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten



## Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde zum überwiegenden Teil von der Studienstiftung des deutschen Volkes gefördert.

Ich danke Prof. Dr. Niedrig für die Überlassung des interessanten Themas meiner Doktorarbeit. Ich bedanke mich ebenfalls für die viele Zeit, die er mir gewidmet hat und für die anregenden und hilfreichen Ideen beim Anfertigen meiner Arbeit.

Bei Prof. Mutzel möchte ich mich für sein Interesse an dieser Arbeit und seine Betreuung an der Freien Universität zu Berlin bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Schmülling, Prof. Schrickler, Dr. Sascha Thewes, Prof. Kunze und Dr. Jens Baumgardt dafür bedanken, dass sie sich bereit erklärt haben als Mitglieder der Prüfungskommission zur Verfügung zu stehen.

Bei Dr. Andreas Nitsche, Dr. Aleksandar Radonic, Dr. Rainer Ulrich und seinem Netzwerk „Nagetierübertragene Pathogene“ und dem Arbeitskreis Mäuse, Dr. Storozenko, Dr. Rauer und Dr. Daniel Ruzek möchte ich mich für die Bereitstellung der zahlreichen Proben und die Hilfe bei Planung von Versuchen, bei der Auswertung meiner Daten und beim Anfertigen meiner Arbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Niedrig (vor allem Nadine Litzba, René Kallies, Matthias Böhte, Nina Stock, Marcel Müller, Juliane Paul, Oliver Donoso Mantke, Peter Hagedorn, Ravish Paliwal, Pranav Patel, Dia Roy, Doreen Vollandt, Cristina Domingo Carrasco, Hi-Gung Bae, Sonja Linke, Leonid Rumer, Yessica Schulze, Anette Teichmann, Patricia Bußmann, Petra Kreher, Petra Baer, Marion Mielke und Marlies Panzer) danke ich für die hilfreichen Tipps im Laboralltag, die Beantwortung der zahlreichen Fragen, die große Unterstützung bei allen auftretenden Problemen und den vielen Spaß bei der Arbeit.

Dank verdienen ebenfalls die Mitglieder von ZBS1 und dem RKI, die mir bei Problemen im Labor mit vielen Tricks geholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Arne sowie meinen weiteren Freunden. Ihrer Unterstützung konnte ich mir in jeder Situation sicher sein.

Vielen Dank!



## Bescheinigung

gem. § 5 Abs. 4 und Abs. 2b der Promotionsordnung des  
Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie vom 02.11.2001

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**„Identifizierung eines Indikators für die Verbreitung des Frühsommer-  
Meningoenzephalitis-Virus und Entwicklung einer RNA-Interferenz-Strategie gegen  
Frühsommer-Meningoenzephalitis“**

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Berlin, den 14. Oktober 2010

Katharina Achazi