

**Molekularepidemiologische Analysen
von Gelbfiebervirusisolaten und
Entwicklung neuer Nachweismethoden
zur Untersuchung und Diagnostik von Gelbfieberviren**

Dissertation

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



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

vorgelegt von

Nina Katharina Stock

aus Duisburg

September 2013

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2008 bis September 2013 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Matthias Niedrig am Robert Koch-Institut in Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Niedrig, Robert Koch-Institut Berlin
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Disputation am: 28.04.2014

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einem anderen Prüfungskomitee vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Nina Katharina Stock)

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

1.1. Gelbfieber	1
1.1.1. Historischer Überblick	1
1.1.2. Klinik	3
1.1.3. Pathogenese.....	5
1.1.4. Diagnostik und Therapie	6
1.2. Das Gelbfiebervirus	7
1.2.1. Taxonomie	7
1.2.2. Partikelbau	8
1.2.2.1. Genomorganisation	8
1.2.2.2. Virusproteine	10
1.2.3. Replikation und Morphogenese.....	15
1.3. Der Gelbfieberimpfstoff 17D	18
1.3.1. Entstehung und Attenuierung.....	18
1.3.2. Impfstoffsicherheit und Nebenwirkungen.....	19
1.3.3. Impfstoffherstellung.....	20
1.4. Ökologie	22
1.4.1. Transmission.....	22
1.4.2. Epidemiologie	23
1.4.3. Aktuelle Situation	25

2. Problemstellung

2.1. Epidemiologische Untersuchungen von GFV-Isolaten	27
2.1.1. Phylogenie von 17D-Impfstoffen	27
2.1.2. Charakterisierung phylogenetischer und biologischer Eigenschaften westafrikanischer GFV-Linien	27
2.2. Entwicklung neuer Nachweismethoden zur Untersuchung und Diagnostik von Gelbfieberviren	28

3. Material

3.1. Chemikalien	29
3.2. Geräte	30
3.3. Kits	32
3.4. Enzyme und Inhibitoren	33
3.4.1. Restriktionsendonukleasen	33

INHALTSVERZEICHNIS

3.4.2. Weitere Enzyme.....	33
3.4.3. Inhibitoren	33
3.5. Nukleinsäure- und Protein-Standards	33
3.6. Oligonukleotide.....	34
3.6.1. Oligonukleotide für die PCR und Sequenzierung	34
3.6.2. Oligonukleotide für die RT-PCR	36
3.6.3. Oligonukleotide zur Insertion des TC-Tags in das GFV-Genom	36
3.7. Vektoren	38
3.7.1. Vektor pACNR-FLYF-17D (GFV-Volllängeklon)	38
3.7.2. pDrive Cloning Vector (Qiagen)	38
3.7.3. Klonierungsvektoren pMK-RQ/pMA (Geneart)	39
3.8. Antikörper und Peptide	40
3.9. Bakterienstämme.....	40
3.10. Medien und Zusätze für die Bakterienkultur	41
3.11. Eukaryotische Zelllinien.....	41
3.12. Medien und Zusätze für die Zellkultur	41
3.13. Viren	42
3.13.1. Gelbfiebertviren.....	42
3.13.2. Weitere inaktivierte Viren	43
3.14. Sequenzen.....	43
3.15. Puffer und Lösungen.....	44
3.16. Software	45
3.16.1. Lizenzierte Software.....	45
3.16.2. Frei verfügbare Onlinesoftware	46
3.17. Verbrauchsmaterialien und Sonstiges	46
4. Methoden	
4.1. Molekularbiologische Methoden.....	48
4.1.1. Reverse Transkription	48
4.1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)-basierte Techniken	48
4.1.2.1. Standard-PCR.....	49
4.1.2.2. Kolonie-PCR	49
4.1.2.3. Real-time PCR (RT-PCR).....	49
4.1.3. Agarosegelelektrophorese	51
4.1.4. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	51
4.1.5. Reinigung von DNA-Fragmenten aus enzymhaltigen Ansätzen	51
4.1.6. DNA-Sequenzierung nach Sanger	52

INHALTSVERZEICHNIS

4.1.7. Restriktionsverdau von DNA	52
4.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase	53
4.1.9. Klonierung von PCR-Produkten in den pDrive Cloning Vector	54
4.1.10. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	54
4.1.11. <i>In vitro</i> Transkription viraler RNA.....	54
4.1.12. Herstellung fluoreszenzmarkierter Gelbfiebeviren	55
4.1.12.1. Die FIASH-Technologie.....	55
4.1.12.2. Rekombinante PCR.....	57
4.1.12.2.1. Erste PCR-Reaktion: Einfügen des TC-Tags in das GFV-Genom	58
4.1.12.2.2. Zweite PCR-Reaktion: Hybridisierungs- und Auffüllreaktion.....	59
4.1.12.3. Homologe Rekombination	59
4.1.12.4. Seitengerichtete Mutagenese	62
4.2. Biochemische Methoden.....	64
4.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	64
4.2.2. Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)	65
4.2.3. Extraktion zellulärer Proteine	66
4.3. Immunologische Methoden.....	66
4.3.1. Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung polyklonaler Antiseren.....	66
4.3.2. Immunofärbung von Proteinen auf NC-/PVDF-Membranen.....	67
4.3.3. Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) zum Nachweis viraler Proteine	68
4.3.4. IIFT zum Nachweis GFV-spezifischer Antikörper	68
4.3.5. IIFT zum Nachweis spezifischer Flavivirus-Antikörper.....	69
4.3.6. Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT).....	69
4.3.7. Sandwich-ELISA	71
4.3.8. Kompetitiver ELISA.....	72
4.4. Zellbiologische Methoden	73
4.4.1. Passagieren eukaryotischer Zellen	73
4.4.2. Einfrieren eukaryotischer Zellen	74
4.4.3. Auftauen eukaryotischer Zellen	74
4.4.4. Zellzahlbestimmung eukaryotischer Zellen.....	74
4.4.5. Transfektion mittels Lipofectamin™ 2000.....	75
4.5. Virologische Methoden	76
4.5.1. RNA-Isolierung aus zellfreien Lösungen	76
4.5.2. RNA-Isolierung aus Zellen	76
4.5.3. Herstellung hochtitriger Viruslösungen	76
4.5.4. Virustitration mittels Plaquetest	77
4.5.5. Wachstumskinetiken zur Untersuchung afrikanischer GFV-Wildtypisolate	78

INHALTSVERZEICHNIS

4.5.6. Wachstumskinetik zur Untersuchung der Proteinexpression während einer GFV-Infektion	80
4.6. Mikrobiologische Methoden.....	80
4.6.1. Anzucht von <i>E.coli</i> -Bakterien	80
4.6.2. Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen.....	80
4.6.3. Plasmid-DNA-Isolierung in kleinem Maßstab (Minipräparation).....	81
4.6.4. Plasmid-DNA-Isolierung in großem Maßstab (Maxipräparation).....	81
4.6.5. Herstellung kompetenter Bakterien mittels Calciumchlorid	81
4.6.6. Transformation Calciumchlorid-kompetenter Bakterien	81
4.6.7. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen	82
4.7. Phylogenetische Methoden.....	82
4.7.1. Alignment.....	82
4.7.2. Modelltest	83
4.7.3. Phylogenetische Stammbaumanalyse	83
4.7.3.1. <i>Maximum Likelihood</i> -Methode.....	83
4.7.3.2. <i>Bayesische</i> Methode	83
4.7.4. Stammbaumvisualisierung	84
5. Ergebnisse	
5.1. Epidemiologische Untersuchungen von GFV-Isolaten	85
5.1.1. Phylogenie von GFV-17D-Impfstoffen.....	85
5.1.1.1. Sequenzanalysen.....	85
5.1.1.2. Phylogenie	89
5.1.2. Phylogenetische und biologische Charakterisierung westafrikanischer Gelbfiebervirusisolate	90
5.1.2.1. Sequenzanalysen.....	91
5.1.2.2. Phylogenie von GFV-Wildtypstämmen	98
5.1.2.3. Wachstumsanalysen westafrikanischer GFV-Isolate	100
5.2. Entwicklung neuer Nachweismethoden zur Untersuchung und Diagnostik von Gelbfieberviren	108
5.2.1. Herstellung von Peptidantikörpern zum Nachweis von GFV-Proteinen	108
5.2.1.1. Identifikation geeigneter Peptide zur Immunisierung von Kaninchen.....	108
5.2.1.2. Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Peptidantikörper.....	109
5.2.1.2.1. Western Blot.....	109
5.2.1.2.2. Indirekter Immunfluoreszenztest.....	114
5.2.1.2.3. Serokonversion im Verlauf der Immunisierung.....	116

INHALTSVERZEICHNIS

5.2.1.2.4. Kreuzreaktivitätstest	118
5.2.1.2.5. Neutralisationstest	120
5.2.1.2.6. Weiterführende Charakterisierung des Anti-GFV-NS1-Serums....	120
5.2.2. Untersuchung der viralen Proteinexpression im Verlauf einer Infektion.....	123
5.2.3. Entwicklung eines ELISA-Tests zum direkten Virusnachweis.....	126
5.2.3.1. Sandwich-ELISA zur spezifischen Detektion des GFV-E-Proteins.....	126
5.2.3.2. Kompetitiver ELISA zur Detektion des GFV-NS1-Proteins	128
5.2.3.3. Sandwich-ELISA zur Detektion des GFV-NS1-Proteins.....	130
5.2.4. Herstellung eines fluoreszierenden infektiösen Gelbfiebervirus.....	132
6. Diskussion	
6.1. Molekularepidemiologische Untersuchungen	136
6.1.1. Phylogenie von Gelbfiebervirus-17D-Impfstoffen	136
6.1.2. Phylogenetische und biologische Charakterisierung westafrikanischer GFV- Isolate	139
6.1.2.1. Sequenzanalysen.....	139
6.1.2.2. Phylogenetische Analysen	143
6.1.2.3. Wachstumsanalysen westafrikanischer Gelbfieberviren	144
6.2. Entwicklung neuer Tools zum Nachweis von Gelbfieberviren	147
6.2.1. Herstellung und Charakterisierung von Peptidantikörpern zum gezielten Nachweis von GFV-Proteinen.....	147
6.2.2. Entwicklung eines ELISA-Tests zum direkten Virusnachweis.....	155
6.2.3. Herstellung eines fluoreszierenden infektiösen Gelbfiebervirus.....	160
7. Zusammenfassung.....	164
8. Summary.....	166
9. Veröffentlichungen.....	168
10. Danksagung.....	169
11. Abkürzungsverzeichnis	171
12. Literaturverzeichnis	174

1. EINLEITUNG

1.1 Gelbfieber

1.1.1 Historischer Überblick

Die Entstehung des Gelbfiebervirus (GFV) fand vermutlich in Zentralafrika statt und liegt circa 3000 Jahre zurück (Zanotto et al., 1996). Man geht davon aus, dass es sich zusammen mit seinem Vektor (*Aedes* spp.) über die Handelswege in den tropischen und subtropischen Regionen Ost- und Westafrikas ausbreitete (Zanotto et al., 1996, Mutebi and Barrett, 2002) und schließlich mit dem Sklavenhandel Europa und Nord- und Südamerika erreichte. Dort war das Virus im 17. und 18. Jahrhundert Auslöser zahlreicher Epidemien (Barrett and Higgs, 2007).

Die erste glaubwürdige Beschreibung einer Gelbfieberekrankung findet sich in einem Maya-Schriftstück aus Yukatan (Mexiko) aus dem Jahre 1648 (Carter, 1931). Der Begriff des Gelbfiebers (GF) wurde jedoch erst 1750 von Griffith Hughes in seinem Buch *Natural History of Barbados* geprägt und bezieht sich auf die gelb gefärbte Haut der Erkrankten.

Bereits 1881 vermutete Carlos Finlay, ein Arzt und Wissenschaftler aus Kuba, dass Mücken die Überträger der Krankheit sind, konnte seine Theorie jedoch zu dieser Zeit nicht beweisen (Bryan et al., 2004, Staples and Monath, 2008). Seine Vermutung legte aber den Grundstein für die Forschungen von Walter Reed, der Ende des 19. Jh. durch Menschenversuche auf Kuba Finlays Theorie beweisen und GFV als filtrierbares Agens identifizieren konnte (Staples and Monath, 2008). Anfang des 20. Jahrhunderts folgten daraufhin großangelegte Kampagnen zur Eliminierung der Mücken, die große Erfolge in der Bekämpfung des urbanen Gelbfiebers erzielten. Die Entdeckung des zoonotischen Dschungelzyklus, durch den das Virus über eine ständige Zirkulation zwischen Affen und Mücken in der Natur erhalten bleibt, brachte jedoch die Erkenntnis, dass eine vollständige Ausrottung der Erkrankung unmöglich ist (Soper, 1937).

1927 gelang erstmals die Isolation des GFV. Der Amerikaner Adrian Stokes isolierte den Virusstamm Asibi aus einem erkrankten Patienten aus Ghana (Stokes et al., 2001), während etwa zeitgleich dem französischen Forscherteam um Jean Laigret die Isolation des *French viscerotropic strain* aus einem Patienten mit einer milden Form der Krankheit in Dakar gelang (Frierson, 2010, Sellards and Hindle, 1928).

Einen bedeutenden Durchbruch für die weltweite Bekämpfung des GF erreichte Max Theiler 1937 mit der Herstellung des attenuierten Virusstammes 17D, der bis heute erfolgreich als Lebendimpfstoff eingesetzt wird. Die Attenuierung gelang durch die wiederholte Passagierung des Wildtypstammes Asibi auf zerkleinerten Hühnerembryonen, denen das zentrale Nervensystem entfernt wurde. Für diese Entdeckung bekam Theiler 1951 den

EINLEITUNG

bisher einzigen Nobelpreis für einen antiviralen Impfstoff (Norrby, 2007, Theiler and Smith, 1937b, Theiler and Smith, 1937a).

Auch aus dem *French viscerotropic strain* gelang die Herstellung eines Impfstoffes. In diesem Fall erfolgte die Passagierung im Hirngewebe von Mäusen, was zur Entwicklung des attenuierten *French neurotropic strain* führte, der allerdings einen erhöhten Neurotropismus aufwies. Dieser Impfstoff wurde bis in die 1970er Jahre besonders in Afrika mit großem Erfolg eingesetzt, wurde jedoch 1982 abgeschafft aufgrund des hohen Risikos, postvakzinale Enzephalitiden hervorzurufen (Staples and Monath, 2008).

Der stetig wachsende technische Fortschritt in der Wissenschaft führte zu einem immer besseren Verständnis des GFV und der Gelbfieberkrankheit. Besonders die vollständige Sequenzierung des Impfstammes 17D durch Rice et al. im Jahre 1985 (Rice et al., 1985) trug einen großen Teil zum molekularbiologischen Verständnis des Virus bei. Auch die Diagnostik hat sich durch neue Techniken wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und den *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) stark weiterentwickelt. Die Entwicklung einer spezifischen Therapie ist jedoch bis heute nicht gelungen.

Durch die Verfügbarkeit des Impfstoffes und die damit seit den 1940er Jahren durchgeführten Massenimmunisierungen sowie durch die Vektorbekämpfung mit Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) reduzierte sich weltweit die Anzahl an Neuinfektionen drastisch, und das GFV konnte in Südamerika sogar fast vollständig eliminiert werden. Mit dem zunehmenden Verschwinden der Krankheit wurden diese Präventionsmaßnahmen jedoch vernachlässigt, so dass seit den 1970er Jahren wieder zunehmend Epidemien in Afrika und Südamerika beobachtet werden konnten (Robertson et al., 1996).

Seit 1988 haben daher die *World Health Organisation* (WHO) und die *Pan American Health Organisation* (PAHO) die Aufnahme der Gelbfieberimpfung in die Kindergrundimmunisierung in Endemiegebieten stark vorangetrieben. Darüber hinaus wurde 2007 die so genannte Gelbfieberinitiative der WHO gegründet, die durch die *Global Alliance of Vaccine and Immunization* (GAVI) unterstützt wird und sich zum Ziel gesetzt hat, die Gelbfiebersituation in Endemiegebieten durch präventive und reaktive Impfkampagnen zu verbessern (World Health Organisation, 2007).

Trotz der gut wirksamen Impfung und einem innerhalb der letzten 100 Jahre weit fortgeschrittenen Wissen über das GFV ist die Krankheit nach wie vor ein ernstzunehmendes, weltweit verbreitetes Gesundheitsproblem. Besonders die Finanzierung sowie die logistische Durchführung von Impfkampagnen in Afrika stellt ein großes Problem dar. Zudem sind viele Einzelheiten der Virusvermehrung und des gesamten Viruszyklus in seinem ökologischen Kontext bis heute unverstanden, so dass weiterhin ein großer Forschungsbedarf besteht (Staples and Monath, 2008).

1.1.2 Klinik

Das klinische Bild einer Gelbfiebererkrankung variiert stark zwischen asymptomatischen oder leichten Verläufen mit grippeähnlichen Symptomen und tödlich verlaufenden hämorrhagischen Fiebern, wobei davon ausgegangen wird, dass einer von sieben Infizierten tatsächlich erkrankt (Staples and Monath, 2008). Diese Varianz im Krankheitsverlauf wird einerseits durch eine unterschiedliche Pathogenität der Virusstämme, andererseits durch genetische oder erworbene Prädispositionen des Wirtes bedingt (Monath and Barrett, 2003). Eine voll ausgeprägte Gelbfiebererkrankung verläuft in drei Phasen (Abb. 1.1) (Monath and Barrett, 2003, Monath, 2001).

Nach einer erfolgreichen Infektion durch den Stich einer infizierten Mücke und einer Inkubationszeit von drei bis sechs Tagen kommt es mit abrupt einsetzenden Symptomen zur ersten Krankheitsphase - der Infektionsphase. Diese zeichnet sich durch unspezifische allgemeine Krankheitssymptome wie Fieber, Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen, Übelkeit, Schüttelfrost, Bradykardie und Schwindel aus, die über einen Zeitraum von drei bis sechs Tagen andauern. Im Blut lassen sich Leukopenien, Neutropenien sowie erhöhte Transaminaselevel, die auf einen beginnenden Leberschaden hindeuten, nachweisen. Der Patient ist in dieser Krankheitsphase virämisch, und es lässt sich ein Virustiter von 10^5 (Monath, 2001) bis 10^7 (Macnamara, 1957) infektiösen Viruspartikeln pro Milliliter Blut nachweisen.

In der sich anschließenden Remissionsphase, die 24 (Monath, 2001) bis 48 Stunden (Monath and Barrett, 2003) andauern kann, kommt es zu einem kurzzeitigen Rückgang der Symptome. Die eingreifende adaptive Immunantwort bewirkt die Beseitigung der im Blut zirkulierenden Viren. Zu diesem Zeitpunkt kann sich der Patient vollständig erholen.

In 15-25% der Fälle kommt es zur dritten Krankheitsphase – der toxischen Phase. In diesem Stadium manifestieren sich die charakteristischen Symptome der Gelbfiebererkrankung, die durch erneut auftretendes starkes Fieber, Bauchschmerzen, Erbrechen, Nierenversagen, Dehydratation, Blutdruckabfall, Gelbsucht und Hämorrhagien gekennzeichnet sind. Im Blut lassen sich eine Thrombozytopenie und eine Reduktion der Gerinnungsfaktoren nachweisen, was zu einer verstärkten Blutungsneigung führt. Ein erhöhtes Serum-Transaminaselevel zeigt den auftretenden Leberschaden an und spiegelt die Schwere des Krankheitsverlaufes wider: je höher die Werte, desto schlechter die Prognose (Oudart and Rey, 1970). Mit beginnendem Nierenversagen steigen außerdem die Kreatininkonzentration im Blut sowie die Proteinkonzentration im Urin an, was durch die Ausscheidung von Immunkomplexen hervorgerufen wird. Gleichzeitig nehmen Urinmenge und pH-Wert des Urins ab. Durch die Zerstörung der Leberzellen, die normalerweise am Abbau und der Ausscheidung des Hämoglobins beteiligt sind, reichert sich das Abbauprodukt Bilirubin im Blut an und es kommt zur Gelbsucht (Modrow S., 2010). Zudem findet keine ausreichende Produktion an

Gerinnungsfaktoren mehr statt und es kommt zu starken Blutungen im ganzen Körper. In der Endphase der Krankheit kommt es zu Multiorganversagen, Delirium, Koma und Schock, vermutlich hervorgerufen durch einen so genannten Zytokinsturm des Immunsystems (Systemic Inflammatory Response Syndrome - SIRS) (Monath, 2008). Sehr selten kommt es zu einer neurologischen Manifestation in Form einer Enzephalitis.

Insgesamt sterben 20-50% der Patienten, die diese Krankheitsphase erreichen, ca. 7-10 Tage nach Beginn der Symptome an Multiorganversagen und Schock (Monath, 2001), was einer Gesamtletalität von 3-12,5% entspricht. Die Angaben der Letalität variieren jedoch sehr stark und hängen unter anderem von der Melderate und dem Immunstatus der betroffenen Population ab (Monath and Barrett, 2003). Bezogen auf das Alter ist die Sterblichkeit bei Kindern und älteren Menschen am höchsten.

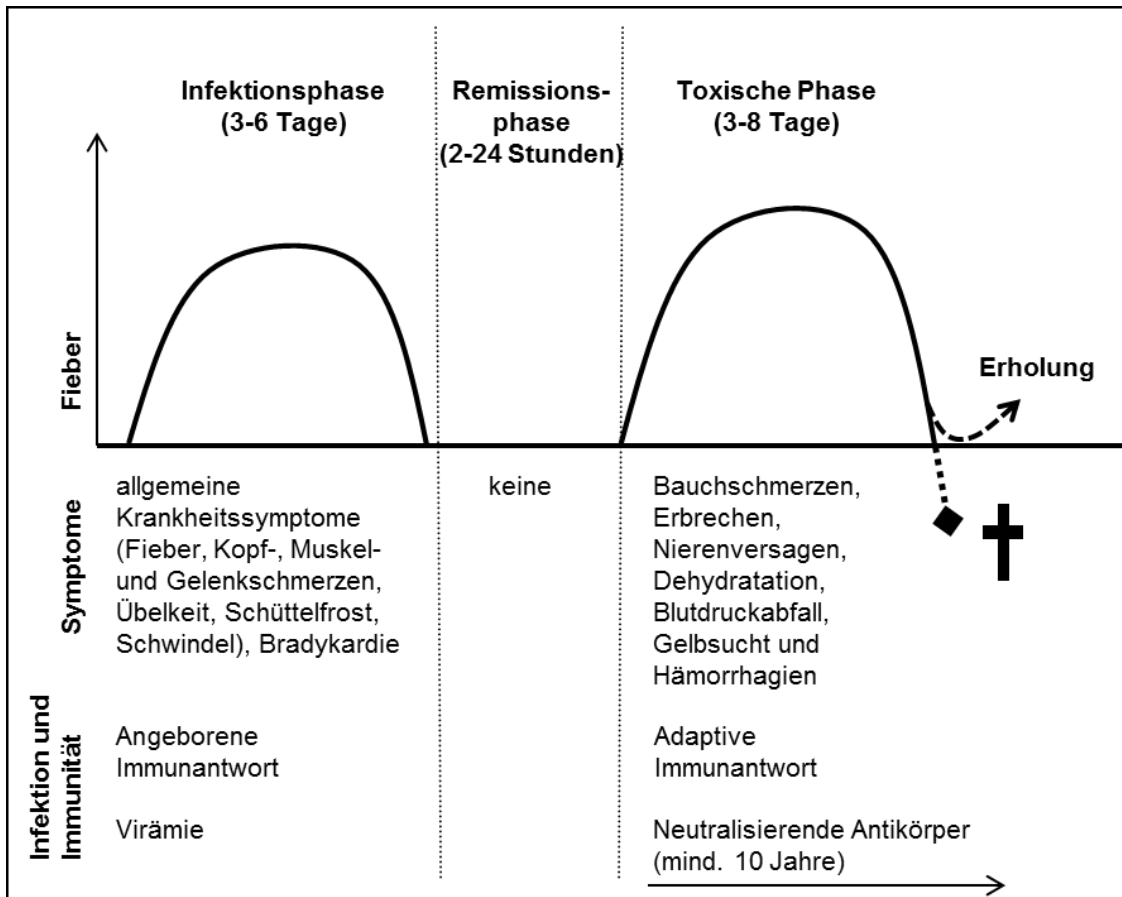


Abb. 1.1: Typischer Krankheitsverlauf und Immunreaktion während einer Gelbfiebererkrankung (verändert nach Monath 2001 (Monath, 2001)). Dargestellt sind die drei Krankheitsphasen einer Gelbfieberinfektion. Während der 3-6 Tage andauernden Infektionsphase zeigen sich unspezifische Krankheitssymptome wie Fieber, Kopfschmerzen und Übelkeit. In dieser Zeit ist der Patient virämisch und das angeborene Immunsystem kommt zum Einsatz. In der sich anschließenden Remissionsphase klingen die Symptome für kurze Zeit ab, bevor sich in 15-25% der Patienten die toxische Phase mit den typischen Symptomen der Gelbfiebererkrankung wie Gelbsucht und Hämorrhagien ausprägt. In dieser Zeit werden spezifische und neutralisierende Antikörper gegen das GFV nachweisbar (adaptive Immunantwort). 20-50% der Patienten dieser Krankheitsphase sterben an Multiorganversagen und Schock.

1.1.3 Pathogenese

Das GFV gelangt durch den Stich einer infizierten Mücke in die Haut des Wirtes, wobei schätzungsweise 10^3 bis 10^4 infektiöse Partikel übertragen werden (Monath and Barrett, 2003). Im umliegenden Gewebe der Einstichstelle infiziert es Endothelzellen und dendritische Zellen (DZ) und wird anschließend von Letzteren über die lymphatischen Gefäße in die lokalen Lymphknoten transportiert (Abb. 1.2) (Palmer et al., 2007, Khaiboullina et al., 2005, Marovich et al., 2001, Barba-Spaeth et al., 2005). Hier trifft es auf weitere infizierbare Zellen und es kommt zu einer starken Replikation der Viren, die nach ihrer Freisetzung als extrazelluläre Partikel in die Blutbahn gelangen und sich im gesamten Körper verbreiten (Monath and Barrett, 2003). Während dieser Zeit kann der Patient als neue Infektionsquelle dienen, wobei eine Mücke mindestens 10 Viruspartikel aufnehmen muss um selbst infiziert zu werden. Dazu ist eine Virämie von 10^4 infektiösen Einheiten pro Milliliter Blut (PFU/ml) ausreichend (Barrett and Monath, 2003).

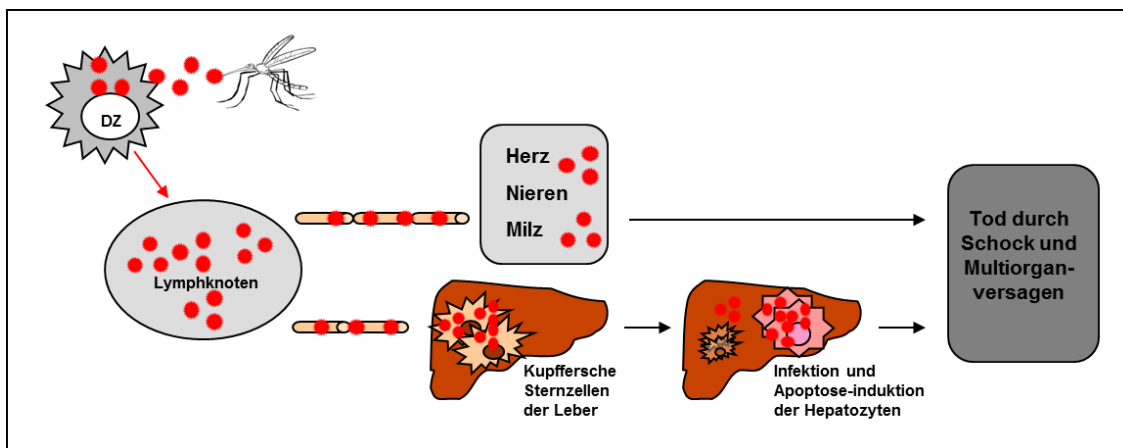


Abb. 1.2: Vereinfachte Darstellung der Gelbfieberpathogenese. Das Virus gelangt durch den Stich einer infizierten Mücke in die Haut, wo es zuerst dendritische Zellen infiziert. Über diese gelangt es in die Lymphknoten, in denen es zu einer starken Virusvermehrung kommt. Anschließend verteilen sich die Viren über die Blutbahn im gesamten Körper und erreichen schließlich die Organe. Das Hauptzielorgan ist die Leber. In ihr werden zunächst die Kupfferschen Sternzellen und anschließend die Hepatozyten infiziert. Typisch für eine Infektion mit dem GFV ist dabei der apoptotische Zelltod der Hepatozyten. Am Ende der Infektion kommt es zu Multiorganversagen, Schock und schließlich zum Tod.

Über das Blut erreichen die Viren schließlich die sekundären Zielorgane wie Herz, Nieren und Milz sowie ihr Hauptzielorgan – die Leber (Abb. 1.2). In der Leber werden zunächst die Kupfferschen Sternzellen befallen. Sind diese aufgrund der Virusreplikation zerstört, kommt es zur Infektion der Hepatozyten und im weiteren Verlauf zu einer massiven Schädigung der gesamten Leber. Typisch für eine Infektion mit dem GFV ist hierbei, dass die Hepatozyten einen apoptotischen Zelltod sterben und so gut wie keine Entzündungszeichen in der Leber festzustellen sind, was für eine direkte Organschädigung durch das Virus spricht (Monath and Barrett, 2003). Die Leberschädigung ist auch der Grund für die verringerte Produktion an

Gerinnungsfaktoren und somit für die in dieser Krankheitsphase typischen Blutungen im gesamten Körper. Auch die Zellen der übrigen Organe werden direkt durch die virale Replikation geschädigt, so dass am Ende dieser als „Viszerotropismus“ bezeichneten Infektionsform der Tod durch Multiorganversagen und Schock eintritt. In sehr seltenen Fällen kann es außerdem zu einer Infektion des zentralen Nervensystems, dem so genannten „Neurotropismus“, kommen, indem die Viren durch infizierte Makrophagen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und so eine Enzephalitis hervorrufen können (Modrow S., 2010).

1.1.4 Diagnostik und Therapie

Die Diagnose einer akuten Gelbfieberinfektion erfolgt idealerweise durch den direkten Nachweis viraler Partikel oder ihrer Bestandteile im Blut mittels PCR, Plaquetest oder Virusanzucht (Bae et al., 2003, Monath, 2001, Weidmann et al., 2010, Nunes et al., 2011). Dies ist jedoch nur in der ersten Infektionsphase möglich, in welcher der Patient virämisch ist (Abb. 1.1). Eine fortgeschrittene oder zurückliegende Erkrankung lässt sich daher nur indirekt über den Nachweis GFV-spezifischer Antikörper diagnostizieren. Diese treten etwa mit Beginn der zweiten Krankheitswoche in Erscheinung und können über verschiedene serologische Tests wie ELISA, Immunfluoreszenztests und Neutralisationstests nachgewiesen werden (Niedrig et al., 2008). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Viren der Familie *Flaviviridae*, zu denen auch das GFV gehört (1.2.1, Abb. 1.3), unter Umständen eine sehr hohe Kreuzreaktivität zueinander aufweisen und es deshalb besonders in tropischen Regionen, wo verschiedene Flaviviren auftreten, zu Fehldiagnosen kommen kann (Houghton-Trivino et al., 2008, Allwinn et al., 2002, Mansfield et al., 2011). Differentialdiagnostisch zur Gelbfieberekrankung zu beachten sind die Krankheiten Leptospirose, Rückfallfieber, Hepatitis, Malaria sowie andere hämorrhagische Fieber wie das Dengue-Fieber und das Krim-Kongo-Fieber (Monath, 2008).

Ein weiteres Problem stellt die diagnostische Lücke zwischen dem Verschwinden der viralen Partikel im Blut und dem ersten Auftreten GFV-spezifischer Antikörper dar. In dieser Zeit ist weder ein direkter noch ein indirekter GFV-Nachweis möglich. Außerdem erfordern all diese Methoden ein bestimmtes Maß an Laborausstattung sowie geschultes Personal, was besonders in entlegenen Gebieten Afrikas nicht immer gewährleistet werden kann. Der Bedarf an neuen, einfach anwendbaren und sensitiven Nachweisverfahren, die idealerweise auch unter Feldbedingungen einsetzbar sind, besteht also nach wie vor.

Bis heute gibt es keine spezifische Therapie gegen das GFV, so dass sich die Behandlung von GF-Patienten auf eine intensivmedizinische Betreuung beschränkt – allerdings mit wenig Erfolg. Im Laufe der Zeit wurden verschiedenste Therapieansätze wie die Gabe von Ribavirin oder Interferon getestet, zufrieden stellende Ergebnisse konnten dabei aber nie erreicht werden (Monath, 2008). Ein Hauptproblem dabei ist der rechtzeitige Behandlungsbeginn:

Substanzen, die bei Verabreichung vor oder kurz nach der Infektion in Tiermodellen eine gute Wirkung zeigten, versagten, wenn sie erst nach dem Auftreten der gelbfieberspezifischen Symptome eingesetzt wurden (Monath, 2008). Eine solche Wirkungsweise wäre jedoch essenziell, weil eine Früherkennung mit Beginn der unspezifischen Symptome, besonders in endemischen Regionen, so gut wie ausgeschlossen werden kann. Der Bedarf an einer spezifischen Therapie ist trotz vorhandenem Impfstoff nach wie vor sehr hoch, da eine flächendeckende Impfung in endemischen Gebieten aus finanziellen und logistischen Gründen nur schwer realisierbar ist. Neuere Ansätze zur Entwicklung einer Therapie konzentrieren sich z.B. auf die gezielte Inhibition der viralen Nicht-Strukturproteine (Keller et al., 2006, Monath, 2008, Yin et al., 2006a, Yin et al., 2006b). Darüber hinaus konnte in verschiedenen Ansätzen eine hemmende Wirkung durch RNAi gegen einige Flaviviren gezeigt werden (Stein and Shi, 2008, Pacca et al., 2009).

1.2 Das Gelbfiebervirus

1.2.1 Taxonomie

Die Familie der *Flaviviridae* unterteilt sich in die drei Gattungen *Flavivirus*, *Pestivirus* und *Hepacivirus* und beinhaltet mehr als 70 bekannte Viren (Abb. 1.3) (Modrow S., 2010). Das Gelbfiebervirus gehört mit zahlreichen anderen humanpathogenen Erregern, darunter das Denguevirus und das West-Nil-Virus, zum Genus *Flavivirus*. Es war das erste Virus dieser Virusfamilie, das man isolieren konnte, und steht daher mit seinem charakteristischen Krankheitsbild der Gelbsucht für ihren Namen (*flavus*, lat.: gelb).

Genus	Vektor	Mensch	Tier
Flavivirus	Stechmücken	Gelbfiebervirus	Gelbfiebervirus
		Denguevirus	Wesselsbronvirus
		West-Nil-Virus	West-Nil-Virus
		Japanisches-Enzephalitisvirus	
	Zecken	St.-Louis-Enzephalitis-Virus	
		Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
		Kyasanur-Forest-Disease-Virus	Kyasanur-Forest-Disease-Virus
		Omsk-Haemorrhagic-Fever-Virus	Omsk-Haemorrhagic-Fever-Virus
			Louping-III-Virus
			Jutiapavirus
Pestivirus	-		Rio-Bravo-Virus
			Klassisches Schweinepest Virus
			Virus der bovinen Virusdiarrhoe
Hepacivirus	-	Hepatitis-C-Virus	Border-Disease-Virus der Schafe
nicht klassifiziert	-	Hepatitis-G-Virus	

Abb. 1.3: Übersicht über die wichtigsten Vertreter innerhalb der Familie der *Flaviviridae* (verändert nach Modrow 2010 (Modrow S., 2010)). Unterschieden wird zwischen humanpathogenen und tierpathogenen Viren sowie zwischen den drei Genera *Flavivirus*, *Pestivirus* und *Hepacivirus*.

1.2.2 Partikelbau

Das Gelbfiebervirus zählt zu den Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom und hat eine Partikelgröße von 40-50 nm. Das Genom liegt in enger Wechselwirkung mit dem basischen C-Protein vor, welches das Kapsid bildet und die RNA umschließt. Das Kapsid wird wiederum von einer Membranhülle umgeben, in die zwei weitere virale Strukturproteine eingelagert sind - das Matrix-Protein (M) und das Envelope-Protein (E) (Abb. 1.4) (Modrow S., 2010).

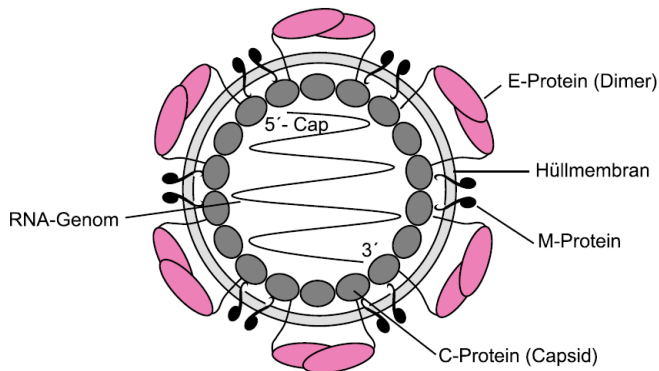


Abb. 1.4: Schematische Darstellung eines *Flavivirus* (Modrow S., 2010). Das einzelsträngige RNA-Genom wird von einem Kapsid umgeben, das durch das C-Protein gebildet wird (dunkelgrau). Das Kapsid wird seinerseits wiederum von einer Membran umgeben (hellgrau), in die die viralen Hüllproteine E (pink) und M (schwarz) eingelagert sind.

1.2.2.1 Genomorganisation

Das GFV besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom in Plusstrangorientierung mit einer Größe von ca. 10.862 Basen (Referenzsequenz NC_002031) (Rice et al., 1985). Das 5'-Ende enthält eine Cap-Struktur, wodurch die RNA in der Wirtszelle direkt von den zellulären Ribosomen translatiert werden kann und somit dieselbe Funktionsweise wie eine zelluläre Messenger-RNA (mRNA) aufweist. Die Enden des Genoms werden durch nicht-translatierte Bereiche (NTRs) flankiert, die 118 Basen am 5'-Ende betragen und am 3'-Ende eine variable Länge von 444 bis 524 Basen aufweisen (Bryant et al., 2005). Diese Bereiche bilden spezielle Sekundärstrukturen aus, die eine wichtige Rolle bei der Replikation und Translation spielen (Brinton and Dispoto, 1988, Proutski et al., 1997b).

Das 3'-NTR des Gelbfiebervirus besteht aus unterschiedlichen Bereichen, die in Abb. 1.5 schematisch dargestellt sind. Das distale Ende bildet eine als *long stable hairpin* (3'-LSH) bezeichnete, stabile Sekundärstruktur aus, die das funktionelle Kernelement für die virale Replikation und Transkription darstellt. Die korrekte Ausbildung dieser Struktur scheint eine entscheidende Auswirkung auf die Virulenz zu haben. Eine alternative Faltung in diesem Bereich konnte z.B. mit der unterschiedlichen Virulenz zwischen dem GFV-Impfstamm 17D und dem Wildtyp Asibi assoziiert werden (Proutski et al., 1997a).

Außerdem findet man am vorderen Ende des 3'-NTR, direkt hinter dem Stopcodon, einen Bereich mit repetitiven Sequenzen (RYFs), die jeweils zwei *Loop*-Strukturen ausbilden (Abb. 1.5). Die Anzahl der RYFs variiert zwischen den bekannten Genotypen. So besitzen westafrikanische GFV-Stämme alle drei RYF-Sequenzen, die ost- und zentralafrikanischen Virusstämme nur RYF1 und 3, und Stämme des südamerikanischen Genotyps lediglich RYF3. Insgesamt weisen der Bereich der RYFs und der dahinter liegende Bereich bis zum Beginn der 3'-LSH-Struktur zwischen verschiedenen Virusisolaten eine hohe Variabilität auf und scheinen nicht essenziell für die Replikation zu sein. Diese Regionen werden daher eher als replikationsverstärkende Strukturelemente angesehen (Bryant et al., 2005, Mutebi et al., 2004, Gritsun and Gould, 2006).

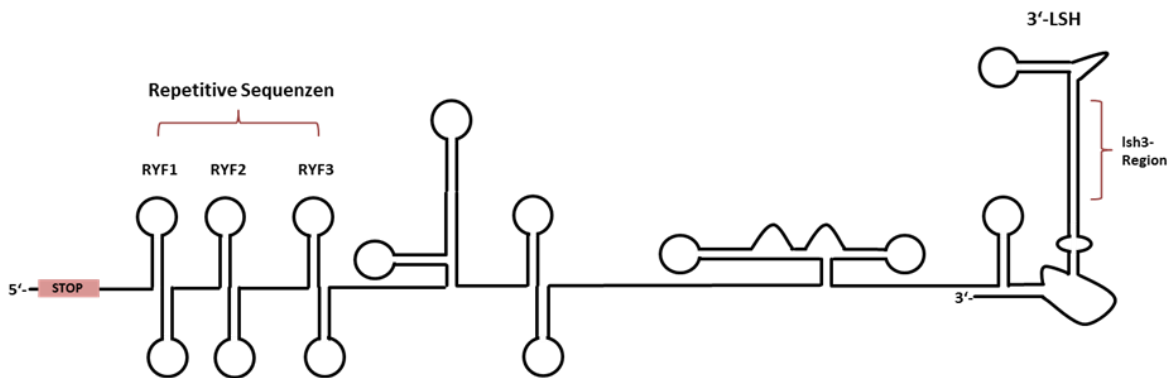


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur des nicht-translatierten 3'-Endes (3'-NTR) des GFV. Das distale Ende beinhaltet die *long stable hairpin*-Struktur (3'-LSH), die das funktionelle Kernelement für die Virusreplikation darstellt. Die Ish3-Region innerhalb dieser Domäne kann Mutationen akkumulieren, ohne dass diese einen Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur nehmen. Die Bereiche zwischen dem Stopcodon und dem 3'-LSH werden als replikationsverstärkende Elemente betrachtet und enthalten die repetitiven Sequenzbereiche RYF1-RYF3.

Das gesamte GFV-Genom enthält nur einen einzigen offenen Leserahmen (ORF = *open reading frame*), der für ein zusammenhängendes Polyprotein mit einer Länge von 3.411 Aminosäuren (AS) kodiert. In diesem Vorläuferprotein befinden sich die drei Strukturproteine C, PrM/M und E sowie die Nichtstrukturproteine NS1 bis NS5 (Abb. 1.6). Während der Translation wird das Polyprotein durch virale und zelluläre Proteasen in seine einzelnen Bestandteile gespalten, so dass die benötigten Proteine für die virale Replikation und Morphogenese vorliegen (1.2.2.2, 1.2.3).

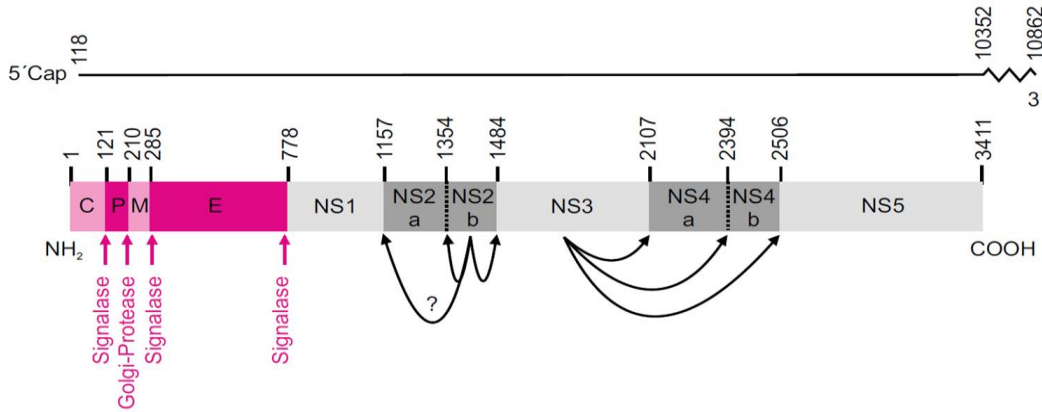


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des GFV-Genoms (oben) und des daraus translatierten Polyproteins (unten) (Modrow S., 2010). Das Polyprotein beinhaltet die Strukturproteine C, PrM/M und E (pink) sowie die Nichtstrukturproteine NS1-NS5 (grau), die kotranslational durch zelluläre (Signalase, Golgi-Protease) und virale Proteasen (NS2B, NS3) in ihre Einzelbestandteile gespalten werden. Die Pfeile zeigen die jeweiligen Schnittstellen an.

1.2.2.2 Virusproteine

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2.1 beschrieben, besitzt das GFV drei Strukturproteine (C, PrM/M und E) und sieben Nichtstrukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5), die in Tabelle 1.1 mit ihren wichtigsten Funktionen aufgelistet sind. Nicht von allen Proteinen sind Funktion und Struktur vollständig bekannt, so dass man sich hier zum Teil an den Forschungsergebnissen zu anderen Flaviviren orientiert.

Tabelle 1.1 Übersicht über die GFV-Proteine und ihre wichtigsten Funktionen (verändert nach Modrow (Modrow S., 2010))

Protein	Größe	Eigenschaften	Funktion
C	12-14 kDa	basisch, Dimer	Kapsidprotein, Interaktion mit RNA
PrM	18-19 kDa	glykosyliert	Faltung und Stabilisierung des unreifen E-Proteins, Vorläufer des M-Proteins
M	7-9 kDa		reifes Membranprotein
E	51-59 kDa	glykosyliert, Dimer	Membranprotein, Induktion neutralisierender Antikörper, Adsorption, Hämagglutination
NS1	45 kDa	glykosyliert, membranassoziiert oder sezerniert, Di- oder Hexamer	Induktion neutralisierender Antikörper, Bestandteil des Replikationskomplexes, Immunmodulation
NS2A	20-24 kDa		evtl. Bestandteil des Replikationskomplexes
NS2B	14 kDa		Zn ²⁺ -Metalloproteinase, Kofaktor der NS3-Protease
NS3	68-70 kDa		Serinprotease, Helikase
NS4A	16 kDa		evtl. Bestandteil des Replikationskomplexes
NS4B	26 kDa		evtl. Bestandteil des Replikationskomplexes, Immunmodulation
NS5	103-104 kDa		Methyltransferase (<i>Capping</i>), RNA-abhängige RNA-Polymerase

Das Matrix-Protein (M-Protein) ist ca. 8 kDa groß und geht während der Virusreifung durch Spaltung aus dem glykosylierten Vorläuferprotein PrM hervor. Das PrM-Protein dient der korrekten Faltung des E-Proteins sowie der Unterbindung der Dimerisierung und der damit einhergehenden Aktivierung des E-Proteins während der Virusreifung. Durch seine Spaltung in das M-Protein verliert es diese stabilisierenden Eigenschaften und trägt so zur Entstehung infektiöser viraler Partikel bei (Modrow S., 2010, Li et al., 2008).

Das sphärische Kapsid setzt sich aus den ca. 13 kDa großen C-Proteinen zusammen, die als Dimere vorliegen. Jedes Monomer des Proteins wird durch die asymmetrische Anordnung von vier α -Helices gebildet (Abb. 1.7, links). Durch das antiparallele Aneinanderlagern zweier Monomere kommt es zur Ausbildung eines symmetrischen Dimers, wobei die Fläche, die durch die beiden $\alpha 4$ -Domänen gebildet wird, reich an basischen Aminosäuren ist. Durch die dadurch bedingte positive Ladung erfolgt wahrscheinlich die Interaktion mit der negativ geladenen RNA. Im Gegensatz dazu kommt es auf der gegenüberliegenden Seite durch die räumliche Anordnung der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen zur Ausbildung einer hydrophoben Spalte, die mit der Membranhülle des Virus interagiert (Abb. 1.7, Mitte und rechts) (Ma et al., 2004, Dokland et al., 2004, Jones et al., 2003, Patkar et al., 2007). Auf diese Weise werden alle Bestandteile des Viruspartikels miteinander verbunden.

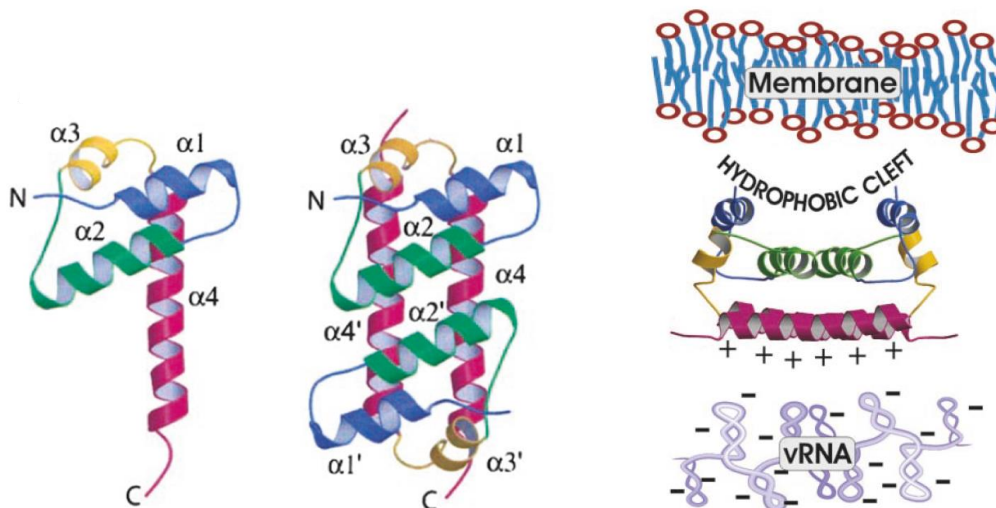


Abb. 1.7: Struktur des Denguevirus C-Proteins. Dargestellt ist die Tertiärstruktur des Monomers (links) und Quartärstruktur des dimerisierten Proteins (Mitte). Die basenreiche Region der $\alpha 4$ -Helices interagiert vermutlich mit der viralen RNA, die hydrophobe Region der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Helices ist der Membranhülle angelagert (rechts) (Ma et al., 2004).

Das Envelope-Protein (E-Protein) hat eine Größe von 51-59 kDa und ist glykosyliert. Es liegt als Dimer vor und ist mit seinem C-Terminus in der Hüllmembran verankert. Aufgrund der Strukturanalyse des E-Proteins verwandter Flaviviren geht man davon aus, dass sich auch das E-Protein des GFV in drei Domänen unterteilt (Kanai et al., 2006, Nybakken et al., 2006, Modis et al., 2004, Modis et al., 2005, Bressanelli et al., 2004). In Abbildung 1.8 ist die

EINLEITUNG

Struktur des E-Proteins des West-Nil-Virus dargestellt (Kanai et al., 2006). Domäne III (blau) beinhaltet die Rezeptorbindedomäne und vermittelt dadurch die Adsorption an den zellulären Rezeptor bei der Infektion (1.2.3). Domäne I verbindet als Zentraldomäne die Domänen II und III miteinander. Ihr kommen vorwiegend organisatorische Funktionen während der Strukturänderungen des Proteins zu. Domäne II enthält den sogenannten *Fusionloop*, einen Anker aus hydrophoben Aminosäuren, wodurch die Verschmelzung der viralen Membran mit der Wirtszellmembran eingeleitet wird. Durch seine Struktur ist das E-Protein der Flaviviren der Klasse-II-Fusionsproteinen zuzuordnen (1.2.3, Abb. 1.11) (Mukhopadhyay et al., 2005). Darüber hinaus hat das E-Protein hämagglutinierende Eigenschaften und ist das hauptverantwortliche Oberflächenantigen, gegen das im Verlauf der Infektion neutralisierende Antikörper gebildet werden (Chavez et al., 2010).

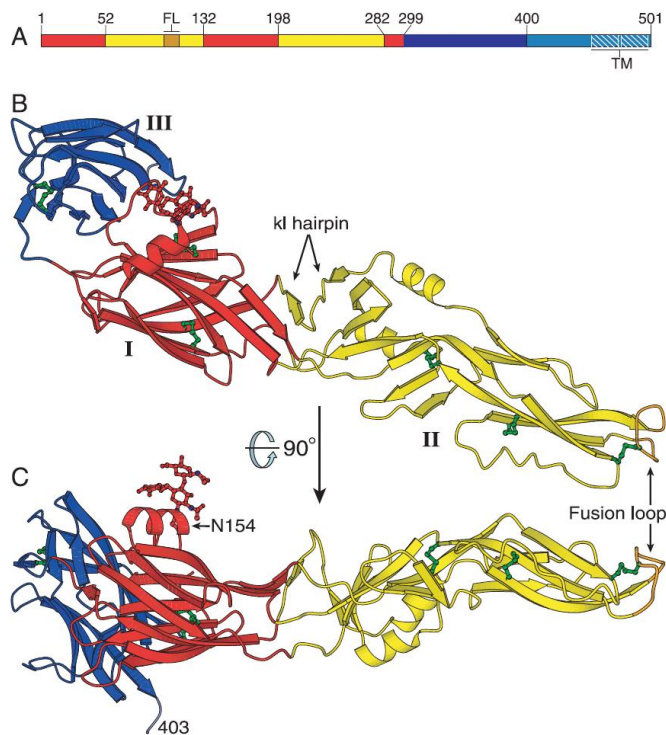


Abb. 1.8: Struktur des E-Protein-Monomers des West-Nil-Virus in linearisierter, schematischer Darstellung (A) und in seiner 3D-Struktur in zwei rechtwinkligen Orientierungen (B und C). Zu sehen sind die drei Domänen des Proteins: Domäne III mit Rezeptorbindedomäne (blau), Domäne I (rot) und Domäne II mit *Fusionloop* (gelb) (Kanai et al., 2006).

Neben den Strukturproteinen, kodiert das GFV-Genom für sieben Nichtstrukturproteine (NS1 bis NS5), die kein Bestandteil des reifen Viruspartikels sind (Abb. 1.6, Tabelle 1.1).

Das NS1-Protein ist ein 45 kDa großes glykosyliertes Protein, das sowohl in membrangebundener Form auf der Zelloberfläche infizierter Zellen als auch in löslicher, sezernierter Form vorkommt. Die Struktur des Proteins ist bisher noch nicht bekannt, jedoch weiß man, dass es als Dimer (membranassoziiert) oder Hexamer (sezerniert) vorliegen kann. Funktionell scheint es am viralen Replikationskomplex beteiligt zu sein und in die

Immunantwort einzugreifen, indem es die Aktivierung des Komplementsystems inhibiert und die *toll-like*-Rezeptor 3 (TLR3)-vermittelte Signalkaskade blockiert. Während einer GFV-Infektion werden protektive Antikörper gegen das NS1-Protein gebildet. Die Zirkulation der sezernierten Form des Proteins außerhalb der Zellen macht es zu einem möglichen alternativen Marker für die Diagnose einer akuten GFV-Infektion (Chung et al., 2006, Perera and Kuhn, 2008, Wilson et al., 2008, Schlesinger et al., 1990, Post et al., 1991, Macdonald et al., 2005, Avirutnan et al., 2011).

Das NS3-Protein der Flaviviren ist ein ca. 70 kDa großes Protein, das aus zwei großen Untereinheiten besteht. Die N-terminale Untereinheit (AS 1-180) fungiert als Serinprotease, die C-terminalen 438 Aminosäuren des Proteins stellen die Helikaseuntereinheit dar (Abb. 1.9). Beide Untereinheiten sind durch einen flexiblen Bereich miteinander verbunden. Die Proteaseuntereinheit ist für die meisten Spaltungen des viralen Polyproteins verantwortlich. Ihrer Funktionalität ist jedoch von dem 14 kDa großen NS2B-Protein abhängig, welches als Kofaktor wirkt. Dabei interagiert der zentrale Teil des NS2B-Proteins mit dem aktiven Zentrum der Protease. Seine hydrophoben Enden dienen vermutlich dazu, den NS2B-NS3-Komplex in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) der Zelle zu verankern (Abb. 1.9, NS2B ist in rot dargestellt).

Die Helikaseuntereinheit des NS3-Proteins ist Teil des Replikationskomplexes und für die Entwindung der RNA-Sekundärstruktur verantwortlich. Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine Beteiligung an der Morphogenese der Viruspartikel. (Bollati et al., 2010, Carpp et al., 2011, Luo et al., 2008, Modrow S., 2010, Patkar and Kuhn, 2008, Perera and Kuhn, 2008, Wu et al., 2005)

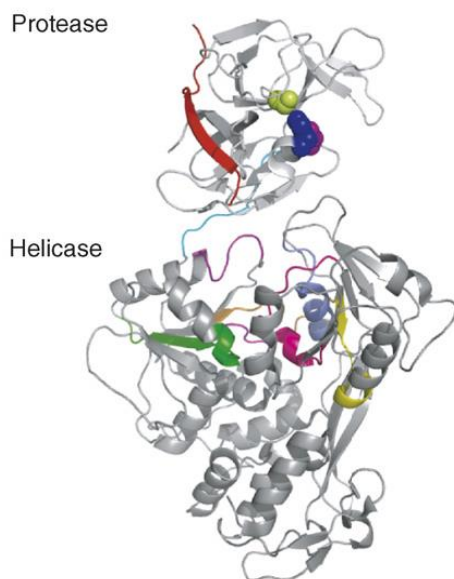


Abb. 1.9: Struktur des NS3-Proteins mit den beiden Untereinheiten der N-terminalen Protease und der C-terminalen Helikase. Der Kofaktor NS2B der Proteaseuntereinheit ist in rot dargestellt (Perera and Kuhn, 2008).

EINLEITUNG

Das NS5-Protein besteht ebenfalls aus zwei Untereinheiten und ist mit ca. 100 kDa das größte und am besten konservierte Protein der Flaviviren (Abb. 1.10). Im N-terminalen Bereich des Proteins befindet sich die Methyltransferase-Domäne, die für das *Capping* der neu synthetisierten viralen RNA verantwortlich ist. Die C-terminale Domäne beinhaltet die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Sie ist essenziell für die Neusynthese der viralen RNA und somit für die Virusreplikation. Ihr Aufbau entspricht mit Finger-, Handfläche- und Daumen-Domäne der typischen Struktur einer Polymerase, wobei sich das aktive Zentrum in der Handflächen-Domäne befindet. Des Weiteren beinhaltet die Polymeraseuntereinheit eine Kernerkennungssequenz, die einerseits mit dem zellkernassoziierten Molekül β -Importin und zum anderen mit dem NS3-Protein interagiert. Beide Proteine (NS3 und NS5) konnten für verschiedene Flaviviren bereits im Zellkern nachgewiesen werden (Bollati et al., 2010, Malet et al., 2008, Perera and Kuhn, 2008, Pryor et al., 2007, Uchil et al., 2006).

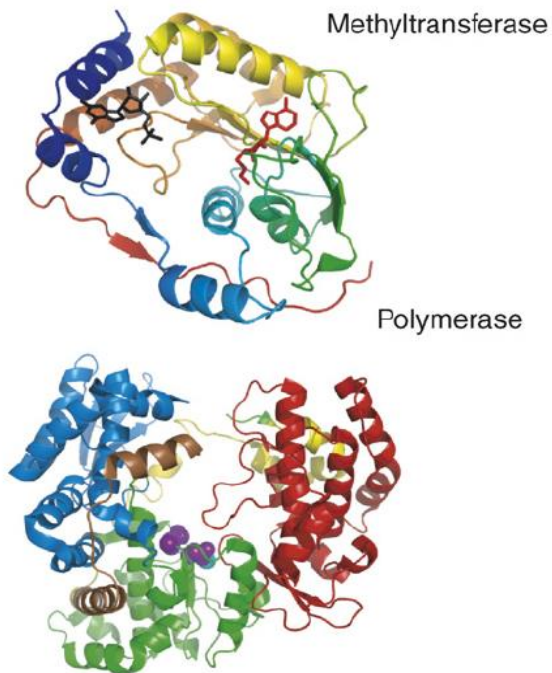


Abb. 1.10: Struktur der N-terminalen Methyltransferase-Domäne und der C-terminalen Polymeraseuntereinheit des Denguevirus NS5-Proteins (Perera and Kuhn, 2008).

Über die hydrophoben Transmembranproteine NS2A, NS4A und NS4B ist nur wenig bekannt, alle scheinen jedoch als Teil des Replikationskomplexes wichtig für die Virusproduktion zu sein. NS4B interagiert außerdem mit dem NS3-Protein und inhibiert vermutlich die Interferon-Signalkaskade, einen zellulären Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen (Miller et al., 2007, Munoz-Jordan et al., 2003, Perera and Kuhn, 2008, Xie et al., 2013).

1.2.3 Replikation und Morphogenese

Die Infektion einer Wirtszelle durch das GFV beginnt mit der Adsorption über das E-Protein an einen zellulären Rezeptor. Verschiedene Moleküle wie z.B. Glykosaminoglykane, DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), verschiedene *heat-shock*-Proteine oder $\alpha_v\beta_3$ -Integrine wurden als mögliche Rezeptoren für Flaviviren diskutiert (Chu and Ng, 2004, Germi et al., 2002, Smit et al., 2011, Tassaneeritthep et al., 2003). Die anschließende Aufnahme in die Zelle erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose. Nach Ansäuerung des Endosomenlumens kommt es im E-Protein zu einer Konformationsänderung, so dass das Fusionspeptid frei wird und in die zelluläre Endosomenmembran eindringen kann. Gleichzeitig lösen sich die Dimer-Strukturen auf und es kommt zu einer Trimerbildung. Weitere Konformationsänderungen in Domäne I und II des E-Proteins führen dazu, dass die Virus- und die Endosomenmembran in räumliche Nähe gelangen und letztendlich miteinander verschmelzen. Diese Art der Membranfusion wird als Klasse-II-Membranfusion bezeichnet und ist in Abb. 1.11 schematisch dargestellt (Mukhopadhyay et al., 2005, Kielian, 2006, Smit et al., 2011, Stiasny et al., 2011).

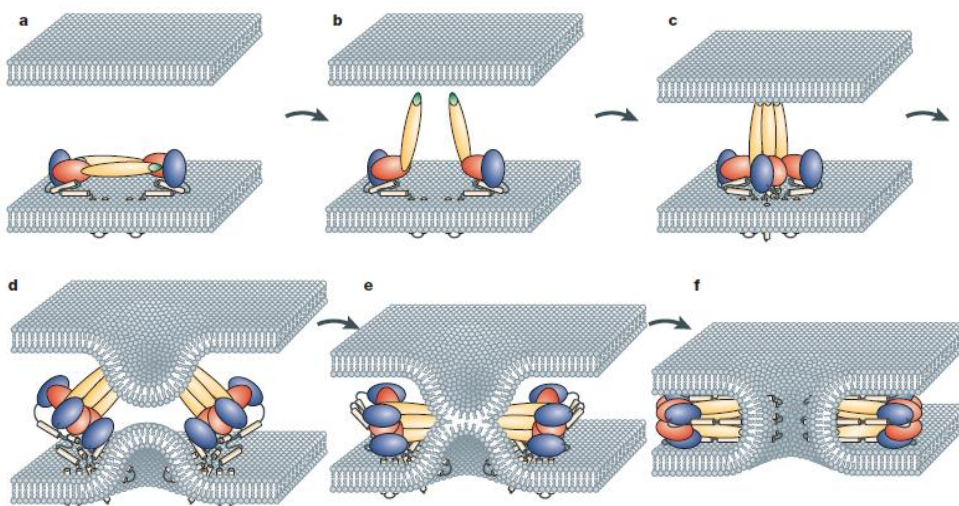


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der Membranfusion von Klasse-II-Fusionsproteinen (Mukhopadhyay et al., 2005). Das E-Protein liegt als Dimer auf der Virusmembran vor (a). Nach der Bindung an einen zellulären Rezeptor und anschließender Endozytose kommt es zur Ansäuerung des Endosomenlumens, woraufhin es zu einer Strukturänderung im E-Protein kommt und Domäne II nach außen schwingt (b). Es kommt zu einer Trimerbildung und der Insertion des Fusionspeptids in die zelluläre Endosomenmembran (c). Durch eine erneute Konformationsänderung des Proteins werden die beiden Membranen in räumliche Nähe gebracht und es kommt zur Membranverschmelzung (d-f). (blau = Domäne III, rot = Domäne I, gelb = Domäne II, grün = Fusionspeptid)

Nach der Membranverschmelzung wird das Nukleokapsid ins Zytoplasma entlassen und die virale RNA freigesetzt (Abb. 1.12). Wie genau die Freisetzung erfolgt, ist jedoch bis heute ungeklärt. Über die Cap-Struktur kann die RNA direkt mit den zellulären Ribosomen interagieren und das Polyprotein wird translatiert. Über ein Signalpeptid am C-Protein wird es

kotranslational in der Membran des ER verankert und dort durch zelluläre und virale Proteasen in seine einzelnen Proteine gespalten, sobald die entsprechenden Enzyme vorliegen (Abb. 1.12 und 1.6). Die Membranproteine E und M bleiben durch Transmembrandomänen in der ER-Membran verankert, wohingegen das C-Protein lediglich durch Wechselwirkungen mit der Membran assoziiert bleibt.

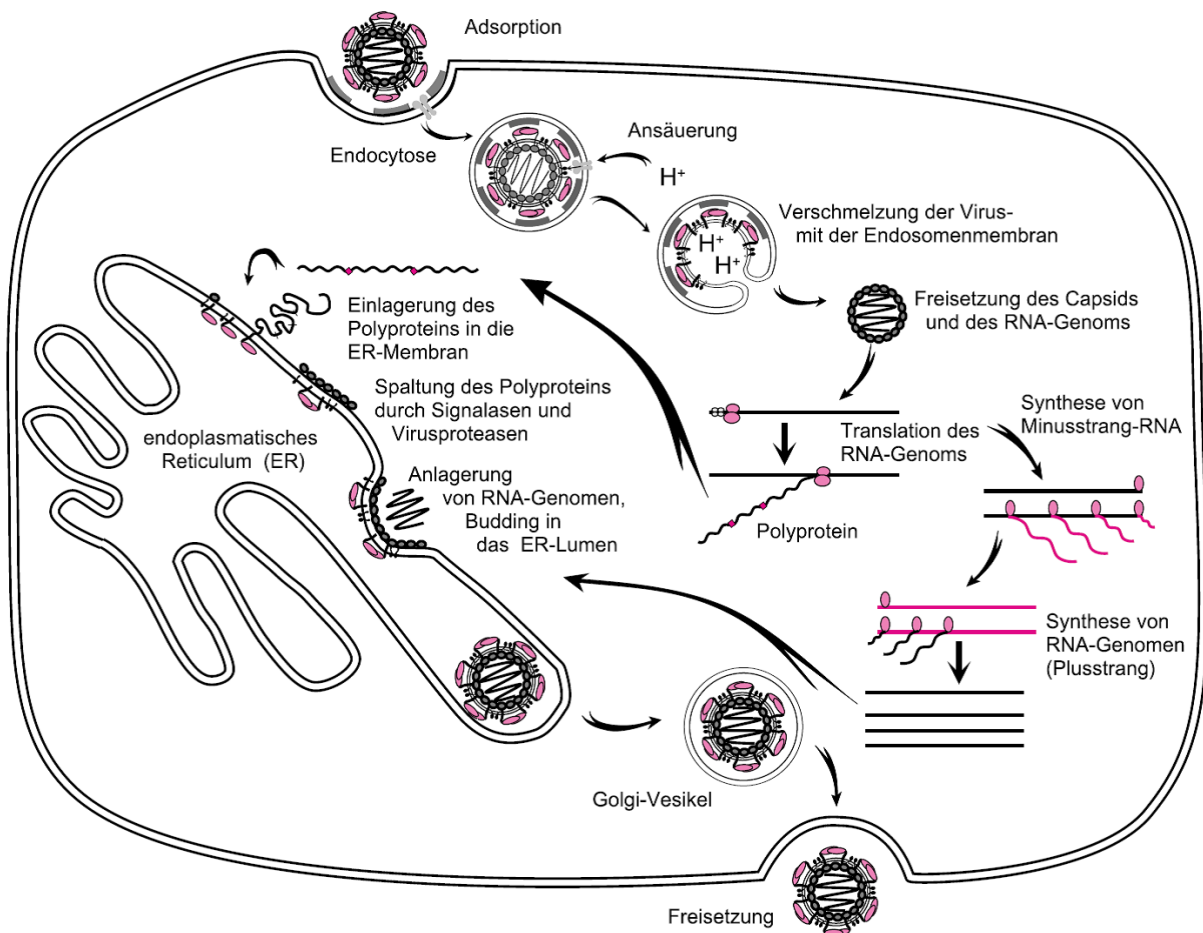


Abb. 1.12: Schematische Darstellung des Replikationszyklus eines Flavivirus. Die Infektion einer Zelle beginnt mit der Adsorption an einen zellulären Rezeptor und der sich anschließenden rezeptorvermittelten Endozytose. Durch Ansäuerung des Endosoms kommt es zu einer Strukturänderung der viralen Membranproteine, worauf die Verschmelzung mit der Endosomenmembran erfolgt und das virale Kapsid ins Zytoplasma entlassen wird. Nach der Freisetzung der RNA aus dem Kapsid wird das virale Polyprotein durch die zellulären Ribosomen synthetisiert. Es wird dabei kotranslational ins ER eingelagert und durch virale und zelluläre Proteasen in seine Einzelbestandteile prozessiert. Sobald die erforderlichen Proteine (NS3 und NS5) vorliegen, erfolgt die Replikation des viralen Genoms. Die Morphogenese erfolgt ebenfalls am ER, und die neu gebildeten Viruspartikel werden über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert, wobei sie zu infektiösen Partikeln heranreifen. Die Freisetzung erfolgt an der Zelloberfläche durch Exozytose oder Lyse (Modrow S., 2010).

EINLEITUNG

Sobald die Nichtstrukturproteine vorliegen, kann die Replikation des viralen Genoms im Zytoplasma stattfinden. Dazu synthetisiert die RNA-abhängige RNA-Polymerase (NS5) in Zusammenarbeit mit der Helikaseuntereinheit des NS3-Proteins zunächst Negativstrang-Matrizen von der genomischen Positivstrang-RNA (Abb. 1.12). Von diesen Negativsträngen werden wiederum neue Positivstrang-RNA-Genome gebildet, die direkt an ihrem 5'-Ende gecappt werden. Diese Positivstränge dienen zum einen der erneuten Translation viraler Proteine, zum anderen werden sie als Genom in die neuen Viruspartikel verpackt.

Die Morphogenese der neu gebildeten Viren erfolgt an der Membran des rauen ERs (Abb. 1.12). Dabei bindet sich die neu synthetisierte RNA an die stark basischen C-Proteine, es kommt zu einer Strukturänderung und anschließend zur Einstülpung der unreifen Viruspartikel ins ER. Die weitere Virusreifung, die die Glykosylierung des PrM- und E-Proteins sowie die Spaltung des PrM- in das reife M-Protein beinhaltet, findet während des Transportes zur Zelloberfläche im Golgi-Apparat statt. Zum Schluss werden die reifen Viren durch Exozytose oder Lyse aus der Zelle ausgeschleust (Modrow S., 2010, Monath and Barrett, 2003, Lindenbach and Rice, 2003, Ishak et al., 1988, Mukhopadhyay et al., 2005, Chambers et al., 1990).

Wie bereits erwähnt sind einige Details der GFV-Replikation noch nicht vollständig aufgeklärt. Dazu zählen zum Beispiel die Freisetzung des viralen Genoms aus dem Kapsid oder die exakte Funktion einiger NS-Proteine. Des Weiteren gibt es mittlerweile mehrere Studien, die die Lokalisation viraler Bestandteile im Zellkern belegen und eine Beteiligung an der Virus-Wirts-Interaktion nahelegen (Pryor et al., 2007, Uchil et al., 2006, Mori et al., 2005, Netsawang et al., 2010, Colpitts et al., 2011, Sangiambut et al., 2008). Die genaue Funktion und Auswirkung konnte jedoch noch nicht dargelegt werden.

1.3 Der Gelbfieberimpfstoff 17D

1.3.1 Entstehung und Attenuierung

Der attenuierte Gelbfieberimpfstamm 17D ging 1937 durch die Arbeiten von Max Theiler aus dem 1927 in Ghana isolierten Wildtypstamm Asibi hervor (Barrett and Teuwen, 2009, Frierson, 2010). Zur Attenuierung führten 53 initiale Übertragungszyklen in Affen, 18 Passagen auf Gewebe aus Mäuseembryonen, 50 Passagen auf zerkleinerten Hühnerembryonen und 152 Passagen auf zerkleinerten Hühnerembryonen ohne Nervengewebe (Hahn et al., 1987, Stokes et al., 2001). Die Attenuierung erfolgte zufällig zwischen der 89. und 114. *in vitro*-Passage und zeigt sich in einer deutlich reduzierten Virulenz in Primaten. Ausgehend von diesen Experimenten wurde das Virus im Laufe der Zeit an verschiedenen Orten weiter passagiert, was letztendlich zu den heute existierenden unterschiedlichen 17D-Impfstämmen geführt hat (Abb. 1.13). Die Abschwächung der Virulenz ließ sich trotz gezielter Versuche nicht reproduzieren.

Die vollständige Genomsequenzierung des Impfstammes 17D-204 und des Wildtypstammes Asibi zeigte insgesamt 68 Nukleotidunterschiede, die zu 32 Aminosäureunterschieden führen (Tabelle 1.2) (Hahn et al., 1987, Rice et al., 1985). Vergleichende Studien verschiedener Impfstämme mit dem Stamm Asibi konnten die für alle Vakzin-Stämme gemeinsamen Mutationen auf 48 Nukleotid- und 22 AS-Unterschiede eingrenzen (dos Santos et al., 1995, Galler et al., 1997, Galler et al., 1998).

Tabelle 1.2 Zusammenfassung der Sequenzunterschiede zwischen dem Wildtypstamm Asibi und dem Impfstamm 17D-204 (verändert nach Hahn et al., 1987).

Genom- abschnitt	<u>Gesamt</u>		<u>Unterschiede</u>		<u>Unterschiede in %</u>	
	Nukleotide	Aminosäuren	Nukleotide	Aminosäuren	Nukleotide	Aminosäuren
5'-NTR	118	-	0	-	0	-
C	363	121	2	0	0,55	0
prM	267	89	0	0	0	0
M	225	75	2	1	0,89	1,89
E	1479	493	15	12	1,01	2,43
NS1	1227	409	5	2	0,41	0,49
NS2A	501	167	6	5	1,2	2,99
NS2B	390	130	4	2	1,03	2,31
NS3	1869	623	9	2	0,48	0,32
NS4A	861	287	6	3	0,7	0,78
NS4B	336	112	2	1	0,6	0,89
NS5	2715	905	11	4	0,4	0,44
3'-NTR	511	-	6	-	1,17	-
Total:	10862	3411	68	32	0,63	0,97

Die Entwicklung eines infektiösen Volllängeklons, basierend auf dem Genom des Impfstammes 17D, eröffnete die Möglichkeit, gezielt Mutationen in das GFV-Genom

einzuführen, um die Grundlage der Attenuierung aufzuklären (3.7.1, Abb. 3.1) (Bredenbeek et al., 2003). Studien die sich mit dieser Thematik befassen, konnten jedoch bis heute nicht klären welchen Einfluss die einzelnen Mutationen genau auf die Abschwächung haben und welche entscheidend für die Attenuierung sind. Vielmehr geht man davon aus, dass eine Kombination aus verschiedenen Mutationen zu der verminderten Virulenz führt (Monath, 2005, Monath and Barrett, 2003).

1.3.2 Impfstoffsicherheit und Nebenwirkungen

Seit seiner Entwicklung wurde der 17D-Impfstoff weltweit über 540 Millionen Mal verabreicht und wurde immer als sehr sicher und stabil beschrieben (Barrett et al., 2007, Barrett and Teuwen, 2009). In den letzten Jahren wurde jedoch immer häufiger von schweren Nebenwirkungen nach einer GFV-Immunisierung berichtet, die in einem Zeitraum zwischen zwei und 30 Tagen nach der Impfung auftraten (*Serious Adverse Events* = SAE). Unterscheiden lassen sich dabei *vaccine-associated neurotropic disease* (YEL-AND) und *vaccine-associated viscerotropic disease* (YEL-AVD). YEL-AND verursacht Enzephalitiden in 0,19-0,8 Fällen pro 100.000 Impfungen mit einer Letalität von unter 5%. YEL-AVD gleicht in seinen Symptomen stark einer natürlichen GFV-Infektion und tritt mit einer Häufigkeit von 0,004-11,7 Fällen pro 100.000 Impfungen auf. Die Letalität liegt hier bei bis zu 64% und tritt verstärkt bei Frauen auf. Die Gründe für das Auftreten von SAEs sind nur wenig verstanden, man geht aber davon aus, dass individuelle genetische Prädispositionen eine große Rolle spielen. Im Verhältnis von Nutzen zu Risiko einer Impfung überwiegt jedoch in endemischen Regionen der Nutzen (Barrett et al., 2007, Ferguson et al., 2010, Whitembury et al., 2009, Thomas et al., 2011, Monath, 2005).

Die Gelbfieberimpfung ist absolut kontraindiziert für Kinder unter 6 Monaten und immunsupprimierte Patienten, was ein großes Problem in Afrika darstellt, wo über 20 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion leben (*Global HIV/AIDS Response – Progress Report 2011*, WHO). Menschen über 60 Jahre oder unter 9 Monaten sollten nur geimpft werden, wenn es medizinisch als absolut notwendig anzusehen ist. Auch eine erfolgte Thymektomie wird als Risikofaktor angesehen (Barrett and Teuwen, 2009, Ferguson et al., 2010).

Ein fundiertes Wissen über den genauen Attenuierungsmechanismus des GFV-Impfstoffes sowie über die Entstehung von SAEs zu bekommen ist nicht nur für die derzeitige Impfung gegen das GFV wichtig. Für die Entwicklung geeigneter Impfstoffe gegen andere Flaviviren wie z.B. das Denguevirus wird als Basis ebenfalls der 17D-Impfstoff verwendet. Bei der Herstellung so genannter chimärer Impfstoffe werden dabei bestimmte Bereiche des 17D-Impfstoffes gegen die Proteine anderer Flaviviren ausgetauscht, um so eine Immunreaktion gegen die neu eingefügten Strukturen hervorzurufen. Eine sorgfältige Analyse des GFV-

Impfstoffes ist daher grundsätzlich für den Schutz vor Krankheiten, die durch Flaviviren ausgelöst werden, von großer Bedeutung (Chang et al., 2004, Guy et al., 2010b, Murphy and Whitehead, 2011, Guy et al., 2010a).

1.3.3 Impfstoffherstellung

Die Herstellung des GFV-Impfstoffes erfolgt auf bebrüteten, pathogenfreien Hühnereiern, die mit einem zertifizierten Virusstamm infiziert werden. Um als Impfvirus bestehen zu können, muss das Stammvirus (*master seed virus*) und das daraus hervorgehende Produktionsvirus (*working seed virus*) zahlreiche Sicherheitsprüfungen durchlaufen und bestehen. Erst dann kann es für die Herstellung neuer Impfstoffchargen verwendet werden, die jeweils nur eine Passage von dem entsprechenden *working seed virus* entfernt sein dürfen.

Zu den erforderlichen Sicherheitstests für *master* und *working seed lot* zählen (i) immunologische und molekularbiologische Tests zur Identifizierung des Virus, (ii) Tests auf andere relevante Pathogene und Substanzen um Kontaminationen auszuschließen, (iii) Tests zur Bestimmung der Infektiosität des Impfstoffes sowie (iv) Tierversuche im Primatenmodell zur Sicherstellung der Wirksamkeit des Impfstoffes und zum Ausschluss schwerer Nebenwirkungen (z.B. durch Rückmutationen).

Die Tierversuche schreiben die intrazerebrale Infektion von zehn Affen der Spezies *Macaca mulatta* oder *Macaca fascicularis* vor, die über 30 Tage beobachtet werden. Zehn weitere Affen dienen als Kontrollgruppe. Untersucht werden verschiedene Parameter hinsichtlich Immunogenität, Viszerotropismus und Neurotropismus, die sich im Wesentlichen nicht von der Kontrollgruppe unterscheiden dürfen. Diese Tests umschließen u.a. sehr aufwändige histopathologische Untersuchungen nach der Tötung der Tiere. Die Notwendigkeit der Primatenversuche für eine sichere Impfstoffherstellung wurde bereits des Öfteren diskutiert, bis heute sind sie jedoch vorgeschrieben (Ferguson et al., 2010, WHO/BS/10.2131, (ECSB 2008)).

An dem Produktionsprozess des Gelbfieberimpfstoffes hat sich seit Beginn seiner Vermarktung nicht viel geändert, und nach wie vor gilt der Impfstoff als sicher und genetisch stabil (Barban et al., 2007, Barrett et al., 2007). Die Abstammungsverhältnisse der heutigen Impfstämme sind gut dokumentiert, basieren jedoch lediglich auf historischen Informationen (Abb. 1.13). Diese Dokumentation enthält wichtige Informationen wie z.B. das Passage-Level des jeweiligen Impfstammes, seinen Ursprung sowie eine Übersicht über die weltweiten Impfstoffhersteller (WHO/BS/10.2131, (ECSB 2008)). Derzeit gibt es weltweit sechs aktive GFV-Impfstoff-Hersteller: Sanofi Pasteur in Frankreich und den USA, das Pasteur-Institut im Senegal, das Chumakov-Institut in Russland und die Firma Beijing Tiantan Biological Products Co., die alle Varianten des GFV-17D Subtyps verwenden, sowie die Firma Bio-

EINLEITUNG

Manguinhos FioCruz in Brasilien, die eine Variante des Subtyps GFV-17DD verwendet (Abb. 1.13) (WHO/BS/10.2131, (ECSB 2008)).

Wie während des letzten WHO-Meetings zu GFV-Impfstoffen diskutiert wurde, ist diese Art des Stammbaums allein nicht mehr zeitgemäß und sollte durch einen auf molekularbiologischen Daten beruhenden Stammbaum ergänzt werden (Ferguson et al., 2010).

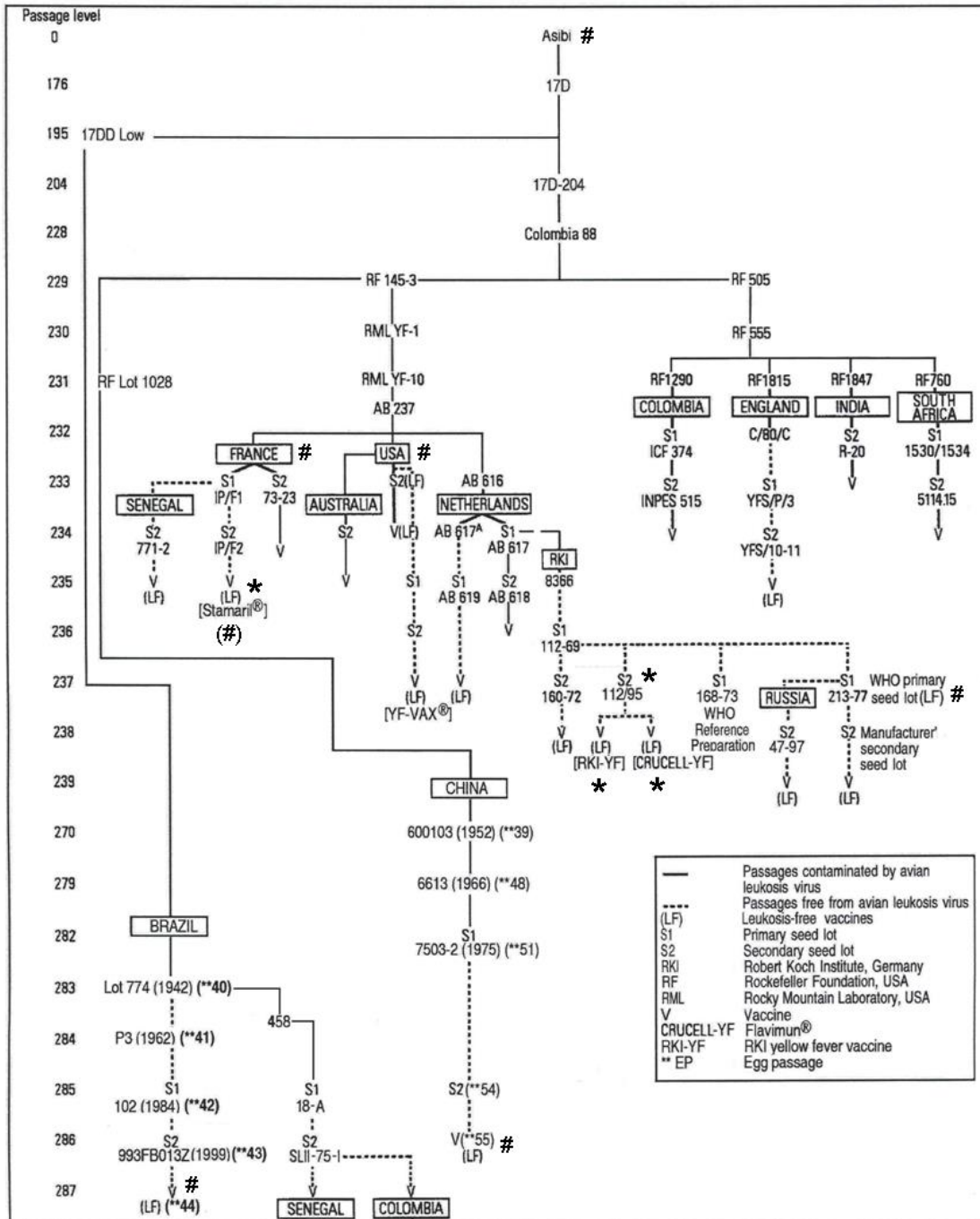


Abb. 1.13: 17D-Genealogie basierend auf Daten der Viruspassagierung und der weltweiten Verbreitung (modifiziert nach WHO (WHO/BS/10.2131, (ECSB 2008)). Die Sequenzen der in der NCBI-Datenbank GenBank veröffentlichten Impfstämme sind mit einer Raute gekennzeichnet (#). Die Impfstämme, die mit einem Stern markiert sind (*), wurden in dieser Arbeit erstmals komplett sequenziert und ebenfalls in GenBank veröffentlicht (Stock et al., 2012).

1.4 Ökologie

1.4.1 Transmission

Das Gelbfiebertvirus bleibt in der Natur durch die zyklische Übertragung zwischen Primaten und Mücken erhalten. Dabei lassen sich je nach Vegetationszone und beteiligten Spezies verschiedene Arten von Zyklen definieren:

Der Dschungelzyklus stellt den ursprünglichen und natürlichen Zyklus des GFV dar. Hier erfolgt die Übertragung in Dschungel- und Waldgebieten zwischen Affen und Mücken, wobei in Afrika und Südamerika unterschiedliche Spezies daran beteiligt sind (Abb. 1.14). Während afrikanische Affen normalerweise keine Zeichen einer GFV-Infektion aufweisen, erkranken die Affen in Südamerika an GF und sterben teilweise an der Infektion (Barrett and Monath, 2003, Tolle, 2009).

In den Grenzregionen zu Wäldern und in Savannenregionen tritt der so genannte Savannen- oder intermediäre Zyklus auf, in dem die Virusübertragung unter normalen Umständen ebenfalls zwischen Affen und Mücken stattfindet, die beteiligten Mückenspezies jedoch vielfältiger sind (Abb. 1.14). Durch den gesteigerten Kontakt zwischen Mücken und Menschen in diesen Regionen kann es hin und wieder zu einer Virusübertragung auf den Menschen kommen, weshalb diese Gebiete auch als „Zone der Ausbruchsentstehung“ bezeichnet werden. Dieser Transmissionszyklus wurde nur in Afrika beobachtet. In Südamerika findet in der Regel eine Übertragung auf Menschen statt, wenn diese in Dschungelgebiete eindringen in denen das GFV endemisch ist.

Der für die menschliche Bevölkerung kritischste Transmissionszyklus ist der urbane Zyklus, in dem das Virus sowohl in Afrika als auch in Amerika nur zwischen Menschen und der Mückenspezies *Aedes aegyptii* übertragen wird. *Ae. aegyptii* hält sich vorwiegend in Dörfern und Städten auf und saugt mit hoher Präferenz an Menschen. Wenn also das Virus durch einen infizierten Menschen bzw. eine infizierte Mücke in eine Stadt eingeschleppt wird, so besteht ein hohes Risiko, dass sich das Virus schnell in der dortigen Population ausbreitet und es zu einem größeren Ausbruch kommt.

Die Entstehung der verschiedenen Zyklen war aufgrund von geographischen Gegebenheiten, Korrelationen zwischen Vektorverbreitung und Verbreitung der entsprechenden Primatenspezies sowie einer unterschiedlichen Wirtspräferenz der verschiedenen Mückenspezies möglich. Sie dienen einerseits dem natürlichen Erhalt des Virus in der Natur, andererseits der Amplifikation des Virus zu Zeiten hoher Vektordichte nach der Regenzeit (Barrett and Monath, 2003, Gould et al., 2003, Gould and Solomon, 2008).

Einen weiteren Übertragungsweg des GFV stellt die vertikale Transmission dar. Dabei werden die Viren einer infizierten weiblichen Mücke über die Ovarien auf die Eier und somit

auf die Nachkommen übertragen. Diese Transmission dient der Langzeiterhaltung des Virus und stellt einen Überlebensmechanismus in der Trockenzeit dar. Die Viren können in den Eiern über lange Zeit persistieren, bis die Larven zu Beginn der Regenzeit schlüpfen und durch ihre Entwicklung die Virusreplikation reaktivieren. Durch diesen Übertragungsweg kann es auch zur Infektion von männlichen Mücken kommen, die kein Blut saugen und daher nicht durch einen horizontalen Übertragungsweg infiziert werden können (Barrett and Monath, 2003, Fontenille et al., 1997).

Wie groß die Bedeutung der vertikalen Transmission für den Erhalt des GFV in seinen natürlichen Zyklen ist und welche Rolle diese Übertragungsform für die Entstehung von Ausbrüchen spielt, ist bisher noch wenig erforscht.

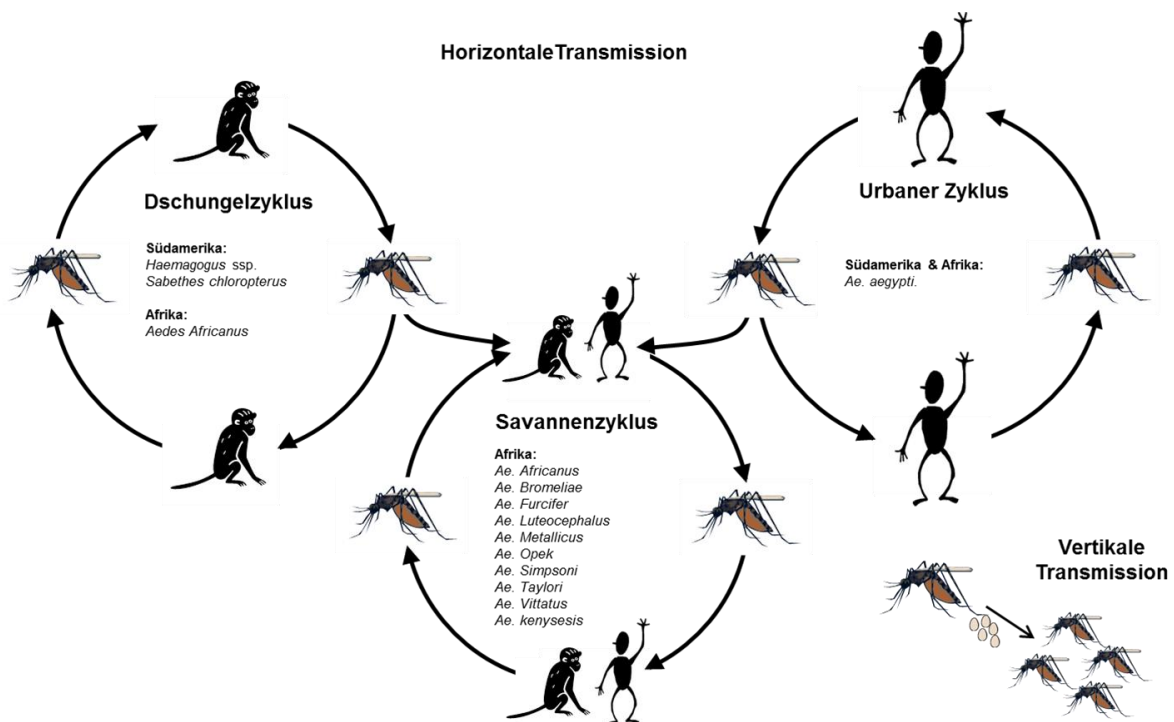


Abb. 1.14: Wege der GFV-Transmission ((Niedrig and Böthe, 2008), modifiziert). Dargestellt sind die verschiedenen Transmissionszyklen mit den jeweils involvierten Vektorspezies in Afrika und Südamerika.

1.4.2 Epidemiologie

Die Verbreitung des Gelbfiebervirus ist abhängig von der Verbreitung des Vektors und ist daher auf die tropischen und subtropischen Regionen Afrikas und Südamerikas beschränkt (Abb. 1.15). Obwohl *Aedes aegyptii* auch in Asien endemisch ist, wurde das Virus dort bisher nicht registriert. Die genaue Ursache dafür ist unbekannt, vermutet werden jedoch eine geringere Vektorkompetenz der asiatischen Mücken für das GFV oder eine mögliche kreuzreaktive Immunität der Population, die durch das Vorhandensein anderer Flaviviren hervorgerufen werden könnte (Barrett and Higgs, 2007, Barrett and Monath, 2003, Gould et al., 2003).

EINLEITUNG

Bis heute sind weltweit sieben GFV-Genotypen beschrieben, die unterschiedliche geographische Verbreitungsgebiete aufweisen und daher auch als Topotypen bezeichnet werden. Zwei Genotypen finden sich in Südamerika (südamerikanischer Genotyp I und II) und fünf in Afrika. Diese umfassen den westafrikanischen Genotyp I (endemisch in Nigeria, Kamerun und Gabun), den westafrikanischen Genotyp II (Senegal, Guinea, Elfenbeinküste, Ghana), den ost- und zentralafrikanischen Genotyp (Sudan, Äthiopien, Zentralafrikanische Republik, Demokratische Republik Kongo), den ostafrikanischen Genotyp (Kenia) und den Angola-Genotyp (Angola) (Abb. 1.15) (Barrett and Monath, 2003, de Souza et al., 2010, Mutebi and Barrett, 2002, Mutebi et al., 2001, von Lindern et al., 2006, Carrington and Auguste, 2013).

Die Homologie der Nukleotidsequenzen der verschiedenen Genotypen beträgt zwischen 70 und 75%. Innerhalb eines Genotyps kann die Sequenzidentität einzelner Isolate bis zu 100% aufweisen, selbst bei Stämmen, deren Isolierung Jahrzehnte auseinanderliegt. Diese Tatsache spiegelt eine sehr langsame Evolutionsrate und die hohe genetische Stabilität des Virus wider (Deubel et al., 1985, Lepiniec et al., 1994, Mutebi and Barrett, 2002, Mutebi et al., 2001).

Phylogenetische Studien über die Evolution des GFV wurden allerdings bis heute nur in begrenztem Umfang durchgeführt, was hauptsächlich auf die limitierte Verfügbarkeit von GFV-Wildisolaten zurückzuführen ist. Zudem beruht die Genotypisierung bisher in den meisten Fällen auf phylogenetischen Studien, die sich auf die Analyse partieller Genomsequenzen beschränken (Chang et al., 1995, Lepiniec et al., 1994, Mutebi and Barrett, 2002, Mutebi et al., 2001, Sall et al., 2010, Wang et al., 1996).

Um erweiterte Kenntnisse über die Evolution und Epidemiologie des GFV zu erlangen wäre ein verstärktes Sammeln und Sequenzieren von GFV-Wildisolaten notwendig. So könnten neue Virusstämme und eventuell Genotypen in Gebieten zum Vorschein kommen, für die es bisher nur geringe Sequenzdaten gibt (z. B. Ost- und Zentralafrika). Diese Theorie wird z.B. durch eine Studie unterstützt, die sich im Speziellen mit der molekularen Evolution westafrikanischer GFV-Stämme befasst (Sall et al., 2010). In dieser konnte gezeigt werden, dass allein im Senegal eine Ko-Zirkulation von insgesamt sechs verschiedenen GFV-Linien zu beobachten ist, was eine höhere genetische Diversität innerhalb eines Genotyps belegt als man bisher vermutete. Jedoch stützt sich auch diese Arbeit lediglich auf partielle Sequenzdaten des GFV-E-Proteins. Ob sich die bisherige Einteilung auch durch eine Analyse anderer Genombereiche stützen lassen würde ist unklar. Ebenfalls ungeklärt ist bis jetzt die Frage, inwieweit sich die verschiedenen Genotypen auf den Phänotypen, also die biologischen Eigenschaften der Gelbfiebertviren im Vektor und Primaten, auswirken.

So ist z.B. das Auftreten von Ausbrüchen in Afrika nicht uniform. Die meisten Ausbrüche ereignen sich in Westafrika, wohingegen es in Ost- und Zentralafrika eher selten zu

Ausbrüchen kommt. Eine Erklärung dafür könnte möglicherweise die unterschiedliche Variabilität der Genotypen sein: tatsächlich weist der westafrikanische Genotyp I eine höhere Heterogenität auf als der westafrikanische Genotyp II oder der ostafrikanische Genotyp (Mutebi et al., 2001).

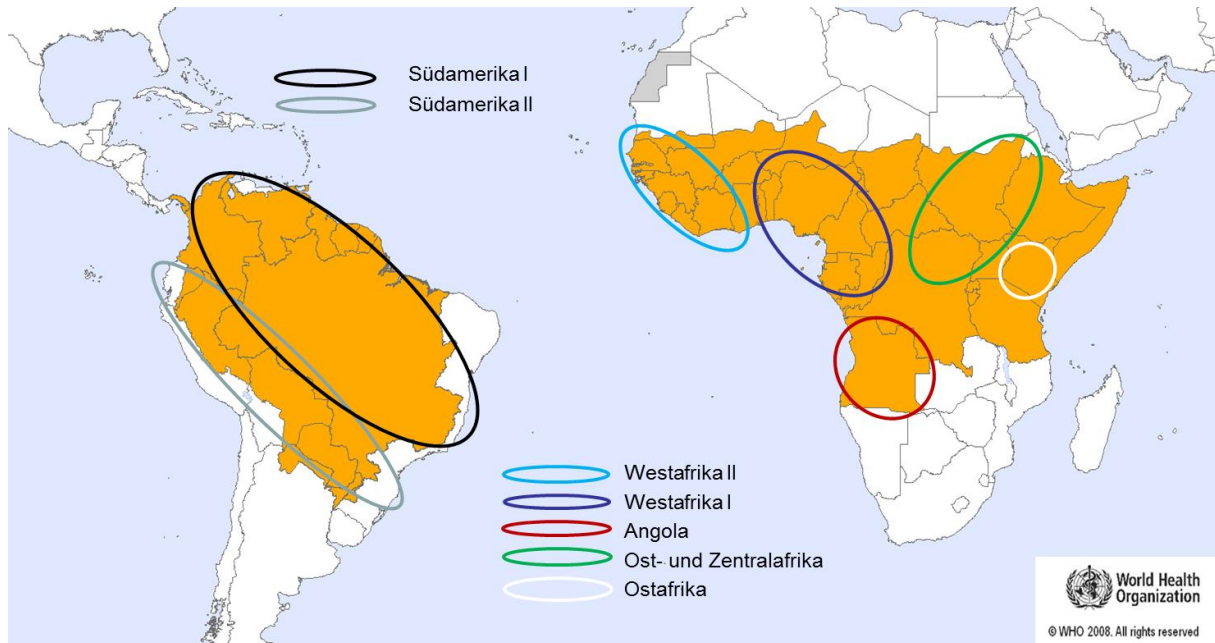


Abb. 1.15: Die Karte zeigt die weltweite Verbreitung des GFV (orange hinterlegt) sowie die geografische Verbreitung der bisher identifizierten Genotypen (verändert nach (Mutebi and Barrett, 2002)).

1.4.3 Aktuelle Situation

Trotz jahrzehntelanger, erfolgreicher Kontrollmaßnahmen wie Impfung und Vektorbekämpfung, geht man heutzutage immer noch von mehr als 200.000 GFV-Infektionen und 30.000 Todesfällen pro Jahr weltweit aus. Besonders in den letzten 30-40 Jahren konnte man einen bedeutenden Anstieg der gemeldeten Gelbfiebererkrankungen feststellen, was auf verschiedene Faktoren wie z.B. eine abnehmende Impfrate, verstärkte Migrationsbewegungen und Urbanisierung, nachlassende Vektorbekämpfung und auch ein verbessertes Meldesystem zurückzuführen ist (Barrett and Monath, 2003, Mutebi and Barrett, 2002, Robertson et al., 1996).

All diese Faktoren werden nicht nur durch biologische und ökologische Faktoren (z.B. Verhalten von Vektor und Wirt, Vektorkompetenz, klimatische Bedingungen) beeinflusst, sondern auch durch politische und sozioökonomische Faktoren (z.B. Armut, Hygienestandards, Beschaffenheit des Gesundheitssystems, politische Unruhen, religiöse Überzeugungen).

Als Reaktion auf diese Entwicklung wurde die Gelbfieberinitiative ins Leben gerufen, die von der *Global Alliance of Vaccine and Immunization* (GAVI) unterstützt wird (WHO, 2007). Diese

EINLEITUNG

Initiative hat sich zur Aufgabe gesetzt durch gezielte präventive und reaktive Massenimpfkampagnen die Gelbfiebersituation besonders in Afrika zu kontrollieren, was zusätzlich die Untersuchung von schweren Impfwischenfällen umfasst (1.3.2).

Nach wie vor haben 25% der Länder in Endemiegebieten die Gelbfieberimpfung noch nicht in ihr nationales Impfprogramm aufgenommen, und auch die flächendeckende Impfung ist weltweit mit geschätzten durchschnittlich 45-50% längst nicht ausreichend (WHO, Stand 2011) (www.who.int/topics/yellow_fever). Finanzielle und logistische Probleme sowie Limitierungen in der Impfstoffherstellung sind die Hauptgründe, die eine empfohlene Durchimpfungsrate von 80% der Bevölkerung in Endemiegebieten verhindern.

Zu vermerken ist außerdem eine Veränderung der GFV-Aktivität innerhalb Afrikas: Nachdem sich das Virus in Ostafrika über 40 Jahre lang nicht bemerkbar gemacht hat, kam es in dieser Region seit 1992 wieder zu Ausbrüchen (Ellis and Barrett, 2008, Onyango et al., 2004, Reiter et al., 1998, Sanders et al., 1998). Der aktuellste ereignete sich Ende 2012 im Sudan und verzeichnete über 170 Tote (http://www.who.int/csr/don/2012_12_06/) (Markoff, 2013).

Ein weiteres Problem, das immer mehr in den Fokus gerät, ist die weltweite Verbreitung tropischer Mückenspezies aufgrund vermehrter Reisetätigkeit und klimatischer Veränderungen. So konnte sich mittlerweile die Spezies *Aedes albopictus* im Süden Europas manifestieren und auch der Vektor für das Gelbfiebervirus, *Aedes Aegypti*, wurde bereits in Europa registriert (http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/aedes_aegypti). Diese Tatsache liefert die Grundvoraussetzung für die Einschleppung und Verbreitung tropischer Krankheiten, was z.B. mit einem Chikungunya-Ausbruch im Jahre 2007 in Norditalien oder einem Denguefieber-Ausbruch 2012 auf Madeira (Portugal) beobachtet werden konnte (Charrel et al., 2007, Gould et al., 2010, Gould and Higgs, 2009, Poletti et al., 2011, Tatem et al., 2006, 2012, Sousa et al., 2012, Tomasello and Schlagenhauf, 2013).

2. PROBLEMSTELLUNG

Die vorliegende Doktorarbeit gliedert sich in zwei Teile, wobei sich der erste Teil mit der Epidemiologie und Evolution von Gelbfiebereviren befasst (2.1) und der zweite Teil auf die Entwicklung neuer Nachweistechiken für die Anwendung in Forschung und Diagnostik abzielt (2.2).

2.1 Epidemiologische Untersuchungen von GFV-Isolaten

Dieser Teil der Arbeit dient der Aufklärung phylogenetischer Zusammenhänge verschiedener GFV-Isolate sowie der Charakterisierung ihrer biologischen Eigenschaften. Er befasst sich zum einen mit der Analyse von GFV-Impfstoffen (2.1.1) und zum anderen mit der Untersuchung afrikanischer Wildtypstämme (2.1.2).

2.1.1 Phylogenie von 17D-Impfstoffen

Auf der letzten WHO-Tagung zur Herstellung und Bewertung von GFV-Impfstoffen wurden verschiedene Aspekte der GFV-Impfstoffproduktion diskutiert (Ferguson et al., 2010). Dazu zählt die bisher nur auf historischen Daten beruhende Dokumentation der Abstammungsverhältnisse von GFV-Impfstoffen sowie die Aktualität und Notwendigkeit der bestehenden Sicherheitskriterien für die Impfstoffproduktion inklusive der derzeit vorgeschriebenen Tests im Primatenmodell (1.3.3) (WHO/BS/10.2131, (ECSB 2008)). Die Notwendigkeit für einen auf molekularbiologischen Daten beruhenden Stammbaum der GFV-Impfstoffe zur Ergänzung der historischen Informationen wurde auf diesem Treffen herausgestellt.

Im Rahmen der Impfstoffzulassung der Firma Crucell Switzerland AG (Bern, Schweiz) sollte daher in Kooperation mit dem Robert Koch-Institut das komplette Genom verschiedener Passagen des firmeneigenen GFV-Impfstoffes sequenziert und vergleichend mit dem Genom anderer GFV-Impfstoffe analysiert werden. Des Weiteren sollte ein Stammbaum erstellt werden, der auf dem Gesamtgenom aller frei verfügbaren GFV-Impfstoffsequenzen beruht und die o.g. historische Dokumentation ergänzt.

2.1.2 Charakterisierung phylogenetischer und biologischer Eigenschaften westafrikanischer GFV-Linien

Das GFV weist eine hohe genetische Stabilität und innerhalb seiner beschriebenen Genotypen eine hohe Homogenität auf (1.4.2). Eine neuere Studie, die sich mit der Evolution afrikanischer Gelbfiebervirus- und Denguevirusstämme beschäftigt, deutet jedoch auf eine höhere Variabilität in der westafrikanischen GFV-Population hin als bisher angenommen und konnte die Zirkulation sechs verschiedener GFV-Linien in Westafrika belegen (Sall et al., 2010). Diese Ergebnisse beruhen auf Sequenzanalysen des E-Proteins von 37 GFV-Isolaten aus West- und Zentralafrika.

Um diese Erkenntnisse zu bestätigen und auszuweiten, sollte das komplette Genom von ausgewählten Isolaten dieser sechs westafrikanischen GFV-Linien sequenziert und analysiert werden. Zusätzlich sollte das Genom fünf weiterer bisher uncharakterisierter GFV-Isolate sequenziert und in die Betrachtung eingeschlossen werden.

Da zu Beginn dieser Arbeit die Gesamtgenomsequenz von nur zehn GFV-Wildisolaten in internationalen Datenbanken zur Verfügung stand, sollte zusammen mit den in dieser Arbeit neugewonnenen Sequenzen ein Stammbaum, basierend auf allen verfügbaren Gesamtgenomen von Gelbfiebviren, erstellt und bewertet werden.

Ein weiteres Ziel dieses Projektes war der Vergleich der westafrikanischen GFV-Linien in Hinblick auf ihre biologischen Eigenschaften. Dazu sollten vergleichende Wachstumsanalysen der GFV-Linien in einer humanen Zelllinie und in Insektenzellen durchgeführt werden. Abschließend sollten die erhaltenen Ergebnisse mit den Sequenzdaten korreliert und analysiert werden.

2.2 Entwicklung neuer Nachweismethoden zur Untersuchung und Diagnostik von Gelbfiebviren

Um die Möglichkeiten für die Untersuchung der GFV-Pathogenese und die direkte Virusdiagnostik zu erweitern, sollten neue Nachweistechniken entwickelt und Labormethoden etabliert werden.

Am Robert Koch-Institut stand zum direkten Nachweis GFV-spezifischen Antigens bisher lediglich ein Antikörper zur Verfügung, der gegen das GFV-E-Protein gerichtet ist und dieses nur in seiner nativen Form detektiert, was eine Anwendbarkeit auf bestimmte Methoden limitiert. Kommerziell erhältliche Antikörper sind ebenfalls gegen das E-Protein bzw. gegen das Gesamtvirus gerichtet. In dieser Arbeit sollten daher neue Antikörper gegen einzelne GFV-Proteine hergestellt und mittels verschiedener Methoden hinsichtlich ihrer Funktionalität und Anwendbarkeit für Diagnostik und Forschung beurteilt werden.

Zur Verbesserung des direkten Virusnachweises bei einer akuten GFV-Infektion (1.1.4) sollte ein ELISA-Test entwickelt werden, der auch unter Feldbedingungen einsetzbar wäre. Dazu sollten erste Ergebnisse aus einer Diplomarbeit als Grundlage dienen und entsprechend der Zielsetzung weiterentwickelt werden (Litzba, 2006).

Zur Untersuchung der GFV-Pathogenese mittels *Live cell imaging*-Mikroskopie sollte durch gentechnische Modifikation ein fluoreszenzmarkiertes GFV hergestellt werden. Die Zielsetzung dieses Teilprojektes beinhaltete dabei die Identifikation einer geeigneten Methode zur Fluoreszenzmarkierung, welche die charakteristischen Eigenschaften des Virus nicht verändern und gleichzeitig für Lebendzellstudien geeignet sein sollte. Darüber hinaus sollte das Virus mit geeigneten gentechnischen Methoden konstruiert sowie auf seine Funktionalität hin untersucht werden.

3. MATERIAL

3.1 Chemikalien

3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, München
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich, München
6-Carboxy-X-Rhodamin (ROX)	Invitrogen, Karlsruhe
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose (NuSieve [®] 3:1)	Biozym, Oldendorf
Amidoschwarz	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto Adjuvans, complete (Freund)	DIFCO Laboratories (BD), Detroit, MI, USA
Bacto Adjuvans, incomplete (Freund)	DIFCO Laboratories (BD), Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Bacto Laboratories, Liverpool, UK
Bacto Hefeextrakt	Bacto Laboratories, Liverpool, UK
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Bovine Serum Albumin-Lösung (100x)	New England Biolabs [®] , Ipswich, MA, USA
Bromphenolblau (Tetrabromphenolsulfonphthalein)	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Cap Analog (m7G(5')ppp(5')G)	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Carboxymethylzellulose (CMC)	BDH Chemicals Ltd., Poole, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix)	Eppendorf, Hamburg
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Set	Fermentas, St. Leon-Rot
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid, 0,025 % i. d. Tropfflasche	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Serva, Heidelberg
GeneAmp [®] dNTPs	Carl Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
IIFT-Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
Isopropyl β -D-thiogalactosidase (IPTG)	EUROIMMUN AG, Lübeck
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	Merck, Darmstadt
	Biokanol Pharma, Rastatt

MATERIAL

Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, München
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
L(+)-Arabinose	Sigma-Aldrich, München
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchloridlösung (50 mM)	Eppendorf, Hamburg
	Invitrogen, Karlsruhe
Manganchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Dinatriumcarbonat-Decahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Polyacrylamid (PAA) (Rotiphorese® Gel 30; 37.5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Prolong® <i>Gold antifade reagent with DAPI</i>	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
	Invitrogen, Karlsruhe
Ribonukleosidtriphosphat-Mix (rNTP-Mix)	Invitrogen, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Select-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Linde, Berlin
Sucrose	Sigma-Aldrich, München
N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
tRNA	Sigma-Aldrich, München
Tryptose-Phosphat Broth	Sigma-Aldrich, München
Tween® 20	Merck, Darmstadt
Wasser (molekularbiologischer Standard)	Eppendorf, Hamburg
Zymosan A	Sigma-Aldrich, München

3.2 Geräte

Analysenwaage (BP 310 p)	Sartorius, Göttingen
Autoklaven:	
• Automat 21/2	Webeco, Bad Schwartau
• Varioklav®	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschränke:	
• für Bakterienkultur (mit Schüttler)	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
	Heraeus, Hanau
• für Zellkultur	Sanyo, Osaka, Japan
	Eppendorf, Hamburg
Elektroporator (Eppendorf 2510)	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
ELISA-Reader Infinite®200	

MATERIAL

Gefrierschränke:

- -20 °C

Bosch, Stuttgart
Liebherr, Biberach a.d. Riß
Heraeus, Hanau

- -80 °C

Geldokumentationsgerät Biovision (CN-3000.WL/LC)

PEQLAB, Erlangen

Gelelektrophoresesysteme

- ComPhor Mini/Midi
- Mini Protean® 3

Biozym, Oldendorf
Bio-Rad, München

Hamilton Spritze

Hamilton Messtechnik
GmbH, Höchst, DE

Heizplatte/Magnetrührer:

- IKA® RH basic 2
- IKA KM02

Ika Werk, Staufen
Ika Werk, Staufen

Kühlschränke

Bosch, Stuttgart
Philipp Kirsch, Offenburg

Mikroskope:

- Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200)
- Invertmikroskop Telaval 3
- EUROStarII
- Biozero

Carl Zeiss, Jena
Carl Zeiss, Jena
EUROIMMUN, Lübeck
Keyence Deutschland
GmbH, Neu-Isenburg
Carl Zeiss, Jena
Motic, Wetzlar

- PrimoVert
- AE21

Photometer (Bio-Photometer)

pH-Meter 766 Calimatic

Eppendorf, Hamburg
Knick Elektronische
Messgeräte, Berlin
Eppendorf, Hamburg
Gilson Inc., Middleton, USA
Brand, Wertheim
Agfa-Gevaert Group,
Mortsel, Belgien
Applied Biosystems,
Carlsbad, CA, USA
Biometra, Göttingen
Bio-Rad, München

Pipetten (bis 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl)

Pipettierhilfe (Accujet®)

Röntgenfilmentwicklungssystem Curix 60

Sequencer 3500xL Dx Genetic Analyzer

Spannungsgeräte

Sterilarbeitsbänke:

- antair BSK
- BioGard Hood

Kendro, Langenselbold
Baker Company,
Sanford, ME, USA
Thermo Fisher Scientific
Inc., Waltham, MA, USA
Heraeus, Hanau

- Safe 2020

- HeraSafe

Stickstoffprobenlagerungstank

Union Carbide, Houston,
TX, USA

Temperierbad

Thermoblock (Thermomixer comfort)

Recker Laborbedarf, Berlin
Eppendorf, Hamburg

Thermozykler:

- Biometra T Gradient
- Biometra T Personal
- Biometra T Professional Basic Gradient
- Stratagene MX3000P / MX3005P

UV-Tisch (Transilluminator TC-312A)

Vortex®

Westernblot-Apparatur (Fastblot B 34)

Zentrifugen:

- 1-13
- 1-15 K
- 3-K30 C
- Zentrifuge 5415R
- Heraeus Megafuge 1.0 R
- Heraeus Multifuge® 3S/3S-R
- Sigma 2K15 Kühlzentrifuge
- Tischzentrifuge Biofuge pico

Biometra, Göttingen
 Biometra, Göttingen
 Biometra, Göttingen
 Agilent Technologies, Inc.,
 Santa Clara, CA, USA
 Spectroline, Westbury, USA
 Carl Roth, Karlsruhe
 Biometra, Göttingen

Sigma Laborzentrifugen,
 Osterode am Harz
 Sigma Laborzentrifugen,
 Osterode am Harz
 Sigma Laborzentrifugen,
 Osterode am Harz
 Eppendorf, Hamburg
 Heraeus, Hanau
 Heraeus, Hanau
 B. Braun, Melsungen
 Heraeus, Hanau

3.3 Kits

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

IIFT Flaviviren-Mosaik 3

IIFT Gelbfieber-Viren

Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit

QIAamp® Viral RNA Mini Kit

QIAshredder columns

RNeasy® Mini Kit

SuperSignal® West Dura Substrat

SuperSignal® West Pico Substrat

SuperSignal® West Femto Substrat

Invisorb® Spin DNA Extraction Kit

QIAquick Gel Extraction Kit

QuantiTect Virus + ROX Vial Kit

NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents

QIAquick PCR Purification Kit

MSB Spin PCRapace

QIAGEN PCR Cloning Kit

QIAGEN Plasmid Maxi Kit

HiSpeed Plasmid Maxi Kit

Counter-Selection BAC Modification Kit

Applied Biosystems,
 Carlsbad, CA, USA
 EUROIMMUN AG, Lübeck
 EUROIMMUN AG, Lübeck
 STRATEC Molecular
 GmbH, Berlin
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Pierce, Rockford, IL, USA
 Pierce, Rockford, IL, USA
 Pierce, Rockford, USA
 STRATEC Molecular
 GmbH, Berlin
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Pierce, Rockford, IL, USA
 Qiagen, Hilden
 STRATEC Molecular
 GmbH, Berlin
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Gene Bridges GmbH,
 Heidelberg

MATERIAL

QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
TMB Peroxidase EIA Substrate Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

3.4 Enzyme und Inhibitoren

3.4.1 Restriktionsendonukleasen

<u>Enzym</u>	<u>Erkennungssequenz</u>	<u>Hersteller</u>
Nsil	5'-ATGCA [▼] T-3'	New England Biolabs®, Frankfurt/Main
NotI	5'-GC [▼] GGCCGC-3'	New England Biolabs®, Frankfurt/Main
MluI	5'-A [▼] CGCGT-3'	New England Biolabs®, Frankfurt/Main
XhoI	5'-C [▼] TCGAG-3'	New England Biolabs®, Frankfurt/Main

3.4.2 Weitere Enzyme

Platinum® Taq DNA-Polymerase (5 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
SP6 RNA Polymerase (20 U/μl)	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
SuperScript™ III Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript™ II Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase (5 U/μl)	Fermentas, St. Leon-Rot

3.4.3 Inhibitoren

RNasin® Ribonuclease-Inhibitor	Promega, Madison, WI, USA
RNase Out (RNase-Inhibitor) (40 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Halt Protease-Inhibitor-Cocktail (100X)	Promega, Mannheim Pierce, Rockford, IL, USA

3.5 Nukleinsäure- und Protein-Standards

Tabelle 3.1: Nukleinsäure- und Protein-Längenstandards für die Agarosegelelektrophorese und SDS-PAGE

	<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Nukleinsäure-Standards	TrackIt™ 100 bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
	TrackIt™ 1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
	Quick-Load® 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs®, Frankfurt/Main
	Quick-Load® 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs®, Frankfurt/Main
Protein-Standard	Prestained Protein Marker, Page Ruler	Fermentas, St. Leon-Roth

3.6 Oligonukleotide

3.6.1 Oligonukleotide für die PCR und Sequenzierung

Tabelle 3.2: GFV-spezifische Primer. Die Primer stammen zum Teil aus einer vorherigen Doktorarbeit (Bae, 2006), zum Teil wurden sie in dieser Arbeit im Rahmen der Genomsequenzierung neu designt (mit # gekennzeichnet).

GFV-Protein	Primer	Orientierung	Sequenz (5'→3')	5'-Lage (GFV-Genom)	3'-Lage (GFV-Genom)	5'-Lage (GFV-Klon)	3'-Lage (GFV-Klon)
	E-S0 #	sense	GTT CCG CGC ACA TTT CC	-	-	513	529
	Not1_hin #	sense	TGA CGT GTC GAC GCG GCC G	-	-	545	563
5'NTR	U1 s	sense	AGT AAA TCC TGT GTG CTA ATT GAG GT	1	26	809	834
C	E-S1 #	sense	GCG TCA ATA TGG TAC GAC GAG	152	172	960	980
	U1b as	antisense	TGT TTG ACA AGG AGC GAA CTC CT	172	194	980	1002
	U1c s	sense	ATG CTG GAC CCA AGA CAA GGC T	329	350	1137	1158
	U1d s	sense	AGA GAG TGG TGG CCA GTT TGA T	372	393	1180	1201
prM	E-S2 #	sense	GTA CTG GTG CCC AGA CTC AAT G	594	615	1402	1423
	U2 s	sense	AAC GTT AGA GTC GCA TAT GGT AAG T	689	713	1497	1521
M	U1 as	antisense	TTT CTT GCC GGG TCT TCA AAC CAT	777	800	1585	1608
	E-S3 #	sense	GTT GGT CCG GCC TAC TCA	955	972	1763	1780
E	E-as6 #	antisense	TGA GTA GGC CGG ACC AAC	955	972	1763	1780
	E-S4 #	sense	CAA TGC GTG CAA GCG CAC	1239	1256	2047	2064
	E-as5 #	antisense	GTG CGC TTG CAC GCA TTG	1239	1256	2047	2064
	164 s	sense	GCC AAA TTC ACT TGT GTC AAA TTC AT	1322	1347	2130	2155
	YF-Erev #	antisense	GCA ATT GTG CTC TGA TGA C	1385	1403	2193	2211
	U2 as	antisense	CTG ATA GTG CAT CAA ACT TGA GAG T	1445	1469	2253	2277
	E-S5 #	sense	GCT CCC AGG AAG TCG AGT TC	1469	1488	2277	2296
	E-as4 #	antisense	GAA CTC GAC TTC CTG GGA GC	1469	1488	2277	2296
	U3 s	sense	CCT GCC ATG GCA GAG TGG AAG T	1615	1636	2423	2444
	E-S6 #	sense	CAA CTG ACA CTG GCC ATG	1901	1918	2709	2726
	E-as3 #	antisense	CAT GGC CAG TGT CAG TTG	1901	1918	2709	2726
	E1 s	sense	TGG CAC AAA GAG GGG AGT TCA ATA GGA	2138	2164	2946	2972
	U4 s	sense	CTC CGC TGG AGG GTT CTT CAC T	2236	2257	3044	3065
	U4b s	sense	CTC CGC TGG AGG GTY CTT CAC T	2236	2257	3044	3065
	164 as	antisense	CCA ACC GAA GTG AAG AAC CCT CCA	2242	2265	3050	3073
	E-S7 #	sense	GTT TGG CTC TGC CTT TCA G	2283	2301	3091	3109
E-as2 #	antisense	CTG AAA GGC AGA GCC AAA C	2283	2301	3091	3109	
NS1	U3 as	antisense	TGT TAT CCA GTT CAA GCC GCC AAA T	2308	2332	3116	3140
	U4c s	sense	ATT TGG CGG CTT GAA CTG GAT AAC A	2308	2332	3116	3140
	YF-Efor #	sense	CAT GAT CTT GGT AGG AGT G	2401	2419	3209	3227
	E-S8 #	sense	GAG ACT CTG ATG ACT GG	2519	2535	3327	3343
	E-as1 #	antisense	CCA GTC ATC AGA GTC TC	2519	2535	3327	3343
	E2 s	sense	ATG AGA TGT GGA GAA GCA GGG CAG AT	2646	2671	3454	3479
	E2 as	antisense	ATC TGC CCT GCT TCT CCA CAT CTC AT	2646	2671	3454	3479
	U2b as	antisense	CCC GTC CCA AAC TCC TCT ATC T	2913	2934	3721	3742
	Mlu1_rück #	antisense	ATG TAC ACG CGT GTG GTG AA	2938	2957	3746	3765
	E-as0 #	antisense	CGC AGT CTA TGG TGT ATT C	2971	2989	3779	3797
76 s	sense	GGA GGC CCA GTT AGC TCT CAC AAT CAT A	3194	3221	4002	4029	
U4c as	antisense	CCT CAC TTC TAG TGG TAC CTG CAT	3257	3278	4065	4086	
E1 as	antisense	GGA CAC GCT TCT CTC CTC ACT TCT A	3270	3288	4078	4096	

MATERIAL

	U4 as	antisense	CTG GAC ACG CTT CTC TCC TCA CT	3274	3296	4082	4104
	U4b as	antisense	CCC GCT ATC CGT GGT GGA TC	3348	3367	4156	4175
	76b as	antisense	ACC ACT TCC ATT GCT ATC ATC ATG C	3543	3567	4351	4375
	3597 s	sense	ATG CTG GTT GGA GGA GTG GTG CT	3596	3618	4404	4426
	3666 as	antisense	TCA GCA AAT CAA GGA GAG TTA CCT G	3644	3665	4452	4473
	U5 s	sense	GCT GAG GTG AGA CTT GCC GCA AT	3989	4011	4797	4819
NS2a	76 as	antisense	AGT GTG AGG GCC ACC AGA GGT ATA GTC TT	4076	4104	4884	4912
	119 s	sense	TGC ATT TCT GGC AAC CCG CAT	4147	4167	4955	4975
NS2b	U5 as	antisense	GAA AGC CAG TCC TGC CAG CAC T	4225	4245	5033	5053
	FJb s	sense	AGG TTC AGT TGA TTG CTG CTG T	4857	4878	5665	5686
	U6 s	sense	CTA CCC GAG TGG CAC TTC AGG AT	4966	4988	5774	5796
	119 as	antisense	GAC ACG AAG GAG TTG TCA CCG ACA A	5043	5067	5851	5875
	5375 as	antisense	TAA GTT AGG GTG GCA TGG CAC AT	5363	5385	6171	6193
	98 s	sense	TGG ATC CAG CTA GCA TAG CCG CT	5451	5473	6259	6281
NS3	U6 as	antisense	CTG GGT ATG TCC GTT TGAACA TCT	5583	5607	6391	6415
	U3b s	sense	ACG GCA TGG TTC CTT CCA TCC AT	5657	5679	6465	6487
	U7 s	sense	GAC CAG CCG GTA TGG CTT TCG T	6203	6224	7011	7032
	98 as	antisense	CTT GGG CGC AGA GGC TTC TTT G	6345	6366	7153	7174
	100 s	sense	AAA GAA GCC TCT GCG CCC AAG G	6346	6367	7154	7175
	U7 as	antisense	CCT CCT ACC TTC AGC AAA CTT GAT	6419	6439	7227	7247
	U8 s	sense	CTT ACC GCA ATG CAC TAT CAA TGA T	6555	6579	7363	7387
	U9b s	sense	GAA TAG CCC AGT CAG CCT CAG T	7092	7113	7900	7921
NS4a	U9 s	sense	CAT AAT GCT GCT GGT CAG TGG CT	7165	7187	7973	7995
	100 as	antisense	GGT AAA ATG AGA GAC CAG TGG AGC ATG GC	7232	7260	8040	8068
	U8 as	antisense	GTA AAA TGA GAG ACC AGT GGA GCA T	7235	7259	8043	8067
NS4b	U9c s	sense	TGG CTG AAG GCA TTG TCC TAG CAT	7464	7487	8272	8295
	U9b as	antisense	AGA TTC AGT TCC CTC TTC CAG ACT	7666	7689	8474	8497
	U10 s	sense	TTT ACT CTT GGA AGA GAC GGC CAT	7943	7966	8751	8774
	U9 as	antisense	GTT TTG TCC TTG AAG GTG ATG ATG T	8001	8025	8809	8833
	U9c as	antisense	TGT GAC GCA TGA CGA TGA TGA CT	8082	8104	8890	8912
	150 s	sense	CCC GCA GCA ATG TCA CAT TTA CTG T	8310	8334	9118	9142
	U10 as	antisense	GGT CCC TTG TCT GTC TCA ACA CT	8429	8451	9237	9259
	U11 s	sense	GTG TCG GAC TTG TGT GTA CAA CAT GAT	8977	9003	9785	9811
NS5	150 as	antisense	CAT CCG CGT AGA ATC CAC CAC C	9218	9239	10026	10047
	U14s #	sense	GAATGGCAGAAGCAGAGATG	9504	9523	10312	10331
	U14as #	antisense	CATCTCTGCTTCTGCCATTC	9504	9523	10312	10331
	176 s	sense	ATT GTG GTG CCT TGC CGA GAA CA	9818	9840	10626	10648
	U11 as	antisense	CAC ATG TTG GCA TAG GCC TTG CT	9911	9933	10719	10741
	U12 s	sense	XAC CAA CAA CCC ACA CAT GCA GGA	10102	10125	10910	10933
	U13s #	sense	GACCTGCAACCGGGTGAGCTTATC	10328	10351	11136	11159
	U13as #	antisense	GATAAGCTCACCCGGTTGCAGGTC	10328	10351	11136	11159
	U12b s	sense	CTC CAC ACA TTG AGA CAG AAG AAG T	10511	10535	11319	11343
	U15s #	sense	CTGGTTTCTGGGACCTCCAC	10625	10645	11433	11453
3'NTR	U15as #	antisense	GTGGGAGTCCCAGAAACCAG	10625	10645	11433	11453
	176 as	antisense	CCT GGC GTC AAT ATG GTC CCA CT	10743	10765	11551	11573
	U12 as	antisense	GGT TTT GTG TTT GTC ATC CAA AGG T	10835	10859	11643	11667

MATERIAL

Tabelle 3.3: Universelle Flavivirus-Primer

Name	Orientierung	Sequenz (5'→3')	GFV-Protein	Referenz
Unifor	sense	TGG GGN AAY SRN TGY GGN YTN TTY GG	E	(Gaunt and Gould, 2005)
Unirev	antisense	CCN CCH RNN GAN CCR AAR TCC CA	E	
flaviNS3x1	sense	YIR TIG GIY TIT AYG GIW WYG G	NS3	(Crochu et al., 2004)
flaviNS3x2	antisense	RTT IGC ICC CAT YTC ISH DAT RTC IG	NS3	
FU1PM	sense	TAC AAC ATG ATG GGV AAR AGW GAR AA	NS5	(Kuno et al., 1998)
FD3PM	antisense	ARC ATG TCT TCY GTB GTC ATC CA	NS5	
EMF1	sense	TGG ATG ACG ACG GAA GAC ATG	NS5	(Pierre et al., 1994)
VD8	antisense	GGG TCT CCT CTA ACC TCT AGT	3'-NTR	

Tabelle 3.4: Sonstige Primer

Name	Orientierung	Sequenz (5'→3')	Zielsequenz	Hersteller
Flash-for	sense	TGT TGT CCC GGG TGT TGT	TC-Tag	Invitrogen, Karlsruhe
Flash-back	antisense	ACA ACA CCC GGG ACA ACA	TC-Tag	Invitrogen, Karlsruhe
Random Primer	-	-	-	Invitrogen, Karlsruhe

3.6.2 Oligonukleotide für die RT-PCR

Tabelle 3.5: Primer und Sonde für die Gelbfieber-spezifische Real-Time PCR

Name	Orientierung	Sequenz (5'→3')	GFV-Protein	Referenz
YFV FP	sense	ATT GAG GTG CAT TGG TCT GC	5'-NTR	(Weidmann et al., 2010)
YFV RP	antisense	GTC RGT TCT CTG CTA ATC GCT CA	5'-NTR	
YFV LNA2	Sonde	AGTTGCTARGCA+AT+A+A+A	5'-NTR	

RNA-Standard zur Quantifizierung (in Kopien/μl, verdünnt in H₂O mit tRNA (1:100))

(Dr. Weidmann, Abteilung Virologie, Universitätsmedizin Göttingen)

3.6.3 Oligonukleotide zur Insertion des TC-Tags in das GFV-Genom

Tabelle 3.6: Primer für die Mutagenese mittels rekombinanter PCR

Name	Orientierung	Sequenz (5'→3')
I1-for	sense	TGT TGT CCC GGG TGT TGT ATT GAT AGA CCT G
I1-rev	antisense	ACA ACA CCC GGG ACA ACA GGC TAC TGT CTC T
I2-for	sense	TGT TGT CCC GGG TGT TGT GCC CAG GAC TTG ACC C
I2-rev	antisense	ACA ACA CCC GGG ACA ACA CCA CTG TCT GTC CAC
I3-for	sense	TGT TGT CCC GGG TGT TGT CAG TAT GTC ATC AG
I3-rev	antisense	ACA ACA CCC GGG ACA ACA AAT TTT GGT CTG AT

Tabelle 3.7: Primer zur Herstellung der rpsL-neo-Kassette für die Mutagenese mittels homologer Rekombination

Name	Orientierung	Sequenz (5'→3')
Insert1-Upperoligo	sense	TTATGGCCCCCTGACAAGCCTTCATTGGACATCTCACTAGAGACAGTAGCCG GCCTGGTGTATGATGGCGGGATCG
Insert1-Loweroligo	antisense	GTGAGAAGTGCATTGTAACACACTTTCCTCACCTCAGCAGGTCTATCAATTC AGAAGAAGTCTGCAAGAAGGCG

MATERIAL

Tabelle 3.8: Primer für die Mutagenese mittels seitengerichteter Mutagenese

Name	Orientierung	Sequenz (5'→3')
C1-1.Hälfte-for	sense	GGAAACAGACCTTGTTGTCCCGGACCTTCAAGAG
C1-1.Hälfte-back	antisense	CTCTTGAAGGTCCGGGACAACAAGGTCTGTTTCC
C1-2.Hälfte-for	sense	CCTTGTGTGCCCGGTGTTGTGGACCTTCAAGAG
C1-2.Hälfte-back	antisense	CTCTTGAAGGTCCACAACACCCGGGACAACAAGG
C2-1.Hälfte-for	sense	GTGGAAAATGCTGTGTTGTCCCGACCCAAGACAAG
C2-1.Hälfte-back	antisense	CTTGTCTTGGGTCGGGACAACACAGCATTTCAC
C2-2.Hälfte-for	sense	GCTGTGTTGTCCCGGTGTTGTGACCCAAGACAAG
C2-2.Hälfte-back	antisense	CTTGTCTTGGGTCACAACACCCGGGACAACACAGC
Insert2_vorwärts-1.Hälfte	sense	GGACAGACAGTGGTGTGTTGTCCCGCCAGGACTTGACC
Insert2_rückwärts-1.Hälfte	antisense	GGTCAAGTCCTGGGCGGGACAACACCACTGTCTGTCC
Insert2_vorwärts-2.Hälfte	sense	CAGTGGTGTGTTGTCCCGGTGTTGTGCCAGGACTTGACC
Insert2_rückwärts-2.Hälfte	antisense	GGTCAAGTCCTGGGCACAACACCCGGGACAACCACTG
Insert3_vorwärts-1.Hälfte	sense	GATCAGACCAAAATTTGTTGTCCCCAGTATGTCATCAGAGC
Insert3_rückwärts-1.Hälfte	antisense	GCTCTGATGACATACTGGGACAACAATTTTGGTCTGATC
Insert3_vorwärts-2.Hälfte	sense	GACCAAAATTTGTTGTCCCGGTGTTGTGATGATGTCATC
Insert3_rückwärts-2.Hälfte	antisense	GATGACATACTGACAACACCCGGGACAACAATTTTGGTC
Insert1_vorwärts-1.Hälfte	sense	GAGACAGTAGCCTGTTGTCCATTGATAGACCTGC
Insert1_rückwärts-1.Hälfte	antisense	GCAGGTCTATCAATGGGACAACAGGCTACTGTCTC
Insert1_vorwärts-2.Hälfte	sense	GCCTGTTGTCCCGGTGTTGTATTGATAGACCTGC
Insert1_rückwärts-2.Hälfte	antisense	GCAGGTCTATCAATAACAACACCCGGGACAACAGGC

3.7 Vektoren

3.7.1 Vektor pACNR-FLYF-17D (GFV-Volllängeklon)

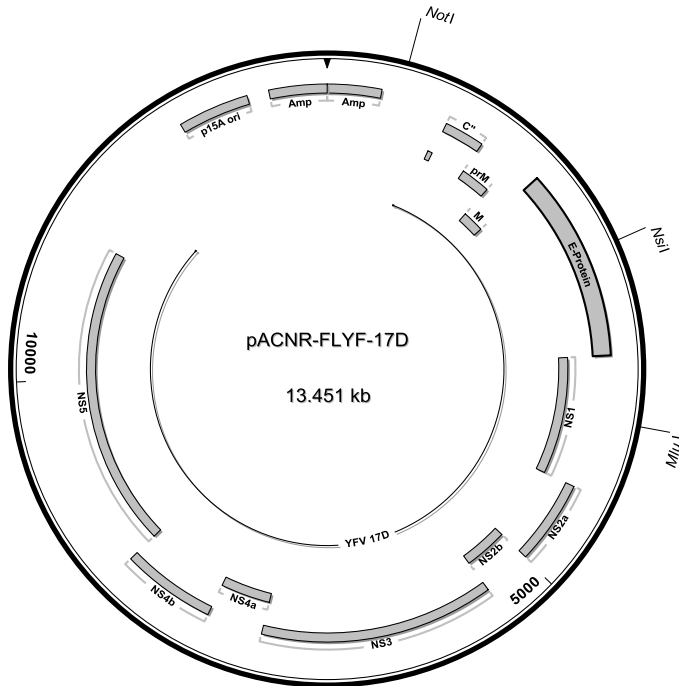


Abb. 3.1: Der Vektor pACNR-FLYF-17D (GFV-17D im Vektor pACNR1181, Dr. Beate Kümmerer, BNI Hamburg) enthält das gesamte GFV-Genom, das unter der Kontrolle eines SP6-Promotors steht (Bredenbeek et al., 2003). Für die Selektion enthält der Vektor zusätzlich das Gen für eine Ampicillinresistenz. Die Schnittstellen für die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen NotI, NsiI und MluI sind angegeben.

3.7.2 pDrive Cloning Vector (Qiagen)

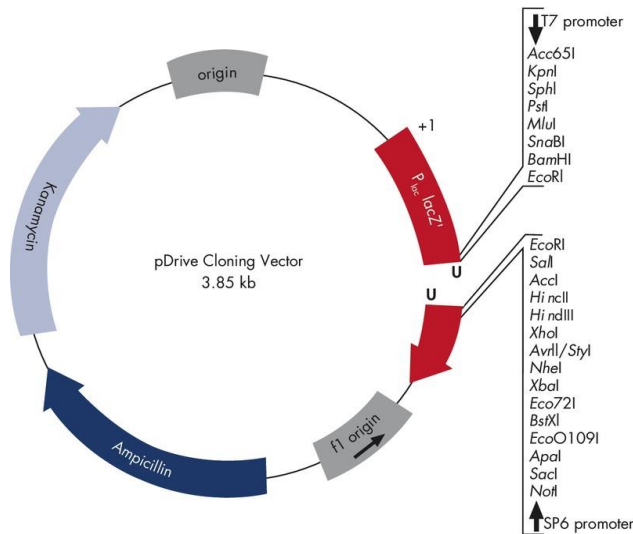


Abb. 3.2: Der pDrive Cloning Vector ist Bestandteil des in dieser Arbeit verwendeten QIAGEN PCR Cloning Kits (Qiagen, Hilden) und enthält neben einer *multiple cloning site* die Gene für eine Ampicillin- und eine Kanamycinresistenz sowie das LacZ-Gen welches die Selektion mittels Blau-Weiß-Screening ermöglicht.

3.7.3 Klonierungsvektoren pMK-RQ/pMA (Geneart)

Für die Konservierung synthetisch hergestellter DNA-Bereiche wurden diese von der Firma Geneart in die Vektoren pMK-RQ bzw. pMA kloniert, die neben einer *multiple cloning site* die Gene für eine Kanamycin- bzw. Ampicillinresistenz tragen.

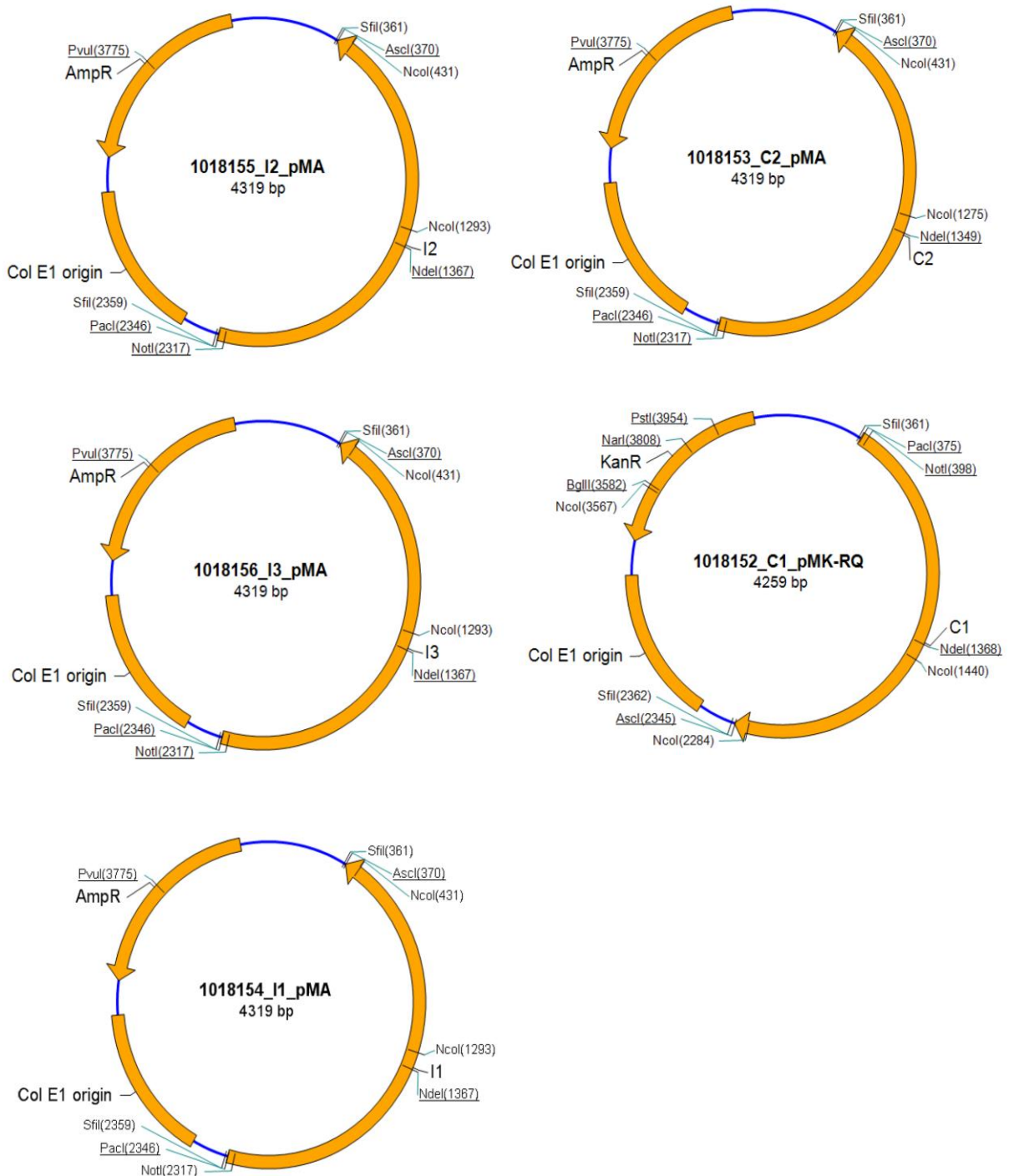


Abb. 3.3: Klonierungsvektoren pMK-RQ und pMA der Firma Geneart mit den synthetisch hergestellten DNA-Fragmenten zur Herstellung der GFV-Konstrukte 17D-E-I1, 17D-E-I2, 17D-E-I3, 17D-C1 und 17D-C2 (5.2.4).

3.8 Antikörper und Peptide

Tabelle 3.9: Monoklonale Erstantikörper

Name	Zielprotein	Spezifikation	Konzentration	Kopplung	Quelle/Referenz
MAK 6330	GFV-E	monoklonaler Maus-Antikörper	1,2 mg/ml	-	(Gelderblom et al., 1985)
HRP-MAK 6330	GFV-E	monoklonaler Maus-Antikörper	1,2 mg/ml	HRP	

Tabelle 3.10: Polyklonale Kaninchen-Antiseren. Die Antiseren wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und getestet.

Name	Zielprotein	Spezifikation	Konzentration	Kopplung	Quelle/Referenz
Anti-GFV-NS1	GFV-NS1	Kaninchenserum	-	-	-
Anti-GFV-E	GFV-E	Kaninchenserum	-	-	-
Anti-GFV-C	GFV-C	Kaninchenserum	-	-	-
Anti-GFV-NS1 IgG	GFV-NS1	Kaninchen-IgG	1,85 mg/ml	-	Eurogentec, Belgien
Anti-GFV-NS1 IgG-HRP	GFV-NS1	Kaninchen-IgG	0,16 mg/ml	HRP	Eurogentec, Belgien
Anti-GFV-NS1 IgG-Biotin	GFV-NS1	Kaninchen-IgG	1,33 mg/ml	Biotin	Eurogentec, Belgien

Tabelle 3.11: Sekundärantikörper

Name	Ziel	Spezifikation	Kopplung	Quelle/Referenz
goat-anti-mouse FITC	Maus-IgG	polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper	FITC	Dianova
goat-anti-rabbit FITC	Kaninchen-IgG	polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen Antikörper	FITC	Dianova
goat-anti-mouse HRP	Maus-IgG	polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper	HRP	Pierce
goat-anti-rabbit HRP	Kaninchen-IgG	polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen Antikörper	HRP	Pierce
goat-anti-mouse poly-HRP	Maus-IgG	polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper	poly-HRP	Pierce
goat-anti-rabbit poly-HRP	Kaninchen-IgG	polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen Antikörper	poly-HRP	Pierce
Streptavidin-HRP	Biotin	Streptavidin-HRP	HRP	Sigma-Aldrich

Tabelle 3.12: Immunisierungspeptide. Die Peptide zur Immunisierung von Kaninchen wurden von der Firma Eurogentec synthetisiert und an das Carrierprotein *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) gebunden.

Zielprotein	Sequenz	Konzentration
GFV-NS1	C-KQK TKQ IGN RPG PSR	0,94 mg/ml
GFV-E	AMR VTK DTN DNN LYK-C	0,73 mg/ml
GFV-C	QDP KNV YQR GTH PFS-C	0,94 mg/ml

3.9 Bakterienstämme

E. coli MC 1061

ATCC #53338

Genotyp: F- hsdR2 hsdM+ hsdS+ mcrA mcrB1 araD139 Δ(ara-leu)7696 Δ(lacIPOZY)X74 galE15 galU galK16 rpsL thi lambda-

Invitrogen Top10

Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

3.10 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

Luria Bertani (LB)-Flüssigmedium	10 g/l Bacto Trypton 5 g/l Bacto Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,5 (mit NaOH einstellen)
LB-Platten	LB-Medium + 15 g/l Select-Agar
S.O.C-Medium	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 3.13: Antibiotika mit der jeweiligen verwendeten Endkonzentration und Hersteller

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml	Sigma-Aldrich, München
Streptomycin	50 µg/ml	Sigma-Aldrich, München
Chloramphenicol	15 µg/ml	Sigma-Aldrich, München
Kanamycin	15 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	3 µg/ml	Sigma-Aldrich, München

3.11 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 3.14: Eukaryotische Zelllinien. Alle Zelllinien wurden aus der RKI-Stammsammlung erhalten.

Zelllinie	Ursprung	ATCC- Referenz *
Vero E6	Affennierenzellen	CRL-1586
PS-Zellen	Schweinenierenzellen	-
HepG2	Humanes Leberzellkarzinom	-
Ap61	Insektenzellen (<i>Aedes pseudocutellaris</i>)	-

* ATCC = American Type Culture Collection

3.12 Medien und Zusätze für die Zellkultur

D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Leibovitz-Medium (L 15)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Opti-Mem® I Reduced Serum-Medium	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Carboxymethylzellulose-Medium (CMC)	L15-Medium + 1,6% CMC
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Trypsin/EDTA-Lösung	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
L-Glutamin	PAA Laboratories, Linz, Österreich

MATERIAL

Penicillin/Streptomycin-Mix	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Fungizone® Amphotericin B	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Tryptosephosphat-Lösung	2,95 g Tryptose Phosphat Broth 100 ml PBS sterilfiltrieren

3.13 Viren

3.13.1 Gelbfiebertviren

Gelbfiebertvirus 17D	RKI-Impfstamm Charge 354/1
Gelbfiebertvirus 17D	17D RKI #142/94/1
RKI YFV Vaccine	Lot # J131-031A
Bezeichnung: Stamm 17D-204, Substamm 112/95, Passage 238 (Lot Nr.:Ch.B.189/00/1) (CruceCell Switzerland AG)	
Flavimun WSL (Working Seed Lot)	Lot # J131-031B
Bezeichnung: Stamm 17D-204, Substamm 112/95, Passage 237 (CruceCell Switzerland AG)	
TVX Flavimun (Impfstoff)	Lot # J131-031C
Bezeichnung: Stamm 17D-204, Substamm 112/95, Passage 238 (Lot Nr.: 3001552) (CruceCell Switzerland AG)	
Stamaril® Gelbfieber-Lebendimpfstoff (Sanofi Pasteur MSD GmbH)	Ch.-B.: Z6329-2
Gelbfiebertvirus Asibi (Ghana, 1927)	RKI-Stammsammlung

Tabelle 3.15: Westafrikanische Gelbfiebertviren, die in dieser Arbeit sequenziert und analysiert wurden (bereitgestellt vom Institut Pasteur de Dakar, Senegal)

Isolat Nr.	Accession Nr.	Isolat	Isoliert aus	Jahr	Ort	Linie
333	JX898871	ArD 114896	Ae. aegypti *	1995	Koungheul, Sn	3
335	JX898872	ArD 114972	Ae. aegypti *	1995	Koungheul, Sn	3
357	JX898876	ArD 156468	Ae. furcifer	2001	Kedougou, Sn	4
351	JX898875	ArD 149815	Ae. furcifer	2000	Kedougou, Sn	5
345	JX898873	ArD 149214	Ae. furcifer	2000	Kedougou, Sn	5
350	JX898874	ArD 149194	Ae. taylori	2000	Kedougou, Sn	5
258	JX898868	HD 117294	Human	1995	Koungheul, Sn	6
314	JX898870	ArD 121040	Ae. furcifer	1996	Kedougou, Sn	6
307	JX898869	DakArAmt7	Ae. africanus	1973	Côte d'Ivoire	1
6857	JX898877	ArD 181464	Ae. furcifer	2005	Kedougou, Sn	4
6858	JX898878	ArD 181250	Ae. furcifer	2005	Kedougou, Sn	4
6865	JX898879	ArD 181676	Ae. taylori	2005	Kedougou, Sn	4
6866	JX898880	ArD 181564	Ae. luteocephalus	2005	Kedougou, Sn	4
6867	JX898881	ArD 181439	Ae. luteocephalus	2005	Kedougou, Sn	4

* isoliert aus männlichen oder frisch geschlüpften Moskitos

3.13.2 Weitere inaktivierte Viren

Folgende Viren stammten aus der Stammsammlung des Robert Koch-Instituts und wurden in inaktiver Form verwendet. Die Inaktivierung erfolgte durch Hitzebehandlung und/oder Gammabestrahlung.

- Gelbfieberevirus 17D Bulk3 (GFV 17D Bulk3)
- Gelbfieberevirus Ivory Coast (GFV Ivory Coast)
- Gelbfieberevirus Brazil (GFV Brazil)
- West-Nil-Virus France (WNV France)
- West-Nil-Virus Kunjin (WNV Kunjin)
- Japanisches Enzephalitis-Virus (JEV)
- Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME)
- Venezolanisches Equines Enzephalitis-Virus (VEEV)
- Denguevirus Serotypen 1-4 (Den 1-4)

3.14 Sequenzen

Folgende Sequenzen aus der Sequenzdatenbank GenBank wurden für diese Arbeit verwendet. Sequenzen, die als Teil dieser Arbeit neu sequenziert und in der Datenbank erstmalig veröffentlicht wurden, sind mit einem * gekennzeichnet.

Tabelle 3.16: Sequenzen aus der Sequenzdatenbank GenBank, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die mit einem ^a markierten Sequenzen wurden für die PeptidAuswahl im Ergebnisteil 5.2.1.1 verwendet, die mit * gekennzeichneten Sequenzen wurden innerhalb dieser Arbeit sequenziert.

	Accession number	Virus
GFV-Impfstämme	FJ654700.1	Yellow fever virus 17D/Tiantan
	U21055.1	YFU21055 Yellow fever virus French neurotropic strain ^a
	GQ379163.1	Yellow fever virus strain case #2 (17DD YEL-AVD Peru)
	GQ379162.1	Yellow fever virus strain case #1 (17DD YEL-AVD Peru)
	U17067.1	YFU17067 Yellow fever virus vaccine strain 17D-213
	U17066.1	YFU17066 Yellow fever virus vaccine strain 17DD ^a
	DQ118157.1	Yellow fever virus isolate YF-AVD2791-93F/04 from Spain ^a
	NC_002031.1	Yellow fever virus (NCBI Reference, YFV-17D-204, USA) ^a
	DQ100292.1	Yellow fever virus strain 17DD-Brazil ^a
	X03700.1	Yellow fever virus complete genome, (YFV-17D-204_1 (USA)) ^a
	X15062.1	Yellow fever virus genomic RNA (YFV-17D-204_2 (Pasteur)) ^a
	JN628279 *	RKI YFV vaccine
	JN628280 *	Flavimun WSL (working seed lot)
	JN628281 *	TVX Flavimun vaccine
GFV-Wildtypstämme	AY640589.1	Yellow fever virus strain ASIBI ^a
	AY603338.1	Yellow fever virus strain Ivory Coast 1999 ^a
	AY572535.1	Yellow fever virus strain Gambia 2001 ^a
	U21056.1	YFU21056 Yellow fever virus French viscerotropic strain ^a
	AF094612.1	Yellow fever virus strain Trinidad 79A isolate 788379 ^a
	U54798.1	YFU54798 Yellow fever virus strain 85-82H Ivory Coast ^a
	DQ235229.1	Yellow fever virus strain Couma ^a
	AY968065.1	Yellow fever virus strain Uganda48a ^a
	AY968064.1	Yellow fever virus strain Angola71 ^a

MATERIAL

	JN620362	Yellow fever virus strain Uganda 2010
	JX898871 *	Yellow fever virus strain ArD 114896
	JX898872 *	Yellow fever virus strain ArD 114972
	JX898876 *	Yellow fever virus strain ArD 156468
	JX898875 *	Yellow fever virus strain ArD 149815
	JX898873 *	Yellow fever virus strain ArD 149214
	JX898874 *	Yellow fever virus strain ArD 149194
	JX898868 *	Yellow fever virus strain HD 117294
	JX898870 *	Yellow fever virus strain ArD 121040
	JX898869 *	Yellow fever virus strain DakArAmt7
	JX898877 *	Yellow fever virus strain ArD 181464
	JX898878 *	Yellow fever virus strain ArD 181250
	JX898879 *	Yellow fever virus strain ArD 181676
	JX898880 *	Yellow fever virus strain ArD 181564
	JX898881 *	Yellow fever virus strain ArD 181439
Weitere Flaviviren	NC_001477	Dengue virus 1 ^a
	NC_001474	Dengue virus 2 ^a
	NC_001475	Dengue virus 3 ^a
	NC_008719	Sepik virus strain
	NC_001672	Tick-borne encephalitis virus (FSME-Virus) ^a
	NC_007580	St.Louis encephalitis virus ^a
	NC_001437	Japanese encephalitis virus ^a
	NC_001563	West Nile virus ^a

3.15 Puffer und Lösungen

DNA-Probenpuffer (6x)	6 ml Glycerin + 40 mg Bromphenolblau gelöst in 5 ml TBE (1x)
DNA-Probenpuffer (6x)	New England Biolabs [®] , Frankfurt/Main
First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Naphthalin-Schwarz	1 g Amidoschwarz 13,6 g Natriumacetat 60 ml Eisessig auf 1 l H ₂ O auffüllen
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Puffer für Restriktionsenzyme	New England Biolabs [®] , Frankfurt/Main
Ligasepuffer (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot
TBE-Puffer (5x)	Eppendorf, Hamburg
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl 2 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄

MATERIAL

TFB-I-Puffer	30 mM KAc 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 15% Glyzerin pH 5,8 (mit Essigsäure einstellen) steril filtrieren
TFB-II-Puffer	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15% Glyzerin pH 7,0 (mit KOH einstellen) steril filtrieren
SDS-Probenpuffer (4x) (mit oder ohne β-Mercapthoethanol)	50 mM Tris; pH 6.8 40% Glyzerin 8% β-Mercaptoethanol 4 g/l Bromphenolblau 80 g/l SDS
SDS-Laufpuffer (5x)	15 g/l Tris 72 g/l Glyzin 5 g/l SDS
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 150 mM Glyzin 10% Methanol
0,1 M Carbonatpuffer, pH 9,8 (ELISA)	5,6 g Natriumhydrogen- carbonat 9,53 g Dinatriumcarbonat- Decahydrat auf 1 l H ₂ O auffüllen
IIFT-Probenpuffer	EUROIMMUN AG, Lübeck

3.16 Software

3.16.1 Lizenzierte Software

Adobe® Photoshop® CS3 Extended Version 10	Adobe Systems Inc., München
Lasergene® SeqMan Pro Software (Version 8.1.5)	DNASTAR Inc., Madison, WI, USA
MS Office	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
MxPro 4.10 QPCR Software	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
Prism 5 für Windows	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA

SDS 1.9.1 (ABI Prism® Sequence Detector)	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Geneious Pro™ Version 5.3.4	Biomatters LTD, Auckland, Neuseeland
Endnote X5	Thomson Reuters, Carlsbad, CA, USA
Adobe Acrobat Reader	Adobe Systems GmbH, München

3.16.2 Frei verfügbare Onlinesoftware

jModelTest 0.1	http://darwin.uvigo.es/software/jmodeltest.html
MrBayes 3.1.2	http://mrbayes.sourceforge.net/
Tracer v1.5	http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/
Seaview 4.2.12	http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html
Figtree v1.3.1	http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/

3.17 Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Blutabnahmezubehör:

- Serum-Röhrchen CAT 6 ml Becton Dickinson GmbH,
Heidelberg
- Flügelkanülen Becton Dickinson GmbH,
Heidelberg
- Adapter Becton Dickinson GmbH,
Heidelberg

Deckgläser für OT

Waldemar Knittel
Glasbearbeitung,
Braunschweig
EUROIMMUN, Lübeck

Elektroporationsküvetten (1 mm)	Invitrogen, Karlsruhe
Einwegküvetten	Eppendorf, Hamburg
Einwegküvetten (UV durchlässig)	Eppendorf, Hamburg
Einwegspritzen	B. Braun, Melsungen
ELISA Maxisorb 96-well	Nunc, Wiesbaden
Entwicklerkassetten	Appligene, Heidelberg
Färbeküvette	Carl Roth, Karlsruhe
Glaswaren (Kolben, Flaschen etc.)	Schott Glas, Mainz
IIFT-Auftragsschablone	EUROIMMUN, Lübeck
Kryo-Einfriergerät	Nunc, Wiesbaden
Kryogefäße (1,8 ml mit Innengewinde)	Nunc, Wiesbaden
Lochplatten (6er, 12er, 24er, 48er, 96er)	Nunc, Wiesbaden

Membranen:

- Westran® PVDF (0,2 µm/0,45 µm) Schleicher & Schuell,
Dassel
- Nitrocellulose (0,2 µm/0,45 µm) Schleicher & Schuell,
Dassel

MATERIAL

Neubauer-Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
Parafilm	American National Can, Greenwich, CT, USA
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen mit Aerosolschutz (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Biozym, Oldenburg Eppendorf, Hamburg Molecular Bioproducts
Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Platten: 96er; 0,2 mL (für TaqMan [®] -PCR) Deckel für TaqMan [®] -Platten (8er-Streifen)	Abgene, Epsom, UK Abgene, Epsom, UK
PCR-Reaktionsgefäße: • 0,2 ml; 0,5 ml	Biozym, Oldendorf Eppendorf, Hamburg Nunc, Wiesbaden Biozym, Oldenburg
• 0,2 ml; 8er-Streifen	
Pinzetten (diverse)	Carl Roth, Karlsruhe
Polystyrol-Gefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Quadripermschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße: • 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml • 15 ml; 50 ml	Eppendorf, Hamburg Nunc, Wiesbaden VWR International
Röntgenfilm BioMax MR	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilm CL-XPosure TM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Seropipetten (1 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml, 50 ml)	Nunc, Wiesbaden
Skalpelle	B. Braun Aesculap, Tuttlingen
Spatel (diverse)	Carl Roth, Karlsruhe
Sterilfilter (0,22 und 0,45 µm)	Carl Roth, Karlsruhe
Tiefkühlbox mit Aluminium-Block	Nunc, Wiesbaden
Whatman Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen mit/ohne Filterdeckel (25 cm ² ; 75 cm ² ; 175 cm ²)	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CH

4. METHODEN

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Reverse Transkription

Damit RNA für gängige molekularbiologische Methoden einsetzbar wird, muss sie in der Regel zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu werden DNA-Primer eingesetzt, die entweder spezifisch oder unspezifisch an die RNA binden. Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (auch reverse Transkriptase) kann an diesen Primern ansetzen und entlang des RNA-Stranges einen komplementären DNA-Strang erzeugen. Dieser kann anschließend als Template für weitere PCR-Techniken verwendet werden.

Für die cDNA-Synthese wurden die reversen Transkriptasen SuperScript™ II oder III (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Vor der reversen Transkription wurden die Komponenten aus Reaktionsansatz 1 (Tabelle 4.1) für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend kurz auf Eis gestellt. Dieser Schritt dient dazu, in der RNA vorhandene Sekundärstrukturen aufzuschmelzen und ein korrektes Anlagern der Primer zu gewährleisten. Anschließend wurden die Komponenten des zweiten Reaktionsansatzes (Tabelle 4.2) hinzugegeben, und die Transkription erfolgte für 50 min bei 50°C. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase sowie zur Trennung der Hybridstränge wurde der Ansatz für 15 min auf 70°C erhitzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

Tabelle 4.1 Reaktionsansatz 1 der reversen Transkription

Reagenz	Volumen
random Primer (3 µg/µl)	1 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
virale RNA	10 µl
Aqua bidest.	1 µl

Tabelle 4.2 Reaktionsansatz 2 der reversen Transkription

Reagenz	Volumen
First Strand Buffer (5x)	4 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
Reverse Transkriptase (SuperScript II oder III, 200 U/µl)	1 µl
RNase-Inhibitor (RNase Out / RNasin, 40 U/µl)	1 µl

4.1.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)-basierte Techniken

Die PCR wird verwendet, um bestimmte DNA-Bereiche spezifisch zu vervielfältigen. Dabei rahmen zwei sequenzspezifische Primer die zu amplifizierende Zielsequenz ein, so dass eine DNA-abhängige DNA-Polymerase an diese binden und die dazwischen liegende Sequenz amplifizieren kann. Durch eine zyklische Wiederholung der dabei ablaufenden

Schritte (Trennung der DNA-Doppelstränge, Bindung der Primer an die DNA-Einzelstränge und Vervollständigung der DNA-Doppelstränge durch die Polymerase) kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Bereichs.

4.1.2.1 Standard-PCR

Für eine standardmäßige Amplifikation von DNA-Sequenzen wurden die benötigten Reagenzien entsprechend dem Reaktionsansatz in Tabelle 4.3 zusammengegeben. Als DNA-abhängige DNA-Polymerase wurde entweder die Polymerase Amplitaq[®] von Applied Biosystems oder die Platinum[®] Taq-Polymerase von Invitrogen verwendet.

Die genauen Mengen der einzelnen Komponenten variierten je nach Größe und Art des eingesetzten Templates und wurden jeweils an die erforderlichen Bedingungen des Assays angepasst. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem programmierbaren Heizblock nach dem in Tabelle 4.3 beschriebenen Temperaturprofil. Auch hier waren die Zeit- und Temperaturbereiche der einzelnen Zyklusparameter abhängig von der jeweiligen Größe und Beschaffenheit des DNA-Templates.

Tabelle 4.3 Reaktionsansatz und Temperaturprofil für die Standard-PCR

Reagenz	Volumen [µl]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Puffer [10x]	2,0	94	5	40-45
MgCl ₂ [50 mM]	0,6 - 1,2	94	0,5-1	
dNTP [10 mM]	0,4 - 2,0	51-65	0,5-1	
Polymerase	0,2	72	1 min/1 kb DNA	
Primer <i>sense</i> [10 µM]	0,4 - 2,0	72	3-10	
Primer <i>antisense</i> [10 µM]	0,4 - 2,0	4	∞	
Template-DNA	1,0 - 2,0			
Aqua bidest.	ad 20 µl			

4.1.2.2 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR bietet die Möglichkeit, Bakterienklone nach einer Transformation direkt von der Agarplatte mittels PCR auf das Vorhandensein eines gewünschten Plasmides oder DNA-Abschnittes zu testen. Dazu wird je eine Einzelkolonie in 50 µl Wasser gelöst, wovon anschließend 10 µl in 100 µl LB-Medium überimpft und für eine eventuelle spätere Anzucht bei 4°C aufbewahrt werden. Der Rest wird für je 5 min bei -80°C und direkt im Anschluss bei 100°C inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Um die Nukleinsäuren im Überstand anzureichern, werden größere Zellbestandteile für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Von dem Überstand werden daraufhin 5 µl in die PCR eingesetzt (4.1.2.1).

4.1.2.3 Real-time PCR (RT-PCR)

Die Real-time PCR ermöglicht neben der Amplifikation von bestimmten DNA-Bereichen auch eine Quantifizierung der entstandenen spezifischen PCR-Produkte in Echtzeit. Dazu wird zusätzlich eine Sonde eingesetzt, die zwischen den beiden Primern bindet und an einem

Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff und an dem anderen mit einem so genannten Quencher gekoppelt ist. Ist die Sonde intakt, unterdrückt der Quencher, bedingt durch die räumliche Nähe zum Fluoreszenzfarbstoff, das Lichtsignal des Fluoreszenzmarkers (FRET-Prinzip). Binden jedoch Sonde und Primer an ein passendes Template, so führt die Amplifikation des DNA-Stranges aufgrund der Exonukleaseaktivität der Polymerase zur Zerstörung der Sonde. Quencher und Fluoreszenzfarbstoff entfernen sich voneinander und das dabei frei werdende Lichtsignal kann in einem entsprechenden Real-time-Gerät gemessen werden. Durch die parallele Verwendung einer Standardreihe kann man in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des ersten messbaren Lichtsignals zusätzlich auf die ursprünglich in der Probe enthaltene DNA-Menge rückschließen und diese Methode so für eine quantitative Diagnostik verwenden.

Die beschriebene Methode verlangt den Einsatz von DNA-Templates, so dass für den Nachweis viraler RNA zunächst eine cDNA-Synthese durchgeführt werden muss (4.1.1). Viele kommerziell erwerblichen Kits enthalten jedoch bereits reverse Transkriptasen, so dass durch einen zusätzlich programmierten Syntheseschritt beide Reaktionen (reverse Transkription und PCR) als OneStep Real-time PCR ablaufen können.

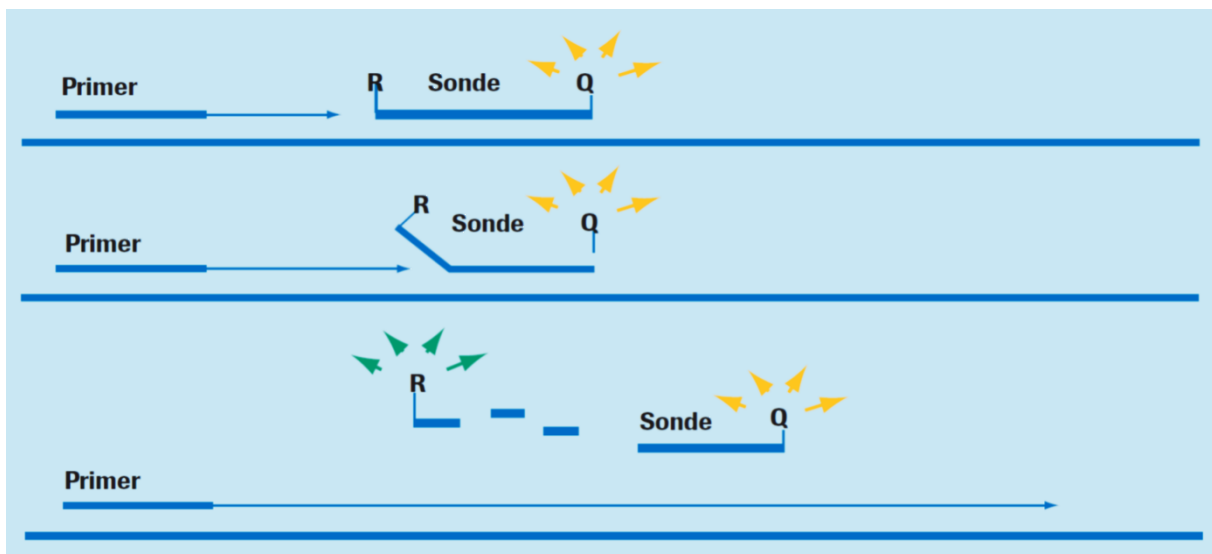


Abb. 4.1 Prinzip der Real-time PCR. Bei Bindung eines spezifischen Primers und einer Sonde an ein DNA-Template wird die Sonde durch die Synthese des neuen DNA-Stranges zerstört. Dabei werden Fluoreszenzmarker und Quencher voneinander getrennt, wodurch es zur Freisetzung eines Lichtsignals kommt. (Quelle: http://www. Roche.com/pages/facetten/pcr_d.pdf)

In dieser Arbeit wurde für den Nachweis viraler RNA ein etablierter OneStep Real-time PCR-Assay verwendet, der einen Bereich im 5'-NTR des GFV-Genoms nachweist (Weidmann et al., 2010). Hierfür wurde das QuantiTect Virus-Kit von Qiagen verwendet und wie in Tabelle 4.4 beschrieben angewandt. Für die Quantifizierung wurde eine RNA-Standardreihe verwendet (3.6.2).

METHODEN

Tabelle 4.4 OneStep RT-PCR zum Nachweis des GFV 5'-NTRs nach Weidmann et al. unter Verwendung des QuantiTect Virus Kits von Qiagen

Reagenz	Volumen [μ l]	Temperatur	Zeit	Zyklen
5x QuantiTect Virus NR MasterMix	5	50°C	30 min	1
100x QuantiTect Virus RT Mix	0,25	95°C	15 min	1
50x Rox	0,5	94°C	15 sec	45
Aqua bidest.	13,75	60°C	60 sec	
Primer YFV FP [10 μ M]	1,25			
Primer YFV RP [10 μ M]	1,25			
Sonde YFV LNA2 [10 μ M]	0,5			
RNA	2,5			
Total	25			

4.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten sowie zur Mengenabschätzung und Reinheitskontrolle von PCR-Produkten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. In dieser Arbeit wurden 1%ige Agarosegele (w/v) in 1x TBE-Puffer verwendet, die zur Färbung der DNA mit einer 0,025%igen Ethidiumbromidlösung entsprechend der Herstellerangaben versetzt wurden. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben entsprechend dem Volumen mit 6x DNA-Probenpuffer versehen. Als Marker wurde je nach zu erwartender Bandengröße ein passender Größenstandard verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80-120 Volt, und die Banden wurden anschließend in einem digitalen Geldokumentationsgerät der Fa. PEQLAB analysiert.

4.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das Invisorb[®] Spin DNA Extraction Kit der Firma STRATEC Molecular GmbH oder das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte in 25-50 μ l H₂O (bidest.), die Lagerung bei +4 oder -20°C.

4.1.5 Reinigung von DNA-Fragmenten aus enzymhaltigen Ansätzen

Um DNA-Fragmente nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau von noch vorhandenen Enzymen oder Nukleotiden zu befreien und das Puffermilieu zu optimieren, müssen sie vor der weiteren Verwendung aufgereinigt werden. Hierzu wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder das MSB[®] Spin PCRapace Kit (STRATEC Molecular GmbH) laut Herstellerangaben verwendet. Die Elution erfolgte in 25-50 μ l H₂O (bidest.) und die Lagerung bei +4 oder -20°C.

4.1.6 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Zur Bestimmung der Basenabfolge einer Nukleinsäure wurde eine Sequenzierreaktion auf der Grundlage der Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977). Die Reagenzien wurden aus dem BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems verwendet, und die zu sequenzierenden DNA-Proben wurden gemäß dem Protokoll in Tabelle 4.5 mit einem geeigneten Primer amplifiziert. Die Auftrennung der Amplifikate zur Bestimmung der Sequenz wurde von der RKI-internen Sequenzierabteilung auf einem 3500 xL Dx Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Die gewonnenen Sequenzen wurden mittels der Lasergene[®] SeqMan Pro Software (Version 8.1.5) der Firma DNASTAR Inc. ausgewertet.

Tabelle 4.5 Reaktionsansatz für die DNA-Sequenzierung nach Sanger

Reagenz	Volumen	Temperatur	Zeit	Zyklen
Big Dye [®] Reaktionsmix	2,0 µl	96°C	2 min	25
BigDye [®] Puffer [5x]	1,0 µl	96°C	10 sec	
Primer [10 µM]	0,5 µl	56°C	05 sec	
DNA	10-20 ng	60°C	4 min	
Aqua bidest.	ad 10 µl	4°C	∞	

Für die Sequenzierung der kompletten Virusgenome wurde ein Set von GFV-spezifischen Primern verwendet (3.6.1). Mit diesen wurden, ausgehend von zuvor generierter viraler cDNA (4.1.1), sich überlappende PCR-Produkte hergestellt (4.1.2.1), die anschließend jeweils in mindestens zwei verschiedenen Ansätzen sequenziert wurden. So sollte eine möglichst hohe Sequenzabdeckung für die Bestimmung der korrekten Basenabfolge erzielt werden.

4.1.7 Restriktionsverdau von DNA

Für Klonierungen, Linearisierungen von Vektoren sowie zur Ligationskontrolle von Plasmid-DNA ist es nötig, doppelsträngige DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen zu schneiden. Für jedes Enzym werden vom Hersteller unterschiedliche Restriktionspuffer mit den jeweils optimalen Bedingungen empfohlen. Daher ist bei gleichzeitigem Schneiden mit zwei unterschiedlichen Enzymen auf die richtige Wahl eines für beide Endonukleasen optimalen Restriktionspuffers zu achten. Die Zusammensetzung des Restriktionsansatzes unterscheidet sich in analytischen Ansätzen, in denen die DNA-Fragmente anschließend nicht weiter verwendet werden (z.B. zur Ligationskontrolle), von quantitativen Ansätzen, in denen die geschnittenen Fragmente anschließend aufgereinigt und weiter verarbeitet werden (z.B. für eine Klonierung). Beide Ansätze sind in Tabelle 4.6 dargestellt.

METHODEN

Tabelle 4.6 Reaktionsansätze für einen analytischen und einen quantitativen Restriktionsverdau

Reagenz	Analytischer Ansatz	Quantitativer Ansatz
Puffer (10 x; NEB)	1,0 µl	5,0 µl
ggf. BSA (100 x)	0,1 µl	0,5 µl
DNA	x (~ 0,2 µg)	x (1-10 µg)
Enzym (~2 U)	0,2 – 0,5 µl	2,0 µl
Aqua bidest.	ad 10,0 µl	ad 50,0 µl

Der Restriktionsansatz wurde für 1-2 h bei 37°C inkubiert und für quantitative Ansätze anschließend durch eine PCR-Purifikation (4.1.5) oder Gelextraktion (4.1.4) gereinigt. Die Kontrolle erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (4.1.3).

4.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase

Zur Verknüpfung linearer DNA-Fragmente (z.B. für eine Klonierung) wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet, welche die kovalente Verknüpfung von 3'-Hydroxylgruppen mit freien 5'-Phosphatgruppen zu Phosphodiesterbindungen katalysiert. Voraussetzung für die Katalyse ist, dass die beiden zu verknüpfenden Fragmente mit demselben Enzym geschnitten wurden und somit kompatible Enden in der korrekten Orientierung besitzen. Dabei kann es sich sowohl um überhängende als auch um glatte Enden handeln.

Die DNA-Konzentration der zu ligierenden DNA-Fragmente (i.d.R. ein geschnittener Vektor und ein entsprechendes Insert) wurde entweder mittels Agarosegelelektrophorese (4.1.3) oder durch photometrische Analyse (4.1.10) bestimmt. Um eine hohe Ligationseffizienz zu erzielen, wurden der Vektor und das zu klonierenden DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:5 bis 1:10 (Vektor:Insert) in den Reaktionsansatz (Tabelle 4.7) eingesetzt. Die Effizienz der Verknüpfungsreaktion wurde durch ein kleines Reaktionsvolumen gefördert. Die Ligrationsreaktion wurde über Nacht auf Eis inkubiert, so dass eine langsame Temperaturerhöhung stattfinden konnte und im Laufe der Zeit alle Temperaturen bis zur Raumtemperatur durchlaufen wurden. Als Religationskontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert mitgeführt. Für die anschließende Transformation (4.6.6) in kompetente Bakterien wurde der gesamte Ligrationsansatz verwendet.

Tabelle 4.7 Reaktionsansatz für die Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase

Reagenz	Volumen [µl]
T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	1-2
Ligasepuffer (10x)	1-2
Insert	X
Vektor	X
Aqua bidest.	ad 10-20

4.1.9 Klonierung von PCR-Produkten in den pDrive Cloning Vector

Die Klonierung von PCR-Produkten in den pDrive Cloning Vector (Qiagen) (3.7.2) bietet eine einfache Möglichkeit, lineare DNA-Fragmente zu konservieren oder zu amplifizieren. Das Prinzip beruht dabei auf der Tatsache, dass PCR-Produkte nach einer Amplifikation mit einer Taq-Polymerase an ihrem 3'-Ende einen Poly-A-Überhang aufweisen. Der pDrive Cloning Vector liegt in linearisierter Form vor und enthält an seinen 3'-Enden einen dazu komplementären Poly-U-Überhang, was zu einer unspezifischen Verknüpfung der beiden DNA-Fragmente führt und eine hohe Ligationseffizienz gewährleistet. Das Qiagen PCR Cloning Kit wurde in dieser Arbeit verwendet, um den Teil des GFV-Genoms, der für die Proteine E, C und PrM kodiert, in einem kleineren Plasmid für die seitengerichtete Mutagenese erreichbar zu machen (4.1.12.4). Dabei wurde nach den Herstellerangaben verfahren. Nach erfolgter Klonierung wurden die Plasmide in den Bakterienstamm *E.coli* Top10 transformiert (4.6.6).

4.1.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung wurde diese je nach erwarteter Konzentration mit Wasser in einem Volumen von 50 µl verdünnt und UV-spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einer UV-Einwegküvette und einem Eppendorf Bio-Photometer gegen einen Leerwert (Aqua bidest.) gemessen. Die Konzentration der Probe ergibt sich dabei nach folgender Formel:

$$c[\mu\text{g} / \text{mL}] = A_{260\text{nm}} * 50\mu\text{g} / \text{mL} * \text{Verdünnung}$$

Formel 4.1 Berechnung der Konzentration einer wässrigen, Nukleinsäure-haltigen Lösung aus der Absorption bei 260 nm, beruhend auf dem Prinzip des Lambert-Beerschen Gesetzes. $A_{260\text{nm}}$ entspricht der gemessenen Absorption, der Faktor „Verdünnung“ berücksichtigt die Verdünnung vor der Messung. Diese Formel gilt für doppelsträngige DNA. Für einzelsträngige DNA ist anstatt 50 µg/ml ein Faktor von 33 µg/ml einzusetzen, für RNA 40 µg/ml.

Die Reinheit der Lösung in Bezug auf Proteinverunreinigungen wird über den Quotienten A_{260}/A_{280} ausgedrückt. Ein Wert von 1,7-2,0 spiegelt dabei nahezu reine DNA wider. Für RNA liegt der Wert bei 1,9-2,1.

4.1.11 *In vitro* Transkription viraler RNA

Als Transkription bezeichnet man die Synthese von RNA ausgehend von einem DNA-Strang. In dieser Arbeit wurde diese Methode dazu verwendet, das auf dem Plasmid pACNR-FLYF-17D (GFV-Volllängeklon) kodierte GFV-Genom (3.7.1) in virale RNA umzuschreiben und diese als Grundlage für die Produktion infektiöser Viruspartikel zu benutzen (Bredenbeek et al., 2003).

METHODEN

Dazu wurde der GFV-Volllängeklon zunächst mit dem Restriktionsenzym XhoI linearisiert (4.1.7) und aufgereinigt (4.1.5), bevor er für die *in vitro* Transkription eingesetzt werden konnte. Unmittelbar vor dem kodierenden Bereich des GFV-Genoms trägt das Plasmid einen Promotor für die SP6-RNA-Polymerase, welche in der Transkriptionsreaktion die RNA-Synthese katalysiert. Des Weiteren versieht sie das 5'-Ende der neu synthetisierten RNA mit einer Cap-Struktur, die für eine spätere Translation des Genoms essenziell ist. Der Reaktionsansatz für die *in vitro* Transkription ist in Tabelle 4.8 dargestellt. Die Reaktion lief für 1 h bei 40°C. Nach der Transkription wurde die Konzentration der erhaltenen RNA photometrisch bestimmt (4.1.10).

Tabelle 4.8 Reaktionsansatz für die *in vitro* Transkription viraler RNA

Reagenz	Volumen [μ l]
Transkriptionspuffer (10x, Ambion)	5,00
rNTP-Mix (2,5 mM)	10,00
DTT (10 mM)	5,00
CAP (m7G(5')ppp(5')G) (10 mM)	1,25
RNAse Out (40 U/ μ l)	0,25
SP6-Polymerase	0,25
linearisiertes Plasmid	20,00
Aqua bidest.	8,25
Total	50

4.1.12 Herstellung fluoreszenzmarkierter Gelbfiebertviren

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedenste Techniken für die gezielte Fluoreszenzmarkierung von Proteinen entwickelt, die eine mikroskopische Untersuchung der Proteinstruktur und -funktionalität ermöglichen. Eine der bekanntesten Techniken ist die Markierung mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) (Tsien, 1998), welches durch gentechnische Manipulation an ein gewünschtes Zielprotein angehängt werden kann. Für die Markierung kleiner Viren hat diese Methode jedoch den Nachteil, dass das GFP – bedingt durch seine Größe von 27 kDa - mit großer Wahrscheinlichkeit die Funktionalität viraler Eigenschaften einschränkt. Diese oder ähnliche Probleme sind für andere Methoden ebenfalls zu vermuten. Für die Fluoreszenzmarkierung von Gelbfiebertviren wurde daher in dieser Arbeit die FIAsh (*Fluorescein Arsenical Hairpin binder*)-Technologie verwendet (Griffin et al., 1998), die im Folgenden dargestellt wird.

4.1.12.1 Die FIAsh-Technologie

Die FIAsh-Methode ist eine relativ neue Technik, die für die spezifische Fluoreszenzmarkierung von Proteinen zur mikroskopischen Untersuchung in lebenden Zellen verwendet werden kann (Griffin et al., 1998, Hoffmann and Lohse, 2006). Im Gegensatz zu einer Markierung mit GFP beruht diese Methode auf einem Zweikomponentensystem, das aus einem 6 Aminosäuren kurzen Peptid und einem

METHODEN

arsenhaltigen Färbereagenz besteht. Das Peptid wird dabei gentechnisch in den für das zu untersuchende Protein kodierenden DNA-Bereich eingefügt und besteht aus der Tetracystein-Sequenz CCPGCC (TC-Tag). Das Färbereagenz ist ein lösliches, nicht fluoreszierendes Molekül, welches in zwei verschiedenen Emissionsspektren erhältlich ist (FIAsH-EDT₂ und ReAsH-EDT₂) und eine spezifische Bindung mit dem TC-Tag eingeht. Erst durch diese Bindung kommt es zu einem Fluoreszenzsignal (Abb. 4.2).

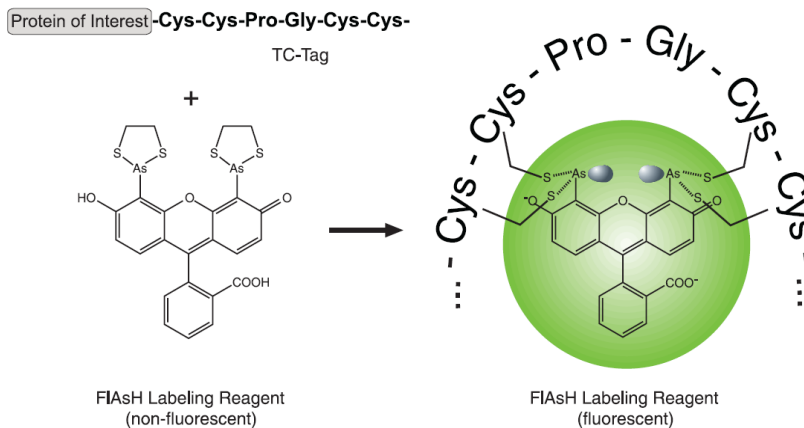


Abb. 4.2 Prinzip der Fluoreszenzfärbung durch die FIASH-Methode. Der in das Zielprotein integrierte TC-Tag (CCPGCC) geht eine spezifische Bindung mit einem löslichen, nicht fluoreszierenden Molekül ein (FIAsH-EDT₂, ReAsH-EDT₂). Erst durch diese Interaktion kommt es zur Entstehung eines Lichtsignals. (Quelle: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp34561.pdf>)

Ein großer Vorteil dieser Methode hinsichtlich der Zielsetzung dieser Arbeit (2.2) ist die geringe Größe sowohl des TC-Tags als auch des FIASH-Moleküls (Fluorophor) (Abb. 4.3). Dies erhöht die Chance, die Funktionalität des Virus auch nach erfolgter Markierung zu erhalten. Darüber hinaus ist der Fluorophor membrangängig und kann somit zur Färbung intrazellulär vorliegender Proteine in lebenden Zellen verwendet werden. Durch die Verfügbarkeit des Fluorophors ReAsH-EDT₂ lässt sich zudem eine Färbung für die Elektronenmikroskopie erzielen, was die Versuchsmöglichkeiten zusätzlich erweitert (Hoffmann and Lohse, 2006).

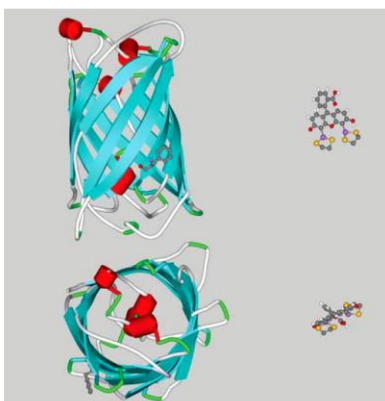


Abb. 4.3 Größenvergleich des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) (links, Größe: 236 AS, Masse: 27 kDa) mit dem FIASH-Molekül (rechts, Größe des Bindungsmotivs: 6 AS, Masse: 0,7 kDa) in Seitenansicht (oben) und Draufsicht (unten) (Hoffmann and Lohse, 2006).

In dieser Arbeit wurde die FIAsh-Methode gewählt um die GFV-Proteine E und C für die Untersuchung der viralen Replikation in lebenden Zellen zu markieren. So sollte die Möglichkeit geschaffen werden, verschiedene Schritte des Replikationszyklus nachzuvollziehen.

Basierend auf Proteinstrukturanalysen verschiedener Flaviviren wurden fünf verschiedene Stellen im GFV-Genom für die Insertion des TC-Tags ausgewählt (5.2.4). Für die Insertion sollte das Genom des GFV-Volllängeklons (3.7.1) gentechnisch verändert werden. Hierzu wurden die molekularbiologischen Methoden rekombinante PCR, homologe Rekombination und seitengerichtete Mutagenese (4.1.12.2, 4.1.12.3, 4.1.12.4) getestet.

4.1.12.2 Rekombinante PCR

Die rekombinante PCR ist eine PCR-Technik aus zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen, die zur Modifikation von DNA-Fragmenten durch Insertion, Deletion oder Substitution bestimmter Genombereiche eingesetzt wird (Higuchi et al., 1988). In dieser Arbeit wurde sie dazu benutzt, den TC-Tag an ausgewählten Stellen des GFV-E-Proteins einzufügen (5.2.4).

Während der ersten PCR-Reaktion wird das Fremdepitop in einen ausgewählten Genomabschnitt eingefügt. Dazu werden vier Oligonukleotide eingesetzt, von denen zwei komplementär zu den Enden des zu amplifizierenden Fragments sind (externe Primer) und zwei weitere zu der Stelle, an der das Epitop eingefügt werden soll (interne Primer) (Abb. 4.4). Diese internen Primer besitzen zusätzlich einen Überhang, der dem gewünschten Fremdepitop entspricht und zunächst nicht mit der Matrize hybridisiert. Nach Ablauf mehrerer PCR-Zyklen entstehen zwei unterschiedliche PCR-Fragmente, die beide mit dem eingefügten Epitop enden und daher an dieser Stelle komplementär zueinander sind.

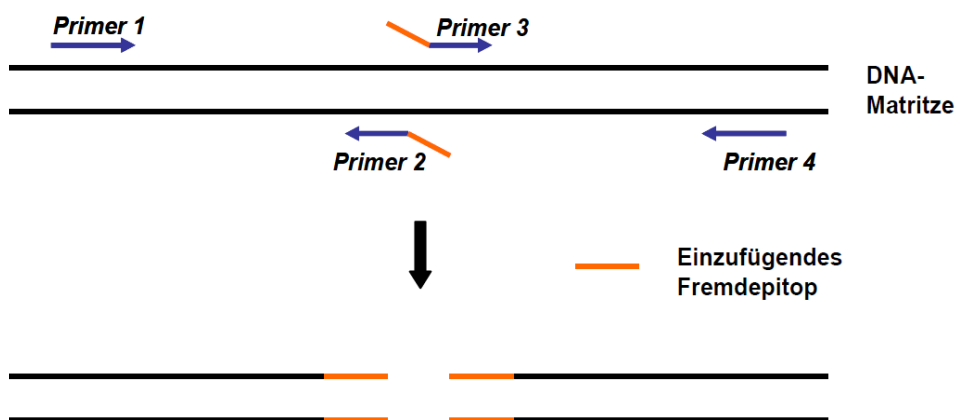


Abb. 4.4 Erste PCR-Reaktion der rekombinanten PCR zum Einfügen von Fremdepitopen. Durch die Verwendung interner Primer, die einen Sequenzüberhang entsprechend der Sequenz des Fremdepitops besitzen, entstehen zwei PCR-Produkte, die durch das inserierte Epitop an ihren Enden komplementär zueinander sind.

Diese Tatsache ist die Grundlage für die zweite PCR-Reaktion, in der nur noch die externen Primer eingesetzt und die beiden DNA-Fragmente zusammengefügt und amplifiziert werden. Das Resultat ist das ursprüngliche Gen-Fragment mit eingefügtem Fremddepitop (Abb. 4.5).

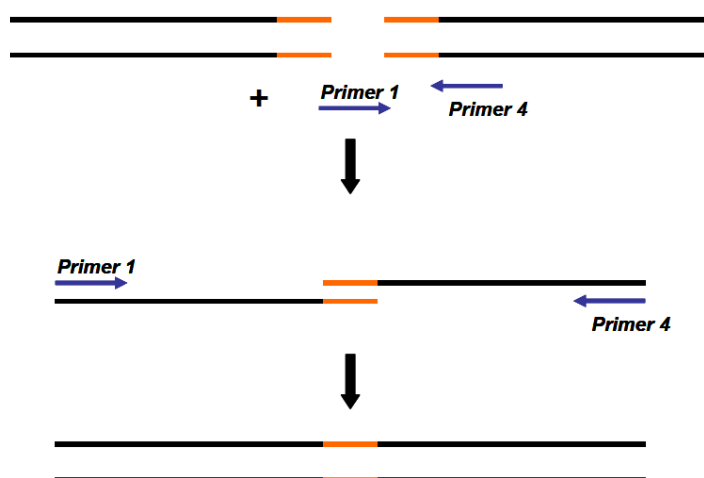


Abb. 4.5 Zweite PCR-Reaktion der rekombinanten PCR. Durch den Einsatz der beiden zuvor generierten DNA-Fragmente und der beiden externen Primer erfolgt im zweiten Schritt der rekombinanten PCR die Hybridisierungs- und Auffüllreaktion, an dessen Ende das ursprüngliche DNA-Fragment mit dem inserierten Fremddepitop entsteht.

4.1.12.2.1 Erste PCR-Reaktion: Einfügen des TC-Tags in das GFV-Genom

Als Template für die Insertion des TC-Tags in das GFV-Genom wurde der GFV-Volllängeklon (3.7.1) verwendet. Um eine spätere Klonierung des modifizierten Genomabschnittes sicher zu stellen, wurden die äußeren Primer so gewählt, dass die Einzelschnittstellen NotI, NsiI und MluI in den amplifizierten DNA-Fragmenten enthalten sind und so ein Genomfragment von 3236 bp amplifiziert wurde (externe Primer: Not1_hin und Mlu1_rück (3.6.1)). Die jeweiligen Sequenzen der internen Primer für die Insertion des TC-Tags zur Herstellung der modifizierten Viren 17D-E-I1, 17D-E-I2 und 17D-E-I3 sind unter 3.6.3 (Tabelle 3.6) aufgelistet.

Zur Herstellung der beiden DNA-Fragmente eines Konstrukts wurden zwei unabhängige PCR-Ansätze bereitet, wobei jeder je einen externen und den entsprechenden internen Primer enthält. Die Zusammensetzung eines einfachen Reaktionsansatzes ist in Tabelle 4.9 dargestellt.

Tabelle 4.9 Einfacher Reaktionsansatz der ersten PCR-Reaktion zum Einfügen des TC-Tags in das GFV-Genom.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration	Temperatur	Zeit	Zyklen
GFV-Volllängeklon	1-15 µl	0,75 µg	94°C	3 min	35x
dNTP-Mix	2 µl	200 µM	94°C	30 sec	
Taq-Polymerase	1 µl	5U/100 µl	55°C	30 sec	
10x PCR-Puffer	10 µl	1x	72°C	1 min/kb	
MgCl ₂	12 µl	7,5 mM	72°C	10 min	
Externer Primer (10 pmol)	3 µl	1 µM	4°C	∞	
Interner Primer (10 pmol)	3 µl	1 µM			
Aqua bidest.	ad 100 µl				

METHODEN

Nach Ablauf der Reaktion wurden die PCR-Fragmente durch PCR-Aufreinigung (4.1.5) bzw. Gelextraktion (4.1.4) gereinigt und mittels Agarosegelelektrophorese (4.1.3) auf Größe und Reinheit überprüft.

4.1.12.2 Zweite PCR-Reaktion: Hybridisierungs- und Auffüllreaktion

Diese Reaktion diente dem Zusammenfügen und der Vervielfältigung der beiden Teilfragmente eines Konstrukts, die in der ersten PCR-Reaktion hergestellt wurden. Als Primer dienten in diesem Schritt nur noch die externen Primer (Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10 Reaktionsansatz der zweiten PCR-Reaktion der rekombinanten PCR.

Reagenz	Volumen	Endkonzentration	Temperatur	Zeit	Zyklen
PCR-Fragment 1	5 µl		94°C	5 min	35x
PCR-Fragment 2	5 µl		94°C	30 sec	
Externer Primer 1 (10 pmol)	3 µl	1 µM	55°C	1 min	
Externer Primer 2 (10 pmol)	3 µl	1 µM	72°C	1 min 30 sec - 3 min	
dNTP-Mix	2 µl	200 µM	72°C	10 min	
Taq-Polymerase	2 µl	10U/100 µl	4°C	∞	
10x PCR-Puffer	10 µl	1x			
MgCl ₂	12 µl	7,5 mM			
Aqua bidest.	58 µl				
Total	100 µl				

Im Anschluss an diese Reaktion wurden die fertigen PCR-Produkte erneut aufgereinigt (4.1.5; 4.1.4) und auf einem Agarosegel (4.1.3) auf Menge und Reinheit überprüft. Für die Umklonierung in den GFV-Volllängeklon (3.7.1) wurde sowohl das fertige PCR-Fragment als auch der Volllängeklon mit den Restriktionsenzymen NsiI bzw. MluI und NotI geschnitten (4.1.7) und die gewünschten Fragmente erneut aufgereinigt (4.1.5). Anschließend wurden beide Fragmente ligiert (4.1.8) und in kompetente *E.coli*-Zellen des Stammes MC1061 transformiert (4.6.6). War die Transformation erfolgreich, wurden die gewachsenen Bakterienkolonien in einer Übernachtskultur angereichert und die GFV-Plasmide isoliert (4.6.3). Durch PCR und Sequenzierung des modifizierten Genombereiches wurden die GFV-Konstrukte auf die Anwesenheit des eingefügten TC-Tags überprüft (4.1.2.1 und 4.1.6).

4.1.12.3 Homologe Rekombination

Die homologe Rekombination ist ein essenzieller zellulärer Prozess zum physikalischen Austausch von DNA-Sequenzen zwischen zwei Genombereichen, der durch Enzyme katalysiert wird. Natürlicherweise ist dieser Prozess ein zellulärer DNA-Reparaturmechanismus. In der Gentechnik wird er jedoch dazu benutzt, gezielt Mutationen in einen gewünschten DNA-Bereich einzufügen.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass jeder beliebige Genomabschnitt unabhängig von seiner Größe und dem Vorhandensein von Restriktionsschnittstellen durch diese Technik verändert werden kann.

METHODEN

In dieser Arbeit wurde für das Einfügen des TC-Tags in das GFV-Genom die homologe Rekombination mittels Red/ET-Rekombination gewählt. Dazu wurde das Counter-Selection BAC Modification Kit der Firma Gene Bridges GmbH gewählt, welches u.a. für das Einfügen von nicht selektionierbaren DNA-Molekülen in ein Genom entwickelt wurde.

Das zugrunde liegende Prinzip ist das des Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismus: Liegt in einer Zelle ein lineares DNA-Fragment vor bzw. weist das Genom an einer Stelle einen Doppelstrangbruch auf, wird dieser von einer speziellen Exonuklease (RecE bzw. Red α) erkannt, die daraufhin einen der beiden DNA-Stränge verdaut und somit einen Einzelstrangüberhang produziert (Abb. 4.6). Dieser Einzelstrang wird wiederum von einem so genannten *single strand binding protein* (RecT bzw. Red β) erkannt und ummantelt. Im nächsten Schritt wird in der Zelle nach DNA-Sequenzen gesucht, die zu dem komplexierten Einzelstrang homolog sind. Ist die Suche erfolgreich, wandert der Einzelstrang in diesen Bereich ein, paart sich mit seiner komplementären Sequenz und kann durch die Nutzung der Fremdsequenz wieder repliziert werden (Abb. 4.6).

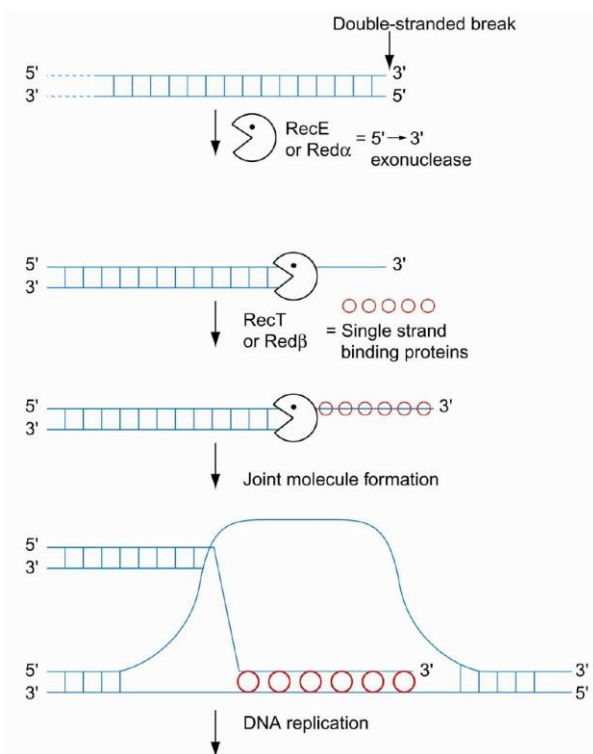


Abb. 4.6 Prinzip des Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismus. Ein Doppelstrangbruch wird in der Zelle von einer speziellen Exonuklease erkannt und partiell so verdaut, dass ein Einzelstrangüberhang entsteht. Dieser wird durch das *single strand binding protein* komplexiert und hybridisiert mit homologen DNA-Bereichen in der Zelle (*joint molecule formation*), so dass daraufhin wieder eine normale DNA-Replikation stattfinden kann. (Quelle: Handbuch des Counter-Selection BAC Modification Kit, Gene Bridges GmbH)

Eine Voraussetzung für das Einfügen nicht selektionierbarer DNA-Fragmente mit der hier gewählten Methode ist, dass das zu verändernde Genom bzw. Plasmid in einem *E.coli*-Stamm vorliegt, der eine natürliche Resistenz zu Streptomycin aufweist.

METHODEN

Durch Elektroporation wird in einem ersten Schritt ein zusätzliches Plasmid in die Zellen transformiert (pRed/ET), das neben einer Tetracyclinresistenz die Gene für die beiden Red/ET-Rekombinationsproteine enthält (Abb. 4.7, Step 1). Das Expressionsplasmid ist temperatursensitiv und benötigt für die Dauer der gentechnischen Veränderung ein Bakterienwachstum bei 30°C. Die Gene der Rekombinationsproteine unterliegen einem induzierbaren Promotor und werden durch die Zugabe von L-Arabinose und einen kurzzeitigen Temperaturwechsel zu 37°C exprimiert.

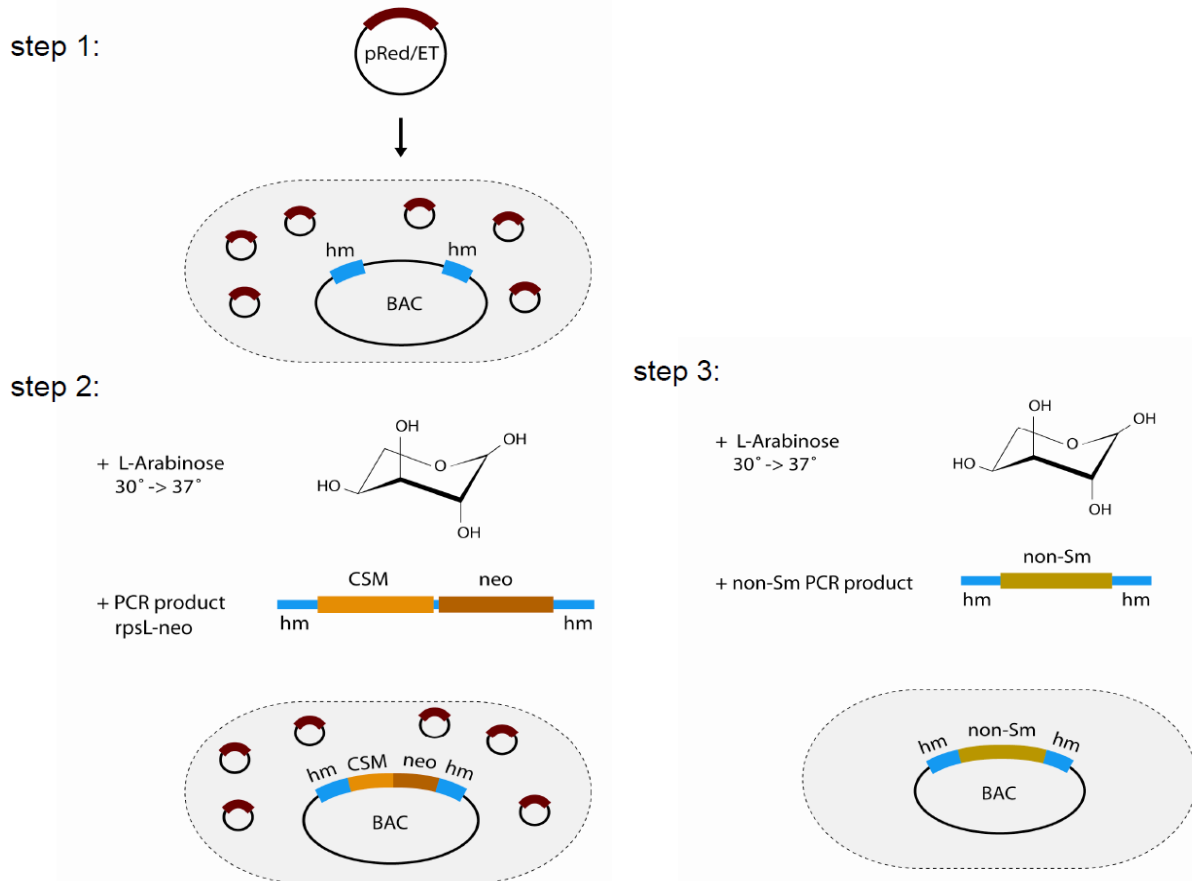


Abb. 4.7 Prinzip der homologen Rekombination mittels Red/ET-Rekombination. Schritt 1: Das Plasmid pRed/ET, welches für die Rekombinationsenzyme kodiert, wird in eine Bakterienzelle mit dem zu modifizierenden Zielgenom transformiert. Die Zellen sind zu diesem Zeitpunkt resistent gegenüber Streptomycin und Tetracyclin. Schritt 2: Die Expression der Rekombinationsenzyme wird mittels L-Arabinose und einer Temperaturerhöhung auf 37°C induziert und die rpsL-neo-Selektionskassette wird in die Zelle transformiert. Es entstehen Zellen mit einer Resistenz gegenüber Kanamycin und Tetracyclin sowie einer Sensitivität gegenüber Streptomycin. Schritt 3: Nach erneuter Expression der Rekombinationsenzyme wird die rpsL-neo-Kassette durch eine zuvor individuell hergestellte Kassette ausgetauscht, die die gewünschte Mutation in das Zielgenom einbringt. Die Zellen erlangen nach erfolgreicher Rekombination ihre Resistenz gegenüber Streptomycin zurück. „hm“ bezeichnet in der Abbildung die homologen Sequenzbereiche, zwischen denen die Mutation stattfinden soll. (Quelle: Handbuch des Counter-Selection BAC Modification Kit, Gene Bridges GmbH)

Im nächsten Schritt wird eine DNA-Kassette in die Zelle transformiert, die die Gene für eine Kanamycinresistenz und eine Streptomycinsensitivität trägt (rpsL-neo-Kassette). Diese Selektionsmarker werden dabei durch DNA-Sequenzen flankiert, die homolog zu den Sequenzen sind, die den zu verändernden Genombereich umrahmen. Eine erfolgreiche

Rekombination resultiert in Bakterien, die resistent gegenüber Tetracyclin und Kanamycin sind sowie sensitiv gegenüber Streptomycin (Abb. 4.7, Step 2). Nach Selektion positiver Bakterienklone werden erneut die Rekombinationsproteine durch Zugabe von L-Arabinose und einen Temperaturshift zu 37°C exprimiert. Im darauf folgenden Schritt werden die Zellen mit einer weiteren DNA-Kassette transformiert, die im Vorfeld durch molekularbiologische Methoden individuell hergestellt wurde. Diese enthält die gewünschte Sequenz, die in das Zielgenom eingebracht werden soll, sowie dieselben homologen Arme wie die zuvor eingesetzte Selektionskassette. Durch eine erneute Rekombination wird die Selektionskassette durch die gewünschte Zielsequenz ersetzt. Bakterien, die eine erfolgreiche Rekombination durchlaufen haben, können nun über die wiedererlangte Streptomycinresistenz selektioniert werden (Abb. 4.7, Step 3). Durch PCR und Sequenzierung (4.1.2.1 und 4.1.6) wird die korrekte Rekombination überprüft.

In dieser Arbeit wurde als Ausgangsmaterial für die Rekombination der *E.coli*-Stamm MC1061 verwendet, der zuvor auf seine natürliche Resistenz gegenüber Streptomycin getestet und mit dem GFV-Volllängeklon pACNR-FLYF-17D transformiert wurde (3.7.1, 4.6.6). Durch den Volllängeklon erhalten die Bakterien zusätzlich eine Resistenz gegenüber Ampicillin.

Alle für die Rekombination notwendigen Schritte wurden nach Herstellerangaben wie im Handbuch des Counter-Selection BAC Modification Kit beschrieben durchgeführt. Um die Methode zu etablieren, wurde zunächst lediglich die Insertion des TC-Tags zur Herstellung des GFV-Konstrukts 17D-E-I1 angestrebt. Die Auswahl der Primer für die Herstellung der rpsL-neo-Kassette erfolgte nach den Herstellerangaben. In Abschnitt 3.6.3 (Tabelle 3.7) sind die entsprechenden Primer beschrieben. Die Herstellung der DNA-Kassette zur Insertion des TC-Tags wurde mittels rekombinanter PCR (4.1.12.2) durchgeführt. Da die homologe Rekombination jedoch unabhängig von Restriktionsschnittstellen abläuft, wurden hier die externen Primer E-S2 und E-as4 verwendet (3.6.1), so dass ein kürzeres PCR-Fragment von 912 bp entstand, welches für den zweiten Rekombinationsschritt eingesetzt wurde.

4.1.12.4 Seitengerichtete Mutagenese

Eine weitere Möglichkeit Mutationen unabhängig von Restriktionsschnittstellen in ein Plasmid einzufügen, ist die seitengerichtete Mutagenese. Für den Versuch, den TC-Tag in das GFV-Genom einzufügen, wurde das QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet.

Bei dieser Technik wird eine speziell für lange DNA-Fragmente geeignete Polymerase verwendet (*PfuUltra*® high-fidelity DNA Polymerase), die dazu in der Lage ist, ein komplettes Plasmid in einem PCR-Zyklus zu replizieren (Abb. 4.8). Um eine gewünschte Mutation in ein Plasmid einzufügen, werden zwei zueinander komplementäre Primer eingesetzt, von denen je

einer an einen DNA-Strang des Plasmids bindet. Beide Primer enthalten in ihrer Sequenz zusätzlich die gewünschte Mutation, wodurch nach der Amplifikation Plasmide entstehen, die die gewünschte Insertion beinhalten.

Da die Template-Plasmide zuvor aus *E.coli*-Zellen isoliert wurden und daher methyliert vorliegen, lassen sie sich nach der Amplifikation durch die Verwendung des Restriktionsenzym DpnI, welches spezifisch nur methylierte DNA schneidet, aus dem PCR-Ansatz entfernen. Anschließend wurden die modifizierten Plasmide zur Amplifikation in XL10-Gold ultrakompetente Zellen transformiert und die korrekte Mutagenese nach einer folgenden Plasmidpräparation durch PCR und Sequenzierung kontrolliert (4.1.2.1 und 4.1.6).

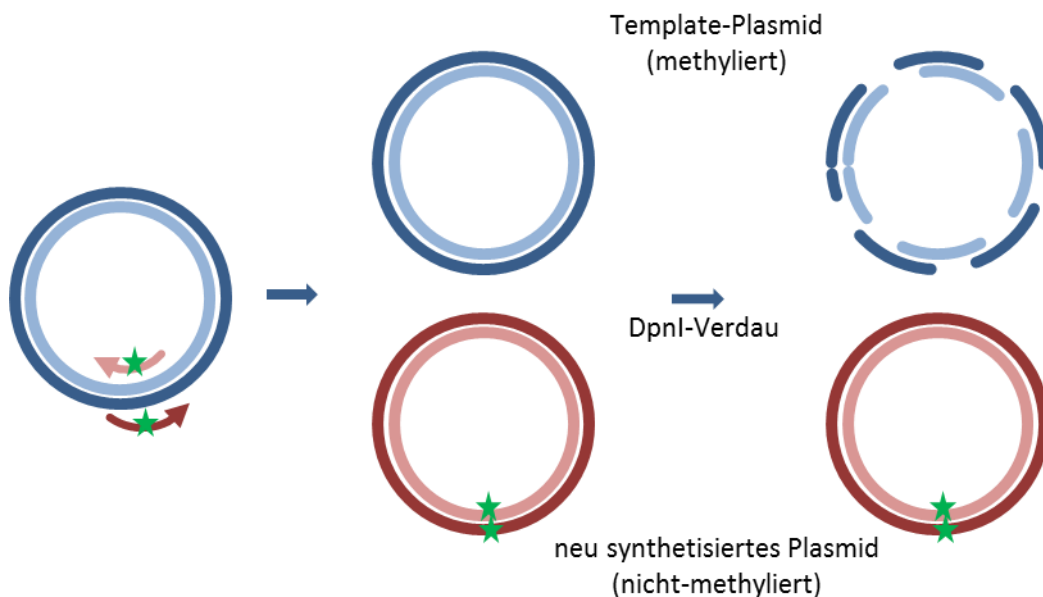


Abb. 4.8 Schematische Darstellung der seitengerichteten Mutagenese. Das Template-Plasmid wird durch die Verwendung zweier komplementärer Primer amplifiziert, die in ihrer Sequenz eine gewünschte Mutation beinhalten (grüner Stern). Es entstehen Plasmide mit der zusätzlichen Mutation. Die methylierten Template-Plasmide können anschließend durch die Restriktion mit dem Enzym DpnI spezifisch verdaut werden, so dass lediglich das modifizierte Plasmid verbleibt.

Alle Schritte für die Mutation mittels seitengerichteter Mutagenese wurden, wenn nicht anders angegeben, wie in den Herstellerangaben beschrieben durchgeführt. Auch das Primerdesign richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers. Für die im Herstellerprotokoll angegebene Transformation wurde an Stelle des angegebenen NZY+ Broth-Mediums kommerziell erwerbliches SOC-Medium verwendet.

Obwohl diese Methode ausdrücklich für die Mutagenese von großen Plasmiden entwickelt wurde (bis zu einer Größe von 14 kb), führte sie bei dem Versuch, den TC-Tag in den GFV-Volllängeklon einzufügen (13,4 kb), leider nicht zum Erfolg. Aus diesem Grund wurde der Bereich, der für das GFV E-, M- und C-Protein kodiert, mittels PCR amplifiziert (Primer E-S0 und E-as0) (4.1.2.1) und in den pDrive Cloning Vector umklont (ca. 7 Kb) (3.7.2). Da dieser Bereich die Restriktionsschnittstellen MluI, NsiI und NotI enthält, wurde eine spätere

Rückklonierung in das GFV-Genom gewährleistet. Alle Mutageneseschritte wurden anschließend in dem pDrive Cloning Vector und in *E.coli*-Top10 Zellen durchgeführt.

Des Weiteren wurde die Insertion des TC-Tags auf zwei Schritte verteilt, da die direkte Einfügung des gesamten Tags ebenfalls nicht erfolgreich war. So wurde in einem ersten Mutageneseschritt die erste Hälfte des Tags eingefügt, die Plasmide wurden isoliert (4.6.3) und mittels PCR und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft (4.1.2.1 und 4.1.6). Im Falle eines positiven Ergebnisses wurde anschließend die zweite Hälfte des Tags in einem zweiten Mutageneseschritt eingefügt. Auch in diesem Fall wurden die Plasmide anschließend sequenziert und auf die korrekte Insertion des Tags analysiert. Die verwendeten Primer zur Herstellung der GFV-Konstrukte 17D-E-I1, 17D-E-I2, 17D-E-I3, 17D-C1 und 17D-C2 mit dieser Methode sind unter 3.6.3 (Tabelle 3.8) aufgeführt.

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen aufgrund ihrer Massenunterschiede (Laemmli, 1970). Dabei werden proteinhaltige Lösungen mit einem SDS-haltigen Probenpuffer versetzt, der fast alle nicht kovalenten Wechselwirkungen in den Proteinen zerstört. Wird dem Puffer außerdem β -Mercaptoethanol zugefügt, werden zusätzlich Disulfidbrücken aufgelöst, und das Protein verliert seine Sekundär- und Tertiärstruktur. Ein Aufkochen der Probe kann diesen Effekt verstärken. Durch die Anlagerung von SDS-Anionen erhalten die Proteine eine negative Ladung und können so elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden. Das Gel besteht aus zwei Komponenten: einem Sammelgel, das der Konzentration der Proteine dient, und dem eigentlichen Trenngel, das die Auftrennung der Proteine gewährleistet. Der Anteil des Polyacrylamids in dem Gel wird dabei nach der Größe der aufzutrennenden Proteine gewählt. In dieser Arbeit wurden Polyacrylamidgele mit einem 12%igen Trenngel verwendet, die mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet wurden (Tabelle 4.11).

Tabelle 4.11 Reaktionsansatz für die Herstellung eines Polyacrylamidgels mit 12%igem Trenngel und 5%igem Sammelgel

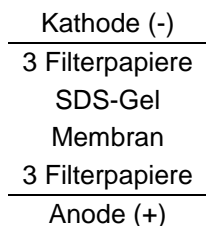
Substanz	Trenngel 12%	Sammelgel 5%
Aqua bidest.	3,755 ml	3,5 ml
2 M Tris (pH 8,8)	2,1 ml	-
0,5 M Tris (pH 6,8)	-	1 ml
20% SDS	50 μ l	37,5 μ l
PAA	3,96 ml	1,25 ml
60% Sucrose	-	1,75 ml
10% APS	120 μ l	62,5 μ l
Temed	15 μ l	6,25 μ l

In dieser Arbeit wurde die SDS-PAGE sowohl in einer denaturierenden als auch in einer halbnativen Variante angewandt. Für die denaturierende Variante wurden die Proben mit $\frac{1}{4}$ Volumen 4x konzentriertem SDS-Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol versetzt, 5 min bei 96°C aufgekocht und auf das Gel aufgetragen. Im Falle der halbnativen Variante wurde das β -Mercaptoethanol in dem Probenpuffer weggelassen und die Probe lediglich bei 40°C für 5 min erwärmt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde der Prestained Protein Marker, PAGE Ruler (Fa. Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese wurde in 1x SDS-Laufpuffer bei 150 V für ca. 1,5 h durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers die untere Gelkante erreicht hatte. Der Nachweis der im Gel befindlichen Proteine erfolgte im Anschluss durch den Transfer auf eine geeignete Membran mittels Western Blot (4.2.2) und durch die Detektion mit spezifischen Antikörpern (4.3.2).

4.2.2 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Nach der Auftrennung von Proteinen in einer SDS-PAGE (4.2.1) können diese durch Elektroblothing auf eine Nitrozellulose- (NC) oder eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran transferiert werden. Dabei wandern die durch das SDS stark negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld einer Elektroblothing-Apparatur in Richtung Anode und binden dadurch an die Membran. Die benötigte Stromstärke ist dabei proportional zur Fläche des Gels. Je nach Größe des nachzuweisenden Proteins können Membranen mit einer Porengröße von 0,2 oder 0,45 μm verwendet werden.

In dieser Arbeit wurde das Halbtrockenblot-Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) mit folgendem Aufbau zwischen zwei Graphit-Plattenelektroden verwendet:



Im Falle der Verwendung einer Nitrozellulosemembran wurden vor dem Transfer alle Bestandteile in Transferpuffer getränkt, um die Leitfähigkeit zu erhöhen. Wurde eine PVDF-Membran verwendet, wurde diese zunächst für 15 s in Methanol aktiviert und 2 min in destilliertem Wasser abgespült, bevor sie ebenfalls für 5 min in Transferpuffer äquilibriert werden konnte. Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 200 mA für ein Gel bzw. 300 mA für den Proteintransfer aus zwei Gelen.

Die Membranen wurden anschließend in PBS mit 0,1% Tween-20 und 5-10% Milchpulver über Nacht inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Am nächsten Tag konnte dann die Proteindetektion durch spezifische Antikörper erfolgen (4.3.2).

4.2.3 Extraktion zellulärer Proteine

Für die Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen wurde das NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit von Thermo Fisher Scientific Inc. laut Herstellerangaben verwendet. Das in 4.5.6 erhaltene Zellpellet wurde in 250 µl eiskaltem CER I-Puffer resuspendiert und nach dem Herstellerprotokoll weiter verarbeitet. Dabei wurde das zytoplasmatische Proteinextrakt vom Kernextrakt separiert und beide Fraktionen bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.3 Immunologische Methoden

4.3.1 Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung polyklonaler Antiseren

Für die Herstellung polyklonaler Antiseren gegen Peptide verschiedener GFV-Proteine wurden Kaninchen mit synthetisch hergestellten Peptiden immunisiert, die zuvor *in silico* entsprechend ihrer molekularen Eigenschaften ausgewählt worden waren (5.2.1.1 und 3.8). Dazu wurde das in Tabelle 4.12 dargestellte Immunisierungsschema durchgeführt, das sich an Protokollen der „Tierschutzaspekte bei der Immunisierung von Versuchstieren“ der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V. (Stand: Februar 1997) (<http://www.tierschutz-tvt.de/merkblatt4.pdf>) sowie dem *Standard Rabbit Polyclonal Antibody Protocol for Protein and Peptide Antigens* der Pocono Rabbit Farm & Laboratory Inc. (Stand: 2008) (Canadensis, PA, USA; <http://www.prfal.com>) orientiert. Vor der Grundimmunisierung wurde an zwei unterschiedlichen Tagen Präimmenserum abgenommen, das in den späteren Versuchen als Negativkontrolle eingesetzt wurde.

Für die Grundimmunisierung wurden 250-300 µl des Peptids mit derselben Menge kompletten Freund's Adjuvans (CFA) gemischt und subkutan injiziert. Die Konzentration des dabei injizierten Antigens variiert für die verschiedenen Peptide aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen in den gelieferten Stammlösungen (3.8, Tabelle 3.12) sowie individueller Abweichungen während der Durchführung und ist für die jeweilige Immunisierung in Tabelle 4.12 aufgeführt. Für die Folgeimmunisierungen wurde das Peptid mit 750 µl inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) und isotonischer Kochsalzlösung in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml in den in Tabelle 4.12 angegebenen Konzentrationen subkutan verabreicht.

Das Blut wurde in Serumröhrchen abgenommen und bei 4°C und 1.400 rpm für 12 min zentrifugiert. Anschließend wurde das abgetrennte Serum vorsichtig abgenommen, in kleinen Mengen aliquotiert und in Kryoröhrchen bei +4°C für kürzere Zeiträume oder -20°C für eine längere Aufbewahrung gelagert.

Die Injektionen und Blutabnahmen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Fachpersonal des Tierstalls im Robert Koch-Institut.

METHODEN

Tabelle 4.12 Schema zur Immunisierung von Kaninchen für die Produktion polyklonaler Antisera.

Tag	Anwendung	E-Protein	C-Protein
0	Blutentnahme	Präimmunserum (20.08.08)	Präimmunserum (20.08.08)
14	Blutentnahme	Präimmunserum (04.09.08)	Präimmunserum (04.09.08)
19	Grundimmunisierung	ca. 180 µg Peptidantigen in CFA	ca. 220 µg Peptidantigen in CFA
33	Immunisierung	ca. 110 µg Peptidantigen in IFA	ca. 80 µg Peptidantigen in IFA
43	Blutentnahme	Postimmunserum (02.10.08)	Postimmunserum (02.10.08)
49	Immunisierung	ca. 175 µg Peptidantigen in IFA	ca. 165 µg Peptidantigen in IFA
63	Blutentnahme	Postimmunserum (22.10.08)	Postimmunserum (22.10.08)
78	Immunisierung	ca. 115 µg Peptidantigen in IFA	ca. 150 µg Peptidantigen in IFA
92	Blutentnahme	Postimmunserum (19.11.08)	-
106	Immunisierung	ca. 80 µg Peptidantigen in IFA	ca. 100 µg Peptidantigen in IFA
120	Blutentnahme	Postimmunserum (17.12.08)	Postimmunserum (17.12.08)
153	Immunisierung	ca. 65 µg Peptidantigen in IFA	ca. 85 µg Peptidantigen in IFA
160	Ausblutung	Postimmunserum (26.01.09)	Postimmunserum (26.01.09)

Tag	Anwendung	NS1-Protein
0	Blutentnahme	Präimmunserum (03.12.2008)
14	Blutentnahme	Präimmunserum (17.12.2008)
35	Grundimmunisierung	ca. 140 µg Peptidantigen in CFA
49	Immunisierung	ca. 170 µg Peptidantigen in IFA
64	Immunisierung	ca. 170 µg Peptidantigen in IFA
77	Blutentnahme	Postimmunserum (18.02.2009)
91	Immunisierung	ca. 170 µg Peptidantigen in IFA
105	Blutentnahme	Postimmunserum (18.03.2009)
119	Immunisierung	ca. 70 µg Peptidantigen in IFA
133	Blutentnahme	Postimmunserum (15.04.2009)
154	Immunisierung	ca. 130 µg Peptidantigen in IFA
166	Ausblutung	Postimmunserum (18.05.2009)

(CFA=*complete Freund's Adjuvans*, IFA=*incomplete Freund's Adjuvans*)

4.3.2 Immunofärbung von Proteinen auf NC-/PVDF-Membranen

Nach dem Transfer aus einem SDS-Gel auf NC- oder PVDF-Membranen und anschließender Absättigung der Membran (4.2.2), wurden die gebundenen Proteine indirekt durch antigenspezifische Antikörper nachgewiesen. Dazu wurde die Membran zunächst dreimal für je 10 min in PBS mit 0,1% Tween-20 gewaschen, bevor sie mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Erstantikörper für 1 h inkubiert wurde (verdünnt in PBS + 0,1% Tween + 1% Milchpulver). Anschließend wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und daraufhin 1 h mit einem erstantikörperspezifischen Zweitantikörper inkubiert. Vor der Detektion wurde die Membran wiederum dreimal gewaschen, wobei diesmal der letzte Waschschrift in reinem PBS ohne Tween erfolgte. Für den Nachweis wurden HRP-konjugierte Zweitantikörper verwendet, die nach enzymatischer Umsetzung eines entsprechenden Chemilumineszenz-Substrates ein Lichtsignal freisetzen. Als Substrat dienten verschiedene Produkte des SuperSignal® West ECL-Reagenz der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Pico, Dura oder Femto), die sich lediglich in ihrer Sensitivität unterscheiden. Das entstehende Lichtsignal wurde in einer Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm übertragen und in einer Entwicklermaschine analog fixiert.

4.3.3 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) zum Nachweis viraler Proteine

Zur Überprüfung des Infektionsstatus von Zellen, die zuvor mit GFV infiziert wurden, wurde ein indirekter Immunfluoreszenztest durchgeführt. Die infizierten Zellen wurden dazu zunächst mit PBS gewaschen, in PBS oder Medium resuspendiert und auf einen Objektträger getropft. Nach kompletter Austrocknung wurden die Zellen für mindestens 10 min in eiskaltem Aceton fixiert, erneut getrocknet und anschließend bis zur Färbung bei -20°C gelagert. Die Fixierung mit Aceton diente dabei gleichzeitig der Inaktivierung des Virus in den Zellen.

Der Nachweis des Gelbfieberevirus erfolgte mit einem GFV-spezifischen Antikörper in einer geeigneten Verdünnung in PBS für 1 h bei 37°C, der auf den fixierten Zellen inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper für 1 h bei 37°C in dunkler Umgebung. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen, vollständig getrocknet und zum Schluss mit dem Eindeckelmedium *ProLong® Gold antifade reagent with DAPI* (Invitrogen) und einem Deckglas fixiert. Das im Eindeckelmedium enthaltene DAPI führt zu einer zusätzlichen Färbung der Zellkerne. Nach der Aushärtung des Mediums wurden die gefärbten Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

4.3.4 IIFT zum Nachweis GFV-spezifischer Antikörper

Für den Nachweis GFV-spezifischer Antikörper im Serum wurde ein kommerziell erhältlicher IIFT der Firma EUROIMMUN AG eingesetzt (IIFT Gelbfieber-Viren). In diesem Test sind mit GFV infizierte und nicht infizierte Zellen nebeneinander auf einem Objektträger fixiert und können so gleichzeitig mit demselben Serum inkubiert werden (Abb. 4.9). Für die Verdünnung der Antikörper wurde der zugehörige Probenpuffer IIFT verwendet. Der Nachweis erfolgte mit einem gegen das Testserum gerichteten fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper und anschließender Auswertung an einem Fluoreszenzmikroskop.

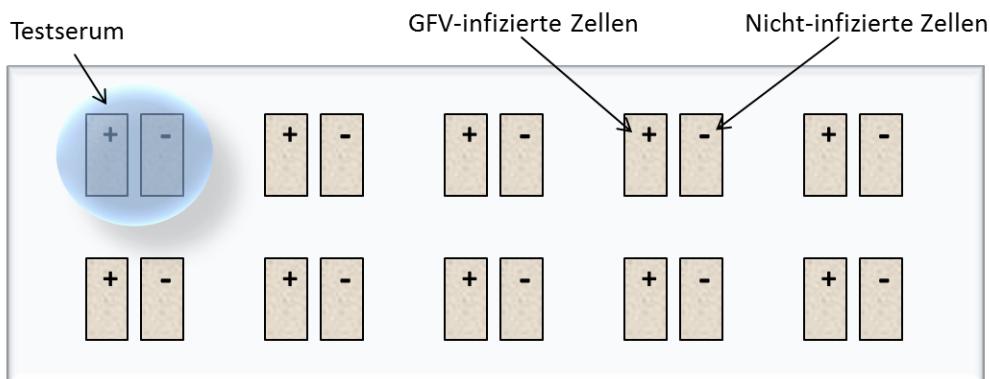


Abb. 4.9: Schematische Darstellung eines Gelbfieber-Viren IIFTs der Firma EUROIMMUN AG. Die Fixierung von mit GFV infizierten und nicht-infizierten Zellen ermöglicht die gleichzeitige Inkubation mit einer Serumprobe.

4.3.5 IIFT zum Nachweis spezifischer Flavivirus-Antikörper

Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität mit anderen Flaviviren wurden die in dieser Arbeit hergestellten GFV-Antiseren in einem kommerziell erwerblichen Test der Firma EUROIMMUN AG getestet, der für die serologische Diagnostik verschiedener Flaviviren entwickelt wurde (IIFT Flaviviren-Mosaik 3) (Abb. 4.10). Dieser Test ermöglicht es ein Serum gleichzeitig auf die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern gegen acht verschiedene Flaviviren (FSME-Virus, West-Nil-Virus, Gelbfiebervirus, Japanische Enzephalitis-Virus, Denguevirus Typ 1-4) zu untersuchen. Für die Verdünnung der Antikörper wurde der zugehörige Probenpuffer IIFT verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper und anschließender Fluoreszenzmikroskopie.

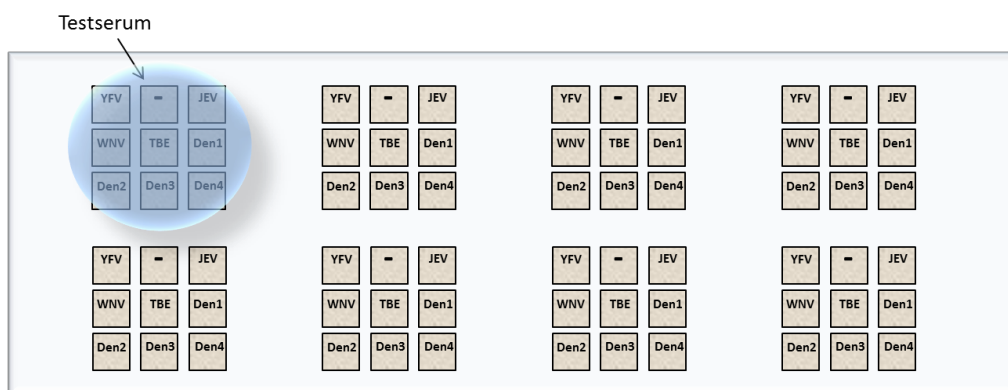


Abb. 4.10: Schematische Darstellung eines Flaviviren-Mosaik 3 IFTs der Firma EUROIMMUN AG. Jedes Testfeld auf dem Objektträger enthält fixierte Zellen, die mit acht verschiedenen Flaviviren infiziert sind sowie eine Negativkontrolle. Dies ermöglicht den gleichzeitigen Test einer Serumprobe auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen verschiedene Flaviviren. (TBE=FSME-Virus, WNV=West-Nil-Virus, YFV=Gelbfiebervirus, JEV=Japanische Enzephalitis-Virus, Den1-4=Denguevirus Typ 1-4)

4.3.6 Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT)

Der PRNT dient der Quantifizierung neutralisierender Antikörper im Serum. Dazu werden verschiedene Verdünnungen des zu testenden Serums mit einer konstanten Menge an infektiösen Viruspartikeln gemischt und wie im Plaquetest (4.5.4) auf eukaryotischen Zellen inkubiert. Die Auswertung bezieht sich in diesem Fall auf das Ausbleiben von Plaques im Zellrasen in Abhängigkeit von der Serumverdünnung. Befinden sich im Serum Antikörper, die in der Lage sind die Viren zu neutralisieren, bleibt eine Zellschädigung aus (Abb. 4.11).

Das zu testende Serum wurde zunächst 1:5 und anschließend seriell 1:2 bis zu einer Endverdünnung von 1:160 in L15-Medium (5% FKS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) verdünnt. Die gefriergetrocknete Viruslösung einer Referenzcharge 345/1 des GFV-17D-Impfstammes wurde ebenfalls in L15-Medium aufgenommen und auf eine Konzentration von 200 PFU/ml eingestellt. Anschließend wurden je 500 µl jeder Serumverdünnung zusammen mit 500 µl der eingestellten Viruslösung für 1 h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die in diesem Test eingesetzten PS-Zellen auf eine Zellzahl von 6×10^5 Zellen/ml eingestellt (4.4.4).

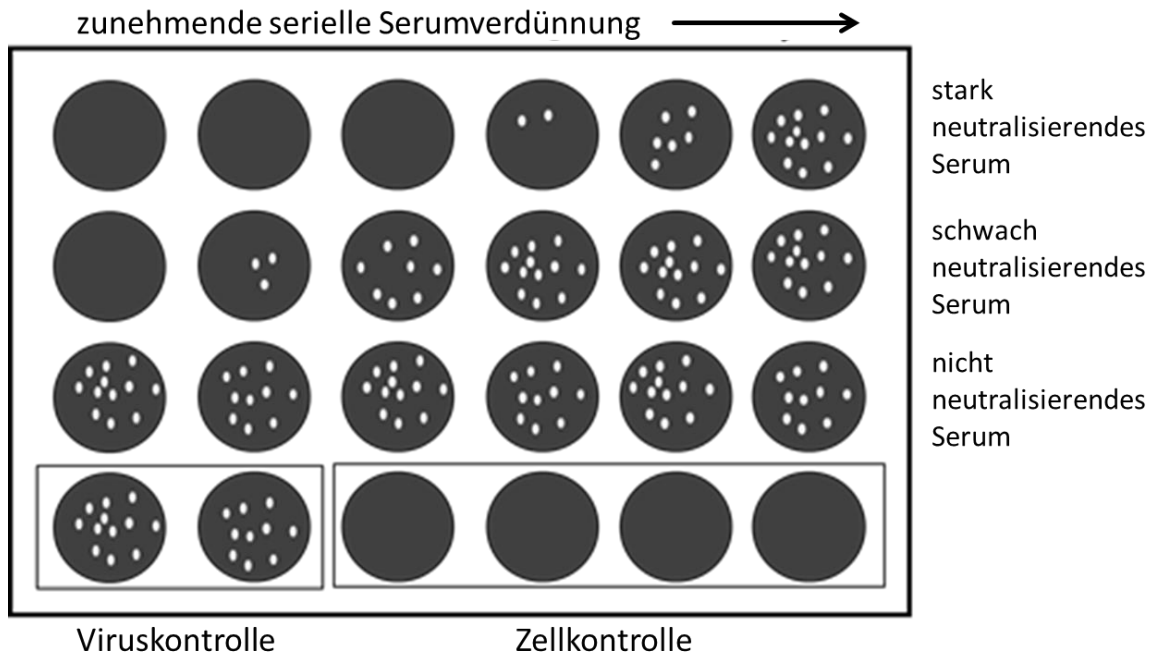


Abb. 4.11: Schematische Darstellung des Plaque-Reduktions-Neutralisationstests. Die Inkubation neutralisierender Antikörper mit einer Viruslösung führt zur Inaktivierung der Viruspartikel und unterdrückt somit eine Zellschädigung. Dieser Effekt lässt mit zunehmender Serumverdünnung nach.

In jede Vertiefung einer 24-well-Platte wurden 200 µl der eingestellten Zellsuspension zusammen mit jeweils 200 µl der Serum-Virus-Lösung gegeben und vorsichtig durch Schwenken gemischt. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C (95% rel. Luftfeuchtigkeit ohne CO₂) wurde jeder Ansatz mit 400 µl L15-CMC-Überschichtungsmedium (L15-Medium + 1,6% CMC) überschichtet und weitere vier Tage inkubiert.

Zur Fixierung der Zellen sowie zur Virusinaktivierung wurde nach dieser Zeit der Überstand abgenommen und die Zellen für 20 min mit 3,7% Formaldehyd behandelt. Anschließend wurde der Zellrasen durch eine mindestens 30-minütige Inkubation mit Naphthalin-Schwarz-Lösung gefärbt und mit Wasser abgespült. Für die Berechnung der 90%igen Plaquereduktion wurden die sichtbaren Plaques ausgezählt und der Neutralisationstiter nach Reed und Muench (Reed and Muench, 1938) berechnet.

Für ein verlässliches Ergebnis wurde die Bestimmung des Neutralisationstiters mindestens in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde stets ein bekanntes Negativserum mitgeführt, als Positivkontrolle diente die Neutralisation mit dem Antikörper MAK6330. Zusätzlich wurden eine Zellkontrolle (ohne Virus) und eine Viruskontrolle (ohne Serum) durchgeführt. Ab einem Neutralisationstiter von 1:10 wird von einem aktiven Immunschutz gegen das Gelbfiebertvirus ausgegangen.

4.3.7 Sandwich-ELISA

Zur Detektion viralen Antigens wurden verschiedene Ansätze eines Sandwich-ELISAs (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) getestet, dessen Grundprotokoll in einer vorhergegangenen Diplomarbeit entwickelt wurde (Litzba, 2006).

Das Prinzip des Sandwich-ELISAs ist in Abb. 4.12 schematisch dargestellt. Zunächst wird ein gegen das Zielprotein gerichteter Fängerantikörper an eine Platte gebunden (*Coating*) und nichtbesetzte Stellen des Untergrunds mit einer Blockierungslösung abgesättigt (1 + 2). Im nächsten Schritt wird die zu untersuchende Lösung dazugegeben, so dass enthaltenes Antigen an den Fängerantikörper binden kann (3). Der spezifische Nachweis erfolgt mit einem gegen das Antigen gerichteten Detektionsantikörper. Dieser kann direkt mit einer Peroxidase konjugiert sein (4) oder aber für eine weitere Signalverstärkung durch einen gegen den Detektionsantikörper gerichteten Zweitantikörper, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist, nachgewiesen werden (5). Die Signalverstärkung kann außerdem erreicht werden, indem man einen Biotin-konjugierten Detektionsantikörper verwendet, der mit Peroxidase-markiertem Streptavidin nachgewiesen wird (6). Die eigentliche Signalentstehung wird durch Inkubation mit einem Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat und dessen Umsetzung durch die an den Detektionsantikörper gebundene Peroxidase erzielt, wobei eine Farbreaktion entsteht (7). Die Intensität dieser Reaktion lässt sich anschließend mit der Menge an gebundenem Antigen korrelieren.

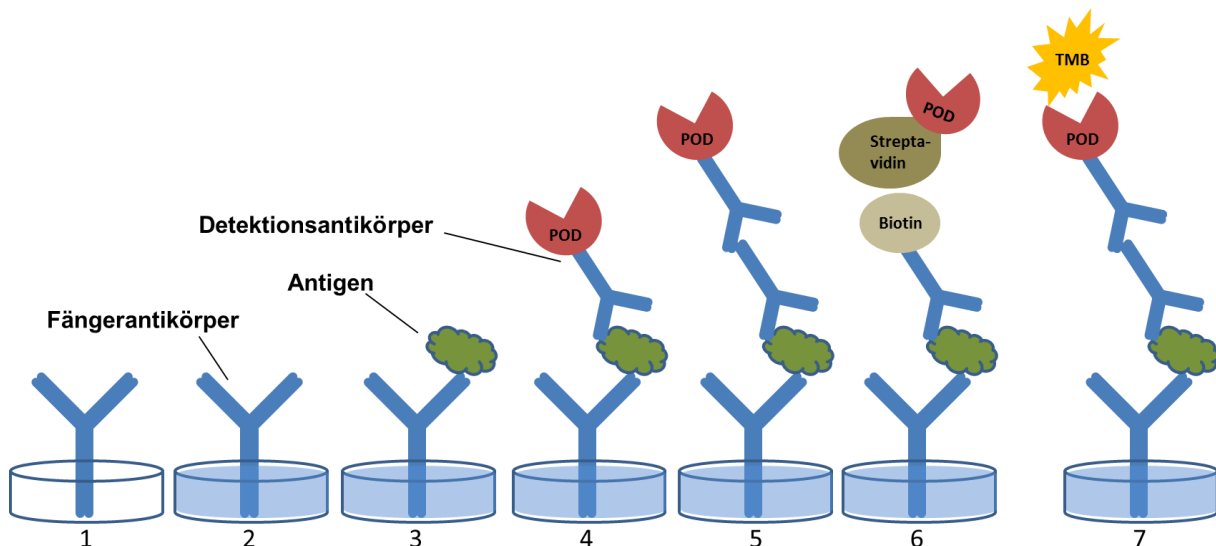


Abb. 4.12: Prinzip des Sandwich-ELISAs. Die Schritte *Coating* (1), Blockierung (2), Antigenbindung (3), Antigen-detektion (4-6) und Signalentstehung (7) sind im Text erläutert.

In dem hier verwendeten Grundprotokoll wurde der Fängerantikörper in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,8) verdünnt und in einem Volumen von 100 µl je Vertiefung an eine 96-well-Platte (Maxisorp, Nunc) gebunden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am darauffolgenden Tag wurde die Platte 3x mit 150 µl Waschpuffer (2x PBS + 0,05% Tween-20) je Vertiefung gewaschen und die freien Bindungsstellen mit Blockpuffer (2x PBS + 0,05%

Tween-20 + 3% FKS) für 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Es folgten erneut drei Waschschriffe. Die Inkubation mit der antigenhaltigen Lösung erfolgte in einem Volumen von 50-100 µl je Vertiefung für 2 h bei Raumtemperatur, wobei je nach Versuchsansatz eine Verdünnung in 2x PBS oder einem anderen angemessenen Verdünnungsmedium durchgeführt wurde (5.2.3). Für den spezifischen Antigennachweis wurde nach erneutem 5-maligem Waschen für 1 h mit dem Detektionsantikörper inkubiert. Dieser wurde in einem geeigneten Verhältnis in Verdünnungspuffer verdünnt (2x PBS + 0,05% Tween 20 + 1% FKS) und in einem Volumen von 50-100 µl je Vertiefung eingesetzt. Im Falle der Verwendung eines Zweitantikörpers wurden der Waschschriff sowie die Schritte der Antikörperinkubation wiederholt. Es wurde ein letztes Mal 5x gewaschen, bevor je 100 µl des TMB-Substrats in jede Vertiefung gegeben wurde. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion durch die Zugabe von je 100 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt und das entstandene Farbsignal konnte bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm im ELISA-Reader abgelesen werden.

4.3.8 Kompetitiver ELISA

Einen weiteren Ansatz zur Detektion viralen Antigens stellt der kompetitive ELISA dar. Hierzu wird das Antigen direkt an den Untergrund einer ELISA-Platte gebunden, ohne dass ein Fängerantikörper eingesetzt wird. Bevor der Detektionsantikörper zum Nachweis des gebundenen Antigens eingesetzt wird, wird er mit der zu untersuchenden Lösung, die möglicherweise ebenfalls das Antigen enthält, inkubiert. Ist das Antigen in der Lösung enthalten, reagiert es mit dem Detektionsantikörper und blockiert so dessen Bindungsstellen. Dieser Ansatz wird daraufhin zur Detektion des Antigens auf der vorbereiteten ELISA-Platte eingesetzt. Ist in der Testlösung dasselbe Antigen enthalten, bleibt eine Bindung und somit die entsprechende Substratumsetzung aus. Ein positives Signal entspricht in diesem Ansatz also einem negativen Testergebnis (Abb. 4.13).

Die Vorinkubation des Detektionsantikörpers mit der zu testenden Lösung erfolgte für 1 h bei 37°C. Für die Beschichtung der ELISA-Platte wurde das NS1-Immunsierungspeptid (3.8) in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,8) entsprechend verdünnt und in einem Volumen von 50 µl je Vertiefung über Nacht bei 4°C an die Platte gebunden. Alle weiteren Schritte entsprachen denjenigen des ELISA-Grundprotokolls und wurden wie unter 4.3.7 beschrieben durchgeführt.

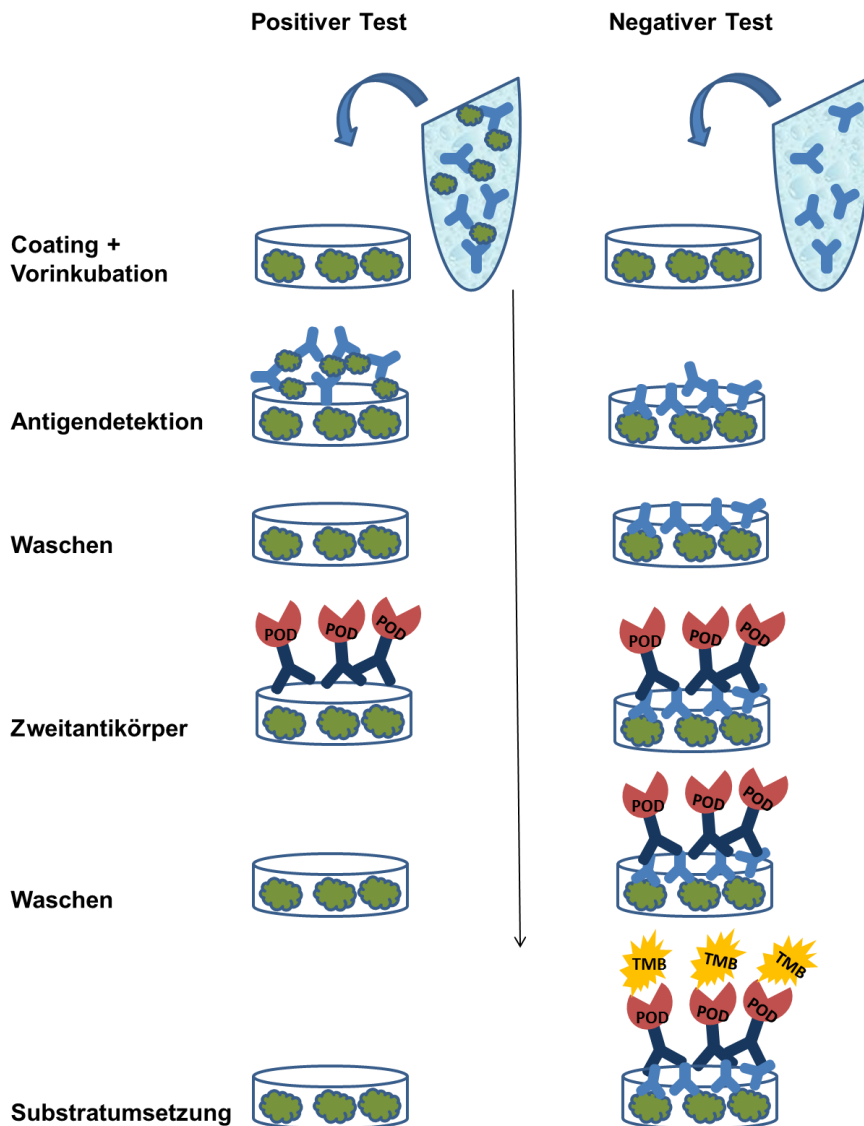


Abb. 4.13: Schematische Darstellung eines kompetitiven ELISAs. Die zu testende Lösung wird vor der Verwendung im ELISA mit dem Detektionsantikörper inkubiert und kann im Falle der Anwesenheit des Antigens dessen Bindungsstellen besetzen. Bei anschließender Inkubation mit dem gebundenen Antigen auf der ELISA-Platte bleibt im Falle eines positiven Tests die Bindung aus. Im Gegensatz dazu führt die Vorinkubation mit einer Lösung, die negativ für das zu testende Antigen ist, zu einer Interaktion des Detektionsantikörpers mit dem gebundenen Antigen und somit zu einem positiven Signal nach der Substratumsetzung.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Passagieren eukaryotischer Zellen

Alle verwendeten adhärenenten Zelllinien wurden in beschichteten Kulturflaschen in einem Begasungsbrutschrank bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit und unter den für sie optimalen Bedingungen kultiviert (Tabelle 4.13) und für die Zellerhaltung alle 3-5 Tage passagiert. Dazu wurde den konfluent gewachsenen Zellen das Medium abgenommen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA benetzt und für ca. 10 min bei 37°C inkubiert (HepG2-, VeroE6-, PS-Zellen) beziehungsweise

METHODEN

vorsichtig mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst (Ap61-Zellen). Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen, durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in einem für jede Zellart spezifischen Verhältnis bezüglich der Fläche in neue Kulturflaschen eingesät.

Tabelle 4.13 Kultivierungsbedingungen für eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Medium	Zusätze	Temperatur	CO ₂
Ap61	L15	10% FKS; 1% Glutamin; 10% Tryptosephosphat; 1% Penicillin/Streptomycin; 0,05% Fungizone	28°C	0%
HepG2	RPMI	10% FKS; 1% Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin	37°C	5%
VeroE6	DMEM	10% FKS; 1% Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin	37°C	5%
PS	L15	10% FKS; 1% Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin	37°C	0%

4.4.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen

Für das längerfristige Aufbewahren eukaryotischer Zellen wurden diese bei -196°C über flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden subkonfluent gewachsene Monolayer (~70%) mit PBS gewaschen, wie unter 4.4.1 beschrieben abgelöst und 5 min bei 1.100xg sedimentiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in 90% FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (v/v) resuspendiert. Die Zellen wurden zunächst in Kryogefäßen in einer mit Isopropanol gefüllten Isolierbox bei -80°C langsam eingefroren (Abkühlung 1°C/h) und erst nach einigen Tagen in einen Stickstoffprobenlagerungstank umgelagert.

4.4.3 Auftauen eukaryotischer Zellen

Eingefrorene Zellen wurden unter warmem Wasser schnell aufgetaut und anschließend direkt in eine 25 cm²-Kulturflasche überführt, um eine Zellschädigung durch Eiskristallbildung zu minimieren. Sobald sich ein fester Zellrasen gebildet hatte, wurde das Kulturmedium ausgetauscht, um das zelltoxische DMSO zu entfernen.

4.4.4 Zellzahlbestimmung eukaryotischer Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Tropfen suspendierter Zellen (4.4.1) in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Ausgezählt wurden jeweils 4 x 16 Quadrate (in Abb. 4.14 mit einem „L“ gekennzeichnet). Das arithmetische Mittel der vier großen Quadrate ergab, unter Berücksichtigung ggf. durchgeführter Vorverdünnungen, mit dem Faktor 10⁴ multipliziert die Zellzahl pro Milliliter Ausgangslösung (Formel 4.2).

$$\text{Zellen pro ml} = \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{\text{Zellzahl aller Quadrate}}{4} \times 10^4$$

Formel 4.2 Berechnung der Zellkonzentration aus dem Ergebnis der Zellzählung. Zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter wird die Anzahl der Zellen, die in 4 x 16 Quadraten gezählt wurden, durch 4 dividiert und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Dieses Ergebnis ergibt mit 10⁴ multipliziert die gesuchte Zellzahl pro Milliliter.

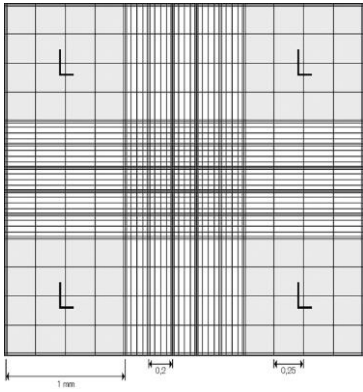


Abb. 4.14 Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer zur Bestimmung der Zellzahl eukaryotischer Zellen in einer Suspensionslösung. (Quelle: Fisher Scientific)

4.4.5 Transfektion mittels Lipofectamin™ 2000

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen fremder Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen. Für die Einschleusung viraler RNA in VeroE6-Zellen wurde in dieser Arbeit die Methode der Lipofektion mittels Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) gewählt, die im Rahmen einer früheren Arbeit für diesen Zweck als die optimale chemische Transfektionsmethode identifiziert wurde (Bae, 2006). Bei diesem Prinzip wird die Nukleinsäure durch Lipide komplexiert und kann so durch eine Lipidverschmelzung mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen werden.

Für die Transfektion wurden VeroE6-Zellen am Vortag in 6-well-Platten so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 60-80% konfluent waren. Um eine größtmögliche Transfektionseffizienz zu erzielen, wurden verschiedene Konzentrationen an Lipofectamin™ 2000 ausgetestet. Pro Vertiefung wurde schließlich folgender Ansatz verwendet:

Lösung 1: 250 µl OptiMEM + 5 µl Lipofectamin™ 2000

Lösung 2: 250 µl OptiMEM + 3,4 µg RNA

Die Lösungen 1 und 2 wurden separat in polystyrolbeschichteten Transfektionsröhrchen angesetzt und jeweils 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze zusammengegeben und zur Komplexbildung weitere 20 min inkubiert.

Währenddessen wurde der Zellrasen zweimal mit warmem OptiMEM gewaschen, bevor der Transfektionsansatz zugegeben wurde. Zur Aufnahme der RNA folgte eine Inkubation für 5 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch wieder durch DMEM-Kulturmedium ersetzt.

4.5 Virologische Methoden

Die Arbeiten mit infektiösen Viren wurden entsprechend der Sicherheitsrichtlinien je nach verwendetem Virusstamm in einem Sicherheitslabor der Stufe 2 (BSL-2) oder 3 (BSL-3) durchgeführt.

4.5.1 RNA-Isolierung aus zellfreien Lösungen

Die Isolierung viraler RNA aus zellfreien Lösungen wurde mit dem QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde in 60 µl Elutionspuffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.5.2 RNA-Isolierung aus Zellen

Zur Gewinnung viraler RNA aus Zellen wurde das RNeasy[®] Mini Kit der Firma Qiagen entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden in RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol aufgeschlossen und mit den QIAshredder-Säulen von Qiagen homogenisiert. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.5.3 Herstellung hochtitriger Viruslösungen

Für die Herstellung großer Virusmengen wurden VeroE6- oder Ap61-Zellen verwendet, die in einer 75 cm² Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von etwa 70% herangewachsen waren (4.4.1). Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 500 µl einer sterilfiltrierten Virusstammlösung infiziert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h unter gelegentlichem Schwenken und unter den für die jeweilige Zelllinie angegebenen Bedingungen inkubiert (Tabelle 4.14). Das geringe Volumen des Inokulums trägt dazu bei, dass der Kontakt zwischen Viren und Zellen und damit auch die Infektion erleichtert wird. Nach 1 h wurden 15 ml des entsprechenden Kulturmediums auf die Zellen gegeben und für weitere 5-10 Tage inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach dem Ergebnis der Infektion und wurde in der Regel so lange weitergeführt, bis ein zytopathischer Effekt zu sehen war. Um den Virustiter zu erhöhen, wurde unter Umständen nach 4 bis 5 Tagen das Medium noch einmal gewechselt, um zelltoxische Substanzen zu entfernen und die Virusproduktion anzuregen. Der Infektionsstatus wurde vor der Ernte mittels indirekter Immunfluoreszenz (4.3.3), RT-PCR (4.1.2.3) oder Plaquetest (4.5.4) überprüft. Für die Virusernte wurde der Zellkulturüberstand in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und 10-15 min lang bei 4.000xg zentrifugiert, um abgelöste Zellfragmente zu sedimentieren. Die Viruslösung wurde in Kryogefäßen aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

METHODEN

Tabelle 4.14 Kultivierungsbedingungen für die Virusanzucht in Ap61- und VeroE6-Zellen

Zelllinie	Medium	Zusätze	Temperatur	CO ₂
Ap61	L15	2% FKS; 1% Glutamin; 5% Tryptosephosphat; 1% Penicillin/Streptomycin; 0,05% Fungizone	28°C	0%
VeroE6	DMEM	5% FKS; 1% Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin	37°C	5%

4.5.4 Virustitration mittels Plaquetest

Um die Anzahl infektiöser viraler Partikel in zellfreien Lösungen (z.B. Zellkulturüberstand oder Serum) zu bestimmen, wird der Plaquetest eingesetzt. Dabei wird die zu untersuchende Lösung in verschiedenen Verdünnungsstufen auf infizierbare Zellen gegeben und die Virusausbreitung nach erfolgter Infektion durch die Zugabe eines viskösen Überschichtungsmediums begrenzt. Hierdurch wird die Brown'sche Molekularbewegung unterbunden und so die Infektionsausbreitung auf die unmittelbaren Nachbarzellen einer primär infizierten Zelle begrenzt. Somit geht jedes Loch im Zellrasen (Plaque) auf ein einziges infektiöses Viruspartikel zurück. Durch Auszählung der entstanden Plaques lässt sich dann unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe die Anzahl der ursprünglich in der Lösung vorhandenen infektiösen Viruspartikel (Plaque-Forming Units = PFU) pro ml berechnen (Abb. 4.15, Formel 4.3).

Für den Plaquetest wurden PS-Zellen wie in 4.4.1 beschrieben abgelöst, in 5 ml L15-Medium (5% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin) resuspendiert und auf eine Zellzahl von 6×10^5 Zellen/ml eingestellt (4.4.4). In jede Vertiefung einer 24-well-Platte wurden 200 µl der Zelllösung sowie 200 µl der entsprechenden Verdünnungsstufe einer Viruslösung gegeben, und nach leichtem Schwenken für 4 h bei 37°C ohne Zugabe von CO₂ inkubiert. Die Verdünnungsstufen wurden seriell 1:10 hergestellt, wobei die Startverdünnung je nach erwarteter Viruskonzentration variiert wurde. Die Ansätze erfolgten stets in Doppel- oder Dreifachbestimmung. Als Kontrollen wurde jeweils eine Vertiefung mit unverdünnter Viruslösung bzw. mit reinem Medium inkubiert. Nach erfolgter Infektion wurde jede Vertiefung mit 400 µl L15-CMC-Überschichtungsmedium (L15-Medium + 5% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin und 1.6% CMC) bedeckt und für weitere 4 (Referenzstämme 17D und Asibi) bis 7 (Wildisolate) Tage inkubiert.

Für die Inaktivierung und Fixierung wurden die Zellen 15 min mit 3,7% Formaldehyd behandelt und der Zellrasen anschließend für mindestens 30 min mit Naphthalin-Schwarz-Lösung gefärbt. Zur Bestimmung der Anzahl infektiöser Partikel wurde ein Verfahren gewählt, bei dem geringere Verdünnungsstufen mit größeren Plaquezahlen höher gewichtet werden als höhere Verdünnungen mit geringerer Plaquezahl (Ferguson and Heath, 2004). Dies minimiert die statistische Anfälligkeit geringer Plaquezahlen je Vertiefung.

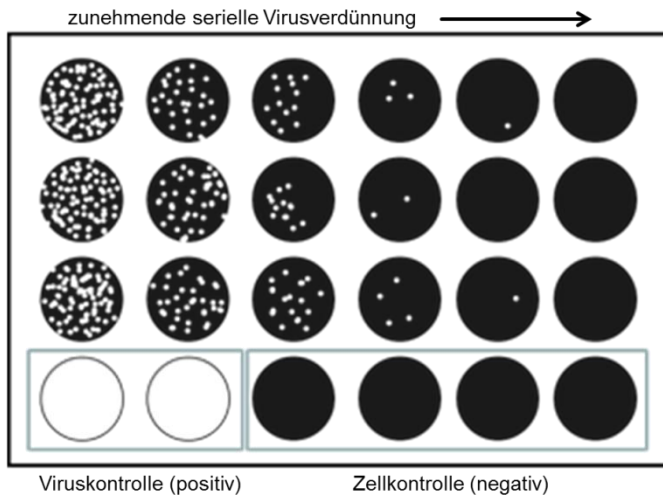


Abb. 4.15 Schematische Darstellung eines Plaquetests. Eine virushaltige Lösung wird seriell verdünnt und auf infizierbaren Zellen inkubiert. Jede dabei entstehende sichtbare Schädigung im Zellrasen (Plaques) geht auf ein ursprüngliches Viruspartikel in der Ausgangslösung zurück. Durch Auszählen der Plaques und entsprechende Hochrechnung (Formel 4.3) kann so der Virustiter in der Ausgangslösung bestimmt werden.

$$pfu / mL = \frac{\sum \text{Plaques}}{\sum V(\text{Viruslösungen})}$$

Formel 4.3 Berechnung der Anzahl infektiöser viraler Partikel pro Milliliter. Die Summe der Plaques in allen auswertbaren Verdünnungsstufen wird durch die Summe der Volumina an Viruslösungen dividiert. In diesen Volumina wurden die Verdünnungsstufen bereits in der Form berücksichtigt, so dass z.B. das Virusvolumen der 1:10-Verdünnung nicht mit 200 µl, sondern mit 20 µl angesetzt wurde.

4.5.5 Wachstumskinetiken zur Untersuchung afrikanischer GFV-Wildtypisolate

Um die biologischen Eigenschaften verschiedener GFV-Isolate zu vergleichen, wurden Wachstumskinetiken in Insektenzellen (Ap61) und humanen Leberzellen (HepG2) durchgeführt. Der Infektionsverlauf wurde hinsichtlich der infektiösen Viruspartikel im Zellkulturüberstand (Plaquetest), viraler Genomäquivalente im Zellkulturüberstand und in den Zellen (RT-PCR) und viralen Antigenen in den Zellen (indirekte Immunfluoreszenz) dokumentiert.

Alle für die Wachstumskinetiken verwendeten Virusstämme wurden auf Ap61-Zellen angezüchtet (4.5.3) und insgesamt 2x passagiert (4.4.1). Die Kinetiken wurden in 12-well-Platten durchgeführt, wobei jeweils eine Platte pro Virusstamm verwendet wurde und zusätzlich eine Platte als Negativkontrolle uniniziert gelassen wurde. In jede Vertiefung der Platte wurden $2,4 \times 10^5$ Zellen in einem Volumen von 400 µl des entsprechenden Mediums (Tabelle 4.15) eingesät und mit weiteren 400 µl Viruslösung infiziert. Die Viruslösung wurde vorher auf 6×10^3 PFU/ml eingestellt, so dass jedes Loch mit insgesamt $2,4 \times 10^3$ PFU infiziert wurde, was einer MOI (*multiplicity of infection*) von ca. 0,01 entspricht. Nach einer Infektionszeit von 4 h wurde das alte Medium entfernt und durch 2 ml frisches Medium pro Vertiefung ersetzt. So wurde ein Startpunkt für die Wachstumskurve gesetzt.

METHODEN

Die Ernte von jeweils einer Vertiefung pro Virusstamm erfolgte unmittelbar vor und nach dem Mediumwechsel sowie 22, 28, 50, 75, 99, 124 und 146 Stunden nach der Infektion. Jede Ernte wurde dabei wie folgt durchgeführt (Abb. 4.16): Die Überstände wurden abgenommen und in Aliquots à 500 µl bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgekratzt und anschließend in 500 µl PBS resuspendiert. Ein Tropfen dieser Lösung wurde auf einen Objektträger aufgetropft und für eine spätere Immunfluoreszenzfärbung wie unter 4.3.3 beschrieben fixiert. 250 µl der Zellsuspension wurden bei -80°C für spätere Analysen eingefroren. Die restlichen 250 µl wurden für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit sedimentiert, das Pellet in 350 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (RNeasy Mini Kit, Qiagen) aufgenommen und bis zur späteren RNA-Extraktion (4.5.2) ebenfalls bei -80°C gelagert.

Tabelle 4.15 Kultivierungsbedingungen für die Wachstumsversuche in Ap61- und HepG2-Zellen

Zelllinie	Medium	Zusätze	Temperatur	CO ₂
Ap61	L15	5% FKS; 1% Glutamin; 5% Tryptosephosphat; 1% Penicillin/Streptomycin; 0,05% Fungizone	28°C	0%
HepG2	RPMI	5% FKS; 1% Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin	37°C	5%

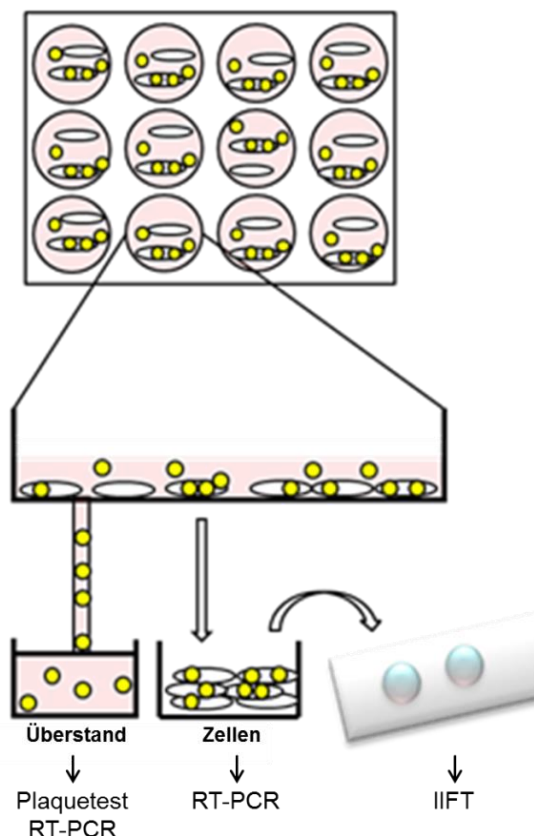


Abb. 4.16 Schematische Darstellung einer Ernte für die Wachstumskinetik zur Untersuchung afrikanischer GFV-Wildtypstämme. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur Verwendung im Plaquetest oder in der RT-PCR bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden zunächst in PBS resuspendiert und für einen indirekten Immunfluoreszenztest auf einem Objektträger fixiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und das Zellpellet in RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol für eine spätere Verwendung in der RT-PCR ebenfalls bei -80°C eingefroren.

4.5.6 Wachstumskinetik zur Untersuchung der Proteinexpression während einer GFV-Infektion

Um die Expression verschiedener Virusproteine während des Infektionsverlaufs zu untersuchen, wurden ähnlich wie in 4.5.5 VeroE6-Zellen mit dem GFV-Impfstamm 17D der Referenzcharge 354/1 infiziert und über einen Zeitraum von ca. einer Woche beobachtet. Dazu wurde für jeden Erntezeitpunkt eine Zellkulturflasche (75 cm²) mit jeweils $3,3 \times 10^6$ VeroE6-Zellen angesetzt. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 500 µl einer Viruslösung mit einer Konzentration von $6,6 \times 10^4$ PFU/ml infiziert (MOI 0,01) und für 1 h unter regelmäßigem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit 15 ml frischem Medium (DMEM + 5% FKS; 1% Glutamin; 1% Penicillin/Streptomycin) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Ernte von jeweils einer Zellkulturflasche erfolgte unmittelbar nach dem Mediumwechsel sowie 20, 45, 68, 91, 122, 145, 167 und 189 Stunden nach der Infektion. Jede Ernte wurde dabei wie folgt durchgeführt: Der Überstand wurde abgenommen, in Aliquots à 1 ml bei -80°C gelagert und im weiteren Verlauf zur Detektion infektiöser viraler Partikel (4.5.4) sowie für den Nachweis extrazellulären NS1-Proteins im Western Blot (4.2.1, 4.2.2, 4.3.2) verwendet. Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend in 6 ml PBS abgeschabt und resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde auf einem Objektträger fixiert und bei -20°C für eine spätere Immunfluoreszenzfärbung gelagert (4.3.3). Der Rest wurde ebenfalls zu je 1 ml aliquotiert und die Zellen für 5 min bei 500xg sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -80°C gelagert. Ein Aliquot wurde direkt zur Aufreinigung zellulärer Proteine weiter verarbeitet (4.2.3).

4.6 Mikrobiologische Methoden

4.6.1 Anzucht von *E.coli*-Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien wurde je nach Verwendungszweck in Flüssigmedium (LB-Flüssigmedium) oder auf festem Kulturmedium (LB-Medium plus 15 g/l Select Agar) durchgeführt. Zur speziellen Selektion von Bakterien mit natürlicher oder durch Plasmide erworbener Antibiotikaresistenz wurde dem Kulturmedium das jeweilige Antibiotikum in der empfohlenen Endkonzentration zugegeben (3.10). Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37°C im Bakterenschüttler (Flüssigmedium) oder im Brutschrank.

4.6.2 Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienkulturen wurden 850 µl einer frischen Übernachtskultur mit 150 µl sterilem Glycerin gemischt und in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

4.6.3 Plasmid-DNA-Isolierung in kleinem Maßstab (Minipräparation)

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit der Firma Invitex (Strattec Molecular) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 30-50 µl H₂O (bidest.) eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.6.4 Plasmid-DNA-Isolierung in großem Maßstab (Maxipräparation)

Für die Gewinnung größerer Plasmidmengen wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit oder das HiSpeed Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in 50-1000 µl H₂O (bidest.) eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.6.5 Herstellung kompetenter Bakterien mittels Calciumchlorid

Um Bakterien für die Aufnahme fremder DNA empfänglich zu machen (4.6.6), müssen sie zunächst mit geeigneten Chemikalien behandelt werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene hitzeschock-kompetente *E.coli*-Stämme durch eine Behandlung mit Calciumchlorid hergestellt.

Dazu wurden 200 ml einer Bakterienkultur herangezogen, bis eine OD₆₀₀ von 0,6-1 erreicht war (4.6.7). Anschließend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt und bei 6.000xg und 4°C für 5 min pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 40 ml eiskaltem TFB-I-Puffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 8 ml TFB-II-Puffer resuspendiert und die Bakteriensuspension in vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu je 50 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.6.6 Transformation Calciumchlorid-kompetenter Bakterien

Bei der hier angewendeten Hitzeschocktransformation wird die Bakterienmembran durch kurzfristiges Erhitzen permeabilisiert, so dass Fremd-DNA von außen in die Bakterien gelangen kann. Dazu wurden zunächst CaCl₂-kompetente Bakterien (4.6.5) langsam auf Eis aufgetaut und auf das 10-fache Volumen mit kaltem CaCl₂ (0,1 M) aufgefüllt. 100 µl dieser Bakteriensuspension wurden anschließend mit der zu transformierenden DNA-Lösung für 20 min auf Eis inkubiert, bevor ein Hitzeschock bei 44°C für 45 s erfolgte. In diesem Moment öffnen sich die Poren der Bakterienmembran und die DNA dringt in die Zelle ein. Zum Schließen der Membran wurden die Ansätze sofort auf Eis abgekühlt. Für eine erste Anreicherung der frisch transformierten Bakterien wurde dem Ansatz zunächst 200 µl Kulturmedium ohne Antibiotikum (LB- oder SOC-Medium) zugegeben und für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf Agar-Platten ausgestrichen,

die gegebenenfalls mit einem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion präpariert wurden. Die weitere Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

4.6.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Bakterienkulturen

Zur Bestimmung der Bakteriendichte in einer Flüssigkultur wird das Lambert Beer'sche Gesetz angewendet (Formel 4.3). Dabei wird die durch das Wachstum bedingte Trübung des Mediums bestimmt, indem 100 µl der Bakteriensuspension in einer Einwegküvette in einem Eppendorf Bio-Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gemessen werden.

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

Formel 4.4 Lambert Beer'sches Gesetz. Die Extinktion E bei der Wellenlänge λ ist gleich dem Produkt aus dem Extinktionskoeffizienten ε bei der Wellenlänge λ , der Schichtdicke d und der Konzentration des Absorbens c.

4.7 Phylogenetische Methoden

Um die evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen von Gelbfiebeviren zu analysieren, wurden phylogenetische Stammbäume basierend auf der viralen Gesamtgenomsequenz generiert. Diese wurden auf der Grundlage von *Maximum Likelihood* und *Bayesian Inference* berechnet. Die Erstellung von Stammbäumen erfordert die Durchführung verschiedener phylogenetischer Methoden, die im Folgenden entsprechend der Abfolge ihrer Anwendung erläutert werden.

4.7.1 Alignment

Um die Verwandtschaft von Nukleotidsequenzen zu bestimmen, müssen diese zunächst in geordneter Weise gegenübergestellt und verglichen werden. Dies wird in einem Alignment gemacht, bei dem Sequenzen durch einen mathematischen Algorithmus so gegenübergestellt werden, dass die Reihenfolge ihrer einzelnen Elemente erhalten bleibt. Bei nicht 100%iger Übereinstimmung können dabei Lücken oder Fehlpaarungen entstehen. Diese entsprechen eventuellen Mutationen und bilden die Grundlage für die spätere Berechnung der Abstammungsverhältnisse.

Für das Alignment von viralen Genomsequenzen wurde in dieser Arbeit das MUSCLE (*multiple sequence comparison by log-expectation*) alignment tool mit den standardmäßigen Einstellungen innerhalb der Software Geneious Pro™ Version 5.3.4 von Biomatters LTD verwendet (Kato et al., 2002, Kato and Toh, 2008).

4.7.2 Modelltest

Maximum Likelihood und *Bayesian Inference* sind Modell-basierte Methoden, bei denen die Unterschiede in den DNA-Sequenzen verschiedener Arten vor dem Hintergrund verschiedener Modelle der Sequenzevolution interpretiert werden. Diese Modelle beschreiben unterschiedliche Annahmen der Sequenzevolution und müssen für jeden Datensatz individuell bestimmt werden. Für diesen Zweck entwickelte Programme vergleichen anhand des jeweiligen Datensatzes die verschiedenen Modelle und geben eine Empfehlung für die besten Modelleinstellungen. Dabei wird z.B. die Wahrscheinlichkeit der möglichen Nukleotidsubstitutionen während der Sequenzevolution berücksichtigt.

Zur Bestimmung des besten Modells zur Sequenzevolution wurde hier das Programm jModeltest 0.1 (<http://darwin.uvigo.es/software/jmodeltest.html>) verwendet (Posada, 2008). Die Wahrscheinlichkeitsgrößen wurden auf drei Substitutionsmodelle eingestellt, alle anderen Werte wurden nach Standardeinstellungen verwendet. Die Modellauswahl wurde mit dem *Akaike Information Criterion* (AIC), einem statistischen Rechenmodell, berechnet.

4.7.3 Phylogenetische Stammbaumanalyse

Für die Erstellung von Stammbäumen gibt es verschiedene Methoden die auf unterschiedlichen statistischen Grundlagen beruhen. In dieser Arbeit wurden zwei Methoden vergleichend herangezogen, um eine größtmögliche Unterstützung der Ergebnisse zu erzielen.

4.7.3.1 *Maximum Likelihood-Methode*

Die Stammbaumberechnung mittels *Maximum Likelihood*-Analyse wurde mit dem Programm Seaview 4.2.12 durchgeführt (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>). Es wurden jeweils die Standardeinstellungen verwendet und in Anlehnung an das Ergebnis des Modelltests das entsprechende Evolutionsmodell eingestellt (GTR bzw. GTR+G [*General Time-Reversible Model (with gamma distributed rate variation among sites)*]). Zur Berechnung wurden 500 oder 1000 *Bootstrap*-Replikate durchgeführt.

4.7.3.2 *Bayesische Methode*

Die *Bayesische* Analyse zur Stammbaumberechnung wurde mit dem Programm MrBayes 3.1.2 durchgeführt (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) und bestand aus zwei parallelen Läufen mit jeweils 4 *chains* (Suchalgorithmen). Entsprechend dem Resultat des Modelltests wurde auch hier ein GTR+G Modell spezifiziert. Beide Läufe wurden über 10 Millionen Generationen beobachtet und die Daten jeder 100. Generation gespeichert. Der Temperaturkoeffizient für die *chains* – ein Maß dafür, dass auf der Suche nach den besten Bäumen Zwischenschritte mit geringerer Wahrscheinlichkeit akzeptiert werden - wurde auf

0,1 gesetzt, um einen ausreichenden Kettenaustausch zu gewährleisten. Alle Läufe erreichten Stationarität während der Berechnung (mittlere Standardabweichung der geteilten Häufigkeit $<0,1$). Zur Überprüfung der Konvergenz der Modellwahrscheinlichkeit und Parameter wurde das Programm Tracer v1.5 verwendet (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). Die 10% aller Bäume mit den schlechtesten statistischen Wahrscheinlichkeitswerten wurden als *burn-in* verworfen. Aus den verbleibenden Bäumen wurde anschließend ein 50% *Majority-rule*-Konsensusbaum in MrBayes 3.1.2 berechnet (<http://mrbayes.sourceforge.net/>).

4.7.4 Stammbaumvisualisierung

Alle berechneten Konsensusbäume wurden mit dem Programm Figtree v1.3.1 visualisiert und zur *Outgroup* hin gewurzelt (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bäume als Kladogramm dargestellt.

5. ERGEBNISSE

5.1 Epidemiologische Untersuchungen von GFV-Isolaten

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Sequenzanalysen und phylogenetischen Analysen sowie der Untersuchungen der biologischen Eigenschaften verschiedener Gelbfieberevirusisolate dargestellt. Dabei konzentriert sich der erste Teil auf die Untersuchung von GFV-Impfstämmen, im zweiten Teil werden vorwiegend westafrikanische Wildisolate im Vergleich zu den Referenzstämmen Asibi und 17D behandelt.

5.1.1 Phylogenie von GFV-17D-Impfstoffen

Um den Forderungen des letzten WHO-Meetings zur Herstellung und Bewertung von GFV-Impfstoffen nachzugehen und die bisherige Dokumentation der Impfstoffe durch molekularbiologische Daten zu ergänzen (Ferguson et al., 2010) (1.3.3; 2.1.1), wurde das Genom verschiedener Produktionspassagen des GFV-Impfstoffes der Firma Crucell Switzerland AG sequenziert und analysiert. Zusätzlich wurde ein Stammbaum erstellt, der neben den in dieser Arbeit entstandenen Vollgenomen auf den kompletten Genomsequenzen aller öffentlich verfügbaren GFV-Impfstoffe basiert (Sequenzdatenbank NCBI GenBank). Dieser wurde anschließend mit der bisher verfügbaren historischen Genealogie verglichen (6.1.1).

5.1.1.1 Sequenzanalysen

Für die Genomsequenzierung wurde von der Firma Crucell Switzerland AG cDNA der GFV-Impfpassagen RKI YFV Vaccine (Impfstoff), Flavimun WSL (Impfstoff, *working seed lot*) und TVX Flavimun (Impfstoff) zur Verfügung gestellt. Als Referenz wurde die virale RNA aus einer kommerziell erwerblichen Impfpampulle des Impfstoffes Stamaril® der Firma Sanofi Pasteur isoliert und ebenfalls zu cDNA umgeschrieben (3.13.1; 4.1.1). Ausgehend von der cDNA wurden je Virusstamm mindestens 20 PCR-Produkte generiert, die das gesamte virale Genom abdecken und gegenseitig überlappen (4.1.6). Alle PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und durch eine anschließende Gelextraktion aufgereinigt (4.1.3; 4.1.4). Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die einzelnen Impfstämme niemals parallel, sondern immer nacheinander und möglichst an unterschiedlichen Tagen bearbeitet.

Für alle drei Impfstämme der Firma Crucell Switzerland AG wurden vollständige Genomsequenzen erhalten und in der Sequenzdatenbank NCBI GenBank veröffentlicht (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; JN628279, JN628280, JN628281). Die Sequenzierung des als Kontrolle verwendeten GFV-Impfstammes Stamaril bestätigte das

ERGEBNISSE

interne Sequenzierergebnis der Firma Sanofi Pasteur (Barban et al., 2007) und beinhaltet eine Heterogenität der Viruspopulation an Nukleotidposition 4054, die jedoch keine Auswirkung auf Proteinebene hat. Die Durchführung der Sequenzierung konnte somit als verlässlich eingestuft werden. Zwischen den drei Impfstämmen der Firma Crucell Switzerland AG konnten keine Sequenzunterschiede festgestellt werden.

Unter Verwendung dieser neuen Sequenzen wurde das Genom aller bisher veröffentlichten GFV-17D-Impfstämme (3.14) miteinander verglichen und analysiert. Tabelle 5.1 zeigt die Nukleinsäureunterschiede zwischen den Genomen aller GFV-17D-Sequenzen.

Insgesamt finden sich 84 Sequenzunterschiede zwischen den GFV-Impfstoffen die sich über das gesamte Genom verteilen, was einer Homologie von 99,2% entspricht. 55 dieser Nukleotidunterschiede resultieren in der gleiche Aminosäure und sind daher als stille Mutationen einzuordnen, wohingegen sich 29 Nukleotidunterschiede auf die Proteinebene auswirken (*missense*-Mutation). Die sich auswirkenden Mutationen akkumulieren im Bereich des E-Proteins (34%) und des NS5-Proteins (24%).

Zwischen den beiden Gruppen der 17D- und 17DD-Impfstoffe zeigen sich 56 Nukleotidunterschiede, von denen 18 eine Auswirkung auf die Proteinsequenz haben. Davon sind nur 12 Nukleotide übereinstimmend für alle 17DD-Impfstämme, wovon sich wiederum nur 6 in der Proteinstruktur widerspiegeln (Table 5.1).

Der chinesische Impfstamm 17D-Tiantan grenzt sich mit 13 Nukleotidunterschieden und 6 Aminosäureaustauschen von allen anderen 17D-Impfstämmen ab. Diese Unterschiede stellen für 17D-Tiantan Alleinstellungsmerkmale dar.

ERGEBNISSE

Tabelle 5.1: Sequenzunterschiede im Genom aller verfügbaren GFV-Impfstoffsequenzen. Abweichende Nukleotide sind durch fettgedruckte Buchstaben hervorgehoben; Mutationen, die sich auf die Proteinsequenz auswirken, sind grau hinterlegt. Ein "Y" steht für die Basen C oder T an dieser Position.

	C		PrM				E										NS1													
	Nucleotide position	142	237	370	490	643	883	1003	1140	1150	1431	1436	1437	1491	1558	1692	1946	2003	2110	2219	2220	2356	2677	3470						
17D	Stamaril® YF-vaccine	A	C	C	G	A	G	T	T	G	A	G	A	T	C	C	T	A	G	A	C	T	C	A						
	YF-AVD2791-93F 04 from spain	A	C	C	G	A	G	T	T	G	A	G	A	T	C	C	T	A	G	A	C	T	C	A						
	Crucell® TVX Flavimun	A	C	C	G	A	G	T	T	G	C	G	A	T	C	C	T	A	G	A	C	T	C	A						
	Crucell® Flavimun WSL	A	C	C	G	A	G	T	T	G	C	G	A	T	C	C	T	A	G	A	C	T	C	A						
	RKI YFV vaccine YFV-17D-213	A	C	C	G	A	G	T	T	G	C	G	A	T	C	C	T	A	G	A	C	T	C	A						
	YFV-17D-204.2	A	C	C	G	A	G	T	T	G	A	G	A	T	C	C	T	A	G	A	C	T	C	A						
	YFV-17D-204.1	A	C	C	G	A	G	T	T	G	A	G	A	T	C	C	T	A	G	A	C	T	C	A						
	YFV 17D-Tiantan China	G	T	C	A	A	G	T	T	A	A	G	A	C	C	T	T	A	G	A	C	T	C	G						
	YFV-17DD Brazil	A	C	C	G	A	A	T	C	G	A	G	A	T	C	C	C	G	G	A	C	C	C	A						
	YFV-17DD	A	C	T	G	G	A	T	C	G	A	A	G	T	A	C	C	A	A	G	T	T	C	A						
YFV-17DD case#1	A	C	T	G	G	A	T	C	G	A	A	G	T	A	C	C	A	G	G	T	C	T	A							
YEL-AVD Peru	A	C	T	G	G	A	Y	C	G	A	A	G	T	A	C	C	A	G	G	T	C	T	A							
17DD	YFV-17DD case#2	A	C	T	G	G	A	Y	C	G	A	A	G	T	A	C	C	A	G	G	T	C	T	A						
	YEL-AVD Peru	A	C	T	G	G	A	Y	C	G	A	A	G	T	A	C	C	A	G	G	T	C	T	A						
	NS2a	3599		3637	3668	4013	4054	NS2b		4204	4222	4523	4559	NS3			4612	4804	4873	4921	4942	4948	4957	4972	5115	5123	5153	5161	5225	5362
	Stamaril® YF-vaccine	T	C	C	T	Y	C	G	C	G	C	G	C	T	G	G	A	C	C	G	A	C	G	T	A	C				
	YF-AVD2791-93F 04 from spain	T	C	C	T	T	C	G	C	G	C	G	C	T	G	G	A	C	C	G	A	C	G	T	A	C				
	Crucell® TVX Flavimun	T	C	C	T	T	C	G	C	G	C	G	C	T	G	G	A	C	C	G	A	C	G	T	A	T				
	Crucell® Flavimun WSL	T	C	C	T	T	C	G	C	G	C	G	C	T	G	G	A	C	C	G	A	C	G	T	A	T				
	RKI YFV vaccine YFV-17D-213	T	C	C	T	T	C	G	C	G	C	G	C	T	G	G	A	C	C	G	A	C	G	T	A	T				
	YFV-17D-204.2	T	C	C	T	T	C	G	C	G	C	G	C	T	G	G	A	C	C	G	A	C	G	T	A	C				
	YFV-17D-204.1	T	C	C	T	T	C	G	C	G	C	G	C	T	G	G	A	C	C	G	A	C	G	T	A	C				
YFV 17D-Tiantan China	T	C	T	T	T	C	G	C	A	C	T	G	G	A	C	C	G	A	C	C	G	T	A	C						
YFV-17DD Brazil	T	C	C	C	C	C	A	C	G	T	C	T	G	A	C	C	G	A	T	A	C	A	C	A						
YFV-17DD	C	T	C	C	C	T	G	C	G	T	T	T	G	G	C	T	A	G	C	A	T	C	A							
YFV-17DD case#1	C	T	C	C	C	T	G	Y	G	T	T	T	G	G	C	T	A	G	C	A	T	C	C							
YEL-AVD Peru	C	T	C	C	C	T	G	Y	G	T	T	T	A	G	Y	T	A	G	C	A	T	C	C							
YFV-17DD case#2	C	T	C	C	C	T	G	Y	G	T	T	T	A	G	Y	T	A	G	C	A	T	C	C							
YEL-AVD Peru	C	T	C	C	C	T	G	Y	G	T	T	T	A	G	Y	T	A	G	C	A	T	C	C							

ERGEBNISSE

Tabelle 5.1: Fortsetzung

	Nucleotide position	NS3				NS4a				NS4b						NS5								
		5393	5641	6070	6280	6418	6514	6529	6625	6673	6758	6947	7319	7496	7497	7571	7701	7975	8029	8099	8808	9397	9522	9523
17D	Stamaril® YF-vaccine	T	G	C	C	T	T	T	A	T	A	C	A	T	T	A	G	C	T	G	A	A	T	G
	YF-AVD2791-93F 04 from spain	T	G	C	C	C	T	T	A	T	A	C	A	T	T	A	G	C	T	G	A	A	T	G
	Crucell® TVX Flavimun	T	G	C	C	T	T	T	A	T	A	C	A	C	T	A	G	C	T	G	A	A	T	G
	Crucell® Flavimun WSL	T	G	C	C	T	T	T	A	T	A	C	A	C	T	A	G	C	T	G	A	A	T	G
	RKI YFV vaccine YFV-17D-213	T	G	C	C	T	T	T	C	T	A	C	A	T	C	A	G	C	T	G	A	A	T	G
	YFV-17D-204.2	T	A	C	C	T	T	T	A	T	A	C	A	T	T	A	G	C	T	G	A	A	T	G
	YFV-17D-204.1	T	A	C	C	T	T	C	A	T	G	C	G	T	T	A	G	C	T	G	A	A	T	G
	YFV 17D-Tiantan China	T	G	C	G	T	T	T	A	T	A	C	A	T	T	A	G	C	T	G	A	A	T	G
17DD	YFV-17DD Brazil	C	G	T	C	T	T	A	T	A	T	A	T	T	C	A	C	T	A	G	A	A	T	
	YFV-17DD	T	G	T	C	T	C	T	C	T	A	C	A	T	T	C	A	T	C	G	G	G	T	
	YFV-17DD case#1	T	G	T	C	T	C	T	C	Y	A	C	A	T	T	C	A	T	C	G	G	G	T	
	YEL-AVD Peru																							
	YFV-17DD case#2 YEL-AVD Peru	T	G	T	C	T	C	T	C	Y	A	C	A	T	T	C	A	T	C	G	G	G	T	
	Nucleotide position	NS5							3'-NTR															
		9605	9783	9988	10144	10174	10243	10291	10367	10454	10550	10675	10722	10815	10847	10860								
17D	Stamaril® YF-vaccine	A	A	C	A	A	G	C	C	A	C	A	G	G	C	A								
	YF-AVD2791-93F 04 from spain	A	A	C	A	A	G	C	C	A	C	A	G	G	C	A								
	Crucell® TVX Flavimun	A	A	C	A	A	G	C	C	A	C	A	G	G	C	A								
	Crucell® Flavimun WSL	A	A	C	A	A	G	C	C	A	C	A	G	G	C	A								
	RKI YFV vaccine YFV-17D-213	A	A	C	A	A	A	C	C	A	C	A	G	G	C	A								
	YFV-17D-204.2	A	A	C	A	A	A	C	C	A	C	A	A	G	C	A								
	YFV-17D-204.1	G	A	C	A	A	A	C	C	G	C	A	G	G	C	A								
	YFV 17D-Tiantan China	A	A	C	G	A	G	C	C	A	C	A	G	A	C	T								
17DD	YFV-17DD Brazil	A	G	C	A	A	G	C	T	A	T	A	G	G	C	A								
	YFV-17DD	A	A	C	A	A	A	C	C	A	T	A	G	G	C	A								
	YFV-17DD case#1	A	A	C	A	A	G	C	T	A	T	A	G	G	A	A								
	YEL-AVD Peru																							
	YFV-17DD case#2 YEL-AVD Peru	A	A	Y	A	R	G	Y	T	A	T	R	G	G	A	A								

5.1.1.2 Phylogenie

Mit allen verfügbaren Genomsequenzen von GFV-Impfstämmen (3.14) wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt, der den bisherigen historischen Stammbaum ergänzen soll. Als Außengruppe wurde die Genomsequenz des verwandten Flavivirus Denguevirus-Typ1 verwendet. Zusätzlich wurde das Genom der GFV-Wildtypstämme Asibi und *French viscerotropic virus* mit einbezogen (3.14). Der Stammbaum wurde vergleichend mit zwei verschiedenen mathematischen Verfahren erstellt, um die Abstammungsverhältnisse mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit zu bestätigen. Dazu wurde einerseits ein *Bayesischer* Algorithmus und andererseits das *Maximum Likelihood*-Verfahren verwendet (4.7).

Die aus den unterschiedlichen Verfahren abgeleiteten Stammbäume zeigen eine große Übereinstimmung hinsichtlich ihrer Topologie und statistischen Validität. Abb. 5.1 zeigt den Konsensusbaum basierend auf dem *Bayesischen* Algorithmus. Die Werte an den Knotenpunkten beschreiben die entsprechenden *posterior probability* (pp)-Werte zur Veranschaulichung der statistischen Validität. In Klammern sind zusätzlich die *Bootstrap* (bs)-Werte der *Maximum Likelihood*-Analysen mit jeweils 500 und 1000 *Bootstraps* angegeben.

In allen Analysen ist die Klade der 17DD-Impfstoffe, die vorwiegend in Südamerika verabreicht werden, mit starker statistischer Validität (0,96 pp, 97 bs, 98 bs) klar von der Klade der 17D-Impfstoffe abgegrenzt (Abb. 5.1).

Innerhalb der 17D-Impfstoffe bilden die Stämme 17D-204 aus den USA und vom Institut Pasteur im Senegal (YFV-17D-204_1 und YFV-17D-204_2) (Dupuy et al., 1989, Rice et al., 1985) eine gut unterstützte Untergruppe (1 pp, 89 bs, 88 bs). Eine weitere Untergruppe wird durch die Impfstämme der Firma Crucell Switzerland AG, den früheren Impfstoff des Robert Koch-Instituts (RKI YFV vaccine) und den Stamm 17D-213, der von der WHO für die Impfstoffherstellung zur Verfügung gestellt wird (dos Santos et al., 1995, Pfister et al., 2005, WHO/BS/10.2131, (ECSB 2008)), gebildet und besonders in der *Bayesischen* Analyse unterstützt (0,99 pp, 69 bs, 70 bs). Die beiden obengenannten Untergruppen liegen innerhalb einer Polytomie zusammen mit dem französischen Impfstoff Stamaril[®], einem Isolat eines Impfwischenfalles aus Spanien (YEL-AVD2791-93F 04) (Doblas et al., 2006) sowie dem chinesischen Impfstamm 17D-Tiantan.

Der Wildtypstamm Asibi steht zu den 17D-Impfstoffen in einem Schwesterngruppenverhältnis, genauso wie der Impfstamm *French neurotropic virus* zu dem Wildtypstamm *French viscerotropic virus*. Des Weiteren stehen die Wildtypstämme Asibi und *French viscerotropic virus* in einem Schwesternverhältnis.

ERGEBNISSE

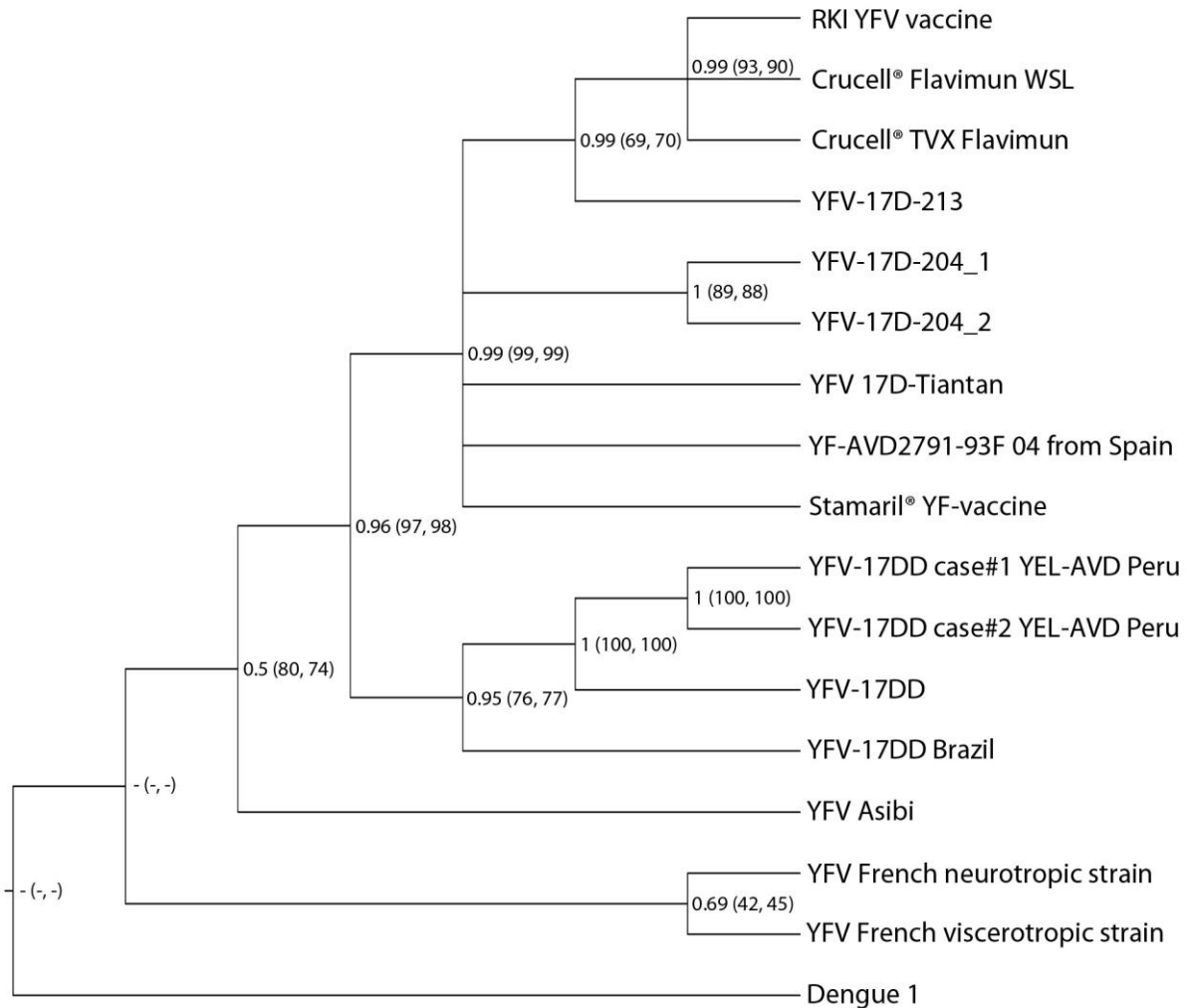


Abb. 5.1: Konsensusbaum der *Bayesischen* Analyse mit 10 Millionen Generationen, basierend auf dem Gesamtgenom von GFV-Impfstoffen. *Posterior probability*-Werte befinden sich an den entsprechenden Knotenpunkten. Die entsprechenden *Bootstrap*-Werte der *Maximum Likelihood*-Analysen mit 500 und 1000 *Bootstraps* sind in Klammern zusätzlich angegeben. Ein ‚-‘ besagt, dass ein bestimmter Ast statistisch nicht unterstützt ist.

5.1.2 Phylogenetische und biologische Charakterisierung westafrikanischer Gelbfiebervirusisolate

Durch Sequenzierung und anschließende Stammbaumanalysen des E-Protein-Genomabschnittes von westafrikanischen GFV-Isolaten konnten Sall et al. 2010 zeigen, dass in Westafrika mindestens sechs verschiedene GFV-Linien zirkulieren. Damit konnten sie darlegen, dass die genetische Variabilität innerhalb eines Genotyps höher ist als zuvor angenommen (Sall et al., 2010).

Um diese Ergebnisse zu vertiefen, sollte das Gesamtgenom ausgewählter Isolate dieser westafrikanischen GFV-Linien analysiert und die Abstammungsverhältnisse von GFV-Wildtypstämmen in einem phylogenetischen Stammbaum geklärt werden. Zusätzlich sollten die biologischen Eigenschaften der verschiedenen GFV-Linien in Wachstumsanalysen

miteinander verglichen und die Ergebnisse mit den Resultaten der Sequenzanalyse korreliert werden.

5.1.2.1 Sequenzanalysen

Von allen durch Sall et al. (2010) beschriebenen westafrikanischen GFV-Linien wurde mindestens je ein Isolat für die Sequenzierung des gesamten Virusgenoms ausgewählt (mit Ausnahme von Linie 2, die mit nur einem Isolat beschrieben wurde und in dieser Studie nicht zur Verfügung stand). Außerdem wurden fünf bisher nicht charakterisierte GFV-Isolate sequenziert (Isolate 6857, 6858, 6865, 6866 und 6867), die im Jahre 2005 im Senegal aus Mücken isoliert wurden. Diese Isolate wurden innerhalb dieser Arbeit der Linie 4 zugeordnet und werden daher im weiteren Verlauf dementsprechend bezeichnet. Tabelle 5.2 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit charakterisierten Virusisolate und enthält die Bezeichnung, die nach Sall et al. beschriebene Linie, die Isolationsquelle sowie Ort und Jahr der Isolierung des jeweiligen GFV-Isolates.

Tabelle 5.2: Westafrikanische Gelbfieberviren, die in dieser Arbeit sequenziert und analysiert wurden (bereitgestellt vom Institut Pasteur de Dakar, Senegal).

Isolat Nr.	Linie	Isoliert aus	Jahr	Ort
333	3	Ae. aegypti *	1995	Koungheul, Sn
335	3	Ae. aegypti *	1995	Koungheul, Sn
357	4	Ae. furcifer	2001	Kedougou, Sn
351	5	Ae. furcifer	2000	Kedougou, Sn
345	5	Ae. furcifer	2000	Kedougou, Sn
350	5	Ae. taylori	2000	Kedougou, Sn
258	6	Human	1995	Koungheul, Sn
314	6	Ae. furcifer	1996	Kedougou, Sn
307	1	Ae. africanus	1973	Ivory Coast
6857	4 ⁿ	Ae. furcifer	2005	Kedougou, Sn
6858	4 ⁿ	Ae. furcifer	2005	Kedougou, Sn
6865	4 ⁿ	Ae. taylori	2005	Kedougou, Sn
6866	4 ⁿ	Ae. luteocephalus	2005	Kedougou, Sn
6867	4 ⁿ	Ae. luteocephalus	2005	Kedougou, Sn

* isoliert aus männlichen oder frisch geschlüpften Mücken; ⁿ innerhalb dieser Arbeit zugeordnet; Sn=Senegal

Die Genomsequenzierung der GFV-Isolate wurde wie unter 4.1.6 beschrieben durchgeführt. Für alle Isolate konnten komplette Genomsequenzen ermittelt werden, die unter den Zugriffsnummern JX898868 bis JX898881 in der Sequenzdatenbank GenBank veröffentlicht wurden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; siehe auch 3.13, Tabelle 3.15).

Im Verlauf der Genomsequenzierung konnten zwei Positionen identifiziert werden, die keine eindeutige Basenzuordnung zulassen und deren Nukleotidbesetzung eine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz hat. Die erste Basenunklarheit ist ein „Y“ (C oder T) an Nukleotidposition 1140 (AS 56 des GFV-E-Proteins) des GFV-Isolates 357, was an dieser Stelle entweder zu der Aminosäure Alanin oder Valin führt. Die zweite unklare Base ist ein

ERGEBNISSE

„R“ (A oder G) und befindet sich an Position 1376 (AS 135 des GFV-E-Proteins) in der Sequenz der GFV-Isolate 6857, 6858, 6865, 6866 und 6867. In diesem Fall führen die jeweiligen Nukleotide entweder zur Ausprägung der Aminosäure Valin oder Isoleucin (Tabelle 5.3). Das Ergebnis der Sequenzierung zur Detektion der doppelten Basenzuordnungen ist in den Chromatogrammen in Abb. 5.2 dargestellt.

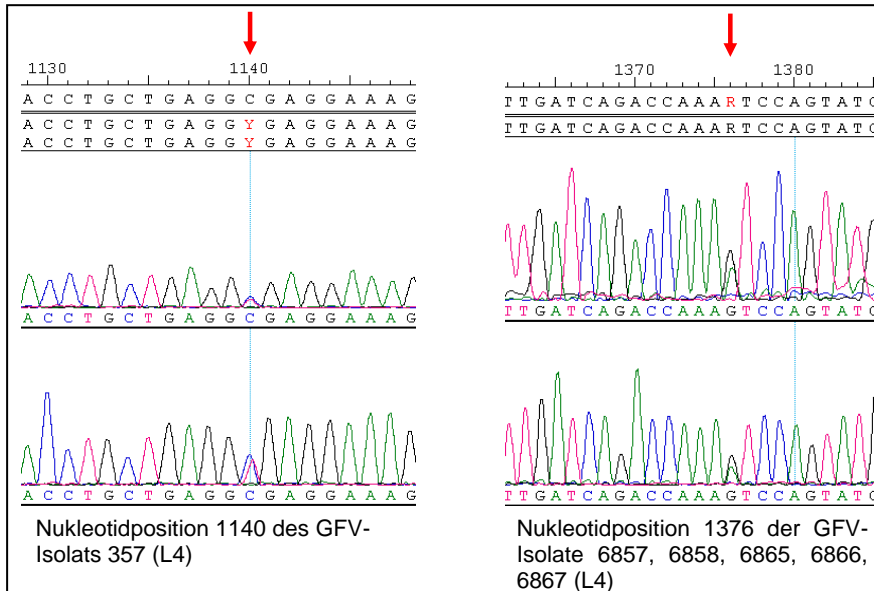


Abb. 5.2: Sequenzchromatogramme der Nucleotidpositionen 1140 und 1376 mit nicht eindeutiger Basenzuordnung für die GFV-Isolate 357, 6857, 6858, 6865, 6866 und 6867 (L4=Linie 4)

Die Aminosäuresequenz des viralen Polyproteins aller GFV-Isolate wurde nach erfolgreicher Sequenzierung gegenübergestellt und mit der Sequenz des Referenzstammes Asibi verglichen. Tabelle 5.3 fasst die AS-Differenzen im gesamten Polyprotein aller hier analysierten GFV-Isolate im Vergleich zur Aminosäuresequenz von Asibi zusammen. Abweichende Aminosäuren des jeweiligen Isolates von der Asibi-Sequenz sind grau hinterlegt.

Betrachtet man die Aminosäurevarianz zwischen den einzelnen Isolaten, so lassen sich die verschiedenen GFV-Linien erkennen (Tabelle 5.3). Die Varianz innerhalb einer Linie ist zwischen dem Isolat 357 und den im Jahre 2005 isolierten Viren 6857, 6858, 6865, 6866, 6867 für die Linie 4 mit 0,41% am größten, wohingegen die Isolate der Linie 5 eine Varianz von nur 0,18% und die der Linie 6 von 0,26% aufweisen. Linie 3 weist auf Proteinebene eine komplette Übereinstimmung zwischen den zugehörigen Sequenzen auf (Isolate 333 und 335), ebenso wie die Isolate 6857, 6858, 6865, 6866 und 6867 der Linie 4. Bei den letzteren ist bemerkenswert, dass diese Isolate zwar alle im selben Zeitrahmen und in der gleichen Region, jedoch aus verschiedenen Mückenarten isoliert wurden (Tabelle 5.2). Betrachtet man nur die Region des E-Proteins, errechnet sich eine Variabilität von 1,00% für Linie 4, 0,40% für Linie 5 und 0,00% für die Linien 6 und 3.

ERGEBNISSE

Tabelle 5.3: Aminosäureunterschiede im GFV-Polypeptid zwischen den in dieser Arbeit sequenzierten GFV-Isolaten und dem Referenzstamm Asibi. Angegeben ist die Aminosäureposition der Mutation in dem entsprechenden Protein, Unterschiede zu Asibi sind grau hinterlegt.

Protein:	C											prM			E											NS1							
	25	79	80	86	90	105	107	110	116	119	25	125	147	7	54	56	83	122	124	135	153	171	249	262	331	344	430	450	457	121	205	218	
Asibi	N	A	V	R	S	V	T	F	L	T	V	L	T	T	A	A	A	A	S	I	N	E	N	M	K	I	V	N	M	N	H	A	
L 1	307	N	A	V	R	S	V	T	F	L	A	V	L	T	T	A	A	A	A	S	I	N	E	N	M	K	V	I	S	M	N	H	T
L 3	333	N	A	A	R	G	V	T	F	L	T	M	F	T	A	V	A	A	A	S	I	K	E	D	M	R	I	V	N	I	N	H	A
	335	N	A	A	R	G	V	T	F	L	T	M	F	T	A	V	A	A	A	S	I	K	E	D	M	R	I	V	N	I	N	H	A
L 4	357	N	A	V	R	S	V	T	F	L	T	V	L	T	T	A	A/V	A	V	F	I	N	E	N	M	K	I	V	S	M	N	H	A
L4 "2005"	6857	N	V	V	R	S	V	T	F	L	T	V	L	T	T	A	A	V	A	S	I/V	N	E	N	M	K	I	V	S	M	N	H	A
	6858	N	V	V	R	S	V	T	F	L	T	V	L	T	T	A	A	V	A	S	I/V	N	E	N	M	K	I	V	S	M	N	H	A
	6865	N	V	V	R	S	V	T	F	L	T	V	L	T	T	A	A	V	A	S	I/V	N	E	N	M	K	I	V	S	M	N	H	A
	6866	N	V	V	R	S	V	T	F	L	T	V	L	T	T	A	A	V	A	S	I/V	N	E	N	M	K	I	V	S	M	N	H	A
	6867	N	V	V	R	S	V	T	F	L	T	V	L	T	T	A	A	V	A	S	I/V	N	E	N	M	K	I	V	S	M	N	H	A
L 5	345	N	A	V	R	S	A	T	L	I	A	V	L	T	T	A	A	A	A	S	I	N	E	N	T	K	I	V	S	M	S	H	A
	350	N	A	V	R	S	A	T	L	I	A	V	L	T	T	A	A	A	A	S	I	N	E	N	M	K	I	V	S	M	S	H	A
	351	N	A	V	R	S	A	T	L	I	A	V	L	T	T	A	A	A	A	S	I	N	K	N	M	K	I	V	S	M	S	H	A
L 6	258	N	A	V	R	S	A	A	F	L	A	V	L	M	T	A	A	A	A	S	I	N	E	N	M	K	I	V	S	M	N	H	A
	314	S	V	V	K	S	A	A	F	L	A	V	L	M	T	A	A	A	A	S	I	N	E	N	M	K	I	V	S	M	N	N	A

Protein:	NS1			NS2A									NS2B						NS3														
	240	276	326	3	35	55	82	105	147	189	220	9	45	47	54	60	79	126	13	89	111	192	253	254	280	347	397	444	515	535	545	594	
Asibi	E	K	S	I	V	T	I	T	T	Q	I	A	A	R	K	S	S	R	I	G	V	M	S	A	V	E	R	K	V	K	D	K	
L 1	307	D	K	N	V	M	T	I	T	V	Q	I	A	A	R	R	S	S	K	I	G	V	M	S	A	I	E	R	K	I	R	D	R
L 3	333	E	K	S	I	V	T	V	A	T	Q	I	A	A	R	K	A	S	R	V	G	V	K	S	A	I	E	R	K	V	K	D	K
	335	E	K	S	I	V	T	V	A	T	Q	I	A	A	R	K	A	S	R	V	G	V	K	S	A	I	E	R	K	V	K	D	K
L 4	357	E	R	S	I	V	T	I	T	T	Q	L	A	A	R	R	S	S	K	I	G	I	M	F	A	I	E	R	K	V	K	D	K
L4 "2005"	6857	E	R	S	I	V	I	I	T	T	Q	L	T	V	R	R	S	S	K	I	G	I	M	S	A	I	E	R	K	V	K	D	K
	6858	E	R	S	I	V	I	I	T	T	Q	L	T	V	R	R	S	S	K	I	G	I	M	S	A	I	E	R	K	V	K	D	K
	6865	E	R	S	I	V	I	I	T	T	Q	L	T	V	R	R	S	S	K	I	G	I	M	S	A	I	E	R	K	V	K	D	K
	6866	E	R	S	I	V	I	I	T	T	Q	L	T	V	R	R	S	S	K	I	G	I	M	S	A	I	E	R	K	V	K	D	K
	6867	E	R	S	I	V	I	I	T	T	Q	L	T	V	R	R	S	S	K	I	G	I	M	S	A	I	E	R	K	V	K	D	K
L 5	345	E	R	S	I	V	I	I	T	T	Q	L	A	A	R	R	S	N	K	I	G	V	M	S	A	I	E	R	K	V	K	G	K
	350	E	R	S	I	V	I	I	T	T	Q	L	A	A	R	R	S	N	K	I	G	V	M	S	A	I	E	R	K	V	K	D	K
	351	E	R	S	I	V	I	I	T	T	Q	L	A	A	G	R	S	N	K	I	G	V	M	S	A	I	E	R	R	V	K	D	K
L 6	258	E	R	S	I	V	T	I	T	T	Q	L	A	A	R	R	S	S	K	I	S	V	M	S	G	I	G	R	K	V	K	D	K
	314	E	R	S	I	V	T	I	T	T	R	L	A	A	R	R	S	S	K	I	G	V	M	S	A	I	E	R	K	V	K	D	K

ERGEBNISSE

Tabelle 5.3: Fortsetzung

Protein:	NS3		NS4A	2K	NS4B													NS5															
	613	614	30	9	8	16	18	19	32	95	98	117	121	145	165	182	246	2	78	108	138	162	245	258	275	292	295	335	531	594	641	643	
	Asibi	S	E	F	Y	K	K	N	L	L	I	V	M	S	E	A	A	K	S	I	D	V	V	R	I	K	S	Y	R	F	V	E	V
L 1	307	A	D	F	Y	R	R	N	L	L	I	V	M	T	K	A	A	E	R	T	E	V	V	R	I	R	T	Y	R	F	V	D	A
L 3	333	S	E	L	F	K	K	N	S	F	M	I	M	S	K	V	A	K	T	I	D	V	V	R	T	K	S	Y	K	L	V	E	V
	335	S	E	L	F	K	K	N	S	F	M	I	M	S	K	V	A	K	T	I	D	V	V	R	T	K	S	Y	K	L	V	E	V
L 4	357	A	D	F	Y	K	K	N	L	L	I	V	M	S	K	A	A	K	S	T	D	V	M	R	I	R	T	Y	R	F	V	E	A
L4 "2005"	6857	A	D	F	Y	K	K	N	L	L	I	V	M	S	K	A	A	N	R	T	D	V	M	R	I	R	T	Y	R	F	I	E	A
	6858	A	D	F	Y	K	K	N	L	L	I	V	M	S	K	A	A	N	R	T	D	V	M	R	I	R	T	Y	R	F	I	E	A
	6865	A	D	F	Y	K	K	N	L	L	I	V	M	S	K	A	A	N	R	T	D	V	M	R	I	R	T	Y	R	F	I	E	A
	6866	A	D	F	Y	K	K	N	L	L	I	V	M	S	K	A	A	N	R	T	D	V	M	R	I	R	T	Y	R	F	I	E	A
	6867	A	D	F	Y	K	K	N	L	L	I	V	M	S	K	A	A	N	R	T	D	V	M	R	I	R	T	Y	R	F	I	E	A
L 5	345	A	D	F	Y	K	K	D	L	L	I	V	T	S	K	A	S	K	R	T	D	V	M	R	I	R	T	Y	R	F	V	E	A
	350	A	D	F	Y	K	K	D	L	L	I	V	T	S	K	A	S	K	R	T	D	V	M	G	I	R	T	Y	R	F	V	E	A
	351	A	D	F	Y	K	K	D	L	L	I	V	T	S	K	A	S	K	R	T	D	V	M	R	I	R	T	Y	R	F	V	E	A
L 6	258	A	D	F	Y	K	K	D	S	L	I	V	T	S	K	A	A	K	R	T	D	M	M	R	I	R	T	H	R	F	V	E	A
	314	A	D	F	Y	K	K	D	S	L	I	V	T	S	K	A	A	K	R	T	D	M	M	R	I	R	T	Y	R	F	V	E	A

Protein:	NS5										
	645	652	657	660	680	810	815	833	878	882	
	Asibi	T	T	N	K	L	T	E	M	I	K
L 1	307	A	I	D	K	M	P	E	V	I	K
L 3	333	T	T	N	R	L	T	E	M	V	K
	335	T	T	N	R	L	T	E	M	V	K
L 4	357	T	T	D	K	L	T	G	V	I	R
L4 "2005"	6857	T	T	D	K	L	T	G	V	I	K
	6858	T	T	D	K	L	T	G	V	I	K
	6865	T	T	D	K	L	T	G	V	I	K
	6866	T	T	D	K	L	T	G	V	I	K
	6867	T	T	D	K	L	T	G	V	I	K
L 5	345	A	T	D	K	L	T	G	V	I	K
	350	A	T	D	K	L	T	G	V	I	K
	351	A	T	D	K	L	T	G	V	I	K
L 6	258	T	T	D	K	L	T	G	V	I	K
	314	T	T	D	K	L	T	G	V	I	K

ERGEBNISSE

Vergleicht man die AS-Sequenz der verschiedenen GFV-Linien mit der Sequenz des Referenzstammes Asibi, so beobachtet man eine Sequenzabweichung zwischen 0,53% (Linie 4) und 1,08% (Linie 1) (Tabelle 5.4, zweite Spalte). Dabei wurden nur die Abweichungen gezählt, die allen Isolaten einer Linie gemeinsam sind und so innerhalb der Linie konserviert sind.

Betrachtet man jedoch die in der jeweiligen Linie einzigartig auftretenden Mutationen (Alleinstellungsmerkmale) im Verhältnis zu der Gesamtzahl an Mutationen zwischen dieser Linie und Asibi [Anzahl der Mutationen zu Asibi, die nur in dieser Linie auftreten / Gesamtanzahl der Mutationen dieser Linie zu Asibi], zeigen sich enorme Unterschiede zwischen den einzelnen Linien (Tabelle 5.4, dritte Spalte). Während der Anteil dieser Alleinstellungsmerkmale für die Linien 4, 5 und 6 zwischen 5,5 und 22,2% liegt, weist Linie 1 Alleinstellungsmerkmale in Höhe von 56,8% und Linie 3 von sogar 90,0% auf. Die meisten dieser Mutationen befinden sich für Linie 3 in den Proteinen E, NS4B und NS5 und für Linie 1 in den Proteinen NS3, NS4B und NS5 (Tabelle 5.4, vierte Spalte).

Tabelle 5.4 Anzahl der Aminosäureunterschiede der untersuchten GFV-Linien im Vergleich zu Asibi über das gesamte Polyprotein (zweite Spalte). Alleinstellungsmerkmale einer bestimmten Linie wurden auf die gesamten Abweichungen dieser Linie zu Asibi bezogen und prozentual dargestellt (dritte Spalte). Die genaue Lage der Alleinstellungsmerkmale im Polyprotein ist in der vierten Spalte separat aufgeschlüsselt.

GFV-Linie	Anzahl (%) der Aminosäureunterschiede im gesamten Polyprotein zu Asibi	Anzahl (%) der Alleinstellungsmerkmale*	Anzahl der Alleinstellungsmerkmale im Protein:										
			C	prM	E	NS1	NS2A	NS2B	NS3	NS4A	2K	NS4B	NS5
Linie 1	37 (1.08%)	21 (56.8%)	0	0	2	3	3	0	4	0	0	4	5
Linie 3	30 (0.88%)	27 (90.0%)	2	2	6	0	2	1	2	1	1	4	6
Linie 4 (357)	23 (0.67%)	5 (21.7%)	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	1
Linie 4 "2005"	27 (0.79%)	6 (22.2%)	0	0	2	0	0	2	0	0	0	1	1
Linie 4 (gesamt)	18 (0.53%)	1 (5.5%)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Linie 5	29 (0.85%)	5 (17.2%)	2	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
Linie 6	26 (0.76%)	3 (11.5%)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

* Anzahl der Mutationen, die nur in der jeweiligen Linie auftreten. Prozentangaben beschreiben den Anteil der Alleinstellungsmerkmale der jeweiligen Linie gemessen an ihren Gesamtunterschieden zu Asibi (Spalte zwei)

Beim Vergleich des nicht-translatierten 3'-Endes (Abb. 5.3) fallen zwei Besonderheiten im Isolat 307 (Linie 1, Ivory Coast 1973) auf: Die erste ist eine Insertion an Nukleotidposition 3 (gezählt von Beginn des Stopkodons), die andere ist eine Deletion an Position 174. Die selbe Deletion wurde bereits für ein anderes Isolat (YFV 85-82H Ivory Coast), das ebenfalls aus der Elfenbeinküste stammt, beschrieben (Pisano et al., 1997). Die Insertion wurde in diesem Fall jedoch an Nukleotidposition 304 gefunden. Insgesamt weisen diese beiden Isolate eine große Ähnlichkeit in der Sequenz des 3'-NTRs auf (Abb. 5.3).

Die Isolate der Linie 3 weisen insgesamt vier für sie einzigartige Mutationen im 3'-NTR auf. Hierbei handelt es sich um die Nukleotide 7, 8, 54 und 449. Für Linie 4 sind in diesem Bereich zwei Nukleotidunterschiede zu finden (Nukleotide 117 und 126), für Linie 5 drei

ERGEBNISSE

(Nukleotide 12, 204 und 288), und für Linie 6 sind es ebenfalls zwei Nukleotide (113 und 138) (Abb. 5.3).

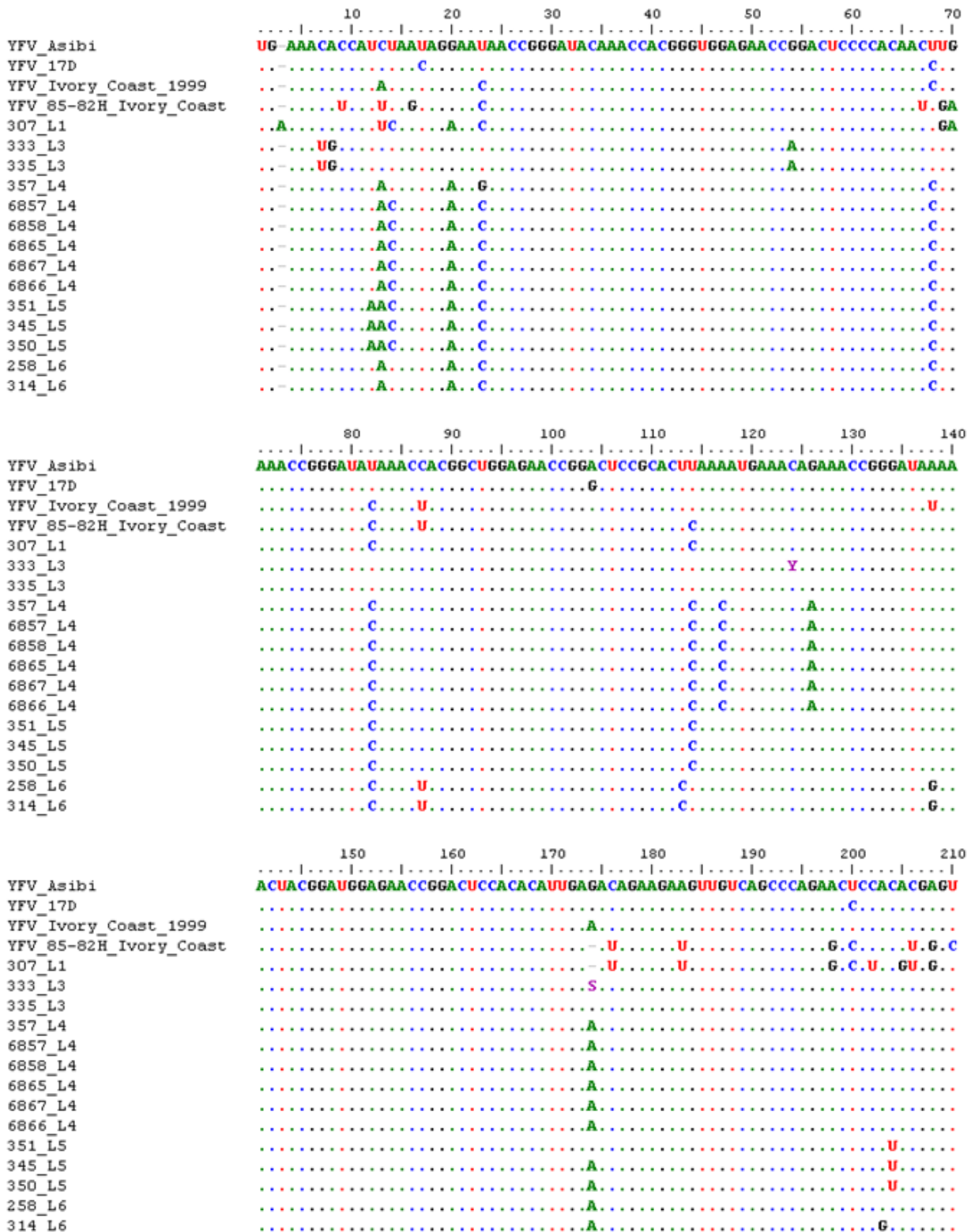


Abb. 5.3: Alignment der RNA-Sequenz des 3'-NTRs von 18 westafrikanischen GFV-Isolaten. Die Sequenz der in dieser Arbeit sequenzierten GFV-Isolate wurde mit den Sequenzen der GFV-Stämme Asibi und 17D sowie mit zwei Isolaten der Elfenbeinküste (YFV Ivory Coast 1999 und YFV 85-82H Ivory Coast) verglichen. Die Sequenzen für den Vergleich wurden aus der Sequenzdatenbank GenBank erhalten (3.14, Tabelle 3.16). Punkte zeigen eine Übereinstimmung in der Sequenz mit dem Referenzstamm Asibi an. L1-L6 zeigt die von Sall et al. (2010) beschriebene GFV-Linie an.

ERGEBNISSE

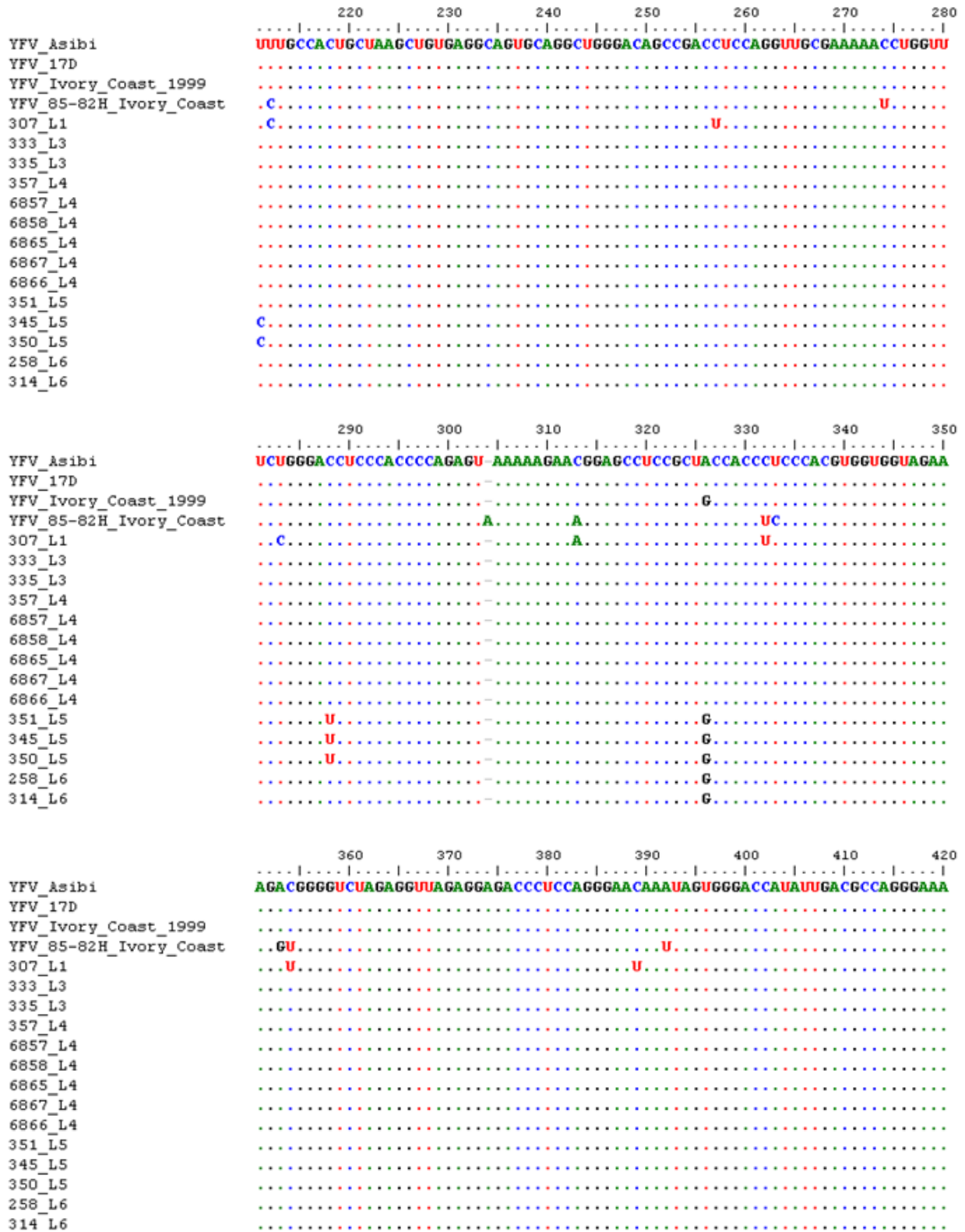


Abb. 5.3: Fortsetzung

ERGEBNISSE

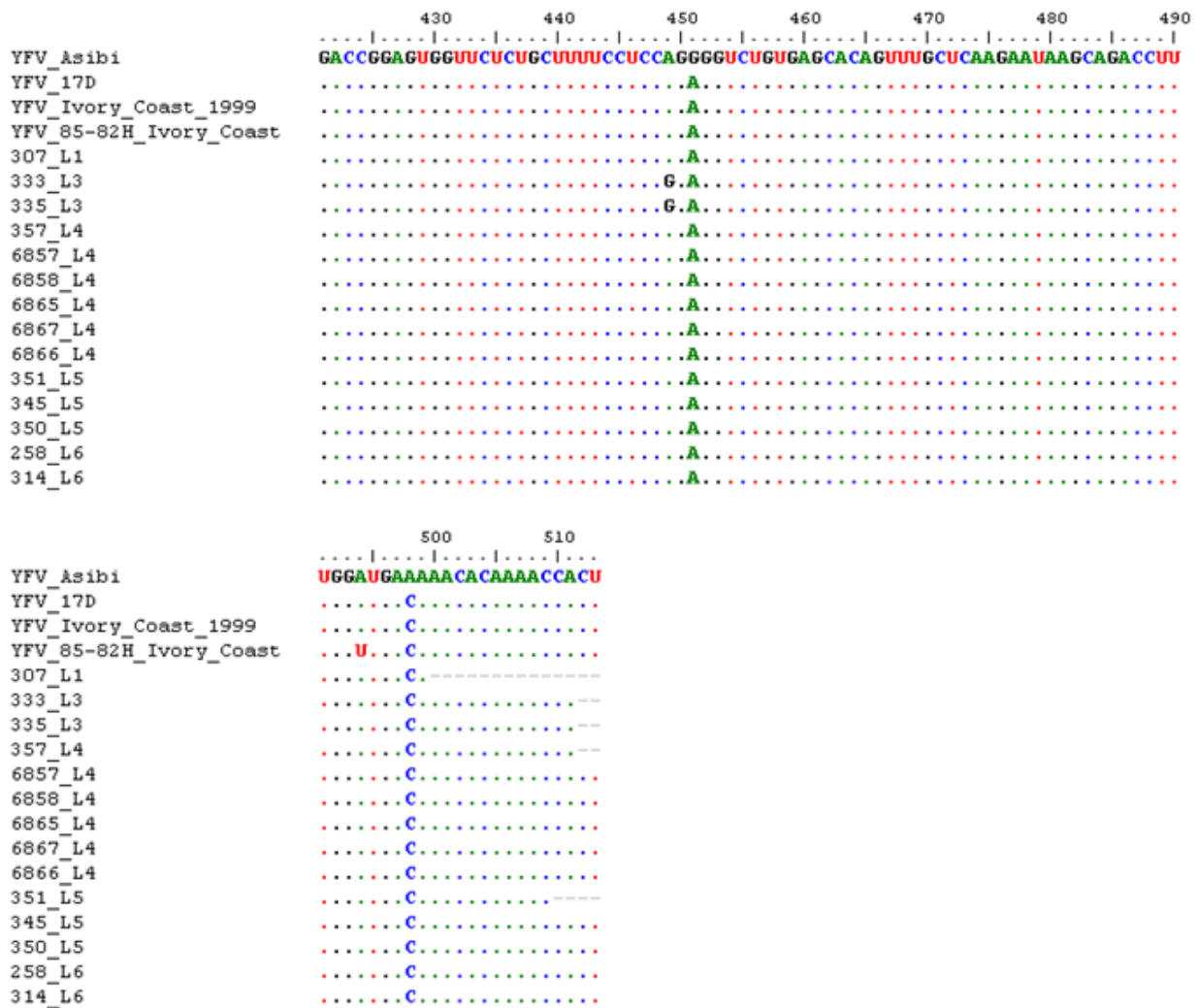


Abb. 5.3: Fortsetzung

5.1.2.2 Phylogenie von GFV-Wildtypstämmen

Für die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes, basierend auf dem viralen Gesamtgenom von Wildisolaten, wurden insgesamt 24 GFV-Genomsequenzen verwendet. 14 Isolate wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal sequenziert (Abschnitt 5.1.2.1, Tabelle 5.2 und Abschnitt 3.13, Tabelle 3.15), 10 waren öffentlich in der Sequenzdatenbank GenBank zugänglich (Abschnitt 3.14, Tabelle 3.16). Die Genomsequenzen wurden wie in 4.7.1 beschrieben zusammen mit der als Außengruppe dienenden Genomsequenz des Sepik-Virus aligned (Abschnitt 3.14, Tabelle 3.16). Der Modelltest, die Stammbaumberechnung nach der *Maximum Likelihood* (ML)-Methode mit 1000 *Bootstraps* und der *Bayesischen* Methode mit 10 Millionen Generationen sowie die Stammbaumvisualisierung wurden wie unter 4.7 beschrieben durchgeführt.

Insgesamt stimmt der Stammbaum der ML-Analyse hinsichtlich seiner Topologie mit dem Stammbaum der *Bayesischen* Berechnung überein. Abbildung 5.4 zeigt den Konsensusbaum der *Bayesischen* Berechnung. Die entsprechenden

ERGEBNISSE

Wahrscheinlichkeitswerte (*posterior probability* = pp) sind an den jeweiligen Knotenpunkten angegeben. Um die Unterstützung durch die Stammbaumberechnung mit der ML-Analyse zu veranschaulichen, sind die entsprechenden *Bootstrap*- (bs-) Werte zusätzlich in Klammern angegeben.

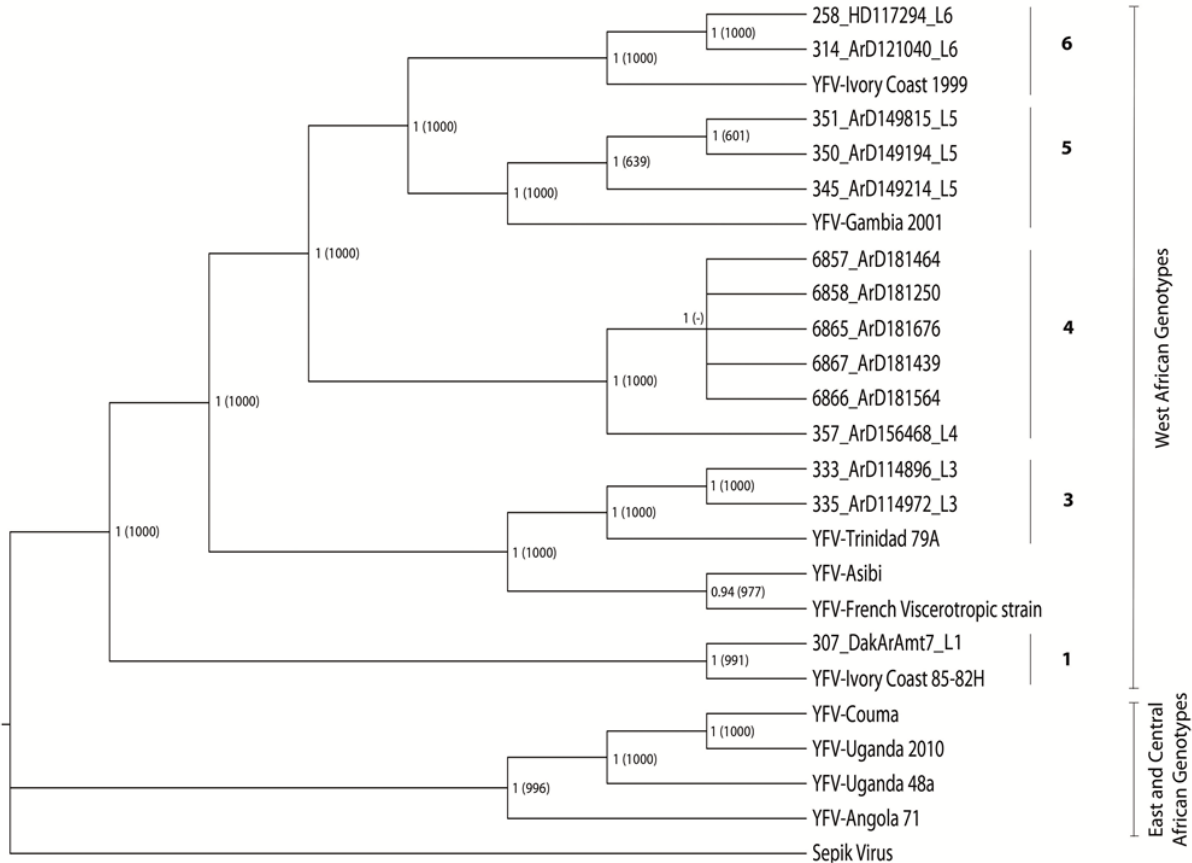


Abb. 5.4 Konsensusbaum der *Bayesischen* Stammbaumanalyse mit 10 Millionen Generationen basierend auf dem Gesamtgenom von GFV-Wildtypisolaten. Die *posterior probability* (pp)-Werte sind an den entsprechenden Knotenpunkten angegeben, und die *Bootstrap* (bs)-Werte der ML-Berechnungen mit 1000 Bootstraps stehen als zusätzliche Unterstützung in Klammern. Nicht unterstützte Werte von weniger als 500 bs bzw. 0,5 pp sind mit einem “-“ angegeben. Die bereits nach Sall et al. (2010) vorcharakterisierten GFV-Stämme sind am Ende ihrer Bezeichnung mit L1 bis L6 (Linie 1-6) gekennzeichnet. Zur Vereinfachung sind die entsprechenden Linien der westafrikanischen Genotypen am rechten Bildrand zusätzlich zusammengefasst (1-6).

Der Stammbaum zeigt eine klare Abgrenzung der ost- und zentralafrikanischen Genotypen (repräsentiert durch die Virusstämme Couma, Uganda 2010, Uganda 48a und Angola 71) von den westafrikanischen Genotypen.

Die westafrikanischen Genotypen gruppieren sich entsprechend der bereits zuvor beschriebenen Linien (Sall et al., 2010). Die erste Gruppe beinhaltet das Isolat 307 der Linie 1 und ein weiteres Isolat aus der Elfenbeinküste (YFV-Ivory Coast 85-82H), die zweite Gruppe wird durch die beiden Referenzstämme *Asibi* und *French viscerotropic virus* beschrieben. In der dritten Gruppe befinden sich die Isolate der westafrikanischen Linie 3 (333, 335) und der Stamm Trinidad 79A als einziger Vertreter aus Südamerika. Die vierte

Gruppe spiegelt Linie 4 wider und schließt das Isolat 357 sowie die im Jahre 2005 isolierten Viren 6857, 6858, 6865, 6867 und 6866 ein. Aufgrund ihrer kompletten Sequenzidentität (Abschnitt 5.1.2.1) repräsentieren die letzteren einen einzigen Virusstamm und erscheinen daher in diesem Baum in einer Polytomie.

Gruppe 5 beinhaltet neben den Isolaten der Linie 5 (345, 350, 351) einen Virusstamm aus Gambia (YFV-Gambia 2001), und Gruppe 6 repräsentiert die Isolate der Linie 6 (314, 258) zusammen mit einem weiteren Isolat aus der Elfenbeinküste (YFV-Ivory Coast 1999).

5.1.2.3 Wachstumsanalysen westafrikanischer GFV-Isolate

Um die Auswirkung von Sequenzmerkmalen auf die phänotypischen Eigenschaften von Gelbfiebertviren zu untersuchen, wurden Wachstumskinetiken mit jeweils einem Isolat der verschiedenen GFV-Linien in Moskitozellen (Ap61) und humanen Leberzellen (HepG2) durchgeführt. Diese beiden Zelllinien wurden ausgewählt, um das natürliche Wirtsreservoir des GFV (Mücken und Primaten) widerzuspiegeln. Die Isolate 333 (Linie 3), 357 (Linie 4), 345 (Linie 5), 314 (Linie 6) und 307 (Linie 1) wurden stellvertretend für die jeweiligen GFV-Linien ausgewählt, während der Wildtypstamm Asibi und der Impfstamm 17D (RKI #142/94/1) als Referenz mitgeführt wurden (3.13).

Die Wachstumsanalysen wurden wie unter 4.5.5 beschrieben über einen Zeitraum von sechs Tagen durchgeführt. Der Infektionsstatus wurde durch lichtmikroskopische Beobachtung, Immunfluoreszenzfärbung der infizierten Zellen (4.3.3) sowie durch den Nachweis viraler Genomäquivalente in den Zellen und im Zellkulturüberstand durch RT-PCR (4.5.1, 4.5.2, 4.1.2.3) dokumentiert. Zusätzlich wurde die Anzahl an infektiösen viralen Partikeln im Zellkulturüberstand mittels Plaquetest bestimmt (4.5.4). Die Experimente wurden zeitlich unabhängig vom ersten Versuch einmal wiederholt, um das Wachstumsverhalten der Viren zu bestätigen. Hierbei wurde die Infektion jedoch lediglich hinsichtlich lichtmikroskopischer Betrachtung der Zellen und Bestimmung der Genomäquivalente im Zellkulturüberstand dokumentiert. In den Abbildungen 5.5 bis 5.8 sind die Ergebnisse aller untersuchten Parameter für die jeweiligen Virusisolate dargestellt. Die Varianz der beiden Versuchsdurchläufe ist in den entsprechenden Datenkurven des RNA-Gehalts im Überstand in Form von Fehlerbalken veranschaulicht.

Abbildung 5.5 zeigt die Ergebnisse für die Referenzstämme Asibi und 17D. Obwohl es sich bei dem Asibi-Stamm um ein Wildisolat handelt und bei dem Stamm 17D um einen attenuierten Impfstamm, zeigen beide Stämme im Wesentlichen das gleiche Wachstumsverhalten. Für beide verläuft die Replikation in HepG2-Zellen deutlich schneller als in Ap61-Zellen. Der Unterschied an neugebildeten infektiösen Viruspartikeln [PFU/ml] zwischen den beiden Zelllinien beträgt hier bis zu 3 Logstufen im Verlauf der Infektion. Der erreichte Titer nach sechs Tagen ist jedoch nahezu identisch in beiden Zelllinien.

ERGEBNISSE

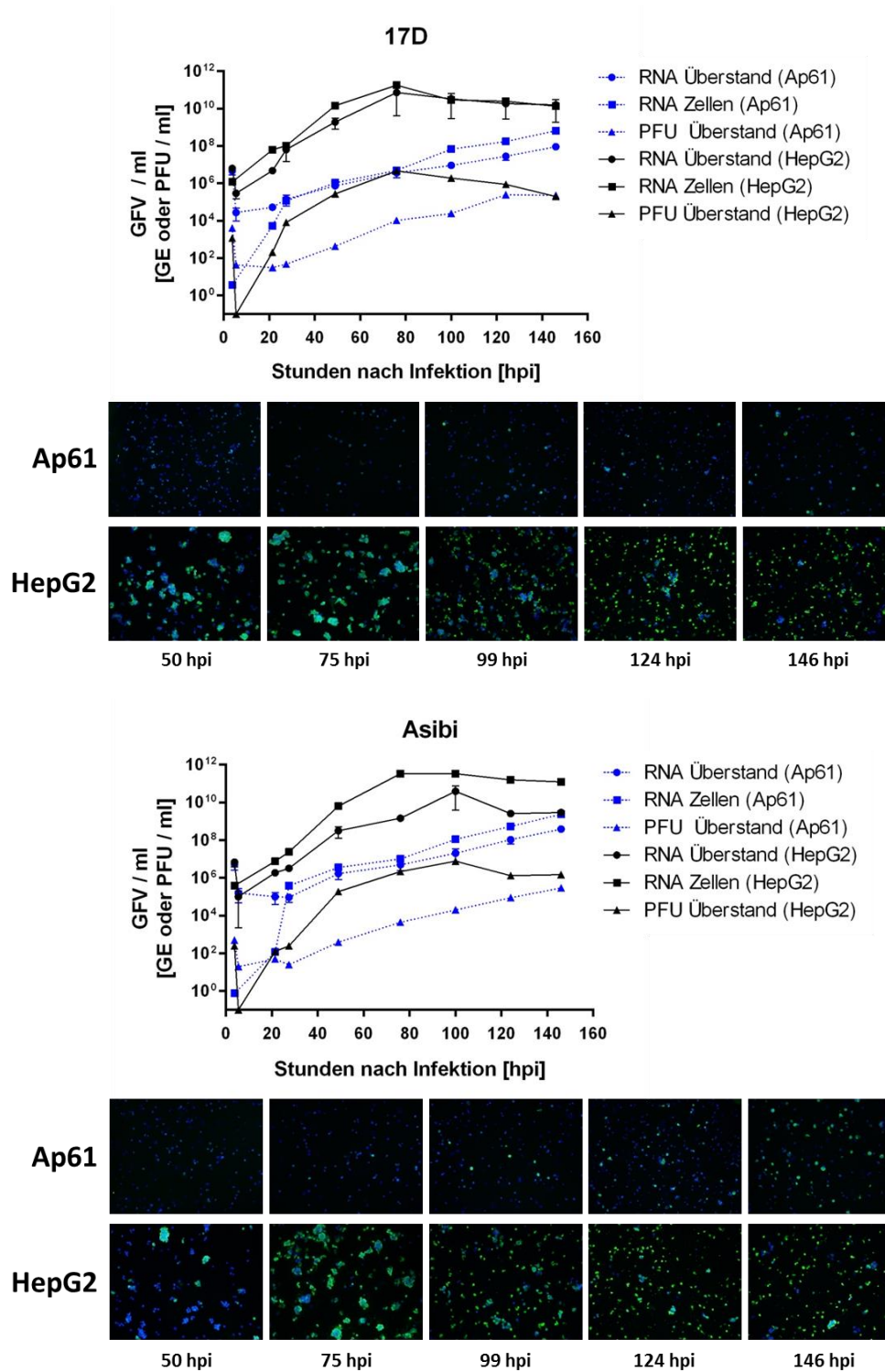


Abb. 5.5: Ergebnis der Wachstumskinetiken der GFV-Stämme 17D und Asibi. Die Graphen zeigen die Menge an viralen Genomäquivalenten isoliert aus Zellkulturüberständen (●) und Zellen (■) [GE/ml] sowie die Anzahl infektiöser viraler Partikel im Zellkulturüberstand (▲) [PFU/ml] über einen Zeitraum von 146 Stunden nach Infektion. Die Experimente wurden in Ap61-Zellen (blau) und HepG2-Zellen (schwarz) durchgeführt. Die Abweichungen der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente sind durch Fehlerbalken in den Datenlinien der extrazellulären RNA dargestellt. Der Infektionsverlauf ist zusätzlich durch das Ergebnis des Immunfluoreszenztests veranschaulicht. Die Färbung erfolgte gegen das virale E-Protein (MAK6330, 1:100 + goat-anti-mouse FITC, 1:200 – grüner Farbkanal) und den Zellkern (DAPI – blauer Farbkanal) wie unter (4.3.3) beschrieben.

ERGEBNISSE

Die in Überständen und Zellen gemessene Menge an Genomäquivalenten [GE/ml] variiert je nach Zelllinie zwischen 0,5 und 2 Logstufen für den Stamm Asibi und bis zu einer Logstufe für den Stamm 17D, wobei die Kopienzahl an intrazellulärer viraler RNA immer leicht über der aus den Zellkulturüberständen liegt.

Am Ende des Versuchs verlaufen die Wachstumskurven der Kinetik in Ap61-Zellen beider Stämme immer noch ansteigend, wohingegen die der Kinetik in HepG2-Zellen bereits 75 (17D) bzw. 99 Stunden (Asibi) nach der Infektion ein Plateau erreicht haben und ab diesem Zeitpunkt eine Stagnation bzw. ein Titerabfall zu beobachten ist. Dieser Verlauf wird auch durch die Immunfluoreszenzfärbung bestätigt, in der die HepG2-Zellen nach 75 Stunden komplett infiziert sind und nach 99 Stunden beginnen abzusterben. Ap61-Zellen hingegen sind bis zum Ende des Versuchs nur zu etwa 40-60% infiziert und zeigen keinerlei zytopathischen Effekt (Abb. 5.5 und Tabelle 5.5).

Ein wesentlicher Unterschied im Wachstumsverlauf zwischen den Zelllinien für diese beiden Virusstämme ist zu Beginn der Infektion sichtbar: bereits kurz nach der Infektion ist in HepG2-Zellen virale RNA nachweisbar, in Ap61-Zellen ist dies erst nach ca. 20 Stunden möglich.

Ein Unterschied in der Anfangsphase der Infektion ist bei Betrachtung der Immunfluoreszenzfärbung außerdem zwischen den beiden Stämmen Asibi und 17D zu beobachten. Während in Ap61-Zellen der GFV-Stamm Asibi insgesamt eine etwas frühere und stärkere Infektion der Zellen zeigt als der Stamm 17D, sieht es in HepG2-Zellen umgekehrt aus: hier führt der Impfstamm 17D zu einer früheren Infektion der Zellen als der Wildtypstamm Asibi. Nach 75 Stunden sind die Leberzellen (HepG2) jedoch mit beiden Stämmen durchinfiziert (Abb. 5.5, Tabelle 5.5).

Auch die Isolate 307 (Linie 1), 314 (Linie 6), 345 (Linie 5) und 357 (Linie 4) zeigen untereinander ein vergleichbares Wachstumsverhalten (Abb. 5.6 und Abb. 5.7). In beiden Zelllinien werden Titer von ca. 10^6 PFU/ml erreicht. Die virale RNA erreicht intrazellulär Kopienzahlen von ca. 10^{11} GE/ml, in den Überständen liegen die Kopienzahlen mit bis zu ca. 10^{10} GE/ml durchschnittlich eine Logstufe darunter. In beiden Zelllinien zeigen die Wachstumskurven ab 99 Stunden nach der Infektion zum Versuchsende hin einen stagnierenden oder abnehmenden Verlauf.

Bei mikroskopischer Betrachtung des Infektionsverlaufs in Ap61-Zellen, beobachtet man im Gegensatz zu den Referenzstämmen für diese Isolate bereits nach ca. 99 Stunden eine starke Infektion der Zellen (Tabelle 5.5, Abb. 5.6 und Abb. 5.7) und ein Absterben der Zellen zwischen 124 und 146 Stunden nach der Infektion (Abb. 5.6 und Abb. 5.7). Bei Infektion mit dem Isolat 345 sind die Zellen sogar schon nach ca. 50 Stunden durchinfiziert und ein zytopathischer Effekt ist bereits ab 75 Stunden zu beobachten (Abb. 5.7).

ERGEBNISSE

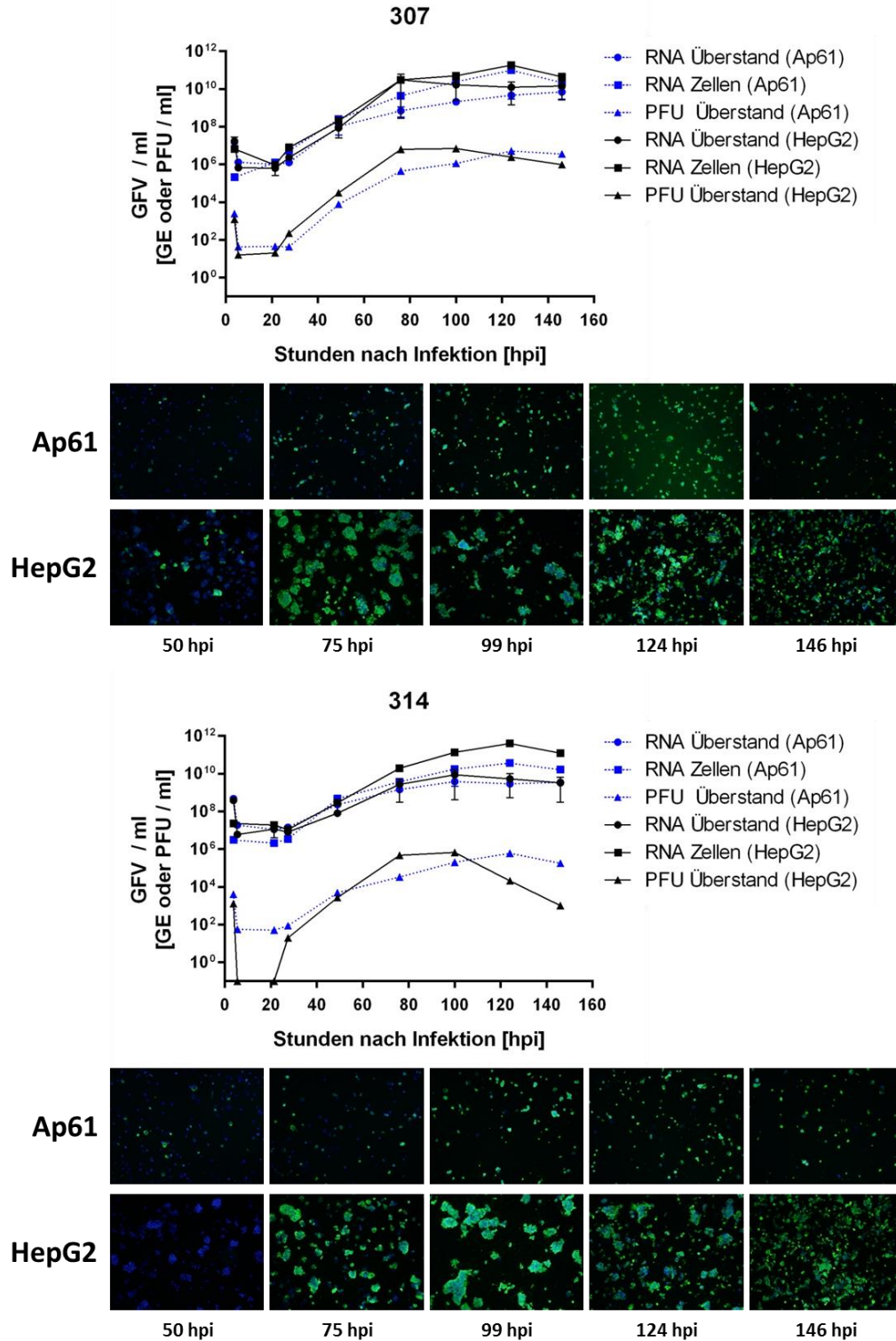


Abb. 5.6: Ergebnis der Wachstumskinetiken der GFV-Isolate 307 und 314. Die Graphen zeigen die Menge an viralen Genomäquivalenten isoliert aus Zellkulturüberständen (●) und Zellen (■) [GE/ml] sowie die Anzahl infektiöser viraler Partikel im Zellkulturüberstand (▲) [PFU/ml] über einen Zeitraum von 146 Stunden nach Infektion. Die Experimente wurden in Ap61-Zellen (blau) und HepG2-Zellen (schwarz) durchgeführt. Die Abweichungen der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente sind durch Fehlerbalken in den Datenlinien der extrazellulären RNA dargestellt. Der Infektionsverlauf ist zusätzlich durch das Ergebnis des Immunfluoreszenztests veranschaulicht. Die Färbung erfolgte gegen das virale E-Protein (MAK6330, 1:100 + goat-anti-mouse FITC, 1:200 – grüner Farbkanal) und den Zellkern (DAPI – blauer Farbkanal) wie unter (4.3.3) beschrieben.

ERGEBNISSE

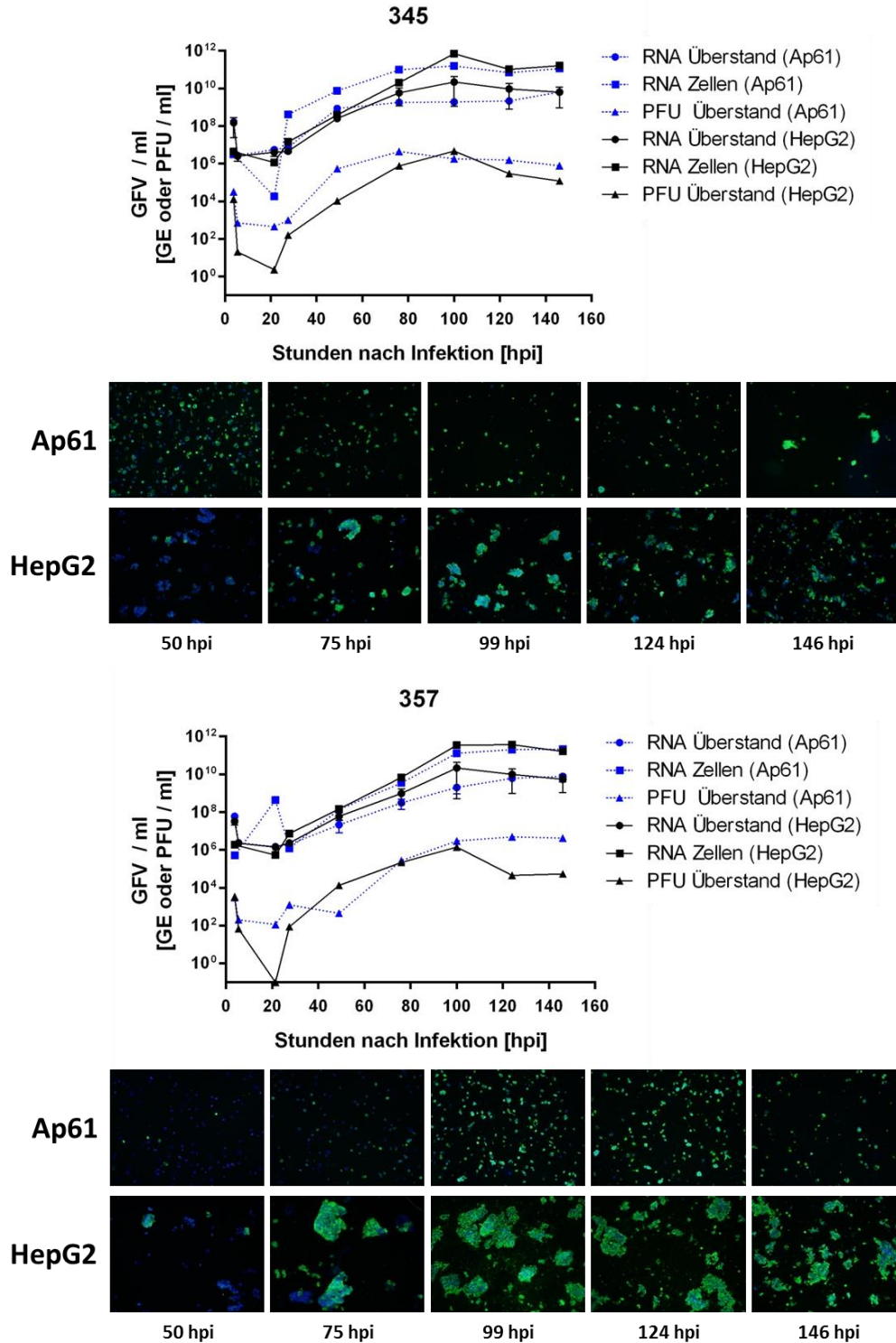


Abb. 5.7: Ergebnis der Wachstumskinetiken der GFV-Isolate 345 und 357. Die Graphen zeigen die Menge an viralen Genomäquivalenten isoliert aus Zellkulturüberständen (●) und Zellen (■) [GE/ml] sowie die Anzahl infektiöser viraler Partikel im Zellkulturüberstand (▲) [PFU/ml] über einen Zeitraum von 146 Stunden nach der Infektion. Die Experimente wurden in Ap61-Zellen (blau) und HepG2-Zellen (schwarz) durchgeführt. Die Abweichungen der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente sind durch Fehlerbalken in den Datenlinien der extrazellulären RNA dargestellt. Der Infektionsverlauf ist zusätzlich durch das Ergebnis des Immunfluoreszenztests veranschaulicht. Die Färbung erfolgte gegen das virale E-Protein (MAK6330, 1:100 + goat-anti-mouse FITC, 1:200 – grüner Farbkanal) und den Zellkern (DAPI – blauer Farbkanal) wie unter (4.3.3) beschrieben.

ERGEBNISSE

Die Immunfluoreszenzfärbung der infizierten HepG2-Zellen zeigt für diese vier Virusisolate eine 80-100%ige Infektion der Zellen nach 75 Stunden (Tabelle 5.5). Im Gegensatz zu einer Infektion mit den Referenzstämmen bleiben die Zellen in diesem Fall jedoch länger stabil und ein beginnendes Absterben ist erst 124 bis 146 Stunden nach der Infektion zu beobachten (Abb. 5.6 und Abb. 5.7). Bei Infektion mit dem Isolat 357 (Linie 4) bleiben die Zellen sogar bis zum Versuchsende intakt.

Das GFV-Isolat 333 (Linie 3) weist im Vergleich zu allen anderen untersuchten Isolaten ein abweichendes Wachstumsverhalten auf (Abb. 5.8). In HepG2-Zellen gleicht der Kurvenverlauf zwar dem der anderen untersuchten Moskitoisolate, das mikroskopische Bild ähnelt jedoch dem der Referenzstämmen und zeigt ein komplettes Absterben der Zellen 99 Stunden nach erfolgter Infektion.

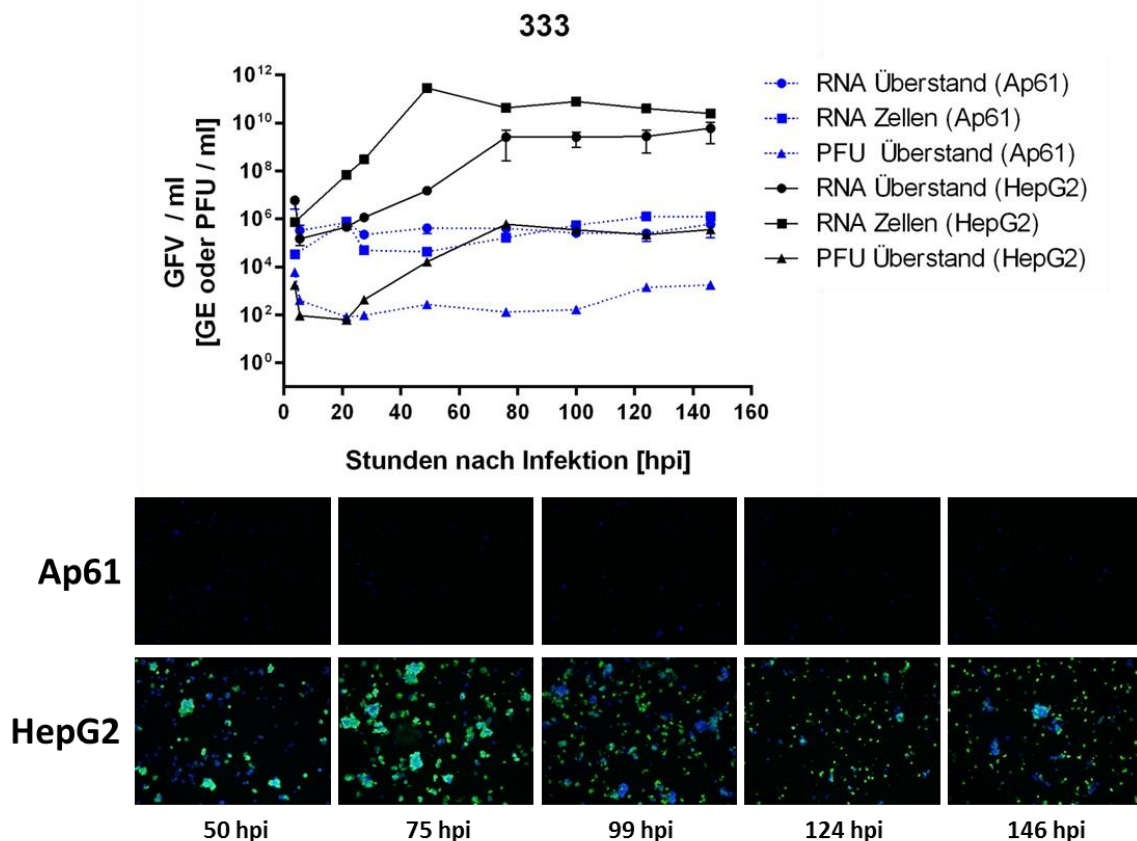


Abb. 5.8: Ergebnis der Wachstumskinetik des GFV-Isolates 333. Die Graphen zeigen die Menge an viralen Genomäquivalenten isoliert aus Zellkulturüberständen (●) und Zellen (■) [GE/ml] sowie die Anzahl infektiöser viraler Partikel im Zellkulturüberstand (▲) [PFU/ml] über einen Zeitraum von 146 Stunden nach der Infektion. Die Experimente wurden in Ap61-Zellen (blau) und HepG2-Zellen (schwarz) durchgeführt. Die Abweichungen der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente sind durch Fehlerbalken in den Datenlinien der extrazellulären RNA dargestellt. Der Infektionsverlauf ist zusätzlich durch das Ergebnis des Immunfluoreszenztests veranschaulicht. Die Färbung erfolgte gegen das virale E-Protein (MAK6330, 1:100 + goat-anti-mouse FITC, 1:200 – grüner Farbkanal) und den Zellkern (DAPI – blauer Farbkanal) wie unter (4.3.3) beschrieben.

ERGEBNISSE

In Ap61-Zellen ist eine Replikationsaktivität für das Isolat 333 hinsichtlich infektiöser Viruspartikel oder viraler *de novo* RNA nicht eindeutig nachweisbar, was sich in konstant niedrigen Werten widerspiegelt. Genauso wenig konnte durch Immunfluoreszenzfärbung der infizierten Zellen über den gesamten Versuchsverlauf eine Infektion nachgewiesen werden (Abb. 5.8, Tabelle 5.5), obwohl durch lichtmikroskopische Betrachtung bereits 22 Stunden nach der Infektion ein beginnendes Zellsterben beobachtet werden konnte. Eine Aufnahme der Viren in die Zellen scheint jedoch normal zu erfolgen, wie der Nachweis intrazellulärer RNA kurz nach der Infektion vermuten lässt.

Tabelle 5.5: Ergebnis des indirekten Immunfluoreszenztests zur Dokumentation des Infektionsverlaufes der verschiedenen GFV-Linien in Ap61- und HepG2-Zellen über einen Zeitraum von 4 bis 146 Stunden nach Infektion [hpi]. Die Färbung erfolgte gegen das virale E-Protein (MAK6330, 1:100 + goat-anti-mouse FITC, 1:200) wie unter (4.3.3) beschrieben. Der prozentuale Anteil an infizierten Zellen wurde abgeschätzt und wie folgt angezeigt: (+) = <10%; + = 10-40%; +(+) = 40-50%; ++ = 50-75%; ++(+) = 75-85%; +++ = 85-100%. Ein Minus zeigt ein negatives Ergebnis an.

hpi	Prozent an Ap61-Zellen infiziert mit GFV-Isolat:							Prozent an HepG2-Zellen infiziert mit GFV-Isolat:						
	17D	Asibi	333	357	345	314	307	17D	Asibi	333	357	345	314	307
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	+	(-)	-	(+)	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	+(+)	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
50	(+)	-	-	+	++	+(+)	+(+)	++(+)	+	++	+	+	-	+
75	-	(+)	-	++	++	+(+)	++	+++	+++	+++	++(+)	+++	++(+)	+++
99	(+)	+	-	++(+)	++	++	++(+)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
124	+	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
146	+	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Abbildung 5.9 zeigt noch einmal den Wachstumsverlauf aller untersuchten GFV-Isolate im Vergleich. In HepG2-Zellen zeigen alle Isolate einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf hinsichtlich infektiöser Viruspartikel sowie der Genomäquivalente in Zellen und Zellkulturüberständen. Unterschiede sind nur bei mikroskopischer Betrachtung festzustellen (Abb. 5.5-5.8, Tabelle 5.5).

In Ap61-Zellen zeigen sich deutlichere Unterschiede bezüglich der Kurvenverläufe. Wie bereits beschrieben, lässt sich klar zwischen den Referenzstämmen, dem Isolat 333 und den restlichen Moskitoisolaten unterscheiden. Die Referenzstämme Asibi und 17D erreichen in Ap61-Zellen insgesamt nicht so hohe Titer wie die Moskitoisolate 307, 314, 345 und 357. Sie zeigen jedoch auch noch am Versuchsende einen ansteigenden Kurvenverlauf, wohingegen der Titer der anderen Virusstämme einen stagnierenden bzw. sogar abfallenden Verlauf zeigt (Abb. 5.9). Einen weiteren Unterschied zwischen Referenzstämmen und Moskitoisolaten lässt sich im Verlauf der viralen RNA-Kopien in der Zellfraktion erkennen. Bereits kurze Zeit nach erfolgter Infektion lassen sich virale Genomäquivalente der Moskitoisolate in der Zellfraktion nachweisen. Für die Referenzstämme hingegen sieht man eine Zunahme der Genomäquivalente erst innerhalb der ersten 22 Stunden (Abb.5.9 b, links). Der abweichende Wachstumsverlauf des Isolates 333 wird in dieser Darstellung

ERGEBNISSE

besonders deutlich: die Infektion der Ap61-Zellen entspricht der der anderen Moskitoisolate und zeigt sich durch den positiven Nachweis viraler RNA in der Zellfraktion kurz nach der Infektion. Eine Replikationsaktivität hinsichtlich eines ansteigenden Virustiters lässt sich jedoch nicht eindeutig nachweisen (Abb. 5.9, links). Der stagnierende Wachstumsverlauf wird durch das negative Ergebnis im Immunfluoreszenztest unterstützt (Tabelle 5.5, Abb. 5.8).

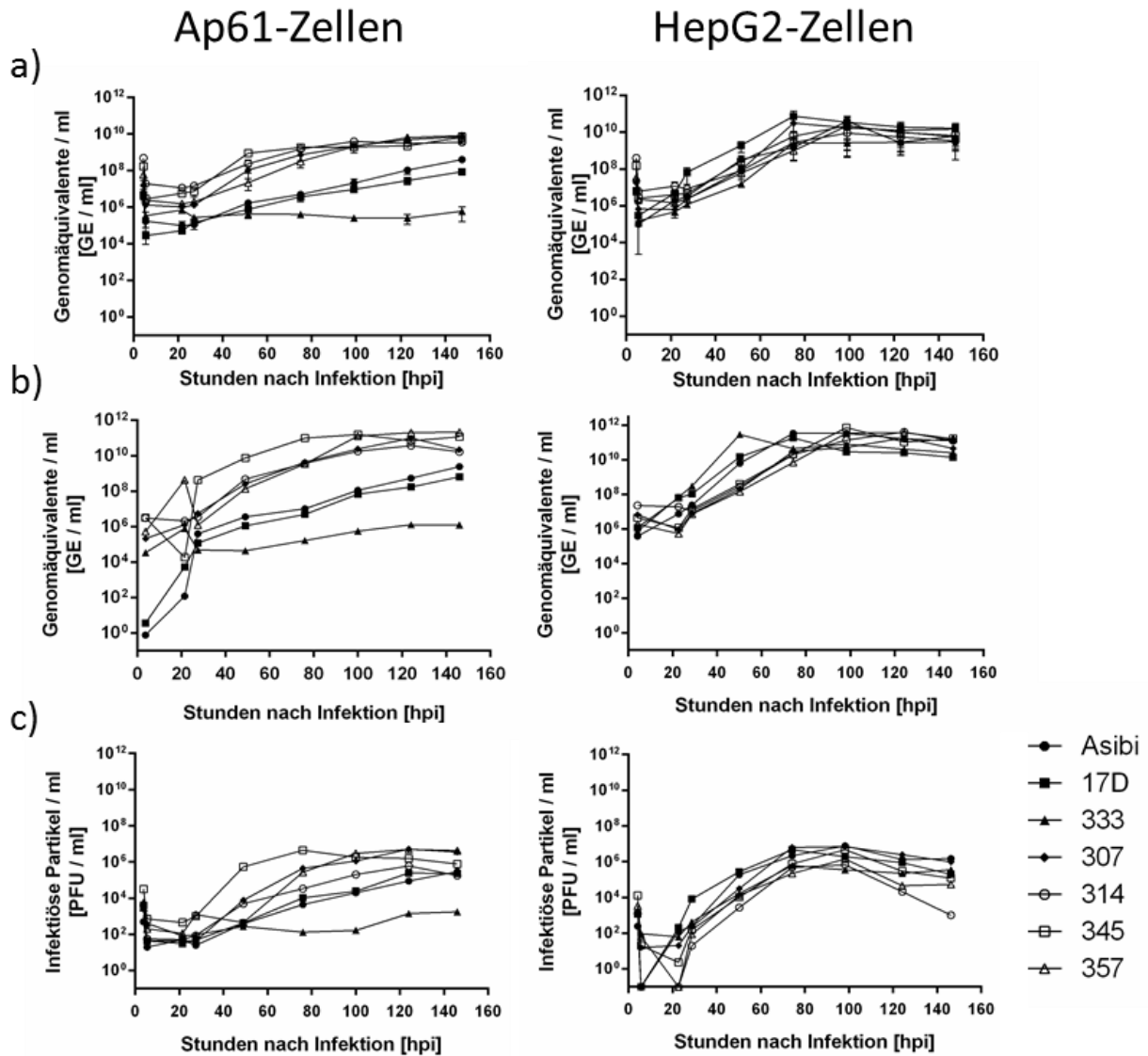


Abb. 5.9: Wachstumskurven der verschiedenen GFV-Linien in Ap61- (links) und HepG2-Zellen (rechts). Die Graphen zeigen die Menge an extrazellulärer (a) und intrazellulärer viraler RNA in Genomäquivalenten pro Milliliter [GE/ml] sowie die Anzahl infektiöser viraler Partikel im Zellkulturüberstand (c) [PFU/ml] über einen Zeitraum von 146 Stunden nach der Infektion. Die Abweichungen der zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente sind durch Fehlerbalken in den Datenlinien der extrazellulären RNA dargestellt (a).

5.2 Entwicklung neuer Nachweismethoden zur Untersuchung und Diagnostik von Gelbfieberviren

In diesem Teil der Arbeit konzentriert sich der erste Abschnitt auf die Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern, die gegen spezielle Peptidsequenzen verschiedener GFV-Proteine gerichtet sind (Peptidantikörper), sowie deren Anwendung. Der zweite Abschnitt befasst sich mit der Konstruktion eines fluoreszenzmarkierten Viruspartikels zur Untersuchung der GFV-Pathogenese in Lebendzelleexperimenten.

5.2.1 Herstellung von Peptidantikörpern zum Nachweis von GFV-Proteinen

Für den gezielten Nachweis von GFV-Proteinen lag im Robert Koch-Institut bisher ausschließlich ein monoklonaler Antikörper vor, der gegen das E-Protein gerichtet ist und lediglich die native Form des Proteins detektiert (MAK6330) (Gelderblom et al., 1985). Auch kommerziell sind bislang keine Antikörper erhältlich, die einen gezielten Nachweis einzelner GFV-Proteine ermöglichen. Um neue Nachweismöglichkeiten für Diagnostik und Forschung zu schaffen, sollten Peptidantikörper gegen verschiedene Virusproteine hergestellt werden. Zielproteine waren dabei die beiden Strukturproteine C und E sowie das Nichtstrukturprotein NS1, das von der infizierten Zelle ins Blut sezerniert wird und somit ein interessantes Target für diagnostische Zwecke darstellt (1.2.2.2). Die hergestellten Antikörper sollten dabei spezifisch für die Detektion von Gelbfieberviren sein und keine Kreuzreaktivität zu anderen Flaviviren aufweisen. Des Weiteren sollte eine Detektion sowohl des nativen als auch des denaturierten Virusproteins möglich sein, um eine Anwendbarkeit in möglichst vielen verschiedenen Essays zu gewährleisten.

5.2.1.1 Identifikation geeigneter Peptide zur Immunisierung von Kaninchen

Zur Identifikation geeigneter Immunisierungspeptide wurde unter Verwendung der Lasergene® SeqMan Pro Software zunächst ein Alignment der Proteinsequenzen von 16 GFV-Stämmen durchgeführt (unter 3.1.4 in Tabelle 3.16 mit einem ^a markiert). Ziel dabei war es, konservierte Sequenzbereiche von Gelbfieberviren zu identifizieren, so dass eine spätere Detektion möglichst aller Genotypen des Virus möglich ist.

Anschließend wurde die Konsensussequenz der 16 GFV-Sequenzen mit der Proteinsequenz anderer Flaviviren abgeglichen. In diesem Fall wurde auf diejenigen Bereiche selektioniert, die einen großen Unterschied zur GFV-Sequenz aufweisen, um eine spätere Kreuzreaktivität mit anderen Flaviviren zu vermeiden.

ERGEBNISSE

Alle ausgewählten Sequenzbereiche innerhalb der Proteine E, C und NS1 wurden anschließend *in silico* mit dem Modul Protean der Software Lasergene® SeqMan Pro auf ihre immunogenen Eigenschaften hin untersucht. Dabei wurde besonders auf Sequenzbereiche mit einer vorhergesagten geringen Hydrophobizität sowie einer hohen Oberflächenwahrscheinlichkeit und Antigenizität geachtet. Diese Eigenschaften entsprechen theoretisch einer Exposition des gewählten Bereichs auf der Proteinoberfläche und würden somit eine gute Zugänglichkeit der Zielsequenz für den Antikörper gewährleisten.

Nach dieser Selektion konnten vier Sequenzbereiche identifiziert werden, die den gesetzten Anforderungen entsprachen. In der Peptidserviceeinheit der Firma Eurogentec wurden diese Sequenzen noch einmal auf ihre immunogenen Eigenschaften hin überprüft und entsprechend der optimalen Bedingungen wie folgt modifiziert. Die Peptide wurden auf eine Länge von 15 Aminosäuren begrenzt und am Ende durch ein zusätzliches Cystein (C-) ergänzt, was die Bindung des Peptids an ein *Carrierprotein* verbessert. Die Peptide wurden vor der Immunisierung an das *Carrierprotein* KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) gekoppelt, was aufgrund seiner hohen molekularen Masse und guten Antigenizität die Phagozytose des Peptids durch Immunzellen bei der Immunisierung wesentlich verstärkt. Des Weiteren enthält es T-Zell-Epitope, wodurch es die Proliferation von T-Helfer-Zellen fördert. Zusätzlich wird es niemals in Blocklösung in immunologischen Testsystemen verwendet, so dass es hierdurch in der späteren Anwendung zu keiner Interferenz kommen sollte.

Schließlich wurden drei Peptide zur Immunisierung synthetisiert (Tabelle 5.6). Die Synthese und Kopplung der Immunisierungspeptide erfolgte durch die Firma Eurogentec.

Tabelle 5.6: Sequenz und Position der ausgewählten Peptide für die Peptidimmunisierung. Das zusätzliche Cystein für die Bindung an das *Carrierprotein* ist am Ende der jeweiligen Sequenz durch ein ‚-‘ abgegrenzt.

Aminosäureposition im GFV-Polyprotein	Proteinbereich	Peptidsequenz
67-81	C	C-KQK TKQ IGN RPG PSR
585-599	E	AMR VTK DTN DNN LYK-C
908-922	NS1	QDP KNV YQR GTH PFS-C

5.2.1.2 Herstellung und Charakterisierung polyklonaler Peptidantikörper

Mit den zuvor hergestellten Peptiden wurden Kaninchen wie unter 4.3.1 beschrieben immunisiert. Die gewonnenen Antiseren wurden mit den folgenden biochemischen und immunologischen Nachweissystemen auf ihre Funktionalität geprüft.

5.2.1.2.1 Western Blot

Die Funktionalität der gewonnenen Antiseren wurde zunächst durch den Nachweis der entsprechenden GFV-Proteine im Western Blot getestet. Dazu wurden die Proteine aus Kulturüberständen von mit GFV infizierten PS-Zellen durch eine SDS-PAGE ihrer Größe

ERGEBNISSE

nach aufgetrennt (4.2.1) und anschließend auf eine Membran übertragen (4.2.2). Dabei wurden für den Nachweis folgende Parameter getestet:

- SDS-PAGE unter denaturierenden und halbnativen Bedingungen
- Übertrag auf Nitrozellulose (NC)- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen
- Übertrag auf Membranen mit einer Porengröße von 0,2 oder 0,45 μm

Die anschließende Immunfärbung der Proteine wurde mit den jeweiligen Antisera entsprechend dem Grundprotokoll wie unter 4.3.2 beschrieben durchgeführt.

Abbildung 5.10 fasst die Ergebnisse für den Nachweis des C-Proteins im Western Blot zusammen. Getestet wurde die Detektion mit dem Serum, das nach der 5. Immunisierung erhalten wurde (4.3.1, Tabelle 4.12: C-Protein 17.12.08) in den Verdünnungen 1:100, 1:250 und 1:500. Als Negativkontrolle diente das Präimmunserum, das vor Beginn der Immunisierung abgenommen wurde.

Nach einer Proteinauftrennung in einem denaturierenden Gel ist auf der NC-Membran mit einer Porengröße von 0,2 μm eine klare Bande auf Höhe von ca. 16 kDa zu sehen, was der Größe des C-Proteins entspricht (Abb. 5.10 E, 1.2.2.2). Eine zusätzliche Bande ist in Höhe von ca. 37 kDa zu sehen. Die Intensität beider Banden nimmt mit zunehmender Verdünnung des Serums ab, bei Inkubation mit dem Präimmunserum sind sie nicht detektierbar.

Bei dem Transfer der Proteine aus einem denaturierenden Gel auf eine NC-Membran mit der Porengröße 0,45 μm ist nur die Bande auf Höhe von 37 kDa sichtbar, wogegen die 16 kDa-Bande fehlt (Abb. 5.10 F). Bei einem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran zeigen sich etwas andere Ergebnisse. Hier sind bei einer Porengröße von 0,45 μm beide Banden sichtbar und weisen eine hohe Intensität auf (Abb. 5.10 H). Bei einer PVDF-Membran der Porengröße 0,2 μm ist die 37 kDa-Bande nicht nachweisbar, und die 16 kDa-Bande ist nur bei einer Serumverdünnung von 1:250 sichtbar (Abb. 5.10 G). Insgesamt zeigt die Färbung auf der PVDF-Membran im Vergleich zur NC-Membran sehr viel stärkere Hintergrundsignale, so dass die spezifischen Signale nur schwer zu deuten sind.

Nach einer Proteinauftrennung in einem halbnativen Gel und einem Transfer auf eine NC-Membran (Abb. 5.10 A und B) sieht man eine Bande bei 16 kDa, die 37 kDa Bande ist nur sehr schwach und maximal bis zu einer Serumverdünnung von 1:250 zu sehen. Das Signal ist auch hier auf einer Membran der Porengröße 0,2 μm stärker als auf einer Membran der Porengröße 0,45 μm . Der Nachweis des C-Proteins nach einem Transfer aus einem halbnativen Gel auf eine PVDF-Membran ist nicht (0,2 μm) oder nur sehr schwach (0,45 μm) möglich (Abb. 5.10 C und D).

Insgesamt lässt sich der beste Nachweis des C-Proteins nach einer Proteinauftrennung unter denaturierenden Bedingungen und einem Transfer auf eine NC-Membran mit einer Porengröße von 0,2 μm sowie einer Serumverdünnung von 1:250 erzielen.

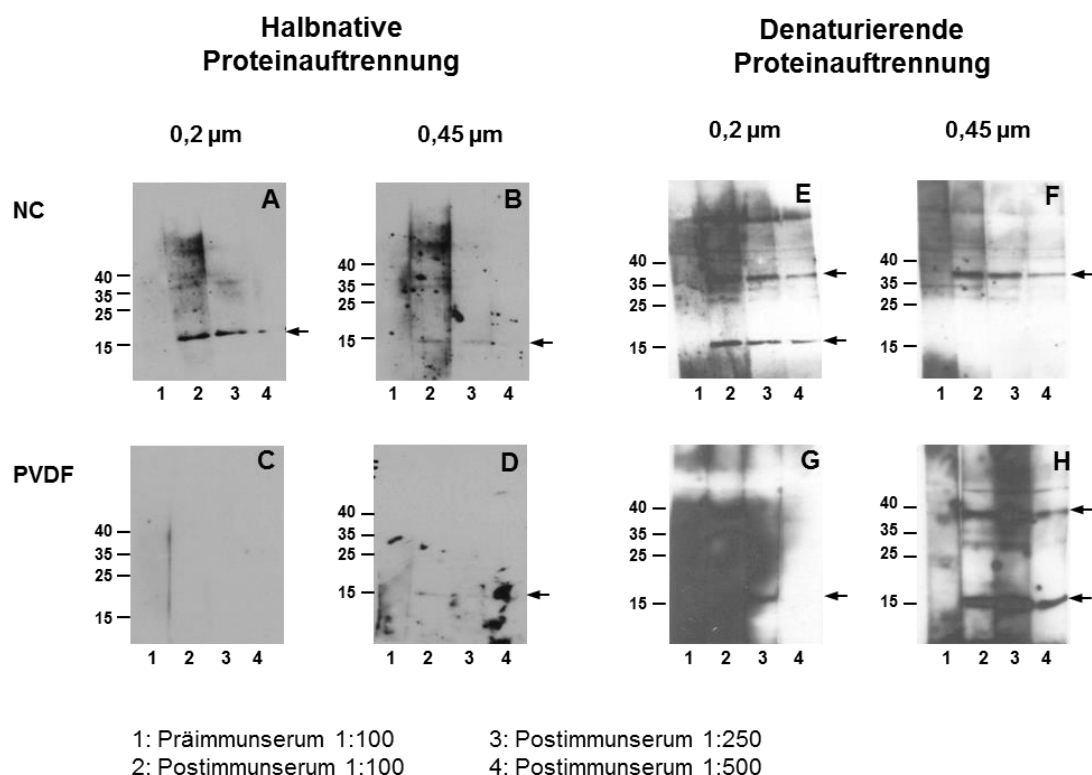


Abb. 5.10: Immunoblot zum Nachweis des C-Proteins nach Proteinauftrennung in einem SDS-Gel unter halbnativen und denaturierenden Bedingungen und anschließendem Transfer auf verschiedene Membranen (PVDF= Polyvinylidenfluorid; NC= Nitrozellulose) mit einer Porengröße von 0,2 und 0,45 µm. Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-GFV-C Prä- und Postimmunserum und einem geeigneten Zweitantikörper (goat-anti-rabbit-HRP, Pierce; 1:5000). Entwickelt wurde mit dem Super Signal West Dura (halbnatives Gel) bzw. Femto (denaturierendes Gel) Reagenz von Thermo Scientific.

Für den Nachweis des E-Proteins wurde bei einer Proteinauftrennung unter halbnativen Bedingungen ebenfalls das Serum verwendet, das nach der 5. Immunisierung erhalten wurde (4.3.1, Tabelle 4.12: E-Protein 17.12.08). Für den Nachweis unter denaturierenden Bedingungen wurde das 6. Postimmunserum verwendet (4.3.1, Tabelle 4.12: E-Protein 26.01.09). Der Nachweis erfolgte jeweils in den Verdünnungen 1:100, 1:200 und 1:500. Als Negativkontrolle diente auch hier das entsprechende Präimmunserum. Für den Nachweis des E-Proteins unter halbnativen Bedingungen war mit dem monoklonalen Antikörper MAK6330 (Gelderblom et al., 1985) zusätzlich eine Positivkontrolle vorhanden.

Bei einer Proteinauftrennung unter halbnativen Bedingungen sieht man auf allen getesteten Membranen in der Positivkontrolle eine Bande auf Höhe von ca. 40 kDa (Abb. 5.11 A-D, Spur 5), die etwas kleiner ist als die erwartete Bande für das E-Protein (51-59 kDa). Das Signal dieser Bande ist nach einem Transfer auf eine PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm besonders stark (Abb. 5.11 D). Hier erscheint zusätzlich eine schwächere Bande von ca. 54 kDa. Mit dem hergestellten Anti-GFV-E-Serum ist unter halbnativen Bedingungen nur ein Nachweis auf einer PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm und bis zu einer Serumverdünnung von 1:200 möglich. Hier ist eine Bande auf Höhe von

ERGEBNISSE

40 kDa zu sehen, die der Bande der Positivkontrolle entspricht. Diese Bande ist bei Inkubation mit dem Präimmunserum nicht nachweisbar. Insgesamt zeigt der Nachweis unter halbnativen Bedingungen ein sehr schlechtes Verhältnis zwischen spezifischen und unspezifischen Signalen.

Unter denaturierenden Bedingungen ist der monoklonale Antikörper MAK6330, wie erwartet, nicht funktionstüchtig (Abb. 5.11 E-H, Spur 6). Das Anti-GFV-E-Serum detektiert, mit Ausnahme der PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,2 μm , auf allen Membranen eine Bande bei 55 kDa, was der erwarteten Größe des E-Proteins entspricht und mit der zweiten Bande der Positivkontrolle unter nativen Bedingungen übereinstimmt. Das als Negativkontrolle verwendete Präimmunserum weist ebenfalls diese Bande auf (Abb. 5.11 E, F und H, Spur 1). Das Verhältnis von spezifischem zu unspezifischem Signal ist unter denaturierenden Bedingungen wesentlich besser als unter halbnativen Bedingungen. Das beste Ergebnis wird hier auf einer NC-Membran mit einer Porengröße von 0,45 μm und einer Serumverdünnung von 1:200 erzielt (Abb. 5.11 F).

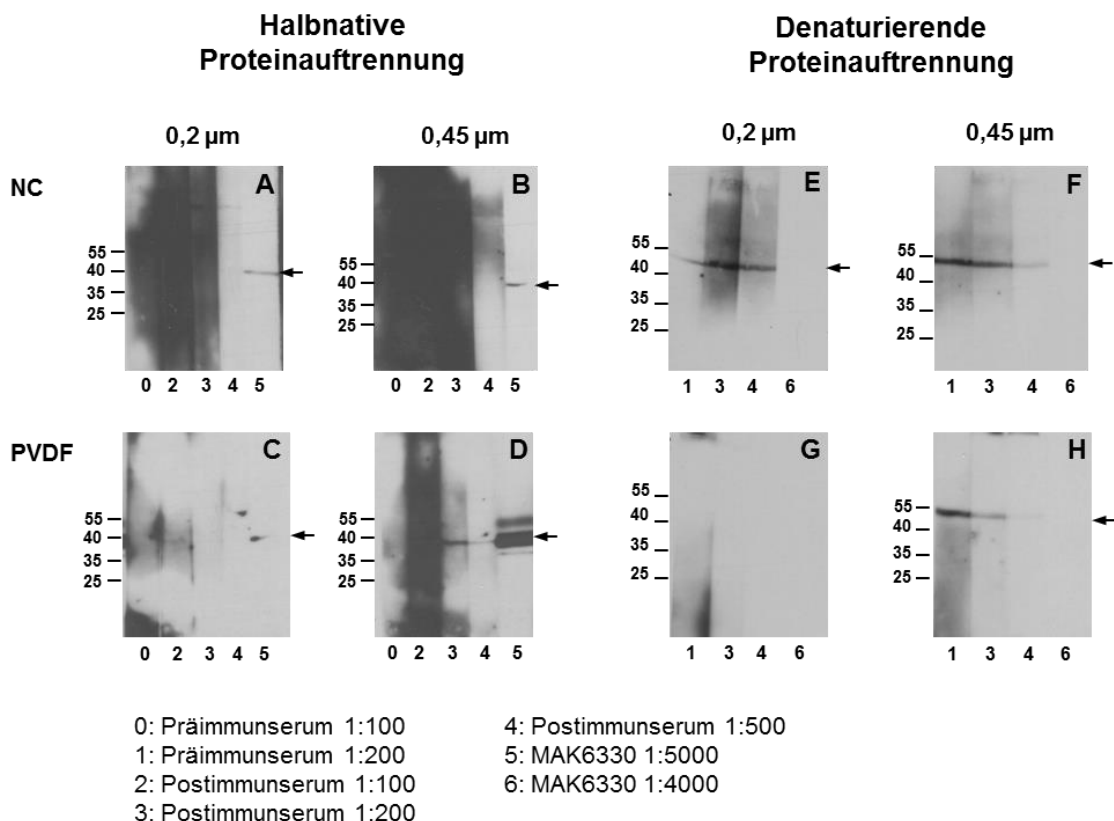


Abb. 5.11: Immunoblot zum Nachweis des GFV-E-Proteins nach Proteinauftrennung in einem SDS-Gel unter halbnativen und denaturierenden Bedingungen und anschließendem Transfer auf verschiedene Membranen (PVDF= Polyvinylidenfluorid; NC= Nitrozellulose) mit einer Porengröße von 0,2 und 0,45 μm . Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-GFV-E Prä- und Postimmunserum und einem geeigneten Zweitantikörper (goat-anti-rabbit-HRP, Pierce; 1:5000). Als Positivkontrolle wurde unter halbnativen Bedingungen der monoklonale Antikörper MAK6330 verwendet (Zweitantikörper: goat-anti-mouse, 1:5000). Entwickelt wurde mit dem Super Signal West Femto Reagenz von Thermo Scientific.

ERGEBNISSE

Für den Funktionalitätstest des hergestellten Anti-GFV-NS1-Serums wurde das Serum, das nach der 4. Immunisierung erhalten wurde, in den Verdünnungen 1:100, 1:200 und 1:500 verwendet (4.3.1, Tabelle 4.12: NS1-Protein 18.03.09). Als Negativkontrolle diente auch hier das entsprechende Präimmunserum.

Nach einer Proteinauftrennung unter denaturierenden Bedingungen lässt sich auf allen getesteten Membranen eine Bande auf Höhe von ca. 45 kDa nachweisen, deren Intensität mit zunehmender Serumverdünnung schwächer wird und der erwarteten Größe für das NS1-Protein entspricht (Abb. 5.12, E-H). Eine entsprechende Bande lässt sich in den Negativkontrollen nicht nachweisen (Spur 1 in den jeweiligen Abbildungen). Das beste Ergebnis lässt sich hier auf einer NC-Membran mit einer Porengröße von 0,45 μm erzielen, auf der selbst eine Serumverdünnung von 1:500 noch ein starkes Signal zeigt (Abb. 5.12, F). Nach einer Proteinauftrennung unter halbnativen Bedingungen zeigt sich ein ähnliches Bild, jedoch fällt das Verhältnis von spezifischem zu unspezifischem Signal wesentlich schlechter aus (Abb. 5.12, A-D). Des Weiteren zeigt das Protein unter halbnativen Bedingungen mit einer Größe von ca. 38 kDa ein verändertes Laufverhalten.

In Tabelle 5.7 sind noch einmal alle Ergebnisse des Proteinnachweises im Western Blot zusammengefasst.

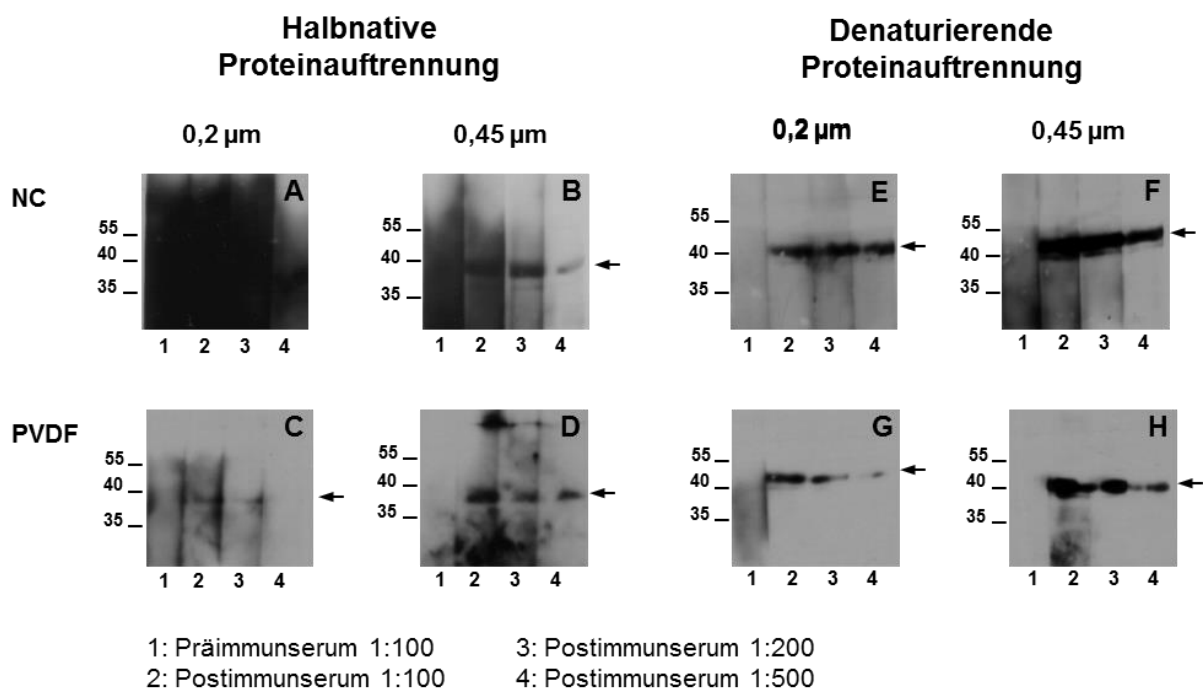


Abb. 5.12: Immunoblot zum Nachweis des GFV-NS1-Proteins nach Proteinauftrennung in einem SDS-Gel unter halbnativen und denaturierenden Bedingungen und anschließendem Transfer auf verschiedene Membranen (PVDF= Polyvinylidenfluorid; NC= Nitrozellulose) mit einer Porengröße von 0,2 und 0,45 μm . Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-GFV-NS1 Prä- und Postimmunserum und einem geeigneten Zweitantikörper (goat-anti-rabbit-HRP, Pierce; 1:5000). Entwickelt wurde mit dem Super Signal West Femto Reagenz von Thermo Scientific.

ERGEBNISSE

Tabelle 5.7: Übersicht über die Funktionalität der hergestellten Peptidantikörper im Immunoblot zum Nachweis der jeweiligen GFV-Proteine. Getestet wurde der Nachweis nach einer denaturierenden sowie einer halbnativen Proteinauftrennung und anschließendem Transfer auf verschiedene Membranen (NC = Nitrozellulose, PVDF= Polyvinylidenfluorid), jeweils mit einer Porengröße von 0,2 und 0,45 µm.

	Serum	NC 0,2 µm	NC 0,45 µm	PVDF 0,2 µm	PVDF 0,45 µm
halbnative Bedingungen	Anti-GFV-C	++	+	-	+
	Anti-GFV-E	-	-	-	++
	Anti-GFV-NS1	+	++	+	++
denaturierende Bedingungen	Anti-GFV-C	+++	-/+++ ^{a)}	+	++
	Anti-GFV-E	(+)	(+)	-	(+)
	Anti-GFV-NS1	+++	+++	++	++

- = negativ, (+) = unspezifisches Signal, + = schwaches Signal, ++ = gutes Signal, +++ = sehr gutes Signal mit gutem Hintergrundverhältnis, ^{a)} das negative Ergebnis bezieht sich auf die 16 kDa Bande, das sehr gute Ergebnis auf die 37 kDa-Bande

5.2.1.2.2 Indirekter Immunfluoreszenztest

Weiterhin wurden die GFV-Antiseren auf ihre Eignung untersucht, das GFV im indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) nachzuweisen. Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher Immunfluoreszenztest der Firma Euroimmun verwendet (4.3.4). Getestet wurden die Postimmunsereen vom 26.01.2009 (Anti-GFV-E und Anti-GFV-C) bzw. 18.05.2009 (Anti-GFV-NS1), die nach der Ausblutung der Kaninchen erhalten wurden (4.3.1, Tabelle 4.12).

Die Ergebnisse des IIFTs sind in Abb. 5.13 zusammengefasst. Der obere Abbildungsteil zeigt die Ergebnisse der Kontrollen. Als Positivkontrolle diente hier der monoklonale Antikörper MAK6330, der sich gegen das GFV-E-Protein richtet. Als Negativkontrollen wurden die Zellen lediglich mit den Zweitantikörpern inkubiert (goat-anti-rabbit FITC, goat-anti-mouse FITC). Die Aufnahmen der 10-fachen Vergrößerung sowie die Aufnahme der 20-fachen Vergrößerung bei Inkubation mit dem Anti-GFV-NS1-Serum (Abb. 5.13 c) zeigen jeweils nicht-infizierte (-) und GFV-infizierte (+) Zellen im Vergleich.

Für alle hergestellten Seren sieht man im IIFT eine spezifische Färbung GFV-infizierter Zellen, verdeutlicht in der Gegenüberstellung infizierter und nicht-infizierter Zellen in den Aufnahmen der 10-fachen Vergrößerung. Bei stärkerer Vergrößerung (20x, 40x) sieht man ein besonders deutliches Signal für die Seren Anti-GFV-NS1 und Anti-GFV-C. Besonders auffällig ist die spezifische zentrale Färbung im Bereich des Zellkerns bei Inkubation mit dem Anti-GFV-C-Serum (Abb. 5.13 a).

Das gegen das E-Protein gerichtete Serum Anti-GFV-E zeigt zwar ein positives Signal in der Immunfluoreszenz, jedoch ist die Intensität im Vergleich zu dem monoklonalen Antikörper MAK6330 in der Positivkontrolle sehr schwach.

ERGEBNISSE

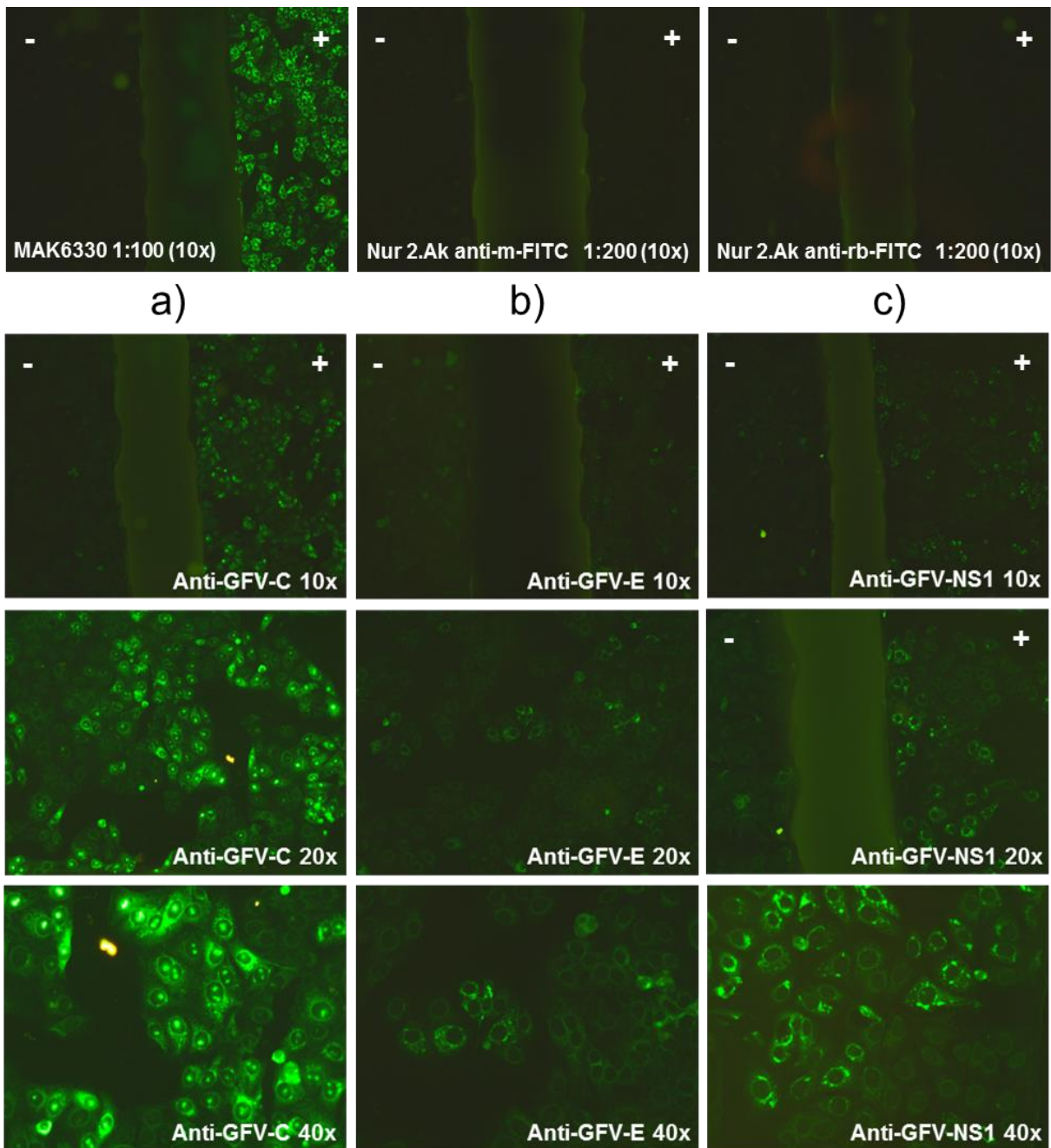


Abb. 5.13: Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis GFV-spezifischer Antikörper (4.3.4). Auf den Objektträgern sind jeweils GFV-infizierte (+) und nicht-infizierte (-) Zellen fixiert. Als Positivkontrolle erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper MAK6330 in einer Verdünnung von 1:100, als Negativkontrolle wurde lediglich mit den Zweitantikörpern (goat-anti-rabbit (rb)/-mouse (m), FITC) inkubiert. Die hergestellten Immunsereen gegen die GFV-Proteine C (a), E (b) und NS1 (c) wurden in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Die mikroskopische Vergrößerung ist in den jeweiligen Abbildungsteilen angegeben.

5.2.1.2.3. Serokonversion im Verlauf der Immunisierung

Zur Dokumentation der Serokonversion im Verlauf der Peptidimmunisierung wurden die hergestellten Antiseren dem zeitlichen Verlauf ihrer Abnahme entsprechend im Western Blot getestet (4.2.2). Dabei wurden für den Nachweis des jeweiligen Proteins die in Abschnitt 5.2.1.2.1 ausgetesteten Bedingungen angewandt. Für den Nachweis wurden jeweils die zwei Präimmunseren verwendet, die vor Beginn der Immunisierung abgenommen wurden, sowie die Postimmunseren, die im Verlauf der Immunisierung nach jeder Folgeimpfung abgenommen wurden (4.3.1, Tabelle 4.12). Als Negativkontrolle erfolgte die Inkubation lediglich mit dem Zweitantikörper. Die Ergebnisse des Immunisierungsverlaufs sind in Abb. 5.14 dargestellt.

Für die Seren Anti-GFV-NS1 und Anti-GFV-C ist in den Spuren der Präimmunseren kein Signal detektierbar (Abb. 5.14 a und b, Spuren 2 und 3). Bereits nach der ersten Immunisierungsdosis ist für das Anti-GFV-NS1 Serum ein positives Signal bei ca. 45 kDa sichtbar, das sich im weiteren Immunisierungsverlauf verstärkt (Abb. 5.14, a). Bei Inkubation mit dem Anti-GFV-C-Serum ist ebenfalls eine Serokonversion sichtbar, die sich im Auftreten der beiden Banden von ca. 16 und 37 kDa zeigt und nach der vierten Impfdosis detektierbar wird (Abb. 5.14, b). Das Ergebnis der dritten Impfdosis kann in diesem Fall nicht beurteilt werden, da dem Kaninchen aus Tierschutzgründen zu diesem Zeitpunkt kein Blut abgenommen werden konnte. Für das Anti-GFV-E-Serum ist ein Signal bei etwa 55 kDa zu sehen, das sowohl bei einer Inkubation mit dem Präimmunserum als auch mit dem Postimmunserum nachweisbar ist (Abb. 5.14, c). Dieses Signal ist zu Beginn der Impfung stärker sichtbar (Spuren 4 und 5), schwächt sich aber im weiteren Verlauf der Immunisierung wieder ab (Spuren 6-8).

Die Serokonversion im Verlauf der Immunisierung wurde zusätzlich im IIFT getestet (Daten nicht gezeigt) und zeigte das gleiche Ergebnis für das Anti-GFV-NS1-Serum. Für das Anti-GFV-C-Serum war die Konversion bereits schwach nach der ersten Impfdosis detektierbar. Für das Anti-GFV-E-Serum lässt sich im IIFT eine Serokonversion erkennen, die nach der zweiten Impfdosis in Erscheinung tritt, aber nur sehr schwach detektierbar ist.

ERGEBNISSE

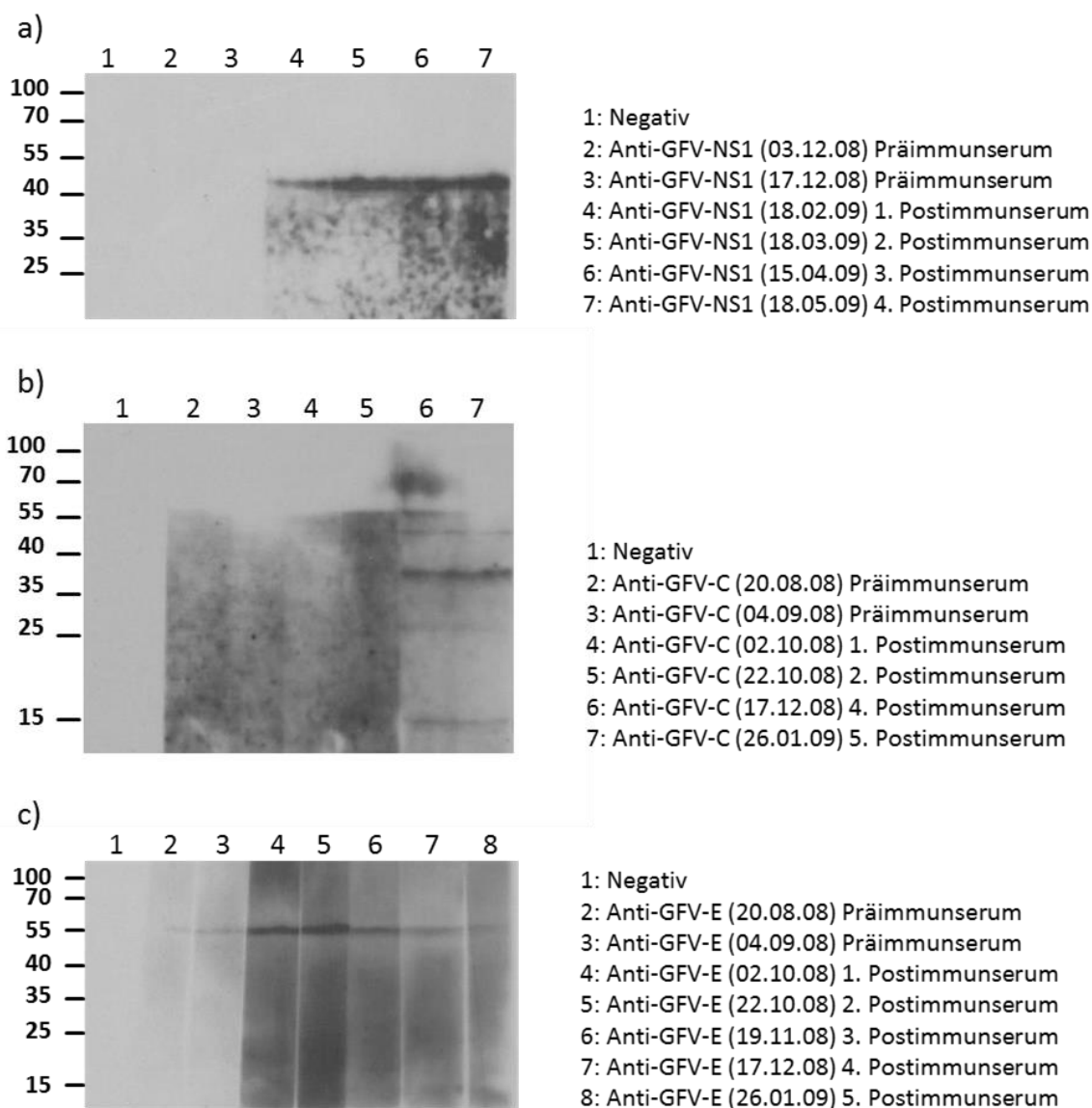


Abb. 5.14: Immunoblot zum Nachweis der erfolgten Serokonversion im Verlauf der Immunisierung von Kaninchen mit Peptiden der GFV-Proteine E, C und NS1. Zellkulturüberstände von GFV-infizierten PS-Zellen wurden in einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt (4.2.1) und anschließend auf eine NC-Membran mit einer Porengröße von 0,2 μm (b) bzw. 0,45 μm (a und c) transferiert (4.2.2). Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Inkubiert wurde mit den im Zuge der Immunisierung erhaltenen Prä- und Postimmunseren gegen die verschiedenen GFV-Proteine in den Verdünnungen 1:150 (Anti-GFV-C und Anti-GFV-E; b und c) oder 1:500 (Anti-GFV-NS1; a). Die Detektion erfolgte mit einem gegen Kaninchen gerichteten Zweitantikörper (goat-anti-rabbit-Poly-HRP, Pierce) in den Verdünnungen 1:30000 (a und c) oder 1:50000 (b). Entwickelt wurde mit dem Super Signal West Dura Reagenz von Thermo Scientific.

5.2.1.2.4 Kreuzreaktivitätstest

Für eine diagnostische Anwendung ist ein spezifischer Nachweis des Gelbfiebervirus essentiell. Ziel bei der Auswahl der Immunisierungspeptide war es daher, eine Kreuzreaktivität mit anderen Flaviviren auszuschließen. Um dies zu testen, wurde ein kommerzieller Immunfluoreszenztest der Firma Euroimmun verwendet, der für die serologische Diagnostik flaviviraler Erkrankungen entwickelt wurde (4.3.5).

Zellen, die mit verschiedenen Flaviviren infiziert waren, wurden mit den hier hergestellten Peptidantikörpern inkubiert. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte Zellen.

Für alle in dieser Arbeit hergestellten Anti-GFV-Seren ließ sich ein positives Fluoreszenzsignal in den GFV-infizierten Zellen nachweisen. Die nicht-infizierten Zellen sowie die mit anderen Flaviviren infizierten Zellen zeigten kein spezifisches Fluoreszenzsignal (Abb. 5.15 und 5.16).

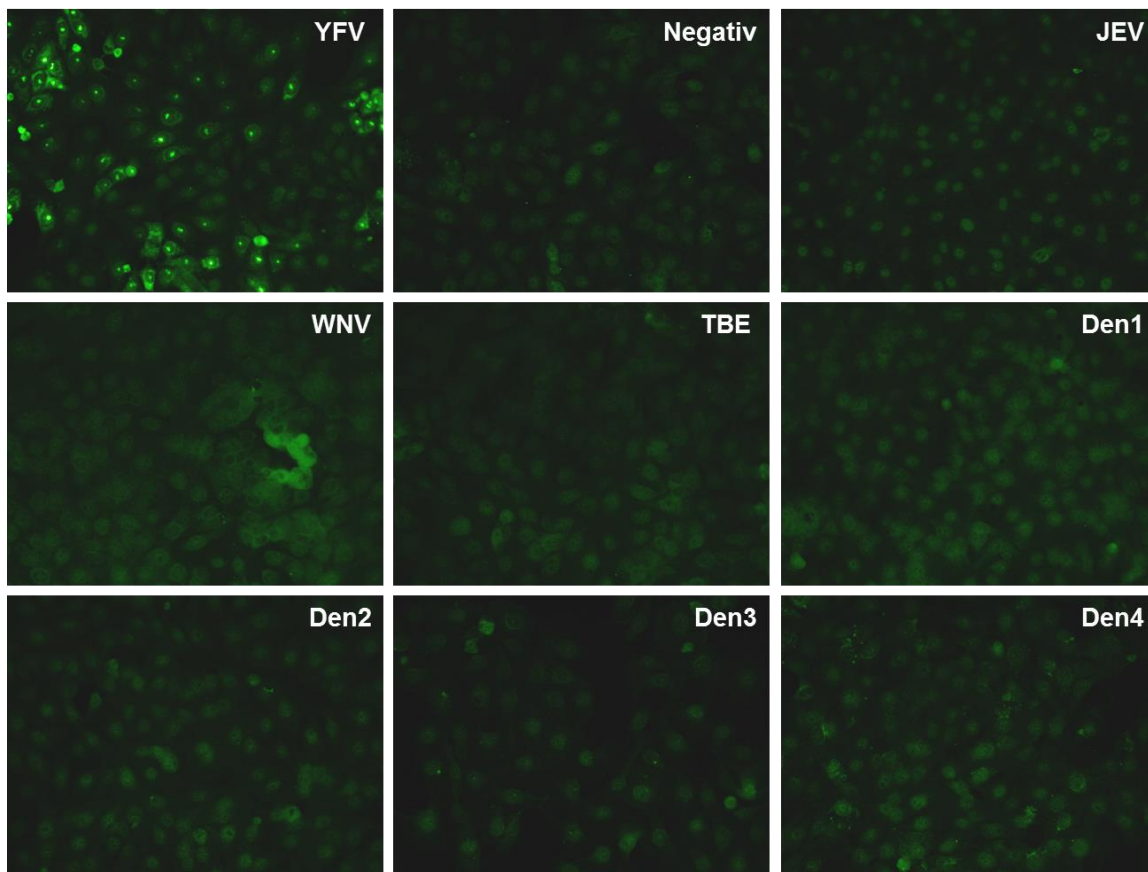
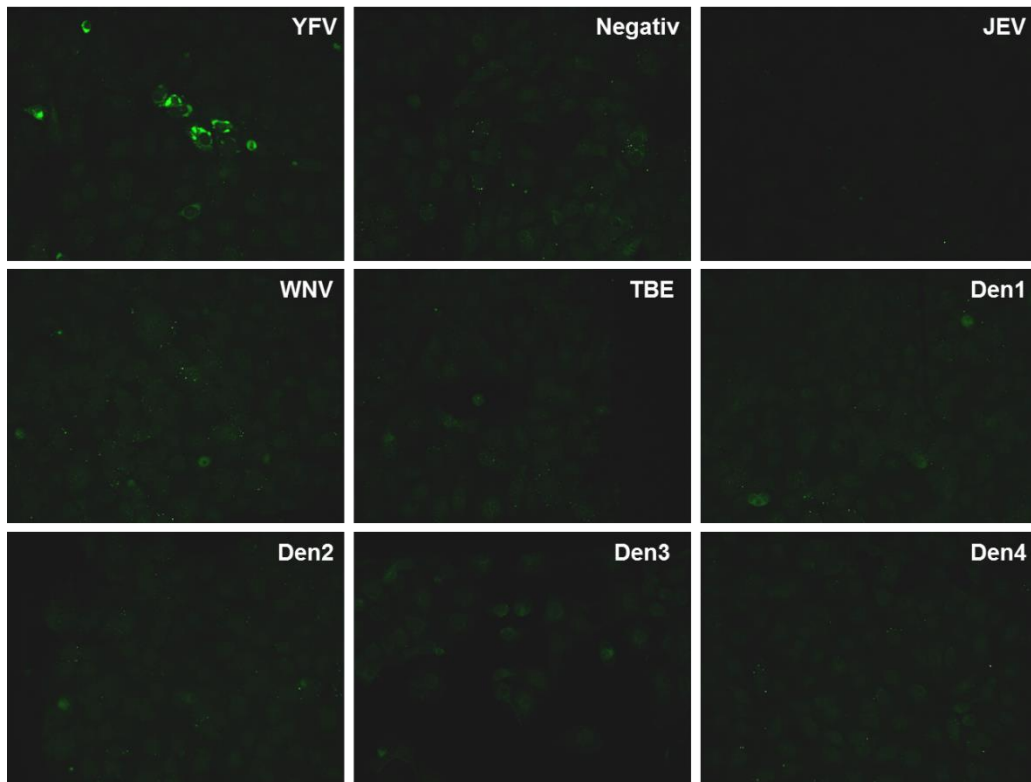


Abb. 5.15: Indirekter Immunfluoreszenztest zur Detektion von Antikörpern gegen verschiedene Flaviviren (4.3.5). Die Inkubation wurde mit dem Anti-GFV-C-Serum in einer Verdünnung von 1:20 und einem geeigneten Zweitantikörper (goat-anti-rabbit, FITC) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit 20facher Vergrößerung.

(YFV=Gelbfiebervirus, JEV=Japanisches Enzephalitis-Virus, WNV=West-Nil-Virus, TBE=Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, Den1-4=Denguevirus Serotypen 1-4)

ERGEBNISSE

a)



b)

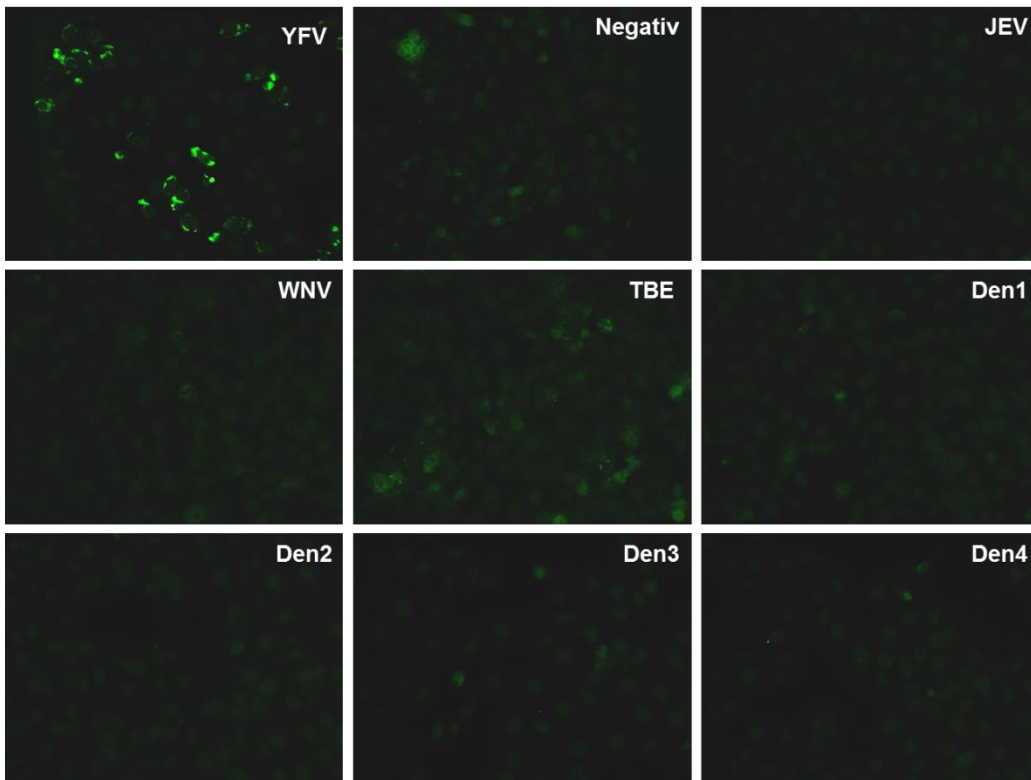


Abb. 5.16: Indirekter Immunfluoreszenztest zur Detektion von Antikörpern gegen verschiedene Flaviviren (4.3.5). Die Inkubation wurde mit dem Anti-GFV-E-Serum (a) und dem Anti-GFV-NS1-Serum (b) in einer Verdünnung von 1:20 und einem geeigneten Zweitantikörper (goat-anti-rabbit, FITC) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit 20facher Vergrößerung. (YFV=Gelbfieberevirus, JEV=Japanisches Enzephalitis-Virus, WNV=West-Nil-Virus, TBE=Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, Den1-4=Denguevirus Serotypen 1-4)

5.2.1.2.5 Neutralisationstest

Die hergestellten Antiseren wurden außerdem auf ihre neutralisierenden Eigenschaften untersucht. Dazu wurde der Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT) verwendet (4.3.6). Die Seren Anti-GFV-C und Anti-GFV-E zeigten in diesem Test keinerlei neutralisierende Fähigkeiten. Das Anti-GFV-NS1-Serum wies einen Neutralisationstiter von 1:6 auf (Daten nicht gezeigt).

5.2.1.2.6 Weiterführende Charakterisierung des Anti-GFV-NS1-Serums

Aufgrund des unspezifischen Signals im Western Blot und der schwachen Signalstärke im Immunfluoreszenztest wurde das Anti-GFV-E-Serum nicht weiter verwendet (6.2.1). Der Nachweis des C-Proteins mit dem Anti-GFV-C-Serum im Western Blot konnte in weiteren Versuchen nicht zufriedenstellend reproduziert werden bzw. aufgrund einer zu großen Hintergrundfärbung nicht klar interpretiert werden. Daher wurde dieses Serum im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur noch im IIFT verwendet (6.2.1).

Das Anti-GFV-NS1-Serum zeigte in beiden Methoden ein reproduzierbares und spezifisches Ergebnis und wurde daher weiter charakterisiert.

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden verschiedene Verdünnungsstufen eines virushaltigen Zellkulturüberstandes in einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt (4.2.1), auf eine Membran transferiert (4.2.2) und mit dem Anti-GFV-NS1-Serum inkubiert (4.3.2). Die Virusmenge in dem verwendeten Überstand wurde zuvor mittels Plaquetest bestimmt und auf einen Virustiter von $2,8 \times 10^6$ PFU/ml berechnet (4.5.4).

Mit dem Anti-GFV-NS1-Serum lässt sich das NS1-Protein in diesem Versuchsansatz im Zellkulturüberstand mit einer Viruskonzentration von mindestens $2,8 \times 10^5$ PFU/ml nachweisen (Abb. 5.17). Bei einer Viruskonzentration von $5,6 \times 10^4$ PFU/ml ist bereits kein Signal mehr detektierbar.

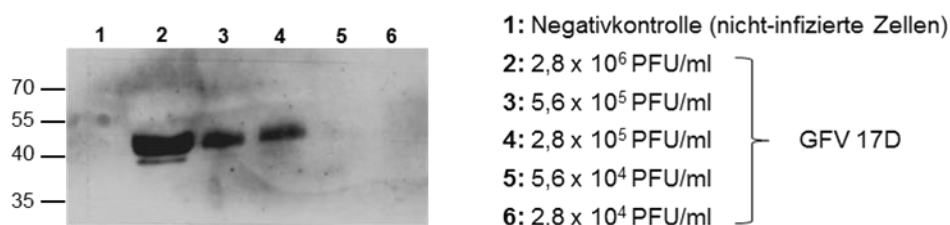


Abb. 5.17: Immunoblot zur Sensitivitätsbestimmung des Anti-GFV-NS1-Serums. Der Überstand GFV-infizierter PS-Zellen wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen mittels SDS-Page aufgetrennt (4.2.1), auf eine NC-Membran ($0,45 \mu\text{m}$) transferiert (4.2.2) und mit dem Anti-GFV-NS1-Serum in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der Überstand nicht-infizierter Zellen aufgetragen. Zur Detektion wurde ein geeigneter Zweitantikörper eingesetzt (goat-anti-rabbit-HRP, Pierce; 1:5000) (4.3.2). Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Die Entwicklung erfolgte mit dem Super Signal West Femto Reagenz von Thermo Scientific.

ERGEBNISSE

Das Anti-GFV-NS1-Serum wurde zusätzlich hinsichtlich seiner kreuzreaktiven Eigenschaften zu anderen verwandten Viren im Western Blot untersucht. Dazu wurden virushaltige Zellkulturüberstände der GFV-Stämme Asibi, 17D, 17D Bulk3, Brasil und Ivory Coast sowie der Viren West-Nil-Virus (WNV) France, West-Nil-Virus Kunjin, Japanisches Enzephalitis-Virus (JEV), Venezolanisches Equines Enzephalitis-Virus (VEEV), Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSME) und die Denguevirus Serotypen 1-4 in einer SDS-Page aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit dem Anti-GFV-NS1-Serum inkubiert (3.13 und 4.2.1, 4.2.2, 4.3.2). Als Kontrolle wurden die Überstände nicht-infizierter Zellen aufgetragen. Abb. 5.18 zeigt das Ergebnis des Kreuzreaktivitätstests. Mit dem Anti-GFV-NS1-Serum lässt sich, mit Ausnahme des Impfstammes 17D Bulk3, das NS1-Protein aller hier getesteten GFV-Stämme nachweisen. Für alle anderen Viren sowie für die beiden Negativkontrollen lässt sich kein spezifisches Signal detektieren.

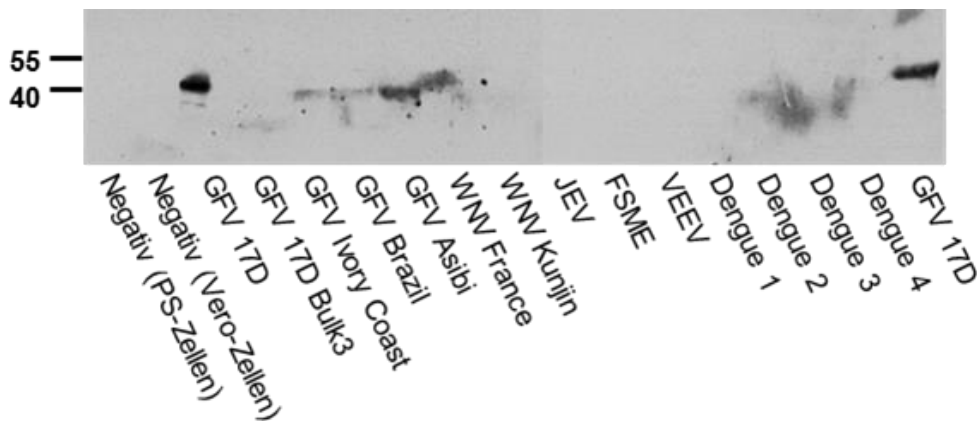


Abb. 5.18: Immunoblot zur Bestimmung der Kreuzreaktivität des Anti-GFV-NS1-Serums. Die Kulturüberstände infizierter Zellen wurden mittels SDS-Page aufgetrennt (4.2.1), auf eine NC-Membran (0,45 µm) transferiert (4.2.2) und mit dem Anti-GFV-NS1-Serum in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der Überstand nicht-infizierter Zellen aufgetragen. Zur Detektion wurde ein geeigneter Zweitantikörper eingesetzt (goat-anti-rabbit-HRP, Pierce; 1:5000) (4.3.2). Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Die Entwicklung erfolgte mit dem Super Signal West Femto Reagenz von Thermo Scientific. (JEV=Japanisches Enzephalitis-Virus, WNV=West-Nil-Virus, FSME=Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, VEEV=Venezolanisches Equines Enzephalitis-Virus)

Um die Sensitivität für den Nachweis des NS1-Proteins zu erhöhen und weitere Möglichkeiten für den Proteinnachweis zu schaffen, wurden die IgG-Antikörper des Anti-GFV-NS1-Serums aufgereinigt (Anti-GFV-NS1-IgG) und mit Biotin (Anti-GFV-NS1-IgG-Biotin) bzw. HRP (Anti-GFV-NS1-IgG-HRP) gekoppelt.

Durch die Kopplung der Antikörper mit Biotin ist eine weitere Möglichkeit des signalverstärkenden Proteinnachweises über die Detektion mit Streptavidin-HRP gegeben. Durch die Kopplung mit HRP ist ein Nachweis des Proteins ohne die Inkubation mit einem

ERGEBNISSE

Zweitantikörper möglich. Die IgG-Aufreinigung und -Kopplung wurde von der Firma Eurogentec durchgeführt.

Die Funktionalität der aufgereinigten Antikörper (Anti-GFV-NS1-IgG) wurde im Western Blot und IIFT mit dem ursprünglichen Serum (Anti-GFV-NS1-Serum) verglichen (Abb. 5.19, Abb. 5.20). Des Weiteren wurde der Nachweis des NS1-Proteins im Western Blot mit den Biotin- und HRP-gekoppelten Antikörpern getestet (Abb. 5.19).

Der direkte Vergleich der aufgereinigten Anti-GFV-NS1-IgG-Antikörper mit dem Anti-GFV-NS1-Serum zeigt sowohl im Western Blot (Abb. 5.19, Spuren 3 und 4) als auch im IIFT (Abb. 5.20) ein schwächeres Signal bei einer Inkubation mit dem Anti-GFV-NS1-IgG-Antikörper. Mit der Aufreinigung verbessert sich jedoch auch das Verhältnis von spezifischem Signal zu Hintergrundfärbung, was sich in einem klareren Bild im Westernblot widerspiegelt (Abb. 5.19, Spur 4). Bei der Detektion des NS1-Proteins mit dem Biotin-gekoppelten Anti-GFV-NS1-IgG in Kombination mit Streptavidin-HRP ist eine deutliche Signalverstärkung zu sehen, die jedoch wieder mit einer starken Hintergrundfärbung einhergeht (Abb. 5.19, Spur 5). Bei dem Nachweis des NS1-Proteins mit dem HRP-gekoppelten Anti-GFV-NS1-Antikörper ist wie auch in den Negativkontrollen kein Signal zu detektieren (Abb. 5.19, Spuren 1, 2 und 6).

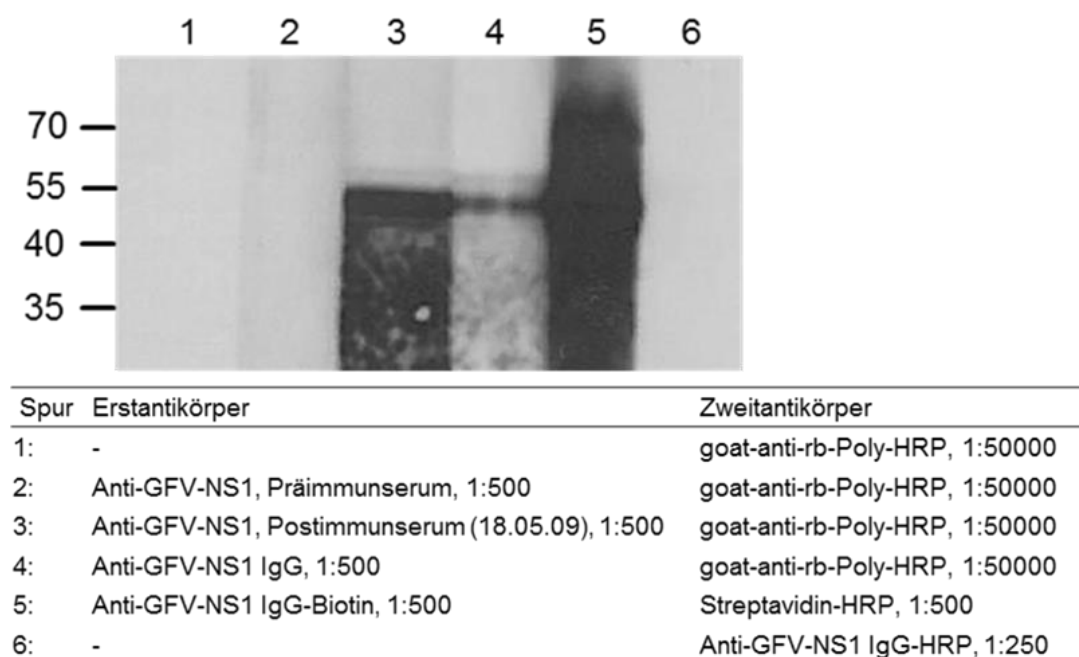


Abb. 5.19: Immunoblot zum Nachweis des GFV-NS1-Proteins. Die Überstände GFV-infizierter PS-Zellen wurden mittels SDS-Page aufgetrennt (4.2.1) und auf eine NC-Membran (0,45 µm) transferiert (4.2.2). Der Nachweis des NS1-Proteins erfolgte mit verschiedenen Kombinationen von Erst- und Zweitantikörpern (Tabelle) (4.3.2). Als Negativkontrolle wurde nur mit dem Zweitantikörper (Spur 1) oder mit dem entsprechenden Präimmunserum (Spur 2) inkubiert. Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Die Entwicklung erfolgte mit dem Super Signal West Femto Reagenz von Thermo Scientific.

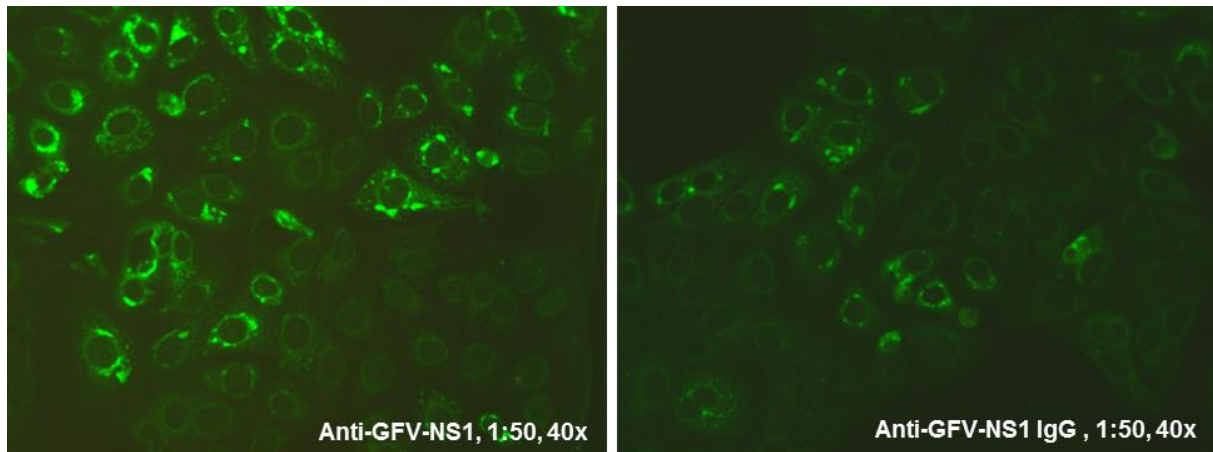


Abb. 5.20: Indirekter Immunfluoreszenztest zur Detektion von GFV-spezifischen Antikörpern (4.3.4). Die Inkubation erfolgte mit dem Anti-GFV-NS1-Serum (links) und den aufgereinigten Anti-GFV-NS1 IgG-Antikörpern (rechts), jeweils in einer Verdünnung von 1:50, sowie mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper (goat-anti-rabbit, FITC). Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit 40facher Vergrößerung.

5.2.2 Untersuchung der viralen Proteinexpression im Verlauf einer Infektion

Die in dieser Arbeit hergestellten Antiseren gegen die GFV-Proteine NS1 und C wurden dazu verwendet, die virale Proteinexpression im Infektionsverlauf zu dokumentieren. Zu diesem Zweck wurde eine Wachstumskinetik über einen Zeitraum von einer Woche mit dem GFV-Impfstamm 17D in VeroE6-Zellen durchgeführt (4.5.6). Der Zellkulturüberstand wurde mittels Plaquetest auf infektiöse Viruspartikel (4.5.4), sowie auf das Vorhandensein von sekretiertem NS1-Protein durch die Analyse im Western Blot (4.2.1, 4.2.2, 4.3.2) untersucht. Die intrazelluläre Expression der Proteine E, C und NS1 wurde im IIFT (4.3.3) nachgewiesen und nach der Extraktion zellulärer Proteine für das NS1-Protein zusätzlich im Western Blot (4.2.1, 4.2.2, 4.3.2).

Im Infektionsverlauf ist zunächst ein stark ansteigender Virustiter in den ersten 4 Tagen zu beobachten, der 91 Stunden nach der Infektion (hpi) mit einem Titer von $1,24 \times 10^6$ PFU/ml seinen Höhepunkt erreicht. Im weiteren Verlauf nimmt der Virustiter bis zum Versuchsende wieder bis zu einem Titer von $5,18 \times 10^3$ PFU/ml stetig ab (Abb. 5.21 a).

Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Expression des intrazellulären NS1-Proteins im Western Blot (Abb. 5.21 b, unten). Das NS1-Protein tritt hier 68 Stunden nach der Infektion zum ersten Mal in Erscheinung. Es zeigt die stärkste Expression nach 122 Stunden und schwächt sich zum Versuchsende hin wieder leicht ab, bleibt dabei jedoch konstant in einer gut detektierbaren Konzentration erhalten. Die sezernierte Form des NS1-Proteins ist erst einen Tag später (91 hpi) im Zellkulturüberstand nachweisbar und bleibt im weiteren Verlauf in seiner Menge unabhängig vom Virustiter konstant (Abb. 5.21 b, oben).

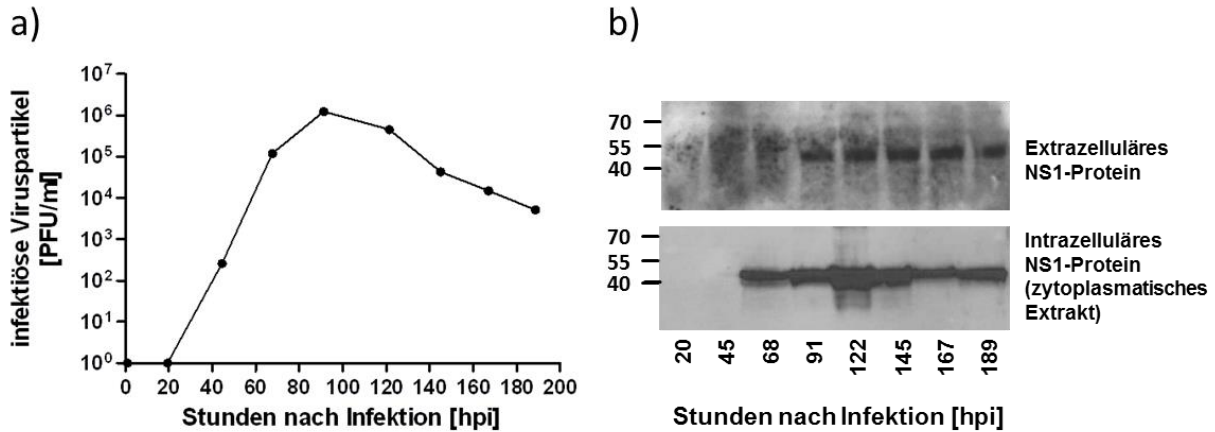


Abb. 5.21: Infektionsverlauf einer GFV-Infektion (GFV-17D, MOI=0,01) in VeroE6-Zellen. Die Anzahl neugebildeter infektiöser Viruspartikel wurde mittels Plaquetest bestimmt (4.5.4) (a). Die intrazelluläre und extrazelluläre Expression des GFV-NS1-Proteins im Verlauf der Infektion wurde mit dem Anti-GFV-NS1-Serum im Western Blot nachgewiesen (b). Dazu wurden die Zellkulturüberstände sowie die Proteine der zytoplasmatischen Zellfraktion nach entsprechender Extraktion (4.2.3) in einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt (4.2.1) und anschließend auf eine NC-Membran (0,45 µm) übertragen (4.2.2). Die Proteindetektion erfolgte mit dem Anti-GFV-NS1-Serum (1:500) und einem geeigneten Zweitantikörper (goat-anti-rabbit-poly-HRP, 1:50.000) (4.3.2). Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Die Entwicklung erfolgte mit dem Super Signal West Femto Reagenz von Thermo Scientific.

Dieser Verlauf spiegelt sich auch im Immunfluoreszenztest wider (Abb. 5.22), in dem die stärkste Proteinexpression für alle drei Proteine 91 und 122 Stunden nach der Infektion sichtbar ist. Die Proteine E und NS1 lassen sich bereits vereinzelt 45 Stunden nach der Infektion nachweisen (Abb. 5.22, Mitte und unten), das C-Protein wird erst einen Tag später (68 hpi) detektiert (Abb. 5.22, oben). Ab 145 Stunden nach der Infektion ist ein Absterben der Zellen zu beobachten.

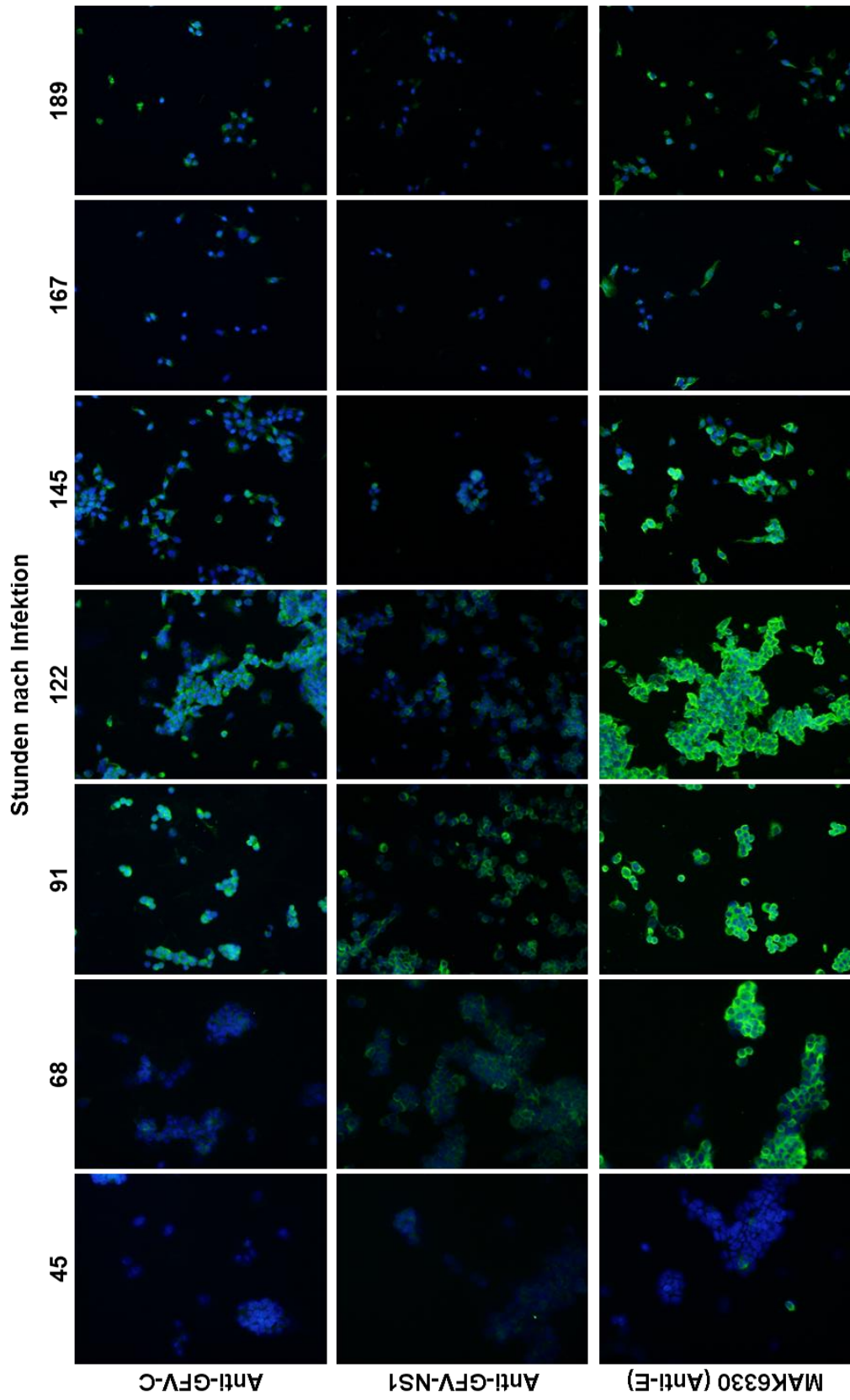


Abb. 5.22: Indirekter Immunfluoreszenztest (4.3.3) zur Detektion der GFV-Proteine E, C und NS1 in VeroE6-Zellen über einen Zeitraum von 189 Stunden nach der Infektion. Der Nachweis erfolgte mit dem Anti-GFV-C-Serum (1:25) (oben), dem Anti-GFV-NS1-Serum (1:25) (Mitte) und dem monoklonalen Anti-E-Antikörper MAK6330 (1:100) (unten) sowie einem geeigneten Zweitantikörper (goat-anti-rabbit-FITC und goat-anti-mouse-FITC, 1:200) (grüner Farbkanal). Die Kernfärbung wurde mit DAPI durchgeführt (blauer Farbkanal). Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit 20facher Vergrößerung.

5.2.3. Entwicklung eines ELISA-Tests zum direkten Virusnachweis

Um die Bandbreite diagnostischer Mittel im Bereich des direkten Virusnachweises zu erweitern, sollte ein ELISA-Test zur Detektion viralen Antigens entwickelt werden, der idealerweise auch unter Feldbedingungen anzuwenden ist (1.1.4, 2.2). Zu diesem Zweck wurden verschiedene Ansätze getestet, die im Folgenden dargestellt werden. Die Parameter wie Antikörperverdünnungen oder Peptidkonzentrationen wurden, falls erforderlich, in entsprechenden Vorversuchen definiert und sind hier nicht aufgeführt.

5.2.3.1 Sandwich-ELISA zur spezifischen Detektion des GFV-E-Proteins

In einem ersten Ansatz wurde versucht, Viruspartikel in menschlichem Serum nachzuweisen. Dazu wurde ein Sandwich-ELISA gewählt, der sich gegen das GFV-E-Protein richtet. Der Versuch wurde wie im Grundprotokoll beschrieben durchgeführt (4.3.7), das sich hauptsächlich an den Ergebnissen einer zu diesem Thema durchgeführten Diplomarbeit orientiert (Litzba, 2006). Eine 96-well-Platte wurde mit dem gegen das E-Protein gerichteten monoklonalen Antikörper MAK6330 in einer Verdünnung von 1:800 beschichtet und anschließend mit unterschiedlichen virushaltigen Lösungen inkubiert, wobei sowohl verschiedene Viruskonzentrationen als auch verschiedene Lösungen zur Verdünnung ausgetestet wurden. Als Verdünnungslösungen wurden *Phosphate Buffered Saline* (PBS) und Fötales Kälberserum (FKS) verwendet sowie unterschiedliche menschliche Seren, die sich durch ihre vorherige Exposition zu Flaviviren unterscheiden (S-Naiv = negativ/keine vorherige Exposition zu Flaviviren, S-FSMEvac = nach FSME-Immunsisierung, S-Dengue = nach Denguevirus-Infektion). Die Antigendetektion erfolgte mit einer HRP-konjugierten Variante des MAK6330-Antikörpers (HRP-MAK6330, 1:2400) und anschließender Substratinkubation (4.3.7).

Abb. 5.23 zeigt die gemessene Extinktion im ELISA für den Antigennachweis in verschiedenen Verdünnungslösungen bezogen auf die enthaltene Viruskonzentration. Der Test zeigt einen sehr guten Antigennachweis in Abhängigkeit der Viruskonzentration bei einer Virusverdünnung in PBS und FKS (Abb. 5.23, PBS und FKS). Bei einer Virusverdünnung in menschlichem Serum zeigt sich lediglich ein sehr schwaches Signal bei höheren Viruskonzentrationen, das sich weiterhin verschlechtert, wenn der Patient vorher bereits anderen Flaviviren ausgesetzt war (Abb. 5.23, S-Naiv, S-FSMEvac, S-Dengue).

Da der Unterschied zwischen dem hier verwendeten FKS und menschlichem Serum hauptsächlich in der vorherigen Hitze- und damit Komplementinaktivierung des FKS liegt, wurde dieser Schritt im Versuchsablauf simuliert. Dazu wurde das Serum vor (S-Naiv + 56°C + Virus) bzw. nach (S-Naiv + Virus + 56°C) der Viruszugabe jeweils 30 Minuten bei 56°C erhitzt.

ERGEBNISSE

Im Falle der Hitzeinaktivierung des Serums vor der Virusverdünnung ist ein positiver Effekt zu beobachten (Abb. 5.23, S-Naiv + 56°C + Virus) und im Vergleich zur Detektion mit unbehandeltem Serum (S-Naiv) verdoppelt sich die Intensität des Signals. Im Falle der Hitzeinaktivierung nach der Viruszugabe bleibt das Signal komplett aus (Abb. 5.23, S-Naiv + Virus + 56°C). Da im Falle einer natürlichen Infektion das Virus im Serum bereits vorliegt und die Hitzeinaktivierung im Zuge des Virusnachweises anschließend durchgeführt werden müsste, ist diese Methode der Seruminaktivierung für die weitere diagnostische Testentwicklung auszuschließen.

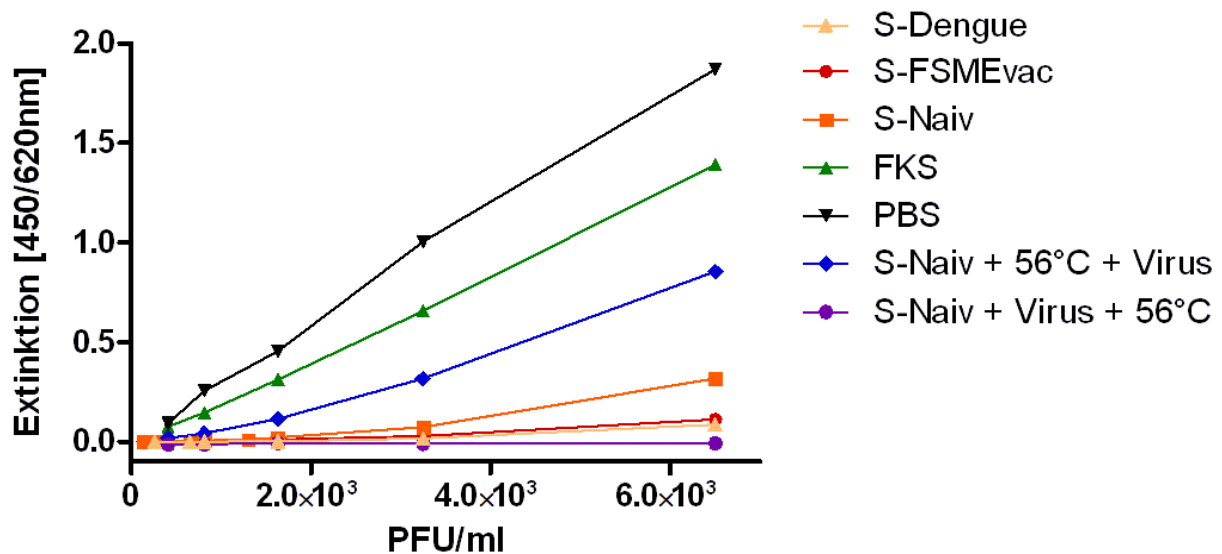


Abb. 5.23: Sandwich-ELISA zur Detektion viraler Partikel in menschlichem Serum, gerichtet gegen das GFV-E-Protein. Virushaltige Zellkulturüberstände wurden in PBS, FKS und humanen Seren, die entweder naiv gegenüber Flaviviren waren (S-Naiv) oder zuvor bereits mit Flaviviren in Kontakt gekommen sind (S-FSMEvac, S-Dengue), verdünnt und für den Antigennachweis im ELISA wie unter 4.3.7 beschrieben verwendet. Zur Seruminaktivierung wurde das naive Serum zusätzlich vor (S-Naiv + 56°C + Virus) bzw. nach (S-Naiv + Virus + 56°C) der Viruszugabe für 30 min bei 56°C erhitzt. Fängerantikörper: MAK6330 (1:800); Detektionsantikörper: HRP-MAK6330 (1:2400).

Im weiteren Verlauf wurde versucht, das Serum durch die Zugabe chemischer Substanzen zu inaktivieren. Dazu wurde dem Serum nach der Viruszugabe EDTA [0,02 M] oder Zymosan [10 mg/ml] zugegeben und für eine (Zymosan) bzw. zwei (EDTA) Stunden bei 37°C inkubiert.

Die chemische Seruminaktivierung erwirkt im Vergleich zum nicht-inaktivierten Serum eine leichte Verstärkung des Signals, erzielt dennoch lediglich eine Extinktion von ca. 0,3 (Abb. 5.24).

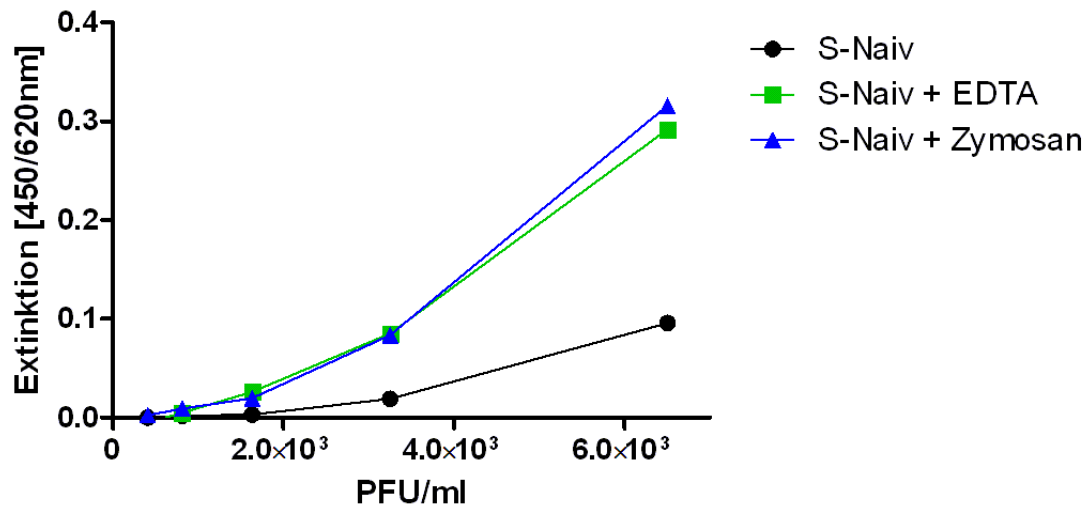


Abb. 5.24: Sandwich-ELISA gegen das GFV-E-Protein zur Detektion viraler Partikel in menschlichem Serum nach chemischer Seruminaktivierung. Virushaltige Zellkulturüberstände wurden in einem gegenüber Flaviviren naiven, menschlichen Serum (S-Naiv) verdünnt und im ELISA wie unter 4.3.7 beschrieben detektiert. Zur chemischen Seruminaktivierung wurde dem Serum nach der Viruszugabe entweder EDTA [0,02 M] (S-Naiv + EDTA) oder Zymosan [10 mg/ml] (S-Naiv + Zymosan) zugefügt und für 1 (Zymosan) bzw. 2 Stunden (EDTA) bei 37°C inkubiert. Fängerantikörper: MAK6330 (1:800); Detektionsantikörper: HRP-MAK6330 (1:2400).

5.2.3.2 Kompetitiver ELISA zur Detektion des GFV-NS1-Proteins

Mit dem in dieser Arbeit hergestellten Peptidantikörper gegen das GFV-NS1-Protein steht ein neues Tool für die Detektion viralen Antigens zur Verfügung. Es wurde daher versucht, ein Nachweissystem zur spezifischen Detektion der löslichen Variante des NS1-Proteins in menschlichem Serum zu entwickeln.

Um die Funktionalität des Antikörpers im ELISA-Testsystem zu bestätigen, wurde eine 96-well-Platte mit verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Immunisierungspeptides (3.8) beschichtet und mit dem Anti-GFV-NS1-Serum bzw. mit dem aufgereinigten Anti-GFV-NS1-IgG in einer Verdünnung von 1:500 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper (Goat-anti-rabbit-Poly-HRP, 1:10.000) und anschließender Substratinkubation (4.3.7). Als Negativkontrolle wurde lediglich mit dem Zweitantikörper inkubiert. Das Ergebnis in Abb. 5.25 a zeigt eine positive Reaktion des Anti-GFV-NS1-Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid im ELISA, die sich in Abhängigkeit der Peptidkonzentration verstärkt und eine linear ansteigende Extinktion aufweist. Der Zweitantikörper allein zeigt keine Interaktion mit dem Peptid oder dem Material der Platte.

Um auf diese Reaktion aufzubauen, wurde versucht, eine spezifische Detektion des NS1-Proteins in einem kompetitiven ELISA-Test zu erzielen, dessen Prinzip auf einer Vorinkubation des Antikörpers mit einer virushaltigen Lösung beruht. Ist das NS1-Protein in der Lösung enthalten, werden durch die spezifische Bindung an den Antikörper die Bindungsstellen blockiert, und eine Interaktion des Antikörpers mit dem Peptid im ELISA-

ERGEBNISSE

Test bleibt aus. Ein ausbleibendes Signal im Test würde demnach einem positiven Testergebnis bzw. einer Virusinfektion entsprechen (4.3.8). Für diesen Versuch wurde das Anti-GFV-NS1-Serum vor der Inkubation im Peptid-ELISA für 1 Stunde bei 37°C entweder mit PBS (Anti-GFV-NS1 + PBS), mit dem Immunisierungspeptid [4 µg/ml] (Anti-GFV-NS1 + Peptid) oder mit virushaltigem Zellkulturüberstand, der zuvor im Western Blot auf die Anwesenheit des NS1-Proteins überprüft wurde (Anti-GFV-NS1 + GFV-17D) (4.2.1, 4.2.2, 4.3.2), in einem Verhältnis von 1:1 inkubiert.

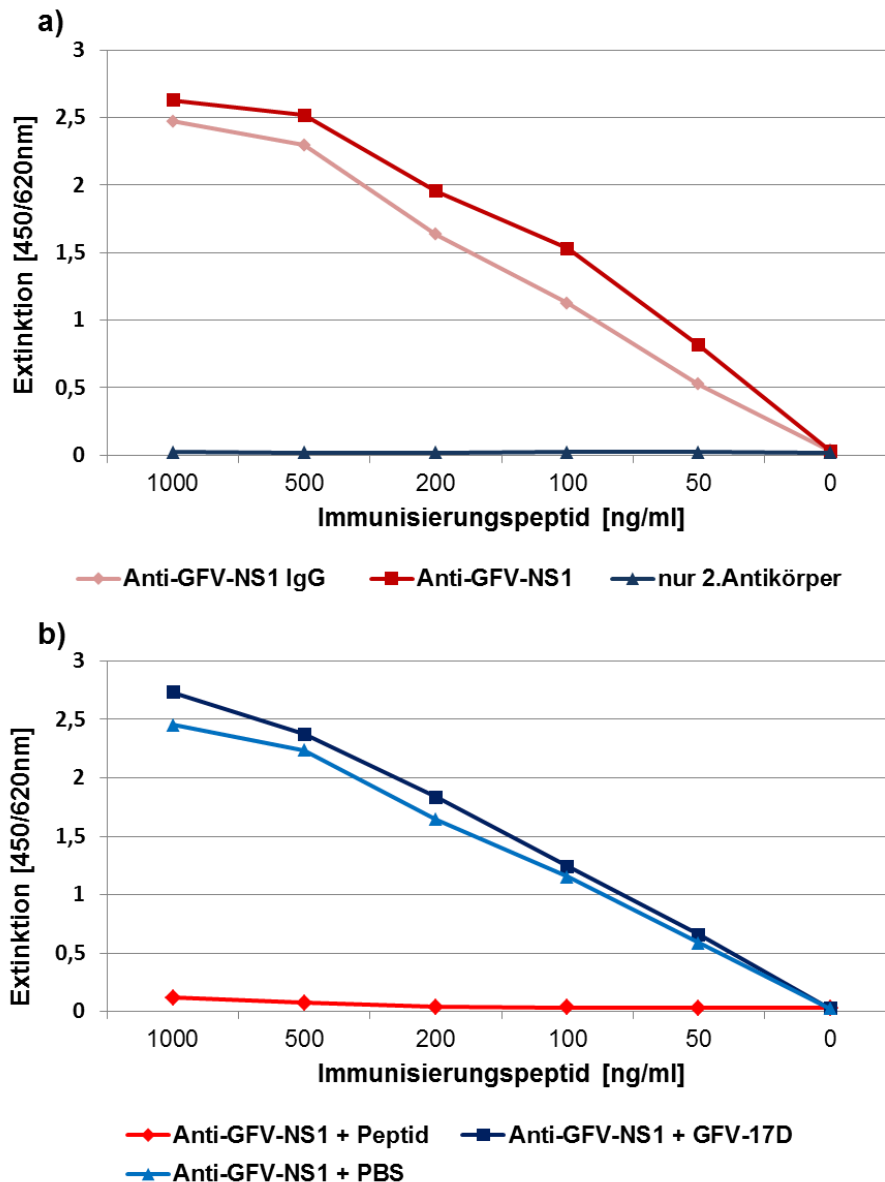


Abb. 5.25: Kompetitiver ELISA zur Detektion des GFV-NS1-Proteins. a) ELISA zur Austestung der Reaktivität des Anti-GFV-NS1-Antikörpers mit dem Immunisierungspeptid. b) Kompetitiver ELISA zur Detektion löslichen NS1-Proteins in GFV-infizierten Zellkulturüberständen. Das Anti-GFV-NS1-Serum wurde vor der Testdurchführung mit dem Immunisierungspeptid [4 µg/ml] (Anti-GFV-NS1 + Peptid), virushaltigem Zellkulturüberstand (Anti-GFV-NS1 + GFV-17D) oder PBS (Anti-GFV-NS1 + PBS) inkubiert. Plattenbeschichtung: Immunisierungspeptid direkt; Detektion: Anti-GFV-NS1-Serum (1:500) + Goat-anti-rabbit-Poly-HRP (1:10.000) (4.3.8)

Das Ergebnis zeigt eine nahezu vollständige Unterdrückung des Signals bei vorheriger Inkubation des Serums mit dem Immunisierungspeptid (Abb. 5.25 b). Bei einer Vorinkubation des Antikörpers mit PBS oder mit virushaltigem Zellkulturüberstand ist kein inhibitorischer Effekt sichtbar. Eine vorherige Hitzebehandlung der Viruslösung sowie die Behandlung mit SDS zur Denaturierung des Proteins führten ebenfalls zu keinem erfolgreichen Ergebnis in Form einer Signalunterdrückung (Daten nicht gezeigt).

5.2.3.3 Sandwich-ELISA zur Detektion des GFV-NS1-Proteins

In einem weiteren Ansatz zum Nachweis des sezernierten NS1-Proteins wurde erneut die Methode des Sandwich-ELISAs gewählt und verschiedene Detektionsantikörper untersucht (4.3.7). Dazu wurde das aufgereinigte Anti-GFV-NS1-IgG (1:500) an eine 96-well-Platte gebunden und mit PBS, dem Immunisierungspeptid [1 µg/ml] sowie mit Zellkulturüberständen nicht-infizierter und GFV-infizierter Zellen inkubiert. Für die Detektion wurden die in Tabelle 5.8 angegebenen Kombinationen an Erst- und Zweitantikörpern getestet.

Abbildung 5.26 fasst die Ergebnisse des NS1-Nachweises mit den verschiedenen Antikörpern im Sandwich-ELISA zusammen.

Grundsätzlich lässt sich mit keinem der getesteten Detektionsantikörper ein Unterschied in der Signalstärke zwischen der Detektion antigenhaltiger (Immunisierungspeptid bzw. Zellkulturüberstand GFV-infizierter Zellen) und negativer Lösung (PBS bzw. Zellkulturüberstand nicht-infizierter Zellen) beobachten (Abb. 5.26). Die einzige Ausnahme stellt die Detektion des Immunisierungspeptids mit den Antikörpern Anti-GFV-NS1-Biotin und Streptavidin-HRP dar, was sich in einer ca. 4-fachen Extinktion im Vergleich zu den anderen Lösungen darstellt (Abb. 5.26, 8 und 9). Eine vorherige Hitzebehandlung der Zellkulturüberstände zur Denaturierung des Antigens hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Signalstärke (Daten nicht gezeigt).

Bei einem Nachweis in Kombination mit dem Zweitantikörper Goat-anti-rabbit-Poly-HRP sieht man eine Varianz der Signalstärke in Abhängigkeit der Konzentration des Zweitantikörpers für alle getesteten Lösungen (Abb. 5.26, 4-7); ein Unterschied zwischen antigenhaltiger und negativer Lösung lässt sich aber auch hier nicht beobachten. Des Weiteren zeigt auch die alleinige Inkubation mit den Zweitantikörpern in der Negativkontrolle ein vergleichbares Signal (Abb. 5.26, 1 und 2).

Eine direkte Detektion des NS1-Proteins mit dem HRP-gekoppelten Anti-GFV-NS1-IgG ist, wie auch bereits im Western Blot gezeigt, nicht möglich (5.2.1.2.6, Abb. 5.19) (Abb. 5.26, 3).

ERGEBNISSE

Tabelle 5.8: Übersicht über die im Sandwich-ELISA verwendeten Detektionsantikörper zum Nachweis des NS1-Proteins

	Erstantikörper	Zweitantikörper	
1:	-	Goat-anti-rabbit-Poly-HRP 1:10000	(Negativkontrolle)
2:	-	Streptavidin-HRP 1:250	(Negativkontrolle)
3:	-	Anti-GFV-NS1-HRP 1:500	
4:	Anti-GFV-NS1 1:500	Goat-anti-rabbit-Poly-HRP 1:10000	
5:	Anti-GFV-NS1 1:500	Goat-anti-rabbit-Poly-HRP 1:20000	
6:	Anti-GFV-NS1-IgG 1:500	Goat-anti-rabbit-Poly-HRP 1:10000	
7:	Anti-GFV-NS1-IgG 1:500	Goat-anti-rabbit-Poly-HRP 1:20000	
8:	Anti-GFV-NS1-Biotin 1:500	Streptavidin-HRP 1:250	
9:	Anti-GFV-NS1-Biotin 1:500	Streptavidin-HRP 1:500	

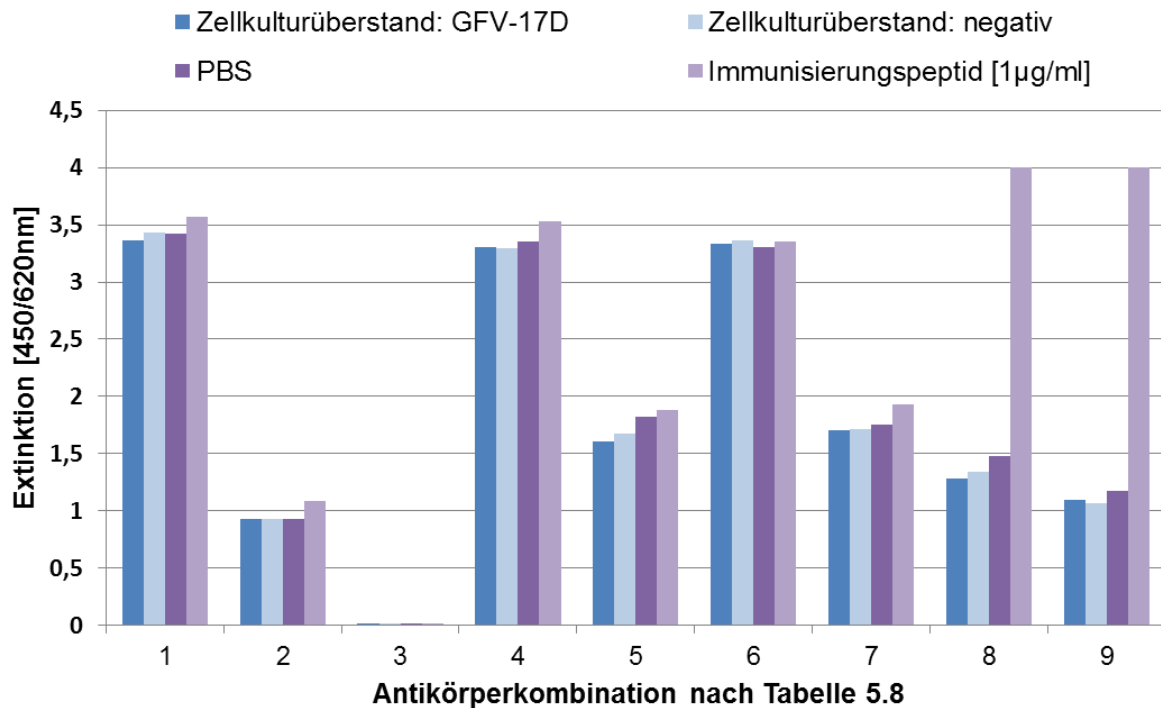


Abb. 5.26: Sandwich-ELISA zur Detektion des GFV-NS1-Proteins. Die Plattenbeschichtung erfolgte mit dem Anti-GFV-NS1-IgG (1:500). Die Inkubation erfolgte mit PBS, dem Immunisierungspeptid [1 µg/ml] sowie mit Zellkulturüberständen nicht-infizierter und GFV-infizierter Zellen. Zur Detektion wurden verschiedene Kombinationen von Erst- und Zweitantikörpern verwendet (Tabelle 5.8). Der ELISA wurde wie unter 4.3.7 beschrieben durchgeführt.

5.2.4 Herstellung eines fluoreszierenden infektiösen Gelbfiebervirus

Um eine Möglichkeit zu schaffen, die GFV-Pathogenese in lebenden Zellen zu untersuchen, sollte ein fluoreszenzmarkiertes Gelbfiebervirus konstruiert werden, das trotz genetischer Modifikation seine charakteristischen Eigenschaften behält und somit für Experimente unter dem *Live Cell Imaging* Mikroskop geeignet ist (2.2).

Nach erfolgter Literaturrecherche wurde zu diesem Zweck die FIAsh-Methode gewählt (4.1.12). Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, dass das eingefügte Peptid (Tetracystein-[TC]-Tag) mit seinen 6 Aminosäuren sehr klein ist und daher die Chance, dass das markierte Protein seine Funktion beibehält, im Vergleich zu anderen Fluoreszenzmarkierungen (z.B. durch GFP) verhältnismäßig groß ist. Außerdem sind die mit dem Peptid interagierenden Fluorophore (FIAsh, ReAsH) membrangängig, was eine Anfärbbarkeit des Virus in lebenden Zellen zulässt.

Um mit einer möglichst großen Wahrscheinlichkeit ein fluoreszenzmarkiertes GFV zu erhalten, das den oben genannten Anforderungen entspricht, sollten fünf verschiedene gentechnisch veränderte Viren konstruiert werden, die den TC-Tag an unterschiedlichen Stellen ihres Genoms tragen.

Für die Insertion des TC-Tags wurden drei Positionen im E-Protein und zwei im C-Protein ausgewählt. Bei der Wahl der Insertionsstellen wurde darauf geachtet, dass keine wesentlichen funktionellen Domänen oder wichtige Proteinbereiche ausgewählt wurden. Da für das GFV-E-Protein noch keine Röntgenstrukturanalyse vorliegt, wurden für die Markierung folgende Positionen im GFV-Genom, basierend auf der Struktur des E-Proteins des West-Nil-Virus (1.2.2.2), zur Insertion des TC-Tags ausgewählt:

17D-E-I1: zwischen den Basen 1120 und 1121 (Domäne I)

17D-E-I2: zwischen den Basen 1600 und 1601 (Domäne II)

17D-E-I3: zwischen den Basen 1378 und 1379 (Domäne I)

Für die Wahl der Insertionsstellen im C-Protein wurde als Grundlage die Struktur des Denguevirus-C-Proteins gewählt (1.2.2.2) und resultierte in folgenden Konstrukten:

17D-C1: zwischen den Basen 232 und 233 (zwischen Domäne $\alpha 1$ und $\alpha 2$)

17D-C2: zwischen den Basen 334 und 335 (zwischen Domäne $\alpha 3$ und $\alpha 4$)

Die Insertion des TC-Tags in das GFV-17D-Genom erfolgte auf Basis des Volllängeklons pACNR-FLYF-17D (3.7.1). Dazu wurden die Methoden rekombinante PCR (4.1.12.2), homologe Rekombination (4.1.12.3) und seitengerichtete Mutagenese (4.1.12.4) getestet. Alle diese Methoden führten aus verschiedenen Gründen nicht zum gewünschten Erfolg.

ERGEBNISSE

Der Ansatz der rekombinanten PCR hat prinzipiell funktioniert, und die entsprechenden Genombereiche konnten mit dem inserierten TC-Tag amplifiziert werden. Die anschließende Klonierung in den GFV-Volllängeklon blieb jedoch erfolglos.

Im Falle der homologen Rekombination hat der erste Rekombinationsschritt gut funktioniert und resultierte in der Insertion der *rpsL*-neo-Selektionskassette an der gewählten Insertionsstelle. Der Austausch der Selektionskassette gegen den durch rekombinante PCR hergestellten Genomabschnitt mit inseriertem TC-Tag im zweiten Rekombinationsschritt blieb aber auch in diesem Ansatz ohne Erfolg. Das Ergebnis waren unter anderem GFV-Sequenzen mit großen Deletionen oder inserierten *E.coli*-Sequenzen (Daten nicht gezeigt).

Bei dem Versuch, die Mutationen mittels seitengerichteter Mutagenese in das GFV-Genom zu inserieren, traten zwei Probleme auf. Zunächst zeigte sich, dass trotz der Optimierung des verwendeten Kits für eine Mutagenese großer Plasmide, der GFV-Volllängeklon zu groß ist, um eine Amplifikation des gesamten Plasmids erfolgreich durchzuführen. Daher wurde der entsprechende Genombereich in den Klonierungsvektor pDrive kloniert (4.1.12.4) und die Mutagenese in diesem Vektor durchgeführt. Des Weiteren musste die Insertion der Sequenz für den TC-Tag aufgrund ihrer Beschaffenheit und Größe in zwei Schritten ablaufen, wobei in einem ersten Versuchsdurchlauf die erste Hälfte der Sequenz eingefügt wurde und anschließend die zweite Hälfte. Prinzipiell hat diese Art der Mutagenese funktioniert, und die Sequenz für den TC-Tag konnte an gewünschter Stelle in das GFV-Genom eingefügt werden. Sequenzanalysen zeigten allerdings zusätzliche Punktmutationen auch an anderen Stellen des Genoms, die sich zum Teil auf die AS-Sequenz auswirkten oder zu einer Leserasterverschiebung führten. Zusätzlich gestaltete sich, wie auch schon im Ansatz der rekombinanten PCR, die Umklonierung des mutierten Genomabschnittes in den GFV-Volllängeklon schwierig und gelang nur für das Konstrukt 17D-E-I2. Versuche, aus diesem Konstrukt durch *in vitro* Transkription infektiöse virale Partikel zu erhalten, blieben ebenfalls erfolglos (4.1.11). In Kombination mit dem Ergebnis der zusätzlich eingefügten Mutationen wurden alle hier generierten Konstrukte verworfen.

Die Genomabschnitte mit den inserierten TC-Tags für die verschiedenen GFV-Konstrukte wurden letztendlich durch die Firma GENEART AG synthetisch hergestellt. Dazu wurden die zu synthetisierenden Genombereiche so gewählt, dass sie für die spätere Umklonierung die im GFV-Volllängeklon vorhandenen Restriktionsschnittstellen *Nsi*I und *Not*I beinhalten (3.7.1). Die Genomabschnitte haben somit eine Größe von 1965 bp und wurden von der Firma GENEART AG in den Klonierungsvektoren pMK-RQ bzw. pMA geliefert (3.7.3).

Die Genombereiche für die fünf GFV-Konstrukte wurden in den GFV-17D-Volllängeklon umkloniert (4.1.7, 4.1.8) und anschließend in MC1061-Zellen transformiert (4.6.6). Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR sowohl auf die Anwesenheit des Plasmids als auch auf die Anwesenheit des TC-Tags getestet (4.1.2.2) (Primerpaare:

ERGEBNISSE

Flash_for/U2as und Flash_for/E2as). Im Falle eines positiven Ergebnisses wurden die entsprechenden Bakterienklone angereichert und die modifizierten GFV-17D-Plasmide für das weitere Vorgehen isoliert (4.6.1, 4.6.2, 4.6.3, 4.6.4).

Die Umklonierung in den GFV-Volllängeklon war schließlich mit Ausnahme des Virus 17D-E-I2 für alle Konstrukte erfolgreich. Um die Richtigkeit der Virussequenz und die korrekte Insertion des TC-Tags zu bestätigen, wurde zunächst der hier verwendete GFV-Volllängeklon (pACNR-FLYF-17D) in seiner unveränderten Form komplett sequenziert und mit seiner ursprünglich angegebenen Sequenz (Dr. Kümmerer, BNI Hamburg) abgeglichen (3.7.3, 4.1.6). Die gentechnisch veränderten Plasmide 17D-E-I1, 17D-E-I3, 17D-C1 und 17D-C2 wurden lediglich über den inserierten DNA-Bereich sequenziert.

Die Sequenzierung des gesamten GFV-17D-Volllängeklons wies dabei Unterschiede zu seiner ursprünglichen Sequenz auf, die insgesamt zu drei Aminosäuremodifikationen im GFV-Genom führten. Dabei handelt es sich um die AS-Positionen 1065 (NS2A-Protein, Valin > Methionin), 2439 (NS4B-Protein, Glutaminsäure > Lysin) und 3484 (NS5-Protein, Alanin > Threonin) des GFV-Polypeptids. Die inserierten Sequenzen der modifizierten Plasmide wiesen, abgesehen von der Insertion des TC-Tags, keine Unterschiede zu dem hier verwendeten GFV-17D-Volllängeklon auf.

Um aus den modifizierten GFV-17D-Klonen infektiöse Viruspartikel zu erhalten, wurden die Plasmide mittels *in vitro* Transkription in virale RNA umgeschrieben (4.1.11). Anschließend wurden ca. 3,4 µg der so hergestellten viralen RNA in VeroE6-Zellen transfiziert (4.4.5).

Die hierfür optimalen Bedingungen wurden zuvor mit dem unveränderten GFV-17D-Volllängeklon getestet. Als Negativkontrolle wurden die Zellen lediglich mit dem Transfektionsreagenz ohne RNA behandelt. Die Virusproduktion in den transfizierten Zellen wurde nach drei und nach sechs Tagen mittels Immunfluoreszenztest (4.3.3) und RT-PCR (4.1.2.3) überprüft. Um die Entstehung infektiöser viraler Partikel nachzuweisen, wurde der Überstand der transfizierten Zellen im Plaquetest auf die Anwesenheit Plaque-bildender Einheiten überprüft (4.5.4).

Abbildung 5.29 zeigt das Ergebnis für den Nachweis viraler Partikel drei Tage nach der Transfektion. Für alle GFV-Konstrukte ließ sich nach drei Tagen virale RNA im Zellkulturüberstand nachweisen, die einen Titer von $1,6 \times 10^8$ (17D-E-I1) bis $2,5 \times 10^9$ (17D-C1) Genomäquivalenten pro Milliliter erreichte. Der Immunfluoreszenztest zur Detektion des GFV-E-Proteins fiel jedoch nur für das Konstrukt 17D-C1 eindeutig positiv aus, für das Konstrukt 17D-C2 lässt sich allenfalls in einzelnen Zellen eine Färbung vermuten. Auch der Nachweis infektiöser Viruspartikel zeigte mit einem Titer von $5,23 \times 10^5$ PFU/ml lediglich für das GFV-Konstrukt 17D-C1 ein positives Ergebnis. Die Untersuchung sechs Tage nach der Transfektion zeigte das gleiche Ergebnis für alle hier getesteten Viruskonstrukte (Daten nicht gezeigt).

	17D-C1	17D-C2	17D-E-I1	17D-E-I3	Negativ
GE/ml	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	negativ
PFU/ml	$5,23 \times 10^5$	negativ	negativ	negativ	negativ

Abb. 5.29: Indirekter Immunfluoreszenztest (4.3.3) zur Detektion des GFV-E-Proteins drei Tage nach der Transfektion viraler RNA in VeroE6-Zellen. Die RNA wurde vor der Transfektion mittels *in vitro* Transkription von den gentechnisch veränderten GFV-Plasmiden gewonnen (4.1.11, 4.4.5). Erstantikörper: MAK6330, 1:100; Zweitantikörper: goat-anti-mouse-FITC (grüner Farbkanal), 1:200; Kernfärbung: DAPI (blauer Farbkanal). Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit 20facher Vergrößerung. Das Ergebnis des Nachweises viraler Genomäquivalente [GE/ml] und infektiöser Viruspartikel [PFU/ml] im Zellkulturüberstand ist für das jeweilige GFV-Konstrukt unter dem zugehörigen Fluoreszenzbild angegeben.

6. DISKUSSION

6.1 Molekularepidemiologische Untersuchungen

In diesem Teil der Arbeit wurden die Genomsequenzen von Gelbfiebertviren sowie deren verwandtschaftliche Beziehungen zueinander untersucht. Dabei wurden Impfstämme und Wildtypstämme getrennt voneinander betrachtet. Die Charakterisierung der Wildtypstämme umfasste zusätzlich die Untersuchung ihrer biologischen Eigenschaften, die mit den Ergebnissen der Genomanalyse in Bezug gesetzt wurden.

6.1.1 Phylogenie von Gelbfiebertvirus-17D-Impfstoffen

Während des WHO-Meetings der Arbeitsgruppe zur Herstellung und Bewertung von GFV-Impfstoffen im Mai 2009 wurden verschiedene Aspekte der Impfstoffsicherheit, -kontrolle und -produktion diskutiert (Ferguson et al., 2010). Ein Diskussionspunkt war die historische Aufzeichnung der Verbreitung von GFV-17D-Impfstoffen, in der die Herkunft und jeweilige Passage der GFV-Impfstämme aller Hersteller verzeichnet sind (1.3.3, Abb. 1.13). Als Ergebnis der Diskussion wurden diese Informationen als wichtig für die Beaufsichtigung der Impfstoffproduktion befunden, jedoch wurde herausgestellt, dass diese Informationen allein nicht mehr zeitgemäß sind und durch molekulargenetische Daten ergänzt werden sollten.

Zudem wurde das Auftreten schwerer Nebenwirkungen in Folge einer Impfung (SAEs) und deren mögliche Ursachen erörtert. Bisher konnte keine Verbindung zwischen der Verwendung bestimmter GFV-Impfstämme und dem Auftreten von SAEs nachgewiesen werden. Vielmehr geht man zurzeit davon aus, dass eine genetische Prädisposition der Impflinge für die Ausprägung von Symptomen verantwortlich ist. Auch fortgeschrittenes Alter und Thymuserkrankungen werden als Risikofaktoren in Betracht gezogen (1.3.2) (Monath et al., 2005, Pulendran et al., 2008).

Die Untersuchung von Sequenzdaten kann wichtige Hinweise auf die Entstehung von SAEs und die Attenuierung des Virus liefern. Eine verstärkte Einbeziehung von Sequenzdaten wäre zudem für die Sicherheitsüberwachung der Impfstoffproduktion notwendig. Es ist daher erstrebenswert, die Genomsequenzen von *master* und *working seed virus* der jeweiligen Impfstoffe zur Verfügung zu haben. Diese sind in öffentlichen Sequenzdatenbanken jedoch nur teilweise verfügbar.

Bisherige Arbeiten, die sich mit der Genomanalyse von GFV-Impfstoffen befassen, konzentrieren sich zum einen auf den Vergleich von Impfstoffen mit dem Wildtypstamm Asibi und somit auf den Attenuierungsmechanismus (dos Santos et al., 1995, Hahn et al., 1987, Wang et al., 1995) oder vergleichen die Genomsequenz ausgewählter einzelner Impfstämme miteinander (Dupuy et al., 1989, Galler et al., 1998, Wang et al., 1995).

DISKUSSION

In Anlehnung an die von der WHO beschriebenen Erfordernisse wurde in dieser Arbeit das Genom von drei Impfstoffpassagen der Firma Crucell Switzerland AG zum ersten Mal vollständig sequenziert. Des Weiteren wurden die resultierenden Sequenzen mit den bereits veröffentlichten Sequenzen von 10 weiteren GFV-Impfstoffen verglichen. Der Fokus der Analyse lag in diesem Fall auf dem umfassenden Sequenzvergleich aller derzeit veröffentlichten GFV-17D-Impfstoffe und zielte nicht auf den Vergleich mit Wildtypstämmen ab.

Dieser Vergleich bestätigte mit einer Homologie der Nukleinsäuresequenzen von 99,2% die hohe genetische Stabilität des Virus (5.1.1.1) (Barrett et al., 2007). Insgesamt konnten 84 Nukleotid- und 29 Aminosäureunterschiede im gesamten Polyprotein identifiziert werden, die im Bereich der Proteine E (34%) und NS5 (24%) akkumulieren.

Die 17DD-Gruppe grenzt sich durch insgesamt 18 AS-Unterschiede von der 17D-Gruppe ab, wobei nur sechs Unterschiede davon in allen 17DD-Impfstoffen konserviert sind (5.1.1.1, Tabelle 5.1). Wie die Dokumentation der Abstammungsverhältnisse zeigt, wurden die 17DD-Impfstoffe seit der 195. Passage separat von den 17D-Impfstoffen passagiert (1.3.3, Abb. 1.13), was zu den hier beschriebenen Sequenzunterschieden geführt hat.

17D-Tiantan weist im Vergleich zu den anderen GFV-Impfstoffen die meisten Sequenzunterschiede auf (6 AS), die nur in diesem Impfstamm vorkommen und somit Alleinstellungsmerkmale darstellen (5.1.1.1, Tabelle 5.1). Diese Beobachtung korreliert ebenfalls mit den Informationen der historischen GFV-Genealogie (1.3.3, Abb. 1.13), die die Separation des Stammes 17D-Tiantan in der 229. Passage und dessen anschließende, unabhängige Passagierung in China zeigt.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit mit der Generierung eines auf den Genomsequenzen aller veröffentlichten GFV-Impfstämme beruhenden phylogenetischen Stammbaumes (5.1.1.2, Abb. 5.1) erstmalig die Möglichkeit geschaffen, die molekularen Abstammungsmerkmale mit den historischen Fakten von Herkunft und Passage vergleichen zu können. Damit wird zukünftig die Erforschung von GFV-Impfstoffen sowie die Untersuchung von Einflüssen des viralen Genotyps auf die Entstehung von schweren Nebenwirkungen erleichtert.

Generell spiegelt der phylogenetische Stammbaum die historische Abstammungsdokumentation (1.3.3, Abb. 1.13) in allen Punkten wider, jedoch würden mehr Sequenzen benötigt, um eine Auflösung aller Einzelheiten des Stammbaums zu ermöglichen, was speziell durch die Polytomie der 17D-Untergruppe verdeutlicht wird. Da 17D-Tiantan die einzige Sequenz des chinesischen Herstellers ist und die vorhandenen Sequenzunterschiede phylogenetisch als uninformative Autapomorphien (neuerworbene Merkmale eines einzelnen Virusstammes gegenüber seinen Vorläufern) zu betrachten sind,

haben sie keinen Einfluss auf die Topologie des Stammbaums und es kommt zu der Gleichstellung mit den anderen 17D-Impfstoffen.

Die Schwesterngruppenstellung (Aufgabelung zweier Stämme aus einem Vorläufer) des Wildtypstammes Asibi zu den 17D-Impfstoffen korreliert mit der Tatsache, dass alle 17D- und 17DD-Impfstoffe aus dem Stamm Asibi durch serielle Passagierung hervorgegangen sind (Barrett and Teuwen, 2009, Frierson, 2010). Ebenso ging der Impfstamm *YFV French neurotropic virus* durch 237 intrazerebrale Passagen in Mäusen aus dem Wildtypstamm *YFV French viscerotropic virus* hervor (Barrett and Stanberry, 2009, Frierson, 2010), was sich ebenfalls in einem Schwesterngruppenverhältnis in der Phylogenie darstellt.

Diese Arbeit liefert mit der Veröffentlichung von drei neuen GFV-Impfstoffsequenzen, dem umfassenden Vergleich aller bisher veröffentlichten Sequenzdaten von GFV-Impfstoffen sowie der Zusammenfassung molekulargenetischer Daten und dem Vergleich mit historischen Aufzeichnungen eine Basis für zukünftige Arbeiten im Bereich der Impfstoffforschung.

Für die Evaluierung der Impfstoffsicherheit, auch in Hinblick auf die Verwendung für die Herstellung chimärer Impfstoffe (1.3.2), sowie für die Erforschung des viralen Attenuierungsmechanismus und des Auftretens von SAEs wäre eine verstärkte Sequenzierung und Offenlegung der Impfstoffdaten der einzelnen Hersteller sehr wichtig. Die Sequenzdaten sollten darüber hinaus benutzt werden, um eine Kontinuität in der Impfstoffherstellung sicherzustellen. Übereinstimmende Sequenzen zwischen einzelnen Viruspassagen könnten dann die nach WHO-Richtlinien immer noch vorgeschriebenen Sicherheitstests in Primaten ergänzen oder teilweise ersetzen. Die Notwendigkeit dieser aufwändigen und schwierigen Tests wurde bereits mehrfach diskutiert. Demnach müssen alle *working* und *master seeds* nach wie vor durch intrazerebrale Injektion von Primaten und anschließende umfangreiche histologische Untersuchungen getestet werden (1.3.3) (Ferguson et al., 2010, WHO/BS/10.2131, (ECSB 2008)). Da eine gute und qualitätsgesicherte Sequenzierung heutzutage mittlerweile einfach durchzuführen ist, wäre zu überlegen ob man diese Tests auch aus ethischen Gründen auf die *master seed lots* beschränken könnte. Zwischen *master* und *working seed* liegt, genau wie zwischen *working seed* und dem fertigen Impfstoff, nur eine Passage. Eine Sequenzierung des Endproduktes ist jedoch nicht vorgeschrieben. Man könnte also in Erwägung ziehen, alle Produktionspassagen einschließlich des Endproduktes nach festgelegten Richtlinien zu sequenzieren und die Tests im Primatenmodell auf die *master seed* zu beschränken (Stock et al., 2012).

6.1.2 Phylogenetische und biologische Charakterisierung westafrikanischer GFV-Isolate

6.1.2.1 Sequenzanalysen

In dieser Arbeit wurde das vollständige Genom von insgesamt 14 westafrikanischen GFV-Wildisolaten sequenziert und veröffentlicht (5.1.2). Damit wurde die Anzahl der in GenBank verfügbaren Genomsequenzen von GFV-Wildisolaten von ursprünglich 10 auf 24 erhöht (mittlerweile 36 (Nunes et al., 2012)). Neun dieser Isolate wurden in einer früheren Studie bereits im Bereich der für das E-Protein kodierenden Region sequenziert und in verschiedene Viruslinien klassifiziert (Sall et al., 2010). Fünf Wildisolate aus dem Jahr 2005 dagegen wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal sequenziert und konnten, basierend auf der Klassifizierung von Sall et al. (2010), in die Linie 4 eingeordnet werden (5.1.2.2, Abb. 5.4).

Die genaue Sequenzanalyse der hier sequenzierten GFV-Isolate zeigt eine Heterogenität in der Viruspopulation mit Unterschieden in der AS-Sequenz für insgesamt sechs Isolate (357, 6857, 6858, 6865, 6866 und 6867), die alle der Linie 4 angehören (5.1.2.1). Für das Isolat 357 kommt es dabei zum Einbau der Aminosäure Alanin oder Valin an Position 56 des E-Proteins; die Isolate 6857, 6858, 6865, 6866 und 6867 weisen dagegen an Position 135 des E-Proteins die Aminosäure Isoleucin oder Valin auf. Das E-Protein ist verantwortlich für die Rezeptorbindung bei der Infektion, es initiiert die Membranverschmelzung zur Freisetzung des viralen Kapsids und ist bedingt durch seine exponierte Lage auf der Virusaußenseite das Zielprotein, gegen das im Verlaufe der Immunantwort neutralisierende Antikörper gebildet werden. Es ist einem hohen Selektionsdruck unterlegen und weist von allen Virusproteinen die höchste Varianz auf (Knipe and Howley, 2007, Kuno et al., 1998). Die hier beobachtete Heterogenität im Bereich des E-Proteins liegt demnach innerhalb der Erwartungen.

Die Isolate von 2005 (6857, 6858, 6865, 6866, 6867) weisen über ihr gesamtes Genom keine Sequenzunterschiede zueinander auf, obwohl sie aus verschiedenen Vektorspezies isoliert wurden (*Ae. furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus*), und repräsentieren damit denselben Virusstamm. Diese Beobachtung hebt nicht nur die genetische Stabilität des Gelbfiebervirus hervor, sondern zeigt außerdem, dass hauptsächlich die GFV-Linie 4 nach ihrem Erscheinen 1976-1979 und 2001 auch im Jahre 2005 wieder in der Region Kedougou (Senegal) aufgetreten ist. Diese Tatsache unterstreicht außerdem die Hypothese, dass verschiedene Viruslinien innerhalb ihres zoonotischen Zyklus ständig in dieser Region vertreten sind und einzeln oder gemeinsam in Erscheinung treten können (Sall et al., 2010).

Der Vergleich der AS-Sequenz des viralen Polyproteins aller hier sequenzierten GFV-Isolate lässt die nach Sall et al. (2010) vorklassifizierten GFV-Linien erkennen (5.1.2.1, Tabelle 5.3). Verglichen mit dem Referenzstamm Asibi weichen alle hier untersuchten Linien in ihrer AS-

Sequenz nur bis zu maximal 1,08% von der Referenzsequenz ab (5.1.2.1, Tabelle 5.4), was abermals eine hohe genetische Stabilität der Gelbfieberviren belegt.

Eindeutige Unterschiede werden jedoch deutlich, wenn man die genauen Positionen dieser Sequenzunterschiede betrachtet und speziell die Alleinstellungsmerkmale der einzelnen Linien ins Auge fasst. Während der Anteil der Alleinstellungsmerkmale für die Linien 4, 5 und 6 zwischen 5,5 und 22,2% liegt, weist Linie 1 Alleinstellungsmerkmale mit einem Anteil von 56,8% und Linie 3 sogar von 90% auf (5.1.2.1, Tabelle 5.4). Anders formuliert sind also 90% der Sequenzunterschiede zwischen Linie 3 und dem Referenzstamm Asibi einzigartig für diese Linie und treten nicht in den anderen Linien auf. Die Mutationen dieser Linie sind besonders im Hinblick auf das abweichende Wachstumsverhalten des zugehörigen Isolates 333 interessant und wurden daher genauer betrachtet (5.1.2.3, siehe auch Abschnitt 6.1.2.3).

Die Sequenzabweichungen der Linie 3 akkumulieren im Bereich des E-, NS4B- und NS5-Proteins (5.1.2.1, Tabelle 5.4). Das E-Protein ist Teil des Viruspartikels und weist eine hohe Varianz zwischen unterschiedlichen GFV-Isolaten auf. Von den sechs Mutationen im E-Protein befinden sich zwei in Domäne I (AS 7 und 153), zwei in Domäne II (AS 54 und 249), eine in Domäne III (AS 331) und eine in der Transmembrandomäne (AS 457) (1.2.2.2).

Die genaue Funktion des NS4-Proteins ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die NS4B-Untereinheit ist jedoch höchstwahrscheinlich mit der ER-Membran assoziiert und inhibiert den IFN- α /IFN- β Signalweg (Miller et al., 2007, Munoz-Jordan et al., 2003). Vier Alleinstellungsmerkmale der Linie 3 liegen in dieser Untereinheit. Aufgrund der limitierten Kenntnis zur Struktur und Funktion des NS4-Proteins lassen sich jedoch keine konkreten Aussagen zur Auswirkung dieser Mutationen machen.

Das NS5-Protein der Flaviviren wurde dagegen bereits in zahlreichen Studien untersucht (Bollati et al., 2010, Malet et al., 2008, Geiss et al., 2009, Lescar and Canard, 2009, Liu et al., 2010, Malet et al., 2007). Das N-terminale erste Drittel des NS5-Proteins kodiert für die Methyltransferasedomäne, die für das *Capping* der neugebildeten viralen RNA verantwortlich ist (1.2.2.2). In dieser Untereinheit liegen zwei Alleinstellungsmerkmale der Linie 3 (AS 2 und AS 258). Beide Positionen befinden sich in den variablen Regionen des Proteins, die den konservierten Kernbereich zwischen AS 59 und 224 umschließen, und somit nicht in der funktionellen Domäne des Proteins. Eine Auswirkung dieser Mutationen auf die Funktionalität des Proteins ist daher nicht zu vermuten.

Die C-terminale Proteindomäne enthält die RNA-abhängige RNA-Polymerase (1.2.2.2). Sie erfüllt die Funktion der RNA-Synthese und ist somit essentiell für die virale Replikation. Linie 3 zeigt in dieser Domäne vier Mutationen, die in keiner weiteren hier untersuchten Linie zu finden sind (AS 335, 351, 660 und 878).

Studien über das Denguevirus zeigen, dass die AS-Positionen 335 und 351 in einem Proteinbereich liegen, der sowohl mit dem NS3-Protein interagiert als auch mit dem Protein Importin- β , das den Proteintransport in den Zellkern unterstützt. Dieser Proteinbereich funktioniert somit sehr wahrscheinlich auch im GFV-NS5-Protein als Lokalisationssequenz für den Zellkern. Die hier beschriebenen Mutationen könnten folglich einen Einfluss sowohl auf die Kernlokalisierung des NS5-Proteins als auch auf die Interaktion mit dem NS3-Protein haben. Die Mutation an AS-Position 660 bedarf besonderer Aufmerksamkeit: sie befindet sich beim Denguevirus direkt im aktiven Zentrum der Polymerase und liegt in unmittelbarer Nähe zur AS 663, die entscheidend für die katalytische Aktivität des Enzyms ist (Malet et al., 2008). Diese Mutation der Linie 3 könnte demnach, durch eine veränderte Effizienz der Polymerase, ein möglicher Grund für das abweichende Wachstumsverhalten des GFV-Isolats 333 sein (5.1.2.3).

Im NS3-Protein weist Linie 3 ein Alleinstellungsmerkmal in der Protease-Untereinheit auf (AS 13), das jedoch nicht im Bereich des katalytischen Zentrums liegt, welches durch die Interaktion der Aminosäurereste 51, 75 und 135 gebildet wird. Eine weitere Mutation im NS3-Protein (AS 192) befindet sich direkt am N-terminalen Ende der Helikase-Untereinheit (Bollati et al., 2010, Perera and Kuhn, 2008, Gebhard et al., 2012, Wu et al., 2005). Kritischer im Hinblick auf eine funktionelle Auswirkung des Proteins könnte jedoch die Mutation an AS-Position 60 des NS2B-Proteins sein. NS2B ist ein essenzieller Kofaktor für die proteolytische Aktivität der NS3-Protease; die Aminosäurereste 49-89 interagieren dabei mit dem NS3-Protein (Bollati et al., 2010, Kondo et al., 2011, Luo et al., 2008, Perera and Kuhn, 2008). Da AS 60 innerhalb dieses Bereiches liegt, wäre ein Einfluss der hier auftretenden Mutation auf die Proteaseaktivität denkbar.

Die Mutationen im NS2A-Protein (AS 82 und 105) befinden sich in den Transmembrandomänen des Proteins (Xie et al., 2013). Die Mutationen im C-Protein (AS 80 und 90) liegen beide in der α -Helix 4, die mit der viralen RNA interagiert (1.2.2.2). Beide Mutationen liegen zudem im Bereich der Zellkern-Lokalisationssequenz und könnten eine Auswirkung auf die Kernlokalisierung des Proteins und somit auf die Virus-Wirts-Interaktion haben (Colpitts et al., 2011, Jones et al., 2003, Patkar et al., 2007, Sangiambut et al., 2008, Ma et al., 2004).

Im PrM-Protein weist GFV-Linie 3 ebenfalls zwei Alleinstellungsmerkmale auf (AS 25 und 125). AS 25 liegt in der Pr-Untereinheit des Proteins, welches für die Stabilisierung des E-Proteins im unreifen Viruspartikel verantwortlich ist und dieses somit vor einer verfrühten Fusion mit der Wirtszellmembran schützt. Eine Mutation, die Einfluss auf diese Funktion nimmt, könnte das Replikationsverhalten beeinflussen. AS 125 befindet sich dagegen in der Ektodomäne des Proteins, die dem M-Protein im reifen Viruspartikel entspricht (Li et al., 2008).

Das nicht-translatierte 3'-Ende (3'-NTR) des Flavivirusgenoms bildet eine sequenzabhängige Sekundärstruktur aus und spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation der viralen Replikation und Transkription. Das äußerste Ende dieses Genomabschnittes stellt die essenzielle Kerndomäne dar und wird aufgrund seiner Sekundärstruktur auch als 3'-LSH (*long stable hairpin*) bezeichnet. Die Domänen zwischen dem Stopkodon des Polyproteins und dem 3'-LSH scheinen dagegen nicht essenziell für die Replikation zu sein (Gritsun and Gould, 2006, Mutebi et al., 2004, Proutski et al., 1997a, Proutski et al., 1997b, Wang et al., 1996) (1.2.2.1). Verschiedene Studien zeigen, dass diese Bereiche eine hohe Variabilität aufweisen, in denen z.B. Hotspots von Nukleotidmutationen sowie Deletionen und Duplikationen verschiedener Größe liegen können, ohne die Replikationsfähigkeit des Virus zu beeinflussen (Bryant et al., 2005, Mutebi et al., 2004, Proutski et al., 1997b, Wang et al., 1996).

Das Isolat 307 (Linie 1) zeigt im 3'-NTR zwei außergewöhnliche Mutationen im Vergleich zu den anderen hier untersuchten Virusisolaten (5.1.2.1, Abb. 5.3). Die erste ist eine Insertion direkt nach dem Stopkodon, die andere ist eine Deletion an Position 174 des 3'-NTRs. Ähnliche Mutationen wurden bereits in einem anderen Virusstamm gefunden, der 1982 im Zuge eines GFV-Ausbruchs in der Elfenbeinküste isoliert wurde (Pisano et al., 1997). Bei diesem Isolat lag die Deletion an derselben Position, die Insertion jedoch an Nukleotidposition 304 des 3'-Endes. Die Sekundärstruktur dieses Stammes wurde bereits untersucht (Mutebi et al., 2004) und ließ keine besonderen Auswirkungen auf die Replikationsfunktion vermuten. Die Insertion des Isolates 307 hinter dem Stopkodon liegt in einem Bereich, der als Hotspot für Nukleotidvarianz beschrieben ist. Auch die Wachstumsversuche dieser Arbeit zeigen kein auffälliges Replikationsverhalten dieses GFV-Isolates (5.1.2.3, Abb. 5.6), so dass diese Mutationen als unerheblich betrachtet werden können. Eine Auswirkung *in vivo* lässt sich jedoch auf Basis der hier durchgeführten Versuche nicht ausschließen.

Gleiches ist für die Mutationen im 3'-NTR der Linie 3 zu vermuten. Die hier beobachteten Mutationen liegen entweder in einem Hotspot für Nukleotidvarianz (Nukleotide 7 und 8 des 3'-NTRs), in der nichtessenziellen, repetitiven Sequenz 1 (RYF1) (Nukleotid 54) oder in der Ish3-Region der 3'-LSH-Struktur (Nukleotid 449) (5.1.2.1, Abb. 5.3 und 1.2.2.1, Abb. 1.5). Obwohl die Ish3-Region einen Anteil der essenziellen, funktionellen 3'-LSH-Struktur ausmacht und somit ein funktionaler Einfluss zu erwarten wäre, ist in diesem speziellen Fall nicht davon auszugehen, dass sich diese Mutation auf die Replikationsfähigkeit auswirkt. Der Grund dafür ist, dass genau dieser Teil des 3'-LSHs bekannt dafür ist Mutationen zu akkumulieren, ohne dass diese einen Effekt auf die Ausbildung der Sekundärstruktur haben (Mutebi et al., 2004).

6.1.2.2 Phylogenetische Analysen

In diesem Teil der Arbeit wurden phylogenetische Untersuchungen von GFV-Wildtypstämmen durchgeführt, die auf Nukleotidsequenzen des gesamten Virusgenoms basieren. Der Fokus lag hierbei auf der Einordnung der 14 neu sequenzierten westafrikanischen GFV-Isolate und deren Beziehung zu allen bekannten GFV-Genotypen.

Der molekulargenetisch rekonstruierte Stammbaum separiert eindeutig die westafrikanischen Genotypen von den ost- und zentralafrikanischen Genotypen (5.1.2.2, Abb. 5.4). Innerhalb der Klade der westafrikanischen Genotypen bestätigt diese Analyse eine Aufspaltung in sechs verschiedene GFV-Linien, die bereits durch eine Analyse partieller Sequenzdaten identifiziert werden konnten (Sall et al., 2010).

Der GFV-Stamm Trinidad79A stellt die zum Zeitpunkt der Arbeit einzige frei zugängliche Genomsequenz eines südamerikanischen GFV-Isolates dar und liegt im Stammbaum in derselben Untergruppe wie die senegalesische GFV-Linie 3. Eine Studie von *Chang et al.*, die auf partiellen Sequenzdaten des E-Proteins beruht, ließ vermuten, dass dieser Stamm erst kürzlich von Westafrika nach Trinidad eingeführt wurde (Chang et al., 1995). *Wang et al.* klassifizierten diesen Stamm durch Analysen der Sequenzbereiche des 5'-Endes, des NS4-Proteins und des 3'-Endes jedoch eindeutig als südamerikanischen Genotyp (Wang et al., 1996). Die hier durchgeführte Untersuchung, basierend auf Gesamtgenomsequenzen, unterstützt die Theorie von *Chang et al.* Um jedoch den Ursprung des GFV-Stammes Trinidad79A letztendlich zu klären, bedarf es einer weiterführenden Analyse mit zusätzlichen südamerikanischen GFV-Genomsequenzen.

In der Elfenbeinküste sind GFV-Isolate aus zwei verschiedenen Linien zu finden: Eines gruppiert mit der senegalesischen Linie 6, das andere mit Linie 1 innerhalb der westafrikanischen Genotypen. Diese Einteilung spiegelt eine Ko-Zirkulation von zwei verschiedenen Genotypen in der Elfenbeinküste wider (westafrikanischer Genotyp I und II, 1.4.2) oder – aufgrund der zeitlich auseinanderliegenden Isolation in den Jahren 1982 und 1999 (Bae et al., 2005, Pisano et al., 1997) – ein Switch in der Zirkulation vom westafrikanischen Genotyp I zum westafrikanischen Genotyp II.

Insgesamt werden in diesem Stammbaum die weiterhin sehr eingeschränkten Möglichkeiten zur Untersuchung der Diversität und Evolution von Gelbfiebertviren deutlich, was vor allem auf die geringe Anzahl frei verfügbarer Genomsequenzen von GFV-Wildisolaten zurückzuführen ist. Besonders verständlich wird dieses Problem, wenn man die Gruppe der ost- und zentralafrikanischen Virusstämme betrachtet (5.1.2.2, Abb. 5.4). Hier befinden sich mehrere afrikanische GFV-Stämme, die aufgrund der Analyse partieller Genomsequenzen zuvor eindeutig als unterschiedliche Genotypen identifiziert werden konnten (Mutebi and Barrett, 2002, Mutebi et al., 2001, von Lindern et al., 2006), innerhalb einer

monophyletischen Gruppe. Diese Darstellung ist auf die limitierte Anzahl an kompletten Genomsequenzen aus diesen geographischen Regionen zurückzuführen.

Um eine bessere Auflösung der Verwandtschaftsbeziehungen erzielen zu können und zukünftig phylogeographische Studien zu erleichtern, wäre eine stärkere Probenakquise, Virusisolierung und Sequenzierung von GFV-Wildisolaten nötig. Durch eine höhere Datenmenge wäre eine detailliertere Aufspaltung der einzelnen Genotypen möglich, und sogar neue GFV-Linien könnten entdeckt werden, wie hier für die Gruppe der westafrikanischen Genotypen gezeigt werden konnte. Des Weiteren könnte eine genauere Dokumentation der GFV-Verbreitung und -Evolution bedeutend zum Verständnis von Ausbruchsentwicklungen und der Komplexität des arboviralen Zyklus im Allgemeinen beitragen. Ein gutes Beispiel hierfür liefert die sich verändernde GFV-Aktivität in Ostafrika (1.4.2). Nach jahrzehntelangem Nichterscheinen des Gelbfieberevirus kam es in den letzten Jahren wieder regelmäßig auch zu größeren Ausbrüchen. Kontinuierlich erhobene Sequenzdaten könnten in solchen Situationen Aufschluss über die Gelbfiebersituation in ausbruchsfreien Zeiten sowie über die evolutionäre Entwicklung und Verbreitung in Zusammenhang mit der Entstehung von Ausbrüchen beitragen.

6.1.2.3 Wachstumsanalysen westafrikanischer Gelbfiebereviren

Um das Wachstumsverhalten der verschiedenen westafrikanischen GFV-Linien (Moskitoisolate) zu untersuchen, wurden Infektionskinetiken in Insektenzellen (Ap61-Zellen) und humanen Leberzellen (HepG2-Zellen) durchgeführt. HepG2-Zellen wurden bereits in verschiedenen Studien zur Untersuchung viraler Infektionen, insbesondere auch von Flaviviren, verwendet und wurden daher auch in dieser Arbeit als Modellzelllinie eingesetzt (Lefevre et al., 2006, Marianneau et al., 1996, Marianneau et al., 1998, Thepparit et al., 2004). Ap61-Zellen sind höchst empfänglich für GFV und daher besonders gut für die primäre Isolation und Anzucht von Wildtyp-GFV geeignet (Fontenille et al., 1997, Monath and Barrett, 2003). Das Ziel der vergleichenden Versuchsdurchführung mit diesen beiden Zelllinien war es, die beiden natürlich vorkommenden Wirtsgruppen (Mücken und Primaten) des Gelbfieberevirus abzubilden. Zu Vergleichbarkeitszwecken wurden in allen Versuchen zusätzlich die GFV-Referenzstämme Asibi und 17D mitgeführt (Humanisolate).

In humanen Leberzellen zeigten alle untersuchten Virusstämme ein vergleichbares Wachstumsverhalten hinsichtlich der Replikation viraler RNA und der Entstehung infektiöser Viruspartikel. Unterschiede im Infektionsverhalten sind nur mikroskopisch sichtbar. Hier sieht man eine wesentlich stärkere Zellschädigung bei Infektion mit den Viren Asibi, 17D und 333 (Linie 3) im Vergleich zu der Infektion mit den Isolaten 345 (Linie 5), 357 (Linie 4), 307 (Linie 1) und 314 (Linie 6) (5.1.2.3, Abb. 5.5-5.8).

DISKUSSION

Eine Studie, in der das Wachstumsverhalten der Referenzstämme 17D und Asibi in HepG2-Zellen verglichen wurde, konnte eine höhere Empfänglichkeit der Zellen für den attenuierten Virusstamm 17D in den ersten drei Tagen nach Infektion nachweisen (Lefevre et al., 2006). Auch in dieser Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung innerhalb der ersten 50 Stunden nach Infektion eine stärkere Infektion von HepG2-Zellen mit dem Virusstamm 17D als mit dem Wildtypstamm Asibi beobachtet werden (5.1.2.3, Tabelle 5.5). Nach 75 Stunden waren die Zellen jedoch mit beiden Virusstämmen vollständig infiziert. In Ap61-Zellen dagegen war ein gegensätzlicher Effekt zu beobachten: hier zeigte die Untersuchung der Zellen mittels Immunfluoreszenz eine stärkere Infektion mit dem Stamm Asibi als mit dem Impfstamm 17D (5.1.2.3, Tabelle 5.5 und Abb. 5.5). Alle anderen untersuchten Parameter wiesen weder in Insektenzellen noch in humanen Leberzellen Unterschiede zwischen den beiden Referenzstämmen auf.

In Insektenzellen (Ap61-Zellen) zeigen die Virusstämme 17D und Asibi eine wesentlich langsamere Replikation als die Moskitoisolate - mit Ausnahme des Isolates 333 (Linie 3). Diese Tatsache ist vermutlich auf eine schlechtere Aufnahme der Viren in die Zellen zurückzuführen, was sich in dem fehlenden Nachweis intrazellulärer viraler RNA kurz nach der Infektion zeigt (5.1.2.3, Abb. 5.5-5.7 und Abb. 5.9 b, links). Die Internalisierung der Viruspartikel scheint also für die Referenzstämme in Ap61-Zellen langsamer abzulaufen. Des Weiteren zeigt ein früherer und stärkerer zytopathischer Effekt eine stärkere Replikation der Moskitoisolate im Vergleich zu den Referenzstämmen in dieser Zelllinie an.

Der Referenzstamm Asibi wurde 1927 aus einem Gelbfieberpatienten isoliert, und der Impfstamm 17D ging durch serielle Passagierung aus diesem hervor (Frierson, 2010) (1.3.1). Beide Stämme sind seit diesem Zeitpunkt im Laborgebrauch. Eine genaue Dokumentation der Passagierung ist für viele Laborstämme nicht vorhanden, und es kann von einer gewissen Zellkulturadaption dieser Isolate ausgegangen werden. Im Gegensatz zu diesen beiden humanen Isolaten wurden alle anderen hier untersuchten GFV-Stämme aus Mücken isoliert und haben nur eine sehr kurze Passagierungsgeschichte, hauptsächlich in Insektenzelllinien. Diese beiden Gruppen (Moskito- und Humanisolate) zeigen in dieser Arbeit eine unterschiedliche Ausprägung des zytopathischen Effekts. Eine vorrausgegangene Adaption an die entsprechenden Wirtszellen könnte eine mögliche Erklärung dafür sein.

In seinem natürlichen Zyklus repliziert das Gelbfiebervirus alternierend zwischen dem Moskitovektor und Primaten bzw. über gewisse Zeiträume nur in der Mücke (vertikale Transmission). Dabei kommt es jedoch zu keiner offensichtlichen Adaption des Virus an einen der beiden Wirte, und auch die außergewöhnlich hohe genetische Stabilität des GFV wurde in zahlreichen Studien immer wieder bestätigt (Deubel et al., 1985, Lepiniec et al., 1994, Mutebi and Barrett, 2002, Mutebi et al., 2001).

Eine Studie von Cooper und Scott z.B. zeigt, dass diese beiden Gegebenheiten nicht zwingend widersprüchlich sein müssen (Cooper and Scott, 2001). In dieser Studie wurde das *Eastern Equine Encephalitis Virus* (EEEV) jeweils für 10 Passagen entweder auf einer Insektenzelllinie, einer Vogelzelllinie oder alternierend auf beiden Zelllinien kultiviert. Die Experimente zeigten eine höhere Virusproduktion in beiden Zelllinien bei vorher alternierend kultivierten Virusstämmen als bei Stämmen, die nur in einer Zelllinie kultiviert wurden. Virusstämme, die für 10 Passagen an Insektenzellen adaptiert wurden, zeigten anschließend eine erhöhte Suszeptibilität für Insektenzellen, aber nicht für Vogelzellen. An Vogelzellen adaptierte Viren zeigten weder für Insektenzellen noch für Vogelzellen eine gesteigerte Empfänglichkeit.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Virusvermehrung in alternierenden Wirten auf Viruspopulationen selektioniert, die gut in beiden Systemen replizieren können. Wenn man die in dieser Arbeit untersuchten Moskitoisolate als entweder moskitoadaptierte oder alternierend kultivierte Virusstämme betrachtet und die beiden humanen Isolate Asibi und 17D als primatenadaptiert, stimmen diese Beobachtungen mit den Ergebnissen von Cooper und Scott überein. Die Moskitoisolate zeigen eine gute Replikation in beiden Zelllinien, die Referenzstämme hauptsächlich in humanen Zelllinien (5.1.2.3, Abb. 5.9).

Das GFV-Isolat 333 (Linie 3) weist im Vergleich zu den anderen GFV-Isolaten in beiden untersuchten Zelllinien ein deutlich verändertes Wachstumsverhalten auf (5.1.2.3, Abb. 5.8 und 5.9). In humanen Leberzellen (HepG2) zeigt dieses Isolat ein Infektionsmuster, das eher dem der Referenzstämme entspricht als dem der anderen Moskitoisolate. Bei einer Infektion von Insektenzellen (Ap61) ist unter diesen Versuchsbedingungen keine effektive Replikation zu beobachten, stattdessen ist eine starke Zellschädigung in einem frühen Infektionsstadium zu sehen.

Die GFV-Linie 3 ist bisher die einzige, die in der Natur mit vertikaler Transmission in Verbindung gebracht werden konnte (Sall et al., 2010). Auch das Isolat 333 wurde aus frisch geschlüpften bzw. männlichen Mücken der Spezies *Aedes aegypti* isoliert, stammt also direkt aus einem Stadium der vertikalen Transmission (5.1.2, Tabelle 5.2). Die in dieser Studie verwendete Zelllinie stammt von Larven der verwandten Mückenspezies *Aedes pseudocutellaris* ab und ist besonders empfänglich für eine Infektion mit GFV (Fontenille et al., 1997), so dass eigentlich von einer guten Replikation ausgegangen werden könnte.

Die vertikale Transmission oder die Persistenz in Moskitoeiern ist ein Überdauerungszustand des Virus (1.4.1). Während dieses Stadiums ist in den Insektenzellen der Eier allenfalls ein sehr geringer Zellmetabolismus nachweisbar, der erneut angeregt wird, wenn die Larven schlüpfen. Da die Virusreplikation direkt von der zellulären Replikationsmaschinerie abhängig ist, findet in diesem Stadium auch keine effiziente Virusvermehrung statt (Carrington and Auguste, 2013).

Die hier durchgeführten Experimente konnten keine eindeutige Replikationsaktivität des Virus durch Plaquetest, RT-PCR oder IIFT nachweisen. Allerdings konnte eine frühe durch die Virusinfektion bedingte Zellschädigung beobachtet werden (5.1.2.3).

Diese könnte durch eine besonders starke Replikation zu Beginn der Infektion erklärt werden. Durch eine dadurch auftretende Zellschädigung werden die Ressourcen für das Virus limitiert, was zu der hier beobachteten stagnierenden Wachstumskurve führen könnte. Wie diese Tatsache jedoch mit einer möglichen Adaption an den Moskitovektor im Zuge der vertikalen Transmission in Verbindung stehen könnte, bleibt zu klären.

Die Besonderheiten im Replikationsverhalten des Isolates 333 sind vor allem im Zusammenhang mit den Alleinstellungsmerkmalen in seiner Proteinsequenz interessant und machen diese Linie zu einem interessanten Objekt für weitere Forschungsarbeiten. Besonders die Mutationen in den Nichtstrukturproteinen könnten durch ihre Beteiligung am viralen Replikationskomplex sowie an der Virus-Wirts-Interaktion einen Einfluss auf die Virusvermehrung nehmen (diskutiert in Abschnitt 6.1.2.1). Eine weitere Untersuchung dieser GFV-Linie könnte daher zukünftig zur Aufklärung bestimmter Proteinfunktionen sowie zum Verständnis der vertikalen Transmission beitragen.

6.2 Entwicklung neuer Tools zum Nachweis von Gelbfiebertviren

In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen verschiedene GFV-Proteine hergestellt und charakterisiert, die anschließend in weiterführenden Experimenten zur Anwendung kamen. Des Weiteren wurden verschiedene Ansätze zur Etablierung eines ELISAs für einen direkten Virusnachweis getestet. Im Rahmen der Entwicklung neuer Tools zur Analyse der GFV-Pathogenese wurden gentechnisch veränderte Gelbfiebertviren konstruiert, die die Basis für eine zukünftige Anwendung in mikroskopischen Lebendzelleexperimenten liefern sollen. Die Ergebnisse zu diesen Themen werden im Folgenden diskutiert.

6.2.1. Herstellung und Charakterisierung von Peptidantikörpern zum gezielten Nachweis von GFV-Proteinen

Am Robert Koch-Institut war der gezielte Nachweis von GFV-Proteinen bisher nur sehr begrenzt möglich und beschränkte sich auf das GFV-E-Protein. Eingesetzt wird hierfür der monoklonale Antikörper MAK6330 (Gelderblom et al., 1985), dessen Anwendbarkeit zudem dadurch limitiert ist, dass er lediglich die native Form des Proteins detektiert. Kommerziell erwerbliche Antikörper richten sich ebenfalls gegen das E-Protein bzw. den gesamten Viruspartikel. Die Möglichkeiten im Bereich gezielter Grundlagenforschung sowie für die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden sind daher sehr eingeschränkt. Besonders im Bereich des direkten Virusnachweises für die Diagnose einer akuten Infektion besteht weiterhin ein großer Forschungsbedarf. Dies ist begründet in der diagnostischen Lücke

zwischen dem Auftreten einer Virämie und dem Auftreten GFV-spezifischer Antikörper. Des Weiteren besteht ein Bedarf an diagnostischen Tests für eine einfache Anwendung unter Feldbedingungen in Endemiegebieten (1.1.4, 2.2).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Antikörper gegen verschiedene GFV-Proteine hergestellt und in Hinblick auf ihre Anwendungsmöglichkeiten für Forschung und Diagnostik getestet. Für die Herstellung polyklonaler Peptidantikörper wurden *in silico* Peptide der Strukturproteine E und C sowie des Nichtstrukturproteins NS1 ausgewählt, die zur Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden (5.2.1.1, 4.3.1). Die Antikörper sollten keine Kreuzreaktivität zu anderen Flaviviren zeigen und ein breites Anwendungsspektrum aufweisen, was eine Detektion des nativen und des denaturierten Proteins umfasst. Da die Auswahl der Peptide auf theoretischen Vorhersagen beruhte, die sich nicht zwangsläufig in natürlichen Systemen widerspiegeln müssen, ist eine sorgfältige Testung der Antikörper besonders für eine diagnostische Anwendung sehr wichtig. Faktoren wie individuelle Eigenschaften des Immunsystems im Kaninchen oder alternative Sekundärstrukturen der Proteine *in vivo* können Gründe für ein letztendlich nicht funktionelles Antiserum sein (Bratke et al., 2009).

Für alle ausgewählten Proteine wurden polyklonale Peptidantiseren gewonnen und mit verschiedenen Methoden auf ihre Funktionalität geprüft. Dazu zählte für alle Antiseren die Anwendung im Western Blot (4.2.1, 4.2.2, 4.3.2), in der indirekten Immunfluoreszenz (4.3.4, 4.3.5) und im Neutralisationstest (4.3.6). Das Antiserum zur Detektion des NS1-Proteins wurde im Rahmen der Etablierung eines GFV-spezifischen ELISAs zusätzlich für eine Anwendung in diesem System getestet (4.3.7, 4.3.8).

Alle hier hergestellten Antiseren zeigen ein positives Ergebnis zur spezifischen Detektion des GFV im Immunfluoreszenztest (5.2.1.2.2, 5.2.1.2.4). Eine Kreuzreaktion zu anderen Flaviviren war nicht zu beobachten, was eine Grundvoraussetzung für eine Anwendbarkeit in der Diagnostik darstellt. Die Auswahl der Peptide war demnach hinsichtlich dieser Zielsetzung erfolgreich.

Während einer GFV-Infektion werden bekanntermaßen neutralisierende Antikörper gegen das E- und das NS1-Protein gebildet. Viele Einzelheiten über die molekularen Mechanismen der antikörpervermittelten Virusneutralisierung sind noch nicht verstanden, könnten jedoch wichtige Erkenntnisse für die zukünftige Entwicklung Epitop-basierter Impfstoffe bzw. Antikörper-basierter Therapieansätze liefern (Dowd and Pierson, 2011, Pierson and Diamond, 2008). Die Ausprägung der neutralisierenden Eigenschaften hängt stark von der Zugänglichkeit des entsprechenden Epitops sowie von der Affinität des Antikörpers zu dem Epitop ab. Im Zuge der Charakterisierung der in dieser Arbeit gewonnenen Antiseren wurden diese auf ihre neutralisierenden Fähigkeiten hin untersucht.

Zwei der drei Antisera (Anti-GFV-C und Anti-GFV-E) wiesen keinerlei neutralisierende Eigenschaften im Neutralisationstest auf (5.2.1.2.5). Die Antikörper sind demnach nicht in der Lage, durch die Bindung an das jeweilige Epitop die funktionellen Eigenschaften des Proteins zu inhibieren und somit das Virus zu neutralisieren. Das Anti-GFV-NS1-Serum weist dagegen einen Neutralisationstiter von 1:6 auf (5.2.1.2.5), der jedoch knapp unter dem diagnostischen Grenzwert von 1:10 liegt (Barrett et al., 2007). Das zur Immunisierung verwendete Peptid könnte dennoch einem Epitop im NS1-Protein entsprechen, das an der Induktion eines Immunschutzes beteiligt ist.

Für den Nachweis des GFV-E-Proteins im Western Blot nach einer halbnativen Proteinauftrennung liegt mit dem monoklonalen Antikörper MAK6330 eine Positivkontrolle vor, die auf allen getesteten Membranen eine Bande von etwa 40 kDa detektiert (5.2.1.2.1, Abb. 5.11). Diese Bande entspricht nicht der erwarteten Größe von 51-59 kDa für das E-Protein (1.2.2.2) (Lindenbach and Rice, 2003). Ein verändertes Laufverhalten unter halbnativen Bedingungen könnte z.B. durch alternative Proteinfaltungen hervorgerufen werden. Eine zweite Bande, die der erwarteten Größe des E-Proteins entspricht, ist lediglich auf einer PVDF-Membran der Porengröße 0,45 µm nachweisbar, auf der insgesamt auch das stärkste Signal erreicht wurde. Diese Membran ist unter halbnativen Versuchsbedingungen auch die einzige Membran, auf der ein Proteinnachweis mit dem hier hergestellten Anti-GFV-E-Serum möglich ist. Das dadurch erzielte Signal entspricht dem der Positivkontrolle und ist nicht bei einer Inkubation mit dem Präimmenserum zu detektieren. Es ist damit als spezifisch zu betrachten.

Eine Proteindetektion im Western Blot nach einer denaturierenden Proteinauftrennung ist mit dem Antikörper MAK6330 nicht möglich, was die bereits beschriebene Limitation des Antikörpers für eine breite Versuchsanwendung unterstreicht (5.2.1.2.1, Abb. 5.11). Das neu hergestellte Anti-GFV-E-Serum zeigt unter diesen Bedingungen ein klares Signal, das mit ca. 53 kDa der erwarteten Größe des E-Proteins entspricht. Diese Bande ist jedoch auch bei einer Inkubation mit dem Präimmenserum zu sehen, weshalb die Reaktion unter diesen Versuchsbedingungen als unspezifisch anzusehen ist. Auch der vergleichende Proteinnachweis in Zellkulturüberständen von GFV-infizierten und nicht-infizierten Zellen zeigte inkonsistente und unspezifische Signale (Daten nicht gezeigt).

Gründe für eine unspezifische Reaktion unter denaturierenden Bedingungen könnten sein, dass Peptidbereiche anderer Proteine freigelegt werden, die unter nativen Bedingungen verborgen bleiben. Bei ausreichender Übereinstimmung mit dem Peptid, das zur Immunisierung verwendet wurde, kann es zu unspezifischen Interaktionen kommen. Eine weitere Möglichkeit für unspezifische Reaktionen ist dadurch gegeben, dass das Kaninchen, das für die Immunisierung mit dem Peptid des E-Proteins verwendet wurde, bereits für Immunisierungsversuche im Bereich der HIV-Forschung verwendet wurde, die nicht zum

gewünschten Erfolg führten. Das Kaninchen ist demnach nicht mehr naiv, und es besteht die Möglichkeit, dass die in den vorhergehenden Versuchen verwendeten Antigene zufällig mit dem GFV-E-Protein kreuzreagieren.

Der einzige positive und spezifische Nachweis des E-Proteins im Western Blot mit dem hier hergestellten Serum ist nur unter halbnativen Bedingungen auf einer PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm möglich (5.2.1.2.1, Abb. 5.11). Die hier erhaltene Signalstärke ist jedoch wesentlich schwächer als die bei einem Nachweis mit dem Antikörper MAK6330. Das gleiche Ergebnis zeigt der Nachweis des E-Proteins im IIFT (5.2.1.2.2, Abb.5.13). Das E-Protein lässt sich zwar mit dem Anti-GFV-E-Serum detektieren, die Sensitivität ist jedoch auch in diesem Fall dem MAK6330 stark unterlegen. Für den Nachweis des E-Proteins in seiner nativen Form ist somit der Antikörper MAK6330 vorzuziehen. Das polyklonale Anti-GFV-E-Serum ist nach den hier getesteten Anwendungen weder für diagnostische noch für Forschungszwecke brauchbar und wurde nicht weiter untersucht.

Für den Nachweis des C-Proteins mit dem Anti-GFV-C-Serum konnte im Western Blot sowohl unter denaturierenden als auch unter halbnativen Bedingungen ein Signal nachgewiesen werden, das mit 16 kDa in etwa der erwarteten Größe des C-Proteins entspricht (5.2.1.2.1, Abb. 5.10) (1.2.2.2). Diese Bande wird mit zunehmender Serumverdünnung schwächer und ist bei einer Inkubation mit dem Präimmunserum nicht detektierbar. Dies zeigt einen spezifischen Nachweis des C-Proteins mit dem hergestellten Anti-GFV-C-Serum. Die Signalstärke ist insgesamt unter denaturierenden Bedingungen besser, was durch eine bessere Zugänglichkeit des Epitops nach der Denaturierung des Proteins erklärt werden könnte. Des Weiteren ist anzumerken, dass die Entwicklung der Western Blots nach einer denaturierenden Proteinauftrennung mit dem Super Signal West Femto Reagenz durchgeführt wurde, die der Blots nach halbnativer Auftrennung mit dem Super Signal West Dura Reagenz (5.2.1.2.1, Abb. 5.10). Das Femto Reagenz ist sensitiver und erlaubt damit eine Detektion schwächerer Signale.

Das C-Protein lässt sich nach einer denaturierenden Auftrennung nicht bzw. nur sehr schwach auf einer NC-Membran mit 0,45 µm Porengröße nachweisen, was auf eine zu große Porengröße zurückzuführen sein könnte und beim Proteintransfer zum Hindurchrutschen des kleinen C-Proteins führt. Auf einer PVDF-Membran derselben Porengröße ist die Bande jedoch gut detektierbar. Hier kommt vermutlich ein anderes Bindungsverhalten der Membran zum Tragen.

Besonders unter denaturierenden Bedingungen ist eine zusätzliche, ebenfalls spezifische Bande von ca. 37 kDa sichtbar (5.2.1.2.1, Abb. 5.10 E, F, H). Diese könnte der ungespaltenen Variante des PrM/C-Komplexes während der Virusreifung entsprechen (Nowak et al., 1989, Yamshchikov and Compans, 1993, Murray et al., 1993). Warum diese Bande nur sehr schwach unter halbnativen Bedingungen zu sehen ist, ist unklar.

DISKUSSION

Möglicherweise liegt es an einer alternativen Faltung im ungespaltenen Zustand und einer daher verringerten Zugänglichkeit des Peptids für den Antikörper.

Das Anti-GFV-C-Serum zeigt grundsätzlich ein spezifisches Signal für eine Detektion des GFV-C-Proteins im Western Blot. Der beste Nachweis konnte auf einer NC-Membran mit 0,2 µm Porengröße und einer Serumverdünnung von 1:250 nach einer Proteinauftrennung in einem denaturierenden Gel erreicht werden (5.2.1.2.1, Abb. 5.10 E).

Aufgrund von Problemen, dieses Signal zuverlässig zu reproduzieren und die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren (Daten nicht gezeigt), wurde das Serum im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mehr in diesem Testsystem verwendet. Für diagnostische Zwecke ist die Intensität und Reproduzierbarkeit des Signals im Western Blot nicht zufriedenstellend, eine Anwendung des Tests in der Forschung ist jedoch denkbar. Um die Anwendbarkeit zu optimieren, könnte man zum Beispiel die IgG-Antikörper aus dem Serum aufreinigen und so das Verhältnis von spezifischem zu unspezifischem Signal verbessern.

Ein Nachweis des C-Proteins im Immunfluoreszenztest konnte mit dem Anti-GFV-C-Serum ebenfalls spezifisch und in diesem Fall auch gut reproduzierbar erzielt werden. Das spezifische Fluoreszenzsignal war besonders stark in den kommerziell erwerblichen Tests der Firma EUROIMMUN AG zu sehen, in denen zudem die starke Färbung im Bereich des Zellkerns auffällt (5.2.1.2.2, Abb. 5.13a und 5.2.1.2.4, Abb. 5.15). In den durchgeführten nicht-kommerziellen IFTs ist diese Färbung nicht eindeutig zu sehen, was vermutlich auf die Qualität des IFTs oder auf die Ko-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dapi zurückzuführen ist, der spezifisch den Zellkern markiert und so zu einer Überlagerung des Signals führt (5.2.2, Abb. 5.22). Studien zu anderen Flaviviren konnten bereits eine Kernlokalisierung des C-Proteins sowie seine Interaktion mit verschiedenen Kernproteinen zeigen (Colpitts et al., 2011, Netsawang et al., 2010, Sangiambut et al., 2008, Yang et al., 2008, Bhuvanakantham et al., 2009). Wie groß jedoch die Bedeutung des C-Proteins für die Virus-Wirts-Interaktion im Verlaufe einer natürlichen Infektion ist, ist noch nicht im Detail geklärt.

Das hier hergestellte Antiserum stellt besonders für eine Anwendung im IFT ein gutes Tool zur weiteren Untersuchung des C-Proteins dar. Um eine Lokalisation des C-Proteins im Zellkern auch für das Gelbfiebervirus zu bestätigen, könnten z.B. unter Anwendung dieses Antikörpers Ko-Lokalisationsstudien oder hochauflösende Schichtaufnahmen in einem konfokalen Lasermikroskop durchgeführt werden. Diese Untersuchungen könnten folglich zur Aufklärung der Proteinfunktion beitragen.

Das Anti-GFV-NS1-Serum zeigt im Western Blot unter allen getesteten Bedingungen ein spezifisches Signal für den Nachweis des NS1-Proteins (5.2.1.2.1, Abb. 5.12). Unter denaturierenden Bedingungen ist eine Bande für das NS1-Protein auf einer Höhe von etwa 45 kDa zu sehen, was eine gute Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur darstellt

(Lindenbach and Rice, 2003). Unter halbnativen Bedingungen zeigt das Protein mit ca. 38 kDa ein leicht verändertes Laufverhalten. In Untersuchungen des NS1-Proteins von Flaviviren zeigen sich ebenfalls geringe Größenunterschiede bei einem Nachweis im Western Blot (Crooks et al., 1994, Falconar and Young, 1991, Schlesinger et al., 1990, Smith and Wright, 1985). Ein unterschiedliches Laufverhalten konnte z.B. mit dem Auftreten von Multimeren sowie mit verschiedenen Glykosylierungsmustern assoziiert werden (Crooks et al., 1994, Flamand et al., 1999, Post et al., 1991).

Das beste Ergebnis für einen Nachweis des NS1-Proteins wurde unter denaturierenden Bedingungen auf einer NC-Membran mit 0,45 µm Porengröße erzielt. Hier zeigt eine Detektion mit einer Serumverdünnung von 1:500 immer noch ein sehr starkes Signal mit einem sehr guten Verhältnis von spezifischem Signal zu Hintergrundfärbung (5.2.1.2.1, Abb. 5.12 F). Der Nachweis des NS1-Proteins im IIFT ist ebenfalls spezifisch, jedoch im Vergleich zu einem Nachweis im Western Blot weniger sensitiv (5.2.1.2.2, Abb. 5.13 c).

Durch den gut reproduzierbaren und spezifischen Nachweis des NS1-Proteins stellt das Anti-GFV-NS1-Serum ein gutes Tool sowohl für Forschungszwecke als auch potenziell für die Diagnostik dar. Das zur Herstellung des Antiserums gewählte Peptid scheint demnach einem gut zugänglichen und immunogenen Epitop im NS1-Protein zu entsprechen.

Um das Anwendungsspektrum des Anti-GFV-NS1-Serums für diagnostische Zwecke weiter auszutesten, wurde eine Nachweisgrenze zur Detektion des NS1-Proteins im Zellkulturüberstand in Relation zum Virustiter bestimmt. Es zeigte sich eine Nachweisgrenze entsprechend $2,8 \times 10^5$ PFU/ml bei einem Nachweis im Western Blot (5.2.1.2.6, Abb. 5.17). Dieses Ergebnis ist allerdings kritisch zu betrachten, da das NS1-Protein zu einem großen Teil sezerniert wird und nicht in Assoziation mit dem Viruspartikel vorliegt.

Diese Tatsache wird besonders in den späteren Versuchen zur Proteinexpression im Verlauf der GFV-Infektion deutlich (5.2.2). Die sezernierte Form des NS1-Proteins wird ab etwa 91 Stunden nach der Infektion nachweisbar, was einem Virustiter von $1,24 \times 10^6$ PFU/ml entspricht, und bleibt anschließend trotz abfallendem Titer in konstanter Menge im Überstand erhalten (5.2.2, Abb. 5.21b und im folgenden Abschnitt auf S.153 diskutiert). Der Nachweis des NS1-Proteins hängt somit nicht einzig vom erreichten Virustiter ab, sondern vielmehr auch vom Infektionszeitpunkt: vor Erreichen des maximalen Virustiters lässt sich bei einem Titer von $1,19 \times 10^5$ PFU/ml (69 hpi) noch kein NS1-Protein im Überstand nachweisen. Bei demselben Titer nach Überschreiten des maximalen Virustiters, was einem bereits abfallenden Titer entspricht, ist eine deutliche Menge an NS1-Protein im Zellkulturüberstand detektierbar (5.2.2, Abb. 5.21). Das zeitversetzte Erscheinen des NS1-Proteins im Zellkulturüberstand bestätigt die Beobachtungen früherer Infektionsstudien mit dem West-Nil-Virus (Macdonald et al., 2005).

DISKUSSION

In diesem Zusammenhang ist der Kreuzreaktivitätstest des Anti-GFV-NS1-Serums im Western Blot retrospektiv mit Vorsicht zu betrachten (5.2.1.2.6, Abb. 5.18). Der Test zeigt unter den hier angewendeten Bedingungen keine Kreuzreaktivität des Anti-GFV-NS1-Serums mit den anderen getesteten Viren. Da diese Viren jedoch bereits in inaktivierter Form erhalten wurden und keine detaillierten Informationen über den Zeitraum zwischen der Infektion der Zellen und der Ernte des Überstandes sowie über den exakten Virustiter vorlagen, ist nicht mit Sicherheit zu beurteilen, ob eine ausreichende Menge NS1-Protein im Überstand dieser Viren für eine Detektion in diesem Test enthalten war. Da die Proben aber aus Virusanzuchten stammten, die auf einen maximalen Virustiter abzielen, kann dennoch von einer ausreichenden Menge an NS1-Protein in den Überständen ausgegangen werden. Der eindeutige Beweis durch den Proteinnachweis über spezifische Antikörper für die Detektion des NS1-Proteins der verwendeten Viren war nicht möglich, da innerhalb dieser Arbeit keine entsprechenden Antikörper zur Verfügung standen. Die Spezifität des Anti-GFV-NS1-Serums wird jedoch zusätzlich im Kreuzreaktivitätstest durch den kommerziellen Flaviviren-IIFT gestützt (5.2.1.2.4, Abb. 5.16), so dass insgesamt von einer guten Spezifität für das hier hergestellte Serum auszugehen ist.

Für ein breiteres Anwendungsspektrum in diagnostischen Tests wurden die IgG-Antikörper des Anti-GFV-NS1-Serums aufgereinigt und mit Biotin bzw. HRP gekoppelt. So sollten alternative Möglichkeiten der Signaldetektion und -verstärkung geschaffen werden. Der direkte Vergleich mit dem ursprünglichen Serum im Western Blot und IIFT zeigt einen Titerverlust bedingt durch die Aufreinigung und somit ein schwächeres spezifisches Signal (5.2.1.2.6, Abb. 5.19, Spur 3 und 4, Abb. 5.20). Die Kopplung mit Biotin und der anschließende Nachweis durch eine Inkubation mit Streptavidin-HRP zeigt jedoch eine sehr gute Signalverstärkung im Western Blot. Somit wurde die Basis für eine sensitivere Detektion des NS1-Proteins in zukünftigen Anwendungen geschaffen (5.2.1.2.6, Abb. 5.19, Spur 5). Ein Nachweis des NS1-Proteins mit dem HRP-gekoppelten Anti-GFV-NS1-IgG-Antikörper ist dagegen nicht möglich (5.2.1.2.6, Abb. 5.19, Spur 6). Hierzu ist anzumerken, dass während der Kopplung durch die Firma Eurogentec nochmals ein großer Titerverlust zu verzeichnen war, was in der von der Firma angegebenen Antikörperkonzentration von lediglich 0,16 mg/ml evident wird (vor der Kopplung 1,85 mg/ml) (3.8. Tabelle 3.10). Das ausbleibende Signal ist also möglicherweise nur auf den zu geringen Antikörpertiter zurückzuführen. Um das Prinzip des Nachweises mit diesem Antikörper zu testen, müsste eine erneute Kopplung mit höheren Antikörpertitern durchgeführt werden. Innerhalb dieser Arbeit war dies jedoch nicht mehr möglich.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit erfolgreich polyklonale Peptidantikörper gegen die GFV-Proteine E, C und NS1 hergestellt werden.

DISKUSSION

Das Anti-GFV-E-Serum ist aufgrund unspezifischer Signale bei einer Detektion des denaturierten Proteins bzw. einer zu geringen Nachweiskraft und keinem Mehrwert im Vergleich zu dem monoklonalen Antikörper MAK6330 unter halbnativen Versuchsbedingungen für die hier getesteten Anwendungen auszuschließen. Die Seren gegen die Virusproteine C und NS1 erlauben einen spezifischen Nachweis der entsprechenden GFV-Proteine und sind daher ein gutes neues Tool zur Erforschung der GFV-Pathogenese sowie einzelner Proteinfunktionen. Besonders die gute Spezifität und Sensitivität des Anti-GFV-NS1-Serums im Western Blot und IIFT liefert die Möglichkeit für eine Anwendung auch im diagnostischen Bereich. In dem Kontext ist der Anti-GFV-NS1-Antikörper besonders auch hinsichtlich der Problematik der diagnostischen Lücke zwischen Ende der Virämie und dem Auftreten der humoralen Immunantwort interessant. Dieser Antikörper bietet also potenziell die Basis für eine neue Anwendung im Bereich der Diagnostik einer akuten GFV-Infektion.

Die hier hergestellten Antiseren gegen das C- und NS1-Protein wurden dazu verwendet, die Proteinexpression im Verlaufe einer GFV-Infektion in VeroE6-Zellen zu untersuchen (5.2.2). In diesem Experiment zeigte sich, dass der Virustiter bei einer initialen Infektionsdosis einer MOI von 0,01 seinen Maximalwert 91 Stunden nach der Infektion erreicht und danach langsam wieder absinkt. Ein zytopathischer Effekt tritt erst 122 bis 145 Stunden nach der Infektion in Erscheinung. Diese Tatsache sollte in Zukunft bei der Herstellung hochtitriger Viruslösungen in Betracht gezogen werden. Bis dato wird die Virusanzucht in der Regel bis zum Auftreten einer Zellschädigung, als Indikator für einen hohen Virustiter, durchgeführt (4.5.3).

Intrazelluläres NS1-Protein ist im Western Blot erstmals 68 Stunden nach der Infektion nachweisbar, was einem erreichten Virustiter von $1,19 \times 10^5$ PFU/ml entspricht und korreliert im Verlauf der Infektion in etwa mit dem Virustiter. Die stärkste Expression zellulären NS1-Proteins liegt mit einer leichten Verzögerung im Vergleich zum Virustiter bei 122 Stunden nach der Infektion (5.2.2, Abb. 5.21). Die extrazelluläre, sezernierte Form des NS1-Proteins ist im Western Blot erstmals 91 Stunden nach der Infektion detektierbar, was dem Zeitpunkt des maximal erreichten Virustiters entspricht. Mit absinkendem Virustiter bleibt das NS1-Protein weiterhin in konstanter Menge im Überstand nachweisbar. Die Menge an nachweisbarem NS1-Protein lässt sich damit nicht direkt mit dem entstandenen Virustiter im Zellkulturüberstand korrelieren; ein positiver Nachweis hängt somit zusätzlich vom Zeitpunkt der Infektion ab (siehe auch S.151).

Im Hinblick auf den Nachweis einer akuten GFV-Infektion unterstreicht dieser Verlauf die besonders gute Eignung des sezernierten NS1-Proteins als Zielprotein für eine Diagnose in der Zeit zwischen absinkender Virämie und dem Auftreten GFV-spezifischer Antikörper. Auch bei einem verminderten Virustiter ist das Protein weiterhin außerhalb der Zellen

detektierbar. Für andere Flaviviren wurde der gleiche Verlauf des NS1-Proteins für Zellkulturinfektionen gezeigt und konnte auch auf Tiermodelle übertragen werden (Chung and Diamond, 2008, Macdonald et al., 2005). In den Tierexperimenten zeigte sich ein Peak für den Nachweis viraler RNA an Tag 2 und 3 nach der Infektion, während der beste Nachweis des NS1-Proteins im Blut zwischen Tag 4 und 6 nach der Infektion möglich war. Der schwindende Nachweis viraler Bestandteile korrelierte dabei mit dem Auftreten spezifischer IgM-Antikörper.

Inwieweit sich das NS1-Protein des Gelbfieberevirus im Blut mit dem hier hergestellten Antikörper nachweisen lässt und welches Testsystem dafür in Frage kommt, bleibt zu prüfen (siehe auch ELISA, 6.2.2). Möglicherweise wäre dafür z.B. die Produktion monoklonaler Antikörper mit gleicher Antigenerkennung in höherer Konzentration in Betracht zu ziehen.

Der Nachweis der Proteine E, C und NS1 im Verlauf der GFV-Infektion mittels indirektem Immunfluoreszenztest zeigt ein vereinzelt Auftreten der Proteine E und NS1 bereits 45 Stunden nach der Infektion (5.2.2, Abb. 5.22). Das C-Protein wird erst 68 Stunden nach der Infektion nachweisbar. Da während der Virusreplikation das gesamte Polyprotein translatiert wird und damit eigentlich alle Proteine zeitgleich in gleicher Menge in Erscheinung treten müssten, lässt sich das leicht verzögerte Auftreten des C-Proteins hier vermutlich eher auf die Sensitivität der verwendeten Antikörper zurückführen. Der monoklonale Antikörper MAK6330 ist, bedingt durch seine gezielte *in vitro*-Herstellung, höher konzentriert und damit sensitiver als die durch Immunisierung gewonnenen polyklonalen Antiseren. Ein Unterschied zwischen dem Nachweis des C- und NS1-Proteins dürfte auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit der Epitope für die Antikörper zurückzuführen sein. Das C-Protein liegt hauptsächlich in enger Assoziation mit der ER-Membran vor, wohingegen sich das NS1-Protein entweder auf der Zelloberfläche befindet oder von der Zelle sezerniert wird und damit vermutlich freier für eine Interaktion mit dem Antikörper zugänglich ist (1.2.2.2, 1.2.3).

Die bereits diskutierte Lokalisation des C-Proteins im Bereich des Zellkerns wird in diesem Experiment nicht so deutlich, was möglicherweise mit den Versuchsbedingungen des hier durchgeführten IIFs zusammenhängt (siehe S.150).

Insgesamt wird in diesem Experiment erneut der Nutzen der Antiseren zur Detektion der viralen GFV-Proteine C und NS1 für eine Anwendung in der Grundlagenforschung sowie das Potential des Anti-GFV-NS1-Serums für eine mögliche Verwendung in diagnostischen Tests deutlich.

6.2.2. Entwicklung eines ELISA-Tests zum direkten Virusnachweis

In der Gelbfieberdiagnostik sind die Möglichkeiten für den Nachweis einer akuten Infektion wegen der kurzen Virämie und der anschließenden diagnostischen Lücke bis zum Auftreten der spezifischen Antikörper sehr eingeschränkt. Zudem sind oft die technischen

Anforderungen direkter Nachweismethoden wie z.B. RT-PCR nicht adäquat für eine Anwendung unter Feldbedingungen in Endemiegebieten (2.2, 1.1.4). Besonders in entlegenen Regionen Afrikas können die erforderlichen Mittel für eine Routinediagnostik oft nicht gewährleistet werden. Einfach durchzuführende Schnelltests wären in diesem Fall die ideale Lösung. Im Bereich PCR-basierter Techniken wurden in den letzten Jahren dahingehend vielversprechende Fortschritte gemacht (Domingo et al., 2012b, Kwallah et al., 2013, Patel et al., 2013), der Virusnachweis beschränkt sich damit jedoch wieder auf die virämische Phase des Patienten.

In dieser Arbeit wurde daher versucht, einen ELISA-Test für den direkten Virusnachweis zu etablieren, der auch unter Feldbedingungen durchführbar ist. Das Prinzip des ELISAs lässt sich theoretisch auf ein Säulensystem übertragen, das ohne die Verwendung zusätzlicher Geräte anwendbar ist (DiaVita, Tomaso et al., 2007). Ein ELISA für diagnostische Zwecke konnte sowohl für den Nachweis viraler Proteine als auch für den Nachweis spezifischer Antikörper bereits für verschiedene Flaviviren etabliert werden (Chung and Diamond, 2008, Dussart et al., 2006, Dussart et al., 2008, Kumarasamy et al., 2007, Kuno, 2003, Macdonald et al., 2005, Mei et al., 2012). Für das Gelbfieberevirus war bisher jedoch nur die Entwicklung für eine serologische Diagnostik zur Bestätigung einer durchgemachten Infektion erfolgreich (Domingo et al., 2012a, Kuno, 2003, Niedrig et al., 2008).

Der erste Versuch einen spezifischen GFV-ELISA zu entwickeln orientierte sich hauptsächlich an den Ergebnissen einer Diplomarbeit, die zu diesem Thema durchgeführt wurde (Litzba, 2006), und basierte auf einem Sandwich-ELISA, der gegen das GFV-E-Protein gerichtet ist. Dazu wurde sowohl für das *Coating* als auch für die Detektion der monoklonale Antikörper MAK6330 verwendet (5.2.3.1). Dabei zeigte sich, dass sich ein zunächst sehr gutes Ergebnis des direkten Virusnachweises in PBS und FKS nicht auf einen Virusnachweis in menschlichem Serum übertragen lässt. Bei einer Virusverdünnung in menschlichem Serum wurde das Signal mit einer Extinktion von ca. 0,3 auf einen Detektionsbereich reduziert, der für diagnostische Tests nicht verlässlich ist (5.2.3.1, Abb. 5.23). Diese Inhibition lässt sich durch im Serum vorhandene Komplementkomponenten erklären, die eine unspezifische Bindung der Viruspartikel verursachen, so dass diese nicht mehr frei zugänglich im Serum vorliegen (Modrow S., 2010, Schütt and Bröker, 2009, Ye et al., 2013).

Der inhibitorische Effekt wird außerdem verstärkt, wenn das Serum von Individuen stammt, die bereits vorher mit anderen Flaviviren in Kontakt gekommen sind (im Falle des in dieser Studie genutzten Humanserums durch eine Impfung gegen das FSME-Virus und eine natürliche Infektion mit dem Denguevirus) (5.2.3.1, Abb. 5.23). Dies lässt sich durch das zusätzliche Vorhandensein kreuzreaktiver Antikörper im Serum erklären, die ebenfalls die im Serum vorhandenen Viruspartikel binden (Allwinn et al., 2002, Houghton-Trivino et al., 2008).

DISKUSSION

Der Unterschied zwischen den hier verwendeten humanen Seren und FKS liegt in der Hitzeinaktivierung des FKS durch den Hersteller, wodurch die Komplementkomponenten zerstört werden. Dieser Schritt wurde in der Entwicklung des ELISAs simuliert, indem das Serum vor bzw. nach der Viruszugabe erhitzt wurde. Die Erhitzung vor der Viruszugabe zeigt einen positiven Effekt auf die Höhe des detektierbaren Signals, das mit einer Extinktion von 0,8-0,9 in einen Bereich gelangt, der für einen diagnostischen Ansatz geeignet ist (5.2.3.1, Abb. 5.23). Erhitzt man das Serum jedoch nach der Viruszugabe, bleibt das Signal vollständig aus. Dies lässt sich damit erklären, dass durch die Erhitzung nicht nur die Komplementkomponenten zerstört werden, sondern auch die Sekundärstruktur des viralen E-Proteins. Da der hier verwendete Antikörper nur für den Nachweis des nativen E-Proteins geeignet ist, bleibt eine Interaktion nach einer Denaturierung des Proteins aus. Dies führt somit zum Ausbleiben des Signals. Während einer natürlichen Infektion liegt das Virus bereits im Serum vor, und eine Hitzeinaktivierung wäre nur im Nachhinein möglich, was diese Art der Seruminaktivierung für dieses Testsystem ausschließt.

Der Versuch, die Komplementkomponenten durch die Zugabe chemischer Substanzen (Zymosan oder EDTA) zu zerstören (Linscott and Levinson, 1969) (<http://www.complementtech.com/product-description/Cells/Zymosan.htm>), zeigte zwar einen positiven Effekt in Form einer leichten Signalverstärkung, jedoch konnte kein Bereich erreicht werden, der für eine diagnostische Anwendung ausreichend wäre (5.2.3.1, Abb. 5.24).

Ein direkter Virusnachweis im Blut bzw. Serum während einer akuten GFV-Infektion ist mit dem Antikörper MAK6330 unter diesen Bedingungen im ELISA demnach nicht möglich. Mit einem spezifisch gegen das GFV-E-Protein gerichteten Antikörper, der das Protein auch in seiner denaturierten Form erkennt, wäre dieser Ansatz jedoch vorstellbar. Der Versuch, ein polyklonales Antiserum mit den erforderlichen Eigenschaften gegen das E-Protein herzustellen, war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht erfolgreich. Die Schwierigkeit, geeignete Peptidantikörper gegen das GFV-E-Protein herzustellen, wurde bereits von Jackson und Phillipotts dargelegt, die nach mehreren erfolglosen Versuchen zu dem Schluss kamen, dass vermutlich konformationsabhängige Epitope im E-Protein für die Bildung spezifischer Antikörper entscheidend sind (Jackson and Phillipotts, 1997).

In einem zweiten Ansatz zur Testentwicklung für die Diagnose einer akuten GFV-Infektion, wurde ein kompetitiver ELISA mit dem NS1-Protein als Zielprotein gewählt (4.3.8, 5.2.3.2). Das NS1-Protein stellt aufgrund seiner Sezernierung ins Blut ein interessantes Target dar, da durch seinen Nachweis eine akute Infektion auch im Zeitraum zwischen der virämischen Phase und dem Auftreten der GFV-spezifischen Antikörper möglich ist (1.1.4, 1.2.2.2). ELISA-Tests zur spezifischen Detektion des Denguevirus-NS1-Proteins konnten beispielsweise zeigen, dass während einer Denguevirus-Infektion zwischen 0,01 und 50 µg NS1-Protein pro Milliliter im Patientenserum nachweisbar sind. Der Test für die

Antigendetektion war positiv zwischen Tag 1 und Tag 9 nach Auftreten des Fiebers, auch im Falle eines negativen PCR-Ergebnisses (Alcon et al., 2002, Young et al., 2000).

Mit dem in dieser Arbeit hergestellten Anti-GFV-NS1-Serum, welches in anderen Nachweistechiken besonders gute Ergebnisse sowohl für den Nachweis des denaturierten als auch des nativen NS1-Proteins erzielte (5.2.1.2), ist ein neues Tool für die Anwendung dieser Methode auf das Gelbfiebervirus verfügbar.

Im ELISA zeigt das Anti-GFV-NS1-Serum eine sehr gute Reaktion mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid, welches als Zielantigen in diesem Test verwendet wurde. Durch eine Vorinkubation des Serums mit dem Peptid lässt sich die Reaktion vollständig inhibieren, was die Funktion des inhibitorischen Testsystems prinzipiell belegt (5.2.3.2, Abb. 5.25). Durch eine Vorinkubation mit NS1-haltigen Zellkulturüberständen GFV-infizierter Zellen ließ sich der inhibitorische Effekt jedoch nicht hervorrufen (5.2.3.2, Abb. 5.25 b). Die Interaktion des nativen NS1-Proteins mit dem Anti-GFV-NS1-Serum ist demnach anscheinend nicht stark genug, um die Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren und erfolgreich mit dem Immunisierungspeptid zu konkurrieren, welches eine sehr starke Affinität zu dem Antikörper aufweist. Auch eine vorherige Denaturierung des Proteins durch Erhitzen oder die Behandlung mit SDS hatte keinen positiven Effekt in Bezug auf eine inhibitorische Wirkung (Daten nicht gezeigt).

Die Entwicklung eines kompetitiven ELISAs zur Detektion des NS1-Proteins mit diesem polyklonalen Antiserum war nicht erfolgreich und ist daher als diagnostische Methode auszuschließen.

Aus diesem Grund wurde erneut der Ansatz des Sandwich-ELISAs gewählt, der bereits für das GFV-E-Protein getestet wurde (siehe S.155, 5.2.3.3). Hierzu wurde die ELISA-Platte mit dem aufgereinigten Anti-GFV-NS1-IgG als Fängerantikörper beladen. Der Nachweis des NS1-Proteins erfolgte anschließend mit verschiedenen Kombinationen an Detektionsantikörpern, die alle Varianten des hergestellten Anti-GFV-NS1-Serums darstellen. Dazu zählte das Anti-GFV-NS1-Serum bzw. -IgG in Kombination mit einem HRP-gekoppelten Anti-rabbit-Antikörper, das Biotin-gelabelte Anti-GFV-NS1-IgG in Kombination mit Streptavidin-HRP sowie das direkt HRP-gekoppelte Anti-GFV-NS1-IgG (5.2.3.3).

Mit keinem der hier getesteten Detektionsantikörper ließ sich ein spezifischer Signalunterschied zwischen antigenhaltiger und negativer Testlösung detektieren (5.2.3.3, Abb. 5.26). Dies könnte dadurch begründet sein, dass das NS1-Protein zwar an den Fängerantikörper bindet, dadurch aber das entsprechende Epitop bereits belegt ist. Da für die Detektion derselbe Antikörper mit derselben Spezifität verwendet wird, ist dann keine Interaktion mit eben diesem Epitop mehr möglich. Da das NS1-Protein jedoch als Dimer oder Hexamer vorliegt, wäre dieser Ansatz theoretisch denkbar gewesen. Der Nachweis des E-Proteins im Sandwich-ELISA unter Verwendung des monoklonalen MAK6330 hat hinsichtlich

DISKUSSION

dieser Problematik vermutlich deswegen funktioniert, weil es sich um die Detektion ganzer Viruspartikel handelt und das E-Protein mehrfach auf einem Partikel vorliegt (siehe S.155).

Bei einer Detektion in Kombination mit dem Anti-rabbit-Antikörper war lediglich ein Unterschied in der Signalstärke in Abhängigkeit seiner eingesetzten Konzentration zu verzeichnen, der auch in der Negativkontrolle sichtbar wurde (5.2.3.3, Abb. 5.26 - 1, 4, 5, 6 und 7). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass es hier zu einer Interaktion zwischen dem Zweitantikörper und dem an die Platte gebundenen Fängerantikörper kommt, bei dem es sich ebenfalls um das Anti-GFV-NS1-IgG handelt und der daher auch mit dem Kaninchen-spezifischen Zweitantikörper reagiert.

Der NS1-Nachweis durch den direkt HRP-gekoppelten Anti-GFV-NS1-IgG-Antikörper war wie auch bereits im Western Blot nicht erfolgreich. Der Grund dafür könnten ebenfalls die bereits durch den Fängerantikörper blockierten Epitope des Proteins sein. Eine andere Erklärung wäre der sehr hohe Titerverlust des Antikörpers im Laufe der Kopplung (Konzentration des Anti-GFV-NS1-HRP nach der Kopplung: 0,16 mg/ml (3.8, Tabelle 3.10, siehe auch S.152). Um eine Funktionalität dieses Antikörpers im ELISA letztendlich zu klären, müsste eine erneute Kopplung unter Erhaltung des Antikörpertiters vorgenommen werden.

Die einzige Ausnahme in diesem Experiment hinsichtlich eines unterschiedlichen Signals zwischen antigenhaltiger und negativer Testlösung stellt die Detektion des Immunisationspeptids durch das Biotin-gekoppelte Anti-GFV-NS1-IgG in Kombination mit Streptavidin-HRP dar (5.2.3.3, Abb. 5.26, 8 und 9). Hier zeigt sich im Vergleich zur Detektion der anderen Testlösungen eine maximal messbare Extinktion von 4,0. Diese Reaktion ist jedoch als unspezifisch einzuordnen und möglicherweise darauf zurückzuführen, dass das Peptid nicht nur an den Fängerantikörper, sondern auch an die Platte bindet und es zusätzlich zu einer unspezifischen Reaktion des Streptavidins mit dem Peptid kommen könnte.

Der Nachweis des NS1-Proteins in einem Sandwich-ELISA ist unter den hier durchgeführten Bedingungen und mit diesen Antikörpern nicht möglich. Wie essenziell die richtige Zusammenstellung geeigneter Fänger- und Detektionsantikörper für einen funktionierenden Test ist, zeigt die Entwicklung eines ELISAs zur spezifischen Detektion des Denguevirus-Typ2-NS1-Proteins von Young et al. Aus einem Panel von 35 monoklonalen Antikörpern war keiner als Fängerantikörper geeignet, und lediglich drei zeigten eine spezifische Detektion bei einem Einsatz als Detektionsantikörper. Der erfolgreiche Test gelang erst in Kombination mit einem polyklonalen, kreuzreagierenden Antiserum, das als Fängerantikörper eingesetzt wurde (Falconar and Young, 1991, Young et al., 2000).

Um den hier begegneten Problemen entgegenzuwirken und den Test zur Detektion des GFV-NS1-Proteins weiterzuentwickeln, müssten neue Antikörper hergestellt werden, die z.B.

gegen ein anderes Epitop des NS1-Proteins gerichtet sind und aus einer anderen Spezies stammen. Auch die zusätzliche Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen das gesamte Protein könnte in Kombination mit dem hier hergestellten Peptidantikörper zu einem besseren Ergebnis führen. So würde man einerseits die Problematik umgehen, das Fänger- und Detektionsantikörper die gleiche Bindungsstelle haben, andererseits würde eine unspezifische Reaktion des Zweitantikörpers mit dem Fängerantikörper ausbleiben. Diese Ansätze zur Entwicklung eines ELISAs für einen GFV-spezifischen NS1-Nachweis werden teilweise in einer sich anschließenden Doktorarbeit (Camille Escadafal) weiterverfolgt.

6.2.3. Herstellung eines fluoreszierenden infektiösen Gelbfiebervirus

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Konzeptionierung und Herstellung eines fluoreszierenden GFV zur Verwendung in Lebendzelleexperimenten für die Untersuchung der GFV-Pathogenese.

Die Anforderungen dabei waren, dass das Virus nach erfolgter Fluoreszenzmarkierung noch dieselben infektiösen Eigenschaften aufweisen soll wie das ursprüngliche Virus und für Studien in lebenden Zellen geeignet ist. Die Wahl der Methode fokussierte sich daher auf eine Technik, die möglichst geringe Veränderungen der Proteinstruktur bewirkt sowie eine Kompatibilität mit lebenden Zellen aufweist. Nach erfolgter Literaturrecherche fiel die Wahl auf die FIAsh-Methode (4.1.12.1) (Griffin et al., 1998, Hoffmann and Lohse, 2006, Brandenburg and Zhuang, 2007, Giepmans et al., 2006). Im Vergleich zu anderen Fluoreszenzmarkierungen wie z.B. durch GFP oder Quantumdots, zeichnet sich diese Methode durch ein Zweikomponentensystem aus, das lediglich die Insertion eines 6 Aminosäure langen Peptides (TC-Tag) in das gewünschte Zielprotein erfordert. Erst die Zugabe eines membrangängigen Fluorophors, das eine spezifische Bindung mit dem Peptid eingeht, führt zur Entstehung des Fluoreszenzsignals. Durch die separate Zugabe des Fluorophors, welches für Signale in verschiedenen Wellenlängen erhältlich ist, lässt sich eine gezielte Markierung des entsprechenden Proteins zu einem gewünschten Zeitpunkt hervorrufen. Weiterhin ist eine Markierung für den Nachweis im Elektronenmikroskop möglich. Besonders für die Verfolgung kleiner Viren in lebenden Zellen bietet diese Methode aufgrund der geringen Größe des zu inserierenden Peptids einen vielversprechenden neuen Ansatz für die Fluoreszenzmarkierung einzelner Virusproteine. Einen Nachteil dieser Methode könnte die beschriebene Problematik einer hohen unspezifischen Hintergrundfärbung darstellen (Giepmans et al., 2006, Rudner et al., 2005).

Da sich über den Erhalt der Proteinfunktion selbst bei geringfügigen Veränderungen nur spekulieren lässt, sollten insgesamt fünf verschiedene GFV-Konstrukte hergestellt werden die den TC-Tag an unterschiedlichen Stellen ihres Genoms tragen. So sollte die Wahrscheinlichkeit des Erhalts eines replikationsfähigen Virus erhöht werden. Für die

DISKUSSION

Insertion wurden insgesamt fünf Stellen in den GFV-Proteinen E und C gewählt, die sich aufgrund der fehlenden Proteinstrukturen für das GFV an den entsprechenden Proteinen verwandter Flaviviren orientierten (5.2.4). Die Wahl fiel auf diese beiden Proteine, da sie Teil des Viruspartikels sind und damit ein gutes Ziel für die Markierung darstellen um im Fluoreszenzmikroskop den viralen Replikationszyklus in allen Stadien zu verfolgen (1.2.3). Beispiele erfolgreicher Experimente mit ähnlichen Zielsetzungen zeigen z.B. Lebendzelleexperimente mit FIAsh-markierten HIV-, VSV- oder Influenza-Viren (Campbell and Hope, 2008, Das et al., 2009, Rudner et al., 2005, Li et al., 2010, Pereira et al., 2011).

Die Markierung des E-Proteins würde zum Beispiel eine gute Möglichkeit bieten die Schritte des Viruseintritts und der Membranverschmelzung zu dokumentieren. Eine Färbung des C-Proteins dagegen könnte bedingt durch seine zytoplasmatische Lage am ER leichter während einer bereits bestehenden Infektion vorgenommen werden und somit für die Untersuchung der Virusmorphogenese und des Transportes zur Zelloberfläche verwendet werden. Zudem könnte es zur Aufklärung einer möglichen Lokalisation des C-Proteins im Zellkern und seiner dortigen Funktion beitragen (siehe auch S.150).

Für die Insertion des TC-Tags an den ausgewählten Stellen des GFV-Genoms wurden im Laufe dieser Arbeit verschiedene Techniken gewählt (4.1.12.2, 4.1.12.3, 4.1.12.4). Als Basis für die Mutagenese diente der GFV-Volllängeklon (3.7.1). Die Schwierigkeiten hinsichtlich einer Mutagenese mit herkömmlichen Methoden lagen dabei hauptsächlich in der Größe des Plasmids (13,45kb) und der limitierten Verfügbarkeit geeigneter Restriktionsschnittstellen im Bereich des zu verändernden Genomabschnittes.

Der Versuch den TC-Tag mit Hilfe einer rekombinanten PCR in einen bestimmten Genomabschnitt einzufügen hat prinzipiell funktioniert (5.2.4, 4.1.12.2). Die anschließende Klonierung des in der PCR hergestellten Fragments in den GFV-Volllängeklon war jedoch nicht erfolgreich. Die Gründe dafür konnten letztendlich nicht aufgedeckt werden. Als mögliche Ursachen könnten aber die langen DNA-Fragmente diskutiert werden, die durch eventuell ausgebildete Sekundärstrukturen während der Ligation nicht mit einander verknüpft werden konnten. Die Länge der hergestellten PCR-Fragmente war jedoch essentiell um geeignete Schnittstellen für die Umklonierung zu gewährleisten. Ein weiterer Grund könnte sein, dass nach der zweiten PCR-Reaktion in einigen Versuchsansätzen nicht genug Material zur Verfügung stand (Daten nicht gezeigt), so dass die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Ligation begrenzt war.

Die Methode der homologen Rekombination bietet eine gute Alternative zu herkömmlichen Mutations- und Klonierungstechniken, da sie Mutationen theoretisch unabhängig von Restriktionsschnittstellen an jeder beliebigen Position eines Genoms einfügen kann (5.2.4, 4.1.12.3). Aus diesem Grund konnte das durch rekombinante PCR hergestellte

Genomfragment, welches den TC-Tag enthielt, verkürzt werden und daher effektiver produziert werden.

Die Methode der homologen Rekombination für die Mutation des GFV war im ersten Rekombinationsschritt erfolgreich. Der entscheidende Austausch der Selektionskassette gegen den TC-Tag beinhaltenden Genomabschnitt im zweiten Rekombinationsschritt war jedoch nicht möglich und führte zu unspezifischen Mutationen in Form von Deletionen und Insertionen zufälliger DNA-Sequenzen (Daten nicht gezeigt). Alle Modifikationen des Protokolls entsprechend der Angaben zur Rekombinationsoptimierung des Handbuchs sowie im Rahmen der Fehlerdiskussion mit der Herstellerfirma besprochen blieben ebenfalls erfolglos. Schließlich stellte sich heraus, dass diese Methode für *single copy*-Plasmide optimiert wurde und für Plasmide die in mehreren Kopien pro Zelle vorliegen problematisch ist. Diese Information war jedoch nicht im Protokoll nachzulesen und wurde erst im Rahmen der Zusammenarbeit mit der Herstellerfirma dargelegt.

Der Ansatz den TC-Tag mittels seitengerichteter Mutagenese in das GFV-Genom zu inserieren, konnte durch eine vorherige Umklonierung des entsprechenden Genomabschnittes in ein kleineres Plasmid sowie die Aufteilung der Mutagenese in zwei Schritte optimiert werden und führte schließlich zur erfolgreichen Insertion des TC-Tags (5.2.4, 4.1.12.4). Die Umklonierung des mutierten Genomabschnittes in den GFV-Volllängeklon war jedoch, wie schon im Falle der rekombinanten PCR, sehr schwierig und gelang lediglich für das Konstrukt 17D-E-I2. Anschließende Versuche aus diesem Konstrukt infektiöse Viruspartikel zu erhalten blieben erfolglos (5.2.4) (Daten nicht gezeigt). Zudem zeigten Sequenzanalysen der mutierten Genomabschnitte zusätzliche, unerwünschte Mutationen an anderen Stellen des Genoms, die im schlimmsten Fall zu einer Leserasterverschiebung führten (Daten nicht gezeigt). Diese Mutationen könnten der Grund für die erfolglose Produktion viraler Partikel für das Gelbfiebervirus 17D-E-I2 sein.

Aufgrund dieser zusätzlichen Mutationen lässt sich nicht feststellen, ob eine ausbleibende Virusproduktion oder ein verändertes Wachstumsverhalten des Virus durch den inserierten TC-Tag oder durch die unerwünschten Mutationen hervorgerufen wird. Die Problematik der zusätzlich eingefügten, unerwünschten Mutationen wurde für die Herstellung der GFV-Konstrukte 17D-C1 und 17D-C2 im Rahmen einer in Kollaboration durchgeführten Diplomarbeit detailliert erörtert (Chowdhury, 2011).

Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Insertion des TC-Tags in das GFV-Genom, wurden die gewünschten Genomabschnitte letztendlich synthetisch hergestellt und in den GFV-Volllängeklon umkloniert (5.2.4). Die Umklonierung war für die Konstrukte 17D-E-I1, 17D-E-I3, 17D-C1 und 17D-C2 erfolgreich.

Die Herstellung viraler Partikel durch *in vitro*-Transkription resultierte in einem positiven Nachweis viraler Genomäquivalente für alle vier hergestellten GFV-Konstrukte (5.2.4,

Abb. 5.29). Ein eindeutig positiver Nachweis infektiöser viraler Partikel (Plaquetest) sowie die Expression viraler Proteine (IIFT) ließ sich jedoch nur für das Virus 17D-C1 zeigen. Die Detektion viraler RNA mit ausbleibender Produktion infektiöser Partikel für die anderen Konstrukte könnte den Nachweis der initial transfizierten RNA darstellen. Eine andere denkbare Möglichkeit wäre, dass die Replikation und damit Amplifikation der viralen RNA zwar stattfindet, eine Produktion infektiöser Viruspartikel jedoch aufgrund modifizierter Proteinfaltungen bedingt durch den inserierten TC-Tag fehlschlägt. Zudem lag die transfizierte RNA-Menge von 3,4 µg unter der empfohlenen Menge des Herstellers (Lipofectamin, Invitrogen) und könnte für eine erfolgreiche Transfektion in diesen Fällen nicht ausreichend gewesen sein.

Von insgesamt fünf geplanten fluoreszenzmarkierten GFV konnten innerhalb dieser Arbeit schließlich vier durch die gentechnische Veränderung des GFV-Volllängeklons hergestellt werden. Von diesen ist eines in der Lage infektiöse Viruspartikel zu bilden. Dies unterstreicht die Schwierigkeit der theoretischen Vorhersage von Auswirkungen auf Proteinfaltungen und -funktionen durch gezieltes Einbringen von Mutationen.

Die weiteren Schritte für eine Anwendung des hergestellten, modifizierten Virus GFV-17D-C1 für die Untersuchung der GFV-Pathogenese beinhalten eine weitere Charakterisierung der Wachstumseigenschaften des Virus sowie der Fluoreszenzmarkierung durch die Zugabe des Fluorophors FIAsH. Da die Sequenz des hier verwendeten GFV-Volllängeklons in seiner unmarkierten Form Unterschiede zu seiner ursprünglich angegebenen Sequenz aufweist (5.2.4), sollte der Vergleich des Wachstumsverhaltens des Virus 17D-C1 mit dem des 17D-Virus aus einer charakterisierten Impfcharge erfolgen. So können eventuelle Fehlerquellen bedingt durch diese Mutationen ausgeschlossen werden.

In Bezug auf die Fluoreszenzmarkierung mit den Fluorophoren FIAsH und ReAsH sollten aufgrund der beschriebenen Problematik hoher Hintergrundfluoreszenz Vorversuche zur Optimierung des spezifischen Signals durchgeführt werden (Giepmans et al., 2006, Rudner et al., 2005). Auch die Zugänglichkeit des Epitops für den Farbstoff muss dadurch geklärt werden und ist die Voraussetzung für eine Anwendung in Lebendzelleexperimenten.

Hinsichtlich der Translation der GFV-Konstrukte 17D-E-I1, 17D-E-I3 und 17D-C2 könnte eine Wiederholung der Transfektion mit erhöhter RNA-Menge erfolgsversprechend sein.

Diese weiterführenden Experimente zur Expression der anderen GFV-Konstrukte sowie zur Charakterisierung und Anwendung des Virus 17D-C1 waren innerhalb der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr möglich und werden im Rahmen einer anderen Doktorarbeit (Camille Escadafal) weitergeführt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Das Gelbfiebervirus (GFV) stellt trotz des Vorhandenseins eines effektiven Impfstoffes nach wie vor ein weltweites, ernstzunehmendes Gesundheitsproblem dar.

Molekularepidemiologische Analysen von Gelbfieberviren sind aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Sequenzdaten bisher nur eingeschränkt möglich. Innerhalb dieser Arbeit wurde das Genom von drei GFV-Impfstämmen und 14 westafrikanischen Wildisolaten erstmals vollständig sequenziert und veröffentlicht. Damit wurde die Anzahl frei verfügbarer GFV-Genomsequenzen von ursprünglich 21 auf 38 erhöht. Mit Hilfe dieser Sequenzdaten wurden anschließend die Verwandtschaftsbeziehungen von Gelbfieberviren unter separater Betrachtung von Impfstämmen und Wildtypstämmen eingehend analysiert.

Die Analyse der Impfstämme beinhaltet einen umfassenden Sequenzvergleich, die Generierung eines phylogenetischen Stammbaumes basierend auf Genomsequenzen sowie dessen Vergleich mit der historischen Genealogie von GFV-Impfstoffen. Damit wurde der beim letzten WHO-Meeting zu GFV-Impfstoffen angesprochenen Notwendigkeit einer molekularbiologischen Datenanalyse entsprochen und somit erstmalig die Möglichkeit geschaffen, die molekularen Abstammungsmerkmale mit den Daten der historischen Aufzeichnung direkt zu vergleichen. Durch diese Arbeit wird die zukünftige Forschung zu GFV-basierten Impfstoffen wesentlich erleichtert.

Die Untersuchung westafrikanischer GFV-Isolate umfasst zusätzlich zu einer Sequenzanalyse und der Generierung eines phylogenetischen Stammbaumes die Untersuchung biologischer Eigenschaften.

Die auf GFV-Gesamtgenomsequenzen basierenden Stammbaumanalysen konnten eine vorausgegangene, auf partiellen Sequenzdaten basierende Klassifizierung westafrikanischer Genotypen in sechs verschiedene GFV-Linien bestätigen und fünf bisher nicht charakterisierte GFV-Isolate in diese Klassifizierung einbeziehen. Diese Untersuchung unterstreicht außerdem die Notwendigkeit einer verstärkten und kontinuierlichen Erhebung von Sequenzdaten afrikanischer GFV-Isolate, um so die Möglichkeiten epidemiologischer und evolutionsbiologischer Studien zum GFV zu erweitern.

Die Replikation der westafrikanischen GFV-Linien (Moskitoisolate) wurde in humanen Leberzellen und Insektenzellen vergleichend zu der der Referenzstämmen Asibi und 17D (Humanisolate) untersucht. Insgesamt weisen die Gruppen der Moskitoisolate und der Referenzstämmen in beiden Zelllinien deutliche Unterschiede zueinander im Wachstumsverhalten auf, was eine vorausgegangene Zelladaptation implizieren könnte.

Die Wachstumsanalysen der westafrikanischen GFV-Linie 3 zeigen abweichende Ergebnisse zu beiden Gruppen (Moskito- und Humanisolate). Auffällig ist zudem ein gehäuftes Auftreten von Mutationen in der Proteinsequenz dieser Linie, die in keiner anderen

ZUSAMMENFASSUNG

Linie zu finden sind. Vor dem Hintergrund, dass diese Linie bisher als einzige in einem natürlichen Kontext mit vertikaler Transmission in Verbindung gebracht werden konnte, wäre eine weitere Charakterisierung dieses Isolates sowohl zur Aufklärung bestimmter Proteinfunktionen als auch zum Verständnis der vertikalen Transmission sehr wichtig.

Die hier durchgeführte Studie verbindet erstmals genetische Informationen mit phänotypischen Eigenschaften afrikanischer GFV-Wildisolate und diskutiert bestehende Wissenslücken im Bereich der Funktion und Ökologie von Gelbfieberviren.

Sowohl für Forschungszwecke als auch für die Diagnostik einer akuten GFV-Infektion besteht ein großer Bedarf an neuen Testsystemen für den gezielten Nachweis einzelner Virusproteine.

Zur Entwicklung neuer Nachweismethoden wurden in dieser Arbeit polyklonale Peptidantiseren gegen die GFV-Proteine E, C und NS1 hergestellt und charakterisiert. Die Antiseren gegen die Proteine C und NS1 weisen in verschiedenen Methoden gute Ergebnisse für eine spezifische Proteindetektion auf. Innerhalb dieser Arbeit konnten diese Seren bereits zur Untersuchung der GFV-Proteinexpression während einer Infektion im Zellkultursystem angewandt werden und erweitern damit die Möglichkeiten in der Forschung. Durch die Sezernierung ins Blut während der frühen Infektionsphase im Menschen stellt das NS1-Protein ein geeignetes Zielprotein für die GFV-Diagnostik dar. Das hier hergestellte NS1-Antiserum ist daher zusätzlich ein vielversprechendes Tool zur Entwicklung neuer diagnostischer Methoden.

Die Etablierung eines ELISA-Tests für den spezifischen Nachweis von GFV-Proteinen konnte innerhalb dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden. Die bisher erhaltenen Ergebnisse liefern jedoch eine Basis für die zukünftige Weiterentwicklung dieser Methode.

Im Rahmen der Entwicklung neuer Methoden zur Untersuchung der GFV-Pathogenese wurde in dieser Arbeit außerdem ein Konzept zur Herstellung fluoreszenzmarkierter GFV-Partikel für eine Anwendung in Lebendzelleexperimenten entwickelt. Insgesamt wurden vier gentechnisch veränderte GFV hergestellt, die jeweils eine kurze Peptidsequenz für eine spezifische Fluoreszenzmarkierung in unterschiedlichen Proteinbereichen enthalten. Eines dieser Konstrukte ist in der Lage, infektiöse virale Partikel zu bilden. Die erzielten Ergebnisse bieten eine Grundlage für die Weiterentwicklung und Anwendung dieser neuartigen Methode.

Insgesamt erweitert diese Arbeit das Methodenspektrum zur Untersuchung und Diagnostik von Gelbfieberviren.

8. SUMMARY

Despite the availability and effectiveness of the live attenuated vaccine 17D, yellow fever virus (YFV) remains a serious public health problem worldwide. However, due to limited accessibility of sequence data, the possibilities for molecular epidemiological analyses of YFV are still restricted.

Within this work, the whole genomes of three YFV vaccine strains and 14 West African wild isolates have been sequenced for the first time, thus increasing the number of published YFV whole genome sequences from 21 to 38. Using this sequence data, the phylogenetic relationships of yellow fever viruses were extensively analyzed, considering vaccine and wild-type strains separately.

The analyses of vaccine strains include a comprehensive comparison of YFV sequences, the generation of a phylogenetic tree based on full genome sequences and its comparison with the historical genealogy of YFV vaccines. This investigation responds to the need for a molecular data analysis of vaccine strains, which was addressed during the WHO meeting for the evaluation of yellow fever vaccines in 2009. For the first time the present study enables researchers to relate directly the genealogy of vaccine strains with the corresponding molecular data and provides valuable information for the prospective research on YFV-based vaccines.

The investigation of West African YFV isolates includes the analysis of sequence data, the generation of a phylogenetic tree as well as the investigation of biological strain characteristics. The phylogenetic analyses based on full genome sequences support a classification of West African genotypes into six distinct YFV lineages which had been identified previously by partial sequence analyses. Five formerly uncharacterized YFV isolates were integrated into this classification for the first time. Furthermore, this investigation underlines the need for intensified and continuous acquisition of sequence data from YFV wild-type strains, in order to promote future epidemiological and evolutionary biological studies.

The replication of the West African YFV lineages (mosquito isolates) has been investigated in human liver cells and insect cells, in comparison to the YFV reference strains Asibi and 17D (human isolates). Overall, the mosquito isolates and the reference strains disclose clear differences regarding their growth behavior in both cell lines, potentially implicating previous cell adaptation.

YFV lineage 3 exhibits deviating growth characteristics compared to both groups of YFV strains (mosquito and human isolates). In addition, its protein sequence reveals a conspicuous accumulation of unique mutations which could not be found in other lineages.

SUMMARY

Against the background that so far this lineage has been the only one which could be isolated in the context of vertical transmission in nature, further characterization of this isolate would be of great interest for the understanding of certain protein functions and vertical transmission.

The presented study combines for the first time genetic information with phenotypical characteristics of African YFV wild-type isolates and discusses existing gaps of knowledge in the field of character and ecology of yellow fever viruses.

To date, there is still a need for new test systems detecting specific viral proteins for the diagnostics of acute YFV infections as well as for research purposes.

For this purpose, polyclonal peptide antisera for the detection of YFV proteins E, C and NS1 were produced and characterized as part of this study. The antisera against the C and NS1 protein showed positive results for the specific detection of the target protein in various tests and were used to investigate the protein expression during YFV infection in cell culture. The usage of these antisera extends the possibilities for research applications. Due to its secretion into the blood during the early stages of infection in humans, the NS1 protein represents a suitable target for YFV diagnostics. Therefore, the NS1 antiserum produced in this study represents a promising tool for the development of novel diagnostic tests.

The establishment of an ELISA test for the specific detection of YFV proteins could not be completed during this study. However, the preliminary results provide a basis for further development and application of this method.

With the aim to develop new methods for the investigation of YFV pathogenesis, a concept for the construction of fluorescence-labeled YFV particles suitable for live cell experiments has been initiated and developed as part of this study. Overall, four genetically modified YFV constructs were produced, carrying a small peptide sequence for fluorescence labeling at different insertion sites. One YFV construct is able to create infectious viral particles and offers the basic principle for the advancement and application of this novel method.

Together, the results of this study enlarge the methodological spectrum for the investigation and diagnostics of yellow fever virus.

9. VERÖFFENTLICHUNGEN

Stock, N. K., N. Boschetti, C. Herzog, M. S. Appelhans, and M. Niedrig. 2012.

The phylogeny of yellow fever virus 17D vaccines.

Vaccine 30:989-994.

Stock, N. K., H. Laraway, O. Faye, M. Diallo, M. Niedrig, and A. A. Sall. 2013.

Biological and phylogenetic characteristics of yellow fever virus lineages from West Africa.

Journal of Virology 87:2895-2907.

Stock, N. K., C. Escadafal, K. Achazi, M. Cissé, and M. Niedrig.

Development and characterization of polyclonal peptide antibodies for the detection of yellow fever virus proteins.

(In Vorbereitung)

10. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Matthias Niedrig, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Doktorarbeit am Robert Koch-Institut anzufertigen. Ich habe seine Unterstützung und sein Vertrauen während der Bearbeitung vielfältiger Projekte sowie seine Offenheit gegenüber neuen Ideen und Kooperationen stets sehr geschätzt.

Prof. Dr. Rupert Mutzel des Fachbereichs Biologie der FU Berlin danke ich für die freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten meiner Arbeit zu übernehmen.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die tolle Aufnahme in die Gruppe, Bastelstunden und Kochabende danken. Ich habe hier nicht nur hilfsbereite Kollegen gefunden, sondern auch sehr gute Freunde!

Ganz besonders danke ich Matze, Nadine, Katha, Claudia, Camille, Constanze, meinem Lieblingshiwi Hewad, Dia und Madi für die großartige Unterstützung während meiner Doktorarbeit sowie allen anderen Mit-Doktoranden, -Diplomanden und Freunden für eine schöne Zeit am RKI. Ich habe die Zeit mit Euch sehr genossen! Besonders jetzt, da ich in den Genuss meines langersehnten Einzelbüros gekommen bin, vermisse ich Euch und das „alte Chaos“ doch sehr!

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen am Robert Koch-Institut bedanken, die mir während der letzten Jahre geholfen und so zu dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders die Unterstützung des Tierstalls und des Sequenzierlabors soll hier erwähnt sein.

Meinen Kooperationspartnern von Crucell Switzerland AG und Marc Appelhans möchte ich für eine sehr nette Zusammenarbeit und Unterstützung in meinem Projekt zur Phylogenie von GFV-Impfstoffen danken.

Meinen Freunden und Kollegen vom Institut Pasteur de Dakar, insbesondere Dr. Amadou Alpha Sall, danke ich vielmals für die Möglichkeit, einen Teil meiner Doktorarbeit im Senegal absolviert haben zu können. Ich habe in dieser Zeit sowohl in beruflicher als auch in privater Hinsicht sehr viel gelernt und werde diese Erfahrungen sicher nie vergessen!

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie: Danke, dass ich immer auf Eure Unterstützung zählen kann, dass Ihr mich aufmuntert und immer an mich glaubt. Zu wissen, dass Ihr immer da seid und hinter mir steht, bedeutet mir sehr viel. Ich vermisse Euch und liebe Euch sehr!

Auch meinen Freunden, die in den letzten Jahren mit mir durch dick und dünn gegangen sind, möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken. Ich bin unglaublich froh, Euch zu haben! Und auch wenn wir uns manchmal länger nicht sehen, sollt Ihr wissen, wie wichtig Ihr mir seid!

DANKSAGUNG

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Ursula Erikli, Matze (Dich hat es sicherlich die meisten Nerven gekostet - Danke für deine Ausdauer und stete Unterstützung!), Claudia (danke auch Dir nochmal für die Hilfe in deiner eigenen heißen Phase!) und Nadine bedanken, die an der Korrektur dieser Arbeit beteiligt waren und so zur Entstehung dieser Schrift beigetragen haben.

11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

17D	Gelbfiebervirus 17D-Impfstamm	Ch.-B.	Chargenbezeichnung
17DD	Gelbfiebervirus 17DD-Impfstamm	CMC	Carboxymethylcellulose
17D-E-I1	GFV-Konstrukt mit TC-Tag im E-Protein, Insertionsstelle 1	CO ₂	Kohlenstoffdioxid
17D-E-I2	GFV-Konstrukt mit TC-Tag im E-Protein, Insertionsstelle 2	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
17D-E-I3	GFV-Konstrukt mit TC-Tag im E-Protein, Insertionsstelle 3	DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
17D-C1	GFV-Konstrukt mit TC-Tag im C-Protein, Insertionsstelle 1	DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan – Insektizid
17D-C2	GFV-Konstrukt mit TC-Tag im C-Protein, Insertionsstelle 2	Den1-4	Denguevirus Serotyp 1-4
3D	dreidimensional	dest.	destilliert
A ₂₆₀	spektroskopischer Absorptionswert bei 260 nm	D-MEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
A ₂₈₀	spektroskopischer Absorptionswert bei 280 nm	DMSO	Dimethylsulfoxid
Abb.	Abbildung	DNA	Desoxyribonukleinsäure
ad	bis zu	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Ae.	Aedes	DTT	Dithiothreitol
AIC	<i>Akaike Information Criterion</i>	DZ	dendritische Zellen
Ak	Antikörper	<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat	E-Protein	<i>Envelope</i> -Protein (Membranprotein)
AS	Aminosäure	ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	EDT	Ethandithiol
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
bidest.	zweifach destilliert	EEEV	<i>Eastern Equine Encephalitis Virus</i>
BNI	Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg	ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> – enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
bp	Basenpaare	ER	Endoplasmatisches Retikulum
bs	<i>Bootstrap</i> -Wert	et al.	<i>et alii</i> – und andere
BSA	bovines Serumalbumin	Fa.	Firma
BLS-2/-3	<i>Biosafety level 2/3</i>	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
bzw.	beziehungsweise	FKS	fötales Kälberserum
c	Konzentration	FIAsH	<i>Fluorescein Arsenical Hairpin Binder</i> (Molekül)
C-Protein	Kapsid-Protein	FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
C-Terminus	Carboxy-Terminus	FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
ca.	circa	FU	Freie Universität Berlin
CaCl ₂	Calciumchlorid	GAVI	<i>Global Alliance of Vaccine and Immunization</i>
Cap	Flavivirus 5'-Capstruktur (m ⁷ G(5')ppp(5')Am ²)	GE	Genomäquivalente
cDNA	komplementäre DNA		
CFA	komplettes Freund's Adjuvans		

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GFP	Grün fluoreszierendes Protein	NaCl	Natriumchlorid
GF	Gelbfieber	NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
GFV	Gelbfiebervirus / -viren	NaOH	Natriumhydroxid
GTR+G	<i>general time-reversible model plus gamma distribution</i>	NC	Nitrozellulose
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
H ₂ O	Wasser	Nr.	Nummer
hpi	<i>hours post infection</i> - Stunden nach Infektion	NS	virales Nicht-Strukturprotein
HRP	Meerrettichperoxidase	NTP	Nukleosidtriphosphate
i.d.R.	in der Regel	NTR	nicht-translatierter Bereich
IF	Immunfluoreszenzfärbung	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
IFA	inkomplettes Freund's Adjuvans	ORF	<i>open reading frame</i> - offener Leserahmen
IFN	Interferon	OT	Objektträger
IgG/IgM	Immunglobuline Klasse G/M	PAA	Polyacrylamid
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactosidase	PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
Jh.	Jahrhundert		
JEV	Japanische Enzephalitis-Virus	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
KAc	Kaliumacetat	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> – Polymerase Kettenreaktion
KCl	Kaliumchlorid		
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	PFU	<i>plaque forming units</i> – infektiöse Partikel
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i> – Carrier-Protein	pH	<i>ponds Hydrogenii</i> – negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
KOH	Kaliumhydroxid		
L1-6	GFV-Linie 1-6		
LacZ	Gen für das Enzym β-Galactosidase	pp	<i>posterior probability</i>
lat.	lateinisch	PrM-Protein	Vorläufer des Matrix-Proteins
LB	Luria-Bertani	PRNT	Plaque-Reduktions-Neutralisationstest
Lot	Identifikationsnummer	PVDF	Polyvinylidenfluorid
LSH	<i>long stable hairpin</i> -Struktur des 3'-NTR	rb	<i>rabbit</i>
M-Protein	Matrix-Protein	RbCl	Rubidiumchlorid
MAK	monoklonaler Antikörper	ReAsH	<i>Fluorescein Arsenical Hairpin Binder</i> (basierend auf Resorufin)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	rel.	relativ
ML	<i>Maximum Likelihood</i>	RKI	Robert Koch-Institut, Berlin
MnCl ₂	Manganchlorid	RNA	Ribonukleinsäure
MOI	<i>multiplicity of infection</i> – Infektionsdosis	RNAi	RNA-Interferenz
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	RNase	Ribonuklease
mRNA	Boten-RNA	rNTP	Ribonukleosidtriphosphate
MUSCLE	<i>multiple sequence comparison by log-expectation</i>	rpm	<i>rotations per minute</i> – Umdrehungen pro Minute
N-Terminus	Amino-Terminus	ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
		RT	reverse Transkription/-kriptase oder Real-time

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RT-PCR	reverse Transkriptions-/ Real-time PCR	tRNA	Transfer-RNA
		UV	ultraviolett
RYF	repetitive Sequenz im 3'-NTR des Gelbfiebervirus	VEEV	Venezolanisches Equines Enzephalitis-Virus
SAE	<i>Serious Adverse Event</i> – schwere Nebenwirkung nach einer Impfung	VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
SDS	Sodium-Dodecylsulfat	v/v	Volumen pro Volumen – Volumenprozent
SIRS	Sytemisches inflammatorisches Response-Syndrom	WHO	<i>World Health Organisation</i> – Weltgesundheitsorganisation
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> -Medium mit Glukose	WNV	West-Nil-Virus
Sn	Senegal	WSL	<i>working seed lot</i>
spp.	Spezies (pl.)	w/v	Masse pro Volumen
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	YEL-AND	<i>yellow fever vaccine-associated neurotropic disease</i> –
TBE	<i>Tick Borne Encephalitis</i> (Frühsommer- Meningoenzephalitis)-Virus	YEL-AVD	neurotroper Impfwischenfall <i>yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease</i> –
TC-Tag	Tetracystein-Sequenzmarker		viscerotroper Impfwischenfall
TEMED	Tetramethyl ethylenediamin	YFV	<i>yellow fever virus</i> –
TLR	<i>Toll-like</i> -Rezeptoren		Gelbfiebervirus
TMB	Tetramethylbenzidin		

Einheiten

%	Prozent	µM	Mikromolar (mikromol / Liter)
°C	Grad Celsius	M	Molar (mol / Liter)
bp	Basenpaare	m	(Molekül)masse
cm	Zentimeter	mA	Milliampere
g	Gramm	mg	Milligramm
	als „x g“ Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)	min	Minute(n)
		ml	Milliliter
h	Stunde(n)	mm	Millimeter
kDa	kilo Dalton	mM	Millimolar (millimol / Liter)
kb	kilo Basen	nm	Nanometer
l	Liter	ng	Nanogramm
µg	Mikrogramm	s / sec.	Sekunde(n)
µl	Mikroliter	U	Unit(s)
µm	Mikrometer	V	Volt

Nukleinbasen

A	Adenin	T	Thymin
C	Cytosin	U	Uracil
G	Guanin		

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aminosäuren

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

12. LITERATURVERZEICHNIS

2012. Outbreak news. Dengue fever in Madeira, Portugal. *Wkly Epidemiol Rec*, 87, 413.
- ALCON, S., TALARMIN, A., DEBRUYNE, M., FALCONAR, A., DEUBEL, V. & FLAMAND, M. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol*, 40, 376-81.
- ALLWINN, R., DOERR, H. W., EMMERICH, P., SCHMITZ, H. & PREISER, W. 2002. Cross-reactivity in flavivirus serology: new implications of an old finding? *Med Microbiol Immunol*, 190, 199-202.
- AVIRUTNAN, P., HAUHART, R. E., SOMNUKE, P., BLOM, A. M., DIAMOND, M. S. & ATKINSON, J. P. 2011. Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J Immunol*, 187, 424-33.
- BAE, H.-G. 2006. "Analyse der Immunantwort nach Infektion mit Gelbfiebertviren". Dissertation, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin.
- BAE, H. G., DROSTEN, C., EMMERICH, P., COLEBUNDERS, R., HANTSON, P., PEST, S., PARENT, M., SCHMITZ, H., WARNAT, M. A. & NIEDRIG, M. 2005. Analysis of two imported cases of yellow fever infection from Ivory Coast and The Gambia to Germany and Belgium. *J Clin Virol*, 33, 274-80.
- BAE, H. G., NITSCHKE, A., TEICHMANN, A., BIEL, S. S. & NIEDRIG, M. 2003. Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *J Virol Methods*, 110, 185-91.
- BARBA-SPAETH, G., LONGMAN, R. S., ALBERT, M. L. & RICE, C. M. 2005. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med*, 202, 1179-84.
- BARBAN, V., GIRERD, Y., AGUIRRE, M., GULIA, S., PETIARD, F., RIOU, P., BARRERE, B. & LANG, J. 2007. High stability of yellow fever 17D-204 vaccine: a 12-year retrospective analysis of large-scale production. *Vaccine*, 25, 2941-50.
- BARRETT, A. D. & HIGGS, S. 2007. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol*, 52, 209-29.
- BARRETT, A. D. & MONATH, T. P. 2003. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. *Adv Virus Res*, 61, 291-315.
- BARRETT, A. D., MONATH, T. P., BARBAN, V., NIEDRIG, M. & TEUWEN, D. E. 2007. 17D yellow fever vaccines: new insights. A report of a workshop held during the World Congress on medicine and health in the tropics, Marseille, France, Monday 12 September 2005. *Vaccine*, 25, 2758-65.
- BARRETT, A. D. & TEUWEN, D. E. 2009. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol*, 21, 308-13.
- BARRETT, A. D. T. & STANBERRY, L. R. 2009. *Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases*, London/Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- BHUVANAKANTHAM, R., CHONG, M. K. & NG, M. L. 2009. Specific interaction of capsid protein and importin-alpha/beta influences West Nile virus production. *Biochem Biophys Res Commun*, 389, 63-9.

- BOLLATI, M., ALVAREZ, K., ASSENBERG, R., BARONTI, C., CANARD, B., COOK, S., COUTARD, B., DECROLY, E., DE LAMBALLERIE, X., GOULD, E. A., GRARD, G., GRIMES, J. M., HILGENFELD, R., JANSSON, A. M., MALET, H., MANCINI, E. J., MASTRANGELO, E., MATTEVI, A., MILANI, M., MOUREAU, G., NEYTS, J., OWENS, R. J., REN, J., SELISKO, B., SPERONI, S., STEUBER, H., STUART, D. I., UNGE, T. & BOLOGNESI, M. 2010. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res*, 87, 125-48.
- BRANDENBURG, B. & ZHUANG, X. 2007. Virus trafficking - learning from single-virus tracking. *Nat Rev Microbiol*, 5, 197-208.
- BRATKE, K., LUTTMANN, W., KÜPPER, M. & D., M. 2009. Der Experimentator: Immunologie. 3. Aufl., Springer.
- BREDENBEEK, P. J., KOOI, E. A., LINDENBACH, B., HUIJKMAN, N., RICE, C. M. & SPAAN, W. J. 2003. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J Gen Virol*, 84, 1261-8.
- BRESSANELLI, S., STIASNY, K., ALLISON, S. L., STURA, E. A., DUQUERROY, S., LESCAR, J., HEINZ, F. X. & REY, F. A. 2004. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J*, 23, 728-38.
- BRINTON, M. A. & DISPOTO, J. H. 1988. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology*, 162, 290-9.
- BRYAN, C. S., MOSS, S. W. & KAHN, R. J. 2004. Yellow fever in the Americas. *Infect Dis Clin North Am*, 18, 275-92.
- BRYANT, J. E., VASCONCELOS, P. F., RIJNBRAND, R. C., MUTEBI, J. P., HIGGS, S. & BARRETT, A. D. 2005. Size heterogeneity in the 3' noncoding region of South American isolates of yellow fever virus. *J Virol*, 79, 3807-21.
- CAMPBELL, E. M. & HOPE, T. J. 2008. Live cell imaging of the HIV-1 life cycle. *Trends Microbiol*, 16, 580-7.
- CARPP, L. N., GALLER, R. & BONALDO, M. C. 2011. Interaction between the yellow fever virus nonstructural protein NS3 and the host protein Alix contributes to the release of infectious particles. *Microbes Infect*, 13, 85-95.
- CARRINGTON, C. V. & AUGUSTE, A. J. 2013. Evolutionary and ecological factors underlying the tempo and distribution of yellow fever virus activity. *Infect Genet Evol*, 13, 198-210.
- CARTER, H. 1931. Yellow Fever: An Epidemiological and Historical Study of its Place of Origin. *Baltimore: The Williams & Wilkins Company*.
- CHAMBERS, T. J., HAHN, C. S., GALLER, R. & RICE, C. M. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*, 44, 649-88.
- CHANG, G. J., CROPP, B. C., KINNEY, R. M., TRENT, D. W. & GUBLER, D. J. 1995. Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus. *J Virol*, 69, 5773-80.
- CHANG, G. J., KUNO, G., PURDY, D. E. & DAVIS, B. S. 2004. Recent advancement in flavivirus vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 3, 199-220.
- CHARREL, R. N., DE LAMBALLERIE, X. & RAOULT, D. 2007. Chikungunya outbreaks--the globalization of vectorborne diseases. *N Engl J Med*, 356, 769-71.

- CHAVEZ, J. H., SILVA, J. R., AMARILLA, A. A. & MORAES FIGUEIREDO, L. T. 2010. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals*, 38, 613-8.
- CHOWDHURY, P. R. 2011. *Establishment of a yellow fever virus neutralization assay and FIAsH-labelling of virus proteins.*, Diplomarbeit. Technische Universität Berlin, FB Biotechnologie.
- CHU, J. J. & NG, M. L. 2004. Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *J Biol Chem*, 279, 54533-41.
- CHUNG, K. M. & DIAMOND, M. S. 2008. Defining the levels of secreted non-structural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice. *J Med Virol*, 80, 547-56.
- CHUNG, K. M., LISZEWSKI, M. K., NYBAKKEN, G., DAVIS, A. E., TOWNSEND, R. R., FREMONT, D. H., ATKINSON, J. P. & DIAMOND, M. S. 2006. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19111-6.
- COLPITTS, T. M., BARTHEL, S., WANG, P. & FIKRIG, E. 2011. Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells. *PLoS One*, 6, e24365.
- COOPER, L. A. & SCOTT, T. W. 2001. Differential evolution of eastern equine encephalitis virus populations in response to host cell type. *Genetics*, 157, 1403-12.
- CROCHU, S., COOK, S., ATTOUI, H., CHARREL, R. N., DE CHESSE, R., BELHOUCHE, M., LEMASSON, J. J., DE MICCO, P. & DE LAMBALLERIE, X. 2004. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol*, 85, 1971-80.
- CROOKS, A. J., LEE, J. M., EASTERBROOK, L. M., TIMOFEEV, A. V. & STEPHENSON, J. R. 1994. The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. *J Gen Virol*, 75 (Pt 12), 3453-60.
- DAS, S. C., PANDA, D., NAYAK, D. & PATTAIK, A. K. 2009. Biarsenical labeling of vesicular stomatitis virus encoding tetracysteine-tagged m protein allows dynamic imaging of m protein and virus uncoating in infected cells. *J Virol*, 83, 2611-22.
- DE SOUZA, R. P., FOSTER, P. G., SALLUM, M. A., COIMBRA, T. L., MAEDA, A. Y., SILVEIRA, V. R., MORENO, E. S., DA SILVA, F. G., ROCCO, I. M., FERREIRA, I. B., SUZUKI, A., OSHIRO, F. M., PETRELLA, S. M., PEREIRA, L. E., KATZ, G., TENGAN, C. H., SICILIANO, M. M. & DOS SANTOS, C. L. 2010. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *J Med Virol*, 82, 175-85.
- DEUBEL, V., PAILLIEZ, J. P., CORNET, M., SCHLESINGER, J. J., DIOP, M., DIOP, A., DIGOUTTE, J. P. & GIRARD, M. 1985. Homogeneity among Senegalese strains of yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg*, 34, 976-83.
- DIAVITA Products for the detection of biological agents. <http://www.diavita.de/germanneu/images/stories/Downloads/BroschEnglischInternet.pdf>, DiaVita GmbH
- DOBLAS, A., DOMINGO, C., BAE, H. G., BOHORQUEZ, C. L., DE ORY, F., NIEDRIG, M., MORA, D., CARRASCO, F. J. & TENORIO, A. 2006. Yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease and death in Spain. *J Clin Virol*, 36, 156-8.

- DOKLAND, T., WALSH, M., MACKENZIE, J. M., KHROMYKH, A. A., EE, K. H. & WANG, S. 2004. West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation. *Structure*, 12, 1157-63.
- DOMINGO, C., ESCADAFAL, C., RUMER, L., MENDEZ, J. A., GARCIA, P., SALL, A. A., TEICHMANN, A., DONOSO-MANTKE, O. & NIEDRIG, M. 2012a. First international external quality assessment study on molecular and serological methods for yellow fever diagnosis. *PLoS One*, 7, e36291.
- DOMINGO, C., PATEL, P., YILLAH, J., WEIDMANN, M., MENDEZ, J. A., NAKOUNE, E. R. & NIEDRIG, M. 2012b. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol*, 50, 4054-60.
- DOS SANTOS, C. N., POST, P. R., CARVALHO, R., FERREIRA, I. I., RICE, C. M. & GALLER, R. 1995. Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. *Virus Res*, 35, 35-41.
- DOWD, K. A. & PIERSON, T. C. 2011. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. *Virology*, 411, 306-15.
- DUPUY, A., DESPRES, P., CAHOUR, A., GIRARD, M. & BOULOY, M. 1989. Nucleotide sequence comparison of the genome of two 17D-204 yellow fever vaccines. *Nucleic Acids Res*, 17, 3989.
- DUSSART, P., LABEAU, B., LAGATHU, G., LOUIS, P., NUNES, M. R., RODRIGUES, S. G., STORCK-HERRMANN, C., CESAIRE, R., MORVAN, J., FLAMAND, M. & BARIL, L. 2006. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol*, 13, 1185-9.
- DUSSART, P., PETIT, L., LABEAU, B., BREMAND, L., LEDUC, A., MOUA, D., MATHEUS, S. & BARIL, L. 2008. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS Negl Trop Dis*, 2, e280.
- ELLIS, B. R. & BARRETT, A. D. 2008. The enigma of yellow fever in East Africa. *Rev Med Virol*, 18, 331-46.
- FALCONAR, A. K. & YOUNG, P. R. 1991. Production of dimer-specific and dengue virus group cross-reactive mouse monoclonal antibodies to the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol*, 72 (Pt 4), 961-5.
- FERGUSON, M. & HEATH, A. 2004. Collaborative study to assess the suitability of a candidate International Standard for yellow fever vaccine. *Biologicals*, 32, 195-205.
- FERGUSON, M., SHIN, J., KNEZEVIC, I., MINOR, P. & BARRETT, A. 2010. WHO Working Group on Technical Specifications for Manufacture and Evaluation of Yellow Fever Vaccines, Geneva, Switzerland, 13-14 May 2009. *Vaccine*, 28, 8236-45.
- FLAMAND, M., MEGRET, F., MATHIEU, M., LEPAULT, J., REY, F. A. & 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.
- FONTENILLE, D., DIALLO, M., MONDO, M., NDIAYE, M. & THONNON, J. 1997. First evidence of natural vertical transmission of yellow fever virus in *Aedes aegypti*, its epidemic vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 91, 533-5.
- FRIERSON, J. G. 2010. The yellow fever vaccine: a history. *Yale J Biol Med*, 83, 77-85.

- GALLER, R., FREIRE, M. S., JABOR, A. V. & MANN, G. F. 1997. The yellow fever 17D vaccine virus: molecular basis of viral attenuation and its use as an expression vector. *Braz J Med Biol Res*, 30, 157-68.
- GALLER, R., POST, P. R., SANTOS, C. N. & FERREIRA, II 1998. Genetic variability among yellow fever virus 17D substrains. *Vaccine*, 16, 1024-8.
- GAUNT, M. W. & GOULD, E. A. 2005. Rapid subgroup identification of the flaviviruses using degenerate primer E-gene RT-PCR and site specific restriction enzyme analysis. *J Virol Methods*, 128, 113-27.
- GEBHARD, L. G., KAUFMAN, S. B. & GAMARNIK, A. V. 2012. Novel ATP-independent RNA annealing activity of the dengue virus NS3 helicase. *PLoS One*, 7, e36244.
- GEISS, B. J., THOMPSON, A. A., ANDREWS, A. J., SONS, R. L., GARI, H. H., KEENAN, S. M. & PEERSEN, O. B. 2009. Analysis of flavivirus NS5 methyltransferase cap binding. *J Mol Biol*, 385, 1643-54.
- GELDERBLUM, H. R., KOCKS, C., L'AGE-STEHR, J. & REUPKE, H. 1985. Comparative immunoelectron microscopy with monoclonal antibodies on yellow fever virus-infected cells: pre-embedding labelling versus immunocyoultramicrotomy. *J Virol Methods*, 10, 225-39.
- GERMI, R., CRANCE, J. M., GARIN, D., GUIMET, J., LORTAT-JACOB, H., RUIGROK, R. W., ZARSKI, J. P. & DROUET, E. 2002. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*, 292, 162-8.
- GIEPMANS, B. N., ADAMS, S. R., ELLISMAN, M. H. & TSIEN, R. Y. 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science*, 312, 217-24.
- GOULD, E. A., DE LAMBALLERIE, X., ZANOTTO, P. M. & HOLMES, E. C. 2003. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus Flavivirus. *Adv Virus Res*, 59, 277-314.
- GOULD, E. A., GALLIAN, P., DE LAMBALLERIE, X. & CHARREL, R. N. 2010. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect*, 16, 1702-4.
- GOULD, E. A. & HIGGS, S. 2009. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103, 109-21.
- GOULD, E. A. & SOLOMON, T. 2008. Pathogenic flaviviruses. *Lancet*, 371, 500-9.
- GRIFFIN, B. A., ADAMS, S. R. & TSIEN, R. Y. 1998. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*, 281, 269-72.
- GRITSUN, T. S. & GOULD, E. A. 2006. Direct repeats in the 3' untranslated regions of mosquito-borne flaviviruses: possible implications for virus transmission. *J Gen Virol*, 87, 3297-305.
- GUY, B., GUIRAKHOO, F., BARBAN, V., HIGGS, S., MONATH, T. P. & LANG, J. 2010a. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine*, 28, 632-49.
- GUY, B., SAVILLE, M. & LANG, J. 2010b. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Hum Vaccin*, 6, 696-705.
- HAHN, C. S., DALRYMPLE, J. M., STRAUSS, J. H. & RICE, C. M. 1987. Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 2019-23.
- HIGUCHI, R., KRUMMEL, B. & SAIKI, R. K. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res*, 16, 7351-67.

- HOFFMANN, C. & LOHSE, M. J. 2006. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen in lebenden Zellen: FIAsh-Methode. *BIOspektrum*, 12, 495-7.
- HOUGHTON-TRIVINO, N., MONTANA, D. & CASTELLANOS, J. 2008. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Rev Salud Publica (Bogota)*, 10, 299-307.
- ISHAK, R., TOVEY, D. G. & HOWARD, C. R. 1988. Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures. *J Gen Virol*, 69 (Pt 2), 325-35.
- JACKSON, R. E. & PHILLPOTTS, R. J. 1997. Production of virus-specific antisera using synthetic peptides corresponding to sequences in the yellow fever E protein: brief report. *Viral Immunol*, 10, 11-4.
- JONES, C. T., MA, L., BURGNER, J. W., GROESCH, T. D., POST, C. B. & KUHN, R. J. 2003. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *J Virol*, 77, 7143-9.
- KANAI, R., KAR, K., ANTHONY, K., GOULD, L. H., LEDIZET, M., FIKRIG, E., MARASCO, W. A., KOSKI, R. A. & MODIS, Y. 2006. Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. *J Virol*, 80, 11000-8.
- KATOH, K., MISAWA, K., KUMA, K. & MIYATA, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*, 30, 3059-66.
- KATOH, K. & TOH, H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform*, 9, 286-98.
- KELLER, T. H., CHEN, Y. L., KNOX, J. E., LIM, S. P., MA, N. L., PATEL, S. J., SAMPATH, A., WANG, Q. Y., YIN, Z. & VASUDEVAN, S. G. 2006. Finding new medicines for flaviviral targets. *Novartis Found Symp*, 277, 102-14; discussion 114-9, 251-3.
- KHAIBOULLINA, S. F., RIZVANOV, A. A., HOLBROOK, M. R. & ST JEOR, S. 2005. Yellow fever virus strains Asibi and 17D-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression. *Virology*, 342, 167-76.
- KIELIAN, M. 2006. Class II virus membrane fusion proteins. *Virology*, 344, 38-47.
- KNIFE, D. M. & HOWLEY, P. M. 2007. *Fields Virology, 5th Edition*, Lippincott Williams & Wilkins.
- KONDO, M. Y., OLIVEIRA, L. C., OKAMOTO, D. N., DE ARAUJO, M. R., DUARTE DOS SANTOS, C. N., JULIANO, M. A., JULIANO, L. & GOUVEA, I. E. 2011. Yellow fever virus NS2B/NS3 protease: hydrolytic properties and substrate specificity. *Biochem Biophys Res Commun*, 407, 640-4.
- KUMARASAMY, V., WAHAB, A. H., CHUA, S. K., HASSAN, Z., CHEM, Y. K., MOHAMAD, M. & CHUA, K. B. 2007. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol Methods*, 140, 75-9.
- KUNO, G. 2003. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Adv Virus Res*, 61, 3-65.
- KUNO, G., CHANG, G. J., TSUCHIYA, K. R., KARABATSOS, N. & CROPP, C. B. 1998. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol*, 72, 73-83.
- KWALLAH, A. O., INOUE, S., MUIGAI, A. W., KUBO, T., SANG, R., MORITA, K. & MWAU, M. 2013. A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. *J Virol Methods*, 193, 23-7.

- KYHSE-ANDERSEN, J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10, 203-9.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LEFEUVRE, A., CONTAMIN, H., DECELLE, T., FOURNIER, C., LANG, J., DEUBEL, V. & MARIANNEAU, P. 2006. Host-cell interaction of attenuated and wild-type strains of yellow fever virus can be differentiated at early stages of hepatocyte infection. *Microbes Infect*, 8, 1530-8.
- LEPINIEC, L., DALGARNO, L., HUONG, V. T., MONATH, T. P., DIGOUTTE, J. P. & DEUBEL, V. 1994. Geographic distribution and evolution of yellow fever viruses based on direct sequencing of genomic cDNA fragments. *J Gen Virol*, 75 (Pt 2), 417-23.
- LESCAR, J. & CANARD, B. 2009. RNA-dependent RNA polymerases from flaviviruses and Picornaviridae. *Curr Opin Struct Biol*, 19, 759-67.
- LI, L., LOK, S. M., YU, I. M., ZHANG, Y., KUHN, R. J., CHEN, J. & ROSSMANN, M. G. 2008. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*, 319, 1830-4.
- LI, Y., LU, X., LI, J., BERUBE, N., GIEST, K. L., LIU, Q., ANDERSON, D. H. & ZHOU, Y. 2010. Genetically engineered, biarsenically labeled influenza virus allows visualization of viral NS1 protein in living cells. *J Virol*, 84, 7204-13.
- LINDENBACH, B. D. & RICE, C. M. 2003. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*, 59, 23-61.
- LINSCOTT, W. D. & LEVINSON, W. E. 1969. Complement components required for virus neutralization by early immunoglobulin antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 64, 520-7.
- LITZBA, N. 2006. *Untersuchung der Immunantwort nach Gelbfieberimpfung in HIV-Infizierten und die Etablierung zweier Gelbfieber-Nachweissysteme*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- LIU, L., DONG, H., CHEN, H., ZHANG, J., LING, H., LI, Z., SHI, P. Y. & LI, H. 2010. Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition. *Front Biol (Beijing)*, 5, 286-303.
- LUO, D., XU, T., HUNKE, C., GRUBER, G., VASUDEVAN, S. G. & LESCAR, J. 2008. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol*, 82, 173-83.
- MA, L., JONES, C. T., GROESCH, T. D., KUHN, R. J. & POST, C. B. 2004. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 3414-9.
- MACDONALD, J., TONRY, J., HALL, R. A., WILLIAMS, B., PALACIOS, G., ASHOK, M. S., JABADO, O., CLARK, D., TESH, R. B., BRIESE, T. & LIPKIN, W. I. 2005. NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. *J Virol*, 79, 13924-33.
- MACNAMARA, F. N. 1957. A clinico-pathological study of yellow fever in Nigeria. *West Afr Med J*, 6, 137-46.
- MALET, H., EGLOFF, M. P., SELISKO, B., BUTCHER, R. E., WRIGHT, P. J., ROBERTS, M., GRUEZ, A., SULZENBACHER, G., VONRHEIN, C., BRICOGNE, G., MACKENZIE, J. M., KHROMYKH, A. A., DAVIDSON, A. D. & CANARD, B. 2007. Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. *J Biol Chem*, 282, 10678-89.
- MALET, H., MASSE, N., SELISKO, B., ROMETTE, J. L., ALVAREZ, K., GUILLEMOT, J. C., TOLOU, H., YAP, T. L., VASUDEVAN, S., LESCAR, J. &

- CANARD, B. 2008. The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. *Antiviral Res*, 80, 23-35.
- MANSFIELD, K. L., HORTON, D. L., JOHNSON, N., LI, L., BARRETT, A. D., SMITH, D. J., GALBRAITH, S. E., SOLOMON, T. & FOOKS, A. R. 2011. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol*, 92, 2821-9.
- MARIANNEAU, P., MEGRET, F., OLIVIER, R., MORENS, D. M. & DEUBEL, V. 1996. Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *J Gen Virol*, 77 (Pt 10), 2547-54.
- MARIANNEAU, P., STEFFAN, A. M., ROYER, C., DROUET, M. T., KIRN, A. & DEUBEL, V. 1998. Differing infection patterns of dengue and yellow fever viruses in a human hepatoma cell line. *J Infect Dis*, 178, 1270-8.
- MARKOFF, L. 2013. Yellow fever outbreak in Sudan. *N Engl J Med*, 368, 689-91.
- MAROVICH, M., GROUARD-VOGEL, G., LOUDER, M., ELLER, M., SUN, W., WU, S. J., PUTVATANA, R., MURPHY, G., TASSANEETRITHEP, B., BURGESS, T., BIRX, D., HAYES, C., SCHLESINGER-FRANKEL, S. & MASCOLA, J. 2001. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 6, 219-24.
- MEI, L., WU, P., YE, J., GAO, G., SHAO, L., HUANG, S., LI, Y., YANG, X., CHEN, H. & CAO, S. 2012. Development and application of an antigen capture ELISA assay for diagnosis of Japanese encephalitis virus in swine, human and mosquito. *Virol J*, 9, 4.
- MILLER, S., KASTNER, S., KRIJNSE-LOCKER, J., BUHLER, S. & BARTENSCHLAGER, R. 2007. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem*, 282, 8873-82.
- MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D. & HARRISON, S. C. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427, 313-9.
- MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D. & HARRISON, S. C. 2005. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol*, 79, 1223-31.
- MODROW S., F. D., TRUYEN U., SCHÄTZEL H. 2010. *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- MONATH, T. P. 2001. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis*, 1, 11-20.
- MONATH, T. P. 2005. Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines*, 4, 553-74.
- MONATH, T. P. 2008. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res*, 78, 116-24.
- MONATH, T. P. & BARRETT, A. D. 2003. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Adv Virus Res*, 60, 343-95.
- MONATH, T. P., CETRON, M. S., MCCARTHY, K., NICHOLS, R., ARCHAMBAULT, W. T., WELD, L. & BEDFORD, P. 2005. Yellow fever 17D vaccine safety and immunogenicity in the elderly. *Hum Vaccin*, 1, 207-14.
- MORI, Y., OKABAYASHI, T., YAMASHITA, T., ZHAO, Z., WAKITA, T., YASUI, K., HASEBE, F., TADANO, M., KONISHI, E., MORIISHI, K. & MATSUURA, Y. 2005. Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. *J Virol*, 79, 3448-58.
- MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R. J. & ROSSMANN, M. G. 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, 3, 13-22.
- MUNOZ-JORDAN, J. L., SANCHEZ-BURGOS, G. G., LAURENT-ROLLE, M. & GARCIA-SASTRE, A. 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14333-8.
- MURPHY, B. R. & WHITEHEAD, S. S. 2011. Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol*, 29, 587-619.

- MURRAY, J. M., AASKOV, J. G. & WRIGHT, P. J. 1993. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J Gen Virol*, 74 (Pt 2), 175-82.
- MUTEBI, J. P. & BARRETT, A. D. 2002. The epidemiology of yellow fever in Africa. *Microbes Infect*, 4, 1459-68.
- MUTEBI, J. P., RIJNBRAND, R. C., WANG, H., RYMAN, K. D., WANG, E., FULOP, L. D., TITBALL, R. & BARRETT, A. D. 2004. Genetic relationships and evolution of genotypes of yellow fever virus and other members of the yellow fever virus group within the Flavivirus genus based on the 3' noncoding region. *J Virol*, 78, 9652-65.
- MUTEBI, J. P., WANG, H., LI, L., BRYANT, J. E. & BARRETT, A. D. 2001. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol*, 75, 6999-7008.
- NETSAWANG, J., NOISAKRAN, S., PUTTIKHUNT, C., KASINRERK, W., WONGWIWAT, W., MALASIT, P., YENCHITSOMANUS, P. T. & LIMJINDAPORN, T. 2010. Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis. *Virus Res*, 147, 275-83.
- NIEDRIG, M. & BÖTHE, M. 2008. Gelbfieber - Eine zunehmende Gefahr. *Die Medizinische Welt*, 59, 257-60.
- NIEDRIG, M., KURSTEINER, O., HERZOG, C. & SONNENBERG, K. 2008. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against yellow fever virus. *Clin Vaccine Immunol*, 15, 177-81.
- NORRBY, E. 2007. Yellow fever and Max Theiler: the only Nobel Prize for a virus vaccine. *J Exp Med*, 204, 2779-84.
- NOWAK, T., FARBER, P. M., WENGLER, G. & WENGLER, G. 1989. Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology*, 169, 365-76.
- NUNES, M. R., PALACIOS, G., CARDOSO, J. F., MARTINS, L. C., SOUSA, E. C., JR., DE LIMA, C. P., MEDEIROS, D. B., SAVJI, N., DESAI, A., RODRIGUES, S. G., CARVALHO, V. L., LIPKIN, W. I. & VASCONCELOS, P. F. 2012. Genomic and phylogenetic characterization of Brazilian yellow fever virus strains. *J Virol*, 86, 13263-71.
- NUNES, M. R., PALACIOS, G., NUNES, K. N., CASSEB, S. M., MARTINS, L. C., QUARESMA, J. A., SAVJI, N., LIPKIN, W. I. & VASCONCELOS, P. F. 2011. Evaluation of two molecular methods for the detection of Yellow fever virus genome. *J Virol Methods*, 174, 29-34.
- NYBAKKEN, G. E., NELSON, C. A., CHEN, B. R., DIAMOND, M. S. & FREMONT, D. H. 2006. Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein. *J Virol*, 80, 11467-74.
- ONYANGO, C. O., OFULA, V. O., SANG, R. C., KONONGOI, S. L., SOW, A., DE COCK, K. M., TUKEI, P. M., OKOTH, F. A., SWANEPOEL, R., BURT, F. J., WATERS, N. C. & COLDREN, R. L. 2004. Yellow fever outbreak, Imatong, southern Sudan. *Emerg Infect Dis*, 10, 1063-8.
- OUDART, J. L. & REY, M. 1970. [Proteinuria, proteinaemia, and serum transaminase activity in 23 confirmed cases of yellow fever]. *Bull World Health Organ*, 42, 95-102.
- PACCA, C. C., SEVERINO, A. A., MONDINI, A., RAHAL, P., D'AVILA S, G., CORDEIRO, J. A., NOGUEIRA, M. C., BRONZONI, R. V. & NOGUEIRA, M. L. 2009. RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and in vivo. *Virus Genes*, 38, 224-31.

- PALMER, D. R., FERNANDEZ, S., BISBING, J., PEACHMAN, K. K., RAO, M., BARVIR, D., GUNTHER, V., BURGESS, T., KOHNO, Y., PADMANABHAN, R. & SUN, W. 2007. Restricted replication and lysosomal trafficking of yellow fever 17D vaccine virus in human dendritic cells. *J Gen Virol*, 88, 148-56.
- PATEL, P., LANDT, O., KAISER, M., FAYE, O., KOPPE, T., LASS, U., SALL, A. A. & NIEDRIG, M. 2013. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Viol J*, 10, 58.
- PATKAR, C. G., JONES, C. T., CHANG, Y. H., WARRIER, R. & KUHN, R. J. 2007. Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein. *J Virol*, 81, 6471-81.
- PATKAR, C. G. & KUHN, R. J. 2008. Yellow Fever virus NS3 plays an essential role in virus assembly independent of its known enzymatic functions. *J Virol*, 82, 3342-52.
- PEREIRA, C. F., ELLENBERG, P. C., JONES, K. L., FERNANDEZ, T. L., SMYTH, R. P., HAWKES, D. J., HIJNEN, M., VIVET-BOUDOU, V., MARQUET, R., JOHNSON, I. & MAK, J. 2011. Labeling of multiple HIV-1 proteins with the biarsenical-tetracysteine system. *PLoS One*, 6, e17016.
- PERERA, R. & KUHN, R. J. 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*, 11, 369-77.
- PFISTER, M., KURSTEINER, O., HILFIKER, H., FAVRE, D., DURRER, P., ENNAJI, A., L'AGE-STEHR, J., KAUFHOLD, A. & HERZOG, C. 2005. Immunogenicity and safety of BERNA-YF compared with two other 17D yellow fever vaccines in a phase 3 clinical trial. *Am J Trop Med Hyg*, 72, 339-46.
- PIERRE, V., DROUET, M. T. & DEUBEL, V. 1994. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. *Res Virol*, 145, 93-104.
- PIERSON, T. C. & DIAMOND, M. S. 2008. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev Mol Med*, 10, e12.
- PISANO, M. R., NICOLI, J. & TOLOU, H. 1997. Homogeneity of yellow fever virus strains isolated during an epidemic and a post-epidemic period in West Africa. *Virus Genes*, 14, 225-34.
- POLETTI, P., MESSERI, G., AJELLI, M., VALLORANI, R., RIZZO, C. & MERLER, S. 2011. Transmission potential of chikungunya virus and control measures: the case of Italy. *PLoS One*, 6, e18860.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*, 25, 1253-6.
- POST, P. R., CARVALHO, R. & GALLER, R. 1991. Glycosylation and secretion of yellow fever virus nonstructural protein NS1. *Virus Res*, 18, 291-302.
- PROUTSKI, V., GAUNT, M. W., GOULD, E. A. & HOLMES, E. C. 1997a. Secondary structure of the 3'-untranslated region of yellow fever virus: implications for virulence, attenuation and vaccine development. *J Gen Virol*, 78 (Pt 7), 1543-9.
- PROUTSKI, V., GOULD, E. A. & HOLMES, E. C. 1997b. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. *Nucleic Acids Res*, 25, 1194-202.
- PRYOR, M. J., RAWLINSON, S. M., BUTCHER, R. E., BARTON, C. L., WATERHOUSE, T. A., VASUDEVAN, S. G., BARDIN, P. G., WRIGHT, P. J., JANS, D. A. & DAVIDSON, A. D. 2007. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. *Traffic*, 8, 795-807.

- PULENDRAN, B., MILLER, J., QUEREC, T. D., AKONDY, R., MOSELEY, N., LAUR, O., GLIDEWELL, J., MONSON, N., ZHU, T., ZHU, H., STAPRANS, S., LEE, D., BRINTON, M. A., PERELYGIN, A. A., VELLOZZI, C., BRACHMAN, P., JR., LALOR, S., TEUWEN, D., EIDEX, R. B., CETRON, M., PRIDDY, F., DEL RIO, C., ALTMAN, J. & AHMED, R. 2008. Case of yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease with prolonged viremia, robust adaptive immune responses, and polymorphisms in CCR5 and RANTES genes. *J Infect Dis*, 198, 500-7.
- REED, L. J. & MUENCH, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.
- REITER, P., CORDELLIER, R., OUMA, J. O., CROPP, C. B., SAVAGE, H. M., SANDERS, E. J., MARFIN, A. A., TUKEI, P. M., AGATA, N. N., GITAU, L. G., RAPUODA, B. A. & GUBLER, D. J. 1998. First recorded outbreak of yellow fever in Kenya, 1992-1993. II. Entomologic investigations. *Am J Trop Med Hyg*, 59, 650-6.
- RICE, C. M., LENCHES, E. M., EDDY, S. R., SHIN, S. J., SHEETS, R. L. & STRAUSS, J. H. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*, 229, 726-33.
- ROBERTSON, S. E., HULL, B. P., TOMORI, O., BELE, O., LEDUC, J. W. & ESTEVES, K. 1996. Yellow fever: a decade of reemergence. *JAMA*, 276, 1157-62.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-4.
- RUDNER, L., NYDEGGER, S., COREN, L. V., NAGASHIMA, K., THALI, M. & OTT, D. E. 2005. Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol*, 79, 4055-65.
- SALL, A. A., FAYE, O., DIALLO, M., FIRTH, C., KITCHEN, A. & HOLMES, E. C. 2010. Yellow fever virus exhibits slower evolutionary dynamics than dengue virus. *J Virol*, 84, 765-72.
- SANDERS, E. J., MARFIN, A. A., TUKEI, P. M., KURIA, G., ADEMBA, G., AGATA, N. N., OUMA, J. O., CROPP, C. B., KARABATSOS, N., REITER, P., MOORE, P. S. & GUBLER, D. J. 1998. First recorded outbreak of yellow fever in Kenya, 1992-1993. I. Epidemiologic investigations. *Am J Trop Med Hyg*, 59, 644-9.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SANGIAMBUT, S., KEELAPANG, P., AASKOV, J., PUTTIKHUNT, C., KASINRERK, W., MALASIT, P. & SITTISOMBUT, N. 2008. Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. *J Gen Virol*, 89, 1254-64.
- SCHLESINGER, J. J., BRANDRISS, M. W., PUTNAK, J. R. & WALSH, E. E. 1990. Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. *J Gen Virol*, 71 (Pt 3), 593-9.
- SCHÜTT, C. & BRÖKER, B. 2009. *Grundwissen Immunologie*, 2. Aufl., Spektrum Wissenschaftlicher Verlag.
- SELLARDS, A. W. & HINDLE, E. 1928. The Preservation of Yellow Fever Virus. *Br Med J*, 1, 713-4.
- SMIT, J. M., MOESKER, B., RODENHUIS-ZYBERT, I. & WILSCHUT, J. 2011. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*, 3, 160-71.
- SMITH, G. W. & WRIGHT, P. J. 1985. Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected vero and *Aedes albopictus* cells. *J Gen Virol*, 66 (Pt 3), 559-71.

- SOPER, F. L. 1937. The Newer Epidemiology of Yellow Fever. *Am J Public Health Nations Health*, 27, 1-14.
- SOUSA, C. A., CLAIROUIN, M., SEIXAS, G., VIVEIROS, B., NOVO, M. T., SILVA, A. C., ESCOVAL, M. T. & ECONOMOPOULOU, A. 2012. Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: preliminary report. *Euro Surveill*, 17.
- STAPLES, J. E. & MONATH, T. P. 2008. Yellow fever: 100 years of discovery. *JAMA*, 300, 960-2.
- STEIN, D. A. & SHI, P. Y. 2008. Nucleic acid-based inhibition of flavivirus infections. *Front Biosci*, 13, 1385-95.
- STIASNY, K., FRITZ, R., PANGERL, K. & HEINZ, F. X. 2011. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids*, 41, 1159-63.
- STOCK, N. K., BOSCHETTI, N., HERZOG, C., APPELHANS, M. S. & NIEDRIG, M. 2012. The phylogeny of yellow fever virus 17D vaccines. *Vaccine*, 30, 989-94.
- STOKES, A., BAUER, J. H. & HUDSON, N. P. 2001. The transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*. 1928. *Rev Med Virol*, 11, 141-8.
- TASSANEETRITHEP, B., BURGESS, T. H., GRANELLI-PIPERNO, A., TRUMPFHELLER, C., FINKE, J., SUN, W., ELLER, M. A., PATTANAPANYASAT, K., SARASOMBATH, S., BIRX, D. L., STEINMAN, R. M., SCHLESINGER, S. & MAROVICH, M. A. 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*, 197, 823-9.
- TATEM, A. J., HAY, S. I. & ROGERS, D. J. 2006. Global traffic and disease vector dispersal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6242-7.
- THEILER, M. & SMITH, H. H. 1937a. The Effect of Prolonged Cultivation in Vitro Upon the Pathogenicity of Yellow Fever Virus. *J Exp Med*, 65, 767-86.
- THEILER, M. & SMITH, H. H. 1937b. The Use of Yellow Fever Virus Modified by in Vitro Cultivation for Human Immunization. *J Exp Med*, 65, 787-800.
- THEPPARIT, C., PHOOLCHAROEN, W., SUKSANPAISAN, L. & SMITH, D. R. 2004. Internalization and propagation of the dengue virus in human hepatoma (HepG2) cells. *Intervirology*, 47, 78-86.
- THOMAS, R. E., LORENZETTI, D. L., SPRAGINS, W., JACKSON, D. & WILLIAMSON, T. 2011. Active and passive surveillance of yellow fever vaccine 17D or 17DD-associated serious adverse events: systematic review. *Vaccine*, 29, 4544-55.
- TOLLE, M. A. 2009. Mosquito-borne diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 39, 97-140.
- TOMASELLO, D. & SCHLAGENHAUF, P. 2013. Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012. *Travel Med Infect Dis*.
- TOMASO, H., THULLIER, P., SEIBOLD, E., GUGLIELMO, V., BUCKENDAHL, A., RAHALISON, L., NEUBAUER, H., SCHOLZ, H. C. & SPLETTSTOESSER, W. D. 2007. Comparison of hand-held test kits, immunofluorescence microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay, and flow cytometric analysis for rapid presumptive identification of *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol*, 45, 3404-7.
- TSIEN, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67, 509-44.
- UCHIL, P. D., KUMAR, A. V. & SATCHIDANANDAM, V. 2006. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. *J Virol*, 80, 5451-64.
- VON LINDERN, J. J., ARONER, S., BARRETT, N. D., WICKER, J. A., DAVIS, C. T. & BARRETT, A. D. 2006. Genome analysis and phylogenetic relationships between east, central and west African isolates of Yellow fever virus. *J Gen Virol*, 87, 895-907.

- WANG, E., RYMAN, K. D., JENNINGS, A. D., WOOD, D. J., TAFFS, F., MINOR, P. D., SANDERS, P. G. & BARRETT, A. D. 1995. Comparison of the genomes of the wild-type French viscerotropic strain of yellow fever virus with its vaccine derivative French neurotropic vaccine. *J Gen Virol*, 76 (Pt 11), 2749-55.
- WANG, E., WEAVER, S. C., SHOPE, R. E., TESH, R. B., WATTS, D. M. & BARRETT, A. D. 1996. Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3' noncoding region of strains from Africa. *Virology*, 225, 274-81.
- WEIDMANN, M., FAYE, O., KRANASTER, R., MARX, A., NUNES, M. R., VASCONCELOS, P. F., HUFERT, F. T. & SALL, A. A. 2010. Improved LNA probe-based assay for the detection of African and South American yellow fever virus strains. *J Clin Virol*, 48, 187-92.
- WHITTEMBURY, A., RAMIREZ, G., HERNANDEZ, H., ROPERO, A. M., WATERMAN, S., TICONA, M., BRINTON, M., UCHUYA, J., GERSHMAN, M., TOLEDO, W., STAPLES, E., CAMPOS, C., MARTINEZ, M., CHANG, G. J., CABEZAS, C., LANCIOTTI, R., ZAKI, S., MONTGOMERY, J. M., MONATH, T. & HAYES, E. 2009. Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine*, 27, 5974-81.
- WHO 2007. The Yellow Fever Initiative. www.who.int/topics/yellow_fever/en/.
- WHO/BS/10.2131 (ECSB 2008). Expert Committee on Biological Standardization: Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Live Attenuated Yellow Fever Vaccines; Proposed replacement of: TRS 872, Annex 2 and Amendment to TRS 872, Annex 2, TRS http://www.who.int/biologicals/BS2131_YF_Recommendations_CLEAN_15_July_2010.
- WILSON, J. R., DE SESSIONS, P. F., LEON, M. A. & SCHOLLE, F. 2008. West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J Virol*, 82, 8262-71.
- WORLD HEALTH ORGANISATION, W. 2007. The Yellow Fever Initiative.
- WU, J., BERA, A. K., KUHN, R. J. & SMITH, J. L. 2005. Structure of the Flavivirus helicase: implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing. *J Virol*, 79, 10268-77.
- XIE, X., GAYEN, S., KANG, C., YUAN, Z. & SHI, P. Y. 2013. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *J Virol*, 87, 4609-22.
- YAMSHCHIKOV, V. F. & COMPANS, R. W. 1993. Regulation of the late events in flavivirus protein processing and maturation. *Virology*, 192, 38-51.
- YANG, M. R., LEE, S. R., OH, W., LEE, E. W., YEH, J. Y., NAH, J. J., JOO, Y. S., SHIN, J., LEE, H. W., PYO, S. & SONG, J. 2008. West Nile virus capsid protein induces p53-mediated apoptosis via the sequestration of HDM2 to the nucleolus. *Cell Microbiol*, 10, 165-76.
- YE, J., ZHU, B., FU, Z. F., CHEN, H. & CAO, S. 2013. Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine*, 31, 461-71.
- YIN, Z., PATEL, S. J., WANG, W. L., CHAN, W. L., RANGA RAO, K. R., WANG, G., NGEW, X., PATEL, V., BEER, D., KNOX, J. E., MA, N. L., EHRHARDT, C., LIM, S. P., VASUDEVAN, S. G. & KELLER, T. H. 2006a. Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 16, 40-3.
- YIN, Z., PATEL, S. J., WANG, W. L., WANG, G., CHAN, W. L., RAO, K. R., ALAM, J., JEYARAJ, D. A., NGEW, X., PATEL, V., BEER, D., LIM, S. P., VASUDEVAN, S. G. & KELLER, T. H. 2006b. Peptide inhibitors of Dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead. *Bioorg Med Chem Lett*, 16, 36-9.

LITERATURVERZEICHNIS

- YOUNG, P. R., HILDITCH, P. A., BLETCHLY, C. & HALLORAN, W. 2000. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*, 38, 1053-7.
- ZANOTTO, P. M., GOULD, E. A., GAO, G. F., HARVEY, P. H. & HOLMES, E. C. 1996. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 548-53.