

Aus dem Institut/der Klinik Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Entwicklung neuer antiviraler Strategien
gegen die Chikungunya-Virus-Infektion:
Identifizierung antiviraler Substanzen
und neuer Zielstrukturen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Eva Berberich
Tierärztin aus Wilhelmshaven

Berlin 2020
Journal-Nr.: 4045

Aus dem Institut/der Klinik Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Entwicklung neuer antiviraler Strategien gegen die
Chikungunya-Virus-Infektion:
Identifizierung antiviraler Substanzen und neuer Zielstrukturen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Eva Berberich
Tierärztin aus Wilhelmshaven

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4045

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Klaus Osterrieder
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Alex Greenwood
Dritter Gutachter: PD Dr. Michael Veit

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Chikungunya virus disease, mosquito-borne diseases, man gene expression,
glycosaminoglycans, antiviral agents

Tag der Promotion: 21.08.2020

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-097-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2020

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2021

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Nach Regen kommt Sonnenschein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1. Einleitung	9
1.1 Das Chikungunya-Fieber (Infektion mit dem Chikungunya Virus)	9
1.1.1 Klinisches Erscheinungsbild der Erkrankung	9
1.1.2 Wirtszelltropismus und Pathogenese	11
1.1.3 Globale Verteilung	14
1.2 Das Chikungunya Virus	17
1.2.1 Das Virusgenom	19
1.2.2 Replikationszyklus	20
1.2.3 Struktur und Morphologie der Virionen	22
1.2.4 Virus-Eintritt in die Wirtszelle	25
1.3 Glykosaminoglykane	27
1.4 Aktuelle antivirale CHIKV Forschung	29
2. Ziel der Arbeit	35
3. Material und Methoden	37
3.1 Material	37
3.1.1 Viren, Mikroorganismen und Zelllinien	37
3.1.2 Medien	39
3.1.3 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien	40
3.1.4 Restriktionsenzyme	42
3.1.5 Kits	42
3.1.6 Antikörper	42
3.1.7 Plasmide	43
3.1.8 Oligonukleotide	46
3.1.9 Puffer, Lösungen und Färbungen	48
3.1.10 Laborausrüstung	50
3.1.11 Verbrauchsmaterial	52
3.1.12 Software	54
3.1.13 Internet tools	54
3.2 Methoden	55
3.2.1 Mikrobiologische Methoden	55
3.2.2 Zellkultur	57
3.2.3 Molekularbiologische Methoden	63
3.2.4 Proteinbiochemische Methoden	66

3.2.5	Statistische Analyse	69
4.	Ergebnisse	70
4.1	Untersuchung der Bindungsaktivitäten der CHIKV E2 Domänen mit Fusionsproteinen, generiert und sekretiert von eukaryotischen Zellen	70
4.1.1	Herstellung von CHIKV-Fc-Fusionsproteinen	70
4.1.2	Untersuchung der Zellbindung von Fc-CHIKV Fusionsproteinen	77
4.1.3	GAG-abhängige Bindung der Fc-CHIKV Fusionsproteine	84
4.1.4	Etablierung stabiler Zelllinien, die Fc-CHIKV Fusionsproteine exprimieren.....	88
4.2	Detaillierte Analyse der Bindungsaktivität von E2 Domäne A	92
4.2.1	Herstellung von Mutanten der Domäne A.....	92
4.2.2	Untersuchung der Zellbindung von CHIKV E2-Domäne A Mutanten	96
4.2.3	GAG-abhängige Bindung der Domäne A-Mutanten.....	101
4.3	Detaillierte Analyse der Funktion des β -ribbon-connectors	105
4.3.1	Herstellung von Varianten des β -ribbon-connectors als Fc-Fusionsproteine .	105
4.3.2	Untersuchung der Zellbindung mit den Varianten des β -ribbon-connectors (β -Varianten).....	110
4.3.3	GAG-abhängige Zellbindung der β -Varianten.....	115
4.4	Untersuchung auf hemmende Wirkung der Fusionsproteine auf den CHIKV-Zelleintritt via Luciferase-Assay	119
5.	Diskussion.....	124
5.1	Charakterisierung des CHIKV-Zelleintritt	124
5.1.1	Untersuchung der einzelnen CHIKV E2 Domänen	125
5.1.2	Genauere Betrachtung der Zellbindung von Domäne A	128
5.1.3	Genauere Betrachtung des β -ribbon-connectors	129
5.1.4	Etablierung stabiler Zelllinien.....	131
5.1.5	Untersuchung auf hemmende Wirkung der Fusionsproteine auf den Zelleintritt	131
6.	Zusammenfassung.....	133
7.	Summary.....	135
8.	Literaturverzeichnis	137
9.	Anhang.....	147
9.1	Expression und Sekretion der A-Varianten mit der Mutation E79G.....	147
9.2	Coomassie-Gele.....	148
9.2.1	Herstellung der einzelnen E2-Domänen als Fusionsprotein (4.1.1)	148

9.2.2	Herstellung von A-Mutanten als Fusionsprotein (4.2.1)	150
9.2.3	Herstellung von β -Varianten als Fusionsprotein	152
9.3	Natives Gel.....	154
9.4	Aminosäuresequenzen der genutzten E2 Domänen bzw. Varianten als Fusionsprotein (+Fc)	155
9.5	Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren	159
9.6	Abkürzungsverzeichnis.....	160
9.7	Abbildungsverzeichnis.....	161
10.	Publikationen	163
11.	Danksagung	164
12.	Selbständigkeitserklärung.....	166

1. Einleitung

1.1 Das Chikungunya-Fieber (Infektion mit dem Chikungunya Virus)

Das Chikungunya Virus (CHIKV) zählt zu den Arboviren (*arthropod-borne*) und wird von Moskitos der Gattung *Aedes* übertragen. Ein enzootischer sylvatischer Zyklus ist in Afrika nachgewiesen worden, wobei hier das Virus zwischen nicht-menschlichen Primaten und verschiedenen waldbewohnenden Moskitoarten (*Aedes*-Arten) zirkuliert. Für die Infektionen des Menschen sind die anthropophilen Moskitos *Aedes aegypti* (Gelbfiebermücke) und *Aedes albopictus* (Tigermücke) verantwortlich (Coffey et al. 2014).

Heutzutage ist Chikungunya vor allem in Indien, im Indischen Ozean, Südostasien und im subsaharischen Afrika endemisch und löst immer wieder weltweit große Epidemien aus, wie zuletzt in der Karibik (2013) und Latein Amerika mit 351,000 vermuteten Fällen im Jahr 2016 (www.paho.org, Lourenço-de-Oliveira und Failloux 2017).

1.1.1 Klinisches Erscheinungsbild der Erkrankung

Eine Infektion mit dem CHIKV äußert sich mit einem plötzlichen Einsetzen von unspezifischen klinischen Symptomen, die dem Erscheinungsbild einer Grippe ähneln. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen klagen infizierte Personen über starke Kopfschmerzen, hohes Fieber, Übelkeit, Erytheme, Petechien, sowie Muskel- und Gelenkschmerzen. In den meisten Fällen ist eine CHIKV-Infektion selbstlimitierend und die akute Phase, mit den zuvor beschriebenen Symptomen, ist innerhalb kurzer Zeit (Tage bis Wochen) überwunden (Schwartz und Albert 2010). Andere Verläufe zeigen eine Persistenz des Virus, sowie eine persistierend-rezidivierende Arthritis (12-49%) mit oder ohne anhaltender Myalgie, die über Monate und Jahre andauern kann (Dupuis-Maguiraga et al. 2012). Bei der Arthritis sind verschiedene Gelenke betroffen, die Manifestation im unteren Rücken und der daraus resultierende gebeugte Gang der Betroffenen führte zur Namensgebung. Chikungunya bedeutet „der gebeugt Gehende“ und stammt aus der Sprache der Makonde, ein Stamm in Südosttansania (Burt et al. 2017). Weitere Komplikationen konnten in sehr jungen (<1 Jahr) oder älteren (>65 Jahren), sowie durch weitere Infektionen immunsupprimierte Patienten beobachtet werden. So ist von klinischen Fällen mit Enzephalitis, Enzephalopathien, Myokarditis und Kreislaufversagen berichtet worden (Alvarez et al. 2017; Inglis et al. 2016). Im Allgemeinen ist die Todesrate bei einer Chikungunya-Erkrankung zwar gering (0,1%) (Caglioti et al. 2013) und bei 15% der Infektionen liegt sogar ein asymptomatischer Verlauf vor (Schwartz und Albert 2010), dennoch führen gerade die persistierenden Arthritiden zu einer starken Einschränkung der Betroffenen und zu ökonomischen Kosten während großer Epidemien. Außerdem konnte bereits die vertikale Übertragung (Mutter-Kind) nachgewiesen und das CHIKV in der Brustmilch einer stillenden Mutter detektiert werden (Cardona-Correa

et al. 2017; Campos et al. 2017). Das erhöht die Gefahr der Neuinfektionen sehr junger Individuen mit schweren Krankheitsverläufen und starken Komplikationen. Dies ist von großer Bedeutung gerade im Hinblick auf die immer größer werdende Prävalenz des Virus auf der ganzen Welt. Zusätzlich ist CHIKV in Gebieten endemisch und epidemisch, in denen auch andere Viren zirkulieren, die denselben Vektor (Aedes-Arten) zur Übertragung nutzen. Dies kann zu Co-Infektionen und Komplikationen führen. Eine Infektion mit mehreren Viren kann eine synergistische, negative Wirkung der Viren auf den Wirt zur Folge haben. Es können Erkrankungen mit schweren Verläufen auftreten und Fehlbehandlungen, durch den Nachweis nur eines Virus, durchgeführt werden (Yamamoto, David W. (CDC/OID/NCEZID) (CTR)). Co-Infektionen mit Dengue (DENV) oder dem Zika-Virus sind bereits nachgewiesen worden (Göertz et al. 2017; Furuya-Kanamori et al. 2016). Bislang sind noch keine spezifischen Medikamente gegen eine Chikungunya-Infektion vorhanden, sodass nur eine symptomatische Behandlung möglich ist (Abb.1).



Abb. 1 Klinische Symptome einer CHIKV-Infektion

Menschen, die sich mit CHIKV infiziert haben, leiden an grippeähnlichen Symptomen, welche mit gängigen Mitteln behandelt werden. Spezifische Medikamente gegen das Chikungunya-Fieber sind bislang noch nicht erhältlich.

(https://www.telegraphindia.com/1111121/jsp/calcutta/story_14779176.jsp)

1.1.2 Wirtszelltropismus und Pathogenese

Die Übertragung des CHIKV erfolgt üblicherweise horizontal über einen Moskitobiss (*Aedes*-Arten). Zwar ist auch eine vertikale Übertragung (maternal-neonatal) möglich, jedoch macht dies nur einen geringen Anteil der Neuinfektionen aus (Gérardin et al. 2008).

Der Übertragungskreislauf zwischen Vektor (Moskito) und Wirt (Primaten, vielleicht auch andere Vertebraten) verhält sich im sylvatischen („Waldzyklus“, Tier-Tier) und urbanen („Stadtzyklus“, Mensch-Mensch) Zyklus gleich. Der Vektor nimmt das Virus über eine Blutmahlzeit an einem infizierten Wirt auf. Das CHIKV besiedelt die Epithelzellen des Mitteldarms des Moskitos und wandert über das Hämocoel zu den Speicheldrüsen. Bei einer erneuten Blutmahlzeit gelangen die Viren über den infizierten Speichel in einen neuen Wirt (Coffey et al. 2014) (Abb. 2).

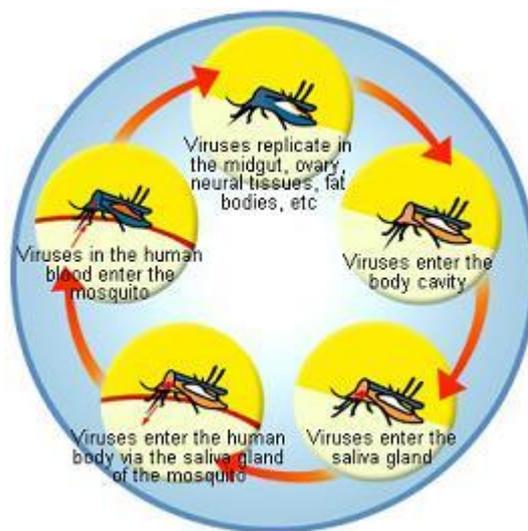
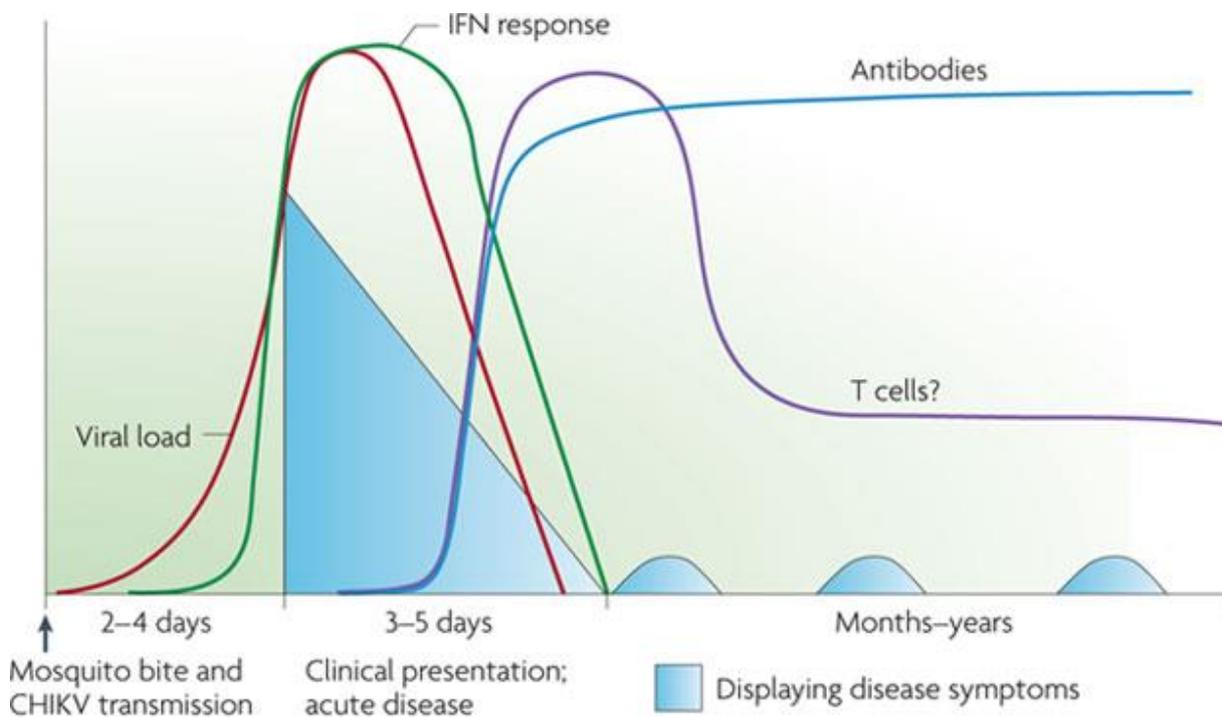


Abb. 2 Virus-Vektor-Zyklus

Eine Blutmahlzeit des Vektors an einem infizierten Wirt führt zu einer Aufnahme des Virus. Das Virus dringt in die Darmzellen des Vektors ein, repliziert und verteilt sich in der Speicheldrüse. Neuinfektionen erfolgen über den infizierten Speichel eines Vektors während einer Blutmahlzeit an einem neuen Wirt. (<http://www.chikungunya.in/>)

Durch den Moskitobiss wird dem Wirt intradermal CHIKV injiziert und eine sofortige Replikation in den subkutanen Blutgefäßen und empfänglichen Zellen der Haut (Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen) schließt sich an. Über die Blutbahn gelangt das Virus zu den Zielorganen Leber, Muskel, Gelenke, Lymphorgane und Gehirn (Schwartz und Albert 2010; Caglioti et al. 2013). Nach einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen kommt es zu einem plötzlichen und heftigen Einsetzen der Krankheitssymptome. Dieses Ereignis korreliert mit der Virämie (mit Virustitern von bis zu 10^8 viralen Partikeln pro ml Blut) und einem simultanen Anstieg der Typ-I-Interferonkonzentration. Die Interferonantwort gehört zum angeborenen Immunsystem, die erste Antwort, die auf ein eindringendes Pathogen erfolgt. Die Kombination aus angeborener und adaptiver Immunantwort (vor allem durch

Stimulation der CD4+ T-Lymphozyten und Zytokine) scheint das CHIKV gut bekämpfen zu können, denn in den meisten Fällen ist eine Chikungunya-Infektion selbstlimitierend und eine Virusdetektion nach ca. 7-10 Tagen nicht mehr möglich (Caglioti et al. 2013). Andererseits konnten auch RAG-defiziente Mäuse (Mangel an Lymphozyten) eine CHIKV-Infektion effektiv bekämpfen und den Organismus vom Virus befreien. Dies lässt darauf schließen, dass die adaptive Immunantwort keine entscheidende Rolle in der Bekämpfung des Virus spielt, auch wenn Mäuse keinen natürlichen Wirt des CHIKV darstellen (Schwartz und Albert 2010) (Abb. 3).



Nature Reviews | Microbiology

Abb. 3 Immunantwort während einer Chikungunya-Infektion

Während einer Chikungunya-Infektion kommt es nach einer Inkubationszeit von 2-4 Tagen zu einem plötzlichen Einsetzen der Krankheitssymptome. Zu diesem Zeitpunkt erreicht der Virustiter im Blut seinen Höhepunkt. Gleichzeitig steigt auch die Typ-I-Interferon-Konzentration an und korreliert mit dem Einsetzen der Krankheitssymptome. Nach 7-10 Tagen ist das Virus aus dem Wirtsorganismus entfernt und auch die Interferon-Konzentration sinkt wieder. Erst nach dem Eliminieren des Virus ist eine effektive, spezifische adaptive Immunantwort (spezifische Antikörper, spezifische T-Zellen) registrierbar. (Schwartz und Albert, 2010)

Weiterhin scheint eine Beteiligung von spezifischen Antikörpern an der Elimination des Virus nahezu ausgeschlossen, da das Virus, wie schon erwähnt, in den meisten Fällen nach ca. 7-10 Tagen aus dem Wirtsorganismus verschwunden ist und spezifische Antikörper erst in dieser Zeit gebildet werden. Jedoch sind spezifische, neutralisierende Antikörper nach der

Genesung im Serum der Patienten detektierbar und führen zu einer lebenslangen Immunität (Long und Heise 2015). Eine überschießende Reaktion bzw. Fehlleitung der adaptiven Immunantwort wird allerdings mit der persistierenden Polyarthrititis in Verbindung gebracht. Durch Kreuzreaktionen sollen B- und T-Lymphozyten gegen wirtseigene Strukturen gerichtet worden sein, wodurch es zur Ausbildung einer Autoimmunreaktion kommt (Schwartz und Albert 2010; Hoarau et al. 2010). Eine anhaltende Gelenksentzündung mit erhöhter Anzahl von Entzündungszellen in der Synovialflüssigkeit ist lange nach Überwindung der akuten Phase in Patienten mit persistierender Polyarthrititis zu vermerken (Hoarau et al. 2010). Her et al. (2010) gehen davon aus, dass infizierte Monozyten/ Makrophagen für die Verbreitung des Virus im Wirtsorganismus, sowie durch ihre Migration in die Synovialzellen von Gelenken für die Persistenz des Virus und damit einhergehender persistierender Polyarthrititis verantwortlich sind. Bisher sind die Forschungen über die Pathogenese der persistierenden Polyarthrititis, sowie die Rolle des adaptiven Immunsystems noch nicht abgeschlossen.

Zusammengefasst repliziert das CHIKV in vitro in vielen verschiedenen adhärent wachsenden Zelllinien wie Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und muskulären Satellitenzellen. So zeigten auch Untersuchungen im Mausmodell, dass CHIKV vornehmlich in Muskel-, Gelenk- und Hautfibroblasten, sowie in Endothel- und Epithelzellen vieler Organe (Leber, Milz, Gehirn) repliziert (Dagley und Julander 2013). Im Gegensatz dazu sind sowohl B- und T-Lymphozyten, als auch ausdifferenzierte Myotubes nicht mit dem CHIKV infizierbar. Eine akute Infektion mit dem CHIKV führt zwar zu einer Lymphopenie, diese ist jedoch nicht auf eine direkte Wirkung des Virus auf B- und T-Lymphozyten zurückzuführen (Akahata et al. 2010).

1.1.3 Globale Verteilung

Das Chikungunya-Fieber gehört zu den sogenannten „*vector-borne*“-Erkrankungen. Unter *vector-borne* versteht man, dass das Virus über einen lebenden Organismus (Vektor), im Falle von Chikungunya über Moskitos der Gattung *Aedes*, übertragen wird.

CHIKV zirkuliert in Afrika in einem enzootischen, sylvatischen Zyklus zwischen waldbewohnten Moskitos und nicht-menschlichen Primaten (Jupp und McIntosh 1990). Durch anthropophile *Aedes*-Arten erfolgt die Übertragung des Virus auf den Menschen. In Afrika zirkulieren zwei große enzootische Virusstämme. Der Westafrikanische (WA) und der ost-/zentral-/südafrikanische Stamm (ECSA) (Volk et al. 2010).

1952 wurde CHIKV während einer großen Epidemie erstmals isoliert und wissenschaftlich beschrieben, wobei *Aedes aegypti* (Gelbfiebertmücke) als übertragender Vektor identifiziert werden konnte (Coffey et al. 2014). 1958 wurde über einen ersten Ausbruch in Asien (Thailand) berichtet und ein weiterer Virusstamm (asiatischer Stamm) identifiziert (Coffey et al. 2014). Seit dieser Zeit kam es immer wieder zu kleineren Epidemien in Afrika, Asien und Indien. Für großes Aufsehen sorgte der Chikungunya-Ausbruch 2005 auf der französischen Insel La Réunion (Indischer Ozean), bei dem ein Drittel der Bevölkerung (ca. 266.000 Bewohner) infiziert wurde. Der ECSA-Stamm hatte sich durch Reisende im Indischen Ozean, Indien und Südostasien ausgebreitet und traf hier auf eine immunologisch naive Bevölkerung. Dies führte zu einem hoch infektiösen Virus, das viele Menschen infizieren konnte und einige schlimme Erkrankungsfälle auslöste (Schuffenecker et al. 2006; Weaver 2014). Während dieser Ausbreitung kam es zu der Ausbildung eines neuen Virusstamms (Indischen Ozean Stamm (IO)), der verschiedene Punktmutationen aufwies. Die bedeutendste Mutation ist der Aminosäureaustausch an der Stelle 226 des Glykoproteins E1 von Alanin (A) zu Valin (V) (Schuffenecker et al. 2006). Diese Mutation führte zu einer verbesserten Replikation in *Aedes albopictus* (asiatische Tigermücke), wahrscheinlich durch die bessere Anpassung an das Lipidmuster auf der Zellmembran dieser Mosquitoart (Coffey et al. 2014). Auch im Semliki-Forest-Virus hat die Stelle 226 im Glykoprotein E1 die Cholesterol-abhängigkeit während der Zellfusion (Chatterjee et al. 2002) beeinflusst. Die Mutation im CHIKV-Genom hatte jedoch keinen Nachteil auf die Nutzung des ursprünglichen Vektors (*Aedes aegypti*). Die Erschließung des neuen Vektors legte die Basis für die globale Verbreitung des CHIKV, denn *Aedes albopictus* ist nicht nur in Tropen und Subtropen der Erde beheimatet, sondern kann auch in den gemäßigten Klimazonen gut überleben. So kam es bereits 2007 zur ersten Epidemie in Europa. Von ungefähr 200 Fällen in der Region um Ravenna ist berichtet worden (Lines 2007). Im Jahre 2008 wurde der IO-Stamm auch in Südostasien entdeckt (Hapuarachchi et al. 2010) und führte im September 2010 in Frankreich zur lokalen Übertragung von CHIKV durch dort ansässige asiatische Tigermücken (Gould et al. 2010). Die ersten Berichte über Chikungunya-Ausbrüche auf dem

amerikanischen Kontinent erfolgten im Dezember 2013. Das CHIKV erreichte die Karibik, breitete sich nach Zentral- und Südamerika aus und führte dort zu einer immer noch andauernden Epidemie. Interessant ist hier, dass die lokale Übertragung durch *Aedes aegypti* erfolgte und Infektionen vom asiatischen Virusstamm hervorgerufen wurden (Leparc-Goffart et al. 2014). In Europa kam es 2014 in Frankreich und 2015 in Spanien zu CHIKV-Ausbrüchen mit lokaler Übertragung durch *Aedes albopictus* (Delisle et al. 2015, www.who.int/csr/don/archive/disease/chikungunya/en/). Reisende brachten das Virus ins Land und die ortsansässigen asiatischen Tigermücken verbreiteten CHIKV in der Bevölkerung. Gefährlich am unspezifischen klinischen Erscheinungsbild einer Chikungunya-Erkrankung ist, dass es häufig zu Verwechslungen mit anderen viralen Infektionen führt, wie z.B. mit dem Dengue-Fieber. Außerdem nutzen mehrere Viren die *Aedes*-Arten als Überträger, sodass oftmals eine CHIKV-Infektion nicht erkannt oder bei einer Co-Infektion übersehen wurde und so eine vollständige epidemiologische Geschichte des CHIKV eventuell nicht darstellbar ist (Yamamoto, David W. (CDC/OID/NCEZID) (CTR)).

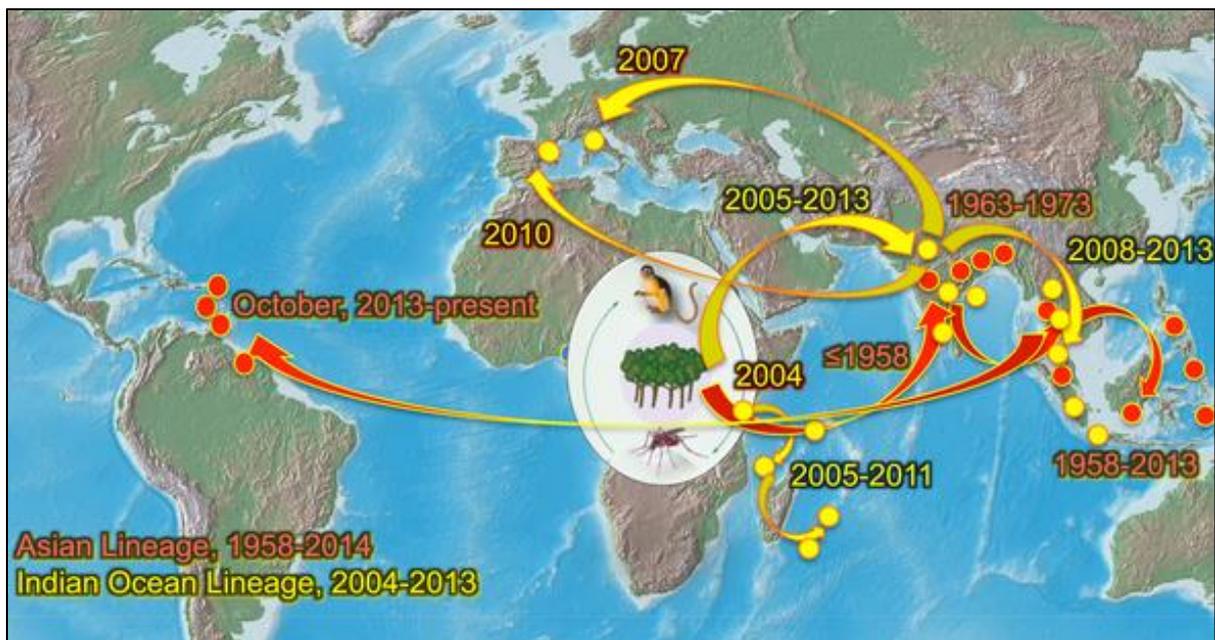


Abb. 4 Zeitliche und geografische Verbreitung des Chikungunya Virus

Nach der ersten Beschreibung des CHIKV 1952 in Tansania folgten mehrere Ausbrüche in Afrika und Asien, bei denen CHIKV über *Aedes aegypti* übertragen wurde. 2005 breitete sich das Virus im Indischen Ozean aus und ein neuer Virusstamm (IO), der besser in *Aedes albopictus* replizieren konnte, entstand. 2007 sind erste Epidemien in Europa beschrieben worden und seit Ende 2013 hat CHIKV auch den amerikanischen Kontinent erreicht.

CHIKV ist endemisch im subsaharischen Afrika, Südostasien, Indien und im Indischen Ozean. Große, noch andauernde Epidemien sind aktuell auf dem amerikanischen Kontinent zu verzeichnen. Hier scheinen die Bedingungen für CHIKV gut zu sein, sodass das Virus endemisch werden könnte. (Coffey et al. 2014)

Die Gefahr vor weiteren großen Epidemien weltweit oder auch vor der Ausbildung neuer endemischer Zyklen (z.B. im tropischen Amerika; Lourenço-de-Oliveira und Failloux 2017) nimmt immer weiter zu, da sich Chikungunya, nicht zuletzt durch die Nutzung der asiatischen Tigermücke als Vektor und den zunehmenden Reisetourismus, global ausbreitet. Die asiatische Tigermücke ist bereits in vielen Ländern der gemäßigten Klimazone gesichtet worden, die Prävalenz ist steigend (Kraemer et al. 2015). Außerdem ist CHIKV in vielen beliebten Urlaubszielen aktiv, was zu einer steigenden Anzahl importierter Chikungunya-Fälle führt. So werden auch in Deutschland regelmäßig importierte Infektionen registriert (<https://www.abig.rki.de/ABiG/DE/Content/Agenzien/Agenzien.html?eigenschaft=4195394&gens=4694152>, in Deutschland besteht Meldepflicht). Generell ist die Globalisierung bei der Verteilung verschiedener Viruserkrankungen beteiligt. Daher ist es von enormer Bedeutung, sowohl vorliegende Infektionen gründlich zu diagnostizieren, als auch antivirale Mittel bzw. präventive Mittel (Impfstoffe) zu entwickeln, um die Verbreitung des Virus und das Ausmaß der Epidemien eindämmen zu können. Momentan kann nur symptomatisch behandelt werden und Reisenden wird geraten, sich gegen Moskitos zu schützen.

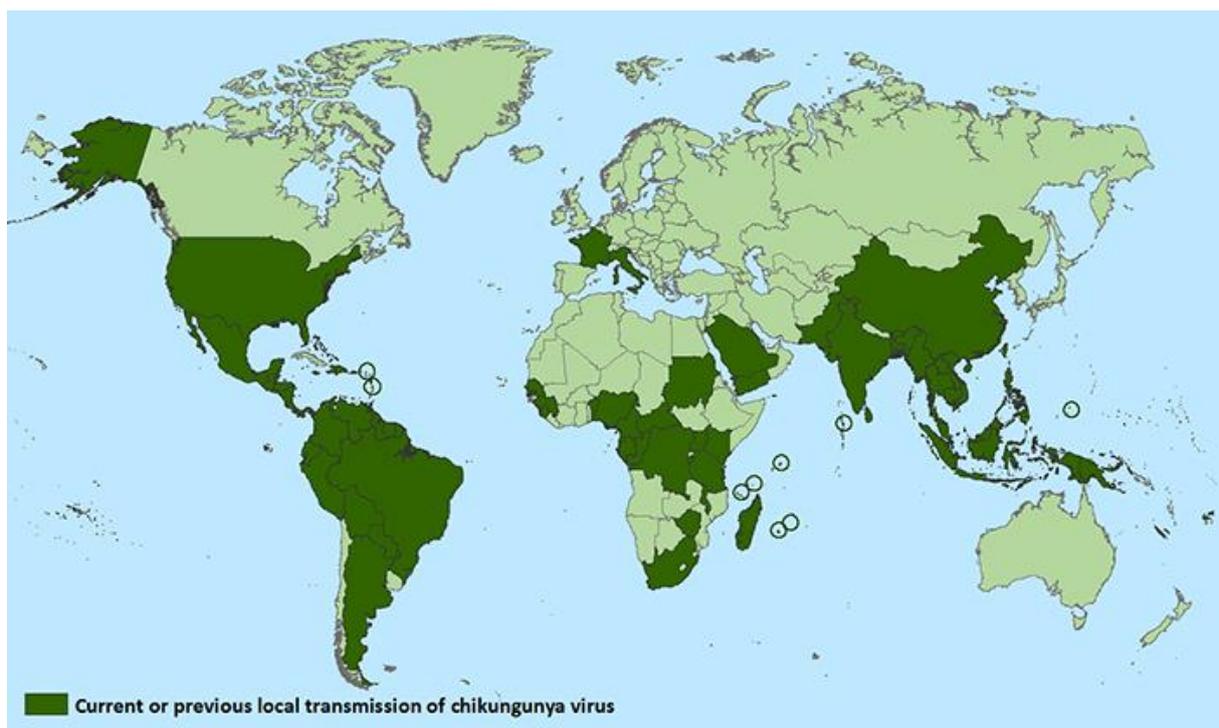


Abb. 5 Aktuelle Verbreitung von Chikungunya mit lokaler Übertragung

Diese Karte zeigt Länder, in denen Chikungunya aktuell aktiv ist und lokal übertragen werden kann. Länder, in denen nur von importierten Fällen berichtet worden ist, sind in dieser Darstellung nicht aufgeführt. (<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>)

1.2 Das Chikungunya Virus

Das Chikungunya Virus (CHIKV) gehört der Gattung *Alphavirus* an, die wiederum zur Familie *Togaviridae* zählt.

Die Familie der *Togaviridae* (*Toga* = *Mantel*) umfasst zwei Gattungen, die bereits erwähnten *Alphaviren* und die *Rubiviren*. Die Gattung *Rubivirus* ist monotypisch, d.h. sie umfasst nur den Erreger der Röteln (Spezies: *Rubillavirus*). Zu den *Alphaviren* zählen bis zu 30 Spezies, die alle im Virusgenom eine positiv-einzelsträngige RNA aufweisen. Weiterhin sind die Viren behüllt und besitzen auf der Virushülle charakteristische Spikes, die aus den Glykoproteinen E1 und E2 bestehen. Untereinheiten der Virionen sind in ikosaedrischer Symmetrieform angeordnet und ein Virion misst eine Größe von etwa 60-70nm Durchmesser. Ein veralteter Name der Gattung *Alphavirus* ist *Arbovirus A* (***Arthropode Born viruses***), was ehemals vom Übertragungsweg der Viren via Mücken abgeleitet wurde und immer noch ein gemeinsames Merkmal der meisten Mitglieder dieser Gattung ist (Doerr und Gerlich 2010).

CHIKV lässt sich mit nah verwandten Spezies, wie zum Beispiel dem O'Nyong-nyong-Virus (ONNV), Ross-River-Virus (RRV), Semliki-Forest-Virus (SFV) u.a. zum Semliki-Forest-Komplex zusammenfassen. Dieser Komplex, wie auch das gut untersuchte Sindbis-Virus (SINV) gehören zu den *Alphaviren* der „Alten Welt“ und prägen das klinische Erscheinungsbild durch Arthralgien, Polyarthritis, Fieber und Hautausschläge (*Arthritogene Alphaviren*). *Alphaviren* der „Neuen Welt“ werden oft mit den vorherrschenden klinischen Symptomen einer Enzephalitis assoziiert, jedoch können auch Infektionen mit *Alphaviren* der „Alten Welt“ bzw. *Arthritogene Viren* zur Ausbildung einer Enzephalitis (z.B. CHIKV) führen. Wichtige Vertreter der Enzephalitis-Untergruppe sind das Eastern-Equine-Encephalomyelitis-Virus (EEEV), Western-Equine-Encephalomyelitis-Virus (WEEV) und das Venezuelan-Enzephalomyelitis-Virus (VEEV) (Fields et al. 2001).

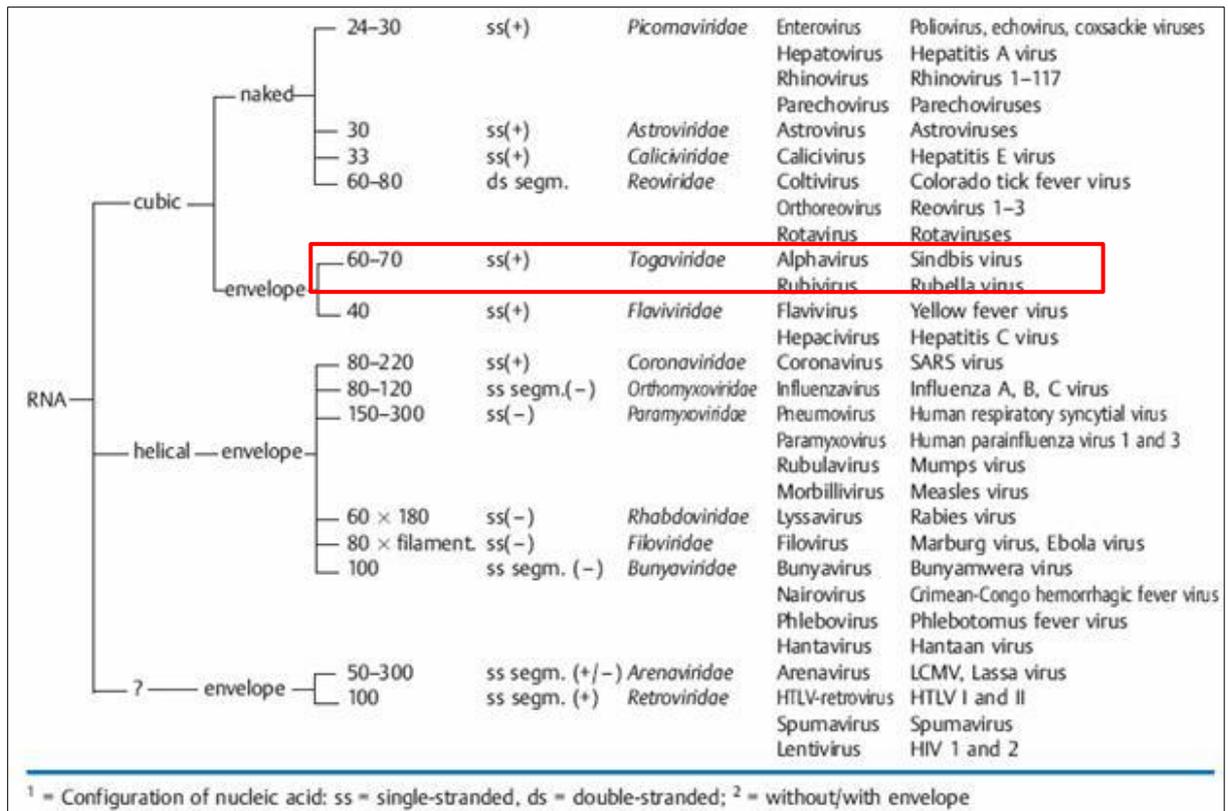


Abb. 6 Einteilung der RNA-Viren

CHIKV ist ein +ss-RNA-Virus, das zur Gattung der Alphaviren und diese wiederum zur Familie der Togaviridae gehört. CHIKV ist behüllt, besitzt charakteristische Spikes auf der Virushülle und weist eine ikosaedrische Form, mit einem Durchmesser von 60-70nm auf. (<http://biosiva.50webs.org/virus.htm>)

1.2.1 Das Virusgenom

Das CHIKV-Genom besteht aus einer positiven (+) einzelsträngigen (ss) RNA, die 11,8 kB umfasst. Der virale RNA-Strang kann aufgrund seiner positiven Orientierung in der Wirtszelle direkt als mRNA genutzt werden. Zur Stabilisierung weist die RNA am 5'-Ende eine Cap-Struktur und am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz auf. Der Cap-Struktur folgt eine 76 Nukleotide (nt) lange nicht-translatierbare Region (NTR). Eine weitere NTR befindet sich auch am 5'-Ende, die dort 526 Nukleotide (nt) umfasst (betrachtet wurde der CHIKV-Stamm S27) (Solignat et al. 2009). Diese NTRs bestehen aus sich wiederholenden Sequenzen (RSE) und werden zwar nicht translatiert, scheinen aber während der Translation eine regulierende Rolle einzunehmen. Weiterhin besitzt das Virusgenom zwei offene Leseraster (ORF), wobei der erste (von 5' gesehen) 7424 nt groß ist und für die Nichtstrukturproteine nsP1-4 kodiert. Der zweite ist 3732 nt lang und beinhaltet die genetische Information für die drei wichtigsten Strukturproteine das Kapsidprotein (C), sowie die beiden Glykoproteine E1 und E2. Für beide Proteingruppen wird zuvor ein Vorläuferprotein gebildet, das durch spätere proteolytische Spaltung in die einzelnen Proteine unterteilt wird (Tsetsarkin et al. 2011). Zusammengefasst lässt sich die Genomorganisation folgendermaßen beschreiben: 5'cap-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-(*junction region*)-C-E3-E2-6K-E1-poly(A) 3' (Khan et al. 2002) (siehe Abb. 7). Die Verbindungsregion (*junction region*) ist, wie die oben beschriebenen NTRs, eine Sequenz, die nicht translatiert wird. Allerdings befindet sich in dieser 68nt langen Region unter anderem ein interner Promotor, der die Synthese der 26S subgenomischen mRNA steuert. Die 26S subgenomische mRNA kodiert für die Strukturproteine Kapsidprotein (bildet das virale Kapsid), das Glykoprotein E1 (Klasse II-Fusionsprotein) und E2 (verantwortlich für die Rezeptorbindung) (Solignat et al. 2009).

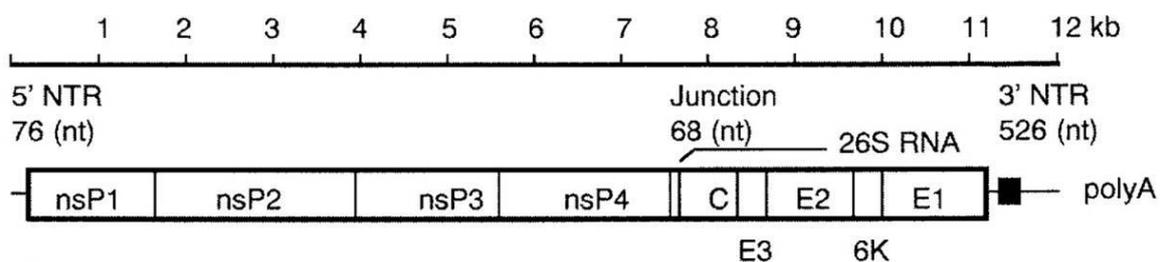


Abb. 7 Organisation des CHIKV-Genoms

Auf der ca. 12 kb langen CHIKV-RNA befinden sich zwei offene Leseraster (ORF), wobei der erste für die Nichtstrukturproteine und der zweite für die Strukturproteine kodiert. Zwischen den beiden ORFs befindet sich die Verbindungsregion (*junction region*), die genauso wie die NTRs an den Genomenden nicht translatiert wird und den Promotor für die subgenomische mRNA enthält. Die Virus-RNA besitzt außerdem eine 5'-Cap-Struktur, sowie einen 3'-Poly-A-Schwanz. (Khan et al. 2002)

1.2.2 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus der Alphaviren (Abb.8) findet im Zytoplasma der Wirtszelle statt und verläuft über die Dauer von etwa 4 Stunden (Thiboutot et al. 2010; Caglioti et al. 2013). CHIKV wird über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen, wobei das gebundene Virus von der Wirtsmembran umschlossen und innerhalb von Endosomen ins Zellinnere transportiert wird (Lee et al. 2013). Verantwortlich für die Bindung der noch immer unbekanntenen zellulären Rezeptoren ist das virale Glykoprotein E2, das sich als E2/E1-Heterodimer auf der Virusoberfläche befindet. Durch den im Endosom vorherrschenden sauren pH-Wert kommt es zur Konformationsänderung im E2/E1-Komplex und das Fusionsprotein E1 wird freigelegt (Kielian 2010) (siehe 1.2.4). Es folgt die Verschmelzung der viralen mit der zellulären Membran und das virale Nukleokapsid wird ins Zytoplasma der Wirtszelle entlassen. Das Kapsidprotein besitzt in seiner Sequenz C-terminal ein Bindungselement, was ihm ermöglicht, an große ribosomale Untereinheiten zu binden (Singh und Helenius 1992), woran sich dann die Replikation des viralen Genoms in zwei Schritten anschließt.

Das Virusgenom besteht, wie in 1.2.2 beschrieben, aus einer positiven einzelsträngigen RNA, die direkt von zellulären Enzymen des Wirts als mRNA genutzt werden kann. Von ihr wird das Vorläuferprotein der Nichtstrukturproteine (nsP) (erster ORF), nsP1234, abgelesen und gebildet. Die nsP sind von besonderer Bedeutung bei sich anschließenden Replikationsvorgängen und steuern diese. Durch proteolytische Spaltung wird zuerst das nsP4 vom restlichen Polyprotein getrennt. Das nsP4 bildet mit dem Polyprotein nsP123 und Wirtszellproteinen einen Komplex und synthetisiert einen negativ(-)-Strang, komplementär zur viralen (+)ss-RNA, der als Template für die subgenomische 26S mRNA und die genomische 49S RNA dient (Barton et al. 1991). Ist eine ausreichende Konzentration vom Polyprotein nsP123 erreicht, wird dieses Protein proteolytisch in seine einzelnen Nichtstrukturproteine geteilt. Alle nsP üben zusammen mit zellulären Proteinen eine (+)-RNA-Strang-Replikase-Funktion aus und bilden vom negativen RNA-Strang die 26S subgenomische mRNA (Shirako und Strauss 1994). Bei diesem Prozess ist vor allem nsP2 durch seine Aktivität als Helikase und Protease von Bedeutung. Von der subgenomischen mRNA wird das Vorläuferprotein pE2-E1 (C-E3-E2-6k-E1) der Strukturproteine synthetisiert. Durch autoproteolytische Serin-Proteasen spaltet sich das Kapsidprotein (C) in *cis* vom übrigen Polyprotein ab. Durch die Abspaltung des C-Proteins wird am N-Terminus von pE2 eine Signal-Sequenz frei, die für die eigene Translokation ins Endoplasmatische Retikulum (ER) sorgt. Im ER wird das pE2 weiter prozessiert und das Protein 6k abgespalten. Das Protein 6k ist nach Solignat für die Translokation von E1 verantwortlich (Solignat et al. 2009). Die Glykoproteine pE2 und E1 werden vom ER zum Golgi-Apparat transportiert. In Clathrin-Vesikel verpackt, gelangen sie zur Zellmembran, wobei pE2 im Golgi-Apparat durch Furin-

Proteasen in die Hüllproteine E2 und E3 unterteilt wird (Jose et al. 2009). E3 ist für die richtige Faltung des pE2 sowie für die Verbindung und Interaktionen zwischen den Glykoproteinen E2 und E1 von Bedeutung (Voss et al. 2010).

Das virale Genom wird von 240 Kapsidproteinen in ikosaedrischen Symmetrieform (T=4) verpackt und diffundiert als Nukleokapsid (Core) diffus durchs Zytoplasma in Richtung Zellmembran (Perera et al. 2001). Das Entlassen neuer, fertiger Virionen erfolgt durch Knospung aus der Wirtszelle, wodurch das Nukleokapsid eine Virushülle erhält. Die Virushülle besteht aus einer Doppellipidschicht, die von der Zellmembran der Wirtszelle stammt. Außerdem befinden sich die Glykoproteine E2-E1 als Heterodimere auf der Oberfläche der Virushülle, da diese schon vorher zur Zellmembran gelangten und in diese integriert wurden (Abb.8) (Strauss und Strauss 1994).

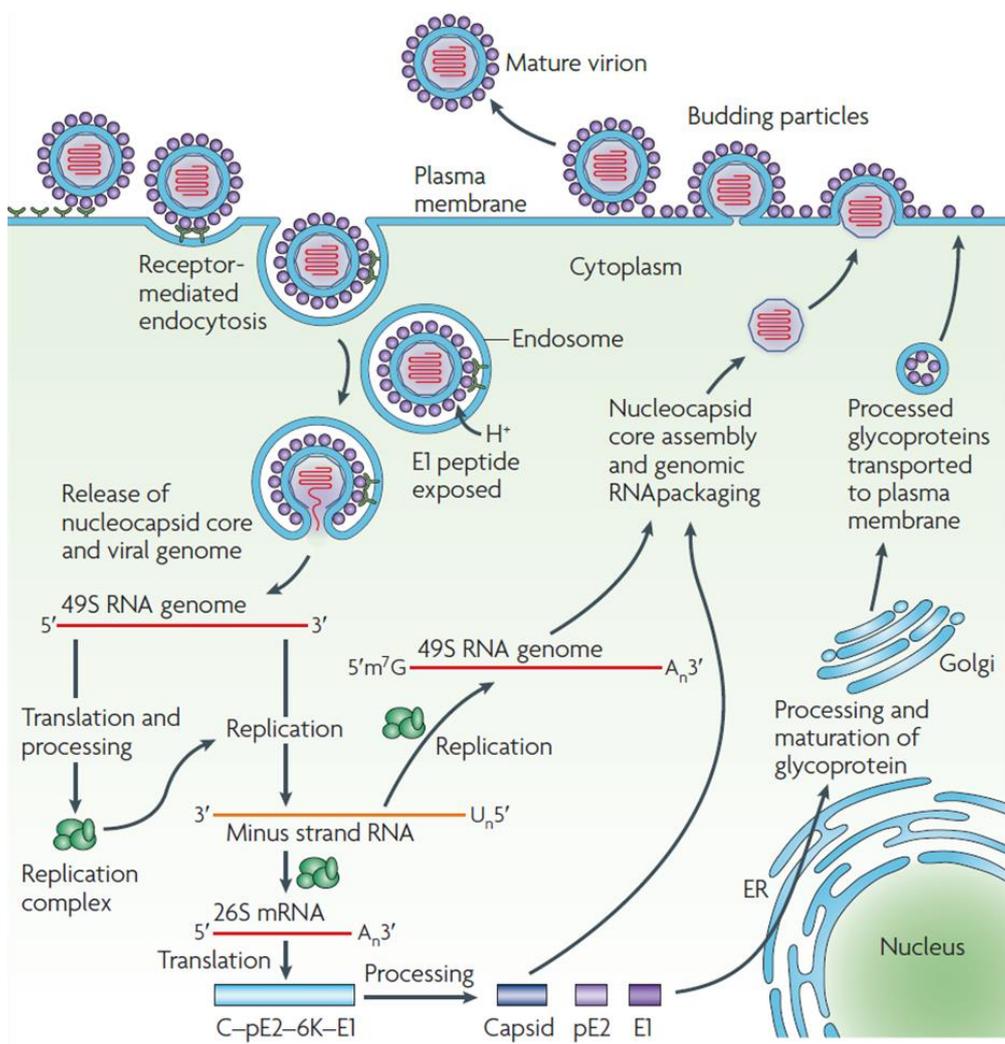


Abb. 8 Replikationszyklus von Alphaviren

Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose (Rezeptorbindung E2) und anschließender viraler-zellulärer Membranfusion, gelangt das Virusgenom in die Zelle. Die Replikation startet mit der Translation der Nichtstrukturproteine (Vorläuferprotein nsP1234, nachfolgend in einzelne Proteine prozessiert) direkt vom (+)ss-

RNA-Strang. Die nsP und zelluläre Enzyme bilden einen Komplex und synthetisieren einen (-)ss-RNA-Strang, der als Template für das virale 49S RNA Genom und die 26S mRNA genutzt wird. Von der 26S mRNA wird das Vorläuferprotein C-pE2-6K-E1 (pE2-E1, p62-E1) translatiert. Das Kapsidprotein (C) spaltet sich autoproteolytisch vom Vorläuferprotein ab und umhüllt mit 240 Kopien das virale Genom. Das restliche Polyprotein wird durch Furin-Proteasen weiter prozessiert (ER) und gelangt in Clathrin-Vesikeln (Golgi-Apparat) zur Zellmembran, wo sie in die Virushülle, die von der Zellmembran gebildet wird, integriert werden. (Schwartz und Albert 2010)

1.2.3 Struktur und Morphologie der Virionen

Das CHIKV ist ein behülltes, positiv-einzelsträngiges RNA-Virus. Es besteht aus einem 11,8 kB großen Virusgenom, (+)ss-RNA, das von einer Proteinhülle, dem sogenannten Kapsid, umhüllt ist. Diese Proteinhülle setzt sich aus mehreren Untereinheiten, den Kapsomeren, zusammen und ist im Durchmesser ca. 40 nm groß. Bei den Alphaviren wird aus 240 (T=4) dimeren C-Proteinen ein ikosaedrisches Kapsid gebildet (Modrow et al. 2010). Das C-Protein steht über seine basischen Anteile mit der negativ geladenen Nukleinsäure des viralen Genoms in nicht kovalenter Verbindung. Das Nukleokapsid ist außerdem von einer Virushülle umgeben. Diese Hülle besteht aus einer doppelten, von der Wirtszelle stammenden, Phospholipidschicht, die während der Freisetzung neuer Viruspartikel durch die Knospung entstand (Kielian und Rey 2006). In die Lipidschicht sind zudem virale Glykoproteine eingelagert, die während der Replikation zur Wirtszellmembran gelangten und sich im Bereich der Knospung anreicherten. Zelluläre Membranproteine wurden weitestgehend verdrängt, sodass die Membranhülle der Viren hauptsächlich aus Phospholipiden und viralen Glykoproteinen besteht. Auf der Oberfläche der viralen Hülle sind die beiden viralen Hüllproteine E1 (Envelope Protein) und E2 zu finden, die als E2/E1-Heterodimere vorliegen. Insgesamt sind 240 solcher E2/E1-Heterodimere vorhanden, wobei sich jeweils drei zu Trimeren zusammenlagern und somit 80, in ikosaedrischen Symmetrie angeordneten, sogenannte Spikes bilden (Voss et al. 2010) (Abb.9). Die Verbindung zwischen Hülle und Nukleokapsid wird über den zytoplasmatischen Teil (C-Terminus) des Glykoprotein E2 gewährleistet (Solignat et al. 2009). Ein Viruspartikel misst im Durchmesser eine Größe von 60-70 nm (Doerr und Gerlich 2010).

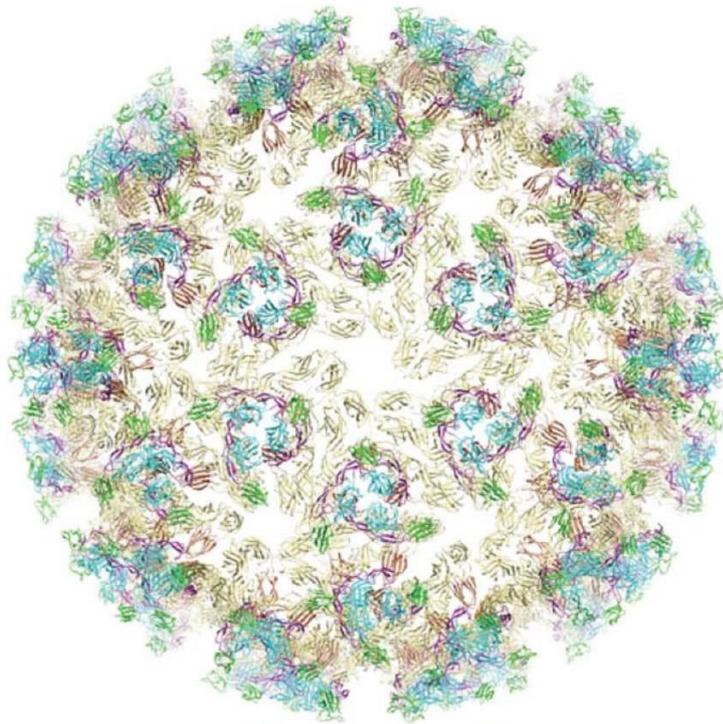


Abb. 9 Atomare Darstellung des Chikungunya Virus

240 E2/E1-Heterodimere sind zu 80 Spikes zusammengelagert. Das Glykoprotein E2 ist in cyan (Domäne A), dunkelgrün (Domäne B), pink (Domäne C) und dunkellila (β -ribbon-connector) gefärbt. E1 ist komplett in sandfarben gehalten. (Voss et al. 2010)

1.2.3.1 Organisation und Morphologie der Hüllproteine E1 und E2

Auf der Oberfläche von Chikungunya Viruspartikeln befinden sich 80 Spikes, die aus jeweils drei zusammengelagerten E2/E1-Heterodimeren bestehen. Diese beiden Glykoproteine sind für den Virus-Eintritt in die Wirtszelle verantwortlich. Auf der Virusoberfläche wird E1 von E2 überlagert, sodass E2 als erstes mit der Wirtszelle in Kontakt tritt. Über das Glykoprotein E2 bindet das Virus an einen noch immer unbekanntes zellulären Rezeptor, wodurch die Virusaufnahme in Endosomen und der Transport ins Zellinnere getriggert wird (Kielian 2010). E2 entstammt dem Vorläuferprotein pE2, das während der Reifung in E2 und E3 geteilt wurde. E3 umfasst die ersten 64 Aminosäuren (AS) vom N-Terminus des pE2 und weist N-terminal eine β -Schleife auf, der sich drei α -Helix anschließen. Wie auch die übrigen Glykoproteine besitzt auch E3, an Position 12, eine Glykosylierungsstelle. In der räumlichen Darstellung bilden E1 und E2 die Form einer gedrehten Platte von 150Å Länge, 50Å Höhe und 25Å Breite, aus der E3 seitlich herausragt und der Form eines „Pferdeschuhs“ ähnelt. Das 432 AS große Glykoprotein E2 besteht ausschließlich aus β -Faltblattstrukturen und gehört der Immunglobulin-Superfamilie an. Seine Unterteilung erfolgt in die drei

Immunglobulin-Domänen A, B und C. Domäne C liegt dabei der viralen Membran am nächsten. Das distale Ende bildet Domäne B, die sich an der Spitze eines langen β -ribbon-connectors befindet. Domäne A befindet sich im Zentrum des Proteins. Der β -ribbon-connector verbindet die Domänen von E2 untereinander und tritt mit E3 in Kontakt, außerdem enthält er eine säureempfindliche Region (ASR). Durch die Kommunikation mit E3 kommt es zur richtigen Faltung des Proteins und zur Bildung einer Grube zur Einlagerung der Fusions-Schleife von E1. Auch E2 ist glykosyliert und zwar an Position 263 und 345, wobei sich die Stelle 263 in der Sequenz des β -ribbon-connector und 345 in der Stammregion befindet (Voss et al. 2010). Die Stammregion ist mit der Transmembranregion verbunden und schließt sich an Domäne C an. Die Transmembranregion sorgt für die Verankerung in der Virushülle und tritt über seinen 32 AS langen zytoplasmatischen Anteil mit dem Kapsid in Kontakt (Solignat et al. 2009).

E1 ist ein Klasse II-Fusionsprotein und sorgt für die Fusion der viralen mit der Endosommembran (Kielian und Rey 2006). Es umfasst 439 AS und ist weiter in drei Domänen unterteilt, die reich an β -Faltblättern sind und als Domäne I, II, III bezeichnet werden. E1 steht mit E3 in keiner direkten Verbindung, kommuniziert jedoch mit E2 über die gesamte Länge der Domäne II. Außerdem befindet sich am Ende der Domäne II die hydrophobe Fusionsschleife, die bis zur pH-Wert-Änderung im Endosom in der durch Domäne A und B (E2) gebildeten Grube lagert, wodurch eine vorzeitige Fusion verhindert wird (Li et al. 2010). Diese Konformation wird von einigen Histidin-Seitenketten des E2-Proteins unterstützt. Im E1-Protein bildet Domäne I das Zentrum und ist über eine Linker-Region mit Domäne III verbunden, die eine weitere Verbindung zu E2, in diesem Fall Domäne C, schafft. Domäne III befindet sich nahe der viralen Membran und ist über die Stammregion mit der Transmembranregion verbunden. An Position 141 befindet sich eine Glykosylierungsstelle (Sánchez-San Martín et al. 2008) (Abb.10).

Für die Interaktionen, die innerhalb und zwischen den einzelnen Spikes ablaufen, sind nur die Glykoproteine E1 und E2 verantwortlich. Durch die räumliche Anordnung von E2 Domäne A im Zentrum, wobei alle A-Domänen der drei Heterodimere miteinander interagieren, und Domäne B zur Seite, wird den Spikes die charakteristische Propellerstruktur verliehen (Voss et al. 2010) (Abb.9).

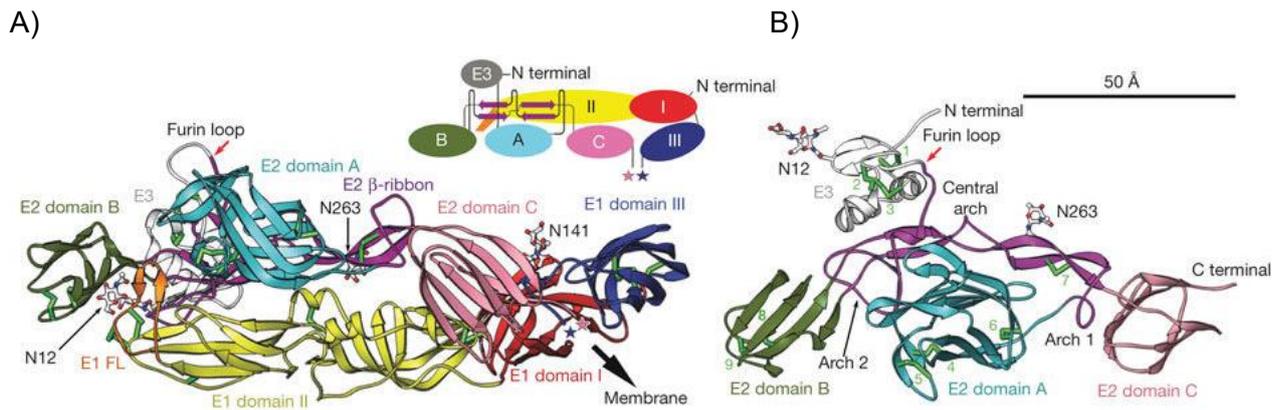


Abb. 10 Schematische Darstellung des pE2-E1-Heterodimers

A) zeigt verkleinert eine vereinfachte Darstellung und in groß ein Schleifendiagramm der einzelnen Glykoproteine E3 (grau), E2 mit den Domänen A (blau), B (dunkelgrün) und C (pink) sowie E1 mit den Domänen I (rot), II (gelb) und III (dunkelblau). Der β -ribbon-connector von E2 ist in dunkelviolett gehalten. Die Sterne markieren den C-Terminus der Domäne C (E2) bzw. der Domäne III (E1), der über die Stammregion mit der Transmembranregion verbunden und somit der viralen Membran am nächsten ist.

B) zeigt dasselbe Schleifendiagramm um 90° gedreht, um eine bessere Aufsicht auf das Glykoprotein E3 zu gewähren. Die grünen Nummern markieren die Disulfide. (Voss et al. 2010)

1.2.4 Virus-Eintritt in die Wirtszelle

Das CHIKV gelangt über eine Rezeptor-vermittelte Endozytose ins Zellinnere der Wirtszelle (Lee et al. 2013). Nahezu alle Zellen sind infizierbar, jedoch scheinen B- und T-Lymphozyten, von Monozyten stammende dendritische Zellen sowie ausdifferenzierte Muskelzellen resistent für eine CHIKV-Infektion zu sein (Sourisseau et al. 2007). Wie bereits erwähnt bindet das virale Glykoprotein E2 an den zellulären Rezeptor und induziert so die Aufnahme in das Endosom. Ob die Endozytose Clathrin-abhängig ist oder nicht, wird viel diskutiert. Lee et. al konnten nachweisen, dass in Moskitozellen eine Endozytose von Clathrin abhängt (Lee et al. 2013). Bei der Aufnahme in Mammaliazellen wurde lange von einer Clathrin-vermittelten Endozytose ausgegangen, wobei neuere Forschungsergebnisse ermitteln konnten, dass nicht Clathrin, sondern Eps15 bei der Endozytose unverzichtbar sei (Bernard et al. 2010). Das Protein Eps15 (epidermal growth factor receptor substrate 15) ist zwar auch bei der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt, sorgt aber auch für einen Clathrin-unabhängigen Aufnahmeprozess ins Endosom (Sigismund et al. 2005). Weiterhin ist noch nicht ausreichend geklärt, welche Strukturen des E2-Proteins in die Rezeptorbindung involviert sind. Es besteht die Annahme, dass Domäne A und B sowie das Verbindungsstück, der β -ribbon-connector, zum Teil aufgrund ihrer exponierten Lage innerhalb der räumlichen Anordnung (Voss et al. 2010, Abb.9) und der Tatsache, dass gegen sie gerichtete neutralisierende Antikörper eine Bindung bzw. ein Eintreten des Virus in die Wirtszelle verhindern können (Selvarajah et al. 2013; Weber et al. 2015a; van Duijl-

Richter et al. 2015), für die Rezeptorbindung verantwortlich sind (van Duijl-Richter et al. 2015; Weber et al. 2017). Außerdem bedarf auch die Identifikation zellulärer Strukturen, an die das CHIKV bindet, weiterer Untersuchung. Eine mögliche Beteiligung des Membranproteins Prohibitin (Wintachai et al. 2012), des Phosphatidylserine (PtdSer)-Mediated Virus Entry-enhancing Rezeptors (Moller-Tank et al. 2013), Glykosaminoglykane (Christianson und Belting 2014) (siehe unten) in Mammaliazellen, und die β -Untereinheit der ATP-Synthase in Moskitozellen (Fongsaran et al. 2014) wurde bereits angedeutet, jedoch konnte das Fehlen dieser zellulären Strukturen eine Infektion nicht vollends verhindern, sodass weitere Faktoren im Zell-Eintritt eine Rolle spielen müssen (van Duijl-Richter et al. 2015).

Nachdem das Virus ins Endosom aufgenommen wurde, wird es mit einem dort herrschenden sauren pH-Wert konfrontiert. Eine milde pH-Wert-Senkung führt zu einer Konformationsänderung im E2/E1-Heterodimer, wodurch die Fusionsschleife von E1 freigelegt wird (Li et al. 2010) (Abb.11 b)). Innerhalb der Spikes auf der Virushülle wird das Fusionsprotein E1 vom Rezeptor-Bindungs-Protein E2 überdeckt. Domäne A und B sowie das Verbindungsstück β -ribbon-connector des E2-Proteins bilden eine Grube, in die die Fusionsschleife von E1 eingelagert ist (Voss et al. 2010). Die Domäne B bildet im E2-Protein, über den β -ribbon-connector mit den anderen Domänen verbunden, das distale Ende und bedeckt dabei die Fusionsschleife von E1. Der β -ribbon-connector weist eine flexible Struktur sowie eine säuresensitive Region (ASR) auf (Voss et al. 2010). Die ASR reagiert auf die pH-Wert-Änderung, vor allem Histidine spielen hier eine Rolle (van Duijl-Richter et al. 2015), und führt dazu, dass Domäne B bewegt wird.

Durch das Verschieben von Domäne B gelangt die hydrophobe Fusionsschleife von E1 in eine exponierte Lage und kann aktiv werden, indem sie in der Endosommembran inseriert (Li et al. 2010; van Duijl-Richter et al. 2015) (Abb.11 c)). Neben dem pH-Wert haben auch Lipide in der Ziellmembran einen unterstützenden Einfluss auf den Fusionsschritt. So scheint die E1-Insertion durch Cholesterol stimulierbar zu sein. Die Cholesterol-sensitive Region befindet sich an Position 226 des E1-Proteins. Ist an dieser Stelle ein Valin (V) anstelle eines Alanins (A) zu finden, erhöht dies die Cholesterolabhängigkeit und führt dazu, dass ein niedrigerer pH-Wert benötigt wird (Tsetsarkin et al. 2007; van Duijl-Richter et al. 2015). Diese Mutation führte außerdem zur besseren Nutzung des zweiten Vektors *Aedes albopictus* (Tsetsarkin et al. 2007; Coffey et al. 2014).

Bei weiter abfallendem pH-Wert dissoziiert das Glykoprotein E2 gänzlich von E1 und drei E1-Proteine lagern sich zu einem Trimer zusammen. Durch Lageänderungen in Domäne III und der Stammregion (E1) wird der E1-Trimer zurück gefaltet und eine schleifenähnliche Struktur des Homotrimers entsteht. Durch diesen Prozess trifft die Endosommembran der Wirtszelle

auf die virale Membran (Abb.11d)). Über eine gebildete Fusionspore gelangt das Nukleokapsid ins Cytoplasma der Wirtszelle (Kielian 2010).

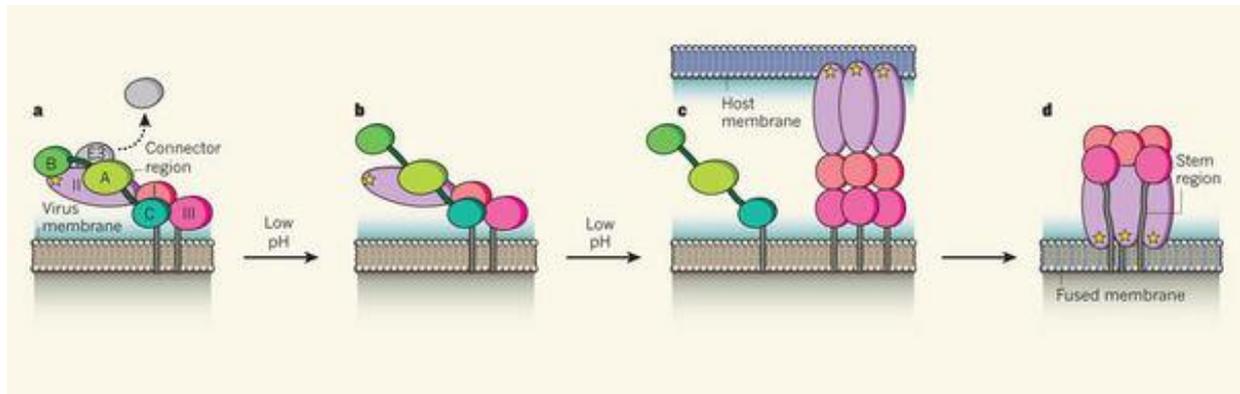


Abb. 11 Fusionsprozess der viralen Membran mit der zellulären Endosommembran

a) Auf der Virushülle formen jeweils drei E2/E1-Heterodimere einen der insgesamt 80 Spikes. Das Klasse II-Fusionsprotein E1 wird hierbei vom Rezeptor-bindenden Protein E2 überlagert. Gezeigt sind das Glykoprotein E1 mit den Domänen I, II mit Fusionsschleife (Stern) und III, E2 mit Domäne A, B und C sowie das Glykoprotein E3, das ein Spaltprodukt vom pE2 ist und im weiteren Prozess keine Rolle mehr spielt, hier vollständigshalber dargestellt ist. b) Durch pH-Wert-Absenkung im Endosominneren wird Domäne B bewegt und legt dadurch die Fusionsschleife von E1 frei. c) Der pH-Wert wird weiter gesenkt und führt dazu, dass E2 gänzlich von E1 dissoziiert. Die hydrophobe Fusionsschleife von E1 inseriert derweil in die zelluläre Endosommembran. d) Durch Lageveränderungen in Domäne III und der Sternregion wird der Homotrimer zurückgeklappt und eine schleifenähnliche Struktur entsteht. Dargestellt sind hier der zurückgefaltete E1-Homotrimer und die fusionierte Membran. Direkt im Anschluss wird eine Fusionspore gebildet, durch die das virale Nukleokapsid ins Cytoplasma der Wirtszelle gelangt. (Kielian 2010)

1.3 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane (GAG), oder auch Mucopolysaccharide genannt, bestehen aus repetierenden Disaccharideinheiten, wobei eine Einheit aus einer Uronsäure und einem Aminozucker besteht, die 1-3-glykosidisch miteinander verbunden sind. Sie sind auf nahezu allen Mammaliazellen zu finden. Meist sind sie kovalent an ein Protein gebunden und werden dann als Proteoglykan bezeichnet, können aber auch in ungebundener Form vorliegen. Alle Glykosaminoglykane sind negativ geladen, wobei die Ladungsstärke zwischen den einzelnen Gruppenvertretern stark variiert. Eine besondere Eigenschaft dieser biologischen Strukturen ist die Fähigkeit, Wasser aufzunehmen und eine hohe Elastizität aufzuweisen. Daher werden sie durch eine gallertige, viskose Substanz charakterisiert, wodurch sie sich als biologische Schmierstoffe oder flexible Kitte eignen (Kreutzig 2006). Wichtige Vertreter der GAG sind die Hyaluronsäure (HA), Heparin (HP) und Heparansulfat (HS) sowie Chondroitin (CS)- und Dermatansulfat (DS). Die Hyaluronsäure nimmt hierbei eine Sonderstellung ein. Sie kann aus bis zu 100.000 aufeinanderfolgenden Disaccharid-

Einheiten bestehen, die eine amphipathische Helix bilden. Sie besitzt im Gegensatz zu den übrigen beschriebenen GAG keine Sulfatgruppen und liegt als einzige niemals proteingebunden vor. Die Hyaluronsäure wird von Fibroblasten gebildet und ist unter anderem in Gelenken, im Knorpel, in der Nabelschnur und auch im Glaskörper des Auges zu finden. Weitere Mitglieder der Glykosaminoglykane sind das Dermatan- (v.a. in der Haut) und das Chondroitinsulfat (Bindegewebe; Knorpel, Synovia). Wie es ihr Name schon suggeriert, enthalten beide GAG Sulfatgruppen, die zu einer Verstärkung der negativen Ladung beitragen (Kreutzig 2006). Sulfatierte GAG sind die am stärksten negativ geladenen biologischen Strukturen, die in der Natur vorkommen (Sarrazin et al. 2011).

Von besonderer Bedeutung, gerade in Hinblick auf Zellbindungsaktivitäten innerhalb der Virologie sowie für die vorliegenden Forschungsarbeiten, ist das Heparansulfat (HS). Anders als der Name es vermuten lässt, besitzt es weniger Sulfatgruppen, aber mehr Acetylgruppen pro Dissacharid-Einheit als sein struktureller Verwandter Heparin, ist jedoch deutlich länger als dieser. Heparin wird von Mastzellen gebildet und ist ein wichtiges natürlich vorkommendes Antikoagulans, das auch in der Medizin Anwendung findet (Shriver et al. 2012). Das HS ist vor allem als proteingebundenes Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) bedeutsam. HSPG besitzen eine wichtige Funktion innerhalb der Basalmembran, in der sie für eine stabile Struktur sorgen und Zellmigrationen vorbereiten oder als Bestandteil von Vesikeln, in denen sie für die sichere Verpackung der Granula zuständig sind. Sie dienen als Rezeptor oder Co-Rezeptor für zahlreiche Enzyme, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren und unterstützen dadurch die Zelle-zu-Zelle Kommunikation, die Zellbeweglichkeit und auch die Verbindung zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix. Außerdem sind HSPG als Endozytoserezeptoren identifiziert worden und zusammengefasst in vielen menschlichen/tierischen Zellstrukturen, vor allem auf nahezu jeder Zellmembran von Mammaliazellen zu finden (Sarrazin et al. 2011). Genau deshalb gerieten HS, aber auch die übrigen GAG, in den Fokus der Virus-Zellbindungsforschung, darunter auch die Alphaviren. Eine GAG-abhängige Bindungsaktivität konnte bereits für mehrere Alphaviren festgestellt werden, wie z.B. EEEV, SINV, SFV und auch CHIKV (Gardner et al. 2011; Smit et al. 2002; Tanaka et al. 2017; Weber et al. 2017). Für CHIKV konnte gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität zu GAG in Mammaliazellen von Bedeutung ist und in einer erhöhten Pathogenität resultiert. In Moskitozellen allerdings spielen GAG keine Rolle und eine Passagierung auf diesen Zellen führt sogar zum Verlust der Fähigkeit, an zelluläre GAG-Rezeptoren zu binden (Acharya et al. 2015). So scheint die Bindung an zelluläre GAG mit der Virulenz des Virus zu korrelieren (Acharya et al. 2015; Gardner et al. 2011), da das Virus nur für den Wirt, in dem GAG-Rezeptoren genutzt werden, jedoch nicht für den Vektor (keine genutzten GAG-Rezeptoren) pathogen ist. Andererseits konnten auch Zellkultur-adaptierte CHIKV-Stämme identifiziert werden, die eine erhöhte GAG-Abhängigkeit im Bindungsprofil

aufwiesen, jedoch eine geringere Infektiosität zeigten. Diese adaptierten Stämme sind im Zuge einer attenuierten Impfstoffherstellung entstanden und enthielten einige Punktmutationen, die in der erhöhten GAG-Bindung resultierten, jedoch nicht infektiös waren. Die stärkste GAG-Bindung war durch die Mutationen E79K, G82R oder E166K im E2-Glykoprotein aufgetreten, wobei die Mutation G82R die deutlichste Erhöhung verursachte (Gardner et al. 2014; Ashbrook et al. 2014; Silva et al. 2014). Tanaka et al. (2017) konnten für CHIKV herausfinden, dass vor allem die N-Sulfation des zellulären HS und die dazu benötigten Enzyme für die Virusbindung von besonderer Bedeutung sind und dies spezifisch für CHIKV sei. Die O-Sulfation würde erst nach dem Viruseintritt, nämlich während der Replikation eine Rolle spielen.

Mit rekombinanten Proteinen, die eine Domäne des CHIKV E2-Proteins enthielten und in *E.coli* hergestellt wurden, ist das Rezeptor-bindende Glykoprotein E2 genauer untersucht worden. Es konnte herausgefunden werden, dass Domäne C keine Bindungsaktivität gegenüber zellulären Strukturen besitzt. Domäne A und B konnten allerdings eine Zellbindung zeigen, wobei B ausschließlich an zelluläre Glykosaminoglykane band. Domäne A konnte auch an Zellen binden, die keine GAG exprimierten. Dies impliziert die Annahme, dass CHIKV mehrere Strukturen und Wege nutzt, um in die Wirtszelle zu gelangen -einen GAG-abhängigen über Domäne B und einen GAG-unabhängigen über Domäne A (Weber et al. 2017).

1.4 Aktuelle antivirale CHIKV Forschung

Um eine CHIKV-Infektion zu verhindern, gibt es mehrere mögliche Angriffspunkte. So gibt es Forschungen im Bereich der Vektorbekämpfung (Moskitos), der Suche nach natürlichen und synthetischen Stoffen, die während des Viruseintritts, der Replikation oder der Verbreitung neuer Viruspartikel inhibierend wirken (Abb. 13), und der Impfstoffherstellung. Ist es bereits zu einer CHIKV-Infektion gekommen, so wird mit schmerz- und entzündungshemmenden Mitteln versucht, eine überschießende Immunreaktion des betroffenen Organismus zu vermeiden und die klinischen Symptome während der akuten Infektion zu minimieren.

Vektorbekämpfung: Generell wird Reisenden, die in betroffene Gebiete unterwegs sind, sowie auch den dort lebenden Menschen empfohlen, sich vor Moskitos zu schützen. Moskitos sind nicht nur Überträger des CHIKV, sondern auch vieler anderer gefährlicher Infektionskrankheiten (z.B. Dengue), wodurch es erst recht von Bedeutung ist, einen Moskitobiss zu vermeiden. Es wird geraten, sich nicht in Ufernähe von stehenden Gewässern (Laichplätze) aufzuhalten und Spaziergänge auf die Tagstunden zu beschränken. Bei den CHIKV-Überträgermücken *A. aegypti* und *A. albopictus* ist dieses Verhalten allerdings unwirksam. Die domestizierten Moskitoarten suchen sich

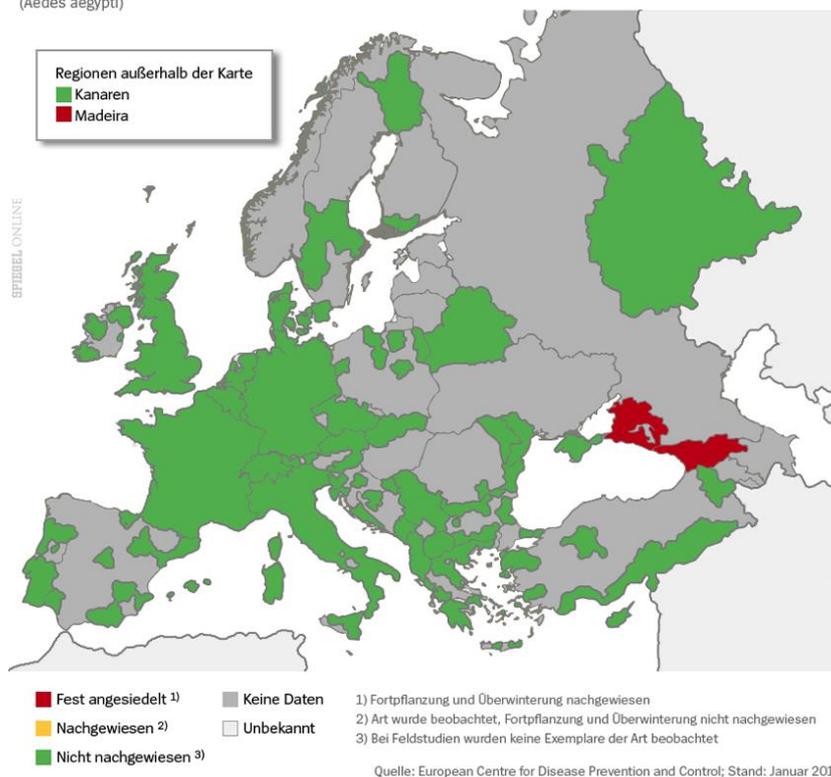
menschennahe Laichplätze, wie z.B. die Regentonne aus. Zudem sind die stechenden Weibchen sowohl tag-, als auch dämmerungsaktiv (Coffey et al. 2014).

Weiterhin sollen Anti-Moskito-Kleidung (stichfeste, lange und helle Kleidung) sowie das Schlafen unter einem Moskitonetz helfen. Körpernah sollen Insektenschutzsprays, die den chemischen Wirkstoff DEET (Diethyltoluamid) enthalten, genutzt werden (www.tropeninstitut.de).

Außerdem soll der Vektor direkt bekämpft und nicht nur der Biss unterbunden werden. Ein Beispiel der Moskitobekämpfung lieferte die Stadt Heidelberg. In Italien ist die asiatische Tigermücke festangesiedelt und in Hessen entlang der Autobahn A5 (Basel-Frankfurt) bereits nachgewiesen worden. Dies führte dazu, dass seit 2016 in Heidelberg sterilisierte asiatische Tigermücken ausgesetzt wurden, die, durch die Verdrängung der zeugungsfähigen Männchen, weitere Nachkommen verhindern und die Mückenpopulation auf lange Sicht eindämmen bzw. ausrotten sollen (www.spiegel.de).

A) Gelbfiebermücke

(*Aedes aegypti*)



B) Asiatische Tigermücke

(Aedes albopictus)

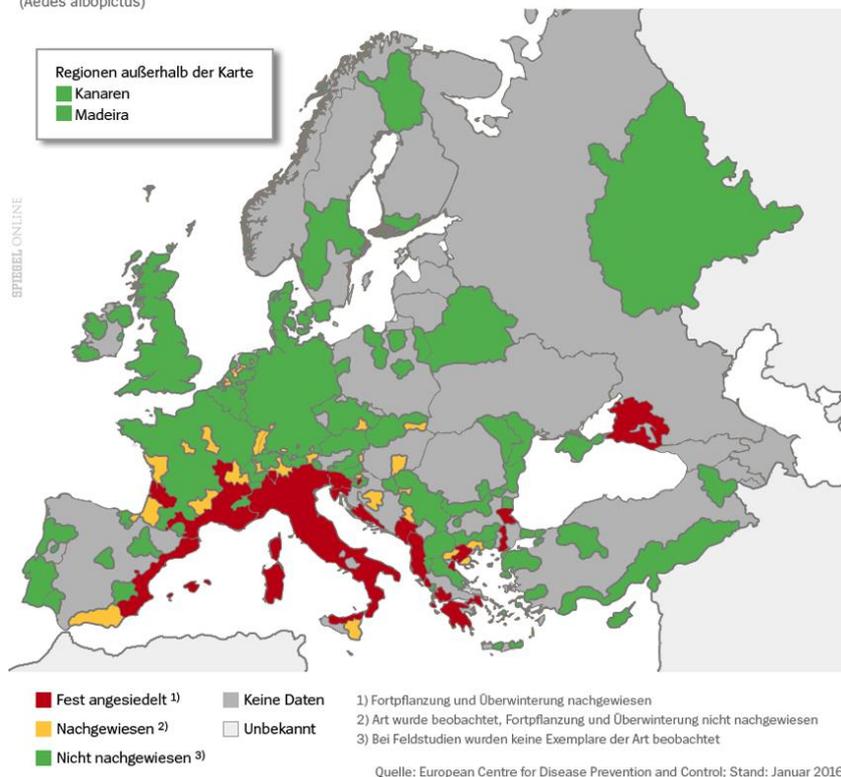


Abb. 12 Aktuelle globale Verteilung der Überträgermoskitoarten A) *Aedes aegypti* und B) *Aedes albopictus*

CHIKV-inhibierende Stoffe: Als Beispiel für einen natürlich-hemmenden Stoff konnte ein Catechin des grünen Tees identifiziert werden. Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) ist die Hauptkomponente des grünen Tees und zeigte hemmende Eigenschaften auf den CHIKV-Zelleintritt (Weber et al. 2015b). Zuvor konnte für EGCG schon bei mehreren Virusinfektionen sowie beim Tumorwachstum eine inhibierende Wirkung nachgewiesen werden. Zudem soll es zur Verhinderung von Arteriosklerose beitragen (Babu und Liu 2008; Hong et al. 2017) und einen positiven Effekt in der Behandlung von Alzheimer- oder Parkinson-Erkrankung haben. Weiterhin wirkt es antioxidativ und reguliert die Cholesterinaufnahme (Xicota et al. 2017). Die Wirkungsweise des ECGC als CHIKV-Zelleintrittshemmer beruht auf der kompetitiven Bindung der zellulären CHIKV-Rezeptoren Heperansulfat und die Sialinsäure (van Duijl-Richter et al. 2015). Allerdings scheint es weitere Rezeptoren zu geben, die für einen Zelleintritt des Virus sorgen (Weber et al. 2017). Als weitere Kandidaten, die die Wirtszellrezeptorbindung des Virus stören, sind Flavagline (Naturprodukt aus Pflanzen des Genus *Aglaia*), die mit dem Rezeptor Prohibitin interagieren, und neutralisierende monoklonale Antikörper, die vor allem gegen Areale der Domänen A und B des E2-Hüllproteins gerichtet sind, zu nennen (van Duijl-Richter et al. 2015).

Stoffe, die eine 10-*H* Phenothiazin-Struktur aufweisen (z.B. Chlorpromazin, ein antipsychotisches Arzneimittel), konnten die Clathrin-abhängige Endozytose stören (van

Duijl-Richter et al. 2015), jedoch wurde auch über eine Clathrin-unabhängige Endozytose berichtet (Bernard et al. 2010).

Suramin ist ein Antiprotozoikum, das unter dem Namen Germanin oder Bayer-205 als therapeutisches Mittel gegen Trypanosomenkrankheiten eingesetzt wird. Eine inhibierende Wirkung auf die frühen Phasen der Infektion sowie der extrazellulären Verbreitung verschiedener Viren, darunter auch CHIKV, konnte Suramin außerdem zugesprochen werden (Albulescu et al. 2015; Ho et al. 2015; Henß et al. 2016). Auch Arbidol, ein in Russland zugelassenes Medikament zur Vermeidung der Influenza-Infektion, und seine Derivate scheinen die Membranfusion während der CHIKV-Infektion verhindern zu können (Delogu et al. 2011).

Monoklonale Antikörper, die den E2/E1-Heterodimer auf der Virushülle stabilisieren und somit das Freilegen der Fusionsschleife von E1 verhindern, wirken ebenso einer Membranfusion entgegen. Monoklonale Antikörper, die gegen die ASR des E2-Proteins gerichtet sind, verhindern die Konformationsänderung, die als Reaktion auf die pH-Wert-Absenkung erfolgt (Selvarajah et al. 2013; van Duijl-Richter et al. 2015) (Abb. 13).

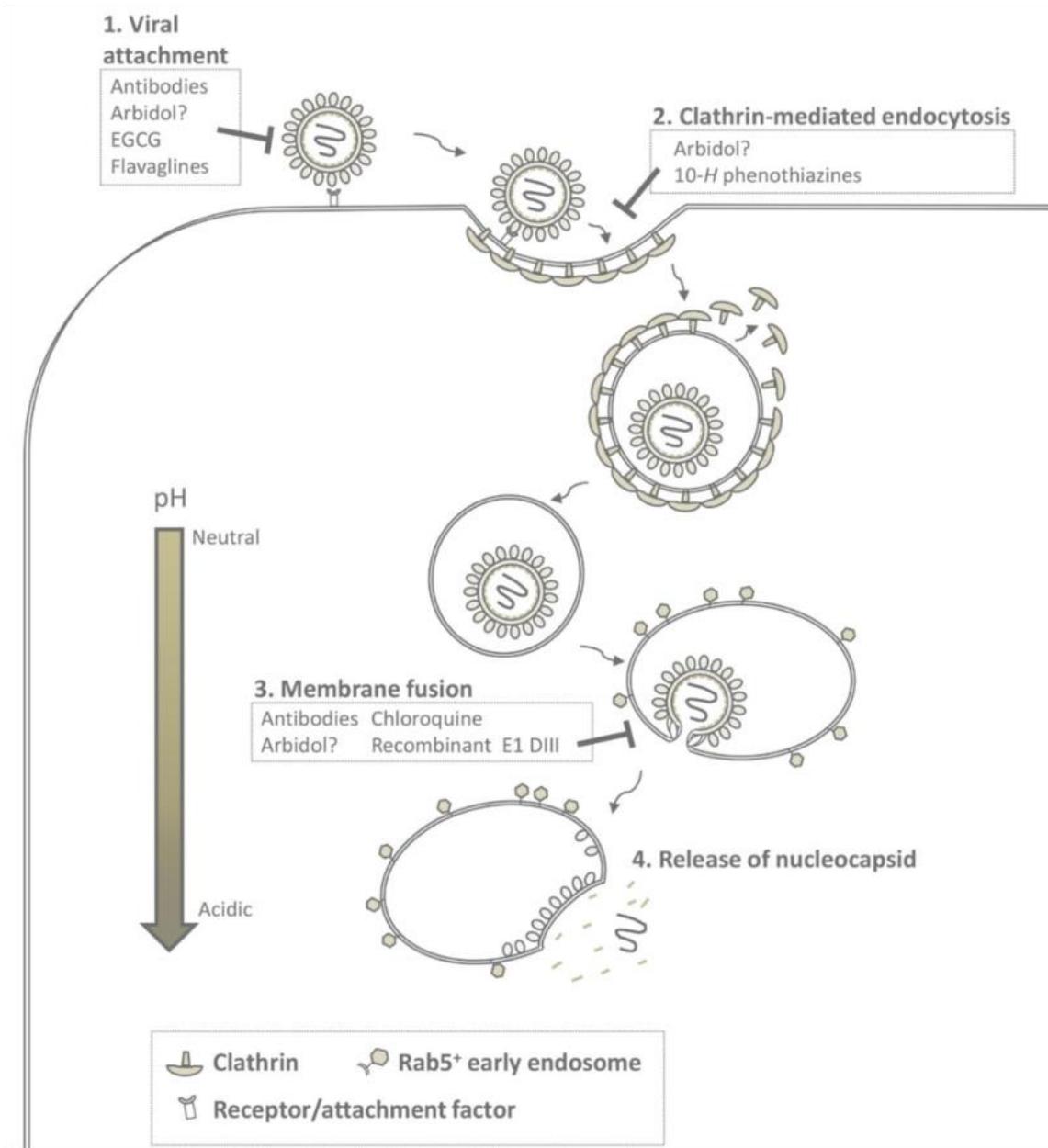


Abb. 13 Zelleintritt des CHIKV und mögliche Inhibitoren

Gezeigt sind der Eintrittsprozess, bestehend aus Rezeptorbindung, Endozytose, Membranfusion und der Entlassung des Nukleokapsid ins Zytoplasma der Wirtszelle sowie mögliche Inhibitoren, die an verschiedenen Stellen des Zelleintritts wirken. (van Duijl-Richter et al. 2015)

Impfstoffe: Es gibt mehrere Strategien einen Impfstoff herzustellen, aus denen dann attenuierte Lebendvakzine, Totimpfstoffe, Impfstoffe aus rekombinanten Proteinen oder virusähnlichen Partikeln und auch DNA-Vakzine entstehen (Caglioti et al. 2013). Ein Impfstoff muss sicher sein und darf keine Infektionen bzw. starke Nebenwirkungen verursachen. Außerdem sollte er wirksam sein und eine gute humorale sowie im besten Falle auch zelluläre Immunantwort auslösen (Rudd und Mahalingam 2015). Auch für CHIKV gibt es mehrere Ansätze in der Impfstoffherstellung, doch bis jetzt ist noch kein Impfstoffkandidat lizenziert und kommerziell vermarktet worden (Weaver und Lecuit 2015). Der attenuierte Lebendimpfstoff CHIKV181/25 durchlief Phase II der klinischen Prüfung und führte schon nach einmaliger Injektion zur Bildung großer Mengen neutralisierender Antikörper. Allerdings führte eine Vakzinierung mit diesem Impfkandidat in 8% der Fälle zu milden, transienten Arthritiden und damit schwand das Interesse an weiterführenden Untersuchungen zu diesem Vakzinestamm (Edelman et al. 2000; Gorchakov et al. 2012). Chimäre CHIKV-Impfstoffe auf der Basis eines attenuierten VEEV-Stamms oder des Pocken-Impfstoffs MVA zeigten gute Ergebnisse bezüglich der Immunantwort im Tiermodell (Rudd und Mahalingam 2015; Wang et al. 2008; Ramsauer et al. 2015). Genauso wie der CHIKV/IRES Impfstoffkandidat, bei dem die Expression der CHIKV-Strukturproteine durch die internale ribosomale Eintrittsstelle (IRES) des Enzephalomyokarditis Virus (EMV) verändert wurde (Plante et al. 2011; Caglioti et al. 2013). Eine weitere Variante, die zudem eine gute Sicherheit bietet, ist die Impfung mit Virus-ähnlichen Partikeln (virus like particle = VLP). Bei den VLP werden nur Teile des Virus zur Impfung genutzt. Im Falle von CHIKV wurden VLP hergestellt, welche die Strukturproteine Kapsidprotein sowie die beiden Glykoproteine E1 und E2 beinhalten. Aufgrund neutralisierender Antikörper, die vor allem gegen die beiden Glykoproteine gerichtet sind, können Organismen vor einer CHIKV-Infektion geschützt werden. Schon die Virusanheftung an die Wirtszelle sowie der Eintritt in die Wirtszelle können unterbunden werden, da die neutralisierten Glykoproteine für die Rezeptorbindung und Membranfusion verantwortlich sind (Akahata et al. 2010). Ein VLP-basierender, sowie ein rekombinanter Impfstoff auf Basis von MVA befinden sich in Phase I der klinischen Prüfungen (Ramsauer et al. 2015; Akahata und Nabel 2012; Chang et al. 2014).

2. Ziel der Arbeit

Das Chikungunya Virus (CHIKV) wird von Stechmücken der Gattung *Aedes* übertragen und verursacht das Chikungunya-Fieber in Menschen. Erkrankte Personen leiden an grippeähnlichen Symptomen, die nach kurzer Dauer überstanden sind, wenn das intakte Immunsystem das Virus erfolgreich bekämpfen konnte. Andererseits kann eine Infektion in 30-40% auch zu chronisch-rezidivierenden Arthritiden führen. Es sind weder spezifische Medikamente, noch ein wirksamer Impfstoff kommerziell erhältlich, so dass Betroffene nur symptomatisch behandelt werden können.

CHIKV, ein Alphavirus, dringt über rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle ein. Hierfür sind die Glykoproteine E1 (Membranfusion) und E2 (Rezeptorbindung) verantwortlich. Unbekannt ist weiterhin, an welche zellulären Strukturen das Virus bindet und somit die Endozytose startet. Um effektive antivirale Mittel zu erfassen, ist es von besonderer Bedeutung, den viralen Zyklus im Detail zu kennen. Daraus ergibt sich die Zielsetzung dieser Arbeit. Im Fokus stand vor allem der virale Zelleintritt, im speziellen die Virus-Zellbindung, wodurch die Funktion und Wirkungsweise des Glykoproteins E2 genauer betrachtet wurde. E2 besteht aus drei Domänen (A, B, C), die untereinander über einen β -ribbon-connector verbunden sind. Diese einzelnen Domänen weisen unterschiedliche Zell-Bindungsaktivitäten auf. Außerdem wurde die Rolle der Glykosaminoglykane genauer betrachtet, da diese schon als Rezeptor für Alphaviren identifiziert wurden. In zuvor durchgeführten Bindungsversuchen konnte mit in *E.coli* generierten, rekombinanten Proteinen, folgende Bindungsaktivitäten aufgezeigt werden. Domäne C zeigte keine Bindungsaktivität, wohingegen Domäne B ausschließlich glykosaminoglykanabhängig an eukaryotische Zellen gebunden hatte. Auch Domäne A zeigte eine Bindung an eukaryotische Zellen, jedoch nur teilweise glykosaminoglykanabhängig.

In dieser Arbeit sollten neue Fusionsproteine, die einzelne Domänen (mit oder ohne β -ribbon-connector, bzw. nur β -ribbon-connector) fusioniert mit dem Fc-Teil eines humanen IgG Antikörpers beinhalten, generiert und erneut Bindungsexperimente durchgeführt werden. Die Herstellung von Fusionsproteinen vereinfachte zum einen ihre Produktion und Aufreinigung, zum anderen unterstützte sie durch ihre Generierung in eukaryotischen Zellen die richtige Faltung und gegebenenfalls die Glykosylierung der Proteine. Somit konnten bereits getroffene Aussagen zum Teil verifiziert und mit weiteren Experimenten die Bindungsaktivität von Domäne A und des β -ribbon-connectors genauer untersucht werden. Die Bindung von Domäne A wurde zudem durch die Einführung von Punktmutation weiter analysiert. Bei einem attenuierten Virus wurden diese Punktmutationen entdeckt und resultierten dort in einer erhöhten GAG-abhängigen Bindung des Virus. In dieser Arbeit wurde dieses Ereignis auf Proteinebene untersucht.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Untersuchung des β -ribbon-connectors, der die Säure-sensitive Region (ASR) beinhaltet und an den neutralisierende Antikörper binden. Neu generierten Fusionsproteine, die den β -ribbon-connector alleine oder in Kombination mit einzelnen E2-Domänen beinhalteten, wurden überprüft.

Zusammengefasst sollten mit den Bindungsexperimenten die Virusbindung an die Zelle charakterisiert werden. Das verbesserte Verständnis des Zelleintritts stellt die Basis der Entwicklung und Optimierung von Epitopen für Impfstoffe und Angriffspunkte für Inhibitoren dar.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Viren, Mikroorganismen und Zelllinien

3.1.1.1 Viren

CHIKV-luci

(Henß et al. 2016)

3.1.1.2 Bakterien

Alle verwandten Mikroorganismen sind *E. coli* K12 Derivate.

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Referenz</u>
DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r κ^- m κ^+), λ^-	NEB, (Frankfurt/Main)
Top 10	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen (Karlsruhe)
XL10-Gold ultrakompetent cells	TetrD (mcrA) 183 D (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac The [F'proAB lacIqZDM15 Tn10(Tetr) Amy Camr]	Agilent Technologies (Böblingen)

3.1.1.3 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Medium</u>	<u>Referenz</u>
CHO-K1	chinesischer Hamster ovariale Epithelzellen	F-12; 10% FCS, 2mM Glutamin	Mhairi Ferguson, Pirbright Institute, UK
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen, stabil transfiziert mit pcDNA3.1	DMEM; 10% FCS; 2mM Glutamin	ATCC: CRL-1573
CHO pgsA-745	chinesischer Hamster ovariale Epithelzellen; CHO-K1-Derivat; Xylosyltransferase-Mangel → keine Proteoglykansynthese	F-12; 10% FCS, 2mM Glutamin	Mhairi Ferguson, Pirbright Institute, UK

3.1.2 Medien

3.1.2.1 Medien und Zusätze für die Zellkultur

100x Penicillin Streptomycin	Lonza AG (Köln)
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Biochrom AG (Berlin)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biowest (Renningen)
Ham's F-12 Nutrient Mix	Gibco (Invitrogen, Karlsruhe)
L-Glutamin, 200mM	Lonza AG (Köln)
Opti-MEM® I <i>Reduced Serum Media</i>	Gibco; via Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Phosphate-buffered salt solution</i> (PBS- Dulbecco)	Abteilung 3/3 (Paul-Ehrlich-Institut)
RPMI 1640	Biochrom AG (Berlin)
Trypsin/EDTA	Lonza AG (Köln)

3.1.2.2 Medien für Mikroorganismen

<u>Name</u>	<u>Bezogen von</u>
LB (lysogeny broth) Medium	Abteilung 3/3 (Paul-Ehrlich-Institut)
LB Agarplatten + Ampicillin	Abteilung 3/3 (Paul-Ehrlich-Institut)
SOC Medium	Abteilung 3/3 (Paul-Ehrlich-Institut)

3.1.3 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Agarose (SeaKem® ME)	Lonza AG (Cologne)
Amoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Bovines Serum Albumin (BSA, 10mg/ml)	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Britelite	Perkin Elmer (Rodgau)
Bromophenol blue	Merck KGaA (Darmstadt)
Citronensäure	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio-Rad Laboratories GmbH (Munich)
Deoxyribonucleotide (dNTPs)	Qiagen (Hilden)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
DNA Ladepuffer	Fermentas (Schwerte)
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Ethanol	Materiallager (Paul-Ehrlich-Institute)
EZ Vision	MoBiTec (Göttingen); AMRESCO
Gelred	VWR (Darmstadt; Biotium)
Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific (Dreieich)
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
H ₂ O _{bidest.} ("Reinstwasser")	Section 3/3 (Paul-Ehrlich-Institut)
Heparansulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Heparin Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare (Frankfurt/Main)
Isopropanol	Materiallager (Paul-Ehrlich-Institut)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Lumi-Light Western Blot Substrate	Roche (Mannheim)
Methanol	Materiallager (Paul-Ehrlich-Institut)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Natriumphosphat	Merck (Darmstadt)
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin	Gibco; via Invitrogen (Karlsruhe)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific (Dreieich); Finnzymes
Pierce™ Protein A Agarose	Thermo Scientific (Dreieich)
Roti®-Block	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Life Technologies GmbH (Darmstadt)

T4 DNA Ligase	NEB (Frankfurt/Main)
T4 DNA Polymerase	NEB (Frankfurt/Main)
Taq Polymerase	Qiagen (Hilden)
Tetramethyldiamin (UltraPure™ TEMED)	Invitrogen (Karlsruhe)
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
TRIS-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
TrueBlue	KPL (Gaithersburg, USA)
Trypan blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

3.1.4 Restriktionsenzyme

Apa I	NEB
Bam HI-HF	NEB
Dpn I	Promega
EcoR I-HF	NEB
Nco I-HF	NEB
Nhe I-HF	NEB
Xba I	NEB
Xho I	NEB

3.1.5 Kits

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	ThermoFisher Scientific GmbH (Schwerte)
KOD Hot Start	Novagen (Merck KGaA, Darmstadt)
NucleoBond® Xtra Maxi Plus	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase Kit	NEB (Frankfurt/Main)
Pierce® Silver Stain for Mass Spectrometry	Thermo Scientific (Dreieich)
Pierce® BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific GmbH (Schwerte)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
BD Cytotfix/Cytoperm	BD (Heidelberg)

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Sekundäre Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Herkunftsspezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Referenz</u>
α -human-IgG- γ -chain-HRP	Ziege	WB: 1:2500	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
α -human-IgG-FITC	Ziege	FACS: 1:50	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd (Suffolk)

3.1.7 Plasmide

<u>Name</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Referenz</u>
pBabe Puro	Ampicillin, Puromycin, SV40 Promotor	Katja Sliva (PEI, Abteilung 2/2)
pBabe Puro Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G	Ampicillin, Puromycin, SV40 Promotor, Fc-CHIKV E2 Domäne A	Diese Arbeit
pBabe Puro Fc-CHIKV E2 Domäne B	Ampicillin, Puromycin, SV40 Promotor, Fc-CHIKV E2 Domäne B	Diese Arbeit
pBabe Puro Fc-CHIKV E2 Domäne C	Ampicillin, Puromycin, SV40 Promotor, Fc-CHIKV E2 Domäne C	Diese Arbeit
pBabe Puro Fc-CHIKV E2 Domäne A- β E79G	Ampicillin, Puromycin, SV40 Promotor, Fc-CHIKV E2 Domäne A- β	Diese Arbeit
pBabe Puro Fc	Ampicillin, Puromycin, SV40 Promotor, Fc-Teil (humanes IgG)	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP (TS153 5 3)	Ampicillin, Neomycin; CMV Promoter, SV40 Promoter; Fc-Teil (humanes IgG)	Stefan Dübel (TU Braunschweig)
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A G79E	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV E2 Domäne A G79E	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A E79G	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV E2 Domäne A E79G	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A E79G E166K	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV Domäne A E166K	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A G79K	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV Domäne A G79K	Diese Arbeit

pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A G79E G82R	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV Domäne A G82R	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A ohne β -ribbon- connector (A- β) G79E	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV Domäne A ohne β - ribbon-connector	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne B	Ampicillin, Neomycin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV Domäne B	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne B + β -ribbon-connector	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV Domäne B + β -ribbon- connector	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne C	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV Domäne C	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV E2 Dom A G79E N263A	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV Domäne A ohne Glykosylierungsstelle	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV E2 gesamt	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV E2 gesamt, E79G	Diese Arbeit
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV E2ecto	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); E2 ecto, E79G	(Weber et al. 2017)
pCMV2.5-hIgG1-Fc-XP-CHIKV β -ribbon-connector	Ampicillin; CMV Promoter; C-term. Fc-Teil (humanes IgG); CHIKV β -ribbon-connector	Diese Arbeit
pET-15b-CHIKV E2 Dom A E166K	Ampicillin; T7 promoter; N-term. His-tag; lac-operon; CHIKV E2 Domäne A, Mutation E79G E166K	(Weber et al. 2017)
pET-15b-CHIKV E2 Dom A G79K	Ampicillin; T7 promoter; N-term. His-tag; lac-operon; CHIKV E2 Domäne A, Mutation G79K	(Weber et al. 2017)

pET-15b-CHIKV E2 Dom A G82R	Ampicillin; T7 promoter; N-term. His-tag; lac-operon; CHIKV E2 Domäne A, Mutation E79G G82R	(Weber et al. 2017)
pET-15b-CHIKV E2 Domäne A	Ampicillin; T7 promoter; N-term. His-tag; lac-operon; CHIKV E2 Domäne A E79G	(Weber et al. 2017)
pET-15b-CHIKV E2 Domäne B	Ampicillin; T7 promoter; N-term. His-tag; lac-operon; CHIKV E2 Domäne B	(Weber et al. 2017)
pET-15b-CHIKV E2 Domäne C	Ampicillin; T7 promoter; N-term. His-tag; lac-operon; CHIKV E2 Domäne C	(Weber et al. 2017)
pHIT60	MLV, gag-pol	(Soneoka et al. 1995)
pHITG	Ampicillin; VSV-G	(Soneoka et al. 1995)

3.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Primer) wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Die folgenden Primer wurden bei der PCR eingesetzt um die angegebenen Domänen abzulesen. Außerdem ist in jedem Primer eine Sequenz für ein spezifisches Restriktionsenzym enthalten, was für die Klonierung von Bedeutung ist.

<u>Name</u>	<u>Sequenz für</u>	<u>Sequenz</u> 5' nach 3'
CHIKV E2 Domäne A fw	Apa I Domäne A+ β -ribbon- connector	AAAAGGGCCCAGCACCAAGGACAACCTTCAAC
CHIKV E2 Domäne A rev	Nhe I Domäne A+ β -ribbon- connector	AAAAGCTAGCCTTGGGCACCATGCAGGTC
CHIKV E2 Domäne B fw	Apa I Domäne B	AAAAGGGCCCCCGACACCCCGATAGAA
CHIKV E2 Domäne B rev	Nhe I Domäne B	AAAAGCTAGCGGTCACGGCGGCGTGGC
CHIKV E2 Domäne C fw	Apa I Domäne C	AAAAGGGCCCGCCCGGAACCCTACCGTG
CHIKV E2 Domäne C rev	Nhe I Domäne C	AAAAGCTAGCCTGGGGCCAGTACTTGTAGG
CHIKV E2 Domäne A- β rev	Nhe I Domäne A ohne β - ribbon-connector	AAAAGCTAGCGGGGTCGTGGTGAAGGG
CHIKV E2 + Fc fw	BamH I Fusionsprotein E2 Domäne + Fc	AAAAGGATCCATGGGATGGAGCTGTATCATC
CHIKV E2 + Fc rev	EcoR I Fusionsprotein E2 Domäne + Fc	AAAAGAATTCTTATTTACCCGGGGACAGGG
CHIKV E2 β - ribbon- connector fw	Apa I β -ribbon-connector	AAAAGGGCCCCCGTGATCGGCAGAGAGAA G
CHIKV E2	Nhe I	AAAAGCTAGCCTTGGGCACCATGCAGGTCAC

Domäne A-Gly rev	Domäne A+ β -ribbon- connector, ohne Glykosylierungsstelle	CGGGGCC
wt-G79E for	Mutagenese PCR Domäne A „Rückmutation“ G79E	CACATCCCCGCCGACGCCGAGAGAGCCGGA CTGTTTGTGC
wt-G79E rev	Mutagenese PCR Domäne A „Rückmutation“ G79E	GCACAAACAGTCCGGCTCTCTCGGCGTCGGC GGGGATGTG

Die nachfolgend aufgelisteten Primer wurden für die Sequenzierungen genutzt, die von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt wurden.

<u>Name</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Sequenz</u> 5' nach 3'
CMV for	Fusionsprotein E2 Domäne + Fc	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
Fusion rev	Fusionsprotein E2 Domäne + Fc	CAGGAGTTCAGGTGCTGG
pBabe5 (fw)	Stabile Zellen Fusionsprotein in pBabe	CTTTATCCAGCCCTCAC
pBabe3 (rev)	Stabile Zellen Fusionsprotein in pBabe	ACCCTAACTGACACACATTCC

3.1.9 Puffer, Lösungen und Färbungen

3.1.9.1 Puffer für DNA Agarosegele

<u>Name</u>	<u>Bezogen von/ Herstellungsrezept</u>
TAE Puffer	Abteilung 3/3 (Paul-Ehrlich-Institut)

3.1.9.2 Puffer für die Protein A Aufreinigung und Heparin Sepharose Bindungsversuch

<u>Name</u>	<u>Bezogen von/ Herstellungsrezept</u>
Binde-/Wasch-Puffer	20mM Natriumphosphat, pH 7
Elutions-Puffer	0.1M Citronensäure, pH 2,5
Neutralisations-Puffer	1M Tris, pH 9,0

3.1.9.3 Puffer für Zellysate

<u>Name</u>	<u>Bezogen von/ Herstellungsrezept</u>
Lysis-Puffer	1% Nonidet P-40, 50mM TRIS-HCl pH 7.5 , 5mM EGTA, 150mM NaCl, 40 µl/ml Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim)

3.1.9.4 SDS-Page

<u>Name</u>	<u>Bezogen von/ Herstellungsrezept</u>
SDS-Lauf-Puffer (10x)	Abteilung 3/3 (Paul-Ehrlich-Institut)
Sammelgel-Puffer	500mM TRIS-HCl, 0.4% SDS, pH6.8
Trenngel-Puffer	1.5M Tris, 0.4% SDS, pH8.8
SDS-Lade-Puffer (4x)	200mM TRIS-HCl (pH6.8), 8% SDS, 40% Glycerol, 0.2% Bromophenol blue, 4% β -Mercaptoethanol (frisch dazugeben)
Sammelgel (5%)	0.9 ml Sammelgel- Puffer, 2.2 ml H ₂ O, 0.6 ml Rotiphorese® Gel 30, 20 μ l APS (10%), 5 μ l TEMED
Trenngel (12.5%)	2.3 ml Trenngel-Puffer, 3.1 ml H ₂ O, 3.9 ml Rotiphorese® Gel 30, 95 μ l APS (10%), 5 μ l TEMED

3.1.9.5 Coomassie Färbung

<u>Name</u>	<u>Bezogen von/ Herstellungsrezept</u>
Coomassie Färbelösung	0.125% Coomassie Brilliant Blue G250, 50% Methanol, 10% Essigsäure
Coomassie Entfärber I	50% Methanol, 10 % Essigsäure
Coomassie Entfärber II	5 % Methanol, 7.5% Essigsäure

3.1.10 Laborausüstung

<u>Gerät</u>	<u>Handelsname</u>	<u>Hersteller</u>
Agarosegel Apparatur	Mini Horizontal Submarine Unit	Hoefer (Holliston, USA)
Autoklav	Varioklav	H+P (Oberschleissheim)
Brutschrank (Bakterien)	Innova 4200 incubator shaker	New Brunswick scientific (Eppendorf, Hamburg)
Brutschrank (Zellkultur)	BBD 6220	Hereaus Sorvall (Hanau)
Chemilumineszenz Detektion System	Fusion FX-7	Vilber (Eberhardzell)
Sicherheitswerkbank	Sterilgard III Advanced	The Baker Company (Sanford, USA)
DNA-Konzentrationsmesser	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher (Schwerte)
Eismaschine	AF80	Scotsman (Vernon Hills, USA)
Durchflusszytometer (FACS)	BD LSR II SORP	BD (Heidelberg)
Kühl-Gefrierkombination	4°C/-20°C	Liebherr (Biberach)
Gefrierschrank	-80°C	Heraeus Sorvall (Hanau)
Luciferase-Signal-Detektor	PHERASTAR	BMG LABTECH (Ortenberg)
Matrix Pipette für 384-well Platten	Matrix Multichannel Equalizer Electronic Pipette 125 µl	Thermo Scientific (Dreieich)
Microplattenleser	GENios Microplate Reader	(Tecan)
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss AG (Göttingen)
Mikrowelle	-	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe)
N ₂ -Tank	Chronos/Apollo	Messer Group (Sulzbach)
Pipet Boy	pipetus®	Integra Biosciences (Fernwald)
Roller Mixer	RollerMixer SRT6	Stuart (Asbach)
Rotator (Eppi-Rotator)	Rotator SB3	Stuart (Asbach)
SDS-PAGE Kammer	Mini PROTEAN 3/tetra system	BioRad (Munich)
Semi-dry Western blot Apparatur	Trans-Blot SD semi-dry transfer cell	BioRad (Munich)

Thermocycler	Professional Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Thermomixer	Compact or comfort	Eppendorf (Hamburg)
UV-Detektor	Gel iX Imager	Intas (Göttingen)
Überkopfschüttler	Heidolph Reax 2	Heidolph Instruments Labortechnik (Schwabach)
Vacuumpumpe	Vacuboy	Integra Biosciences (Fernwald)
Vortexer	Vibrofix VF1 electronic	IKA (Staufen)
Waage	LA1200S	Sartorius (Göttingen)
	TE214S-OCE	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	System 1068	GFL (Burgwedel)
Zellzähler	Z1 Coulter Particle Counter	Beckman Coulter (Brea, USA)
Zentrifugen	RC 26 Plus (Rotor SLA-1500)	Heraeus Sorvall (Hanau)
	Eppendorf 5810R (Rotor A-4-62)	Eppendorf (Hamburg)
	Biofuge fresco (Rotor 3325B)	Heraeus Sorvall (Hanau)
	Eppendorf 5415R (Rotor F-45-18-11)	Eppendorf (Hamburg)
	Galaxy MiniStar	VWR (Darmstadt)
	Biofuge primo R (Rotor 7590)	Heraeus Sorvall (Hanau)
	Megafuge 1.0 R	Heraeus Sorvall (Hanau)
	Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Scientific
	Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)

3.1.11 Verbrauchsmaterial

<u>Material</u>	<u>Handelsname</u>	<u>Hersteller</u>
10 cm Schalen	-	Sarstedt,(Nümbrecht)
384 well Filterspitzen	Matrix Filterspitzen, 125 µl	VWR (Darmstadt)
384 well Platten	CELLSTAR 384-well microtiterplate	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Dialysekammer	Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes; 3.5, 10.0, 20.0 kDa	Thermo Scientific (Dreieich)
FACS tubes	5ml	BD (Heidelberg)
Flächendesinfektionsmittel	Terralin	Schülke & Mayr (Norderstedt)
Glaspipetten	25 ml, 10 ml, 5 ml	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Handschuhe	Latex	Braun (Sempach, Switzerland)
Hautdesinfektion	Desderman	Schülke & Mayr (Norderstedt)
Kanülen	25G	Braun (Sempach, Switzerland)
Kryoröhrchen	1.8 ml	Greiner (Kremsmünster, Austria)
Microwell-Platte 96 U	TC microwell 96U	Thermo Scientific (Dreieich)
Mikroliter Pipetten	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Mundschutz	Coldex	Attends (Schwalbach)
Pipettenspitzen	1 ml, 200 µl, 20 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen mit Filter	1 ml, 200 µl, 100 µl, 10 µl	Nerbe Plus (Winsen/Luhe)
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Immobilon®-P	Millipore (Bedford, USA)
Reagenzglas	15 ml and 50 ml PP tubes	Greiner (Kremsmünster, Austria)
Reaktionsgefäße	1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf (Hamburg)
Skalpell	-	Braun (Sempach, Switzerland)

Reservoir (sterile) Spritzen	55 ml PS sterile solution basin 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Roth (Karlsruhe) Braun (Sempach, Switzerland) Amsterdam (Netherlands)
Sterile Filter, 0.45 µm (für Flaschen)	-	
Sterile Filter, 0.45 µm (für Spritzen)	-	Sartorius (Göttingen)
Sterilfilter, 0.2 µm (für Spritzen)	-	Sartorius (Göttingen)
Tubes für Bakterienkulturen	-	Sarstedt (Nümbrecht)
Whatman Papier	-	Hartenstein (Würzburg)
Zellkulturflaschen	T25, T75, T175	Greiner (Kremsmünster, Austria)
Zellkulturplatten	6-, 12-, 24-, 96-wells	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellscharber	Cell scraper 39 cm	VWR (Darmstadt)

3.1.12 Software

FACS Analyse	BD FACSDiva™ Software Version 6.1.3;
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS3
Plasmidkarten	VectorNTI Suite 9
Statistische Auswertungsprogramme	Microsoft Office 2010; GraphPad Prism 7
Western Blot Analyse	Fusion FX-7

3.1.13 Internet tools

Internetseite

Verwendung

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

Vergleichen von DNA- und Proteinsequenzen

http://www.bioinformatics.org/sms/rev_com_p.html

Reverse und/ oder complement DNA Sequenzen

<http://web.expasy.org/translate/>

Übersetzung von DNA- in Proteinsequenz

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

Virtueller Verdau von DNA-Sequenzen

<http://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>

Informationen zum Verdau mit zwei Restriktionsenzymen von NEB

http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/comp_mv.shtml

Zum Errechnen des Molekulargewichts von Proteinen

http://web.expasy.org/compute_pi/

Berechnung des isoelektrischen Punkts von Proteinen

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

Die mikrobiologischen Methoden beschreiben die Arbeit mit Mikroorganismen und die Nutzung deren Eigenschaften, wie z.B. ein schnelles Wachstum.

In dieser Arbeit wurden *E.Coli*-Stämme benutzt, um in kurzer Zeit große Mengen an Plasmiden und/oder Proteinen zu gewinnen. Die Bakterien wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C und 220 rpm (rounds/minute) für mindestens 16 h kultiviert.

3.2.1.1 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in (kompetente) Bakterienzellen. Die Kompetenz von Zellen wird an ihrer Bereitschaft, fremdes genetisches Material aufzunehmen, gemessen. Zellen, die keine natürliche Kompetenz aufweisen, können mithilfe von chemischen, elektromechanischen oder physikalischen Verfahren kompetent gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden *E.coli*-Derivate verwendet. Die jeweilige zu transformierende DNA enthielt das Ampicillin-Resistenzgen in ihrer Sequenz, wodurch Nährmedien mit Ampicillinzusatz für ein selektives Wachstum genutzt werden konnten.

Für die jeweilige Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA, bei einer Ligation der gesamte Ligationsansatz, wurde hinzugefügt und 30 min mit den Bakterienzellen auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 sec wurde der Ansatz sofort wieder für 2 min auf Eis transferiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 500 µl SOC-Medium und die Inkubation für 1 h bei 37°C. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf die Agarplatte pipettiert und mithilfe eines Spatels ausplattiert. Die getrocknete Agarplatte lagerte über Nacht bei 37°C bzw. über Tage bei Raumtemperatur.

3.2.1.2 DNA Vervielfältigung und DNA-Präparation aus *E.coli*-Stämmen

Transformierte *E.coli*-Stämme wurden kultiviert, um eine hohe Konzentration an Plasmid-DNA oder gewünschtes Protein zu erhalten. LB-Medium wurde als Nährmedium der Bakterien genutzt. Dem LB-Medium können, bei Vorhandensein eines Resistenzgens, Antibiotikazusätze für das selektive Wachstum hinzugefügt werden. Alle genutzten Plasmide

beinhalteten ein Ampicillin-Resistenzgen, sodass Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml dem Nährmedium zugesetzt werden konnte.

Für die Präparation von nur geringen Plasmid-DNA-Konzentrationen, z. B. bei der Suche nach einem positiven Klonierungsergebnis, wurde nach der Transformation von kompetenten *E.coli*-Stämmen einzelne Klone ausgewählt und in 5 ml LB-Medium + Ampicillin über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kultivierung wurde in 5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Dann erfolgte die DNA-Präparation nach Anleitung des verwendeten GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits (Thermo Scientific).

Für eine größere DNA-Ausbeute, wurden 400 ml LB-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben verwendet. Zur Präparation wurde das NucleoBond® Xtra Maxi Plus Kit (Macherey-Nagel) genutzt und nach dessen Anleitung vorgegangen.

3.2.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen. Im Arbeitsraum herrschte Pflicht zum Tragen von Schutzkleidung, welche Arbeitskittel, Handschuhe und Mundschutz umfasste. Die Arbeiten wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

3.2.2.1 Stammhaltung und Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle Zellen wurden bei 37°C unter 5% CO₂ Atmosphäre mit 90% Luftfeuchtigkeit gehalten.

Die Stammhaltung erfolgte in T175- oder T75-Zellkulturflaschen. Für Transfektionen, Proteinernte und weitere Versuche wurden die Zellen auch auf 10 cm-Schalen, 6 well- bis zu 384 well-Platten kultiviert.

Um die Zellen in den Zellkulturflaschen zu vermehren, wurden sie mit dem jeweiligen Nährmedium versorgt, dem jeweils 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden 1:5 (CHO K1, pgsA-745 Zellen) bis 1:10 (HEK 293T Zellen) geteilt, sofern sie ein flächiges Wachstum von 90% erreicht hatten, was in der Regel zweimal die Woche durchzuführen war.

Adhärenz wachsende Zellen müssen zum Splitten vom Boden/Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst werden. Dies erfolgte enzymatisch mit Trypsin/EDTA, welches proteolytisch die äußeren Membranproteine der Zellen abspaltet und sie somit von der anhaftenden Oberfläche löst. Zuerst wurde das noch vorhandene Nährmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, um letzte Reste vom Medium zu beseitigen und optimale Bedingungen für die enzymatische Ablösung herzustellen. Die abgelösten Zellen wurden gut resuspendiert und für die Stammhaltung 1:5 bzw. 1:10 geteilt und frisches Nährmedium hinzugefügt. Wurden Zellen für Versuche in einer gewissen Konzentration benötigt, wurden die abgelösten Zellen mit frischem Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt und auf anderen Formaten (z.B. 10 cm-Schale, 6 well-Platte) kultiviert.

Bei Suspensionszellen erfolgte das Splitten durch gutes Resuspendieren und anschließendes Entfernen der abgeteilten Menge. Der verbliebene Anteil wurde mit Nährmedium aufgefüllt, bzw. die benötigte Zellkonzentration durch Verdünnung mit frischem Nährmedium erreicht.

3.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl/ml wurde mittels Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen von ihrem Untergrund mithilfe eines Zellschabers oder, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Mit 9,9 ml ISOTON® II Diluent (Beckman Coulter) wurde eine 1:100-Verdünnung hergestellt und der Messvorgang nach der Bedienungsanleitung des Gerätes durchgeführt.

3.2.2.3 Lagerung von eukaryotischen Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum zu erhalten, wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen vom verbliebenen Medium befreit, mit PBS gewaschen, dann, wie zuvor beschrieben, vom haftenden Untergrund gelöst und in frischem Medium resuspendiert, bzw. bei Suspensionzellen nur resuspendiert. Diese entstandene Zellsuspension wurde dann 3 min bei 300*g (1500 rpm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet einer halben T175-Flasche wurde im Anschluss in 1 ml FCS mit einem Zusatz von 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen bei -80°C weggefroren. Nach 24h erfolgte die Überführung und dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen eingefrorener Zellen geschah bei 37°C. Der gesamte Inhalt der Kryoröhrchen wurde in frischem Medium resuspendiert und in eine T75-Flasche gegeben.

3.2.2.4 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, gelöst und in PBS aufgenommen. Nach Vereinzelung durch gutes Resuspendieren, wurde 1 ml in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl Lysispuffer+Proteinaseinhibitoren gelöst. Danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis und eine erneute Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert und das Pellet entsorgt. Die Lagerung der Zelllysate fand bei der Nutzung am selben Tag auf Eis, für eine langfristige Lagerung bei -80°C statt. Sollte eine Proteinanalyse der Zelllysate via Western Blot gemacht werden, wurde der Probe 4x SDS-Ladepuffer hinzugefügt und 5 min bei 95°C gekocht. Diese Proben konnten direkt genutzt, oder bei -80°C gefroren werden.

3.2.2.5 Transfektion von Zellen mit Lipofectamin® 2000

Die Transfektion beschreibt den Gentransfer von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen. Dies wurde bei jeder Erzeugung von rekombinanten Proteinen in eukaryotischen Zellen mithilfe von Lipofectamin® 2000 durchgeführt. Das Wirkungsprinzip von Lipofectamin® beruht auf der Bildung von Lipidkügelchen. Die zu transfizierende DNA wird in diese Fettkügelchen aufgenommen und zu eukaryotischen Zellen gegeben. Die Membran der Fettkugeln verschmilzt mit der Zellmembran und die freie DNA gelangt in die Zelle.

Die Transfektion zur Protein- oder Vektorpartikelproduktion fand in 10 cm-Schalen statt. Hierfür wurden HEK 293T Zellen auf 10 cm-Schalen kultiviert, bis ein Flächenwachstum von 2/3 der Schale erreicht wurde, was nach Ausbringung von 1/10 Zellen einer T175-Flasche und Inkubation von 20 h der Fall war. Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurden zuerst 10 µg DNA mit 500µl OptiMEM® (DNA-Ansatz) sowie 25 µl Lipofectamin® mit 500µl

OptiMEM® (Lipofectamin-Ansatz) verdünnt. Beide Ansätze wurden miteinander vermischt und 20 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Der Transfektionsatz wurde vorsichtig auf die kultivierten Zellen gegeben und bei den in 3.2.2.1 angegebenen Bedingungen kultiviert. Nach mindestens 20 h erfolgte ein Mediumwechsel auf das in 3.2.2.1 beschriebene Nährmedium. Nach weiteren 20 h konnten die sekretierten rekombinanten Proteine geerntet werden, indem der Überstand der Zellen vorsichtig entnommen und steril filtriert wurde (0,2 µm oder 0,4 µm Spritzenfilter). Die Zellen wurden erneut mit Nährmedium benetzt und für weitere 20 h inkubiert, um eine weitere Proteinernte zu ermöglichen.

3.2.2.6 Herstellung von retroviralen Vektorpartikeln (VP)

Die Herstellung retroviraler Vektorpartikel fand auf der Basis des Transfervektors pBabe Puro und pHIT60 (Murinen Leukämie Virus (MLV)) statt. Der Transfervektor beinhaltet das Verpackungssignal ψ , LTRs, sowie ein Puromycin-Resistenzgen, das zur Selektion der transduzierten Zellen (3.2.2.7) benutzt wurde. Vom pHIT60 stammen gag, pol und pro. Verpackt wurde die genetische Information für die Fusionsproteine, bestehend aus einer Domäne von CHIKV-E2 fusioniert an die Fc-Region eines humanen Antikörpers. Außerdem wurden die Vektoren mit dem Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) pseudotypisiert, um eine Clathrin-vermittelte Endozytose in nahezu alle Zellen und damit die Aufnahme der Fremd-Gene zu erreichen.

Vektorpartikel wurden produziert, um die Generierung von stabilen Zelllinien zu ermöglichen. Hierzu wurden pro Vektorpartikeltyp HEK 293T-Zellen in 10 cm-Schalen über Nacht kultiviert und anschließend transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie unter 3.2.2.5 beschrieben, jedoch wurden zu dem DNA-Ansatz noch pHIT60 sowie pHIT-G hinzugefügt. Als Transfervektor wurde pBabe-Puro genutzt, in den zuvor die genetische Information der jeweiligen Fusionsproteine kloniert wurde.

Nach Inkubation über Nacht bekamen die Zellen frisches Nährmedium. Am nächsten Tag konnten Vektorpartikel geerntet werden, indem der Überstand der Zellen entnommen und steril filtriert wurde (0,45 µm, 0,2 µm Spritzenfilter). Die Vektorpartikel wurden am selben Tag zur Transduktion (3.2.2.7) von (neuen) HEK 293T Zellen genutzt. Durch Einfrieren bei -80°C war jedoch zudem eine längerfristige Lagerung möglich.

3.2.2.7 Transduktion von Zellen mit VP

Die Transduktion ist eine weitere Form des Gentransfers. Es wurde versucht, durch retrovirale Vektoren die genetische Information für die in 3.2.2.6 beschriebenen rekombinanten Proteine stabil in HEK 293T Zellen zu integrieren. Die transduzierten Zellen sollten dadurch konstant das rekombinante Protein produzieren.

Für die Transduktion wurden HEK 293T Zellen auf 6 well-Platten kultiviert. Nach mindestens 12 h und einem konfluierenden Wachstum von 75%, wurden die Vektorpartikel auf die Zellen gegeben und 6 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit frischem Nährmedium versorgt. Am folgenden Tag fand ein Austausch des Mediums gegen Selektionsmedium (Zellkulturmedium wie in 3.2.2.1 beschrieben mit einem Zusatz von 1,5 µg/ml Puromycin) statt, um nur das Wachstum der Zellen zu fördern, die erfolgreich transduziert wurden. Die Zellen wurden auf der 6-well-Platte gehalten, bis sie komplett konfluent gewachsen sind, danach wurden sie auf eine 10 cm-Schale überführt.

3.2.2.8 Kultivierung einzelner Klone von transduzierten Zellen

Transduzierte Zellen können auch nur das Puromycinresistenzgen aufgenommen haben, wodurch das Fördern des Wachstums einzelner Klone von großem Interesse wird.

Um einen Antikörper exprimierenden Klon zu finden, wurden, mithilfe von Whatman-Papier, einzelne Klone aus den 10 cm-Schalen ausgewählt und kultiviert. Das Whatman-Papier wurde zuvor autoklaviert und in Form von kleinen Kreisen in Trypsin eingeweicht. Überflüssiges Trypsin wurde durch Abstreifen entfernt und das Whatman-Papier auf einzelne Klone gelegt. Es wurde darauf geachtet, nur einen Klon zu berühren. Nach kurzer Inkubation wurde das Whatman-Papier auf eine 24 well-Platte übertragen und mit 1 ml frischem Nährmedium benetzt. Hier war es wichtig, dass die Seite des Whatman-Papiers unten lag, die zuvor der Zelle zugewandt war. Am folgenden Tag wurden das Medium und das Whatman-Papier vorsichtig entfernt und frisches Nährmedium auf die Zellen gegeben. Die Überprüfung positiver Proteinproduktion erfolgte via Western Blot Analyse.

3.2.2.9 Virusneutralisationsassay

Der Luciferase-basierende Assay wurde angewendet, um zu testen, ob die rekombinanten Proteine (die einzelne Domänen des Glykoprotein E2 von CHIKV enthalten) den Viruseintritt hemmen können. Es wurden HEK 293T, CHO K1 und CHO pgsA-745 Zellen auf jeweils einer 384 well-Platte getestet. Für den Assay wurden 6000 (HEK 293T) bzw. 3000 Zellen/well (CHO K1 und pgsA-745) auf einer 384-well-Platte (Greiner) mit einer Matrix Multichannel Equalizer Electronic Pipette (Thermo Scientific) ausgesät und über Nacht inkubiert. Die rekombinanten Proteine wurden in gleichen Konzentrationen genutzt und, um eine Mengenabhängigkeit zu überprüfen, in fünf Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) getestet. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe auf einer 96 well-Platte angefertigt. Im ersten well wurden die Proteine auf die gleiche Konzentration gebracht und absteigend jeweils 1:2 mit DMEM+ 1% FCS verdünnt. Die Proteine wurden in Triplikaten auf die Zellen gegeben und eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert. Außerdem wurden für die Positiv- und

Negativkontrolle jeweils drei wells nur mit DMEM+ 1% FCS überschichtet. Danach wurde CHIKV-luci, Wildtyp-Virus mit Luciferase innerhalb des CHIKV nsP3 (Nicht Struktur Protein 3) (Henß et al. 2016), in einer Verdünnung von 1:2048 zu den Zellen gegeben. Die Zugabe von Virus erfolgte auch bei der Positivkontrolle, jedoch wurde die Negativkontrolle ausschließlich mit DMEM+1% FCS behandelt. Nach 6 h Inkubation bei 37°C wurden 20 µl Britelite (Perkin Elmer) hinzugefügt und das durch die Luciferase umgesetzte Substrat als Lichtsignale mittels PHERAstar FS (BMG LABTECH) detektiert. Das Signal wurde in relativen Lichteinheiten/ relative light units (RLU) angegeben.

3.2.2.10 **Durchflusszytometrie (FACS= fluorescence-activated cell sorting)**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem Zellen einzeln an einem Lichtstrahl vorbeifließen und die dadurch entstandene Beugung des Lichtes gemessen wird. Je nachdem wie das Licht gebeugt wird, kann auf bestimmte Eigenschaften der Zellen geschlossen werden. Der Scan verläuft mit einer hohen Durchflussrate, wodurch auch Eigenschaften ganzer Populationen sichtbar gemacht werden können. Beim FACS wird zusätzlich die Fluoreszenz mit speziellen Filtern detektiert. Nur wenige Zellen emittieren auf natürliche Weise Fluoreszenz. Dies ermöglicht, mittels Fluoreszenz markierter Antikörper bestimmte Strukturen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip sichtbar zu machen. Nur Zellen, die das Antigen auf der Zelloberfläche tragen, weisen bei der Messung Fluoreszenz auf.

Um Strukturen innerhalb der Zelle im FACS sichtbar zu machen, müssen diese zuvor permeabilisiert werden. Außerdem können mithilfe des Seitwärtsstreulicht (SSC=sideward scatter) die Granularität und durch das Vorwärtsstreulicht (FSC=foward scatter) die Größe der untersuchten Zellen erfasst werden.

Anhand dieser Ergebnisse können innerhalb einer Probe verschiedene Zellpopulationen und tote von lebenden Zellen unterschieden werden.

Hergestellte (FACS)-Proben wurden mit dem FACS BD LSR II SORP (BD, Heidelberg) nach Anwenderprotokoll gemessen.

3.2.2.11 **Bindungsversuche mit rekombinanten Proteinen**

Durch Bindungsversuche wurde überprüft, ob die rekombinanten Proteine an Oberflächenstrukturen von Zellen binden. Zudem wurde speziell die Bindungsaffinität zu Glykosaminoglykanen (GAGs) getestet, indem jeweils CHO K1 und pgsA-745 Zellen genutzt wurden.

Die jeweiligen Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, wobei zuvor das Kulturmedium durch PBS+2% FCS (FACS-Puffer) ausgetauscht

wurde. Durch mehrfaches Resuspendieren erfolgte eine Vereinzelung der Zellen und die Zellzahl konnte am Zell Counter bestimmt werden. Die Zellzahl wurde mit FACS-Puffer auf 500.000 Zellen/ml eingestellt und 1 ml in jedes FACS-Röhrchen gegeben. Die Zellen wurden 3 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen. Die rekombinanten Proteine wurden zu gleichen Konzentrationen und für beide Zelllinien gleichermaßen zu den Zellen gegeben und durch Vortexen mit den Zellen vermischt. Außerdem wurden eine Mock-Kontrolle, die nur die jeweiligen Zellen enthielt, und eine Antikörper-Kontrolle, die aus Zellen und FITC-gelabelten anti-human IgG Antikörper bestand, mitgeführt. Diese Proben wurden nur mit FACS-Puffer behandelt. Es folgte eine Inkubation bei 4°C für 30 min. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. Die Zellen wurden mit 2 ml FACS-Puffer überschichtet und 3 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nun wurde zu den Zellen nochmals 1 ml FACS-Puffer zugegeben, gevortext und erneut 3 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auch hier verworfen. Anschließend wurden 25 µl anti-human-IgG-FITC-Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 (mit FACS-Puffer) zu den Proben gegeben. Die Mock-Kontrolle wurde gleichermaßen mit FACS-Puffer gewaschen. Die Proben wurden gevortext und weitere 30 min bei 4°C inkubiert. Darauf folgte erneut die oben beschriebene Waschprozedur, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden mit je 100 µl PBS+2% PFA fixiert (vortexen) und noch am selben Tag in der Durchflußzytometrie analysiert. Bis zur Messung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

3.2.2.12 Intrazelluläre Färbung von Zellen (FACS)

Es wurde mithilfe der intrazellulären Färbung (BD Cytofix/Cytoperm) überprüft, ob die stabilen Zellen rekombinantes Protein produzieren. Hierzu wurden die Zellen durch die Nutzung des Zellschabers von der Zellkulturflasche gelöst und durch Resuspendieren vereinzelt. Jeweils 2 ml der Zellsuspension wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und 3 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 250 µl Cytofix/Cytoperm (BD) aufgenommen und 30 min bei 4°C gelagert. Danach wurden die Zellen mit 250 µl 1x Cytoperm/Wash gewaschen, indem sie in der Lösung resuspendiert und anschließend 3 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen. Die Permeabilisation erfolgte durch Aufnahme der Zellen in 500 µl 1x Cytoperm/Wash und 30-minütiger Inkubation bei 4°C. Danach fand ein erneuter Waschschrift statt und die Zellen wurden weitere 30 min bei 4°C mit dem anti-human-IgG-FITC-Antikörper (1 µl Antikörper in 50 µl 1x Cytoperm/Wash) gefärbt. Die Zellen mussten erneut zweimal gewaschen und, aufgenommen in 1 ml 1x Cytoperm/Wash, mittels FACS analysiert werden. Zu jeder Messung wurden unbehandelte HEK 293T-Zellen, die die Färbung gleichermaßen durchliefen, als Negativkontrolle mitgeführt.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Die Restriktionsenzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, von NEB (Frankfurt/Main) erworben und die DNA gemäß der Gebrauchsanweisung geschnitten.

3.2.3.2 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Die Dephosphorylierung wurde angewandt, um ein Schließen des linearisierten Vektorplasmids zu verhindern. Für eine anschließende Ligation mit dem Insert sollte die Dephosphorylierung nur am Vektor geschehen, so werden die fehlenden Phosphatreste vom Insert aufgefüllt.

Nach Verdau des Vektors mit den entsprechenden Restriktionsenzymen schließt sich eine Inkubation mit Antarctic Phosphatase an. Dabei wurde der Probe jeweils 1 µl des Enzyms Antarctic Phosphatase und dem dazugehörigen Puffer beigefügt. Anschließend folgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C.

3.2.3.3 DNA Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von Eurofins Genomics durchgeführt. Hierfür wurden 15 µl Proben des zu analysierenden Plasmids mit einer Konzentration von 50-100 ng/µl zur Firma geschickt. Die Sequenzierergebnisse wurden dann mithilfe von Vector NTI oder anderen Internet Tools (3.1.12, 3.1.13) überprüft.

3.2.3.4 DNA Ligationen

Die Ligation ermöglicht, ein Insert in ein Plasmid einzufügen. Der Vektor sowie das Plasmid wurden zuvor mit Restriktionsenzymen behandelt, sodass sie zueinander passend sind. Die Ligation wurde mithilfe der T4 Ligase und dazugehörigem Puffer durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes wurde so gering wie möglich gehalten und umfasste 10 oder 20 µl. Davon waren jeweils $\frac{1}{10}$ T4 Ligase und $\frac{1}{10}$ T4 Ligase Puffer. Der Vektor und das Insert wurden in einem Verhältnis von 1:2 - 1:5 (Vektor: Insert) verwendet, wobei die Menge des Vektors jeweils auf 100 ng festgesetzt wurde. Das Volumen wurde mit Reinstwasser auf 10 oder 20 µl aufgefüllt. Zur Religationskontrolle, dies beschreibt die „Rückligation“ des Vektors ohne Einbettung des Inserts, wurde eine Probe ohne Insert angesetzt. Der

Ligationsansatz wurde entweder 2 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.2.3.5 Agarosegel Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde genutzt, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe voneinander zu trennen. Es wurden 1-2%-ige Agarosegele genutzt, in denen die aufgetragene DNA bei 80-100 V zum Pluspol wanderte. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder wurde als Größenmarker genutzt und die DNA-Proben mit EZ Vision (Amresco; für Fragmente größer als 1 kbp) oder Gelred (Biotium; für Fragmente kleiner als 1 kbp) gefärbt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Geldokumentationssystems *Gel iX Imager* (Intas) bei $\lambda=312$ nm UV-Licht.

3.2.3.6 DNA-Isolierung aus Agarosegel

Um die DNA aus dem Agarosegel zu extrahieren, wurde das NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel) oder das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Bande mithilfe eines sterilen Skalpells aus dem Agarosegel herausgeschnitten und anschließend nach Gebrauchsanweisung des Kits weiter behandelt.

3.2.3.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Es wurde jeweils 1 µl Probe gemäß der Gebrauchsanleitung gemessen.

3.2.3.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde genutzt, um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren.

Während einer PCR laufen mehrere Zyklen, bestehend aus Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Anlagerung der komplementären Primer und Elongation des spezifischen DNA-Abschnittes durch Polymerasen (Mullis und Brickell 1992), ab. In einem PCR Tube wurden pro PCR, 10µl GC-Puffer, 1µl dNTP-Mix (10 mM), jeweils 5 µl des *forward* und *reverse* Primers (Konzentration: 10 pmol/µl), 100 ng Template, 1,5 µl DMSO und 0,5 µl DNA-Polymerase gemischt. Reinstwasser (DdH₂O) wurde hinzugefügt, um das Endvolumen des PCR-Ansatzes von 50 µl zu erreichen. Als DNA-Polymerase wurde die hitzestabile Phusion Polymerase (Finnzymes; mit dazugehörigem GC-Puffer) verwendet. Als Template fungierte jeweils reines Plasmid.

Die Probe durchlief anschließend folgendes PCR-Programm, durchgeführt mit dem Thermocycler (Biometra, Göttingen):

Zuerst wurde die Probe initial 30 sec bei 98°C denaturiert, gefolgt von 35 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (10 sec bei 98°C), Anlagerung der komplementären Primer (30 sec bei 57,5°C) und Elongation des abgelesenen DNA-Abschnitts (30 sec bei 72°C). Die ausgewählte Temperatur für die Anlagerung der Primer richtet sich nach deren Schmelztemperatur. Die Temperatur für die Elongationsphase ist abhängig von der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und der optimalen Temperatur der verwendeten Polymerasen (Gebrauchsanweisung). Abschließend erfolgte eine weitere Elongationsphase für 7 min bei 72°C und das Herunterkühlen auf 4°C. Die Probe konnte entweder direkt weiter verwendet und das entstandene PCR-Produkt durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft oder bei -20°C gelagert werden. Eine kurzfristige Lagerung bei 4°C war auch möglich.

3.2.3.9 Mutagenese PCR

Die Mutagenese PCR wurde benutzt um die Punktmutation G79E (Rückmutation zur Wildtyp(wt)-Sequenz) in die Fc-CHIKV E2 Domäne-Fusionsprotein-Sequenz einzuführen. Hierfür wurden spezifische Oligonukleotide benutzt (designed bei Eurofins Genomic), die komplementär zur verwendeten Template-Sequenz waren und die gewünschte Punktmutation enthielten. Die Mutagenese PCR wurde anschließend mithilfe des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Böblingen) durchgeführt. Für den PCR-Ansatz wurden 10 ng DNA, 1 µl KOD Hot Start DNA Polymerase, 5 µl KOD Hot Start DNA Polymerase Reaction Buffer (10x), 3 µl MgSO₄ (25 mM), 5 µl dNTPs (2 mM) sowie jeweils 1,5 µl von forward und reverse Primer (enthalten beide die gewünschte Punktmutation) gemischt. Mit Reinstwasser wurde das Gesamtvolumen pro PCR-Ansatz von 50 µl erreicht. Die Probe durchlief anschließend folgendes PCR-Programm, durchgeführt mit dem Thermocycler (Biometra, Göttingen):

Zuerst wurde die Probe initial 2 min bei 95°C denaturiert, gefolgt von 20 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (20 sec bei 95°C), Anlagerung der komplementären Primer (10 sec bei 65°C) und Elongation des abgelesenen DNA-Abschnittes (100 sec bei 72°C). Abschließend erfolgte eine weitere Elongationsphase für 5 min bei 72°C und das Herunterkühlen auf 4°C. Die Lagerung erfolgte bei -20°C oder es wurde direkt mit dem Dpn I-Verdau weiterverfahren. Um die parentale DNA, welche die gewünschte Punktmutation nicht enthielt, zu entfernen, wurde die PCR-Probe mit 1 µl Dpn I (Promega, Mannheim) und 5 µl vom dazugehörigen MULTI-CORE Buffer (10x, Promega, Mannheim) für 90 min bei 37°C inkubiert.

3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Zu den proteinbiochemischen Methoden zählen Techniken zur Charakterisierung, Reinigung, Nachweis und Veränderung von Proteinen.

3.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration konnte mithilfe des Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) bestimmt werden. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Anwenderprotokoll. Die Auswertung fand mittels Microplate reader (Tecan) und der Tecan XFluor™ software statt.

3.2.4.2 Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Electrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE werden Proteine anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Den Proben (Zelllysate oder Überstände 3.2.2.4) wird SDS-Ladepuffer hinzugefügt. Das Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) lagert sich an die Aminosäuren der Proteine und lädt sie stark negativ, wobei die Eigenladung überdeckt wird und somit keine Auswirkung auf das Laufverhalten hat. Außerdem erfolgt eine Zugabe von β -Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücken aufspaltet. Zusätzlich wurde die Probe mit allen Zusätzen 5 min bei 95°C gekocht. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in einem Polyacrylamid-Gel, bestehend aus Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30), Ammonium-Persulfate (APS) und Tetramethylethylenediamin (TEMED). APS und TEMED sind für die schnelle Polymerisation des Gels verantwortlich (Gelrezept unter 3.1.9.5). Die Proteine wurden zuerst im Sammelgel konzentriert (7% Acrylamid) und im Trenngel gemäß ihrer Molekülmasse separiert (12,5% Acrylamid). Die Auftrennung erfolgte in einer Kammer von BioRad, gefüllt mit 1x SDS-Laufpuffer und bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel. Die Proteine durchwanderten das Gel solange, bis der im Probenpuffer enthaltene Bromphenol Blau Farbstoff das Ende des Gels erreicht hatte.

3.2.4.3 Coomassie-Färbung

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue lagert sich an die basischen und aromatischen Aminosäuren von Proteinen und macht sie dadurch sichtbar. Die Coomassie-Färbung wurde zum semiquantitativen Nachweis von Proteinen nach einer Separation durch die SDS-PAGE genutzt. Hierfür wurde das Gel nach der SDS-PAGE 40 min bei RT in der Coomassie-Färbelösung unter dauerhaftem Schwenken (auf dem Shaker) inkubiert. Danach wurde das Gel in Entfärberlösung I überführt. Die Entfärberlösung I wurde in Abständen von 5, 10, 15 und 30 min gewechselt. Über Nacht wurde das Gel in Entfärberlösung II gelagert. Alle Entfärbeschritte wurden bei RT auf dem Shaker durchgeführt, bis die Hintergrundfärbung

verschwunden war. Danach wurde das Gel in Reinstwasser gewaschen und ein Bild mittels Scanner (HP Laser Jet 4345mfp) gemacht. Das Rezept für die Puffer ist unter 3.1.9.6 beschrieben.

3.2.4.4 Western Blot

Die bei der SDS-PAGE separierten Proteine können mithilfe des Western Blots vom Gel auf eine Polyvinylidenelektrolyt (PVDF) Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) übertragen und darauf fixiert werden. Die Membran kann danach weiterbehandelt und spezifische Proteine, durch Bindung von Enzym gekoppelten Antikörpern, sichtbar gemacht werden.

Der Western Blot wurde mit einer Trans-Blot SD semi-dry Transfer Zelle (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gemäß dem Anwenderprotokoll durchgeführt. Die PVDF Membran wurde vor dem Transfer mit Methanol aktiviert. Das SDS-Gel wurde auf die PVDF Membran gelegt und eingebettet in vier TRIS-Borat-Puffer getränkten Whatman-Papieren in der Blotting Apparatur geblottet. Der Blot erfolgte bei 100 mA/Gel für 75 min. Anschließend wurde die Membran mindestens 1 h bei RT mit Roti-Block (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) auf dem Shaker inkubiert, um freie Bindungsstellen des Proteins zu blockieren und spätere unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Dieser Schritt konnte auch über Nacht bei 4°C durchgeführt werden. Darauf folgte die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Protein, ebenfalls für 1 h bei RT auf dem Shaker. Hauptsächlich wurde ein *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelter anti-human-IgG- γ -chain-Antikörper genutzt, weshalb zum Nachweis der CHIKV-Fc-Fusionsproteine nur ein Antikörper gebraucht wurde. Bei dem β -Aktin-Nachweis wurde die Membran zuerst mit einem primären Antikörper gegen β -Aktin (über Nacht bei 4°C) und anschließend 1 h bei RT mit einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper gegen die Spezies, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde, inkubiert. Die Schritte wurden auf dem Shaker durchgeführt, wobei zwischen den beiden Inkubationen die Membran dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen wurde. Nachdem die Membran mit dem spezifischen, HRP gekoppelten Antikörper inkubiert war, wurde sie dreimal 5 min mit TBS-T auf dem Shaker gewaschen. Abschließend wurde die Membran mit HRP-Substrat benetzt und eine Chemilumineszenz-Reaktion induziert. Dabei wird Luminol oxidiert und Licht emittiert. Das Lichtsignal wurde mittels Fusion FX-7 (Vilber) detektiert.

3.2.4.5 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

3.2.4.5.1 Aufreinigung von eukaryotischen Zellen produzierten rekombinanten Proteinen via Protein A

Rekombinante Fusionsproteine wurden in eukaryotischen Zellen hergestellt und von diesen sekretiert. Die Fusionsproteine bestehen aus einer Domäne des Glykoproteins E2 vom CHIKV fusioniert an den Fc-Teil eines humanen Antikörpers. Durch diese Fusion werden die gebildeten Proteine von den eukaryotischen Zellen sekretiert. Außerdem kann Protein A zur Aufreinigung genutzt werden. Protein A stammt vom *Staphylococcus aureus*. Es befindet sich in der Zellwand des Bakteriums und bindet opsonierende Antikörper falsch herum, also am Fc-Teil. Dadurch kann *Staph. aureus* dem Immunsystem des Wirts entgehen.

Die Pierce™ Protein A Agarose (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) musste vor der Benutzung von ihrem Lösungspuffer befreit werden. Hierfür wurde die gebrauchte Menge Protein A Agarose (50:50 in Lösung) in einer Menge von 200 µl Protein A / 10 ml aufzureinigenden Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 3 min bei 2500*g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 1 ml Binde-/Wasch-Puffer aufgenommen und gut resuspendiert. Dann folgte eine weitere Zentrifugation für 3 min bei 2500*g, wobei auch hier der Überstand verworfen wurde. Der Überstand, aus dem die Fusionsproteine gereinigt werden sollen, wurde in ein 50 ml Falcon gegeben und 1:1 mit Binde-/Wasch-Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde das Protein A Agarose-Pellet erneut in 1 ml Bindepuffer aufgenommen und in den vorbereiteten Zellüberstand überführt. Nach einer Inkubation von 2 h bei RT auf dem Roller Mixer (Stuart) oder im Überkopfschüttler fand eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 2500*g statt, worauf zwei Waschschriffe folgten (Überstand werfen, Pellet in 1 ml Binde-/Wasch-Puffer aufnehmen, zentrifugieren). Abschließend wurde das Pellet in 5 ml Elutionspuffer aufgenommen, für 5 min bei RT inkubiert und ein weiteres Mal für 3 min bei 2500*g zentrifugiert. Der Überstand (Eluat) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und pro 100 µl Eluat wurden 10 µl Neutralisations-Puffer hinzugefügt. Rezepte für die Puffer sind unter 3.1.9.3 beschrieben. Die eluierten Proteine wurden in einer Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (Thermo Fisher scientific) über Nacht bei 4°C gegen PBS (4,5 L) dialysiert. Die Fusionsproteine wurden aus der Dialysekammer entnommen und 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, um ausgefälltes Protein zu entfernen. Der Überstand wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße gefüllt, mithilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Nutzung der Proteine, wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut.

3.2.4.6 Heparin-Sepharose Bindungsversuch

Mit der Heparin-Sepharose wurde die Glykosaminoglykan (GAG)-abhängige Bindung der generierten Fusionsproteinen überprüft.

Hierfür wurden pro Fusionsprotein 100 µl Heparin-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, Freiburg) in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Die Heparin Sepharose befand sich zur Lagerung in Ethanolösung (80:20). Das Ethanol wurde durch Zentrifugieren (3 min, 2500*g, Überstand verwerfen) und Waschen des Pellets mit 1 ml Binde-/Wasch-Puffer entfernt (Waschschritt wie in 3.2.4.8). Dann wurde das Pellet in 500 µl Binde-/Waschpuffer aufgenommen und mit 10 µg Fusionsprotein (Volumina der Fusionsproteine zuvor 1:1 mit Binde-/Wasch-Puffer gemischt) 2 h bei RT auf dem Eppi-Rotator (Stuart) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 2500*g bei RT für 3 min. Der Überstand wurde verworfen und es folgten drei Waschschritte, wie in 3.2.4.8, mit 1 ml Binde-/Wasch-Puffer. Die letzte Zentrifugation wurde mit 13000 rpm durchgeführt. Das Pellet wurde in 80 µl 1x SDS-Ladepuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C gekocht und die Bindung an Heparin-Sepharose mithilfe einer SDS-Page und anschließender Western Blot Analyse überprüft. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

3.2.5 Statistische Analyse

Die p-values wurden mithilfe der unkorrigierten 2way ANOVA bestimmt (Konfidenzintervall von 95%). Aufgrund der Testgruppengröße n=3 wurde zur exploratorischen Analyse der Werte die unkorrigierte Ermittlung einer Signifikanz genutzt (Fisher's LSD Test). Signifikante Bindungen bzw. Unterschiede wurden mit *, **, *** und **** gekennzeichnet. Nicht signifikante (n. s.) Bindungen bzw. Unterschiede blieben ungekennzeichnet.

n. s.	P > 0.05
*	P ≤ 0.05
**	P ≤ 0.01
***	P ≤ 0.001
****	P ≤ 0.0001

4. Ergebnisse

Alle Versuche wurden durchgeführt, um den Virus-Zelleintritt genauer zu analysieren sowie virale und zelluläre bindungsaktive Strukturen zu identifizieren und charakterisieren. Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Bindungsaktivitäten der CHIKV E2 Domänen mit Fusionsproteinen, generiert und sekretiert von eukaryotischen Zellen

In zuvor durchgeführten Versuchen mit rekombinanten Proteinen (*E.coli*) konnte folgendes Bindungsaktivitätsprofil aufgezeigt werden. Sowohl Domäne A, als auch Domäne B binden an Zellen. Domäne C wiederum zeigt keine Bindungsaktivität (Weber et al. 2017). Diese Aussagen galt es nun mit den CHIKV-Fc-Fusionsproteinen zu verifizieren oder zu widerlegen.

4.1.1 Herstellung von CHIKV-Fc-Fusionsproteinen

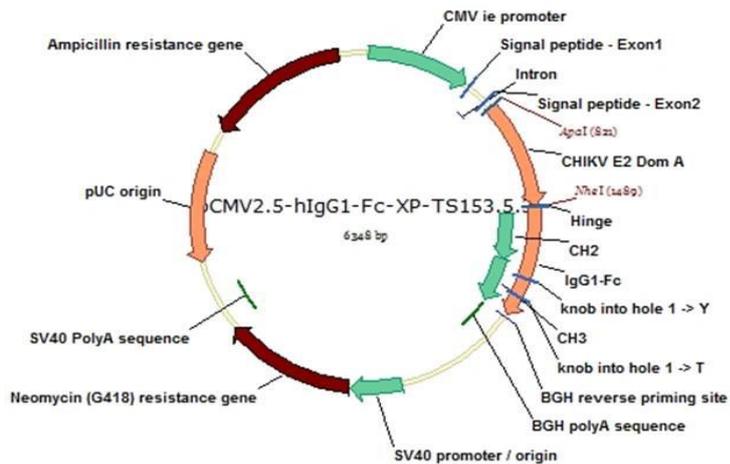
Die Herstellung von Fusionsproteinen wurde genutzt, da die Proteine auf diese Weise, wie intrinsische Antikörper, von eukaryotischen Zellen sekretiert werden. Zum einen wird davon ausgegangen, dass die Produktion der Proteine in eukaryotischen Zellen die richtige Faltung unterstützt, was ein Nachteil bei den in *E.coli* exprimierten rekombinanten Proteinen ist, zum anderen erleichtert die Sekretionsfähigkeit der Fusionsproteine die Isolation, die durch das Sammeln des Zellüberstandes erfolgte. Ein weiterer positiver Aspekt ist die einfache Aufreinigung mit Protein A, das mit dem Fc-Teil der Fusionsproteine interagiert.

Es wurden Fusionsproteingene, bestehend aus jeweils einer Domäne des Glykoprotein E2 (CHIKV) fusioniert an den Fc-Teil eines humanen IgG-Antikörpers, generiert. Hierfür wurde die jeweilige CHIKV E2 Domäne in den pCMV2.5-hIgG1Fc-XP-Vektor kloniert (Abb. 14).

Der pCMV-hIgG1Fc-XP-Vektor wird zur Herstellung von rekombinanten Antikörpern und Antikörper-Fusionsproteinen genutzt. Die genutzte Vektor-Variante pCMV2.5-hIgG1Fc-XP entstand im Zuge der Optimierung des Expressionsvektors. Seine Antikörpergen-Expressions-Kassette wird durch einen CMV-Promotor reguliert und durch eine Poly-A-Sequenz terminiert. Nach der Promotorregion ist eine modifizierte KOZAK-Sequenz, die während der Proteinbiosynthese von Bedeutung ist, zu finden. Das Sekretionssignal wird von der Sequenz für das sekretorische humane-IgG schwere Kette Signal-Peptid gebildet, das jedoch auf zwei Exons und ein Intron reduziert ist. Darauf folgt eine *Spacer*-Region, die durch eine Apa I/Nhe I-Klonierungskassette flankiert wird. Diese Klonierungskassette ermöglicht eine „single step in frame“-Klonierung sowie die Fusion mit dem Fc-Teil. Die Variante 2.5 zeichnet sich durch ein ochre Stop-Codon mit sich anschließendem Adenin (A)

aus, wodurch die terminale Sequenz für die Translation am 3'-Ende des Fc-Teils optimiert wurde (Jäger et al. 2013). Außerdem ist im Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion vorhanden (Abb. 14) und er besitzt eine Neomycin Phosphotransferase als Selektionsmarker, der durch einen SV40 Promotor kontrolliert wird.

A



B



Abb. 14 Expressionsvektor für Fc-Fusionsproteine

A) zeigt die schematische Darstellung des Vektors, als Beispiel mit Domäne A als Insert. Die Domänensequenz wird mithilfe der Restriktionsenzyme Apa I und Nhe I passend in den Vektor eingefügt. Der Vektor enthält den IgG1-Fc-Teil sowie einen CMV Promotor und eine Ampicillin-Resistenz.

Unter B) ist das fertige Fusionsprotein zu sehen, das aus dem humanen Fc-Fragment fusioniert mit einer Domäne des CHIKV-Proteins E2 (hier repräsentativ Domäne A) besteht.

Mittels PCR wurde die genetische Information der Domäne A (plus gesamten β -ribbon-connector, beide Anteile via G_4PG_5 -Linker verbunden) (aa1-aa172 + G_4PG_5 -Linker + aa231-aa271) vom Plasmid pET-15b-CHIKV E2 Domäne A, Domänen B (aa172 – aa231) von pET-15b-CHIKV E2 Domäne B und Domäne C (aa271–aa341) von pET-15b-CHIKV E2 Domäne C amplifiziert (s. Abb. 13). Dabei wurden jeweils Primer verwendet, die am 5`-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Apa I (forward Primer) und am 3`-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Nhe I (reverse Primer) einfügten. Die Schnittstellen für die beiden Restriktionsenzyme befinden sich auch in der *multiple cloning site* des Vektors, was ein Einfügen der CHIKV E2 Domänen-Information vor den humanen Fc-Teil und nach dem CMV-Promotor und das Sekretionssignal ermöglichte. Somit konnten die PCR Produkte in den Vektor mit den Restriktionsenzymen Apa I und Nhe I kloniert werden (Abb.15).

Nachfolgend aufgelistete Templates und Primer wurden für die jeweiligen Domänen in der PCR verwendet.

Template	abgelesene Information	Genutzte Primer
pET-15b-CHIKV E2 Domäne A	Domäne A mit β -ribbon-connector (AA 1-172 + G_4PG_5 -Linker + AA 231-271)	CHIKV E2 Domäne A fw CHIKV E2 Domäne A rev
pET-15b-CHIKV E2 Domäne B	Domäne B (AA 172-231)	CHIKV E2 Domäne B fw CHIKV E2 Domäne B rev
pET-15b-CHIKV E2 Domäne C	Domäne C (AA 271-341)	CHIKV E2 Domäne C fw CHIKV E2 Domäne C rev

Die Sequenz der Domäne A enthielt im genutzten Template eine Punktmutation (im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz) an der Stelle 79. Dort befand sich anstatt der genetischen Information für eine Glutaminsäure (E), die der Aminosäure Glycin (G). Um eine Beeinflussung der Bindungsaktivität durch diese Mutation auszuschließen, wurde mithilfe einer Mutagenese-PCR eine „Rückmutation“ (G79E) vollzogen. Die Mutagenese-PCR wurde wie in 3.2.3.9, unter der Verwendung der Primer *wt-G79E for* und *wt-G79E rev*, durchgeführt. Hierdurch entstand das Plasmid Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E.

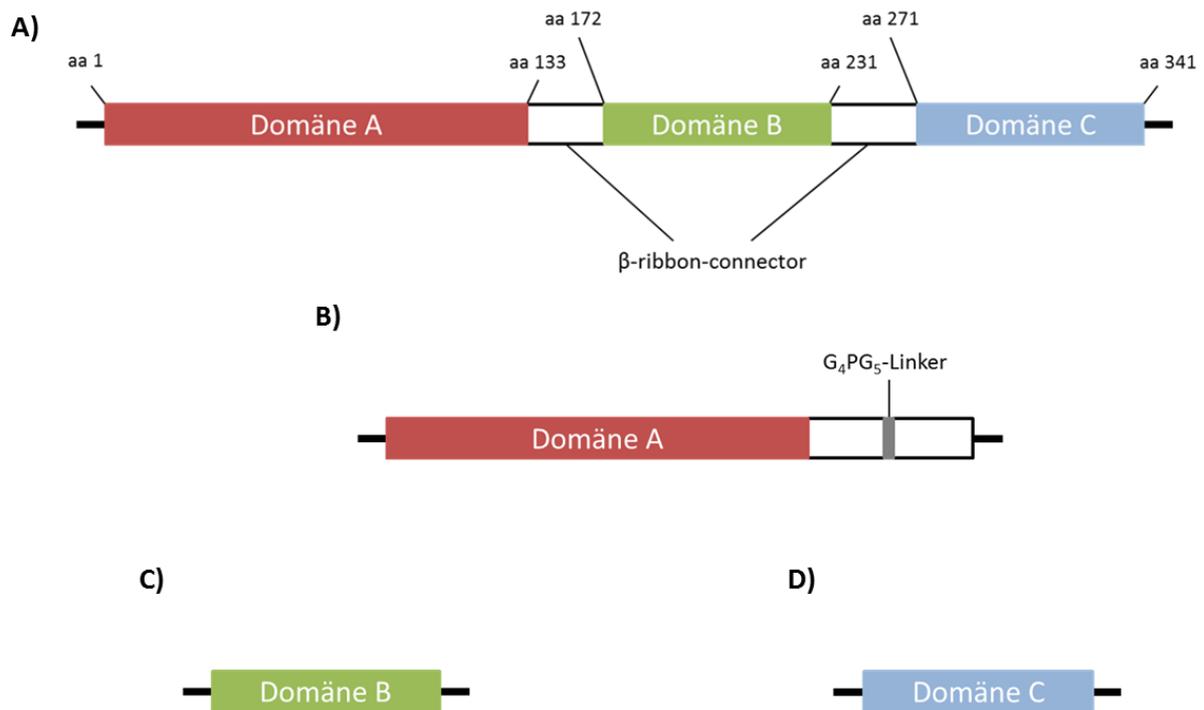


Abb. 15 Schematische Darstellung des Glykoprotein E2 (CHIKV)

Das Glykoprotein E2 besteht aus den drei Domänen A, B und C. Die Domänen sind über einen β -ribbon-connector verbunden (Abb. 15 A). In der räumlichen Darstellung befindet sich Domäne C der viralen Membran am nächsten, Domäne B bildet das distale Ende mit Domäne A im Zentrum. Für die Fusionsproteine wurden die einzelnen Domänen in den Fc-Vektor kloniert, wobei Domäne B (Abb. 15 C) und C (Abb. 15 D) exakt und Domäne A plus β -ribbon-connector abgelesen wurden. Bei Domäne A wurden beide Teile des β -ribbon-connectors, verbunden über einen G_4PG_5 -Linker, angefügt (Abb. 15 B).

Durch die Klonierung sind nachfolgend aufgeführte Plasmide generiert worden:

Plasmid	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A (AA 1-172+ G_4PG_5 -Linker+ AA 231-271) G79E	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne B (AA 172-231)	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne C (AA 271-341)
Fusionsprotein	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E	Fc-CHIKV E2 Domäne B	Fc-CHIKV E2 Domäne C

4.1.1.1 Expression der Fc-Fusionsproteine

HEK 293T Zellen wurden mit den Fc-CHIKV-Plasmiden und zur Kontrolle mit dem pCMV2.5-hlgG1Fc-XP-Vektor ohne Insert mit Lipofectamin Reagenz transfiziert. Der Zellüberstand wurde an Tag 2 und 3 geerntet. Die Überstände der beiden Tage wurden für das jeweilige Fusionsprotein gepoolt und mithilfe von Protein A aufgereinigt. Hierfür wurden die Fusionsproteine 2 h mit 200 µl Protein A/10 ml Überstand inkubiert, danach mehrfach mit Binde-/Wasch-Puffer gewaschen und gebundene Fusionsproteine abschließend mithilfe eines sauren Elutionspuffers von der Protein A-Agarose gelöst. Um den pH-Wert des Eluats zu neutralisieren, wurden pro 100 µl Eluat 10 µl Neutralisationspuffer hinzugefügt und eine Dialyse gegen PBS über Nacht durchgeführt (siehe 3.2.4.5.1).

Die Identifizierung der Fusionsproteine erfolgte mittels Western Blot Analyse mit einem gegen human-IgG gerichtetem Antikörper (Abb. 16). Das Fusionsprotein Fc-CHIKV-E2 Domäne A sollte ein Molekulargewicht von 51,1 kDa, Fc-CHIKV-E2 Domäne B von 33,2 kDa, Fc-CHIKV-E2 Domäne C von 35,3 kDa und das Fc-Protein ein Gewicht von 29,2 kDa aufweisen. Diese Angaben sind jedoch rein errechnete Werte, bei denen weitere posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierungen) der Proteine, die das Molekulargewicht erhöhen, außer Acht gelassen wurden. So befinden sich zum Beispiel im Fc-CHIKV-E2 Domäne A-Protein eine Glykosylierungsstelle, welche die erhöhte Masse verursacht (s. Abb. 16, Spur 2). Auch das Fc-Protein ist glykosylierbar, was dessen Bande oberhalb der erwarteten Laufhöhe erklärt (Abb. 16, Spur 1) und auch für die höher liegenden Banden von Fc-CHIKV-E2 Domäne B und Fc-CHIKV-E2 Domäne C verantwortlich ist, da auch diese den Fc-Teil besitzen (Abb. 16, Spur 3+4). Alle Fusionsproteine wurden gut in den Zellüberstand abgegeben, wobei Fc-CHIKV-E2 Domäne C etwas schwächer sekretiert wurde. Die richtige Aminosäuresequenz wurde mithilfe der Sequenzierung bestätigt.

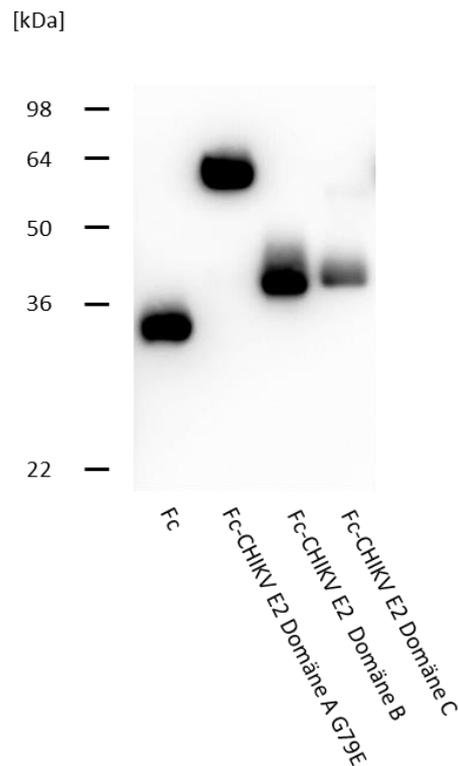


Abb. 16 Herstellung von Fusionsproteinen

HEK 293T Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A G79E, pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne B und pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne C transfiziert. Der Zellüberstand von Tag 2 und 3 wurde gepoolt und mit Protein A aufgereinigt. Die Fusionsproteine wurden mittels SDS-PAGE separiert und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mithilfe eines anti-human-IgG- γ -chain-HRP gekoppelten Antikörpers und anschließender Messung der Chemilumineszenz.

Die Proteine sollten in weiteren Versuchen in gleichen Mengen (10 μ g und 20 μ g) eingesetzt werden. Dies erforderte eine Konzentrationsbestimmung der jeweiligen Proteine, was mithilfe einer Coomassie-Färbung erfolgte. Die Konzentrationen der jeweiligen Fusionsproteine konnte ermittelt werden, indem sie mit einer Konzentrationsreihe von bovinem Serum Albumin (BSA) verglichen wurden. Hierfür durchliefen die Proteine (jeweils 30 μ l Probe) eine Separation via SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (3.2.4.3) (Abb. 17). Die Fusionsproteinherstellung erfolgte dreimal unabhängig voneinander. Exemplarisch ist nachfolgend nur ein Coomassie-Gel aufgezeigt, die weiteren befinden sich im Anhang.

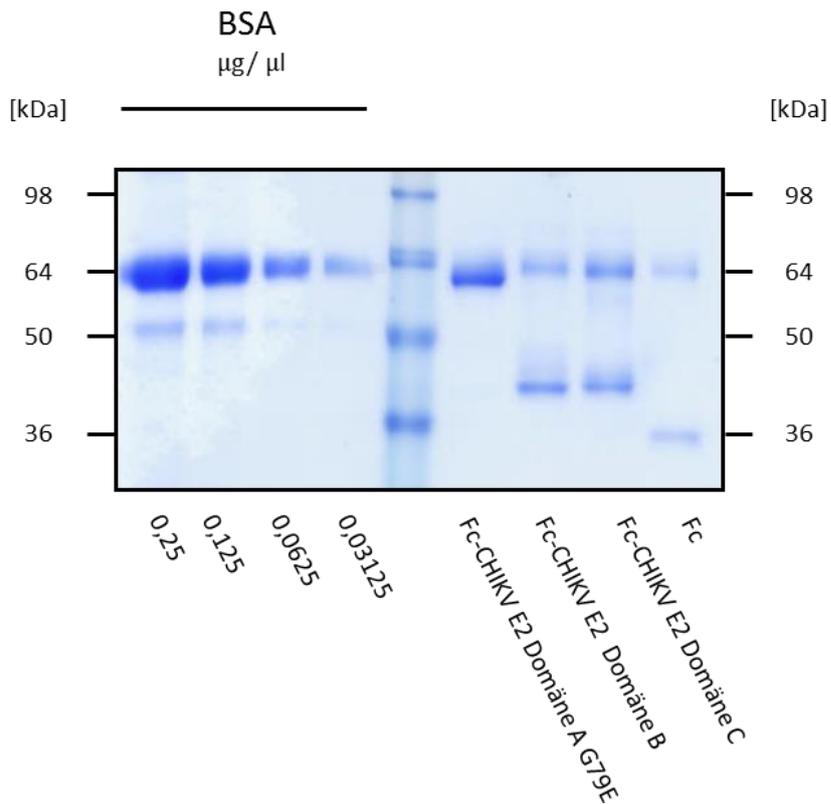


Abb. 17 Konzentrationsbestimmung der Fusionsproteine

Die Fusionsproteine wurden mittels SDS-PAGE separiert und mit Coomassie gefärbt. Die Proteine (rechts) wurden gegen eine BSA-Konzentrationsreihe (links) aufgetragen. Die Bandenstärke der Proteine wurde mit denen der Konzentrationsreihe verglichen und so die Konzentration ermittelt. Das Probenvolumen betrug jeweils 30 µl.

Anhand des Coomassie-Gels (Abb. 17) wurden die Konzentrationen der Fusionsproteine bestimmt:

Fusionsprotein	Fc- CHIKV E2 Domäne A G79E	Fc- CHIKV E2 Domäne B	Fc- CHIKV E2 Domäne C
Konzentration anhand des Coomassie-Gels	0,09 µg/µl	0,045 µg/µl	0,045 µg/µl
Volumen für 10 µg Protein eingesetzt	111,1 µl	222,2 µl	222,2 µl

4.1.2 Untersuchung der Zellbindung von Fc-CHIKV Fusionsproteinen

Um zu ermitteln, welche Domäne von E2 an Zellen bindet, wurden Zellbindungsversuche mit den aufgereinigten Fc-Fusionsproteinen durchgeführt (3.2.2.11). Durch Analyse der Proteinbindung an CHO K1 und pgsA-745 Zellen (keine Proteoglykansynthese) konnte zusätzlich eine Glykosaminoglykan-Abhängigkeit der Bindung untersucht werden. Glykosaminoglykane (GAG) sind linear aufgebaute, saure Polysaccharide, die aus mehreren Dissaccharid-Einheiten bestehen. Sie sind negativ geladen und befinden sich auf nahezu allen Zellen (Sarrazin et al. 2011). Ihre Beteiligung am viralen Zellbindungsprozess wurde bereits für viele andere Viren beschrieben (Christianson und Belting 2014; Gardner et al. 2011; Smit et al. 2002).

Als CHIKV-spezifische Bindung wurden stärkere Bindungsaktivitäten, als der des humanen IgG Fc-Teil alleine, angesehen. Diese Grenze wird im Weiteren als spezifische Bindungsgrenze bezeichnet. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurden diese Versuche dreimal durchgeführt, mit jeweils neu aufgereinigten Fusionsproteinen (Coomassie-Gele Abb. 17 bzw. Anhang 8.2.1).

Für jeden Bindungsversuch wurden CHO K1 und pgsA-745 Zellen mit jeweils 10 µg und 20 µg Protein 30 min bei 4°C inkubiert, mit FACS-Puffer (PBS+ 2% FCS) gewaschen, die gebundenen Proteine mithilfe eines gegen humanes IgG-gerichteten und FITC-gekoppelten-Antikörper detektiert und via Durchflusszytometrie gemessen. Die Konzentration der genutzten Fusionsproteine wurde anhand des Coomassie-Gels (Abb. 17 bzw. Anhang 8.2.1) ermittelt. Die FITC Mean Werte aus drei Versuchen wurden für die jeweiligen Proteine erfasst und mit der Kontrolle (Fc-Protein) ins Verhältnis gesetzt. Anschließend wurde der Mittelwert (MW), sowie die Standardabweichung (SD) errechnet. Die Einzelwerte, sowie MW und SD sind in der Darstellung angegeben (Abb. 19 und 20).

Abb. 18 verdeutlicht die Ermittlung spezifischer Bindungsaktivitäten anhand von FACS-Daten. Als Beispiel wurde die Negativkontrolle mit dem Bindungsversuch mit Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E verglichen. Die Inkubation von Zellen mit dem Fc-Protein alleine und das daraus resultierende mittlere FITC-Signal (FITC mean) dient als Kontrolle. Die FITC mean Werte die aus Bindungsversuchen mit den Fusionsproteinen entstanden, wurden mit den FITC mean Werten der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt (z.B. FITC mean Fc-CHIKV E2 Domäne A / FITC mean Fc). In der bildlichen Darstellung kann man ein „Shiften“ der Population erkennen, sofern die Fusionsproteine Zellbindungsaktivität aufwiesen und mit dem FITC-gelabelten Antikörper detektiert wurden (Abb. 18). In A) ist das Verhalten der Zellpopulation, sowie der gemessene FITC mean Wert nach Inkubation mit dem Fc-Protein alleine dargestellt. B) zeigt die Veränderung innerhalb der Population und des FITC mean Wertes nach Inkubation mit Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E. Zu sehen ist ein „Shiften“ der

Zellpopulation, die mit Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E inkubiert wurde und weist damit auf einen hohen Anteil gebundener Fusionsproteine hin.

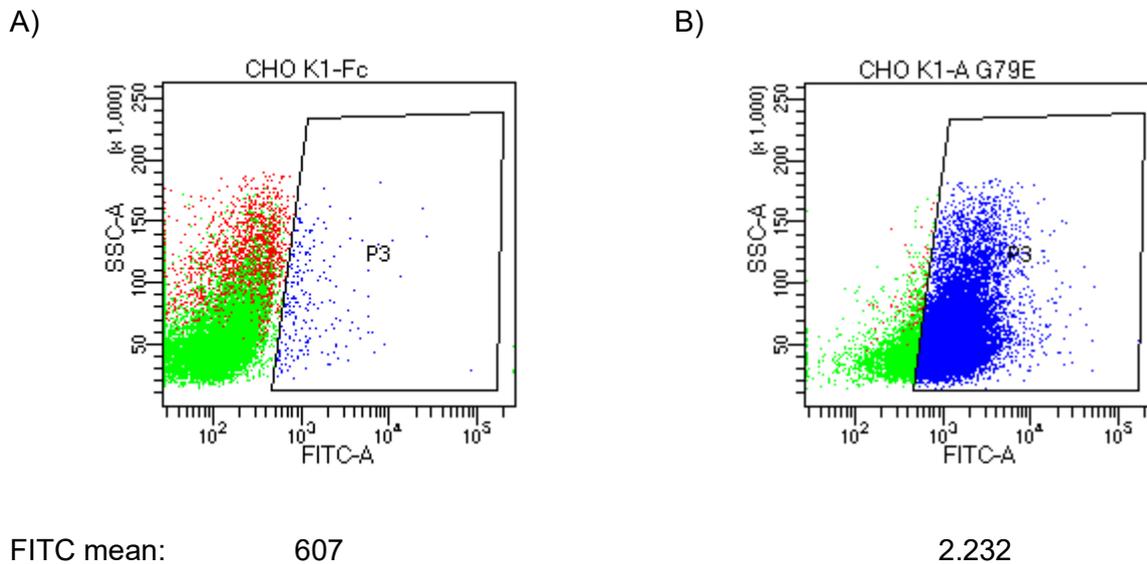


Abb. 18 FACS-Analyse

A) zeigt das Verhalten einer CHO K1 Zellpopulation, die mit der Negativkontrolle (Fc-Protein) behandelt wurde. In B) ist das „Shiften“ der CHO-K1 Zellpopulation zu erkennen, die zuvor mit FC-CHIKV E2 Domäne A G79E inkubiert wurde. Auch die FITC mean Werte zur Berechnung der MW und SD, sowie zur grafischen Darstellung sind angegeben.

Bei den Zellbindungsversuchen wurden zuerst 10 µg Fusionsprotein auf CHO K1 (GAG exprimierende Zellen) und pgsA-745 Zellen (keine zellulären GAG) getestet, um zu ermitteln, ob die Anwesenheit zellulärer GAG einen Einfluss auf die Zellbindung hat. Abb. 19 stellt die Bindungsaktivitäten der Fusionsproteine auf beiden Zelllinien im direkten Vergleich dar. Eine signifikante Bindung war nur bei Domäne A G79E auf CHO K1 (Abb. 19, Spur 1) ersichtlich. Weiterhin schienen auch Domäne B an CHO K1 Zellen (Abb. 19, Spur 3) und Domäne A G79E, sowie Domäne C an pgsA-745 Zellen zu binden (Abb. 19, Spur 2, 6). Diese Messergebnisse waren zwar nicht signifikant, dennoch waren Werte, die oberhalb der spezifischen Bindungsgrenze lagen reproduzierbar. Aufgrund der geringen Probengröße (n=3) kann zu diesen Messergebnissen nur sehr ungenau eine Signifikanz berechnet, dennoch kann ein Trend der Zellbindung beschrieben werden.

Zusammengefasst konnte mit diesem Versuch eine deutliche Bindungsaktivität von Domäne A G79E auf GAG-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Ein Trend zur Zellbindung war auch schwach für Domäne B an GAG-exprimierende Zellen, sowie für Domäne A G79E und C an pgsA-745 Zellen, die keine GAG auf der Zelloberfläche besitzen, ersichtlich. Wichtig zu bemerken ist hier, dass Domäne A G79E in Kombination mit beiden Teilen des β -ribbon-connectors vorliegt (siehe 4.3).

Zellbindungsversuche mit 10 µg Fusionsprotein auf CHO K1 und pgsA-745 Zellen

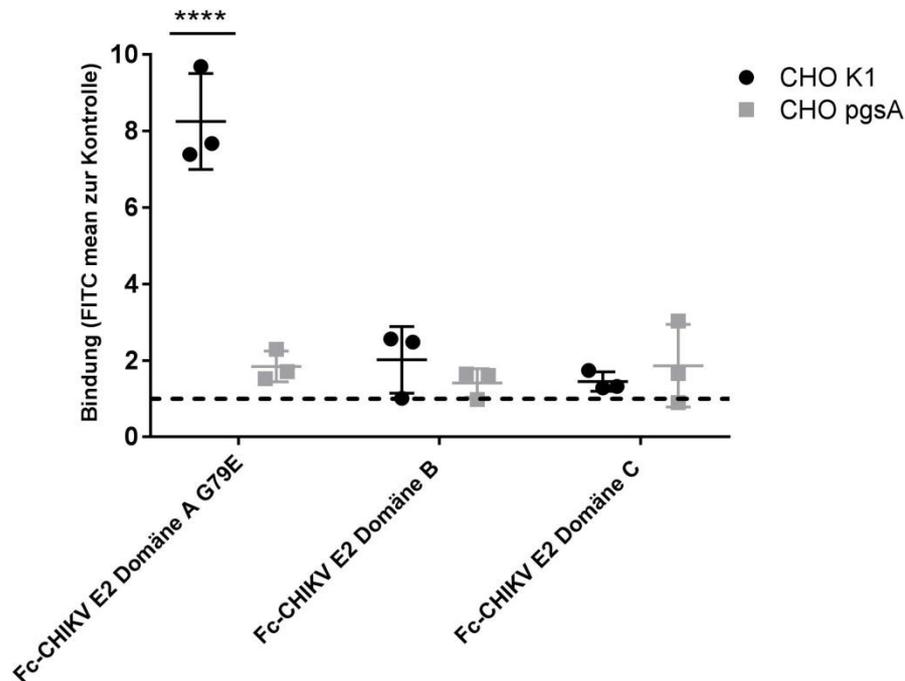


Abb. 19 Zellbindung von CHIKV E2 Domänen

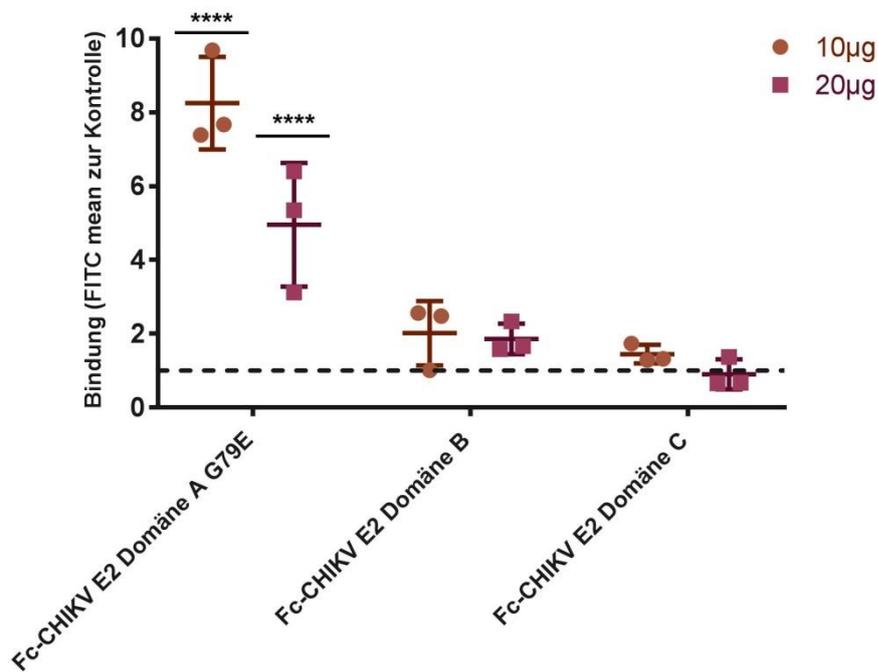
CHO K1 und pgs-A745 Zellen wurden mit Fc-CHIKV Fusionsproteinen inkubiert. Gebundene Proteine wurden von FITC-gelabelten anti-human-IgG-Antikörpern markiert und emittierendes FITC-Signal mittels FACS erfasst. Die gestrichelte Linie liegt bei 1 und repräsentiert die Bindung des Fc-Proteins. Als CHIKV-spezifisch wurden Bindungsaktivitäten oberhalb von 1 angesehen. Gezeigt wird die Bindung von 10 µg Protein auf CHO K1 und pgs-A745 Zellen im Vergleich. Angegeben sind der MW und die SD. **** kennzeichnet signifikante Bindungen.

Für Domäne A und B, hergestellt in *E.coli*, wurde eine signifikante Bindung auf GAG-exprimierenden Zellen beschrieben. Vor allem Domäne B zeigte eine stark GAG-abhängig Bindung an Zellen und für Domäne A konnte auch eine GAG-unabhängige Bindung beobachtet werden (Weber et al. 2017). Als Fc-Fusionsprotein war bei getesteten 10 µg Protein nur für Domäne A G79E eine signifikante GAG-abhängige Bindung detektierbar. Die eingesetzte Proteinmenge wurde nur anhand der Coomassie gefärbten Gele abgeschätzt und könnte daher ungenau sein. Um zu ermitteln, ob die Proteinkonzentration die Unterschiede der Versuchsergebnisse bedingte und ob die Bindung der Domänen generell konzentrationsabhängig ist, wurden die Fc-Fusionsproteine jeweils in zwei Konzentrationen (10 µg und 20 µg) auf CHO K1 und pgsA-745 Zellen getestet. Der Versuch erfolgte 3x unabhängig voneinander, wobei hier die Einzelwerte, der Mittelwert (MW) (FITC mean zur Kontrolle) und die SD dargestellt sind (Abb. 20).

Nur Domäne A G79E band in beiden getesteten Konzentrationen an CHO K1 Zellen, wobei ein Unterschied der Bindung beider getesteter Konzentrationen ersichtlich war (Abb. 20 A), Spur 1+2). Interessanterweise führte eine Konzentrationserhöhung zu einer verminderten Bindungsaktivität, was vermuten lässt (Abb. 20 A), Spur 1+2), dass zwischen 10 µg und 20 µg Protein für Domäne A G79E eine Sättigungsgrenze erreicht wurde, bei der alle Bindungsstellen für diese Domäne besetzt sind und eine Erhöhung der Konzentration zu Protein-Aggregationen führt, die die Zellbindung stören könnten.

Bei Vernachlässigung der Signifikanz (siehe oben), konnte auch für Domäne B eine schwache, konzentrationsunabhängige Bindung an CHO K1 Zellen beobachtet werden, da zwei Werte deutlich über der spezifischen Bindungsgrenze lagen (Abb. 20 A), Spur 3+4). Auf pgsA-745 Zellen wiesen bei einer Konzentration von 20 µg, Domäne A G79E und Domäne B eine signifikante Bindung auf (Abb. 20 B), Spur 2 und 4). Deutliche Schwankungen waren hingegen bei Domäne C ersichtlich und nur ein Wert wies auf eine Zellbindung hin, jedoch ist die Probengröße 3 zu gering, um eine deutliche Aussage treffen zu können. Ein Wert, der oberhalb der spezifischen Bindungsgrenze lag, könnte auf einen Trend einer GAG-unabhängige Zellbindung bei getesteten 10 µg Protein hindeuten (Abb. 20 B), Spur 5), die jedoch sehr schwach ausfällt und bereits die Sättigungsgrenze erreicht hat. Eine Konzentrationserhöhung korrelierte negativ mit der Bindungsaktivität (Abb. 20 B), Spur 6).

A) Fusionsproteine, getestet in zwei Konzentrationen auf CHO K1 Zellen



B) Fusionsproteine, getestet in zwei Konzentrationen auf pgsA-745 Zellen

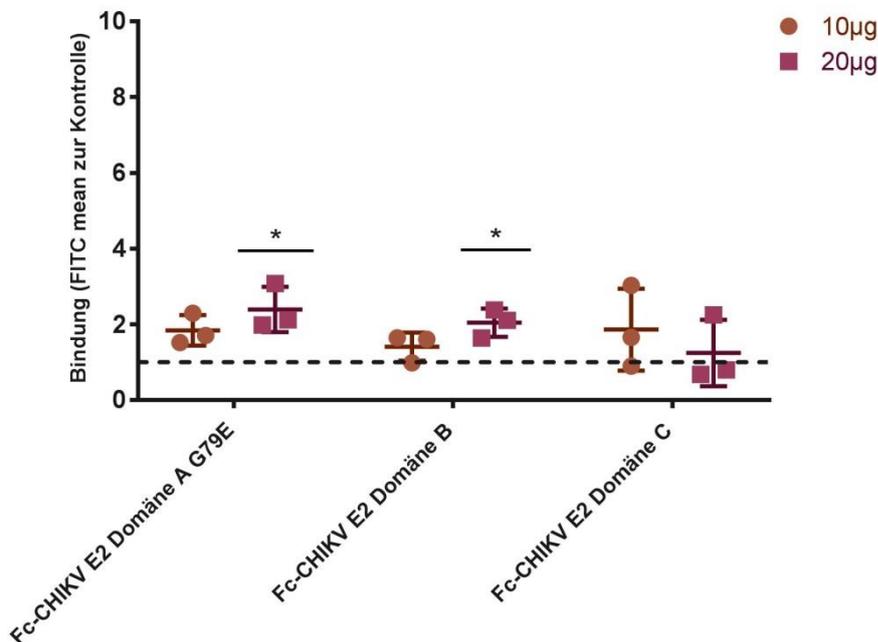


Abb. 20 Zellbindung von CHIKV E2 Domänen in zwei Konzentrationen

CHO K1 und pgsA-745 Zellen wurden mit Fc-CHIKV Fusionsproteinen inkubiert. Gebundene Proteine wurden von FITC-gelabelten anti-human-IgG-Antikörpern markiert und emittierendes FITC-Signal mittels FACS erfasst. Die gestrichelte Linie liegt bei 1 und repräsentiert die Bindung des Fc-Proteins. Als CHIKV-spezifisch wurden Bindungsaktivitäten oberhalb von 1 angesehen. Bei A) wurden zwei Konzentrationen Protein (10 µg und 20 µg)

auf CHO K1 und bei B) auf pgsA-745 Zellen getestet. Angegeben sind der MW und die SD. *, **, *** und **** kennzeichnen signifikante Bindungen.

4.1.3 GAG-abhängige Bindung der Fc-CHIKV Fusionsproteine

Die Fusionsproteine Fc-CHIKV E2 Domäne A und Fc-CHIKV E2 Domäne B binden an CHO K1 Zellen stärker als an pgsA-745 Zellen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die schwächere Bindung der Fusionsproteine an pgsA-745 Zellen, aus dem Mangel an zellulären GAG resultierte und die Bindung der Domänen zum Teil GAG-abhängig ist. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden weitere Versuche vollzogen, die die GAG-Abhängigkeit der Bindung genauer überprüften.

4.1.3.1 Hemmung der Zellbindung durch Vorhandensein von löslichem GAG

Es wurde untersucht, ob das Vorhandensein von löslichem GAG die Bindung der Fusionsproteine an Zellen beeinflussen kann. Hierfür wurden Zellbindungsversuche auf GAG-exprimierenden CHO K1 Zellen (wie in 4.1.2, Abb. 19) durchgeführt, wobei die Fusionsproteine zuvor mit Heparansulfat (ein GAG) inkubiert wurden. 10 µg Fusionsproteine (siehe 4.1.1 Abb. 17, bzw. 4.1.2 Tabelle) wurden 30 min mit Heparansulfat (HS) in einer Konzentration von 500 µg/ml inkubiert und anschließend zu CHO K1 Zellen gegeben. Die Konzentration von 500 µg/ml HS konnte in vorangegangenen Versuchen als nicht toxisch bestimmt werden (Weber et al. 2017). Zur Kontrolle wurden CHO K1 Zellen mit 10 µg Fusionsprotein ohne HS, inkubiert. Die anschließende Behandlung beider Versuchsgruppen erfolgte gleichermaßen wie in 4.2.2. Die Bindungsversuche sind 3x durchgeführt worden, wobei die FITC mean Werte der einzelnen Fusionsproteine mit dem mittleren FITC-Signal (FITC mean) der Kontrolle (Fc-Protein) verglichen und gemittelt wurden. Die Einzelwerte, der Mittelwert der FITC mean Werte im Vergleich zur Kontrolle, sowie die Standardabweichung sind in der Abbildung angegeben (Abb. 21). Binden die Fusionsproteine GAG-abhängig, so sollte eine vorherige Inkubation mit löslichem Heparansulfat zu einer Besetzung der GAG-Bindungsstellen und in den Zellbindungsversuchen zu einer reduzierten Bindungsaktivität auf CHO K1 Zellen führen.

So verursachte die Vorinkubation mit löslichem Heparansulfat bei Fc-CHIKV E2 Domäne A eine deutliche Abnahme der Zellbindung (Abb. 21, Spur 1+2). Die Betrachtung der Einzelwerte zeigte, dass Fc-CHIKV E2 Domäne B eine schwache, aber inkonstante Bindung an CHO K1 Zellen aufweist, die bei einer vorherigen Inkubation mit HS nicht mehr zu detektieren war. Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E hingegen schien trotz der Inkubation mit HS eine verbleibende, aber deutlich schwächere Bindungsaktivität (Abb. 19, Spur 1+2) zu behalten. Bei Fc-CHIKV E2 Domäne C führte das Vorhandensein von löslichem GAG zu keiner Veränderung in der Bindungsaktivität, die in beiden Vergleichsgruppen nicht vorhanden war (Abb. 19, Spur 5+6). Die Versuchsergebnisse entsprachen weitgehend den

Ergebnissen der Bindungsversuche auf CHO K1 und CHO pgs-A745 Zellen (s. Abb. 18) und zeigen, dass die Fusionsproteine mit den Domänen A und B (schwach und inkonsistent) ein GAG-abhängiges Bindungsprofil aufweisen. Domäne A war trotz der Blockierung der GAG-Bindungsstellen durch Heparansulfat noch in der Lage, wenn auch nur schwach, an Zellen zu binden. Das Bindungsverhalten von 20 µg Fusionsprotein wurde in diesem Fall nicht untersucht.

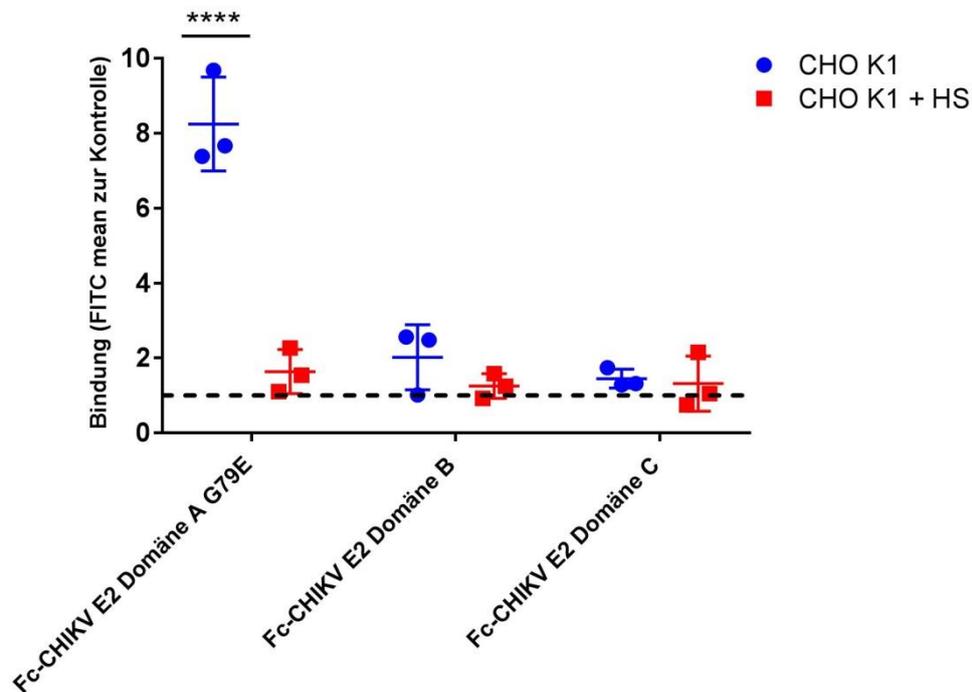


Abb. 21 Zellbindung bei Zugabe von löslichem Heparansulfat

10 µg Fusionsprotein wurden mit Heparansulfat in einer Konzentration von 500 µg/ml vermengt und 30 min bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurden CHO K1 Zellen mit dem Protein-Heparansulfat-Mix und zum Vergleich mit 10 µg unbehandeltem Protein inkubiert. Bindende Proteine wurden von FITC-gelabelten anti-human-IgG-Antikörpern markiert und emittierendes FITC-Signal mittels FACS erfasst. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Bindung des Fc-Proteins (ohne Domänenteil). Als CHIKV-spezifisch wurden Bindungsaktivitäten oberhalb dieser Linie angesehen. Angegeben sind der MW (FITC mean zur Kontrolle) und die SD. **** markiert signifikante Bindungsaktivität der Fusionsproteine.

4.1.3.2 Bindung der Fusionsproteine an Heparin-Sepharose

Außerdem wurde die direkte Bindung der Fusionsproteine an Glykosaminoglykane, ohne dass weitere zelluläre Strukturen als beeinflussende Faktoren vorhanden sind, untersucht, indem die Fusionsproteine mit Heparin-Sepharose vermischt und gebundenes Protein via Western Blot Analyse identifiziert wurde. Die Bindungsversuche mit Heparin-Sepharose verliefen nach dem Prinzip der Immunpräzipitation. In diesem Fall wurde Heparin stellvertretend als Glykosaminoglykan genutzt. Es ist durch reduktive Aminierung an die Sepharose gebunden und somit immobilisiert worden. Fusionsproteine, die eine GAG-abhängige Bindung aufweisen, sollten an Heparin binden und können somit bei nachfolgenden Waschschrritten nicht entfernt werden. 10 µg des jeweiligen Fusionsproteins wurden mit 100 µl Heparin-Sepharose für 2 h inkubiert, mit Binde-/Wasch-Puffer gewaschen und gebundenes Fusionsprotein mittels Western Blot Analyse detektiert (siehe 3.2.4.6) (Abb. 22).

Die Volumina für 10 µg Fusionsprotein wurde anhand des Coomassie-Gels (Abb. 17) bestimmt, die nachfolgend nochmals aufgelistet sind:

Fusionsprotein	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E	Fc-CHIKV E2 Domäne B	Fc-CHIKV E2 Domäne C
Konzentration anhand des Coomassie-Gels	0,09 µg/µl	0,045 µg/µl	0,045 µg/µl
Benötigtes Volumen für 10 µg Protein	111,1 µl	222,2 µl	222,2 µl

Die Analyse via Western Blot zeigte folgende Ergebnisse: Alle Proteine, auch die Negativkontrolle, das Fc-Protein alleine, konnten an Heparin-Sepharose binden (Abb. 22 B)). Fc-CHIKV E2 Domäne C zeigte in etwa dieselbe Bandenstärke wie das Fc-Protein (Abb. 22 B), Spur 3+4) und wurde so als Hintergrundbindung definiert. Von Domäne A und B wurde mehr Protein präzipitiert (Abb. 22 B), Spur 1+2), das auf eine stärkere Heparinbindung hindeutet. Die Ergebnisse entsprachen den Zellbindungsversuchen (Abb. 19+20) und bestätigen, dass Domäne A und B an GAG binden und Domäne C keine GAG-abhängige Bindung aufweist.

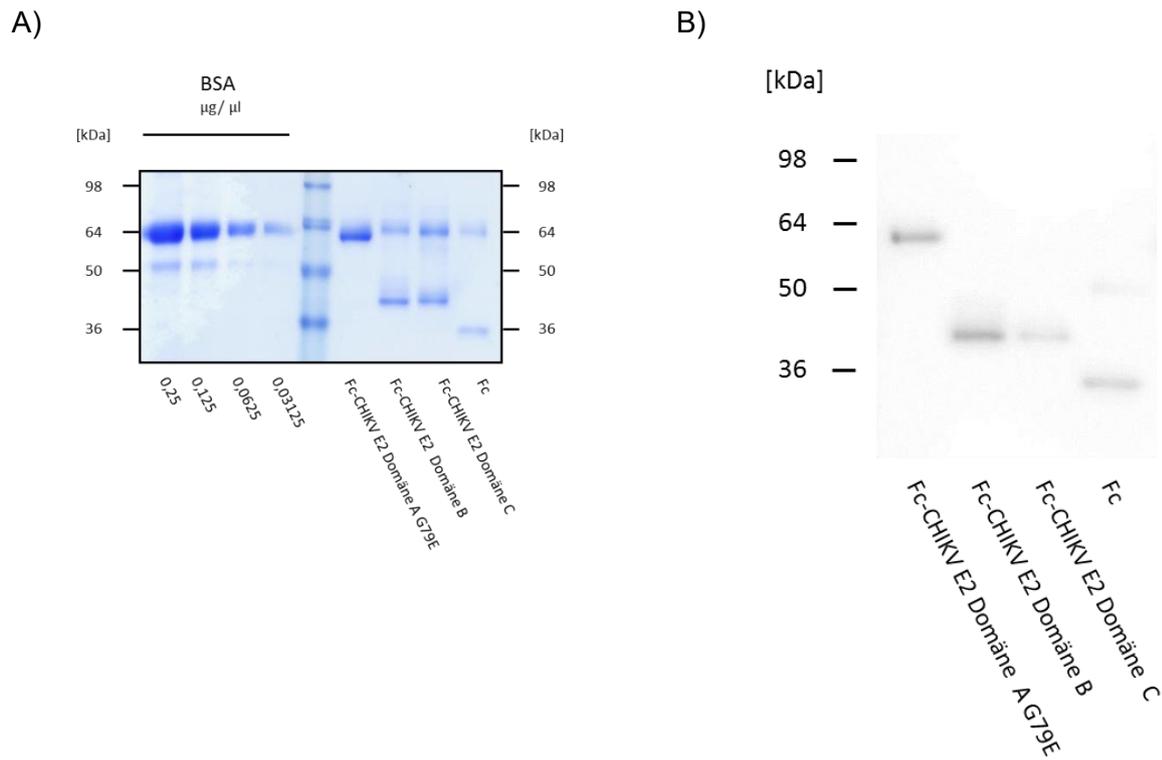


Abb. 22 Bindung der Fusionsproteine an Heparin-Sepharose

Jeweils 10 µg der Fusionsproteine wurden mit 100 µl Heparin-Sepharose vermischt und 2 h bei RT und ständigem Rotieren inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE separiert und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mithilfe eines anti-human-IgG- γ -chain-HRP Antikörpers und anschließender Messung der Chemilumineszenz. A) zeigt erneut das Coomassie-Gel, anhand dessen die Proteinkonzentration bestimmt wurde. In B) ist die Western Blot Analyse der an Heparin-Sepharose gebundenen Fusionsproteine zu sehen.

4.1.4 Etablierung stabiler Zelllinien, die Fc-CHIKV Fusionsproteine exprimieren

Mithilfe von retroviralen Vektorpartikeln sollte die Information zur Bildung von Fusionsproteinen in das Genom von HEK 293T Zellen integriert werden, um eine stabile Produktion von Fusionsproteinen in großen Mengen zu erhalten. Hierfür wurden zuerst die jeweiligen Fusionsproteingene in den Transfervektor pBabe Puro unter Verwendung der Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI kloniert.

Folgende Plasmide und Primer wurden zur Herstellung der pBabe-Fc-CHIKV E2-Fusionsprotein-Plasmid genutzt:

Template	Abgelesene genetische Information	Genutzte Primer	Generiertes Plasmid
pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A	Fc+Domäne A E79G (mit β -ribbon-connector)	CHIKV E2 + Fc fw CHIKV E2 + Fc rev	pBabe Puro Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G
pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne B	Fc+Domäne B	CHIKV E2 + Fc fw CHIKV E2 + Fc rev	pBabe Puro Fc-CHIKV E2 Domäne B
pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne C	Fc+Domäne C	CHIKV E2 + Fc fw CHIKV E2 + Fc rev	pBabe Puro Fc-CHIKV E2 Domäne C
pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A- β	Fc+Domäne A- β E79G (ohne β -ribbon-connector)	CHIKV E2 + Fc fw CHIKV E2 + Fc rev	pBabe Puro Fc-CHIKV E2 Domäne A- β E79G
pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-Vektor	Humaner IgG Fc-Teil	CHIKV E2 + Fc fw CHIKV E2 + Fc rev	pBabe Puro Fc

Bei der Klonierung von Fc+Domäne A und Fc-Domäne A- β in den pBabe-Vektor wurde als Template das Plasmid genutzt, dass in der Domäne A-Sequenz noch ein Glycin (G) anstelle einer Glutaminsäure (E) an Position 79 enthielt. Hier erfolgte keine „Rückmutation“ (siehe 4.1.1). Die Domäne A-Varianten mit der Mutation E79G, abgesehen von Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G (siehe 4.2) wurden in eukaryotischen Zellen schlechter exprimiert und sekretiert (Daten siehe Anhang 8.1).

Zur Vektorpartikelherstellung wurden HEK 293T Zellen mit dem Verpackungsplasmid pHIT60 (gag, pol, pro), dem Expressionsplasmid für das VSV-G Hüllprotein (pHit-G VSV-G, Glykoprotein) und jeweils dem Transfektorplasmid pBabe Puro-Fc-CHIKV E2 bzw. Fc mit LTRs, Verpackungssignal und den Genen der Fusionsproteine, transfiziert (3.2.2.6).

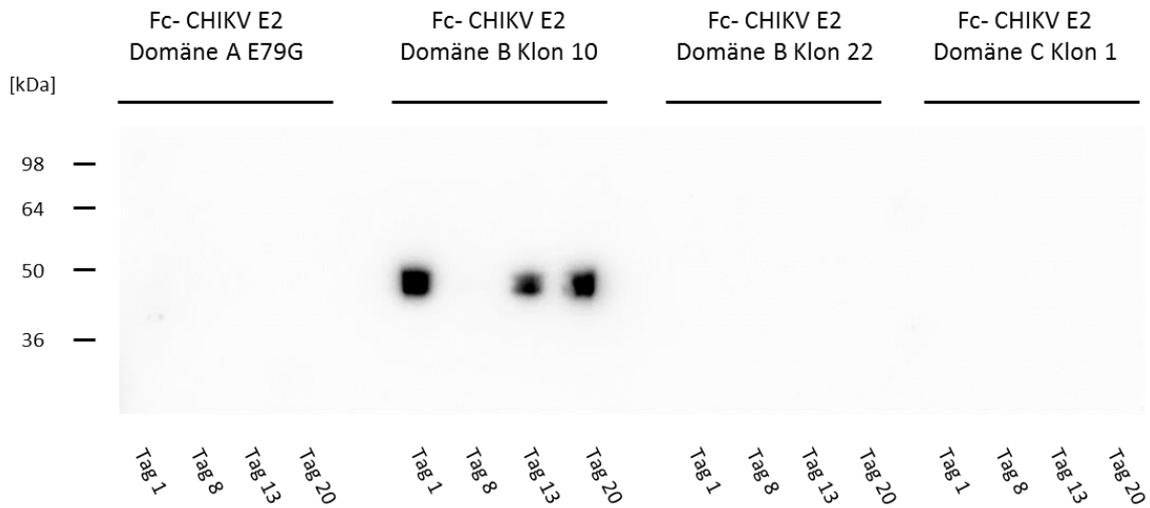
Zur Herstellung von Vektorpartikeln wurden die aufgelisteten Plasmide in folgenden Volumina benötigt:

Plasmide	Benötigte Menge
pHit60 (MLV)	3,6 µg
pHitG (VSV)	1,9 µg
pBabe Puro Fc-CHIKV E2 bzw. pBabe Puro Fc	5,5 µg

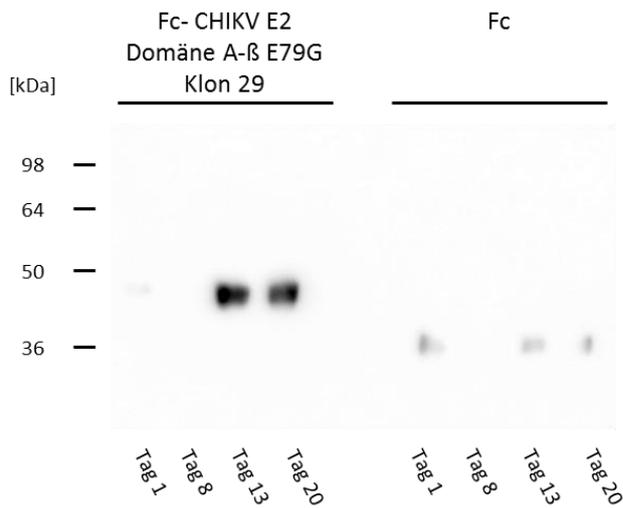
Nach 36 h Inkubation konnten die Vektorpartikel (VP) mit dem Überstand der transfizierten Zellen entnommen und neue HEK 293T Zellen mit den geernteten VP transduziert werden (3.2.2.7). Anschließend konnten die erfolgreich transduzierten Zellen durch Haltung in Selektionsmedium (1,5 µg/ml Puromycin) identifiziert und kultiviert werden. Die gewünschte Produktion von Fusionsproteinen wurde über die Analyse von Zellüberständen mittels Western Blot überprüft (Abb. 23). Hierfür sind jeweils 30 µl Zellüberstand von verschiedenen Entnahmezeitpunkten untersucht worden, wobei Tag 1 den ersten Tag beschreibt, an dem Zellüberstand zur Kontrolle entnommen (Abb. 23) und die Zellen zusätzlich intrazellulär gegen gebildetes Fusionsprotein gefärbt wurden (s. Abb. 24). Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Zellen unter Puromycin-Selektion konfluentes Wachstum und es konnte davon ausgegangen werden, dass nur Zellen mit einer Puromycin-Resistenz überlebt hatten. Die Zellen wurden weiterhin unter Selektionsmedium kultiviert und weitere Western Blot Analysen, sowie intrazelluläre Färbungen der Zellen erfolgten in 5-7 Tagesabständen, um eine konstante Proteinproduktion protokollieren zu können.

Die Western Blot Analyse der Zellüberstände im zeitlichen Verlauf wies deutliche Banden bei Fc-CHIKV E2 Domäne B in Klon 10 an Tag 1, 13 und 20 auf (Abb. 23). Etwas schwächere Banden waren bei Fc-CHIKV E2 Domäne A-β bei den späteren Entnahmezeitpunkten (13 und 20) zu erkennen (Abb. 23). Schwache Banden waren auch beim Leervektor zu vermerken (Tag 1, 13 und 20) (Abb. 23). Die Größe der Fusionsproteine stimmte mit denen aus transienten Transfektionen überein (siehe 4.1.1, Abb. 16). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Etablierung stabiler Zelllinien im Falle der Fusionsproteine Fc-CHIKV E2 Domäne B, Fc-CHIKV E2 Domäne A-β und sehr schwach für Fc alleine geglückt war.

A)



B)

**Abb. 23 Western Blot Analyse von Zellüberstand der stabilen Zelllinien**

Von Zellüberstand wurden 30 µl Probe analysiert. Enthaltene Proteine wurden mittels SDS-PAGE separiert und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mithilfe eines anti-human-IgG- γ -chain-HRP Antikörpers und anschließender Messung der Chemilumineszenz.

Des Weiteren wurde eine intrazelluläre Färbung der Zelllinien durchgeführt, um gebildete Fusionsproteine im Zellinneren in der Durchflusszytometrie zu detektieren und die Anzahl der fusionsproteinbildenden Zellen zu bestimmen (3.2.2.12) (Abb. 24). Dies erfolgte in zeitlichen Abständen von 5-7 Tagen über eine Dauer von 3 Wochen, wodurch der zeitliche Verlauf der Fusionsproteinexpression dokumentiert werden konnte. Die Zellen befanden sich über die gesamte Dauer unter Puromycin-Selektion und die intrazelluläre Färbung, sowie die Western Blot Analyse des Überstandes erfolgten am selben Tag. Die Ergebnisse der Färbung zeigten, dass die Etablierung einer stabilen Zelllinie nur bei einem Konstrukt gelang. Nur die Zelllinie, die das Fusionsprotein Fc-CHIKV-E2-Domäne B exprimiert, konnte erfolgreich hergestellt werden (Abb. 24). Außerdem wurde das Protein Fc-CHIKV-E2-Domäne B auch wie erwartet sekretiert (siehe Western Blot Analyse des Überstands, Abb. 23). Aus diesem Grund wurde weiter mit transienten Transfektionen bei der Herstellung der Fusionsproteine gearbeitet und auf die Etablierung einer stabilen Zelllinie verzichtet.

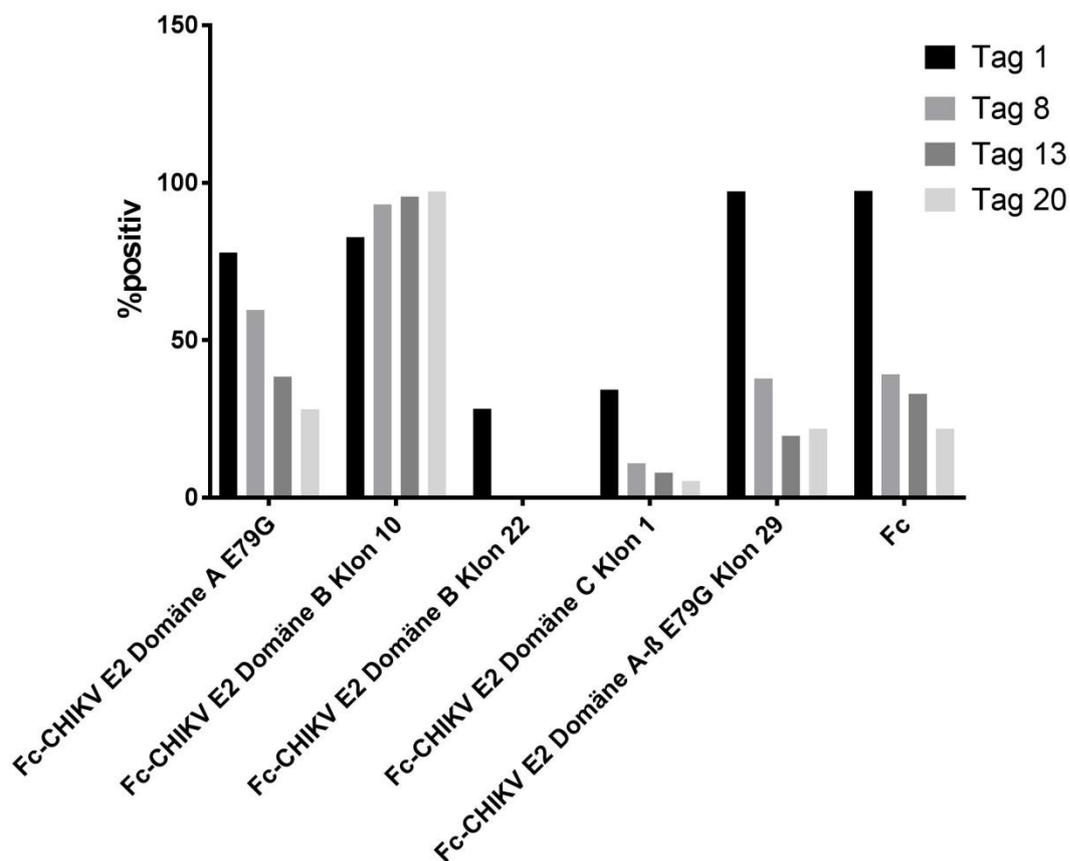


Abb. 24 Prozentuale Verteilung der fusionsproteinbildenden Zellklone über einen zeitlichen Verlauf von 3 Wochen

Die Zellen wurden permeabilisiert und intrazellulär befindendes Fusionsprotein mittels FITC-gelabelten anti-human-IgG-Antikörpern markiert. Emittierendes FITC-Signal wurde mittels FACS erfasst. Gezeigt wird hier der prozentuale Anteil von fusionsproteinbildenden Zellen (positiv) über eine Dauer von drei Wochen.

4.2 Detaillierte Analyse der Bindungsaktivität von E2 Domäne A

4.2.1 Herstellung von Mutanten der Domäne A

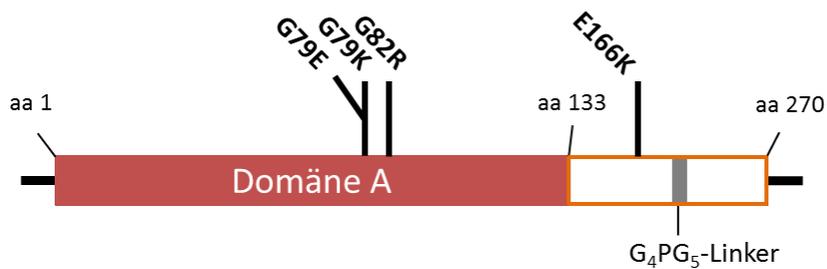
Bei der Herstellung eines attenuierten Impfstoffvirusstamms ist das Auftreten einiger Mutationen beschrieben worden (Ashbrook et al. 2014; Silva et al. 2014; Gardner et al. 2014). So sind während der Passagierung des Virus auf wirtsfremden Zellen Punktmutationen im Zuge der Adaption entstanden. Diese Punktmutationen resultierten beim attenuierten Virusstamm in einer erhöhten Bindungsaffinität zu Glykosaminoglykanen. Um dieses Ereignis auf Proteinebene zu untersuchen, wurden die Punktmutationen G79K, G82R, E166K jeweils in die Sequenz für das Fusionsprotein Fc-CHIKV-E2-Domäne A (mit β -ribbon-connector) eingefügt. Hierfür wurden Plasmide als Template genutzt, die die Sequenz für die Domäne A plus beide Teile des β -ribbon-connector (über einen G₄PG₅-Linker miteinander verbunden) (aa1-aa172+ G₄PG₅-Linker+aa231-aa271), sowie eine der beschriebenen Mutationen enthielten. Über eine PCR wurde die Information für die Domäne A-Mutanten von den Plasmiden pET-15b-CHIKV E2 Dom A G79K, pET-15b-CHIKV E2 Dom A G82R und pET-15b-CHIKV E2 Dom A E166K abgelesen (Weber et al. 2017) und mithilfe der Restriktionsenzyme Apa I und Nhe I in den pCMV2.5-hlgG1Fc-XP-Vektor kloniert. Dadurch entstanden drei verschiedene Domäne A-Mutanten als Fusionsprotein, die jeweils eine der beschriebenen Punktmutation aufwiesen (Abb. 25).

Die PCR erfolgte mit den angegebenen Plasmiden und Primern:

Template	abgelesene Information	Genutzte Primer
pET-15b-CHIKV E2 Dom A G79K	Domäne A E79K	CHIKV E2 Domäne A fw CHIKV E2 Domäne A rev
pET-15b-CHIKV E2 Dom A G82R	Domäne A E79G G82R	CHIKV E2 Domäne A fw CHIKV E2 Domäne A rev
pET-15b-CHIKV E2 Dom A E166K	Domäne A E79G E166K	CHIKV E2 Domäne A fw CHIKV E2 Domäne A rev

Auch hier wurde bei der Mutante Domäne A G82R mithilfe einer Mutagenese PCR eine „Rückmutation“ vollzogen, um an der Stelle 79 der Wildtyp-Sequenz zu gleichen. Bei der Mutante Domäne A G79K war dies nicht nötig, da diese Stelle sowieso mutieren sollte. Die Mutagenese-PCR wurde wie in 3.2.3.9, unter der Verwendung der Primer *wt-G79E for* und *wt-G79E rev* durchgeführt und lies das Plasmid pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A G79E G82R entstehen. Die Mutante A E166K behielt den Aminosäure-Austausch E79G bei. Zum Vergleich wurde auch die Variante Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G, die nicht „rückmutierte“, getestet. pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A (AA 1-172+ G₄PG₅+ AA

231-271) E79G entstand mithilfe einer PCR (Template pET-15b-CHIKV E2 Domäne A, Primer CHIKV E2 Domäne A fw und CHIKV E2 Domäne A rev) und anschließender Klonierung in den pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-Vektor, unter Verwendung der Restriktionsenzyme Apal und NheI (siehe 4.1.1).



β -ribbon-connector

Abb. 25 Schematische Darstellung der Punktmutationen in CHIKV E2 Domäne A

Der Aminosäure-Austausch G79K, G82R und E166K wurde jeweils einzeln in das Fusionsprotein Fc-CHIKV E2 Domäne A eingefügt. Die Punktmutation E79G war im Plasmid enthalten, das bei 4.1.1 als Template benutzt wurde. Das Fusionsprotein besteht aus der Domäne A+ beide Anteile des β -ribbon-connectors, die über einen G₄PG₅-Linker miteinander verbunden sind, sowie jeweils einer der gezeigten Punktmutationen.

Insgesamt sind folgende Plasmide generiert worden:

Plasmid	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A (AA 1-172+ G ₄ PG ₅ + AA 231-271) G79K	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A (AA 1-172+ G ₄ PG ₅ + AA 231-271) (AA 172-231) G79E G82R	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A (AA 1-172+ G ₄ PG ₅ + AA 231-271) E79G E166K	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A (AA 1-172+ G ₄ PG ₅ + AA 231-271) E79G
Fusionsprotein	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79K	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E G82R	Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G E166K	Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G

Anschließend wurden HEK 293T Zellen mit der Mutanten-Fc-DNA transfiziert und der Zellüberstand an Tag 2 und 3 geerntet. Die Überstände der beiden Tage wurden für die jeweilige Mutante gepoolt und mithilfe von Protein A aufgereinigt (3.2.4.5.1).

Eine erfolgreiche Transfektion und somit Expression und Sekretion der Domäne A-Mutanten wurde mittels Western Blot Analyse überprüft (Abb. 24). Das Molekulargewicht der Mutanten entspricht dem von Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E (siehe auch 4.1.1, Abb. 16). Die richtige Aminosäuresequenz wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

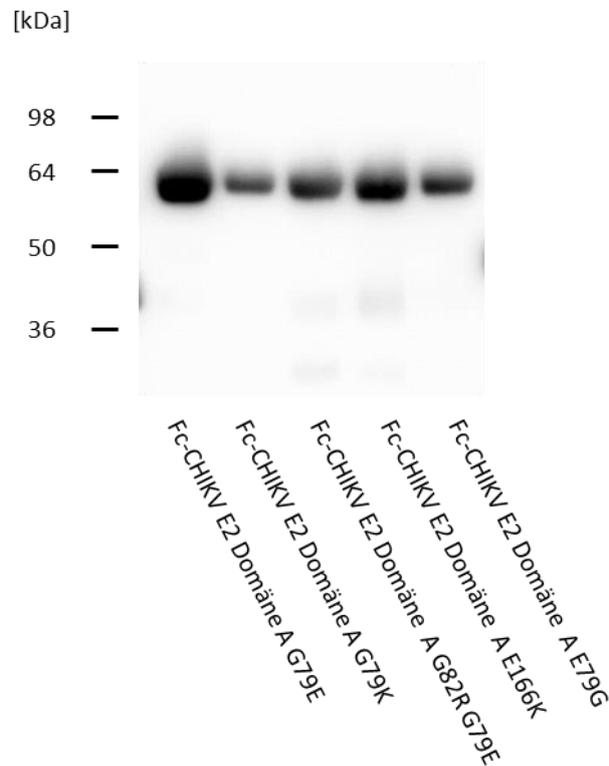


Abb. 26 Identifikation der Domäne A-Mutanten im Zellüberstand von transfizierten HEK 293T Zellen

Der Zellüberstand von transfizierten HEK 293T Zellen wurde mithilfe von Protein A aufgereinigt, die Fusionsproteine via SDS-PAGE separiert und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mittels anti-human-IgG- γ -chain-HRP-gekoppelten Antikörpers und anschließender Messung der Chemilumineszenz.

Die Ermittlung der Konzentration, um die Proteine in gleichen Mengen in weiteren Versuchen einsetzen zu können, erfolgte mithilfe der Coomassie-Färbung (Abb. 27). Die Domäne A-Mutanten wurden dreimal unabhängig voneinander hergestellt und aufgereinigt. Repräsentativ ist ein Coomassie-Gel zur Konzentrationsbestimmung dargestellt, die übrigen befinden sich im Anhang unter 8.2.

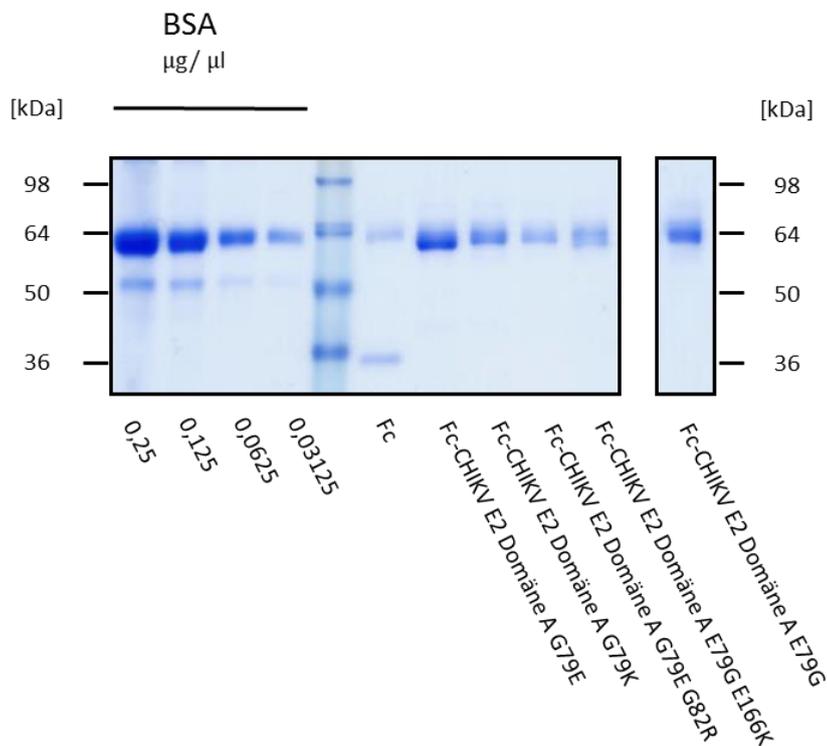


Abb. 27 Konzentrationsbestimmung der Fc-CHIKV Domäne A-Mutanten

Die Fc-CHIKV Domäne A Proteine (rechts) wurden gegen eine BSA-Konzentrationsreihe (links) aufgetragen. Die Bandenstärke der Proteine wurde mit denen der Konzentrationsreihe verglichen und so die Konzentration ermittelt. Das Probenvolumen betrug jeweils 30 µl.

Mithilfe der Coomassie-Färbung (Abb. 27) konnte die Konzentration der Fusionsproteine anhand einer BSA-Konzentrationsreihe ermittelt werden:

Fusionsprotein	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79K	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E G82R	Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G E166K	Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G
Konzentration anhand des Coomassie-Gels	0,09 µg/µl	0,055 µg/µl	0,03 µg/µl	0,03125 µg/µl	0,06 µg/µl
Volumen für 10 µg Protein	111,1 µl	181,8 µl	333,3 µl	320 µl	166,6 µl

4.2.2 Untersuchung der Zellbindung von CHIKV E2-Domäne A Mutanten

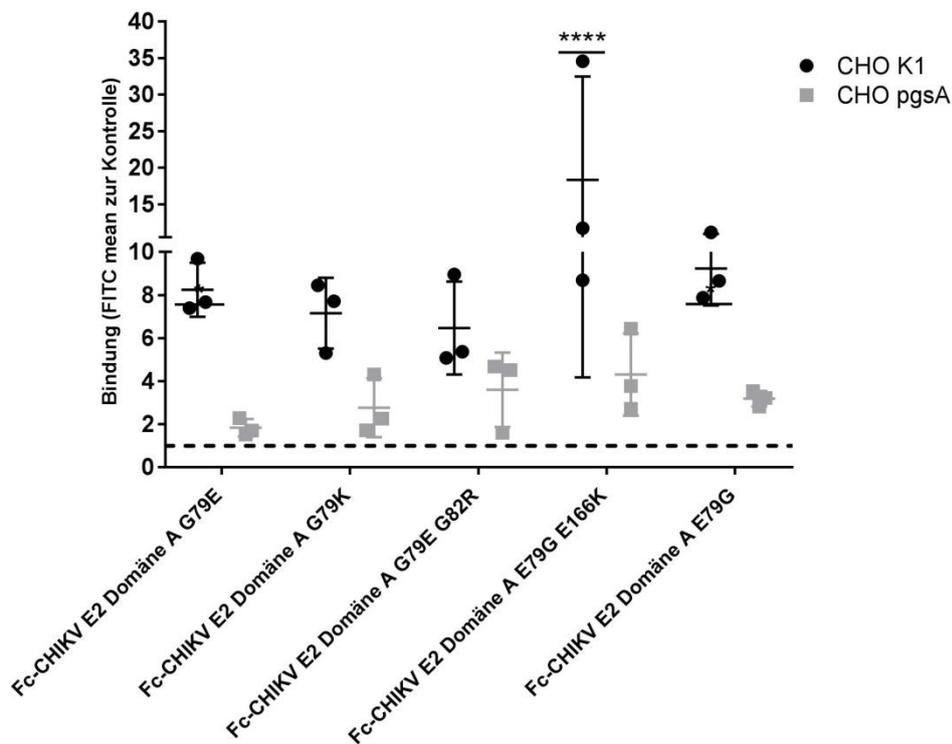
Die Bindungsaktivität der Domäne A Mutanten wurde auf CHO K1 und pgsA-745 Zellen getestet, um eine Glykosaminoglykan-abhängige Bindung der Proteine zu untersuchen. Als CHIKV-spezifisch wurden Bindungen, die stärker als der humane IgG Fc-Antikörper alleine waren, definiert. Auch diese Versuche wurden dreimal mit aufgereinigten Fusionsproteinen aus einer jeweils anderen Proteinproduktion durchgeführt (Abb. 28).

Zuerst wurden 10 µg der Domäne A-Mutanten auf CHO K1 und pgsA-745 Zellen im direkten Vergleich betrachtet (Abb. 28). Hierbei fiel vor allem die Mutante E79G E166K auf, die stark an CHO K1 Zellen band und dies auch deutlicher als die anderen Domäne A-Varianten (Abb. 28 A, Spur 7). Eine deutlich schwächere, aber auch signifikante Bindung an CHO K1 Zellen konnte bei Domäne A G79E (Wildtypsequenz) und Domäne A E79G beobachtet werden (Abb. 28, Spur 1, 9).

Auf pgsA-745 Zellen, die keine GAG auf der Zelloberfläche exprimieren, war für die drei beschriebenen Fusionsproteine keine signifikante Bindung ersichtlich (Abb. 28 A), was auf eine GAG-abhängige Bindungsaktivität schließen lässt, die durch die Mutation E166K deutlich verstärkt wird.

Für die übrigen Messwerte konnte aufgrund geringer Probengröße keine Signifikanz ermittelt werden. Bei Betrachtung der Einzelwerte war jedoch ein Trend der Zellbindung für die Mutanten G79K und G79E G82R an CHO K1 Zellen ersichtlich, wenn auch schwächer als die übrigen Domäne A-Varianten bzw. die Wildtyp-Domäne A (Domäne A G79E) (Abb. 28, 3+4, 5+6). Die Mutationen G79K und G79E G82R schienen im Domäne A-Fusionsprotein die Bindungsaktivität sowohl auf CHO K1, als auch auf pgsA-745 Zellen nicht zu beeinflussen. Dies steht im Gegensatz zu veröffentlichten Aussagen für das Virus, dass vor allem die Mutation G82R, aber auch G79K die Bindungsaffinität zu zellulären GAG deutlich erhöhen würde (Ashbrook et al. 2014, 2014; Silva et al. 2014; Gardner et al. 2014).

Für alle Domäne A-Varianten konnte eine Bindung an pgsA-745 Zellen beobachtet werden, die durch die Mutationen im Vergleich mit Domäne A G79E (Wildtypsequenz) verstärkt wurden, jedoch nicht signifikant waren (Abb. 28 A). Dies deutet darauf hin, dass die Mutationen in der A-Domäne die GAG-unabhängige Bindung leicht verstärken. Die Mutation im β -ribbon-connector (E166K) scheint zu einer erhöhten Bindungsaktivität an beide Zelllinien zu führen.

Zellbindungsversuche mit 10 µg Domäne A-Mutanten auf CHO K1 und pgsA-745 Zellen**Abb. 28 Zellbindung der Domäne A-Mutanten**

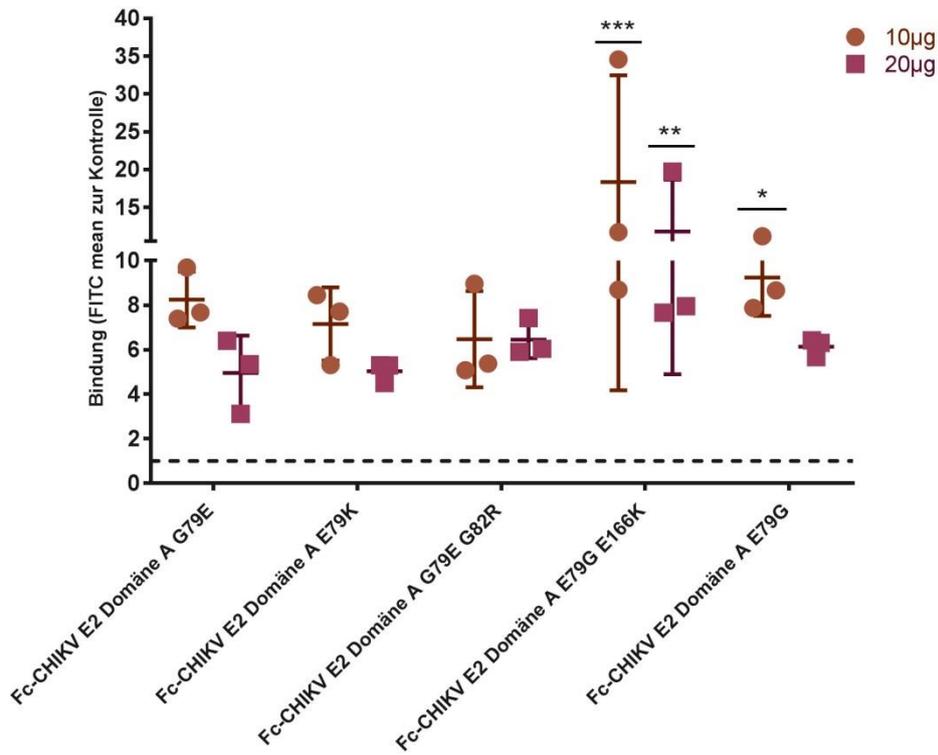
CHO K1 und pgsA-745 Zellen wurden mit jeweils 10 µg Protein inkubiert. Bindende Proteine wurden von FITC-gelabelten anti-human-IgG-Antikörpern markiert und emittierendes FITC-Signal mittels FACS erfasst. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Bindung des Fc-Proteins. Als CHIKV-spezifisch wurden Bindungsaktivitäten oberhalb dieser Linie angesehen. Zu sehen sind die Mittelwerte (FITC mean zur Kontrolle) mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Mit *, **** sind signifikante Bindungen gekennzeichnet.

Weiterhin wurde ermittelt, ob eine Konzentrationserhöhung der Fusionsproteine (20 µg) einen Effekt auf die Bindungsaktivität ausübt und ob die von Gardner et al., Ashbrook et al. und Silva et al. beschriebene erhöhte GAG-Affinität der viralen A-Mutanten in höheren Proteinkonzentrationen nachvollzogen werden könnte (Abb. 29).

Die Versuche zeigten, dass eine Konzentrationserhöhung auf CHO K1 Zellen negativ mit der Bindungsaktivität korreliert, jedoch nur bei A E79G E166K und A E79G zu Unterschieden in der Signifikanz zwischen den gemessenen Konzentrationen führte (Abb. 29 A). Die Bindungsstellen auf den CHO K1 Zellen schienen bereits bei 10 µg gesättigt zu sein, sodass die Bindung bei höherer Konzentration schwächer ausfiel. Für die Mutante G79E G82R wurde dies allerdings nicht beobachtet, die Bindung war in beiden getesteten Konzentrationen dieselbe (Abb. 29 A, Spur 5+6). Deutliche Unterschiede konnten nur bei Domäne A E79G E166K im Vergleich mit den übrigen Domäne A-Varianten bei 10 µg Protein auf CHO K1 Zellen beobachtet werden (Abb. 29 A, Spur 7), was bereits im direkten Vergleich mit pgsA-745 Zellen zu sehen war (Vgl. Abb. 28).

Auf pgsA-745 Zellen führte eine höhere Proteinkonzentration zu einer leichten Verstärkung der Bindungsaktivität, sodass für A G79E G82R, A E79G E166K und A E79G bei getesteten 20 µg eine signifikanten Bindungen an pgsA-745 Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 29 B). Die Mutanten zeigten eine bessere Bindung an pgsA-745 Zellen, wobei die Mutationen G79K, G79E G82R und E79G E166K im Vergleich zu A G79E, bei Betrachtung der Einzelwerte eine reproduzierbar stärkere Bindung aufwiesen (Abb. 29 B, Spur 10). Eine Mutation innerhalb der Domäne A-Sequenz scheint zu einer verbesserten Bindung an pgsA-745 Zellen zu führen, die mit steigender Konzentration zunimmt. Die stärkste Bindungsaktivität auf CHO K1 Zellen wies die Mutation E79G E166K auf (Abb. 29 A+B), welche einen Aminosäure-Austausch im β -ribbon-connector hat, was seine Wichtigkeit im GAG-abhängigen Zellbindungsprozess andeutet (siehe 4.3).

A) Domäne A-Mutanten, getestet in zwei Konzentrationen auf CHO K1 Zellen



B) Domäne A-Mutanten getestet in zwei Konzentrationen auf pgsA-745 Zellen

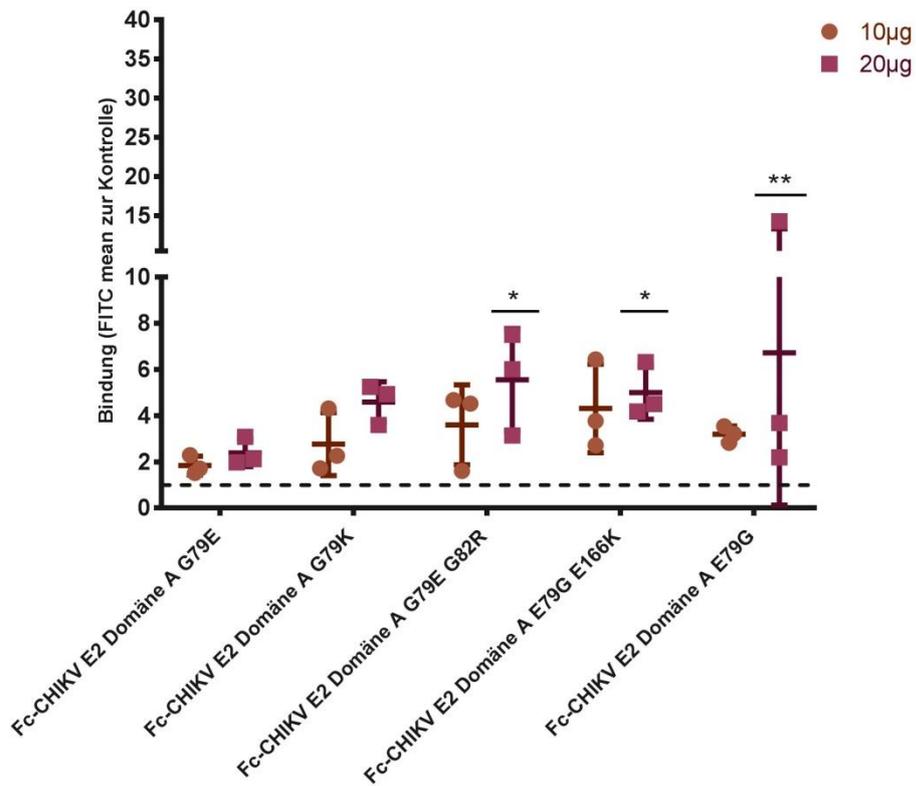


Abb. 29 Zellbindung der Domäne A-Mutanten in zwei Konzentrationen

CHO K1 und pgsA-745 Zellen wurden mit jeweils 10 µg und 20 µg Protein inkubiert. Bindende Proteine wurden von FITC-gelabelten anti-human-IgG-Antikörpern markiert und emittierendes FITC-Signal mittels FACS erfasst. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Bindung des Fc-Proteins. Als CHIKV-spezifisch wurden Bindungsaktivitäten oberhalb dieser Linie angesehen. A) zeigt die Bindung von zwei Konzentrationen Protein (10 µg und 20 µg) auf CHO K1 und bei B) auf pgsA-745 Zellen. Zu sehen sind die Mittelwerte (FITC mean zur Kontrolle) mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. *, **, *** kennzeichnet die signifikanten Bindungen.

4.2.3 GAG-abhängige Bindung der Domäne A-Mutanten

Wie schon zuvor erwähnt resultieren die beschriebenen Punktmutationen im attenuierten Virusstamm in einer erhöhten GAG-abhängigen Bindungsaktivität (Gardner et al. 2014; Silva et al. 2014; Ashbrook et al. 2014). Als Fusionsprotein zeigten die Mutanten zum Teil (Mutation G79K und G82R) nur eine Erhöhung der Bindungsaktivität auf pgsA-745 Zellen, die keine GAG exprimieren (Abb. 28 A, Abb. 29 B). Nur die Mutation E166K zeigte eine erhöhte Bindung an beiden Zelllinien, die im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein (A G79E) deutlicher auf GAG-exprimierenden Zellen ausfiel (Abb. 28 A, Abb. 29 B). Um dieses Ereignis genauer zu betrachten, sollte mit weiteren Versuchen die GAG-abhängige Zellbindung der Domäne A-Mutanten präziser analysiert werden.

4.2.3.1 Hemmung der Zellbindung durch Vorhandensein von löslichem GAG

Es wurden Zellbindungsversuche durchgeführt, bei denen die Domäne A-Mutanten, sowie Domäne A G79E (Wildtyp) zuvor mit löslichem Heparansulfat (HS) inkubiert wurden. Dadurch sollte, wie bereits oben (4.1.3.1) beschrieben, überprüft werden, ob die Zellbindung durch HS gehemmt werden kann. In der Abbildung sind die Einzelwerte, der Mittelwert der FITC mean Werte (verglichen zur Kontrolle) und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt (Abb. 30). In diesem Versuch wurden nur eine Konzentration von 10 µg Protein (siehe 4.2.1 Abb. 27, bzw. 4.2.2 Tabelle) eingesetzt.

Eine Vorinkubation mit löslichem Heparansulfat führte bei allen Fusionsproteinen zu einer deutlichen Abnahme der Bindungsaktivität (Abb. 30). Der Trend der Versuchsergebnisse war mit den Auswertungen der Bindungsversuche auf CHO K1 und pgsA-745 (keine GAG-Synthese) Zellen vergleichbar (Abb. 28 A). Die Mutante E79G E166K band stärker an CHO K1 Zellen als die übrigen Domäne A-Varianten, daher ist auch bei dieser Mutante ein deutlicher Unterschied zwischen der Bindungsaktivität nach Inkubation mit HS und der direkten CHO K1-Zellbindung ersichtlich (Abb. 30, Spur 5+6 und 7+8). Die Zellbindung aller Domäne A-Varianten konnten durch HS gehemmt werden, wobei alle Werte der GAG-unabhängigen Bindung des Wildtyp Proteins (G79E) entsprachen.

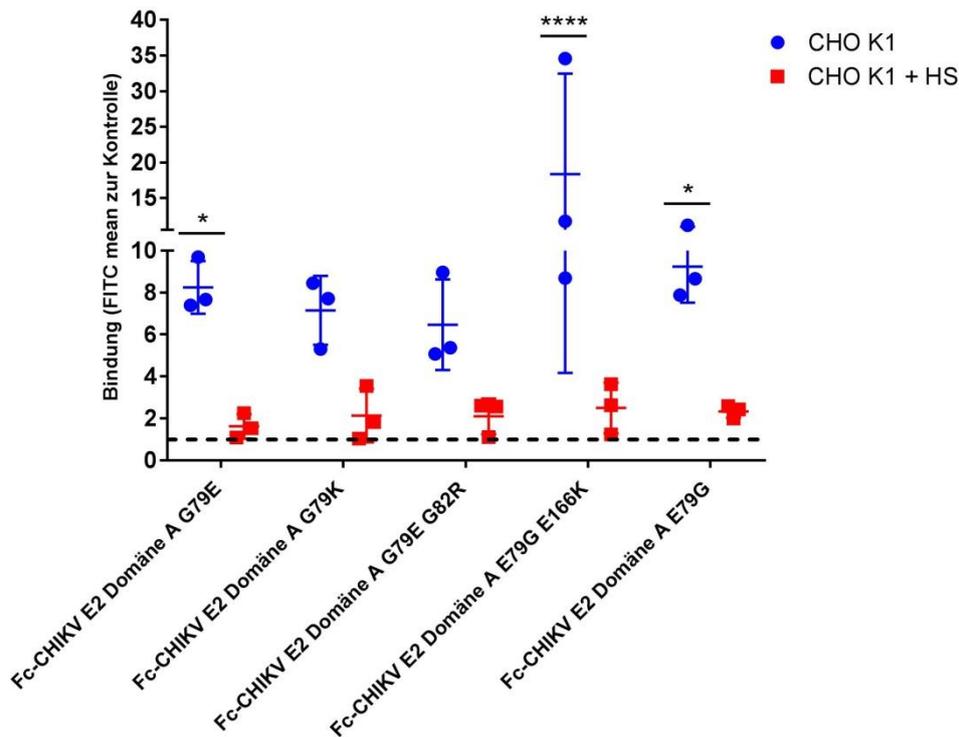


Abb. 30 Hemmung der GAG-abhängigen Zellbindung durch Zugabe von Heparansulfat

10 µg Protein wurden mit Heparansulfat in einer Konzentration von 500 µg/ml vermengt und 30 min bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurden CHO K1 Zellen mit dem Protein-Heparansulfat-Mix und zum Vergleich mit 10 µg unbehandeltem Protein inkubiert. Bindende Proteine wurden von FITC-gelabelten anti-human-IgG-Antikörpern markiert und emittierendes FITC-Signal mittels FACS erfasst. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Bindung des Fc-Fragments. Als CHIKV-spezifisch wurden Bindungsaktivitäten oberhalb dieser Linie angesehen. Mit *, **** werden signifikante Bindungen beschrieben.

4.2.3.2 Bindung der Domäne A-Mutanten an Heparin-Sepharose

Die Immunpräzipitation mit Heparin-Sepharose simulierte die direkte Bindung an Glykosaminoglykane. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in 4.1.3.2. In diesem Versuch wurden 10 µg Fusionsprotein eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Coomassie-Färbung. Das Gel ist in Abb. 27 zu sehen.

In nachfolgender Tabelle sind nochmals die ermittelte Konzentration (Abb. 27), sowie die daraus resultierenden, benötigten Volumina beschrieben:

Fusionsprotein	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79K	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E G82R	Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G E166K	Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G
Konzentration anhand des Coomassie-Gels	0,09 µg/µl	0,055 µg/µl	0,03 µg/µl	0,03125 µg/µl	0,06 µg/µl
Benötigtes Volumen für 10 µg Protein	111,1 µl	181,8 µl	333,3 µl	320 µl	166,6 µl

Wie schon in 4.1.3.2 beschrieben, bindet auch das Fc-Protein schwach an Heparin-Sepharose (Abb. 22). Beim Vergleich der Bandenstärke von den Domäne A-Varianten mit der Bande des Fc-Proteins, waren alle deutlich stärker und ließen auf eine stärkere Bindungsaktivität von Domäne A G79E und ihrer Mutanten an die Heparin-Sepharose schließen (Abb. 31). Ein geringer Unterschied zwischen Wildtyp-Domäne A (G79E) und Mutanten konnte nur für die Mutation E79G E166K detektiert werden (Abb. 31, Spur 5), was den Ergebnissen der Bindungsversuche auf CHO K1 und pgsA-745 Zellen entspricht (Abb. 28 und 29).

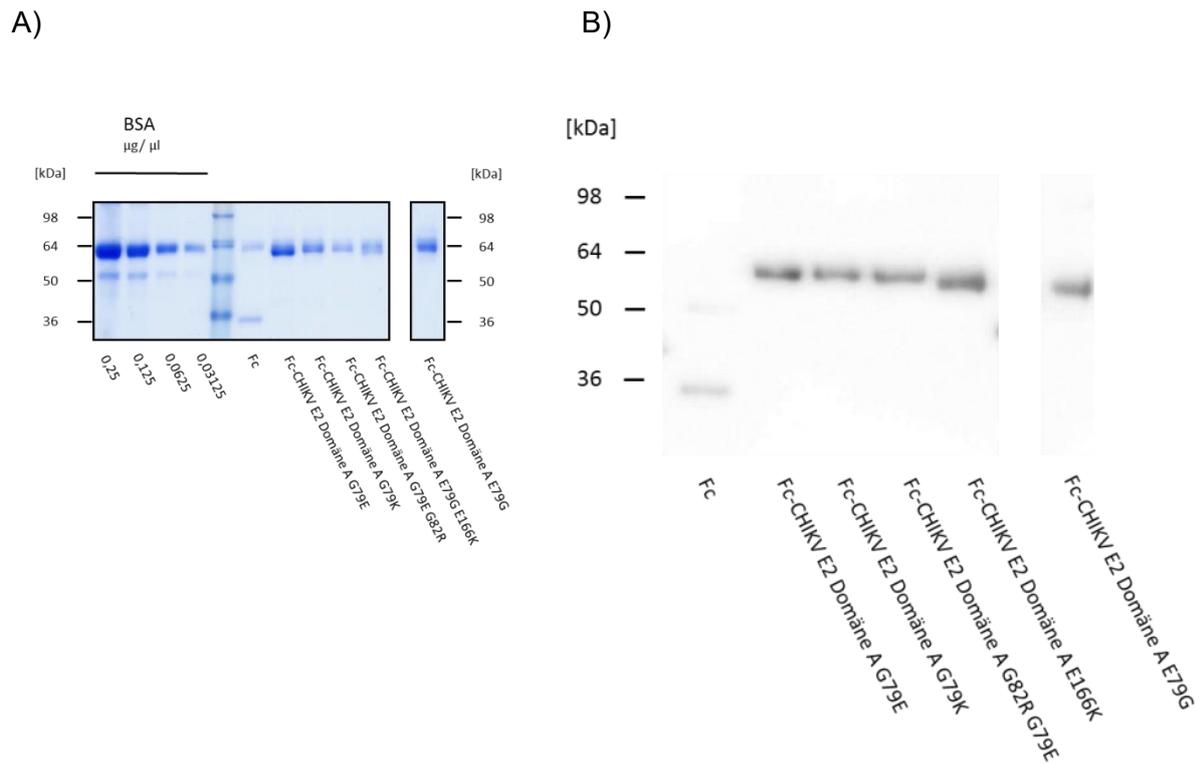


Abb. 31 Bindung der Mutanten an Heparin-Sephrose

Jeweils 10 µg der Fusionsproteine wurden mit 100 µl Heparin-Sephrose vermischt und 2 h bei RT und ständigem Rotieren inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE separiert und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mithilfe eines anti-human-IgG- γ -chain-HRP Antikörpers und anschließender Messung der Chemilumineszenz. A) zeigt erneut das Coomassie-Gel, anhand dessen die Proteinkonzentration bestimmt wurde. In B) ist die Western Blot Analyse der an Heparin-Sephrose gebundenen Fusionsproteine zu sehen.

4.3 Detaillierte Analyse der Funktion des β -ribbon-connectors

4.3.1 Herstellung von Varianten des β -ribbon-connectors als Fc-Fusionsproteine

Um zu ermitteln welche Rolle der β -ribbon-connector bei der Zellbindung spielt, wurden weitere Fusionsproteine generiert, die Domäne A ohne β -ribbon-connector, Domäne B mit β -ribbon-connector und nur die beiden Teile des β -ribbon-connector, verbunden über einen G₄PG₅-Linker, enthielten.

Zur Herstellung der Fusionsproteine wurde die Information für den jeweiligen Teil des CHIKV mittels PCR abgelesen und über die Restriktionsenzyme Apa I und Nhe I in den pCMV2.5-hlgG1Fc-XP-Vektor kloniert (s. Abb. 32).

Folgende Plasmide wurden als Template bei der PCR genutzt:

Template	abgelesene Information	Genutzte Primer
pET-15b-CHIKV E2 Domäne A	Domäne A E79G ohne β -ribbon-connector (AA 1-133)	CHIKV E2 Domäne A fw CHIKV E2 Domäne A- β rev
pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV E2ecto	Domäne B mit β -ribbon-connector (AA 133-271)	CHIKV E2 Domäne B fw CHIKV E2 Domäne B rev
pET-15b-CHIKV E2 Domäne A	β -ribbon-connector (AA 133-172 + G ₄ PG ₅ -Linker + AA 231-271)	CHIKV E2 β -ribbon-connector fw CHIKV E2 Domäne A rev

In der Sequenz des β -ribbon-connectors befindet sich außerdem an Position 263 eine Glykosylierungsstelle, an der durch N-Glykosylierung ein Zuckerrest an die Aminosäure Asparagin (N) gebunden wird (Voss et al. 2010). Diese Glykosylierung erfolgt nicht in Bakterienzellen, aber in eukaryotischen Zellen. Da die Domäne A mit β -ribbon-connector als Fusionsprotein (hergestellt von eukaryotischen Zellen) höhere Bindungsaktivitäten zeigte, als dieselbe Domäne hergestellt in *E.coli* (Weber et al. 2017), rückte die Glykosylierungsstelle in den Fokus. Außerdem ist ein anderes Glykosylierungsmuster des E2 Glykoproteins nach Passagierung auf Moskitozellen beobachtet worden, was in einem Verlust der Glykosaminoglykanbindung des Virus resultierte (Acharya et al. 2015). Durch die Punktmutation der Position 263 von Asparagin (N) zu Alanin (A), wird eine Glykosylierung auch bei der Produktion von Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen verhindert. Mit Hilfe der PCR, unter Verwendung eines reverse Primers der die Punktmutation enthielt, wurde die genetische Information der Domänen A mit beiden Anteilen des β -ribbon-connectors (über

G₄PG₅-Linker verbunden) ohne Glykosylierungsstelle vom Plasmid pET-15b-CHIKV E2 Domäne A abgelesen (Primer: CHIKV E2 Domäne A fw, CHIKV E2 Domäne A ohne Glykosylierungsstelle rev) und mithilfe der Restriktionsenzyme Apa I und Nhe I in den pCMV2.5-hlgG1Fc-XP-Vektor kloniert (Abb. 32). Die weiteren Schritte entsprachen denen, die in 4.1.1 aufgeführt sind.

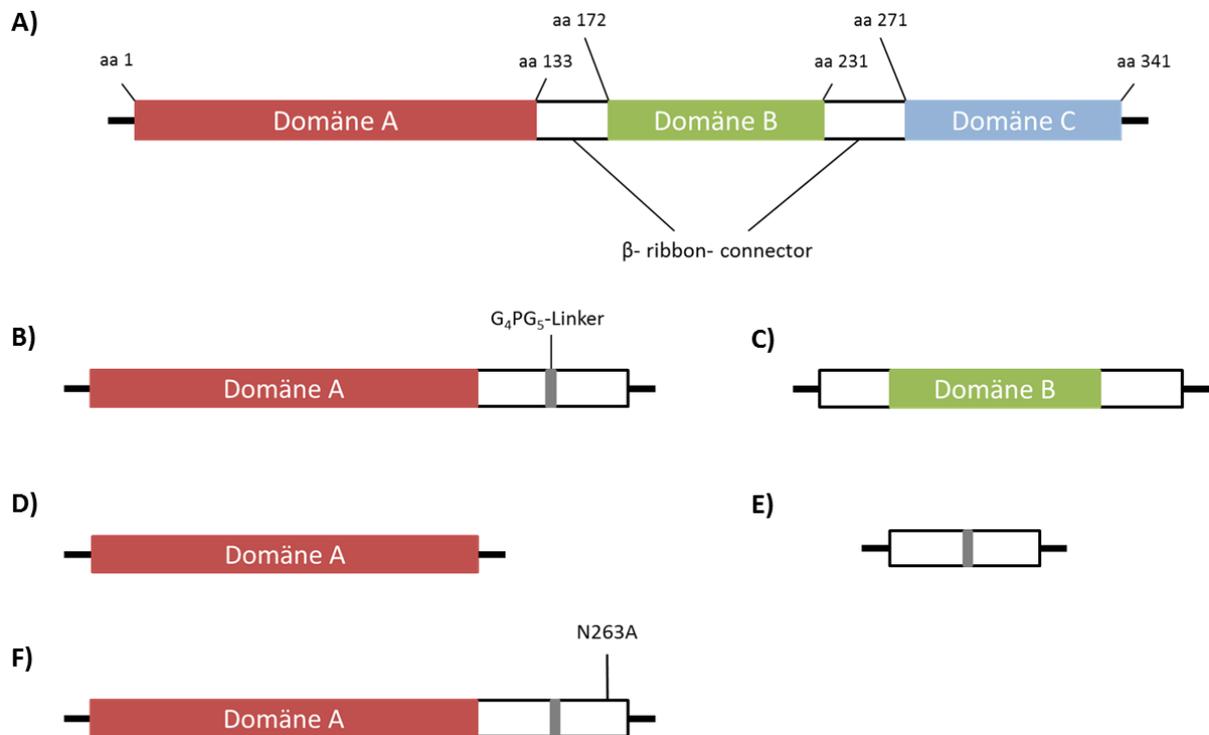


Abb. 32 Schematische Darstellung der Varianten des β -ribbon-connectors

A) zeigt die Sequenz des extrazellulären Teils des Glykoprotein E2, schematisch dargestellt. B) zeigt die CHIKV E2 Domäne A, welche die Domäne A plus beide Teile des β -ribbon-connectors, verbunden über einen G₄PG₅-Linker enthält. C) ist eine Abbildung der Variante CHIKV E2 Domäne B+ β -ribbon-connector. Bei D) ist CHIKV E2 Domäne A ohne den β -ribbon-connector (A- β) zu sehen und E) repräsentiert beide Teile des β -ribbon-connectors, verbunden über einen G₄PG₅-Linker. F) zeigt CHIKV E2 Domäne A-Gly, die einen Aminosäure-Austausch an Position 263 aufweist und somit keine Glykosylierungsstelle mehr besitzt, außerdem sind beiden Anteilen des β -ribbon-connectors, verbunden über einen G₄PG₅-Linker, vorhanden.

In der Sequenz der Fusionsproteine, die A- β und A-Gly enthalten, musste auch hier mithilfe einer Mutagenese-PCR eine „Rückmutation“ von G79E vollzogen werden. Die Mutagenese-PCR wurde wie in 3.2.3.9 beschrieben, unter der Verwendung der Primer *wt-G79E for* und *wt-G79E rev* durchgeführt und lies die Plasmide pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A- β G79E und pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV Domäne A-Gly G79E entstehen.

Insgesamt sind folgende Plasmide generiert worden:

Plasmid	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV E2 Domäne A- β (AA 1-172) G79E	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV E2 Domäne B+ β (AA 133-271)	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV E2 β -ribbon-connector (AA 133-172+ G4PG5-Linker+ AA 231-271)	pCMV2.5-hlgG1-Fc-XP-CHIKV E2 Domäne A (AA 1-172+ G4PG5-Linker+ AA 231-271) G79E N263A
Fusionsprotein	Fc-CHIKV E2 Domäne A- β G79E	Fc-CHIKV E2 Domäne B+ β	Fc-CHIKV E2 Domäne β -ribbon-connector	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E N263A

HEK 293T Zellen wurden mit den generierten Plasmiden transfiziert und die Fusionsproteine mithilfe der Protein A-Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand von Tag 2 und 3 isoliert (siehe 4.1.1.1). Die Produktion erfolgte drei Mal unabhängig voneinander.

Der Zellüberstand von transfizierten HEK 293T Zellen wurde via Western Blot Analyse auf vorhandenes Fusionsprotein der Varianten des β -ribbon-connectors überprüft (Abb. 33). Berechnungen zufolge sollten die sekretierten Fusionsproteine Fc-CHIKV E2 Domäne A- β 41,6 kDa, Fc-CHIKV E2 Domäne B+ β 42,7 kDa, Fc-CHIKV E2 β -ribbon-connector 38,7 kDa und Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E N263A 51,1 kDa groß sein. Unberücksichtigt bleibt hierbei die Erhöhung des Molekulargewichts durch posttranslationale Modifikationen (siehe 4.1.2), die zu einem Laufverhalten der Fusionsproteine oberhalb der errechneten Größe führen (Abb. 33). Alle Proteine wurden sekretiert und die richtige Aminosäuresequenz wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

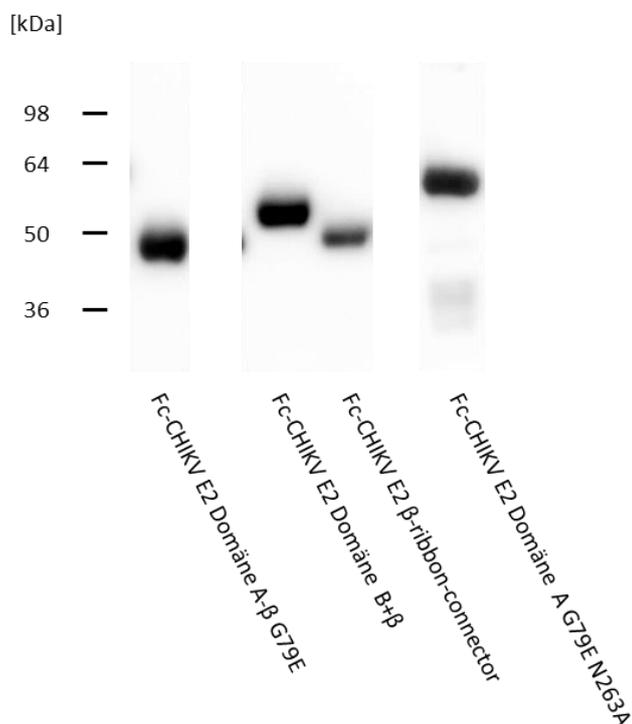


Abb. 33 Identifikation der Varianten des β -ribbon-connectors im Zellüberstand von transfizierten HEK 293T Zellen

Die Fc-Fusionsproteine wurden aus transfizierten HEK 293T-Zellen mithilfe von Protein A aufgereinigt, via SDS-PAGE separiert und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mittels anti-human-IgG- γ -chain-HRP Antikörpers und anschließender Messung der Chemilumineszenz.

Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden erneut mittels SDS-PAGE separiert und anschließend mit Coomassie gefärbt, um eine Konzentrationsbestimmung durchführen zu können (Abb. 34). Die Fusionsproteinproduktion erfolgte dreimal unabhängig voneinander. Exemplarisch ist nur ein Coomassie-Gel zur Konzentrationsbestimmung aufgeführt, die übrigen sind im Anhang zu finden 8.2.3.

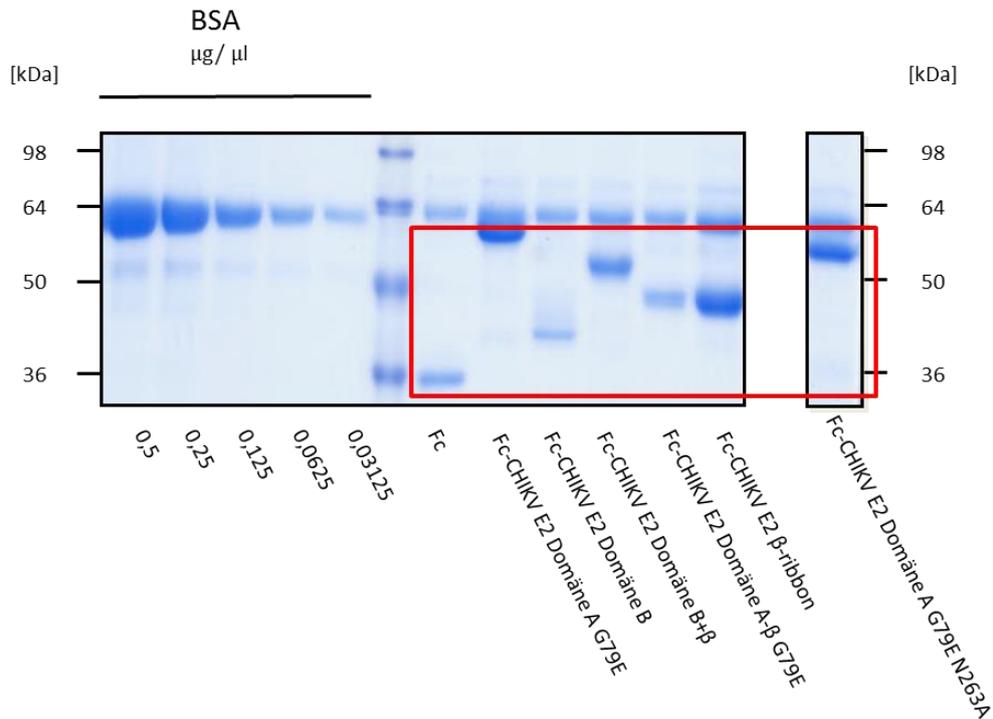


Abb. 34 Konzentrationsbestimmung der Varianten des β -ribbon-connectors

Die Fusionsproteine (rechts) wurden gegen eine BSA-Konzentrationsreihe (links) aufgetragen. Der rote Kasten markiert den Bereich, in dem sich die gewünschten Proteine befinden. Die Bandenstärke der Proteine wurde mit denen der Konzentrationsreihe verglichen und so die Konzentration ermittelt. Das Probenvolumen betrug jeweils 30 μ l.

Mithilfe des Coomassie-Gels (Abb. 34) wurden folgende Konzentrationen bestimmt:

Fusionsprotein	Konzentration anhand des Coomassie-Gels	Volumen für 10 μ g Protein
Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E	0,25 μ g/ μ l	40 μ l
Fc-CHIKV E2 Domäne B	0,045 μ g/ μ l	222,2 μ l
Fc-CHIKV E2 Domäne B+ β	0,125 μ g/ μ l	80 μ l
Fc-CHIKV E2 Domäne A- β G79E	0,0625 μ g/ μ l	153,8 μ l
Fc-CHIKV E2 β -ribbon-connector	0,3 μ g/ μ l	33,3 μ l
Fc-CHIKV E2 Domäne A-Gly G79E	0,25 μ g/ μ l	40 μ l

4.3.2 Untersuchung der Zellbindung mit den Varianten des β -ribbon-connectors (β -Varianten)

Für die Zellbindungsversuche wurden CHO K1 (zelluläre GAG) und pgsA-745 (keine GAG) Zellen mit jeweils 10 μ g und 20 μ g Protein 30 min bei 4°C inkubiert. Bindende Proteine wurden mithilfe eines gegen humanes IgG-gerichteten und FITC-gekoppelten Antikörper detektiert und via Durchflusszytometrie gemessen.

Als erstes wurde das Verhalten der β -Varianten in einer Konzentration von 10 μ g Fusionsprotein auf CHO K1 und pgsA-745 Zellen verglichen. Hier konnte gezeigt werden, dass Fusionsproteine, die eine Domäne in Kombination mit dem β -ribbon-connector enthielten, stärker an Zellen gebunden hatten, als Fusionsproteine ohne β -ribbon-connector (Abb. 35). Deutlich signifikante Bindungen konnten für Domäne B mit β -ribbon-connector und die Glykosylierungsmutante A G79E N263A auf CHO K1 Zellen gemessen werden (Abb. 35 A, Spur 7 und 11), wobei die Bindung der Domäne B+ β -ribbon-connector geringgradig schwächer ausfiel (Abb. 35 A, Spur 7). Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E N263A zeigte auch eine signifikante Bindung an pgsA-745 Zellen (Abb. 35, Spur 12). Bei Domänen A ohne β -ribbon-connector war auf beiden Zelllinien keine Bindungsaktivität zu beobachten, in Kombination mit dem β -ribbon-connector konnte die Domäne aber an Zellen binden (Abb. 35 A, B, Spur 1 und 3, nicht signifikant). Für den β -ribbon-connector alleine war nur auf CHO K1 eine Bindung ersichtlich, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies (Abb. 35, Spur 9).

Daraus lässt sich schließen, dass der β -ribbon-connector die GAG-abhängige und vielleicht auch schwach die GAG-unabhängigen Zellbindung vermittelt. In Kombination mit Domäne B zeigt der β -ribbon-connector eine stärkere Zellbindung als in Kombination mit Domäne A (Abb. 35, Spur 1+2, 7+8), weshalb die Domäne B wohl auch an der Zellbindung beteiligt ist. Die Deletion der Glykosylierungsstelle bewirkte auf beiden Zelllinien einen Anstieg der Bindungsaktivität. Dies führt zur Annahme, dass eine Glykosylierung des β -ribbon-connectors an der Stelle 263 eine Hemmung der Zellbindung zur Folge hat.

Zellbindungsversuche mit 10 µg Fusionsprotein (β -Varianten) auf CHO K1 und pgsA-745 Zellen

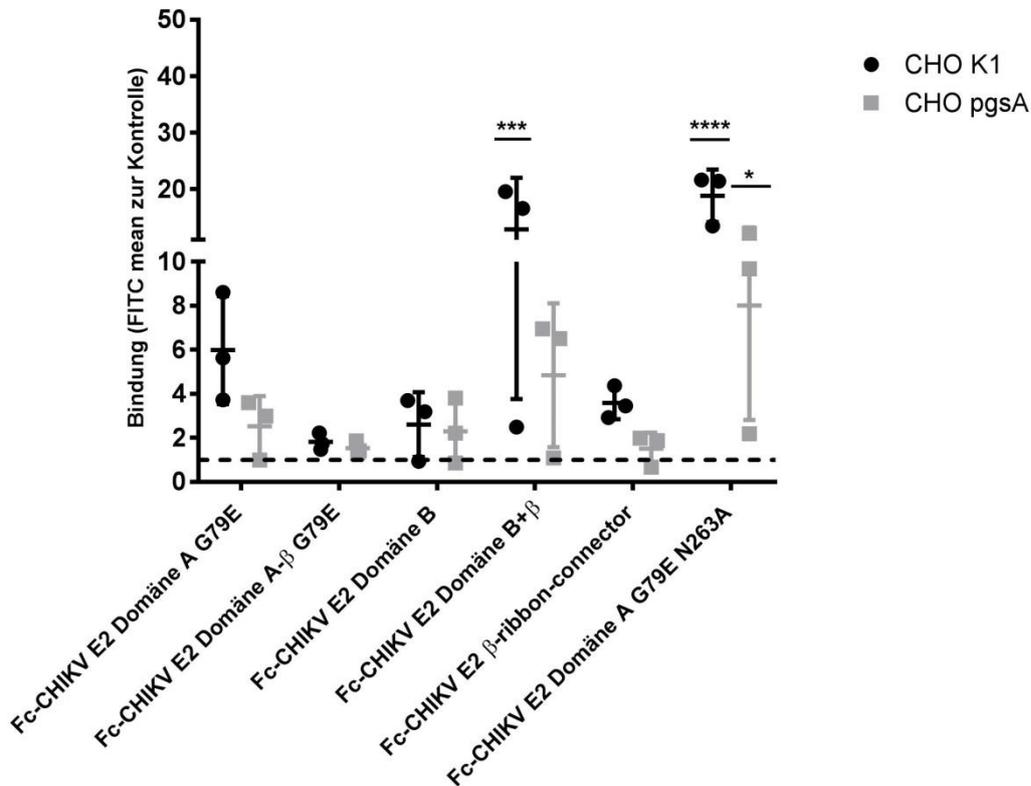


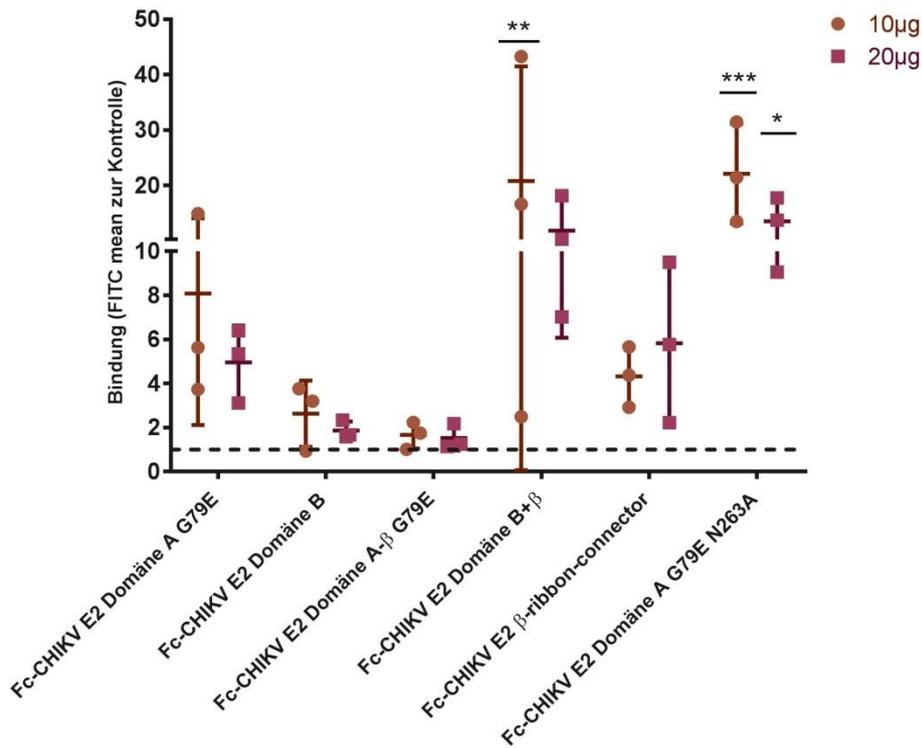
Abb. 35 Zellbindung der Varianten des β -ribbon-connectors

CHO K1 und pgsA-745 Zellen wurden mit 10 µg Protein inkubiert. Bindende Proteine wurden von FITC-gelabelten anti-human-IgG-Antikörpern markiert und emittierendes FITC-Signal mittels FACS erfasst. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Bindung des Fc-Proteins. Als CHIKV-spezifisch wurden Bindungsaktivitäten oberhalb dieser Linie angesehen. Es sind der Mittelwert (FITC mean zur Kontrolle) und die SD angegeben. Signifikante Bindungen der Fusionsproteine an Zellen sind mit *, *** oder **** gekennzeichnet.

Zur Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit der Bindung wurden die Fusionsproteine jeweils in zwei Konzentrationen (10 µg und 20 µg) auf CHO K1 und pgsA-745 Zellen getestet (Abb. 36). Eine Konzentrationserhöhung korrelierte auf CHO K1 Zellen in den meisten Fällen negativ mit der Bindungsaktivität (Abb. 36 A). Dies lässt, wie auch in den vorherigen Bindungsversuchen mit Fusionsproteinen, auf das Erreichen einer Sättigungsgrenze der zellulären Bindungsstellen schließen. Nur der β -ribbon-connector alleine zeigte mit Erhöhung der Konzentration auch eine verstärkte, jedoch nicht signifikante Bindung (Abb. 36 A, Spur 9+10).

Auf pgsA-745 Zellen ließ ein Konzentrationsanstieg eine leichte Steigung der Bindung erahnen, die am deutlichsten bei A G79E N263A ausfiel (Abb. 36 B, Spur 9+10, 11+12). Auch für die Domänen A und B in Kombination mit dem β -ribbon-connector, sowie für Domäne B bei einer Konzentration von 20 µg Protein (siehe 4.1), war ein Trend der pgsA-745-Zellbindung zu erkennen. Der β -ribbon-connector alleine wies nur einen Wert auf, der deutlich oberhalb der spezifischen Bindungsgrenze lag und für eine spezifische Zellbindung sprechen würde. Dies deutet zum einen auf noch unbesetzte zelluläre Bindungsstellen hin, zum anderen zeigt es, dass der β -ribbon-connector, vor allem in Kombination mit einer E2-Domäne, auch die GAG-unabhängig Zellbindung fördert. Sofern er nicht glykosyliert ist und in Kombination mit Domäne A vorliegt, führt dies zu einer deutlichen Bindungsverstärkung an beide Zelllinien.

A) Zellbindungsaktivität der β -Varianten in zwei Konzentrationen auf CHO K1 Zellen



B) Zellbindungsaktivität der β -Varianten in zwei Konzentrationen auf pgsA-745 Zellen

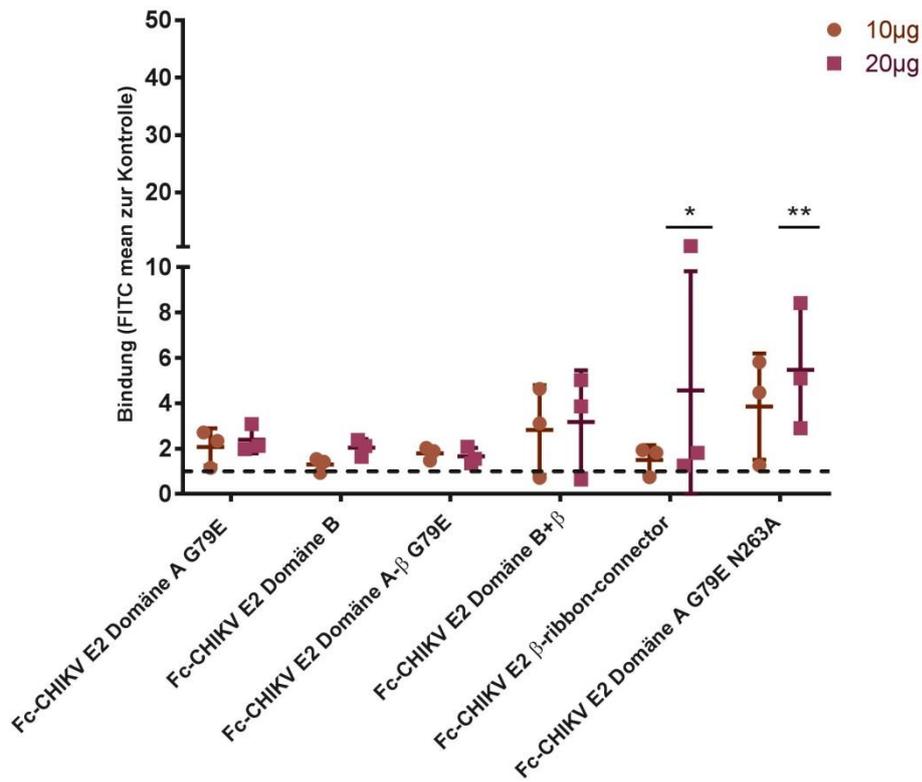


Abb. 36 Zellbindung der Varianten des β -ribbon-connectors

CHO K1 und pgsA-745 Zellen wurden mit jeweils 10 μ g und 20 μ g Protein inkubiert. Bindende Proteine wurden von FITC-gelabelten anti-human-IgG-Antikörpern markiert und emittierendes FITC-Signal mittels FACS erfasst. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Bindung des Fc-Proteins. Als CHIKV-spezifisch wurden Bindungsaktivitäten oberhalb dieser Linie angesehen. Bei A) wurden zwei Proteinkonzentrationen (10 μ g und 20 μ g) auf CHO K1 und bei B) auf pgsA-745 Zellen getestet. Es sind der Mittelwert (FITC mean zur Kontrolle) und die SD angegeben. Mit *, **, *** werden die signifikanten Bindungen markiert.

4.3.3 GAG-abhängige Zellbindung der β -Varianten

Zur Untersuchung, inwieweit die Bindung des β -ribbon-connectors GAG-abhängig ist, wurden weitere Versuche durchgeführt.

4.3.3.1 Hemmung der Zellbindung durch lösliches GAG

Bei diesem Experiment wurden Bindungsversuche, wie in 4.1.3.1 beschrieben, vollzogen, wobei ermittelt wurde, ob lösliches Heparansulfat (HS) zu einer Beeinflussung der Bindung an zelluläre GAG führt.

Vergleichbar zu dem Bindungsverhalten der Fusionsproteine auf pgsA-745 Zellen (Abb. 32 A, C) war auch hier eine verminderte Bindungsaktivität bei vorhandenem HS zu verzeichnen (Abb. 33). Die Bindung von Fc-CHIKV E2 Domäne A ohne β -ribbon-connector blieb unbeeinflusst und band nicht an Zellen (Abb. 33 Spur 5+6).

Fusionsproteine mit β -ribbon-connector binden stark an GAG-exprimierende Zellen. Diese Bindung ist durch Vorinkubation mit löslichem HS hemmbar, dennoch bleibt eine geringe Zellbindungsaktivität bestehen. Die Ergebnisse sind mit den Zellbindungsversuchen auf CHO K1 und pgsA-745 Zellen vergleichbar (Abb. 35) und unterstützen die Annahme, dass der β -ribbon-connector vor allem die GAG-abhängige, aber auch schwach die GAG-unabhängige Bindung fördert bzw. für diese verantwortlich ist.

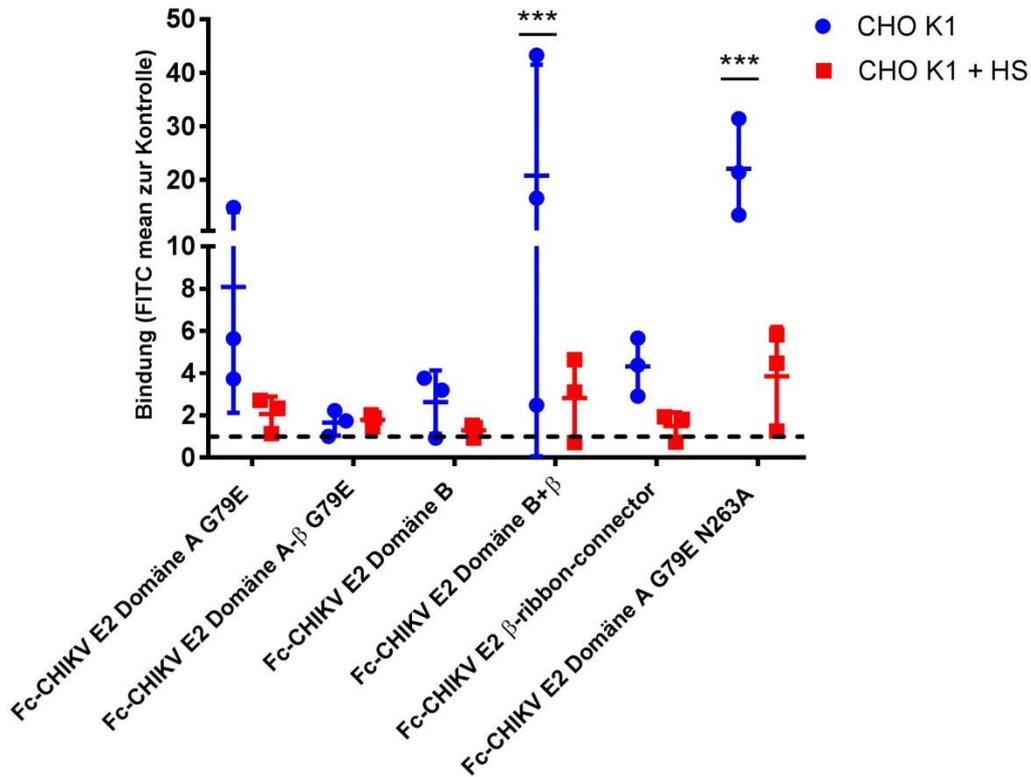


Abb. 37 Beeinflussung der Zellbindung durch Zugabe von löslichem GAG

10 µg Protein wurden mit Heparansulfat in einer Konzentration von 500 µg/ml vermengt und 30 min bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurden CHO K1 Zellen mit dem Protein-Heparansulfat-Mix und zum Vergleich mit 10 µg unbehandeltem Protein inkubiert. Bindende Proteine wurden von FITC-gelabelten anti-human-IgG-Antikörpern markiert und emittierendes FITC-Signal mittels FACS erfasst. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Bindung des Fc-Proteins. Als CHIKV-spezifisch wurden Bindungsaktivitäten oberhalb dieser Linie angesehen. Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, der Mittelwert (FITC mean zur Kontrolle) und die Standardabweichung sind angegeben. *** kennzeichnet die signifikanten und n. s. die nicht signifikanten Bindungen.

4.3.3.2 Bindung der β -Varianten an Heparin-Sepharose

Um auszuschließen, dass zelluläre Strukturen bei der Glykosaminoglykanbindung eine Rolle spielen, wurden die β -Varianten mit Heparin-Sepharose inkubiert. Eine Bindung der Fusionsproteine an Heparin lässt auf vorhandene GAG-Rezeptoren der Fusionsproteine schließen. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in 4.1.3.2 beschrieben und Fc-Fusionsproteine, die nach Inkubation mit der Heparin-Sepharose an diese gebunden haben, wurden mittels Western Blot Analyse (Abb. 33) identifiziert. Eingesetzt wurden 10 μg Fusionsprotein (siehe 4.3.1 Abb. 34, bzw. 4.3.2 Tabelle).

Das benötigte Volumen wurde mithilfe der Konzentrationsbestimmung anhand des Coomassie-Gels (Abb. 34) errechnet und ist nachfolgend beschrieben:

Fusionsprotein	Konzentration anhand des Coomassie-Gels	Volumen für 10 μg Protein
Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E	0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	40 μl
Fc-CHIKV E2 Domäne B	0,045 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	222,2 μl
Fc-CHIKV E2 Domäne B+ β	0,125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	80 μl
Fc-CHIKV E2 Domäne A- β G79E	0,0625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	153,8 μl
Fc-CHIKV E2 β -ribbon-connector	0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	33,3 μl
Fc-CHIKV E2 Domäne A-Gly G79E	0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	40 μl

Vergleichbar mit den Ergebnissen der Bindungsversuche auf den CHO K1 Zellen, zeigten auch hier alle Konstrukte eine deutlich stärkere Bindung zur Heparin-Sepharose im Gegensatz zum Fc-Fragment alleine (Abb. 38). Außerdem wurde mehr Protein bei den Konstrukten, die den β -ribbon-connector beinhalten, präzipitiert (Abb. 38, Spur 2, 4, 7). Abweichend davon zeigte auch A- β eine deutliche Bande, die stärker war als die des β -ribbon-connectors alleine und Domäne A+ β -ribbon-connector (Abb. 38, Spur 5). Die deutlichsten Präzipitationen zeigten sich bei der Glykosylierungs-Mutante (Abb. 34, Spur 7). Mit diesen Versuchsergebnissen wurde weitestgehend bestätigt, dass der β -ribbon-connector eine hohe Bindungsaffinität zu GAG aufweist und in Kombination mit den Domänen die Bindung an GAG verstärkt. Der β -ribbon-connector scheint den Großteil der

GAG-abhängigen Bindung zu übernehmen. Weiterhin führt eine Deletion der Glykosylierungsstelle auch in diesem Versuch zu einer verstärkten GAG-Bindung. Die N-Glykosylierung an der Stelle 263 scheint die GAG-Bindung zu hemmen.

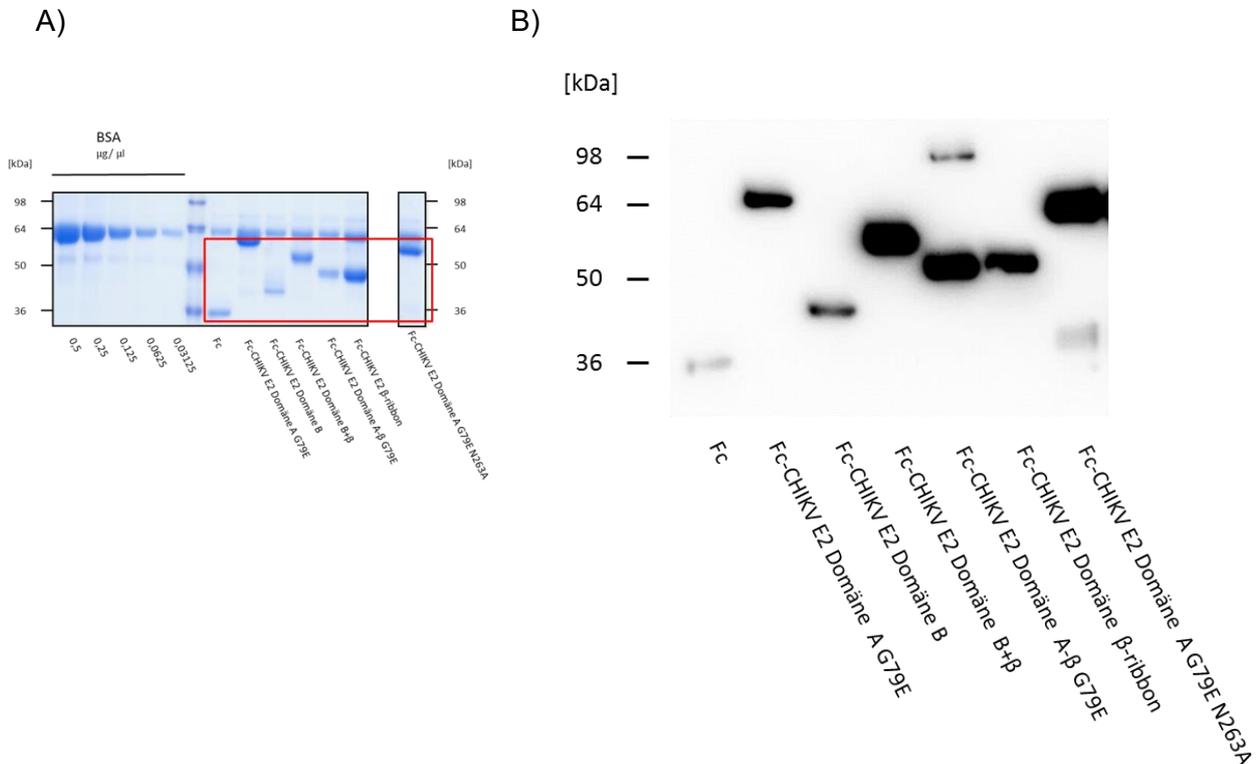


Abb. 38 Bindung der Varianten des β -ribbon-connectors an Heparin-Sepharose

Jeweils 10 μg der Fusionsproteine wurden mit 100 μl Heparin-Sepharose vermischt und 2 h bei RT und ständigem Rotieren inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE separiert und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mithilfe eines anti-human-IgG- γ -chain-HRP Antikörpers und anschließender Messung der Chemilumineszenz. A) zeigt das Coomassie-Gel zur Konzentrationsermittlung. Bei B) ist die Western Blot Analyse der Heparin-Sepharose-Bindung zu sehen.

4.4 Untersuchung auf hemmende Wirkung der Fusionsproteine auf den CHIKV-Zelleintritt via Luciferase-Assay

Mithilfe eines Luciferase-Assays im 384 well Format wurde getestet, ob die Fusionsproteine die Infektion von eukaryotischen Zellen mit einem Luciferase-markiertem Chikungunya Virus hemmen können.

Hierfür wurden HEK 293T, CHO K1 und pgsA-745 Zellen auf jeweils einer 384 well Platte ausgesät und über Nacht inkubiert (3.2.2.9). Die zu testenden Fusionsproteine wurden anhand von Coomassie-Gelen verglichen und nach optischer Wertung auf gleiche Konzentration gebracht. (Abb. 39).

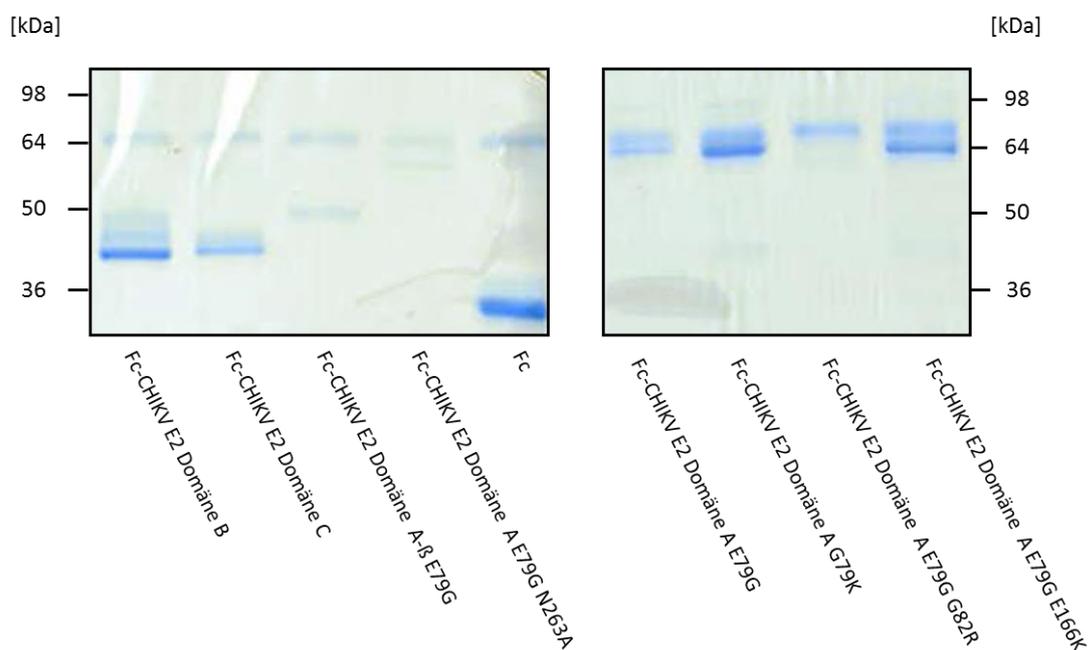


Abb. 39 Konzentrationsbestimmung der genutzten Fusionsproteine

Der Zellüberstand von transfizierten HEK 293T Zellen wurde mithilfe von Protein A aufgereinigt, die Proteine wurden anschließend via SDS-PAGE separiert und mit Coomassie gefärbt. Die Proteine wurden anhand ihrer Bandenstärke zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das Probenvolumen betrug jeweils 30 µl.

Die schwächste Bande wurde mit 1 versehen und unverdünnt im Versuch eingesetzt. Werte unter 1 enthalten Fusionsproteine, die in höherer Konzentration vorlagen und für den Versuch verdünnt werden mussten.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Fusionsproteine, in welcher Menge sie im Versuch eingesetzt werden, sowie ihre Verdünnung angegeben:

Fusionsprotein (+Fc)	Anpassung anhand des Coomassie-Gels: Angegeben ist der Anteil vom Gesamtvolumen (160 µl), der vom Fusionsprotein gebildet wird	Verdünnung
Domäne A E79G	1/2	80 µl Fusionsprotein+ 80 µl Zellkulturmedium+ 1% FCS
Domäne B	1/4	40 µl Fusionsprotein+ 120 µl Zellkulturmedium+ 1% FCS
Domäne C	1/2	80 µl Fusionsprotein+ 80 µl Zellkulturmedium+ 1% FCS
Domäne A ohne β-ribbon-connector E79G	1	160 µl Fusionsprotein unverdünnt
Domäne A G79K	1/4	40 µl Fusionsprotein+ 120 µl Zellkulturmedium+ 1% FCS
Domäne A E79G R82G	1	160 µl Fusionsprotein unverdünnt
Domäne A E79G E166K	1/4	40 µl Fusionsprotein+ 120 µl Zellkulturmedium+ 1% FCS
Domäne A-Gly E79G	1	160 µl Fusionsprotein unverdünnt
Fc (Leervektor)	1/8	20 µl Fusionsprotein+ 140 µl Zellkulturmedium+ 1% FCS

Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass die Fc-Domäne A-Varianten E79G eine schlechtere Expression und Sekretion in eukaryotischen Zellen zeigten (Daten siehe Anhang 8.1). Das Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G G82R Protein ist im Coomassie-Gel kaum zu sehen (Abb. 35), sodass dieses Fusionsprotein eindeutig in einer niedrigeren Konzentration eingesetzt wurde.

Anschließend wurden die Proteine 1:2 verdünnt, sodass 5 verschiedene Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) in Triplikaten getestet werden konnten. Es sind die Mittelwerte der relative light units in % zur Kontrolle (CHIKV-luci unbehandelt) und die Standardabweichung angegeben (Abb. 40). Die Zellen wurden 30 min mit den Proteinen inkubiert und anschließend mit CHIKV-luci (Henß et al. 2016) infiziert. Der weitere Versuchsablauf erfolgte wie in 3.2.2.9 beschrieben. Wenn die Zellen erfolgreich mit CHIKV-luci infiziert wurden, war eine Lichtemission detektierbar. Die Ergebnisse wurden gegen das gemessene Signal der Positivkontrolle, CHIKV-luci unbehandelt, ins Verhältnis gesetzt und die Werte als relative light units RLU in % der Kontrolle angegeben. Das bedeutet, dass eine prozentuale Angabe der relative light units unterhalb von 100% eine Hemmung und oberhalb der 100%-Grenze eine Verstärkung der CHIKV-luci Infektion widerspiegelt. Die Auswertung erbrachte folgende Ergebnisse: Die Infektion von HEK 293T Zellen wurde durch die Fusionsproteine deutlich verstärkt und war Konzentrationsabhängig. Diese Verstärkung fand jedoch auch bei der Inkubation der Zellen mit dem Fc-Fragment ohne CHIKV-Anteil statt (Abb. 40 A) und ist deshalb unspezifisch. Die Infektion von CHO K1 oder pgsA-745 Zellen wurde durch die Proteine nicht beeinflusst (Abb. 40).

C) Hemmung der CHIKV-luci Infektion von pgsA-745 Zellen durch Fc-Fusionsproteine

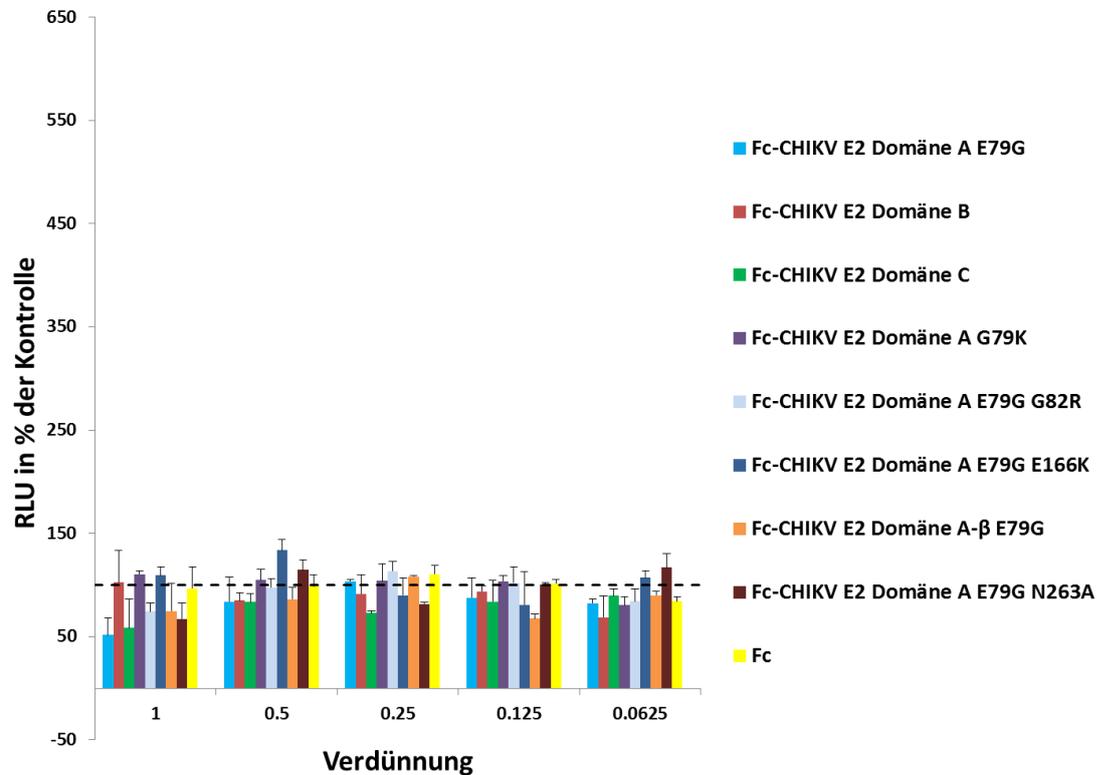


Abb. 40 Hemmung der CHIKV-Infektion durch Fusionsproteine

HEK 293T (A), CHO K1 (B) und CHO pgsA (C) Zellen wurden mit Fusionsprotein in 5 verschiedenen Verdünnungsstufen für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Infektion mit CHIKV-luci und eine 6 h Inkubation bei 37°C. Abschließend wurde emittierendes Licht-Signal mittels PHERAstar FS gemessen. Die Werte wurden als Relative Light Units (RLU) als % der Kontrolle angegeben. Die gestrichelte Linie repräsentiert die 100%-Grenze. Werte oberhalb dieser Linie beschreiben eine Verstärkung der CHIKV-Infektion, Werte unterhalb, eine Hemmung.

5. Diskussion

Das Chikungunyafieber wird durch eine Infektion des Menschen mit dem Chikungunyavirus (CHIKV) ausgelöst und geht häufig mit plötzlich auftretenden grippeähnlichen Symptomen einher. Ein intaktes Immunsystem ist in der Lage eine Infektion zu bekämpfen. In ca. 30% der Fälle entwickeln infizierte Personen jedoch schwere chronisch-rezidivierende Gelenkschmerzen (Schwartz und Albert 2010).

Das Chikungunyavirus wird durch Moskitos der Gattung *Aedes* übertragen und ist bislang endemisch und epidemisch in Afrika, im Indischen Ozean und Südostasien. Es breitet sich jedoch rasch global aus und führte bereits in Amerika und Europa zu Epidemien (Lines 2007; Gould et al. 2010; Delisle et al. 2015; Leparc-Goffart et al. 2014).

Eine Infektion kann nur symptomatisch behandelt werden, da weder Medikamente noch Impfstoffe zur Verfügung stehen. Aufgrund der wiederholten großen Epidemien in den letzten Jahren und der zu erwartenden weiteren Ausbreitung von CHIKV in den nächsten Jahren und Jahrzehnten, ist die Entwicklung eines Impfstoffes und einer spezifischen Behandlung gegen das Virus dringend notwendig.

5.1 Charakterisierung des CHIKV-Zelleintritt

Der Eintritt in die Wirtszelle wird über die Glykoproteine E1 und E2, die sich auf der Hülle des Chikungunya Virus befinden, ermöglicht. Über Rezeptor-vermittelte Endozytose und anschließender Membranfusion gelangt das virale Nukleokapsid ins Zytoplasma der Wirtszelle (Lee et al. 2013). In diesem Prozess übernimmt das Glykoprotein E2 den ersten Schritt und bindet an Strukturen auf der Wirtszellmembran. Es ist weder ausreichend bekannt welche Areale im E2-Protein, noch welche Strukturen auf der Wirtszellmembran in die Virus-Zellbindung involviert sind. Der Rezeptorbindungsschritt hat eine besondere Bedeutung in der Forschung zur Herstellung präventiver Arzneimittel die eine CHIKV-Infektion verhindern sollen. Sofern das Virus bereits daran gehindert werden kann an die Wirtszelle zu binden, kann eine Virusvermehrung nicht erfolgen und die injizierte Viruspopulation (Moskitobiss) bleibt lokal und auf ihre initial verabreichte Dosis beschränkt.

Auf der Virushülle liegt das Glykoprotein E2 mit dem Fusionsprotein E1 als Heterodimer vor, von denen jeweils drei zu Trimeren zusammengelagert sind und einen der 80 Spikes bilden. E2 überragt dabei E1 und liegt somit der viralen Oberfläche auf. Es besteht aus den Domänen A, B und C, wobei Domäne B das distale Ende bildet, Domäne A im Zentrum liegt und Domäne C nahe der viralen Membran zu finden ist (Voss et al. 2010). Die Domänen sind über einen β -ribbon-connector miteinander verbunden. Innerhalb der Spikes ist in jedem Heterodimer die Domäne B zur Seite geneigt. Die jeweiligen A-Domänen kommunizieren

miteinander und bilden das Zentrum. Somit stellen diese beiden Domänen und ihre Verbindung (β -ribbon-connector) den ersten Kontakt zur Außenwelt dar, wodurch es nicht verwunderlich ist, dass vermutlich diese Strukturen an der Rezeptorbindung beteiligt sind (van Duijl-Richter et al. 2015). Die einzelnen Domänen wurden bereits mit Hilfe von, in *E. coli* generierten, rekombinanten Proteinen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Domäne A und B an Zellen binden und Domäne C nicht am Zellbindungsprozess beteiligt ist (Weber et al. 2017). Als zelluläre Bindungspartner sind unter anderem Glykosaminoglykane (GAG) beschrieben worden. GAG sind negativ geladene, saure Polysaccharide, die aus Disaccharid-Einheiten bestehen und auf nahezu jeder Zellmembran anzutreffen sind. GAG konnten schon für andere Alphaviren als zellulärer Rezeptor identifiziert werden (Christianson und Belting 2014; Gardner et al. 2011; Smit et al. 2002) und so auch für Chikungunya (Tanaka et al. 2017; Weber et al. 2017). Bei genauerer Betrachtung der einzelnen E2-Domänen, konnte für Domäne B eine Glykosaminoglykan-abhängige Bindungsaktivität ermittelt werden. Domäne A+ β -ribbon-connector hingegen zeigte nur eine teilweise GAG-abhängige Bindung und konnte auch auf nicht GAG-exprimierenden Zellen binden (Weber et al. 2017).

5.1.1 Untersuchung der einzelnen CHIKV E2 Domänen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mithilfe von Fusionsproteinen, die aus einer Fusion des Fc-Teils eines humanen Antikörpers mit einer Domäne des CHIKV E2-Proteins bestehen, die Bindungsaktivität der einzelnen Domänen genauer analysiert und zusätzlich die GAG-Abhängigkeit ihrer Bindung geprüft. Die Domänen B und C wurden hierbei alleine und Domäne A in Kombination mit beiden Teilen des β -ribbon-connectors betrachtet. Diese Fusionsproteine wurden von eukaryotischen Zellen (humane embryonale Nierenzellen) produziert, wodurch die natürliche Faltung, die die einzelnen Proteine während der Replikation in infizierten Primaten vollziehen, unterstützt werden sollte. Leider war es aufgrund einer relativ geringen Probenanzahl ($n=3$) zum Teil schwierig eine statistische Signifikanz der Bindungsstärken der einzelnen Fc-Fusionsproteine zu ermitteln. Daher wird im Weiteren neben signifikanten Bindungen auch der Trend zur Zellbindung diskutiert.

Die Kombination aus Domäne A und β -ribbon-connector zeigte die stärkste Bindung auf CHO K1 Zellen (Abb. 19, 20 A), eine Zelllinie, die Glykosaminoglykane (GAG) auf ihrer Zelloberfläche exprimiert. Durch die Tatsache, dass die beschriebene Kombination eine schlechtere Bindungsaktivität an pgsA-745 Zellen zeigte (Abb. 19), die Bindung an CHO K1 Zellen durch lösliches GAG (Heparansulfat) gehemmt werden kann (Abb. 21) und sie außerdem an Heparin-Sepharose band (Abb. 22), wird die Annahme bestätigt, dass Domäne A mit β -ribbon-connector an zelluläre Glykosaminoglykane bindet. Interessant ist, dass die Bindung an CHO K1 Zellen konzentrationsabhängig zu sein scheint. Höhere

Konzentrationen des Fusionsproteins führen zu einer Abnahme der Bindungsaktivität (Abb. 20 A). Eine mögliche Erklärung für dieses Ereignis wäre, dass die Bindungsaffinität zu Glykosaminoglykanen recht hoch ist. Da gerade positiv geladene Anteile des Proteins mit den negativ geladenen GAG interagieren, kommt es bei Erhöhung der Proteinkonzentration zur ladungsbedingten Abstoßung und möglicherweise zu Aggregationen der Proteine, die dann abgewaschen wurden. Dennoch zeigte das Fusionsprotein Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E die deutlichste Bindung an GAG-exprimierende Zellen, was darauf schließen lässt, dass entweder die Kombination aus Domäne A und β -ribbon-connector, die Domäne A oder der β -ribbon-connector selbst zelluläre GAG als Wirtszellrezeptor nutzt. Die Domäne A alleine konnte in weiteren Versuchen als nichtbindend identifiziert werden. Außerdem zeigte die Domäne B in Kombination mit dem β -ribbon-connector eine deutliche Zellbindung. Dies erhärtet den Verdacht, dass der β -ribbon-connector selbst oder durch Stabilisation der Domänen v.a. die GAG-abhängige Zellbindung übernimmt (siehe 5.1.3).

Sowohl Domäne A+ β -ribbon-connector, als auch Domäne B besitzen beide einen isoelektrischen Punkt (8.62; 7,87), der sich im basischen Bereich befindet. Die Zellbindungsversuche sind bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt worden, wodurch die Proteine im protonierten Zustand, also positiv geladen, vorliegen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass auch Domäne B eine gewisse Affinität zu negativ geladenen GAG zeigt und sowohl an CHO K1 Zellen (Abb. 20 A) als auch an Heparin-Sepharose bindet (Abb. 22). Bindungsversuche mit nicht GAG-exprimierenden Zellen (Abb. 19) und eine vorherige Inkubation mit löslichem GAG führten zu einer verminderten Bindungsaktivität. (Abb. 20 A). Domäne C, wie schon bereits untersucht wurde (Weber et al. 2017), weist keine Bindungsaffinität zu Glykosaminoglykanen auf (Abb. 20 A, Abb. 21, Abb. 22). Passend dazu besitzt diese Domäne einen isoelektrischen Punkt im sauren Bereich (5,20) und liegt während des Versuchs deprotoniert und dadurch negativ geladen vor, was eine Ladungsabstoßung der gleichgeladenen Strukturen zur Folge hat.

Doch nicht nur Glykosaminoglykane sind in die Virus-Zellbindung involviert und scheinen auch nicht der zelluläre Rezeptor zu sein, der die Membranfusion vermittelt, zumindest nicht alleine (van Duijl-Richter et al. 2015). Eine gesteigerte Bindungsaffinität zu Glykosaminoglykanen führt zu einer verminderten Virulenz (Ashbrook et al. 2014; Silva et al. 2014; Gardner et al. 2014). Dies kann durch die Hemmung der Aufnahme viraler Partikel in die Wirtszelle oder der Freisetzung neuer Viren verursacht worden sein. Die Möglichkeit, dass eine verminderte Virusaufnahme der Grund ist, legt die Vermutung nah, dass die Bindung an zelluläre GAG einen der ersten Kontakte des Virus zur Wirtszelle darstellt und anschließend weitere Rezeptoren gebunden werden, die dann zur Membranfusion führen. Dies impliziert außerdem die Annahme, dass die Bindung an GAG normalerweise nicht zu stark ist und auf der Suche nach dem eigentlichen Rezeptor wieder gelöst werden kann,

ähnlich wie beim „Rolling“ der Leukozyten während der Leukodiapedese (Janeway 2002). Eine starke Bindung würde auch die Freisetzung neuer Viruspartikel verhindern. Außerdem scheinen Glykosaminoglykanrezeptoren in Moskitozellen keine Rolle zu spielen (Acharya et al. 2015). Nach der Passagierung auf Moskitozellen zeigte das CHIKV schon nach der ersten Passage keine GAG-abhängige Bindung mehr. Dennoch konnten eukaryotische Zellen infiziert werden, wenn auch schlechter, und die GAG-Affinität steigerte sich wieder mit der Replikation und damit Anpassung an die eukaryotische Zelllinie (Acharya et al. 2015). Im natürlichen Infektionszyklus wechselt das Virus ständig zwischen Wirt (eukaryotische Zellen) und Vektor (Moskitozellen). Beide Zellarten müssen ohne vorherige Änderungen infizierbar sein. Da also GAG während der Virus-Zellbindung im Moskito keine Rolle spielen und das Virus nach Replikation im Vektor und Verlust der GAG-Rezeptoren trotzdem infektiös für den Wirt bleibt, müssen noch andere Strukturen in den Bindungsprozess und der Zellaufnahme des Virus involviert sein. Bei der Bestimmung der Bindungsaktivität der Fusionsproteine an pgsA-745 Zellen konnte daher beobachtet werden, dass alle Domänen des E2-Proteins auch schwach an Zellen binden, die keine GAG exprimieren (Abb. 20 B). Diese Bindung nimmt bei Domäne A und B mit steigender Konzentration leicht zu (Abb. 20 B). Das Ergebnis zeigt, dass eine Bindungsaffinität für beide Domänen, abgesehen von Glykosaminoglykanen, auch zu anderen Strukturen vorhanden ist, diese Affinität jedoch geringer ist und viele Bindungsstellen frei sind, wodurch eine Bindung durch Erhöhung der Konzentration gesteigert werden kann. Der alternative Rezeptor muss also in hoher Dichte auf der Zellmembran vorhanden sein.

Nur der β -ribbon-connector enthält eine Glykosylierungsstelle und die Fusionsproteine sind von eukaryotischen Zellen hergestellt worden. Fc-CHIKV E2 Domäne A (mit β -ribbon-connector) könnte daher, wie auf eukaryotischen Zellen passagierte Viren, die stärkere Affinität zu GAG aufweisen. Womöglich würde eine Herstellung der Proteine in Moskitozellen zu einem anderen, eher GAG-unabhängigen Bindungsprofil führen (Vergleiche Virus-Adaption an eukaryotische Zellen und Moskitozellen: (Acharya et al. 2015)). Jedoch müssten beide Proteine, unabhängig vom Expressionssystem, Zellen binden, nur mit unterschiedlicher Affinität.

Interessant ist das Bindungsverhalten von Domäne C. Auf CHO K1 Zellen und als rekombinantes Protein, in *E.coli* hergestellt (Weber et al. 2017), zeigte sie keine Bindungsaktivität. Bei der niedrigen Proteinkonzentration scheint sie allerdings schwach spezifisch an pgsA-745 Zellen zu binden (Abb. 20 B), was jedoch bei einer Konzentrationssteigerung nicht mehr ersichtlich war. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte sein, dass entgegen vorheriger Erkenntnisse (Weber et al. 2017; Caglioti et al. 2013; Voss et al. 2010) Domäne C am Bindungsprozess beteiligt wäre.

Wahrscheinlicher ist, dass es ein Zufallsbefund ist, da diese Bindung weder eine Signifikanz aufweist, noch durch Konzentrationserhöhung steigerbar ist.

Die Tatsache, dass eine Bindungsaktivität der Domäne C als rekombinantes Protein aus *E.coli* weder auf CHO K1, noch auf pgsA-745 Zellen beobachtet werden konnte (Weber et al. 2017), als Fc-Fusionsprotein jedoch schon, könnte damit erklärt werden, dass die Fusionsproteine aufgrund ihrer Antikörperstruktur als Dimere vorliegen und dadurch die normalerweise schwache Bindungsaffinität gesteigert werden kann. Eine Steigerung der Affinität durch Dimerbildung ist auch für andere Strukturen beschrieben worden (Sarrazin et al. 2011). Eine Erhöhung der Fusionsproteinkonzentration führt eventuell durch Aggregation der Proteine dazu, dass eine Dimerbildung oder die Bindung an den zellulären Rezeptor nicht mehr möglich ist.

5.1.2 Genauere Betrachtung der Zellbindung von Domäne A

Im Zuge der Attenuierung sind im CHIKV durch die Anpassung an die Zellkultur Mutationen entdeckt worden, die in einer erhöhten Affinität zu zellulären GAG resultierten. Als Fc-Fusionsprotein konnte nur mit der Mutation E79G E166K eine signifikant höhere Bindung als die Wildtyp-Domäne A (G79E) an GAG-exprimierende Zellen beobachtet werden (Abb. 28). Alle eingefügten Mutationen ließen die Domäne A in ihrer Ladung positiver werden. Bei dem Aminosäureaustausch E79G wurde eine saure AS von einer neutralen AS ersetzt. Durch den Wechsel von N zu R an der Stelle 82 veränderte sich auch die Eigenschaft der AS von neutral zu basisch. Die Mutationen E166K und G79K führten sogar dazu, dass eine saure AS entfernt wurde und eine basische AS an ihre Stelle trat. Im attenuierten Virusstamm hatte diese Erhöhung der positiven Ladung zur Folge, dass das Virus nun in der Lage war stärker mit den negativ geladenen GAG zu interagieren. Vor allem für die Mutation an Position 82 wurde eine deutliche Erhöhung der GAG-Affinität beschrieben (Ashbrook et al. 2014, 2014). Als Fc-Fusionsprotein scheinen die Mutationen die sich im Bereich der Domäne A befinden (G79K, G82R, E79G) keinen Einfluss auf die Zellbindung zu haben (Abb. 28, 29 A, 30), weshalb diese Mutationen vermutlich nur im gesamten E2-Protein für Veränderungen sorgen. Die Mutationen an den Stellen 79 und 82 könnten sich auf die Faltung und intramolekuläre Bindungen bzw. Ladungsverteilungen auswirken und daher nur im Zusammenspiel mit weiteren Strukturen des E2-Proteins zu einer verstärkten Bindung an GAG führen. Die Mutation E166K befindet sich im β -ribbon-connector. Der β -ribbon-connector konnte vor allem in Kombination mit der E2 Domänen A oder B deutlich an Zellen binden, wohingegen die Domänen alleine keine signifikante Bindung zeigten (Abb. 35, 36). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit des β -ribbon-connectors im Prozess der Zellbindung und daher ist es nicht verwunderlich, dass Veränderungen in dessen Sequenz deutliche Auswirkungen haben. Der β -ribbon-connector scheint für die GAG-abhängige Bindung

verantwortlich zu sein und eine Verstärkung seiner positiven Ladung durch Mutationen erhöht seine GAG-Affinität. Dieser Befund könnte eventuell in der Impfstoffforschung genutzt werden (siehe unten).

5.1.3 Genauere Betrachtung des β -ribbon-connectors

Der β -ribbon-connector konnte in Verbindung mit einer der E2-Domänen die deutlichste Bindung an CHO K1 Zellen vorweisen, wohingegen die Domänen alleine nur eine schwache (Domäne B) bis gar keine (Domäne A- β) Zellbindung zeigten (Abb. 35, 36 A). In Kombination mit Domäne B band der β -ribbon-connector stärker als mit Domäne A und wies sogar eine signifikante Bindung an pgsA-745 Zellen auf (Abb. 35, 36).

Der β -ribbon-connector alleine band an CHO K1 (Abb. 35, 36 A) stärker als die Domänen A und B alleine. Der β -ribbon-connector scheint der zellbindende Anteil des E2-Proteins und vor allem für die GAG-abhängige Bindung zuständig zu sein. Dafür spricht sowohl die deutliche Abnahme der Zellbindung auf Zellen, die keine GAG exprimieren (Abb. 35, 36 B), sowie die Bindungsinhibition durch lösliche HS (Abb. 37). Zusätzlich wird diese Tatsache dadurch unterstützt, dass Mutationen, die die positive Ladung des β -ribbon-connectors erhöhen zu einer deutlichen Steigerung der Affinität zu zellulären GAG führen. Domäne B zeigt auch ohne β -ribbon-connector eine gewisse Bindung an Zellen, was die deutliche Bindungsaktivität der Kombination aus diesen beiden E2-Strukturen, die noch deutlicher ausfiel als die Verbindung Domäne A+ β -ribbon-connector, erklären könnte (Abb. 19, 35) und der Domäne B auch eine Beteiligung am Bindungsprozess zuschreibt. Möglicherweise führt aber auch die natürliche Abfolge der Aminosäuresequenz in der Verbindung Domäne B+ β -ribbon-connector zu der deutlichen und stärkeren Bindung. In der Kombination mit Domäne A und auch ohne Domänenanteil, sind beide Teile des β -ribbon-connectors dort über einen G_4PG_5 -Linker miteinander verbunden, wo sich normalerweise die Domäne B befinden würde. Dieser eingebaute Linker, besteht zum einen aus weniger Aminosäuren als die Domäne B, zum anderen ist er neutral geladen, wohingegen die Domäne B eine positive Gesamtladung aufweist. Daher könnte der Austausch der Domäne B durch den G_4PG_5 -Linker Auswirkungen auf die Faltung und daraus resultierende intramolekuläre Bindungen und Ladungsverteilungen haben. Das könnte zu einer schwächeren Bindung des β -ribbon-connectors alleine und in Kombination mit Domäne A führen. Weitere Studien könnten beide Anteile des β -ribbon-connectors, verbunden über einen anderen Linker, untersuchen, um einen Einfluss des Linkers auszuschließen. Eventuell stabilisiert der β -ribbon-connector in Verbindung mit einer Domäne auch die Ladungsverteilung der Domäne und sie kann dadurch nur in dieser Verbindung ihre volle Bindungsaktivität ausüben. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der β -ribbon-connector definitiv eine wichtige und tragende Rolle

im Zellbindungsprozess einnimmt und auch aufgrund seiner säuresensitiven Region (ASR) ein guter Kandidat zur antiviralen Bekämpfung bzw. Forschung ist. Eine Blockierung oder ein „Knock-out“ des β -ribbon-connectors könnte die Virusaufnahme in die Wirtszelle verhindern, da sowohl die Zellbindung (diese Arbeit), als auch die Konformationsänderung innerhalb der Endosomen (ASR) von ihm gesteuert wird (Li et al. 2010). Antivirale Medikamente, wie gegen den β -ribbon-connector gerichtete Antikörper oder GAG-ähnliche Substanzen, könnten den β -ribbon-connector blockieren und somit inhibierend auf die CHIKV-Infektion wirken. Er könnte in der Impfstoffforschung eingesetzt werden, z.B. als VLP-basierender oder rekombinanter Impfstoff. Vor allem bei der GAG-abhängigen Bindung ist der β -ribbon-connector von Bedeutung. Ein Mutieren seiner Sequenz im Virus, das in einer erhöhten GAG-abhängigkeit resultiert, könnte evtl. die Virulenz des Virus mindern. Vielleicht wären mehrere Mutationen in dieser Struktur, unter anderem E166K und N263A (siehe unten), stabiler als die bereits beschriebenen Mutationen in der E2 Domäne A-Sequenz des attenuierten Impfstoffstamms 181/25 (Ashbrook et al. 2014; Silva et al. 2014; Gardner et al. 2014). Der Impfstoffstamm 181/25 löste trotz Attenuierung zu 8% Arthritiden aus (Edelman et al. 2000; Gorchakov et al. 2012). Die Mutationen müssten jedoch im Virusmodell überprüft werden, da hier nur eine Betrachtung auf Proteinebene erfolgte.

Weiterhin scheint die Glykosylierung des β -ribbon-connectors die Bindung an Zellen zu stören. Denn die Deletion der Glykosylierungsstelle an Position 263 resultierte in einer verstärkten Bindung, stärker als es die Domäne A mit β -ribbon-connector und aktiver Glykosylierungsstelle besaß (Abb. 35, 36, 37). Auf beiden Zelllinien, K1 und pgsA-745, konnte die Glykosylierungsmutante eine signifikante Zellbindung zeigen (Abb. 35, 36). Dies widerspricht zum Teil den Beobachtungen in Moskitozellen, wo das Fehlen einer N-Glykosylierung zu einem Verlust der Affinität zu GAG-Rezeptoren führte, was auch in eukaryotischen Zellen durch das Einsetzen von Tunicamycin (unterdrückt die N-Glykosylierung) nachgeahmt wurde (Acharya et al. 2015). Diese Ergebnisse beziehen sich jedoch auf Versuche die mit dem Virus vollzogen wurden, wobei die Bindungsaktivität des gesamten E2-Proteins untersucht wurde. Das E2-Protein besitzt neben der Glykosylierungsstelle an Position 263 noch eine weitere in der Stammregion an Position 345, der in dieser Arbeit keine Betrachtung zukam. Eine Hemmung beider Glykosylierungen oder nur an Position 345 könnte für den Verlust der GAG-Affinität verantwortlich sein. Da die Mutation der Glykosylierungsstelle 263 zu einer erhöhten GAG-abhängigkeit führt, könnte diese Mutation alleine im Virus eventuell auch zu einer Verstärkung der GAG-Affinität auf eukaryotischen Zellen, sowie einer verminderten Virulenz des Virus führen. Diese Hypothesen müssten im Virusmodell überprüft werden. Ein Zusammenspiel der Mutationen E166K und N263A könnte in einer deutlichen Affinitätssteigerung zu zellulären GAG und damit korrelierender Attenuierung des Virus resultieren.

5.1.4 Etablierung stabiler Zelllinien

Leider blieb der Versuch Zelllinien zu etablieren, die stabil Fc-CHIKV-Fusionsproteine produzieren, weitestgehend erfolglos. Nur die Zelllinie, die des Fusionsprotein Fc-CHIKV E2 Domäne B exprimiert und sekretiert, schien die Produktion dauerhaft beizubehalten (Abb. 23, 24). Möglicherweise ist die Generierung der Fusionsproteine auf Dauer toxisch für die Zellen, weshalb die Expression des Fusionsproteins mit der Zeit unterdrückt wird. In anknüpfende Studien könnte eine Vektorpartikelherstellung auf Basis von HIV untersucht werden. Womöglich würde dies bessere Ergebnisse erzielen. Außerdem müsste eine größere Anzahl an Klonen untersucht werden, um einen stabilen Klon zu entdecken.

In Bezug auf die Toxizität zeigten sich die Fusionsproteine in Bindungsversuchen als nicht zelltoxisch, jedoch trafen Fusionsprotein und Zellen nur für eine Dauer von höchstens 3h aufeinander. Eine Langzeittoxizität wurde nicht untersucht.

Aufgrund von mangelnder Ausbeute und aus Zeitgründen, erfolgte die Produktion der Fc-Fusionsproteine mit der deutlich effizienteren transienten Transfektion.

5.1.5 Untersuchung auf hemmende Wirkung der Fusionsproteine auf den Zelleintritt

Mit dem Luciferase-Assay sollte getestet werden, ob eine vorherige Inkubation der Zellen mit den Fusionsproteinen zu einer Beeinflussung des Zelleintritts vom CHIKV führt. Eine Hypothese wäre, dass die Fusionsproteine den CHIKV Rezeptor blockieren und eine Infektion der Zellen nicht mehr zustande kommt. Andererseits könnten die Fusionsproteine durch die Bindung an die Rezeptoren und Komplexbildung mit dem Virus die Aufnahme des Virus in die Zellen verstärken.

Bei der Infektion von CHO K1 und pgsA-745 Zellen mit dem CHIKV-luci kam es zu keiner Beeinflussung durch die Fc-Fusionsproteine (Abb. 40 B, C). Vermutlich wurden die Fusionsproteine in zu geringer Konzentration genutzt, sodass sie allein mengenmäßig keine Konkurrenz für das Virus darstellten und eine Ansättigung der zellulären Bindungsstellen nicht erfolgte. Weiterhin könnte auch die Bindungsaffinität der Fusionsproteine zu gering sein und deutlich unterhalb der des Virus liegen, sodass sich die schwache Bindung an Zellen bei vorhandenem Virus lösen könnte. Die Fusionsproteine müssten, um einen Effekt zu erzielen, in deutlich größeren Mengen eingesetzt werden.

Bei HEK 293T Zellen verstärkten alle Fusionsproteine den Zelleintritt des Virus (Abb. 40 A), wobei sich HEK 293T Zellen generell besser infizieren lassen als CHO Zellen und dessen Derivat (Weber et al. 2017). Da aber auch der Fc-Teil alleine die Infektion von Zellen verstärkt, ist es keine CHIKV-spezifische Eigenschaft. Es wurde keine Pufferkontrolle

durchgeführt, womit geprüft werden könnte, ob womöglich der Proteinpuffer für die Versuchsergebnisse verantwortlich ist.

Die Fusionsproteine haben in geringen Konzentrationen keinen deutlichen Einfluss auf eine CHIKV-Infektion gezeigt. Für die Nutzung als Therapeutikum sollte ein Stoff bereits in geringen Konzentrationen wirksam sein. Außerdem scheinen höhere Konzentrationen eher zu einer Verstärkung der Virusaufnahme in die Wirtszelle zu führen. Aus diesem Grund sollten die Fc-Fusionsproteine nicht in der therapeutischen CHIKV-Behandlung eingesetzt werden.

6. Zusammenfassung

Entwicklung neuer antiviraler Strategien gegen die Chikungunya-Virus-Infektion: Identifizierung antiviraler Substanzen und neuer Zielstrukturen

Das Chikungunya Virus (CHIKV) ist ein positiv einzelsträngiges RNA-Virus der Gattung Alphavirus und wird über die antropophilen Moskitoarten *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* auf den Menschen übertragen. CHIKV breitet sich rasant global aus und führt zu großen Epidemien in Südamerika. Nicht zuletzt trägt die Globalisierung, die Nutzung des an die gemäßigten Klimazonen angepassten Vektors *Aedes albopictus*, sowie der steigende Reiseverkehr dazu bei.

Eine CHIKV-Infektion löst das Chikungunya-Fieber in Menschen aus und geht mit grippeähnlichen Symptomen einher, die nach etwa zwei Wochen wieder abklingen. Allerdings beklagen auch 30% der Betroffenen chronisch-rezidivierende Polyarthritiden. Die Erkrankung kann nur symptomatisch behandelt werden, da weder spezifische antivirale Medikamente, noch ein zugelassener Impfstoff vorhanden sind. Die Rezeptorbindung ist ein guter Ansatzpunkt um Medikamente zu entwickeln, da somit das Eindringen des Virus in die Wirtszelle verhindert wird.

Das CHIKV gelangt über Rezeptor-vermittelte Endozytose in das Zytoplasma der Wirtszelle, woran sich die Replikation und Herstellung neuer infektiöser Virionen anschließt. Für den Zelleintritt sind die Hüllproteine E1 und E2 verantwortlich, wobei das Glykoprotein E1 die Membranfusion vermittelt und E2 für die Rezeptorbindung zuständig ist. Das E2-Protein ist in die drei Domänen, A, B und C unterteilt, die untereinander über einen β -ribbon-connector verbunden sind. Es war nicht hinreichend bekannt, welche Bereiche des E2-Proteins, sowie welche zellulären Strukturen in die Virus-Zellbindung involviert sind. Auf viraler Seite wurden die E2 Domänen A und B als Zellbindungsdomänen bereits beschrieben. Glykosaminoglykane, die sich auf der Zellmembran nahezu aller eukaryotischen Zellen befinden, wurden für Alphaviren und auch speziell für CHIKV als zelluläre Bindungsstrukturen bereits identifiziert. In dieser Arbeit wurde die Zellbindung des E2-Proteins untersucht, indem die einzelnen Domänen und der β -ribbon-connector einzeln oder in Kombination miteinander als Fc-Fusionsproteine hergestellt und deren GAG-abhängige bzw. GAG-unabhängige Bindung an Zellen untersucht wurde.

Der β -ribbon-connector wurde als Haupt-Zellbindungsdomäne ermittelt. Vor allem in Kombination mit Domäne B zeigte er deutliche Bindung an GAG-exprimierende Zellen, die auch etwas schwächer in Kombination mit Domäne A ersichtlich waren. Es konnte auch eine Erhöhung der GAG-unabhängigen Bindung beobachtet werden. Durch die Mutation im β -ribbon-connectors an der Stelle 166, die eine positive Ladungsverschiebung zur Folge hatte, steigerte sich die Bindungsaktivität der Kombination Domäne A und mutierten β -ribbon-

connector deutlich auf GAG-exprimierenden Zellen, sowie schwach auf Zellen, die keine GAG auf der Zelloberfläche besitzen. Weiterhin konnte herausgefunden werden, dass die N-Glykosylierung an Position 263 (β -ribbon-connector) hemmend auf die Zellbindung wirkt. Durch eine Mutation, die eine Glykosylierung an dieser Stelle verhindert, konnte eine deutliche Steigerung der Bindungsaktivität auf GAG-exprimierenden aber auch an –nicht exprimierenden Zellen beobachtet werden. Der β -ribbon-connector konnte als Bindungsdomäne, die den GAG-abhängigen Zelleintritt steuert, identifiziert werden und dient somit als guter Kandidat für die Entwicklung antiviraler Medikamente.

7. Summary

Development of novel antiviral strategies against a Chikungunyavirus-infection:

Identification of antiviral substances and novel targets

The Chikungunyavirus (CHIKV) is a mosquito-transmitted Alphavirus that causes chikungunya fever, with flu like symptoms, in humans. However severe arthritis may persist for several years after an infection in 30 % of the infected persons, which might lead to considerable economic costs during large outbreaks. CHIKV was first documented in Tanzania in 1952 and then spread in Africa, to Asia and currently to South America including the Caribbean islands. Temperate and cold regions are reachable due to an effectively adaptation to the Asian tiger mosquitos, globalization and climate warming. There is no specific treatment or licensed vaccine for chikungunya fever, making it important to find an effective means preventing or combating a chikungunya infection. CHIKV is a (+)-single stranded-RNA virus which enters cells by receptor-mediated endocytosis and a subsequent pH-dependent fusion step. CHIKV has two surface proteins, which are involved in the entry-process. The glycoprotein E1 is a class II viral fusion protein, E2 mediates cell attachment and is further divided into three subdomains A, B and C. The domains are linked to each other via a β -ribbon-connector, which contains an acid-sensitive region. The focus is on finding strategies to prevent the entry of CHIKV into human cells, by characterizing the function of the E2 protein in more detail. Additionally the important role of cell surface glycosaminoglycans (GAGs) for CHIKV cell attachment was studied. Previous work could show that cell surface GAGs promote CHIKV entry. Mutations in E2 domain A from cell culture adapted CHIKV further enhanced CHIKV binding to GAG expressing cells. Therefore Fc-E2-fusion proteins, consisting of the Fc-region of a human antibody and subdomains of the glycoprotein E2, as well as fusion proteins with mutations in the subdomain A, which are described above, were generated. Furthermore Fc-E2-fusion proteins were created, which lack the β -ribbon-connector or contain only the β -ribbon-connector, to prove its role in the cell binding process. It could be shown, that subdomain C is without any binding ability. Subdomain A binds just in combination with the β -ribbon-connector to both cell types. The binding affinity to GAG expressing cells is much higher. Subdomain B in combination with the β -ribbon-connector showed a significant binding to GAG expressing cells, but the domain lacking the β -ribbon-connector could still weakly bind to both cell types. That implicates that the β -ribbon-connector of the CHIKV E2 protein regulates the GAG-dependent cell entry. Additionally domain B seems to be involved in the entry mechanism as well. Due to the mutation of the β -ribbon-connector at the position 166, which provided a positive charge displacement, the combination of domain A and mutated β -ribbon-connector had an increased binding activity on GAG-expressing cells. This generated fusion protein binds on

GAG-deficient cells as well, although less than on GAG-expressing cells. Furthermore it could be ascertained that the N-glycosylation at the position 263 (β -ribbon-connector) has an inhibiting function on the cell binding. In summary the β -ribbon-connector could be identified as the main binding structure of the CHIKV E2 glycoprotein and therefore it is a good candidate for antiviral drug development.

8. Literaturverzeichnis

Acharya, Dhiraj; Paul, Amber M.; Anderson, John F.; Huang, Faqing; Bai, Fengwei (2015): Loss of Glycosaminoglycan Receptor Binding after Mosquito Cell Passage Reduces Chikungunya Virus Infectivity. In: *PLoS neglected tropical diseases* 9 (10), e0004139. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004139.

Akahata, Wataru; Nabel, Gary J. (2012): A specific domain of the Chikungunya virus E2 protein regulates particle formation in human cells. Implications for alphavirus vaccine design. In: *Journal of virology* 86 (16), S. 8879–8883. DOI: 10.1128/JVI.00370-12.

Akahata, Wataru; Yang, Zhi-Yong; Andersen, Hanne; Sun, Siyang; Holdaway, Heather A.; Kong, Wing-Pui et al. (2010): A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. In: *Nature medicine* 16 (3), S. 334–338. DOI: 10.1038/nm.2105.

Albulescu, Irina C.; van Hoolwerff, Marcella; Wolters, Laura A.; Bottaro, Elisabetta; Nastruzzi, Claudio; Yang, Shih Chi et al. (2015): Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms. In: *Antiviral research* 121, S. 39–46. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.06.013.

Alvarez, María Fernanda; Bolívar-Mejía, Adrián; Rodríguez-Morales, Alfonso J.; Ramirez-Vallejo, Eduardo (2017): Cardiovascular involvement and manifestations of systemic Chikungunya virus infection. A systematic review. In: *F1000Res* 6, S. 390. DOI: 10.12688/f1000research.11078.1.

Ashbrook, Alison W.; Burrack, Kristina S.; Silva, Laurie A.; Montgomery, Stephanie A.; Heise, Mark T.; Morrison, Thomas E.; Dermody, Terence S. (2014): Residue 82 of the Chikungunya virus E2 attachment protein modulates viral dissemination and arthritis in mice. In: *Journal of virology* 88 (21), S. 12180–12192. DOI: 10.1128/JVI.01672-14.

Babu, Pon Velayutham Anandh; Liu, Dongmin (2008): Green tea catechins and cardiovascular health. An update. In: *Current medicinal chemistry* 15 (18), S. 1840–1850.

Barton, D. J.; Sawicki, S. G.; Sawicki, D. L. (1991): Solubilization and immunoprecipitation of alphavirus replication complexes. In: *Journal of virology* 65 (3), S. 1496–1506.

Bernard, Eric; Solignat, Maxime; Gay, Bernard; Chazal, Nathalie; Higgs, Stephen; Devaux, Christian; Briant, Laurence (2010): Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells. Role of clathrin and early endosomal compartments. In: *PloS one* 5 (7), e11479. DOI: 10.1371/journal.pone.0011479.

Blagrove, Marcus S. C.; Caminade, Cyril; Waldmann, Elisabeth; Sutton, Elizabeth R.; Wardeh, Maya; Baylis, Matthew (2017): Co-occurrence of viruses and mosquitoes at the

- vectors' optimal climate range. An underestimated risk to temperate regions? In: *PLoS neglected tropical diseases* 11 (6), e0005604. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005604.
- Burt, Felicity J.; Chen, Weiqiang; Miner, Jonathan J.; Lenschow, Deborah J.; Merits, Andres; Schnettler, Esther et al. (2017): Chikungunya virus. An update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. In: *The Lancet Infectious Diseases* 17 (4), e107-e117. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30385-1.
- Caglioti, Claudia; Lalle, Eleonora; Castilletti, Concetta; Carletti, Fabrizio; Capobianchi, Maria Rosaria; Bordi, Licia (2013): Chikungunya virus infection: an overview.
- Campos, G. S.; Bandeira, A. C.A.; Rocha, V. F.D.; Dias, J. P.; Carvalho, R. H.; Sardi, S. I. (2017): First Detection of Chikungunya Virus in Breast Milk.
- Cardona-Correa, Sara E.; Castaño-Jaramillo, Lina María; Quevedo-Vélez, Augusto (2017): Reporte de caso de transmisión vertical de la infección por virus chikungunya. In: *Revista chilena de pediatría* 88 (2), S. 285–288. DOI: 10.4067/S0370-41062017000200015.
- Chang, Lee-Jah; Dowd, Kimberly A.; Mendoza, Floreliz H.; Saunders, Jamie G.; Sitar, Sandra; Plummer, Sarah H. et al. (2014): Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults. A phase 1 dose-escalation trial. In: *Lancet (London, England)* 384 (9959), S. 2046–2052. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61185-5.
- Chatterjee, Prodyot K.; Eng, Christina H.; Kielian, Margaret (2002): Novel mutations that control the sphingolipid and cholesterol dependence of the Semliki Forest virus fusion protein. In: *Journal of virology* 76 (24), S. 12712–12722.
- Christianson, Helena C.; Belting, Mattias (2014): Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 35, S. 51–55. DOI: 10.1016/j.matbio.2013.10.004.
- Coffey, Lark L.; Failloux, Anna-Bella; Weaver, Scott C. (2014): Chikungunya virus-vector interactions. In: *Viruses* 6 (11), S. 4628–4663. DOI: 10.3390/v6114628.
- Dagley, Ashley; Julander, Justin G. (2013): A mouse model of chikungunya virus with utility in antiviral studies. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1030, S. 439–448. DOI: 10.1007/978-1-62703-484-5_33.
- Delisle, E.; Rousseau, C.; Broche, B.; Leparç-Goffart, I.; L'Ambert, G.; Cochet, A. et al. (2015): Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. In: *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 20 (17).
- Delogu, Ilenia; Pastorino, Boris; Baronti, Cécile; Nougairède, Antoine; Bonnet, Emilie; Lamballerie, Xavier de (2011): In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus

and characteristics of a selected resistant mutant. In: *Antiviral research* 90 (3), S. 99–107.

DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.03.182.

Doerr, Hans W.; Gerlich, Wolfram H. (2010): *Medizinische Virologie*. 2., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage. s.l.: THIEME.

Dupuis-Maguiraga, Laurence; Noret, Marion; Brun, Sonia; Le Grand, Roger; Gras, Gabriel; Roques, Pierre (2012): Chikungunya disease. Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. In: *PLoS neglected tropical diseases* 6 (3), e1446. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001446.

Edelman, R.; Tacket, C. O.; Wasserman, S. S.; Bodison, S. A.; Perry, J. G.; Mangiafico, J. A. (2000): Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 62 (6), S. 681–685.

Fields, Bernard N.; Griffin, Diane F.; Howley, Peter M.; Knipe, David M. (Hg.) (2001): *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Fongsaran, Chanida; Jirakanwisal, Krit; Kuadkitkan, Atichat; Wikan, Nitwara; Wintachai, Phitchayapak; Thepparit, Chutima et al. (2014): Involvement of ATP synthase β subunit in chikungunya virus entry into insect cells. In: *Archives of virology* 159 (12), S. 3353–3364. DOI: 10.1007/s00705-014-2210-4.

Furuya-Kanamori, Luis; Liang, Shaohong; Milinovich, Gabriel; Soares Magalhaes, Ricardo J.; Clements, Archie C. A.; Hu, Wenbiao et al. (2016): Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. In: *BMC infectious diseases* 16, S. 84. DOI: 10.1186/s12879-016-1417-2.

Gardner, Christina L.; Ebel, Gregory D.; Ryman, Kate D.; Klimstra, William B. (2011): Heparan sulfate binding by natural eastern equine encephalitis viruses promotes neurovirulence. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (38), S. 16026–16031. DOI: 10.1073/pnas.1110617108.

Gardner, Christina L.; Hritz, Jozef; Sun, Chengqun; Vanlandingham, Dana L.; Song, Timothy Y.; Ghedin, Elodie et al. (2014): Deliberate attenuation of chikungunya virus by adaptation to heparan sulfate-dependent infectivity. A model for rational arboviral vaccine design. In: *PLoS neglected tropical diseases* 8 (2), e2719. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002719.

Gérardin, Patrick; Barau, Georges; Michault, Alain; Bintner, Marc; Randrianaivo, Hanitra; Choker, Ghassan et al. (2008): Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. In: *PLoS medicine* 5 (3), e60. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050060.

Göertz, Giel P.; Vogels, Chantal B. F.; Geertsema, Corinne; Koenraadt, Constantianus J. M.; Pijlman, Gorben P. (2017): Mosquito co-infection with Zika and chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of *Aedes aegypti*. In: *PLoS neglected tropical diseases* 11 (6), e0005654. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005654.

Gorchakov, Rodion; Wang, Eryu; Leal, Grace; Forrester, Naomi L.; Plante, Kenneth; Rossi, Shannan L. et al. (2012): Attenuation of Chikungunya virus vaccine strain 181/clone 25 is determined by two amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein. In: *Journal of virology* 86 (11), S. 6084–6096. DOI: 10.1128/JVI.06449-11.

Gould, E. A.; Gallian, P.; Lamballerie, X. de; Charrel, R. N. (2010): First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France. From bad dream to reality! In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16 (12), S. 1702–1704. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03386.x.

Hapuarachchi, H. C.; Bandara, K. B. A. T.; Sumanadasa, S. D. M.; Hapugoda, M. D.; Lai, Yee-Ling; Lee, Kim-Sung et al. (2010): Re-emergence of Chikungunya virus in South-east Asia. Virological evidence from Sri Lanka and Singapore. In: *The Journal of general virology* 91 (Pt 4), S. 1067–1076. DOI: 10.1099/vir.0.015743-0.

Henß, Lisa; Beck, Simon; Weidner, Tatjana; Biedenkopf, Nadine; Sliva, Katja; Weber, Christopher et al. (2016): Suramin is a potent inhibitor of Chikungunya and Ebola virus cell entry.

Her, Zhisheng; Malleret, Benoit; Chan, Monica; Ong, Edward K. S.; Wong, Siew-Cheng; Kwek, Dyan J. C. et al. (2010): Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (10), S. 5903–5913. DOI: 10.4049/jimmunol.0904181.

Ho, Yi-Jung; Wang, Yu-Ming; Lu, Jeng-wei; Wu, Tzong-Yuan; Lin, Liang-In; Kuo, Szu-Cheng; Lin, Chang-Chi (2015): Suramin Inhibits Chikungunya Virus Entry and Transmission. In: *PLoS one* 10 (7), e0133511. DOI: 10.1371/journal.pone.0133511.

Hoarau, Jean-Jacques; Jaffar Bandjee, Marie-Christine; Krejbich Trotot, Pascale; Das, Trina; Li-Pat-Yuen, Ghislaine; Dassa, Bérengère et al. (2010): Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184 (10), S. 5914–5927. DOI: 10.4049/jimmunol.0900255.

Hong, On-Yu; Noh, Eun-Mi; Jang, Hye-Yeon; Lee, Young-Rae; Lee, Byoung Kil; Jung, Sung Hoo et al. (2017): Epigallocatechin gallate inhibits the growth of MDA-MB-231 breast cancer

cells via inactivation of the β -catenin signaling pathway. In: *Oncology letters* 14 (1), S. 441–446. DOI: 10.3892/ol.2017.6108.

Inglis, Fiona M.; Lee, Kim M.; Chiu, Kevin B.; Purcell, Olivia M.; Didier, Peter J.; Russell-Lodrigue, Kasi et al. (2016): Neuropathogenesis of Chikungunya infection. Astrogliosis and innate immune activation. In: *Journal of neurovirology* 22 (2), S. 140–148. DOI: 10.1007/s13365-015-0378-3.

Jäger, Volker; Büssow, Konrad; Wagner, Andreas; Weber, Susanne; Hust, Michael; Frenzel, André; Schirrmann, Thomas (2013): High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. In: *BMC biotechnology* 13, S. 52. DOI: 10.1186/1472-6750-13-52.

Janeway, Charles A. (2002): Immunologie. 5. Aufl. Heidelberg u.a.: Spektrum Akad. Verl. (Spektrum Lehrbuch).

Jose, Joyce; Snyder, Jonathan E.; Kuhn, Richard J. (2009): A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. In: *Future microbiology* 4 (7), S. 837–856. DOI: 10.2217/fmb.09.59.

Jupp, P. G.; McIntosh, B. M. (1990): *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. In: *Journal of the American Mosquito Control Association* 6 (3), S. 415–420.

Khan, Afjal Hossain; Morita, Kouichi; Parquet Md, Maria del Carmen; Hasebe, Futoshi; Mathenge, Edward G. M.; Igarashi, Akira (2002): Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. In: *The Journal of general virology* 83 (Pt 12), S. 3075–3084. DOI: 10.1099/0022-1317-83-12-3075.

Kielian, Margaret (2010): Structural biology. An alphavirus puzzle solved. In: *Nature* 468 (7324), S. 645–646. DOI: 10.1038/468645a.

Kielian, Margaret; Rey, Félix A. (2006): Virus membrane-fusion proteins. More than one way to make a hairpin. In: *Nature reviews. Microbiology* 4 (1), S. 67–76. DOI: 10.1038/nrmicro1326.

Kreutzig, Thomas (2006): Kurzlehrbuch Biochemie. 12., vollst. überarb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer (Vorklinik).

Lee, Regina Ching Hua; Hapuarachchi, Hapuarachchige Chanditha; Chen, Karen Caiyun; Hussain, Khairunnisa' Mohamed; Chen, Huixin; Low, Swee Ling et al. (2013): Mosquito cellular factors and functions in mediating the infectious entry of chikungunya virus. In: *PLoS neglected tropical diseases* 7 (2), e2050. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002050.

- Leparc-Goffart, Isabelle; Nougairede, Antoine; Cassadou, Sylvie; Prat, Christine; Lamballerie, Xavier de (2014): Chikungunya in the Americas. In: *Lancet (London, England)* 383 (9916), S. 514. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60185-9.
- Li, Long; Jose, Joyce; Xiang, Ye; Kuhn, Richard J.; Rossmann, Michael G. (2010): Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. In: *Nature* 468 (7324), S. 705–708. DOI: 10.1038/nature09546.
- Lines, Jo (2007): Chikungunya in Italy. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 335 (7620), S. 576. DOI: 10.1136/bmj.39342.563310.80.
- Long, Kristin M.; Heise, Mark T. (2015): Protective and Pathogenic Responses to Chikungunya Virus Infection. In: *Current tropical medicine reports* 2 (1), S. 13–21. DOI: 10.1007/s40475-015-0037-z.
- Lourenço-de-Oliveira, Ricardo; Failloux, Anna-Bella (2017): High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. In: *PLoS neglected tropical diseases* 11 (6), e0005698. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005698.
- Margaret Kielian and Félix A. Rey: Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin.
- Modrow, Susanne; Falke, Dietrich; Truyen, Uwe (2010): *Molekulare Virologie*. 3. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Moller-Tank, Sven; Kondratowicz, Andrew S.; Davey, Robert A.; Rennert, Paul D.; Maury, Wendy (2013): Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. In: *Journal of virology* 87 (15), S. 8327–8341. DOI: 10.1128/JVI.01025-13.
- Mullis, P. E.; Brickell, P. M. (1992): The use of the polymerase chain reaction in prenatal diagnosis of growth hormone gene deletions. In: *Clinical endocrinology* 37 (1), S. 89–95.
- Perera, R.; Owen, K. E.; Tellinghuisen, T. L.; Gorbalenya, A. E.; Kuhn, R. J. (2001): Alphavirus nucleocapsid protein contains a putative coiled coil alpha-helix important for core assembly. In: *Journal of virology* 75 (1), S. 1–10. DOI: 10.1128/JVI.75.1.1-10.2001.
- Plante, Kenneth; Wang, Eryu; Partidos, Charalambos D.; Weger, James; Gorchakov, Rodion; Tsetsarkin, Konstantin et al. (2011): Novel chikungunya vaccine candidate with an IRES-based attenuation and host range alteration mechanism. In: *PLoS pathogens* 7 (7), e1002142. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002142.
- Ramsauer, Katrin; Schwameis, Michael; Firbas, Christa; Müllner, Matthias; Putnak, Robert J.; Thomas, Stephen J. et al. (2015): Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine. A randomised, double-blind,

placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. In: *The Lancet. Infectious diseases* 15 (5), S. 519–527. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)70043-5.

Ronald E. Smith, Robert A. Nozik (1986): Uveitis. Klinik, Diagnose, Therapie Ein Leitfaden für die Praxis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Rudd, Penny A.; Mahalingam, Suresh (2015): Fighting back against chikungunya. In: *The Lancet. Infectious diseases* 15 (5), S. 488–489. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)70079-4.

Sánchez-San Martín, Claudia; Sosa, Hernando; Kielian, Margaret (2008): A stable prefusion intermediate of the alphavirus fusion protein reveals critical features of class II membrane fusion. In: *Cell host & microbe* 4 (6), S. 600–608. DOI: 10.1016/j.chom.2008.10.012.

Sandra Müller (2005): Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung der humanen Xylosyltransferase I und II. Dissertation.

Sarrazin, Stephane; Lamanna, William C.; Esko, Jeffrey D. (2011): Heparan sulfate proteoglycans. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (7). DOI: 10.1101/cshperspect.a004952.

Schuffenecker, Isabelle; Iteaman, Isabelle; Michault, Alain; Murri, Séverine; Frangeul, Lionel; Vaney, Marie-Christine et al. (2006): Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. In: *PLoS medicine* 3 (7), e263. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030263.

Schwartz, Olivier; Albert, Matthew L. (2010): Biology and pathogenesis of chikungunya virus. In: *Nature reviews. Microbiology* 8 (7), S. 491–500. DOI: 10.1038/nrmicro2368.

Selvarajah, Suganya; Sexton, Nicole R.; Kahle, Kristen M.; Fong, Rachel H.; Mattia, Kimberly-Anne; Gardner, Joy et al. (2013): A neutralizing monoclonal antibody targeting the acid-sensitive region in chikungunya virus E2 protects from disease. In: *PLoS neglected tropical diseases* 7 (9), e2423. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002423.

Shirako, Y.; Strauss, J. H. (1994): Regulation of Sindbis virus RNA replication. Uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. In: *Journal of virology* 68 (3), S. 1874–1885.

Shriver, Zachary; Capila, Ishan; Venkataraman, Ganesh; Sasisekharan, Ram (2012): Heparin and heparan sulfate. Analyzing structure and microheterogeneity. In: *Handbook of experimental pharmacology* (207), S. 159–176. DOI: 10.1007/978-3-642-23056-1_8.

Sigismund, Sara; Woelk, Tanja; Puri, Claudia; Maspero, Elena; Tacchetti, Carlo; Transidico, Pietro et al. (2005): Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. In:

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (8), S. 2760–2765. DOI: 10.1073/pnas.0409817102.

Silva, Laurie A.; Khomandiak, Solomiia; Ashbrook, Alison W.; Weller, Romy; Heise, Mark T.; Morrison, Thomas E.; Dermody, Terence S. (2014): A single-amino-acid polymorphism in Chikungunya virus E2 glycoprotein influences glycosaminoglycan utilization. In: *Journal of virology* 88 (5), S. 2385–2397. DOI: 10.1128/JVI.03116-13.

Singh, I.; Helenius, A. (1992): Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. In: *Journal of virology* 66 (12), S. 7049–7058.

Smit, J. M.; Waarts, B.-L.; Kimata, K.; Klimstra, W. B.; Bittman, R.; Wilschut, J. (2002): Adaptation of Alphaviruses to Heparan Sulfate. Interaction of Sindbis and Semliki Forest Viruses with Liposomes Containing Lipid-Conjugated Heparin. In: *Journal of virology* 76 (20), S. 10128–10137. DOI: 10.1128/JVI.76.20.10128-10137.2002.

Solignat, Maxime; Gay, Bernard; Higgs, Stephen; Briant, Laurence; Devaux, Christian (2009): Replication cycle of chikungunya. A re-emerging arbovirus. In: *Virology* 393 (2), S. 183–197. DOI: 10.1016/j.virol.2009.07.024.

Soneoka, Yuko; Cannon, Paula M.; Ramsdale, Emma E.; Griffiths, Joanne C.; Romano, Gaetano; Kingsman, Susan M.; Kingsman, Alan J. (1995): A transient three plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors.

Sourisseau, Marion; Schilte, Clémentine; Casartelli, Nicoletta; Trouillet, Céline; Guivel-Benhassine, Florence; Rudnicka, Dominika et al. (2007): Characterization of reemerging chikungunya virus. In: *PLoS pathogens* 3 (6), e89. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030089.

Strauss, J. H.; Strauss, E. G. (1994): The alphaviruses. Gene expression, replication, and evolution. In: *Microbiological reviews* 58 (3), S. 491–562.

Tanaka, Atsushi; Tumkosit, Uranan; Nakamura, Shota; Motooka, Daisuke; Kishishita, Natsuko; Priengprom, Thongkoon et al. (2017): Genome-Wide Screening Uncovers the Significance of N-Sulfation of Heparan Sulfate as a Host Cell Factor for Chikungunya Virus Infection. In: *Journal of virology* 91 (13). DOI: 10.1128/JVI.00432-17.

Thiboutot, Michelle M.; Kannan, Senthil; Kawalekar, Omkar U.; Shedlock, Devon J.; Khan, Amir S.; Sarangan, Gopalsamy et al. (2010): Chikungunya. A potentially emerging epidemic? In: *PLoS neglected tropical diseases* 4 (4), e623. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000623.

Tsetsarkin, Konstantin A.; Chen, Rubing; Sherman, Michael B.; Weaver, Scott C. (2011): Chikungunya virus. Evolution and genetic determinants of emergence. In: *Current opinion in virology* 1 (4), S. 310–317. DOI: 10.1016/j.coviro.2011.07.004.

- Tsetsarkin, Konstantin A.; Vanlandingham, Dana L.; McGee, Charles E.; Higgs, Stephen (2007): A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. In: *PLoS pathogens* 3 (12), e201. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030201.
- van Duijl-Richter, Mareike K. S.; Hoornweg, Tabitha E.; Rodenhuis-Zybert, Izabela A.; Smit, Jolanda M. (2015): Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. In: *Viruses* 7 (7), S. 3647–3674. DOI: 10.3390/v7072792.
- Volk, Sara M.; Chen, Rubing; Tsetsarkin, Konstantin A.; Adams, A. Paige; Garcia, Tzintzuni I.; Sall, Amadou A. et al. (2010): Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. In: *Journal of virology* 84 (13), S. 6497–6504. DOI: 10.1128/JVI.01603-09.
- Voss, James E.; Vaney, Marie-Christine; Duquerroy, Stéphane; Vonrhein, Clemens; Girard-Blanc, Christine; Crublet, Elodie et al. (2010): Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. In: *Nature* 468 (7324), S. 709–712. DOI: 10.1038/nature09555.
- Wang, Eryu; Volkova, Eugenia; Adams, A. Paige; Forrester, Naomi; Xiao, Shu-Yuan; Frolov, Ilya; Weaver, Scott C. (2008): Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. In: *Vaccine* 26 (39), S. 5030–5039. DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.07.054.
- Weaver, Scott C. (2014): Arrival of chikungunya virus in the new world. Prospects for spread and impact on public health. In: *PLoS neglected tropical diseases* 8 (6), e2921. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002921.
- Weaver, Scott C.; Lecuit, Marc (2015): Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. In: *The New England journal of medicine* 372 (13), S. 1231–1239. DOI: 10.1056/NEJMra1406035.
- Weber, Christopher; Berberich, Eva; Rhein, Christine von; Henß, Lisa; Hildt, Eberhard; Schnierle, Barbara S. (2017): Identification of Functional Determinants in the Chikungunya Virus E2 Protein. In: *PLoS neglected tropical diseases* 11 (1), e0005318. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005318.
- Weber, Christopher; Büchner, Sarah M.; Schnierle, Barbara S. (2015a): A small antigenic determinant of the Chikungunya virus E2 protein is sufficient to induce neutralizing antibodies which are partially protective in mice. In: *PLoS neglected tropical diseases* 9 (4), e0003684. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003684.
- Weber, Christopher; Sliva, Katja; Rhein, Christine von; Kümmerer, Beate M.; Schnierle, Barbara S. (2015b): The green tea catechin, epigallocatechin gallate inhibits chikungunya virus infection. In: *Antiviral research* 113, S. 1–3. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.11.001.

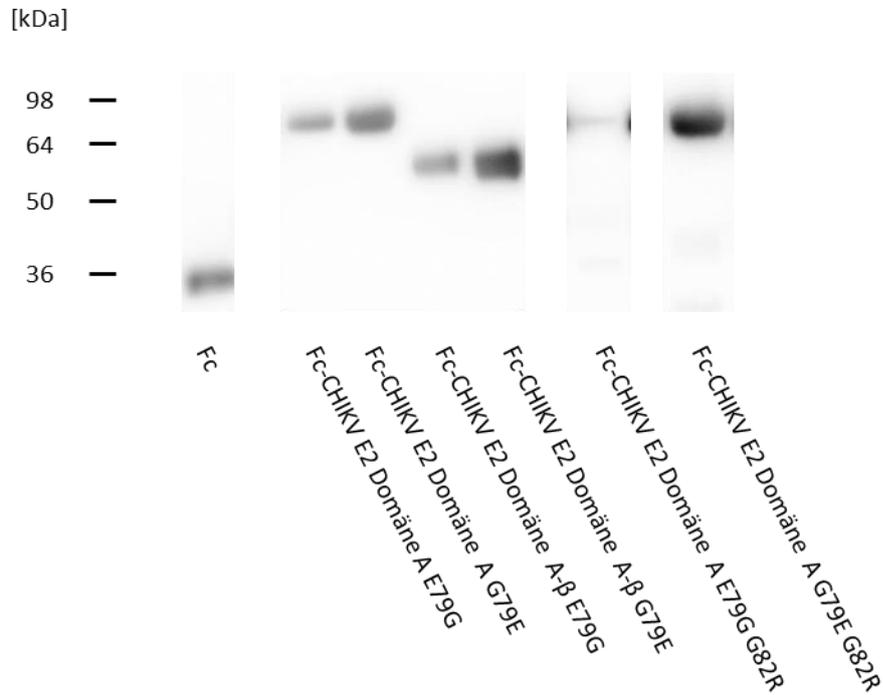
Wintachai, Phitchayapak; Wikan, Nitwara; Kuadkitkan, Atichat; Jaimipuk, Thitigun; Ubol, Sukathida; Pulmanusahakul, Rojjanaporn et al. (2012): Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. In: *Journal of medical virology* 84 (11), S. 1757–1770. DOI: 10.1002/jmv.23403.

Xicota, Laura; Rodriguez-Morato, Jose; Dierssen, Mara; La Torre, Rafael de (2017): Potential Role of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) in the Secondary Prevention of Alzheimer Disease. In: *Current drug targets* 18 (2), S. 174–195. DOI: 10.2174/1389450116666150825113655.

Yamamoto, David W. (CDC/OID/NCEZID) (CTR): CDC Fact Sheet. Online verfügbar unter https://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV_DengueEndemic.pdf, zuletzt geprüft am 10.07.2017.

9. Anhang

9.1 Expression und Sekretion der A-Varianten mit der Mutation E79G

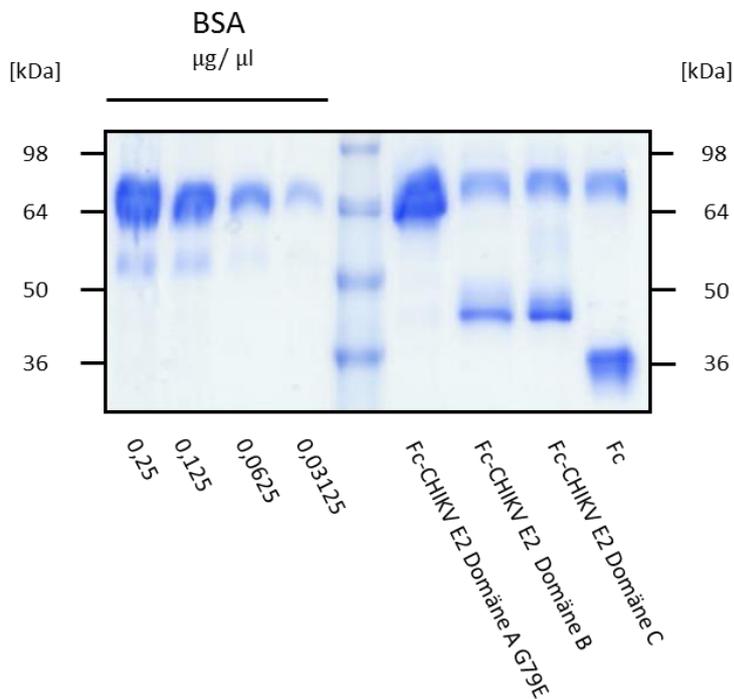


Die Fusionsproteine, die die Mutation E79G enthielten, zeigten eine etwas schwächere Expression und Sekretion als die Fusionsproteine, deren Domäne-Sequenz der Wildtypsequenz glich (G79E). Für Domäne A E79G G82R war nur eine sehr schwache Bande im Western Blot erkennbar.

9.2 Coomassie-Gele

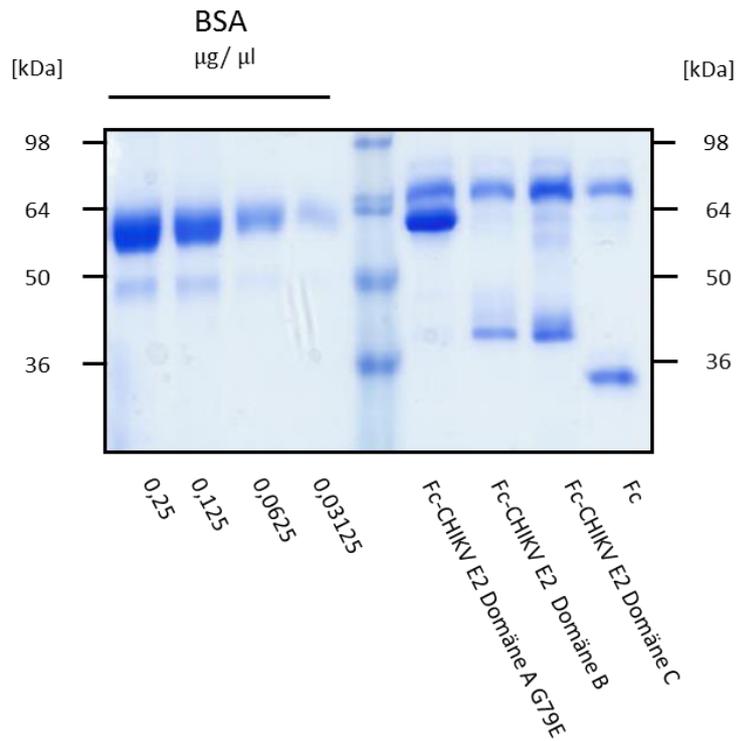
Die Herstellung der Fusionsproteine erfolgte dreimal unabhängig voneinander. Im Ergebnisteil ist exemplarisch nur ein Coomassie-Gel mit Proteinkonzentrationsbestimmung gezeigt. Nachfolgend sind die übrigen Coomassie-Gele mit Konzentrationsbestimmung aufgeführt.

9.2.1 Herstellung der einzelnen E2-Domänen als Fusionsprotein (4.1.1)



Konzentrationsbestimmung anhand des Coomassie-Gels:

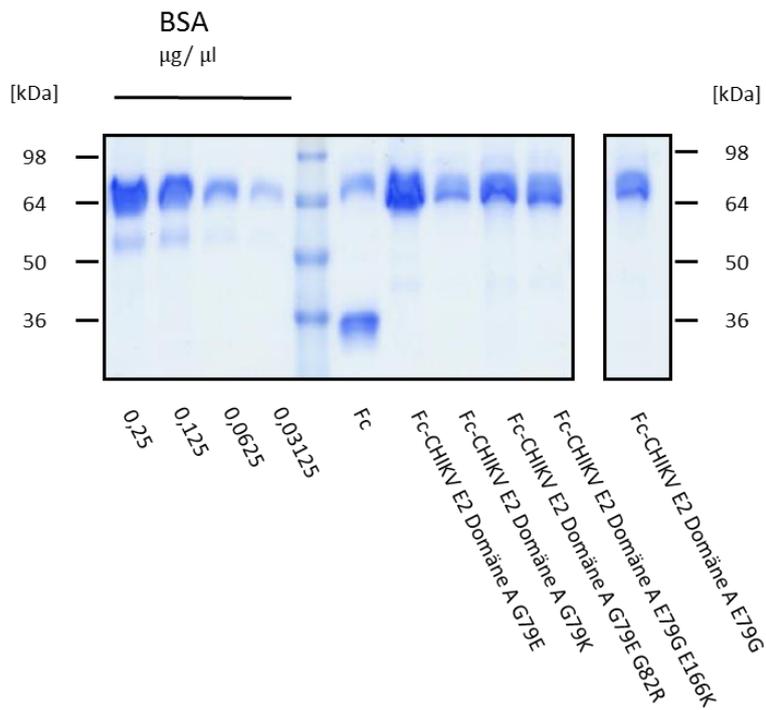
Fusionsprotein	Fc- CHIKV E2 Domäne A G79E	Fc- CHIKV E2 Domäne B	Fc- CHIKV E2 Domäne C
Konzentration anhand des Coomassie-Gels	0,25 µg/µl	0,0625 µg/µl	0,1 µg/µl
Volumen für 10 µg Protein eingesetzt	40 µl	160 µl	100 µl



Konzentrationsbestimmung anhand des Coomassie-Gels:

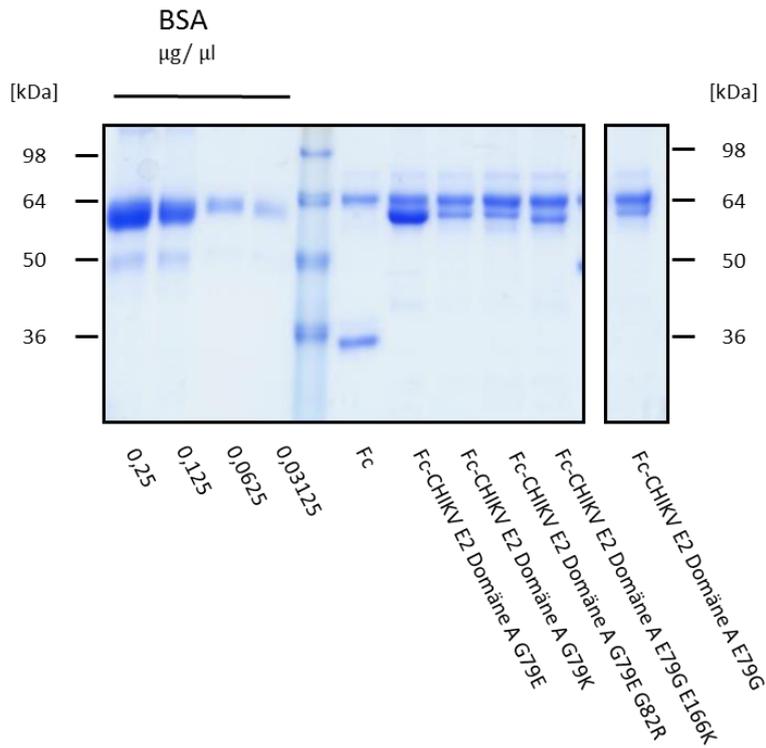
Fusionsprotein	Fc- CHIKV E2 Domäne A G79E	Fc- CHIKV E2 Domäne B	Fc- CHIKV E2 Domäne C
Konzentration anhand des Coomassie-Gels	0,25 µg/µl	0,045 µg/µl	0,07 µg/µl
Volumen für 10 µg Protein eingesetzt	40 µl	222,2 µl	153,8 µl

9.2.2 Herstellung von A-Mutanten als Fusionsprotein (4.2.1)



Konzentrationsbestimmung anhand des Coomassie-Gels:

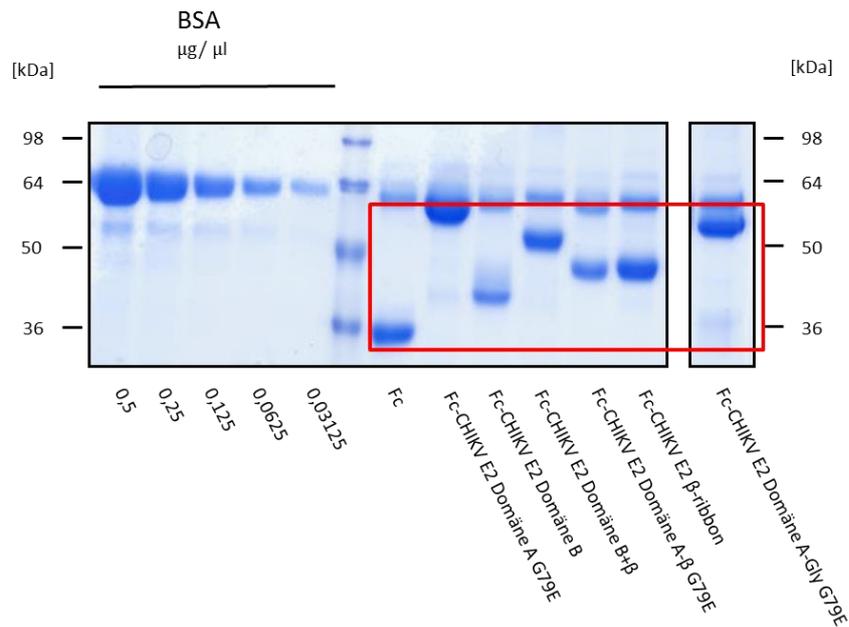
Fusionsprotein	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79K	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E G82R	Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G E166K	Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G
Konzentration anhand des Coomassie-Gels	0,25 µg/µl	0,0625 µg/µl	0,125 µg/µl	0,12 µg/µl	0,075 µg/µl
Volumen für 10 µg Protein	40 µl	160 µl	80 µl	83,3 µl	133,3 µl



Konzentrationsbestimmung anhand des Coomassie-Gels:

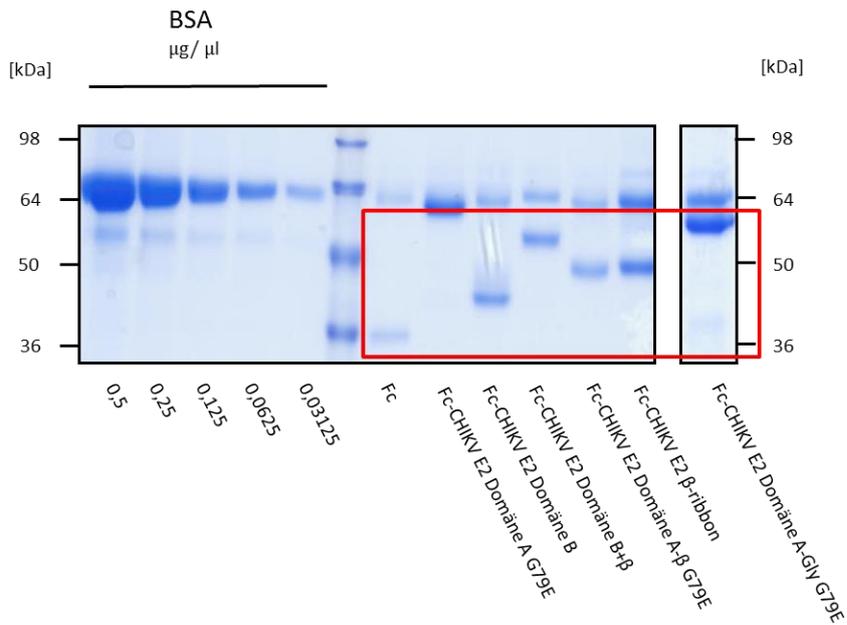
Fusionsprotein	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79K	Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E G82R	Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G E166K	Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G
Konzentration anhand des Coomassie-Gels	0,25 µg/µl	0,065 µg/µl	0,065 µg/µl	0,07 µg/µl	0,065 µg/µl
Volumen für 10 µg Protein	40 µl	153,8 µl	153,8 µl	142,9 µl	153,8 µl

9.2.3 Herstellung von β -Varianten als Fusionsprotein



Konzentrationsbestimmung anhand des Coomassie-Gels:

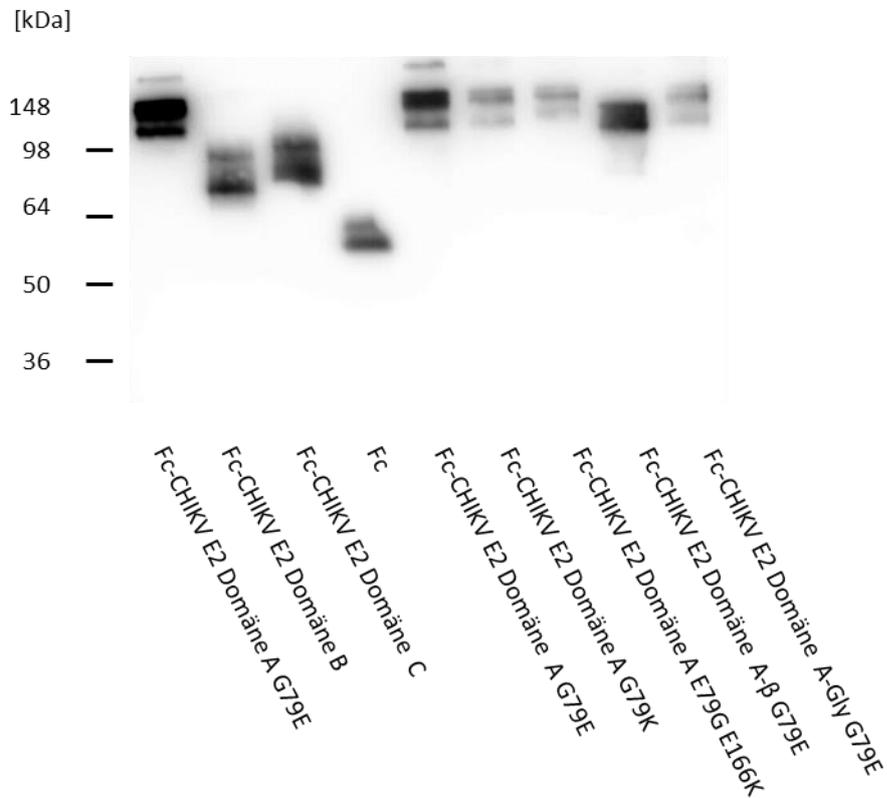
Fusionsprotein	Konzentration anhand des Coomassie-Gels	Volumen für 10 µg Protein
Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E	0,25 µg/µl	40 µl
Fc-CHIKV E2 Domäne B	0,625 µg/µl	160 µl
Fc-CHIKV E2 Domäne B+β	0,2 µg/µl	50 µl
Fc-CHIKV E2 Domäne A-β G79E	0,09 µg/µl	111.1 µl
Fc-CHIKV E2 β-ribbon-connector	0,23 µg/µl	43,5 µl
Fc-CHIKV E2 Domäne A+B-Gly G79E	0,21 µg/µl	47,6 µl



Konzentrationsbestimmung anhand des Coomassie-Gels:

Fusionsprotein	Konzentration anhand des Coomassie-Gels	Volumen für 10 µg Protein
Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E	0,09 µg/µl	111,1 µl
Fc-CHIKV E2 Domäne B	0,045 µg/µl	222,2 µl
Fc-CHIKV E2 Domäne B+β	0,045 µg/µl	222,2 µl
Fc-CHIKV E2 Domäne A-β G79E	0,04 µg/µl	250 µl
Fc-CHIKV E2 β-ribbon-connector	0,055 µg/µl	181,8 µl
Fc-CHIKV E2 Domäne A+B-Gly G79E	0,09 µg/µl	111,1 µl

9.3 Natives Gel



Im nativen Gel ist deutlich zu erkennen, dass sich die Fusionsproteine, aufgrund ihrer Antikörperstruktur, als Dimere zusammenlagern. Exemplarisch sind nur einige Fusionsproteine aufgeführt.

9.4 Aminosäuresequenzen der genutzten E2 Domänen bzw. Varianten als Fusionsprotein (+Fc)

In schwarz ist die genutzte Sequenz CHIKV-E2 Domäne, wobei der β -ribbon-connector in grün angegeben ist. Rot markiert sind Mutationen und die Linker-Region erscheint in blau. In Gelb ist die Wildtypsequenz an der Stelle 79 angegeben. Dunkelrot verweist auf den Fc-Teil.

Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G:

STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIGTDDSH
 DWTKLRYMDNHIPADA^GRAGL FVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHS
 CTHPFHHDP^PVI^GREK^FHSR^PQH^GKEL^PCSTYVQSNAATAEEIEVHMP^GGGGG^PGGGG^GNH
^{KKWQYNSPLVPRNAELGDRKGKIHIPFLANVTCMVPKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP}
^{PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV}
^{LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTC}
^{LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV}
^{MHEALHNHYTQKSLSLSPGK}

Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E:

STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIGTDDSH
 DWTKLRYMDNHIPADA^ERAGL FVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHS
 CTHPFHHDP^PVI^GREK^FHSR^PQH^GKEL^PCSTYVQSNAATAEEIEVHMP^GGGGG^PGGGG^GNH
^{KKWQYNSPLVPRNAELGDRKGKIHIPFLANVTCMVPKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP}
^{PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV}
^{LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTC}
^{LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV}
^{MHEALHNHYTQKSLSLSPGK}

Fc-CHIKV E2 Domäne A G79K:

STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIGTDDSH
 DWTKLRYMDNHIPADA^KRAGL FVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHS
 CTHPFHHDP^PVI^GREK^FHSR^PQH^GKEL^PCSTYVQSNAATAEEIEVHMP^GGGGG^PGGGG^GNH
^{KKWQYNSPLVPRNAELGDRKGKIHIPFLANVTCMVPKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP}

PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-CHIKV E2 Domäne A G79E G82R:

STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIGTDDSH
 DWTKLRYMDNHIPADA^YRA^RLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHS
 CTHPFHHDPP^VIGREK^FHSRP^QHGKEL^PCSTYV^QSNAATA^EEIEV^HMP^GGGGG^PGGGG^GNH
^KKWQYNS^LVPRNAEL^GDRK^GKIHIP^FPLAN^VTCMV^PKDKTHT^CPPCPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTC
 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-CHIKV E2 Domäne A E79G E166K:

STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIGTDDSH
 DWTKLRYMDNHIPADA^GRAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHS
 CTHPFHHDPP^VIGREK^FHSRP^QHGKEL^PCSTYV^QSNAATA^EEIK^VHMP^GGGGG^PGGGG^GN
^HKKWQYNS^LVPRNAEL^GDRK^GKIHIP^FPLAN^VTCMV^PKDKTHT^CPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-CHIKV E2 Domäne A-β G79E:

STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCSPVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIGTDDSH
 DWTKLRYMDNHIPADA^ERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHS
 CTHPFHHDPPDKTHT^CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-CHIKV E2 Domäne A-Gly G79E:

STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSVALERIRNEATDGTLKIQVSLQIGIGTDDSH
DWTCLRYMDNHIPADAEERAGL FVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRKISHS
CTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQH GKELPCSTYVQSNAATAEEIEVHMPPGGGGPGGGGGNH
KKWQYNSPLVPRNAELGDRKGKIHIPFLAAVTCMVPKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-CHIKV E2 Domäne B:

PDTPDRTLLSQQSGNVKITVNSQTARYKCNCGGSNEGLITTDKVINNCKVDQCHAAVTDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-CHIKV E2 Domäne B+ β -ribbon-connector:

PVIGREKFHSRPQH GKELPCSTYVQSNAATAEEIEVHMPPDTPDRTLLSQQSGNVKITVNSQ
TARYKCNCGGSNEGLITTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSPLVPRNAELGDRKGKIH
IPFLANVTCMVPKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-CHIKV E2 Domäne C:

ARNPTV TYGKNQVIMLLYPDHTLLSYRSMGEEP NYQEEWVTHKKEVVLTVPTEGLEVTWG
NNEPYKYWPQDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-CHIKV E2 β -ribbon-connector:

PVIGREKFHSRPQH GKELPCSTYVQSNAATAEEIEVHMPGGGGPGGGGGNHKKWQYNSP
LVPRNAELGDRKGKIHIPFPLANVTCMVPKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

9.5 Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren

Abkürzung /Buchstabe	Aminosäure
A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
E	Glutaminsäure
Q	Glutamin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

9.6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	<i>Aedes</i> spp.
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
CHIKV	Chikungunyavirus
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherischia Coli</i>
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward scatter
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde
HS	Heperansulfat
Ig	Immunglobulin
IRES	Internal ribosomal entry site
kDa	Kilodalton
L	Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MVA	Modified Vaccinia virus Ankara
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyde
RLU	Relative light units/ relative Lichteinheiten
SSC	Sideward scatter
VP	Vektorpartikel
VLP	Virus ähnliche Partikel (virus like particle)
kb	Kilobasen

9.7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Klinische Symptome einer CHIKV-Infektion.....	8
Abb. 2 Virus-Vektor-Zyklus.....	9
Abb. 3 Immunantwort während einer Chikungunya-Infektion.....	10
Abb. 4 Zeitliche und geografische Verbreitung des Chikungunya Virus.....	13
Abb. 5 Aktuelle Verbreitung von Chikungunya mit lokaler Übertragung.....	14
Abb. 6 Einteilung der RNA-Viren.....	16
Abb. 7 Organisation des CHIKV-Genoms.....	17
Abb. 8 Replikationszyklus von Alphaviren.....	19
Abb. 9 Atomare Darstellung des Chikungunya Virus.....	21
Abb. 10 Schematische Darstellung des pE2-E1-Heterodimers.....	23
Abb. 11 Fusionsprozess der viralen Membran mit der zellulären Endosommembran.....	25
Abb. 12 Aktuelle globale Verteilung der Überträgermoskitoarten A) <i>Aedes aegypti</i> und B) <i>Aedes albopictus</i>	29
Abb. 13 Zelleintritt des CHIKV und mögliche Inhibitoren.....	31
Abb. 14 Expressionsvektor für Fc-Fusionsproteine.....	69
Abb. 15 Schematische Darstellung des Glykoprotein E2 (CHIKV).....	71
Abb. 16 Herstellung von Fusionsproteinen.....	73
Abb. 17 Konzentrationsbestimmung der Fusionsproteine.....	74
Abb. 18 FACS-Analyse.....	76
Abb. 19 Zellbindung von CHIKV E2 Domänen.....	78
Abb. 20 Zellbindung von CHIKV E2 Domänen in zwei Konzentrationen.....	80
Abb. 21 Zellbindung bei Zugabe von löslichem Heparansulfat.....	83
Abb. 22 Bindung der Fusionsproteine an Heparin-Sepharose.....	85
Abb. 23 Western Blot Analyse von Zellüberstand der stabilen Zelllinien.....	88
Abb. 24 Prozentuale Verteilung der fusionsproteinbildenden Zellklone über einen zeitlichen Verlauf von 3 Wochen.....	89
Abb. 25 Schematische Darstellung der Punktmutationen in CHIKV E2 Domäne A.....	91
Abb. 26 Identifikation der Domäne A-Mutanten im Zellüberstand von transfizierten HEK 293T Zellen.....	92
Abb. 27 Konzentrationsbestimmung der Fc-CHIKV Domäne A-Mutanten.....	93
Abb. 28 Zellbindung der Domäne A-Mutanten.....	95
Abb. 29 Zellbindung der Domäne A-Mutanten in zwei Konzentrationen.....	98
Abb. 30 Hemmung der GAG-abhängigen Zellbindung durch Zugabe von Heparansulfat ...	100
Abb. 31 Bindung der Mutanten an Heparin-Sepharose.....	102
Abb. 32 Schematische Darstellung der Varianten des β -ribbon-connectors.....	104

Abb. 33 Identifikation der Varianten des β -ribbon-connectors im Zellüberstand von transfizierten HEK	106
293T Zellen	106
Abb. 34 Konzentrationsbestimmung der Varianten des β -ribbon-connectors.....	107
Abb. 35 Zellbindung der Varianten des β -ribbon-connectors	109
Abb. 36 Zellbindung der Varianten des β -ribbon-connectors	112
Abb. 37 Beeinflussung der Zellbindung durch Zugabe von löslichem GAG	114
Abb. 38 Bindung der Varianten des β -ribbon-connectors an Heparin-Sepharose	116
Abb. 39 Konzentrationsbestimmung der genutzten Fusionsproteine	117
Abb. 40 Hemmung der CHIKV-Infektion durch Fusionsproteine	121

10. Publikationen

Teile dieser Dissertation sind bereits unter nachfolgend aufgeführtem Titel veröffentlicht worden:

Weber, C et al. (2017): Identification of Functional Determinants in the Chikungunya Virus E2 Protein. *PLoS neglected tropical diseases* 11 (1), e0005318.

DOI: [10.1371/journal.pntd.0005318](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005318).

11. Danksagung

Abschließend möchte ich mich noch bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben....

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Klaus Osterrieder möchte ich mich für die Betreuung am Fachbereich der FU Berlin bedanken. Auf jede meiner Fragen erfolgte eine zeitnahe Antwort, außerdem gaben Sie mir das Vertrauen und die Freiheit, meiner Arbeit selbständig, unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Schnierle, nachzugehen. Dies hat mir sehr geholfen.

Durch Frau Prof. Dr. Barbara Schnierle wurde ich gut während meiner externen Arbeit am Paul-Ehrlich-Institut betreut. Ich danke Ihnen für die Hilfe und Beantwortung meiner Fragen, sowie der Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe.

Ich danke der Jürgen-Manchot-Stiftung, die mich mithilfe eines Stipendiums bei meinem Vorhaben, eine Dissertation zu verfassen, sehr unterstützt hat. Außerdem danke ich Elvira Thormann für ihr offenes Ohr.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern, ob ehemalige oder noch aktive, der Gruppe 2/2 bedanken. Ich danke Frau Dr. Katja Sliva und Herrn Dr. Christopher Weber für die Einführung in den Laboralltag sowie in das Thema meiner Doktorarbeit.

Bei Lisa Henß, Heike Baumann und Christine von Rhein möchte ich mich für die technische Assistenz und Hilfe bzw. Durchführung von Versuchen bedanken.

Judith Martin, Matthieu Gast, Joshua Kandler, Simon Beck und vor allem Tobias Herrmann sind Personen, die ich während meiner Doktorandenzeit kennenlernen durfte und die den Laboralltag erheiterten. Danke dafür!

Ein besonderer Dank gilt Patrick Weiterer und Marie Mühlhause. Ihr habt mir nicht nur einiges an Arbeit abgenommen, sondern auch den Spaß an der Arbeit zurückgebracht. Danke! → Gut FACS!

Der Gruppe NG3 danke ich fürs Asyl gewähren und dass ihr bei Fragen und persönlichen Belangen für mich da wart.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken! Ich danke euch, dass ihr immer für mich da seid und dass ihr mit mir jede Situation meistert, egal wie schwierig sie ist. Ich bin froh eine so fantastische Familie wie euch zu haben!

Meine lieben Freunde, ihr seid unersetzbar! Ihr habt mir zugehört, mich aufgebaut und Ablenkung geschaffen. Das hat mich vorm völligen Durchdrehen bewahrt. Danke!

Ich danke Dir, Janni, dass Du meine Launen ausgehalten hast und mich so gut unterstützt hast, wie es Dir möglich war. Ich freue mich auf einen neuen Lebensabschnitt mit Dir und hoffentlich bessere Laune.

Mein Findus, Du hast mir Freude und Abwechslung gebracht. Ich bin froh, dass Du unser Leben fröhlicher machst!

.... Wie mein Vater sagte: „Es ist nicht wichtig, was der Grund des Problems ist, sondern wie wir es gemeinsam lösen!“

Gedruckt mit Unterstützung der Ernst-Reuter-Gesellschaft der Freunde, Förderer und Ehemaligen der Freien Universität Berlin e.V..

12. Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Bremen, den 21.08.2020

Eva Berberich



9 783967 290974

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-097-4