Analyse der humoralen, neutralisierenden Immunantwort nach natürlichen Infektionen mit Dengueviren

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und

Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie der Universität

Hamburg

vorgelegt von

Heidi Auerswald

Hamburg, 2016

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2012 bis Januar 2016 in der Laborgruppe von Dr. Michael Schreiber, Abteilung Virologie, am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin der Freien und Hansestadt Hamburg angefertigt.

Disputation am 1.4.2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn Zweitgutachter: Dr. Michael Schreiber

Most people say that it is the intellect which makes a great scientist.

They are wrong: it is character.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Denguevirus-Hüllprotein E	2
1.2	Das Denguevirus	5
1.3	Pathogenese	10
1.4	Humorale Immunantwort gegen DENV	10
1.5	Diagnostische Bestimmung des DENV-Serotyps	13
1.5.1	Virologische Diagnostik: Der direkte Virusnachweis	13
1.5.2	Serologische Diagnostik: Der indirekte Virusnachweis	14
1.6	Rekombinante Denguevirus-Partikel	15
1.7	Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Geräte, Chemikalien und Materialien	20
2.1.1	Geräte und Materialien	20
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.3	Antikörper	22
2.1.4	Kits	22
2.1.5	Enzyme	22
2.1.6	Molekulargewichtsstandards	23
2.1.7	Zellen	23

2.1.8	Virus-Isolate	23
2.1.9	Seren	24
2.2	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1	Isolation viraler RNA	24

2.2.2	cDNA-Synthese	24
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.2.3.1	Amplifikation von DENV prM/E-Fragmenten	25
2.2.3.2	Serotypen-PCR	26
2.2.3.3	Assembly-PCR und Gibson-Assembly	26
2.2.4	Herstellung des Expressionsvektors pcHA	28
2.2.5	Klonierung von prM/E-Expressionsvektoren	28
2.2.6	Transformation von DNA in chemokompetente E.coli-Zellen	29
2.2.7	Herstellung chemokompetenter E.coli-Zellen	29
2.2.8	Plasmidpräparation	29
2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.10	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	29
2.2.11	DNA-Sequenzierung	30
2.3	Proteinbiologische und -analytische Methoden	30
2.3.1	Herstellung und Reinigung rekombinanter Antigene	30
2.3.2	Immuno-Dot-Blot	30
2.4	Zellbiologische Methoden	31
2.4.1	Zellkultur eukarytischer Zellen	31
2.4.2	Herstellung und Nachweis DENV-pseudotypisierter HIV-1-Partikel	32
2.4.2.1	Liposomale Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen	32
2.4.2.2	Luciferase-Assay	32
2.4.3	Kultivierung von Dengueviren	33
2.4.4	Quantifizierung der Virusmengen	33
2.4.4.1	Plaque-Assay	33
2.4.4.2	Foci-Assay	33
2.4.5	Zellfärbemethoden	34

2.4.5.1	Kristallviolettfärbung	34
2.4.5.2	Focifärbung	35
2.4.5.3	Immunfluoreszenz-Färbung	36
2.4.6	Neutralisationstest	36
2.4.6.1	Plaque reduction neutralization test (PRNT)	37
2.4.6.2	Foci reduction neutralization test (FRNT)	38

3	Ergebnisse	39
3.1	Etablierung des Neutralisationstests	39
3.1.1	Virusquantifizierung durch Bestimmung einzelner infizierter Zellen	39
3.1.2	Anzucht der Dengueviren	42
3.1.3	Neutralisationstest	43
3.2	Serologische Bestimmung der Neutralisationsprävalenz	46
3.2.1	Verwendete Seren von Dengue-infizierten Patienten	46
3.2.1.1	Serotypisierung der Seren aus Kambodscha	46
3.2.1.2	Serotypisierung der Seren aus Kolumbien	50
3.2.1.3	Serotypisierung von Seren deutscher Reiserückkehrer	53
3.2.1.4	Serotypisierung der Seren aus Vietnam	54
3.2.1.5	Serotypisierung der Seren aus Burkina Faso	57
3.2.2	Einfluss der verwendeten DENV-Isolate auf die Neutralisation	61
3.2.3	Verlauf der neutralisierenden Antikörperantwort	64
3.3	Virologische Bestimmung des Virustyps der Infektion	68
3.4	Vergleich des Virustyps mit der Neutralisationsprävalenz	68
3.5	Vergleich der Neutralisationsdaten mit dem Antigentest	75
3.6	Denguevirus prM/E-pseudotypisierte HIV-1-Partikel	82
3.6.1	Konstruktions des pcHA-Vektors	84

3.6.2	Herstellung der Dengue-Expressionsplasmide	84
3.6.3	Transfektion der HIV-1-Vektoren	88
3.6.4	Transfektion der pcHAD1-4-Vektoren	94
3.6.5	Herstellung Dengue-pseudotypisierter HIV-1-Partikel	99
4	Diskussion	103
4.1	DENV-pseudotypisierte Partikel	103
4.2	Neutralisationsanalyse von DENV-Patientenseren	109
5	Zusammenfassung	116
6	Summary	117
7	Literaturverzeichnis	118
7 8	Literaturverzeichnis Abkürzungsverzeichnis	118 129
7 8 9	Literaturverzeichnis Abkürzungsverzeichnis Anhang	118 129 131
7 8 9 9.1	Literaturverzeichnis Abkürzungsverzeichnis Anhang Oligonukleotide	118 129 131 131
7 8 9 9.1 9.2	Literaturverzeichnis Abkürzungsverzeichnis Anhang Oligonukleotide Vektoren	118 129 131 131 133
7 8 9 9.1 9.2 9.2.1	LiteraturverzeichnisAbkürzungsverzeichnisAnhangOligonukleotideVektorenpcDNA3.1/Hygro	118 129 131 131 133 133
7 8 9 9.1 9.2 9.2.1 9.2.2	LiteraturverzeichnisAbkürzungsverzeichnisAnhangOligonukleotideVektorenpcDNA3.1/HygropNL4-3-Luc-R ⁻ E ⁻	118 129 131 131 133 133 133
 7 8 9 9.1 9.2 9.2.1 9.2.2 9.3 	LiteraturverzeichnisAbkürzungsverzeichnisAnhangOligonukleotideVektorenpcDNA3.1/HygropNL4-3-Luc-RʿEʿprM/E-Sequenzen der DENV-Expressionsvektoren	118 129 131 131 133 133 133 133 134
7 8 9 9.1 9.2 9.2.1 9.2.2 9.3 9.4	LiteraturverzeichnisAbkürzungsverzeichnisAnhangOligonukleotideVektorenpcDNA3.1/HygropNL4-3-Luc-R`E`prM/E-Sequenzen der DENV-ExpressionsvektorenOriginaldaten der Neutralisationstests	118 129 131 131 133 133 133 133 134 138
 7 8 9 9.1 9.2 9.2.1 9.2.2 9.3 9.4 9.5 	LiteraturverzeichnisAbkürzungsverzeichnisAnhangOligonukleotideVektorenpcDNA3.1/HygropNL4-3-Luc-R ⁻ E ⁻ prM/E-Sequenzen der DENV-ExpressionsvektorenOriginaldaten der NeutralisationstestsAuflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS	118 129 131 131 133 133 133 134 138 146
 7 8 9 9.1 9.2 9.2.1 9.2.2 9.3 9.4 9.5 	LiteraturverzeichnisAbkürzungsverzeichnisAnhangOligonukleotideVektorenpcDNA3.1/HygropNL4-3-Luc-R ⁻ E ⁻ prM/E-Sequenzen der DENV-ExpressionsvektorenOriginaldaten der NeutralisationstestsAuflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS	118 129 131 131 133 133 133 133 134 138 146

Danksagung	150
Lebenslauf	152

1 Einleitung

Das Denguefieber, das durch Moskitos auf den Menschen übertragen wird, ist in den tropischen Regionen Südostasiens, Afrikas, Mittel- und Südamerikas endemisch (Abb. 1). Denguefieber ist damit die sich am schnellsten ausbreitende, von Moskitos übertragene Krankheit mit bis zu 400 Millionen Krankheitsfällen jährlich.¹ Nach einer Dengue-Infektion entwickelt sich eine humorale Immunantwort, wobei die meisten Antikörper gegen das virale *envelope*, das E-Protein, gerichtet sind.^{2,3} Aufgrund zweier Faktoren, der hohen Variabilität des E-Proteins und aufeinander folgender Infektionen mit verschiedenen Dengueviren, ist die gegen das E-Protein gerichtete Antikörperantwort des Menschen äußerst komplex. Die hohe Variabilität des E-Proteins erschwert besonders die serologische Differenzierung der verschiedenen Dengueviren sowie die genauere Charakterisierung neutralisierender Antikörper und deren Epitope. Die Einteilung der Dengueviren erfolgt aufgrund der Antikörper-vermittelten Virusneutralisation in vier verschiedene Dengue-Serotypen: DENV1, DENV2, DENV3 und DENV4.⁴



Abb. 1 Verbreitung der Dengue-Serotypen. Ursprünglich sind die Serotypen DENV1-4 geografisch getrennt voneinander entstanden. Die zunehmende Ausbreitung der Moskitovektoren (*Aedes aegypti, Aedes albopictus*) führte zu einer weltweiten Verbreitung und einem 30-fachen Anstieg der Infektionsraten in den letzten 30-40 Jahren.^{5,6} So entstanden viele Denguehyperendemische Gebiete, in denen heute mehrere DENV-Serotypen gleichzeitig zirkulieren.¹ Die Zahlen 1, 2, 3, 4 in der Abbildung entsprechen den DENV-Serotypen 1-4.

1.1 Das Denguevirus-Hüllprotein E

Auf der Oberfläche der Dengue-Viruspartikel befinden sich die zwei Glykoproteine prM (*precursor membrane*) und E (*envelope*). Beide sind in der Lipidhülle des Virus fest verankert. Das prM-Protein spielt eine wichtige Rolle für das *assembly* und die Reifung der Viruspartikel.⁷ Das E-Protein ist für die Rezeptorbindung und Membranfusion verantwortlich und daher ein wichtiger Angriffspunkt für neutralisierende Antikörper.⁸

Die Variabilität des E-Proteins ist der eigentliche Grund, warum die Dengueviren in vier verschiedene Serotypen (DENV1-4) unterteilt werden.^{9,10} Das E-Protein besteht aus 495 Aminosäuren mit einer 60-75 %igen Aminosäure-Sequenzhomologie zwischen den verschiedenen DENV-Serotypen. Die variablen Aminosäuren im E-Protein definieren den jeweiligen Serotyp.¹¹ Antikörper werden sowohl gegen konservierte Epitope (kreuzreagierende Antikörper) als auch gegen variable Regionen (Serotyp-spezifische Antikörper) gebildet.^{12,13}

Die Genstruktur des E-Proteins untergliedert sich in acht Abschnitte (Abb. 2A). Drei Sequenzabschnitte kodieren für ED1 (E-Proteindomäne 1), zwei Abschnitte für ED2 (E-Proteindomäne 2). Drei weitere Sequenzabschnitte kodieren für ED3 (E-Proteindomäne 3), die stem-Region und den Teil, welcher das E-Protein in der Membran verankert (anchor-Region). Die stem-Region verbindet ED3 mit dem Membrananker. Zwischen der stem-Region und ED3 befindet sich eine Schnittstelle für die Protease Trypsin, wodurch die Ektodomäne mit den drei Teilen ED1, ED2 und ED3 abgespalten werden kann.¹⁴ Dieses lösliche E-Protein wurde für die meisten bisherigen Untersuchungen und zur Aufklärung der Struktur mittels Proteinkristallografie verwendet.¹⁵ Die existierenden 3D-Modelle zeigen daher meist die Struktur des löslichen E-Proteins (Abb. 2B).

Jedes E-Protein besteht aus drei strukturell voneinander getrennten Domänen (Abb. 2B).¹⁵ Im Zentrum des Proteins befindet sich ED1, mit dem N-Terminus und zwei Glykosylierungsstellen. Die exponierte Oberfläche (*lateral ridge*) dieser Domäne ist weniger immunogen als die anderen Teile des E-Proteins und enthält lediglich Epitope für nicht-neutralisierende Antikörper.^{16–18} ED1-Antikörper weisen meist eine hohe Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen DENV-Serotypen und zu anderen Viren der Flavivirus-Gruppe auf.^{19,20}

2

Α

Genstruktur



B Modell des löslichen E-Monomers



C Homodimer und Viruspartikel



Abb. 2 Das Dengue-E-Protein. (A) Die Genomorganisation des E-Gens zeigt die Aufteilung der DNA-Abschnitte, die für die einzelnen E-Proteindomänen, ED1 (rot), ED2 (gelb) und ED3 (blau), kodieren. Die ED3-Domäne wird von einem kontinuierlichen Genomabschnitt exprimiert. ED1 und ED2 werden dagegen von getrennten Genabschnitten kodiert. (B) Am 3D-Modell des Monomers eines löslichen E-Proteins zeigt sich die klare Unterteilung in die drei strukturellen Domänen ED1, ED2 und ED3. Die Antikörper-bindenden Bereiche des E-Proteins sind durch Kreise markiert (modifiziert nach Wahala²¹). Die Abbildung basiert auf Daten des DENV3 E-Proteins (pdb: 1UZG¹⁷) und wurde mit der Software Pymol erstellt. (C) E-Proteine bilden Homodimere in antiparalleler Ausrichtung (*head-to-tail*). Auf einem gereiften Viruspartikel sind jeweils drei E-Homodimere in einer *herringbone*-Orientierung angeordnet (Viruspartikel-Model nach Klein²²).

Die ED1-Domäne wird auf einer Seite von ED2 und auf der anderen von ED3 flankiert. Die ED1- und ED2-Domänen sind durch die interphase-Region verbunden (Abb. 2B). Dieser Domänenübergang ergibt sich aus der nicht-linearen Anordnung der kodierenden Genabschnitte für ED1 und ED2 (Abb. 2A). Die ED2-Domäne vermittelt die Dimerisierung des E-Proteins. Neben der interphase-Region finden sich weitere Antikörper-bindende ED2-Bereiche (central interphase, lateral ridge, fusion loop; Abb. 2B). Der an der Spitze des E-Proteins exponierte fusion loop ist unter den Denguevirus-Varianten hoch konserviert und bewirkt beim Viruseintritt das Verschmelzen von Virus- und Zellmembran. Sowohl der Bereich des fusion loop als auch die *interphase*-Region enthalten Epitope für neutralisierende Antikörper.^{12,18,23} Die dritte E-Domäne, ED3, besitzt eine charakteristische Immunglobulin-artige Struktur. Die Domäne besteht aus zwei β -sheets, die das hydrophobe Zentrum der Domäne umschließen, und flexiblen *loops* an einem Ende (*lateral ridge*, Abb. 2B).¹⁵ Die ED3-Domäne ist vermutlich die Rezeptor-bindende Struktur und daher auch eines der wichtigsten Ziele für neutralisierende Antikörper.^{23–25} Dabei enthält ED3 sowohl Epitope für Gruppen-reaktive Antikörper (gegen andere Flaviviren gerichtet) als auch Serokomplex-reaktive Antikörper (gegen andere DENV-Serotypen gerichtet).^{12,13,26} Von besonderer Bedeutung sind allerdings die neutralisierenden Antikörper, da diese den Immunität^{23–25} Großteil der Serotyp-spezifischen und daher die Neutralisationsprävalenz bestimmen. Die Neutralisationsprävalenz eines Patienten wird durch das Virus definiert, gegen den der Patient die höchste Neutralisationsantwort besitzt. Diese Serotyp-spezifischen, neutralisierenden Antikörper machen aber nur einen kleinen Teil (<5 %) der Immunantwort aus.²⁷ Zusätzlich zu den Antikörpern, deren Epitope klar den E-Proteindomänen ED1, ED2 und

ED3 zugeordnet werden können, existieren auch Antikörper gegen komplexe, diskontinuierliche Epitope, die nur auf dem E-Protein-Dimer oder komplexen E-Protein-Konformationen auf dem Viruspartikel zu finden sind.^{28–30} Diese komplexen, sogenannten quarternären Epitope, sind nicht immer auf der Oberfläche der Partikel exponiert, da die Konformation der E-Proteine dynamisch ist und so z.B. bei verschiedenen Temperaturen (28°C und 37°C) unterschiedliche E-Strukturen auf der Virusoberfläche präsentiert werden.^{31,32}

1.2 Das Denguevirus

Dengueviren gehören zur Familie der *Flavivirida*e und dem Genus Flavivirus.³³ Die Flaviviren werden in vier Serokomplexe unterteilt (Abb. 3). Dabei bilden die Dengueviren den DENV-Serokomplex, der nochmals in die vier Serotypen (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4) unterteilt wird.³⁴ Diese Klassifizierung beruhte ursprünglich auf der unterschiedlichen Virus-Neutralisation durch Maus-Immunseren.⁴ Auch im Menschen ist die Neutralisation am stärksten gegen einen Serotyp gerichtet. Diese dominierende neutralisierende Antikörperantwort wird in dieser Arbeit als Neutralisationsprävalenz bezeichnet, und somit als die Fähigkeit einen DENV-Serotyp am besten zu neutralisieren. Heute werden die Viren allerdings nicht mehr hinsichtlich ihrer serologischen Eigenschaften klassifiziert, sondern basierend auf ihrer Genomsequenz. Trotz dieser veränderten Zuordungskriterien blieb die Nomenklatur der Serotypen erhalten. Auf Proteinebene betragen die Unterschiede zwischen den Serotypen 25 % bis 40 %, wobei die meisten Unterschiede im E-Protein lokalisiert sind.⁵ Auch die Viren innerhalb eines DENV-Serotypes unterscheiden sich bis zu 3 % in ihrer Aminosäuresequenz, weshalb eine weitere Unterteilung in Genotypen erfolgt.³⁵



Abb. 3 Einordnung und Unterteilung der Dengueviren. Der Dengue-Serokomplex ist unterteilt in die vier Serotypen DENV1-4. Jeder Dengue Serotyp spaltet sich in weitere Varianten, sogenannte Genotypen, auf.³⁴

Das Genom der Dengueviren ist eine einzelsträngige RNA von ca. 10,8 kb mit positiver Polarität (Abb. 4A). Das Genom dient direkt als mRNA für die Synthese eines einzigen Polyproteins (Abb. 4B). Die Partikelbildung findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt, wobei die Teile des Polyproteins, die sich später auf der Oberfläche der Viruspartikel befinden, zur Zeit des assemblys ins Lumen des ER ragen. Durch die virale Protease NS2B/3 und zelluläre Proteasen wird das Polyprotein gespalten. Nach proteolytischer Spaltung des Polyproteins bilden dimerisierte C-Proteine das Nukleokapsid, welches das RNA-Genom umhüllt (Abb. 4C). Das Nukleokapsid wird von einer Lipiddoppelschicht umschlossen, die der ER-Membran der Wirtszelle entstammt. In dieser Membran befinden sich die DENV-Hüllproteine prM und E, die mit jeweils zwei Transmembran-Regionen in der Membran verankert sind (Abb. 4B).³⁶ Im ER-Lumen entstehen zunächst unreife Partikel, bei denen die prM/E-Heterodimere als Trimere von der Membran abstehend angeordnet sind (spiky Partikel).³⁷ Die Abb. 4C zeigt in einer grafischen Vereinfachung anstelle des 3-dimensionalen Trimers eine 2-dimensionale Darstellung mit zwei prM/E-Dimeren. Die Reifung der Partikel erfolgt durch den niedrigeren pH-Wert in den Endosomen (Ansäuerung). Dies führt zu einer Reorganisation des prM/E-Heterodimers.³⁸ Die Proteine liegen dadurch flach als antiparallele Dimere auf der Oberfläche der Partikel (smooth Partikel), wodurch im prM-Protein die Furin-Schnittstelle zwischen pr und M zugänglich wird. Das abgespaltene, N-terminale pr-Polypeptid bleibt aber am M/E-Heterodimer assoziiert und wird erst freigesetzt, nachdem die Partikel die Wirtszelle verlassen haben.

1.3 Der Denguevirus-Lebenszyklus

Das Denguevirus gehört zu den Zoonosen und somit zu den Infektionserkrankungen die ursprünglich reine Tiererkrankungen waren, inzwischen aber auch humanpathogen sind. Daher werden zwei Denguevirus-Zyklen unterschieden. Zum einen der sylvatische Zyklus zwischen nicht-menschlichen Primaten mit arborealen *Aedes*-Moskitos als übertragende Vektoren. Zum anderen der urbane endemische Zyklus, bei dem Menschen durch Moskitos (hauptsächlich *Aedes aegypti*) infiziert werden.³⁹



Abb. 4 Denguevirus. (A) Das einzelsträngige RNA-Genom (10,8 kb) kodiert ein Polyprotein. Der kodierende Bereich wird von zwei untranslatierten Regionen (UTRs) flankiert. Struktur-Proteine C (*capsid*), prM (*precursor membran*) und E (*envelope*). Nicht-Struktur-Proteine NS1-5. (B) Das Polyprotein wird ko- und posttranslational von der viralen Protease NS2B/3 und Proteasen der Wirtszelle gespalten. (C) Virale Partikel bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, die das Nukleokapsid und das RNA-Genom umhüllt. In die Membran eingebettet sind die Hüllproteine prM und E. In den Endosomen erfolgt eine Konformationsänderung der prM/E-Heterodimere, wodurch die Furin-Protease pr von M abspalten kann.

Genetische Analysen weisen darauf hin, dass die vier DENV-Serotypen unabhängig aus sylvatisch zirkulierenden Viren hervorgegangen sind.^{35,40} Die heutigen, endemischen Viren sind dadurch entstanden, dass Menschen durch infizierte, arboreale Moskitos in Kontakt mit den sylvatischen Viren kamen und sich diese Viren dann an die Vermehrung im Menschen und die Übertragung durch anthropophile Moskitos (Aedes aegypti) anpassten. Die Verbreitung dieser Moskitospezies steht im engen Zusammenhang mit der endemischen Ausbreitung der Dengueviren.⁴¹ Moskitos, speziell Aedes aegypti, leben in engem Kontakt zum Menschen und nutzen Wasserreservoirs wie z.B. Regentonnen oder Pfützen in alten Autoreifen als Habitat zur Eiablage und für die Entwicklung ihrer Larven. Für die Entwicklung der Eier benötigen weibliche Moskitos Blut, wobei in urbanen Gegenden der Mensch als bevorzugter Wirt für die Blutmahlzeit dient.⁴²⁻⁴⁴ Nach der Blutmahlzeit gelangt das Virus im Moskito bis zum Darm, durchdringt dort die Darmbarriere und vermehrt sich im gesamten Körper der Stechmücke. Sobald auch die Speicheldrüsen infiziert sind, kann die Stechmücke bei einer erneuten Blutmahlzeit das Virus auf einen anderen Menschen übertragen. Zusätzlich zum Moskito-Mensch-Übertragungsweg, existiert auch ein transovarieller Zyklus in den Moskitos.^{45,46} Dabei wird das Virus von der infizierten, weiblichen Stechmücke an ihre Eier und somit direkt an die nächste Moskitogeneration weitergegeben. Aufgrund dieser Übertragungsmechanismen findet sich das Denguevirus überall in den Tropen und Subtropen, wo auch die entsprechenden *Aedes*-Moskitopopulationen vorkommen.^{47,48} Wird der Mensch durch einen oder mehrere Moskitostiche mit DENV infiziert, breitet sich das Virus von den primär infizierten Zellen in der Haut systemisch über infizierte Monozyten im gesamten Körper aus.⁴⁹ Die Virusvermehrung verläuft dabei in allen Zellen gleich (Abb. 5). Die DENV-Infektion resultiert schließlich in einer Immunantwort, die Antikörper gegen das prM-, M- und E-, sowie gegen das NS1-Antigen induziert.²⁷ Die humorale Dengue-Immunantwort ist komplex, da die verschiedenen Antigene kreuzreaktive, aber auch Serotyp-spezifische Antikörper sowohl neutralisierender als auch infektionsverstärkender Art hervorbringen.



Abb. 5 Dengue-Lebenszyklus und wichtige Antigene. Das Virus kann sich in verschiedenen Zellen von Menschen, Affen oder Stechmücken vermehren. Der zelluläre Virusrezeptor ist unbekannt, aber Heparansulfatproteoglykane spielen eine wichtige Rolle bei der Anheftung an die Zelloberfläche (1).⁵⁰ Nach endozytotischer Aufnahme in die Wirtzelle (2) wird die virale RNA freigesetzt und am ER translatiert.⁵¹ Hierbei entsteht ein membranständiges Polyprotein (3), das aus C- (gelb), prM- (grün) und E-Protein (rot) sowie aus den Nicht-Strukturproteinen (blau) besteht. Die Reifung der im ER gebildeten Viruspartikel erfolgt während des sekretorischen Weges durch den Golgi-Apparat. Dabei wird durch die zelluläre Protease Furin das pr-Polypetid vom M-Protein abgespalten (4).⁵² Reife Partikel verlassen die Zelle und präsentieren dem Immunsystem infektiöse M/E-Strukturen, was zur Bildung von Antikörpern führt, die sowohl Serotyp-spezifisch als auch kreuzreagierend sein können (5).^{3,27,27} Die unvollständige Spaltung des prM-Proteins führt zur Freisetzung nichtinfektiöser Partikel mit prM/E-Strukturen (6). Antikörper, die gegen pr gerichtet sind, vermitteln bei einer sekundären DENV-Infektion meist keine Neutralisation sondern wirken infektionsverstärkend.^{12,20,53} Zusätzlich zu den Viruspartikeln werden hexamere NS1-Lipopartikel freigesetzt (7). Antikörper gegen NS1 bewirken u.a. die Aktivierung des Komplements.⁵⁴

1.3 Pathogenese

Die klinische Manifestation von **DENV-Infektionen** reicht von asymptomatischen Verläufen, über eine sich selbst-limitierende Fiebererkrankung bis hin zu schweren Krankheitsverläufen mit hämorrhagischem Fieber.⁵⁵ Nur in 20-25 % Infektionen treten überhaupt Krankheitssymptome auf.¹ Die meisten der symptomatischen Infektionen verlaufen mild, zwar mit hohem Fieber aber meist mit einer vollständigen Erholung der Patienten nach 1-2 Wochen. Sehr schwere Krankheitsverläufe treten in weniger als 5 % der infizierten Patienten auf. Dabei zeigten epidemiologische Beobachtungen, dass sekundäre DENV-Infektionen häufiger zu einem schweren Krankheitsverlauf führen als primäre Infektionen.^{56–58}

1.4 Humorale Immunantwort gegen DENV

Die humorale Immunantwort gegen Dengue umfasst die Bildung von IgMund IgG-Antikörpern, die gegen die DENV-Antigene prM, E und NS1 gerichtet sind (Abb. 5). Antikörper sind ein entscheidender Teil des Schutzes gegen virale Infektionen, aber nicht alle gebildeten DENV-spezifischen Antikörper bewirken eine Neutralisation. Man unterscheidet daher neutralisierende und nicht-neutralisierende Antikörper, die sowohl Serotyp- als auch Gruppen- und Serokomplex-spezifisch sein können.^{12,19,24,25} Die höchste neutralisierende, Serotyp-spezifischen Immunantwort wird als Neutralisationsprävalenz definiert. Bei Dengue-Infektionen werden neutralisierende Antikörper gebildet, die die Interaktion des Virus mit der Wirtszelle blockieren oder die Fusion von Virus- und Wirtszellmembran verhindern. Zusätzlich zu der direkten Antikörper-vermittelten Neutralisation werden durch eine Antikörperbindung Effektorzellen (wie z.B. Makrophagen) und Komplementkomponenten rekrutiert, was zur Apoptose oder einer Komplement-vermittelten Lyse infizierter Zellen führt.⁵⁹ Die humorale Antwort auf eine primäre DENV-Infektion beginnt ca. fünf Tage nach dem Auftreten von Symptomen mit der Bildung von IgM-Antikörpern (Abb. 6). Einige Tage später setzt auch die IgG-Immunantwort ein. Die IgM-Konzentration bleibt meist niedrig und sinkt relativ schnell wieder ab.⁶⁰ Die IgG-Bildung setzt zwar später ein, erreicht aber deutlich höhere Titer und persistiert für mehrere Jahre.^{61,62}



Abb. 6 Verlauf diagnostischer Parameter bei Dengue-Infektionen. Der Infektionsverlauf beginnt mit der Übertragung des Virus auf den Menschen durch Dengue-infizierte Moskitoweibchen. Nach einer kurzen intrinsischen Inkubation von wenigen Tagen kann das Virus, in Form von RNA oder dem NS1-Antigen, direkt nachgewiesen werden. Für den Patienten beginnt die Krankheit mit einer akuten Phase, in der die typischen Symptome, wie z.B. Fieber und Muskelschmerzen, auftreten. In dieser Phase verringert sich die nachweisbare Virusmenge bereits deutlich. Nach einer Woche mildern sich meist die Symptome und es beginnt die Konvaleszenzphase. Ab dieser Phase lässt sich das Virus im Blut der Patienten nicht mehr direkt durch RT-PCR oder NS1-Antigentest nachweisen. Die DENV-Diagnostik erfolgt dann nur noch serologisch über den Nachweis Dengue-spezifischer IgGund IgM-Antikörper. Die primäre Infektion wird von der sekundären Infektion anhand der IgM-und IgG-Titer unterschieden. Eine primäre Infektion ist dadurch charakterisiert, dass sich in Serumproben der akuten Phase IgM-Antikörper aber keine IgG-Antikörper finden, da deren Bildung erst später einsetzt. Bei der sekundären Infektion steigt dagegen der IgG-Titer in den ersten Tagen schnell an, weshalb bereits in Serumproben der akuten Phase IgG-Antikörper detektiert werden können, und die IgM-Titer sind deutlich geringer als bei primären Infektionen.

Bei einer erneuten DENV-Infektion steigt der IgG-Titer deutlich schneller und höher an, wohingegen die IgM-Konzentration nur sehr schwach ansteigt und schnell wieder abfällt.^{63,64} Aufgrund der Unterschiede von IgM- und IgG-Titern und deren Verläufen kann eine primäre von einer sekundären DENV-Infektion unterschieden werden (Abb. 6). Die beobachteten, humoralen Immunantworten gegen Dengue sind meist sehr komplex, besonders in Patienten aus endemischen Gebieten, da diese wahrscheinlich vor einer symptomatischen Dengue-Erkrankung mindestens eine asymptomatische Infektion durchlaufen haben.⁶⁵

Nach einer primären DENV-Infektion werden Serotyp-spezifische Antikörper gebildet, die gegen das ursprüngliche Denguevirus gerichtet sind und den Patienten lebenslang vor einer erneuten Erkrankung mit genau diesem Virustyp, dem sogenannten homologen Serotyp, schützen.^{61,62} Diese Immunantwort schützt aber nicht vor einer Infektion mit anderen DENV-Serotypen (heterologen Serotypen).^{61,62} In der frühen Phase nach der Infektion dominieren kreuzreaktive Antikörper, die auch gegen heterologe DENV-Serotypen und andere Flaviviren gerichtet sind.^{62,66,67} Die Menge dieser kreuzreagierenden Antikörper geht während der ersten Monate der Konvaleszenzphase zurück und nach ungefähr einem Jahr verbleiben DENV-Serotypspezifische Antikörper im Serum.⁶⁸ Der Zeitpunkt, zu dem es zu einer erneuten Infektion kommt, beeinflusst die klinische Manifestation im Patienten. Im kurzen Zeitraum, in dem sowohl Serotyp-spezifische als auch kreuzreagierende Antikörper im Patienten vorhanden sind, kommt es meist nur zu asymptomatischen DENV-Infektionen.⁶⁹ Sobald aber vorwiegend Serotyp-spezifische Antikörper vorhanden sind, ist eine erneute symptomatische DENV-Erkrankung, ausgelöst durch einen anderen Serotyp, nicht nur möglich sondern auch wahrscheinlicher.^{20,58,70,71} Eine mögliche Erklärung für dieses epidemiologische Phänomen liefert die Hypothese der Antikörper-abhängigen Infektionsverstärkung (antibody-dependent enhancement, ADE). Dabei vermitteln nicht-neutralisierende Antikörper, die an die DENV-Partikel binden, den erleichterten Eintritt der Viruspartikel in Fcy-Rezeptor-tragende Zellen und verursachen dadurch eine schnellere Virusvermehrung.^{70,72} Dies resultiert in einer erhöhten Virämie, übermäßiger Produktion von Zytokinen und letztendlich in schwereren Krankheitsverläufen.^{73–75}

Eine wichtige Beobachtung ist, dass nach einer sekundären, symptomatischen DENV-Infektion kaum noch weitere symptomatische DENV-Infektionen auftreten.^{76,77} Dies deutet darauf hin, dass die humorale Immunantwort nach mindestens zwei DENV-Infektionen mit zwei verschiedenen DENV-Serotypen ausreichend breit ausgebildet ist, um gegen alle DENV-Serotypen zu schützen. Die Antikörperantwort auf eine tertiäre oder quaternäre DENV-Infektion zeigt keine Unterschiede im Vergleich zu einer sekundären Infektion, weshalb alle nicht-primären, multiplen Infektionen als sekundär bezeichnet werden.⁷⁸

1.5 Diagnostische Bestimmung des DENV-Serotyps

Die Diagnostik von DENV-Infektionen kann direkt durch den Nachweis von viraler RNA oder des NS1-Antigens erfolgen, oder aber indirekt durch eine Detektion der induzierten DENV-spezifischen Antikörper. Die Identifizierung des DENV-Serotyps hat dabei eine besondere Bedeutung, da die schützende, neutralisierende Antikörperantwort nur gegen den homologen Serotyp gerichtet ist. Die Identifikation des DENV-Serotyps ist auch wichtig, weil sich die Serotypen in ihrer Virulenz unterscheiden und es immer mehr Länder gibt, in denen mehrere unterschiedliche Serotypen zirkulieren (Abb. 1).^{79–81}

1.5.1 Virologische Diagnostik: Der direkte Virusnachweis

Während der akuten, virämischen Phase der Infektion, d.h. in der ersten Woche nach dem Einsetzen der Symptome, können das Virus bzw. die virale RNA und das NS1-Antigen, direkt nachgewiesen werden (Abb. 6). Da die Virämie aber nur von kurzer Dauer und manchmal von sehr geringer Intensität ist, kann der direkte Virusnachweis nur in einem engen Zeitraum in der akuten Phase der Infektion erfolgen. Die direkte Virusisolation aus Patientenblut wird üblicherweise durch Anzucht in Moskitozellen *in vitro* durchgeführt.⁸² Erfolgreicher und effizienter ist die *in vivo*-Virusanzucht durch die direkte Aufnahme von Patientenblut durch lebende Moskitos.⁸³ Der Erfolg der Virusisolation hängt vom Virustiter im Patienten und dem DENV-Serotyp ab,⁸⁴ weshalb diese Methode meist nicht standardmäßig angewandt wird. Der Serotyp isolierter Viren kann durch Sequenzierung oder Reaktion mit monoklonalen, Serotyp-spezifischen Antikörpern bestimmt werden. Während der virämischen Phase ist für Virus-Nachweis und -Identifikation die quantitative *reverse transcriptase*-PCR (qRT-PCR) die Methode der Wahl. Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden kann der DENV-Serotyp schnell und mit hoher Sensitivität bestimmt werden.⁸⁵ Dabei werden die Serotypen aufgrund von Sequenzunterschieden in ihren E- und NS1-Genen voneinander differenziert.⁸⁶ Solange das Virus im Patienten zirkuliert, kann ein DENV-Nachweis auch über die Detektion des NS1-Antigens im Blut erfolgen.⁸⁷

1.5.2 Serologische Diagnostik: Der indirekte Virusnachweis

In der konvaleszenten Phase der Infektion kann im Patienten kein Virus mehr detektiert werden. Deshalb bleibt für den Nachweis der DENV-Infektion nur noch die Analyse der induzierten Antikörper. Die Antikörper sind gegen die DENV-Hüllproteine prM und E sowie gegen das frei im Blut zirkulierende NS1 gerichtet (Abb. 5). Die Antikörper können mittels Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA), indirektem Fluoreszenz-Antikörpertest (IFA), Analyse der Hämagglutinationsinhibition (HI) oder Neutralisationstest (NT) nachgewiesen werden.^{88–91} Die serologische Diagnostik ist dabei durch die Vielzahl an kreuzreagierenden, infektionsverstärkenden, gruppen- und typenspezifischen Antikörpern sehr komplex.

Die Detektion von NS1-Antikörpern mittels ELISA erlaubt sowohl den DENV-Nachweis als auch die Identifikation des Serotyps.⁹² Die gegen die DENV-Proteine M und E gerichteten IgM- und IgG-Antikörper werden am häufigsten zur serologischen DENV-Diagnostik herangezogen. Die IgM-Antikörper werden zum Ende der akuten Phase gebildet und ihr Titer sinkt während der Konvaleszenzphase schnell wieder auf die Menge vor der Infektion ab (Abb. 6). Deshalb ist der IgM-Nachweis für die Diagnostik in der frühen Krankheitsphase geeignet, für die Untersuchung konvaleszenter Serumproben oder retrospektiver Analysen jedoch nicht brauchbar. Wie bereits beschrieben, kann das Verhältnis von IgM- zu IgG-Antikörpern als Marker des Immunstatus verwendet werden (Abb. 6). Der Nachweis von IgG-Antikörpern durch ELISA, HI oder NT ist die Standard-Diagnostik zum Nachweis einer DENV-Infektion. Dabei ist der Nachweis mittels ELISA und IFA einfach durchzuführen, aber nur wenig sensitiv.⁹³ Der HI-Test ist anfällig für falsche Ergebnisse, die durch Kreuzreaktion mit anderen Flaviviren (wie JEV und YFV) induziert werden. Der Neutralisationstest (NT) stellt die Methode mit der höchsten Spezifität dar. Er erlaubt sowohl die Identifikation des Virustyps mit Hilfe genau charakterisierter Serotypspezifischer Seren als auch die Bestimmung der Neutralisationsprävalenz mit genau charakterisierten Viren.⁴ Meist benutzt man bestimmte, von der WHO empfohlene Viren um die Neutralisationsprävalenz in humanen Serumproben zu bestimmen.⁹⁴ Der Neutralisationstest ist prinzipiell sehr zeitintensiv und muss zusätzlich unter den nötigen Sicherheitsbestimmungen (Sicherheitsstufe BSL3) durchgeführt werden.

Ein bisher nicht gelöstes Problem ist der Vergleich des Virustyps aus der akuten Phase der Infektion mit der dominanten Antikörper-vermittelten Neutralisation (Neutralisationsprävalenz). Bisher wurde der Dengue-Serotyp in Studien meist durch RT-PCR oder Sequenzierung bestimmt und daraus geschlussfolgert, dass die Immunantwort auch gegen diesen Virustyp dominant sein muss. Wurde im umgekehrten Fall die Neutralisationsprävalenz bestimmt, wurde davon ausgegangen, dass auch der entsprechende DENV-Serotyp die Infektion ausgelöst haben musste.

1.6 Rekombinante Denguevirus-Partikel

Wie bei vielen anderen Viren bilden auch die Strukturproteine von DENV virusartige Partikel (*virus-like particles*, VLPs). Dengue-VLPs sind infektiöse Partikel ohne ein entsprechendes virales Genom. Tragen die entsprechenden *envelope*-Proteine Mutationen oder fehlen ganz, so können VLPs auch nicht-infektiös sein. Bei VLPs unterschiedet man zwischen Partikeln, die durch ein virales Nukleokapsid gebildet werden, und umhüllten VLPs, bei denen virale Hüllproteine in einer Lipidmembran eingelagert sind.⁹⁵ Bei beiden Partikelarten führt der Eintritt in eine Zelle nicht zu einer Vermehrung des Virus, da kein virales Genom vorhanden ist. Viele virale Strukturproteine bilden spontan VLPs, die der sphärischen Struktur der natürlichen Viruspartikel sehr ähnlich sind.^{96,97} Solche Partikel können zum Teil auch starke Immunreaktionen hervorrufen, weshalb sie als Impfstoffkandidaten in Frage kommen.

Die DENV-Strukturproteine C, prM und E können unterschiedliche Arten von Partikeln bilden: Nukleokapsid-ähnliche Partikel (NLPs), prM/E VLPs und chimäre VLPs. NLPs formen sich bei der Expression des DENV-C-Proteins z.B. in *Escherichia coli* und induzieren in Mäusen eine schützende Immunantwort gegen das homologe DENV.^{98,99} Für VLPs, die welche DENV-Proteine prM und E auf ihrer Oberfläche tragen, gibt es verschiedene Expressionsysteme. Möglich ist die Herstellung in Pichia pastoris ¹⁰⁰⁻¹⁰³ sowie in eukaryotischen Zellen.^{104–106} Beide Arten der prM/E-Partikel sind hoch immunogen und können sowohl eine effektive humorale wie zelluläre Immunantwort induzieren. Diese Expressionssysteme werden auch für die Erzeugung von chimären VLPs eingesetzt.^{107–109} Auch für chimäre VLPs konnte die Immunogenität im Mausmodell erfolgreich nachgewiesen werden. Zusätzlich zu Partikeln ohne virales Genom (VLPs) gibt es pseudotypisierte Partikel. Dabei beschreibt der Begriff Pseudotypisierung den Austausch der viralen Hüllproteine durch das envelope eines anderen Virus und ist für viele behüllte Viren beschrieben. So existieren verschiedene lentivirale Vektoren zur Erzeugung von pseudotypisierten Partikeln des Humanen Immundefizienz-Virus Typ-1 (HIV-1). Dabei können Eigenschaften wie z.B. ein veränderter Tropismus, eine gesteigerte oder verminderte Infektiosität oder der Einfluss der N-Glykosylierung von verschiedensten HIV-1 envelope-Proteinen untersucht werden. Solche Partikel eigenen sich auch für Neutralisations- und Infektionsexperimente. Eine besondere Eigenschaft von pseudotypisierten Viruspartikeln ist, dass sie nicht die vollständige genetische Information für die Vermehrung von infektiösen Viruspartikeln besitzen. Sie infizieren Zellen, können aber nach Viruseintritt keine neuen infektiösen Partikel ausbilden. Dies wird meist durch Deletion der Hüllproteine erreicht. Diese Art von Infektionsexperiment wird auch als single-round infection bezeichnet. Wenn die Pseudotyp-Vektoren zusätzlich ein Reportergen wie z.B. für Luciferase oder GFP (green fluorescence protein) tragen, kann das Infektionsereignis in den einzelnen Zellen leicht detektiert und quantifiziert werden. Dadurch sind retrovirale Vektoren für die Bildung von Pseudotypen besonders geeignet (Abb. 7).

In der Gruppe der Lentiviren gibt es eine Vielzahl pseudotypisierter Partikel z.B. gemischte HIV-1--HIV-1-, SIV--HIV-1- oder auch HIV-1--HIV-2-Kombinationen. Dabei beinhalten die Vektoren vollständige virale Genome, die *envelope* deletiert sind (*env*⁻). Wird das *envelope*-Protein in *trans* exprimiert, bilden sich infektiöse virale Partikel, die ein Hüllprotein tragen (*env*⁺), die aber weiterhin ein defektes Genom besitzen (*env*⁻). Dies ist die molekularbiologische Grundlage für eine *single-round infection*, bei der nur

der Viruseintritt erfolgen kann aber keine weitere Virusvermehrung. Neben Kombinationen von Retroviren mit verschiedenen retroviralen Hüllproteinen gibt es auch Kombinationen von HIV-1-artigen Partikeln, die Hüllproteine von Hanta, VSV oder Dengueviren tragen.¹¹⁰ Dadurch, dass diese lentiviralen Genome keine Hüllproteine kodieren, aber Reportergene (wie. z.B. Luciferase) besitzen, eignen sie sich besonders gut für Untersuchungen des Mechanismus der viralen Infektion.¹¹¹ Da pseudotypisierte Viruspartikel die natürliche Virionstruktur nachahmen, kommen sie auch als potentielle Impfstoffkandidaten in Frage. Bisher wurde gezeigt, dass rekombinante DENV prM/E-VLPs ähnliche Antikörper und eine vergleichbare Antikörper-abhängige Neutralisation wie inaktivierte, natürliche Dengeviren hervorrufen.¹¹² Solche VLPs stellen nicht nur potentielle Impfstoffkandidaten dar, sondern können auch in der Diagnostik verwendet werden, da sie die DENV-Antigene in einer Konformation exponieren, die denen auf natürlichen Virionen sehr ähnelt. So werden VLPs z.B. als Antigene im ELISA eingesetzt ¹⁰⁵ oder zur Charakterisierung von humanen monoklonalen Antikörpern verwendet.¹¹³

Bisher ungelöst ist das Problem der Darstellung viraler Dengue-Pseudotypen basierend auf einem lentiviralen Vektorsystem. Die trans-Expression von Dengue-Hüllproteinen (prM und E) würde nicht nur infektiöse, pseudotypisierte Partikel produzieren, sondern auch Partikel, die ein virales Genom mit einem Reportergen besitzen. Dadurch würden sich single-round infection-Experimente sehr leicht durchführen und quantifizieren lassen. Gleichzeitig könnten verschiedenste Denge-E-Proteine auf ihre Funktion untersucht werden. Heute werden mit den DNA-Techniken mehr Sequenzen von den weltweit vorkommenden Viren bestimmt, als Viren tatsächlich dauerhaft für Forschungszwecke kultiviert werden. Daher ist es auf lange Sicht wichtig ein System zu entwickeln, um rekombinante Dengueviren oder entsprechende Denguevirus-Pseudotypen zu erzeugen. Dies würde die Untersuchung der verschiedensten Varianten von prM und E ermöglichen. Die bisherigen Arbeiten zur Herstellung von DEN-VLPs basierten auf der erfolgreichen Expression der Oberflächenproteine von JEV und WNV in eukaryotischen Zellen.^{114,115} Durch Ko-Transfektion mit einem retroviralen HIV-1-Vektor, in dem das env-Gen deletiert wurde, konnten so auch pseudotypisierte Partikel produziert werden. Auch für DENV existieren Daten zur Erzeugung von Dengue-Pseudotypen basierend auf einem lentiviralen System.^{108,110}

A Virusartige Partikel



prM/E pseudotypisiertes HIV-1-Partikel



Abb. 7 Struktur rekombinanter Viruspartikel. (A) Virusartige Partikel (virus-like particles, VLPs) von behüllten Viren sind sphärische Partikel ohne Genom, die von außen wie ein intaktes Virus erscheinen. Sie werden von Zellen freigesetzt, welche die viralen DENV-Proteine prM und E exprimieren. VLPs können auch virales Kapsid oder Hüllproteine von anderen Viren (chimäre VLPs) enthalten. (B) DENV-Pseudotypisierte HIV-1-Partikel sind vollständige Viruspartikel mit einem HIV-1-Kapsid und -Genom, bei denen die HIV-1-Hüllproteine gegen DENV-Hüllproteine ausgetauscht wurden. Das virale Genom wird in infizierte Zellen übertragen, dort aber wird die Virusvermehrung durch Mutationen im viralen Genom unterbunden. Die Expression von Luciferase (Luc⁺) als Reportergen ermöglicht eine einfache Quantifizierung des Viruseintritts in permissive Zellen.

B

1.7 Ziel der Arbeit

Flaviviren sind aufgrund ihrer Vielfalt und ihrem einfachen Übertragungsweg eine weltweite Bedrohung. Die Variation der Dengue-Hüllproteine verursacht eine komplexe Immunantwort, wobei der Zusammenhang zwischen humoraler Immunantwort und Virusvariation noch offene Fragen bereithält. Die Virusvariation schränkt zusätzlich die klassischen virologischen Untersuchungsverfahren ein, so dass es von Vorteil wäre ein leicht veränderbares, rekombinantes Dengue-System zu besitzen.

Erstes Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der Dengue-spezifischen, neutralisierenden Antikörperantwort in humanen Patientenseren sowohl mit serologischen als auch virologischen Methoden, und der Vergleich der Ergebnisse beider Methoden. Die Bestimmung der Serotyp-spezifischen Neutralisation in humanen Serumproben sollte vorwiegend mit einer von der WHO empfohlenen Gruppe von Dengueviren durchgeführt werden. Ziel war es einen Denguevirus-Neutralisationstest zu entwickeln der sich nicht nur für die Dengue-WHO-Isolate sondern für alle Dengueviren, speziell für neuere Virusisolate aus Patienten, eignet. Für die Bestimmung der maximalen Neutralisation gegen DENV1-4 (Neutralisationsprävalenz) sollten Seren aus Vietnam, Kambodscha, Kolumbien und Burkina Faso getestet werden. Die Neutralisationsprävalenz sollte, zusätzlich zu den WHO-Standardviren, mit Virusisolaten aus endemischen Gebieten bestimmt werden.

Zweites Ziel der Arbeit war die Konstruktion von DNA-Vektoren zur Herstellung von Dengue-pseudotypisierten Viruspartikeln. Das System sollte auf einem lentiviralen, env-deletierten HIV-1-Vektorsystem aufgebaut werden. Zuerst sollten Expressionsvektoren für die DENV-Hüllproteine prM und E aller vier Dengue-Serotypen hergestellt werden. Die Expression der DENV-Proteine sollte optimiert werden. Damit Infektionsstudien unter Verwendung Dengue-pseudotypisierter Viruspartikel quantifiziert werden können, sollte ein HIV-1-basiertes Vektorsystem mit einem Reportergen angewendet werden, das sich zur Untersuchung von DENV-E-Varianten im Speziellen und Flavivirus-Hüllproteinen im Allgemeinen eignet.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien und Materialien

2.1.1 Geräte und Materialien

Gerät/Material	Bezeichnung	Hersteller
Filtrationseinheit für	Amicon Ultra –4 (10.000 NMWL)	Merck Millipore
Zentrifugen		
Horizontal- SubCell Model 96 Cell		Biorad
Elektrophoresekammer		
Inkubationswannen	30er wells	Viramed
Inkubatoren	Heraeus BBD 220	Thermo Electron
		Corporation
	CB 150E2	Binder
Küvetten	Halbmikroküvetten	Lab Logistic Group
	Präzisionsmikroküvetten	Hellma
Mikroskope	Diavert	Leitz
	EVOS FL Auto	life technologies
Objektträger mit 12	Diagnostic microscope slides	ThermoScientific
Kavitäten	12well 5mm numbered	
PCR-Cycler	TProfessional Basic Gradient	Biometra
	Mastercycler gradient	Eppendorf
Schüttelinkubator	3031	GFL
SDS-PAGE-Gelkammer	Mini-Protean II Cell Gel System	Biorad
Sterilwerkbänke	BSB4	Gelaire
	Sterilgard III Advance	The Baker Company
Thermocycler	Thermomixer comfort	Eppendorf
UV/Vis-Spektrometer	UV-160A	Shimadzu
Vertikal-	Mini-PROTEAN	Biorad
Elektrophoresekammer		
Vortexer	D-6012	NeoLab
	VF2	Janke & Kunkel IKA
		Labortechnik
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 8R	ThermoScientific
	Biofuge pico	Heraeus
	Centriguge 5810R	Eppendorf
	Megafuge 3.0 R	Heraeus
	Avanti J-26 XP	Beckman Coulter

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
2-Propanol	Carl Roth
4-Chloro-1-naphtol	Carl Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese)	Carl Roth
Agarose	Biozym
Ampicillin (tetra-Natriumsalz)	Roth
APS	Carl Roth
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Coomassie Brilliant Blau G250	Carl Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth
DMEM	PanBiotech
DTT	Merck
EDTA	Carl Roth
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Formaldehyd	Carl Roth
Fötales Rinderserum (FCS)	PanBiotech
Glutamin	PanBiotech
Glycin	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kalium-di-hydrogenphosphat	Carl Roth
Kristallviolett	Carl Roth
Magermilchpulver	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydroxid	Merck
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Polyethylengycol 6000	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
Schneider's Drosophila Medium	PanBiotech
SDS (Pellets)	Carl Roth
TEMED	Carl Roth
TMB Immunoblot Substrat	Mikrogen
Tris	Carl Roth
Tween 20	Carl Roth
Wasserstoffperoxid	Merck

Die Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS findet sich in Anhang 9.5.

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Herkunftsorganismus	Hersteller
anti-DENV1	Maus	IPC*
anti-DENV2	Maus	IPC*
anti-DENV3	Maus	IPC*
anti-DENV4	Maus	IPC*
anti-JEV	Maus	IPC*
anti-human IgG FITC-Konjugat	Ziege	Sifin
anti-human IgG HRP-Konjugat	Ziege	Biorad
anti-human IgM HRP-Konjugat	Ziege	Biorad
anti-Maus IgG FITC-Konjugat	Ziege	Sifin
anti-Maus IgG HRP-Konjugat	Ziege	Biorad

* Die DENV Serotyp-spezifischen Antikörper wurden freundlicherweise vom Pasteur-Institut Kambodscha (IPC) zur Verfügung gestellt.¹¹⁶

2.1.4 Kits

Kitbezeichnung	Hersteller
DNA Concentrator Kit	Zymo Research
GeneJET PCR Cloning Kit	Thermo Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
GeneJET Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Scientific
Gibson Assembly Kit	New England Biolabs
Luciferase Assay System	Promega
Phusion High Fidelity PCR Kit	New England Biolabs
QIAmp Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAmp Viral RNA Mini Kit	Qiagen
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific
Screenfect A	Genaxxon

2.1.5 Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller
Accutase	-	PanBio
EcoRV-Restriktionsendonuklease	20 U/µl	New England Biolabs
KpnI-Restriktionsendonuklease	20 U/µl	New England Biolabs
NotI-Restriktionsendonuklease	20 U/µl	New England Biolabs
DNA-Polymerase Phusion	2 U/μl	New England Biolabs
PvuII-Restriktionsendonuklease	20 U/µl	New England Biolabs
Reverse Transkriptase RevertAid H Minus	200 U/µl	Thermo Scientific
T4-DNA-Ligase	5 Weiss U/μl	Fermentas
Trypsin	-	PanBio

2.1.6 Molekulargewichtsstandards

Standard	Hersteller
Generuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
Generuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
Pageruler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific

2.1.7 Zellen

Zelllinie	Orgasismus	ATCC	Herkunft
C6/36	Aedes albopictus	CRL-1660	Friedrich-Löffler-Institut,
			Riems-Greifswald
COS-1	Cercopithecus aethiops	CRL-1650	Friedrich-Löffler-Institut,
			Riems-Greifswald
HEK-293T	Homo sapiens	CRL-11268	Friedrich-Löffler-Institut,
			Riems-Greifswald
U87 CXCR4	Homo sapiens	-	Bernhard-Nocht-Institut für
			Tropenmedizin, Hamburg
VeroB4	Cercopithecus aethiops	CCL-81	Deutsche Sammlung von
			Mikroorganismen und
			Zellkulturen, Braunschweig

2.1.8 Virus-Isolate

Virus	Isolat	GenBankNummer
DENV1	16007 *	AF180817
	Hawaii *	AB609588
	KH/BID-V2004/2006 §	FJ639687
	KH/BID-V2011/2007 §	FJ639693
DENV2	16681 *	U87411
	ThNH81/93 *	AF169688
	D2KH/06PHP §	-
	KH/BID-V2066/2007 [§]	FJ639717
DENV3	H87 *	M93130
	KH/BID-V2058/2005 §	GQ868628
	KH/BID-V2051/2007 §	FJ639713
DENV4	H241 *	S66064
	D4KH/98PHP [§]	-
	D4KH/07 [§]	-

* WHO-Referenz-Isolate

§ Isolate des Pasteur-Instituts Kambodscha (IPC)

Herkunft	Beschreibung	Zur Verfügung gestellt von
Vietnam	79 Patientenseren aus der akuten	Dr. Stefan Schilling ^{117,118}
	Infektionsphase und frühen	
	Konvaleszenzphase	
Kambodscha	20 Patientenseren aus der frühen	IPC ^{116,119}
	Konvaleszenzphase und 80	
	Patientenseren jeweils aus akuter und	
	früher Konvaleszenzphase	
Kolumbien	43 Patientenseren der akuten	Dr. Simone Kann
	Infektionsphase und 12 Patientenseren	
	der Konvaleszenzphase	
Burkina Faso	20 Patientenseren mit unbekanntem	Dr. Thomas Jänisch ¹²⁰
	Infektions- und Immunstatus	
Deutschland	5 Patientenseren von Reiserückkehrern	Dr. Michael Schreiber
	mit bestätigter DENV-Infektion	

2.1.9 Seren

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation viraler RNA

Die Isolation viraler RNA erfolgte mit dem *QIAamp Viral RNA Mini* Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aus VeroB4-Zellkulturüberständen, die mit dem jeweiligen Virus infiziert wurden (2.4.2.1).

2.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* Kit (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Reaktion wurden 5 µl der zuvor isolierten Virus-RNA verwendet (2.2.1). Die Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe der im Kit enthaltenen, randomisierten Hexamer-Oligonukleotiden.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung spezifischer Gensegmente erfolgte mit dem *Phusion High Fidelity PCR* Kit (NEB). Die benötigten Oligonukleotide wurden durch die Firma Metabion synthetisiert (Anhang 9.1). Die Etablierung der jeweiligen PCR erfolgte stets mit der optimierten *annealing*-Temperatur. Die optimale *annealing*-Temperatur wurde durch eine Gradienten-PCR ermittelt, die jeweils 10 K ober- und unterhalb der mittleren, theoretischen Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide erfasste. Der Reaktionsansatz war für alle PCRs identisch (Tab. 1), das Amplifikationsprogramm wurde an die optimale *annealing*-Temperatur der Oligonukleotide und die Größe des zu amplizierenden Fragments angepasst (Tab. 2).

Reaktionsansatz	
5x GC-Puffer	12 µl
<i>forward</i> Primer [10 pmol/μl]	3 μl
<i>reverse</i> Primer [10 pmol/µl]	3 μl
dNTPs [10 mM]	1,2 μl
DNA template	1 μl
Phusion DNA-Polymerase [2U/µl]	0,6 μl
ddH ₂ O	39,2 μl

Tab. 2	Standard-PCR-Programm
--------	-----------------------

Programm			
98°C	30 sec	-	
98°C	10 sec		
Oligonukleotid-spezifisch	30 sec		x Zyklen
72°C	30 sec/kb		
72°C	5 min		
12°C	∞	_	

2.2.3.1 Amplifikation von DENV prM/E-Fragmenten

Die Sequenzen für prM/E der vier DENV-Serotypen wurden mit Hilfe von Serotyp-spezifischen Primerpaaren (d1Kpnl & d1Notl, d2Kpnl & d2Notl, d3Kpnl & d3Notl, d4Kpnl & d4Notl) amplifiziert (Anhang 9.1). Die entstandenen Fragmente umfassten die vollständigen Gene für prM und E sowie das im 3'-Ende des C-Gens kodierte Signalpeptid. Als *templates* für die Amplifikation wurden die jeweiligen cDNAs der DENV-Serotypen verwendet (2.2.2). Jedes Oligonukleotid-Paar hatte dabei eine spezifische *annealing*-Temperatur (Tab. 3). Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen. Anschließend wurden die Fragmente in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.4) und die entsprechenden Banden isoliert (2.2.10), um die DNA-Fragmente zu sequenzieren (2.2.11) und in den Expressionvektor pcHA zu klonieren (2.2.5).

DENV-Serotyp	DENV-Isolat	annealing-Temperatur
DENV1	16007	58°C
DENV2	ThNH81/93	65°C
DENV3	H87	55°C
DENV4	H241	56°C

Tab. 3Annealing-Temperaturen der prM/E-Gene

2.2.3.2 Serotypen-PCR

Die Identifizierung des jeweiligen DENV-Serotyps in den für die Neutralisationstests verwendeten Zellkulturüberständen (2.4.2.1), erfolgte mit Hilfe einer PCR und Serotyp-spezifischen Primerpaaren (DENV1for & DENV1rev, DENV2for & DENV2rev, DENV3for & DENV3rev, DENV4for & DENV4rev; Anhang 9.1).¹²¹ Die amplifizierten Fragmente sind in hoch konservierten Gensegmenten lokalisiert, die für jeden Serotyp charakteristisch sind. Für DENV1 befindet sich diese Sequenz im NS1-Gen, für DENV2-4 in verschiedenen Regionen des Gens, das für das E-Protein kodiert. Als *template* wurde jeweils cDNA verwendet die zuvor aus viraler RNA synthetisiert worden ist (2.2.2). Die *annealing*-Temperatur betrug für alle eingesetzten, Serotyp-spezifischen Primerpaare 55°C. Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen. Die Analyse der entstandenen Fragmente erfolgte mittels Auftrennung im 1%igen Agarosegels (2.2.4).

2.2.3.3 Assembly-PCR und Gibson-Assembly

Für die Herstellung eines chimären Expressionkonstruktes bestehend aus prM/E von DENV2 und Signalsequenz sowie *stem/anchor*-Bereich von JEV war zunächst die Generierung der JEV-Fragmente nötig. Diese wurden durch eine zweistufige Assembly-PCR ^{122,123} mit Hilfe von überlappenden Oligonukleotiden (DENV2JEVSS_01 bis 04 für die JEV-Signalsequenz, DENV2JEVSA_01 bis 08 für die JEV-*stem/anchor*-Sequenz; Oligonukleotide im Anhang 9.1) hergestellt. Die *assembly-*Oligonukleotide wurden in einer ersten PCR-Reaktion zu einem zusammenhängenden DNA-Fragment verknüpft (Tab. 4). Die PCR-Reaktion wurde bei einer *annealing-*Temperatur von 55°C wie oben beschrieben (Tab. 2) durchgeführt.
In der zweiten PCR-Reaktion (durchgeführt wie in 2.2.3) dienten jeweils die amplifizierten Fragmente der ersten PCR-Reaktion (mit den Oligonukleotiden DENV2JEVSS_A & B bzw. DENV2JEVSA_A & B) sowie der pcHAD2-Vektor (mit den Oligonukleotiden DENV2JEME_forward & reverse) als *template* für die Amplifizierung. Für diese Reaktion wurden Oligonukleotide verwendet, die zusätzlich komplementäre Überhänge an die Enden der Fragmente anknüpften. Parallel wurde 1 µg des pcHA-Vektors mit 20 U der Restriktionsendonuklease *Kpn*I bei 37°C geschnitten. Anschließend erfolgte die Auftrennung aller Fragmente der zweiten PCR sowie des geschnittenen pcHA-Vektor im 1 %igen Agarosegel (2.2.9), um die Konzentrationen aller DNA-Fragmente abzuschätzen. Da alle vier Fragmente komplementäre Überhänge trugen, erfolgte die Verknüpfung der DNA-Abschnitte mittels Gibson-*assembly* ^{124,125} für eine Stunde bei 50°C. Hierfür wurde das *Gibson Assembly Kit* (NEB) nach Herstellerangaben verwendet (Tab. 5). Nach Transformation des Reaktionsansatzes in *E. coli* DH5α (2.2.6) und anschließende Plasmidpräparation (2.2.8) einiger Kolonien, wurde die gewünschte Sequenz mittels Sequenzierung (2.2.11) bestätigt.

Reaktionsansatz	JEV-Signal-	JEV-stem/anchor-
	Sequenz	Sequenz
5x GC-Puffer	10 µl	10 µl
Oligonukleotide [je 0,25 ng]	4 x 2,5 μl	8 x 2,5 μl
dNTPs [10 mM]	1 μl	1 μl
Phusion DNA-Polymerase [2 U/µl]	0,5 μl	0,5 μl
ddH ₂ O	28,5 μl	18,5 μl

Tab. 4 Reaktionsansatz *assembly*-PCR

Tab. 5 Reaktionsansatz Gibson-assembly

Reaktionsansatz	
Gibson-assembly Mastermix	10 µl
рсНА	50 ng
JEV-Signalsequenz	100 ng
DENV2-prM/E-Sequenz	100 ng
JEV-stem/anchor-Sequenz	100 ng

2.2.4 Herstellung des Expressionsvektors pcHA

Der Vektor pcDNA3.1/Hygro(+) (Plasmidkarte in Anhang 9.2.1) wurde mit PvuII geschnitten und anschließend mittels T4-Ligase (Fermentas) ligiert. Dadurch wurde ein 2166 bp-Fragment entfernt. Der resultierende Vektor wurde im weiteren Verlauf рсНА Der *Pvu*II-Restriktionsverdau erfolgte genannt. mit 1 μg pcDNA3.1/Hygro(+)-Vektor und 5 U PvuII in Puffer 4 nach den Angaben des Herstellers (NEB) für eine Stunde bei 37°C. Anschließend wurde die Restriktionsendonuklease für 20 Minuten bei 80°C inaktiviert. Die Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.9), die größere DNA-Bande (3263 bp) aus dem Gel ausgeschnitten und in 50µl extrahiert (2.2.10). Die Ligation von 10 µl dieses DNA-Fragmentes erfolgte mit T4-Ligase (1 Weiss-Unit) ü.N. bei 8°C. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz in 100 μl E. coli DH5α (2.2.7) transformiert (2.2.6). Einige Kolonien wurden nach ü.N.-Inkubation von Ampicillin-YT-Agarplatten gepickt und in Ampicillin-dYT-Medium angezogen. Die Plasmid-DNA wurde mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (NEB) isoliert. Die erhaltenen Plasmide wurden durch 10 U EcoRV-Restriktionsendonuklease eine Stunde bei 37°C geschnitten. Geschnittene und ungeschnittene Plasmide wurden zur Analyse in einem 1 % igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.9). Vektoren, die der kalkulierten Größe (3263 kb) entsprachen, wurden mittels Sequenzierung überprüft (2.2.11).

2.2.5 Klonierung von prM/E-Expressionsvektoren

Die amplifizierten prM/E-Sequenzen der jeweiligen DENV-Serotypen (2.2.3.1) wurden zunächst mit dem *GeneJET PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific) in den Vektor pJET2.1 nach Herstellerangaben kloniert und anschließend in *E. coli* DH5α transformiert (2.2.6). Anschließend wurden einzelne Kolonien von Ampicillin-YT-Agarplatten gepickt und in Ampicillin-dYT-Medium angezogen. Die Plasmid-DNA wurde mittels *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) isoliert (2.2.8) und ihre Identität durch Sequenzierung überprüft (2.2.11). Plasmide, welche die entsprechende Sequenz enthielten, wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Kpn*I und *Not*I (je 20 U) bei 37°C zweifach geschnitten.

Der Restriktionsdoppelverdau erfolgte ebenso mit 2 µg des pcHA-Vektors. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe des *DNA Concentrator Kits* (Zymo Research) gereinigt und in einem 1 %igen Agarosegel (2.2.9) aufgetragen, um ihre Konzentrationen zu bestimmen. Anschließend wurde jeweils 1 µg pcHA-Vektor mit dem dreifachen molaren Überschuss an prM/E-Fragment durch T4-Ligase (0,5 Weiss-Einheiten) bei 8°C ü.N. ligiert. Der gesamte Ligationsansatz wurde in 100 µl *E. coli* DH5 α (2.2.7) transformiert (2.2.6). Einzelkolonien wurden wie oben beschrieben angezogen, die Plasmide isoliert (2.2.8) und auf ihre Sequenz überprüft (2.2.11).

2.2.6 Transformation von DNA in chemokompetente *E.coli*-Zellen

Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock bei 42°C für 90 Sekunden in chemokompetente *E. coli* DH5 α eingebracht.¹²⁶

2.2.7 Herstellung chemokompetenter *E.coli*-Zellen

Zur Aufnahme von DNA fähige, d.h. kompetente, *Escherichia coli*-Zellen wurden durch die Behandlung mit Calciumchlorid hergestellt.¹²⁶

2.2.8 Plasmidpräparation

Die Herstellung von Plasmid-DNA erfolgte in *E. coli* DH5α. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit dem *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* bzw. *GeneJET Plasmid Maxiprep Kit* (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der isolierten Plasmide wurde photometrisch bestimmt.¹²⁶

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte in Horizontal-Elektrophoresekammern (Bio-Rad) bei 100 V für 45-50 Minuten in 1 %igen Agarosegelen.¹²⁶

2.2.10 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Amplifizierte DNA wurde in einem präparativen 1 % igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.9) und die Bande mit der erwarteten Größe aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus diesem Gelstück erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction* Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 μ l ddH₂O.

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firma LGC Genomics mit einem automatisierten Verfahren nach Sanger. Für die Sequenzierung von Plasmiden wurden jeweils 2,4 µg DNA eingesendet und LGC-Oligonukleotide (CMV-F, pcDNA3.1-R) verwendet. Für die Sequenzierung von PCR-Fragmenten wurden jeweils 10 µl DNA mit 20 pmol Oligonukleotid zur Sequenzierung eingesendet. Die ermittelten Sequenzen wurde entweder mit dem Programm Clustal- W¹²⁷ mit der erwarteten Sequenz verglichen oder unbekannte Sequenzen mittels BLAST-Analyse identifiziert.¹²⁸

2.3 Proteinbiologische und -analytische Methoden

2.3.1 Herstellung und Reinigung rekombinanter Antigene

Die rekombinanten ED3-Antigene wurden von K. Krausz, K. Franzke, J. Hülsemann und L. Klepsch hergestellt und gereinigt.¹²⁹ Die rekombinanten Antigene waren N-terminal an das Maltose-bindende Protein (MBP) fusioniert und wurden in *E.coli* BL21 (DE3) exprimiert. Die anschließende Reinigung erfolgte über Maltose-Affinitätschromatografie und Größenausschlusschromatografie.

2.3.2 Immuno-Dot-Blot

Patientenseren wurden am Vortag 1:100 in 1 ml Milchpuffer (versetzt mit MBP-Protein, 75 μg/ml) verdünnt und über Nacht bei 8°C inkubiert. Die gereinigten, rekombinanten Antigene (2.3.1) wurden in eine 384*well*-Mikrotiterplatte vorgelegt und dann mit einem selbst hergestellten *Printer*, bestehend aus 24 Stahlkugeln (2 mm Ø), auf Nitrocellulosestreifen (3 mm x 11,5 mm) übertragen. Nach dem Trocknen wurden die Streifen in Inkubationswannen eine Stunde mit Milchpuffer inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den verdünnten Patientenseren. Nach zwei Stunden wurden die Patientenseren von den Nitrocellulosestreifen abgenommen und die Streifen drei Mal für je fünf Minuten mit PBST gewaschen. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit dem anti-humanen HRP-konjugierten Detektionsantikörper (1:750 verdünnt in Milchpuffer). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBST und anschließend mit PBS erfolgte die Entwicklung der Streifen mit einer 4-Chloro-1-naphthol-Färbelösung. Die Farbreaktion wurde durch Entfernen der Lösung und mehrmaliges Waschen der Streifen mit ddH₂O abgestoppt.

Puffer/Reaktionslösung	Zusammensetzung			
Milchpuffer	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS			
PBS ¹²⁶	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ ,			
	1,8 mM KH ₂ PO ₄			
PBST	PBS mit 0.1 % (v/v) Tween 20			
4-Chloro-1-naphthol-	3 mg/ml 4-Chloro-1-naphthol, 20% Methanol,			
Färbelösung	0,0005 % H ₂ O ₂ , PBS			

Tab. 6 Puffer und Reagenzien für den Immuno-Dot-Blot

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur eukarytischer Zellen

Die Anzucht aller Säugetierzelllinien erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ in supplementiertem DMEM (DMEM suppl., Tab. 7). Die Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen (2-3 pro Woche) rekultiviert, indem die adhärenten Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst wurden. Die Zellsuspension wurde in DMEM suppl. aufgenommen und für die Rekultivierung gleichmäßig aufgeteilt.

Die Anzucht der Mosquitozelllinie C6/36 erfolgte bei Raumtemperatur in supplementiertem *Schneider's Drosophila*-Medium (Tab. 7). Die Rekultivierung wurde in regelmäßigen Abständen (3 pro Woche) durchgeführt, indem die semi-adhärenten Zellen mit *Schneider's Drosophila*-Medium suppl. abspült und wieder gleichmäßig aufgeteilt wurden.

Medium	Zusammensetzung
DMEM suppl.	DMEM mit 10 % FCS (Panbio)
	2 mM Glutamin (Panbio)
	5000 U/ml Penicillin (Gibco)
	5000 μg/ml Streptomycin (Gibco)
Schneider's Drosophila Medium	Schneider's Drosophila Medium mit
suppl.	10 % FCS Gold (PAA)
	2 mM Glutamin (Panbio)
	1 mM Pyruvat (Panbio)
	0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren (PAA)
	5000 U/ml Penicillin (Gibco)
	5000 μg/ml Streptomycin (Gibco)

Tab. 7	Medien	für die	Zellkultur

2.4.2 Herstellung und Nachweis DENV-pseudotypisierter HIV-1-Partikel

2.4.2.1 Liposomale Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen

Die Herstellung der pseudotypisierten Partikel wurde durch transiente DNA-Transfektion in verschiedenen Zelllinien getestet. Die Transfektion von Plasmid-DNA erfolgte jeweils in *6well*-Zellkulturplatten. Für die liposomale Transfektion wurde *Screenfect A* (Genaxxon) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Es wurde sowohl die Transfektion in Zellsuspension als auch mit am Vortag ausgesäten, adhärenten Zellen durchgeführt. Die Transfektion erfolgte in DMEM suppl. (Tab. 7, mit 5 % FCS). In jede Kavität wurden $1,5 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Die Transfektion erfolgte jeweils mit einer Mischung aus 5-10 µl *Screenfect A* pro 1 µg Plasmid-DNA (d.h. bei Doppeltransfektion 20 µl *Screenfect A* und je 1 µg Plasmid-DNA). Überstände und Zellen wurden nach 2-3 Tagen analysiert.

Die adhärenten Zellen wurden direkt mit 250 μ l Lysepuffer/Kavität versetzt (Lysepuffer aus Luciferase Assays System; Promega) und mittels Luciferase-Assay analysiert (2.4.2.2). Wenn die transfizierten Zellen zusätzlich zum Luciferase-Assay auch mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht werden sollten, wurden diese zunächst mit 500 µl Accutase/Kavität abgelöst, mit zusätzlichen 500 µl DMEM suppl./Kavität suspendiert und durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 5 Minuten präzipitiert. Die Zellen wurden anschließend in 50 µl PBS resuspendiert und für die Immunfluoreszenzfärbung auf Objektträger mit 12 Kavitäten getropft (2.4.5.3). Die verbliebene Zellsuspension wurde mit 50 µl Lysepuffer versetzt und bis zur Verwendung im Luciferase-Assay bei -20°C gelagert.

2.4.2.2 Luciferase-Assay

Die Transfektionseffizient von Plasmiden, die für das Luciferase-Enzym kodieren, wurde mittels *Luciferase Assay System* (Promega) ermittelt. Hierfür wurden transfizierte Zellen gemäß den Herstellerangaben lysiert und bei -20°C gelagert. Für die Messung wurden jeweils 50 µl LAR-Substrat mit 10 µl lysierte Zellen (2.4.2.1) durch vortexen gemischt und anschließend direkt im Luminometer vermessen. Das von der Luciferase umgesetzte, oxidierte Substrat wurde in Form von relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) gemessen.

2.4.3 Kultivierung von Dengueviren

VeroB4-Zellen wurden in 75 cm²-Flaschen bis zu einer Konfluenz von 80-90% herangezogen (2.4.1) und mit dem entsprechenden Virus (MOI 0,01–0,1) infiziert. Nach Eintreten eines deutlich sichtbaren zytopathischen Effektes (CPE; 4-6 Tage p.i.) wurde der Überstand durch Zentrifugation bei 1500 rpm, 8°C und 10 min von Zelltrümmern getrennt. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -70°C gelagert, oder durch Fällung mit PEG 6000 (Endkonzentration 8 % v/v) aufkonzentriert.¹³⁰ Das Präzipitat wurde in DMEM resuspendiert und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

2.4.4 Quantifizierung der Virusmengen

2.4.4.1 Plaque-Assay

Für die quantitative Virus-Analyse mittels Plaque-Assay wurden VeroB4-Zellen in 24*well*-Zellkulturplatten mit jeweils $5 \cdot 10^4$ Zellen/Kavität ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit 500 µl/Kavität Virusverdünnung in DMEM beginnend mit 1:10 bis 1:20480 (1:2-Verdünnungsreihe). Für die Virusadsorption wurden die Virusverdünnungen für eine Stunde bei 37°C auf den Zellen belassen. Anschließend wurden die Überstände entfernt und durch 1 ml/Kavität Overlaymedium (1 % Methylcellulose in DMEM suppl.) ersetzt. Die Zellkulturplatten wurden für weitere 5-7 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Visualisierung der Infektionsereignisse (Plaques) erfolgte mittels Kristallviolettfärbung (2.4.4.1). Nach dem Färben erfolgte die Auszählung der Plaques, d.h. der nicht-gefärbten, infizierten Zellen und die Berechnung der Anzahl der Infektionsereignisse (*plaque forming units,* pfu) wie folgt:

$$I = \bar{x} \cdot V \cdot 2$$

I = Infektionsereignisse in pfu/ml

 \bar{x} = Mittelwert der ausgezählten Plaques

V = Verdünnungsstufe

2.4.4.2 Foci-Assay

Für die quantitative Virus-Analyse mittels Foci-Assay wurden VeroB4-Zellen in 96*well*-Zellkulturplatten mit jeweils $6 \cdot 10^3$ Zellen/Kavität ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit 100 µl/Kavität Virusverdünnung in DMEM beginnend mit 1:20 bis 1:40960 (1:2-Verdünnungsreihe). Wurden die Virustiter bestimmt, um die Viren anschließend im Neutralisationstest einzusetzen, erfolgte zusätzlich eine einstündige 37°C-Inkubation des Virus vor der Adsorption. Für die Virusadsorption wurden die Virusverdünnungen für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ auf den Zellen belassen. Anschließend wurden die Überstände entfernt und durch 150 µl/Kavität Overlaymedium (0,8 % Methylcellulose in DMEM suppl.) ersetzt. Die Zellkulturplatten wurden für weitere 2-3 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Visualisierung der Infektionsereignisse (Foci) erfolgte mittels Focifärbung (2.4.5.2). Nach der Färbung und dem Auszählen der Foci wurde die Anzahl der Infektionsereignisse, d.h. die *foci forming units* (ffu) wie folgt berechnet: $I = \bar{x} \cdot V \cdot 10$

I = Infektionsereignisse in ffu/ml

- \bar{x} = Mittelwert der ausgezählten Foci
- V = Verdünnungsstufe

2.4.5 Zellfärbemethoden

Für die Quantifizierung von Virusmengen erfolgte entweder die Färbung von nicht-infizierten Zellen (Kristallviolettfärbung 2.4.5.1) oder die Färbung von infizierten Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper (Focifärbung 2.4.4.2). Zusätzlich wurden auch auf Objektträgern fixierte Zellen gefärbt (Immunfluoreszenz-Färbung 2.4.5.3). Dies erfolgte mit transfizierten oder Virus-infizierten Zellen.

2.4.5.1 Kristallviolettfärbung

Durch Färben mit Kristallviolett wurden infizierte von nicht-infizierten Zellen unterschieden. Die Färbung beruhte darauf, dass infizierte Zellen dem zytopathischen Effekt erliegen und deshalb nicht auf der Zellkulturplatte fixiert wurden. Bei der Inkubation mit Kristallviolett wurden deshalb nur nicht-infizierte, auf der Platte fixierte Zellen gefärbt und Infektionsereignisse wurden als ungefärbte Plaques sichtbar. Die Färbung erfolgte nach 5-7-tägiger Inkubation. Die Zellen wurden mit einer 4 %igen Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert und verbliebener Virusüberstand gleichzeitig inaktiviert. Nach 20-minütiger Inkubation wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit 500 µl/Kavität (24*well*-Zellkulturplatten) Kristallviolettlösung für fünf Minuten. Die Färbelösung bestand aus 1 % (w/v) Kristallviolett, 3,7 % (v/v) Formaldehyd, 1 % Methanol und 20 % Ethanol. Nach dem Entfernen der Färbelösung und dem Waschen mit Wasser wurden die Infektionsereignisse ausgezählt.

2.4.5.2 Focifärbung

Die Methode beruhte auf dem direkten Färben infizierter Zellen mit Hilfe Virus-spezifischen, eines primären Antikörpers und einem Meerrettich-Peroxidase-(horse radish peroxidase, HRP) gekoppeltem, sekundären Antikörper. Durch die Zugabe des HRP-Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wurden die infizierten Zellen als Foci sichtbar. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 37°C und 5 % CO2 erfolgte die Virus-Inaktivierung und die gleichzeitige Fixierung der Zellen in den 96well-Zellkulturplatten durch Zugabe von 150 µl/Kavität 3,7 %iges Formaldehyd/PBS. Nach 20-minütiger Inkubation wurde der gesamte Überstand entfernt und die Zellen zweimalig mit 200 µl/Kavität PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der fixierten Zellen durch 50 µl/Kavität 0,5 % Triton/PBS-Lösung für 20 Minuten. Nach erneutem Waschen (2x PBS), erfolgte das Absättigen der Zellen mit 50 µl/Kavität 10 % FCS/PBS für 30 Minuten. Die Zellen wurden danach mit dem jeweiligen DENV-Serotyp-spezifischen Antikörper (2.1.3) detektiert. Die einstündige Inkubation erfolgte mit einer 1:2000 Antikörperverdünnung (in Blocklösung) bei RT. Nach erneutem Waschen (2x PBS), erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei RT mit dem sekundären Antikörper, einem anti-Maus IgG HRP-Konjugat (1:2000 verdünnt in Blocklösung). Vor dem Färben mit dem Substrat wurde nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Durch die Zugabe von je 50 µl/Kavität präzipitierendem TMB-Substrat (Mikrogen) erfolgte die Farbreaktion innerhalb von 10-15 Minuten. Die Überstände wurden entfernt und die gefärbten Foci sofort ausgezählt.

Reaktionslösung	Zusammensetzung
Fixierungs- und Inaktivierungslösung	3,7 % Formaldehyd in PBS
Permeabilisierungslösung	0,5 % Triton X-100 in PBS
Blocklösung	10 % FCS in PBS
Primärer Antikörper	DENV-Serotyp-spezifischer Maus-Antikörper
	(IPC) 1:2000 verdünnt in Blocklösung
Sekundärer Antikörper	anti-Maus IgG-HRP-Konjugat (Biorad)
	1:2000 verdünnt in Blocklösung

Tab. 8 Lösungen für die Focifärbung

2.4.5.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde zum Nachweis erfolgreicher Transfektion oder Infektion genutzt. Hierfür wurden adhärente, transfizierte oder infizierte Zellen mit Accutase abgelöst, mit DMEM suppl. resuspendiert und durch Zentrifugation bei 8000 rpm für zehn Minuten präzipitiert. Die so erhaltenen Zellen wurden in 50 µl PBS resuspendiert und auf Objektträger mit 12 Kavitäten aufgetropft. Die Objektträger wurden getrocknet und anschließend in kaltem Aceton für zehn Minuten fixiert. Nach dem erneuten Trocknen wurden die Objektträger bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Für die Färbung wurden die Objektträger aufgetaut und anschließend wurde auf jede Kavität primärer Antikörper (Verdünnung in PBS, Tab. 9) gegeben. Die Objektträger wurden für eine Stunde bei 37°C mit dieser Lösung inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit PBS gespült und für fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, FITC-konjugierten Detektionsantikörper (Verdünnung in PBS mit 0.0001 % Evans Blue, Tab. 9) für 30 Minuten bei 37°C. Nach der Inkubation wurden die Objektträger erneut mit PBS gespült und getrocknet. Die Färbung wurde im Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

primärer Antikörper			sekundärer Antikörper	
humanes anti-DENV Serum (1:100)		(1:100)	anti-human FITC-Konjugat (1:750)	
monoklonaler	anti-DENV	Maus-Antikörper	anti-Maus FITC-Konjugat (1:40)	
(1:1000)				
humanes anti-HIV Serum (1:100)		:100)	anti-human FITC-Konjugat (1:750)	

Tab. 9 Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

2.4.6 Neutralisationstest

Um die Neutralisationsaktivität eines Serums gegen Dengueviren zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Neutralisationsassays verwendet: der *plaque reduction neutralization test* (PRNT) und der *foci reduction neutralization test* (FRNT). Beide Assays basieren auf dem gleichen Prinzip, dass vorhandene neutralisierende Antikörper an die Viruspartikel binden und somit die Infektion von Zellen blockieren. Deshalb verringert sich die Anzahl an Infektionsereignissen (gemessen als Plaques oder Foci) in Virusproben, die mit Antikörper-enthaltendem Serum versetzt wurden. Als Kontrolle wurden Virusproben ohne Serum und Virusproben mit DENV Antikörper-negativen Seren eingesetzt. Jedes Serum wurde gegen alle vier DENVs getestet, die die vier DENV-Serotypen repräsentieren. Hierfür WHO-Referenz-DENV-Isolate verwendet (2.1.6). wurden die Die generelle Vorgehensweise war bei PRNT und FRNT gleich. Vor dem eigentlichen Test wurde das Serum bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert. Anschließend erfolgte die serielle 1:2-Verdünnung (1:10 bis 1:5120) des Serums in DMEM. Zusätzlich wurde ein humanes Kontrollserum verdünnt, das von einer Person ohne nachweisliche DENV-Infektion stammte. Die Serumverdünnungen wurden dann mit einer definierten Virusmenge versetzt. Diese Virus-Serum-Gemische wurden für die Neutralisationsreaktion eine Stunde bei 37°C und 5 % CO2 inkubiert. Anschließend wurden die Serum-Virus-Gemische auf Zellen (VeroB4-Monolayer) verteilt und für die Adsorption der Viren eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Überstände entfernt und das Overlaymedium aufgetragen. Bis zur Detektion der Plaques (2.4.5.1) bzw. Foci (2.4.5.2) wurden die Zellkulturplatten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.4.6.1 *Plaque reduction neutralization test* (PRNT)

Für den PRNT wurden VeroB4-Zellen in 24*well*-Zellkulturplatten mit jeweils 5·10⁴ Zellen/Kavität ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Serum-Inaktivierung wie oben beschrieben. Die seriellen 1:2-Serumverdünnungen (1:10 bis 1:5120) wurden in jeweils 250 µl DMEM in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen angefertigt. Anschließend wurden zu jeder Serumverdünnung je 250 µl Virusverdünnung (500 pfu/ml) gegeben. Die Serum-Virus-Gemische wurden wie oben beschrieben inkubiert und danach wurden jeweils 200 µl/Kavität auf VeroB4-Monolayer verteilt. Final wurden also 50 pfu/Kavität eingesät. Für das zu untersuchende Patientenserum wurde jede Verdünnung jeweils im Duplikat getestet, parallel mit den Kontrollen (humanes DENV-Negativserum und Virusverdünnung ohne Serum). Die Überstände wurden nach der einstündigen Adsorption bei 37°C und 5 % CO₂ entfernt und durch 500 µl/Kavität Overlaymedium ersetzt. Die Plaques entwickelten sich dann bei 37°C und 5 % CO₂ in den folgenden 5-7 Tagen. Die Detektion der Plaques erfolgte mit Kristallviolett (2.4.4.1). Die Kalkulation der PRNT90-Titer, d.h. der Serumverdünnung mit mindestens 90 % Reduktion der Plaque-Anzahl/Kavität, erfolgte nach dem Auszählen der entwickelten

Plaques (ungefärbte Zellen). Die Plaque-Anzahl in den Kontroll-Kavitäten, d.h. Kavitäten inkubiert mit humanem Negativserum und Kavitäten inkubiert mit der Virusverdünnung ohne Serum, mussten konstant sein und dem ausgesäten Wert entsprechen. Der PRNT90-Titer entsprach der höchsten Serumverdünnung mit weniger als 10 % der ausgesäten Virusmenge (z.B. 50 pfu). Dabei wurde jeweils der Mittelwert der Duplikate der untersuchten Verdünnungen berücksichtigt.

2.4.6.2 Foci reduction neutralization test (FRNT)

Für den FRNT wurden VeroB4-Zellen in 96well-Zellkulturplatten mit jeweils 6·10³ Zellen Zellen/Kavität ausgesät. Am Folgetag wurde die Serum-Inaktivierung wie oben beschrieben durchgeführt. Die seriellen 1:2-Serumverdünnungen (1:10 bis 1:5120) wurden in jeweils 80 µl DMEM in 96 well-Rundbodenplatten angefertigt. Anschließend wurden zu jeder Serumverdünnung je 80 µl Virusverdünnung (2000-4000 ffu/ml) gegeben. Die Serum-Virus-Gemische wurden wie oben beschrieben inkubiert und danach wurden jeweils 50 µl/Kavität auf die VeroB4-Monolayer verteilt, sodass final 50-100 ffu/Kavität in die Platten eingesät wurden. Für das zu untersuchende Patientenserum wurde jede Verdünnung jeweils im Triplikat getestet, parallel mit den Kontrollen (humanes Negativserum und Virusverdünnung ohne Serum). Die Serum-Virus-Gemische wurden nach der einstündigen Adsorption bei 37°C und 5 % CO₂ entfernt und durch 150 µl/Kavität Overlaymedium ersetzt. Die Foci entwickelten sich dann bei 37°C und 5 % CO₂ in den folgenden 2-3 Tagen. Die Detektion der infizierten Zellen erfolgte mittels Focifärbung (2.4.5.2). Die Kalkulation der FRNT-90Titer, d.h. der Serumverdünnung mit mindestens 90 % Reduktion der Foci-Anzahl/Kavität, erfolgte nach dem Auszählen der entwickelten Foci (gefärbte Zellen). Die Foci-Anzahl in den Kontroll-Kavitäten, d.h. Kavitäten inkubiert mit humanem Negativserum und Kavitäten inkubiert mit der Virusverdünnung ohne Serum, mussten konstant sein und dem ausgesäten Wert entsprechen. Der FRNT90-Titer entsprach der höchsten Serumverdünnung mit weniger als 10 % der ausgesäten Virusmenge (z.B. bei eingesetzten 100 ffu Reduktion auf ≤10 ffu). Dabei wurde jeweils der Mittelwert der Triplikate der untersuchten Verdünnungen berücksichtigt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des Neutralisationstests

Für die Etablierung eines zuverlässigen DENV-Neutralisationstests mussten zunächst die nötigen Dengueviren in ausreichenden Mengen angezüchtet und die jeweils gewonnene Virusmenge quantifiziert werden. Die Anzucht der Dengueviren erfolgte in VeroB4-Zellen bei 37°C (2.4.3). Die Zellkulturüberstände wurden in regelmäßigen Abständen mittels DENV-Serotypen-PCR auf ihre Identität hin überprüft (2.2.3.2).

3.1.1 Virusquantifizierung durch Bestimmung einzelner infizierter Zellen

Da die DENV-Infektion in Vero B4-Zellen einen zytopathische Effekt (CPE) auslöst, und somit infizierte Zellen als Plaques erscheinen, wurde versucht die Virusmenge quantitativ mittels Plaque-Assay (2.4.4.1) zu bestimmen. Der CPE konnte nach 7-8 Tagen in Form sichtbarer Plaques detektiert werden (Abb. 8A). Dabei war die Plaquebildung mit Overlaymedium (pH 7,4) nicht gleichmäßig und die Kontur der Plaques unregelmäßig (Abb. 8A). Da bekannt ist, dass der pH-Wert Einfluss auf die Form der Plaques haben kann, wurde durch Zugabe von 20 mM Tris bzw. 35 mM HEPES der pH-Wert des Overlaymediums auf pH 8,0 bzw. pH 7,2 eingestellt und die Plaquebildung erneut untersucht. Für den niedrigeren pH-Wert 7,2 konnten bei DENV3-infizierten Zellen kleinere, schärfer umrissene Plaques beobachtet werden als bei pH 7,4. DENV2 induzierte bereits bei pH 7,4 klare, große Plaques. Die Senkung des pH-Wertes führte bei diesem Virus zu einer verringerten Plaquegröße. In DENV1- und DENV4-infizierten Zellen hatte die Senkung des pH-Wertes keinen signifikanten Einfluss auf die Plaquebildung. Bei pH 8,0 konnten für alle vier DENVs gleichmäßig geformte Plaques beobachtet werden. Allerdings konnte die Plaquebildung und die einhergehende Bestimmung der Viruskonzentration nicht zuverlässig und wiederholbar durchgeführt werden. Verschiedene Ansätze unter gleichen Bedingungen mit Virusüberständen aus einer identischen Charge führten nicht immer zur gleichen Plaquebildung. Deshalb wurde der Foci-Assay als eine weitere Methode angewendet, um die Virusmenge zu quantifizieren.

Der Foci-Assay beruhte auf der Anfärbung von Dengue-Antigenen mit Hilfe von Antikörpern. Hierfür wurden die infizierten Zellen mit Serotyp-spezifischen Antikörpern inkubiert und gebundene Antikörper durch einen Enzym-gekoppelten, sekundären Antikörper nachgewiesen (2.1.3). Für den Foci-Assay standen monoklonale, Serotyp-spezifische Antikörper des Pasteur-Instituts Kambodscha (IPC) zur Verfügung. Vorangegangene Versuche, DENV-infizierte Zellen (WHO-Referenzviren, 2.1.8) durch kommerzielle DENV-Antikörper der Firma AbDSerotec (Tab. 10) zu detektieren schlugen fehl. Dabei wurden zwei verschiedene monoklonale Antikörper getestet, die gegen alle vier DENV-Serotypen gerichtet sein sollten. Mit dem Antikörper MCA2277 konnten DENV1-3, aber nicht DENV4 (Isolat H241) nachgewiesen werden. Ein weiterer kommerzieller Antikörper, der alle vier Serotypen erkennen sollte, war OBT0745. Mit diesem konnte aber selbst bei einer geringen Verdünnung von 1:100 keines der verwendeten Dengueviren nachgewiesen werden. Auch ein monoklonaler Antikörper, der gegen das St. Louis Enzephalitis-Virus (SLV) gerichtet ist und laut Hersteller mit anderen Flaviviren wie DENV und JEV kreuzreagiert, zeigte keine Reaktivität mit DENV1-4 infizierten Zellen. Die monoklonalen Maus-Antikörper des IPC konnten dagegen auch bei Verdünnungen bis zu 1:2000 alle verwendeten Dengueviren bzw. deren Antigene zuverlässig detektieren.

Der optimale Zeitpunkt für die Färbung der DENV-infizierten Zellen wurde für jedes Virus separat ermittelt (Abb. 8B). Dabei konnten bereits zwei Tage nach der Infektion infizierte Zellen (Foci) detektiert werden. Die Foci waren für DENV3- und DENV4-Infektionen sogar mit dem bloßen Auge sichtbar, für DENV1 und DENV2 jedoch erst ab einer 4-fachen Vergrößerung im Mikroskop (Abb. 8B). Drei Tage nach der Infektion waren auch die Foci von DENV1 und DENV2 mit dem bloßen Auge erkennbar. Nach vier Tagen hatten sich die Infektionen aller vier Dengueviren soweit auf die benachbarten Zellen ausgebreitet, dass meist keine einzelnen Foci mehr sichtbar Infektionsexperimenten Daher wurde in allen nachfolgenden waren. (Virusquantifizierung mittels Foci-Assay und Neutralisationstest mittels FRNT) DENV1und DENV2-infizierte Zellen nach drei Tagen, und DENV3- und DENV4-infizierte Zellen nach zwei Tagen mit den Serotyp-spezifischen Antikörpern gefärbt.

Antikörper (AbD Serotec)	Spezifität (laut Herstelle	r)	Reaktivität (gemessen)	
OBT0745 (0,1 mg/ml)	DENV1-4		DENV1-4 r	nicht reaktiv ≤ 1:100
OBT1676 (1 mg/ml)	SLV, DENV,	JEV	DENV1-4 r	nicht reaktiv ≤ 1:100
MCA2277 (1 mg/ml)	DENV1-4		DENV1 s DENV2 s DENV3 s DENV4 r	≤ 1:3000 ≤ 1:2500 ≤ 1:500 hicht reaktiv
А	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
pH 7,2	2		and the second	
рН 7,-	4	1914		
рН 7,:	8			
B 2 Tage	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
3 Tage				
4 Tage				

Tab. 10 Eigenschaften kommerzieller anti-Dengue-Antikörper

Abb. 8 Virusquantifizierung durch Plaque- und Foci-Assay. (A) Plaque-Assay für DENV1-4 in 24well-Zellkulturplatten mit VeroB4-Zellen nach sieben Tagen Inkubation. Die Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt, wodurch die DENV-infizierten, abgestorbenen Zellen als ungefärbte Plaques sichtbar wurden. Die Plaquebildung wurde bei unterschiedlichen pH-Werten des Overlaymediums untersucht. (B) Foci-Assay für DENV1-4 in 96well-Zellkulturplatten mit VeroB4-Zellen 2, 3 und 4 Tage nach Infektion (4-fache Vergrößerung). DENV-infizierte Zellen wurden durch Foci-Färbung mit Hilfe von Serotyp-spezifischen Antikörpern gefärbt. Untersucht wurden die Dengue-WHO-Referenzisolate DENV1 16007, DENV2 16681, DENV3 H87, und DENV4 H241.

3.1.2 Anzucht der Dengueviren

Die Anzucht von DENV1-4 in VeroB4-Zellen wurde am Beispiel der WHO-Referenzviren 16007, 16681, H87 und H241 genauer untersucht. Dabei wurde die Virusmenge jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0-7 Tage p.i.) nach der Infektion mit verschiedenen Virusmengen (0,01; 0,1 und 1) untersucht. Die eingesetzte Virusmenge wurde dabei als Verhältnis von infektiösem Virus zu verwendeter Zelldichte (multiplicity of infection, MOI) angegeben. Die Abb. 9 zeigt die Ergebnisse dieser Analsen deer Virusanzucht. DENV2 und DENV3 zeigten den höchsten Titer bei MOI 1 bereits zwei Tage nach der Infektion, DENV4 sogar bereits einen Tag nach Infektion. DENV1 vermehrte sich im Vergleich zu den drei anderen Viren langsam. DENV1 erreichte selbst bei Infektion mit einer großen Virusmenge (MOI 1) erst nach vier Tagen den höchsten Virustiter (ca. $4 \cdot 10^5$ ffu/ml). Die Infektion mit weniger Virus (MOI 0,1 und 0,01) lieferte bei DENV1, DENV3 und DENV4 einen Tage später als die Infektion mit MOI 1 die maximale Virusmenge. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Infektionen mit MOI 0,1 und 0,01. DENV1 zeigte bei diesen MOIs den höchsten Titer jeweils fünf Tage nach Infektion, DENV3 drei Tage nach Infektion und DENV4 zwei Tage nach Infektion. Lediglich bei DENV2 zeigte sich der höchste gemessene Virustiter jeweils an verschiedenen Tagen für alle drei untersuchten Infektionsraten. Bei MOI 1 wurde der höchste Titer bereits zwei Tage nach Infektion gemessen, für MOI 0,1 nach drei Tagen und beim kleinsten MOI (0,01) erst nach vier Tagen.

Auch die maximal erreichten Titer unterschieden sich zwischen den untersuchten Viren. DENV1 und DENV4 erreichten Virustiter von $5 \cdot 10^5$ ffu/ml, wohingegen DENV2 und DENV3 lediglich Titer bis $3 \cdot 10^5$ ffu/ml zeigten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Infektion von VeroB4-Zellen jeweils mit MOIs zwischen 0,1 und 0,01 durchgeführt, abhängig von der verfügbaren Virusmenge. Die Zellkulturüberstände wurden bei DENV1-Infektionen nach fünf Tagen, bei DENV2-Infektionen nach vier Tagen, bei DENV3-Infektionen nach drei Tagen und bei DENV4-Infektionen nach zwei Tagen entnommen und zusätzlich durch PEG-Fällung konzentriert (2.4.3). Dadurch wurden Virustiter von 10^6 bis 10^7 ffu/ml erreicht.



Abb. 9 Virusanzucht. Anzucht von DENV1-4 (16007, 16681, H87 und H241) in VeroB4-Zellen infiziert mit MOI 1 (blau), MOI 0,1 (grün) oder MOI 0,01 (rot). Täglich wurde der Zellkulturüberstand entnommen und die enthaltene Virusmenge quantitativ mit dem Foci-Assay bestimmt.

3.1.3 Neutralisationstest

Für die guantitative Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern in Patientenseren musste zunächst ein Neutralisationstest in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Es wurde damit begonnen, einen Plaque-Assay für alle vier DENV-Viren (Serotypen) zu etablieren. Nach Optimierung der Bedingungen (Abb. 8A) konnten zwar infizierte Zellen mittels Plaque-Assay quantitativ bestimmt werden, jedoch lieferten die plaque reduction neutralization tests (PRNTs) zur Bestimmung der neutralisierenden Antikörper in Patientenseren keine zuverlässigen Ergebnisse. Zudem mussten die PRNTs in 24 well-Zellkulturplatten vorgenommen werden, da in Zellkulturplatten mit kleineren Kavitäten keine ausreichende Menge an pfu eingesetzt werden konnte. Die verwendeten 24 well-Zellkulturplatten ermöglichten die Infektion mit bis zu 50 pfu/well, wodurch eine Reduktion der pfu-Anzahl um 90% deutlich detektiert werden kann. Die Verwendung von 24well-Zellkulturplatten erforderte aber den Einsatz von großen Serum- und Virusmengen, da das minimale Volumen zur Bedeckung einer Kavität 100 µl betrug.

Außerdem mussten die Zellkulturplatten für den Plaque-Assay mindestens sieben Tage inkubiert werden, um sichtbare Plaques zu detektieren. All dies führte zur Umstellung des Neutralisationstests auf den foci reduction neutralization test (FRNT). Bei dieser Methode wurden die infizierten Zellen durch Focifärbung mit Hilfe der Serotypspezifischen Antikörper vom IPC detektiert (2.4.5.2). Da Foci auch bei geringerer Größe als Plaques deutlich zu erkennen sind, konnte der Test in 96 well-Zellkulturplatten durchgeführt werden. Dies reduzierte drastisch die benötigten Mengen an Serum und Virus, da für die minimale Bedeckung der Kavitäten jeweils 50 µl ausreichten. Ein weiterer Vorteil des FRNT im Vergleich zum PRNT waren die deutlich kürzeren Inkubationszeiten (Abb. 8). FRNTs mit DENV1 und DENV2 konnten nach drei Tagen, und Tests mit DENV3 und DENV4 bereits nach zwei Tagen gefärbt werden. Die FRNTs mit VeroB4-Zellen in 96well-Zellkulturplatten wurden jeweils in dreifacher Ausführung pro Serum durchgeführt (Abb. 10). Ermittelt wurde jeweils die höchste Serumverdünnung, bei der die Focianzahl um 90 % niedriger war als die eingesetzte Virusmenge. Der reziproke Wert dieser Verdünnung wurde als FRNT90-Titer angegeben. Zusätzlich erfolgte pro Zellkulturplatte eine Kontrolle mit einem DENV-negativen humanen Serum und die Rücktitration der eingesetzten Virusmenge. Die Durchführung der FRNTs mit den vier genau charakterisierten DENV-Serotypen erlaubte die Bestimmung des maximalen Neutralisationstiters in den Serumproben (Neutralisationsprävalenz) für jeden der vier DENV-Serotypen. Die Neutralisationsprävalenz beschreibt somit die maximale Antikörper-vermittelte, DENV-Serotyp-spezifische Neutralisation gemessen als FRNT90-Titer.



Abb. 10 Foci reduction neutralization test. Dargestellt sind die originalen 96well-Zellkulturplatten mit den FRNTs der Seren V0817303 (Kambodscha) und P20 S2/2 (Vietnam) für DENV1-4. Die Seren wurden seriell von 1:20 bis 1:10240 verdünnt und mit gleichen Virusmengen (ca. 50 ffu, siehe: Virus ohne Serum) versetzt. Jede Serumverdünnung wurde dreifach getestet. Dabei wurde der reziproke Wert der höchsten Serumverdünnung mit einer Reduktion der Foci-Anzahl ≥ 90% als FRNT90-Titer bestimmt (rot markiert). NK = Negativ-Kontrolle (DENV-negatives Serum); - = Infektion ohne Serum. Virustitration = zur Kontrolle wurde das Virus 1:2 bis 1:512 verdünnt; 0 = Zellen ohne Serum und ohne Virus.

3.2 Serologische Bestimmung der Neutralisationsprävalenz

Unter den verschiedenen Antikörpern, die nach der Infektion mit einem Denguevirus gebildet werden, sind die neutralisierenden Antikörper die wichtigsten für den Patienten. Diese vermitteln bei einer erneuten DENV-Infektion einen effektiven Schutz vor einer Erkrankung.^{131,132} Die quantitative Bestimmung der neutralisierenden Antikörper erfolgt standardmäßig über Neutralisationstests. In dieser Arbeit wurde der *foci reduction neutralization test* (FRNT, 2.4.6.2) verwendet. Ein Neutralisationstest erlaubt zudem auch die Bestimmung des Serotyps gegen den die Mehrzahl der neutralisierenden Antikörper gerichtet ist (Neutralisationsprävalenz). Dies wurde als das Virus detektiert, gegen den der höchste FRNT90-Titer gerichtet war.

3.2.1 Verwendete Seren von Dengue-infizierten Patienten

Für die Neutralisationsexperimente wurden Seren aus den DENVendemischen Ländern Burkina Faso (20 Seren), Kambodscha (120 Seren), Kolumbien (55 Seren) und Vietnam (79 Seren) verwendet, sowie einige wenige Seren von deutschen Reiserückkehrern (6 Seren). Es wurden die Neutralisationstiter gegenüber allen vier DENV-Serotypen ermittelt und so die Neutralisationsprävalenz für jedes Serum bestimmt.

3.2.1.1 Serotypisierung der Seren aus Kambodscha

Die Neutralisation gegen DENV1-4 wurde von 120 Seren bestimmt. Die Seren wurden vom Pasteur-Institut Kambodscha (IPC) bereitgestellt. Sie stammten von symptomatisch infizierten DENV-Patienten, meist Kindern im Alter von <15 Jahren, und wurden im Rahmen des DENV-Überwachungsprogramms im Zeitraum von 2008-2012 gesammelt. Diese Seren wurden am IPC klinisch charakterisiert. Für die meisten der Akutseren wurde der infizierende Virustyp durch qRT-PCR ermittelt. Zusätzlich wurden alle Seren sowohl mittels ELISA auf IgM-Antikörper gegen DENV und JEV als auch mittels HI-Test auf Antikörper gegen DENV2, DENV3 und JEV untersucht. Dies ermöglichte nicht nur den Ausschluss einer JEV-Infektion, sondern auch eine Klassifizierung der DENV-Erkrankungen in primäre und sekundäre Infektionen. Bei primär infizierten Personen können in Akutseren keine Antikörper im HI-Test und keine IgM-Antikörper im ELISA detektiert werden, wohingegen bei sekundär infizierten Patienten durch beide Methoden IgM- und IgG-Antikörpertiter gemessen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Neutralisationstests mit den WHO-Referenzisolaten DENV1 16007, DENV2 16681, DENV3 H87 und DENV4 H241 durchgeführt (Daten in Anhang 9.4).

Da in Kambodscha Dengue hyperendemisch ist, d.h. alle DENV-Serotypen z.T. gleichzeitig zirkulieren, ist die dortige Bevölkerung seit Jahrzehnten vielen verschiedenen Dengueviren ausgesetzt. Dadurch ist der Anteil der hier verwendeten Seren von primär infizierten Patienten sehr gering (12 Seren) und der von sekundär infizierten Patienten deutlich höher (108 Seren). Für den Großteil der Seren wurde die Neutralisationsprävalenz für DENV1 (37 Seren) oder DENV2 (35 Seren) ermittelt (Tab. 11). Ebenso wurden 18 Seren mit einer Neutralisationsprävalenz für DENV3 und neun Seren für DENV4 identifiziert. Zwei der Seren von primär DENV-infizierten Patienten zeigten keine Neutralisation gegenüber allen verwendeten Dengueviren. Dagegen konnte für 19 Seren von sekundär **DENV-infizierten** Patienten die Neutralisationsprävalenz für ein bestimmtes DENV nicht eindeutig bestimmt werden, da diese gleich hohe FRNT90-Titer für mindestens zwei verschiedene Dengueviren zeigten (siehe Anhang 9.4).

Die Analyse der einzelnen FRNT90-Titer der Seren von primär und sekundär DENV-infizierten Patienten zeigte deutliche Unterschiede (Abb. 11). Innerhalb der Seren von primär infizierten Patienten wurde für keines der untersuchten Dengueviren ein FRNT90-Titer über 640 gemessen. Im Vergleich dazu, zeigten die Seren der sekundär infizierten Patienten im Mittel FRNT90-Titer von mindestens 1280. Dennoch befanden sich unter diesen Proben auch Seren die keine oder nur eine sehr geringe Neutralisationsleistung gegen einen oder mehrere Dengueviren aufwiesen. Auffällig war der hohe Anteil an sowohl primär und sekundären Seren, für die keine Neutralisation gegen DENV3 detektiert werden konnte (27 von 120 Seren).

47

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass trotz der geringen Anzahl an Seren von primär DENV-infizierten Patienten, die FRNT90-Titer in diesen Patientenseren deutlich geringer ausfielen als in Seren von sekundär infizierten DENV-Patienten. Um diese Aussage zu überprüfen, wurden Seren aus Kolumbien untersucht (3.2.1.2), die ebenfalls aufgrund ihrer vorangegangenen Diagnostik in Seren von primär und sekundär infizierten DENV-Patienten eingeteilt werden konnten.

	Patientenseren			
	primär	sekundär	gesamt	
Neutralisationsprävalenz*	(n = 12)	(n = 108)	(n = 120)	
DENV1	2	35	37	
DENV2	5	30	35	
DENV3	-	18	18	
DENV4	1	8	9	
DENV1 + DENV2	-	2	2	
DENV1 + DENV3	-	1	1	
DENV1 + DENV4	-	2	2	
DENV2 + DENV3	-	-	-	
DENV2 + DENV4	-	11	11	
DENV3 + DENV4	-	1	1	
> 2 Serotypen		2		
negativ	2	-	2	

Tab. 11 Serotypisierung der Seren aus Kambodscha

* DENV-Serotyp, gegen den der höchste FRNT90-Titer im Patientenserum gemessen wurde.



Abb. 11 Neutralisationstiter der Seren aus Kambodscha. Dargestellt sind die FRNT90-Titer der 12 Seren von primär DENV-infizierten Patienten (oberer Graph) und der 108 Seren von sekundär DENV-infizierten Patienten (unterer Graph) jeweils für DENV1 (blau), DENV2 (rot), DENV3 (grün) und DENV4 (violett). Die Auftragung der Werte erfolgte logarithmisch.

3.2.1.2 Serotypisierung der Seren aus Kolumbien

Die Seren aus Kolumbien stammten von Patienten mit akutem Fieber im Alter zwischen 11 und 80 Jahren. Die klinische Charakterisierung wurde zuvor von Dr. Simone Kann durchgeführt. Dabei wurde die DENV-Infektion mittels qRT-PCR, sowie verschiedenen kommerziellen Schnelltests basierend auf dem Nachweis von DENV-NS1-Antigen, anti-DENV IgM- und IgG-Antikörpern detektiert. Die Untersuchung auf IgM- und IgG-Antikörper ermöglichte eine Einteilung der Seren in primäre und sekundäre Infektionen. Als primär infiziert wurden dabei jene Patienten definiert, deren Akutseren positiv auf anti-DENV-IgM, jedoch negativ auf IgG detektiert wurden. Die übrigen Seren wurden IgG-positiv getestet und somit als Seren von sekundär infizierten Patienten diagnostiziert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Analyse der Neutralisationstiter von 55 Patientenseren. Es wurden Neutralisationstests mit den WHO-Referenzisolaten DENV1 16007, DENV2 16681, DENV3 H87 und DENV4 H241 durchgeführt (Daten in Anhang 9.4).

Insgesamt konnte die Neutralisationsprävalenz für 45 Seren eindeutig bestimmt werden (Tab. 12). Dabei wurde bei 18 Seren eine Neutralisationsprävalenz für DENV1, bei elf Seren für DENV2 und bei 13 Seren für DENV3 ermittelt. Drei Seren zeigten den höchsten FRNT90-Titer gegen DENV4. Der Vergleich der Neutralisationstiter zwischen den Seren von primär (24 Seren) und sekundär DENV-infizierten Personen (31 Seren) war mit diesen Seren vorteilhafter, da annähernd die gleiche Anzahl von Seren für beide Patientengruppen vorhanden waren. Dabei zeigte sich auch hier, wie bei den Seren aus Kambodscha, dass die FRNT90-Titer in den Seren der primär DENV-infizierten Patienten deutlich niedriger ausfielen, als in Seren der sekundär DENV-infizierten Patienten (Abb. 12). Die Mehrheit der Seren der primär infizierten Patienten (75 %) zeigte keinen FRNT90-Titer über 640. Dagegen hatten 81% der Seren der sekundär infizierten Patienten für mindestens eines der vier Dengueviren einen FRNT90-Titer von 1280 oder höher.

	<u>Patientense</u>	Patientenseren		
	primär	sekundär	gesamt	
Neutralisationsprävalenz*	(n = 24)	(n = 31)	(n = 55)	
DENV1	7	11	18	
DENV2	4	7	11	
DENV3	3	10	13	
DENV4	2	1	3	
DENV1 + DENV2	3	1	4	
DENV1 + DENV3	2	-	2	
DENV1 + DENV4	-	-	-	
DENV2 + DENV3	1	1	2	
DENV2 + DENV4	1	-	1	
DENV3 + DENV4	-		<u>-</u>	
negativ	1	-	1	

Tab. 12 Serotypisierung der Seren aus Kolumbien

* DENV-Serotyp, gegen den der höchste FRNT90-Titer im Patientenserum gemessen wurde.



Seren von primär DENV-infizierten Patienten

Abb. 12 Neutralisationstiter der Seren aus Kolumbien. Dargestellt sind die FRNT90-Titer der 24 Seren von primär DENV-infizierten Patienten (oberer Graph) und der 31 Seren von sekundär DENV-infizierten Patienten (unterer Graph) jeweils für DENV1 (blau), DENV2 (rot), DENV3 (grün) und DENV4 (violett). Die Auftragung der Titer erfolgte logarithmisch.

3.2.1.3 Serotypisierung von Seren deutscher Reiserückkehrer

Zusätzlich zu den Seren aus DENV-endemischen Ländern standen sechs Seren von deutschen Reiserückkehrern zur Verfügung, die in der Vergangenheit eine diagnostizierte Dengue-Infektion durchlaufen haben. Alle Seren zeigten geringe oder keine Neutralisationstiter gegenüber DENV1-4 (Tab. 13). Es konnte kein FRNT90-Titer über 640 gemessen werden. Die Bestimmung der Neutralisationsprävalenz war eindeutig für vier der sechs Seren (eines gegen DENV1, drei gegen DENV2). Die zwei weiteren Seren zeigten jeweils für zwei Dengueviren einen gleich hohen FRNT90-Titer. Die niedrigen Neutralisationstiter und die Tatsache, dass es sich bei den Patienten um Reiserückkehrer aus tropischen Ländern und nicht um Einwohner DENV-endemischer Ländern handelte, deuten auf eine primäre DENV-Infektion all dieser Patienten hin.

	FRNT90-Tite	FRNT90-Titer *			
Serum	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	
HJ-M.	<u>160</u>	<u>160</u>	80	80	
M.S.	80	<u>640</u>	80	320	
B.S.	<u>640</u>	320	160	320	
B.P.	320	<u>640</u>	160	<u>640</u>	
G.Q.	<20	<u>40</u>	<20	20	
H.B.	20	160	40	80	

Tab. 13 FRNT90-Titer der Seren von deutschen Reiserückkehrern

* Die ermittelte Neutralisationsprävalenz ist jeweils <u>unterstrichen</u> dargestellt.

3.2.1.4 Serotypisierung der Seren aus Vietnam

Es wurden 79 Seren aus Vietnam, einem weiteren DENV-endemischen Land in Südostasien, auf ihre Neutralisation gegenüber DENV untersucht. Die Seren stammten von symptomatischen DENV-Patienten im Alter zwischen 18 und 65 Jahren, die wegen ihrer DENV-Infektion im Krankenhaus in Huè 1998/99 stationär behandelt wurden.^{117,118} Es erfolgte die Analyse der Neutralisationstiter von 79 Patientenseren, davon 47 Seren aus der akuten Infektionsphase (entnommen 1-3 Tage nach dem Auftreten von Symptomen) und 32 Seren aus der Konvaleszenzphase (entnommen 3-6 Tage nach der ersten Probe). Für diese Seren standen keine weiteren klinischen Daten zur Verfügung. Die Neutralisationstests wurden mit folgenden WHO-Referenzisolaten durchgeführt: DENV1 Hawaii, DENV2 THNh81/93, DENV3 H87 und DENV4 H241 (Daten in Anhang 9.4).

Für 75 Seren konnten Neutralisationstiter gegen mindestens eines der untersuchten vier Dengueviren gemessen werden. Dadurch gelang die Bestimmung der Neutralisationsprävalenz für 43 Seren aus der akuten Phase der Infektion und für 32 Seren aus der Konvaleszenzphase (Tab. 14). Dabei wurden je 27 Seren mit einer Neutralisationsprävalenz für DENV1 bzw. DENV2 detektiert, sowie zwölf Seren mit einer DENV3- und zwei Seren mit einer DENV4-Neutralisationsprävalenz. Für sieben Seren konnte die Neutralisationsprävalenz nicht eindeutig bestimmt werden, da für zwei der Dengueviren die FRNT90-Titer gleich hoch waren. Vier der Akutseren zeigten keine Neutralisationsreaktion gegen alle vier Dengueviren. Die Auftragung aller ermittelten FRNT90-Titer ergab eine breite Streuung, d.h. es gab sowohl Seren mit niedrigen FRNT90-Titern als auch Seren mit hohen Titern gegen alle Dengueviren (Abb. 13). Bei der getrennten Auftragung der FRNT90-Titer für die Akut- und Konvaleszenzseren, zeigten sich deutlich mehr Seren mit niedrigen FRNT90-Titern für die 14 Seren). Dennoch gab es auch innerhalb der Akutseren (12 der 14 Seren). Dennoch gab es auch innerhalb der Akutseren Auftralisationstiter aufwiesen.

Wie bereits durch die Untersuchung der Seren aus Kambodscha und Kolumbien sowie der Seren der Reiserückkehrer gezeigt, wiesen primär infizierte Patienten generell niedrigere FRNT90-Titer auf als Patienten die bereits mehrfach mit DENV in Kontakt gekommen sind. Deshalb weist die große Streuung der FRNT90-Titer, die für alle Dengueviren sowohl in Akut- als auch in Konvaleszenzseren beobachtet wurde, darauf hin, dass es sich bei den untersuchten Patienten sowohl um primär infizierte als auch um bereits mehrfach infizierte DENV-Patienten handelte.

	Patientenseren		
	akut	konvaleszent	gesamt
Neutralisationsprävalenz *	(n = 47)	(n = 32)	(n = 79)
DENV1	16	11	27
DENV2	12	15	27
DENV3	8	4	12
DENV4	2	0	2
DENV1 + DENV2	0	1	1
DENV1 + DENV3	1	0	1
DENV1 + DENV4	0	1	1
DENV2 + DENV3	1	0	1
DENV2 + DENV4	3	0	3
DENV3 + DENV4	0	0	0
negativ	4	0	4

Tab. 14Serotypisierung der Seren aus Vietnam.

* DENV-Serotyp, gegen den der höchste FRNT90-Titer im Patientenserum gemessen wurde.



Abb. 13 Neutralisationstiter der Seren aus Vietnam. Dargestellt sind die FRNT90-Titer von 79 Seren jeweils für DENV1 (blau), DENV2 (rot), DENV3 (grün) und DENV4 (violett). Die Auftragung der Titer erfolgte logarithmisch. Der obere Graph zeigt die FRNT90-Titer aller 79 Seren, der mittlere Graph die FRNT90-Titer der 47 Seren aus der akuten Infektionsphase, und der untere Graph die FRNT90-Titer der 23 Seren aus der Konvaleszenzphase.

3.2.1.5 Serotypisierung der Seren aus Burkina Faso

Es standen 20 Seren aus Burkina Faso für Neutralisationsexperimente zur Verfügung. Die Analyse der Dengue-neutralisierenden Antikörper ermöglichte Einblicke in den Immunstatus von Personen aus einer Region, von der bisher noch sehr wenig über die DENV-Erkrankung bekannt ist. Die Seren stammten von gesunden Personen im Alter zwischen einem und 77 Jahren. Sie wurden in Bourasso (Gemeinde Nouna) im Nordwesten von Burkina Faso im Rahmen einer Malaria-Studie in der Regenzeit 2009 von Dr. Thomas Jänisch gesammelt.¹²⁰ Die Seren wurden durch einen kommerziellen DENV-ELISA (Panbio) und anti-DENV-IFA als DENV-positive Seren charakterisiert (Tab. 16). Weitere Diagnostikdaten standen nicht zur Verfügung, weshalb keine nähere Charakterisierung des DENV-Immunstatus der Patienten möglich Neutralisationstests Im Rahmen dieser Arbeit wurden war. mit den WHO-Referenzisolaten DENV1 16007, DENV2 16681, DENV3 H87 und DENV4 H241 durchgeführt.

Neutralisierende Antikörper konnten für 15 der 20 Seren mittels FRNT bestimmt werden. Dabei wurde für zehn Seren eine Neutralisationsprävalenz für DENV2 ermittelt (Tab. 15). Es konnten keine Seren mit einer DENV1- oder DENV4-Neutralisationsprävalenz identifiziert werden. Für vier Seren konnte die Neutralisationsprävalenz nicht eindeutig bestimmt werden, da die Seren gegen mehrere Viren den gleich hohen FRNT90-Titer aufwiesen. Für fünf Seren konnte keine Neutralisationsreaktion detektiert werden. Die Auftragung aller ermittelten FRNT90-Titer verdeutlichte die hohe Zahl der Seren ohne Neutralisationsaktivität sowie die generell sehr niedrigen FRNT90-Titer für alle vier untersuchten Dengueviren (Abb. 14). So konnte kein FRNT90-Titer über 640 detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Serumproben von primär DENV-infizierten Personen stammten.

Der Vergleich der FRNT90-Titer mit den Ergebnissen aus ELISA und IFA zeigte deutliche Unterschiede in der Sensitivität der Methoden (Tab. 16). Der ELISA-Test zeigte dabei die gleiche Sensitivität wie der FRNT, identifizierte aber Seren ohne neutralisierende Antikörper nicht, sondern wies für diese Seren unklare Ergebnisse aus. Für die fünf Seren ohne messbare FRNT90-Titer ergab der ELISA-Test eine unklare Diagnose.

Der IFA-Test hatte eine geringere Sensitivität als ELISA und FRNT, und zeigte für zwei der Seren ohne detektierbare, neutralisierende Antikörper dennoch einen positiven DENV-Nachweis. Dagegen fiel der IFA-Test für elf Seren negativ aus, für die aber neutralisierende Antikörper detektiert werden konnten.

Tab. 15Serotypisierung der Burkina Faso Seren

	Seren	
Neutralisationsprävalenz *	(n = 20)	
DENV1	0	
DENV2	10	
DENV3	1	
DENV4	0	
DENV2 + DENV3	3	
DENV2 + DENV3 + DENV4	1	
negativ	5	

* DENV-Serotyp, gegen den der höchste FRNT90-Titer im Patientenserum gemessen wurde.



Abb. 14 Neutralisationstiter der Seren aus Burkina Faso. Dargestellt sind die FRNT90-Titer der 20 Seren jeweils für DENV1 (blau), DENV2 (rot), DENV3 (grün) und DENV4 (violett). Die Auftragung der Titer erfolgte logarithmisch.

Serum	IFA	ELISA	Neutralisation (FRNT90) ^c			
	DENV ^a	DENV ^b	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
51	-	+/-	<20	<20	<20	<20
60	-	+	<20	<u>80</u>	20	20
66	+	+	20	160	<u>320</u>	80
72	-	+/-	<20	<20	<20	<20
78	-	+	<20	<u>80</u>	40	<20
81	-	+	20	<u>160</u>	80	80
82	+	+	<20	<u>20</u>	<u>20</u>	<20
86	-	+	<20	<u>80</u>	40	<20
87	-	+	<20	<u>80</u>	20	40
88	-	+	<20	<u>20</u>	<u>20</u>	<20
89	+	+/-	<20	<20	<20	<20
91	-	+/-	<20	<20	<20	<20
96	+	+	<20	<u>40</u>	<20	20
98	-	+	<20	<u>80</u>	<u>80</u>	<u>80</u>
103	-	+	40	<u>640</u>	160	160
109	+	+/-	<20	<20	<20	<20
110	+	+	80	<u>160</u>	<u>160</u>	20
112	-	+	<20	<u>160</u>	80	80
133	-	+	20	<u>80</u>	40	20
267	-	+	<20	<u>80</u>	40	20

Tab. 16Diagnostik-Daten und Neutralisationstiter der Seren aus Burkina Faso.

^a Detektion von anti-DENV Antikörpern mittels IFA; + positiv; - negativ

^b kommerzieller anti-DENV ELISA zur Antikörper-Detektion; + positiv; -/+ undefiniert

^c Neutralisationsprävalenz (Serotyp mit höchstem, ermittelten FRNT90-Titer) grau unterlegt

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Neutralisationstest zur Ermittlung der Neutralisationsprävalenz auch bei niedrigen Antikörper-Titern eine zuverlässige Methode ist. Der Test identifizierte zudem primär DENV-infizierte Patienten in der akuten Infektionsphase. Für die Seren dieser Personen fiel der Neutralisationstest negativ aus, da noch keine neutralisierenden Antikörper gebildet werden konnten. Neutralisationstiter über 1280 deuteten hingegen auf sekundäre DENV-Infektionen hin. Die FRNT90-Titer unterschieden sich signifikant zwischen Seren von primär und sekundär DENV-infizierten Patienten (Abb. 15). Dabei waren die Unterschiede der FRNT90-Titer zwischen primär und sekundär DENV-infizierten Personen für DENV4 signifikant (p = 0,0115), und für DENV1, DENV2 und DENV3 sogar hochsignifikant (p < 0,0001). Die Sensitivität des Neutralisationstests war hoch, denn er erlaubte die Detektion von DENV-Antikörpern auch in niedriger Konzentration. Am Beispiel der Seren aus Burkina Faso konnte gezeigt werden, dass der Neutralisationstest damit anderen Methoden, wie ELISA und IFA, überlegen war, die bei niedrigen Antikörper-Titern unklare oder falsch-negative Ergebnisse lieferten (Tab. 16). Zudem ist der Neutralisationstest die einzige Methode, die neutralisierenden Antikörper zu detektieren und damit Rückschlüsse auf den Immunschutz des Patienten zu ziehen.



Abb. 15 Neutralisationstiter Analyse der von primär und sekundär DENV-infizierten Personen. Altman-Boxplot der FRNT90-Titer von 59 Seren primär infizierter Personen (aus Kambodscha, Kolumbien, Deutschland und Burkina Faso) und 139 Seren von sekundär infizierten Personen (aus Kambodscha und Kolumbien). Die Auftragung der Titer erfolgte logarithmisch. Die Unterschiede der FRNT90-Titer zwischen primären und sekundären Infektionen wurden für jedes Denguevirus mittels Welch-Test analysiert. Signifikante Unterschiede der FRNT90-Titer wurden dabei für alle vier untersuchten Viren gefunden (* p < 0,05; *** p < 0,0001).

3.2.2 Einfluss der verwendeten DENV-Isolate auf die Neutralisation

Die bisher dargestellten Neutralisationstests wurden mit WHO-Referenzisolaten durchgeführt so wie es von der WHO zur Diagnostik von neutralisierenden Antikörpern empfohlen wird.⁹⁴ Da es vermehrt Untersuchungen zu DENV-Serotyps gab,¹⁰ wurde Varianten innerhalb der Viren eines der Neutralisationstest ebenfalls mit anderen Virus-Isolaten durchgeführt und die Ergebnisse mit denen der WHO-Referenzviren verglichen. Hierfür standen Viren aus Kambodscha zur Verfügung, die im Zeitraum 1998-2007 aus virämischen Patienten isoliert wurden und weniger als zehn Zellkultur-Passagen im Labor durchlaufen haben. Mit diesen Virus-Isolaten und den Seren aus Kambodscha konnten autologe Neutralisationstests durchgeführt werden, d.h. die Bestimmung der neutralisierenden Antikörper mit Viren, die aus dem gleichen endemischen Gebiet stammten wie die zu untersuchenden Seren. Für diese Analyse wurden 40 Seren von Patienten aus der frühen Konvaleszenzphase verwendet, deren Akutseren mehrheitlich positiv für DENV1 in der qRT-PCR waren (sieben Seren waren nicht mittels qRT-PCR untersucht worden). Die Ergebnisse der autologen FRNTs im Vergleich zu den Neutralisationstitern mit den WHO-Viren sind in Abb. 16 für jeden Serotyp zusammengefasst (Daten siehe Anhang 9.4). Die Untersuchung erfolgte mit jeweils zwei DENV-Isolaten aus Kambodscha und einem WHO-Referenzvirus für jeden Serotyp (Tab. 17).

Die gemessenen FRNT90-Titer unterschieden sich zwischen den jeweiligen DENV-Isolaten aus Kambodscha kaum. Die FRNT90-Titer für DENV1 waren bei allen Seren gegenüber dem WHO-Referenzisolat (Virus 16007) größer als gegenüber den Kambodscha-Isolaten. Die Titer unterschieden sich bei den meisten Seren in mindestens zwei Verdünnungsstufen. Die FRNT90-Titer gegenüber DENV2 unterschieden sich dagegen nicht oder nur kaum zwischen den drei verschiedenen Virusisolaten. Die gemessenen FRNT90-Titer gegen DENV3 waren deutlich höher für die Kambodscha-Isolate als gegen das WHO-Referenzvirus H87. Diese FRNT90-Titer gegen DENV3 zeigten Unterschiede von vier oder mehr Verdünnungsstufen. Für DENV4 zeigte sich das umgekehrte Bild. Die FRNT90-Titer waren gegenüber dem WHO-Referenzisolat H241 um mindestens zwei Verdünnungsstufen größer als für die Kambodscha-Isolate. Damit konnte gezeigt werden, dass die Wahl der Virus-Isolate, die für den Neutralisationstest verwendet werden, entscheidend für die gemessenen Neutralisationstiter ist. Dabei ergaben sich bei den hier dargestellten Untersuchungen kaum Unterschiede innerhalb der autologen Virus-Isolate. Umso größer war die Differenz der detektierten Neutralisationstiter zwischen dem jeweiligen WHO-Referenzisolat und den autologen Viren, besonders für DENV1, DENV3 und DENV4.

	Isolat	Herkunft	Jahr	Genbank-Nr.
DENV1	16007 *	Thailand	1964	AF180817
	KH/BID-V2004/2006	Kambodscha	2006	FJ639687
	KH/BID-V2011/2007	Kambodscha	2007	FJ639693
DENV2	16881 *	Thailand	1984	U87411
	D2KH/06PHP	Kambodscha	2006	-
	KH/BID-V2066/2007	Kambodscha	2007	FJ639717
DENV3	H87 *	Philippinen	1956	M93130
	KH/BID-V2058/2005	Kambodscha	2005	GQ868628
	KH/BID-V2051/2007	Kambodscha	2006	FJ639713
DENV4	H241 *	Philippinen	1956	AB609591
	D4KH/98PHP	Kambodscha	1998	-
	D4KH/07	Kambodscha	2007	-

Tab. 17 Für die Serotypisierung verwendete DENV-Isolate

* WHO-Referenzvirus


Abb. 16 Neutralisation von 12 Denguevirus-Isolaten mit Seren aus Kambodscha. 40 Seren wurden jeweils gegen 12 Dengueviren getestet. Dargestellt sind die jeweiligen FRNT90-Titer jedes Serums gegenüber einem DENV-WHO-Referenzisolat (blau) und jeweils zwei verschiedenen DENV-Isolaten aus Kambodscha (grün). Die verwendeten Viren finden sich in Tab. 17. Die Auftragung der FRNT90-Titer erfolgte logarithmisch.

3.2.3 Verlauf der neutralisierenden Antikörperantwort

Durch die Analyse der Neutralisationstiter in Serumproben aus der akuten Phase (S1-Probe) und den entsprechenden Folgeproben der konvaleszenten Phase (S2-Probe) konnte der Verlauf der neutralisierenden Antikörperantwort untersucht werden. Innerhalb der Seren aus Vietnam standen Verlaufsproben von 14 Patienten zur Verfügung. Die genauen Zeitpunkte der Serumentnahme waren nicht bekannt. Die Proben der akuten Infektionsphase wurden 1-3 Tage nach dem Auftreten von Symptomen entnommen und die der Konvaleszenzphase 3-6 Tage nach der ersten Probe. Die Analyse der Serumpaare ergab sehr heterogene Verläufe der neutralisierenden Antikörperantwort (Daten in Anhang 9.4; Abb. 17). Es gab Patienten, deren FRNT90-Titer für alle Dengueviren zwischen Akutserum (S1) und Konvaleszenzserum (S2) sanken (Seren A03, A14, P15, P22). Ebenso konnten Patienten identifiziert werden, deren FRNT90-Titer sich lediglich um eine Verdünnungsstufe änderten (P18, P20-2, P23). Bei vier der Patienten stieg der FRNT90-Titer mindestens eines Serotyps um mehr als zwei Verdünnungsstufen an (A01, A06, A08, A10, P21). Die Seren von Patient A09 zeigten für DENV1 und DENV4 einen sehr deutlichen Anstieg ihrer FRNT90-Titer (vier bzw. sechs Verdünnungsstufen), wohingegen der Titer von DENV2 nahezu unverändert blieb (Anstieg nur um eine Verdünnungsstufe), und der Titer für DENV3 um drei Verdünnungsstufen sank.

Um diese Ergebnisse zu überprüfen wurden zusätzlich 12 Serumpaare aus Kolumbien (Südamerika) und Seren von 40 DENV-Patienten aus Kambodscha (Südostasien) untersucht. Die Serumpaare bestanden jeweils aus Akut- und Konvaleszenzserum. Für die Akutseren wurde mittels qRT-PCR der Virustyp der Infektion ermittelt. Diese Untersuchung erlaubte einen direkten Vergleich des Virustyps der Infektion und der Neutralisationsprävalenz im Serum. Die Untersuchung der Neutralisation ergab messbare FRNT90-Titer in allen Serumgruppen gegen alle Serotypen (Daten in Anhang 9.4). Der generelle Anstieg der FRNT90-Titer aller Serotypen von S1- zu S2-Probe war in allen Serengruppen zu beobachten (Abb. 18, Abb. 19). Dieser Effekt beschränkte sich nicht auf den durch qRT-PCR ermittelten Virustyp, sondern zeigte sich parallel meist für alle Dengueviren. Die größten Anstiege der FRNT90-Titer wurden in Seren beobachtet, deren Virustyp bei der Infektion DENV1 oder DENV4 war. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die FRNT90-Titer nach der akuten Infektionsphase anstiegen. Diese Zunahme an neutralisierenden Antikörpern beschränkte sich dabei weder auf den Virustyp der Infektion (durch qRT-PCR ermittelt) noch auf den Serotyp der Neutralisationsprävalenz, sondern umfasste meist alle vier Dengueviren. Dies verdeutlichte die Breite und Komplexität der gegen DENV-gerichteten Immunantwort.



Abb. 17 Analyse der (A) Ergebnisse Serumpaare Vietnam. des aus Neutralisationstests der Seren von 14 Patienten zu je zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (S1, S2). Die Linien zeigen den Anstieg oder Abfall des FRNT90-Titers. Die Symbole entsprechen den jeweiligen Patienten. Die Auftragung der Titer erfolgte logarithmisch. (B) Der Graph zeigt die Differenzen der FRNT90-Titer zwischen den zwei Serumproben jeweils für die Neutralisation von DENV1 (blau), DENV2 (rot), DENV3 (grün) und DENV4 (violett). Die Differenz ist in +/- Serumverdünnungsstufen angegeben.



Abb. 18 Analyse der Serumpaare aus Kolumbien. (A) Zeigt die Ergebnisse des Neutralisationstests der Seren von 12 Patienten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (Abstände in Tagen). Die Linien zeigen den Anstieg oder Abfall des FRNT90-Titers in den beiden Serumproben. Die Symbole entsprechen den jeweiligen Patienten. Die Auftragung der Titer erfolgte logarithmisch. (B) Der Graph zeigt die Differenzen der FRNT90-Titer zwischen den zwei Serumproben jeweils für die Neutralisation von DENV1 (blau), DENV2 (rot), DENV3 (grün) und DENV4 (violett). Die Differenz ist in +/-Serumverdünnungsstufen angegeben. * Virustyp der Infektion, der durch qRT-PCR identifiziert wurde.



Abb. 19 Analyse der Serumpaare aus Kambodscha. Der Graph zeigt die Differenzen der FRNT90-Titer zwischen den zwei Serumproben jeweils für die Neutralisation von DENV1 (blau), DENV2 (rot), DENV3 (grün) und DENV4 (violett). Die Differenz ist in +/- Serumverdünnungsstufen angegeben.
 * Virustyp der Infektion, der durch qRT-PCR identifiziert wurde.

3.3 Virologische Bestimmung des Virustyps der Infektion

In Patientenseren aus der akuten Phase der Infektion kann mittels qRT-PCR die virale RNA detektiert und der Virustyp bzw. DENV-Serotyp bestimmt werden. Dabei erfolgt die Bestimmung der Serotypen durch spezifische Primer, die an bestimmten Eund NS1-Genomabschnitten hybridisieren. Diese Bereiche sind charakteristisch für den jeweiligen DENV-Serotyp.^{85,86} Für die in der Neutralisation eingesetzten Seren standen z.T. Daten zu dem jeweiligen DENV-Serotypen zur Verfügung. Dies betraf 34 von 55 Seren aus Kolumbien und 113 von 120 Seren aus Kambodscha. Zu allen anderen Seren die in dieser Arbeit untersucht wurden, waren keine gesicherten Daten bezüglich des DENV-Serotyps vorhanden.

3.4 Vergleich des Virustyps mit der Neutralisationsprävalenz

Der Serotyp kann entweder direkt (RNA-Nachweis durch qRT-PCR) oder indirekt (Antikörper-vermittelte Neutralisation) bestimmt werden. Ursprünglich wurde der Serotyp durch die Neutralisation von Dengueviren im Labor bestimmt. Da die Dengue-Diagnostik aber zunehmend durch Detektion und Sequenzierung der viralen RNA erfolgt, bleibt oft unklar, wie sich die humorale Immunantwort gegen die verschiedenen Dengueviren zusammensetzt.¹⁰ Um die ermittelten Serotypen beider Methoden besser vergleichen zu können, wurde der Serotyp, der virologisch mittels qRT-PCR bestimmt wurde, im Verlauf dieser Arbeit Virustyp genannt, und der Serotyp, der durch Analyse der Neutralisation bestimmt wurde, als die Neutralisationsprävalenz eines Serums bezeichnet. Für die Seren aus Kolumbien und Kambodscha waren die Daten zur virologischen Serotypisierung (qRT-PCR) größtenteils vorhanden. Mit diesen Seren konnte ein direkter Vergleich durchgeführt werden. Dazu wurden Seren im FRNT sowohl gegen vier WHO-Referenzisolate (heterologer Test) als auch gegen Patientenisolate aus Kambodscha (autologer Test) getestet.

Von 40 Dengue-positiv getesteten Patienten aus Kambodscha standen sowohl Akut- als auch Konvaleszenzseren zur Verfügung. Die Neutralisationsprävalenz gegen Dengue konnte daher in beiden Serumproben bestimmt werden. In Tab. 18 sind die einzelnen Neutralisationstiter im Vergleich zum Virustyp der Infektion dargestellt. Hier erkennt man, dass die Neutralisationsprävalenz nur in Ausnahmefällen mit dem Virustyp übereinstimmt (rot umrandete Werte). Diese Beobachtung gilt auch für die zweite Serumprobe aus der konvaleszenten Phase der Infektion. So wurde in der Gruppe der zehn qRT-PCR DENV1-positiven Serumpaare nur ein Serum (01-V0808303) identifiziert, dessen Neutralisationsprävalenz ebenfalls gegen DENV1 gerichtet war. Dieses Serum stammte von einem primär infizierten DENV-Patienten, denn das entsprechende Akutserum zeigte keine Neutralisation, und im Konvaleszenzserum konnte ausschließlich ein FRNT90-Titer von 20 für DENV1 gemessen werden. Innerhalb der zehn virologisch DENV2-positiven Serumpaare konnte nur ein Patient (Patient Nr. 12 Seren U0505193 U0505194) identifiziert werden, mit den und dessen Neutralisationsprävalenz und infizierender Virustyp gleich war (DENV2). Dieses Serumpaar zeigte aber keine signifikante Änderung der Neutralisationstiter aller Serotypen im Vergleich von Akut- und Konvaleszenserum. Für die qRT-PCR DENV3- und DENV4-positiven Serumpaare fand sich keine Übereinstimmung mit der gemessenen Neutralisationsprävalenz. Die Daten zeigten deutlich die Unterschiede der virologischen und serologischen Serotypisierung. Der maximale Neutralisationstiter in beiden Proben ist nicht gegen das Virus aus der Infektion gerichtet. Damit ergibt sich ein Unterschied über die diagnostische Aussage, abhängig von der verwendeten Methode der Serotypisierung.

Ähnliche Resultate wurden auch mit Seren aus Kolumbien erhalten. Von den 55 Seren waren 34 virologisch mittels qRT-PCR serotypisiert. Für drei dieser Seren konnte der Virustyp so jedoch nicht eindeutig bestimmt werden, da die virale RNA zweier Dengueviren gleichzeitig detektiert wurde (Daten in Anhang 9.4). Die 31 klar definierten Seren wurden ebenfalls mittels FRNT gegen die vier Dengueviren getestet. Lediglich für sechs Seren stimmte der DENV1 Virustyp mit der ermittelten Neutralisationsprävalenz DENV1 überein. Ein Serum gegen mit einer Neutralisationsprävalenz für DENV2 zeigte auch in der qRT-PCR den DENV2-Virustyp. Für alle anderen 24 Seren konnte keine Übereinstimmung von Virustyp und Neutralisationsprävalenz beobachtet werden. In Tab. 19 sind die Ergebnisse der beiden kolumbianischen und kambodschanischen Seren Untersuchungen mit den zusammengefasst.

Tab. 18	FRNT90-Titer und o	RT-PCR-Ergebnisse	e der Seren aus	Kambodscha
---------	--------------------	-------------------	-----------------	------------

Α	Analyse der Akutseren (1. Serumprobe)					
Virustyp	Patienten-	Patienten- Neutralisationstiter (FRNT90) *				
(qRT-PCR)	Serumnr.	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	
DENV1	01-V0805341	<20	<20	<20	<20	
	02-V0805342	320	<u>5120</u>	640	2560	
	03-V0805344	20	<u>320</u>	40	160	
	04-V0810307	<20	<20	<20	<20	
	05-V0817302	<20	<u>80</u>	20	<u>80</u>	
	06-V0817305	80	<u>1280</u>	80	640	
	07-V0817307	40	<u>320</u>	40	<u>320</u>	
	08-V0824323	320	160	<u>5120</u>	320	
	09-V0907301	20	80	<u>320</u>	80	
	10-V0907305	20	20	20	20	
DENV2	11-U0118191	<u>5120</u>	320	80	320	
	12-U0505193	40	<u>2560</u>	640	1280	
	13-U0602259	<u>1280</u>	640	160	640	
	14-U0728368	<20	160	<20	<u>1280</u>	
	15-U0804314	160	640	<u>1280</u>	<u>1280</u>	
	16-U0804315	40	1280	20	<u>2560</u>	
	17-U0804320	160	1280	<u>2560</u>	1280	
	18-U0817308	160	1280	<u>2560</u>	1280	
	19-U0820320	<u>160</u>	40	20	40	
	20-U0906314	<u>2560</u>	640	80	320	
DENV3	21-S0507106	160	<u>2560</u>	20	1280	
	22-S0521272	<u>5120</u>	1280	320	640	
	23-S0611058	<u>2560</u>	640	320	320	
	24-S0617049	320	<u>5120</u>	160	2560	
	25-S0709062	<u>5120</u>	2560	80	1280	
	26-S0806384	160	<u>5120</u>	160	2560	
	27-S0806390	<20	<u>320</u>	<20	40	
	28-S0806392	640	<u>5120</u>	40	<u>5120</u>	
	29-S0806394	<u>5120</u>	640	1280	320	
	30-S0903272	320	<u>10240</u>	320	5120	
DENV4	31-S0603245	<u>1280</u>	80	20	40	
	32-S0603242	<u>320</u>	40	<20	40	
	33-S0704059	640	320	<u>1280</u>	80	
	34-S0813311	40	<u>1280</u>	160	640	
	35-S1105091	<u>5120</u>	160	160	80	
	36-S1106598	160	160	<u>5120</u>	80	
	37-S1118223	<u>640</u>	20	20	40	
	38-U0708378	640	<u>20480</u>	320	5120	
	39-U0709319	640	1280	<u>5120</u>	2560	
	40-U0825418	10240	1280	640	1280	

Analyse der Akutseren	(1. Serumprobe)
-----------------------	-----------------

Virustvp	Patienten-	Neutralisationstiter (FRNT90) *				
(qRT-PCR)	Serumnr.	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	
DENV1	01-V0808303	20	<20	<20	<20	
	02-V0810302	640	<u>20480</u>	640	5120	
	03-V0810303	1280	20480	5120	5120	
	04-V0812302	20	<20	<20	<u>40</u>	
	05-V0817303	320	<u>2560</u>	160	2560	
	06-V0817306	320	5120	640	5120	
	07-V0822302	1280	20480	320	2560	
	08-V0824324	320	320	<u>5120</u>	320	
	09-V0907302	1280	2560	<u>20480</u>	640	
	10-V0909309	80	<u>640</u>	80	<u>640</u>	
DENV2	11-U0122153	<u>20480</u>	2560	1280	5120	
	12-U0505194	80	<u>2560</u>	640	1280	
	13-U0602260	<u>2560</u>	1280	160	1280	
	14-U0730303	<u>640</u>	160	40	320	
	15-U0805320	640	2560	<u>10240</u>	2560	
	16-U0805321	80	2560	40	<u>5120</u>	
	17-U0806316	640	2560	<u>20480</u>	2560	
	18-U0819305	320	2560	<u>5120</u>	2560	
	19-U0825317	<u>20480</u>	2560	1280	2560	
	20-U0907310	<u>10240</u>	5120	640	1280	
DENV3	21-S0509128	1280	<u>5120</u>	40	2560	
	22-S0521273	<u>5120</u>	2560	320	2560	
	23-S0611059	<u>10240</u>	2560	5120	5120	
	24-S0617051	5120	<u>20480</u>	1280	<u>20480</u>	
	25-S0709063	5120	<u>10240</u>	640	5120	
	26-S0806385	160	<u>5120</u>	320	5120	
	27-S0806391	40	<u>160</u>	<20	40	
	28-S0806393	640	<u>5120</u>	80	<u>5120</u>	
	29-S0806395	<u>5120</u>	320	1280	320	
	30-S0903273	1280	<u>5120</u>	320	<u>5120</u>	
DENV4	31-S0605087	<u>10240</u>	640	640	1280	
	32-S0606077	<u>10240</u>	<u>10240</u>	2560	1280	
	33-S0707114	<u>20480</u>	2560	<u>20480</u>	1280	
	34-S0820366	320	<u>5120</u>	2560	2560	
	35-S1106587	<u>20480</u>	1280	1280	640	
	36-S1117207	1280	640	<u>20480</u>	640	
	37-S1122025	<u>10240</u>	2560	1280	1280	
	38-U0708379	640	<u>20480</u>	640	10240	
	39-U0713301	640	1280	<u>20480</u>	2560	
	40-U0825419	20480	2560	1280	5120	

B Analyse der Konvalezenzseren (2. Serumprobe)

* Neutralisationsprävalenz (höchster, ermittelter FRNT90-Titer) unterstrichen und grau unterlegt

Der Serotypisierungsvergleich mit beiden Methoden führte zu dem Ergebnis, dass die Neutralisationsprävalenz sowohl in der akuten als auch in der konvaleszenten Phase der Infektion nur in wenigen Ausnahmefällen (7 von 111) mit dem Virustyp übereinstimmte (Tab. 19; 4x DENV1, 3x DENV2). In drei weiteren Fällen ergab sich eine teilweise Übereinstimmung bei doppelt positiven Seren mit gleich hohen FRNT90-Titern für DENV1 + DENV2 (ein Serum) und DENV1 + DENV3 (zwei Seren) in der Gruppe der kolumbianischen Seren (Tab. 19). Weiterhin auffällig war, dass die Neutralisationsprävalenz in den Seren mit einem identischen Virustyp deutlich unterrepräsentiert war (DENV1 und DENV2) oder sogar zu 100 % fehlte (DENV3 und DENV4) (Abb. 20).



Abb. 20 Vergleich des Virustyps und der Neutralisationsprävalenz in kambodschanischen Seren. Die Säulendiagramme zeigen den jeweiligen Anteil (%) der ermittelten Neutralisationsprävalenz DENV1 (blau), DENV2 (rot), DENV3 (grün), DENV4 (violett) der Verlaufsproben (Akutserum, S1; Konvalezenzserum, S2) von 40 Patienten (Tab. 18).

Serotypen*				
Neutralisationsprävalenz (FRNT90)	Virustyp (qRT-PCR)			
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
<u>Kolumbien (Σ = 31)</u>	<u>(n = 15)</u>	(n = 11)	(n = 1)	(n = 4)
DENV1	<u>3</u>	8	-	1
DENV2	3	<u>1</u>	-	3
DENV3	3	1	-	-
DENV4	2	1	-	-
DENV1 + DENV2	<u>1</u>	-	1	-
DENV1 + DENV3	<u>2</u>	-	-	-
DENV2 + DENV3	1	-	-	-
<u>Kambodscha (Σ = 80)</u>	<u>(n = 20)</u>	(n = 20)	(n = 20)	(n = 20)
DENV1	<u>1</u>	9	7	9
DENV2	6	<u>2</u>	9	4
DENV3	4	5	-	5
DENV4	1	3	-	-
DENV1 + DENV2	-	-	-	1
DENV1 + DENV3	-	-	-	1
DENV2 + DENV4	5	-	4	-
DENV3 + DENV4	-	1	-	-
DENV1-4	1	-	-	-
negativ	2	-	-	

Tab. 19 Vergleich der serologischen und virologischen Serotypisierung

* Übereinstimmungen von Virustyp und Neutralisationsprävalenz sind fett dargestellt

Für 33 weitere Seren aus Kambodscha waren Daten zum Virustyp vorhanden. Daher konnten diese Seren benutzt werde um einen Vergleich mit der Neutralisation von WHO- und IPC-Viren (Tab. 17, 3.2.2) durchzuführen. Alle diese Seren waren mit der qRT-PCR positiv auf DENV1 getestet wurden, aber keines zeigte den höchsten FRNT90-Titer gegen eines der zwei DENV1-Isolate aus Kambodscha (Tab. 20). Auch bei der Neutralisation mit dem WHO-DENV1 zeigten nur sieben Seren diese Neutralisationsprävalenz. Die Neutralisation innerhalb der WHO-Viren war für die meisten Seren gegen DENV2 gerichtet (39 %). Auch innerhalb der Virusisolate aus Kambodscha zeigten nahezu alle Seren (31 von 33) eine Neutralisationsprävalenz gegen DENV2 und/oder DENV3. Lediglich ein Serum wurde mit einer DENV4-Neutralisationsprävalenz diagnostiziert und für ein Serum konnte keine Neutralisation gegen die Kambodschaviren detektiert werden. Dies zeigte, dass bei der Verwendung von Virusisolaten aus dem Gebiet aus dem die Seren stammen, keine Übereinstimmung von Virustyp und Neutralisationsprävalenz im Serum beobachtet werden konnte (Tab. 20).

	<u>Neutralisa</u>	tionsprävalenz (FRNT)	Virustyp (gRT-PCR)	
	WHO	IPC		
DENV1	7	-	33	
DENV2	13	12	-	
DENV3	4	15	-	
DENV4	5	1	-	
DENV1 + DENV2	1	-	-	
DENV1 + DENV4	1	-	-	
DENV2 + DENV3	-	4	-	
DENV2 + DENV4	1	-	-	
> 2 Serotypen	1			
negativ	_	1	_	

Tab. 20 Serotypisierung von Seren mit virologischem DENV1-Nachweis

3.5 Vergleich der Neutralisationsdaten mit dem Antigentest

Die Neutralisationsprävalenz im Serum wurde durch den Neutralisationstest ermittelt. Zum Nachweis Serotyp-spezifischer Antikörper wurde auch ein spezieller Antigentest verwendet. In der Arbeitsgruppe wurden rekombinante ED3-Antigene entwickelt, die in ihrer denaturierten Form (ED3*) vermehrt Serotypspezifische Reaktivitäten mit Seren von DENV-Patienten zeigten (durchgeführt von Dr. M. Schreiber, K. Franzke und L. Klepsch). Deshalb wurden die Ergebnisse der Neutralisationsstudien mit denen des ED3*-Antigentests verglichen. Der Vergleich der Neutralisationsdaten mit den Ergebnissen des ED3*-Antigentests umfasste 70 Seren aus Vietnam. Es ergaben sich große Übereinstimmungen (96 %) zwischen beiden Methoden (Abb. 21). Lediglich für zwei Seren wurden unterschiedliche Serotypen ermittelt. Der Neutralisationstest wies jedoch eine deutlich höhere Sensitivität auf. Mittels Neutralisationstest konnte der Serotyp für 94 % der Seren bestimmt werden, wohingegen nur für 66 % der Seren eine positive Reaktivität im ED3*-Antigentest beobachtet werden konnte. Dennoch zeigten sich ähnliche Verteilungen bei den detektierten Serotypen (Tab. 21). Große Unterschiede zeigte jedoch der Anteil der DENV2-positiven Seren (im FRNT 33 %, im ED3*-Test 9 %, Tab. 21).



Abb. 21 Serotypisierung mittels ED3*-Antigentest und Neutralisationstest (FRNT) von Seren aus Vietnam. Der Graph zeigt den Anteil der ED3*-positiven Seren (n = 46) und die Verteilung der detektierten Serotypen ermittelt durch Neutralisationstest (blau) bzw. ED3*-Antigentest (rot). Eingerechnet wurden auch Seren, die gleiche Reaktivität gegenüber zwei verschiedenen Serotypen aufwiesen.

ED3*-Antigen		<u>Neutralisa</u>	tionsprävalenz_	Differenz
		ED3*	FRNT	FRNT-ED3*
negativ	DENV1	-	6	-
(n = 24)	DENV2	-	9	-
	DENV3	-	2	-
	DENV4	-	-	-
	DENV1 + DENV2	-	-	-
	DENV1 + DENV3	-	1	-
	DENV1 + DENV4	-	-	-
	DENV2 + DENV3	-	1	-
	DENV2 + DENV4	-	1	-
	DENV3 + DENV4			
	negativ	24	4	20
positiv	DENV1	17	17	-
(n = 46)	DENV2	6	14	8
	DENV3	4	8	4
	DENV4	4	2	2
	DENV1 + DENV2	-	2	2
	DENV1 + DENV3	5	-	5
	DENV1 + DENV4	-	1	1
	DENV2 + DENV3	6	-	6
	DENV2 + DENV4	1	2	1
	DENV3 + DENV4	-	-	-
	> 2 Serotypen	3	_	3

Tab. 21VergleichderSerotypisierungdurchED3*-AntigentestundNeutralisationstest (FRNT) für Seren aus Vietnam

FRNT-ED3*: Anzahl der Seren mit unterschiedlichen Serotypisierungsresultaten im FRNT und ED3*-Test

Um diese Ergebnisse zu bekräftigen wurden auch 120 Seren aus Kambodscha für den Vergleich der Serotypisierung mittels Neutralisationstest und ED3*-Antigentest herangezogen. Für 36 dieser Seren konnte keine Reaktivität mit den ED3*-Antigenen festgestellt werden. Beide Methoden lieferten nicht für alle Seren eindeutige Ergebnisse: der Neutralisationstest zeigte für elf Seren zwei Serotypen an, und der ED3*-Antigentest für neun Seren Reaktivitäten gegenüber zwei Serotypen sowie für 20 Seren Reaktivitäten gegenüber mehr als zwei Serotypen. Bei der Identifizierung des Serotyps für die übrigen 44 Seren zeigte sich eine 89 %ige Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden und somit keine signifikanten Unterschiede in der Serotypisierung (Abb. 22, Tab. 22). Die Detektion des DENV1-, DENV3- und DENV4-Serotyps zeigte für beide Methoden gleiche oder sehr ähnliche Ergebnisse.



Abb. 22 Serotypisierung mittels ED3*-Antigentest und Neutralisationstest (FRNT) der Seren aus Kambodscha. Der Graph zeigt den Anteil der ED3*-positiven Seren (n = 84) und die Verteilung der detektierten Serotypen ermittelt durch Neutralisationstest (blau) bzw. ED3*-Antigentest (rot). Eingerechnet wurden auch Seren, die gleiche Reaktivität gegenüber zwei verschiedenen Serotypen aufwiesen.

ED3*-Antigen		Neutralisationsprävalenz		Differenz	
		ED3*	FRNT	FRNT-ED3*	
negativ (n = 36)	DENV1	-	15	-	
	DENV2	-	5	-	
	DENV3	-	3	-	
	DENV4	-	4	-	
	DENV1 + DENV2	-	-	-	
	DENV1 + DENV3	-	1	-	
	DENV1 +DENV4	-	1	-	
	DENV2 + DENV3	-	-	-	
	DENV2 + DENV4	-	3	-	
	DENV3 + DENV4	-	1	-	
	> 2 Serotypen	-	1	-	
	negativ	36	2	34	
positiv (n = 84)	DENV1	15	22	7	
	DENV2	21	30	9	
	DENV3	14	15	1	
	DENV4	5	5	-	
	DENV1 + DENV2	2	2	-	
	DENV1 + DENV3	6	-	6	
	DENV1 + DENV4	-	1	1	
	DENV2 + DENV3	1	-	1	
	DENV2 + DENV4	-	8	8	
	DENV3 + DENV4	-	-	-	
	> 2 Serotypen	20	-	20	

Tab. 22VergleichderSerotypisierungdurchED3*-AntigentestundNeutralisationstest (FRNT) für Seren aus Kambodscha

FRNT-ED3*: Anzahl der Seren mit unterschiedlichen Serotypisierungsresultaten im FRNT und ED3*-Test

Um die Korrelation der Serotypisierung mittels Neutralisationstest und ED3*-Antigentest weiter zu untermauern, wurden Seren mit anderer geografischer Herkunft untersucht. Hierfür wurden die Neutralisationsdaten der 55 Seren aus Kolumbien mit den Ergebnissen des ED3*-Antigentests verglichen. Dabei konnte für 30 Seren kein Serotyp mittels ED3*-Antigentest ermittelt werden. Unter den 25 ED3*-positiven Seren befanden sich sechs, die gleichzeitig gegen DENV1 und DENV3 reagierten (Tab. 23). Weitere sieben Seren reagierten gegen die rekombinanten ED3*-Antigene von mehr als zwei Serotypen. Unter Beachtung der doppelt-positiven ED3*-Ergebnisse ergaben sich Übereinstimmungen der DENV1- und DENV4-Detektion zwischen ED3*- und Neutralisationstest (Abb. 23). Die Anzahl der ermittelten Seren mit DENV2 oder DENV3 als Serotyp unterschieden sich zwar zwischen beiden Methoden, die Differenzen waren jedoch nicht signifikant.



Abb. 23 Serotypisierung mittels ED3*-Antigentest und Neutralisationstest (FRNT) der Seren aus Kolumbien. Der Graph zeigt den Anteil der ED3*-positiven Seren (n = 25) und die Verteilung der detektierten Serotypen ermittelt durch Neutralisationstest (blau) bzw. ED3*-Antigentest (rot). Eingerechnet wurden auch Seren, die gleiche Reaktivität gegenüber zwei verschiedenen Serotypen aufwiesen.

ED3*-Antigen		Neutralis	ationsprävalenz_	Differenz
		ED3*	FRNT	FRNT-ED3*
negativ	DENV1	-	10	-
(n = 30)	DENV2	-	5	-
	DENV3	-	6	-
	DENV4	<u>-</u>	2	
	DENV1 + DENV2	-	2	-
	DENV1 + DENV3	-	2	-
	DENV1 + DENV4	-	-	-
	DENV2 + DENV3	-	2	-
	DENV2 + DENV4	-	-	-
	DENV3 + DENV4	-		-
	negativ	30	1	29
positiv	DENV1	4	8	4
(n = 25)	DENV2	3	6	3
	DENV3	3	7	4
	DENV4	2	1	1
	DENV1 + DENV2	6	2	4
	DENV1 + DENV3	-	-	-
	DENV1 + DENV4	-	-	-
	DENV2 + DENV3	-	-	-
	DENV2 + DENV4	-	1	1
	DENV3 + DENV4	-	-	-
	>2 Serotypen	7	_	7

Tab. 23VergleichderSerotypisierungdurchED3*-AntigentestundNeutralisationstest (FRNT) für Seren aus Kolumbien.

FRNT-ED3*: Anzahl der Seren mit unterschiedlichen Serotypisierungsresultaten im FRNT und ED3*-Test

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der ED3*-Antigentest zur Ermittlung des DENV-Serotyps und somit zur Detektion von DENV-Serotyp-spezifischen und neutralisierenden Antikörpern geeignet ist. Die Sensitivität des Antigentests lag mit 64 % deutlich niedriger als die des Neutralisationstests (97 %). Die Sensitivität des Antigentests korrelierte aber mit den FRNT90-Titern (Abb. 24). Seren, die keine Reaktivität gegen die ED3*-Antigene aufwiesen, zeigten signifikant geringere FRNT90-Titer(Abb. 24). Dieser Effekt war hochsignifikant für die FRNT90-Titer gegen DENV2 und DENV4 (p < 0,0001), sehr signifikant für die Titer gegen DENV1 (p = 0,0002), und signifikant für die FRNT90-Titer gegen DENV3 (p = 0,0376).



Abb. 24 Analyse der Neutralisationstiter von ED3*-negativen und ED3*-positiven Seren. Altman-Boxplot der FRNT90-Titer von 96 Seren ohne Reaktivität gegen die ED3*-Antigene und 155 Seren mit positiver Reaktivität gegen mindestens eines der ED3*-Antigene. Die Auftragung der Titer erfolgte logarithmisch. Die Unterschiede der FRNT90-Titer zwischen ED3*-negativen und ED3*-positiven Seren wurden für jedes der vier Dengueviren mittels Welch-Test analysiert. Signifikante Unterschiede der FRNT90-Titer wurden dabei für alle vier untersuchten DENV-Typen gefunden (* p < 0,05; ** p < 0,001; *** p < 0,0001).</p>

3.6 Denguevirus prM/E-pseudotypisierte HIV-1-Partikel

Um rekombinante DENV-Partikel für virologische Experimente, wie z.B. Neutralisationstests und Untersuchungen zum Virus-*entry* zu gewinnen, sollte ein System zur Herstellung von Dengue-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln etabliert werden. Die in dieser Arbeit verwendete Strategie orientierte sich an Arbeiten der Gruppe Wang.¹¹⁰ Dieses System basiert auf retroviralen Vektoren zur Produktion von *env*-deletierten, Replikations-inkompetenten HIV-1-Partikeln (pNL4-3-Luc-R⁻E⁻, pNL4-3-Luc-AM). Ziel war es, die HIV-1-Hüllproteine durch die der Dengueviren zu ersetzen. Partikel, welche von außen wie ein intaktes Virus erscheinen, aber sich nicht weiter vermehren können werden auch als VLPs bezeichnet (virusartige Partikel; *virus-like particles*). Solche Partikel tragen kein Genom, was von Nachteil ist, wenn man den Eintritt des Virus untersuchen möchte. Daher wurde das HIV-1 rekombinante System verwendet, welches auch ein Genom einschleust. Auf dem HIV-1-Genom befindet sich zusätzlich ein Reportergen für die Expression von Luciferase.

Für die Expression der DENV-Hüllproteine wurde der Expressionsvektor pcHA konstruiert (Abb. 25A). Die jeweiligen Sequenzen von prM/E für DENV1, DENV2, DENV3 und DENV4 wurden mit Hilfe von Oligonukleotiden von den entsprechenden cDNA-templates amplifiziert (Abb. 25B). Die prM/E-DNA-Fragmente von DENV1-4 wurden jeweils in pcHA kloniert (Abb. 25C). Die resultierenden Vektoren wurden als pcHAD1, pcHAD2, pcHAD3 und pcHAD4 (entsprechend dem Dengue-Serotyp) bezeichnet. Für die Induktion der Partikelbildung wurden zwei verschiedene Vektoren verwendet, die das Genom des HIV-1-Isolat NL4-3 tragen (Abb. 25D). Für die Pseudotypisierung wurde der pNL4-3-Luc-R⁻E⁻-Vektor benutzt, der mehrere Mutationen (*env*, *vp*, *nef*) und ein Gen für Luciferase besitzt (*Luc*). Dadurch wird eine Replikation ausgeschlossen, aber der Viruseintritt in die Wirtszelle kann durch die Expression der Luciferase gemessen werden. Eine gleichzeitige Transfektion des HIV-Vektors und z.B. des pcHAD1-Plasmids in eukaryotische Zellen (Abb. 25E) führt zur Bildung von HIV-1-Partikeln, die auf ihrer Oberfläche die DENV1-Hüllproteine tragen. Solche Partikel sind aufgrund der DENV-Proteine auf ihrer Oberfläche in der Lage, in **DENV-permissive** Zellen einzudringen (Abb. 25F). Die Vermehrung der pseudotypisierten Partikel in DENV-permissiven Zellen ist jedoch aufgrund der Mutationen im HIV-1-Genom prinzipiell nicht möglich (single-round infection).



Abb. 25 Klonierungsstrategie. (A) Die Konstruktion des Vektors pcHA erfolgte durch PvuII-Restriktionsverdau von pcDNA3.1/Hygro(+) und anschließender Ligation. (B) Um die Gene für prM/E zu erhalten wurde DENV-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels spezifischer Primer amplifiziert. (C) Die prM/E-Gene wurden in pcHA über die Schnittstellen KpnI und NotI kloniert. Für alle vier Serotypen wurde der entsprechende prM/E-Vektor hergestellt. (D) Für die Bildung der Partikel wurden NL4-3 basierende HIV-1-Vektoren verwendet, die ein Luciferase-Gen als Reporter (Luc^{\dagger}) tragen. (E) Die Ko-Transfektion mit pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ und z.B. pcHAD1 führt zur Bildung von Partikeln, die das HIV-1-Genom mit Luciferase als Reportergen enthalten und auf ihrer Oberfläche die DENV1-Proteine prM/E tragen. (F) Die prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikel können DENV-permissive Zellen infizieren. Die Infektion kann durch Messung der Luciferase-Aktivität in den Zellen gemessen werden.

3.6.1 Konstruktions des pcHA-Vektors

Für die Produktion von Dengue-pseudotypisierten HIV-Partikeln wurden zunächst die Expressionsvektoren für die jeweiligen prM/E-Gene der vier DENV-Serotypen hergestellt. Dafür wurde der Vektor pcHA konstruiert. Er ging aus dem Vektor pcDNA3.1/Hygro(+) durch *Pvu*II-Restriktionsverdau und Ligation des Ori-Amp-CMV-Fragments hervor (Abb. 26A). Da pcDNA3.1/Hygro(+) zwei Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Pvu*II trägt, entstanden durch den entsprechenden Restriktionsverdau (2.2.4) zwei Fragmente (3263 bp und 2334 bp), die im präparativen Agarosegel aufgetrennt wurden (Abb. 26A). Das größere der beiden Fragmente wurde aus dem Agarosegel isoliert (2.2.10) und anschließend ligiert (2.2.4). Dadurch entstand der Expressionsvektor pcHA mit 3263 bp. Dieser verkürzte Vektor (Abb. 26B) trägt noch den CMV-Promotor, das Ampicillinresistenzgen, die multiple Klonierungstelle (MCS), ein BGH-Polyadenylierungssignal und den pUC-Replikationsursprung (Ori).

3.6.2 Herstellung der Dengue-Expressionsplasmide

Für die Klonierung der prM/E-Genomabschnitte von DENV1-4 wurde zunächst virale RNA aus Zellkulturüberständen DENV-infizierter VeroB4-Zellen isoliert (2.2.1) und mittels randomisierter Hexamer-Oligonukleotide in cDNA umgeschrieben (2.2.2). Die DNA-Fragmente von DENV1-4 prM/E wurden jeweils mit Serotyp-spezifischen Primern, aus der entsprechenden cDNA als *template* amplifiziert (2.2.3.1, Abb. 26C). Das amplifizierte Fragment für jeden DENV-Serotyp bestand jeweils aus dem für prM/E-kodierenden DENV-Genomabschnitt sowie den vorangestellten 42 Nukleotiden des C-Gens, die für die Signalsequenz zur Translokation der Proteine ins ER kodieren. Die Fragmente wurden für die Sequenzierung in pJET (TA-Vektor) kloniert (2.2.5). Die Sequenzen dieser Plasmide wurden überprüft und Klone mit korrekter Sequenz wurden für die Klonierung in pcHA verwendet (Sequenzen in Anhang 9.3). Die Klonierung in pcHA erfolgte zwischen die Restriktionstellen *Kpn*I und *Not*I (2.2.5). Die Expressionsvektoren pcHAD1, pcHAD2, pcHAD3 und pcHAD4 wurden nach Klonierung und erneuter Überprüfung ihrer Sequenz für die Transfektion in eukaryotische Zellen verwendet.



Abb. 26 Herstellung der pcHAD1-4-Vektoren. (A) Durch PvuII-Restriktionsverdau von pcDNA3.1/Hygro(+) entstanden zwei Fragmente (2334 bp und 3263 bp). Das größere Fragment wurde aus dem Agarosegel isoliert und zum Vektor pcHA ligiert. (B) Der Größenunterschied von pcDNA3.1/Hygro(+) und pcHA wurde sowohl in ungeschnittener, zirkulärer Form (-KpnI) als auch in ihrer durch KpnI-Restriktionsverdau linearisierten Form (+KpnI) deutlich. (C) Die jeweiligen prM/E-DNA-Fragmente wurden mittels Serotyp-spezifischer Primer amplifiziert. Die annealing-Temperatur des Fragments (2189 nt) wurde mittels Gradienten-PCR ermittelt. Dabei ergaben sich unterschiedliche Temperaturen für jeden Serotyp: für DENV1 58°C, für DENV2 65°C, für DENV3 55°C, und für DENV4 56°C.

Zusätzlich zu den Expressionsplasmiden pcHAD(1-4), die jeweils für prM/E eines DENV-Serotyps kodieren, wurde ein chimäres Konstrukt aus DENV2- und JEV-Sequenzen hergestellt. Aus bereits publizierten Arbeiten war bekannt, dass chimäre Expressionskonstrukte aus DENV und JEV zu einer erhöhten Partikelsekretion führen.¹⁰⁸ Daher wurde am Beispiel von DENV2 ein chimäres Konstrukt hergestellt, dessen C-terminale DENV-Signalsequenz, downstream von der prM/E-Sequenz, und der stem/anchor-Bereich des E-Gens gegen die entsprechenden Sequenzen von JEV (Isolat SA-14) ausgetauscht wurden. Das für prM/E-kodierende DENV2-Fragment wurde aus dem Expressionsvektor pcHAD2 amplifiziert. Dabei wurden sowohl die N-terminale Signalsequenz als auch die stem/anchor-Region ausgespart. Die JEV-Fragmente (JEV-SS, JEV-SA, Abb. 27A) wurden durch assembly-PCR hergestellt (2.2.3.3) und komplementäre Überhänge wurden mittels PCR angefügt. Alle Fragmente (Abb. 27B), wurden im präparativen 1 % igen Agarosegel aufgetrennt (2.2.9), isoliert (2.2.10) und anschließend isothermal durch die Gibson-assembly-Methode in den NotI/KpnI geschnittenen Vektor pcHA kloniert (2.2.3.3). Auf diese Weise wurde das chimäre Konstrukt für die DENV2-prM/E-Expression (pcHAD2/JE) hergestellt. Die Identität des prM/E-inserts wurde mittels Sequenzierung überprüft (Sequenz in Anhang 9.3).

Ergebnis der Klonierungen war die Herstellung der folgenden Expressionsvektoren:

- 1.) pcHAD1 mit prM/E von DENV1 (Virus 16007)
- 2.) pcHAD2 mit prM/E von DENV2 (Virus ThNH81/93)
- 3.) pcHAD3 mit prM/E von DENV3 (Virus H87)
- 4.) pcHAD4 mit prM/E von DENV4 (Virus H241)
- 5.) pcHAD2/JE mit prM/E von DENV2 (Virus ThNH81/93), aber Signalsequenz und E-stem/anchor von JEV (Virus SA-14)



Herstellung des Expressionsvektors pcHAD2/JE. (A) Für die Konstruktion Abb. 27 des chimären Vektors wurden die drei DNA-Fragmente DENV2 prM/E (grün-rot), JEV-Signalsequenz (JEV-SS, gelb) und die JEV stem/anchor-Region (JEV-SA, rosa) hergestellt. Das für prM/E-kodierende Fragment wurde aus dem Expressionsvektor pcHAD2 amplifiziert. Die JEV-Fragmente wurden durch assembly-PCR aus überlappenden Oligonukleotiden hergestellt. (B) Analyse der drei amplifizierten DNA-Fragmente und des KpnI/NotI-geschnittenen Vektors pcHA (1%iges Agarosegel, JEV-SS, 137 bp; prM/E, 1686 bp; JEV-SA, 358 bp; pcHA, 3263 bp). Alle drei DNA-Fragmente wurden isothermal mittels Gibsonassembly in den geschnittenen pcHA-Vektor kloniert.

3.6.3 Transfektion der HIV-1-Vektoren

Die Transfektion der einzelnen HIV-Vektoren wurde separat getestet. Dabei wurden zunächst die Transfektionsreagenzien zur liposomalen Transfektion mehrerer Hersteller verglichen. Lediglich bei der Verwendung des *Screenfact A*-Reagenz (SFA; Genaxxon) konnten zuverlässige und wiederholbare Ergebnisse erzielt werden.

Zunächst wurde das auf HIV-1 basierende System der Partikelbildung untersucht. Um dieses zu überprüfen wurde die Bildung rekombinanter HIV-1-Partikel durch *trans*-Komplementation induziert. Funktionsfähige, rekombinante HIV-1-Partikel benötigen für die Infektion von HIV-permissiven Zellen auf der Partikeloberfläche die HIV-Proteine gp120 und gp41 (*env* kodiert den Polyprotein-Vorläufer gp160; Abb. 28A). Da die beiden verwendeten pNL4-3-Luc-Vektoren *env*-defizient (*env*⁻) sind, wurde eine Komplementation mit dem Expressionsvektor für gp160 vorgenommen (pgp160; Heiner Schaal, Uni-Düsseldorf).

Der pNL4-3-Luc-R⁻E⁻-Vektor exprimiert kein R-Protein (vpr⁻) und kein gp120/41 (env⁻), da sich jeweils eine frameshift-Mutation in diesen Genen befindet.^{133,134} Zusätzlich ist das kodierte HIV-1-Genom nef-defizient, da dieser Genomabschnitt gegen das Luciferase-Gen ausgetauscht wurde (Abb. 28B). Die Komplementation erfolgte mit dem env-exprimierenden Vektor pgp160 (Abb. 28C). Die so entstehenden Partikel waren Replikations-defizient, konnten jedoch in HIV-permissive Zellen eindringen (single-round infection). Dies wurde über die Messung der Luciferase-Aktivität in den infizierten Zellen nachgewiesen (2.4.2.2). Da der pNL4-3-Luc-R^{-E-}-Vektor für nef defizient war, wurde dessen Gen durch Komplementation mit dem Expressionsvektor pnef (Heiner Schaal; Universität Düsseldorf) ergänzt. Als Vergleich wurde der Vektor pNL4-3-Luc-AM (Alexandra Trkola, Universität Zürich) verwendet, dessen Phänotyp nef⁺, env⁻, Luc⁺ ist (Abb. 28B).¹³⁵ Bei pNL4-3-Luc-AM ist das Luciferase-Gen mit einem zusätzlichen SV40-Promotor in den env-Genomabschnitt inseriert. Die Herstellung der rekombinanten HIV-1-Partikel wurde in COS1- und HEK293T-Zellen vorgenommen. Die COS1-Zellen wurden verwendet, da aus der Literatur bekannt war, dass sie sich für die Herstellung von DEN-VLPs eignen.^{108,110} Zusätzlich wurden HEK293T-Zellen verwendet, da diese sich für die Transfektion und transiente Expression rekombinanter Proteine bewährt haben und in vielen VLP-Systemen angewendet werden.^{136–139}



Abb. 28 HIV-1-Vektorsystem. (A) Im HIV-1-Genom werden die Gene der einzelnen (Poly-)Proteine in mehreren ORFs kodiert. Dabei kodieren gag, pol und env für virale Strukturprotein und alle anderen Gene für akzessorische oder regulatorische Proteine. Das env-Gen kodiert für das Glycoprotein gp160, das gespalten in gp120 und gp41, auf der Oberfläche von HIV-Partikeln zu finden ist. (B) Der Vektor pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ kodiert für das HIV-1-Genom des Virusisolates NL4-3, ist jedoch durch frameshift-Mutationen (rot) defizient für vpr und env, sowie defizient für nef auf Grund der Insertion des Luciferase-Gens. Der Vektor pNL4-3-Luc-AM ist dagegen nur defizient für env, da dessen Leseraster durch eine Stopmutation (rot) und die Insertion des Luciferase-Gens mit einem voranstehenden SV40-Promotor (SV40P) zerstört wurde. (C) Zur Komplementation wurden zusätzlich Plasmide verwendet, die ausschließlich env (pgp160) oder nef (pnef) kodierten.

Die Vektor-Transfektionen wurden mit COS1und HEK293T-Zellen in 6well-Zellkulturplatten durchgeführt (10⁵ Zellen pro Kavität; 2.4.2.1). Dabei wurden pro Kavität und pro 1µg Plasmid jeweils 5 µl SFA verwendet. Nach 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, die transfizierten Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen (2.4.2.2). Die Zellkulturüberstände wurden zur Infektion von HIV-permissiven U87 CXCR4-Zellen sowie nicht-permissiven VeroB4-Zellen verwendet. Somit konnte überprüft werden, ob rekombinante HIV-1-Partikel sekretiert wurden. Diese können in die permissiven U87 CXCR4-Zellen eindringen und dort mittels Luciferase-Assay nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle dienten die nicht-permissiven VeroB4-Zellen, in welche die HIV-1-Partikel nicht eindringen können. Die Zellkulturüberstände wurden eine Stunde auf den entsprechenden Zellen belassen und anschließend durch Zellkulturmedium ersetzt. Nach 48 Stunden erfolgte die Analyse der Luciferase-Aktivität in den U87 CXCR4- und VeroB4-Zellen (2.4.2.2).

Luciferase-Aktivität konnte in COS1- und HEK293T-Zellen nachgewiesen werden, in die mittels liposomaler Transfektion die DNA eines pNL4-3-Luc-Vektors eingebracht worden ist (Abb. 29A). Dabei zeigte sich, dass pNL4-3-Luc-AM 10- bis 20-fach mehr Luciferase-Aktivität induziert als pNL4-3-Luc-R⁻E⁻. Diese erhöhte Expression des Luciferase-Enzyms wurde wahrscheinlich durch den SV40-Promotor verursacht, der im pNL4-3-Luc-AM-Vektor dem Luciferase-Gen vorangestellt ist, im pNL4-3-Luc-R⁻E⁻-Vektor jedoch fehlt (Abb. 29B). Ebenso zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der Transfektion in COS1- und HEK293T-Zellen. Die Transfektionen in COS1-Zellen resultierten in 20- bis 40-fach niedrigeren Luciferase-Aktivitäten als die Transfektionen in HEK293T-Zellen. Die trans-Komplementation mit env und/oder nef hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der Luciferase in den transfizierten Zellen. Bei der Dreifach-Transfektion von pNL4-3-Luc-R^{-E-}, pgp160 und pnef in HEK293T-Zellen 12-fach niedrigere Luciferase-Aktivitäten wurden gemessen als bei der Doppeltransfektion von pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ und pgp160, und 7-fach niedrigere Luciferase-Aktivitäten gemessen als bei der Transfektion von pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ allein. Dies deutete darauf hin, dass die Aufnahmefähigkeit der Zellen bei einer Transfektion von drei Plasmiden und somit 3 µg DNA in 10⁵ Zellen begrenzt war. Bei der Transfektion der drei Plasmide in COS1-Zellen konnten diese Unterschiede jedoch nicht beobachtet werden.

Die Zellkulturüberstände der COS1- und HEK293T-Zellen wurden für die Infektion von HIV-permissiven U87 CXCR4-Zellen sowie nicht-permissiven VeroB4-Zellen verwendet. Zwei Tage nach der Infektion wurde die Luciferase-Aktivität in den U87 CXCR4- und VeroB4-Zellen gemessen. Dabei konnte Luciferase-Aktivität wie erwartet nur nach Komplementation mit gp160 in den HIV-permissiven U87 CXCR4-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 29B). Die Luciferase-Aktivität wurde dabei als positiv angenommen, wenn die gemessenen relativen Lichteinheiten (relative light units, RLU) den threshold von 32,7 RLU überschritten. Der threshold-Wert wurde durch Messung der Luciferase-Aktivität in nicht-transfizierten bzw. uninfizierten Zellen ermittelt. In den VeroB4-Zellen konnte keine Luciferase-Aktivität gemessen werden. Dies zeigte, dass HIV-1-Partikel in den Zellkulturüberstand transfizierter COS1- und HEK293T-Zellen sekretiert wurden. Diese rekombinanten Partikel waren in der Lage HIV-permissive Zellen zu infizieren. Wie bereits bei der Transfektion, zeigte sich auch bei der Infektion in die permissiven U87 CXCR4-Zellen, dass pNL4-3-Luc-AM mehr Luciferase exprimiert als pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ (6- bis 10-fach höhere Luciferase-Aktivität; Abb. 29). Die Unterschiede zwischen Transfektionen in COS1- und HEK293T-Zellen zeigten sich auch bei den Infektionsversuchen mit U87 CXCR4-Zellen. Dabei induzierten die Zellkulturüberstände, die aus HEK293T-Zellen stammten etwa 6-fach höhere Luciferase-Aktivitäten als Partikel aus COS1-Zellen. Da die Partikelmenge in den Zellkulturüberständen nicht quantitativ bestimmt wurde, deutet dies darauf hin, dass HEK293T-Zellen mehr Partikel sekretieren als COS1-Zellen.





Abb. 29 Luciferase-Aktivitäten nach Vektor-Transfektion und Partikel-Infektion.
 (A) Messung der Luciferase-Aktivität in transfizierten COS1- (violett) und HEK293T-Zellen (grün) nach 48 Stunden. Zur Transfektion wurde je 1 μg der entsprechenden Plasmide (+) pro 10⁵ Zellen verwendet. (B) Messung der Luciferase-Aktivität in HIV-permissiven U87 CXCR4-Zellen sowie nicht-permissiven VeroB4-Zellen nach Infektion mit gleichen Volumina der Zellkulturüberständen von COS1- (violett) und HEK293T-Transfektionen (grün) nach 48 Stunden. Die ermittelten relativen Lichteinheiten (RLU) wurden logarithmisch aufgetragen. Die unterbrochene Linie kennzeichnet jeweils den *threshold* von 32,7 RLU.

Die verwendete Plasmidkonzentration für die Transfektion und die Menge an Transfektionsreagenz *Screenfect A* (SFA, Genaxxon) wurde am Beispiel des pNL4-3-Luc-R⁻E⁻-Vektors gemäß Herstellerangaben im 96*well*-Format für die verwendeten Zelllinien optimiert (Abb. 30). Die Luciferase-Aktivität wurde 48 Stunden nach der Transfektion gemessen. Für die Transfektion von pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ in COS1-Zellen ergab sich eine optimale Plasmidmenge von 80 - 90 ng bei Verwendung von 0,4 μ l SFA pro Kavität in einer 96*well*-Zellkulturplatte. Für die Transfektion in HEK293T-Zellen zeigten sich die besten Transfektionsergebnisse für 80 ng Plasmid und 0,3 - 0,4 μ l SFA. Eine gute Transfektionseffizienz für HEK293T-Zellen konnte auch bei geringer Plasmidkonzentration (50 ng) und niedriger SFA-Menge (0,2 μ l) beobachtet werden.



Abb. 30 Optimierung der Transfektionseffizienz am Beispiel pNL4-3-Luc-R⁻E⁻. Messung der Luciferase-Menge in transfizierten COS1- und HEK293T-Zellen nach 48 Stunden. Um die optimale Menge an Plasmid und Transfektionsreagenz *Screenfect A* (SFA) zu ermitteln, wurden jeweils unterschiedliche Mengen beider Komponenten in 96*well*-Zellkulturplatten verwendet. Die Luciferase-Aktivitäten sind in relativen Lichteinheiten (RLU) ermittelt worden.

3.6.4 Transfektion der pcHAD1-4-Vektoren

Die Expression der Vektoren pcHAD1-4, die jeweils für prM/E eines DENV-Serotyps kodieren, wurde in COS1- und HEK293T-Zellen überprüft. Dafür wurde die Expression der DENV-Proteine in den transfizierten Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mittels Focifärbung detektiert (2.4.5.2). Zunächst erfolgte die Transfektion von COS1-Zellen in 96 well-Zellkulturplatten mit unterschiedlichen Plasmidkonzentrationen und verschiedenen Mengen an Transfektionsreagenz (SFA) gemäß dem Optimierungsprotokoll des Herstellers (Abb. 31). Dabei zeigten sich Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den einzelnen Plasmiden. Für pcHAD4 wurden deutlich weniger Zellen detektiert, die die DENV-Proteine exprimieren, im Vergleich zu den anderen drei Plasmiden. Alle vier Plasmide zeigten hohe Expressionsraten bei der Verwendung hoher Plasmidkonzentrationen (90 - 100 ng) und großer Mengen an SFA $(0,5 - 0,7 \mu)$. Für pcHAD1 und pcHAD3 lieferten viele verschiedenen Bedingungen DENV-prM/E-exprimierende Zellen. Das pcHAD1-Plasmid induzierte hohe Expressionraten bei 50 ng Plasmid und 0,2 µl SFA, sowie bei 60 - 80 ng Plasmid und 0,3 - 0,5 µl SFA. Für pcHAD3 wurden für fast alle untersuchten Bedingungen hohe Expressionraten ermittelt, außer für die niedrige Plasmidkonzentration von 50 ng in Kombination mit hohen SFA-Mengen (0,5 - 0,7 μ l), sowie für hohe Plasmidkonzentrationen (80 - 100 ng) und 0,2 μ l SFA. Umgerechnet auf die Transfektion in 6well-Zellkulturplatten konnten alle Konstrukte bei niedriger Plasmidkonzentration von 1,5 µg und 6 µl SFA pro Kavität erfolgreich transfiziert werden, sowie bei sehr hohen Plasmidkonzentrationen von 2,7 - 3 µg in Kombination mit großen SFA-Mengen von 15 - 21 µl pro Kavität.

Nach der Optimierung erfolgte die Transfektion in COS1- und HEK293T-Zellen mit je 1,5 µg und 6 µl SFA in 6*well*-Zellkulturplatten. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mittels IFA gefärbt und auf DENV-Proteinexpression analysiert (2.4.5.3, Abb. 32). Die Färbung erfolgte mit Hilfe eines DENV-Patientenserums und anti-humanem FITC-Konjugat, was zur Grünfärbung von DENV-Protein-exprimierenden Zellen führte. Zusätzlich wurde mit dem Farbstoff *Evans Blue* gegengefärbt, um unerwünschte Färbungen und Autofluoreszenzen zu verringern. Dadurch konnten bei der Überlagerung der grünen FITC-Färbung und der roten *Evans Blue*-Färbung die Zellen, welche die DENV-Proteine exprimieren, eindeutig durch ihre grüne Färbung identifiziert werden. Unspezifisch gefärbte Zellen erscheinen dagegen in der Überlagerung beider Farbstoffe lediglich gelb (Abb. 32).

Beim direkten Vergleich der Transfektion in COS1- und HEK293T-Zellen zeigte sich, dass die Transfektion in HEK293T-Zellen effizienter war, auch weil mehr als doppelt so viele Zellen die Transfektionsprozedur überlebten. Für die HEK293T-Zellen blieb die Zelldichte nach der Transfektionsprozedur konstant, wohingegen sich die Zellzahl bei den COS1-Zellen halbierte. Zusätzlich zeigten die HEK293T-Zellen auch viel mehr prM/E-exprimierende Zellen. Auch die Unterschiede in der Transfektionseffizienz, die sich bereits bei den Optimierungsversuchen zeigten, konnten mittels IFA und der Transfektion in COS1- und HEK293T-Zellen bestätigt werden. Die Plasmide pcHAD1 und pcHAD4 wiesen geringere Transfektionsraten und somit weniger positive Zellen auf als die Transfektionen mit pcHAD2 und pcHAD3. Dabei zeigte besonders pcHAD3 mit 50 % DENV-positiven Zellen eine sehr hohe Transfektionseffizienz in HEK293T-Zellen.

Daher ist es von Vorteil bei zukünftigen Experimenten die HEK293T-Zellen zur reinen prM/E-Expression einzusetzen. Auch würden sich die exprimierenden Zellen für diagnostische Anwendungen eignen und die IFA bzw. die aufwendige Virusanzucht von DENV-Isolaten im BSL3-Sicherheitslabor ersetzen.

pcHAD1



pcHAD2

SFA



Negativkontrollen:



COS1-Zellen



pcHAD3





SFA



Abb. 31 Optimierung der Transfektionseffizienz von pcHAD1-4. Die Bilder zeigen mikroskopische Aufnahmen von pcHAD1-4 transfizierten Zellen 48h nach der Transfektion. Die Transfektion der DENV prM/E-exprimierenden Plasmide pcHAD1-4 in COS1-Zellen wurde für verschiedene Plasmidkonzentrationen (50 – 100 ng) und unterschiedliche Mengen Transfektionsreagenz SFA (0,2 - 0,7 µl) untersucht. Zellen, welche die **DENV-Proteine** exprimieren, wurden mittels Serotyp-spezifischer monoklonaler Antikörper detektiert.

COS1-Transfektion

HEK293T-Transfektion



Abb. 32 DENV prM/E-Expression in COS1- und HEK293T-Zellen nach Transfektion mit pcHAD1-4. Die Bilder zeigen mikroskopische Aufnahmen von prM/Eexprimierenden Zellen nach einer Transfektion mit pcHAD1-4 Vektoren. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion auf Objektträger übertragen und die exprimierten DENV-Hüllproteine mit Hilfe eines humanen DENV-Serums und einem anti-humanen, FITC-gekoppeltem, sekundären Antikörper grün gefärbt. Es erfolgte eine zusätzliche Gegenfärbung mit *Evans Blue*-Farbstoff (rot). Dadurch erschienen in der Überlagerung beider Farbstoffe Zellen mit DENV-Proteinexpression grün und unspezifisch gefärbte Zellen gelb. Als Kontrolle (mock) wurden nichttransfizierte Zellen verwendet.
3.6.5 Herstellung Dengue-pseudotypisierter HIV-1-Partikel

Die Ko-Transfektion jeweils eines pNL4-3-Luc-Vektors und eines der vier pcHAD1-4-Plasmide zur Herstellung der Partikel erfolgte sowohl in COS1-Zellen als auch in HEK293T-Zellen. Dabei wurde in einer 6*well*-Zellkulturplatte von jedem Plasmid 1 µg mit jeweils 10 µl SFA pro Kavität in 10⁵ Zellen transfiziert (2.4.2.1). Für die Induktion der Partikel wurden beide Vektoren, pNL4-3-Luc-R⁻E⁻-Vektor und pNL4-3-Luc-AM Vektor, getestet. Nach 48 Stunden wurden die transfizierten Zellen mittels IFA auf DENV-Proteinexpression überprüft (2.4.5.3). Die Zellkulturüberstände wurden für die Infektion von DENV-permissiven VeroB4-Zellen eingesetzt. Hierfür wurden die Überstände eine Stunde zur Adsorption auf den konfluenten VeroB4-Zellen belassen und anschließend durch Zellkulturmedium (DMEM suppl.) ersetzt. Nach weiteren 48 Stunden wurden die infizierten Zellen mit dem Luciferase-Assays getestet. Der Nachweis der Luciferase-Aktivität in den infizierten Zellen ließ auf eine erfolgreiche Infektion schließen. Damit konnte auch rückwirkend geschlussfolgert werden, dass sich pseudotypisierte Partikel im Zellkulturüberstand befanden.

In den ko-transfizierten Zellen konnte mittels IFA die DENV-Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 32). Dabei zeigten sich, wie bereits zuvor beobachtet, schlechtere Transfektionsraten und geringere Zelldichten der COS1-Zellen im Vergleich zu den HEK293T-Zellen. Die beiden verschiedenen pNL4-3-Luc-Vektoren verursachten keine Unterschiede in der DENV-Proteinexpression (Abb. 32). Die Ko-Transfektion von pcHAD3 bzw. pcHAD4 jeweils mit einem der pNL4-3-Luc-Vektoren in HEK293T-Zellen zeigte hohe Transfektionsraten von bis zu 50 %. Dagegen konnten nach der Ko-Transfektion von pcHAD1 bzw. pcHAD2 mit einem der pNL4-3-Luc-Vektoren.

Die Transfektion des Plasmides pnef als *trans*-Komplementation zu einem der vier pcHAD1-4-Vektoren und dem pNL4-3-Luc-R⁻E⁻-Vektor zeigte keine Auswirkungen auf die DENV-Proteinexpression in den transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

COS1-Transfektion			HEK293T-Transfektion			
.84%	199	de la	pcHAD1 + pNL-4-3-Luc-R ⁻ E ⁻			
	A.		pcHAD2 + pNL-4-3-Luc-R ⁻ E ⁻			
	No. 12		pcHAD3 + pNL-4-3-Luc-R ⁻ E ⁻			
			pcHAD4 + pNL-4-3-Luc-R ⁻ E ⁻			
			mock			
			pcHAD1 + pNL-4-3-Luc-AM			
		<u> </u>	pcHAD2 + pNL-4-3-Luc-AM			
		14/3	pcHAD3 + pNL-4-3-Luc-AM			
a. a. 34 6			pcHAD4 + pNL-4-3-Luc-AM			
anti-DENV- FITC	Evans Blue	Evans Blue + FITC		anti-DENV- FITC	Evans Blue	Evans Blue + FITC

Abb. 33 DENV prM/E-Expression in COS1und HEK293T-Zellen nach Ko-Transfektion mit pcHAD1-4 und pNL4-3-Luc-Vektoren. Die Bilder zeigen mikroskopische Aufnahmen von prM/E-exprimierenden Zellen nach einer Ko-Transfektion mit pcHAD1-4 und den HIV-Vektoren pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ bzw. pNL4-3-Luc-AM. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion auf Objektträger übertragen und die exprimierten DENV-Hüllproteine mit Hilfe eines humanen DENV-Serums und einem anti-humanen, FITC-gekoppeltem, sekundären Antikörper grün gefärbt. Es erfolgte eine zusätzliche Gegenfärbung mit Evans Blue-Farbstoff (rot). Dadurch erschienen in der Überlagerung beider Farbstoffe Zellen mit DENV-Proteinexpression grün und unspezifisch gefärbte Zellen gelb. Als Kontrolle (mock) wurden nicht-transfizierte Zellen verwendet.

Die Überstände der Ko- bzw. Tripel-Transfektionen (mit pnef) wurden zur Infektion von DENV-permissiven VeroB4-Zellen verwendet. Eine erfolgreiche Infektion wurde, wie zuvor schon beschrieben, über Luciferase-Aktivität in diesen Zellen nachgewiesen. Luciferase-Aktivität konnte für die Ko-Transfektion aller pcHAD1-4-Plasmide mit jeweils einem der pNL4-3-Luc-Vektoren detektiert werden (Abb. 34A). Dabei induzierten die Partikel, die durch pNL4-3-Luc-AM gebildet wurden, bis zu 100-fach höhere Luciferase-Aktivitäten als die durch pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ induzierten Partikel. Die Differenz schwankte jedoch für die verschiedenen pcHAD1-4-Plasmide und die unterschiedlichen Zelllinien, die für die Transfektion verwendet wurden (COS1- und HEK293T-Zellen). Trotz schlechterer Transfektionseffizienz der COS1-Zellen (3.6.4), induzierten diese Partikel höhere Luciferase-Aktivitäten in den infizierten VeroB4-Zellen als die Partikel aus den HEK-Transfektionen. Dies zeigte sich vor allem bei den DENV2-, DENV3- und DENV4-pseudotypisierten Partikeln, die durchschnittlich 9-fach höhere Luciferase-Aktivitäten induzierten, wenn sie aus COS1-Zellen stammten. Die Partikel aus der Transfektion von pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ und pnef ergaben höhere Luciferase-Aktivitäten in den infizierten VeroB4-Zellen. Dieser Effekt zeigte sich wesentlich deutlicher in Partikeln aus COS1-Zellen (6- bis 21-fach höhere Luciferase-Aktivitäten) als in den Partikeln aus HEK293T-Zellen (2-fach höhere Luciferase-Aktivitäten).

Die Bildung von chimären DENV2-JEV-Partikeln, induziert durch die Ko-Transfektion von pcHAD2/JE und einem der pNL4-3-Luc-Vektoren, wurde ebenfalls untersucht. Wie bei den anderen Partikeln wurden die Überstände sowohl aus COS1-Transfektionen als auch aus HEK293T-Transfektionen auf ihre Fähigkeit analysiert, DENV-permissive VeroB4-Zellen zu infizieren (Abb. 34B). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den DENV2-pseudotypisierten Partikeln ohne JEV-Anteil. Das System bietet für Grundlagen-orientierte Studien Vorteile. Insgesamt betrachtet wurden durch Ko-Transfektionen von 10⁵ Zellen (6*well*-Format) Partikel hergestellt, die für zwei bis vier Neutralisationsexperimente ausreichen. Daher ist es ein zukünftiges Ziel die Ausbeute der Partikelproduktion zu erhöhen.



Abb. 34 Infektion mit prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln. VeroB4-Zellen wurden eine Stunde mit Zellkulturüberständen von transfizierten COS1-(violett) und HEK293T-Zellen (grün) inkubiert. Nach 48h wurde die Luciferase-Aktivität in RLU (relative Lichteinheiten) gemessen. Die unterbrochene Linie kennzeichnet jeweils den *threshold* von 32,7 RLU. (A) Ergebnisse der Partikel, die durch Ko-Transfektion von pcHAD1-4 und pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ bzw. pNL4-3-Luc-AM hergestellt wurden. Zusätzlich wurde der Einfluss des HIV-Proteins Nef analysiert, indem pcHAD(1-4), pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ und pnef transfiziert wurden. (B) Ergebnisse der Infektion von VeroB4-Zellen mit chimären DENV2-JEV-Partikeln. Diese Partikel entstanden durch Ko-Transfektion von pcHAD2/JE und jeweils einem der pNL4-3-Luc-Vektoren (pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ bzw. pNL4-3-Luc-AM).

4 Diskussion

4.1 DENV-pseudotypisierte Partikel

Pseudotypisierte umhüllte Partikel eignen sich besonders zum Studium der Virusaufnahme (*viral entry*) und deren Inhibition. Sie vermehren sich nicht in Zellen und können keinen vollständigen Viruszyklus durchlaufen, sondern verursachen eine *single-round infection*. Von außen sehen sie wie intakte Viren aus, binden mit den Hüllproteinen der jeweiligen Virusvarianten an die zellulären Rezeptoren und fusionieren dann mit der Wirtzellmembran. Dadurch gelangt das virale Genom aus dem Partikel in die Zelle.

Pseudotypisierte Partikel sind von Vorteil, wenn virale Hüllproteine auf die Effizienz ihres Viruseintritts untersuchen werden sollen. Ein weiterer Vorteil solcher Partikel ist, dass sie im Unterschied zu VLPs ein Genom tragen, in dem die eigentlichen Hüllproteine deletiert sind, und in dem sich zusätzlich ein Reportergen befindet. Als Reporter werden z.B. Luciferase oder GFP benutzt. Damit kann der Eintritt eines einzelnen Viruspartikels in eine Zelle detektiert werden. Ein solches System erlaubt dadurch die quantitative Analyse der Virusaufnahme in Abhängigkeit des zu untersuchenden Hüllproteins.

Verschiedene lentivirale Vektoren von MLV (murines Leukämie-Virus), SIV (simianes Immundefizienz-Virus) und HIV haben sich für die Herstellung pseudotypisierter Partikel bewährt. Am bekanntesten sind die Pseudotypen der gemischten HIV-1 oder SIV-Varianten, sowie von Chimären wie SHIV¹⁴⁰ oder MLV/HIV-1.¹⁴¹ Neben den reinen retroviralen Pseudotypen gibt es auch pseudotypisierte Partikel mit viralen Hüllproteinen anderer Viren wie z.B. von VSV (vesicular stomatitis virus),142,143 Hepatitis C Virus¹⁴⁴ und Ebolavirus.¹⁴⁵ Ein System für die Herstellung von DENV prM/E-pseudotypisierten Partikeln mit einem Reportergen hat sich in der Flavivirus-Forschung bisher nicht etabliert. Daher werden meist nur Bindungsstudien mit DEN-VLPs durchgeführt, um zum Beispiel humane monoklonale Antikörper zu charakterisieren.^{26,105} Neben vereinfachten einem stark System mit ED3-pseutotypisierten HIV-1-Partikeln,¹⁴⁶ die nur Teile des DENV E-Proteins exponieren, findet sich in der wissenschaftlichen Literatur nur eine Arbeit aus dem Jahr 2007, die fusions-kompetente, DENV-pseudotypisierte HIV-1-Partikel beschreibt.¹¹⁰ Mit dieser von Hu et al. veröffentlichten Methode ist die beschriebene Herstellung der

Partikel reproduzierbar, führte aber zu sehr geringen Partikel-Ausbeuten. Daher war eine Verwendung der in dieser Arbeit vorgestellten Neutralisationsstudien (3.2) mit der von Hu et al. beschriebenen Methode nicht möglich. Die Untersuchungen der DENV-Neutralisation dieser Arbeit waren umfangreich, da die Kooperationspartner (z.B. IPC) nicht nur eine ausreichende Menge an humanen Seren, sondern auch entsprechende Volumina zur Verfügung (500 µl) stellten. So basieren die Daten in Tab. 18 zum Nachweis der Neutralisationsprävalenz in kambodschanischen Seren auf 320 Neutralisationstests mit den vier Denguevirus Serotypen (DENV1-4). Auch die Daten in Tab. 19 beruhen auf sehr vielen Neutralisationsexperimenten (396 Teste mit 12 verschiedenen Viren). Insgesamt wurden mehr als 1600 einzelne Neutralisationstests durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurde eine Virusmenge von ca. 8.10⁶ ffu pro untersuchtem Denguevirus hergestellt. Eine solche Menge an DENV-pseudotypisierten Partikeln konnte mit dem System nach Hu et al. nicht produziert werden. Deshalb wurden Experimente zur Verbesserung der Partikelbildung durchgeführt und für die Neutralisationsstudien wurden Virusüberstände von infizierten Zellkulturen verwendet.

Da ein Pseudotypen-System für die Dengueforschung im Allgemeinen sehr wichtig ist, wurde an der Verbesserung dieses Systems gearbeitet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde (i) die Transfektion und Expression von DENV1-4 prM/E in eukaryotischen Zellen optimiert, (ii) ein verbesserter retroviraler Vektor verwendet und (iii) die Funktion des HIV-1 Nef-Proteins auf die Infektiosität der pseudotypisierten Partikel überprüft.

Um die Menge an sekretierten Partikeln zu erhöhen, wurde die Expression der Denguevirus-Proteine prM und E optimiert. Zum einen erfolgte die Transfektion zusätzlich zu COS1-Affennierenzellen auch in humanen HEK293T-Zellen. Dadurch wurde die Expression nicht nur, wie in Hu *et al.* beschrieben, in COS1-Zellen etabliert, sondern auch in HEK293T-Zellen (Abb. 32). Die HEK293T-Zelllinie wurde ausgewählt, da sie sich für die Produktion verschiedenster VLPs bewährt hatte.^{106,109} Die Expression in HEK293T-Zellen führte zu höheren Transfektions- und Expressionraten im Vergleich zu COS1-Zellen. Überraschenderweise induzierten jedoch die Partikel aus COS1-Zellen höhere Luciferase-Aktivitäten als die aus HEK293T-Zellen. Dies deutet daraufhin, dass COS1-Zellen, trotz geringerer prM/E-Expressionsrate, mehr rekombinante Partikel sekretieren oder die produzierten Partikel effizienter in VeroB4-Zellen aufgenommen werden können. Es könnte auch daraufhin deuten, dass sekretierte Partikel aus HEK293T-Zellen außerhalb der Zellen fragiler sind als Partikel aus COS1-Zellen. Ähnliches wurde für die Produktion von Influenza-VLPs in HEK293T-Zellen beobachtet.¹⁴⁷

Um das System der pseudotypisierten Partikel weiter zu verbessern, wurden verschiedene pNL4-3-Luc-Vektoren verwendet. Der bei Hu et al. verwendete pNL4-3-Luc-R⁻E⁻-Vektor ist defizient für nef, da dieses Gen durch das Reportergen für Luciferase ersetzt wurde.^{133,134} Durch *frameshift*-Mutationen im vpr- und env-Gen wird kein R-Protein und kein gp160 exprimiert. Der Vektor hat daher den vpr, env doppelt-negativen Phenotyp. Die Expression von gp160 in trans führte zu intakten, infektiösen HIV-1-Partikeln mit dem defekten Genom (vpr, env). Da der pNL4-3-Luc-R^{-E-}-Vektor ebenfalls *nef*-defizient ist wurden Experimente mit einem Vektor durchgeführt der das Nef-Protein exprimiert. Durch trans-Komplementation von nef konnte dessen wichtiger Einfluss auf die Infektiosität der pseudotypisierten Partikel bestätigt werden. Dieser Effekt war bereits für HIV-1-Partikel bekannt.¹⁴⁸ Da pNL4-3-Luc-R⁻E⁻ Mutationen in vpr und nef trägt und beide Faktoren wichtig sind für die Bildung infektiöser HIV-1-Partikel, wurde ein weiterer Vektor, pNL4-3-Luc-AM, getestet. Der pNL4-3-Luc-AM-Vektor ist nef⁺ und lediglich env-defizient, da die Luciferase in den Bereich der gp120 kodierenden Region inseriert wurde.¹³⁵ Zusätzlich steht in diesem Vektor das Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors, der die Expression des Enzyms erhöht,¹⁴⁹ und von der Regulation und Expression der HIV-1-Produkte unabhängig macht. Der Vorteil des pNL4-3-Luc-AM-Vektors ist, dass er außer der env-Deletion keine Veränderungen hat, die Gene und Genprodukte betreffen, die für den Lebenszyklus und die Bildung der HIV-1-Partikel wichtig sind, wie z.B. den beiden HIV-1-akzessorischen Faktoren Nef und R (nef^+ , vpr^+).

Durch all diese Verbesserungen stellte sich die Produktion von DENVpseudotypisierten Partikeln mit dem pNL4-3-Luc-AM-Vektor als das optimalste System heraus. Mit der Kombination aus pcHA-Vektoren für DENV1-4 prM/E und dem pNL4-3-Luc-AM-Vektor wurden Partikel hergestellt, mit denen um eine log-Stufe höhere Infektionsraten erreicht wurden als mit Partikeln nach der Methode von Hu *et al.* (Abb. 34). Insgesamt betrachtet wurde ein System etabliert, um DENV-pseudotypisierte Partikel für viral entry-Experimente mit allen vier DENV-Serotypen durchführen zu können. Da durch die Optimierungen höhere Infektionsraten erreicht wurden, lässt sich mit diesem System experimentell in einem kleinen Maßstab arbeiten. Mit dem etablierten, verbesserten System können aus der Tranfektion einer 6*well*-Zellkulturplatte DENV-Pseudopartikel für ca. 10-15 Neutralisationsexperimente hergestellt werden.

Die optimierte prM/E-Expression führte zu Zellkulturen, in denen die DENV-Antigene leicht mit entsprechenden Antikörpern detektiert werden können (Abb. 33). Diese Eigenschaft kann für die Antikörper-Diagnostik sehr nützlich sein, da nur mit den Hüllproteinen der Viren und nicht mit den infektiösen Viren selbst gearbeitet wird. Dadurch ersetzt die prM/E-Expression die Virusanzucht für diagnostische Zwecke unter BSL3-Laborbedingunen. Die optimierte prME/-Expression kann außerdem zur Herstellung von DEN-VLPs genutzt werden. Solche DEN-VLPs eignen sich für die Antikörper-Diagnostik, z.B. als Antigene im ELISA. Eine solche Anwendung wurde für VLPs von JEV¹⁵⁰ und WNV¹⁵¹ bereits publiziert. Ebenso können VLPs als Alternative zu attenuierten Lebendimpfstoffen dienen, da rekombinante VLPs deutlich sicherer und einfacher herzustellen sind. Eine solche Strategie wurde bereits erfolgreich für die Herstellung von Impfstoffen gegen das humane Papillomavirus ¹⁵², Hepatitis B-Virus

Ein genereller Unterschied bei der Partikelbildung von DENV und HIV-1 ist der Ort der eigentlichen Bildung der Partikel (Partikel-*assembly*). DENV-Partikel bilden sich direkt nach der Translation der prM- und E-Proteine im ER-Lumen und werden anschließend sekretorisch aus der infizierten Zelle ausgeschleust.^{7,33} Bei HIV-1 dagegen werden die Hüllproteine (gp120 und gp41) zunächst auch in die ER-Membran eingebettet, dann aber sekretorisch zur Plasmamebran transportiert und befinden sich dann auf der Zelloberfläche. Bei HIV-1 erfolgt erst dann die Ausbildung der Partikel an der Plasmamembran durch angelagerte Gag- und GagPol-Polyproteinen (*assembly*) und der Abtrennung der Partikel von der Zelle (*budding*).¹⁵⁷ Dieser essentielle Unterschied im Mechanismus der Partikelbildung führt eventuell zu der niedrigen Ausbeute an DENV-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln im Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen. Die Optimierung der prM/E-Expression führte dadurch eventuell nicht zum gewünschten Effekt. Ein möglicher Lösungsansatz könnte die Verminderung der Sekretionsfähigkeit sein. Aus der wissenschaftlichen Literatur ist bekannt, dass schon der Austausch einer der zwei E-Transmembrandomänen von TBEV gegen JEV zu einer verminderten Sekretion von VLPs führt.¹⁵⁸ Eine solche Verminderung der prM/E-Partikelbildung könnte zu induzierten einer höheren Konzentration von DENV-Hüllproteinen auf der Zellmembran führen. Diese können dann mit einer höheren Effizienz in die durch HIV-1-Gag/GagPol induzierten Viruspartikel eingebettet werden. Ziel zukünftiger Experimente wäre daher, eine Möglichkeit zu finden, die zu einer höheren Expression von prM/E auf der Zelloberfläche und nicht in der Zelle führt. Neben den serologisch-diagnostischen Anwendungen sind die Expressionsvektoren in Kombination mit retroviralen Vektoren ein wichtiges Instrument zur Studie des viral entry bei Flaviviren. Neben DENV1-4 sind Untersuchungen an anderen Flaviviren wie JEV, WNV, TBEV und dem Zikavirus von großer Bedeutung. Auch für diese Viren kann das etablierte System der pseudotypisierten Partikel angewendet werden. Alle diese Flaviviren haben die gleiche Grundstruktur des E-Proteins, die Drei-Domänen-Struktur aus ED1, ED2 und ED3 (Abb. 2).

Außerdem erlaubt das Pseudotyp-System die Studie von chimären E-Proteinen. So könnten z.B. Epitope von DENV-Serotyp-spezifischen Antikörpern in das E-Protein eines nicht-humanpathogenen Flavivirus wie dem Usutuvirus übertragen werden. Damit ließe sich die Bedeutung dieser Epitope für die Pathogenese des Denguefiebers genauer studieren. Mit der Konstruktion chimärer DENV-Pseudotypen eröffnet sich ein komplett neues Feld zur Studie der E-Proteinfunktion. Mit den heutigen Klonierungsmethoden (*assembly*-PCR und Gibson-Klonierungstechnik) lassen sich, wie in der Arbeit am Beispiel der DENV2-JEV-Chimäre gezeigt, sehr leicht alle erdenklichen chimären Kombinationen der Flaviviren herstellen sowie gezielte Mutationen einführen. Von der technischen Seite her betrachtet gibt es keine Einschränkungen für die Konstruktion von E-Proteinvarianten, die dann als Teil eines pseudotypisierten Partikels funktional z.B. auf Immunogenität, Rezeptorbindung oder den Einfluss der N-Glykosylierung auf den Viruseintritt getestet werden können.

Ein Resultat der Neutralisationsstudien ist, dass der von der WHO empfohlene, heterologe Neutralisationstest Widersprüche aufwirft, wenn die Untersuchung der Neutralisationsprävalenz mit Viren aus den endemischen Regionen durchführt wurde aus der auch die Patientenserum stammten (autologe Neutralisationstests, 3.2.2). Für

Vergleichbarkeit der Neutralisationsdaten wird empfohlen, eine nur gut charakterisierte Viren eines bestimmten Sets (WHO-Referenzisolate) zu verwenden, die bereits seit Jahrzenten für Forschungszwecke verwendet werden.^{94,159} Solche Viren, die über längere Zeit in vitro kultiviert wurden, bezeichnet man auch als Zellkultur-adaptierte Viren oder Laborstämme. Die Daten dieser Arbeit haben deutlich gezeigt, dass bei der Verwendung von Viren, die aus dem gleichen Endemie-Gebiet stammen wie die Patientenseren, die Neutralisationsprävalenz nie mit dem infizierten Virustyp übereinstimmt. Dies wurde durch die autologen Neutralisationstests mit insgesamt acht DENV-Patientenisolaten aus Kambodscha deutlich (Tab. 20). Die gleichen Resultate wurden in einem heterologen Neutralisationstest mit 40 Patientenseren aus der Akut- und Kovalenzenzphase beobachtet (Tab. 18). Betrachtet man diese Ergebnisse, kommt man zu dem Schluß, dass das Wechselspiel zwischen Mensch und Virus nicht nur mit Viren aus der endemischen Region getestet werden muss, sondern auch mit den Viren, die aktuell im Menschen vorhanden sind. Dies wäre eine vollständig autologe Kombination von einem Serum und einem Virus aus dem gleichen Patienten. Rein praktisch ist dies aber nur sehr schwer durchführbar. In der Realität besteht das Problem der Virusisolation aus Patientenblut. Dafür muss dem Patienten eine ausreichende Blutmenge entnommen werden. Da aber in vielen endemischen Gebieten, wie z.B. Kambodscha, hauptsächlich Kleinkinder vom Denguefieber betroffen sind, kann man eine solche Maßnahme aus ethischen und sozialen Gründen nicht durchführen, da nicht mehr Blut abgenommen werden darf, als für die reinen diagnostischen Untersuchungen benötigt wird. Die Virusanzucht in Moskitozellen hat sich zwar bewährt,⁸² gelingt aber bspw. für Viren des DENV4-Serotyps nicht immer und ist daher keine zuverlässige Methode.⁸⁰ Außerdem kann bei solchen Virusanzuchten nicht ausgeschlossen werden, dass sich das Virus durch die in vitro-Kultivierung an die Zellen anpasst und seinen Phänotyp ändert. Da die Blutentnahme v.a. bei Kleinkindern nicht immer praktizierbar ist, hat sich zur Diagnostik des Serotyps in Kambodscha (IPC) die Aufnahme des Patientenblutes durch im Labor-gezüchtete Moskitos etabliert.⁸³ Nach der Blutmahlzeit kann das Virus aus der Stechmücke isoliert und sequenziert werden. Durch diese erleichterte Virusisolation wurden am IPC bereits mehrere hundert DENV-Sequenzen erhalten. Solche Datenbanken mit E-Proteinsequenzen von Patientenviren sind eine sehr gute Basis für die Konstruktion von pseudotypisierten Partikeln mit individuellen Virussequenzen, die den DENV-Patientenisolaten genau entsprechen. Zusätzlich zur Umgehung einer komplizierten Virusanzucht, bietet die Verwendung von DENV-pseudotypisierten Partikeln einen weiteren, entscheidenden Vorteil gegenüber angezüchteten Wildtyp-Viren. Die direkt aus den infizierten Moskitos isolierten Viren konnten sich nicht an die Moskitos oder die Zellen, die für die Anzucht verwendet wurden, anpassen. Pseudotypisierte Partikel zeigen somit keine Mutationen aufgrund einer Zellkulturadaption, was sonst bei der Verwendung von Virusisolaten ein stetiges Problem darstellt.^{160–162}

Die aus Patientenviren gewonnenen Virussequenzen können direkt für die Produktion DENV-pseudotypisierter Partikel genutzt werden. So können ganze Bibliotheken von verschiedenen Partikeln entstehen und zur Untersuchung von Patientenseren verwendet werden. Die verschiedenen pseudotypisierten Viruspartikel repräsentieren die unterschiedlichen Sero- und Genotypen, sowie spezielle Virusvarianten von Patienten. Die Variabilität und einfache Herstellung von Mutanten stellt den entscheidenden Vorteil des retroviral-basierten Pseudopartikelsystems gegenüber den herkömmlichen Neutralisationstests mit Wildtyp-Viren dar.

4.2 Neutralisationsanalyse von DENV-Patientenseren

Die Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern in 280 Seren mit Hilfe des foci reduction neutralization test (FRNT) zeigte große Unterschiede zwischen den Patientenseren in Abhängigkeit von der Herkunft der Patienten und ihrem DENVspezifischen Immunstatus. Patienten aus hyperendemischen Ländern (Kambodscha, Vietnam, Kolumbien) wiesen deutlich höhere FRNT90-Titer auf als Patienten aus dem DENV-endemischen Burkina Faso oder als deutsche Reiserückkehrer (3.2.1). Auch der Unterschied der Antikörpertiter zwischen Patienten mit primärer und sekundärer DENV-Infektion war signifikant (Abb. 15). Die Bestimmung der FRNT90-Titer gegen DENV1-4 ermöglichte die Ermittlung der Neutralisationsprävalenz. Diese wurde definiert als das Virus, gegen das die höchste neutralisierende humorale Immunantwort (gemessen als FRNT90-Titer) gerichtet Die war. Neutralisationsprävalenzen der Patientenseren stimmten mit den epidemiologischen Beobachtungen aus den jeweiligen Ländern überein. All diese Untersuchungen zeigten, dass der FRNT zuverlässig die Neutralisationstiter in DENV-Patienten ermitteln kann, weshalb diese Art der serologischen Untersuchung immer noch der WHO-Standard für die Messung neutralisierender Antikörper darstellt.⁷⁸ Eine solche serologische Diagnostik wird verwendet als Labordiagnostik für akut infizierte Patienten, in epidemiologischen Seroprävalenz-Studien und zur Ermittlung der Immunantwort in Menschen und Tieren z.B. bei Impfstoffstudien.

Von besonderer Bedeutung war die Durchführung autologer Neutralisationstests. Dabei wurde zur Neutralisation acht verschiedene kambodschanische Viren (isoliert Patienten zwischen 1998 und 2007), und Seren kambodschanischer aus DENV-Patienten aus den Jahren 2008 bis 2012 verwendet. Dadurch stammten sowohl die verwendeten Viren als auch die Seren aus dem gleichen endemischen Gebiet. Für die Neutralisationsuntersuchungen wurden acht verschiedene IPC-Viren zusätzlich zu den vier WHO-Referenzviren verwendet, wodurch insgesamt 480 Neutralisationsexperimente durchgeführt wurden. Die Neutralisation unter diesen autologen Bedingungen ist zuvor noch nie untersucht worden. Die Abb. 16 zeigt die Unterschiede der Neutralisationstiter gegen die verschiedenen autologen DENV-Patientenisolate (IPC-Viren) als auch gegen die WHO-Referenzisolate. Die FRNT90-Titer gegenüber DENV2 unterschieden sich kaum zwischen den drei verschiedenen Virusisolaten und die gemessenen Titer gegen DENV3 waren deutlich höher für die Kambodscha-Viren als gegen das WHO-Referenzvirus. Dagegen waren die FRNT90-Titer für DENV1 und DENV4 bei allen Seren gegenüber dem jeweiligen WHO-Referenzisolat höher als gegenüber den Kambodscha-Viren. Dies war besonders interessant, da diese Untersuchung mit kambodschanischen Seren von Patienten mit einer gesicherten DENV1-Infektion durchgeführt wurde. Diese Patienten durchliefen also eine symptomatische Erkrankung ausgelöst durch DENV1 (bestätigt durch qRT-PCR), zeigten aber in der frühen Konvaleszenzphase ausgerechnet gegen die autologen DENV1-Viren aus ihrem Land deutliche geringere Neutralisationstiter als gegen das WHO-Referenzvirus. Diese Diskrepanz wird untermauert durch den Vergleich der Neutralisationsprävalenz mit dem Virustyp der Infektion, gezeigt in Tab. 20. Dabei zeigte keiner der Patienten eine Neutralisationsprävalenz gegen die DENV1 Viren aus Kambodscha. Diese unzureichende Neutralisation der autologen Viren könnte ein Grund sein, warum diese Personen symptomatisch an einer DENV1-Infektion erkrankten.

Der gravierende Unterschied zwischen Neutralisationsprävalenz und Virustyp konnte auch mit 80 weiteren Patientenseren gezeigt werden. Dabei wurde jeweils ein Akutund ein Konvaleszenzserum von 40 kambodschanischen DENV1-4-Erkrankten auf ihre Neutralisation gegen vier WHO-Referenzviren untersucht. Wie in Tab. 18 zu sehen, konnte nur bei zwei Patienten eine Übereinstimmung von Neutralisationsprävalenz und infizierendem Virustyp beobachtet werden. Alle anderen 38 Patienten zeigten Neutralisationsprävalenzen gegen andere Virustypen als den Virustyp der aktuellen Infektion (gemessen mit qRT-PCR). Wie bereits bei den autologen NTs führt auch dies zur Hypothese, dass die unzureichende Neutralisation des infizierenden Virustyps ein Grund für die symptomatische Erkrankung dieser Pateinten sein könnte.

Der in der akuten Infektionsphase durch qRT-PCR detektierte Virustyp manifestiert sich nicht in der Neutralisationsprävalenz. Die Untersuchung von Serumpaaren von DENV-Patienten zeigte, dass der Virustyp sich auch nicht im höchsten Anstieg des spezifischen Neutralisationstiters manifestiert (Abb. 18, Abb. 19). Diese Untersuchungen zeigten, dass bei einer sekundären DENV-Infektion der infizierende Virustyp nicht immer den größten Anstieg des Neutralisationstiters hervorruft. Stattdessen wurde meist für alle Serotypen ein Anstieg der Neutralisationstiter beobachtet. Diese generelle, nicht-Serotyp-spezifische Zunahme der Neutralisation wurde auch in großen Studien wie z.B. in Nicaragua beobachtet.¹⁶³

Eine Erklärung dafür, dass die Neutralisationsprävalenz bei einer sekundären Infektion nicht gegen das infizierende Virus sondern gegen einen anderen DENV-Serotyp gerichtet ist, liefert die Theorie des *original antigenic sin*. Diese postuliert, dass der höchste Neutralisationstiter bei einer sekundären Infektion zunächst gegen das Virus der primären Infektion gerichtet ist. Dieses Phänomen wurde für DENV erstmals in den 1980er Jahren in einer Thailand-Studie beobachtet.¹⁶⁴ Dies konnte aber auch mit anderen Flaviviren bestätigt werden. So wurden Mehrschweinchen sequentiell mit JEV und WNV infiziert. Danach konnten verstärkt Antikörper gegen das Virus der ersten Infektion detektiert werden, aber nicht gegen das zweite Virus.¹⁶⁵ Das Problem dieser Modelluntersuchung besteht allerdings darin, dass in endemischen Gebieten nicht nur zwei Infektionen aufeinander folgen sondern mehrere Infektionen, vor allem asymptomatischer Art, stattfinden. Dadurch fällt die DENV-spezifische Immunantwort gegen die vier DENV-Serotypen deutlich komplexer aus. Das Phänomen des *original antigenic sin* wurde auch für andere Viruserkrankungen beobachtet, so z.B. für Influenza.¹⁶⁶ Die Beobachtungen zur Immunantwort nach einer sekundären DENV-Infektion sind allerding nicht konsistent. Es gibt sowohl Studien, die das Phänomen des *original antigenic sin* bestätigen,^{4,164,165,167} als auch Untersuchungen, die einen solchen Zusammenhang von Immunantwort und Virustyp nicht nachweisen konnten.^{168–171}

Studien, die mehrere Serumproben untersucht haben, gesammelt über mehrere Monate nach der sekundären Infektion, zeigten dass die Dauer der Neutralisationsprävalenz gegen das Virus der primären Infektion stark variiert von weniger als einer Woche bis hin zu 3-4 Wochen. ^{68,164,167,168,170,172} Erst danach wurden Neutralisationsprävalenzen gegen das Virus der sekundären Infektion gemessen. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verlaufsproben zeigten diesen Wechsel der Neutralisationsprävalenz allerdings nicht. Auch einen Monat nach der Infektion konnte in den konvaleszenten Serumproben aus Kolumbien keine Veränderung der Neutralisationsprävalenz beobachtet werden (Abb. 18).

Diese Differenzen bei der Untersuchung zum Wechsel der Neutralisationsprävalenz können, neben tatsächlichen Abweichungen der Immunantwort zwischen einzelnen Patienten, auch an den unterschiedlichen Methoden liegen, mit denen die Neutralisationstiter bestimmt wurden. Die Neutralisationstests sind meist Laborinterne Methoden, deren Ergebnisse nur begrenzt mit denen anderer Studien verglichen werden können. Da die Neutralisationstests meist Zell- und Virus-basiert sind, ergeben sich Unterschiede schon allein durch die verwendeten Zelllinien und Virusisolate, sowie deren Passagenanzahl und durch die verwendeten Reagenzien.¹⁷³ Daher wäre es vorteilhafter, die neutralisierenden Antikörper mit einem einfacher durchzuführenden und leicht zu standardisierendem Test zu bestimmen. Besonders wichtig ist dies im Hinblick auf Impfstoffstudien, in denen speziell die neutralisierenden Antikörper von Bedeutung sind, da diese die Immunität vermitteln.^{131,132} Für diese Anwendung und zur Umgehung der Schwierigkeiten der Virus-basierten Neutralisationstests bietet sich das etablierte System der DENV-pseudotypisierten HIV-1-Partikel an, das in dieser Arbeit etabliert wurde. Die Untersuchungen zeigten generell, wie komplex und breit die Neutralisation, besonders in sekundär infizierten Patienten, ausfällt. Dies ist bereits seit Entwicklung des DENV-Neutralisationstests bekannt.⁶⁶ Bei Analysen der Antikörperantwort nach primären und sekundären DENV-Infektionen wurden deutliche Unterschiede beobachtet (Abb. 15). Nach einer primären Infektion werden hauptsächlich kreuzreaktive Antikörper mit geringer Avidität und Neutralisationsaktivität gebildet, wohingegen nach sekundären Infektionen hauptsächlich ebenfalls kreuzreaktive Antikörper, aber mit hoher Avidität und starker Neutralisationsleistung, induziert werden.¹⁷⁴ Die komplexe Kombination der Kreuzreaktivitäten der Antikörper und die Abfolge der Viren bei mehrfachen Infektionen macht die Interpretation von serologischen Ergebnissen jedoch schwierig. Die Konzentration und Qualität der neutralisierenden und kreuzreaktiven Antikörper wird durch viele Faktoren beeinflusst. Die wichtigsten sind das Virus (Sero- und Genotyp) der aktuellen und/oder vorangegangener Infektionen, sowie der Immunstatus des Menschen und seiner genetischer Hintergrund (v.a. bezüglich immunregulatorischer Gene).^{8,175}

Um die humorale Immunantwort besser zu verstehen, wurden Neutralisationstests sowohl mit WHO-Referenzviren als auch mit autologen Virusisolaten aus Kambodscha durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich die Diskrepanz zwischen infizierendem Virustyp und Neutralisationsprävalenz der Immunantwort. Sowohl in den heterologen als auch in den autologen Neutralisationsuntersuchungen stimmte die Neutralisationsprävalenz des Patienten nicht mit dem Virustyp überein, der die sekundäre Infektion verursachte. Dies stellt die z.Z. bevorzugte Impfstoffstrategie einer tetravalenten Vakzine zumindest in endemischen Ländern in Frage. Da die primäre DENV-Infektion meist asymptomatisch abläuft, haben die meisten Menschen bereits im Kindesalter eine Serokonversion und somit Antikörper gegen DENV. Die Antikörperantwort ist im ersten Jahr nach der Infektion noch kreuzreaktiv gegen alle Serotypen gerichtet. Die persistierenden Serotyp-spezifischen Antikörper vermitteln dagegen keine Immunität gegen eine Infektion mit einem anderen Serotyp.¹⁷⁶ In diesen Patienten wäre der Einsatz eines monovalenten Impfstoffes, der nur die Antigene eines DENV-Serotyp beinhaltet, denkbar. In den meisten endemischen Ländern sind DENV-Überwachungsprogramme (surveillance) etabliert, so z.B. in Kambodscha,¹¹⁹ Kolumbien¹⁷⁷ und Vietnam.¹⁷⁸ Dadurch wird die Zirkulation der Viren beobachtet und ein Wechsel des Serotyps zeitnah detektiert. Der Austausch eines zuvor dominierenden Virustyps (Sero- oder Genotyp) gegen einen anderen Virustyp führt in vielen Fällen zu Endemien mit vielen symptomatischen Erkrankungen und z.T. schweren klinischen Manifestationen.^{119,177,179} Da die *surveillance*-Programme sowohl die Virustypen als auch den Immunstatus in der Bevölkerung verfolgen, kann auf einen solchen Virustypwechsel mit einem monovalenten Impfstoff reagiert und somit einer Epidemie entgegengewirkt werden. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten asymptomatisch infizierte auf ihre Neutralisationsprävalenz hin untersucht werden.

Der in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Antigen-Test, basierend auf ED3-Antigenen,¹²⁹ wurde zur Analyse der humoralen Immunantwort genutzt, um die Reaktivitäten gegen das rekombinante Antigen mit den Ergebnissen der Neutralisation zu vergleichen. Der Vorteil des Antigentests lag dabei vor allem in seiner einfachen und schnellen Durchführbarkeit. So konnten über 100 Seren an einem Tag untersucht werden, wohingegen die Analyse der gleichen Serenanzahl mit dem FRNT 6-7 Monate in Anspruch nahm. Die Verwendung von denaturierten Antigenen (ED3*) zeigte bei der Analyse von DENV-Patientenseren Serotyp-spezifische Reaktionen. Um diese Beobachtungen zu validieren, wurden die ermittelten Serotypen des ED3*-Tests mit den ermittelten Neutralisationspävalenzen des FRNTs verglichen. Dabei zeigte der Antigentest eine deutlich geringere Sensitivität als der FRNT. Die ermittelten Serotyp-spezifischen Reaktionen stimmten aber in 72% der ED3*-positiven Seren mit den Neutralisationsprävalenzen des FRNTs überein.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der ED3*-Test eine Alternative zum FRNT darstellt. Dies erlaubt eine einfachere Analyse der neutralisierenden Antikörper von vielen Proben in sehr kurzer Zeit. Damit eignet sich der Antigentest für retrospektive Studien mit vielen Proben und besonders für Impfstoffstudien, da die neutraliserenden Antikörper die Immunität vermitteln.^{131,132}

Dabei befinden sich in der ED3-Domäne des E-Proteins nicht die immundominanten Epitope, da lediglich 10 % der gesamten induzierten anti-DENV-Antikörper gegen ED3 gerichtet sind.¹⁸⁰ Allerdings sind die Bindungsstellen der bedeutendsten neutralisierenden Antikörper auf der ED3-Domäne lokalisiert.^{24,132,181–183} Die neutralisierenden anti-ED3-Antikörper können sowohl Serotyp-spezifisch als auch kreuzreaktiv sein, wobei der Anteil der kreuzreaktiven Antikörper deutlich

überwiegt.^{19,180} Die beiden Antikörpertypen unterscheiden sich aber nicht nur in ihrer Menge sondern auch in ihrer Qualität. Die kreuzreaktiven Antikörper sind meist nur schwach neutralisierend, wohingegen die Serotyp-spezifischen Antikörper ein starkes Neutralisationspotenzial aufweisen.^{24,25,183} Daher ist es von besonderer Bedeutung genau diese stark neutralisierenden, Serotyp-spezifischen Antikörper zu detektieren, die aber nur in geringer Menge in Patientenseren vorhanden sind.

Der ED3*-Test bietet die Möglichkeit den aufwendigen Neutralisationstest zu ersetzen. Dadurch ist es nun möglich Studien mit vielen Proben auf ihre Neutralisationsprävalenz zu untersuchen. Die einfache und schnelle Durchführbarkeit ist dabei besonders vorteilhaft bei Studien mit vielen Teilnehmern und einer großen Probenanzahl, wie z.B. in *surveillance*-Programmen oder Impfstoffstudien.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden 280 Seren von DENV-Patienten aus Kambodscha, Vietnam, Kolumbien und Burkina Faso auf ihre Serotyp-spezifische Neutralisation untersucht. Die Ergebnisse der Neutralisationsexperimente basieren auf über 1600 Tests mit DENV1-4 WHO-Referenzviren sowie acht Dengue-Patientenisolaten aus Kambodscha. Die Virusneutralisation im Serum wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion bestimmt, mit dem Denguevirus-Serotyp aus der akuten Phase der Infektion und mit der Serumreaktivität gegenüber rekombinanten ED3-Antigenen (DENV1-4) verglichen. Dadurch ergaben sich folgende Erkenntnisse: Die Neutralisation gegen den infizierenden Serotyp im Patienten war vermindert und die Entwicklung einer Neutralisationsprävalenz gegen diesen Serotyp war auch einen Monat später nicht zu beobachten. Die höchsten Neutralisationstiter wurden gegen Denguevirus-Serotypen gemessen, die nicht Auslöser der Infektionen waren. Im Vergleich der Neutralisationsdaten mit dem Antigentest wurde eine Korrelation zwischen der Serotyp-spezifischen Neutralisation und der Bindung an das entsprechende ED3*-Antigen beobachtet. Der ED3*-Antigentest ist daher geeignet den aufwendigen Neutralisationstest zu ersetzen. Dies hat Vorteile, speziell bei der Untersuchung des Immunstatus in weiten Bevölkerungsteilen endemischer Gebiete.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Vektorsystem zur Herstellung DENVpseudotypisierter HIV-1-Partikel entwickelt. Dafür wurden Expressionsvektoren für die prM/E-Hüllproteine von DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 und einem chimären DENV2-JEV-Konstruktes hergestellt. Die Expression der Proteine wurde in verschiedenen eukaryotischen Zelllinien optimiert. Für die Bildung der Partikel wurden zwei HIV-1-Vektoren verwendet, die sich in ihrem Genotyp (*env, nef* und *vpr*) unterschieden. Dabei stellte sich pNL4-3-Luc-AM als der optimale Retrovirusvektor heraus, da er *nef*⁺, *vpr*⁺ war und sich das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des SV40-Promotors befand. Für alle fünf DENV-prM/E-Konstrukte wurden infektiöse, pseudotypisierte HIV-1-Partikel hergestellt, deren Infektion von VeroB4-Zellen quantitativ durch Nachweis der Luciferaseaktivität bestimmt wurde. Dieses etablierte System eignet sich für die Untersuchung von prM/E-Varianten in allen Flaviviren und eröffnet neue Möglichkeit den Hüllprotein-abhängigen Infektionsweg zu studieren.

6 Summary

In this study, the serotype specific neutralization of 280 sera of DENV patients from Cambodia, Vietnam, Columbia and Burkina Faso were analyzed. In total, about 1600 single experiments with DENV1-4 WHO virus reference strains and 8 dengue isolates from patients in Cambodia were performed. Virus neutralization of sera was analyzed at different time points after infection, compared to the serotype of dengue viruses from the acute phase of infection and also compared to serum reactions against recombinant ED3 antigens representing all four dengue viruses. Using the abovementioned assay set up, the following observations could be made: Neutralization against the acutely infecting DENV serotype of the patient was reduced and the development of a dominating antibody response against this serotype could not be detected one month after infection. Highest neutralization titers were observed against serotypes that did not cause the infections. Comparison of neutralization results with the outcome of the antigen test led to a positive correlation of serotype specific neutralization and binding to the corresponding ED3* antigen. Due to this, the ED3* antigen assay was deemed suitable for replacing the elaborate neutralization test. Because of its less elaborate set-up, the antigen assay is especially beneficially when investigating the immune status in large parts of the population in endemic areas.

Additionally, a vector system for the production of DENV pseudotyped HIV-1 particles was established. To do so, expression plasmids encoding prM/E envelope proteins of DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 and of an chimeric DENV2-JEV construct were generated. Expression of these proteins was optimized in various eukaryotic cell lines. Induction of particle assembly was tested with two different HIV-1 vectors. They differed in their genotypes for *env*, *nef* and *vpr*. As a result vector pNL4-3-Luc-AM was found to be the best because of its *nef⁺ vpr⁺* genotype and due to the fact that the luciferase reporter gen that was controlled by a SV40 early promoter. All five DENV prM/E constructs drove infectious pseudotyped HIV-1 particles. Their infectivity could be detected quantitatively by measuring luciferase activity in VeroB4 cells. The established vector setup is applicable for the investigation of prM/E variants in all flaviviruses and initiates new opportunities for research on the envelope dependent infection mechanism.

7 Literaturverzeichnis

- 1. Bhatt, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**, 504–507 (2013).
- 2. Heinz, F. X. & Stiasny, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* **30**, 4301–4306 (2012).
- 3. Pierson, T. C., Fremont, D. H., Kuhn, R. J. & Diamond, M. S. Structural Insights into the Mechanisms of Antibody-Mediated Neutralization of Flavivirus Infection: Implications for Vaccine Development. *Cell Host Microbe* **4**, 229–238 (2008).
- 4. Calisher, C. H. *et al.* Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol.* **70**, 37–43 (1989).
- 5. Rico-Hesse, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv. Virus Res.* **59**, 315–341 (2003).
- 6. WHO. *Treatment, prevention and control global strategy for dengue prevention and control.* (2012).
- 7. Kuhn, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* **108**, 717–25 (2002).
- 8. Halstead, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv. Virus Res.* **60**, 421–467 (2003).
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* 59, 23–61 (2003).
- 10. Katzelnick, L. C. *et al.* Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*. **349**, 1338–1343 (2015).
- 11. Weaver, S. C. & Vasilakis, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 523–540 (2009).
- 12. Beltramello, M. *et al.* The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe* **8**, 271–283 (2010).
- 13. de Alwis, R. *et al.* In-Depth Analysis of the Antibody Response of Individuals Exposed to Primary Dengue Virus Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e1188 (2011).
- 14. Wang, S., He, R. & Anderson, R. PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J. Virol.* **73**, 2547–2551 (1999).
- 15. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. & Harrison, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* **427**, 313–319 (2004).
- Schieffelin, J. S. *et al.* Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virol. J.* 7, 28 (2010).
- 17. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. & Harrison, S. C. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **79**, 1223–1231 (2005).
- Roehrig, J. T., Bolin, R. a & Kelly, R. G. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 246, 317–328 (1998).

- 19. Crill, W. D., Hughes, H. R., Delorey, M. J. & Chang, G.-J. J. Humoral Immune Responses of Dengue Fever Patients Using Epitope-Specific Serotype-2 Virus-Like Particle Antigens. *PLoS One* **4**, e4991 (2009).
- 20. Dejnirattisai, W. *et al.* Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. *Science* **328**, 745–748 (2010).
- 21. Wahala, W. M. P. B. *et al.* Natural strain variation and antibody neutralization of dengue serotype 3 viruses. *PLoS Pathog.* **6**, e1000821 (2010).
- 22. Klein, D. E., Choi, J. L. & Harrison, S. C. Structure of a Dengue Virus Envelope Protein Late-Stage Fusion Intermediate. *J. Virol.* **87**, 2287–2293 (2013).
- 23. Crill, W. D. & Roehrig, J. T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J. Virol.* **75**, 7769–7773 (2001).
- 24. Sukupolvi-Petty, S. *et al.* Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J. Virol.* **81**, 12816–12826 (2007).
- 25. Gromowski, G. D. & Barrett, A. D. T. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology* **366**, 349–360 (2007).
- 26. Dejnirattisai, W. *et al.* A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nat. Immunol.* **16**, 170–177 (2014).
- 27. Wahala, W. M. P. B. & de Silva, A. M. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses* **3**, 2374–2395 (2011).
- 28. Rouvinski, A. *et al.* Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature* **520**, 109–U260 (2015).
- 29. Cockburn, J. J. B. *et al.* Structural insights into the neutralization mechanism of a higher primate antibody against dengue virus. *EMBO J.* **31**, 767–779 (2012).
- 30. Fibriansah, G. *et al.* A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. *EMBO Mol. Med.* **6**, 358–371 (2014).
- 31. Zhang, X. et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5 Å resolution. Nat. Struct. Mol. Biol. 20, 105–110 (2013).
- 32. Fibriansah, G. *et al.* Structural Changes in Dengue Virus When Exposed to a Temperature of 37 C. *J. Virol.* **87**, 7585–7592 (2013).
- 33. Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. Flaviviridae. Fields Virol. (2007).
- 34. Rico-Hesse, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* **174**, 479–493 (1990).
- 35. Holmes, E. & Twiddy, S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.* **3**, 19–28 (2003).
- 36. Li, L. *et al.* The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science* **319**, 1830–1834 (2008).
- 37. Yu, I.-M. *et al.* Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* **319**, 1834–1837 (2008).
- 38. Zhang, Y. *et al.* Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* **12**, 1607–1618 (2004).
- 39. Vasilakis, N., Cardosa, J., Hanley, K. a, Holmes, E. C. & Weaver, S. C. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 532–541 (2011).

- 40. Wang, E. *et al.* Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol.* **74**, 3227–3234 (2000).
- 41. Vasilakis, N. & Weaver, S. C. *The History and Evolution of Human Dengue Emergence*. Adv. Virus Res. **72**, (2008).
- 42. Ponlawat, A. & Harrington, L. C. Blood feeding patterns of Aedes aegypti and Aedes albopictus in Thailand. *J. Med. Entomol.* **42**, 844–849 (2005).
- 43. Liebman, K. A. *et al.* Determinants of Heterogeneous Blood Feeding Patterns by Aedes aegypti in Iquitos, Peru. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, (2014).
- 44. Scott, T. W. *et al.* Blood-feeding patterns of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *J. Med. Entomol.* **30**, 922–927 (1993).
- 45. Joshi, V., Mourya, D. T. & Sharma, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of Aedes aegypti mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**, 158–161 (2002).
- 46. Rosen, L., Shroyer, D. A., Tesh, R. B., Freier, J. E. & Lien, J. C. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: Aedes albopictus and Aedes aegypti. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**, 1108–1119 (1983).
- 47. Jansen, C. C. & Beebe, N. W. The dengue vector Aedes aegypti: what comes next. *Microbes Infect.* **12**, 272–279 (2010).
- 48. Lambrechts, L., Scott, T. W. & Gubler, D. J. Consequences of the expanding global distribution of aedes albopictus for dengue virus transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, (2010).
- 49. King, N. J. C. *et al.* Immunopathology of flavivirus infections. *Immunol. Cell Biol.* **85,** 33–42 (2007).
- 50. Chen, Y. *et al.* Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* **3**, 866–871 (1997).
- 51. Acosta, E. G., Castilla, V. & Damonte, E. B. Functional entry of dengue virus into Aedes albopictus mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* **89**, 474–484 (2008).
- 52. Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J. & Heinz, F. X. Proteolytic activation of tickborne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* **71**, 8475–8481 (1997).
- 53. Rodenhuis-Zybert, I. a *et al.* Immature dengue virus: a veiled pathogen? *PLoS Pathog.* **6**, e1000718 (2010).
- 54. Avirutnan, P. *et al.* Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. *J. Immunol.* **187**, 424–433 (2011).
- 55. Guzmán, M. G. & Kourí, G. Dengue: an update. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 33–42 (2002).
- 56. Burke, D. S., Nisalak, A., Johnson, D. E. & Scott, R. M. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**, 172–180 (1988).
- Sangkawibha, N. *et al.* Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am. J. Epidemiol.* 120, 653–669 (1984).
- 58. Halstead, S. B., Nimmannitya, S. & Cohen, S. N. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J. Biol. Med.* **42**, 311–328 (1970).
- 59. Pierson, T. C. & Diamond, M. S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. *Expert Rev. Mol. Med.* **10**, e12 (2008).

- 60. Sa-Ngasang, a *et al.* Specific IgM and IgG responses in primary and secondary dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Epidemiol. Infect.* **134**, 820–825 (2006).
- 61. Imrie, A. *et al.* Antibody to dengue 1 detected more than 60 years after infection. *Viral Immunol.* **20**, 672–675 (2007).
- 62. Sabin, a. B. Research on dengue during World War II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1**, 30–50 (1952).
- 63. Chanama, S. *et al.* Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: Levels and positive rates in comparison with primary infections. *J. Clin. Virol.* **31**, 185–189 (2004).
- 64. Cucunawangsih, Lugito, N. P. H. & Kurniawan, A. Immunoglobulin G (IgG) to IgM ratio in secondary adult dengue infection using samples from early days of symptoms onset. *BMC Infect. Dis.* **15**, 276 (2015).
- 65. Grange, L. *et al.* Epidemiological Risk Factors Associated with High Global Frequency of Inapparent Dengue Virus Infections. *Front. Immunol.* **5**, 1–10 (2014).
- 66. Russell, P. K., Udomsakdi, S. & Halstead, S. B. Antibody response in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **20** Suppl, 103–108 (1967).
- 67. Vaughn, D. W. *et al.* Testing of a dengue 2 live-attenuated vaccine (strain 16681 PDK 53) in ten American volunteers. *Vaccine* **14**, 329–336 (1996).
- 68. Corbett, K. S. *et al.* Preexisting neutralizing antibody responses distinguish clinically inapparent and apparent dengue virus infections in a Sri Lankan pediatric cohort. *J. Infect. Dis.* **211**, 590–599 (2015).
- 69. Montoya, M. *et al.* Symptomatic Versus Inapparent Outcome in Repeat Dengue Virus Infections Is Influenced by the Time Interval between Infections and Study Year. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, 1–10 (2013).
- 70. Halstead, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* (80-.). **239**, 476–481 (1988).
- Boonnak, K., Dambach, K. M., Donofrio, G. C., Tassaneetrithep, B. & Marovich, M. A. Cell Type Specificity and Host Genetic Polymorphisms Influence ADE of Dengue Virus Infection. J. Virol. 85, 1671–1683 (2011).
- 72. Kliks, S. C., Nisalak, A., Brandt, W. E., Wahl, L. & Burke, D. S. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**, 444–451 (1989).
- 73. Kurane, I. & Ennis, F. E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Semin. Immunol.* **4**, 121–127 (1992).
- 74. Kurane, I. *et al.* Activation of T Lymphocytes in Dengue Virus Infections. *J Clin Invest* **2**, 1473–1480 (1991).
- Halstead, S. B. & O'Rourke, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J. Exp. Med.* 146, 201–217 (1977).
- 76. Olkowski, S. *et al.* Reduced Risk of Disease During Postsecondary Dengue Virus Infections. *J. Infect. Dis.* **208**, 1026–1033 (2013).
- Gibbons, R. V. *et al.* Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 910–913 (2007).

- 78. Kuno, G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Adv. Virus Res.* **61**, 3–65 (2003).
- 79. Vaughn, D. W. *et al.* Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J. Infect. Dis.* **181**, 2–9 (2000).
- Nisalak, A., Endy, T. P., Nimmannitya, S., Kalayanarooj, S. & Vaughn, D. W. Serotype-Specific Dengue Virus Circulation and Dengue Disease in Bangkok, Thailand From 1973 To 1999. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 191–202 (2003).
- 81. Corwin, A. L. *et al.* Epidemic dengue transmission in southern Sumatra, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95,** 257–265
- 82. Igarashi, A. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.* **40**, 531–544 (1978).
- 83. Duong, V. *et al.* Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2015).
- 84. Jarman, R. G. *et al.* Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **84,** 218–223 (2011).
- 85. Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. & Vorndamt, a V. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 545–551 (1992).
- Johnson, B. W., Russell, B. J. & Lanciotti, R. S. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. J. Clin. Microbiol. 43, 4977–4983 (2005).
- Young, P. R., Hilditch, P. A., Bletchly, C. & Halloran, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1053–1057 (2000).
- Cordeiro, M. T. Laboratory diagnosis for dengue. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 54 Suppl 1, S10–2 (2012).
- 89. Rathakrishnan, A. & Sekaran, S. D. New development in the diagnosis of dengue infections. *Expert Opin. Med. Diagn.* **7**, 99–112 (2013).
- 90. Teles, F. R. R., Prazeres, D. M. F. & Lima-Filho, J. L. Trends in dengue diagnosis. *Rev. Med. Virol.* **15**, 287–302 (2005).
- 91. Tang, K. F. & Ooi, E. E. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **10**, 895–907 (2012).
- Xu, H. *et al.* Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2872–2878 (2006).
- 93. Maeda, A. & Maeda, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet. J.* (2012).
- 94. WHO. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. (2007).
- 95. Kushnir, N., Streatfield, S. J. & Yusibov, V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* **31**, 58–83 (2012).
- 96. Patient, R., Hourioux, C. & Roingeard, P. Morphogenesis of hepatitis B virus and its subviral envelope particles. *Cell. Microbiol.* **11**, 1561–1570 (2009).

- Schiller, J. T., Castellsagué, X., Villa, L. L. & Hildesheim, A. An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 26, K53–K61 (2008).
- 98. Lazo, L. *et al.* A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine* **25**, 1064–1070 (2007).
- 99. López, C. *et al.* In vitro assembly of nucleocapsid-like particles from purified recombinant capsid protein of dengue-2 virus. *Arch. Virol.* **154**, 695–698 (2009).
- 100. Tripathi, L. *et al.* Pichia pastoris-expressed dengue 3 envelope-based virus-like particles elicit predominantly domain III-focused high titer neutralizing antibodies. *Front. Microbiol.* **6**, 1–10 (2015).
- 101. Liu, W. *et al.* Recombinant dengue virus-like particles from Pichia pastoris: efficient production and immunological properties. *Virus Genes* **40**, 53–59 (2010).
- 102. Arora, U., Tyagi, P., Swaminathan, S. & Khanna, N. Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice. *Vaccine* **31**, 873–878 (2013).
- 103. Mani, S. *et al.* Pichia pastoris-Expressed Dengue 2 Envelope Forms Virus-Like Particles without Pre-Membrane Protein and Induces High Titer Neutralizing Antibodies. *PLoS One* **8**, e64595 (2013).
- 104. Trainor, N. B., Crill, W. D., Roberson, J. a & Chang, G.-J. J. Mutation analysis of the fusion domain region of St. Louis encephalitis virus envelope protein. *Virology* **360**, 398–406 (2007).
- 105. Holmes, D. a., Purdy, D. E., Chao, D. Y., Noga, A. J. & Chang, G. J. J. Comparative analysis of immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect IgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. J. Clin. Microbiol. 43, 3227–3236 (2005).
- 106. Hsieh, S.-C., Liu, I.-J., King, C.-C., Chang, G.-J. & Wang, W.-K. A strong endoplasmic reticulum retention signal in the stem-anchor region of envelope glycoprotein of dengue virus type 2 affects the production of virus-like particles. *Virology* **374**, 338–350 (2008).
- 107. Velez, J. O., Russell, B. J., Hughes, H. R., Chang, G.-J. J. & Johnson, B. W. Microcarrier culture of COS-1 cells producing Japanese encephalitis and dengue virus serotype 4 recombinant virus-like particles. *J. Virol. Methods* **151**, 230–236 (2008).
- 108. Chang, G.-J. J. *et al.* Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus. *Virology* **306**, 170–180 (2003).
- 109. Zhang, S. *et al.* Vaccination with dengue virus-like particles induces humoral and cellular immune responses in mice. *Virol. J.* **8**, 333 (2011).
- 110. Hu, H.-P., Hsieh, S.-C., King, C.-C. & Wang, W.-K. Characterization of retrovirusbased reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengue viruses. *Virology* **368**, 376– 387 (2007).
- 111. Ludwig, C. & Wagner, R. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 537–545 (2007).
- 112. Liu, Y. *et al.* Tetravalent recombinant dengue virus-like particles as potential vaccine candidates: immunological properties. *BMC Microbiol.* **14**, 233 (2014).

- 113. Mattia, K. *et al.* Dengue reporter virus particles for measuring neutralizing antibodies against each of the four dengue serotypes. *PLoS One* **6**, e27252 (2011).
- 114. Chang, G. J., Hunt, a R. & Davis, B. A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice. *J. Virol.* **74**, 4244–4252 (2000).
- 115. Davis, B. S. *et al.* West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.* **75**, 4040–4047 (2001).
- 116. Vong, S. *et al.* Dengue incidence in urban and rural Cambodia: results from population-based active fever surveillance, 2006-2008. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, e903 (2010).
- 117. Schilling, S., Ludolfs, D., Van An, L. & Schmitz, H. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. *J. Clin. Virol.* **31**, 179–184 (2004).
- 118. Blessmann, J. *et al.* Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amebic liver abscess in central Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**, 578–583 (2002).
- 119. Huy, R. *et al.* National dengue surveillance in Cambodia 1980–2008: epidemiological and virological trends and the impact of vector control. *Bull. World Health Organ.* **88**, 650–657 (2010).
- 120. Geiger, C. *et al.* Declining malaria parasite prevalence and trends of asymptomatic parasitaemia in a seasonal transmission setting in North-Western Burkina Faso between 2000 and 2009-2012. *Malar. J.* **12**, 27 (2013).
- 121. Johnson, B. W., Russell, B. J., Lanciotti, R. S. & Icrobiol, J. C. L. I. N. M. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *New York* **43**, 4977–4983 (2005).
- 122. Smith, H. O., Hutchison, C. A., Pfannkoch, C. & Venter, J. C. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15440–15445 (2003).
- Stemmer, W. P. C., Crameri, A., Ha, K. D., Brennan, T. M. & Heyneker, H. L. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* 164, 49–53 (1995).
- 124. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**, 343–345 (2009).
- Gibson, D. G., Smith, H. O., Hutchison, C. A., Venter, J. C. & Merryman, C. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nat. Methods* 7, 901– 903 (2010).
- 126. Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
- 127. Larkin, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007).
- 128. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215**, 403–410 (1990).
- 129. Franzke, K. Identifizierung antigener Determinanten der E-Proteine von Dengue-Viren zum Nachweis Dengue- sowie Serotyp-spezifischer Antikörper. (2014).

- 130. Lewis, G. D. & Metcalf, T. G. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1983–1988 (1988).
- 131. Buddhari, D. *et al.* Dengue virus neutralizing antibody levels associated with protection from infection in thai cluster studies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3230 (2014).
- 132. Katzelnick, L. C., Montoya, M., Gresh, L., Balmaseda, A. & Harris, E. Neutralizing antibody titers against dengue virus correlate with protection from symptomatic infection in a longitudinal cohort. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201522136 (2016).
- 133. He, J. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J. Virol.* **69**, 6705–6711 (1995).
- Connor, R. I., Chen, B. K., Choe, S. & Landau, N. R. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206, 935–944 (1995).
- 135. Pugach, P. *et al.* HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry. *Virology* **361**, 212–228 (2007).
- 136. Taube, S., Kurth, A. & Schreier, E. Generation of recombinant norovirus-like particles (VLP) in the human endothelial kidney cell line 293T. *Arch. Virol.* **150**, 1425–1431 (2005).
- Costa, M. J. L. *et al.* Molecular construction of bionanoparticles: chimaeric SIV p17-HIV I p6 nanoparticles with minimal viral protein content. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 48, 35–43 (2007).
- 138. Pan, Q., He, K. & Huang, K. Development of recombinant porcine parvovirus-like particles as an antigen carrier formed by the hybrid VP2 protein carrying immunoreactive epitope of porcine circovirus type 2. *Vaccine* **26**, 2119–2126 (2008).
- 139. Kolesnikova, L. *et al.* Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus. *J. Virol.* **83**, 2327–2337 (2009).
- Tan, R. C., Harouse, J. M., Gettie, A. & Cheng-Mayer, C. In vivo adaptation of SHIV(SF162): chimeric virus expressing a NSI, CCR5-specific envelope protein. J. Med. Primatol. 28, 164–168
- 141. Siegert, S., Thaler, S., Wagner, R. & Schnierle, B. S. Assessment of HIV-1 entry inhibitors by MLV/HIV-1 pseudotyped vectors. *AIDS Res. Ther.* **2**, **7** (2005).
- 142. Cronin, J., Zhang, X.-Y. & Reiser, J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr. Gene Ther.* **5**, 387–398 (2005).
- 143. Guibinga, G. Cell Surface Heparan Sulfate Is a Receptor for Attachment of Envelope Protein-Free Retrovirus-like Particles and VSV-G Pseudotyped MLV-Derived Retrovirus Vectors to Target Cells. *Mol. Ther.* **5**, 538–546 (2002).
- 144. Flint, M., Logvinoff, C., Rice, C. M., Jane, A. & Mckeating, J. A. Characterization of Infectious Retroviral Pseudotype Particles Bearing Hepatitis C Virus Glycoproteins Characterization of Infectious Retroviral Pseudotype Particles Bearing Hepatitis C Virus Glycoproteins. J. Virol. 78, 6875–6882 (2004).
- 145. Wool-Lewis, R. J. & Bates, P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J. Virol.* **72**, 3155–3160 (1998).

- 146. Chua, A. J. S. *et al.* A novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies. *Virol. J.* **10**, 129 (2013).
- 147. Thompson, C. M. *et al.* Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 and HEK293 expression systems. *BMC Biotechnol.* **15**, 31 (2015).
- 148. Chowers, M. Y. *et al.* Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J. Virol.* **68**, 2906–2914 (1994).
- 149. Benoist, C. & Chambon, P. In vivo sequence requirements of the SV40 early promotor region. *Nature* **290**, 304–310 (1981).
- Chiou, S.-S., Crill, W. D., Chen, L.-K. & Chang, G.-J. J. Enzyme-linked immunosorbent assays using novel Japanese encephalitis virus antigen improve the accuracy of clinical diagnosis of flavivirus infections. *Clin. vaccine Immunol.* 15, 825–835 (2008).
- 151. Roberson, J. A., Crill, W. D. & Chang, G. J. J. Differentiation of West Nile and St. Louis encephalitis virus infections by use of noninfectious virus-like particles with reduced cross-reactivity. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3167–3174 (2007).
- 152. Wang, J. W. & Roden, R. B. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 129–141 (2013).
- 153. Ding, F. X. *et al.* Multiepitope peptide-loaded virus-like particles as a vaccine against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **49**, 1492–1502 (2009).
- 154. Chai, N. *et al.* Properties of Subviral Particles of Hepatitis B Virus. *J. Virol.* **82**, 7812–7817 (2008).
- 155. Schwartzman, L. M. *et al.* An intranasal virus-like particle vaccine broadly protects mice from multiple subtypes of influenza a virus. *MBio* **6**, 1–9 (2015).
- 156. Kang, S.-M., Kim, M.-C. & Compans, R. W. Virus-like particles as universal influenza vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 995–1007 (2012).
- 157. Sundquist, W. I. & Krausslich, H. G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006924 (2012).
- 158. Fritz, R. *et al.* The Unique Transmembrane Hairpin of Flavivirus Fusion Protein E Is Essential for Membrane Fusion. *J. Virol.* **85**, 4377–4385 (2011).
- Roehrig, J. T., Hombach, J. & Barrett, A. D. T. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol.* 21, 123–132 (2008).
- 160. Añez, G., Men, R., Eckels, K. H. & Lai, C.-J. Passage of dengue virus type 4 vaccine candidates in fetal rhesus lung cells selects heparin-sensitive variants that result in loss of infectivity and immunogenicity in rhesus macaques. J. Virol. 83, 10384–10394 (2009).
- 161. Prestwood, T. R., Prigozhin, D. M., Sharar, K. L., Zellweger, R. M. & Shresta, S. A Mouse-Passaged Dengue Virus Strain with Reduced Affinity for Heparan Sulfate Causes Severe Disease in Mice by Establishing Increased Systemic Viral Loads A Mouse-Passaged Dengue Virus Strain with Reduced Affinity for Heparan Sulfate Causes Severe Diseas. 82, 8411–8421 (2008).
- 162. Acosta, E. G., Piccini, L. E., Talarico, L. B., Castilla, V. & Damonte, E. B. Changes in antiviral susceptibility to entry inhibitors and endocytic uptake of dengue-2 virus serially passaged in Vero or C6/36 cells. *Virus Res.* **184**, 39–43 (2014).

- 163. Balmaseda, A. *et al.* High seroprevalence of antibodies against dengue virus in a prospective study of schoolchildren in Managua, Nicaragua. *Trop. Med. Int. Heal.* **11**, 935–942 (2006).
- 164. Halstead, S. B., Rojanasuphot, S. & Sangkawibha, N. Original antigenic sin in dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**, 154–156 (1983).
- 165. Inouye, S., Matsuno, S. & Tsurukubo, Y. 'Original antigenic sin' phenomenon in experimental flavivirus infections of guinea pigs: studies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol. Immunol.* **28**, 569–274 (1984).
- 166. Francis, T., Salk, J. E. & Quilligan, J. J. Experience with vaccination against influenza in the spring of 1947; a preliminary report. *Am. J. Public Health Nations. Health* **37**, 1013–1016 (1947).
- 167. Makino, Y. *et al.* Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections. *Microbiol. Immunol.* **38**, 951–955 (1994).
- Kuno, G., Gubler, D. J. & Oliver, a. Use of 'original antigenic sin' theory to determine the serotypes of previous dengue infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 103–105 (1993).
- 169. Williams, D. T. *et al.* Experimental infections of pigs with Japanese encephalitis virus and closely related Australian flaviviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**, 379–387 (2001).
- 170. Okuno, Y., Fukunaga, T., Tadano, M. & Fukai, K. Serological studies on a case of laboratory dengue infection. *Biken J.* **25**, 163–170 (1982).
- 171. Bancroft, W. H. *et al.* Dengue-2 vaccine: Virological, immunological, and clinical responses of six yellow fever-immune recipients. *Infect. Immun.* **31**, 698–703 (1981).
- Burke, D. S., Nisalak, A. & Gentry, M. K. Detection of flavivirus antibodies in human serum by epitope-blocking immunoassay. *J. Med. Virol.* 23, 165–173 (1987).
- 173. Thomas, S. J. *et al.* Dengue plaque reduction neutralization test (PRNT) in primary and secondary dengue virus infections: How alterations in assay conditions impact performance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**, 825–833 (2009).
- Tsai, W.-Y. *et al.* High-avidity and potently neutralizing cross-reactive human monoclonal antibodies derived from secondary dengue virus infection. *J. Virol.* 87, 12562–12575 (2013).
- 175. Rothman, A. L. Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv. Virus Res.* **60**, 397–419 (2003).
- 176. Simmons, C. P., Farrar, J. J., van Vinh Chau, N. & Wills, B. Dengue. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1423–1432 (2012).
- 177. Ocazionez, R. E., Cortés, F. M., Villar, L. A. & Gómez, S. Y. Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Reintroduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **101**, 725–731 (2006).
- 178. Do, Q. H., Vu, T. Q. H., Huynh, T. K. L. & Pham, K. S. Dengue Heamorrhagic Fever in South Vietnam, 1991-1994. *Dengue Bull.* **20**, 55–61 (1996).
- 179. Do, Q. H., Nguyen, T. K. T., Vu, T. Q. H., Huynh, T. K. L. & Cao, M. T. Dengue epidemic in southern Vietnam, 1998. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 422–425 (2000).
- Wahala, W. M. P. B., Kraus, A. a, Haymore, L. B., Accavitti-Loper, M. A. & de Silva, A. M. Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* **392**, 103–113 (2009).

- Gromowski, G. D., Barrett, N. D. & Barrett, A. D. T. Characterization of dengue virus complex-specific neutralizing epitopes on envelope protein domain III of dengue 2 virus. J. Virol. 82, 8828–8837 (2008).
- 182. Oliphant, T. *et al.* Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat. Med.* **11**, 522–530 (2005).
- 183. Shrestha, B. *et al.* The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. *PLoS Pathog.* 6, e1000823 (2010).

8 Abkürzungsverzeichnis

4CN	4-Chloro-1-naphthol		
ADE	antibody-dependent enhancement (Antikörper-abhängige		
	Verstärkung [einer Infektion])		
APS	Ammoniumperulfat		
BGH	bovine growth factor (Rinderwachstumsfaktor)		
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Sequenz-Vergleichsprogramm)		
CMV	Cytomegalovirus		
CPE	cytopathic effect (zytopathischer Effekt)		
C-Protein	<i>capsid</i> -Protein		
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser		
DENV	Denguevirus		
DEN-VLP	dengue virus-like particles (Denguevirus-artige Partikel)		
DNA	desoxy ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)		
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat		
E. coli	Escherichia coli		
ED1	envelope Proteindomäne 1		
ED2	envelope Proteindomäne 2		
ED3	envelope Proteindomäne 3		
ED3S	envelope Proteindomäne 3 mit stem-Region		
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter		
	Immunadsorptionstest		
E-Protein	envelope Protein		
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)		
FCS	fetale calf serum (fötales Kälberserum)		
ffu	foci forming units (Foci bildende Einheiten)		
FITC	Fluorescein-isothiocyanat		
GHS	global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung		
	von Chemikalien		
HI	Hämagglutionationsinbibition		
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus		
IFA	indirekter Fluoreszenz-Antikörper-Nachweis		
lgG	Immunglobulin G		
lgM	Immunglobulin M		
IPC	Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Kambodscha		
JEV	Japanische Enzephalitis-Virus		
К	Kelvin		
MBP	Maltose-bindendes Protein		
-			
MCS	multiple cloning site (multiple Klonierungsstelle)		

MOI	multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)
M-Protein	membrane-Protein
NEB	New England Biolabs
nt	Nukleotide
NT	Neutralisationstest
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
ori	origin of replication (Replikationsursprung)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBST	PBS mit Tween20
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pfu	plaque forming units (Plaque bildende Einheiten)
p.i.	post infection (nach Infektion)
prM-Protein	precursor membrane Protein (Vorläufer des M-Protein)
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIV	simianes Immundefizienz-Virus
SLV	St. Louis Enzephalitis-Virus
SV40	Simian-Virus 40
TBEV	Tick-bourne encephalitis virus (Frühsommer-Meningoenzephalitis-
	Virus)
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslated region (untranslatierter Bereich)
VLP	virus-like particle (Virus-artige Partikel)
VSV	Vesikular-Stomatitis-Virus
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WHO	World Health Organisation (Welt-Gesundheitsorganisation)
WNV	west nile virus (Westnil-Virus)
YFV	<i>yellow fever virus</i> (Gelbfieber-Virus)

Die in dieser Arbeit verwendeten Anglizismen, die fester Bestandteil der Fachterminologie sind, wurden *kursiv* dargestellt.

9 Anhang

9.1 Oligonukleotide

Primer	Primersequenz (5`- 3`)	PCR-Methode
d1KpnI	cttggtaccgccgccgccatgtctgtgaccatgctcc	
	tc	
d1NotI	cttcgagcggccgcaattacgcctgaaccatgactcc	
	ta	
d2KpnI	cttggtacctctagagccgccgccatggcaggcatga	
	tcattatg	
d2Notl	tttctcgagcggccgctcaactaattaggcctgcacc	privi/E-
		Amplifikation
d3Kpnl		
031100		
d/Knnl		
ичкрп	actta	
d4Notl	cttcgagcggccgctcaactaattatgcttgaactgt	
	gaagccc	
DENV1for	caaaaggaagtcgtgcaata	
DENV1rev	ctgagtgaattctctctactgaacc	
DENV2for	caggttatggcactgtcacgat	
DENV2rev	ccatctgcagcaacaccatctc	Serotypen-
DENV3for	ggactggacacacgcactca	PCR
DENV3rev	catgtctctaccttctcgacttgtct	
DENV4for	ttgtcctaatgatgctggtcg	
DENV4rev	tccacctgagactccttcca	
DENV2JEVSS_01	tagcgtttaaacttaagcttggtactctagagccgcc	
	gcccat	assembly
DENV2JEVSS_02	ccagcatcatgatgctgccggcgcttctcttgcccat	JEV-
	ggcggcggctctctag	Signalsequenz
DENV2JEVSS_03	gcagcatcatgatgctggccagcctggccgtggtgat	- 8
DENV2JEVSS_04		
		Cibcon
DEINVZJEV35_A		Gibson-
DENIV2IEVSS B	ctccgttacgtgtggttagatg	Assembly
		DENV2-JEV-
		Chimäre
DENV2JEVSA_01	gctcaactggttcaagaaaggaagtaccctgggcaag	assembly-PCR
	gccttcagcaccacc	JEV-
DENV2JEVSA_02	aggcggtgtcgcccagggcggccagtctctgggcgcc	stem/anchor-
	cttcagggtggtgctgaaggcc	Sequenz
		.

Primer	Primersequenz (5`- 3`)	PCR-Methode
DENV2JEVSA_03	gggcgacaccgcctgggacttcggcagcatcggcggc	assembly-PCR
	gtgttcaacagcatcggcagag	JEV-
DENV2JEVSA_04	gccgaacagggttctgaaggctccgccgaacacctgg	stem/anchor-
	tgcacggctctgccgatgctgttg	Soquon7
DENV2JEVSA_05	cagaaccctgttcggcggcatgagctggatcacccag	Sequenz
	ggcctgatgggcgccctgctgc	
DENV2JEVSA_06	ggccagggcgatgcttctgtctctggcgttcacgccc	assembly-PCR
	atccacagcaggggggcgcc	JEV-
DENV2JEVSA_07	gcatcgccctggccttcctggccaccggcggcgtgct	stem/anchor-
	ggtgttcctggccaccaacgtg	Soquon7
DENV2JEVSA_08	acactggactagtggatccgagctcggtacttatcag	Sequenz
	gcgtgcacgttggtggccagg	
DENV2JEVSA_A	gctcaactggttcaagaaagga	Gibson-
		Assembly
DENV2JEVSA_B	acactggactagtggatccg	DENV2-JEV-
		Chimäre
DENV2ME_	ttccatctaaccacagtaacggag	Gibson-
forward		Assembly
DENV2ME_	acttcctttcttgaaccagttgagc	DENV2-JEV-
reverse		Chimäre

9.2 Vektoren

9.2.1 pcDNA3.1/Hygro



9.2.2 pNL4-3-Luc-R⁻E⁻



9.3 prM/E-Sequenzen der DENV-Expressionsvektoren

pcHAD1

GAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAA GCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGCCATGTCTGTGACCATGCTC CATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAGAGGAAAGTCACTTTTGTTCAAGACCTCTGTAGGTG TCAACATGTGCACCCTTATTGCGATGGATCTGGGAGAGTTGTGTGAGGACACAATGACC TACAAATGCCCCCGGATCACTGAGGCGGAACCAGATGATGTTGACTGTTGGTGCAATGC CACGGACACATGGGTGACCTATGGAACGTGTTTTCAAACTGGCGAACACCGACGAGACA AACGTTCCGTCGCATTGGCCCCACACGTGGGGCTTGGCCTAGAAACAAGAGCCGAAACA TGGATGTCCTCTGAAGGCGCTTGGAAACAGATACAAAAGTAGAGACTTGGGCTCTGAG CCCAGAAAGGGATCATTTTTATTTTGCTGATGCTGGTAACACCATCTATGGCCATGCGA TGCGTGGGAATAGGCAACAGAGACTTTGTGGAAGGACTGTCAGGAGCAACATGGGTGGA TGTGGTACTGGAGCATGGAAGTTGCGTCACCACCATGGCAAAAAATAAACCAACACTGG ACATTGAACTCTTGAAGACGGAGGTCACAAACCCTGCAGTTCTGCGTAAACTGTGTATT GAAGCTAAAATATCAAACACAACCACCGATTCGAGATGTCCAACACAAGGAGAAGCCAC ACTGGTGGAAGAACAGGACGCGAACTTTGTGTGCCGACGAACGTTCGTGGACAGGGGCT GGGGCAATGGCTGTGGGCTATTTGGAAAAGGTAGCCTAATAACGTGTGCCAAGTTTAAG TGTGCGACAAAACTAGAAGGAAAGATAGTTCAATATGAAAACTTAAAATATTCAGTGAT AGTCACCGTTCACACTGGAGACCAGCACCAGGTGGGAAATGAGACTACAGAACATGGAA CAACTGCAACTATAACACCTCAAGCTCCCACGTCGGAAATACAGCTGACCGACTACGGA GCTCTTACATTAGATTGTTCACCTAGAACAGGGCTAGATTTTAATGAGATGGTGCTGTT GACAATGAAAGAAAAATCATGGCTTGTCCACAAACAATGGTTTCTAGACTTACCACTAC CTTGGACCTCTGGGGCTTCAACATCCCAAGAGACTTGGAACAGACAAGATTTACTGGTC ACATTTAAGACAGCTCATGCAAAGAAGCAGGAAGTAGTCGTACTAGGATCACAAGAAGG AGCAATGCACACTGCGCTGACTGGAGCGACAGAAATTCAAACGTCAGGAACGACAACAA TGGAACCGTTTTGGTGCAGGTTAAATATGAAGGAACAGACGCACCATGCAAGATCCCCT TTTCGACCCAAGATGAGAAAGGAGTAACCCAGAATGGGAGATTAATAACAGCCAACCCC ATAGTCACTGACAAGGAAAAACCAGTCAATATTGAGGCAGAACCACCCTTTGGTGAGAG CTACATCGTGGTAGGAGCAGGTGAAAAAGCTTTGAAACTAAGCTGGTTCAAGAAAGGAA GCATCATAGGGAAAATGTTTGAAGCAACTGCCCGAGGAGCACGAAGGATGGCCATCCTG GGAGACACCGCATGGGACTTCGGTTCTATAGGAGGAGTGTTCACGTCTATGGGAAAACT GGTACACCAGGTTTTTGGAACTGCATATGGAGTTTTGTTTAGTGGTGTTTCTTGGACCA TGAAAATAGGAATAGGGATTCTGCTGACATGGCTAGGATTAAATTCAAGGAACACGTCC CTTTCGATGATGTGCATCGCAGTTGGAATGGTCACACTGTACCTAGGAGTCATGGTTCA

pcHAD2

GGCGTTCCATCTAACCACGTAACGGAGAACCACACATGATCGTCAGTATACAAGAGA AAGGGAAAAGTCTTCTGTTTAAAACAGAGGGATGGCGTGAACATGTGCACCCTCATGGCC ATGGACCTTGGTGAATTGTGTGAAGACACAATCACGTACAAGTGTCCCCTTCTCAGGCA GAATGAGCCAGAAGACATAGACTGTTGGTGCAACTCCACGTCCACGTGGGTAACCTATG GGACTTGTACCACCACGGGAGAACATAGAAGAGAGAAAAAAGATCAGTGGCACTCGTTCCA CATGTGGGAATGGGACTGGAGACGCGAACCGAAACATGGATGTCATCAGAAGGGGCTTG GAAACATGCCCAGAGAATTGAAACTTGGATCCTGAGACATCCAGGCTTCACCATAATGG CAGCAATCTTGGCATACACCATAGGGACGACACATTCCAGAGAGCCCTGATTTTCATC CTACTGACAGCTGTCGCTCCTTCAATGACAATGCGTTGCATAGGAATATCAAATAGAGA CTTTGTAGAAGGGGTTTCAGGAGAGAGAGCTGGGTTGACATAGTCTTAGAACATGGAAGCT
GTGTGACGACGATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGATTTTGAACTGATAAAAGCGGAA GCCAAACAGCCTGCCACCCTAAGGAAGTACTGCATAGAAGCAAAGCTAACCAACAACAAC AACAGAATCTCGTTGCCCAACACAAGGGGGAACCCAGCCTAAAAGAAGAGCAGGATAAGA GGTTCGTCTGCAAACACTCCATGGTAGACAGAGGATGGGGAAATGGATGTGGATTATTT GGAAAGGGAGGCATTGTGACCTGTGCTATGTTCACATGCAAAAAGAACATGAAAGGGAA AGCATGCAGTCGGAAATGACACAGGAAAACATGGCAAGGAAATCAAAGTAACACCACAG AGTTCCATCACAGAAGCAGAATTGACAGGTTATGGCACCGTCACGATGGAGTGCTTTCC GAGAACAAGCCTCGACTTCAATGAGATGGTGTTGCTGCAGATGGAAAATAAAGCTTGGC TGGTGCATAGGCAATGGTTCCTAGACCTGCCATTACCATGGCTGCCCGGAGCGGATACA CAAGGGTCAAATTGGATACAGAAAGAAACATTGGTCACTTTCAAAAATCCCCCATGCGAT GAAACAGGATGTTGTTGTTTTAGGATCCCAAGAAGGGGCCATGCATACAGCACTCACAG GAGCCACAGAAATCCCAAATGTCGTCAGGAAACTTGCTCTTCACTGGACATCTCAAGTGC AGGCTGAGAATGGACAAGCTACAGCTCAAAGGAATGTCATACTCTATGTGCACAGGAAA **GTTTAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAACATGGAACGATAGTTATCAGAGTGC** AATATGAAGGGGACGGCTCTCCATGTAAAATCCCTTTTGAGATAATGGATTTGGAAAAA AGATATGTCTTAGGCCGCCTGATCACAGTCAACCCAATTGTGACAGAAAAAGATAGCCC AGTCAACATAGAAGCAGAACCTCCATTCGGAGACAGCTACATCATCATAGGAGTAGAGC CGGGACAACTGAAGCTCAACTGGTTCAAGAAAGGAAGTTCTATCGGCCAAATGTTTGAG ACAACAATGAGGGGGGGGGGAAGAATGGCCATTTTGGGTGACACAGCCTGGGATTTCGG ATCCCTGGGAGGAGTGTTTACATCTATAGGAAAAGCTCTCCACCAAGTCTTTGGAGCAA TCTATGGAGCTGCCTTCAGTGGGGTTTCATGGACTATGAAAATCCTCATAGGAGTCATT GGGAATTGTGACACTGTATTTGGGAGTCATGGTGCAGGCCCTAATTAGTTGAGCGGCCG CTCGA

pcHAD3

CTCTCTGGCTACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACT ATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGCCATGA CATCGTTCTGTCTCATGATGATGTTACCAGCAACACTTGCTTTCCACTTAACTTCACGA GATGGAGAGCCGCGCATGATTGTGGGGAAGAATGAAAGAGGAAAATCCCTACTTTTTAA GACAGCCTCTGGAATCAACATGTGCACACTCATAGCCATGGATTTGGGAGAGATGTGTG ATGACACGGTCACTTACAAATGCCCCCCACATTACCGAAGTGGAGCCTGAAGACATTGAC TGCTGGTGCAACCTTACATCGACATGGGTGACTTATGGAACATGCAATCAAGCTGGAGA GCATAGACGCGATAAGAGATCAGTGGCGTTAGCTCCCCATGTCGGCATGGGACTGGACA CACGCACTCAAACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTGGAGACAAGTCGAGAAGGTAGAG ACATGGGCCCTTAGGCACCCAGGGTTCACCATACTAGCCCTATTTCTTGCCCATTACAT AGGCACTTCCTTGACCCAGAAAGTGGTTGTTTTTGTACTATTAATGCTGGTTACCCCAT CCATGACAATGAGATGTGTGGGAGTAGGAAACAGAGATTTTGTGGAAGGCCTATCGGGA GCTACGTGGGTTGACGTGGTGCTCGAGTACGGTGGGTGTGTGACTACCATGGCTAAGAA CAAGCCCACGCTGGACATAGAGCTTCAGAAGACCGAGGCCACCCAACTGGCGACCCTAA GGAAGCTATGCATTGAGGGAAAAATTACCAACATAACAACCGACTCAAGATGTCCCACC CGTGGACAGAGGCTGGGGAAACGGTTGTGGTTTGTTTGGCAAGGGAAGCTTGGTGACAT GCGCGAAATTTCAATGTTTAGAATCAATAGAGGGAAAAGTGGTGCAACATGAGAACCTC AAATACACCGTCATCATCACAGTGCACACAGGAGACCAACACCAGGTGGGAAATGAAAC GCAGGGAGTTACGGCTGAGATAACACCCCAGGCATCAACCGCTGAAGCCATTTTACCTG AATATGGAACCCTCGGGCTAGAATGCTCACCACGGACAGGTTTGGATTTCAATGAAATG ATTTTATTGACAATGAAGAACAAAGCATGGATGGTACATAGACAATGGTTCTTTGACTT ACCCCTACCATGGACATCAGGAGCTACAACAGAAACACCAACTTGGAACAGGAAAGAGC TTCTTGTGACATTTAAAAATGCACATGCAAAAAAGCAAGAAGTAGTTGTCCTTGGATCA

pcHAD4

CTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGCCATG ACGATAACATTGCTGTGCTTGATTCCCACCGTAATGGCGTTTCACTTGTCAACAAGAGA TGGCGAACCCCTTATGATAGTGGCAAAACACGAAAGGGGGAGACCTCTCTTGTTTAAGA CAACAGAGGGAATCAACAAATGCACTCTTATTGCCATGGACCTGGGTGAAATGTGTGAG CTGGTGCAATCTCACGTCTGCCTGGGTCATGTATGGGACATGCACTCAGAGTGGGGAAC GGAGACGGGAGAAGCGCTCAGTAGCCCTAACACCACATTCAGGAATGGGATTGGAGACA AGGGCTGAGACATGGATGTCATCGGAAGGGGCTTGGAAACATGCTCAGAGGGTAGAGAG TTGGATACTCAGAAACCCAGGATTCGCTCTCTTGGCAGGATTTATGGCCTATATGATTG GGCAAACAGGAATCCAGCGAACAGTCTTCTTTGTTCTAATGATGCTGGTCGCCCCATCC TACGGAATGCGATGCGTGGGAGTGGGGAACAGAGACTTTGTGGAAGGAGTCTCAGGTGG AGCATGGGTCGATTTGGTGCTAGAACATGGAGGATGTGTCACAACCATGGCCCAGGGAA AACCAACCTTGGATTTTGAACTGATCAAGACAACAGCCAAGGAAGTGGCTCTGTTAAGA ACCTATTGCATTGAAGCCTCGATATCAAACATAACCACGGCAACAAGATGTCCAACGCA AGGAGAACCTTATCTCAAAGAGGAACAAGATCAACAGTACATTTGCCGGAGAGATGTGG TAGACAGAGGGTGGGGCAATGGCTGTGGGCTTGTTTGGGAAAGGAGGAGTTGTGACATGT GCGAAGTTTTCATGCTCGGGGAAGATAACAGGCAATTTGGTCCAAATTGAGAACCTTGA ATACACAGTAGTTGTAACAGTCCACAATGGAGACACCCATGCAGTAGGAAATGACATAT CCAACCATGGAGTGACAGCCACGATAACCCCCCAGGTCACCATCGGTAGAAGTTAAATTA CCGGATTATGGAGAATTAACACTCGATTGTGAACCCAGGTCCGGAATTGATTTAATGA GATGATTCTGATGAAAATGAAAAAGAAAACGTGGCTTGTGCACAAGCAATGGTTTTTGG ATCTACCTCTACCATGGGCAGCAGGAGCAGACACATCAGAAGTTCATTGGAATTACAAA GAGAGAATGGTGACATTCAAGGTTCCTCATGCCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTAGG ATCTCAGGAAGGAGCCATGCATTCTGCCCTCACCGGAGCTACAGAAGTGGATTCCGGTG ATGGAAACCACATGTATGCAGGACATCTGAAATGCAAAGTTCGCATGGAGAAATTGAGA ATTAAGGGAATGTCATACACGATGTGCTCAGGAAAGTTCTCAATTGACAAAGAGATGGC AGAAACACAGCATGGGACAACAGTGGTAAAAGTCAAGTATGAGGGTGCTGGAGCTCCAT GTAAAGTTCCCATAGAGATAAGAGATGTGAACAAGGAAAAAGTGGTAGGGCGCATCATC TCATCTACCCCTTTTGCTGAGTATACCAACAGTGTAACCAACATAGAATTAGAACCCCC CTTTGGGGACAGCTACATAGTAATAGGTGTTGGAGACAGTGCATTAACACTCCATTGGT TCAGGAAAGGGAGTTCCATTGGCAAGATGTTTGAGTCCACATACAGAGGCGCAAAGCGA ATGGCCATTCTAGGTGAAACAGCCTGGGATTTTGGTTCTGTTGGTGGACTGCTCACATC ATTGGGAAAGGCTGTACACCAGGTTTTTGGTAGTGTGTATACAACTATGTTTGGAGGAG TCTCATGGATGGTTAGAATCCTAATTGGGTTCTTAGTGTTGTGGATTGGCACGAATTCG AGAAACACCTCAATGGCAATGACGTGCATAGCTGTTGGAGGAATCACTCTGTTTCTGGG CTTCACAGTTCAAGCATAATTAGTTGAGCGGCCGCTCGA

pcHAD2/JE

CTCTCTGGCTACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACT ATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACTCTAGAGCCGCCGC CATGGGCAAGAGAAGCGCCGGCAGCATCATGATGCTGGCCAGCCTGGCCGTGGTGATCG CCTGCGCCGGCGCCTTCCATCTAACCACACGTAACGGAGAACCACACATGATCGTCAGT ATACAAGAGAAAGGGAAAAGTCTTCTGTTTAAAACAGAGGATGGCGTGAACATGTGCAC CCTCATGGCCATGGACCTTGGTGAATTGTGTGAAGACACAATCACGTACAAGTGTCCCC TTCTCAGGCAGAATGAGCCAGAAGACATAGACTGTTGGTGCAACTCCACGTCCACGTGG GTAACCTATGGGACTTGTACCACCACGGGAGAACATAGAAGAGAAAAAGATCAGTGGC ACTCGTTCCACATGTGGGAATGGGACTGGAGACGCGAACCGAAACATGGATGTCATCAG AAGGGGCTTGGAAACATGCCCAGAGAATTGAAACTTGGATCCTGAGACATCCAGGCTTC ACCATAATGGCAGCAATCTTGGCATACACCATAGGGACGACACATTTCCAGAGAGCCCT GATTTTCATCCTACTGACAGCTGTCGCTCCTTCAATGACAATGCGTTGCATAGGAATAT CAAATAGAGACTTTGTAGAAGGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGACATAGTCTTAGAA CATGGAAGCTGTGTGACGACGATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGATTTTGAACTGAT AAAAGCGGAAGCCAAACAGCCTGCCACCCTAAGGAAGTACTGCATAGAAGCAAAGCTAA CCAACAACAACAAGAATCTCGTTGCCCAACAAGGGGGAACCCAGCCTAAAAGAAGAG CAGGATAAGAGGTTCGTCTGCAAACACTCCATGGTAGACAGAGGATGGGGAAATGGATG TGGATTATTTGGAAAGGGAGGCATTGTGACCTGTGCTATGTTCACATGCAAAAAGAACA TGAAAGGGAAAATCGTGCAACCAGAAAACTTGGAATACACCATTAATTGACAGGTTATG GCACCGTCACGATGGAGTGCTTTCCGAGAACAAGCCTCGACTTCAATGAGATGGTGTTG CTGCAGATGGAAAATAAAGCTTGGCTGGTGCATAGGCAATGGTTCCTAGACCTGCCATT TCACTTTCAAAAATCCCCATGCGATGAAACAGGATGTTGTTGTTTTAGGATCCCAAGAA GGGGCCATGCATACAGCACTCACAGGAGCCACAGAAATCCAAATGTCGTCAGGAAACTT GCTCTTCACTGGACATCTCAAGTGCAGGCTGAGAATGGACAAGCTACAGCTCAAAGGAA TGTCATACTCTATGTGCACAGGAAAGTTTAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAA CATGGAACGATAGTTATCAGAGTGCAATATGAAGGGGACGGCTCTCCATGTAAAATCCC TTTTGAGATAATGGATTTGGAAAAAAGATATGTCTTAGGCCGCCTGATCACAGTCAACC CAATTGTGACAGAAAAAGATAGCCCAGTCAACATAGAAGCAGAACCTCCATTCGGAGAC AGCTACATCATCATAGGAGTAGAGCCGGGACAACTGAAGCTCAACTGGTTCAAGAAAGG AAGTACCCTGGGCAAGGCCTTCAGCACCACCCTGAAGGGCGCCCCAGAGACTGGCCGCCC TGGGCGACACCGCCTGGGACTTCGGCAGCATCGGCGGCGTGTTCAACAGCATCGGCAGA GCCGTGCACCAGGTGTTCGGCGGAGCCTTCAGAACCCTGTTCGGCGGCATGAGCTGGAT CACCCAGGGCCTGATGGGCGCCCTGCTGCTGTGGATGGGCGTGAACGCCAGAGACAGAA GCATCGCCCTGGCCTTCCTGGCCACCGGCGCGCGTGCTGGTGTTCCTGGCCACCAACGTG CACGCCTGATAAGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAATTCTGCAGAT ATCCAGCACAGTGGCGGCCGC

9.4 Originaldaten der Neutralisationstests

Originaldaten der Analyse der Seren aus Kambodscha

Serum	qRT-PCR-	ED3* Antigentest		FR	NT90 ^b	
	Serotyp		DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
W0105301	DENV1	-	<20	<u>80</u>	<20	40
W0110301	DENV1	-	<u>640</u>	320	40	<u>640</u>
W0113302	DENV1	-	20	<u>320</u>	<20	160
W0123301	DENV1	-	<u>2560</u>	640	40	80
W0123303	DENV1	-	<u>640</u>	160	20	80
W0210301	DENV1	-	<u>2560</u>	640	20	80
W0213301	DENV1	-	<20	<u>160</u>	<20	<u>160</u>
W0220301	DENV1	-	<20	<20	<20	<u>20</u>
W0321301	DENV1	-	<u>1280</u>	80	20	80
W0326305	DENV1	-	<u>640</u>	160	<20	80
W0411332	DENV1	-	20	80	< 20	<u>640</u>
W0426320	DENV1	-	<20	<u>80</u>	<20	40
W0502307	DENV1	-	1280	320	<u>10240</u>	160
U0304093	n.d. ª	-	<20	<u>160</u>	20	<u>160</u>
U0512147	n.d.	-	80	<u>160</u>	< 20	40
U0519269	n.d.	-	<u>40</u>	20	<20	20
U0609189	n.d.	-	<u>1280</u>	160	160	160
U0616267	n.d.	-	<u>10240</u>	160	2560	640
W0110302	DENV1	DENV3	80	640	<u>2560</u>	320
W0110307	DENV1	DENV2	80	<u>5120</u>	<20	320
W0113304	DENV1	DENV3	<u>640</u>	<u>640</u>	<u>640</u>	320
W0116301	DENV1	DENV4	40	320	<20	<u>1280</u>
W0116305	DENV1	DENV4	20	80	<20	<u>1280</u>
W0118304	DENV1	DENV3	320	<u>640</u>	<20	80
W0120301	DENV1	DENV2	160	<u>640</u>	160	320
W0124301	DENV1	DENV2	160	<u>5120</u>	20	160
W0130301	DENV1	DENV3	640	640	2560	640
W0203301	DENV1	DENV2	640	2560	<20	160
W0217301	DENV1	DENV2	2560	<u>10240</u>	80	320
W0227306	DENV1	DENV2	<u>640</u>	<u>640</u>	<20	80
W0227308	DENV1	DENV3	<u>640</u>	320	320	<u>640</u>
W0303301	DENV1	DENV4	160	160	<20	2560
W0303304	DENV1	DENV2	320	<u>2560</u>	<20	160
W0305302	DENV1	DENV3	640	320	<u>10240</u>	160
W0307301	DENV1	DENV2	320	<u>1280</u>	<20	320
W0309301	DENV1	DENV1	<u>2560</u>	80	20	160
W0316301	DENV1	DENV2	640	<u>2560</u>	<20	320
W0430302	DENV1	DENV2	80	<u>2560</u>	40	160
W0525302	negativ	DENV1	<u>10240</u>	640	320	1280
U0122153	n.d.	DENV1	<u>10240</u>	640	320	320

Serum	qRT-PCR-	ED3* Antigentest		FR	NT90 ^b	
	Serotyp		DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
V0805341	DENV1	-	<20	<20	<20	<20
V0805342	DENV1	DENV2	320	<u>5120</u>	640	2560
V0805344	DENV1	-	20	<u>320</u>	40	160
V0810307	DENV1	-	<20	<20	<20	<20
V0817302	DENV1	-	<20	<u>80</u>	20	<u>80</u>
V0817305	DENV1	DENV2	80	<u>1280</u>	80	640
V0817307	DENV1	DENV2	40	<u>320</u>	40	<u>320</u>
V0824323	DENV1	DENV3	320	160	<u>5120</u>	320
V0907301	DENV1	DENV3	20	80	<u>320</u>	80
V0907305	DENV1	-	20	20	20	20
V0808303	DENV1	-	<u>20</u>	<20	<20	<20
V0810302	DENV1	DENV2	640	20480	640	5120
V0810303	DENV1	DENV1, 2, 3, 4	1280	20480	5120	5120
V0812302	DENV1	-	20	<20	<20	<u>40</u>
V0817303	DENV1	DENV2, 3, 4	320	<u>2560</u>	160	2560
V0817306	DENV1	DENV2	320	<u>5120</u>	640	<u>5120</u>
V0822302	DENV1	DENV2	1280	<u>20480</u>	320	2560
V0824324	DENV1	DENV3	320	320	<u>5120</u>	320
V0907302	DENV1	DENV3	1280	2560	<u>20480</u>	640
V0909309	DENV1	DENV1	80	<u>640</u>	80	<u>640</u>
U0118191	DENV2	DENV1	<u>5120</u>	320	80	320
U0505193	DENV2	DENV1, 2, 3	40	<u>2560</u>	640	1280
U0602259	DENV2	DENV1, 3	<u>1280</u>	640	160	640
U0728368	DENV2	-	<20	160	<20	<u>1280</u>
U0804314	DENV2	-	160	640	<u>1280</u>	1280
U0804315	DENV2	DENV4	40	1280	20	2560
U0804320	DENV2	DENV3	160	1280	2560	1280
U0817308	DENV2	DENV3	160	1280	2560	1280
U0820320	DENV2	-	<u>160</u>	40	20	40
U0906314	DENV2	DENV1	2560	640	80	320
W0227308	DENV2	DENV1	20480	2560	1280	5120
W0303301	DENV2	DENV1, 2, 3	80	<u>2560</u>	640	1280
W0303304	DENV2	DENV1, 2, 3	2560	1280	160	1280
W0305302	DENV2	DENV1	<u>640</u>	160	40	320
W0307301	DENV2	DENV3	640	2560	<u>10240</u>	2560
W0309301	DENV2	DENV2	80	2560	40	<u>5120</u>
W0316301	DENV2	DENV1, 3	640	2560	<u>20480</u>	2560
W0430302	DENV2	DENV1, 3	320	2560	<u>5120</u>	2560
W0525302	DENV2	DENV1, 3	<u>20480</u>	2560	1280	2560
U0122153	DENV2	DENV1, 2, 3	<u>10240</u>	5120	640	1280
S0507106	DENV3	DENV1, 2, 3	160	<u>2560</u>	20	1280
S0521272	DENV3	DENV1, 2, 3	<u>5120</u>	1280	320	640
S0611058	DENV3	DENV1, 2, 3	<u>2560</u>	640	320	320

Serum	qRT-PCR-	ED3* Antigentest	FRNT90 ^b			
	Serotyp		DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
S0617049	DENV3	DENV2	320	<u>5120</u>	160	2560
S0709062	DENV3	DENV1	<u>5120</u>	2560	80	1280
S0806384	DENV3	DENV1, 2, 3, 4	160	<u>5120</u>	160	2560
S0806390	DENV3	DENV2	<20	<u>320</u>	<20	40
S0806392	DENV3	DENV1, 2, 3, 4	640	<u>5120</u>	40	<u>5120</u>
S0806394	DENV3	-	<u>5120</u>	640	1280	320
S0903272	DENV3	DENV1, 2, 3, 4	320	<u>10240</u>	320	5120
S0509128	DENV3	DENV2	1280	<u>5120</u>	40	2560
S0521273	DENV3	DENV1, 2, 3	<u>5120</u>	2560	320	2560
S0611059	DENV3	DENV1, 3	<u>10240</u>	2560	5120	5120
S0617051	DENV3	DENV1, 2, 3, 4	5120	20480	1280	<u>20480</u>
S0709063	DENV3	DENV1	5120	<u>10240</u>	640	5120
S0806385	DENV3	DENV1, 2, 3, 4	160	<u>5120</u>	320	5120
S0806391	DENV3	DENV2, 3	40	<u>160</u>	<20	40
S0806393	DENV3	DENV1, 2, 3, 4	640	<u>5120</u>	80	<u>5120</u>
S0806395	DENV3	-	<u>5120</u>	320	1280	320
S0903273	DENV3	DENV1, 2, 3, 4	1280	<u>5120</u>	320	<u>5120</u>
S0603245	DENV4	-	<u>1280</u>	80	20	40
S0603242	DENV4	-	<u>320</u>	40	<20	40
S0704059	DENV4	DENV1, 2, 3	640	320	<u>1280</u>	80
S0813311	DENV4	DENV1, 2, 3	40	<u>1280</u>	160	640
S1105091	DENV4	-	<u>5120</u>	160	160	80
S1106598	DENV4	-	160	160	<u>5120</u>	80
S1118223	DENV4	DENV1	<u>640</u>	20	20	40
U0708378	DENV4	DENV2	640	20480	320	5120
U0709319	DENV4	DENV3	640	1280	<u>5120</u>	2560
U0825418	DENV4	DENV1	<u>10240</u>	1280	640	1280
S0605087	DENV4	DENV1	<u>10240</u>	640	640	1280
S0606077	DENV4	DENV1, 2	<u>10240</u>	10240	2560	1280
S0707114	DENV4	-	20480	2560	20480	1280
S0820366	DENV4	DENV1, 2, 3	320	5120	2560	2560
S1106587	DENV4	DENV1	20480	1280	1280	640
S1117207	DENV4	-	1280	640	20480	640
S1122025	DENV4	DENV1	<u>10240</u>	2560	1280	1280
U0708379	DENV4	DENV1, 2	640	20480	640	10240
U0713301	DENV4	DENV3	640	1280	<u>20480</u>	2560
U0825419	DENV4	DENV1, 3	<u>20480</u>	2560	1280	5120

^a Seren, die nicht mittels qRT-PCR untersucht wurden.
^b Der mittels NT ermittelte Serotyp (Neutralisationsprävalenz) ist jeweils <u>unterstrichen</u> dargestellt.

Serum

W0105301 W0110301

W0113302

W0118304

W0123301

W0123303

W0210301

W0213301

W0220301

W0321301

W0326305

W0411332

W0426320

W0430302

W0502307

U0304093

U0512147

U0519269

U0609189

U0616267

W0110302

W0110307

W0113304

W0116301

W0116305

W0120301

W0124301

W0130301

W0203301

W0217301

W0227306

W0227308

W0303301

W0303304

W0305302

W0307301

W0309301

W0316301

W0525302

U0122153

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

<20

aten o	ler aut	ologer	Neutr	alisati	onstes	ts* der	Seren	aus Ka	mbod	scha	
	DENV1			DENV2			DENV3			DENV4	
wно	IPC A	IPC B	wнo	IPC A	IPC B	wнo	IPC A	IPC B	wнo	IPC A	IPC B
<20	<20	<20	80	80	<20	<20	40	80	40	<20	20
640	40	40	320	320	160	40	1280	2560	640	20	40
20	<20	<20	320	320	80	<20	80	80	160	<20	<20
320	40	40	640	640	160	<20	640	640	80	<20	<20
2560	640	640	640	640	320	40	640	1280	80	<20	20
640	160	160	160	160	40	20	640	1280	80	<20	20
2560	160	320	640	320	320	20	1280	1280	80	<20	20
<20	<20	<20	160	320	80	<20	160	160	160	<20	<20
<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	20	<20	<20
1280	20	20	80	40	80	20	1280	1280	80	<20	<20

Originaldate

* Die verwendete Virusisolate finden sich in Tab. 17.

Originaldaten der Analyse der Seren aus Kolumbien

qRT-PCR-				FRNT90 ^a				
Serum	Serotyp	ED3* Antigentest	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Status ^b	
12	negativ	-	20	<u>160</u>	20	80	primär	
12.2	n.d. ^c	-	80	<u>640</u>	80	160	primär	
13	negativ	-	<u>80</u>	20	20	20	primär	
14	DENV1	DENV3	640	1280	<u>2560</u>	640	sekundär	
16	DENV2	DENV1,3	<u>1280</u>	640	640	160	sekundär	
16.2	DENV2	DENV1,2,3	20480	10240	10240	1280	sekundär	
19	DENV2	DENV1	<u>10240</u>	2560	640	640	sekundär	
19.2	DENV2	DENV1	20480	5120	2560	640	sekundär	
35	DENV1	-	<u>5120</u>	1280	1280	320	sekundär	
41	DENV1	-	<u>40</u>	20	20	20	primär	
43	negativ	-	<u>20</u>	<20	<20	<20	primär	
43.2	n.d.	DENV1	<u>80</u>	<u>80</u>	40	40	primär	
44	DENV1	-	<u>20</u>	<20	<u>20</u>	<20	primär	
46	DENV1	-	<u>20</u>	<20	<u>20</u>	<20	primär	
47	DENV2	-	320	160	<u>5120</u>	40	primär	
58	DENV2	-	2560	1280	640	160	sekundär	
59	DENV4	DENV1,2,3	320	<u>640</u>	160	320	sekundär	
59.2	DENV4	DENV1,2,3	<u>5120</u>	2560	1280	1280	sekundär	
61	DENV2	DENV1,3	<u>10240</u>	1280	640	640	sekundär	
63	DENV2	-	<u>1280</u>	80	640	80	primär	
73	DENV1	-	<u>160</u>	<20	20	20	primär	
74	DENV4	DENV1,3	640	<u>2560</u>	640	640	sekundär	
76	DENV3+4	-	<20	<20	<20	<20	primär	
79	DENV3+4	-	<20	<20	<u>20</u>	<20	sekundär	
79.2	DENV3+4	-	20	20	<u>160</u>	40	sekundär	
80	DENV1	-	40	40	<u>160</u>	20	primär	
85	DENV2+4	-	<u>640</u>	160	160	320	sekundär	
104	negativ	-	<u>80</u>	<u>80</u>	40	20	primär	
105	DENV1	-	<u>320</u>	<u>320</u>	40	80	primär	
108	DENV2	DENV1,2,3	<u>10240</u>	2560	5120	2560	sekundär	
125	DENV2	DENV1,2,3,4	5120	10240	1280	<u>20840</u>	primär	
261	DENV2	-	<u>80</u>	20	40	20	primär	
261.2	DENV2	DENV1,3	2560	1280	<u>5120</u>	640	primär	
272	DENV3	DENV1,3	<u>5120</u>	<u>5120</u>	1280	2560	sekundär	
329	negativ	-	10240	5120	<u>20480</u>	640	sekundär	
335	DENV1	-	40	<u>320</u>	40	80	primär	
343	DENV1	DENV2	640	<u>20480</u>	1280	5120	sekundär	
344	negativ	DENV1,3	10240	5120	<u>20480</u>	2560	sekundär	
344.2	n.d.	DENV3	2560	5120	40960	1280	sekundär	
345	DENV1	-	40	320	160	<u>640</u>	sekundär	
346	DENV1	-	160	<u>1280</u>	<u>1280</u>	640	sekundär	

	qRT-PCR-			FRNT90 ^ª				
Serum	Serotyp	ED3* Antigentest	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	Status ^b	
348	DENV4	-	<u>10240</u>	2560	2560	320	primär	
351	negativ	DENV2	2560	40960	2560	5120	sekundär	
352	negativ	DENV1,2,3	1280	10240	40960	5120	sekundär	
352.2	n.d.	DENV1,2,3	640	5120	10240	2560	sekundär	
353	DENV2	DENV1	10240	5120	2560	640	sekundär	
362	negativ	-	640	10240	20480	640	sekundär	
364	DENV1	DENV3	2560	5120	<u>20480</u>	320	sekundär	
421	DENV4	-	20	<u>160</u>	80	40	primär	
421.2	DENV4	-	320	<u>5120</u>	<u>5120</u>	640	primär	
436	DENV1	-	40	<u>640</u>	80	160	sekundär	
436.2	DENV1	DENV2	320	<u>5120</u>	640	640	sekundär	
458	DENV2	DENV4	320	<u>20480</u>	640	320	sekundär	
467	DENV1	-	40	320	80	<u>640</u>	primär	
467.2	DENV1	DENV4	320	2560	640	<u>2560</u>	primär	

^a Der mittels NT ermittelte Serotyp (Neutralisationsprävalenz) ist jeweils <u>unterstrichen</u> dargestellt.

^b Der Immunstatus wurde ermittelt durch anti-DENV IgM-Messung: IgM-positive Seren wurden als primär, IgM- und/oder IgG-positve Seren als sekundär eingestuft.

^c Seren, die mittels qRT-PCR nicht untersucht wurden.

Originaldaten der Analyse der Seren aus Vietnam

Serum	ED3*		FRNT9	0-Titer ^a	
	Antigentest	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
A01	-	2560	1280	1280	640
A01 S2	-	20480	5120	5120	2560
A02	-	<20	<u>320</u>	<u>320</u>	160
A03	DENV1	20480	10240	10240	10240
A03 S2	DENV1	<u>2560</u>	1280	640	320
A04	-	<20	2560	640	1280
A06	DENV3	160	5120	<u>10240</u>	20
A06 S2	n.d. b	320	5120	20480	2560
A07	-	<u>5120</u>	1280	<u>5120</u>	320
A08	-	<20	<u>320</u>	160	<u>320</u>
A08 S2	-	<u>5120</u>	2560	2560	640
A09	DENV1,3	2560	1280	<u>5120</u>	20
A09 S2	DENV2	160	2560	640	1280
A10	n.d.	<20	<u>20</u>	<20	<20
A10 S2	n.d.	<u>80</u>	40	20	20
A11	DENV4	160	10240	640	20480
A11 S2	-	80	<u>1280</u>	640	640
A12 S2	-	80	<u>1280</u>	640	640
A13 S2	DENV2,3	320	<u>5120</u>	20	2560
A14	DENV1	<u>2560</u>	1280	1280	640
A14 S2	-	<20	20	<u>40</u>	20
A15	-	<u>5120</u>	1280	640	640
A26 S2	DENV2,3	80	<u>1280</u>	20	640
A28 S2	DENV1	<u>1280</u>	640	320	160
A29 S2	DENV2,3	< 20	<u>1280</u>	640	640
A31 S2	DENV2	1280	<u>10240</u>	5120	2560
A32 S2	DENV4	160	<u>10240</u>	640	2560
A37 S2	DENV2,3	20	320	160	160
A39 S2	DENV2,3,4	320	<u>5120</u>	1280	2560
A40 S2	DENV1	<u>320</u>	80	160	<u>320</u>
A48 S2	DENV1,3	20480	10240	10240	2560
A49 S2	DENV2,3,4	<u>640</u>	<u>640</u>	160	320
A50 S2	DENV2	640	<u>5120</u>	1280	1280
A51 S2	DENV1	<u>20480</u>	10240	5120	2560
A52 S2	DENV1	<u>10240</u>	2560	2560	2560
A58 S2	DENV2	80	<u>1280</u>	160	640
A59 S2	DENV3	10240	10240	<u>20480</u>	10240
P02	-	20	<u>320</u>	80	160
P04-1	DENV1	<u>20480</u>	1280	2560	1280
P07	-	<20	<20	<20	<20
P09	-	<u>5120</u>	2560	2560	2560
P10	-	<u>160</u>	20	<20	<20
P12	-	<20	<20	<20	<20

Serum	ED3*		FRNT9	0-Titer ^ª	
	Antigentest	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
P12-1	DENV2	20	<u>80</u>	40	<u>80</u>
P13	-	<20	<20	<20	<20
P15	DENV1	<u>10240</u>	2560	2560	5120
P15-2	DENV3	< 20	40	<u>160</u>	20
P15 S2	n.d.	<u>1280</u>	640	320	320
P18	-	<20	<u>320</u>	20	160
P18 S2	n.d.	20	<u>1280</u>	40	320
P18-2	DENV1,3	80	40	<u>160</u>	20
P19	DENV2,3	320	<u>5120</u>	1280	<u>5120</u>
P20	-	20	<u>5120</u>	160	1280
P20-2	DENV1	<u>5120</u>	2560	1280	2560
P20 S2/2	DENV1	<u>5120</u>	2560	2560	1280
P21	-	<20	<u>20</u>	<20	<20
P21 S2	n.d.	20	<u>320</u>	160	160
P22	DENV1,2,3,4	20480	5120	10240	10240
P22 S2	n.d.	<u>512</u> 0	2560	<u>5120</u>	640
P23	-	20	<u>1280</u>	160	640
P23 S2	n.d.	20	<u>1280</u>	160	320
P24	-	160	2560	<u>20480</u>	640
P26	-	<20	<20	<20	<20
P27	DENV1, 3	2560	5120	<u>10240</u>	5120
P28	n.d.	80	<u>160</u>	40	40
P29	-	20	<u>2560</u>	320	640
P30-2	DENV1	<u>10240</u>	5120	2560	5120
P32-2	DENV1	2560	640	1280	160
P34-2	DENV4	80	<u>10240</u>	1280	640
P35-2	DENV2,4	80	2560	1280	640
P38-2	DENV4	160	10240	320	<u>20480</u>
P39-2	DENV3	320	10240	20480	5120
P41-2	DENV1, 3	1280	2560	<u>10240</u>	5120
P42 S2	DENV2	160	<u>20480</u>	320	10240
P48-1	DENV1	<u>10240</u>	5120	5120	2560
P54-2	DENV2,3	320	<u>5120</u>	2560	2560
P55-1	DENV1	<u>40</u>	<u>40</u>	20	20
P56-2	DENV1	<u>10240</u>	5120	5120	2560
P60-2	DENV1	20480	5120	10240	5120

^a Der mittels NT ermittelte Serotyp (Neutralisationsprävalenz) ist jeweils <u>unterstrichen</u> dargestellt. ^b Seren, die nicht mittels Antigentest untersucht wurden.

Substanz	Gefahrstoffsymbol	GHS-Gefahren	GHS-Maßnahmen
2-Propanol		H225	P210
		H319	P233
		H336	P305 + P351 + P338
4-Chloro-1-naphtol		H315	P264
		H319	P302 + P352
		H335	P304 + P340
			P305 + P351 + P338
			P332 + P313
			P337 + P313
Acrylamid		H301	P201
		H312 + H332	P280
		H315	P301 + P310
		H317	P305 + P351 + P338
		H319	P308 + P313
		H340	
		H350	
		H361f	
		H372	
Ampicillin		H315	P261
		H317	P280
		H319	P305 + P351 + P338
		H334	
		H335	
Ammoniumpersulfat (APS)		H272	P280
		H302	P305 + P351 + 338
		H315	P302 + P352
	V	H317	P304 + P341
		H319	P342 + P311
		H334	
		H335	
Calciumchlorid	(!)	H319	P305 + P351 + P338
Dithiothreitol (DTT)	\wedge	H302	P302 + P352
	$\mathbf{\dot{\vee}}$	H315	P305 + P351 + P338
		H319	

9.5 Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe nach GHS

Substanz	Gefahrstoffsymbol	GHS-Gefahren	GHS-Maßnahmen
Essigsäure		H226	P280
		H314	P305 + P351 + P338
			P310
Ethanol		H225	P210
Ethidiumbromid		H302	P260
		H330	P281
		H341	P284
			P310
Ethylendiamintetraacetat		H319	P280
(EDTA)	\checkmark		P305 + P351 + P338
			P310
Formaldehyd		H301	P201
		H311	P260
		H314	P280
	\sim	H317	P301 + 310 + 330
		H331	P303 + 361 + 353
		H341	P304 + 340 + 310
		H350	P305 + 351 + 338
			P308 + 311
			P403 + 233
Kristallviolett		H351	P273
		H302	P280
		H318	P305 + 351 + 338
	\vee \vee	H410	P308 + 313
Methanol		H225	P210
		H301	P260
		H311	P301 + P310
	V	H331	P311
		H370	P342 + P311
Natriumdodecylsulfat		H228	P210
(SDS)		H302	P261
		H315	P280
	\checkmark	H318	P305 + P351 + P338
		H332	P373
		H335	
		H413	

Substanz	Gefahrstoffsymbol	GHS-Gefahren	GHS-Maßnahmen
Natriumhydroxid		H290	P280
		H314	P305 + P351 + P338 BEI
			P310
Penicillin	(!)	H317	P280
Salzsäure		H290	P234
		H314	P260
		H335	P303 + P361 + P353
			P304 + P340
			P305 + P351 + P338
			P309 + P311
			P501
Streptomycin	(!)	H302	
3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin	\wedge	H315	P261
(ТМВ)		H319	P305 + 351 + 338
		H335	
Tetramethylethylendiamin		H225	P210
(TEMED)		H302	P233
		H314	P280
	\sim	H332	P301 + P330 + P331
			P305 + P351 + P338
			P309 + P310
Tris(hydroxymethyl)-	\wedge	H315	H261
aminomethan		H319	P305 + P351 + P338
(Tris)		H335	
Trypsin		H315	P261
		H319	P280
		H334	P302 + P352
		H335	P305 + P351 + P338
			P337 + P313
			P342 + P311
Wasserstoffperoxid		H271	P220
		H332	P261
		H302	P280
	$ $ \vee	H314	P305 + 351 + 338
			P310

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den

Unterschrift

Danksagung

Dr. Michael Schreiber danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Laborgruppe anzufertigen. Besonders bedanken möchte ich mich für die produktiven Diskussionen während der Betreuung und für die Freiheiten, eigene Lösungswege zu verfolgen. Durch diese Zusammenarbeit bin ich sowohl wissenschaftlich als auch persönlich gewachsen.

Prof. Dr. Ulrich Hahn danke ich für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der LG Schreiber Kerstin, Janne, Kati, Lisa, Leo, Deniz, Birko und Franzi für die fachliche und moralische Unterstützung meiner Arbeit. Besonders Leo danke ich für die tolle Zeit im Labor und in Kambodscha. Ich danke auch allen Mitarbeitern des Bernhard-Nocht-Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und trotz so mancher Probleme stetig für eine positive Arbeitsatmosphäre sorgten.

Einen wertvollen Beitrag haben besonders die Mitarbeiter des Pasteur-Instituts Kambodscha geleistet. Ihnen danke ich für die zur Verfügung gestellten Seren, Viren und Antikörper, sowie für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor in Phnom Penh. Dabei möchte ich besonders Philippe Buchy, Philippe Dussart, Veasna Duong, Ong Sivuth, Ken Sreymom und Mao Sothearom erwähnen. Ebenso möchte ich Prof. Dr. Heiner Schaal und Prof. Dr. Alexandra Trkola für die Bereitstellung der pNL4-3-Luc-Vektoren danken. Dr. Thomas Jänisch, Dr. Simone Kann und Dr. Stefan Schilling danke ich für die zur Verfügung gestellten Seren aus ihren Studien in Burkina Faso, Kolumbien bzw. Vietnam. Außerdem gehört meine Dankbarkeit allen anonymen DENV-Patienten, deren Seren ich analysieren durfte. Ohne diese Proben wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen. Mein herzlicher Dank gilt meinen Freunden, die mich in schweren Zeiten unterstützt, in Zeiten des Zweifels bestärkt und in den guten Zeiten mit mir gefeiert haben. Steph, Jessi und Mayke danke ich für die tollen Pausen und noch mehr für die Zeiten außerhalb des Instituts. Ohne euch wäre so manche Idee nicht entstanden und so manche Krise nicht gemeistert worden. Wenn Kollegen zu Freunden werden, hat diese Arbeit mehr bewirkt, als nur einen wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn. Ebenso danke ich Chris, Carsten, Jay, Don und Semjon für ihre bewusste und unbewusste Unterstützung. Ihr habt mich stetig bestärkt, mutige Entscheidungen zu treffen.

Mit tiefer Verbundenheit und Dankbarkeit gedenke ich meiner Uroma, meinem Opa und Onkel Horst. Leider kann ich dieses wichtige Ereignis nicht mehr mit euch teilen. Aber ihr habt enormen Anteil daran, dass ich es bis hierhin geschafft habe.

Ich danke meiner Familie für die stete Unterstützung auf meinem bisherigen Weg. Dr. Volker danke ich für die Inspiration zum Biochemiestudium und der Hilfe beim Organik-Diplom. Ohne dich wäre ich da schon gescheitert. Erika und Veronika danke ich für das stete Interesse, auch an meiner Arbeit, und die vielen, hilfreichen Ratschläge. Meinem Bruder danke ich dafür, dass er stets zu mir hält, egal ob er meiner Meinung ist oder nicht. Und meinen Eltern danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung aller meiner Ideen und die Freiheit, die sie mir stets gewährten, diese auch umzusetzen.

Es gibt immer zwei Wege im Leben, den leichten und den richtigen. Und das hier war definitiv nicht leicht.

Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen