Aus der Abteilung Virologie
(Prof. Dr. med. F. T. Hufert)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Etablierung eines T7-RNA-Polymerase basierten Systems zur Generierung von *virus-like particles* (VLPs) des Oropouche-Virus'

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Berit Lauterjung-Jakobi, geb. Lauterjung

aus

Emden

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in:	Prof. Dr. med. F. T. Hufert
Ko-Referent/in:	PD Dr. rer. nat. A. Hahn
Drittreferent/in:	……..……..….

Datum der mündlichen Prüfung: 02.03.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Etablierung eines T7-RNA-Polymerase basierten Systems zur Generierung von *virus-like particles* (VLPs) des Oropouche-Virus'" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis……IV

Tabellenverzeichnis……..V

Abkürzungsverzeichnis...……...VII

1 Einleitung.....1

1.1 Das Oropouche-Virus 1

1.1.1 Klassifikation 1

1.1.2 Epidemiologie 1

1.1.3 Klinik der Oropouche-Infektion 2

1.1.4 Morphologie des Oropouche-Virus und Replikationsmechanismen 2

1.1.5 Das Minireplikon-System 5

1.1.6 *Virus-like particles* (VLPs) 7

1.2 Zielsetzung 7

2 Material und Methoden.....9

2.1 Standardmaterialien 9

2.2 Zellbiologische Methoden 11

2.2.1 Zellkultur und Zellaussaat.....11

2.2.2 Transfektion und Lyse 13

2.2.3 DNAse-Behandlung.....16

2.2.4 Luminiszenzmessung.....17

2.3 Molekularbiologische Methoden 18

2.3.1 cDNA-Synthese 18

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....21

2.3.3 Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten 23

2.3.4 Reinigung eines DNA-Fragments aus einem Agarosegel 25

2.3.5 TA-Klonierung.....25

2.3.6 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide.....27

2.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA 27

2.3.7.1 Retransformation in *E. coli*.....27

2.3.7.2 Vorkultur 28
2.3.7.3 Hauptkultur 28
2.3.7.4 Midi-Präparation 28
2.3.7.5 Mini-Präparation 28
2.3.8 Konzentrationsbestimmung von DNA 29
2.3.9 Reinigung von DNA/RNA 29
2.3.10 Restriktionsenzymverdau 30
2.3.11 Ligation 31
2.3.12 Minireplikon-System 31
2.3.13 Sequenzierung von Plasmiden 33
2.4 Statistik 33

3 Ergebnisse 34

3.1 Oropouche-Minireplikon-Kinetik-System 34
3.1.1 Einfluss der Oropouche-Polymerase 34
3.2 Herstellung von Oropouche-VLPs 36
3.3 Reklonierung des Plasmids pTM1-OROV-cM 40
3.3.1 Korrektur der Mutationen im OROV-M-ORF 40
3.3.2 Subklonierung von OROV-M1 in pI.18-M2-M3 41
3.3.3 Subklonierung der OROV-M-cDNA 42
3.3.4 Optimierung der Plasmidmengen zur Erzeugung von Oropouche VLPs 43
3.4 Optimierung der Detektion von VLPs in Zielzellen 45
3.4.1 Vergleich der Polymeraseaktivität unterschiedlicher OROV-Stämme 48

4 Diskussion 53

4.1 Die klinische Bedeutung des Oropouche-Virus 53
4.1.1 Das Minireplikon-Systems unter der Verwendung von Polymerasen unterschiedlicher Oropouche-Stämme 54
4.1.2 Ausblick 56

5 Zusammenfassung 58

6 Literaturverzeichnis 59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Aufbaus der Orthobunyaviren 5

Abbildung 2: Das virale Genom 5

Abbildung 3: OROV-Minireplikonsystem 7

Abbildung 4: OROV-Minireplikon-Aktivität 35

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Generierung von VLPs 37

Abbildung 6: Transduktion von BSR-T7-Zellen mit OROV-VLPs 38

Abbildung 7: Einfluss der Expression von OROV-M auf OROV-Minireplikon-Aktivität 39

Abbildung 8: Erzeugung des OROV-M-Expressionsplasmids pI18-OROV-M 42

Abbildung 9: Erzeugung des Plasmids pTM1-OROV-M 43

Abbildung 10: Einfluss der OROV-M Expression auf die OROV-Minireplikon-Aktivität 44

Abbildung 11: Renilla-Luciferase-Aktivität 24 h nach Transduktion mit VLPs 46

Abbildung 12: VLP-Detektion nach Transfektion der Ansätze mit unterschiedlichen L zu N Verhältnissen 48

Abbildung 13: Minireplikon-Systems unter der Verwendung von pTM1-orov-cLrep und pTM1-orov-LSA 49

Abbildung 14: VLP-Detektion mit dem Plasmid L-Göttingen 50

Abbildung 15: VLP-Detektion L-SA 51

Abbildung 16: VLP-Detektion mit L-SA 51

Abbildung 17: VLP-Detektion von L-SA und L-Gö in unterschiedlichen L:N-Verhältnissen 52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standardmaterialien 9
Tabelle 2: Zellkultur und Zellaussaat 11
Tabelle 3: Zelllinie 12
Tabelle 4: Transfektion und Lyse 13
Tabelle 5: Zelllinie bei Transfektion und Lyse 14
Tabelle 6: Plasmide bei Transfektion und Lyse 15
Tabelle 7: DNAse-Behandlung 16
Tabelle 8: Luminiszenzmessung 17
Tabelle 9: Materialien der cDNA-Synthese 18
Tabelle 10: Standardansatz der cDNA-Synthese 20
Tabelle 11: zusätzliche Komponenten der cDNA-Synthese 20
Tabelle 12: Materialien PCR 21
Tabelle 13: PCR-Primer 21
Tabelle 14: Komponenten PCR-Ansatz 22
Tabelle 15: Agarosegel-Elektrophorese 23
Tabelle 16: Reinigung DNA-Fragment bei Agarosegel-Elektrophorese 25
Tabelle 17: Protokoll zum Erzeugen der A-Überhänge 25
Tabelle 18: Protokoll Ligation 26
Tabelle 19: Komponenten der Dephosphorylierung von Plasmiden 27
Tabelle 20: Konzentrationsbestimmung DNA 29
Tabelle 21: Reinigung DNA/RNA 29
Tabelle 22: Restriktionsenzymverdau 30
Tabelle 23: Protokoll eines analytischen Verdaus 30
Tabelle 24: Protokoll eines präparativen Verdaus 31
Tabelle 25: Primer für die Sequenzierung von Plasmiden 33
Tabelle 26: Protokoll der Sequenzierung 33
Tabelle 27: Statistik 33

Tabelle 28: Zwei Versuchsansätze des OROV-Minireplikon-Systems 34

Abkürzungsverzeichnis

BUNV	Bunyavirales
C	Celsius
cDNA	*copy desoxyribonucleic acid*
dsDNA	*double-stranded desoxyribonucleic acid*
ssDNA	*single-stranded desoxyribonucleic acid*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	*Dulbecco´s Modified Eagle Medium*
DPBS	*Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline*
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
FKS	Fetales Kälber-Serum
FF-Luc	*Firefly*-Luciferase
h	Stunde
HPV	Humane Papillomviren
IRES	*internal ribosomal entry side*
kb	Kilobase
mRNA	*messenger ribonucleic acid*
N-Protein	Nukleoprotein
ORF	*open reading frame*
OROV	Oropouche-Virus
OROV-VLPs	Oropouche-*virus-like particles*
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PLB	*passive lysis buffer*
Ren-Luc	Renilla-Luciferase
RLU	*relative light units*
SA	*St. Andrews*
T7-Polymerase	T7-RNA-Polymerase
Taq	*Thermus aquaticus*
U	*unit*
VLPs	*virus-like particles*

1 Einleitung

1.1 Das Oropouche-Virus

1.1.1 Klassifikation

Das Oropouche-Virus gehört zum Genus Orthobunyavirus und damit zu der Familie der Peribunyaviridae. Zusammen mit den Familien Feraviridae, Fimoviridae, Hantaviridae, Jonviridae, Nairoviridae, Phasmaviridae, Phenuiviridae und Tospiviridae bilden die Peribunyaviren aufgrund von molekularen und serologischen Charakteristika die große Ordnung Bunyavirales. Mit der Ausnahme von Fimo- und Tospoviren, können oben genannte Viren Arthropoden infizieren. Von besonderem gesundheitspolitischem Interesse in Zentral- und Südamerika sind Mitglieder der Bunyavirales die nicht nur Arthropoden sondern auch Säugetiere infizieren (sogenannte Arboviren von englisch *arthropod borne*) und bei letzteren Krankheiten hervorrufen können (Elliott 1997; Elliott und Weber 2009; Vasconcelos et al. 2009). Peribunyaviren werden durch Mücken, Moskitos, Sandfliegen und Zecken übertragen (Elliott und Weber 2009). Oropouche-Virus Infektionen beim Menschen werden durch den Vektor *Culicoides paraensis*, einer Stechmückenart, verursacht (Pinheiro et al. 1981; Vasconcelos et al. 2009).

1.1.2 Epidemiologie

Die erste Isolation des Oropouche-Viruses gelang in Trinidad im Jahr 1955. Ein Waldarbeiter hatte sich mit dem Virus infiziert und litt unter Fieber (Anderson et al. 1961). Der erste Ausbruch des sogenannten Oropouche-Fiebers mit geschätzten 11.000 Fällen wurde in Belém, Brasilien, im Jahr 1961 beschrieben. Durch diesen Ausbruch wurde das epidemische Potential der Infektionerkrankung erkannt (Pinheiro et al. 1962). In Brasilien ist das Oropouche-Fieber die zweithäufigste durch Arboviren versursachte Erkrankung nach dem Denguefieber. Beschrieben sind Ausbrüche entlang des Amazonas und in zentral gelegenen Teilen Brasiliens. Insgesamt sind in den letzten 48 Jahren geschätzt 500.000 Infektionen durch das Oropouche-Virus aufgetreten (Bernardes-Terzian et al. 2009).

1.1.3 Klinik der Oropouche-Infektion

Die Infektion des Oropouche-Virus äußert sich in einem meist plötzlichen Krankheitsbeginn und Fieber von normalerweise 39 °C bis 40 °C (Pinheiro et al. 1981). In Manaus, der Hauptstadt des Bundesstaates Amazonas Brasiliens wurde zwischen 2007 und 2008 ein Ausbruch der Oropouche-Erkrankung beschrieben. Während dieses Ausbruchs wurden 631 Blutproben von Patienten gesammelt, die länger als fünf Tage an Fieber litten. 128 dieser Proben wurden positiv auf IgM-Antikörper des Oropouche-Virus getestet (Mourão et al. 2009). 72,2 % der Patienten litten unter Kopfschmerzen, 70,3 % an Myalgien und 57,8 % an Arthralgien. In 42,2 % der Fälle erkrankten die Patienten an Hautausschlägen, in 15,5 % traten hämorrhagische Symptome wie Petechien, Epistaxis und Blutungen des Zahnfleisches auf. Keiner dieser Patienten wurde hospitalisiert und litt unter Spätfolgen der Infektion (Mourão et al. 2009; Bastos et al. 2012). Das Fieber und die Symptome bei systemischer Erkrankung dauern zwei bis fünf Tage an, die Malaise kann jedoch bis zu einem Monat andauern (Pinheiro et al. 1981; Santos et al. 2012).

Es wurden Fälle von Meningoenzephalitiden in Brasilien beschrieben, die durch das Tucunduba-Virus, welches auch zu der Gattung der Orthobunyaviren gehört, verursacht wurden (Shope 1988) . Meningoenzephalitiden, die durch das Oropouche-Virus verursacht wurden, sind selten. Bisher wurden drei Fälle von Infektionen des Zentralen Nervensystems bei einer Infektion mit dem Oropouche-Virus beschrieben, die mittels reverser Transkription, gefolgt von einer PCR und Sequenzierung aus Liquor bestätigt wurden (Bastos et al. 2012). Trotz einer erheblichen Beeinträchtigung der an einer Oropouche-Infektion erkrankten Patienten, konnten bisher keine auf die Infektion zurückzuführenden Todesfälle verzeichnet werden (Pinheiro et al. 1981; Santos et al. 2012).

1.1.4 Morphologie des Oropouche-Virus und Replikationsmechanismen

Viruspartikel der Peribunyaviridae haben einen Durchmesser von circa 100 nm und sind von einer Lipidschicht in die die viralen Glykoproteine Gn und Gc eingelagert sind, umhüllt. Die Partikel enthalten die genomische RNA des Virus in Form von Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs). Die RNA aller Bunyavirales ist einzelsträngig, weist eine negative Polarität auf und besteht aus zwei oder drei Segmenten (S-, M- und L-Segment). Die RNP-Komplexe bestehen aus der von Nukleoprotein umhüllten RNA und sind assoziiert mit L-

Protein. Die Genome der Peribunyaviridae codieren für mindestens vier strukturelle Proteine: die virale Polymerase L auf dem L-Segment, die Glykoproteine Gn und Gc auf dem M-Segment und das N-Protein auf dem S-Segment. Einige Mitglieder der Bunyavirales codieren zusätzlich ein Nichtstrukturprotein NSs, das zelluläre Funktionen moduliert, auf dem S-Segment. Im Falle des OROV codiert das M-Segment zusätzlich das Nichtstrukturprotein NSm, dessen Funktion bisher nicht geklärt ist (Elliott 1990). Das OROV L-Segment hat eine Länge von 6846 Nukleotiden und enthält eine nicht-codierende Region am 5´-Ende aus 43 Nukleotiden, gefolgt von einem einzelnen offenen Leserahmen (*open reading frame*) aus 6750 Nukleotiden, welcher das L-Protein codiert (2250 Aminosäuren) und schließt ab mit einer nicht-codierenden Region am 3´-Ende aus 53 Nukleotiden (Aquino et al. 2003).

Das M-Segment besteht aus einem ORF, welcher ein Polyprotein codiert. Es entstehen nach oder während der Translation drei virale Proteine, zwei dieser Proteine sind Oberflächenproteine. Das größere dieser Oberflächenproteine heißt Gc (107.14 kDa), das kleinere heißt Gn (28.03 kDa). Das dritte Protein heißt NSm (26.26. kDa) (Travassos da Rosa et al. 2017). Das Gen für das S-Segment ist mit einer Länge von 754 Nukleotiden das kürzeste RNA-Segment. Es enthält zwei überlappende offene Leserahmen (ORF), wobei der größere ORF mit einer Länge von 693 Nukleotiden für das N-Protein codiert und der kleinere mit dem N-ORF überlappende ORF (273 Nukleotide) für das Nicht-Strukturprotein NSs codiert (Saeed et al. 2000). Die terminalen Nukleotide jedes Segments am 3´und 5´Ende sind komplementär. Dies ermöglicht die Formation einer doppelsträngigen RNA-Struktur, des sogenannten Pfannenstiels, welcher als Promoter für die Transkription und Replikation jedes Segments dient (Elliott 2014).

Analysen der Struktur des Gens, welches das Nukleoprotein codiert, ergaben drei in Zentral- und Südamerika vorherrschende OROV-Genotypen (I, II, III). Im Amazonasgebiet Brasiliens wurden die Genotypen I und II gehäuft gefunden (Saeed et al. 2000; Nunes et al. 2005; Vasconcelos et al. 2009).

Die Replikation des Virus findet im Zytoplasma statt. Der erste Schritt der Infektion ist das Eindringen des Virus in die Zelle beginnend mit der Bindung von Gn an einen bisher nicht identifizierten zellulären Rezeptor gefolgt von der Endozytose des Viruspartikels. Im sauren Milieu der Endolysosomen löst Gc durch eine Konformationsänderung die Fusion der

viralen und der endolysosomalen Membran aus. Die viralen Genomsegemente mit der daran assoziierten viralen Polymerase gelangen nun aus dem Endozytosevesikel in das Zytoplasma der Zielzelle (Elliott und Schmaljohn 2013).

Danach folgt die Transkription der genomischen RNA-Segmente negativer Polarität durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (Bishop et al. 1980; Elliott und Weber 2009). Die virale mRNA-Transkription wird eingeleitet durch das Abspalten von 5‘-Enden zellulärer mRNA circa 12 bis 18 Nukleotide nach dem 5´7-Methylguanosin-Rest (*cap*) durch die Endonukleose-Aktivität des L-Proteins. Dieser Vorgang wird *cap snatching* genannt (Elliott 2014). Nach der Transkription folgt die Translation der mRNA in Proteine. Die Translation des S-Segments und des L-Segments erfolgt an freien Ribosomen. Das M-Segment mit den Proteinen Gn und Gc wir am Endoplasmatischen Retikulum translatiert (Elliott 2014).

Nach der Transkription und Translation der viralen Proteine folgt die Replikation der viralen Genomsegmente. In Folge dessen entsteht eine komplementäre positivsträngige RNA (genannt Antigenom), die als Vorlage für die Synthese negativsträngiger Genome gilt. Das Genom und das Antigenom sind vom N-Protein umhüllt (Elliott und Weber 2009).

Die molekularen Grundlagen für den Wechsel der Polymerase vom Transkriptions- in den Replikationsmodus sind bisher nicht bekannt. Der entstandene Komplex aus RNA und N-Protein wird RNP (Ribonukleoprotein) genannt und wird innerhalb der Zelle zum Golgi-Apparat transportiert. Dort werden die RNPs in Vesikel verpackt. Diese Vesikel werden dann im Zytoplasma zur Zellmembran transportiert, wo sie mit dieser fusionieren und das Virus aus der Zelle geschleust wird.

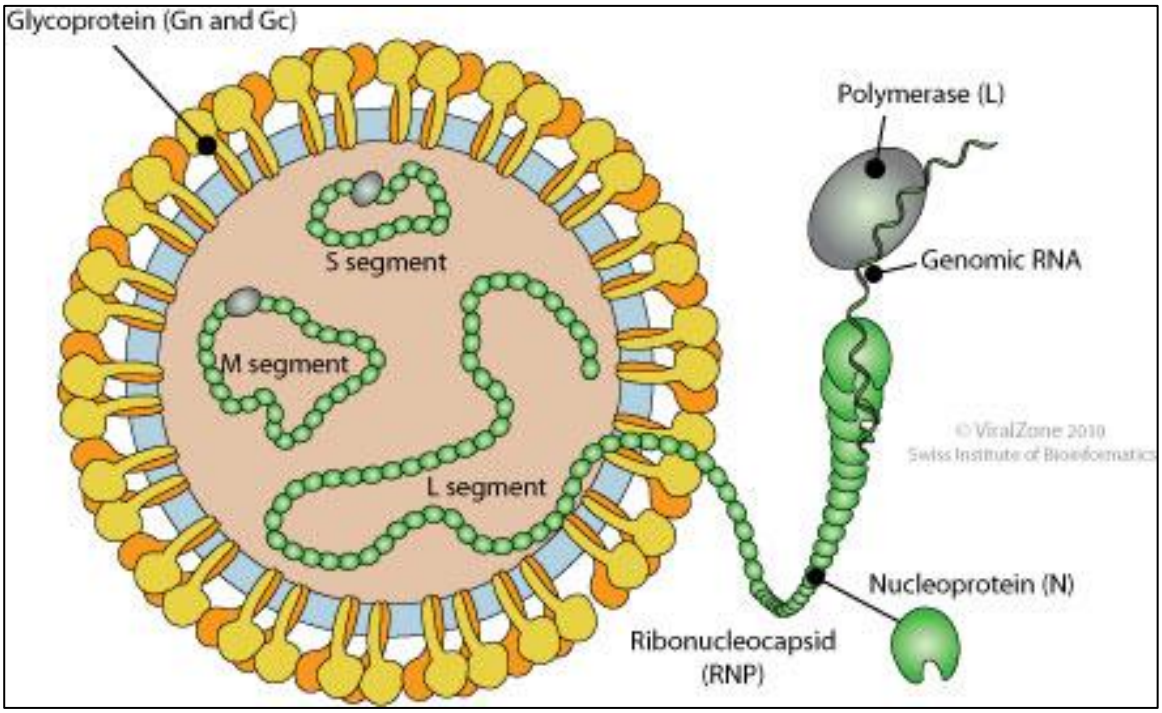

Abbildung 1: Darstellung des Aufbaus der Orthobunyaviren. Orthobunyaviren sind umhüllt von einer Lipiddoppelschicht in die die viralen Glykoproteine (Gn und Gc) eingelagert sind. Die einzelsträngige, negative RNA ist in drei Segmente geteilt (S-, M- und L-Segment), jedes Segment wird von dem Nukleoprotein N umhüllt (Ribonukleoprotein-Komplex) und ist mit der viralen Polymerase assoziiert. © ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioformatics (CC BY-NC-ND 4.0).

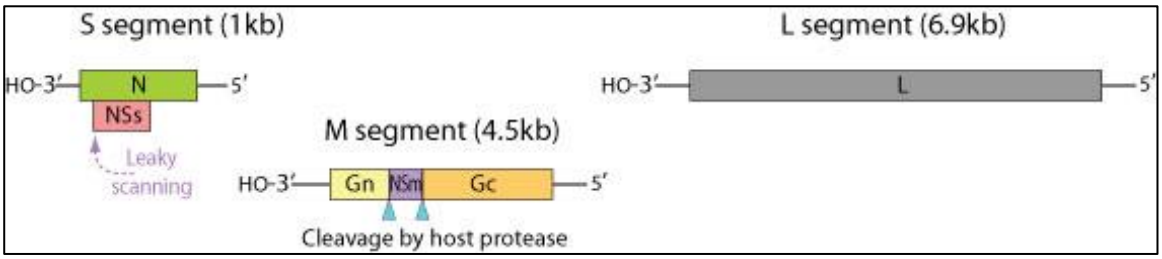

Abbildung 2: Das virale Genom codiert für sechs verschiedene Proteine auf drei Segmenten der RNA. Das S-Segment codiert für das Protein N und für das Nichtstrukturprotein NSs und hat eine ungefähre Größe von 1 kb. Das M-Segment codiert für die beiden Oberflächenproteine Gn und Gc sowie für das Nichtstrukturprotein NSm. Das M-Segment hat eine Größe von 4,5 kb. Das größte Segment mit 6,9 kb ist das L-Segment, welches für die virale Polymerase codiert. © ViralZone: www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioformatics (CC BY-NC-ND 4.0).

1.1.5 Das Minireplikon-System

Das Minireplikon-System stellt ein System dar, mit dem Transkriptions- und Replikationsvorgänge von Viren in einem virusfreien Kontext untersucht werden können. Es handelt sich um ein System, das aus Expressionsplasmiden sowie einen sog. Minigenomplasmid

besteht. Unter der Kontrolle von bestimmten Promotoren (in dieser Arbeit der T7-Polymerase Promoter) codieren die Expressionsplasmide für die virale Polymerase (OROV-L), das Nukleoprotein (OROV-N) welche essentiell für die Transkription/Replikation der viralen Genomsegmente sind. Die L- und N-Plasmide enthalten zwischen T7-Polymerase Promoter und dem ORF, der für die OROV-Polymerase bzw. das Nukleoprotein codiert, eine IRES-Sequenz (siehe Abbildung 3, T7-Promotor + IRES). Diese wird zusammen mit dem jeweiligen ORF in RNA umgeschrieben (siehe Abbildung 3, OROV-L und OROV-N mRNA) und ermöglicht eine Bindung der Ribosomen an die ungecappten Transkripte, die von der T7-Polymerase gebildet werden. Damit sind diese Transkripte zur Translation von viraler Polymerase und Nukleoprotein geeignet (siehe Abbildung 3, OROV-RNA-abhängige RNA-Polymerase und Nukleoprotein). Das Minigenomplasmid, welches ebenfalls mit Hilfe der T7-Polymerase transkribiert wird, imitiert das virale Genom, kann aber im Gegensatz zu den Expressionsplasmiden für Polymerase und Nukleoprotein erst nach Transkription durch die virale Polymerase translatiert werden. Um die Transkriptions-/Replikationsaktivität leicht messen zu können, wurde auf cDNA-Ebene im M-Segment in genomischer Orientierung das virale Gen durch ein Reportergen (hier: Renilla-Luciferase) ersetzt und so das Minigenom generiert (siehe Abbildung 3, Minigenom-RNA). Die Menge der gemessenen Reportergenaktivität korreliert mit der Transkriptions- und Replikationsaktivität der viralen Polymerase (Schnülle 2013). In dieser Arbeit wurden die Expressionsplasmide ausschließlich in BSR-T7-Zellen gebracht, die die T7-Polymerase konstitutiv exprimieren, da wie oben beschrieben, die Transkription der Plasmide T7-Polymerase abhängig ist.

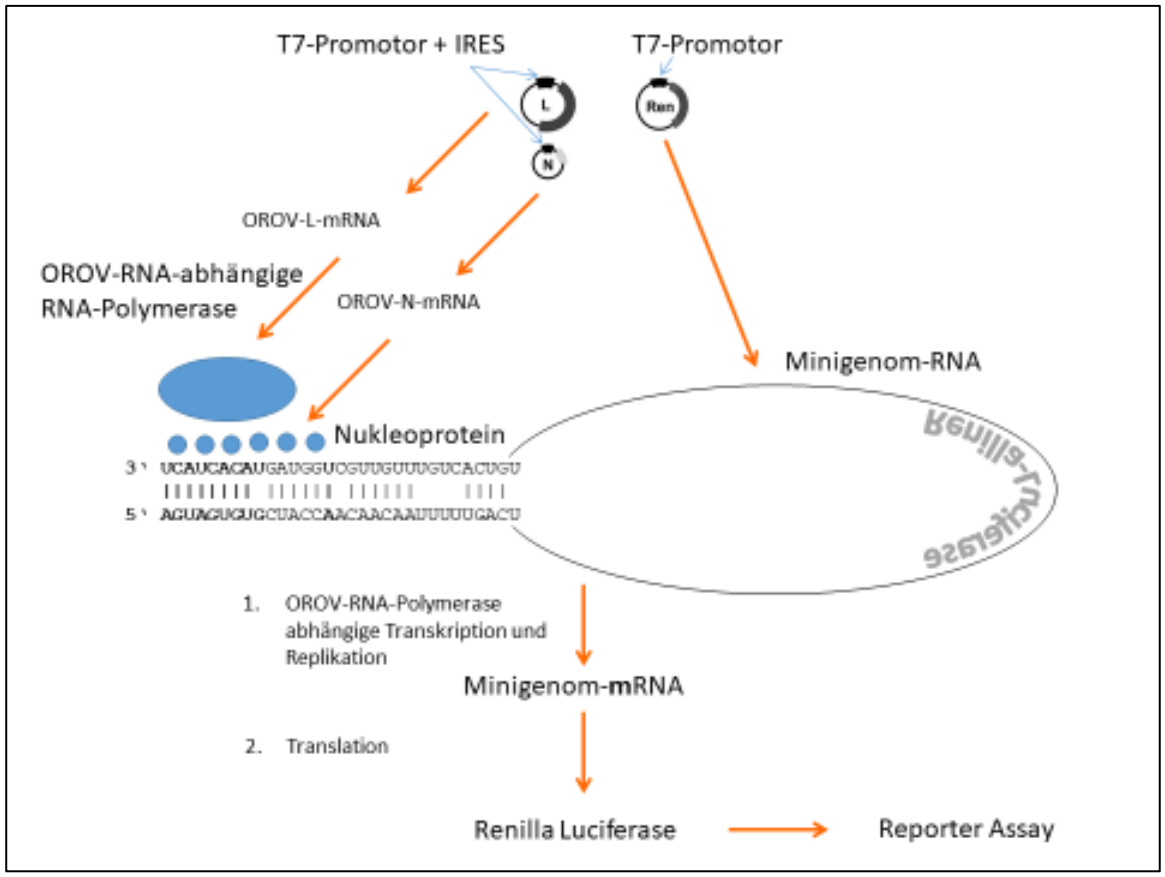

Abbildung 3: OROV-Minireplikonsystem. Erläuterungen siehe Abschnitt 1.1.5.

1.1.6 *Virus-like particles* (VLPs)

VLPs sind Partikel, die einem Virus ähneln, jedoch kein oder kein vollständiges virales Genom enthalten und somit nicht infektiös sind. Damit ist zwar ein Eindringen, aber keine Vermehrung in Zielzellen möglich. Daher können sie als sichere Vakzine eingesetzt werden, wie beispielsweise der Impfstoff Engerix zur Verhütung der Hepatitis-B-Infektion oder Cervarix, der als Vakzin gegen Humane Papillomviren eingesetzt wird (Roldao et al. 2010). Bisher existiert weder eine antivirale Therapie bei Oropouche-Infektionen noch ein Impfstoff. Durch die Etablierung des Minireplikon-Systems und dem Generieren von VLPs des Oropouche-Virus, können neue Erkenntnisse gewonnen werden, die bei der Entwicklung einer Therapie und/oder eines Impfstoffes von Bedeutung sein können.

1.2 Zielsetzung

Basierend auf vorangegangen Arbeiten ist das Ziel dieser Arbeit die Optimierung eines zuvor etablierten OROV Minireplikon-Systems und darauf aufbauend die Etablierung eines

Verfahrens zur Generierung von Oropouche-*virus-like particles* (OROV-VLP). VLPs können als effiziente und sichere Vakzine zum Schutz vor Bunyavirusinfektionen dienen (Pichlmair et al. 2010). Ein Verfahren zur effizienten Herstellung von ORO-VLPs könnte daher als Grundlage für die Entwicklung eines OROV-Vakzins dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Standardmaterialien

Bei den in der nachfolgenden Tabelle aufgelisteten Materialen handelt es sich um Standardmaterialien, die in der Mehrzahl der Versuche verwendet wurden.

Tabelle 1: Standardmaterialien

Geräte	**Hersteller**
Kühlschrank (5 °C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Deutschland
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Wärmebad	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Bakterienbrutschrank	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Pipetten (0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Gilson International, Limburg, Deutschland
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterilbank	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland

Geräte	**Hersteller**
Sterilbank	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland / Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Deutschland
Mikroskop	Nikon Instruments Europe B.V, Amstelveen, Niederlande
Feinwaage	TE 612, Schütt biotec GmbH, Göttingen, Deutschland
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	LG Electronics Deutschland GmbH Ratingen
Vortex	Grant Instruments Ltd, Cambridge, Großbritannien
Tischzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (5418; 5415 C)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	**Hersteller**
Vernichtungsbeutel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (0,1 – 10 µl, 1 – 100 µl, 1 – 200 µl, 101 – 1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, Deutschland
Handschuhe (Latex)	Mikroflex Corporation, Wien, Österreich
Chemikalien	**Hersteller**
Destilliertes Wasser (DNase/RNase-frei)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur und Zellaussaat

Tabelle 2: Zellkultur und Zellaussaat

Verbrauchsmaterialien	**Hersteller**
Gewebekulturflaschen mit Filter (25 cm², 75 cm²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kavitätenplatte (12 Kavitäten)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Medien und Zusätze	**Hersteller**
BioWhittaker DMEM (500 ml) *Dulbecco´s Modified Eagles Medium*	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
Fötales Kälberserum	c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
L-Glutamin	c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
Penicillin/Streptomyin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DPBS (500 ml) *Dulbecco´s Phosphate buffered saline*	c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4, 80 g NaCl, 5,76 g N_2HPO_4 in 1 l H_2O
Enzyme	**Hersteller**
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Antibiotika	**Hersteller**
G 418 (50 mg/ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

In der nachfolgenden Tabelle ist die verwendete Zelllinie, ihr Ursprungsgewebe, Nährmedium und die Bezugsquelle tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 3: Zelllinie

Zelllinie	**Ursprungsgewebe**	**Nährmedium**	**Bezugsquelle**
BSR-T7	Babyhamsternierenzellen mit stabiler Expression der T7-Polymerase	DMEM (gebrauchsfertig), supplementiert mit 500 µg/ml G418 120 µl G418 (50 mg/ml)	Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Durchführung der Zellkultur: Die verwendete Zelllinie BSR-T7 wird in einer Zellkulturflasche mit 12 ml gebrauchsfertigen DMEM im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO2 kultiviert. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um adhärent-wachsende Zellen, die in der Zellkulturflasche einen konfluenten Zellrasen bilden. Um ein kontinuierliches Wachstum zu gewährleisten, werden die Zellen zweimal pro Woche passagiert.

Der eigentliche Passagiervorgang läuft wie folgt ab: Alle verwendeten Medien werden auf Raumtemperatur gebracht. Bei dem gebrauchsfertigen *Dulbecco´s Modified Eagles Medium* (DMEM) und *Dulbecco´s Phosphate* (DPBS) geschieht dies im Wärmebad.

Zunächst wird an der Sterilbank das alte, verbrauchte Nährmedium der Zellkulturflasche entnommen und der Zellrasen wird mit 5 ml DPBS gewaschen. Dies geschieht, um Zellrückstände vollständig zu beseitigen. Anschließend wird 1 ml Trypsin/EDTA für 5 Minuten bei einer Optimaltemperatur von 37 °C direkt auf den Zellrasen gegeben, um ihn von der Zellkulturflasche zu lösen. Durch Beklopfen der Kultivierflasche lösen sich die BSR-T7-Zellen und durch Zugabe von 4 ml gebrauchsfertigem DMEM zum Trypsinat entstehen 5 ml Zellsuspension.

Abhängig vom Zeitpunkt des nächsten Passagiervorgangs und der gewünschten Zelldichte wird entschieden in welchem Verhältnis die Zellen passagiert werden. Bei zweimaligem Passagieren pro Woche und konfluentem Zellrasen wird in einem Verhältnis von 1 zu 10 passagiert. Das bedeutet von den entstandenen 5 ml Zellsuspension verbleiben 0,5 ml in

der Zellkulturflasche, der Rest wird verworfen. Durch Zugabe von 11,5 ml gebrauchsfertigem DMEM wird das Gesamtvolumen in der Kultivierungsflasche wieder auf 12 ml gebracht.

Zuletzt werden 120 µl des Antibiotikums G 418 hinzugefügt. Die BSR-T7-Zellen sind stabil mit einem Expressionsplasmid für die T7-Polymerase und gleichzeitig mit einem Geniticin-Resistenzgen transfiziert. Das Hinzufügen von Geniticin bewirkt, dass nur die Zellen überleben, die die T7-Polymerase und das Resistenzgen für Geniticin exprimieren.

Durchführung der Zellaussaat: Zur Durchführung von Experimenten, wie beispielsweise einem Reporter Assay, müssen Zellen in einer Zellkulturplatte mit Kavitäten ausgesät werden. Durch gleiche Volumina und Zellzahlen wird eine Vergleichbarkeit innerhalb des Tests und mit weiteren Tests erreicht.

Die folgende Formel dient zur Berechnung des Volumens des einzusetzenden Trypsinats.

Formel: ((Soll-Zellzahl pro Kavität) x Anzahl der Kavitäten) / Ist-Zellzahl pro ml Trypsinat = Volumen Trypsinat in ml.

Das Volumen Trypsinat wird abhängig von der Anzahl der Kavitäten mit gebrauchsfertigem DMEM aufgefüllt. Im Falle einer 12-Kavitäten-Zellkulturplatte entspricht dies einem Volumen von 1 ml pro Kavität.

2.2.2 Transfektion und Lyse

Tabelle 4: Transfektion und Lyse

Geräte	**Hersteller**
siehe Kapitel 2.1	
Medien	**Hersteller**
FuGene 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
OptiMEM	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM), 500 ml	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz

Medien	**Hersteller**
DMEM (gebrauchsfertig), 500 ml	500 ml DMEM, 50 ml FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 526,6 mg/l L-Glutamin Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
DPBS (500 ml) *Dulbecco´s Phosphate buffered saline*	c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4, 80 g NaCl, 5,76 g N_2HPO_4 in 1 l H_2O
Passive Lysis Buffer (PLB)	10 ml PLB in 40 ml Wasser, Promega Corporation, Mannheim, Deutschland
Chemikalien	**Hersteller**
G 418	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5: Zelllinie bei Transfektion und Lyse

Zelllinie	**Ursprungsgewebe**	**Nährboden**	**Bezugsquelle**
BSR-T7	Babyhamsternierenzellen mit stabiler Expression der T7-Polymerase	DMEM (gebrauchsfertig), 120 µl G 418	Institut für Virologie, Göttingen, Deutschland

Tabelle 6: Plasmide bei Transfektion und Lyse

Plasmide	Beschreibung	Hersteller/Bezugsquelle
pTM1-orov-cSmut	OROV-N Protein Expressionsplasmid	Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Abteilung Virologie
pI.18-orov-cSmut	OROV-N Protein Expressionsplasmid	Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Abteilung Virologie
pTM1-orov-cL rep	OROV-L Protein Expressionsplasmid	Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Abteilung Virologie
pT7riboSM2-orov-vMpro-vRL rep/neu	OROV-Minigenomplasmid	Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Abteilung Virologie
pTM1-orov-cM	OROV-Gn/Gc Expressionsplasmid	Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Abteilung Virologie
pTM1-orov-M (Esp3I)	OROV-Gn/Gc Expressionsplasmid	Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Abteilung Virologie
pI.18-orov-M (Esp3I)	OROV-Gn/Gc Expressionsplasmid	Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Abteilung Virologie
pTM1-FF-Luc	Firefly Luciferase Expressionsplasmid	Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Abteilung Virologie

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von Plasmiden in eukaryontische Zielzellen. Zu diesem Zweck wird das Transfektions-Reagenz FuGENE 6 verwendet. Es besteht aus einem Gemisch neutraler und kationischer Lipide gelöst in 80 prozentigen Ethanol. Plasmid-DNA kann die Doppellipidhülle der Zellmembran nicht überwinden. Das

Transfektionsreagenz umhüllt die Plasmid-DNA und ermöglicht so das Einbringen in die Zelle.

Durchführung Transfektion: Das Transfektionsreagenz wird zunächst in OptiMEM verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird es in einem Verhältnis von 3:1 der Plasmid-DNA in µg eingesetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 50 µl des Transfektionsansatzes in jede Kavität der Kultivierungsplatte pipettiert. Um einen optimalen Zellrasen zu erhalten, inkubieren die transfektierten ausgesäten Zellen im Brutschrank bei 37 °C. Durchführung Lyse: Um den Transfektionserfolg messen zu können, müssen die transfizierten Zellen zuvor durch den *Passive Lysis Buffer* lysiert werden. Hierzu wird das überstehende Medium der Zellen abpipettiert. Es folgt ein Waschschritt mit 100 µl PBS. Anschließend werden 100 µl PBS auf die Zellen gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wonach sich die Zellen durch leichtes Beklopfen der Kavitätenplatte vom Plattenboden lösen.

2.2.3 DNAse-Behandlung

Tabelle 7: DNAse-Behandlung

Geräte	**Hersteller**
siehe allgemeine Verbrauchsmaterialien Tabelle	
Chemikalien	**Hersteller**
Benzonase Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Zur Entfernung von freien Nukleinsäuren aus Zellkulturüberständen wird eine Endonuklease verwendet, die sowohl DNA als auch RNA zerstört.

Zu diesem Zweck werden 100 µl Zellkulturüberstand mit X U Benzonase versetzt und für 1 h bei 37 C inkubiert.

2.2.4 Luminiszenzmessung

Tabelle 8: Luminiszenzmessung

Geräte	**Hersteller**
FLUOstar Optima Microplate Fluorometer mit FLUOstar Reader Control and Data Analysis Software	BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland
Verbrauchsmaterialen	**Hersteller**
Lumitrac 200 96-Kavitäten-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Medien	**Hersteller**
10x DPBS	c.c. pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
1x PLB, 10 ml *Passive Lysis Buffer* (PLB, 5x) in 40 ml H_2O	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland
Reagenzien	**Hersteller**
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega Corporation, Mannheim, Deutschland. Inhalt: Luciferase Assay Puffer II, Luciferase Assay Substrat, Stop & Glo Puffer, Stop & Glo Substrat, Passiv-Lyse-Buffer (5x)
Plasmide	**Bezugsort**
pTM1-FF-Luc	Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Abteilung Virologie
pT7-ribo-SM2-OROV-vMpro-vRL	Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Abteilung Virologie

Dieses Verfahren ermöglicht durch Messen der Aktivität von Reportergen-Produkten Rückschlüsse auf die Aktivität des Promoters zu ziehen unter dessen Kontrolle die Expression des Reportergens erfolgt. Reportergene sind Gene, die für Enzyme codieren, deren Aktivität einer Messung leicht zugänglich ist.

In diesem Fall werden als Reporter die Enzyme *Firefly*-Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* und Renilla Luciferase aus der Koralle *Renilla reniformis* verwendet. Das

Reportergen Renilla Luciferase ist im Minigenom-Plasmid enthalten und wird abhängig von der T7-Polymerase exprimiert. Da es von der Oropouche Polymerase transkribiert wird, gilt es als Maß für die virale Transkriptionsfähigkeit.

Das Reportergen der Firefly Luciferase wird ebenfalls unter Kontrolle eines T7-Polymerase-abhängigen Promoters exprimiert und dient so zur Überprüfung der Transfektionseffizienz.

Im Dual Luciferase Reporter Assay können beide Reportergene in einem Testansatz zeitgleich getestet werden.

Nach der Lyse der transfizierten Zellen werden die entsprechenden Substrate des Dual Luciferase Reporter Assay nach Herstellerangaben hinzugefügt. Da bei dem Substratumsatz Licht entsteht, kann mittels eines Luminometers die Luciferaseaktivität der Renilla Luciferase und der Firefly Luciferase erfasst werden.

Für diese Methode werden, wie in Kapitel 2.1.1. beschrieben, die gewünschten Zielzellen ausgesät und gemäß dem Kapitel 2.1.2 transfiziert. Für die eigentliche Lumineszensmessung werden die Zellen mit 100 µl PLB pro Kavität lysiert und mit den entsprechenden Substraten des Dual Luciferase Reporter Assay nach Angaben des Herstellers Promega behandelt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 cDNA-Synthese

Tabelle 9: Materialien der cDNA-Synthese

Geräte	**Hersteller**
Thermo-*Cycler*	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Vortex	Grant Instruments Ltd, Cambridge, Großbritannien
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
PCR-*Softtubes*	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Medien	**Hersteller**
Desoxyribonukleosidtriphosphate als dNTP Mix 100 mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Chemikalien	**Hersteller**
Destilliertes Wasser (DNase-/RNase-frei)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	GE Healthcare Europe NV, Brüssel, Belgien
Enzyme	**Hersteller**
SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Primer	**Hersteller**
Random Hexamer Primer	Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
RNA	**Hersteller**
OROV-RNA	Abteilung Virologie, Universitätsmedizin Göttingen

Die Grundlage der Synthese von cDNA ist die reverse Transkription. Virale RNA wird durch das Enzym Superscript III, eine reverse Transkriptase, in einzelstängige DNA umgeschrieben und dient so als Ausgansmaterial für eine PCR.

Tabelle 10: Standardansatz der cDNA-Synthese

Komponente	**Volumen/Menge**
RNA	100 ng
sequenzspezifischen Primer	1 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
bidestilliertes Wasser	x µl
	12 µl Gesamtvolumen

RNA und Primer werden zunächst für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören und anschließend für 1 Minute auf Eis gestellt. Anschließend werden die in Tabelle 11 aufgeführten Komponenten hinzugefügt.

Tabelle 11: zusätzliche Komponenten der cDNA-Synthese

Komponente	**Volumen/Menge**
5x First-Strand Buffer	4 µl
0,1 M DTT	1 µl
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	1 µl
SuperScript III RT (200 U/µl)	1 µl
Template-RNA	x µl
ddH_2O	y µl
	20 µl Gesamtvolumen

Der gesamte Ansatz wird nun für zunächst 5 Minuten bei 25 °C, danach 60 Minuten bei 50 °C inkubiert.

Die cDNA-Synthese schließt mit der Inaktivierungsphase für 15 Minuten bei 70 °C ab. Die entstandene cDNA ist doppelsträngig und kann nun für eine PCR verwendet werden.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Tabelle 12: Materialien PCR

Geräte	**Hersteller**
siehe Kapitel 2.1	
Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
PCR-*Softtubes*	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Medien	**Hersteller**
Desoxyribonukleosidtriphosphate als dNTP Mix 10 mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
10x PfuUltra II Reaction Buffer	Agilent Technologies, Inc., 900 South Taft Loveland, Colorado 80537, USA
Chemikalien	**Hersteller**
Destilliertes Wasser (DNase-/RNase-frei)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Enzyme	**Hersteller**
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	Agilent Technologies, Inc., 900 South Taft Loveland, Colorado 80537, USA
Taq-DNA-Polymerase	5-Prime GmbH, Hamburg, Deutschland

Tabelle 13: PCR-Primer

Primer	**Sequenz (5´-3´)**	**Hersteller**
Esp3 M1-fov	GCAGAATTCGCCCTTGACAGACGTCTCCCATGGCGAATTTAATAATTATT	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Orov M1-rev	ATTCTGTCTTGTAAAGTATTCT	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Die PCR dient der exponentiellen Vervielfältigung einer Ausgangs-DNA, die in diesem Fall als *template* bezeichnet wird.

Allen Polymerase-Kettenreaktionen zugrunde liegend sind folgende Komponenten: einzelsträngige DNA, die das zu amplifizierende DNA-Fragment enthält, eine thermostabile DNA-Polymerase, einen Puffer, der jeweiligen DNA-Polymerase zugehörig, einen Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer, die das zu amplifizierende DNA-Fragment begrenzen, Desoxyribonukleotide und bidestilliertes Wasser.

Tabelle 14: Komponenten PCR-Ansatz

Komponente	**Volumen/Menge**
bidestilliertes Wasser	x µl
10x PCR-Puffer	5 µl
10 mM dNTP	1 µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	1 µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	1 µl
DNA-Polymerase	0,4 – 1 µl
cDNA	10 ng
	50 µl Gesamtvolumen

Der gesamte PCR-Ansatz wird in einem Thermocycler inkubiert, der die folgenden Reaktionsschritte zyklisch wiederholt.

Denaturierung: Durch eine Temperatur von 95 °C brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen beiden Strängen der Doppelstrang-DNA auf, sodass diese als Einstränge vorliegen. Vor Beginn der ersten Denaturierungsphase steht ein Initialisierungsschritt. In diesem Schritt wird der PCR-Ansatz für 2 Minuten auf 95 °C erhitzt, um intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken der cDNA und der Primer aufzulösen.

Annealing: Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer sind spezifisch für die Nukleotidsequenz des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Durch Absenken der Temperatur auf ein für die Primer spezifisches Optimum legen sich jene an die Einzelstrang-DNA an. Dieses Optimum liegt etwa 5 – 10 °C niedriger als die errechnete Schmelztemperatur des Primers.

In dieser Arbeit wurde die *Touchdown*-PCR angewendet. Sie unterscheidet sich von der Standard-PCR in der *Annealing*-Phase. Um unspezifische Bindungen der Oligonukleotide

zu vermeiden, wird die *Annealing*-Temperatur schrittweise um 1 °C pro Zyklus herabgesetzt. Es wird mit einer hohen Annealingtemperatur gestartet, um sicherzustellen, dass die Primer an dem richtigen Stellen des Templates binden. Es wird so eine hohe Spezifität der Primer-Bindung an die DNA erreicht, jedoch entstehen dabei auch wenige Amplifikate (Don et al. 1991).

Elongation: In dieser Phase stellt die DNA-Polymerase einen komplementären Strang zur cDNA her. Dabei dienen die Primer als Anfang des neuen Einzelstrangs. Die Polymerase synthetisiert vom 3´Ende des Templatestrangs in-5`-Richtung. Dabei muss eine für die Polymerase optimale Temperatur erreicht werden. Im Fall der PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase liegt diese bei 95 °C. Die Zeitdauer richtig sich nach der Länge der cDNA in kb angegeben. Bei Verwendung der PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase sind die 2 Minuten pro kb.

2.3.3 Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Tabelle 15: Agarosegel-Elektrophorese

Geräte	**Hersteller**
Chemidoc XRS System mit Software Quantity One	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophoresekammer Horizon	Life Technologies, Kalifornien, USA
Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
Zellkulturplatten (96 Kavitäten)	NUNC, Roskilde, Dänemark
Medien/Lösungen	**Hersteller und Zusammensetzung**
Agarosegele (1 %) groß	1 g Agarose, 100 ml 1x TAE, 5 µl Ethidiumbromid
Medien/Lösungen	**Hersteller und Zusammensetzung**
Agarosegele (1 %) klein	0,3 g Agarose, 30 ml 1x TAE, 1,5 µl Ethidiumbromid
TAE (1x)	40 ml TAE (50x) in 1960 ml Wasser

Chemikalien	Hersteller
6x Orange Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland als Lösung: 10 mg/ml in H_2O
DNA-Längenstandard O´GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

Die Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Die Nukleinsäuren der DNA sind negativ geladen und wandern daher zur Anode. Die Geschwindigkeit ist dabei abhängig von der Fragmentgröße. Kleine Fragmente wandern schnell zu Anode. Das gesamte Agarosegel ist bedeckt von einer Pufferlösung. Die einzusetzende Probe wird mit 6x Orange Loading Dye versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Der enthaltende Gycerolanteil hält die Probe am Boden der Taschen und verhindert so ein Ausschwemmen in die Pufferlösung.

Um die Größe der Fragmente einschätzen zu können, werden 1,5 µl DNA-Längenstandard in eine weitere Tasche pipettiert. Das elektrische Feld wir dann mit 100 Volt für circa 60 Minuten angeschlossen. Anschließend wird mit Hilfe des Chemidoc XRS Systems unter UV-Exposition ein Foto des Gels gemacht und kann ausgewertet werden.

Die Agarosegel-Elektrophorese wird in dieser Arbeit zur Überprüfung der Größe der DNA-Fragmente angewandt. Hierbei werden beispielsweise nach einem Restriktionsverdau und zur Herstellung eines präperativem Gels, aus dem unter UV-Lichtexposition mit Hilfe eines Skalpells das gewünschte DNA-Fragment ausgeschnitten.

2.3.4 Reinigung eines DNA-Fragments aus einem Agarosegel

Tabelle 16: Reinigung DNA-Fragment bei Agarosegel-Elektrophorese

Reagenzien	Hersteller
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Corporation, Kalifornien, USA

Mit Hilfe des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits werden DNA-Fragmente aus Agarosegelen gereinigt und konzentriert. Das Agarosegel wird durch eine Pufferlösung, die chaotrope Salz enthält aufgelöst. Im Folgenden bindet die DNA an eine Silicagel-Matrix über hydrophobe Wechselwirkungen. Es folgen Wasch- und Zentrifugationsschritte bis anschließend die DNA in destilliertem Wasser eluiert wird.

2.3.5 TA-Klonierung

TA-Klonierung dient dazu ein PCR-Produkt (*insert*) in einen Vektor einzufügen. Das Prinzip der TA-Klonierung basiert dabei auf der Eigenschaft der Taq-Polymerase, unabhängig von der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, ein Desoxyadenosin an die 3´-Enden des PCR-Produkts zu hängen. Der linearisierte Vektor besitzt Desoxythymidin-Überhänge an den 3´-Enden, sodass eine effiziente Ligation des PCR-Produkts in den Vektor möglich wird.
In dieser Arbeit wurde das TA Cloning Kit Dual Promoter (pCRII) der Firma Invitrogen verwendet.

Tabelle 17: Protokoll zum Erzeugen der A-Überhänge

Komponente	Volumen/Menge
gereinigtes PCR-Produkt	12 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
PCR-Puffer	2 µl
dNTP	1 µl
bidestilliertes Wasser	4,5 µl
	20 µl Gesamtvolumen

Das Puffervolumen sollte immer 1/10 des Gesamtvolumens betragen. Der Ansatz inkubiert bei 72 °C 30 Minuten. Anschließend wird ein Teil der Reaktion für die Ligation verwendet. Die Ligation wird mit Hilfe und nach Anleitung des Dual Promoter TA-Cloning Kit von der Firma Invitrogen durchgeführt.

Tabelle 18: Protokoll Ligation

Komponente	**Volumen/Menge**
gereinigtes (siehe Kapitel 2.3.4) PCR-Produkt (mit A-Überhängen)	2 µl
10x Ligationspuffer	1 µl
Wasser	4 µl
linearisierter pCRII Vektor (mit T-Überhängen)	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
	10 µl Gesamtvolumen

Es ist zu beachten, dass die DNA-Ligase stets gekühlt verbleiben muss. Nach dem Zusammenführen der Reagenzien, inkubiert der Ansatz für 16 h bei 14 °C.
Es folgt die Transformation des Ligationsproduktes in kompetente *E. coli* Zellen, die anschließend auf eine LB-Amp-Platte ausgestrichen werden.

Um nur transformierte Bakterien, die ein Plasmid mit Insert enthalten zur weiteren Verarbeitung zu verwenden, bedient man sich der Blau-Weiß-Selektion. In der Klonierungsstelle im Vektor pCRII liegt das lacZ′-Gen. Dieses codiert für das N-terminale α-Fragment der β-Galaktosidase, das keine β-Galaktosidase-Aktivität besitzt. Zur Transformation werden Bakterien verwendet, die eine Mutation im lacZ´-Gen tragen, die dazu führt, dass keine enzymatisch aktive β-Galaktosidase gebildet werden kann. Es handelt sich bei dieser Mutation um die Deletion der genetischen Information für die N-terminalen Aminosäuren 11 – 41. Das mutierte Gen wird als lacZ ΔM15 und sein Genprodukt als ω-Fragment bezeichnet. Das α-Fragment, das nach Transformation des Plasmids in die Bakterien gebildet wird, lagert sich mit dem ω-Fragment zusammen, so dass die enzymatisch aktive Form der β-Galaktosidase entstehen kann. Dieser Vorgang wird als α-Komplementation bezeichnet. Dies erlaubt eine Unterscheidung von Bakterien, die nach Transformation ein Plasmid mit Insert tragen von denen, die ein Plasmid ohne Insert tragen. Bakterien, die mit Plasmiden, die kein Insert tragen, transformiert wurden können enzymatisch aktive β-Galaktosidase bilden und färben sich blau.

Bakterien, die mit Plasmiden, die nach erfolgreicher Ligation ein Insert tragen, transformiert wurden, können keine enzymatisch aktive β-Galaktosidase bilden, da es durch das

Einsetzen des Inserts zu einer Zerstörung des Leserasters des lacZ′-Gens gekommen ist und somit kein α-Fragment gebildet werden kann. Die LB-amp-Platten werden vor dem Ausplattieren der transformierten Bakterien mit IPTG und X-Gal behandelt und nach Transformation über Nacht inkubiert. Hierbei dient das IPTG der Aktivierung des lacZ-Promotors und X-Gal als Substrat für die β-Galaktosidase, aus dem durch die enzymatische Umsetzung der blaue Farbstoff entsteht (Mülhardt 2013).

2.3.6 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Die Dephosphorylierung des Vektors durch eine Alkalische Phosphatase wird vor der Ligation von Insert und Vektor durchgeführt. Die 5´-Phosphat-Enden des Vektors werden entfernt, wodurch eine Religation verhindert wird. Dadurch maximiert sich die Wahrscheinlichkeit, dass sich das gewünschte Insert und der Vektor ligieren. Die in dieser Arbeit verwendete Phospatase ist die Alkalische Phosphatase von der Firma Roche.

Tabelle 19: Komponenten der Dephosphorylierung von Plasmiden

Komponente	**Volumen/Menge**
linearisierter Vektor	500 ng
Puffer	2 µl
Alkalische Phosphatase	1 µl
Wasser	x µl
	20 µl Gesamtvolumen

2.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA

2.3.7.1 Retransformation in *E. coli*

Die Retransformation von Plasmid-DNA dient der Vervielfältigung von schon bestehender DNA. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit DNA in immunkompetente *E.coli*-Zellen (XL1 blue) transformiert. 50 µl *E.coli*-Suspension sind in Softtube-Gefäßen bei -80 °C eingefroren und werden zunächst schonend auf Eis aufgetaut. Mit Hilfe eines Bunsenbrenners wird eine sterile Kuppel gebildet, unter dieser dann 1 µl von der zu vervielfältigen Plasmid-DNA in die Bakteriensuspension pipettiert und inkubiert für 30 Minuten auf Eis.

Anschließend wird der gesamte Ansatz unter der sterilen Kuppel auf eine LB-amp-Agarplatte gegeben und inkubiert für 16 h im Brutschrank. Da das verwendete Plasmid eine Codierung für eine Ampicillin-Resistenz enthält, wachsen ausschließlich Bakterien, die das Plasmid enthalten.

2.3.7.2 Vorkultur

Es werden gewachsene Bakterienklone von den LB-amp-Platten mit Hilfe einer Pipettenspitze gepickt und in 5 ml LB-amp-Medium im Schüttelinkubator bei 37 °C 8 h inkubiert. Dabei wird jeweils ein Klon in 5 ml LB-amp-Medium inkubiert.

2.3.7.3 Hauptkultur

Zunächst werden unter einer sterilen Kuppel 50 ml LB-amp-Medium in jeweils einen Erlenmeyerkolben überführt. Es wird pro erwünschte Plasmid-DNA-Herstellung 50 ml LB-amp-Medium benötigt. Je nach Trübung der Vorkultur werden 100 – 200 µl der Vorkultur in 50 ml LB-amp-Medium überführt und wiederum im Schüttelinkubator 16 h bei 37 °C inkubiert.

2.3.7.4 Midi-Präparation

Die aus der Hauptkultur gewonnene Plasmid-DNA wird mit Hilfe und nach Anleitung des NucleoBond AX PC 100 aufbereitet.

Jeder Hauptkulturansatz wird im ersten Schritt 15 Minuten zentrifugiert, damit die DNA sich als Pellet im Zentrifugationsröhrchen niederschlägt. Nachdem die DNA nach Anleitung des Kits behandelt wurde, wird diese nach Eluationsschritt mit 2 ml 70 % Ethanol gefällt, für 30 Minuten bei 15.000 G zentrifugiert und anschließend getrocknet. Abschließend wird das die DNA mit 200 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert und kann nun verwendet werden.

2.3.7.5 Mini-Präparation

Diese Plasmid-DNA-Präparation wird mit Hilfe des PEQLAB Biotechnologie Miniprep Kits und dessen Anleitung durchgeführt. Zur Präparation wird ebenfalls die DNA aus der Hauptkultur verwendet.

2.3.8 Konzentrationsbestimmung von DNA

Tabelle 20: Konzentrationsbestimmung DNA

Gerät	**Hersteller**
Nano Drop ND-1000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn, Deutschland
Chemikalien	**Hersteller**
Bidestilliertes Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Clear and Concentrator™-5	Zymo Research Corporation, Irvine, Kalifornien, USA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgt durch ein Absorptionsspektrometrie mittels des Nano Drop ND-1000 Spektralphotometers, in der über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm die Konzentrationen aller in der Probe enthaltende Nukleotide (RNA, ssDNA, dsDNA) ermittelt werden. Daher ist es wichtig möglichst pure DNA bei der Konzentrationsbestimmung zu verwenden, um ein optimales Ergebnis zu erzielen.

Das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm ist ein Maßstab für die Reinheit der DNA. Ein Verhältnis von 1,8 steht für sehr reine DNA. Falls die unreine DNA detektiert wird, kann mit Hilfe des Clear-and-Concentrator-Reinigungskits die Probe nochmals gereinigt werden.

Zur Konzentrationsbestimmung werden 1,5 µl der Probe eingesetzt, zuvor wird das Spektralphotometer jedoch mit der entsprechenden Elutionslösung geeicht.

2.3.9 Reinigung von DNA/RNA

Die Reinigung von DNA und RNA erfolgt mit dem Clear-and-Concentrator-Reinigungskit und wird nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 21: Reinigung DNA/RNA

Chemikalien	**Hersteller**
Clear and Concentrator™-5	Zymo Research Corporation, Irvine, Kalifornien, USA

2.3.10 Restriktionsenzymverdau

Tabelle 22: Restriktionsenzymverdau

Material	Hersteller
FD-Enzym SacI	Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA
FD-Enzym BclI	Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA
XhoI	Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA
Esp3I	Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA
AleI	Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA
10x FD-Puffer	Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA

Der Restriktionsverdau wird mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen vollzogen. Diese Enzyme erkennen die für sie spezifischen Erkennsequenzen und spalten die DNA an diesen Stellen hydrolytisch.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Enzyme verwendet, die einem Schnellverdau zugrunde liegen, d.h. sie benötigen nur 5 Minuten bei 37 °C um den Enzymverdau zu vollziehen. Der hier angewandte Restriktionsverdau für zwei Anwendungen benutzt, der präparative Verdau und der Kontrollverdau.

Analytischer Verdau: Um den Erfolg einer Klonierung eines spezifischen DNA-Abschnitts in einen Vektor zu überprüfen, wird ein analytischer Verdau durchgeführt und anschließend zur grafischen Darstellung auf ein analytisches Agaraose-Gel aufgetragen.

Tabelle 23: Protokoll eines analytischen Verdaus

Komponente	Volumen/Menge
FD-Enzym	1 µl
10x FD-Puffer	2 µl
Plasmid-DNA	3 – 5 µl
bidestilliertes Wasser	12 – 14 µl
	20 µl Gesamtvolumen

Präparativer Verdau: Um in einer Klonierung ein gewünschtes spezifisches DNA-Stück (*insert*) in einen gewünschten Vektor einzubringen, wird zuvor ein präparativer Verdau

durchgeführt. Er dient zum einen dazu, den gewünschten DNA-Abschnitt (*insert*) aus einem DNA-Strang auszuschneiden und zugleich, wenn dies möglich ist, spezifische Schnittstellen einzubringen.

Tabelle 24: Protokoll eines präparativen Verdaus

Komponente	**Volumen/Menge**
FD-Enzym	1 µl
10x FD-Puffer	2 µl
Plasmid-DNA	3 – 5 µg
bidestilliertes Wasser	x µl
	80 – 100 µl Gesamtvolumen

2.3.11 Ligation

Dieser Schritt dient der Verknüpfung eines zuvor dephosporylierten Vektors (siehe Kapitel 2.3.6) mit einem Insert. Beim Restriktionsverdau entstehen *blunt* oder *sticky* Enden, diese können durch die hier angewandte Ligationsmethode verknüpft werden, da in dem verwendeten Ligations-Reagenzienansatzes die T4-DNA-Ligase verwendet wird. Diese Ligase macht eine Ligation von zuvor nicht kompatiblen Restriktionsschnittstellen möglich.
Der in dieser Arbeit verwendete Reagenzienansatz ist das Rapid-DNA-Ligation-Kit der Firma Thermo Scientific. Die Anwendung wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.12 Minireplikon-System

Das Minireplikon-System stellt ein System dar, mit dem Transkriptions- und Replikationsvorgänge von Viren in einem virusfreien Kontext untersucht werden können. Es handelt sich um ein auf Plasmiden basierenden System, das aus den folgenden Komponenten besteht. Einem Minigenom-Expressionsplasmid und zwei Expressionsplasmiden, die im folgenden Text näher erläutert werden. Das Minigenom-Expressionsplasmid, welches unter der Kontrolle der T7-Polymerase transkribiert wird, imitiert das virale Genom. Ein virales Gen wird dabei durch ein in genomischer Orientierung in das Plasmid kloniertes Reportergen (hier: Renilla-Luciferase) ersetzt. Das Reportergen wird von den viralen 3´- und 5´-nichtcodierenden Enden des M-Segments flankiert. Im natürlich vorkommenden viralen Replikationszyklus dienen diese Enden als Promoterregion für die virale Polymerase. Die

Menge des translatierten Reportergens korreliert mit der Transkriptions-/Replikationsaktivität der viralen Polymerase. Die beiden übrigen Expressionsplasmide enthalten die Nukleotidsequenz der viralen Polymerase (OROV-L) und des viralen Nukleoproteins (OROV-N) und liegen im Gegensatz zum Minigenom-Expressionsplasmid in antigenomischer Richtung vor. Wie schon erwähnt, sind auch diese Expressionsplasmide von der T7-Polymerase abhängig.

Die drei Plasmide werden in eine T7-Polymerase-exprimierende Zellereihe (BSR-T7) transfiziert. Dadurch können die Expressionsplasmide transkribiert werden. Nach der Transkription entsteht bei den in antigenomischer Richtung vorliegenden Sequenzen eine positivsträngige mRNA, die durch die Zelle in die OROV-Polymerase und in das OROV-Nukleoprotein translatiert werden kann. Die Sequenz des Minigenoms liegt jedoch in genomischer Orientierung vor, sodass nach der Transkription eine einzelsträngige RNA mit negativer Polarität vorliegt.

Diese negativsträngige RNA des Minigenoms wird durch die bereits translatierte Polymerase zusammen mit dem Nukleoprotein unter der Bildung eines RNP-Komplexes in positivsträngige mRNA transkribiert, sodass die Translation des Minigenom-Reporter-Gens folgen kann.

Abschließend werden die Zellen nach bestimmten Inkubationszeiten nach Zugabe von Substrat lysiert. Die Menge des umgesetzten Reporterproteins kann nun anhand des Substratumsatzes quantifiziert werden. Da eine Korrelation zwischen viraler Transkriptions-/Replikationsaktivität und produzierter und gemessener Renilla-Luciferase besteht, kann eine Aussage über die virale Transkriptions- bzw. Replikationsaktivität des Virus´ getroffen werden (Schnülle 2013).

2.3.13 Sequenzierung von Plasmiden

Die Sequenzierungsarbeit in dieser Arbeit wurde durch die Firma Seqlab – Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen, Deutschland bearbeitet.

Die zur Sequenzierung verwendeten Primer (Firma) werden nachfolgend tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 25: Primer für die Sequenzierung von Plasmiden

Primer	**Sequenz (5'-3')**
OROV-cM_mp-for1	ACAACTTCGACATCAGGCTG
OROV-cM_mp-rev1	TATCAAGCCGCACATGGAGC
OROV-cM_mp-for2	ACCTTGGTAGATCCACCCGC
OROV-cM_mp-rev2	AATTCTTTGTGGGTCTTGTC

Tabelle 26: Protokoll der Sequenzierung

Komponente	**Volumen/Menge**
Plasmid-DNA	600 ng
Primer	2 µl
DNA-freies Wasser	x µl
	7 µl Gesamtvolumen

2.4 Statistik

Tabelle 27: Statistik

Programm	**Hersteller**
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Anhand des beschriebenen Versuchsaufbaus wurden verschiedene, voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und Ergebnisse erzielt, die eine Transfektionseffizienz beschreiben. Aus den Ergebnissen wurden Mittelwerte gebildet.

Durch einen zweiseitigen t-Test ausgehend von Stichproben mit unterschiedlichen Varianzen wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Versuchsreihen analysiert. Unterschiede zwischen Messwerten mit p-Werten $\leq 0{,}05$ werden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Oropouche-Minireplikon-Kinetik-System

Mit dem Ziel die Transkription und Replikation des Oropouche-Virus´ zu untersuchen, ist es bereits in vorangegangenen Arbeiten gelungen, ein Minireplikon-System zu etablieren.

3.1.1 Einfluss der Oropouche-Polymerase

Für die Rekonstitution eines aktiven viralen OROV-Transkriptions-/Replikationskomplexes in eukaryontischen Zellen bei gleichzeitiger Abwesenheit von infektiösem Virus werden folgenden Komponenten benötigt: Ein zu transkribierendes und replizierendes Minigenom, das für ein Reportergen codiert. Zudem das virale Nukleoprotein zur Rekonstitution von RNP-Komplexen und die virale Polymerase für die Transkription und Replikation der RNP-Komplexe. Alle Komponenten werden in Form von Plasmiden in Zellen transfiziert, die dort dann transkribiert bzw. zur Expression gebracht werden. Zu diesem Zweck wurden BSR-T7-Zellen in 12 Kavitäten ausgesät (siehe Kapitel 2.2). Anschließend wurden diese mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGENE 6 mit den Plasmiden des Minireplikon-Systems transfiziert. Es wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt je 0,3 µg der jeweiligen Konstrukte pro Kavität (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Zwei Versuchsansätze des OROV-Minireplikon-Systems

OROV-Minireplikon mit OROV-L	**OROV-Minireplikon ohne OROV-L (Negativkontrolle)**
pTM1-orov-cSmut	pTM1-orov-cSmut
pTM1-orov-cL rep	pUC19
pT7riboSM2-orov-vMpro-vRLrep./neu (Minigenom)	pT7riboSM2-orov-vMpro-vRLrep./neu (Minigenom)

Beide Ansätze wurden nach jeweils 0, 24 und 48 h lysiert und wurden daher dreifach angesetzt. Um die Transfektionseffizienz zu überprüfen wurden alle Ansätze mit 0,15 µg pTM1-FFLuc pro Kavität transfiziert (siehe Kapitel 2.2.2). Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die einzelnen Kavitäten mit jeweils 100 µl PLB lysiert (siehe 2.2.2) und anschließend die Enzymaktivität der Reportergene FF-Luc und Ren-Luc und somit die

Transfektionseffizienz sowie Replikations-/Transkriptionsaktivität luminometrisch gemessen.

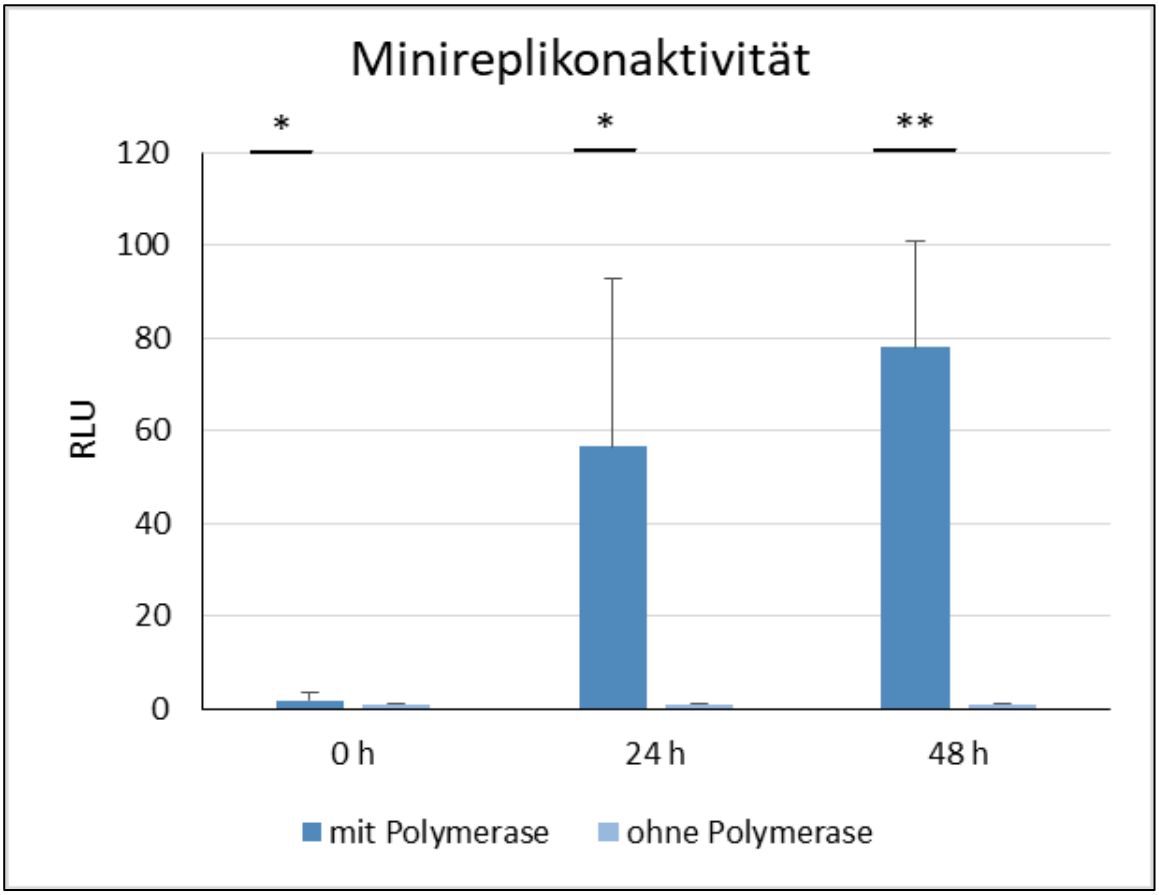

Abbildung 4: OROV-Minireplikon-Aktivität. Die Minireplikon-Aktivität wird zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion des Expressionskonstruktes für die Oropouche-Polymerase gemessen. Die Ansätze mit Polymerase zeigen einen signifikanten Anstieg an Transkriptionsaktivität im Vergleich zu den Ansätzen ohne Polymerase über die Zeit. Dargestellt sind Mittelwerte von vier unabhängigen Messungen.

Der Ansatz mit Polymerase enthält das Plasmid cLrep, welches für die virale Polymerase codiert. Im Ansatz ohne Polymerase fehlt dieses. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt eine spezifische Renilla-Luciferase-Aktivität ausschließlich nach Expression der viralen Polymerase (siehe Abbildung 4). Dies bedeutet, die gemessenen Aktivitätswerte sind spezifisch für die rekonstituierten viralen Transkriptions-/Replikationskomplexe. Zusätzlich ist ein Anstieg der Renilla-Luciferase über die Zeit zu beobachten, was auf eine spezifische Aktivität der viralen Polymerase hindeutet. Damit sind die Voraussetzungen gegeben, um

aufbauend auf das Minireplikonsystem, ein Verfahren zur Herstellung von Oropouche VLPs zu etablieren.

3.2 Herstellung von Oropouche-VLPs

VLPs sind Partikel, die im einfachsten Fall nur aus Hüll- oder/und Kapsidproteinen bestehen und daher replikationsdefizient sind. Manche VLPs weisen ähnliche Charakteristika wie Wildtypviren in Struktur und Antigenität auf und konnten so bereits erfolgreich als Impfstoffe eingesetzt werden (Grgacic und Anderson 2006). Das in Kapitel 3.1 beschriebene Minireplikon-System wurde durch die Hinzunahme des Plasmids pTM1-orov-cM zur Expression der OROV Hüllproteine Gn und Gc und somit zur Generierung von VLPs erweitert. Das Plasmid pTM1-orov-cM codiert für die Glykoproteine Gn und Gc sowie für das Nichtstrukturprotein NSm. Ziel der Hinzunahme dieses Plasmides zum Minireplikon-Transfektionansatz war, durch die Expression der Glykoproteine die Basis für die Bildung von VLPs zu schaffen. 24 und 48 h nach Transfektion wurden die Überstände der Transfektion zur Transduktion auf die Zielzellen (BSR-T7-Zellen) gegeben. Diese Zielzellen wurden dann nach 24 und 48 h lysiert und anschließend die Renilla-Luciferase-Aktivität in den Lysaten bestimmt. Wie Abbildung 6 zeigt, konnte in allen Ansätzen nur eine sehr niedrige Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen werden. Zudem war diese Aktivität in den meisten Ansätzen, in denen keine Expression von OROV-M erfolgte (und damit keine VLPs entstehen können) höher als in den Ansätzen mit OROV-M Expression, die der Erzeugung von VLPs dienen sollten. Somit war es in diesem Experiment nicht gelungen, funktionelle Oropouche-VLPs zu erzeugen.

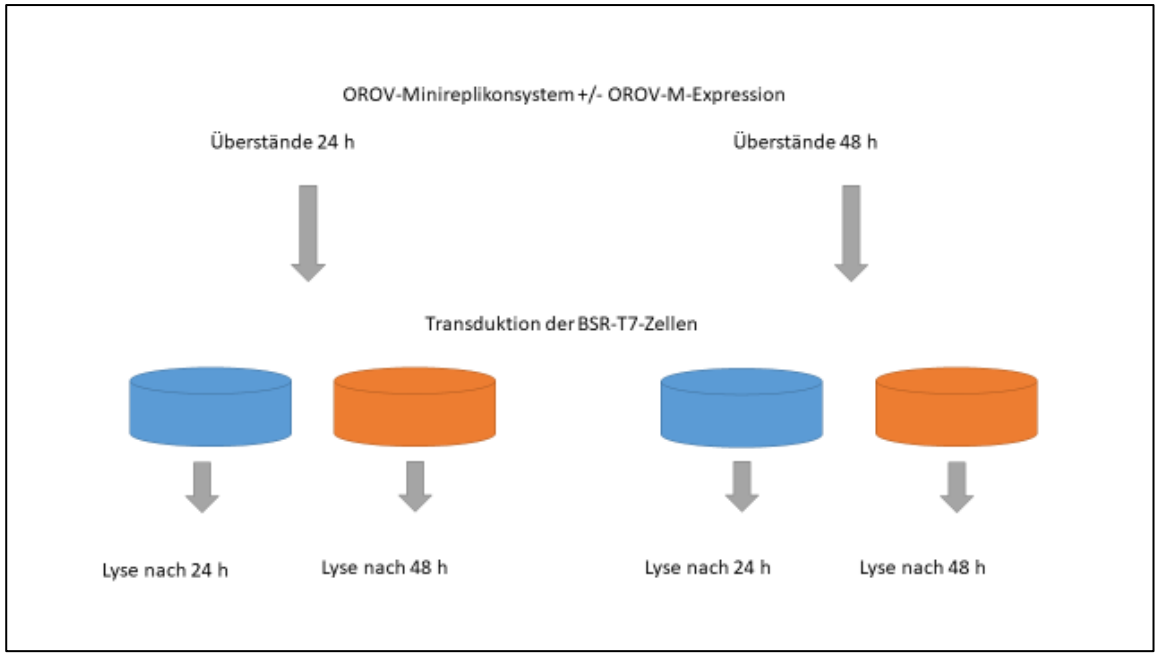

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Generierung von VLPs. Die Überstände zwei verschiedener Minireplikonansätze wurden nach 24 und 48 h auf BSR-T7-Zellen gegeben und diese wurden jeweils nach 24 bzw. 48 h lysiert. Die farbliche Anordnung ist analog zu Abbildung 6.

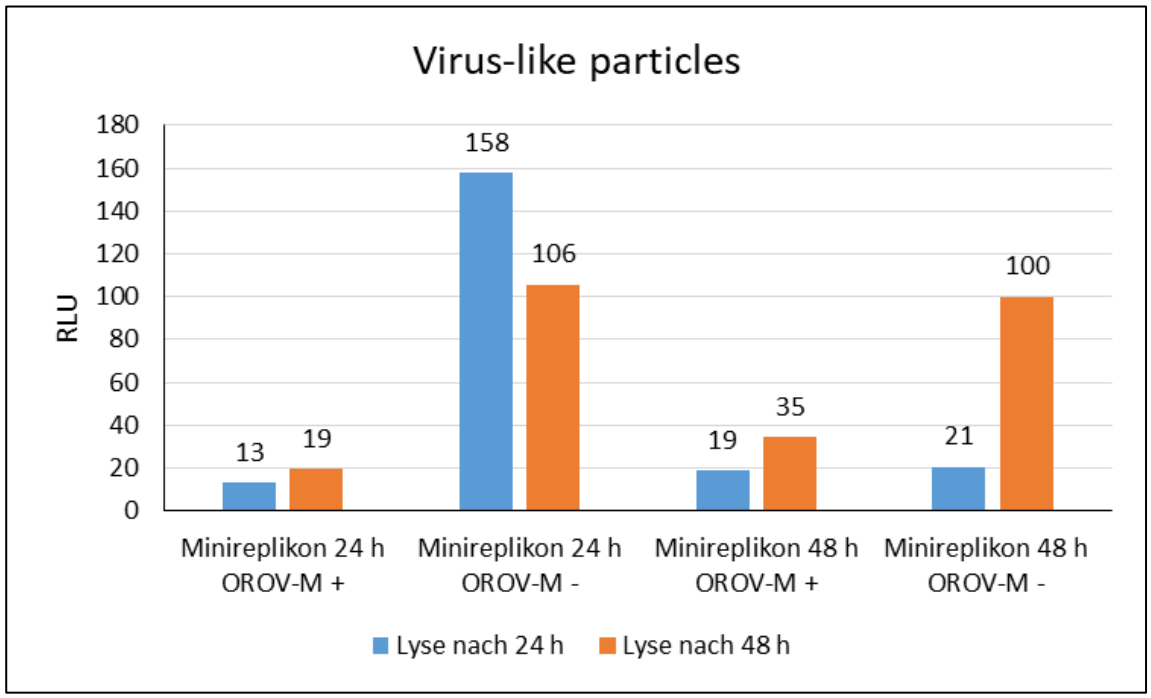

Abbildung 6: Transduktion von BSR-T7-Zellen mit OROV-VLPs. Die Transduktion wird durch die Bestimmung der Renilla-Luciferaseaktivität nachgewiesen. Zur Erzeugung von Oropouche-VLPs wurden BSR-T7 Zellen mit den OROV Minireplikon-Plasmiden sowie einem OROV-M Expressionsplasmid transfiziert. In einem zweiten Ansatz unterblieb die OROV-M Expression als Negativkontrolle. Nach 24 h bzw. 48 h wurden die Überstände geerntet und auf frische BSR-T7 Zellen gegeben. Diese wurden nach 24 h (blaue Säulen) bzw. 48 h (orangefarbene Säulen) lysiert und die Renilla-Luciferaseaktivität bestimmt. Die Plasmidzusammensetzung werden oben im Text beschrieben. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um einen Einzelversuch. Die Zusammensetzung der Ansätze betrugen jeweils 0,25 µg pro Kavität von folgenden Plasmiden pTM1-orov-cSmut, pTM1-orov-cL-rep und pTM1-orov-cM Das Plasmid pTM1-orov-cM wurde zweiten Ansatz nicht verwendet.

Da in den vorangegangen Minireplikon-System-Experimenten eine signifikante Transkriptions-/Replikationsaktivität der OROV-Polymerase gemessen werden konnte, wurde angenommen, dass bei Hinzunahme des Plasmids pTM1-orov-cM ein Fehler unterlaufen sein musste, da im Minireplikon-System in Abwesenheit von pTM1-orov-cM transkriptionell aktive RNP-Komplexe gebildet worden waren. Da das M-Segment für die Glykoproteine Gn und Gc codiert, die keinen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität haben, musste ein technisches Problem bei der Herstellung der VLPs vorliegen. Daher wurde im nachfolgend dargestellten Experiment (siehe Abbildung 7) der Einfluss von pTM1-OROV-cM auf die Minireplikonaktivität untersucht.

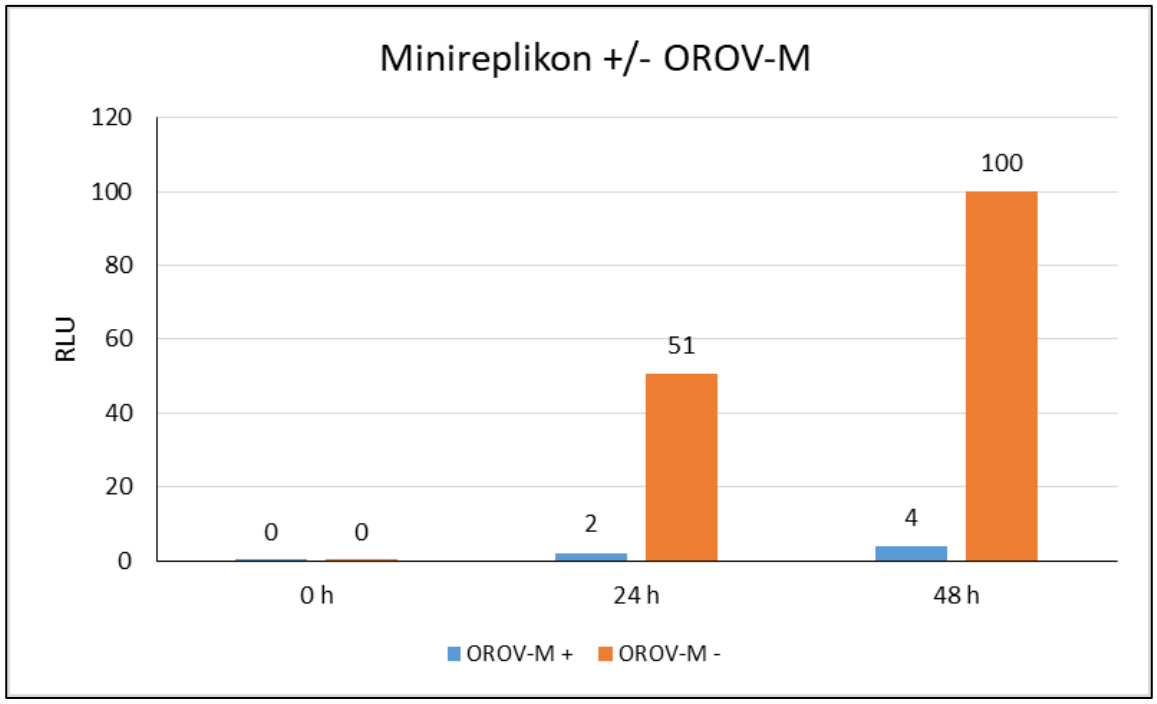

Abbildung 7: Einfluss der Expression von OROV-M auf OROV-Minireplikon-Aktivität. BSR-T7 Zellen wurden mit den OROV-Minireplikon-Plasmiden sowie zusätzlich mit dem OROV-M Expressionsplasmid transfiziert und die Minireplikonaktivität zu den angegebenen Zeitpunkten nach Transfektion durch Bestimmung der Renilla-Luciferaseaktivität gemessen.

Die oben dargestellte Abbildung (siehe Abbildung 7) zeigt den Einfluss der Expression des Plasmides pTM1- orov-cM. Die mit OROV-M + gekennzeichneten Ansätze enthalten jeweils 0,25 µg der Plasmide pTM1-orov-cSmut, pTM1-orov-cLrep und pTM1-orov-cM. Um den Einfluss des Konstruktes orov-cM zu überprüfen, wurde in den mit OROV-M – gekennzeichneten Ansätzen auf die Hinzunahme des M-Plasmids verzichtet. Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Anstieg der gemessenen Minireplikon-Aktivität nur in Abwesenheit des orov-cM Plasmides. Der starke Rückgang der Minireplikonaktivität bei Coexpression der OROV-Glykoproteine lässt auf eine Zytotoxizität von OROV-Gn und Gc schließen. Diese kann unterschiedliche Ursachen haben. Eine Möglichkeit besteht darin, dass in den OROV-Glykoproteinen Mutationen vorliegen, die zu einer erhöhten Zytotoxizität (eventuell verbunden mit einem Funktionsverlust) führen. Daher wurde eine Sequenzierung wie im Kapitel 2.3.13 beschrieben durch die Firma Seqlab durchgeführt. Dabei wurden zwei Mutationen im ersten Drittel der Sequenz gefunden, die zu einem Austausch von Cystein zu Arginin und von Prolin zu Leucin führen.

Bei diesen nicht-konservativen Austauschen ist nicht auszuschließen, dass sie zu erhöhter Zytotoxizität und Funktionsverlust der OROV Glykoproteine führen. Daher wurde vor weiteren Versuchen zur Herstellung von Oropouche VLPs ein neues OROV-M Expressionsplasmid, bei dem die beiden Mutationen korrigiert wurden, kloniert.

3.3 Reklonierung des Plasmids pTM1-OROV-cM

Ziel dieses Arbeitsschrittes war es, eine fehlerfreie OROV-M-ORF cDNA in den Vektor pTM1 zu klonieren, da die in Kapitel 3.2 beschrieben Mutationen innerhalb der M-cDNA vermutlich die Generierung funktioneller VLPs verhindern.

3.3.1 Korrektur der Mutationen im OROV-M-ORF

Da aufgrund der Größe des M-ORFs dieser mittels RT-PCR nur schwer in einem Schritt fehlerfrei amplifiziert werden kann, wurde er in drei Teilen (M1, M2, M3) amplifiziert. Jedes der Teile wurde separat kloniert und über singuläre Schnittstellen wieder zum vollständigen M-ORF zusammengesetzt. Da beide gefundenen Mutationen im M1-Teil lagen, wurde nur dieser neu kloniert. Zunächst wurde aus Oropouche-Virus-RNA cDNA synthetisiert (siehe Kapitel 2.3.1). Es wurde anschließend eine *Touchdown*-PCR durchgeführt, bei der die cDNA als Matrize diente und die Primer Esp3-M1-for und orov-M1-rev verwendet wurden. Mittels einer Gelelektrophorese konnte das M1-Amplifikat mit einer erwarteten Größe von 1,7 kb detektiert und anschließend extrahiert werden. Nach der Reinigung des PCR-Produktes aus dem Agarosegel wurde eine TA-Klonierung in den Vektor pCRII angeschlossen (siehe Kapitel 2.3.4 und 2.3.5). Nach Transformation des Ligationsansatzes und Blau/Weiß-Selektion, wurden mit den transformierten Bakterien Übernachtkulturen in LB-Amp Selektionsmedium zur Vermehrung der Plasmid-DNA angelegt (siehe Kapitel 2.3.7.3). Es folgte eine Minipräparation (siehe Kapitel 2.3.7.5) und eine Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmide. Zur weiteren Erfolgskontrolle wurde dann ein Restriktionsverdau mit dem Enzym Sac I und eine weitere Gelelektrophorese durchgeführt. Plasmide mit dem erwarteten Bandenmuster wurden anschließend sequenziert, um sicherzustellen, dass keine Mutationen vorlagen. Ein fehlerfreies Plasmidkonstrukt wurde ausgewählt, in *E.coli* retransformiert, eine Übernachtkultur in LB-Amp Selektionsmedium angelegt und anschließend eine Midipräparation zur Isolierung des Plasmids pCRII-M1 durchgeführt.

3.3.2 Subklonierung von OROV-M1 in pI.18-M2-M3

Mittels eines XhoI/BclI-Verdaus wurde der Vektor pI.18-M2-M3 zum Einfügen des OROV-M1-Inserts linearisiert. Zugleich wurde das OROV-M1-cDNA Fragment durch einen XhoI/BclI-Verdau aus dem neu hergestellten Vektor pCRII-M1 ausgeschnitten. Die Produkte der Restriktionsverdauansätze wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt (siehe Kapitel 2.3.3 und 2.3.4). Die Konzentrationen beider Produkte wurden mittels eines Spektralphotometers (siehe Kapitel 2.3.8) bestimmt. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden mittels der *rapid-ligation*-Methode (siehe Kapitel 2.3.11) nach dem Protokoll der Firma Fermentas ligiert (siehe Abbildung 8). Anschließend wurde der Ligationsansatz in kompetente *E. coli* transformiert. Ausgewählte Klone der transformierten Bakterien wurden über Nacht in Flüssigkultur vermehrt (siehe Kapitel 2.3.7.3) und anschließend mittels Minipräparation (siehe Kapitel 2.3.7.5) das erzeugte Plasmid isoliert und die DNA-Konzentration mittels UV-Spektrometer bestimmt (siehe Kapitel 2.3.8). Zur Überprüfung des Ligationserfolgs wurde eine Sequenzanalyse mit den Primern PI18 for, PI18 rev und M3 for durch die Firma Seqlab durchgeführt. Ein fehlerfreies Plasmidkonstrukt wurde für die weitere Subklonierung ausgewählt, in *E. coli* transformiert und vermehrt und mittels Midipräparation (siehe Kapitel 2.3.7.4) aufgereinigt.

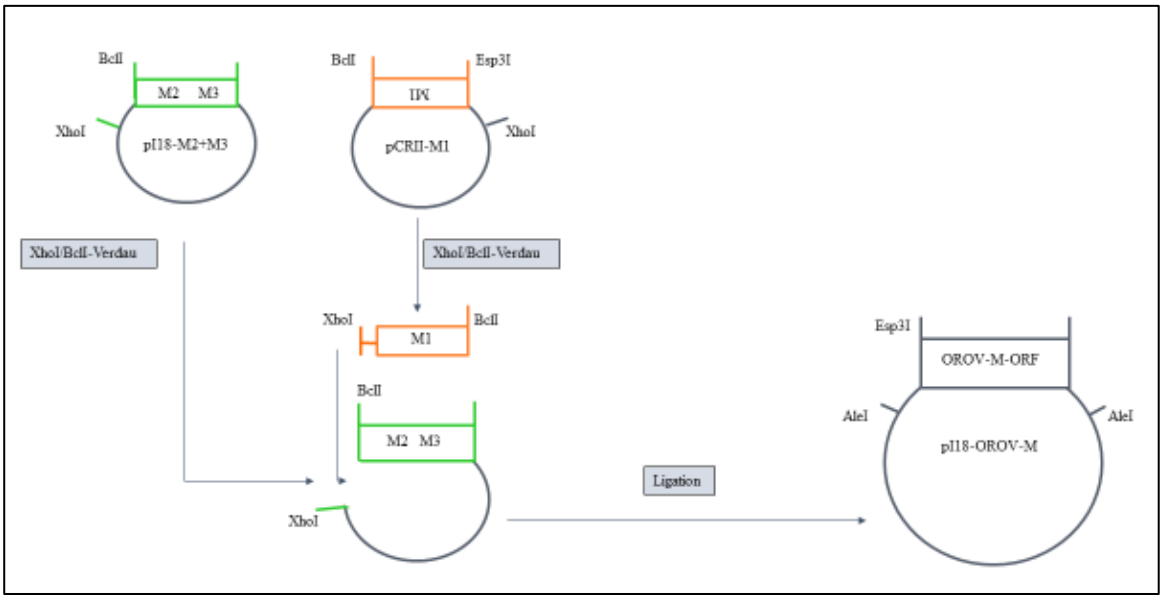

Abbildung 8: Erzeugung des OROV-M-Expressionsplasmids pI18-OROV-M. Schematische Darstellung der Subklonierung des OROV-M1-Fragmentszur Erzeugung des OROV-M-Expressionsplasmids pI18-OROV-M. Die im erzeugten Plasmid pI18-OROV-M dargestellten Schnittstellen (AleI und Esp3I) wurde bei der folgenden Subklonierung des OROV-M-ORFs genutzt.

3.3.3 Subklonierung der OROV-M-cDNA

Durch die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Klonierung stand nun ein Plasmid zur Verfügung, das einen fehlerfreien OROV-M-ORF enthält. Für die Erzeugung von OROV-VLPs in BSR-T7-Zellen wurde ein Expressionsplasmid benötigt, das die Expression des OROV-M-ORFs mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase erlaubt. Daher musste der OROV-M ORF in den Vektor pTM1 umkloniert werden, der die dafür benötigten Elemente (T7 Promotor gefolgt von einer IRES) enthält. In einem weiteren Schritt wurde daher das Insert OROV-M-ORF durch einen Esp3I-/AleI-Verdau aus dem Vektor pI18-OROV-M ausgeschnitten. Nachdem das Plasmid pTM1-FF-Luc durch die Enzyme NcoI und StuI zur Entfernung der FF-luc cDNA verdaut wurde, konnte die Ligation des Inserts OROV-M-ORF und des Vektors pTM1 folgen (siehe Abbildung 9). Die Produkte der Restriktionsverdaus wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend aus dem Agarosegel extrahiert, gereinigt und abschließend die DNA-Konzentration bestimmt (siehe Kapitel 2.3.3 und 2.3.4). Der linearisierte Vektor und das Insert wurden mittels *rapid ligation* (siehe Kapitel 2.3.11) miteinander verknüpft. Anschließend wurde das Konstrukt in XL1-blue-Zellen transformiert, der Transformationsansatz auf LB-Amp/Xgal Agarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert.

Mit den transformierten Bakterien wurden Übernachtkulturen in LB-Amp Selektionsmedium zur Vermehrung der Plasmid-DNA angelegt (siehe Kapitel 2.3.7.3). Es folgte eine Minipräparation (siehe Kapitel 2.3.7.5) und eine Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmide (siehe Kapitel 2.3.8). Abschließend wurde ein Kontrollverdau mit dem Enzym SacI durchgeführt, bei dem Plasmidfragmente mit der erwarteten Größe von 6 kb und 3 kb entstanden sind. Das klonierte Plasmid enthält eine Expressionskassette bestehend aus dem T7-Promoter, gefolgt von einer IRES und der korrigierten cDNA des OROV-M ORFs.

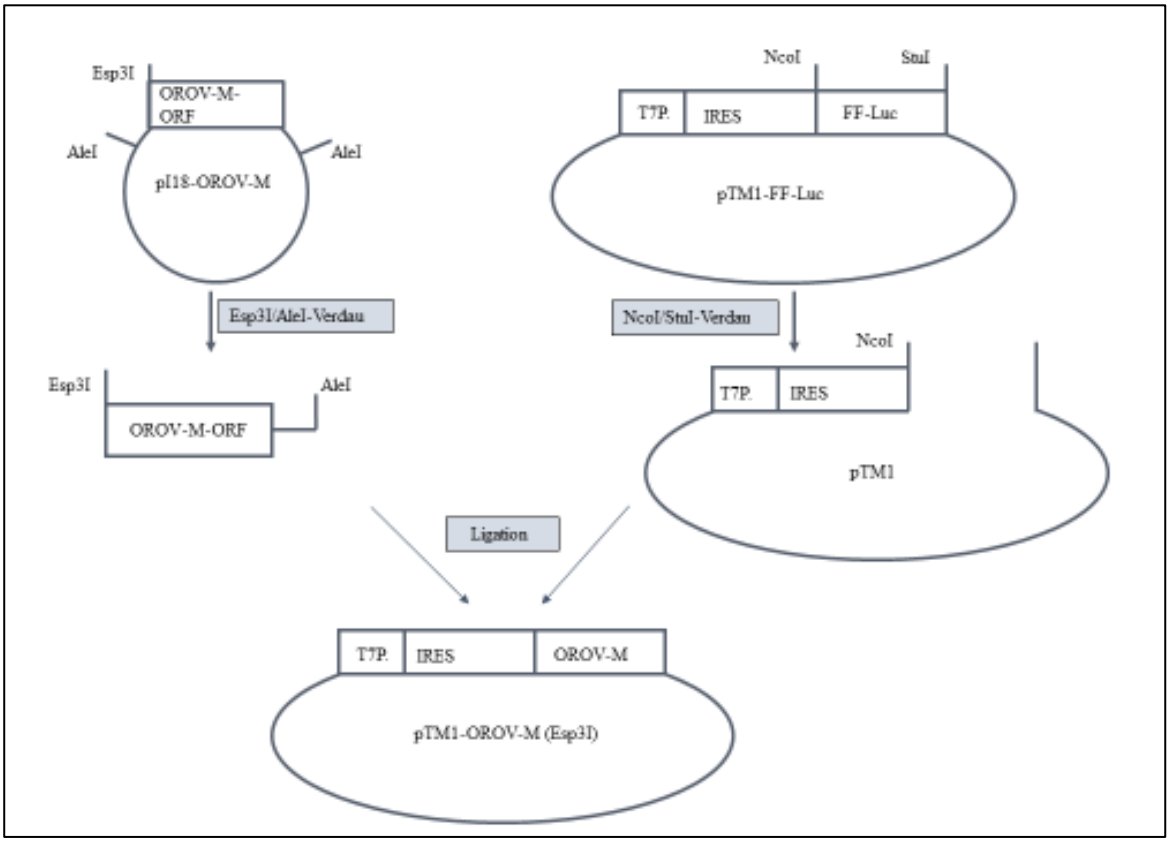

Abbildung 9: Erzeugung des Plasmids pTM1-OROV-M. Schematische Darstellung der Subklonierung des OROV-M ORFs zur Erzeugung des Plasmids pTM1-OROV-M.

3.3.4 Optimierung der Plasmidmengen zur Erzeugung von Oropouche VLPs

Durch die erneute Klonierung der OROV-M cDNA in das Plasmides pTM1-orov-cM stand eine fehlerfreie Variante des Plasmids zur Verfügung, die für die weiteren Versuche zur Generierung von OROV-VLPs eingesetzt wurde.

In dieser Versuchsreihe wurden Minireplikon-Systeme mit unterschiedlichen Konzentrationen der Plasmide pTM1-orov-M durchgeführt, um das optimale Verhältnis von M- und L-Expressionsplasmiden für eine möglichst hohe Minireplikonaktivität zu ermitteln. Dabei ergab sich, dass für eine hohe Minireplikonaktivität, die Menge an OROV-M Expressionsplasmid möglichst gering sein sollte, da mit absteigender Menge an M-Expressionsplasmid die Minireplikonaktivität anstieg (siehe Abbildung 10).

Ansatz 1 enthält 0,3 µg pro Kavität des Plasmides pTM1-orov-cLrep, das Plasmid pTM1-orov-M (Esp3I) ist nicht vorhanden.

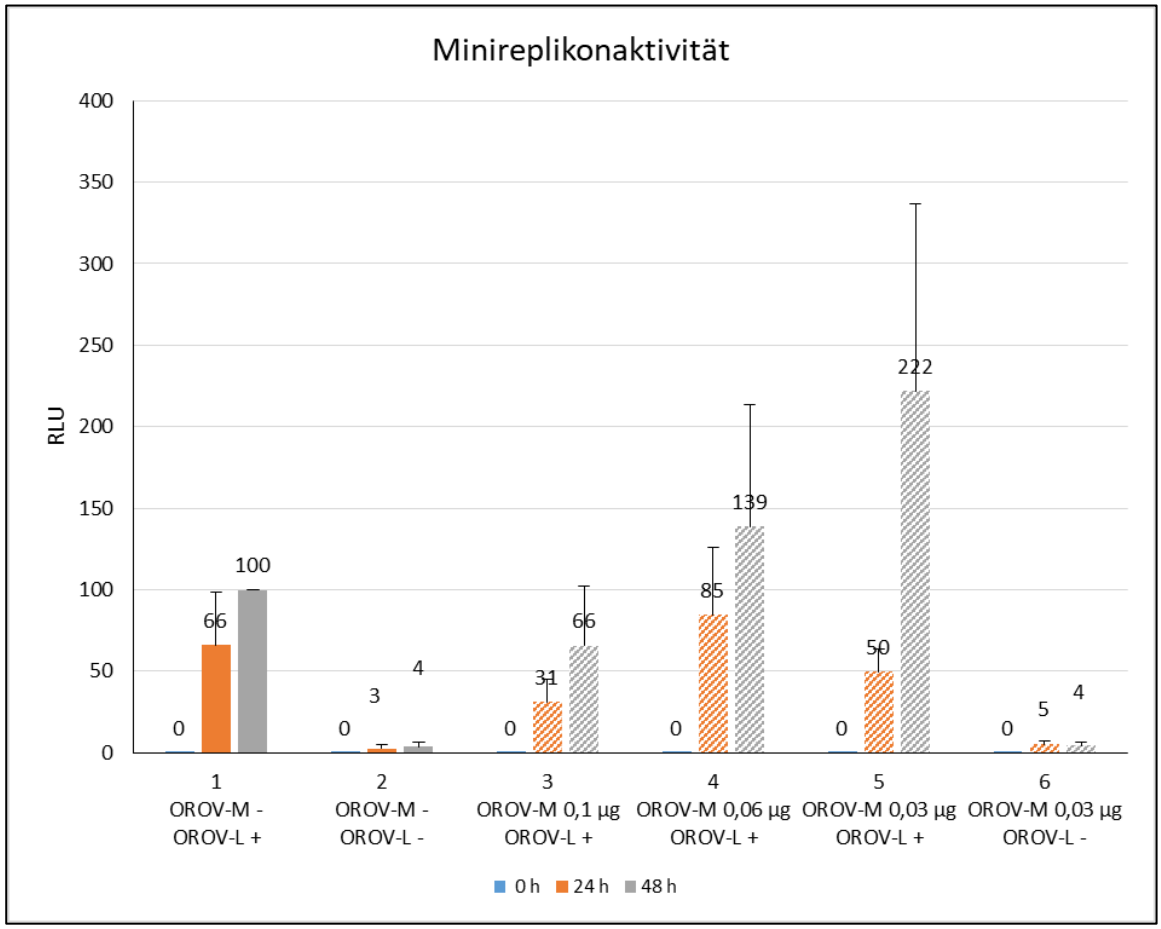

Abbildung 10: Einfluss der OROV-M Expression auf die OROV-Minireplikon-Aktivität. Das Minireplikon-System (siehe Kapitel 2.3.12) wurde um das Expressionsplasmid OROV-M erweitert. Es wurden 6 Ansätze mit unterschiedlicher Mengen des OROV-M Expressionsplasmids durchgeführt und die jeweiligen Mittelwerte der Renilla-Luciferase-Aktivität aus 4 Experimenten ermittelt. Bei 2 Negativkontrollen erfolgte keine Expression der OROV-L-Polymerase (Ansatz 2 und Ansatz 6). Bei dem OROV-M-Plasmid handelt es sich um pTM1-orov-M (Esp3I), welches neu kloniert wurde (siehe Kapitel 3.3). Die Zellen wurden nach 0, 24 und 48 h nach Transfektion lysiert. Zur eindeutigen Übersicht wurden die Lysate der Minireplikon-Experimente, in den OROV-M verwendet wurde schraffiert dargestellt.

Ansatz 4 zeigt eine ähnliche Minireplikonaktivität wie Ansatz 1, der kein OROV-M Expressionsplasmid enthält, bei weiterer Reduktion von OROV-M konnte die Minireplikon-Aktivität nochmals gesteigert werden. Daher ergibt sich das Verhältnis der Plasmide pTM1-orov-M und pTM1-orov-cLrep gemäß des Ansatzes 5 als optimal für eine möglichst hohe Minireplikonaktivität. Ebenfalls ist in Abbildung 10 zu sehen, dass bezüglich der Minireplikonaktivität die optimale Zeitspanne nach Transfektion 48 h beträgt.

3.4 Optimierung der Detektion von VLPs in Zielzellen

Um VLPs besser detektieren zu können, kann in den Zielzellen das transduzierte Minigenom mit Hilfe der viralen Polymerase und dem Nukleokapsidprotein amplifiziert werden. So können relevante und messbare Mengen Ren-Luc erhalten werden und mit dem anschließenden Lumineszensmessverfahren gemessen werden.

In einem modifiziertem Versuch wurden daher die zu transduzierenden Zielzellen (BSR-T7-Zellen) zunächst mit Plasmiden, die zum einen für die virale Polymerase (pTM1-orov-cL-rep) und zum anderen für das Nukleokapsidprotein N (pTM1-orov-cSmut) codieren, wie in dem Kapitel 2.2.2 beschrieben, transfiziert.

Nach einer Inkubationsdauer von 48 h wurden Überstände von Zellen, die zur Erzeugung von VLPs mit Minireplikon-Plasmiden sowie einem OROV-M Expressionsplasmid transfiziert wurden auf die Zielzellen gegeben. War die Erzeugung von VLPs erfolgreich, werden diese mit Hilfe der viralen Glykoproteine in ihrer Hülle an die entsprechenden Rezeptoren der Zielzellen andocken. Anschließend werden die VLPs aufgenommen und das Minigenom in den Zielzellen freigesetzt, was, im Gegensatz zur Infektion mit replikationskompetenten Wildtypviren, als Transduktion bezeichnet wird. Das eingebrachte Minigenom wird mit Hilfe von viraler Polymerase und viralem Nukleoprotein amplifiziert und exprimiert und kann nach Translation des Reportergens (Renilla-Luciferase) mit Hilfe einer Lumineszenzmessung detektiert werden.

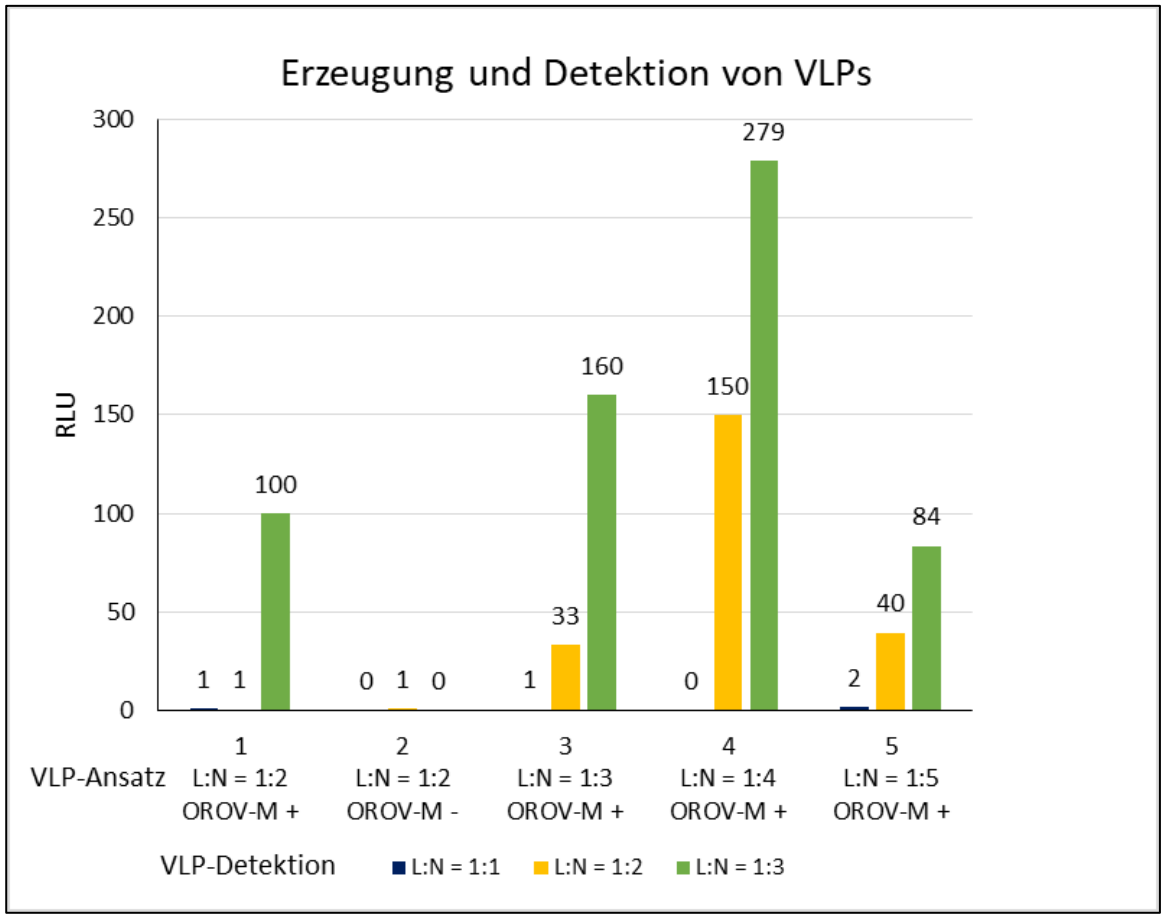

Abbildung 11: Renilla-Luciferase-Aktivität 24 h nach Transduktion mit VLPs. Die Ansätze 1 – 5 entsprechen VLP-Ansätzen, bei denen unterschiedliche Verhältnisse der L und N Expressionsplasmide eingesetzt wurden. Zur Detektion des durch die VLPs transduzierten Minigenoms wurden unterschiedliche Verhältnisse von pTM1-orov-cL zu pTM1-orov-cSmut bei der Transfektion der Zielzellen verwendet. Es handelt sich um einen Einzelversuch.

Zunächst wurden in dieser Arbeit zuvor generierte Überstände des VLP-Systems auf Zielzellen gegeben, was jedoch ohne Erfolg blieb. Es wurde daher im folgenden Versuch getestet, welche Verhältnisse der viralen Polymerase und des Nukleokapsidproteins zueinander in den Zielzellen einen Einfluss auf die Detektion der VLPs haben. Daher wurden die Zielzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der viralen Polymerase sowie des Nukleokapsides transfiziert. In dem für diesen Versuch der VLP-Detektion benötigten System zur Erzeugung von VLPs wurden zudem unterschiedliche Verhältnisse der pTM1-orov-cLrep (L) und pTM1-orov-cSmut (N) Plasmide sowie 0,03 µg des pTM1-orov-M Plasmides pro Ansatz verwendet. Als Negativkontrolle bei der Erzeugung von VLPs wurde ein Ansatz ohne M-Expressionsplasmid eingesetzt. Die Verhältnisse von L:N im VLP-Ansatz variierten wie in Abbildung 11 beschrieben.

Dabei ist wichtig zu beachten, dass es sich bei diesen Werten um die des VLP-Systems handelt und diese erst in einem zweiten Schritt auf transfizierte Zellen zur Detektion der VLPs gegeben werden.

Die einzelnen Kavitäten wurden nach 48 h Inkubationszeit lysiert. Die gemessene Konzentration der Renilla-Luciferase korreliert direkt mit der Transkriptions- bzw. Replikationsaktivität. Im nächsten Schritt wird die Transduktion von Zielzellen vorgenommen werden. Es wurden BSR-T7 Zellen mit verschiedenen Ansätzen transfiziert, um so die optimalen Konzentrationsverhältnisse der L- und N-Expressionsplasmide für die Detektion von VLPs zu ermitteln. Wie in Abbildung 11 dargestellt wurden zur Detektion der VLPs die Indikatorzellen zunächst mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen von L:N transfiziert. Die jeweilige Inkubationszeit der Transfektionsansätze betrug 16 bis 24 h. Die Überstände der VLP-Ansätze wurden zentrifugiert, abpipettiert und mit Benzonase versehen, um unerwünschtes genetisches Material (freie DNA und RNA) zu eliminieren. Anschließend wurden diese Überstände auf die zuvor transfizierten Indikatorzellen gegeben. Die Inkubationsdauer betrug nun 24 h. Anschließend wurde das Zelllysat gewonnen und luminometrisch gemessen. Die Messung ergab, dass die Erzeugung von VLPs bei einem L:N Verhältnis von 1:4 am effizientesten ist. Für die Detektion von VLPs erwiesen sich die L:N Verhältnis von 1:3 bei der Transfektion der Zielzellen als besser im Vergleich zu einem L:N Verhältnis von 1:1.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in dem die Verhältnisse von L zu N im VLP-Ansatz zwischen 1:3, 1:4 und 1:5 variieren. Ansatz 3 ist eine Negativkontrolle ohne OROV-M. Das Ergebnis der VLP-Detektion im Verhältnis der Expressionsplasmide für L und N von 1:1 ergab deutliche höhere Renilla-Luciferase-Aktivität als im Vorversuch (siehe Abbildung 11 und 12). Es bestätigte sich jedoch wie im Vorversuch Abbildung 11 eine gute Aktivität für die Renilla-Luciferase bei einem Verhältnis der Expressionsplasmide L und N von 1:3.

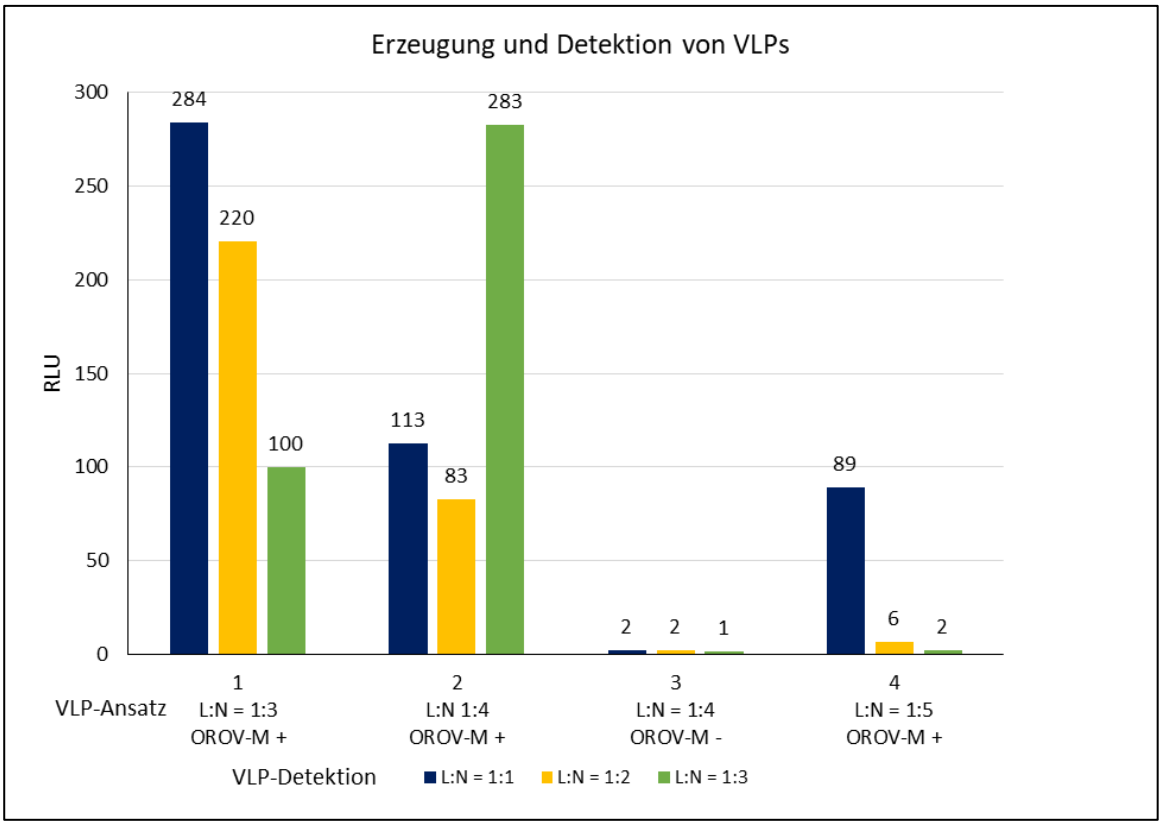

Abbildung 12: VLP-Detektion nach Transfektion der Ansätze mit unterschiedlichen L zu N Verhältnissen.

3.4.1 Vergleich der Polymeraseaktivität unterschiedlicher OROV-Stämme

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob die Polymerase eines anderen OROV-Stamms besser für die Generierung von VLPs geeignet ist als diejenige, welche bisher in dieser Arbeit verwendet wurde. Der bisher verwendete Stamm stammt von einem humanen Stamm. Hintergrund ist die Frage, ob sich die Effizienz der verschiedenen OROV-Polymerasen bezüglich Transkription und Replikation unterscheidet oder ob ein Wechsel vom Transkriptions- zum Replikationsmodus unterschiedlich schnell erfolgt. Zum Vergleich mit der bereits von uns verwendeten Polymerase wurde eine Polymerase untersucht, welche aus einem OROV-Stamm eines Faultieres gewonnen wurde und uns freundlicherweise von Richard Elliott von der Universität *St. Andrews*, *St. Andrews*, Schottland zur Verfügung gestellt wurde. Durch die Kooperation entstand die Plasmid-Bezeichnung L-SA (SA steht für *St. Andrews*).

Zunächst wurden die Aktivitäten der beiden OROV-Polymerasen im Minireplikonsystem verglichen (siehe Abbildung 13).

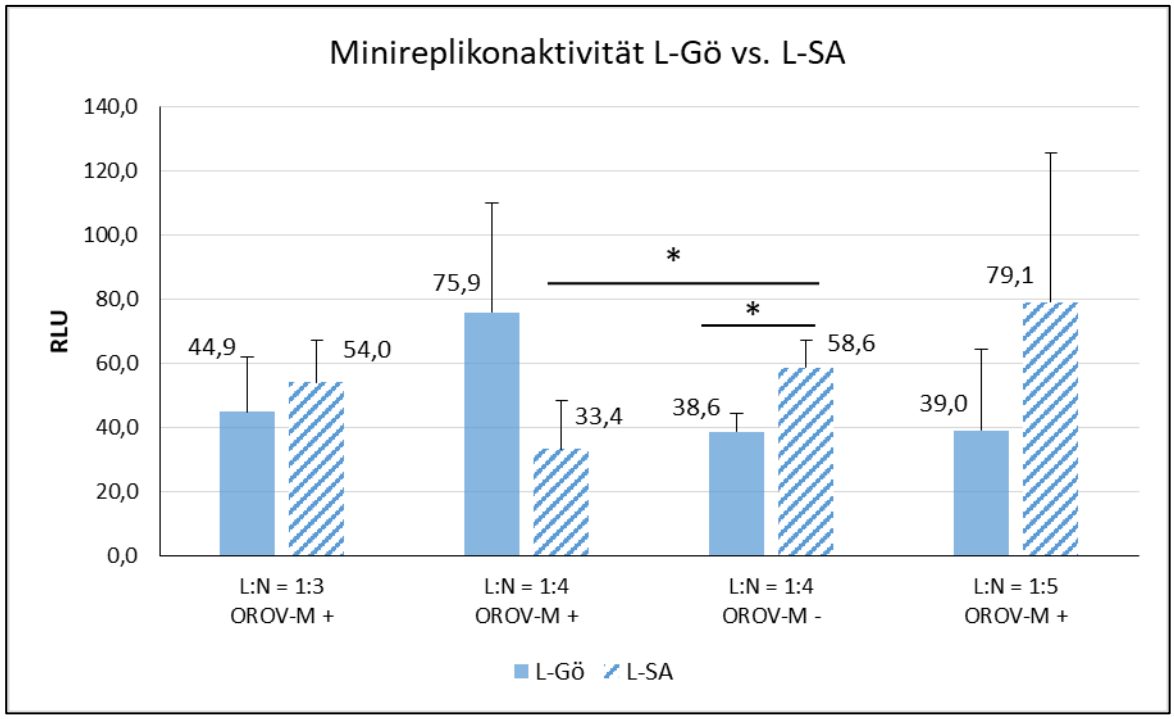

Abbildung 13: Minireplikon-Systems unter der Verwendung von pTM1-orov-cLrep und pTM1-orov-LSA. Aktivitäten des Minireplikon-Systems unter der Verwendung der Plasmide pTM1-orov-cLrep und pTM1-orov-LSA. Die Inkubationsdauer betrug 48 h, es wurden 3 unabhängige Experimente ausgewertet, in den Graphen sind jeweils die Mittelwerte und die dazugehörige Standardabweichung dargestellt. Bei den mit einem Balken und Sternchen versehenen Graphen handelt es sich um die statistisch signifikanten Versuche.

Zur Erzeugung von VLPs mit beiden OROV-Polymerasen wurden BSR-T7 Zellen mit 0,03 µg M-Plasmid und verschiedenen Mengen der L und N-Plasmide in den Verhältnissen 1:3, 1:4, 1:4 ohne die Hinzugabe des M-Plasmides und dem Verhältnis 1:5 transfiziert, um in Zusammenschau mit den Ergebnissen des VLP-Experimentes ein optimales Verhältnis zwischen dem L-Plasmid und N-Plasmid zu finden (siehe Abbildung 13). Das Minireplikon-System, in dem das L-SA-Plasmid verwendet wurde, wurde analog zu den bereits beschriebenen Versuchen durchgeführt und mit dem bisherigen Minireplikonsystem verglichen. In beiden Ansätzen wurde eine ähnliche maximale Renilla-Luciferase Aktivität erreicht. Während aber für OROV-L-SA die maximale Aktivität bei einem L:N-Plasmidverhältnis von 1:5 erreicht wurde, lag das optimale Verhältnis von L:N ist für OROV-L-Gö bei 1:4, allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant. In Abwesenheit von OROV-M und einem L:N Verhältnis von 1:4 wurde jedoch eine signifikant höhere Aktivität für das Minireplikon-System mit L-SA im Vergleich zu L-Gö gemessen. Hier zeigte also die OROV-L-SA-Polymerase eine höhere Transkriptionsaktivität.

Interessanterweise kam es im Minireplikonsystem nur für OROV-L-SA zu einem signifikanten Rückgang der Transkriptionsaktivität, wenn OROV-M koexprimiert wurde.

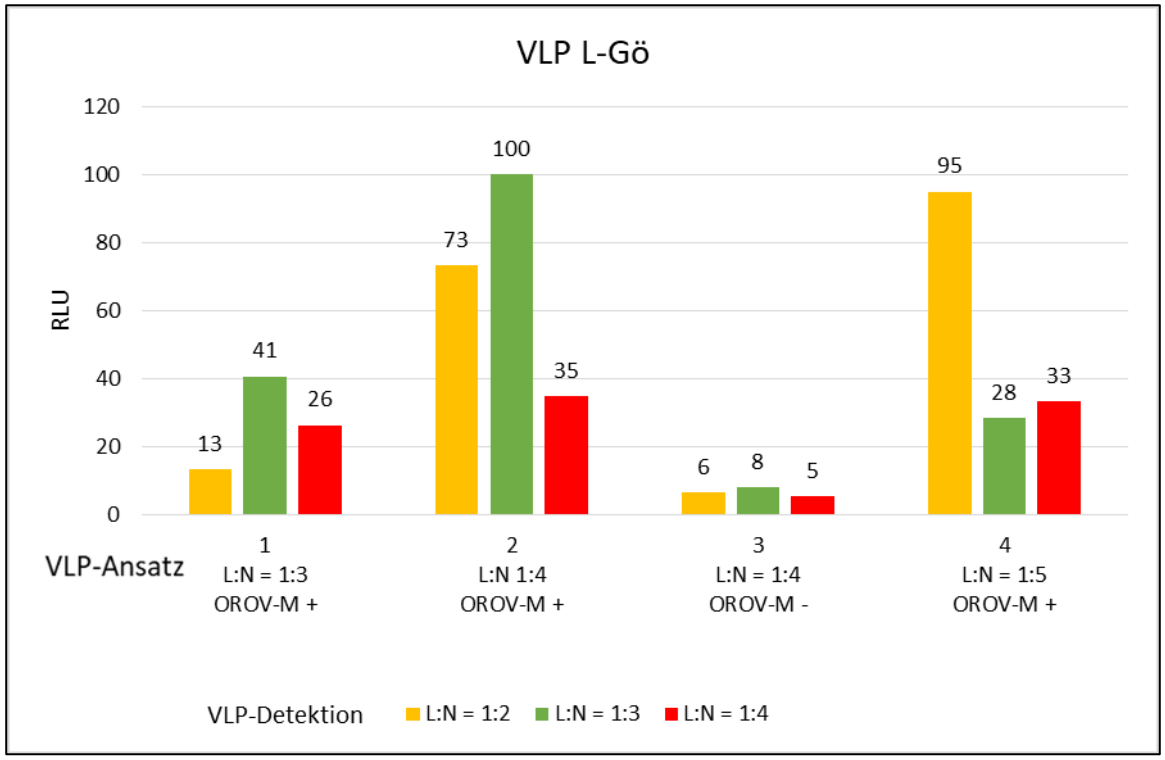

Abbildung 14: VLP-Detektion mit dem Plasmid L-Göttingen. Die Zielzellen wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen des L- und N-Plasmides transfiziert bevor die Überstände des vorangegangenen Minireplikonsystems auf die Zellen gegeben werden. In der Transfektion werden Varianten der L:N-Verhältnisse eingesetzt, ebenso wie im Minireplikonsystem, welches anschließend für die Transduktion verwendet wird (Ansatz 1 – 4). Es handelt sich bei den oben gezeigten Versuchen um Einzelexperimente.

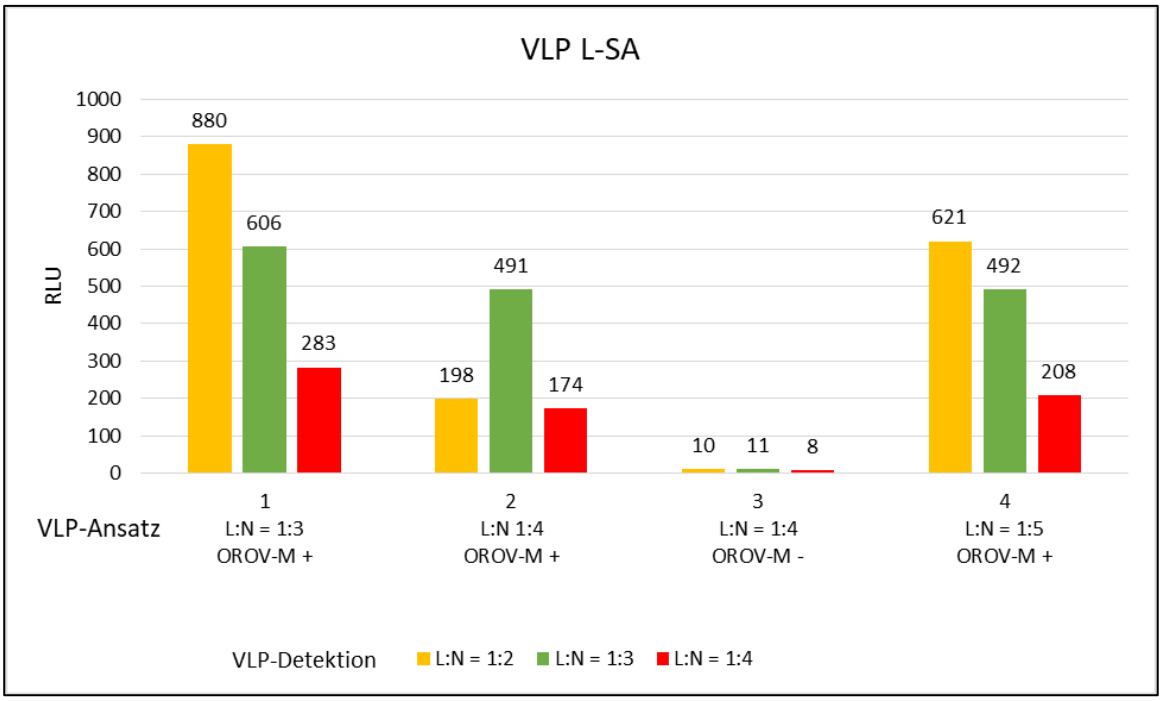

Abbildung 15: VLP-Detektion L-SA. Analoges Vorgehen wie in Abbildung 14. Es handelt sich bei den oben gezeigten Versuchen um Einzelexperimente.

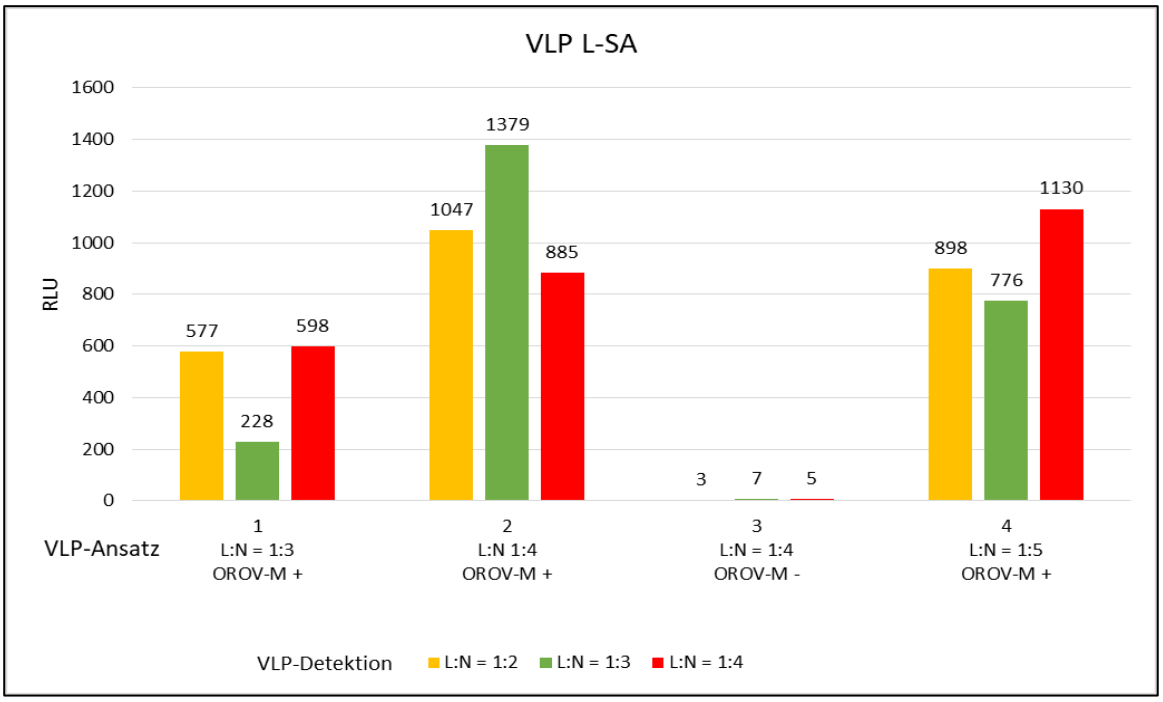

Abbildung 16: VLP-Detektion mit L-SA. Analoges Vorgehen wie in Abbildung 14. Es handelt sich bei den oben gezeigten Versuchen um Einzelexperimente.

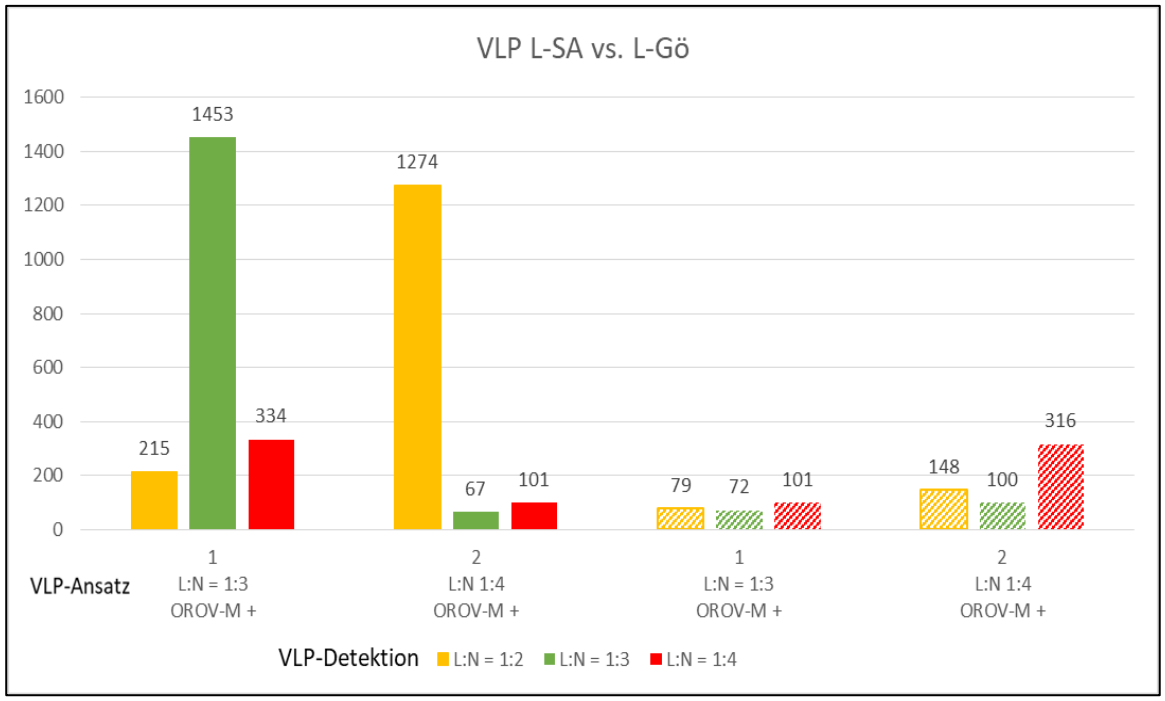

Abbildung 17: VLP-Detektion von L-SA und L-Gö in unterschiedlichen L:N-Verhältnissen. Die unifarbenen Balken zeigen die VLPs mit L-SA, die schraffierten Balken zeigen die VLPs mit dem Plasmid L-Gö.

Zur VLP-Detektion wurden wiederum BSR-T7-Zellen verwendet, die mit unterschiedlichen Verhältnissen von L und N-Expressionsplasmiden für eine optimale Detektion transfiziert worden waren. 16 – 24 h nach Transfektion erfolgte die Transduktion mit den VLPs 24 h nach Transduktion wurden die Zellen lysiert und die Renilla-Luciferase Aktivität bestimmt.

Wie erwartet konnte in den Ansätzen ohne M-Plasmid (siehe Abbildung 14 bis 16 jeweils Ansatz 3) keine VLP-Aktivität detektiert werden, da ohne die Expression der OROV-Glykoproteine keine funktionellen VLPs entstehen können. In allen anderen Ansätzen konnte dagegen Renilla-Luciferase-Aktivität und damit letztendlich die Generierung funktioneller VLPs nachgewiesen werden. Auffällig hierbei war, dass die Erzeugung von VLPs mit Hilfe der OROV-L-SA- Polymerase in allen Ansätzen mindestens dreimal so effizient war wie die Generierung von VLPs mit Hilfe von OROV-cL-rep (siehe Abbildung 17). Somit konnte gezeigt werden, dass sich die beiden OROV-Polymerasen trotz ähnlicher Aktivitäten im Minireplikonsystem deutlich bei der Generierung von VLPs unterscheiden.

4 Diskussion

4.1 Die klinische Bedeutung des Oropouche-Virus

Das Oropouche-Virus, ein von Arthropoden übertragenes Virus, verursacht beim Menschen eine fieberhafte Erkrankung, die mit Symptomen wie Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, Ausschlag und in seltenen Fällen zu Petechien, Nasenbluten oder Blutungen des Zahnfleisches führen können (Alvarez-Falconi und Ríos Ruiz 2010). Nachgewiesen wurde das Virus bisher im süd- und mittelamerikanischen Raum, dort hat es seit 1960 mehrere Epidemien verursacht. Durch den Klimawandel, die geographische Ausbreitung von Arthropoden-Vektoren, vermehrte Exporte von Tieren und der Globalisierung kann sich das Oropouche-Virus, wie auch andere Viren in Gebiete ausbreiten, in denen es bisher nicht beheimatet war (Sakkas et al. 2018). Es ist zu erwarten, dass die internationale Bedeutung des Oropouche-Fiebers zunimmt und dadurch das wissenschaftliche Interesse erneut geweckt wird. Aktuell gibt wie es, ähnlich wie beim Dengue-Fieber-Virus und vielen anderen von Arthropoden übertragenden Erkrankungen, keine antivirale Therapie oder Impfung.

Ziel dieser Arbeit war es aufbauend auf einem etablierten Minireplikon-System (Acrani et al. 2015), in dem eine virale Polymerase verwendet wird, Minireplikon-Aktivität nachzuweisen und VLPs als Grundlage für einen möglichen Impfstoff zur generieren.

VLPs sind ein vielversprechender Ansatz für eine Impfung, da sie bereits erfolgreich als Impfstoff gegen z. B. Humane Papillomviren (HPV) eingesetzt werden. VLPs sind eine sichere Impfstoffvariante, da sie replikationsdefizient sind und eine gute Immunantwort hervorrufen.

Besonders im Hinblick auf die Globalisierung und die damit verbundene Ausbreitung und das Neuauftreten verschiedenster Virusarten, wäre ein Impfstoff gegen das Oropouche-Virus ein Gewinn.

4.1.1 Das Minireplikon-Systems unter der Verwendung von Polymerasen unterschiedlicher Oropouche-Stämme

Basis für die Generierung von VLPs war das bereits etablierte OROV-Minireplikon-System. Im Minireplikonsystem können Transkription und Replikation untersucht und bewertet werden, ohne dass ein infektiöses Virus generiert wird. Um diese Aktivität messbar zu machen, wurden im M-Segment die Hüllproteingene gegen das Reporter-Gen Renilla Luciferase ausgetauscht. Die Aktivität dieses Reporters ist Maß der Aktivität der Transkriptions- und Replikationsaktivität der viralen Polymerase. Das plasmidcodierte mit dem Reporter-Gen versehene M-Segment wird mit Hilfe der T7-Polymerase in RNA umgeschrieben. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass eine virale RNA generiert wird, die weder am 5´- noch am 3´-Ende durch zelluläre Enzyme modifiziert wird und somit das Aussehen eines viralen Segmentes hat und von der viralen OROV-Polymerase erkannt wird.

Die für die Transkription und Replikation notwendige virale OROV-Polymerase und das Nukleoprotein werden ebenfalls mit Hilfe der T7-Polymerase exprimiert. Minireplikonsysteme auf Basis der T7-Polymerase wurden bereits bei anderen Bunyaviren, wie dem Rift-Valley-Virus, erfolgreich etabliert (Ikegami et al. 2005).

Es konnten in dem in dieser Arbeit verwendeten Minireplikon-System reproduzierbare OROV-Polymerase-Aktivitäten gemessen werden.

Wie schon beschrieben, war das Ziel dieser Arbeit die Generierung von VLPs. VLPs sind Partikel, die dem Oropouche-Virus ähneln, jedoch kein virales Wildtyp-Genom enthalten und somit nicht infektiös sind. Im Minireplikon-System entstehen ausschließlich Ribonukleoproteinkomplexe, während für die Generierung von VLPs die Hüllproteine Gn und Gc zusätzlich notwendig sind. Trotz messbarer OROV-Polymerase-Transkriptionsaktivität in den transfizierten BSR-T7-Zellen, konnten zunächst in den durchgeführten Versuchen keine VLPs generiert werden. Dies war daran zu erkennen, dass in Lysaten von Indikatorzellen, die transduziert wurden, keine Luciferaseaktivität gemessen werden konnte. Eine mögliche Ursache für die fehlende Generierung dieser VLPs waren Mutationen in den Hüllproteingenen, die zu einem fehlerhaften M-Plasmid führten. Das M-Plasmid wurde in das Minireplikon-System integriert, da es für die OROV-Hüllproteine codiert und somit notwendig zur Generierung von VLPs ist. Wie Abbildung 6 und 7 zeigen, sank die Minireplikon-Aktivität in transfizierten BSR-T7-Zellen, sobald das M-Plasmid zum Transfektionsexperiment hinzugenommen wurde. Unter der Annahme eines fehlerhaften M-Plasmids, wurde dies nochmals zur Sequenzierung versendet. Dort wurde eine Mutation in der

Gn/Gc-Sequenz gefunden, die zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz führt und somit Grund für die fehlende VLP-Generierung sein kann.

Nach der Korrektur und Neuklonierung des M-Plasmids blieb die Minireplikon-Aktivität nach Transfektion mess- und reproduzierbar (siehe Abbildung 10). Anschließend wurden weitere Versuche durchgeführt, um mit diesem neuklonierten M-Plasmid VLPs herzustellen. Dabei wurden jedoch nur sehr wenige VLPs erzeugt, was durch geringe Luciferase-Aktivitäten den transduzierten Indikatorzellen zu erkennen war. Um eine höhere VLP-Menge zu generieren wurde dann die Überlegung angestellt eine andere OROV-Polymerase zu verwenden. Die bisher verwendete OROV-Polymerase leitet sich von einem OROV-Stamm ab, der aus einem humanen Patienten isoliert wurde.

In weiteren Versuchen wurde der Vergleich mit einer Polymerase, die aus dem Faultier stammt (L-SA) angestellt. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, sinkt die Minireplikon-Aktivität und somit auch die OROV-Transkriptionsaktivität unter Verwendung der Polymerase L-SA nach Co-Transfektion des OROV-M-Expressionsplasmides. Aufgrund der erhöhten Luciferase-Aktivität in den transduzierten Indikatorzellen zeigte sich, dass mit Hilfe der L-SA-Polymerase deutlich mehr VLPs erzeugt werden konnten.

Da der Vergleich der beiden L-Gene die Vermutung zulässt, dass sich Unterschiede auf molekularbiologischer Ebene zwischen den Stämmen des Oropouche-Virus aus Faultieren und aus dem humanen Stamm auf die Aktivität im Minireplikon-System und bei der VLP-Generierung auswirken, gilt es dies in weiteren Versuchsreihen zu überprüfen. Eine mögliche Ursache für die beobachteten Unterschiede kann im Umschalten vom Transkriptions- in den Replikationsmodus der viralen Polymerasen liegen.

Bei Expression der OROV-Glykoproteine wurde ein Rückgang der Transkriptionsaktivität der OROV-Polymerase L-SA im Gegensatz zur OROV-Polymerase L-Gö beobachtet.

Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass in Anwesenheit der OROV-Glykoproteine die OROV-Polymerase L-SA im Gegensatz zur OROV-Polymerase L-Gö besser von Transkription zu Replikation wechseln kann.

Es wird vermutet, dass bei Bunyaviren der Wechsel von Transkription zu Replikation abhängig von der Nukleoproteinmenge ist. Dies ist jedoch insgesamt schlecht erforscht und bedarf weiterer Experimente.

In weiteren Experimenten wurde versucht Bedingungen zu etablieren, unten denen reproduzierbare VLP-Mengen generiert werden können. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe

von Experimenten durchgeführt, bei denen die eingesetzten Plasmidmengen variiert wurden. Dabei war in jedem Experiment ein anderes Verhältnis der Plasmidmengen zueinander erforderlich, um eine optimale Ausbeute an VLPs zu erreichen und es konnten keine konstanten Verhältnisse etabliert werden.

Nach derzeitigen Erkenntnisstand kann von einem technischen Problem bei der Durchführung der Versuche ausgegangen werden. Ein Grund für die fehlende Reproduzierbarkeit könnten Expressionsschwankungen der T7-Polymerase in den BSR-T7-Zellen sein. Es könnte versucht werden durch eine Subklonierung der BSR-T7-Zellen eine Zellpopulation zu isolieren, die eine starke und stabile Expression der T7-Polymerase aufweisen.

Eine weitere Fehlerquelle könnte die Lipofektion sein. Trotz der guten Erfahrungen mit dem verwendeten Lipofektions-Agens in anderen Minireplikonsystemen, könnte der Wechsel zu einem anderen Transfektions-Agens oder gar zu einer anderen Technik wie der Calcium-Phosphat-Transfektion oder Elektroporation eine Möglichkeit sein, stabile Bedingungen für die VLP-Generierung zu schaffen.

Aufbauend u. a. auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnte durch Optimierungen der Transfektionsmethode und der verwendeten Plasmidmengen zwischenzeitlich ein effizientes System zur Generierung von Oropouche-VLPs generiert werden (Acrani et al. 2015).

4.1.2 Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass VLPs generierbar, jedoch nur in geringen Mengen, sind. Es konnten keine Bedingungen geschaffen werden, die eine stetige und reproduzierbare Menge für VLPs zuließen. Die Ursachen dafür sind vielfältig. Da bisher nur ein indirekter Nachweis der VLPs möglich war, wäre ein nächster Schritt die VLPs direkt nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Aktivität der transduzierten Renilla-Luciferase als indirekter Nachweis für die Generierung von VLPs verwendet. Ein direkter Nachweis der VLPs könnte beispielsweise sein, dass mittels Western Blot in Überständen von Produzentenzellen diese sichtbar gemacht werden können.

Ein anderer Ansatzpunkt wäre ein direkter Nachweis der Hüllproteine Gn und Gc. Dies wäre beispielweise mit Hilfe einer Elektronenmikroskopie möglich. Es könnten gezielt Aufnahmen der Hüllproteine am Golgi-Apparat gemacht werden. Da während einer Infektion Umbauprozesse am Golgi-Apparat stattfinden, müssten die OROV-Hüllproteine dort

zu finden sein (Barbosa et al. 2018). Dies wäre beispielsweise mittels der Immunogoldfärbung möglich. Hierbei werden Antigene sichtbar gemacht, indem Antikörper mit Gold-Partikeln gekoppelt werden und so elektronenmikroskopisch bzw. lichtmikroskopisch sichtbar werden (Roth und Binder 1978). Weiterhin könnten virale Partikel in Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Dabei würden fluoreszensmarkierte Antikörper an virale Proteine andocken und mittels einer Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden.

5 Zusammenfassung

Das Oropouche-Fieber ist eine Erkrankung, die durch das Oropouche-Virus verursacht wird und insbesondere in Mittel- und Südamerika vorkommt. Übertragen wird dieses Virus durch Stechmücken. Die häufigsten Symptome sind Fieber, Kopfschmerzen und Gliederschmerzen. Die Erkrankung an sich verläuft meist gutartig, jedoch werden von 70 % der Erkrankten eine Rückkehr der Symptome 2 – 3 Wochen nach Auftreten der ersten Symptome beschrieben (Alvarez-Faconi und Ruiz 2010). Aktuell gibt es keine antivirale Therapie. Die Behandlung der Erkrankung beruht auf der symptomatischen Therapie. Wie bereits eingangs erwähnt ist zu erwarten, dass die Bedeutung des Oropouche-Fiebers aufgrund der Globalisierung zunimmt und so eine kausale antivirale Therapie wünschenswert wäre (Sakkas et al. 2018).

Das Oropouche-Virus enthält ein Genom, welches aus drei Teilen besteht. Das L-Segment, welches für die RNA-abhängige RNA-Polymerase codiert. Das M-Segment codiert für das Gn/Gc-Vorläufer-Protein, welches im endozytoplasmatischen Reticulum gespalten wird und aus dem die Glykoproteine Gn und Gc entsteht. Das S-Segment codiert für das Nukleokapsid N, welches das virale Genom einkapselt (Barbosa 2018).

Das bereits bei anderen Bunyaviren etablierte Prinzip Minireplikon-System wurde als Grundlage genutzt, um in weiterführenden Experimenten VLPs zu generieren. Dabei wurde zunächst festgestellt, dass es nicht möglich war VLPs herzustellen. Als Fehlerquelle wurde das verwendete M-Plasmid zur Expression der Hüllproteine Gn und Gc identifiziert.

Nach der Neuklonierung des M-Plasmids konnten VLPs produziert werden. Allerdings nur in geringen Mengen.

Daraufhin wurde eine OROV-Polymerase, die aus einem Stamm eines Faultiers gewonnen wurde, verwendet. Mit dieser Polymerase konnten anschließend größere Mengen VLPs generiert werden im Vergleich zu der vorher verwendeten OROV-Polymerase, die aus einem humanen Stamm gewonnen wurde. Damit wurde der Grundstein für einen erfolgreichen VLP-basierten Oropouche-Impfstoff geschaffen.

6 Literaturverzeichnis

1. Acrani GO, Tilston-Lunel NL, Spiegel M, Weidmann M, Dilcher M, Andrade da Silva DE, Nunes MRT, Elliott RM (2015): Establishment of a minigenome system for Oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously. J Gen Virol 96 (Pt 3), 513-523
2. Alvarez-Falconi PP, Ríos Ruiz BA (2010): [Oropuche fever outbreak in Bagazan, San Martin, Peru: epidemiological evaluation, gastrointestinal and hemorrhagic manifestations]. Rev Gastroenterol Peru 30 (4), 334-40
3. Anderson CR, Spence L, Downs WG, Aitken TH (1961): Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. Am J Trop Med Hyg 10 574-8
4. Aquino VH, Moreli ML, Moraes Figueiredo LT (2003): Analysis of oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbour an important role for the polymerase activity. Arch Virol 148 (1), 19-28
5. Barbosa NS, Mendonça LR, Dias MVS, Pontelli MC, da Silva EZM, Criado MF, da Silva-Januário ME, Schindler M, Jamur MC, Oliver C, et al. (2018): ESCRT machinery components are required for Orthobunyavirus particle production in Golgi compartments. PLoS Pathog 14 (5), e1007047
6. Bastos MdS, Figueiredo LT, Naveca FG, Monte RL, Lessa N, Pinto de Figueiredo RM, Gimaque JB, Pivoto Joao G, Ramasawmy R, Mourao MP (2012): Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. Am J Trop Med Hyg 86 (4), 732-5
7. Bernardes-Terzian AC, de-Moraes-Bronzoni RV, Drumond BP, Da Silva-Nunes M, da-Silva NS, Urbano-Ferreira M, Sperança MA, Nogueira ML (2009): Sporadic oropouche virus infection, acre, Brazil. Emerg Infect Dis 15 (2), 348-50
8. Bishop DH, Calisher CH, Casals J, Chumakov MP, Gaidamovich SY, Hannoun C, Lvov DK, Marshall ID, Oker-Blom N, Pettersson RF, et al. (1980): Bunyaviridae. Intervirology 14 (3-4), 125-43
9. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991): 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res 19 (14), 4008
10. Elliott RM (1990): Molecular biology of the Bunyaviridae. J Gen Virol 71 (3), 501-22
11. Elliott RM (1997): Emerging viruses: the Bunyaviridae. Mol Med 3 (9), 572-7
12. Elliott RM (2014): Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. Nat Rev Microbiol 12 (10), 673-85
13. Elliott RM, Weber F (2009): Bunyaviruses and the type I interferon system. Viruses 1 (3), 1003-21
14. Elliott RM, Schmaljohn CS: Bunyaviridae, in: Fields Virology, hrsg. v. Knipe DM, Howley PM, 1; Lipincott Williams &Wilkins, Philadelphia, 2013, 1244-1282
15. Grgacic EV, Anderson DA (2006): Virus-like particles: passport to immune recognition. Methods 40 (1), 60-5

16. Ikegami T, Peters CJ, Makino S (2005): Rift Valley Fever Virus Nonstructural Protein NSs Promotes Viral RNA Replication and Transcription in a Minigenome System. J Virol 79

17. Mourão MP, Bastos MS, Gimaqu JB, Mota BR, Souza GS, Grimmer GH, Galusso ES, Arruda E, Figueiredo LT (2009): Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. Emerg Infect Dis 15 (12), 2063-4

18. Mülhardt C: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, Springer Spektrum, Berlin Heidelberg, 2013

19. Nunes MR, Martins LC, Rodrigues SG, Chiang JO, Azevedo Rdo S, da Rosa AP, Vasconcelos PF (2005): Oropouche virus isolation, southeast Brazil. Emerg Infect Dis 11 (10), 1610-3

20. Pichlmair A, Habjan M, Unger H, Weber F (2010): Virus-like particles expressing the nucleocapsid gene as an efficient vaccine against Rift Valley fever virus. Vector Borne Zoonotic Dis 10 (7), 701-3

21. Pinheiro FP, Pinheiro M, Bensabath G, Causey OR, Shope RE (1962): Epidemia de virus Oropouche em Belém. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 12 15-23

22. Pinheiro FP, Travassos da Rosa AP, Travassos da Rosa JF, Ishak R, Freitas RB, Gomes ML, LeDuc JW, Oliva OF (1981): Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. Am J Trop Med Hyg 30 (1), 149-60

23. Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM (2010): Virus-like particles in vaccine development. Expert Rev Vaccines 9 (10), 1149-76

24. Roth J, Binder M (1978): Coloidal gold, ferritin and peroxidase as markers for electron microscopic double labeling lectin techniques. J Histochem Cytochem 26 (3), 163-9

25. Saeed MF, Wang H, Nunes M, Vasconcelos PF, Weaver SC, Shope RE, Watts DM, Tesh RB, Barrett AD (2000): Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. J Gen Virol 81 (Pt 3), 743-8

26. Sakkas H, Bozidis P, Franks A, Papadopoulou C (2018): Oropouche Fever: A Review. Viruses 10 (4),

27. Santos RI, Almeida MF, Paula FE, Rodrigues AH, Saranzo AM, Paula AE, Silva ML, Correa VM, Acrani GO, Neder L, et al. (2012): Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with Oropouche virus. Virus Res 170 (1-2), 25-33

28. Schnülle K: Charakterisierung der Eigenschaften der nichtkodierenden Enden der Genomsegmente des Oropouche-Virus und ihre Bedeutung für die virale Transkription/Replikation sowie die Interaktion mit dem Typ-I-Interferonsystem. Med. Diss. Göttingen 2013

29. Shope RE, J. P. Woodall, and A. P. A. Travassos da Rosa (1988): The epidemiology of disease caused by viruses in group C and Guamá (Bunyaviridae). T. P. Monath (ed.) p. 37-52

30. Travassos da Rosa JF, de Souza WM, Pinheiro FP, Figueiredo ML, Cardoso JF, Acrani GO, Nunes MRT (2017): Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. Am J Trop Med Hyg 96 (5), 1019-1030

31. Vasconcelos HB, Azevedo RS, Casseb SM, Nunes-Neto JP, Chiang JO, Cantuaria PC, Segura MN, Martins LC, Monteiro HA, Rodrigues SG, et al. (2009): Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: Epidemiology and molecular characterization of isolates. J Clin Virol 44 (2), 129-33

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle zunächst bei Herrn Prof. Dr. med. F. T. Hufert für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit diese Dissertation anzufertigen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Martin Spiegel für die wissenschaftliche Begleitung, stetige Unterstützung, Zeit und vor allem seine unermüdliche Geduld über die lange Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Andrea Paluschkiwitz und Frau Susanne Böhlken-Fascher für die Unterstützung und Hilfe im Labor.

Lebenslauf

Mein Name ist Berit Lauterjung-Jakobi, geb. Lauterjung. Geboren wurde ich am 24. Oktober 1986 in Emden.

Ich besuchte von 1993 bis 1997 die Grundschule Früchteburg in Emden, gefolgt von zwei Jahren Orientierungsstufe an der Schule Barenburg. 1999 wechselte ich auf das Johannes-Althusius-Gymnasium in Emden, an dem ich im Jahr 2005 meine Allgemeine Hochschulreife ablegte.

Ich begann im Wintersemester 2005/2006 das Studium der Sportwissenschaften (Magister, Hauptfach), der Wirtschafts- und Sozialpsychologie (Magister, 1. Nebenfach) und der Medizinischen Physiologie (Magister, 2. Nebenfach) an der Georg-August-Universität Göttingen. Im Wintersemester 2006/2007 wechselte ich innerhalb der Universität zum Fach Humanmedizin.

Im Frühjahr 2010 konnte ich den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegen. Im September 2011 begann ich, semesterbegleitend, die experimentelle Dissertation in der Abteilung der Virologie. Während des klinischen Abschnittes meines Studiums habe ich vielseitige Famulaturen in den Fächern Anästhesie, Allgemeinmedizin und Gynäkologie in ambulanten und klinischen Bereichen sowie eine Auslandsfamulatur an der Universitätsklinik Karapitiya in Galle, Sri Lanka gemacht. Meine PJ-Tertiale habe ich im Evangelischen Krankenhaus Weende in Göttingen (Innere Medizin und Chirurgie) und im St. Joseph Stift Bremen (Gynäkologie) absolviert. Im Juni 2014 habe ich nach alter Approbationsordnung den Zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung bestanden.

Während meines Studiums habe ich als Tutorin im STÄPS in diversen Fächern sowie in der Allgemeinmedizin als studentische Hilfskraft gearbeitet.

Seit dem 01.01.2015 arbeite ich als Assistenzärztin in der Gynäkologie im Krankenhaus St. Joseph Stift in Bremen.