

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie

Institut für Virologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Mutations- und Funktionsanalyse des Lassa-Virus Fusionsproteins GP-2

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

(Dr. rer. physiol.)



dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christian Klewitz

aus Fulda

Marburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 16.04.2007

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: PD Dr. ter Meulen

Korreferent: Prof. Dr. Grzeschik

2. Korreferent: Prof. Dr. Elsässer

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1. 1. Bedeutung des Lassa-Virus	1
1. 2. Taxonomie und Epidemiologie des Lassa-Virus	1
1. 3. Pathogenese und Klinik des Lassafiebers	4
1. 4. Immunantwort gegen das Lassa-Virus	4
1. 5. Therapie	5
1. 6. Molekularbiologie des Lassa-Virus	5
1. 6. 1. Virusstruktur	5
1. 6. 2. Infektionszyklus	7
1. 6. 3. Replikationszyklus	7
1. 6. 4. RNA-abhängige RNA-Polymerase L	8
1. 6. 5. Nukleoprotein NP	9
1. 6. 6. Matrixprotein Z	9
1. 6. 7. Glykoprotein GP	11
1. 7. Viruseintritt	16
1. 7. 1. Rezeptorbindung	17
1. 7. 2. Endosomale Lassa-Virusaufnahme durch Viropexis	18
1. 7. 3. Fusion von viraler und zellulärer Membran	20
1. 7. 4. Virale Fusionsproteine	21
1. 7. 5. Fusionspeptidsegmente (FPS)	22
1. 7. 6. Fusionsmechanismen von Virus- und Zellmembran	23
1. 7. 7. Fusionsinhibitoren	25
1. 8. Fragestellung	26

2. MATERIAL UND METHODEN

2. 1. Material	28
2. 1. 1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	28
2. 1. 2. Kits	30
2. 1. 3. Oligonukleotide	31
2. 1. 4. Codon-Optimierung des Lassa-Virus GP	33
2. 1. 5. Enzyme	34
2. 1. 6. Antikörper	34

2. 1. 7. Synthetische Peptide	35
2. 1. 8. Eukaryontische Expressionsvektoren	35
2. 1. 9. Bakterien	37
2. 1. 10. Eukaryontenzellen	37
2. 1. 11. Seren von Lassafieberpatienten	38
2. 1. 12. Puffer und Medien	38
2. 2. Molekularbiologische Methoden	42
2. 2. 1. Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
2. 2. 2. Prinzip der rekombinanten PCR	42
2. 2. 3. Verdau doppelsträngiger DNA	
mit Restriktionsendonukleasen	45
2. 2. 4. Elektrophoretische Auftrennung	
von DNA-Fragmenten im Agarosegel	46
2. 2. 5. Reinigung von DNA-Fragmenten	
aus Agarosegelen (Gelextraktion)	46
2. 2. 6. Ligation von PCR-Fragmenten	46
2. 2. 7. Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	47
2. 2. 8. Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	47
2. 2. 9. Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	47
2. 2. 10. Plasmid-DNA-Isolierung	48
2. 2. 11. Enzymatische Sequenzierung von DNA	48
2. 3. Immunologische Methoden	50
2. 3. 1. Immunoblot (Western-Blot)	50
2. 3. 2. Immunpräzipitation	53
2. 4. Zellkultur-Technik	55
2. 4. 1. Passagieren der Zelllinien	55
2. 4. 2. Herstellung des Mediums für SRD-12B-Zellen	55
2. 4. 3. Transfektion von Zellen mit Lipofectamin [®] 2000	56
2. 5. Rekombinanter Zell-Zellfusionsassay (RZZFA)	57
2. 6. Pseudotypen-Infektiositätsassay	58
2. 6. 1. Pseudotypen-Herstellung	60
2. 6. 2. Pseudotypen-Titration	60
2. 6. 3. Pseudotypen-Transduktion	61
2. 7. Inhibitionsstudien	62

2. 8. Hydrophobizitätsanalyse des Lassa-Virus GP-2-N-Terminus	62
---	----

3. ERGEBNISSE

3. 1. Lassa-Virus GP-induzierte Zell-Zellfusion nach Ansäuerungspuls	63
3. 2. Reifespaltung von Lassa-Virus GP-C als Fusogenitätsvoraussetzung	64
3. 3. Einfluss der GP/Z/NP-Koexpression auf die Zell-Zellfusion	66
3. 4. Strukturelle Analyse der Lassa-Virus Fusionsdomänen	68
3. 5. Funktionelle Analyse der Lassa-Virus Fusionsdomänen	70
3. 5. 1. Mutationsanalyse der beiden postulierten Fusionsdomänen im GP-2	70
3. 5. 2. Herstellung von Lassa-Virus FPS-Mutanten mittels rekombinanter PCR	72
3. 5. 3. Spaltung der Lassa-Virus FPS-Mutanten	73
3. 5. 4. Oberflächenexpression der Lassa-Virus FPS-Mutanten	74
3. 6. Fusogenität der Lassa-Virus FPS-Mutanten	77
3. 7. Retroviraler Pseudotypenassay (rPT-Assay)	78
3. 7. 1. Lassa-Virus GP-vermittelte Pseudotypisierung von MLV-Partikeln	78
3. 7. 2. Hemmung von MLV-Lassa-Virus-GP-rPT mit NH ₄ Cl	80
3. 7. 3. Titration von MLV-Lassa-Virus-GP-rPT	80
3. 7. 4. Inkorporation der Lassa-Virus FPS-Mutanten in rPT	81
3. 7. 5. rPT-Infektiosität der Lassa-Virus FPS-Mutanten	83
3. 8. Inhibitionsstudien	84
3. 8. 1. Inhibition mit synthetischen Peptiden	84
3. 8. 2. Inhibition mit Seren von Lassafieberpatienten	87

4. DISKUSSION

4. 1. Unterschiede zwischen Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren beim Zelleintritt	91
4. 2. Ort der Fusion von Virus und Wirtszellmembran	92
4. 3. FPS-Mutationsanalyse / Fusionsmodell	95
4. 3. 1. FPS-Analyse	96
4. 3. 2. Fusionsmodell	99
4. 4. Inhibitionsstudien	101

4. 5. Ausblick	103
5. ZUSAMMENFASSUNG	
5.1. Zusammenfassung (deutsch)	105
5.2. Zusammenfassung / Summary (englisch)	106
6. ANHANG	
6. 1. Abbildungsverzeichnis	107
6. 2. Tabellenverzeichnis	110
6. 3. Literaturverzeichnis	111
6. 4. Abkürzungsverzeichnis	125
6. 5. Veröffentlichungen	129
6. 6. Präsentationen	130
6. 7. Verzeichnis der akademischen Lehrer	131
6. 8. Danksagung	132

1. EINLEITUNG

1. 1. Bedeutung des Lassa-Virus

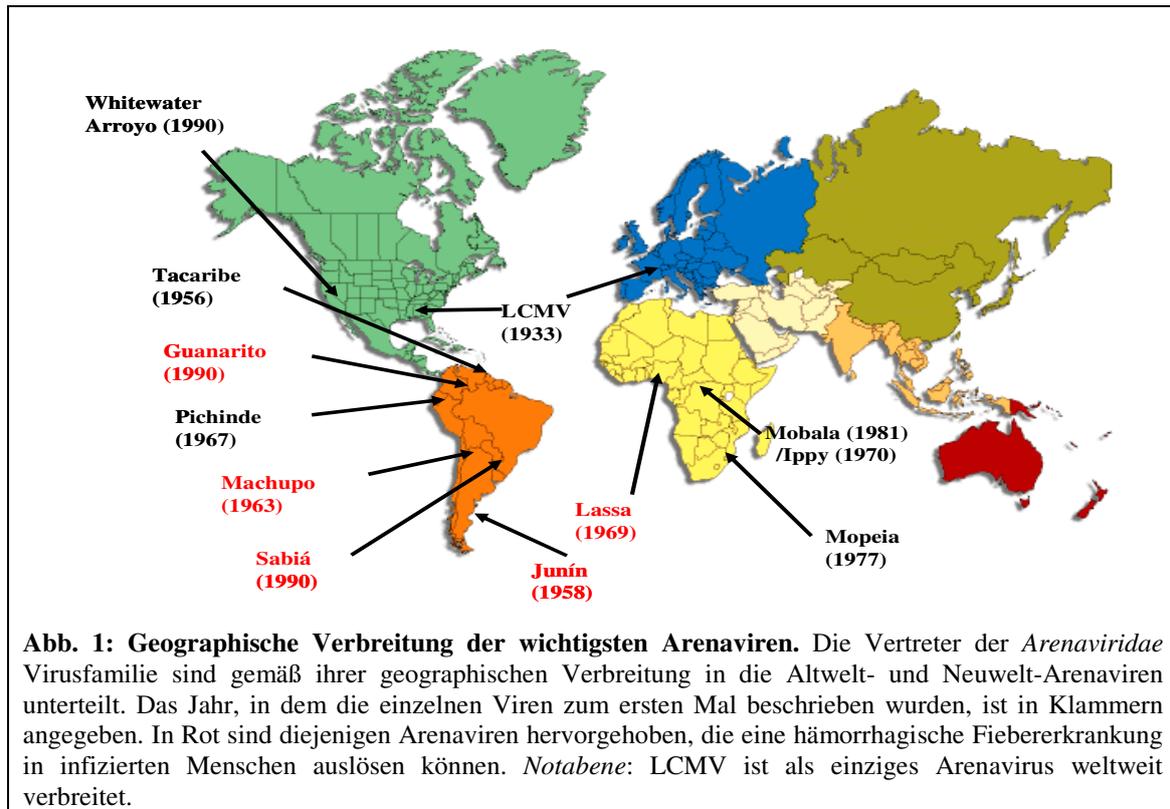
Das Lassa-Virus kann bei infizierten Menschen das Lassa-Hämorrhagische-Fieber (Lassafieber) hervorrufen, eine oft tödlich verlaufende Erkrankung, die nach einer Stadt im Yedseram Flusstal in Nigeria benannt wurde, in der die ersten beschriebenen Fälle im Jahre 1969 auftraten (Buckley und Casals 1970). Teile Guineas, Sierra Leones, Nigerias und Liberias sind endemisch für den Krankheitserreger. Die CDC (Centers for Disease Control and Prevention) schätzt die Zahl der in Westafrika auftretenden Lassa-Virusinfektionen auf 100000 bis 300000 pro Jahr, davon 5000 Todesfälle. Wegen der hohen Sterblichkeitsrate und wegen seiner Übertragbarkeit von Mensch zu Mensch ist das Lassa-Virus in die höchste biologische Sicherheitsstufe BSL-4 (Biosafety Level 4) und in die NIAID (National Institut of Allergy and Infectious Diseases) Biowaffen Kategorie A eingeordnet.

1. 2. Taxonomie und Epidemiologie des Lassa-Virus

Das Lassa-Virus ist ein Vertreter der *Arenaviridae* Familie, deren Genom von zwei einzelsträngigen RNA-Segmenten gebildet wird, die in „ambisense Strategie“, d.h. von entgegengesetzten Richtungen aufeinander zulaufend, kodiert sind. Transmissions-elektronenmikroskopaufnahmen dieser durchschnittlich ca. 100 nm Durchmesser großen Viruspartikel zeigen umhüllte, sphärische Virionen, die körnige Strukturen enthalten. Diese Strukturen sind Ribosomen, die aus der infizierten Wirtszelle stammen und bei der Virusvermehrung in sich neubildende Virionen eingebaut werden (Murphy und Whitfield 1975). Das körnige Aussehen der Viruspartikel führte zu deren Benennung als Arenaviren, was vom lateinischen Wort „*arenosus*“ (dt. = sandig) abgeleitet ist.

Die Familie der *Arenaviridae* gliedert sich in ein Genus (Arenaviren) mit derzeit erkannten dreiundzwanzig verschiedenen Spezies. Innerhalb des Genus differenziert man zwischen zwei Gruppen, nämlich den Altwelt- und den Neuwelt-Arenaviren, gemäß ihrer geographischen und populationsserologischen Verbreitung. Zu den Altwelt-Arenaviren gehören neben dem Lassa-Virus das Ippy-, das Mopeia- und das

Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus (LCMV). LCMV stellt das Bindeglied zu den Neuwelt-Arenaviren dar, da es als einziges Arenavirus weltweit verbreitet ist (Abb. 1).



Die Gruppe der Neuwelt-Arenaviren, welche man auch als Tacaribe-Gruppe bezeichnet, unterteilt sich in drei verschiedene Linien (A, B, C), abgeleitet von der Sequenzanalyse von ca. 600 Nukleotiden der einzelnen Nukleoproteine der unterschiedlichen Vertreter (Bowen *et al.* 2000). Neuere Studien, in denen ein ca. 900 Nukleotide langer Bereich der RNA-abhängigen RNA-Polymerase der Arenaviren analysiert wurde, bestätigten diese Einteilung (Charrel *et al.* 2003).

Neben dem Lassa-Virus können folgende Arenaviren hämorrhagische Fiebererkrankungen auslösen, die alle zur Unterlinie B der Neuwelt-Arenaviren gehören. Diese Viren und die von ihnen hervorgerufenen Erkrankungen sind: Junín-Virus (Argentinisches-Hämorrhagisches-Fieber), Machupo-Virus (Bolivianisches-Hämorrhagisches-Fieber), Guanarito-Virus (Venezuelanisches-Hämorrhagisches-Fieber) und Sabiá-Virus (Brasilianisches-Hämorrhagisches-Fieber).

Arenaviren sind Zoonosen, bei denen jedes Virus an eine spezifische Nagetierart angepasst ist. Das natürliche Lassa-Virusreservoir ist die Vielzitzenmaus aus der Gattung *Mastomys* (Monath *et al.* 1974). Zunächst wurde *Mastomys natalensis* als primäre Wirtsspezies identifiziert. Da dieses Genus jedoch taxonomisch unzureichend untersucht ist, war bis vor Kurzem unklar, welche Spezies oder Subspezies das

tatsächliche Lassa-Virusreservoir darstellen (Salazar-Bravo *et al.* 2002). Neueste genetische Untersuchungen konnten *Mastomys natalensis* als den alleinigen Wirt identifizieren (Lecompte *et al.* 2006). Die Prävalenz von Antikörpern gegen das Lassa-Virus in der Bevölkerung beträgt 8-52% in Sierra Leone, 4-55% in Guinea und 21% in Nigeria. Seropositive Individuen finden sich auch in der Zentralafrikanischen Republik, der Demokratischen Republik Kongo, in Mali und im Senegal. In Sierra Leone, Liberia und Nigeria sind zudem gelegentlich Mitarbeiter des britischen „Department for International Development“, des Internationalen Roten Kreuzes und der Mission der Vereinten Nationen von Lassa-Virusinfektionen betroffen. Des Weiteren wurden sporadische Lassa-Fälle nach Großbritannien, den Niederlanden, der Schweiz und Deutschland importiert (Richmond und Baglolle 2003).

Das Lassa-Virus wird durch direkten oder indirekten Kontakt auf den Menschen übertragen, wobei die direkte Übertragung durch Kontakt mit infizierten Tieren oder mit virushaltigen, exkrementenkontaminierten Lebensmitteln erfolgt. In einigen endemischen Gebieten wurden zudem kleine Nagetiere als Proteinquelle verwendet und vor allem von Kindern gefangen (McCormick *et al.* 1987). Die Übertragung von Mensch zu Mensch ist insbesondere bei engem Kontakt während der virämischen Phase möglich und findet häufig in Krankenhäusern aufgrund schlechter Hygieneverhältnisse statt. Da das Virus während der Rekonvaleszenzphase bis zu zwei Monaten unter anderem im Urin und Sperma infizierter Personen nachweisbar ist, besteht ein längerfristiges Infektionsrisiko für Lebens- und Sexualpartner betroffener Patienten.

1. 3. Pathogenese und Klinik des Lassafiebers

Das durch Lassa-Viren verursachte Lassafieber verläuft bei etwa 30% der Infizierten klinisch apparent, wobei etwa 15% der hospitalisierten Patienten versterben (McCormick *et al.* 1987). Während der Epidemie von 1996/97 in Sierra Leone kam es zu 823 Fällen von Lassafieber mit 153 Toten, was einer Mortalitätsrate von 18,6% entspricht (World Health Organization 1997).

Da Lassa-Virusinfektionen beim Menschen über die Schleimhäute bzw. über Hautkontakte mit infizierten Körperflüssigkeiten oder Exkrementen erfolgen, sind dendritische Zellen und Makrophagen (beides Antigen-Präsentierende-Zellen) die primären Zielzellen des Virus. Die Viren werden im weiteren Infektionsverlauf durch das Blut und die Lymphgefäße im Körper verteilt, und das Virus repliziert dann im

Parenchym unterschiedlicher Organe. Hohe Titer werden in der Leber, der Milz und den Nebennieren gefunden (Lukashevich *et al.* 1999). Trotz weit verbreiteter viraler Replikation während einer Lassa-Virusinfektion sind die Veränderungen in den Endothelien und den anderen Organen nicht ausreichend, um den Tod eines Infizierten herbeizuführen (Winn und Walker 1975).

Nach einer Inkubationszeit von fünf bis einundzwanzig Tagen treten die ersten Symptome des Lassafiebers auf. Diese beinhalten meist Fieber, Hals-, Nacken-, Rücken- oder Bauchschmerzen, Husten, Erbrechen, Diarrhö und Bindehaut-Injektionen. Ödeme (z.B. im Gesicht), wie sie bei einigen Infizierten auftreten, resultieren aus Schwächung der endothelialen Zellen, durch Zytokinfreisetzung infizierter Makrophagen oder durch direkte Infektion mit dem Lassa-Virus, was zu einer erhöhten Permeabilität der Kapillaren führt (sog. Plasma-Leakage-Syndrom). Dies wiederum bewirkt eine Verringerung des effektiv zirkulierenden Blutvolumens, Schock und Multi-Organ-Versagen. Blutungen, gewöhnlich der Schleimhäute (z.B. Zahnfleisch), treten in weniger als einem Drittel aller Fälle auf, führen aber meist zum Tod der Patienten. Die Gesamtmortalität liegt bei circa 1-2% aller Infizierten. Überlebende beginnen zwei bis drei Wochen nach Beginn der Krankheit zu genesen (McCormick *et al.* 1987). Da das Lassa-Virus ein wenig zytopathisches Virus ist und ausgedehnte Nekrosen in infizierten Organen nicht beobachtet werden, geht man gegenwärtig davon aus, dass initiale Immunsuppression gefolgt von Zytokindysregulation der beobachteten Pathologie zugrunde liegt.

Lassa-Virusinfektionen verursachen bei etwa 17% der klinisch Erkrankten transiente oder bleibende Hörschäden. Somit spielt das Virus eine wesentliche Rolle als kausales Agens von Schwerhörigkeit in den Verbreitungsgebieten. 1-2% der Bevölkerung in den betroffenen Gebieten leiden unter uni- oder bilateralem Hörverlust (Cummins *et al.* 1990).

1. 4. Immunantwort gegen das Lassa-Virus

Die Lassa-Virusinfektion induziert eine humorale Immunantwort, welche die virale Replikation nicht kontrolliert. Das Auftreten von spezifischen IgM- und IgG-Antikörpern in Patienten und infizierten Affen korreliert nicht mit der Genesung, sondern wird spät in der Rekonvaleszenz beobachtet (Fisher-Hoch *et al.* 2000). Demgegenüber schützt die Induktion der spezifischen zellulären Immunantwort gegen

das virale Glykoprotein nichthumane Primaten vor einer ansonsten tödlichen Infektion (Fisher-Hoch *et al.* 2000), und eine starke CD4⁺-Gedächtnis-T-Zell-Antwort gegen das Nukleoprotein NP und das Glykoprotein GP konnten in Seropositiven aus endemischen Regionen gezeigt werden (ter Meulen *et al.* 2000 und 2004). Interessanterweise korrelieren T-Zell-Epitope des GP-2 mit dem Bereich des postulierten internen Fusionspeptidsegments (Kap 1. 6. 7.).

Es konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen und Makrophagen mit Lassa-Virus infizierbar sind, diese Infektion aber nicht zu einer Aktivierung dieser Zellen führte. Interessanterweise interferiert das Virus dabei nicht mit exogenen Aktivierungssignalen oder mit der Lebensfähigkeit der Zellen. Der Tropismus des Lassa-Virus für Antigen-Präsentierende-Zellen stellt somit einen entscheidenden Faktor für die hohe Pathogenität und transiente Immunsuppression der Infektion dar (Baize *et al.* 2004). Vermutlich ist die ausgeprägte Glykosylierung des GP die Ursache für eine Maskierung neutralisierender Epitope. Der Organotropismus korreliert möglicherweise mit der Expression einer zellulären Endoprotease, die für die Reifung des Glykoproteins benötigt wird (Lenz *et al.* 2001).

1. 5. Therapie

Das antivirale Medikament Ribavirin (1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol) ist bei der Behandlung von Lassafieber wirksam, jedoch nur, wenn es frühzeitig (bis zu sechs Tage nach Auftreten der ersten Krankheitssymptome) im Krankheitsverlauf verabreicht wird. Dabei ist Ribavirin zweimal so effektiv, wenn es intravenös anstatt oral appliziert wird (Richmond und Baglole 2003). Es ist bisher nicht bekannt, ob Ribavirin auch gegen die anderen hämorrhagischen Arenaviren wirksam ist. Die Behandlungsstrategie sieht vier tägliche Injektionen von jeweils 900 mg für erwachsene Patienten vor (Cameron und Castro 2001). Wenn es innerhalb von sechs Tagen nach Beginn der Krankheitssymptome genommen wird, reduziert es die Todesrate um 90%. Dabei sind Dehydrierung, Ödeme, Hypotonie und renale Dysfunktionen häufige Nebenwirkungen der Ribavirintherapie (Richmond und Baglole 2003). Da Ribavirin ein Teratogen ist, kann es Probleme bei der Spermienentwicklung hervorrufen. Die Gründe dafür sind jedoch unklar (Cameron und Castro 2001). Der antivirale Wirkmechanismus des Ribavirins beruht darauf, dass Ribavirin in Zellen zu Ribavirin-Monophosphat (RMP) phosphoryliert wird. Bei der viralen Genomreplikation führt der direkte Einbau von

RMP in die virale RNA als ATP- oder GTP-Analogon dann zu einer „Fehler-Katastrophe“ und somit letztlich zur Virusbeseitigung (Crotty und Andino 2002).

1. 6. Molekularbiologie des Lassa-Virus

1. 6. 1. Virusstruktur

Lassa-Virionen sind lipidumhüllte pleomorphe Partikel mit einem Durchmesser von 60 bis 200 nm. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen weisen Lassa-Viruspartikel körnige Strukturen auf (Abb. 2B). Diese Strukturen scheinen Ribosomen zu repräsentieren, die bei der Virus-Morphogenese von der Wirtszelle aufgenommen und im Viruspartikel mitgeführt werden. Die Bedeutung dieses Phänomens ist noch nicht geklärt, doch scheint die Anwesenheit von Ribosomen im Viruspartikel keine Rolle für die Infektiosität der Viren zu spielen (Leung und Rawls 1977). Auf der Oberfläche der Virionen befinden sich „Spikes“, die von Trimeren oder Tetrameren der viralen Glykoproteine GP-1 und GP-2 gebildet werden (Burns und Buchmeier 1991; Eschli *et al.* 2006). Das Genom der Lassa-Viren besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Segmenten, die für vier Proteine kodieren und zusammen mit den sie enkapsidierenden Nukleoproteinen das Nukleokapsid bilden.

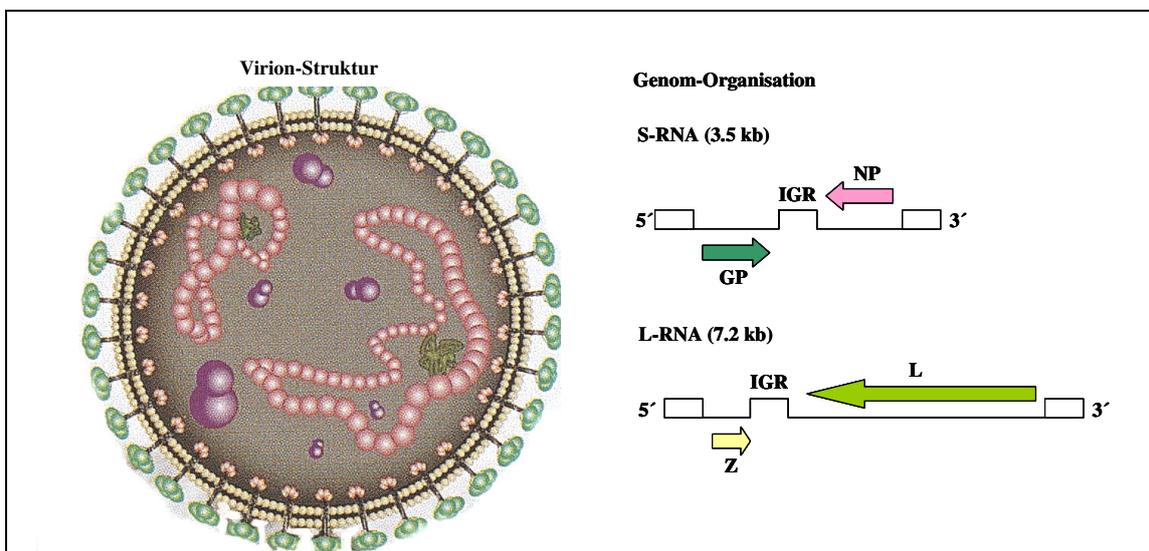


Abb. 2A: Schematische Darstellung der Lassa-Virusmorphologie. Lassa-Viren sind lipidumhüllte Partikel variierender Größe, die zwei RNA-Segmente in Ambisense-Orientierung enthalten. Auf der Oberfläche finden sich Oligomere* der Glykoprotein-Untereinheiten GP-1 und GP-2, die nichtkovalent miteinander verbunden sind und zusammen die „Spikes“ der Virionen bilden (grün). Die Genom-Organisation des Lassa-Virus zeigt S- und L-Segment mit den jeweils kodierten Virusproteinen (siehe Text). IGR bezeichnet die intergenischen Regionen (Abb. verändert nach Brown und Lloyd 1999). *Es ist fraglich, in welchem Oligomerisierungsgrad die Spikes vorliegen. Burns und Buchmeier zeigten 1991 durch Quervernetzungsreagentien, dass GP-1 und GP-2 in LCM-Virionen Tetramere bildet, während eine

neuere Arbeit von Eschli *et al.* (2006) zeigte, dass rekombinant exprimiertes Glykoprotein als Trimer-Komplex an die Oberfläche von transient transfizierten Zellen transportiert wird.

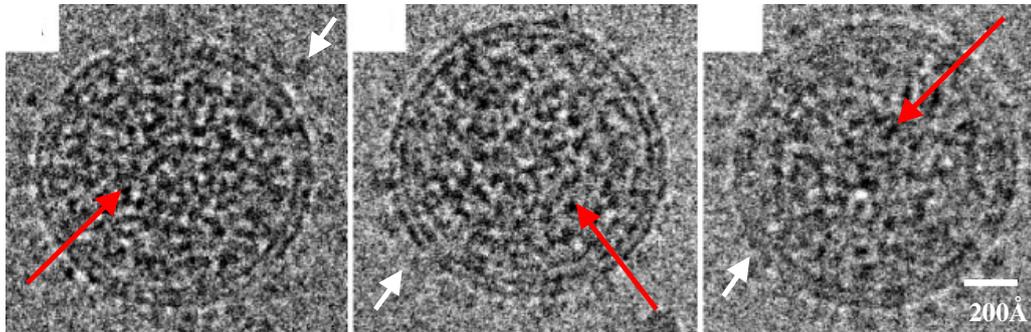


Abb. 2B: Elektronenkryomikroskopische Aufnahmen von Arenaviren. Die Aufnahmen zeigen LCMV-Viren, und man kann neben den Spikes auf der Virion-Oberfläche (weiße Pfeile) auch Wirtszellribosomen im Partikel erkennen (rote Pfeile), die namensgebend für die Virusfamilie sind (Abb. aus Neuman *et al.* 2005).

1. 6. 2. Infektionszyklus

Lassa-Viren infizieren ihre Zielzellen nach Rezeptorbindung mit darauffolgender Endozytose (Kap. 1. 7. 2.). Nachdem als Folge dieser Prozesse die virale RNA ins Zytoplasma der Zelle gelangt, beginnt der Replikationszyklus (Kap. 1. 6. 3.), während dessen die virale RNA transkribiert wird, die Virusproteine translatiert und posttranslational prozessiert werden. Zum Abschluss des Infektionszyklus lagern sich Virusproteine und virale RNA (und gelegentlich Wirtszellribosomen) zusammen (Assemblierung) und schließlich knospen neu gebildete Virionen von der Zellmembran ab (Budding).

1. 6. 3. Replikationszyklus

Das bisegmentierte RNA-Genom des Lassa-Virus besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Spezies: das größere L-Segment kodiert für die virale Polymerase L und das Matrixprotein Z, wohingegen das kleinere S-Segment für das virale Nukleoprotein NP und das Glykoprotein GP kodiert (Abb. 2A).

Das S-Segment umfasst etwa 3500 Nukleotide, wohingegen das L-Segment etwa 7200 Nukleotide aufweist. Die virale RNA enthält keine „Cap“-Strukturen. Am jeweiligen 5'- bzw. 3'-Ende befinden sich nicht nur innerhalb eines Segmentes sondern auch zwischen L- und S-Segment ca. 20 nahezu komplementäre Nukleotide, die zur Bildung

quasizirkulärer, pfannenstielähnlicher Strukturen führen können. Diese können sowohl innerhalb eines Segmentes, als auch in Wechselwirkung mit dem jeweils anderen Segment auftreten. Außerdem sind die 3'- und 5'-Enden zwischen den verschiedenen Arenaviren konserviert, was man sich bei der Diagnostik von Arenavirusinfektionen zunutze macht. Die konservierten Enden werden in einer diagnostischen Real-Time PCR als Matrize für spezifische Primer benutzt (Drosten *et al.* 2003).

Jedes der beiden Gen-Segmente kodiert je zwei Proteine in Ambisense-Orientierung. Dies bedeutet, dass die am 3'-Ende befindlichen Proteine in negativer Orientierung kodiert sind (L und NP), die am 5'-Ende gelegene Proteine hingegen, vergleichbar einer mRNA, in positiver Ausrichtung kodiert sind (Z und GP). Bei der Transkription der negativ-orientierten Gene wird eine zur viralen RNA komplementäre mRNA gebildet, worauf die Translation des Proteins erfolgt. Die in positiver Orientierung kodierten Proteine werden von einer komplementären, antigenomischen RNA, von der ausgehend die mRNA transkribiert wird, translatiert (Meyer und Southern 1993). Die Leserahmen der beiden jeweils in positiver und negativer Orientierung kodierten Proteine laufen demzufolge aufeinander zu und werden von einer nichttranslatierten, etwa 200 Nukleotide langen intergenischen Region (IGR) getrennt, welche G/C-reich ist und welche die Ausbildung einer stabilen, haarnadelähnlichen Sekundärstruktur ermöglicht (Abb. 2A). Innerhalb des offenen Leserahmens für die Polymerase L befindet sich bei LCM- und Lassa-Virus in entgegengesetzter Orientierung zum L ein weiterer offener Leserahmen, der für ein etwa 95 AS großes Protein X kodieren könnte. Die tatsächliche Nutzung dieses Leserahmens ist allerdings bis heute noch fraglich (Djavani *et al.* 1997).

1. 6. 4. RNA-abhängige RNA-Polymerase L

Das größte der Arenavirusproteine ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase L, die bei Lassa-Viren eine molare Masse von 250 kDa aufweist. Die Polymerase ist vermutlich mit dem Ribonukleinsäure-Protein-(RNP)-Komplex assoziiert, da aufgereinigte RNP-Komplexe eine Polymeraseaktivität aufweisen (Fuller-Pace und Southern 1989). Außerdem spielt L eine essentielle Rolle bei der Replikation im Lassa-Virus Replikon-System (Hass *et al.* 2004). L weist funktionelle Domänen auf, die typisch für Polymerasen von Negativstrang-RNA-Viren sind. Dabei wurde eine etwa 500 AS lange Domäne identifiziert, welche kurze konservierte Motive anderer katalytischer Domänen von viralen RNA-abhängigen Polymerasen beinhaltet (Vieth *et al.* 2004). Die virale

mRNA der Polymerase L weist im Gegensatz zum viralen Genom und Anti-Genom am 5'-Ende eine Cap-Struktur auf, gefolgt von vier bis fünf nichtvirkuskodierten Nukleotiden. Daher wird vermutet, dass die Arenavirus-Polymerase eine Domäne besitzt, die sogenannte Cap-Strukturen von zellulären mRNA abschneidet und an die virale mRNA anhängen kann (*engl.*: Cap-snatching).

1. 6. 5. Nukleoprotein NP

Quantitativ liegt das NP als häufigstes Strukturprotein in Arenaviruspartikeln vor. Es besteht aus etwa 570 AS und weist eine molare Masse von ungefähr 60 kDa auf. Für Pichinde-Virus konnte gezeigt werden, dass 70% aller markierten Virusproteine NP sind und dass ein Virion etwa 1530 NP-Moleküle enthält (Buchmeier *et al.* 2002). Das NP enkapsidiert die virale RNA und bildet somit den infektiösen RNP-Komplex. Wahrscheinlich spielt die Menge des intrazellulären NP eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription und Translation. In einem rekombinanten System konnte für LCMV gezeigt werden, dass NP zusammen mit der viralen Polymerase L notwendig und hinreichend für die Transkription und Replikation viraler RNA-Analoga ist (Lee *et al.* 2002). Ebenso wurde spät nach akuter LCMV-Infektion eine phosphorylierte Form des NP beschrieben. Der Anteil der phosphorylierten Form nimmt beim Übergang zur persistierenden Infektion *in vitro* weiter zu (Bruns *et al.* 1986). Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen der LCMV-Morphologie zeigten, dass das NP in großer räumlicher Nähe zum membranverankerten GP-2-Protein vorliegt (Neuman *et al.* 2005). Interessanterweise konnte von Burns und Buchmeier bei LCMV mit Hilfe von Quervernetzungsreagenzien eine Assoziation des NP mit dem zytoplasmatischen Anteil von GP-2 gezeigt werden. Die mögliche Interaktion von NP und GP-2 impliziert daher eventuell eine Funktion beim Virusbudding (Burns und Buchmeier 1991). Des Weiteren könnte diese Interaktion eine Bedeutung für die Membranfusionsfunktion von GP-2 haben (Kap. 1. 6. 7.), was in dieser Arbeit unter anderem untersucht wird.

1. 6. 6. Matrixprotein Z

Das Z-Protein ist, abgesehen vom Signalpeptid, das kleinste bekannte arenavirale Protein mit einer Länge von 90 bis 99 AS und einer ungefähren molaren Masse von 11 kDa. Es enthält eine zentrale RING Domäne von ca. 60 AS-Resten Länge, die konservierte Cysteine und Histidine enthält, um zwei Zink-Ionen zu binden.

Prinzipiell besitzt das arenavirale Z-Protein drei übergeordnete Funktionen: Einerseits ist es eine strukturelle Komponente des Viruspartikels, andererseits ist es ein Genom-Replikations- und Transkriptionsfaktor und außerdem stellt es ein Regulationsprotein dar, das durch vielfältige Wechselwirkungen mit anderen Proteinen der Wirtszelle zahlreiche Prozesse im Infektionsverlauf einer infizierten Zelle steuert.

Gereinigtes Lassa-Virus Z-Protein kann sich zu großen, sphärischen Partikeln zusammenlagern, die durch Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden können (Strecker *et al.* 2003). In viralen Partikeln ist das Z-Protein reichlich vorhanden, und biochemische sowie Koloalisationsstudien lassen eine Interaktion von NP und Z-Protein vermuten (Eichler *et al.* 2004a). Sequenz-Analysen enthüllten im Weiteren das Vorliegen von sog. „Late-Domänen“, d.h. kurze, prolinreiche Sequenzen im Z-Protein von LCM- und Lassa-Virus. Es ist bekannt, dass diese Domänen mit zellulären Proteinen wie Tsg101 interagieren, und somit die Virusfreisetzung steuern. Neuere Experimente haben gezeigt, dass das Lassa-Virus Z-Protein mit Lipidmembranen interagiert, und dass das Z-Protein umhüllte Partikel bilden kann, die in Abwesenheit anderer viraler Proteine aus der Zelle freigesetzt werden. Dabei war die Unversehrtheit der sog. „Late-Domäne“ („PPPY-Motiv“) für diese Funktion des Z-Proteins essentiell (Strecker *et al.* 2003). Gen-Knockout-Experimente zeigten, dass Tsg101 eine Rolle bei der Virusfreisetzung spielt (Urata *et al.* 2006). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse also darauf hin, dass das Z-Protein der Arenaviren das Homolog der Matrixproteine ist, wie sie in anderen Negativstrang-RNA-Viren vorkommen.

Die Wichtigkeit des Z-Proteins für die Replikation und Transkription wurde bei Tacaribe-Virusinfektionen dadurch gezeigt, dass die Immundepletion von Z-Protein aus virusinfizierten Zellextrakten die Synthese von genomischer RNA und NP-mRNA hemmte (Garcin *et al.* 1993).

Durch vielfältige Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen ist das Z-Protein der Arenaviren weiterhin ein wichtiger Regulationsfaktor während der Virusinfektion. So

interagieren die Z-Proteine von LCM- und Lassa-Virus beide mit dem Promyelozytischen-Leukämie-Protein (PML). Nach Transfektion des Lassa-Virus Z-Proteins bzw. einer LCMV-Infektion wird PML, wahrscheinlich aufgrund der Interaktion mit Z, aus dem Nukleus ins Zytoplasma zurückgeführt. Die Wechselwirkung zwischen Z-Protein und PML könnte eine Strategie des Virus darstellen, einen Hauptakteur in der Wirtszellregulation zu beeinflussen. PML bildet zusammen mit anderen Proteinen die PML-Kernkörperchen, die in eine Vielzahl zellulärer Prozesse verwoben sind, darunter Onkogenese, Transkription und Zellzyklus-Regulation (Borden *et al.* 1998b). Außerdem ist PML ein interferonstimuliertes Protein, und die Interaktion könnte eine Rolle bei der antiviralen Antwort der Zelle spielen. Anders ausgedrückt könnte das Virus durch die Umverteilung von PML auf eine Abschwächung der Wirtszellantwort abzielen. Das Z-Protein von LCMV assoziiert ebenfalls mit dem ribosomalen Protein P0. Koimmunpräzitations- und Kolo-kalisationsexperimente legen nahe, dass Z mit dem nukleären, nicht aber mit dem zytoplasmatischen Anteil von P0 interagiert (Borden *et al.* 1998a). Ein dritter zellulärer Interaktionspartner des LCM- und Lassa-Virus Z-Proteins ist der eukaryotische Initiationsfaktor 4E (eIF4E). Beide Proteine koimmunpräzitimieren und kolokalisieren im Zellkern und im Zytoplasma, und eine direkte Interaktion wurde mittels GST-Pull-Down-Experimenten gezeigt. Übereinstimmend mit dieser Interaktion reduziert Z-Protein selektiv die Affinität von eIF4E für sein Substrat, nämlich die Cap-Struktur von mRNA, und unterdrückt somit die Proteintranslation in Zellextrakten. In Zellkultur jedoch reduziert das Z-Protein nicht die komplette Proteinproduktion. Dennoch scheint es selektiv die effiziente Translation derjenigen Proteine zu reduzieren, die eIF4E benötigen. Interessanterweise assoziieren die drei Z-Protein-Wechselwirkungsproteine PML, P0 und eIF4E auch untereinander, was die Bildung eines größeren Komplexes aus Z-Protein, PML, P0 und/oder eIF4E ermöglichen könnte (Campbell Dwyer *et al.* 2000).

1. 6. 7. Glykoprotein GP

Das GP der Arenaviren ist ein Typ-I-Membranprotein mit – je nach Virus-Spezies – acht bis sechzehn potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Lassa-Virus GP, Stamm Josiah, ist 491 AS-Reste lang mit einer molaren Masse von ca. 76 kDa, und es enthält elf N-Glykosylierungsstellen, die alle genutzt werden (Eichler *et al.* 2006).

Nach zwei enzymatischen Spaltungsreaktionen, der Signalpeptidabspaltung – bei der das GP-Vorläuferprotein Prä-GP-C in das Signalpeptid (SP) und GP-C gespalten wird – und der Reifespaltung – bei der GP-C in die Untereinheiten GP-1 und GP-2 gespalten wird – fungiert GP sowohl als Rezeptorbindepartner, als auch als Membranfusionsprotein. Sowohl die beiden Spaltungen als auch die Funktionen der einzelnen Spaltprodukte sind im Folgenden näher erläutert.

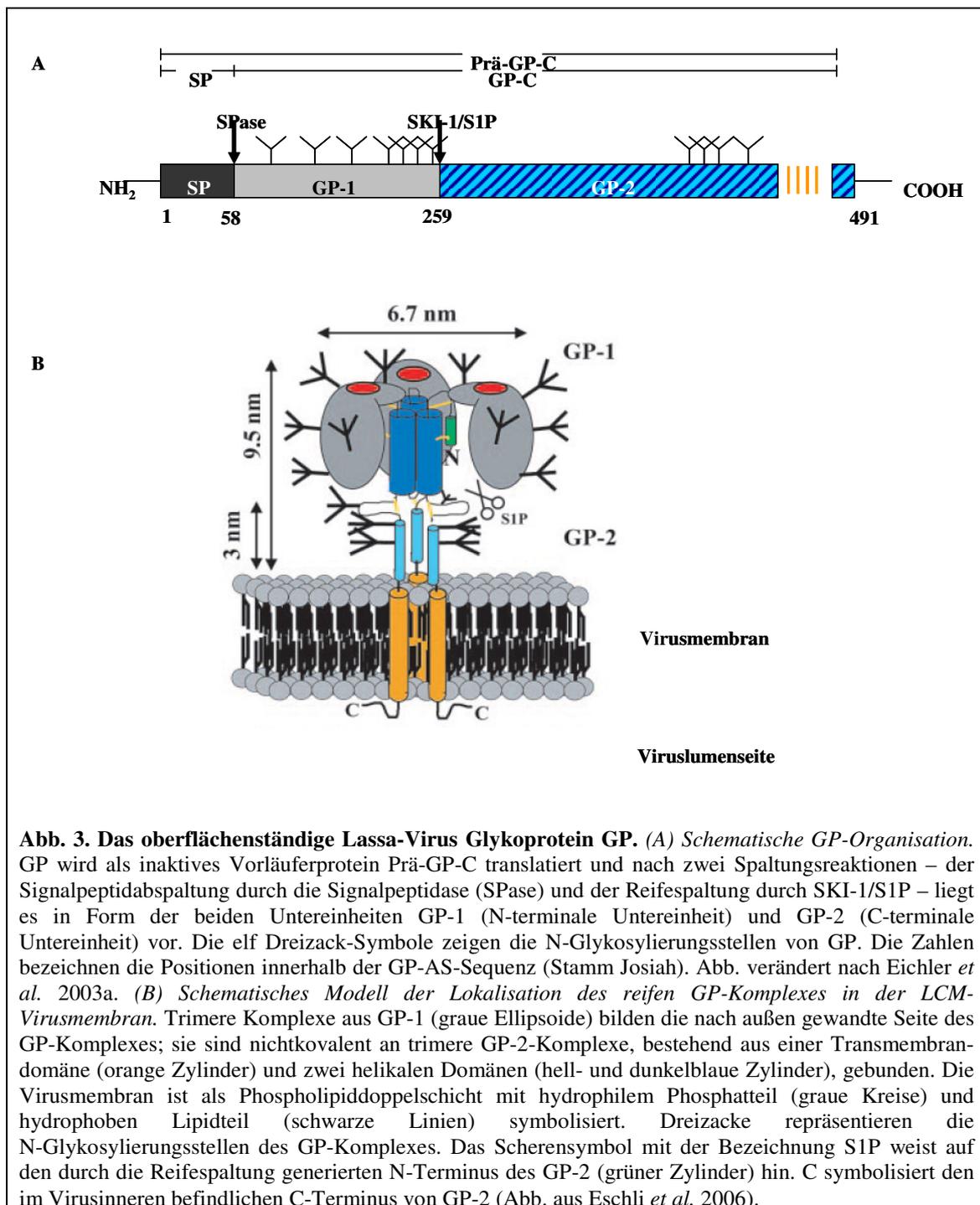


Abb. 3. Das oberflächenständige Lassa-Virus Glykoprotein GP. (A) *Schematische GP-Organisation.* GP wird als inaktives Vorläuferprotein Prä-GP-C translatiert und nach zwei Spaltungsreaktionen – der Signalpeptidabspaltung durch die Signalpeptidase (SPase) und der Reifespaltung durch SKI-1/S1P – liegt es in Form der beiden Untereinheiten GP-1 (N-terminale Untereinheit) und GP-2 (C-terminale Untereinheit) vor. Die elf Dreizack-Symbole zeigen die N-Glykosylierungsstellen von GP. Die Zahlen bezeichnen die Positionen innerhalb der GP-AS-Sequenz (Stamm Josiah). Abb. verändert nach Eichler *et al.* 2003a. (B) *Schematisches Modell der Lokalisation des reifen GP-Komplexes in der LCM-Virusmembran.* Trimere Komplexe aus GP-1 (graue Ellipsoide) bilden die nach außen gewandte Seite des GP-Komplexes; sie sind nichtkovalent an trimere GP-2-Komplexe, bestehend aus einer Transmembrandomäne (orange Zylinder) und zwei helikalen Domänen (hell- und dunkelblaue Zylinder), gebunden. Die Virusmembran ist als Phospholipiddoppelschicht mit hydrophilem Phosphatteil (graue Kreise) und hydrophobem Lipidteil (schwarze Linien) symbolisiert. Dreizacke repräsentieren die N-Glykosylierungsstellen des GP-Komplexes. Das Scherensymbol mit der Bezeichnung S1P weist auf den durch die Reifespaltung generierten N-Terminus des GP-2 (grüner Zylinder) hin. C symbolisiert den im Virusinneren befindlichen C-Terminus von GP-2 (Abb. aus Eschli *et al.* 2006).

Signalpeptid (SP)

Der N-terminale Anteil des primären Translationsproduktes Prä-GP-C des Lassa-Virus GP enthält eine mit 58 AS-Resten ungewöhnlich lange Signalsequenz, die zwei hydrophobe Bereiche umspannt und als Signalpeptid (SP) im Endoplasmatischen Retikulum (ER) abgespalten wird. Obwohl beide Regionen in Biomembranen inserieren können, konnte die N-terminal gelegene hydrophobe Domäne als diejenige identifiziert werden, welche GP-C ins ER transloziert (Eichler *et al.* 2004b). Um die SP-Spaltstelle zu charakterisieren, wurde aufgereinigtes, virales GP-1 aus Lassa-Viruspartikeln N-terminal durch Edman-Abbau ansequenziert, was zur Identifizierung der Sequenz TSLYKGV führte. Dies entspricht den AS-Resten 59-65 des Josiah Lassa-Virus GP. Einzelmutationen von AS-Resten mit positiv geladenen AS, welche die somit identifizierte SP-Spaltstelle flankieren, wurden durchgeführt, um die Hydrophobizität des SP zu erniedrigen und die dadurch bewirkten Veränderungen des mutierten SP funktionell zu bestimmen: Glyzin an Position 54 (G54R), Serin an Position 56 (S56R), Threonin an Position 58 (T58R) und Serin an Position 60 (S60R) wurden jeweils zu Arginin ausgetauscht. Alle vier Mutanten wurden zwar weiterhin als Prä-GP-C-Spezies exprimiert, jedoch wurden die Mutanten S56R und T58R weder an der SP- noch an der Reifespaltungsspaltstelle gespalten. Dies impliziert, dass die SP-Spaltung notwendig für die GP-C-Reifung ist und somit ebenfalls für die Lassa-Virusreplikation (Eichler *et al.* 2003b).

Ferner konnte gezeigt werden, dass die SP-Funktion des Lassa-Virus SP zwar durch SP anderer Proteine ersetzt werden konnte (z.B. Influenza-Virus HA-SP oder CD8-SP), allerdings wurden solche Chimären-Proteine nicht mehr reifegespalten. Wenn das Lassa-Virus SP allerdings *in trans* kotransfiziert wurde, konnte die Reifespaltung bei diesen Chimären wiederhergestellt werden. Dies war ein Hinweis darauf, dass dem Lassa-Virus SP neben der Translokation ins ER eine zusätzliche Funktion innewohnt, nämlich eine Reifespaltung unterstützende, weshalb es als viertes arenavirales Strukturprotein postuliert wurde (Eichler *et al.* 2003b).

Als dritte Funktion wurde für das Junín-Virus SP gezeigt, welches als stabiles SP (SSP) bezeichnet wird, dass es bei Verlust der positiven Ladung im Inneren des SSP (Lysin an Position 33) die Membranfusionseigenschaften des GP-2 (Kap. 1. 7. 6.) verändert. So führte der Verlust der positiven Ladung im SSP zu einem zu verminderten Fusionseffizienzen (bei Austausch von Lysin nach Glutaminsäure oder Lysin nach Serin an AS-Position 33) und ebenso zu einem veränderten pH-Schwellenwert für die Fusion

(z.B. Fusions-pH-Wert 4.5 bei der K33S-Austauschmutante im Vergleich zu pH 6.25 bei wildtypischem Junín-Virus GP-2). Möglicherweise ist dies dadurch bedingt, dass das SSP mit der CPI-Helix oder der Transmembrandomäne des GP-2 (siehe unten) interagiert (York und Nunberg 2006).

GP-1

Die Reifespaltung des Lassa-Virus GP-C findet im ER statt (Lenz *et al.* 2001), wohingegen LCMV GP-C später im sekretorischen Pathway gespalten wird, nämlich im späten Golgi-Apparat (Beyer *et al.* 2003). Es wurde für die Glykoproteine dieser beiden Altwelt-Arenaviren beobachtet, dass diese von der Endoprotease SKI-1/S1P, die zu der Pyrolysin-Gruppe der Subtilasen gehört, nach nichtbasischen AS-Resten gespalten werden. Nach der Reifespaltung liegen zwei Untereinheiten vor, nämlich GP-1 (N-terminale Untereinheit) und GP-2 (C-terminale Untereinheit).

Das nichtmembranverankerte GP-1 ist beim Josiah Lassa-Virus 201 AS-Reste lang (GP-AS 59-259), und es enthält sieben N-Glykosylierungsstellen an den Asparagin-Resten 79, 89, 99, 109, 119, 167 und 224 (GP-AS-Nummerierung) (Eichler *et al.* 2006).

Die Struktur des Lassa-Virus GP-1-Homooligomers wird vermutlich durch Disulfidbrücken stabilisiert. Allerdings ist GP-1 nicht kovalent sondern anscheinend durch ionische Wechselwirkungen mit dem GP-2-Glykoproteinkomplex verbunden (Burns und Buchmeier 1991). Innerhalb des LCM- und Lassa-Virus GP-1 befindet sich eine rezeptorbindende Domäne (Kunz *et al.* 2002). Die Bindung an den Rezeptor kann bei LCMV *in vitro* durch neutralisierende Antikörper verhindert werden, sodass der Mechanismus von neutralisierenden Immunsereen bei Arenaviren wahrscheinlich auf einer Inhibierung der Interaktion zwischen GP-1 und seinem zellulärem Rezeptor α -DG (Kap. 1. 7. 1.) beruht (Kunz *et al.* 2002).

GP-2

GP-2 ist die membranverankerte Untereinheit des Oberflächen-Glykoproteins, und für Junín-Virus wurde es als das Fusionsprotein identifiziert. Es liegt als trimerer, in der Virushülle verankerter Komplex vor (Eschli *et al.* 2006), wobei in älteren Arbeiten ein tetramerer Komplex beschrieben wurde (Burns und Buchmeier 1991). Mit Hilfe von computergenerierten Sekundärstrukturvorhersagen konnten folgende GP-2-Domänen postuliert werden (Gallaher *et al.* 2001, Abb. 4):

- (i) Eine N-terminale Region von 39 AS-Resten Länge, die zwei Bereiche enthält, die beide als FPS (Kap. 1. 7. 5.) fungieren könnten (Glusahkova *et al.* 1990; Gallaher *et al.* 2001). Das erste, N-terminale FPS (N-FPS) umspannt die Sequenz „GTFTWTLS“ (AS 260-267 in GP-Nummerierung, AS 1-8 der GP-2-Nummerierung), wohingegen das zweite, interne FPS (I-FPS) die AS 276-298 (GP-Nummerierung) bzw. 17-39 (GP-2-Nummerierung) umfasst (AS-Sequenz „GGYCLTRWMLIEAELKCFGNTAV“).
- (ii) Weiter C-terminal folgen zwei alpha-helikale Domänen, die erste (AS 305-355 der GP-Nummerierung) wird „Amphi-Helix“ genannt, wohingegen die geladene zweite (GP-AS 401-423) als „CPI-Helix“ (*engl.*: charged preinsertion helix) bezeichnet wird. Beide enthalten Heptad-Repeats (Abfolgen von AS, die in Siebenersritten AS mit gleichen biochemischen Eigenschaften aufweisen) und spielen bei der Fusion eine Rolle, da sie vermutlich während des Fusionsprozesses als Folge von pH-induzierten, strukturellen Umlagerungen im GP-2-Molekül eine Sechs-Helix-Bündel-Struktur ausbilden können, welche die fusionsaktive GP-2-Konformation stabilisiert (Kap. 1. 7. 6.).
- (iii) Zwischen beiden Alpha-Helices befindet sich ein stark glykosylierter Bereich (vier N-Glykosylierungsstellen an den GP-Asparagin-Resten 365, 373, 390 und 395), der das stark kreuzreaktive B-Zell-Epitop „KFWYL“ (GP-AS 368-372) enthält (Weber und Buchmeier 1988).
- (iv) Die AS-Reste 433-450 (GP-Nummerierung) bilden die hydrophobe Membranverankerung des GP-2, welches ein Typ-I-Membranprotein ist, da das sich anschließende C-terminale Ende innerhalb des Virions lokalisiert ist.
- (v) Der im Virus bzw. im Zytoplasma von infizierten Zellen befindliche C-Terminus (GP-AS 451-492) enthält eine elf AS lange Domäne mit vier Arginin- oder Lysinresten (bei LCMV sind es fünf). Denkbar ist, dass dieser Bereich des GP-2 mit dem NP respektive RNP-Komplex des Virus interagiert und so eine Rolle bei der Virusfreisetzung an der Zellmembran spielt.

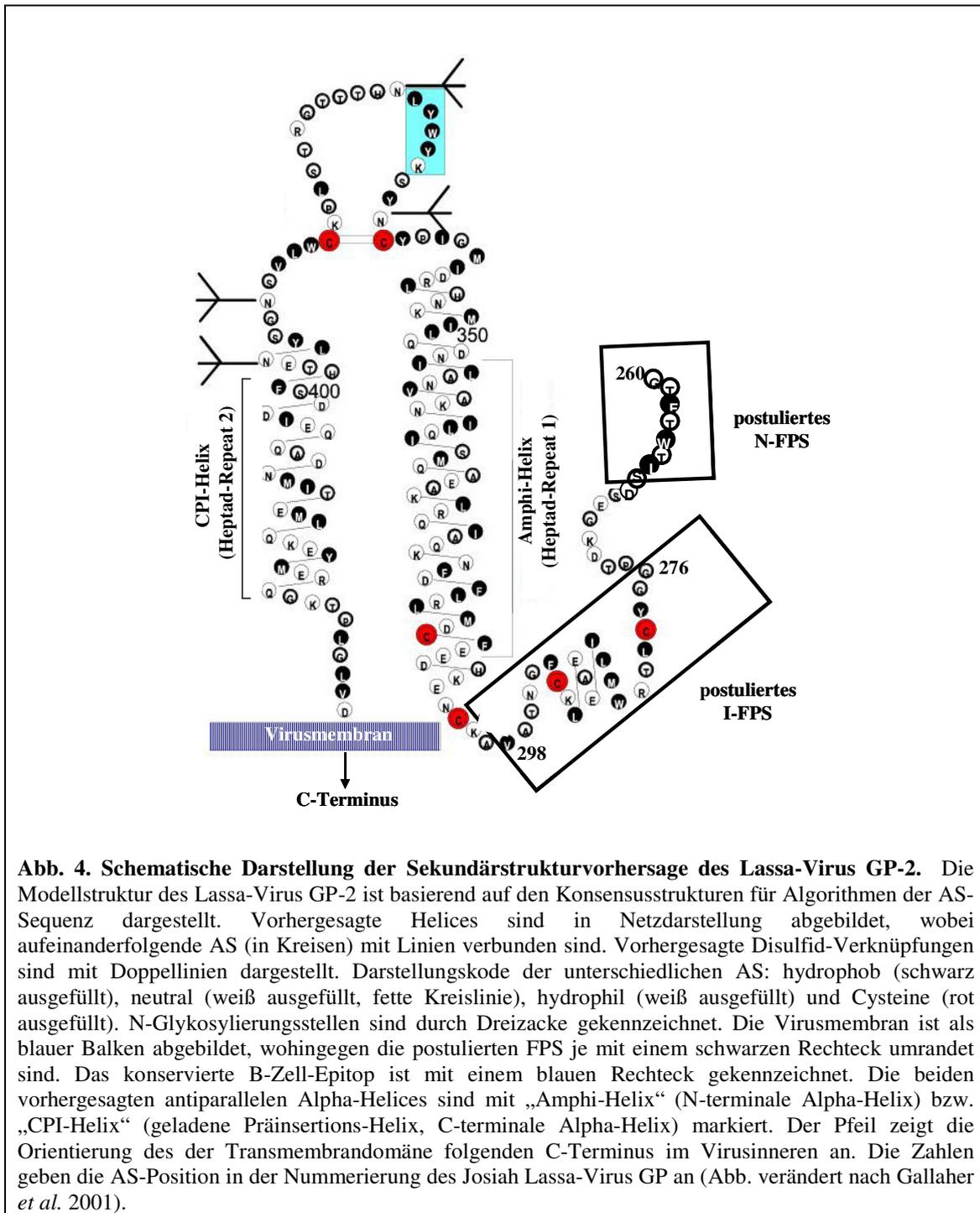


Abb. 4. Schematische Darstellung der Sekundärstrukturvorhersage des Lassa-Virus GP-2. Die Modellstruktur des Lassa-Virus GP-2 ist basierend auf den Konsensusstrukturen für Algorithmen der AS-Sequenz dargestellt. Vorhergesagte Helices sind in Netzdarstellung abgebildet, wobei aufeinanderfolgende AS (in Kreisen) mit Linien verbunden sind. Vorhergesagte Disulfid-Verknüpfungen sind mit Doppellinien dargestellt. Darstellungskode der unterschiedlichen AS: hydrophob (schwarz ausgefüllt), neutral (weiß ausgefüllt, fette Kreislinie), hydrophil (weiß ausgefüllt) und Cysteine (rot ausgefüllt). N-Glykosylierungsstellen sind durch Dreizacke gekennzeichnet. Die Virusmembran ist als blauer Balken abgebildet, wohingegen die postulierten FPS je mit einem schwarzen Rechteck umrandet sind. Das konservierte B-Zell-Epitop ist mit einem blauen Rechteck gekennzeichnet. Die beiden vorhergesagten antiparallelen Alpha-Helices sind mit „Amphi-Helix“ (N-terminale Alpha-Helix) bzw. „CPI-Helix“ (geladene Präinsertions-Helix, C-terminale Alpha-Helix) markiert. Der Pfeil zeigt die Orientierung des der Transmembrandomäne folgenden C-Terminus im Virusinneren an. Die Zahlen geben die AS-Position in der Nummerierung des Josiah Lassa-Virus GP an (Abb. verändert nach Gallaher *et al.* 2001).

1. 7. Viruseintritt

Der Eintritt von umhüllten Viren in Zellen verlangt das Verschmelzen von Virus- und Zielzellmembran. Dabei erfolgt die Fusion entweder direkt an der Plasmamembran der Zelle oder nach Aufnahme in Vesikel und pH-induzierter Konformationsänderung des viralen Fusionsproteins im endosomalen Pathway. Lassa-Viren infizieren Zellen nach rezeptorvermittelter Endozytose und anschließender Fusion an einem noch nicht näher

charakterisierten Ort des endosomalen/lysosomalen Aufnahmeweges (Borrow und Oldstone 1994).

Die Fusion von biologischen Membranen benötigt Energie, die bei der viralen Membranfusion des Typs I – wie sie für das Lassa-Virus vermutet wird (York *et al.* 2005) – aus strukturellen Umlagerungen im Fusionsprotein stammt, das dadurch ein niedrigeres Energieniveau erreicht. Für das Lassa-Virus GP-2 wird die Typ I Membranfusion vermutet (Kap. 1. 7. 6.), wie sie beispielsweise durch das Hämagglutinin (HA) des Influenza-Virus induziert wird. Dabei werden die viralen, membranständigen Oberflächenproteine als einkettige Vorläufer gebildet, welche durch Proteasen gespalten werden und danach als Oligomere der Untereinheiten auf der Virusoberfläche vorliegen. Die Reifespaltung ist ein entscheidender Schritt bei der Herstellung der Fusionskompetenz solcher Virusproteine. Der Prozess der Reifespaltung findet spät während der Biosynthese statt, da diese Proteine, wenn einmal gespalten, einen metastabilen Zustand erreichen und dann leicht aktiviert werden können (Colman und Lawrence 2003). Die Oligomere der viralen Oberflächenproteine bewirken während des Viruseintritts Rezeptorbindung und Fusion, was nachfolgend detailliert dargelegt wird.

1. 7. 1. Rezeptorbindung

Die Interaktion zwischen einem Virus und seinem zellulärem Rezeptor (bzw. seinen Rezeptoren) ist der erste Schritt der Virus-Wirtszellinteraktion und stellt deswegen einen entscheidenden Punkt sowohl für den Gewebetropismus als auch für das Krankheitspotential des Virus dar.

Der zelluläre Rezeptor für die Altwelt-Arenaviren LCM- und Lassa-Virus, sowie für die Neuwelt-Arenaviren der Untergruppe C, ist der α -Dystroglykan-(α -DG)-Komplex, welcher an der Zelloberfläche vorliegt und eine molekulare Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix (EZM) und dem Zytoskelett darstellt (Cao *et al.* 1998; Ervasti und Campbell 1991, 1993). Wegen seines Vorkommens in vielen Geweben, seiner hohen evolutionären Beständigkeit und seiner Fähigkeit mit extrazellulären Proteinen zu interagieren, ist α -DG ein idealer Kandidat, um als Rezeptor für mikrobiologische Pathogene zu fungieren. So nutzen nicht nur oben bezeichnete Arenaviren α -DG als Rezeptor, auch die Infektion von Schwann-Zellen durch *Mycobacterium leprae* wird durch einen Komplex aus α -DG mit Laminin-2 vermittelt (Rambukkana *et al.* 1998).

Dystroglykan (DG) wird als Vorläuferprotein synthetisiert und posttranslational gespalten, was im Entstehen von zwei Untereinheiten resultiert: zum einen die membranverankerte Untereinheit β -DG und zum anderen die periphere Untereinheit α -DG. DG wird in den meisten sich entwickelnden und adulten Geweben exprimiert, typischerweise in Zellen, die an Basalmembranen angrenzen (Durbeej *et al.* 1998). Dort spielt DG eine wichtige Rolle beim Zusammenlagern von Basalmembranen (Henry und Campbell 1998). α -DG wechselwirkt höchst spezifisch und mit hoher Affinität mit den EZM-Proteinen Laminin-1, Laminin-2, Agrin und Perlecan (Ervasti und Campbell 1991; Gee *et al.* 1994; Talts *et al.* 1999). Biochemische und strukturelle Daten deuten darauf hin, dass diese Wechselwirkungen lektinartige Bindungen darstellen, die α -DG-stämmige Zuckerreste involvieren (Ervasti und Campbell 1993; Pall *et al.* 1996; Yamada *et al.* 1996; Hohenester *et al.* 1999). α -DG ist nichtkovalent mit der membranverankerten β -DG Untereinheit verknüpft, welche die Zytoskelettproteine Dystrophin und Utrophin bindet, sowie die Signaltransduktionsmoleküle Grb2 und die Fokale-Adhensions-Kinase (Henry und Campbell 1999).

1. 7. 2. Endosomale Lassa-Virusaufnahme durch Viropexis

Erste Hinweise darauf, dass Arenaviren endozytotisch aufgenommen werden und ein pH-abhängiges Fusionsereignis durchlaufen, lieferten Experimente, die zeigten, dass Infektionen von Zellen sowohl mit dem Altwelt-Arenavirus LCMV, als auch mit dem Neuwelt-Arenavirus Junín-Virus auf Stufe des Eintritts gehemmt werden konnten, und zwar durch Agenzien, die den endosomalen pH-Wert anhoben, z.B. die lysosomotropen, schwachen Basen Chloroquin und Ammoniumchlorid sowie die carboxylischen Ionophoren Monensin und Nigericin (Borrow und Oldstone 1994; Castilla *et al.* 1994).

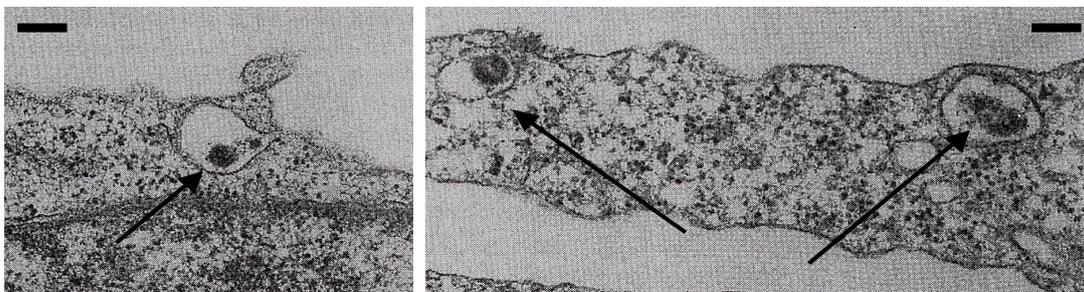


Abb. 5: Internalisierungsprozess von Altwelt-Arenaviren durch Viropexis. LCMV-Viren (Pfeile) werden in großen, glattwandigen, zellulären Kompartimenten aufgenommen, die Phagosomen ähneln. Phagosomen reifen im Weiteren zu Lysosomen, aus denen dann bei geeigneten pH-Bedingungen die Viren ins Zytoplasma gelangen könnten. Balken 200 nm (Elektronenmikroskopische Abb. von LCMV-infizierten Vero-Zellen aus Borrow und Oldstone 1994).

Durch Immunelektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass LCM-Viren bei der Infektion von Affenzellen in Vesikeln endozytiert werden (Borrow und Oldstone 1994). Es konnte dabei beobachtet werden, dass die Virionen in großen (150-300 nm Durchmesser), glattwandigen Vesikeln aufgenommen werden, die nichtclathrin-assoziiert sind. Obwohl viele Viren Zellen durch klassische Endozytose in clathrin-umhüllten Vesikeln infizieren, ist es nicht überraschend, dass Arenaviren dies aufgrund ihrer Größe nicht tun. Arenaviruspartikel sind pleomorph, wobei ein durchschnittliches LCM-*Virion* sphärisch ist mit einem Durchmesser von 90-120 nm und mit Glykoprotein-Spikes, die aus der Hülle etwa 10 nm herausragen (Abb. 3B). Da die Clathrinhülle die Größe von umhüllten Vesikeln auf ca. 100 nm beschränkt, könnte somit die Mehrzahl der LCMV-Partikel zu groß sein, um auf diese Weise in die Zelle aufgenommen zu werden. Die großen, glattwandigen Vesikeln mittels derer LCM-Viren endozytiert werden, ähneln phagozytotischen Vesikeln (Phagosomen). Klassische Phagozytose (wie sie z.B. durch Makrophagen vermittelt wird) ist ein mikrofilamentabhängiger Prozess, der durch Zytochalasine gehemmt wird. Zytochalasine binden an Aktin, verhindern somit die korrekte Polymerisierung in Mikrofilamente und erzeugen dadurch die Disassemblierung der Mikrofilamente. Behandlung von Nager-Fibroblasten mit den Zytochalasinen B und D konnte den LCMV-Eintrittsprozess nicht hemmen, was darauf hindeutet, dass die LCMV-Internalisierung ein nichtmikrofilamentabhängiger Prozess ist, der sich von der klassischen Phagozytose unterscheidet (Borrow und Oldstone 1994). Es ist nicht bekannt, wie dieser zytochalasinresistente Aufnahmeprozess vermittelt wird und ob dieser durch die Virus-Rezeptorbindung ausgelöst wird. Der Befund, dass Lassa- und LCM-Viren α -DG als zellulären Rezeptor nutzen, ist in dieser Hinsicht von großer Bedeutung. Wie oben bereits beschrieben ist α -DG ein Transmembranprotein mit einer zytoplasmatischen Domäne, an die eine Vielzahl zellulärer Proteine bindet, inklusive des Signaltransduktionsmoleküls Grb2 sowie die Zytoskelettproteine Dystrophin und Utrophin. Daher ist es möglich, dass die Lassa- bzw. LCM-Virusbindung an α -DG den Internalisierungsprozess auslösen könnte. Dies geschieht entweder durch direktes Auslösen einer Signalkaskade durch α -DG oder durch Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen α -DG mit seinen zellulären Liganden, wodurch indirekt der DG-Signalweg verändert würde. Letzteres konnte durch Daten gestützt werden, die

besagen, dass LCMV α -DG auf andere Art bindet (d. h. mit anderen Proteinbindungsdomänen) als die zellulären EZM-Liganden (Kunz *et al.* 2001).

Nach Internalisierung der Virionen in Vesikel werden diese beim Transport entlang des endozytotischen Pathways angesäuert. Der intravesikuläre pH-Wert fällt von 6.2 in frühen Endosomen auf ungefähr 4.5, wenn die terminalen Kompartimente des Pathways (Lysosomen) erreicht sind. Fusion der Membran von umhüllten Viren mit der Vesikelmembran wird durch den erniedrigten pH-Wert erreicht; Zeit und Ort dafür wird bei verschiedenen Viren durch die pH-Abhängigkeit der Fusionsaktivität bestimmt. Daher fusionieren Viren wie Semliki-Forest-Virus, bei dem die Fusion bei fast neutralem pH ausgelöst wird (pH 6.2) in frühen Endosomen, wohingegen Viren, die bei niedrigerem pH fusionieren (z.B. Influenza-Virus, pH 5.3) dies in späten Endosomen tun (Earp *et al.* 2004).

Der pH-Wert, bei welchem LCMV-Viren Fusion mit Liposomen auslösten, wurde mittels eines Fluoreszenz-Dequenching-Assays bestimmt (Di Simone *et al.* 1994; Di Simone und Buchmeier 1995). Fusion wurde dabei bei $\text{pH} \leq 5.5$ beobachtet. Für Junín-Virus konnte Fusion von infizierten Zellen nach Inkubation mit Medium, das pH-Werte ≤ 5.5 aufwies, gezeigt werden (Castilla *et al.* 1994).

In Analogie zu den pH-vermittelten Fusionsereignissen anderer Viren, wie z.B. dem Influenza-Virus, ist es wahrscheinlich, dass ein saurer pH-Wert Konformationsänderungen im Arenavirus GP auslöst, die zur Freilegung des FPS führen. Diese Hypothese stützend wurde gezeigt, dass das LCMV GP irreversible Konformationsänderungen nach Exposition mit saurem pH aufweist, bei denen GP-1 vom Virion abdissoziiert, konformationelle Epitope auf GP-1 verloren gehen und verdeckte Epitope auf GP-2 freigelegt werden (Di Simone *et al.* 1994). Ein FPS für Arenaviren wurde noch nicht definitiv identifiziert, obwohl Vorhersagen mutmaßlich involvierter Sequenzen gemacht wurden (Glushakova *et al.* 1990; Gallaher *et al.* 2001).

1. 7. 3. Fusion von viraler und zellulärer Membran

Da die Oberflächenproteine von umhüllten tier- und humanpathogenen Viren in Abwesenheit der anderen viralen Proteine Membranfusion induzieren können, dienen rekombinant exprimierte Oberflächenproteine in Zell-Zellfusionsassays als Modellsystem für die Untersuchung dieses frühen Schrittes der Virus-Wirt-Interaktion (Stegmann *et al.* 1989). In der vorliegenden Arbeit wird ein solches rekombinantes

Assay-System erstmals für das Lassa-Virus etabliert, bei dem zwei Zellpopulationen bei geeigneten Bedingungen fusionieren, was durch spezifische Reporter-genaktivierung quantifiziert wird. In einer Population wird rekombinantes Lassa-Virus GP und ein transaktivierbares Reporter-genkonstrukt exprimiert, während in der zweiten der Virusrezeptor und ein Transaktivator-genkonstrukt exprimiert werden. Kurzzeitige Behandlung einer Kokultur beider Zellpopulationen mit sauren pH-Werten führt zur Zell-Zellfusion, gemessen als Transaktivierung des Reporter-gens (Nussbaum *et al.* 1994). Nachfolgend sind grundlegende Organisationsprinzipien viraler Fusionsproteine und die zugrundeliegenden molekularen Membranfusionsmodelle genauer erklärt.

1. 7. 4. Virale Fusionsproteine

Virale Fusionsproteine sind integrale Membranproteine der Virushülle, die aktiviert werden müssen, um Virus- und Zielzellmembran fusionieren zu können. Auf der Virushülle liegen sie in einer metastabilen Form vor, bei der das FPS – eine Abfolge von hydrophoben AS (Kap. 1. 7. 5.) – im Inneren des Protein-Oligomers verborgen vorliegt. Die Aktivierung der Fusionsproteine erfolgt durch Erniedrigung des pH-Wertes im Verlauf der Virusaufnahme (z.B. bei Aufnahme im endosomalen Pathway) oder durch rezeptorbindungsvermittelte Konformationsänderungen des Fusionsproteins (Earp *et al.* 2004). Die direkte Interaktion des viralen Fusionsproteins mit der Zielzellmembran erfolgt über die Penetration des FPS in die Zellmembran gefolgt von konformationellen Änderungen des Fusionsproteins (Ausbildung einer „Coiled-Coil-Struktur“), was letztlich zur Fusion beider Membranen führt (Kap. 1. 7. 6.).

Durch Mutationsanalysen klonierter Einzelgene einer Vielzahl viraler Fusionsproteine konnten unter anderem die FPS von Influenza-Virus HA2, HIV gp41, Simian-Virus-5 F-Protein oder Semliki-Forest-Virus E1-Protein charakterisiert werden. Zwei prinzipielle Organisationsstrukturen von FPS lassen sich unterscheiden: N-terminal lokalisierte FPS (N-FPS), z.B. bei Influenza-Virus, HIV oder Simian-Virus-5 (Gething *et al.* 1986; Freed *et al.* 1990; Horvath und Lamb 1992) und interne FPS (I-FPS), wie beispielsweise beim Simliki-Forest-Virus (Levy-Mintz und Kielian 1991). Auch für das Ebola-Virus, ein Hämorrhagisches-Fieber-Virus aus der Familie *Filoviridae*, konnte ein I-FPS charakterisiert werden (Ito *et al.* 1999).

FPS sind Glykoproteindomänen, die im Allgemeinen aus Abfolgen von hydrophoben AS bestehen, wie z.B. der durch proteolytische Spaltung erzeugte N-Terminus des

Influenza-Virus HA2. Im Gegensatz dazu trägt das Fusionsprotein G des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) eine interne hydrophobe Domäne (d.h. eine nicht durch proteolytische Prozessierung des Proteins erzeugte), also ein I-FPS (Zhang and Ghosh 1994). Grundsätzlich sind FPS entfernt von Glykosylierungsstellen zu finden. So führte beispielsweise die Einführung einer zusätzlichen AS ins VSV-G FPS und einer dadurch erzeugten zusätzliche N-Glykosylierungsstelle zu einer Verhinderung der pH-abhängigen Fusion (Whitt *et al.* 1990).

Die FPS vieler viraler Glykoproteine wurden durch Mutationsanalysen charakterisiert und deren Einfluss auf die Zell-Zellfusion bestimmt. Für andere Viren jedoch kann unabhängig vom applizierten pH-Wert keine Synzytien-Bildung induziert werden, was es schwieriger macht, die Fusionseigenschaften der Fusionsproteine solcher Viren zu charakterisieren. So konnte z.B. lange Zeit keine Fusion des Ebola-Virus Fusionsproteins GP nachgewiesen werden. Neue Studien von Bär *et al.* zeigten, warum dies zunächst nicht möglich war: Um Zell-Zellfusion zu induzieren, musste Ebola-Virus GP durch Säurebehandlung (pH-Shift) aktiviert werden. Zwar wurde GP durch den sauren pH-Wert fusionsaktiv, der (bisher unidentifizierte) Ebola-Virusrezeptor hingegen wurde durch die Säure so geschädigt, dass keine Fusion im rekombinanten Zell-Zellfusionsassay erfolgen konnte. In diesem modifizierten Zell-Zellfusionsassay wurde ein pH-Wert ≤ 5.0 benötigt, um GP fusionsaktiv zu machen, wobei die receptorexprimierenden Zellen nicht mit dem sauren Medium behandelt wurden (Bär *et al.* 2006). Zur Charakterisierung der GP-Fusionsdomäne wurden daher in Ermangelung eines einfachen Zellfusionsassays Wildtyp-GP sowie verschiedene GP-Mutanten im vermuteten FPS mittels VSV-Pseudotypen exprimiert und die Infektiosität dieser Partikel in humanen Zellen untersucht und verglichen. Virale Pseudotypen sind rekombinante, chimäre Viruspartikel, die die Morphologie eines bestimmten Virus aufweisen (hier: VSV), deren Oberfläche aber das Hüllprotein eines anderen Virus trägt (hier: Ebola-Virus GP). Da einige der untersuchten Ebola-Virus GP-Mutanten zwar keine veränderte Oberflächenexpressionsstärke im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, wohl aber eine veränderte Infektiosität von mit diesen Mutanten pseudotypisierten VSV-Partikeln, wurde ein I-FPS im Ebola-Virus GP postuliert (Takada *et al.* 1997; Ito *et al.* 1999).

1. 7. 5. Fusionspeptidsegmente (FPS)

Obwohl es keine exakte Definition eines FPS gibt, existiert für viele Viren Einigkeit darüber, welche Region des Fusionsproteins dem FPS entspricht. Es gibt einige Kriterien, die FPS charakterisieren. Keines dieser Kriterien ist absolut, kombiniert allerdings sind sie hinreichend für die Identifizierung einer Protein-Domäne als FPS. Das FPS ist oft hydrophob, glyzinreich und am N-Terminus des Fusionsproteins lokalisiert. Ein weiteres Kriterium ist, dass Mutationen im FPS von Fusionsproteinen zum Aktivitätsverlust führen, und zwar wegen der essentiellen Natur der FPS für die Membranfusion (Epanand 2003). Auch Mutationen außerhalb der FPS, z.B. in den Heptad-Repeats der Alpha-Helices, die für die Fusionsproteinfaltung nach der FPS-Membranpenetration essentiell sind (Kap. 1. 7. 6.) oder in den Transmembrandomänen, können zum Verlust der Fusionseigenschaften des Fusionsproteins führen (York *et al.* 2005; Harman *et al.* 2002). Ein synthetisches FPS-Peptid besitzt membranperturbierende Eigenschaften, und es induziert vollständige Fusion mit nachfolgender Konfluenz wasserlöslicher Inhalte der fusionierten Partikel. Im Allgemeinen erzeugen synthetische FPS-Peptide durch ihre membrandestabilisierenden Eigenschaften eine Vermischung der Phospholipiddoppelschichten von Liposomen. Die beiden postulierten FPS des Lassa-Virus sind in Kap. 1. 6. 7. (GP-2) beschrieben (Glushakova *et al.* 1990, Gallaher *et al.* 2001).

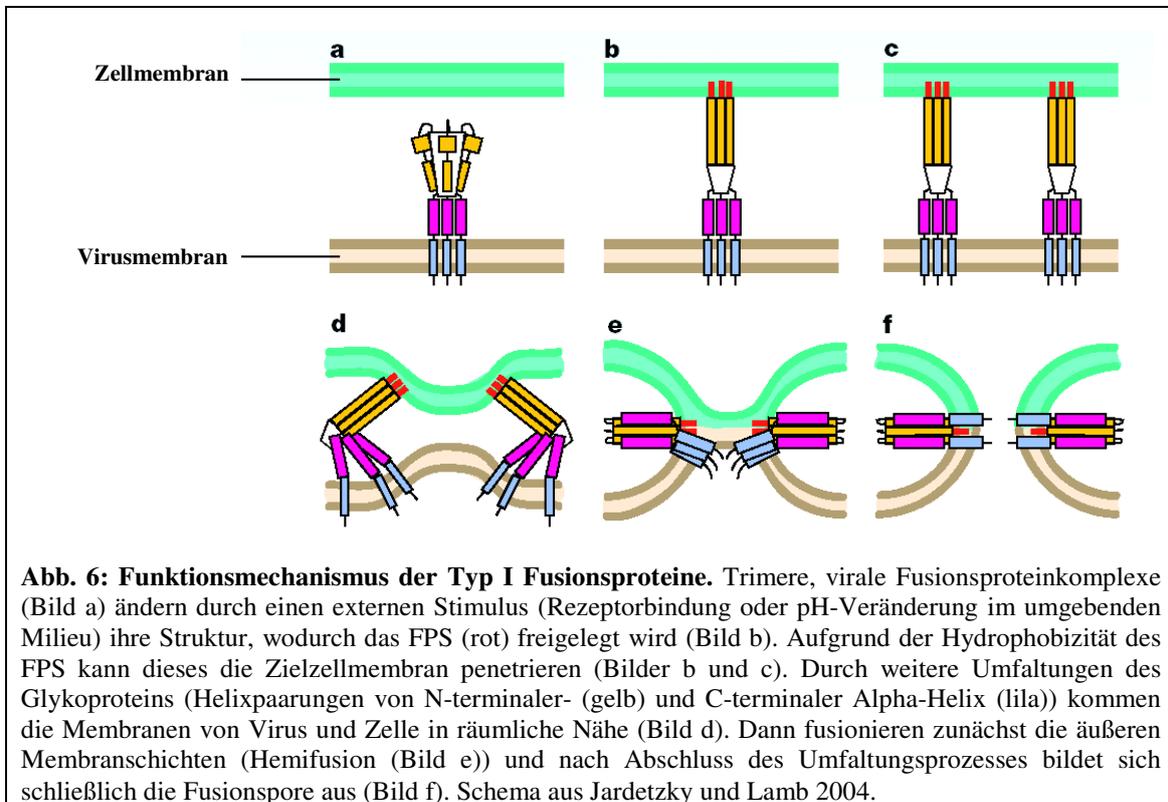
1. 7. 6. Fusionsmechanismen von Virus- und Zellmembran

Man unterscheidet prinzipiell zwei verschiedene Arten der Fusion von Virus- und Zielzellmembran. Man unterteilt dazu die in diesen Prozess involvierten Proteine in Typ I oder Typ II Fusionsproteine, je nachdem, wie der Fusionsprozess mechanistisch vonstatten geht. Das postulierte Lassa-Virus Fusionsprotein GP-2 ist ähnlich den Typ I Fusionsproteinen organisiert (Eschli *et al.* 2006).

Typ I Membranfusion

Die Typ I Fusionsproteine (Abb. 6) liegen als trimere Komplexe auf der Virusoberfläche vor, und zu ihren Vertretern zählen unter anderem die HA2-Untereinheit des Influenza-Virus HA und die F₁-Untereinheiten der paramyxoviralen F-Proteine (z.B. Sendai- oder Masern-Virus). Als Folge eines bestimmten Stimulus (siehe unten) wird das zunächst im Proteininneren lokalisierte FPS freigelegt und kann

in die Zielzellmembran inserieren. Dies bewirkt weitere strukturelle Umlagerungen im Fusionsprotein, die dazu führen, dass die oben bezeichneten innermolekularen Alpha-Helices sich antiparallel zu Sechs-Helix-Bündeln zusammenlagern. Somit wird eine Haarnadelstruktur erzeugt, die Membranen von Virus und Zelle nähern sich räumlich an und fusionieren. Zu den oben allgemein als „Stimulus“ bezeichneten Auslösern der FPS-Freilegung zählen z.B. die Rezeptorbindung (z.B. bei paramyxoviralen F-Proteinen) oder eine pH-abhängige Konformationsänderung des Fusionsproteins (z.B. bei Influenza-Virus HA2), die dadurch entsteht, dass das Virus in sauren Vesikeln entlang des endosomalen Weges aufgenommen wird (Kap. 1. 7. 2.). Prinzipiell hängt der Stimulus also vom Ort des Viruseintritts (Plasmamembran oder endosomaler Pathway) ab (Jardetzky und Lamb 2004).



Typ II Membranfusion

Typ II Fusionsproteine sind die E- bzw. E1-Proteine der Flaviviren, wobei das TBE-Virus (*engl.*: tick-borne encephalitis virus) und das Dengue-Fieber-Virus diejenigen Viren dieser Familie darstellen, von denen das Typ II Fusionsmodell abgeleitet wurde. Neben TBE- und Dengue-Fieber-Virus zählen auch das Gelbfieber-Virus und das West-Nile-Virus zu den Flaviviren. Das Semliki-Forest-Virus aus der Familie der Togaviren (die, wie die Flaviviren, zu den Plusstrangviren zählen) verfügt ebenfalls über ein Typ II

Fusionsprotein. Die Typ II Fusionsproteine besitzen, wie die Typ I Fusionsproteine, drei fusionsrelevante Domänen (I, II und III), jedoch mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften. Im Typ II Membranfusionsmodell spielen molekulare Umorientierungen eine wichtige Rolle beim Fusionsprozess, auch dies ist eine Homologie zu den Typ I Fusionsproteinen. Im Unterschied zu den Typ I Fusionsproteinen jedoch werden Typ II Fusionsproteine nicht durch Reifespaltung erzeugt, und sie enthalten keine Alpha-Helices sondern hauptsächlich Beta-Faltblattstrukturen. Das FPS der Typ II Fusionsproteine liegt nicht N-terminal sondern im Inneren des Proteins, in der Domäne II. Genau wie die FPS der Typ I Fusionsproteine ist das Typ II FPS im unaktivierten, d.h. fusionsinaktiven Zustand räumlich im Molekülinneren verborgen (wegen der hydrophoben Eigenschaften von FPS eine energetische Notwendigkeit). Auch im Typ II Fusionsmodell penetriert das virale FPS die Zielzellmembran, und auch hier spielen Molekülumlagerungen innerhalb der Fusionsproteine die entscheidende Rolle zur Freilegung des FPS. Dies geschieht durch den sauren pH-Wert der Endosomen. Im Unterschied zu den Typ I Fusionsproteinen allerdings in frühen Endosomen, sodass der zur Fusion benötigte pH-Wert höher ist, als beispielsweise für das Influenza-Virus HA2 (vgl. Influenza-Virus HA2 $\text{pH}^{\text{FusionTypI}}=5.3$ vs. Semliki-Forest-Virus E $\text{pH}^{\text{FusionTypII}}=6.3$). In Abb. 7 ist der Fusionsmechanismus des Typs II schematisch dargestellt (Jardetzky und Lamb 2004).

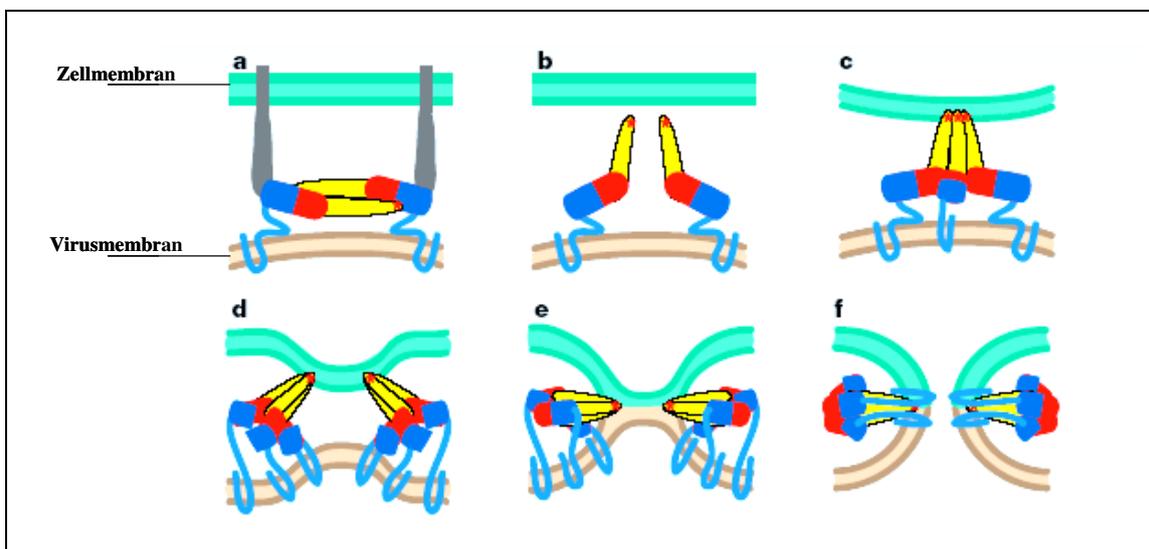


Abb. 7: Funktionsmechanismus der Typ II Fusionsproteine. Typ II Fusionsproteine enthalten drei Domänen (I: rot, II: gelb und III: blau) und vor der Fusion liegen Homodimere auf der Virusmembran vor (Bild a). Als Folge von Konformationsänderungen durch den sauren, endosomalen pH-Wert wird das FPS (orange) bei der Dimer-Dissoziation freigelegt (Bild b), und nach einer Trimer-Reassoziierung penetrieren die FPS die äußere Membranhülle der Zielzelle (Bild c). Durch weitere strukturelle Umlagerungen der einzelnen Fusionsproteindomänen (Bild d) werden Virus- und Zellmembran schließlich angenähert (Bild e) und können fusionieren (Bild f). Abb. aus Jardetzky und Lamb 2004.

1. 7. 7. Fusionsinhibitoren

Für HIV-Infizierte konnte ein Medikament entwickelt werden, das die Fusion des Virus mit der Zielzelle unterbindet (Kilby *et al.* 1998). Dabei handelt es sich um das Oligopeptid T-20 (auch Enfuvirtide, DP-178, Pentafusid oder Fuzeon®). T-20 ist ein Analogon der C-terminalen Alpha-Helix des HIV-1 Fusionsproteins gp41, das den Fusionsprozess dadurch inhibiert, dass es sich bei der Virus-Zellfusion antiparallel mit der N-terminalen gp41-Alpha-Helix paart. Dadurch wird die Ausbildung der Sechshelix-Bündel-Struktur verhindert und die somit fehlende Molekülrückfaltung zur Membranannäherung unterbleibt (gp41 ist ein Typ I Fusionsprotein, siehe Kap. 1. 7. 6.). Ebenso verhindert ein Oligopeptid, dessen AS-Sequenz der N-terminalen gp41-Alpha-Helix entspricht die HIV-Zellfusion, allerdings in geringerem Ausmaß als T-20 (Eckert und Kim 2001). Auch Nichtpeptidmoleküle zur Verhinderung der Ausbildung der Sechshelix-Bündel-Struktur sind potente HIV-Fusionsinhibitoren (Jiang *et al.* 2002), allerdings sind auch diese weniger wirksam als T-20 (Earl *et al.* 2004).

Auch für Alpha- und Flaviviren wurden Fusionsinhibitoren entwickelt. Es handelt sich dabei um Oligopeptide mit AS-Sequenzen der Domäne III der Typ II Fusionsproteine (siehe oben). Die Inhibition der Fusion erfolgt auch hier durch kompetitive Hemmung wichtiger Fusionsproteindomänen (Liao und Kielian 2005).

1. 8. Fragestellung

Es wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit die beiden postulierten Lassa-Virus FPS für die Fusion von Virus und Zielzelle von Bedeutung sind. Dazu wurden Testsysteme entwickelt, um den Eintrittsmechanismus von Lassa-Viren molekular zu charakterisieren. Es wurden Einzel-AS-Austauschmutanten des Lassa-Virus Fusionsproteins GP-2 mit Mutationen in beiden FPS-Domänen hergestellt, die sowohl biochemisch als auch funktionell untersucht wurden.

Die biochemische Charakterisierung umfasste Untersuchungen zu Reifung und intrazellulärem Transport der FPS-Mutanten, wohingegen die funktionelle Analyse auf die Fusogenität und Infektiosität abzielte. Da erst seit kurzer Zeit eine Technologie zur Herstellung rekombinanter Arenaviren zur Verfügung steht und gentechnische Manipulation des Lassa-Virus in die höchste Sicherheitsstufe (BSL-4) fällt, wurden rekombinante, nichtinfektiöse Assay-Systeme entwickelt. Die Assay-Systeme, die das Untersuchen obiger Fragestellungen außerhalb des BSL-4 Labors ermöglichten,

basierten auf gentechnischen Verfahren. Somit war es möglich, ohne Lassa-Viren zu arbeiten, um diese Untersuchungen durchzuführen. Im ersten Testsystem – einem Zell-Zellfusionsassay – wurde die Fähigkeit zur Induktion der Fusion von Zellmembranen als Maß für die Fusogenität bestimmt. Demgegenüber wurde im zweiten Testsystem – den Infektionsstudien mit replikationsinkompetenten, retroviralen Pseudotypen (rPT) – getestet, wie die Infektiosität oben bezeichneter Mutanten mit deren Fusogenität korrelierte.

Außerdem wurden potentiell antivirale Substanzen in den entwickelten Testsystemen untersucht. Dazu wurden synthetische Peptide (Analoge der FPS und der C-terminalen Alpha-Helix des Lassa-Virus GP-2) sowie Seren von Lassafieberpatienten auf deren Effekte auf Fusion und rPT-Infektion getestet.

2. Material und Methoden

2. 1. Material

Die in der vorliegenden Arbeit gebrauchten Materialien werden im Folgenden unter Angabe der Bezugsquelle aufgezählt. Die Rezepturen der kommerziell verfügbaren Reaktionsansätze (Kits) sind den jeweiligen Produktinformationen zu entnehmen.

2. 1. 1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	BioRad, München, D
Agarose (ultra pure)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin, Natriumsalz	Serva, Heidelberg, D
APS (Ammoniumpersulfat)	BioRad, München, D
Bactoagar	Difco Laboratories, Heidelberg, D
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Heidelberg, D
β -gal-Reportergen Lysepuffer (5x)	Roche, Mannheim, D
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth, Karlsruhe, D
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Cholesterin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
CPRG (Chlorophenol Rot β -D-galactopyranosid)	Roche, Mannheim, D
Deconex	Borer Chemie, Zuchwil, CH
Dimethylformamid	Riedel-de-Haen, Seelze, D
DMSO (Dimethylsulfoxyd)	Merck, Darmstadt, D
DNA-Ladepuffer (6x MassRuler [®] Loading Dye Solution)	Fermentas, St. Leon-Roth, D
DNA-Längenstandard GeneRuler [®] DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Roth, D
EDTA (Ethylen-Dinitriol-Tetra-Acetat)	Merck, Darmstadt, D
EGTA (Ethylen-Glycol-bis(β -Amino- ethylether)-N,N,N',N'-Tetra-Acetat)	Merck, Darmstadt, D

Ethanol	Riedel-de-Haen, Seelze, D
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim, D
Fötiales Kälberserum (FCS)	Gibco-BRL, Karlsruhe, D
Glyzerin	Roth, Karlsruhe, D
Glyzin	Merck, Darmstadt, D
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	Riedel-de-Haen, Seelze, D
Jodazetamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
L-Glutamin	Gibco-BRL, Karlsruhe, D
Lipofectamine [®] 2000	Invitrogen, Karlsruhe, D
LMP-Agarose, ultra pure	Gibco-BRL, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried, D
Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg, D
Mevalonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Nitrozellulose	Schleicher & Schuell, Dassel, D
N-hydroxysuccimid (NHS)-Biotin	Calbiochem, San Diego, USA
Oleat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Opti-MEM	Gibco-BRL, Karlsruhe, D
Parafilm M [®]	Brand, Wertheim, D
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg, D
Pepton	Merck, Darmstadt, D
Petrischalen (10 cm Ø)	Sarstedt, Nümbrecht, D
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Proteinstandard, Broad Range, Prestained	NEB, Schwalbach, D
Rainbow Marker [®] (RPN 756)	Amersham Pharmacia, Freiburg, D
Röntgenfilme BIOMAX [®] MR	Kodak, Stuttgart, D
Saccharose	Serva, Heidelberg, D
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt, D
Streptavidin-Peroxidase-Komplex	Amersham Pharmacia, Freiburg, D
Streptavidin-Sepharose	Amersham Pharmacia, Freiburg, D
Sulfo-N-hydroxysuccinimide-Biotin-ethylendiamin	Pierce, Rockford, USA

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin)	BioRad, München, D
Trasylol (Aprotonin)	Bayer, Leverkusen, D
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Serva, Heidelberg, D
Tween 20	Serva, Heidelberg, D
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Zellschaber	Sarstedt Inc., Newton, USA
Zentrifugenröhrchen (SW 28, SW 41)	Beckmann, Frankfurt a. M., D
Zellkulturflaschen Greiner	Greiner BioOne, Frickenhausen, D
Zellkulturflaschen Costar®	Corning Inc., New York, USA
Zellkulturplatten mit 6, 12 oder 24 Vertiefungen	Greiner BioOne, Frickenhausen, D
Zellkulturplatten mit 3, 6 oder 10 cm Ø	Greiner BioOne, Frickenhausen, D

Die in dieser Liste nicht angegebenen Standardchemikalien, wie beispielsweise Natriumchlorid, Natriumzitat, Natronlauge (NaOH) oder Salzsäure (HCl), wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, D), Roche (Mannheim, D) oder Riedel-de-Haen (Seelze, D) bezogen.

2. 1. 2. Kits

ABI Prism® Sequencing Kit	Perkin Elmer, Wellesley, USA
ECL-Super-Signal Kit	Pierce, Rockford, USA
ECL-Super-Signal-Ultra Kit	Pierce, Rockford, USA
QIAGEN High-Speed-Plasmid-Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAprep 8-Plasmid Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
Taq-PCR-Core Kit	Qiagen, Hilden, D
Z-Competent <i>E. coli</i> Transformation Buffer Set	Zymo Research, Orange, USA

2. 1. 3. Oligonukleotide

Alle nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, D) bezogen.

Oligonukleotide zur Sequenzierung

Zum Sequenzieren und Prüfen der erwünschten Mutationseinführungen in die postulierte FPS des Lassa-Virus GP wurden folgende Primer verwendet: Vorwärts-Primer 5'-CAT TGG AAG CTT GCC ACC ATG GGC-3', Revers/komplementärer-Primer 5'-ATC TCG TCT AGA TTA TCA TCT CTT-3'. Die Mutationen wurden im codon-optimierten Lassa-Virus GP (Kap. 2. 1. 4.) mittels rekombinanter PCR (Kap. 2. 2. 2.) erzeugt. Die Sequenzierungen wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt.

Oligonukleotide zur Mutationserzeugung

In der nachfolgenden Tabelle sind die jeweiligen Primer-Paare zum Einführen von Einzel-AS-Austauschmutationen an bestimmten Positionen der postulierten FPS des Lassa-Virus GP-2 ins codon-optimierte Lassa-Virus GP aufgelistet. Erzeugt wurden diese jeweils in einer rekombinanten PCR.

Tab. 1A: Primer zur Herstellung von Einzel-AS-Austauschmutationen innerhalb der postulierten Lassa-Virus GP-2-FPS.

Mutante	Forward Primer	Reverse Primer
G260A	5'-AGA CTG CTG GCC ACC TTC ACC TGG-3'	5'-CCA GGT GAA GGT GGC CAG CAG TCT-3'
T261A	5'-CTG CTG GGC GCC TTC ACC TGG ACA-3'	5'-TGT CCA GGT GAA GGC GCC CAG CAG-3'
F262A	5'-CTG GGC ACC GCC ACC TGG ACA CTG-3'	5'-CAG TGT CCA GGT GGC GGT GCC CAG-3'
W264A	5'-ACC TTC ACC GCC ACA CTG AGC GAT-3'	5'-ATC GCT CAG TGT GGC GGT GAA GGT-3'
L266A	5'-ACC TGG ACA GCC AGC GAT AGC GAG-3'	5'-CTC GCT ATC GCT GGC TGT CCA GGT-3'
G271A	5'-GAT AGC GAG GCC AAG GAC ACC CCT-3'	5'-AGG GGT GTC CTT GGC CTC GCT ATC-3'
G276A	5'-GAC ACC CCT GCC GGC TAC TGC CTG-3'	5'-CAG GCA GTA GCC GGC AGG GGT GTC-3'
G277A	5'- ACC CCT GGC GCC TAC TGC CTG ACC-3'	5'-GGT CAG GCA GTA GGC GCC AGG GGT-3'
Y278A	5'-CCT GGC GGC GCC TGC CTG ACC AGA-3'	5'-TCT GGT CAG GCA GGC GCC GCC AGG-3'

L280A	5'-GGC TAC TGC GCC ACC AGA TGG ATG-3'	5'-CAT CCA TCT GGT GCC GCA GTA GCC-3'
W283A	5'-CTG ACC AGA GCC ATG CTG ATC GAG-3'	5'-CTC GAT CAG CAT GCC TCT GGT CAG-3'
M284A	5'-ACC AGA TGG GCC CTG ATC GAG GCC-3'	5'-GGC CTC GAT CAG GCC CCA TCT GGT-3'
L285A	5'-AGA TGG ATG GCC ATC GAG GCC GAG-3'	5'-CTC GGC CTC GAT GGC CAT CCA TCT-3'
I286A	5'-TGG ATG CTG GCC GAG GCC GAG CTG-3'	5'-CAG CTC GGC CTC GCC CAG CAT CCA-3'
L290A	5'-GAG GCC GAG GCC AAG TGC TTC GGC-3'	5'-GCC GAA GCA CTT GCC CTC GGC CTC-3'
C292A	5'-GAG CTG AAG GCC TTC GGC AAC ACC-3'	5'-GGT GTT GCC GAA GCC CTT CAG CTC-3'
F293A	5'-CTG AAG TGC GCC GGC AAC ACC GCC-3'	5'-GGC GGT GTT GCC GCC GCA CTT CAG-3'
G294A	5'-AAG TGC TTC GCC AAC ACC GCC GTG-3'	5'-CAC GGC GGT GTT GCC GAA GCA CTT-3'
V298A	5'-AAC ACC GCC GCC GCC AAG TGC AAC-3'	5'-GTT GCA CTT GGC GCC GGC GGT GTT-3'
G260L	5'-AGA CTG CTG CTG ACC TTC ACC TGG-3'	5'-CCA GGT GAA GGT CAG CAG CAG TCT-3'
G260R	5'-AGA CTG CTG AGA ACC TTC ACC TGG-3'	5'-CCA GGT GAA GGT TCT CAG CAG TCT-3'
P275R	5'-AAG GAC ACC AGA GGC GGC TAC TGC-3'	5'-GCA GTA GCC GCC TCT GGT GTC CTT-3'

Die rekombinanten PCR-Primer-Paare für neunzehn Alanin- sowie drei weitere Einzel-AS-Austauschmutanten sind zusammengefasst dargestellt. Die Basentriplets, die für die eingeführten Mutationen kodieren, sind jeweils fett hervorgehoben. Alle Mutanten sind wie folgt benannt: original Lassa-Virus GP-AS im Einbuchstabenkode, Position der jeweiligen AS in der Nummerierung des Josiah Lassa-Virus GP (GeneBank-Nr. AAA46286) und eingeführte neue AS im Einbuchstabenkode.

Tab. 1B zeigt die Flankierungsprimer, die für die Einzelfragment-Hybridisierungs- und Auffüllreaktionen der rekombinanten PCR verwendet wurden, um Volllänge-GP-Konstrukte zu erzeugen.

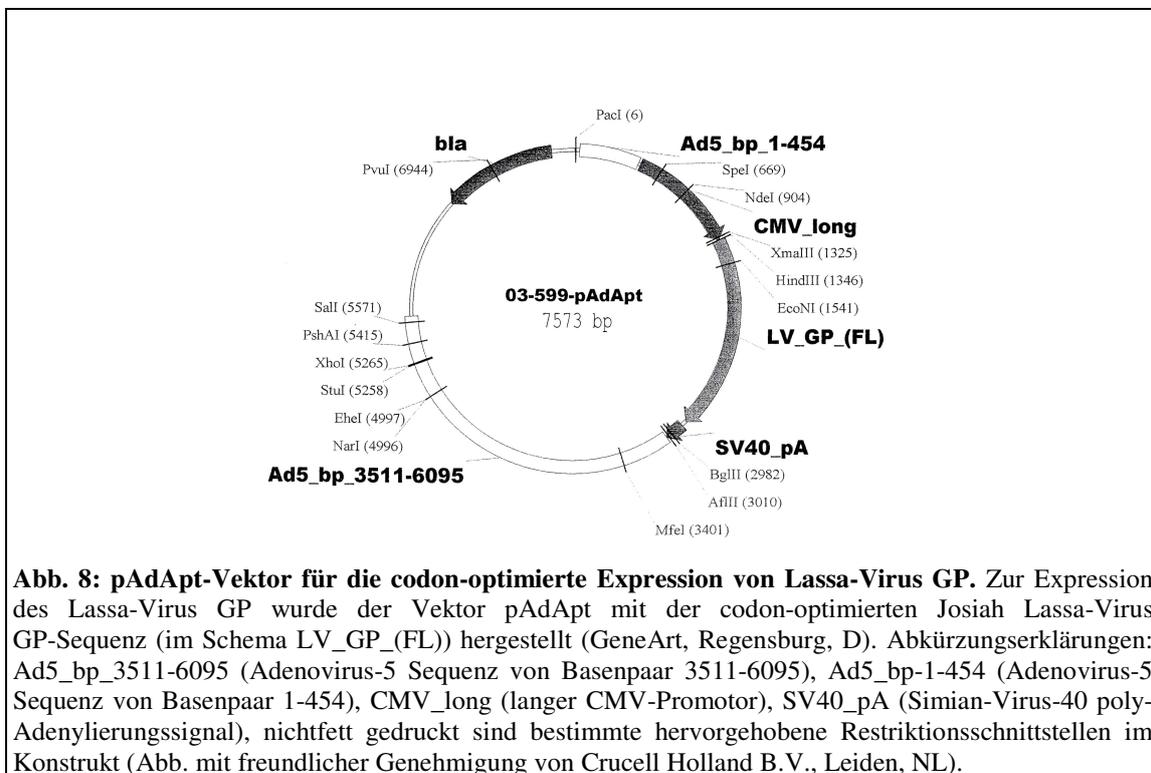
Tab. 1B: Flankierungsprimer.

Primer-Bezeichnung	Nukleotidsequenz
HindIII-vor-Start-Codon (vorwärts)	5'-CAT TGG AAG <i>CTT</i> GCC ACC ATG GGC-3'
XbaI-nach-Stopp-Codon (revers-komplementär)	5'-ATC TCG <i>TCT</i> AGA TTA TCA TCT CTT-3'

Zum Klonieren in pAdApt mittels rekombinanter PCR wurden jeweils zwei Fragmente jeder Mutante hergestellt, die im Bereich der Mutationsstelle komplementär sind und somit hybridisieren können (Forward und Reverse Primer, Tab. 1A). An den jeweiligen nichtkomplementären Enden wurden Restriktionsschnittstellen mit Primern vor dem ATG Start-Codon (HindIII-vor-Start) bzw. nach dem TGA Stopp-Codon (XbaI-nach-Stopp) mit einer HindIII-Schnittstelle (Erkennungspalindrom AAGCTT) vor dem Start-Codon und einer XbaI-Schnittstelle (Erkennungspalindrom TCTAGA) nach dem Stopp-Codon erzeugt.

2. 1. 4. Codon-Optimierung des Lassa-Virus GP

Um die Expressionsrate des Lassa-Virus GP in eukaryontischen Zellen nach transienter Transfektion zu steigern, wurde die Originalsequenz des Lassa-Virus GP, Stamm Josiah, GeneBank Acc. Nr. AAA46286, synthetisch dahingehend verändert, dass für die einzelnen kodierten AS diejenigen Basentriplets verwendet wurden, die präferentiell in eukaryontischen Zellen translatiert werden (GeneArt, Regensburg, D). Außerdem wurden versteckte Splice-Sites, RNA-destabilisierende Sequenzelemente und Sequenzwiederholungen entfernt. Exprimiert wurde dieses synthetische GP-Gen mittels des pAdApt-Vektors, der den starken, langen CMV-Promotor enthält (Havenga *et al.* 2000). Die Optimierung der GP-Codons beruht auf Erkenntnissen von Haas *et al.* (1996). Diese besagen, dass menschliche Gene Basentriplets (Codons) enthalten, die präferentiell genutzt werden, um bestimmte AS zu kodieren. Die beiden Codons, die für die AS Tyrosin kodieren – TAC und TAT – sind beispielsweise mit Häufigkeiten von 74% (TAC) bzw. 26% (TAT) in stark exprimierten menschlichen Genen zu finden. Von den 22 Tyrosin-Resten der natürlich vorkommenden Josiah GP-Sequenz sind sechzehn mit TAC kodiert und sechs mit TAT. In der codon-optimierten Sequenz findet man 20 TAC- und zwei TAT-Codons.



2. 1. 5. Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Krabben (SAP)	Roche, Mannheim, D
Penicillin/Streptomycin	Gibco-BRL, Karlsruhe, D
Restriktionsendonucleasen inkl. Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Trypsin/EDTA	Gibco-BRL, Karlsruhe, D
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Klenow-Enzym	New England Biolabs, Schwalbach, D

2. 1. 6. Antikörper

Anti-Peptid Kaninchen Seren

Folgende Antikörper wurden von O. Lenz (ehemals Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt: α -NP (Josiah-NP-53), α -GP-2 (Josiah-GP-477) und α -Z (Josiah-Z-CT). Die jeweiligen Lassa-Peptide, die zum Immunisieren von Kaninchen verwendet wurden, sind nachfolgend angegeben. Nach der Immunisierung dieser Kaninchen wurden polyklonale Seren gewonnen, welche die gewünschten Antikörper enthielten (Lenz *et al.* 2000).

LASV-Josiah-NP-53	H_2N -LMRKERRDDNNDLKRLRDLNQAVC-COOH
LASV-Josiah-GP-477	H_2N -CGLYKQPGVPVKWKR-COOH
LASV-Josiah-Z-CT	H_2N -CGAADSIRPPPYSP-COOH

Der Nachweis der H7-HA-Expression wurde mittels eines polyklonalen Kaninchen anti-FPV (*engl.*: fowl plague virus (Geflügelpest-Influenza-A-Virus)) Antiserums durchgeführt, das von R. Wagner (ehemals Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt wurde (beschrieben in: Wagner *et al.* 2005).

Kommerzielle Antikörper

Zur Kontrolle, dass gleiche Zellzahlen in den einzelnen Ansätzen der nachfolgend beschriebenen Verfahren verwendet wurden, wurde in den Western-Blot-Analysen ein monoklonaler Maus-Antikörper verwendet, der spezifisch das konstitutiv exprimierte β -Aktin verschiedener Spezies (unter anderem Mensch und Affe) erkennt (Abcam, Cambridge, GB).

Die retroviralen Pseudotypen (Kap. 2. 6.) wurden mittels eines polyklonalen Esel-Antikörpers titriert, der ein Epitop des MLV Capsidproteins p30 erkennt (Quality Biotech, Camden, USA; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von P. M. Cannon, University of Southern California, USA).

Der Nachweis des S-pep-markierten Junín-Virus GP erfolgte mit einem monoklonalen anti-S-pep-Antikörper aus dem Kaninchen (Abcam, Cambridge, GB).

Folgende HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurden bei der Firma Dianova (Hamburg, D) bezogen: Anti-Maus-Immunglobuline vom Kaninchen; Anti-Kaninchen-Immunglobuline vom Schwein und Anti-Esel-Immunglobuline von der Maus.

2. 1. 7. Synthetische Peptide

Die nachfolgend aufgelisteten synthetischen Peptide für die Inhibitionsstudien wurden von der Firma Iris Biotech (Marktredwitz, D) bezogen:

Tab. 2: Synthetische Peptide für Fusions- und Infektionsinhibitionsstudien.

Name	AS-Sequenz	Molekulargewicht [kDa]
CPI-Helix	DDIEQQADNMITEMLQKEYMERQ	2,9
N-FPS	GTFTWTL	0,8
I-FPS	GGYCLTRWMLIEAELKCFGNTAV	2,6

Die in dieser Arbeit verwendeten Namen der synthetisch hergestellten Peptide mit deren Sequenz vom N-terminalen zum C-terminalen Ende sowie deren molare Masse in kDa ist angegeben. Die Peptide wurden nach Herstellerangaben in DMSO gelöst und in Aliquots à 100 µg/µl bei -80°C gelagert.

2. 1. 8. Eukaryontische Expressionsvektoren

Klonierungsvektor

pAdApt: eukaryonter Expressionsvektor unter CMV-Promotor-Kontrolle, zur Verfügung gestellt von Crucell Holland B.V., Leiden, NL (Havenga *et al.* 2001; Abb. 8).

Zur Verfügung gestellte Expressionskonstrukte**pCAGGS-LCMV-GP**

eukaryonter Expressionsvektor unter Hühner- β -Aktin-Promotorkontrolle zur Expression des GP von LCMV Stamm WE (Beyer *et al.* 2003), zur Verfügung gestellt von W. Beyer (Heinrich Pette Institut, Hamburg, D).

pCDNA-JUNV-GP-Spep

eukaryonter Expressionsvektor unter CMV-Promotorkontrolle für die Expression von Junin-Virus Stamm MC2 GP (York *et al.* 2004), welches zur Nachweis im Western-Blot (Kap. 2. 3. 1.) ein S-peptid-Tag trägt (Sequenz: KETAAAKFERQHMS), zur Verfügung gestellt von J. Nunberg (Montana Biotechnology Centre, USA).

pCDNA-SKI1/S1P

eukaryonter Expressionsvektor unter CMV-Promotorkontrolle für die Expression der Lassa-Virus GP-C-prozessierenden Protease SKI-1/S1P, zur Verfügung gestellt von N. G. Seidah (Clinical Research Institut of Montreal, Kanada) (Rawson *et al.* 1999).

pCnBg

eukaryonter Expressionvektor unter Kontrolle des CMV-LTR-Promotors zur Erzeugung retroviraler Pseudotypen mit Beta-Galactosidase-(β -gal)-Reportergergen in Φ NXgp-Zellen (Kap. 2. 6.). Beschrieben in Han *et al.* 1997 und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von P. M. Cannon, University of Southern California, USA.

pHH21-H7-HA

eukaryonter Expressionsvektor unter humaner-RNA-Polymerase-Promotorkontrolle für die Expression von Influenza Virus Hämagglutinin (HA), des Subtyps H7 (H7-HA), zur Verfügung gestellt von R. Wagner (Wagner *et al.* 2005)

pJK2/pLTR β gal

eukaryonter Expressionsvektor mit β -gal-Reportergergen unter der Expressionskontrolle des HIV-1 LTR (*engl.*: long terminal repeat). LTR ist eine regulatorische Nukleotidsequenz von Retroviren (hier von HIV-1), welche alle *cis*-aktiven Sequenzen enthält, also Promotor- und Enhancer-Elemente, die die Genexpression eines nachfolgenden Gens (hier β -gal) kontrollieren. Die Herstellung dieses Konstruktes mit dem Namen pJK2 wurde 1992 von Kimpton

und Emerman beschrieben. Zur Verfügung gestellt von V. Bosch (DKFZ, Heidelberg, D).

pL3tat/pHIV1-tat

eukaryonter Expressionsvektor zur Transaktivierung des HIV-1 LTR. Das HIV-1 Tat-Protein (*engl.*: transactivator of transcription) kann durch Bindung an HIV-1 LTR ein nachfolgendes Gen aktivieren (Transaktivierung). HIV-1 Tat ist ein 82 AS langes Oligopeptid, welches neben der Transaktivierung des LTR auch Kerntransport-, RNA-Bindung und Proteinwechselwirkungsfunktionen aufweist. Das hier verwendete Konstrukt wurde unter dem Namen pL3tat von Schwartz *et al.* 1990 beschrieben. Zur Verfügung gestellt von V. Bosch (DKFZ, Heidelberg, D)

2. 1. 9. Bakterien

E. coli XL-1 blue: [K12, recA1, lac, endA1, gyr96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, (F' proAB⁺, lacIq, lacZ, dM15 Tn10)], Stratagene, Heidelberg, D

2. 1. 10. Eukaryontenzellen

293-Zellen permanente Epithelialzelllinie gewonnen aus Adenovirus-5-DNA transformiertem, menschlichem Embryo-Nierenkarzinom, daher auch häufig die Bezeichnung HEK-293-Zellen (*engl.*: human embryo kidney), ATTC CRL-1573

CHO-K1-Zellen permanente Epithelialzelllinie aus den Ovarien eines chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*), ATCC CCL-61

ΦNXgp-Zellen 293-Zellklon, der die MLV-Gene gag und pol stabil exprimiert, zur Verfügung gestellt durch G. Nolan, Stanford University, USA.

SRD-12B-Zellen SKI-1/S1P-defizienter CHO-K1-Zellklon (SRD, *engl.*: sterol regulatory deficient). Erhalten von Dr. J. L. Goldstein (Rawson *et al.* 1999)

Vero-Zellen permanente Zelllinie aus dem Nierenepithel der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), ATCC CCL-81

2. 1. 11. Seren von Lassafieberpatienten

Acht asymptomatischen Patienten aus Guinea, bei denen mit einem anti-Lassa-Virus-NP-Antikörper eine frühere Lassa-Virusinfektion nachgewiesen worden war (ter Meulen *et al.* 2004), wurde Blut abgenommen. Nach Abtrennung der Erythrozyten wurden die Seren in flüssigem Stickstoff gelagert. Als Kontrollen dienten die Seren des seronegativen Dolmetschers (I.B.F.), sowie des guineischen Projektleiters Dr. Kékoura (TCC-Donor), der im Lassa-Virus Neutralisationstest einen Titer von 1:80 aufwies (ter Meulen *et al.* 2004).

2. 1. 12. Puffer und Medien

Puffer

<u>Anodenpuffer I:</u>	1 M Tris	300 ml
	Ethanol	200 ml
		<i>ad</i> 1 l dH ₂ O

<u>Anodenpuffer II:</u>	1 M Tris	25 ml
	Ethanol	200 ml
		<i>ad</i> 1 l dH ₂ O

<u>Kathodenpuffer:</u>	1 M Tris	25 ml
	Aminocaprinsäure	5,25 g
	Ethanol	200 ml
		<i>ad</i> 1 l dH ₂ O

<u>10x SDS-PAGE-Laufpuffer:</u>	SDS	10 g
	Tris	30 g
	Glyzin	144 g
		<i>ad</i> 1 l dH ₂ O

<u>RIPA-Puffer (pH7.5):</u>	10% Triton X-100	10 ml
	10% DOC	10 ml
	10% SDS	1 ml
	1 M Tris/HCl (pH 7.5)	2 ml
	3 M NaCl	3 ml
	0,5 M EDTA	2 ml
	Trasylol	5 ml
	Jodazetamid	185 g
	<i>ad 1 l dH₂O</i>	
	frisch zusetzen: 1 mM PMSF	
<u>CoIP-Puffer:</u>	1 M Tris	10 ml
	5 M NaCl	10 ml
	0,5 M EDTA	5 ml
	1% NP40	5 g
	0,4% Deoxycholate	2 g
	25 mM Jodazetamid	2,3 g
	Trasylol	5 ml
		<i>ad 1 l dH₂O</i>
	frisch zusetzen: 1mM PMSF	
<u>4x SDS-Probenpuffer:</u>	0,5 M Tris/HCl (pH 6.8)	4 ml
	SDS	0,4 g
	Glyzerin	4 ml
	2% Bromphenolblau	0,1 ml
	dH ₂ O	1,2 ml
	β-Mercaptoethanol	0,4 ml
<u>50x TAE-Puffer:</u>	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	0,5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml
		<i>ad 1 l dH₂O</i>

<u>X-Gal-Färbelösung:</u>	0,5 M Na-Ferricyanid	500 µl
	0,5 M Na-Ferrocyanid	500 µl
	1 M MgCl ₂	100 µl
	40 mg X-Gal / ml DMF	1,25 ml
		<i>ad 50 ml PBS^{def}</i>

Medien für Bakterienkultur

<u>LB-Medium:</u>	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
		<i>ad 1 l dH₂O</i>

<u>SOB-Medium:</u>	Bacto-Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	1 M MgCl ₂	10 ml
	5 M MgSO ₄	10 ml
	5 M NaCl	2 ml
	1 M KCl	0,5 ml
		<i>ad 1 l dH₂O, pH 7.0</i>

LB-Agarplatten: LB-Medium mit 1,5% Bactoagar; Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) wurde nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50 °C zugesetzt und abschließend in Petrischalen gegossen.

Puffer und Medien für Zellkultur

PBS⁺⁺ (Phosphate buffered saline):

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
MgCl ₂	0,1 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
CaCl ₂	0,13 g
	<i>ad 1 l dH₂O</i>

- PBS^{def.}: wie PBS⁺⁺ ohne MgCl₂ und CaCl₂
- D-MEM: Zellkulturmedium (*engl.*: Dulbecco's modified Eagle medium) (Gibco-BRL, Karlsruhe, D) enthält 4500 mg/L D-Glucose, 110 mg/L Natriumpyruvat und nichtessentielle AS aber kein L-Glutamin
- D-MEM/F-12: Zellkulturmedium D-MEM, Variante F-12 (Gibco-BRL, Karlsruhe, D) enthält 3151 mg/L D-Glucose, 110 mg/L Natriumpyruvat und nichtessentielle AS aber kein L-Glutamin
- RPMI-1640: Zellkulturmedium (*engl.*: Roswell Park Memorial Institute medium) (Gibco-BRL, Karlsruhe, D) enthält 2000 mg/L D-Glucose, 25 mM HEPES-Puffer, 2 g/L Natriumbicarbonat und nichtessentielle AS aber kein L-Glutamin
- Medienzusätze: zu den einzelnen Medien wurden je 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin zugegeben, sowie eine variierende Menge (2%-10%) inaktiviertes FCS. Die FCS Inaktivierung wurde vor der Zugabe durch Erhitzen auf 56 °C für eine Stunde und anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur durchgeführt.
- Besondere Medienzusätze, zusätzlich zu den oben erwähnten, wurden für die SKI-1/S1P-defizienten SRD-Zellen zugesetzt, nämlich 5 µg/ml Cholesterin, 1 mM Natriummevalonat und 20 µM Natriumoleat. Das komplette Herstellungsprotokoll für SRD-Zellmedium ist ausführlich unter Kap. 2. 4. 2. im Methodenabschnitt ausgeführt.

2. 2. Molekularbiologische Methoden

2. 2. 1. Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*engl.*: polymerase chain reaction, PCR) dient der selektiven Vervielfältigung von DNA. Dabei wird die DNA-Vorlage zunächst durch Erhitzen auf 95 °C einzelsträngig gemacht (Denaturierung). Durch kurzzeitiges Abkühlen lagern sich an das 5'-Ende des einen und das 3'-Ende des anderen Einzelstranges im nächsten Schritt Oligonukleotide (Primer) an, wenn diese komplementär zur Matrizen-DNA sind (Hybridisierung). Durch Temperaturerhöhung auf 72 °C werden diese DNA-Komplexe enzymatisch vervielfältigt (Amplifikation). Durch etwa 30maliges Wiederholen dieses Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Amplifikation kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des zwischen den Primern gelegenen DNA-Abschnittes. Entscheidend ist dabei die Hitzestabilität der verwendeten DNA-Polymerase. Ursprünglich wurde sie aus dem hyperthermophilen Archaeon *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) isoliert. Als Alternative zur *Taq*-Polymerase, die eine relativ hohe Fehlerrate aufweist, bietet sich eine *Pfu*- oder *Pwo*-Polymerase an, die beide Korrekturmechanismen besitzen, d.h. nicht oder falsch gepaarte Nukleotide werden durch eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität herausgeschnitten und anschließend durch die korrekten Nukleotide ersetzt. Die *Pfu*-Polymerase wird aus dem marinen Archaeon *Pyrococcus furiosus* isoliert, während die *Pwo*-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* gewonnen wird.

2. 2. 2. Prinzip der rekombinanten PCR

Mit Hilfe der rekombinanten PCR können Gene gezielt verändert werden. Dabei werden zwei PCR-DNA-Fragmente neu kombiniert und zusammengefügt, die aus unterschiedlichen Genen oder Genabschnitten stammen können. Die 3'-Region des einen Fragmentes muss komplementär zum 5'-Ende des anderen Fragmentes sein, sodass diese hybridisieren können. Nach der Hybridisierung der beiden Einzelstränge mit den überlappenden Enden und anschließender Auffüllreaktion erhält man ein fusioniertes PCR-DNA-Fragment, das mittels erneuter PCR amplifiziert wird. Durch Restriktionsendonuklease-Verdau des rekombinanten PCR Produktes und darauf

folgender Ligation können Genabschnitte ausgetauscht, deletiert oder substituiert werden (Higuchi *et al.* 1988).

Bestimmung der DNA- und Oligonukleotidkonzentration über UV-Absorption

Nukleinsäuren absorbieren UV-Strahlung mit einem Maximum bei 260 nm in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (Lambert-Beersches Gesetz). Es gelten folgende Näherungswerte:

Oligonukleotide:	1 OD _{260nm} ~ 20 µg/ml
Einzelsträngige DNA:	1 OD _{260nm} ~ 40 µg/ml
Doppelsträngige DNA:	1 OD _{260nm} ~ 50 µg/ml

Somit kann die DNA-Konzentration durch einfaches Messen der Absorption einer verdünnten DNA-Lösung (z.B. 1:100 in ddH₂O) bestimmt werden.

PCR

Für diese Arbeit wurde das *Taq*-PCR-Core Kit und der programmierbare Heizblock GeneAmp PCR System 2400 von Perkin Elmer benutzt.

Reaktionsansatz:

10x PCR-Puffer	10 µl
DNA-Matrize	200 ng
Forward Primer	25 pmol
Reverse Primer	25 pmol
dNPT-Mischung	4 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1 U
ddH ₂ O	ad 100 µl

Zyklusparameter:

Denaturierung vor dem ersten Zyklus	95 °C	5 min
30x Denaturierung	95 °C	1 min
Primeranlagerung	50 °C	1 min
DNA-Synthese	72 °C	1 min/kb
DNA-Synthese nach dem letzten Zyklus	72 °C	10 min
	4 °C	

Nach Ablauf der Reaktion wurden die PCR-Fragmente mittels QIAquick PCR-Purification Kit aufgereinigt und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2. 2. 4.) auf Größe und Reinheit überprüft.

Hybridisierungs- und Auffüllreaktion

Für die Fusion der beiden PCR-DNA-Fragmente nach der ersten PCR wurden die gereinigten Fragmente im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend denaturiert. Aufgrund der komplementären Basensequenzen am 3'-Ende des einen Fragmentes und dem 5'-Ende des anderen entsteht nach Abkühlung ein rekombinantes DNA-Fragment, das in wenigen PCR-Zyklen aus Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese in Abwesenheit von Primern vervielfältigt wird.

Dazu wurden ca. 10 ng der gereinigten PCR-DNA-Fragmente mit den passenden überlappenden Enden in einem PCR-Reaktionsansatz wie oben vereinigt, allerdings ohne Primer und *Taq*-Polymerase, die erst nach der Hybridisierungs- und Auffüllreaktion zugefügt wurden.

Zyklusparameter der Hybridisierungs- und Auffüllreaktion:

Zyklusparameter:

Denaturierung vor dem ersten Zyklus	95 °C	5 min
5x Denaturierung	95 °C	1 min
Hybridisierung	50 °C	2 min
DNA-Synthese	72 °C	1 min
DNA-Synthese nach dem letzten Zyklus	72 °C	10 min
	4 °C	

Nach der Hybridisierungs- und Auffüllreaktion wurden die 100 µl des Reaktionsansatzes in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, in das je 0,1 nmol (Endkonzentration 1 µM) der beiden äußeren Primer vorgelegt wurden. Es folgte eine PCR mit den Parametern wie oben beschrieben, wobei die Zyklenzahl von 30 auf 20 reduziert wurde. Die enthaltenen DNA-Fragmente wurden gereinigt, im Agarosegel überprüft und einem Restriktionsverdau unterzogen (Kap. 2. 2. 3.), um sie nach Extraktion aus einem Agarosegel (Kap. 2. 2. 4.) für die Klonierung einzusetzen.

2. 2. 3. Verdau doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA kann durch sogenannte Restriktionsendonukleasen in Fragmente definierter Länge zerlegt werden (Restriktionsverdau), wobei am 5'- und am 3'-Ende Basenabfolgen entstehen, deren Sequenzen durch die verwendeten Restriktionsenzyme bestimmt werden. Für die verschiedenen Endonukleasen werden gemäß den Angaben des Herstellers diverse Inkubationspuffer (Restriktionspuffer) mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen und pH-Werten verwendet.

Analystischer DNA-Verdau zur Kontrolle nach Plasmidpräparation

Reaktionsansatz:

dsDNA (0,2 – 0,5 µg)	1 µl
10x Inkubationspuffer	1 µl
Restriktionsendonukleasen (ca. 5 U)	1 µl
ddH ₂ O	<i>ad</i> 10 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 1 µl 10x Probenpuffer versetzt und in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt (Kap. 2. 2. 4.).

Präparativer DNA-Verdau

Reaktionsansatz:

dsDNA (5 – 10µg)	5 – 10 µl
10x Inkubationspuffer	5 µl
Restriktionsendonukleasen (10 – 50 U)	1 – 5 µl
ddH ₂ O	<i>ad</i> 50 µl

Der Reaktionsansatz wurde 2 h in einem 37 °C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 5 µl aus dem Ansatz mit 1 µl 10x Probenpuffer versetzt und die Vollständigkeit des Verdau in einem Agarosegel überprüft. War die DNA komplett verdaut, so wurden 5 µl 10x Probenpuffer zu den restlichen 45 µl des Ansatzes gegeben, und der komplette Reaktionsansatz wurde in einem Agarosegel in 0,5x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2. 2. 4.).

2. 2. 4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Um Reaktionen wie die PCR und den Restriktionsverdau zu überprüfen, können DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt und nach Gelfärbung mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr) unter UV-Belichtung sichtbar gemacht werden. Bei Bedarf können die DNA-Fragmente aus dem Gel zurückgewonnen werden.

Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung mit EtBr versetzt (1:100 einer 1%igen EtBr-Stammlösung). Anschließend wurde diese Lösung als Horizontalgel mit eingehängtem Kamm in eine geschlossene Gelkammer gegossen und bis zum Polymerisieren bei Raumtemperatur 30 min unter dem Abzug gelagert. Vor dem Probenauftragen wurden diese mit DNA-Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1x). Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer, und die Elektrophoresespannung betrug 5 V/cm bezüglich des Abstandes der beiden Elektroden. Nach der Elektrophorese wurden die Proben unter UV-Licht betrachtet. Als Kontrolle wurde ein DNA-Größenstandard aufgetragen, der die Größen- und ungefähre Mengenbestimmung der DNA-Fragmente ermöglichte.

2. 2. 5. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Gelextraktion)

Nach Auftrennung über ein präparatives TAE-Agarosegel wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem EtBr-gefärbten Gel unter langwelliger UV-Bestrahlung (360 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein tariertes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe des QIAquick Gelextraction Kits nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die DNA-Reinigung wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2. 2. 4.) überprüft.

2. 2. 6. Ligation von PCR-Fragmenten

Die in den Vektor zu inserierende DNA und die Vektor-DNA wurden nach den oben beschriebenen Methoden mit Restriktionsendonuklease verdaut (Kap. 2. 2. 3.) und anschließend durch Gelextraktion (Kap. 2. 2. 5.) gereinigt.

2. 2. 7. Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Das Enzym SAP (*engl.*: shrimp alkaline phosphatase) entfernt die 5'-Phosphatgruppen von DNA-Enden. Die Dephosphorylierung verhindert die Ligation von DNA und kann so z.B. die Rezirkularisierung des Vektors vermeiden.

Reaktionsansatz:

Restriktionsverdauter Vektor (0,1 µg/µl)	50 µl
10x SAP-Puffer	6 µl
SAP (1 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 60 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym danach bei 65 °C für 15 min inaktiviert.

2. 2. 8. Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die kovalente Verknüpfung von 3'-OH-Gruppen mit freien 5'-Phosphatgruppen zu Phosphodiesterbindungen.

Reaktionsansatz:

Vektor (0,1 µg/µl)	3 µl
DNA-Insert (2 ng/µl)	14 µl
10x Ligationspuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	1 µl

Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Als Ligationskontrolle diente linearisierter Vektor ohne Insert-DNA. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde für die Transformation kompetenter Bakterien benutzt (Kap. 2. 2. 9.).

2. 2. 9. Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*

Bestimmte Bakterienstämme (z.B. *E. coli* XL1-Blue) werden durch Inkubation mit geeigneten Chemikalien (z.B. Kalziumchlorid oder Dimethylsulfoxid) zur Aufnahme von DNA befähigt (Chung *et al.* 1989). Diese kompetenten Bakterien nehmen DNA

während Inkubation auf Eis auf. Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 30 ml SOB-Medium mit 600 µl einer Übernachtskultur (ÜNK) von *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von ungefähr 0,5 bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden auf Eis gekühlt, für 10 min bei 4000 UpM, 4 °C, zentrifugiert und schließlich in 3 ml eiskaltem TSS-Puffer (*engl.*: transformation and storage solution) resuspendiert. 50 µl kompetente Bakterien wurden mit DNA versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz auf LB/Antibiotika-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die gewachsenen resistenten Kolonien wurden in Flüssigkultur vermehrt und die Plasmid-DNA nach Standardmethoden isoliert und analysiert.

2. 2. 10. Plasmid-DNA-Isolierung

Die Plasmid-DNA Präparation beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien (Birnboim und Doly 1979) und der Adsorption von DNA an eine Silikamatrix (für Isolierungen in kleinerem Maßstab mittels QIAprep 8-Plasmid Kit) oder an Anionenaustauschersäulen (für Isolierungen in größerem Maßstab mit dem QIAgen High-Speed-Maxi-Plasmid Kit) in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie 1979). Für die Isolierung wurden 1,5 ml bzw. 200 ml einer *E. coli* XL1-Blue ÜNK verwendet. Die Isolierung und Reinigung der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurden in ddH₂O gelöst und die DNA-Menge photometrisch als OD bei 260 nm bestimmt.

2. 2. 11. Enzymatische Sequenzierung von DNA

Die Methode beruht auf der enzymatischen Synthese von DNA und Kettenabbruch durch Dideoxynukleotide (ddNTP) *in vitro* (Sanger *et al.* 1977). Dazu wurde das ABI Prism[®] Sequencing Kit verwendet. Ausgangspunkt für die enzymatische Synthese der DNA entlang eines als Matrize dienenden DNA-Einzelstranges ist ein Primer, der zu einem bestimmten Teil der Matrize komplementär ist und mit diesem hybridisieren kann. Die AmpliTaq-DNA-Polymerase FS katalysiert in Gegenwart aller vier Deoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und der vier unterschiedlichen, fluoreszenzmarkierten ddNTPs die Polymerisation der zur Matrize komplementären Sequenz. Während der Synthesereaktion, die in mehreren Zyklen abläuft, kommt es durch Einbau der ddNTPs zu statistisch verteilten Abbrüchen der Kettenpolymerisation, da die

ddNTPs nicht die notwendige 3'-OH-Gruppe für die 5'-3'-Phosphodiesterbindung besitzen. Da die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann in diesem System die Sequenzierungsreaktion in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden.

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die DNA-Fragmente durch Ethanolfällung von nichteingebauten, fluoreszenzmarkierten ddNTPs gereinigt und dann in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Lasers detektiert und die DNA-Sequenz über eine spezielle Software ausgewertet.

Sequenzierungsreaktion (ABI Prism[®] Sequencing Reaction Kit)

Reaktionsansatz:

Prämix	4 µl
- A-, C-, G-, T-Dye Terminator	
- dITP, dATP, dCTP, dTTP	
- Tris-HCl (pH 9.0), MgCl ₂	
- Hitzestabile Pyrophosphate	
- AmpliTaq-DNA-Polymerase FS	
dsDNA	100 ng
Primer	7.5 pmol
ddH ₂ O	ad 20 µl

Zyklusparameter:

Denaturierung vor dem ersten Zyklus	96 °C	5 min
25x Denaturierung	96 °C	15 sec
Primeranlagerung	50 °C	15 sec
DNA-Synthese	60 °C	4 min
	4 °C	

Reinigung der DNA-Fragmente (Ethanolfällung)

Die 20 µl Sequenzierungsansatz wurden mit 2 µl 3 M Natriumacetatlösung pH 4.6 – 5.2 und 50 µl Ethanol versetzt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNA durch Zentrifugation bei 13000 UpM für 30 min pelletiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und auf das Gel aufgetragen.

2. 3. Immunologische Methoden

2. 3. 1. Immunoblot (Western-Blot)

Zum direkten Nachweis von Proteinen in transfizierten Zellen sowie in retroviralen Pseudotypen wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit darauf folgendem Immunoblot (Western-Blot) durchgeführt.

Zellyse

Die Zellen wurden auf Eis zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit einem Zellschaber in 500 µl eiskalte PBS^{def}-Lösung geschabt. Die bei 2000 UpM für 5 min und 4 °C pelletierten Zellen wurden dann in 80 – 100 µl 4x SDS-Probenpuffer unter Zusatz von β-Mercaptoethanol resuspendiert. Nach einer Ultraschallbehandlung bei 400 Watt für 3x 30 sec mittels des Sonifiers 450 (Branson, Danbury, USA) wurden die Proben für 5 min bei 97 °C aufgeköcht und unlösliche Aggregate für weitere 5 min bei 13000 UpM abzentrifugiert.

SDS-PAGE

Mittels SDS-PAGE lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen hauptsächlich auf Grund ihrer Masse in Polyacrylamidgelen elektrophoretisch auftrennen. Das Proteingemisch wird zunächst unter Zusatz von SDS (*engl.*: sodium dodecyl sulfate) gelöst, einem Detergenz, das die Hydrathülle und damit fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört und sich über hydrophobe Wechselwirkungen an das Protein anlagert. Zur Reduktion von Disulfidbrückenbindungen wurde β-Mercaptoethanol zugesetzt.

Im Gel können die Proteine durch Silberfärbung, Färbung mit dem Farbstoff Coomassie-Blue oder bei radioaktiv markierten Proteinen durch Auflegen eines Röntgenfilms nachgewiesen werden. Weiterhin können die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden, wo sie durch Antikörper nachgewiesen werden können, und zwar durch streptavidingekoppelte Peroxidase mit anschließender Detektion der Chemolumineszenz.

Material:

10%ige Trenngellösung (für 2 Gele):		3,75%ige Sammelgellösung (für 2 Gele):	
ddH ₂ O	3,0 ml	ddH ₂ O	3,4 ml
1,5 M Tris (pH 8.8)	3,0 ml	0,5 M Tris (pH 6.8)	0,6 ml
30% Acrylamid	3,0 ml	30% Acrylamid	0,6 ml
10% SDS	90 µl	10% SDS	50 µl
TEMED	14 µl	TEMED	10 µl
10% APS	40 µl	10% APS	40 µl

Auftragen der Proben und Elektrophorese:

Die Elektrophorese wurde in Keutz-Miniprotein-Gelkammern (Keutz, Reiskirchen, D) durchgeführt. Das Gel wurde in die Apparatur eingebaut und die Pufferkammern mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen in die Taschen des Sammelgels noch einmal 5 min aufgekocht und anschließend kurz abzentrifugiert.

Elektrophoresebedingungen: 60 min, 150 V.

Elektroblotting

Nach Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel können Proteine aus dem Gel elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen (NC-Membranen) übertragen werden (Kyhse-Anderson 1984). Die durch SDS bei pH > 7 negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld aus dem Gel in Richtung Anode und bleiben dabei irreversibel auf der NC-Membran haften.

Aufbau des Blots:

Anode

- 6 Filterpapiere (getränkt mit Anodenpuffer I)
- 3 Filterpapiere (getränkt mit Anodenpuffer II)
- NC-Membran (getränkt mit ddH₂O)
- Polyacrylamidgel
- Filterpapiere (getränkt mit Kathodenpuffer)

Kathode

Die Filterpapiere und die NC-Membran (Porengröße 0,45 μm) wurden zu einer Größe von 9 cm x 6 cm geschnitten, mit den entsprechenden Puffern oder ddH₂O getränkt und anschließend luftblasenfrei aufeinander gelegt.

Die Stromstärke (I), die an die Kohleplatten (Anode/Kathode) der Blotkammer (Keutz, Reiskirchen, D) angelegt wurde, errechnete sich aus der Fläche des Gels (0,8 mA/cm², also 9 cm x 6 cm x 0,8 mA/cm² = 43,2 mA). Die Proben wurden für 1 h transferiert.

Nachweis von Proteinen auf NC-Membranen

Die auf der NC-Membran gebundenen Proteine wurden indirekt durch Antikörper gegen das Protein nachgewiesen. Bei biotinylierten Proteinen (Kap. 2. 3. 2) erfolgt der Nachweis durch einen Streptavidin-Peroxidase-Komplex, wobei das Streptavidin mit hoher Affinität an das Biotin bindet und die Peroxidase eine Substratentwicklung mit ECL (*engl.*: enhanced chemiluminescence) ermöglicht.

Die NC-Membran wurde nach dem Blot für 30 min bei Raumtemperatur mit 3% BSA in PBS^{def}/0,1%Tween abgesättigt und anschließend dreimal kurz mit PBS^{def}/0,1%Tween gewaschen. Danach wurde der Blot 1 h mit dem ersten Antikörper (spezifisch für das nachzuweisende Protein) in PBS^{def}/0,1%Tween bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem kurzen Spülen mit PBS^{def}/0,1%Tween wurde dreimal für 10 min bei Raumtemperatur mit PBS^{def}/0,1%Tween gewaschen. Der zweite Antikörper (spezifisch für den F_c-Teil des ersten Antikörpers und mit Peroxidase gekoppelt) wurde ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur in einer PBS^{def}/0,1%Tween Lösung inkubiert. Auch hiernach wurde der Blot wie nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper gewaschen, bevor der Blot entwickelt wurde. Der Nachweis der biotinylierten Proben verlief wie bei dem oben beschriebenen Verfahren. Allerdings bedurfte es in diesem Fall keiner Inkubation mit einem zweiten Antikörper, da die Peroxidase bereits an das Streptavidin gekoppelt war. Die Peroxidase konnte über ECL nachgewiesen werden. Hierzu wurde das ECL-Super-Signal Kit oder das ECL-Super-Signal-Ultra Kit verwendet. Die resultierende Lichtemission wurde durch Auflegen eines BIOMAX[®] MR Röntgenfilms detektiert.

Ein Größenstandard, der neben den Proben auf das Gel aufgetragen wurde ermöglichte die Abschätzung der Molekulargewichte der einzelnen Proteine.

Entfernen der Antikörper von der Nitrozellulose (Stripping)

Die an die Proteine auf der NC-Membran gebundenen Antikörper können abgelöst und gewaschen werden, sodass die Proteine ein weiteres Mal mit anderen spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden können.

Ablösepuffer:

1 M Tris/HCl (pH 6.7)	2 ml
SDS (20%)	3,2 ml
β -Mercaptoethanol	222 μ l
ddH ₂ O	26,6 ml

Die NC-Membran wurde 30 min bei 50 °C inkubiert, dreimal kurz mit PBS^{def}/0,1%Tween gewaschen und für mindestens 30 min mit 3% BSA in PBS^{def}/0,1%Tween abgesättigt. Danach konnten die Proteine, wie oben beschrieben nachgewiesen werden.

2. 3. 2. Immunpräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht darauf, dass aus einem Proteingemisch Proteine durch spezifische Antikörper gefällt werden können. An den F_c-Teil der Antikörper bindet das bakterielle Protein-A, das seinerseits an ein Trägermaterial (Sephrose) gebunden ist. Der Komplex aus Protein, Antikörper, Protein-A und Sephrose lässt sich durch Zentrifugation leicht pelletieren. Zur Präzipitation von monoklonalen Maus-Antikörpern muss, abhängig vom IgG-Subtyp, eine Fällung eventuell mit Protein-G-Sephrose durchgeführt werden.

Zellyse für die Immunpräzipitation

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zellen in 6cm-Schalen wurden für 15 min auf Eis vorinkubiert, das Medium wurde abgenommen, und die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurde besonders darauf geachtet, dass das PBS⁺⁺ vollständig abgenommen wurde. Danach wurden die Zellen pro 6cm-Schale mit 500 μ l RIPA- oder CoIP-Puffer für 10 min lysiert. Das Zellysate wurde abgekratzt und in einem Reaktionsgefäß dreimal 10 sec im Eisbad mit Ultraschall behandelt. Durch 60minütige

Zentrifugation bei 4 °C und 13000 UpM wurden unlösliche Bestandteile pelletiert. Die gewünschten Proteine konnten dann über Nacht aus dem Überstand (ÜS) mit Hilfe einer Immunpräzipitation gefällt werden.

Immunopräzipitation nach Zellyse

500 µl des Zelllysates wurden mit spezifischem Antikörper und 30 µl Protein-A-Sepharose über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator (Keutz, Reiskirchen, D) inkubiert. Der Protein/Sepharose-Komplex wurde bei 13000 UpM pelletiert und der ÜS abgesaugt. Das Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem RIPA- oder CoIP-Puffer gewaschen und kurz gemischt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde dieser Waschschrift dreimal wiederholt. Das Pellet wurde dann mit 100 mM Tris (pH 7.5) gewaschen und anschließend mit 10 µl 4x Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol für 5 min bei 97 °C aufgeköcht. Nachdem unlösliche Aggregate bei 13000 UpM abzentrifugiert waren, wurden die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

Oberflächenbiotinylierung

Mit Sulfo-NHS-Biotin können Proteine, die sich auf der Oberfläche von Zellen befinden, selektiv markiert werden. Dabei reagieren primäre Amine der Proteine in einer nukleophilen Reaktion mit dem N-Hydroxysulfosuccinimid-(NHS)-Ester unter Abspaltung von NHS. Das Biotin wiederum bindet nicht kovalent, aber mit hoher Affinität Streptavidin und kann somit leicht detektiert oder gefällt werden.

Nach der Markierung werden die Zellen lysiert und das gesuchte Protein entweder mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und mit Streptavidin-Peroxidase im Western-Blot nachgewiesen, oder biotinylierte Proteine werden mit Streptavidin-Sepharose gefällt und dann wie unter Kap. 2. 3. 1. beschrieben im Immunoblot detektiert. Die Fällung mit Streptavidin-Sepharose wurde mit 100 µl Streptavidin-Sepharose durchgeführt.

Um jeglichen zellulären Transport zu unterbinden, müssen alle Schritte der Oberflächenbiotinylierung auf Eis stattfinden. Nachdem das Medium von den Zellen entfernt wurde und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen waren, wurde jede 6cm-Schale zweimal 15 min mit 2 ml einer Biotinlösung (1 mg Sulfo-NHS-Biotin frisch in 1 ml PBS⁺⁺ gelöst) bei 0 °C behandelt. Danach wurde das überschüssige Biotin durch Waschen mit einer Glyzinlösung (0,1 M Glyzin in PBS⁺⁺) gebunden. Dann wurden die Zellen wie oben beschrieben lysiert, und die Präzipitation der Proteine

wurde mit spezifischen Antikörpern oder mit Streptavidin-Sepharose wie oben dargestellt durchgeführt.

2. 4. Zellkultur-Technik

Zur Expression von Fremdproteinen mittels Expressionsvektoren wurden folgende Säugertierzellen verwendet: 293-, CHO-, Φ NXgp-, SRD-12B- und Vero-Zellen. Die Zellen wurden in 75cm³-Zellkulturflaschen gezüchtet: für CHO-, SRD-12-B- und Vero-Zellen Flaschen der Firma Greiner, wohingegen für 293- und Φ NXgp-Zellen Flaschen der Firma Corning verwendet wurden. Das unterschiedliche Wachstumsverhalten der einzelnen Zellen in verschiedenen Zellkulturflaschen wurde empirisch bestimmt. Die Zellzüchtungen wurden in Brutschränken bei 5%-CO₂-Begasung bei einer konstanten Temperatur von 37 °C durchgeführt. Des Weiteren wurden sämtliche Arbeiten mit den Zellkulturen unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank ausgeführt, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden.

2. 4. 1. Passagieren der Zelllinien

Als Kulturmedium wurde für 293-, Φ NXgp- und Vero-Zellen D-MEM mit 10% FCS verwendet, wohingegen CHO- und SRD-12B-Zellen in D-MEM/F-12 mit 10% FCS passagiert wurden. Der konfluente Zellrasen einer 75cm³-Zellkulturflasche wurde mit 10 ml PBS^{def} gewaschen und anschließend mit 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung behandelt, wodurch sich die Zellen vom Plastikboden der Flasche ablösten. Die abgelösten Zellen wurden in 9 ml Medium resuspendiert und auf eine neue Kulturflasche verteilt (1/20). Innerhalb von drei bis sieben Tagen nach dem Umsetzen wuchsen die Zellen zu einer Einzellschicht (Monolayer) zusammen, woraufhin sie wieder abgelöst und in neue Gefäße überführt wurden.

2. 4. 2. Herstellung des Mediums für SRD-12B-Zellen

Da es sich bei den SRD-12B-Zellen um eine SKI-1/S1P-defiziente Zelllinie handelt und SKI-1/S1P eine wichtige Rolle bei der Cholesterinbiosynthese spielt, muss dem Medium dieser Zellen 5 µg/µl Cholesterin (Stammlösung: 2 mg/ml Ethanol), 1 mM Natriummevalonat und 20 µM Natriumoleat zugesetzt werden. Für Natriummevalonat

und Natriumoleat wurde jeweils wie folgt eine Stammlösung erzeugt, die steril filtriert und aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt wurde. Mevalonat-Lacton wurde in einer Konzentration von 1 M in 10 mM KH₂PO₄-Puffer (pH 4.5) gelöst (1 g in 7,7 ml). Zur Herstellung von Natriumoleat Stammlösung (10 mM Na-Oleat in 12% BSA, 150 mM NaCl) ist zunächst die Herstellung einer 24%igen (w/v) BSA-Lösung in 150 mM (pH 7,4) erforderlich. Hierzu wurden 12 g BSA in 2 g Portionen über 5 h und unter ständigem Rühren zu 35 ml einer 150 mM NaCl-Lösung gegeben. Anschließend wurde der pH mit 5 N NaOH auf 7.5 eingestellt und die Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Diese Lösung kann bei -20 °C gelagert werden. Parallel dazu wurden 76 mg Natriumoleat (304 g/mol) und 10 ml 150 mM NaCl für 5 min unter Rühren in einem Glas-Erlenmeyerkolben auf 60 °C erhitzt. Zu der noch warmen Lösung wurden 12,5 ml 24% BSA gegeben und nach vollständigem Lösen des Oleats das Volumen auf 25 ml eingestellt.

2. 4. 3. Transfektion von Zellen mit Lipofectamin[®] 2000

Lipofectamin[®] 2000 ist eine Liposomenmischung aus kationischen Phospholipiden. Nach Zugabe von DNA bilden sich spontan Lipid-DNA-Komplexe aus, die von der Zelle aufgenommen werden können. In der Zelle kommt es dann zur Expression der transfizierten DNA.

Transfektionsansatz für eine 6cm-Zellkulturschale (für andere Schalengrößen wurden die unten angegebenen Menge entsprechend modifiziert):

A: 500 µl OptiMEM

20 µl Lipofectamin[®] 2000

B: 500 µl OptiMEM

8 µg DNA

Die Lösungen A und B wurden jeweils 5 min einzeln bei Raumtemperatur inkubiert, bevor A und B vereinigt, kurz gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Das Transfektionsmedium wurde zusammen mit 3,5 ml Medium (inklusive FCS, ohne Antibiotika) auf die Zellen gegeben. Nach 4 – 6 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 16 – 48 h konnte die Expression analysiert werden.

2. 5. Rekombinanter Zell-Zellfusionsassay (RZZFA)

In diesem Assay wurde die Lassa-Virus GP-induzierte Zell-Zellfusion *in vitro* untersucht. Der Assay beruht darauf, dass zwei Zellpopulationen fusionieren können, von denen eine Lassa-Virus GP exprimiert, wohingegen die andere funktionelle Lassa-Virusrezeptoren exprimieren muss. Wenn durch eine Änderung des pH-Wertes im umgebenden Zellmedium die GP-Konformation derart geändert wird, dass dieses fusionskompetent wird, können benachbarte Membranen fusionieren (hier die Membranen der beiden Zellpopulationen). Die Fusion wird quantifiziert, indem die Expression des β -gal-Reportergens (unter HIV-1 LTR-Expressionskontrolle, Expressionsvektor pJK2) in einer der beiden Zellpopulationen spezifisch durch das HIV-1 Transaktivator-Protein Tat aus der anderen Zellpopulation ausgelöst wird, und zwar durch Bindung von Tat an LTR. Das Transaktivierungsprinzip eines Reportergens zur Messung der Zell-Zellfusion wurde erstmals 1995 von Nussbaum *et al.* beschrieben und abgewandelt im nachfolgend beschriebenen Verfahren angewandt. Das Prinzip des Assays ist in Abb. 9 dargestellt.

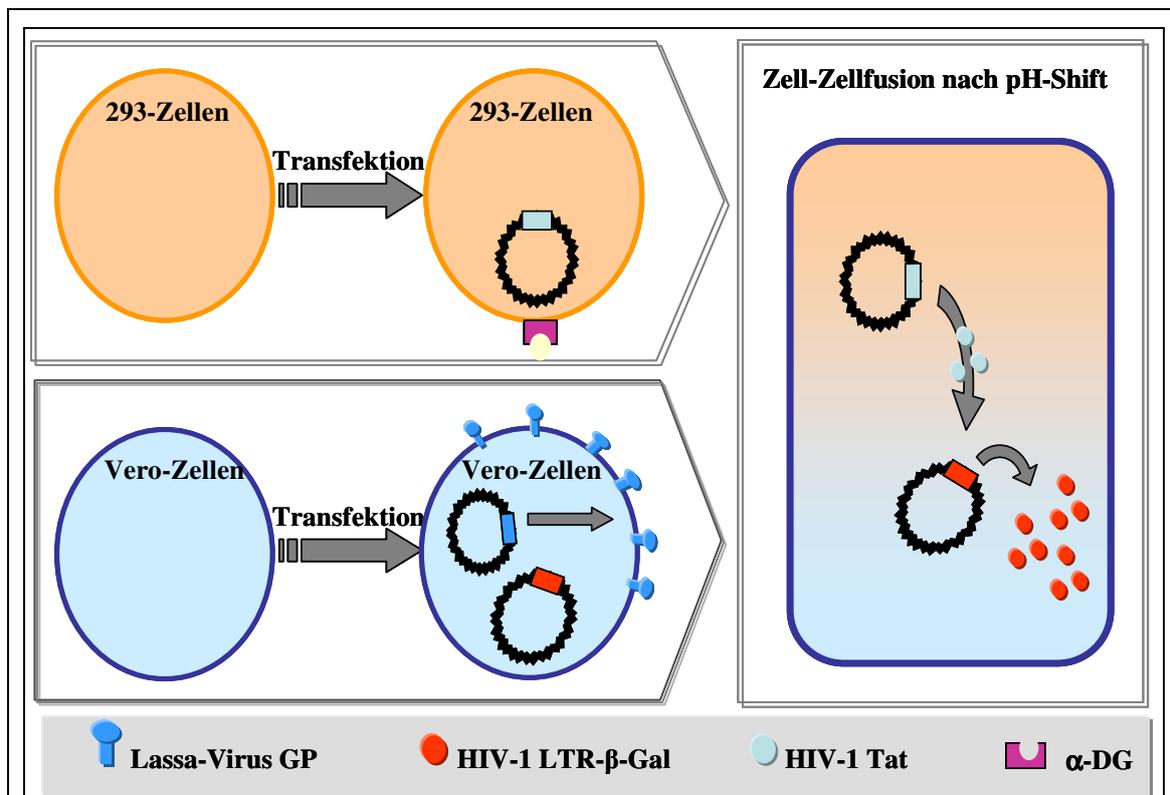


Abb. 9: Prinzip des RZZFA. Zwei Zellpopulationen, von denen eine mit Lassa-Virus GP und dem HIV-1 LTR-induzierbaren Reportergen β -gal transfiziert wurde und die andere mit dem HIV-1 LTR-Aktivatorprotein HIV-1 Tat, wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend einem pH-Shift unterzogen. Bei erfolgter Zellfusion konnte Tat an den LTR binden, und somit die Expression von β -gal induzieren. Gemessen wurde die Zellfusion kolorimetrisch nach der Lyse fusionierter Zellen.

Vero- und 293-Zellen wurden in 6well-Platten ausgesät, so dass die Böden der einzelnen Wells am Tag des Versuches ca. 95% konfluent bewachsen waren. Beide Zellpopulationen wurden dann mittels Lipofectamin[®] 2000 transfiziert (2. 4. 3.) und zwar mit 4 µg DNA pro Well. Die Vero-Zellen wurden mit 2 µg pJK2 und 2 µg viralem Glykoprotein (Influenza-Virus HA, Lassa-, LCM- oder Junín-Virus GP) kotransfiziert, wohingegen die 293-Zellen mit 4 µg pL3tat transfiziert wurden. 4 h nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen, mit 200 µl Trypsin-EDTA pro Well inkubiert und anschließend in 2 ml D-MEM/10%FCS resuspendiert. Dann wurde der Inhalt je eines Wells Vero-Zellen mit dem eines Wells 293-Zellen gemischt und schüttelnd 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Je 1 ml dieser Suspension wurde dann auf insgesamt vier Wells einer 12well-Platte verteilt und über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellmischungen gewaschen und 15 min bei 37 °C mit vorgewärmtem Fusionsmedium unterschiedlicher pH-Werte inkubiert. Beim Fusionsmedium handelte es sich um RPMI-1640 mit 2% FCS, welches durch tropfenweise Zugabe einer sterilen 1 M Citratlösung auf unterschiedliche pH-Werte (pH 7.0 bis pH 3.0) eingestellt wurde. Nach diesem sogenannten pH-Shift wurde das Fusionsmedium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und dann über Nacht mit D-MEM/10%FCS inkubiert (um die bei erfolgter Fusion induzierte β-gal-Expression zu ermöglichen). 24 h nach dem pH-Shift wurden die Zellen einmal mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit 100 µl pro Well β-gal-Reporter gen Lysepuffer inkubiert. Die Lyse wurde für 10 min bei Raumtemperatur durchgeführt, wonach der Puffer mit den Zellresten in Eppendorff Reaktionsgefäße überführt wurde. Durch zweiminütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Haereus[®] Biofuge[®] (Kendro, Hanau, D) konnte ein klarer ÜS vom Zelltrümmer-Pellet abgetrennt werden. 50 µl des ÜS wurden schließlich in einer Flachboden-ELISA-Platte mit 50 µl einer 1 mM CPRG-Lösung gemischt und für 15 – 30 min bei 37 °C inkubiert bis ein Farbumschlag von gelb nach rot zu beobachten war. Zum Quantifizieren der β-gal-Aktivität wurde die Extinktion der ÜS abschließend bei 570 nm in einem ELISA-Platten-Lesegerät (Dynatech, Denkendorf, D) gemessen.

2. 6. Pseudotypen-Infektiositätsassay

In diesem Versuch wurde die Infektiosität von Lassa-Virus GP untersucht. Da Lassa-Viren unter die höchste biologische Sicherheitsstufe BSL-4 fallen, wurde GP auf der

Oberfläche von retroviralen Partikeln, sogenannten retroviralen Pseudotypen (rPT), exprimiert, und mit diesen wurden Lassa-Virus-permissive Vero-Zellen anschließend infiziert (ein „Transduktion“ genannter Vorgang). Die Arbeiten mit den rPT konnten dann unter BSL-2-Bedingungen durchgeführt werden, da diese replikationsdefizienten Partikel nach erfolgter Transduktion keine neuen rPT produzierten.

Die Infektiosität konnte quantifiziert werden, da die GP-tragenden rPT die genetische Information für das β -gal-Reportergen enthielten, welches bei erfolgreicher Transduktion gemessen werden konnte. Das Funktionsprinzip der Pseudotypisierung von retroviralen Partikeln mit Lassa-Virus GP ist in Abb. 10 schematisch dargestellt.

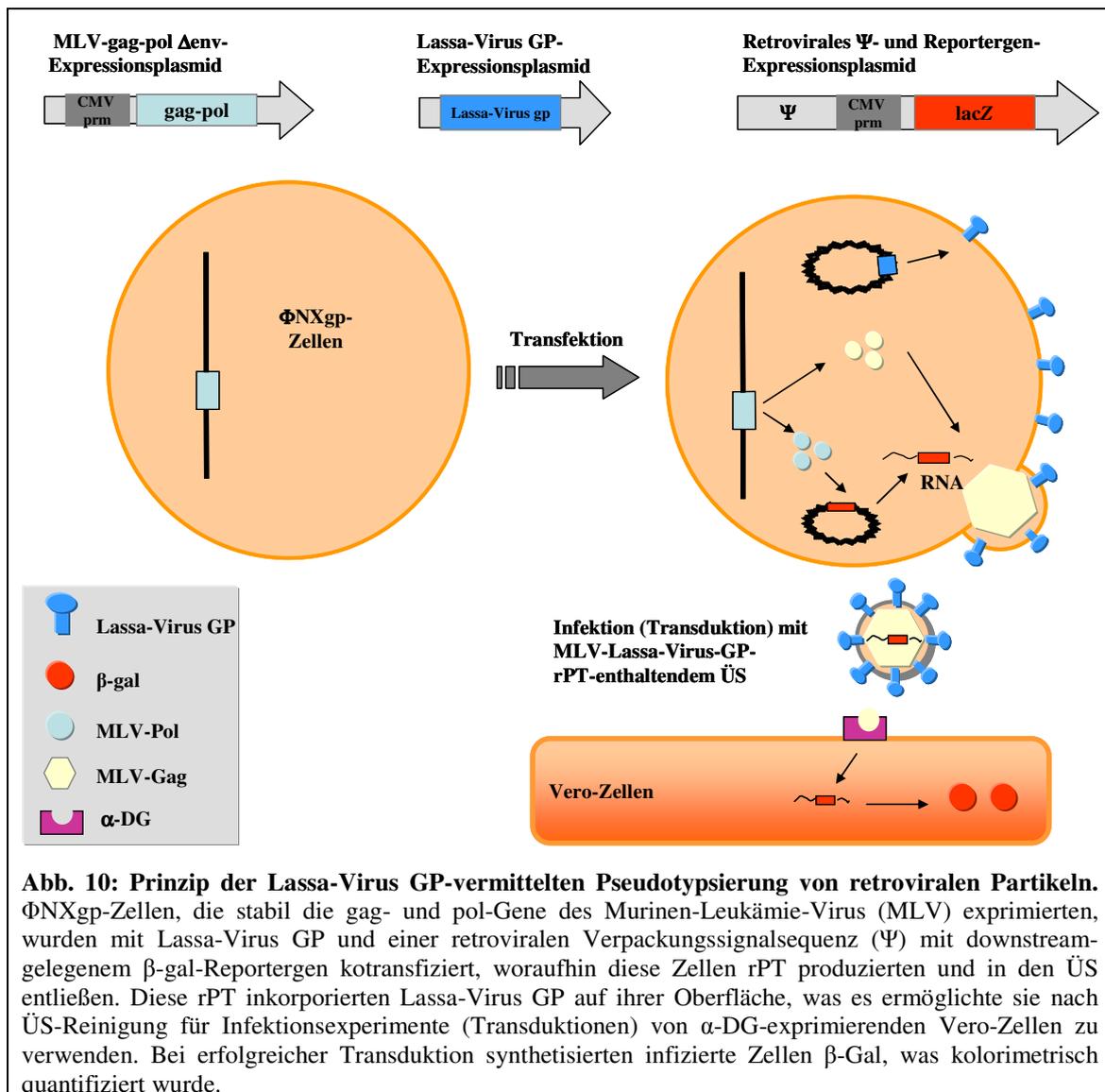


Abb. 10: Prinzip der Lassa-Virus GP-vermittelten Pseudotypisierung von retroviralen Partikeln. Φ NXgp-Zellen, die stabil die gag- und pol-Gene des Murinen-Leukämie-Virus (MLV) exprimierten, wurden mit Lassa-Virus GP und einer retroviralen Verpackungssignalsequenz (Ψ) mit downstream-gelegenen β -gal-Reportergen kotransfiziert, woraufhin diese Zellen rPT produzierten und in den \ddot{U} S entließen. Diese rPT inkorporierten Lassa-Virus GP auf ihrer Oberfläche, was es ermöglichte sie nach \ddot{U} S-Reinigung für Infektionsexperimente (Transduktionen) von α -DG-exprimierenden Vero-Zellen zu verwenden. Bei erfolgreicher Transduktion synthetisierten infizierte Zellen β -Gal, was kolorimetrisch quantifiziert wurde.

2. 6. 1. Pseudotypen-Herstellung

Φ NXgp-Zellen enthalten stabil ins Genom integriert die gag- und pol-Gene von MLV (Murines-Leukämie-Virus, Familie: *Retroviridae*, Unterfamilie: Onkoviren, Genus: C-Typ Viren). Die gag-Gene kodieren für gruppenspezifische Antigene, wohingegen die pol-Gene für die enzymatischen Aktivitäten von MLV kodieren. Kotransfiziert man ein Reporter-gen mit MLV-Verpackungssignalsequenz zusammen mit Lassa-Virus GP in Φ NXgp-Zellen, produzieren diese MLV-ähnliche Partikel (Pseudotypen), welche Lassa-Virus GP auf ihrer Oberfläche tragen. Das Prinzip der hier durchgeführten rPT-Produktion beruht auf Arbeiten von Soneoka *et al.* und wurde 1995 beschrieben. In Abwandlung des darin beschriebenen Protokolls mussten durch die Verwendung von Φ NXgp-Zellen hier nur zwei Plasmide kotransfiziert werden, um rPT herzustellen, nämlich pAdApt-Lassa-Virus-GP und pCnBg.

Φ NXgp-Zellen wurden so in 10cm-Zellkulturschalen ausgesät, dass die Schalenböden am Versuchstag zu 95% konfluent bewachsen waren. Die Zellen wurden dann mittels Lipofectamin[®] 2000 (Kap. 2. 4. 3.) mit 12 μ g pCnBg und 12 μ g pAdApt-Lassa-Virus-GP (Wildtyp oder FPS-Mutanten) kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde anstelle von pAdapt-Lassa-Virus-GP der pAdApt-Leervektor kotransfiziert. 4 h nach der Kotransfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen, anschließend mit 10 ml D-MEM/3%FCS überschichtet und schließlich für 72 h bei 37 °C inkubiert. Während dieser dreitägigen Inkubationsphase entließen solchermaßen kotransfizierte Φ NXgp-Zellen rPT-Partikel in den ÜS.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Schalen mit den Φ NXgp-Zellen für 5 min bei Raumtemperatur mit 0.5%Gluthardialdehyd-PBS⁺⁺(v/v) fixiert und nach Waschen mit PBS⁺⁺ für 10 min bei 37°C mit X-Gal-Färbelösung inkubiert. Nach Wegwaschen der Färbelösung mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop betrachtet und die eventuelle Blaufärbung positiv transfizierter Zellen dokumentiert.

2. 6. 2. Pseudotypen-Titration

Nach dreitägiger rPT-Produktion wurden die ÜS der transfizierten Φ NXgp-Zellen abgenommen, 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und durch ein 0,2 μ m-Filter filtriert, um eventuell verbliebene Zelltrümmer zu entfernen. Dann wurden 50 μ l dieser ÜS direkt mit 15 μ l 4x SDS-PAGE-Probenpuffer gemischt und in zwei Ansätzen zu jeweils 20 μ l

einer SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot unterzogen. Ein Ansatz wurde dabei auf Lassa-Virus GP-Expression getestet, wohingegen der zweite gegen das MLV-Capsidprotein p30 gefärbt wurde. Anhand der Bandenintensität von p30 wurden die ÜS gegen Lassa-Virus Wildtyp-GP-rPT titriert und entsprechend in D-MEM verdünnt für die Infektions- bzw. Transduktionsexperimente eingesetzt. Die Auswertung der p30-Bandenintensitäten erfolgte mit der TINA2.09-Software von Raytest-Isotopenmessgeräte (Straubenhardt, D).

2. 6. 3. Pseudotypen-Transduktion

Da das Virus (bzw. der rPT) zur Oberfläche der Zellen diffundieren und adsorbieren muss, um die Transduktion auszulösen, muss die elektrostatische Abstoßung überwunden werden, die durch die negative Ladung der Zelloberfläche und die abstoßenden, sterischen, entropischen Kräfte erzeugt wird. Geladene Polymere, wie z.B. das kationische Hexadimethrinbromid (Polybrene), können diesen Prozess durch Ladungsabschirmung beeinflussen, wobei Polybrene die elektrostatische Abstoßung verringert, indem es die Zelloberflächenladung neutralisiert. So wurde durch Zugabe von 8 µg/ml Polybrene zu NIH-3T3-Zellen (Maus-Fibroblasten-Zelllinie) die Zelloberflächenladung um 61,4% verringert (Davis *et al.* 2004). Zusätzlich erhöhte diese Polybrene-Konzentration zehnfach die (rezeptor- und hüllproteinunabhängige) Virusadsorption (Davis *et al.* 2002). Daher wurden die rPT-Transduktionsexperimente sowohl in Gegenwart von 8 µg/ml Polybrene als auch ohne Polybrene durchgeführt.

Die gemäß der p30-Intensitäten titrierten rPT-enthaltenden ÜS wurden auf 1 ml mit D-MEM aufgefüllt (ggf. inkl. 8 µg/ml Polybrene, hier: 8 µl einer Stammlösung mit 1 mg/ml Polybrene) und zu 95% konfluenten Vero-Zellen in 12well-Platten gegeben, welche dann sofort 1 h bei Raumtemperatur in einer ELISA-Platten-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen, D; Model: Rotanta 460R) zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS⁺⁺ gewaschen, mit D-MEM/3%FCS überschichtet und für 2 d bei 37 °C inkubiert. Bei den Inhibitionsexperimenten mit NH₄Cl wurde nach der Infektion und vor der D-MEM/3%FCS-Zugabe 1 ml einer 50 mM NH₄Cl-Lösung zu den Zellen gegeben und 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Entfernen der NH₄Cl-Lösung wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen, mit D-MEM/3%FCS-Medium versetzt und 2 d bei 37 °C inkubiert. Die Quantifizierung der Transduktion erfolgte wie für den Zell-Zellfusionsassay beschrieben (Kap. 2. 5.), nämlich durch Bestimmung der β-gal-

Reportergenaktivität in Lysaten von Vero-Zellen, die wie oben beschrieben mit rPT infiziert wurden.

2. 7. Inhibitionsstudien

Drei synthetische Peptide (Analoge folgender Lassa-Virus GP-2-Domänen: N-FPS, I-FPS und CPI-Helix) sowie Seren von Lassafieberpatienten wurden auf deren inhibitorische Wirkung im RZZFA und im rPT-Assay getestet. Im RZZFA wurden die Peptide und die Seren sowohl im sauren Medium während des pH-Shifts als auch im normalen Medium bis 24 h nach dem pH-Shift appliziert. Im rPT-Assay wurden die Hemmstudien wie in Kapitel 2. 6. 3. für die NH_4Cl -Hemmung beschrieben durchgeführt, jedoch mit dem Zusatz, dass die Peptide und Seren zusätzlich 1 h vor der Infektion im Zellmedium inkubiert wurden.

Die Seren wurden dazu jeweils 1:20 verdünnt, und die Peptide wurden in verschiedenen nano- und mikromolaren Konzentrationen zugegeben (siehe Ergebnissteil, Kap. 3. 8.). In den Negativkontrollen der Peptid-Inhibitionen wurde anstelle der Peptide die entsprechende Menge DMSO zu den einzelnen Ansätzen zugegeben.

2. 8. Hydrophobizitätsanalyse des Lassa-Virus GP-2-N-Terminus

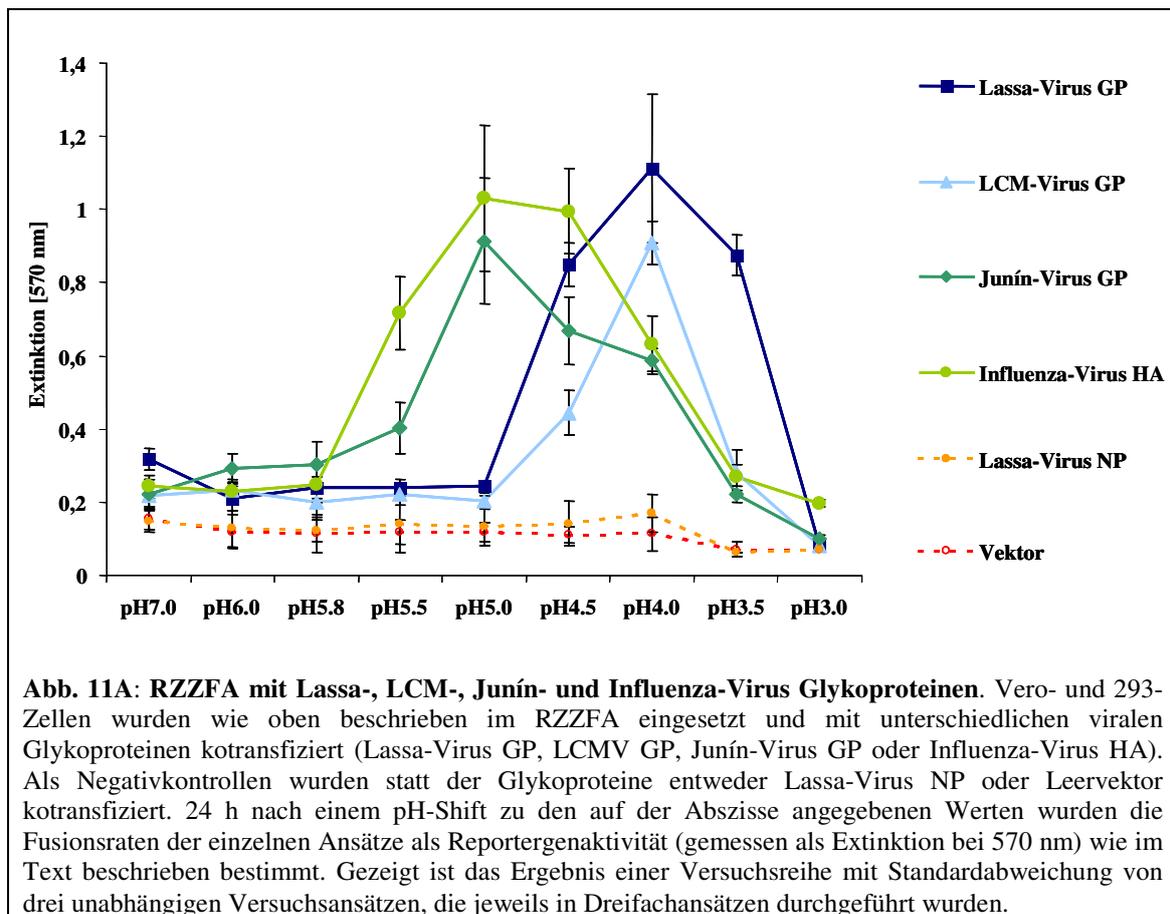
Der „Wimley-White-Hydrophobizitäts-Index“ (WWHI) wurde mittels des Programms „Membrane Protein Explorer“ vom Stephen White Labor (UC Irvine, USA) berechnet (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpex/>). Die Einstellung der „interfacial hydrophobicity“ wurde gewählt, welche Segmente berechnet, die bevorzugt in die Membrandoppelschicht integrieren. Dabei wurden den einzelnen AS experimentell bestimmte freie Transferenergiewerte zugeteilt, die deren Hydrophobizität widerspiegeln. Mit diesen Werten wurde dann die Gesamthydrophobizität der untersuchten AS-Sequenzen errechnet. Die Fenstergröße, die verwandt wurde, betrug neunzehn AS-Reste (Jaysinghe *et al.* 2006).

Neben dem Lassa-Virus GP-2-N-Terminus wurde eine entsprechende Hydrophobizitätsanalyse auch mit den N-Termini der Fusionsproteine folgender Viren durchgeführt: LCM-, Mopeia-, Junín-, Tacaribe-, Machupo-, Influenza-, HI- und Ebola-Virus.

3. ERGEBNISSE

3. 1. Lassa-Virus GP-induzierte Zell-Zellfusion nach Ansäuerungspuls

Die Membranfusion von umhüllten Viren kann in rekombinanten Zell-Zellfusionsassays (RZZFA) simuliert werden. Die Fusion von Kokulturen zweier Zellpopulationen, von denen eine das virale Hüllprotein und die andere den Virusrezeptor exprimieren, wurde durch die spezifische Transaktivierung des β -gal-Reportergens bestimmt (Nussbaum *et al.* 1995).

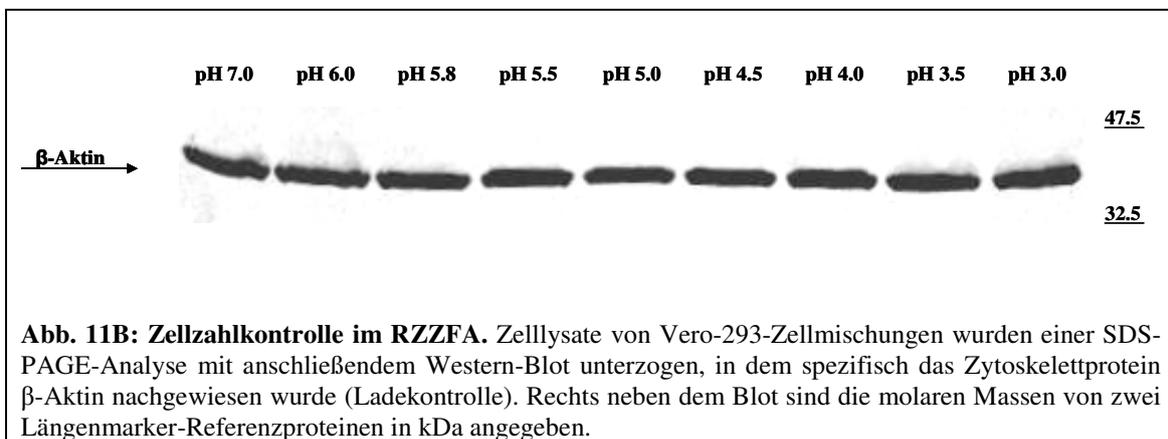


Influenza-Virus HA wurde als Positivkontrolle verwendet, da bekannt war, dass HA nach einem pH-Shift von pH 5.5 Zell-Zellfusion auslösen konnte (White *et al.* 1982). Wie in Abb. 11A zu sehen ist, löste HA Zell-Zellfusion aus, wenn ein pH-Shift zwischen 5.5 und 4.0 appliziert wurde. Ähnliches galt für das GP des Neuwelt-Arenavirus Junín-Virus: hier konnte die Zell-Zellfusion beginnend bei pH 5.5 detektiert werden, und bei pH 5.0 wurde der höchste Fusionswert des Junín-Virus GP gemessen. Lassa-Virus GP dagegen induzierte Zell-Zellfusion erst ab pH-Werten unterhalb 4.5, genau wie LCMV GP. Am stärksten war die beobachtete Lassa/LCM-Virus

GP-induzierte Zell-Zellfusion bei pH 4.0. Als Negativkontrollen wurden sowohl Lassa-Virus NP- als auch pAdApt-(Leervektor)-kotransfizierte Vero-Zellen im RZZFA eingesetzt, was in beiden Fällen nicht zur Zell-Zellfusion führte.

Das vorgestellte Testsystem des RZZFA zeigte somit, dass der Membranfusionsprozess den umhüllte Viren zum Eintritt in ihre Zielzellen benötigen, von den oberflächenständigen Glykoproteinen bewerkstelligt wird – gezeigt hier für die Glykoproteine von Lassa-, LCM-, Junín- und Influenza-Virus.

Um zu kontrollieren, dass gleiche Zellzahlen in den einzelnen Ansätzen vorlagen, wurde bei diesen nach der Lyse die Menge von β -Aktin mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Gleiche Bandenintensität zeigte an, dass in allen Ansätzen gleiche Zellzahlen vorhanden waren, was exemplarisch für eine Ansatzserie der Lassa-Virus GP-transfizierten Zellen aus Abb. 11A dargestellt ist (Abb. 11B).



3. 2. Reifespaltung von Lassa-Virus GP-C als Fusogenitätsvoraussetzung

GP-C wird durch die zelluläre Protease SKI-1/S1P in die Untereinheiten GP-1 und GP-2 gespalten (Lenz *et al.* 2001). Da SRD-Zellen SKI-1/S1P-defizient sind, konnte mit diesen Zellen getestet werden, inwieweit die GP-C-Spaltung für die Fusion erforderlich ist. SRD-Zellen sind gentechnisch veränderte CHO-Zellen, denen das SKI-1/S1P-Gen fehlt (Rawson *et al.* 1999). Demzufolge wurde zunächst getestet, ob in wildtypischen CHO-Zellen Zell-Zellfusion im oben vorgestellten Zell-Zellfusionsassay gemessen werden konnte. Abb. 12A zeigt, dass Lassa-Virus GP-kotransfizierte Wildtyp-CHO-Zellen nach einem pH-Shift von pH 4.0 Zell-Zellfusion zeigten. Die Fusionsaktivität von Wildtyp-CHO-Zellen wurde dann mit der von SRD-Zellen verglichen, und wie Abb. 12A zeigt, fusionierten Lassa-Virus GP-transfizierte SRD-Zellen nicht nach pH-4.0-Inkubation. Wurden SRD-Zellen jedoch zusätzlich zu

Lassa-Virus GP mit einem Plasmid für die exogene Expression von SKI-1/S1P (pCDNA-SKI-1/S1P) kotransfiziert, zeigten diese Zell-Zellfusion. Die hierbei gemessene Fusogenität der GP-/SKI-1-kotransfizierten SRD-Zellen erreichte die gleiche Stärke, wie diejenige in GP-/Leervektor-kotransfizierten Wildtyp-CHO-Zellen.

Zur Verifikation der korrekten Prozessierung des Lassa-Virus GP-C in diesem Experiment wurde mit einem zusätzlichen Versuchsansatz eine Western-Blot-Analyse durchgeführt, deren Ergebnis in Abb. 12B zu sehen ist. Ungespaltenes GP-C konnte in allen Ansätzen detektiert werden, in denen Lassa-Virus GP transfiziert wurde. Zusätzlich konnte das Spaltprodukt GP-2 nachgewiesen werden, und zwar in Wildtyp-CHO-Zellen und in SRD-Zellen, die mit GP und SKI-1/S1P kotransfiziert worden waren. Demgegenüber konnte GP-2 nicht in SRD-Zellen detektiert werden, die nur mit dem Lassa-Virus GP-Vektor kotransfiziert worden waren.

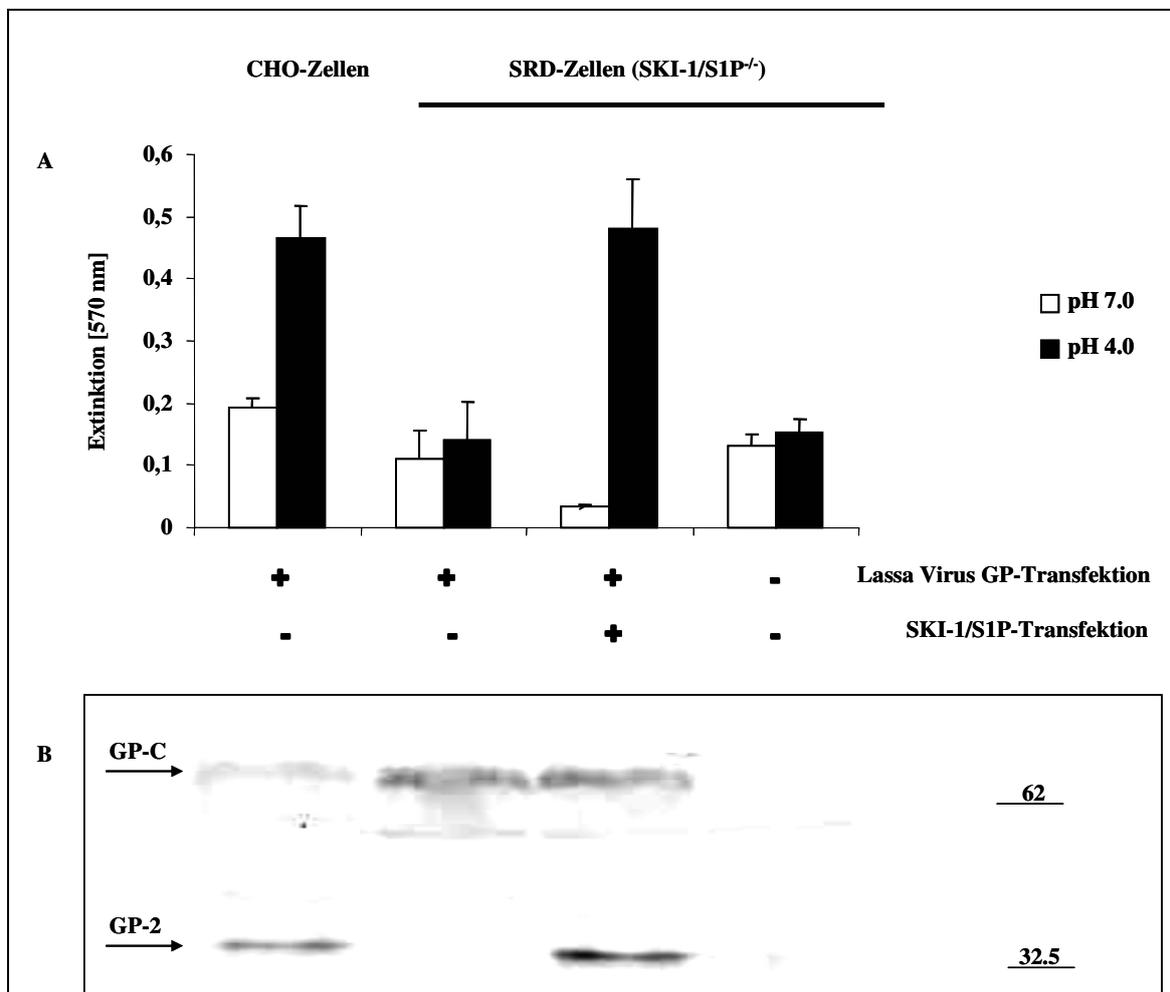


Abb. 12: Die Reifespaltung von GP-C in die Untereinheiten GP-1 und GP-2 ist Voraussetzung für dessen Fusogenität. (A) Lassa-Virus GP-kotransfizierte CHO- und SRD-Zellen zeigten nur dann Zell-Zellfusion nach einem pH-4.0-Shift im RZZFA, wenn GP-C gespalten vorlag. Dabei zeigten SRD-Zellen, denen die GP-C-Prozessierungsprotease SKI-1/S1P fehlte, nur im Falle einer exogenen Komplementierung mittels Kotransfektion von pCDNA-SKI-1/S1P Fusion. SRD-Zellen, die mit GP alleine kotransfiziert wurden, zeigten hingegen keine Fusion nach pH-4.0-Shift. Gezeigt ist das Ergebnis einer Versuchsreihe mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchsansätzen, die jeweils mit

Dreifachansätzen durchgeführt wurden. (B) *Western-Blot-Analyse von Lassa-Virus GP- bzw. SKI-1/SIP-kotransfizierten CHO- und SRD-Zellen.* Während CHO-Zellen GP-C ohne Kotransfektion von SKI-1/SIP spalteten, zeigten SRD-Zellen nur im Falle einer SKI-1/SIP-Kotransfektion Reifespaltung, hier gezeigt durch das Vorhandensein einer GP-2-Bande. Rechts neben dem Blot sind die molaren Massen von zwei Längenmarker-Referenzproteinen in kDa angegeben.

Die fehlende Reifespaltung von GP-C in GP-1 und GP-2 verhinderte also die Zell-Zellfusion. Dieses Experiment zeigte somit, dass die Spaltung von GP-C eine Voraussetzung für die Fusionseigenschaft des Lassa-Virus Glykoproteins darstellte.

3. 3. Einfluss der GP/Z/NP-Koexpression auf die Zell-Zellfusion

Im Inneren eines Lassa-Viruspartikels befindet sich der zytoplasmatische Anteil des Fusionsproteins GP-2 (C-Terminus) in räumlicher Nähe des Matrixproteins Z (Neuman *et al.* 2005). In einer Arbeit zur Bestimmung der LCM-Virionenmorphologie wurde ein Crosslinking-Experiment durchgeführt, welches zeigte, dass GP-2 und NP assoziiert vorlagen (Burns und Buchmeier 1991). Beide Befunde ließen daher vermuten, dass diese viralen Proteine als Proteinkomplexe vorliegen könnten. Demzufolge wurde im RZZFA untersucht, ob Koexpression dieser drei Lassa-Virusproteine die Zellfusion beeinflusst.

Dazu wurden Vero-Zellen wie in Kap. 3. 1. beschrieben im RZZFA eingesetzt und dabei zusätzlich zum Lassa-Virus GP mit Lassa-Virus Z- und/oder Lassa-Virus NP-kodierenden Plasmiden kotransfiziert. Diese Ansätze – zusammen mit Kontrollen, in denen kein GP-Plasmid kotransfiziert wurde – wurden mit Medium unterschiedlicher pH-Werte inkubiert (pH 7.0, pH 6.0, pH 5.0 und pH 4.0) und 24 h später auf β -gal-Aktivität, d. h. auf Fusion, getestet.

Abb. 13A zeigt, dass GP-transfizierte Ansätze Zellfusion auslösten, wenn pH 4.0 appliziert wurde. Dabei konnte entsprechend den in Kap. 3. 1. beschriebenen Befunden in keinem Ansatz Fusion bei einem pH-Wert $>$ pH 4.0 beobachtet werden. Ferner zeigten Kotransfektionsansätze von GP mit Z und/oder NP keine gesteigerten Fusionsaktivitäten nach pH-4.0-Shift. Es konnte in diesen Ansätzen eine leichte (jedoch nichtsignifikante, vgl. Fehlerbalken der Standardabweichungen) Verminderung der Fusion beobachtet werden.

Um die Expression der einzelnen Lassa-Virus Proteine zu verifizieren, wurden Western-Blot-Analysen der einzelnen Ansätze durchgeführt, die bestätigten, dass die einzelnen Proteine in den jeweiligen Proben exprimiert wurden. Als Kontrolle, dass jeder Ansatz

die gleiche Anzahl von Zellen enthielt, wurde die Expressionsstärke des β -Aktins durch Western-Blot-Analyse bestimmt. Dabei konnte bestätigt werden, dass die unterschiedlichen Ansätze gleiche Zellzahlen aufwiesen (Abb. 13B).

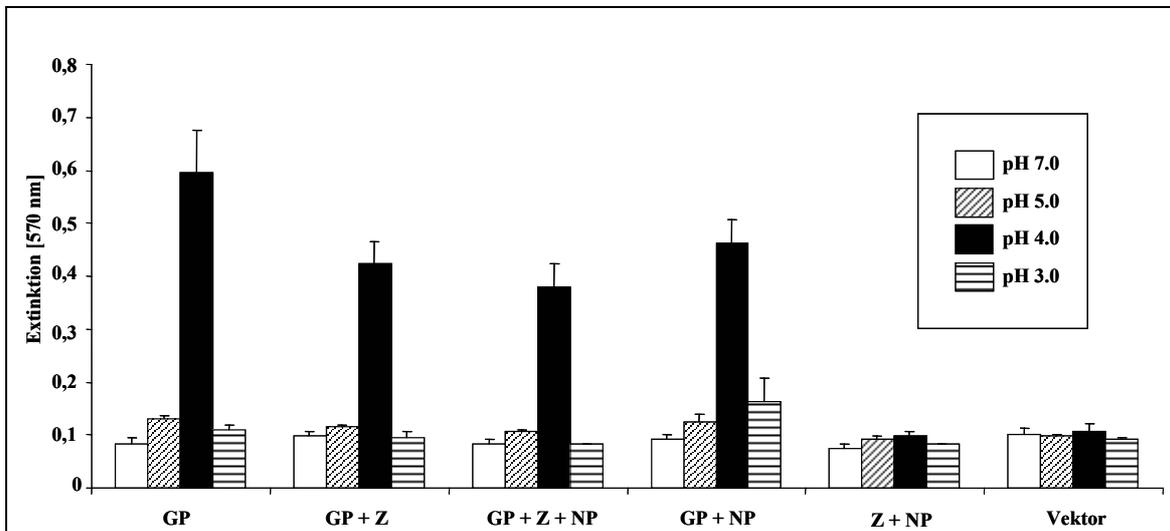


Abb. 13A: Beeinflussung der Fusogenität von Lassa-Virus GP durch Koexpression mit Lassa-Virus Z und/oder Lassa-Virus NP. Kotransfektionsansätze von Lassa-Virus GP mit NP und/oder Z in verschiedenen Kombinationen wurden, wie auf der Abszisse angegeben, im RZZFA eingesetzt und mit verschiedenen pH-Werten inkubiert. 24 h post-pH-Shift wurden die Ansätze lysiert und auf β -gal-Aktivität getestet, die als Extinktion bei 570 nm gemessen wurde. Die vier pH-Werte, mit denen die einzelnen Ansätze geschiftet wurden, sind wie folgt dargestellt: pH 7.0 (weiß), pH 5.0 (schraffiert), pH 4.0 (schwarz) und pH 3.0 (quergestreift). Gezeigt ist das Ergebnis einer Versuchsreihe mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchsansätzen, die jeweils mit Dreifachansätzen durchgeführt wurden.

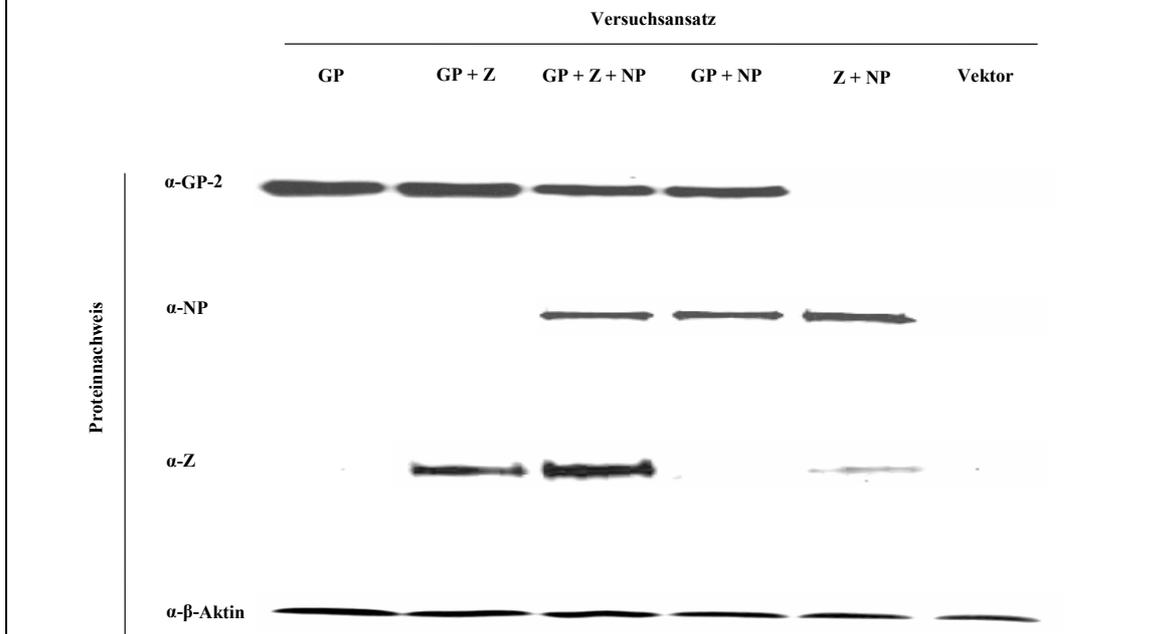


Abb. 13B: Verifikation der Lassa-Virusproteinexpressionen mittels Western-Blot-Analyse. Die in Abb. 13A dargestellten Ansätze wurden 48 h nach der Kotransfektion entweder im RZZFA eingesetzt (Abb. 13A) oder in 4x SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen und nach SDS-PAGE mit den angegebenen Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen. Dabei wurden die polyklonalen anti-Lassa-Virus-Peptid-Antiseren mit einem sekundären anti-Kaninchen-Antikörper detektiert, während der monoklonale anti- β -Aktin-Antikörper mit einem sekundären anti-Maus-Antikörper nachgewiesen wurde.

3. 4. Strukturelle Analyse der Lassa-Virus Fusionsdomänen

Der N-Terminus des Lassa-Virus Fusionsproteins GP-2 enthält zwei hydrophobe Bereiche, die beide als FPS-Domänen postuliert wurden (Kap. 1. 6. 7.). In Tab. 3 ist derjenige Abschnitt des GP-2-N-Terminus im Einbuchstaben-AS-Kode dargestellt, der beide putativen FPS-Domänen beinhaltet. Beim Lassa-Virus GP-2 handelt es sich dabei um einen 39 AS-Reste langen Bereich (AS 260 – AS 298 in der Nummerierung des Josiah Lassa-Virus GP), welcher sich an die Reifespaltungsspaltstelle mit dem Spaltmotiv RRLL anschließt.

Vergleichend dazu sind die GP-2-N-Termini zweier weiterer Altwelt-Arenaviren (LCM- und Mopeia-Virus) und dreier Neuwelt-Arenaviren (Junín-, Tacaribe- und Machupo-Virus) dargestellt. Mittels des Computerprogramms „Membrane Protein Explorer“ wurden diese N-terminalen Domänen auf ihre Hydrophobizität hin untersucht (Stephen White Labor, UC Irvine, USA). Das Programm errechnete dabei die Hydrophobizität als WWHI, indem es jeder einzelnen AS einen gewissen Hydrophobizitätswert zuwies. Der berechnete Wert des WWHI gibt dabei an, welche Regionen am wahrscheinlichsten in Membranen integrieren können, denn je höher die Hydrophobizität des entsprechenden Bereiches ist, desto energetisch begünstigter ist die Interaktion von (hydrophober) Membran und (hydrophobem) FPS (Jaysinghe *et al.* 2006).

Als Kontrollen wurden die WWHI der N-Termini von drei anderen viralen Fusionsproteinen bestimmt, deren FPS bereits charakterisiert sind: Influenza-, Ebola- und HI-Virus (Earp *et al.* 2004). Wie Tab. 3 zeigt, liegen die FPS dieser drei Kontrollviren (jeweils fett hervorgehoben) ganz oder teilweise in den errechneten, wahrscheinlichsten Membraninsertionsbereichen (jeweils unterstrichen). Dies zeigte, dass die Berechnung des WWHI-Wertes für die Bestimmung von viralen FPS valide Daten lieferte. Außerdem wiesen die errechneten WWH-Indices von Influenza-, Ebola- und HI-Virus allesamt höhere freie Transferenergiewerte auf als die untersuchten Arenaviren, was bedeuten könnte, dass Arenaviren weniger starke Fusogene sind als die drei untersuchten Kontrollviren.

Tab. 3: WWHI-Vorhersage der N-Termini der membranverankerten Glykoproteinuntereinheiten von Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren sowie von Influenza-, Ebola- und HI-Virus.

Virus	Spaltmotiv	AS-Sequenz des Transmembranprotein-N-Terminus	WWHI [kcal/mol]
Lassa ^a	RRLI	GTFTWTLSDSE <u>GGYCLTRWMLIEAELKCFG</u> N TAV 260/1 298/39	0.44
LCM ^a	RRLS	GTFTWTLSDSSGVENP <u>GGYCLTKWMILAAELKCFG</u> N TAV	2.11
Mopeia ^a	RRLI	GLFTWTLSDSEGNDMP <u>GGYCLTRSMLIGLDL</u> KCFG N TAI	1.99
Junín ^c	RSLK	<u>AFFSWSLTDSSGKDTPGGYCLEEWMLVAAKMKCFG</u> N TAV	1.12
Tacaribe ^b	RTLK	<u>AFFSWSLTDPLGNEAPGGYCLEKWMLVASEL</u> KCFG N TAI	1.24
Machupo ^c	RSLK	<u>AFFSWSLTDSSGKDMPGGYCLEEWMLIAAKMKCFG</u> N TAV	1.49
Influenza ^d	RRKR	<i>GLFGAIAGFIENGWEG</i> <u>LVDGWYCFRHQNAQ</u> GEGTAADYK	2.35
Ebola ^d	RRTR	EAIVNAQPKCNPNLHYWTTQDE <i>GAAIGLAWIPYFG</i> PAAE	2.80
HIV ^d	REKR	<i>AVGILGAMFLGFLGAAGSTMGAAS</i> VTLTVQARQLLSGIV	3.21

Die membranverankerten Glykoproteinuntereinheiten der Altwelt-Arenaviren Lassa-Virus Stamm Josiah (GeneBank Accession Nr. AAA46286), LCMV Stamm WE (P07399) und Mopeia-Virus (AAC08700), die Neuwelt-Arenaviren Junín-Virus Stamm MC2 (BAA00964), Tacaribe-Virus (NP_694849) und Machupo-Virus (AAS77879) sowie Influenza-Virus (A/FPV/Weybridge(H7N7)) (AAA56803), Zaire Ebola-Virus (AAA96744) und HIV-1 (AAR00908) wurden mittels des Programms „Membrane Protein Explorer“ untersucht. Das Programm berechnete die neunzehn AS-Reste langen Proteinregionen, deren Membraninsertion am wahrscheinlichsten ist (Regionen jeweils unterstrichen). Für Influenza-, Ebola- und HI-Virus sind die FPS fett und kursiv hervorgehoben (Earp *et al.* 2004). Die Nummerierung des Lassa-Virus GP-2 erfolgte gemäß der GP-Nummerierung (260-298) und gemäß der GP-2-Nummerierung (1-39). Diejenigen AS, die in der weiter unten beschriebenen FPS-Mutationsanalyse ausgetauscht wurden, sind fett hervorgehoben. Der WWHI ist als freier Transferenergiewert ΔG (Reaktionsrichtung: Membran \rightarrow Wasser) in kcal/mol angegeben.

^a N-Termini und SKI-1/S1P-Spaltstellen experimentell bestimmt (Lenz *et al.* 2001, Beyer *et al.* 2003)

^b N-Terminus experimentell bestimmt (Burns und Buchmeier 1993)

^c N-Termini und SKI-1/S1P-Spaltstellen vorhergesagt (York *et al.* 2004)

^d N-Termini und Furin-Spaltstellen experimentell bestimmt (Stieneke-Grober *et al.* 1992, Volchkov *et al.* 1998, Garten *et al.* 1994)

Tab. 3 verdeutlicht, dass beim Auswählen eines neunzehn AS-Fensters zur Berechnung des WWHI-Wertes zwei unterschiedliche Membraninsertionsregionen für die GP-2-

N-Termini von Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren errechnet wurden. Während die Neuwelt-Arenaviren eine N-terminale Region der AS-Sequenz „FFSWSLTDSSGKDTPGGYC“ als hydrophobsten, wahrscheinlichsten Membraninsertionsbereich aufwiesen, zeigten die Altwelt-Arenaviren einen entsprechenden weiter C-terminal gelegenen, internen Bereich der AS-Abfolge „GGYCLTRWMLIEAELKCFG“.

Diese Ergebnisse zeigten, dass trotz der relativ hohen Sequenzkonservierung der arenaviralen N-Termini unterschiedliche Bereiche als FPS für Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren in Frage kommen könnten. Außerdem zeigte der N-Terminus des Lassa-Virus GP-2, verglichen mit allen anderen untersuchten viralen Fusionsproteinen, mit 0.44 kcal/mol den geringsten, errechneten WWH-Index, was bedeuten könnte, dass das Lassa-Virus das schwächste Fusogen der untersuchten Gruppe darstellt.

3. 5. Funktionelle Analyse der Lassa-Virus Fusionsdomänen

Da Mutationen in den FPS-Domänen von viralen Fusionsproteinen häufig mit einem Verlust der Fusionseigenschaften einhergehen, und solche Mutationen als ein positives Kriterium zur Identifizierung viraler FPS herangezogen werden können (Kap. 1. 7. 5.), wurden hydrophobe und konservierte AS in beiden postulierten FPS einzeln zu Alanin, Arginin oder Leuzin ausgetauscht und im Weiteren biochemisch sowie im Hinblick auf deren Fusogenität und Infektiosität untersucht.

3. 5. 1. Mutationsanalyse der beiden postulierten Fusionsdomänen im GP-2

Für eine Mutationsanalyse der beiden postulierten FPS-Domänen im Lassa-Virus GP-2 (Kap. 1. 6. 7.) wurden achtzehn verschiedene hydrophobe AS-Reste, sowie ein Prolin- und ein Cystein-Rest in beiden FPS ausgewählt und einzeln zu Alanin, Arginin oder Leuzin mutiert. In Abb. 14 ist zusammenfassend dargestellt, bei welchen AS-Resten dies durchgeführt wurde.

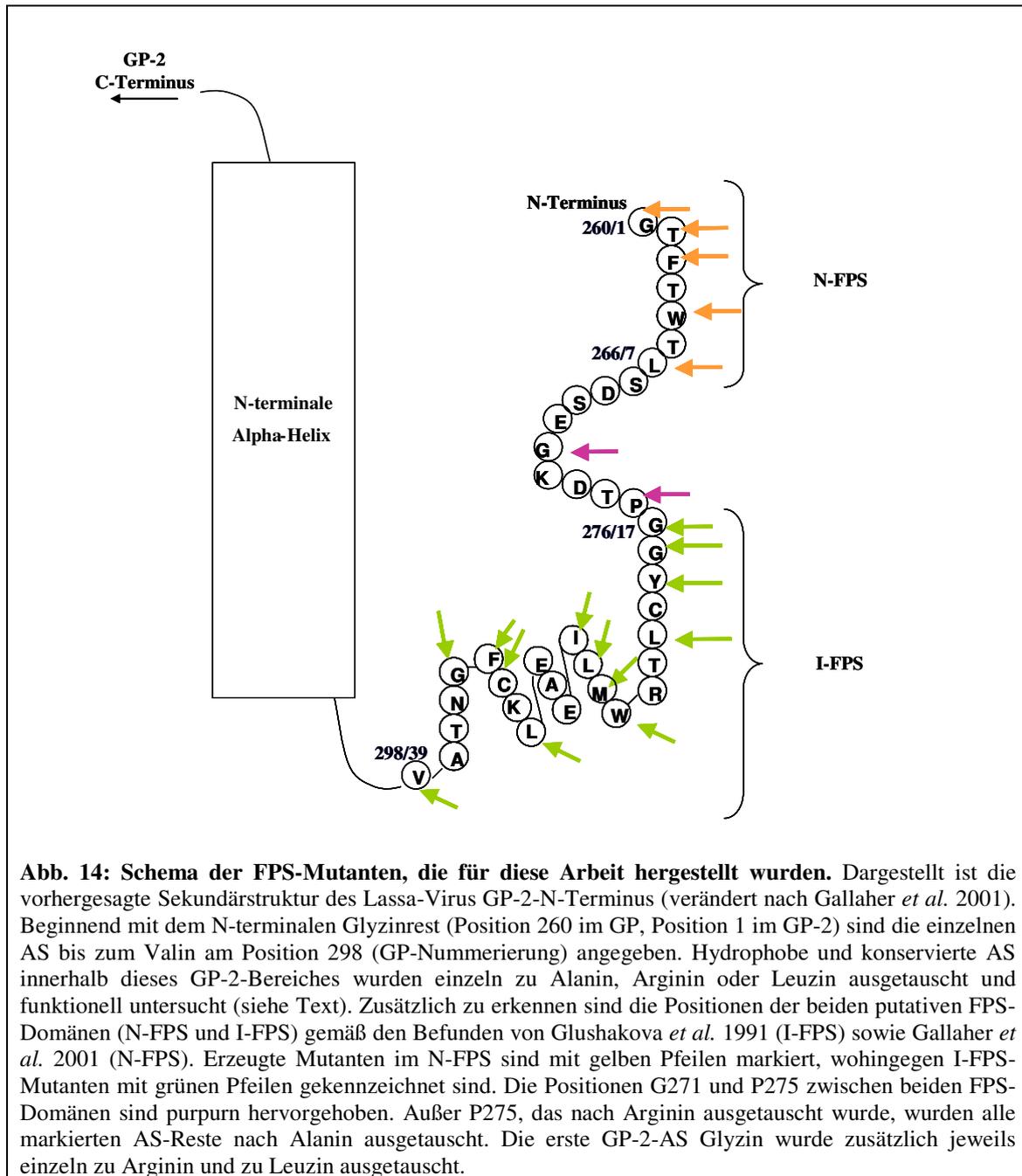
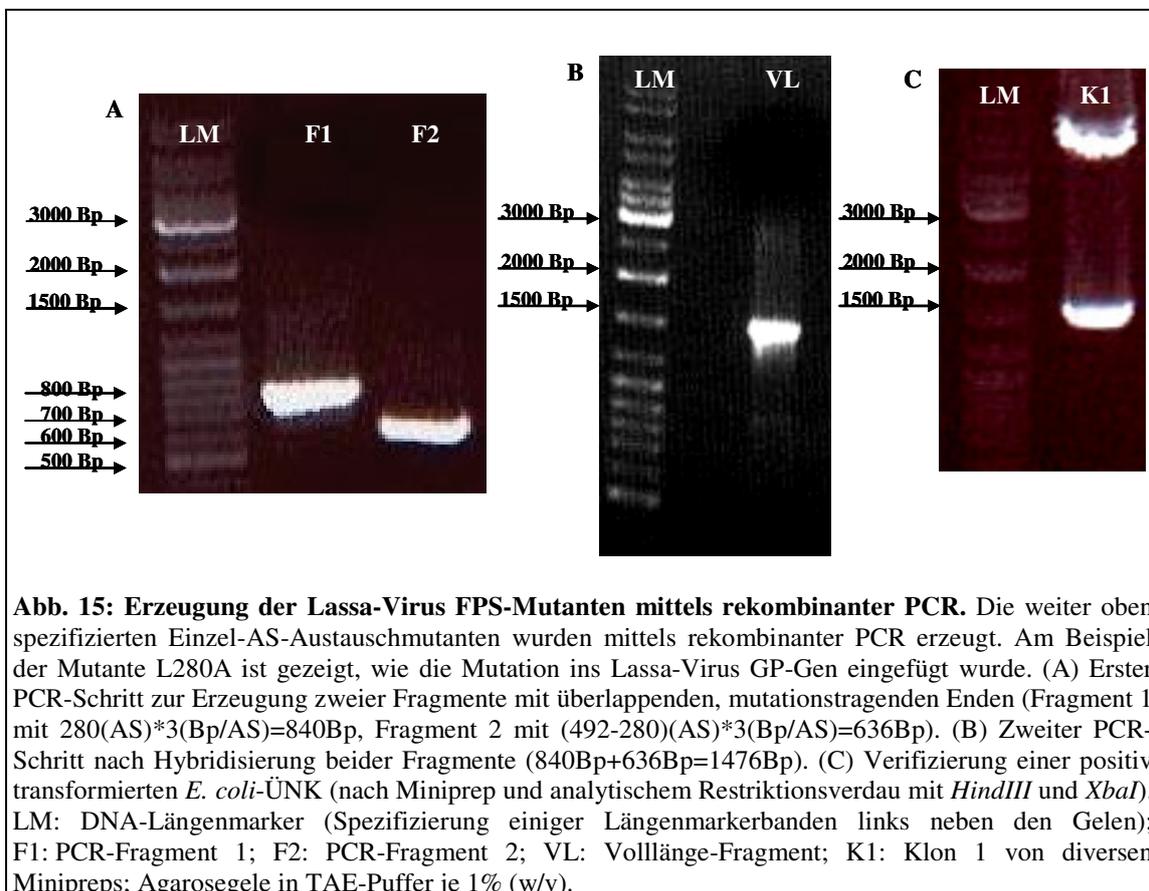


Abb. 14: Schema der FPS-Mutanten, die für diese Arbeit hergestellt wurden. Dargestellt ist die vorhergesagte Sekundärstruktur des Lassa-Virus GP-2-N-Terminus (verändert nach Gallaher *et al.* 2001). Beginnend mit dem N-terminalen Glyzinrest (Position 260 im GP, Position 1 im GP-2) sind die einzelnen AS bis zum Valin am Position 298 (GP-Nummerierung) angegeben. Hydrophobe und konservierte AS innerhalb dieses GP-2-Bereiches wurden einzeln zu Alanin, Arginin oder Leuzin ausgetauscht und funktionell untersucht (siehe Text). Zusätzlich zu erkennen sind die Positionen der beiden putativen FPS-Domänen (N-FPS und I-FPS) gemäß den Befunden von Glushakova *et al.* 1991 (I-FPS) sowie Gallaher *et al.* 2001 (N-FPS). Erzeugte Mutanten im N-FPS sind mit gelben Pfeilen markiert, wohingegen I-FPS-Mutanten mit grünen Pfeilen gekennzeichnet sind. Die Positionen G271 und P275 zwischen beiden FPS-Domänen sind purpurn hervorgehoben. Außer P275, das nach Arginin ausgetauscht wurde, wurden alle markierten AS-Reste nach Alanin ausgetauscht. Die erste GP-2-AS Glyzin wurde zusätzlich jeweils einzeln zu Arginin und zu Leuzin ausgetauscht.

Nach Herstellung der Mutanten mittels rekombinanter PCR (Kap. 3. 5. 2.) wurden diese durch Sequenzierung auf Korrektheit überprüft und dahingehend untersucht, ob sie (i) korrekt reifegespalten wurden (Kap. 3. 5. 3.), (ii) gespaltenes Fusionsprotein an die Zelloberfläche transportiert wurde (Kap. 3. 5. 4.), (iii) inwiefern sie die Fusion beeinflussten (Kap. 3. 6.) und (iv) wie sie sich auf die Infektiosität auswirkten (Kap. 3. 7.).

3. 5. 2. Herstellung von Lassa-Virus FPS-Mutanten mittels rekombinanter PCR

Die oben benannten Lassa-Virus FPS-Mutanten wurden mit rekombinanter PCR erzeugt. Dazu wurden für jede Mutante in einem ersten PCR-Schritt zwei Fragmente erzeugt, die vom Start-Codon bis zur einzuführenden Mutation (Fragment 1) bzw. von der einzuführenden Mutation bis zum Stopp-Codon (Fragment 2) reichten. Nach Hybridisierung beider Fragmente und einem anschließenden zweiten PCR-Schritt mit den Start- und Stopp-Codon-umspannenden Primern (inkl. Restriktionsschnittstellen für die nachfolgende Klonierung) wurde ein neues Volllänge-Fragment erzeugt (Fragment 1 + Fragment 2), welches dann für die weitere Klonierung eingesetzt wurde. Am Beispiel der Mutante L280A (im I-FPS gelegen) ist in Abb. 15 beispielhaft dargestellt, wie dieser Mutageneseprozess bewerkstelligt wurde.



3. 5. 4. Oberflächenexpression der Lassa-Virus FPS-Mutanten

Nach der Reifespaltungsanalyse der FPS-Mutanten wurde untersucht, ob gespaltenes GP-2 auch an die Zelloberfläche von transient transfizierten Vero-Zellen transportiert wurde. Dazu wurde eine Oberflächenbiotinylierung mit anschließender Immunpräzipitation durchgeführt. Diese Methode beruhte darauf, dass zunächst alle Oberflächenproteine einer transfizierten Zelle mit Biotin markiert und anschließend nach Zellyse mit Strepavidin-Sepharose gefällt wurden. Nach SDS-PAGE konnten GP-C und GP-2 spezifisch auf einer Nylonmembran mittels Western-Blot-Analyse mit dem polyklonalen GP-2-spezifischen Kaninchen-Antikörper anti-GP477 immunpräzipitiert werden. Mit dieser Methode wurden Lassa-Virus Wildtyp-GP und die zweiundzwanzig FPS-Mutanten auf ihre Zelloberflächenexpression getestet. In Abb. 17A ist dargestellt, dass für alle Mutanten zwar ungespaltenes GP-C auf der Oberfläche von transient transfizierten Vero-Zellen zu finden ist, das Spaltprodukt GP-2 jedoch nicht für alle Mutanten auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Für acht der einundzwanzig reifegespaltenen FPS-Mutanten konnte kein GP-2 an der Zelloberfläche detektiert werden: T261A, F262A und L266A im N-FPS sowie M284A, L285A, I286A, C292A und F293A im I-FPS. GP-2 der Mutanten G260R, W264A, G271A, P275R und L280A wurde zwar an der Zelloberfläche gefunden, jedoch in geringerer Menge als beim Wildtyp. Für die restlichen acht FPS-Mutanten konnte GP-2 in dem Wildtyp vergleichbarer Menge nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um die Mutanten G260A im N-FPS, sowie G276A, G277A, Y278A, W283A, L290A, G294A und V298A im I-FPS. Standardisiert wurde dieses Experiment durch den Nachweis des β -Aktins, was in Abb. 17B gezeigt ist.

Diese Untersuchung zeigte damit, dass, korrelierend mit der unterschiedlichen Spaltungseffizienz der einzelnen GP-2-Mutanten, auch der Transport zur Zelloberfläche nach transients Expression beeinträchtigt war. Die Tatsache, dass für alle Mutanten sowie für den Wildtyp ungespaltenes GP-C an der Oberfläche von Zellen detektiert wurde, entspricht der *in vivo* Situation von infizierten Vero-Zellen, allerdings wird ungespaltenes GP-C im weiteren Infektionsverlauf nicht in sich von der Zellmembran abschnürende Partikel inkorporiert (Lenz *et al.* 2001).

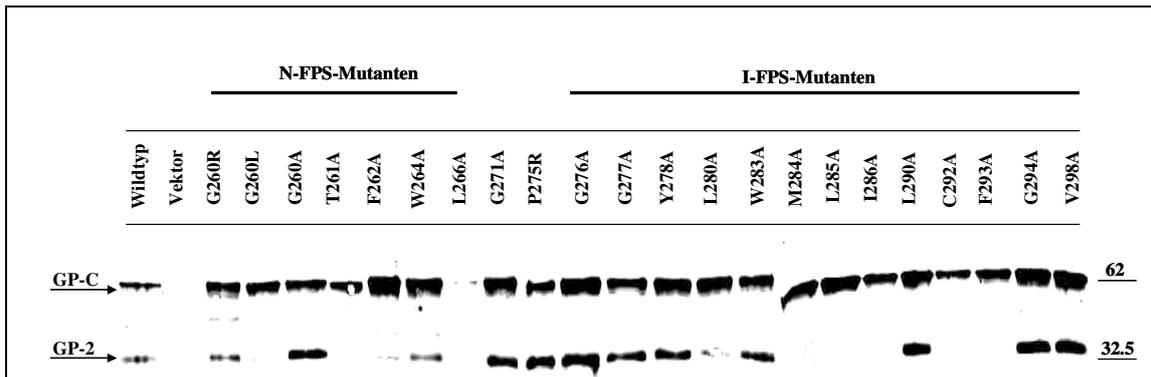


Abb. 17A: Zelloberflächenexpression der Lassa-Virus FPS-Mutanten. Zweiundzwanzig Lassa-Virus GP-2-Mutanten wurden nach transienter Expression in Vero-Zellen oberflächenbiotinyliert und immunpräzipitiert. Nach SDS-PAGE (12% Polyacrylamid, reduzierend) und folgendem Western-Blot wurden die sieben N-FPS-Mutanten, dreizehn I-FPS-Mutanten sowie zwei zwischen den postulierten FPS liegende Mutanten untersucht. Das Vorhandensein einer GP-2-Bande zeigte Oberflächentransport der Reifespaltungsprodukte an, was in allen Fällen mit der GP-2-Intensität von nichtmutiertem Wildtyp-GP verglichen wurde. Die Mutantenbenennung erfolgte analog Abb. 16. Rechts neben dem Blot sind die molaren Massen von zwei Längenmarker-Referenzproteinen in kDa angegeben.

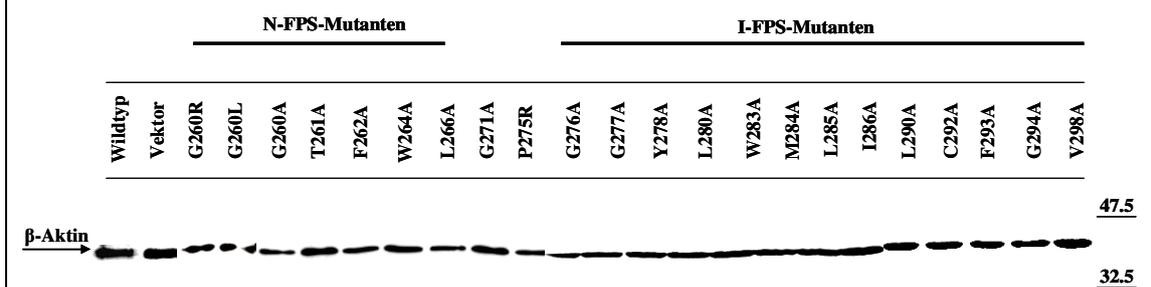


Abb. 17B: Zellzahlkontrolle beim Oberflächenbiotinylierungsexperiment. Vero-Zellen, die transient mit den oben angegebenen Lassa-Virus GP-Konstrukten transfiziert wurden, wurden entweder oberflächenbiotinyliert und immunpräzipitiert (Abb. 17A) oder ohne Biotinylierung (Parallelansätze) einer SDS-PAGE (12% Polyacrylamid, reduzierend) mit anschließendem Western-Blot unterzogen, in dem spezifisch das Zytoskelettprotein β-Aktin nachgewiesen wurde. Gleiche Bandenintensitäten zeigten an, dass in allen Ansätzen gleiche Zellmengen vorlagen. Rechts neben dem Blot sind die molaren Massen von zwei Längenmarker-Referenzproteinen in kDa angegeben.

Grundsätzlich ließen sich durch die in den Kap. 3. 5. 1. – 3. 5. 4. dargestellten biochemischen Untersuchungen zwei Gruppen von FPS-Mutanten charakterisieren: eine Gruppe mit Mutationen, die keinen Einfluss auf Reifespaltung und Zelloberflächentransport zeigten, sowie eine weitere Gruppe von Mutanten, die entweder fehlende oder eingeschränkte Reifespaltungseigenschaften (und demzufolge auch eingeschränkten Oberflächentransport) zeigten oder trotz wildtypischer Spaltung nicht oder in verringertem Ausmaß an die Zelloberfläche transportiert wurden. In Tab. 4 sind die einzelnen GP-2-Mutanten dahingehend zusammengefasst.

Tab. 4: Zusammenfassende strukturelle und biochemische Charakterisierung der Lassa-Virus FPS-Mutanten.

Mutante	FPS-Lokalisation	WWHI* [kcal/mol]	Reife- spaltung	Oberflächen- expression
Wildtyp	-	0,44	+++	+++
G260R	N-FPS	0,44	(+)	(+)
G260L	N-FPS	0,44	-	-
G260A	N-FPS	0,44	+++	+++
T261A	N-FPS	0,44	(+)	-
F262A	N-FPS	0,44	+++	-
W264A	N-FPS	0,44	+++	++
L266A	N-FPS	0,44	+++	-
G271A	-	0,44	+++	++
P275R	-	0,44	+++	++
G276A	I-FPS	0,28	+++	+++
G277A	I-FPS	0,28	+++	+++
Y278A	I-FPS	0	+++	+++
L280A	I-FPS	0	+++	++
W283A	I-FPS	0	+++	+++
M284A	I-FPS	0,04	(+)	-
L285A	I-FPS	0	(+)	-
I286A	I-FPS	0	(+)	-
L290A	I-FPS	0	+++	+++
C292A	I-FPS	0,03	+++	-
F293A	I-FPS	0	(+)	-
G294A	I-FPS	0,28	+++	+++
V298A	I-FPS	0,44	+++	+++

Einzel-AS-Austauschmutationen in beiden postulierten Lassa-Virus FPS-Domänen (N-FPS und I-FPS) wurden wie oben beschrieben gentechnisch erzeugt, mittels WWHI-Analyse strukturell analysiert und biochemisch auf Reifespaltung und Zelloberflächenexpression getestet. Dargestellt sind neben der Benennung der einzelnen Mutanten und deren Zugehörigkeit zu den postulierten FPS-Domänen die Intensitäten der gefundenen Reifespaltungen und Oberflächenexpressionen, jeweils im Vergleich zum Wildtyp (+++: wie Wildtyp, (+): weniger als Wildtyp jedoch detektierbar, -: nicht detektierbar). *Dargestellt sind die WWHI der gesamten neununddreißig AS-Reste langen GP-2-N-Termini mit den jeweiligen Mutationen.

3. 6. Fusogenität der Lassa-Virus FPS-Mutanten

Mit Hilfe des RZZFA wurde nun das Fusionsverhalten der einzelnen Lassa-Virus FPS-Mutanten mit derjenigen des Wildtyp-GP verglichen, was in Abb. 18 graphisch dargestellt ist.

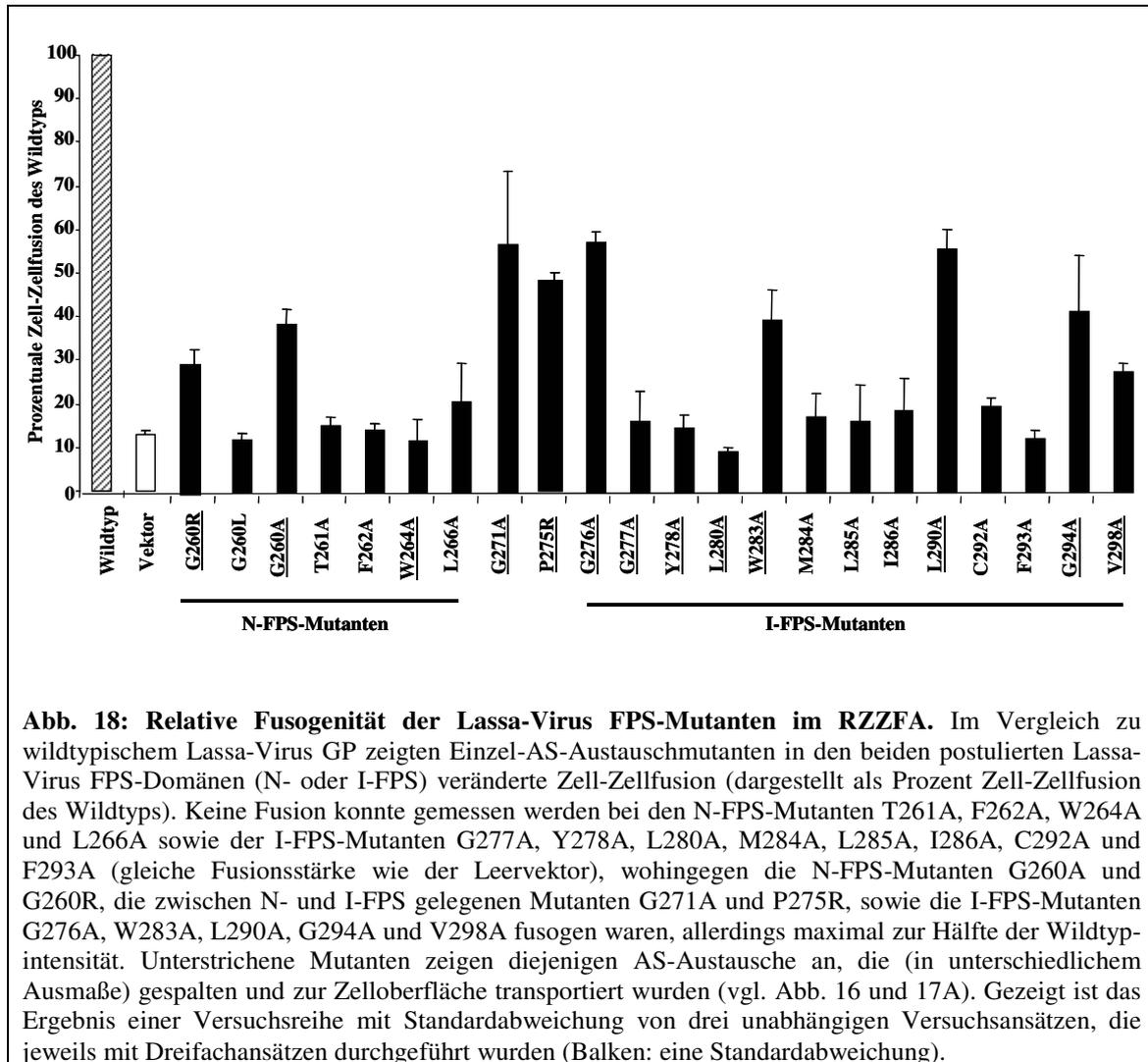


Abb. 18: Relative Fusogenität der Lassa-Virus FPS-Mutanten im RZZFA. Im Vergleich zu wildtypischem Lassa-Virus GP zeigten Einzel-AS-Austauschmutanten in den beiden postulierten Lassa-Virus FPS-Domänen (N- oder I-FPS) veränderte Zell-Zellfusion (dargestellt als Prozent Zell-Zellfusion des Wildtyps). Keine Fusion konnte gemessen werden bei den N-FPS-Mutanten T261A, F262A, W264A und L266A sowie der I-FPS-Mutanten G277A, Y278A, L280A, M284A, L285A, I286A, C292A und F293A (gleiche Fusionsstärke wie der Leervektor), wohingegen die N-FPS-Mutanten G260A und G260R, die zwischen N- und I-FPS gelegenen Mutanten G271A und P275R, sowie die I-FPS-Mutanten G276A, W283A, L290A, G294A und V298A fusogen waren, allerdings maximal zur Hälfte der Wildtypintensität. Unterstrichene Mutanten zeigen diejenigen AS-Austausche an, die (in unterschiedlichem Ausmaße) gespalten und zur Zelloberfläche transportiert wurden (vgl. Abb. 16 und 17A). Gezeigt ist das Ergebnis einer Versuchsreihe mit Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchsansätzen, die jeweils mit Dreifachansätzen durchgeführt wurden (Balken: eine Standardabweichung).

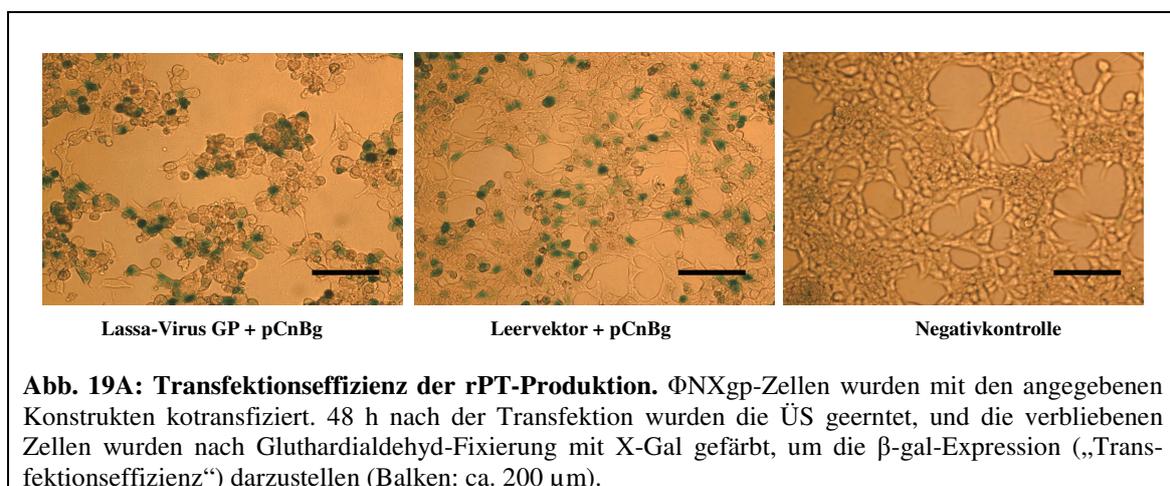
Im RZZFA mit den FPS-Mutanten wurde für diejenigen weiter oben bezeichneten Mutanten, die nicht oder nur in geringerem Maße als der Wildtyp an die Zelloberfläche von transfizierten Vero-Zellen transportiert wurden (s. Abb. 17A u. Tab. 4), festgestellt, dass diese Mutanten keine Zell-Zellfusion induzieren konnten. Es handelte sich dabei um folgende Mutanten: G260L, T261A, F262A, W264A und L266A aus dem N-FPS sowie L280A, M284A, L285A, I286A, C292A und F293A aus dem I-FPS. Demgegenüber konnte eine verringerte Fusogenität im Vergleich zum Wildtyp beim Großteil derjenigen FPS-Mutanten beobachtet werden, die in Wildtypstärke bzw. in leicht verringertem Maße verglichen mit Wildtyp-GP an die Zelloberfläche transportiert

wurden. Dies waren G260A und G260R im N-FPS, G271A und P275R zwischen den postulierten FPS sowie G276A, W283A, L290A, G294A und V298A im I-FPS. Die Fusogenität dieser Mutanten war jeweils um mindestens 50% gegenüber dem Wildtyp reduziert. Für zwei FPS-Mutanten jedoch, die in Wildtypstärke an die Zelloberfläche transportiert wurden, konnte keine Zell-Zellfusionsaktivität gefunden werden. Es handelte sich dabei um die Mutanten G277A und Y278A, die beiden N-terminalen Reste des I-FPS. Diese beiden FPS-Mutanten waren somit nicht aufgrund von Beeinträchtigungen während der Glykoproteinreifung und des Glykoproteintransports nichtfusogen, sondern vielmehr aufgrund veränderter Fusionseigenschaften.

3. 7. Retroviraler Pseudotypenassay (rPT-Assay)

3. 7. 1. Lassa-Virus GP-vermittelte Pseudotypisierung von MLV-Partikeln

Um die funktionelle Bedeutung der Lassa-Virus FPS-Mutanten in einem weiteren *in vitro* Verfahren zu untersuchen, wurde ein weiter oben beschriebenes Testsystem entwickelt (Kap. 2. 6.), welches Lassa-Virus GP-vermittelte Infektionen in einem rekombinanten System ermöglichte. Die Pseudotypisierung von MLV-Partikeln mit LCMV GP wurde bereits früher gezeigt (Beyer *et al.* 2002). Hier wurde nun erstmals die MLV-Pseudotypisierung mit Lassa-Virus GP durchgeführt (Abb. 19A), was dadurch bestätigt wurde, dass unmutiertes Lassa-Virus GP Vero-Zellen transduzierte. Dies wurde durch die β -gal-Aktivität in solchermaßen transduzierten Zellen gezeigt, die das quantifizierbare Resultat einer rPT-Infektion darstellte (Abb. 19B).



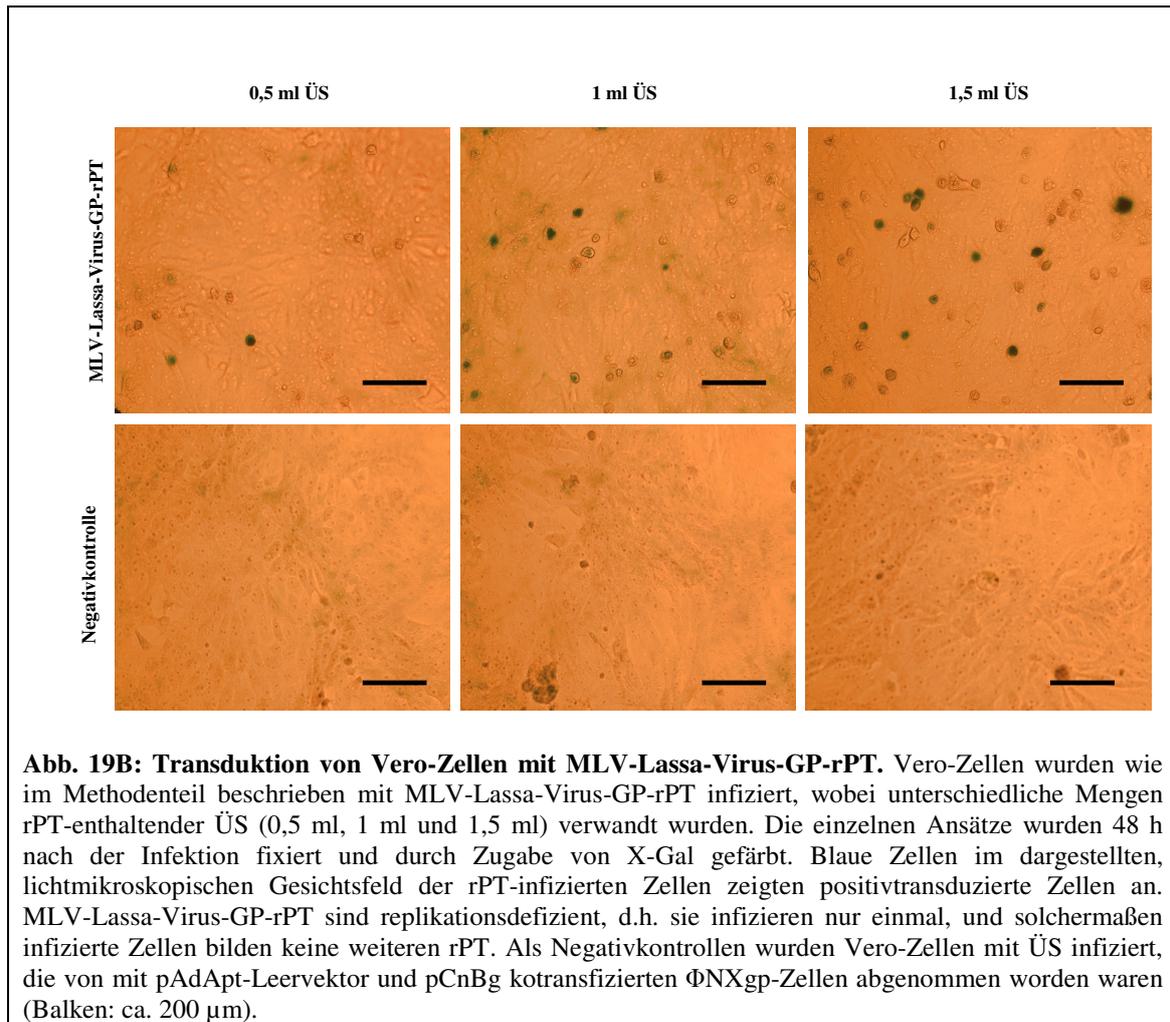


Abb. 19B: Transduktion von Vero-Zellen mit MLV-Lassa-Virus-GP-rPT. Vero-Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben mit MLV-Lassa-Virus-GP-rPT infiziert, wobei unterschiedliche Mengen rPT-enthaltender ÜS (0,5 ml, 1 ml und 1,5 ml) verwandt wurden. Die einzelnen Ansätze wurden 48 h nach der Infektion fixiert und durch Zugabe von X-Gal gefärbt. Blaue Zellen im dargestellten, lichtmikroskopischen Gesichtsfeld der rPT-infizierten Zellen zeigten positivtransduzierte Zellen an. MLV-Lassa-Virus-GP-rPT sind replikationsdefizient, d.h. sie infizieren nur einmal, und solchermaßen infizierte Zellen bilden keine weiteren rPT. Als Negativkontrollen wurden Vero-Zellen mit ÜS infiziert, die von mit pAdApt-Leervektor und pCnBg kotransfizierten Φ NXgp-Zellen abgenommen worden waren (Balken: ca. 200 μ m).

Die Bestimmung der MLV-Lassa-Virus-GP-rPT-Titer wurde durch Auszählen von mindestens zehn lichtmikroskopischen Gesichtsfeldern von transduzierten Vero-Zellen durchgeführt, wovon einige in Abb. 19B dargestellt sind. Bei Infektionen mit 1 ml rPT-ÜS (Abb. 19B, oben, Mitte) wurden im gezeigten Beispiel acht positivtransduzierte (blaugefärbte) Vero-Zellen gezählt, von etwa 460 Zellen insgesamt im gezählten, lichtmikroskopischen Gesichtsfeld. Dies entsprach also ca. $2 \cdot 10^4$ TU/ml (Transfer-einheiten [engl.: transfer units] pro ml). Diese TU-Titer für Wildtyp-GP-tragende MLV-Lassa-Virus-GP-rPT wurden typischerweise bei den hier durchgeführten Experimenten beobachtet. Im Vergleich hierzu lagen die TU-Titer für MLV-LCMV-GP-rPT, die bereits früher beschrieben wurden, bei ca. 10^5 TU/ml (Beyer *et al.* 2002). Versuche zur Optimierung der TU-Titer bei der MLV-Lassa-Virus-GP-rPT-Produktion (Kap. 2. 6. 1.) mit Kombinationen unterschiedlichen Mengen transfizierter DNA oder Lipofectamin[®] 2000 wurde durchgeführt, ergaben allerdings keine höheren TU-Titer (Daten nicht gezeigt).

3. 7. 2. Hemmung von MLV-Lassa-Virus-GP-rPT mit NH₄Cl

Das hier vorgestellte auf rPT basierende Infektionssystem wurde benutzt, um die pH-Abhängigkeit der Fusion zu untersuchen.

Dazu wurde die MLV-Lassa-Virus-GP-rPT-Infektion in Anwesenheit der lysosomotropen Substanz NH₄Cl durchgeführt. NH₄Cl hemmt die Ansäuerung von Endosomen und Lysosomen. Durch die hervorgerufene Hemmung sollten MLV-Lassa-Virus-GP-rPT-Partikel nicht mehr in der Lage sein, Vero-Zellen zu transduzieren, weil sie nicht mehr endosomal/lysosomal aufgenommen werden können. Abb. 20 zeigt, dass die Zugabe von NH₄Cl (50 mM Endkonzentration) für 1 h nach der rPT-Infektion tatsächlich die Transduktion von Vero-Zellen verhindern konnte.

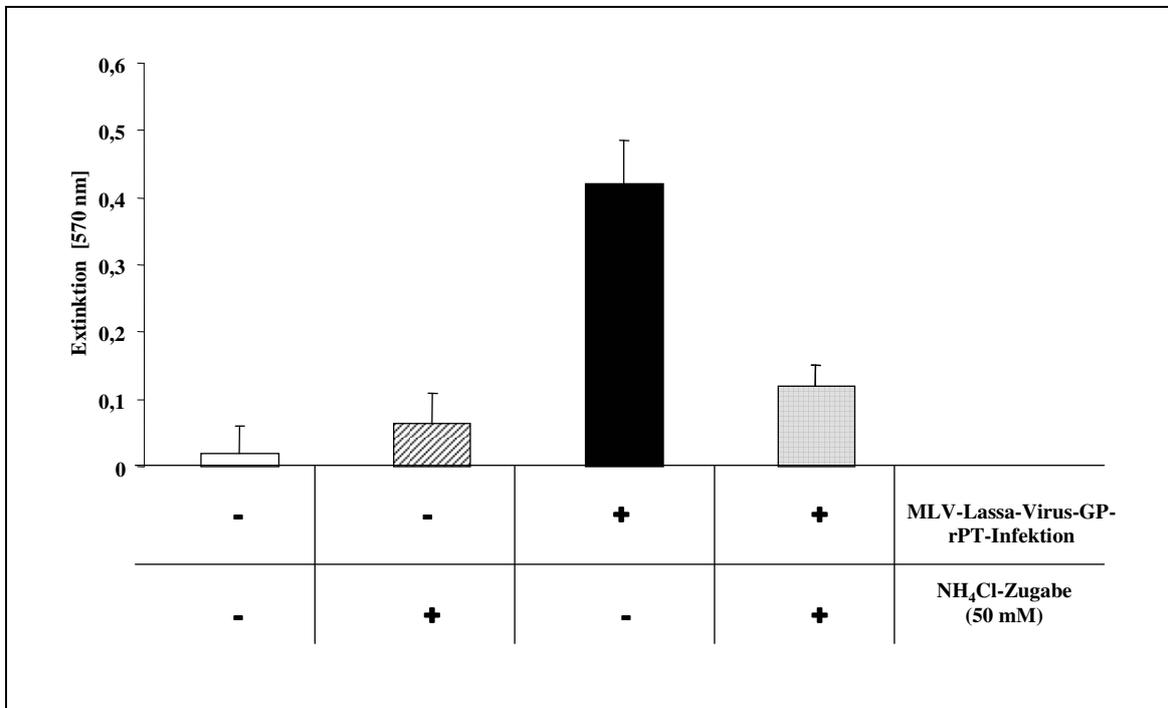


Abb. 20: NH₄Cl-induzierte Hemmung der MLV-Lassa-Virus-GP-rPT-Transduktion. Vero-Zellen, die mit MLV-Lassa-Virus-GP-rPT infiziert wurden, wurden für 1 h nach Abnahme des infektiösen rPT-enthaltenen ÜS mit 50 mM NH₄Cl-Lösung inkubiert, und 2 d nach der Infektion wurde die Transduktionseffizienz mit nicht-NH₄Cl-behandelten Ansätzen verglichen. Es zeigte sich, dass die NH₄Cl-Behandlung die MLV-Lassa-Virus-GP-induzierte Transduktion verhinderte. Gezeigt ist das Ergebnis einer Versuchsreihe von drei unabhängigen Versuchsansätzen, die jeweils mit Dreifachansätzen durchgeführt wurden (Balken: eine Standardabweichung).

3. 7. 3. Titration von MLV-Lassa-Virus-GP-rPT

Um die oben erwähnte Untersuchung der Infektiositäten der Lassa-Virus FPS-Mutanten durchzuführen, wurden rPT für alle Mutanten wie oben beschrieben hergestellt. Da die dazu verwendeten Zellen wegen der benötigten Mengen an Zellmaterial nicht für alle

Mutanten gleichzeitig durchgeführt werden konnte, wurden die gewonnen rPT-enthaltenden ÜS bei -80°C gelagert bis die rPT aller Mutanten vorlagen. Um diese dann auf gleiche rPT-Mengen einzustellen (Titration) wurden die partikelhaltigen ÜS aufgetaut und standardisiert.

Vor der Infektion mit MLV-Lassa-Virus-GP-rPT wurden die rPT der unterschiedlichen FPS-Mutanten mittels Vergleichs der Intensitäten des MLV-Capsidproteins p30 titriert. Dazu wurden die einzelnen geernteten rPT-ÜS direkt mittels eines Western-Blots analysiert und p30 mit einem kommerziellen anti-p30-Anitserum nachgewiesen sowie quantifiziert. Die gefundene, unterschiedlichstarke p30-Bandenintensität ist in Abb. 21 dargestellt. Der Western-Blot zeigte, dass nicht alle transfizierten ΦNXgp-Zellen gleiche Mengen an MLV-LASV-GP-rPT produzierten. Die dabei gefundenen quantitativen Unterschiede schwankten zwischen 19% und 119% des Wildtyps. Die p30-Bandenintensitäten der einzelnen Mutanten (sowie der Negativkontrolle, für die kein virales Glykoprotein in ΦNXgp-Zellen kotransfiziert wurde) wurde mit derjenigen vom Wildtyp-GP verglichen und entsprechend eingestellt.

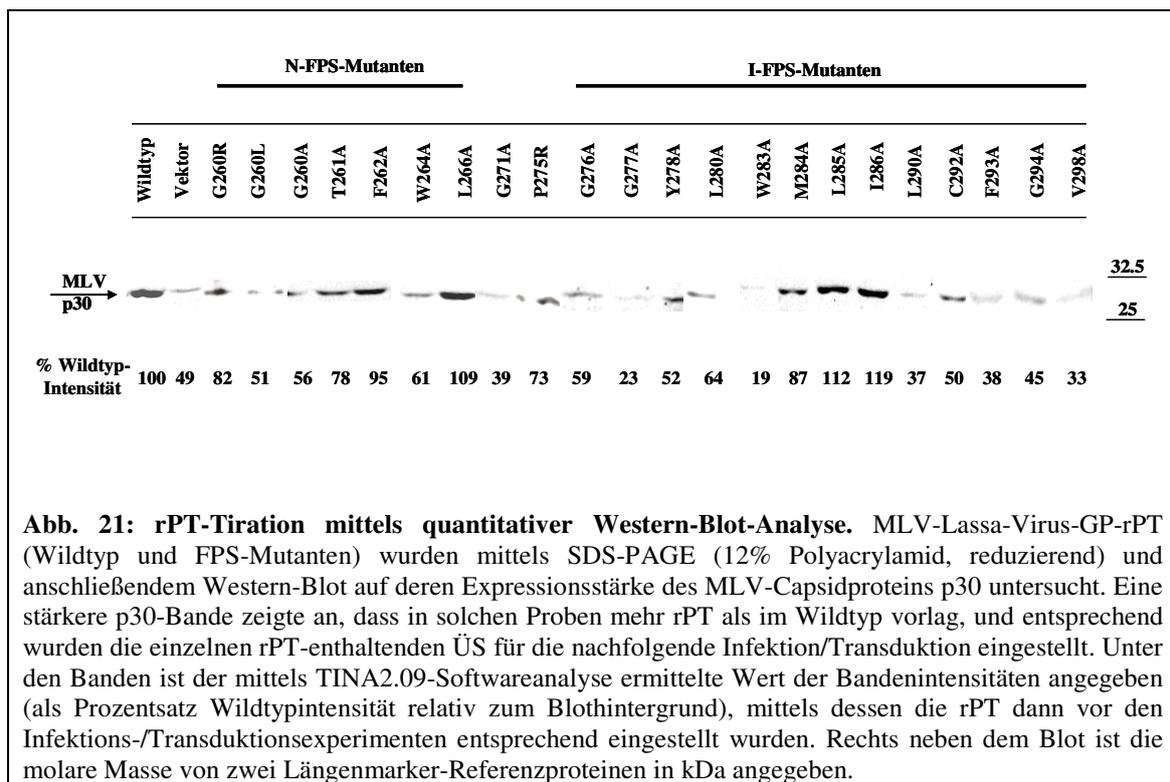


Abb. 21: rPT-Titration mittels quantitativer Western-Blot-Analyse. MLV-Lassa-Virus-GP-rPT (Wildtyp und FPS-Mutanten) wurden mittels SDS-PAGE (12% Polyacrylamid, reduzierend) und anschließendem Western-Blot auf deren Expressionsstärke des MLV-Capsidproteins p30 untersucht. Eine stärkere p30-Bande zeigte an, dass in solchen Proben mehr rPT als im Wildtyp vorlag, und entsprechend wurden die einzelnen rPT-enthaltenden ÜS für die nachfolgende Infektion/Transduktion eingestellt. Unter den Banden ist der mittels TINA2.09-Softwareanalyse ermittelte Wert der Bandenintensitäten angegeben (als Prozentsatz Wildtypintensität relativ zum Blothintergrund), mittels dessen die rPT dann vor den Infektions-/Transduktionsexperimenten entsprechend eingestellt wurden. Rechts neben dem Blot ist die molare Masse von zwei Längenmarker-Referenzproteinen in kDa angegeben.

3. 7. 4. Inkorporation der Lassa-Virus FPS-Mutanten in rPT

Im Folgenden wurden die Lassa-Virus FPS-Mutanten dahingehend untersucht, inwieweit diese nach Inkorporation in rPT-Partikel Vero-Zellen transduzieren konnten.

Zunächst wurde dazu überprüft, welche FPS-Mutanten MLV-Partikel pseudotypisieren konnten. In Abb. 22 ist zusammenfassend dargestellt, wie die einzelnen FPS-Mutanten in rPT inkorporiert wurden.

Der Einbau des Lassa-Virus GP in rPT-Partikel wurde durch Western-Blot-Analyse in infektiösen ÜS von Φ NXgp-Produzentenzellen direkt nachgewiesen (Abb. 22). Dabei zeigte sich, dass neben dem Wildtyp auch neun Lassa-Virus FPS-Mutanten in rPT-Partikel inkorporiert werden konnten: G260R und G260A (im N-FPS gelegen), G271A und P275R (zwischen N- und I-FPS) sowie G276A, G277A, L280A, W283A und L290A (im I-FPS lokalisiert). Für all diese FPS-Mutanten, die als gespaltenes GP-2 in rPT inkorporiert wurden, konnte weiter oben gezeigt werden, dass diese in Wildtyp-GP-ähnlichen Mengen an die Zelloberfläche von transfizierten Zellen transportiert wurden (Kap. 3. 5. 4.). Diese FPS-Mutanten konnten MLV also effizient pseudotypisieren. Auch alle anderen FPS-Mutanten pseudotypisierten MLV, allerdings konnte bei diesen nur das ungespaltene GP-C-Vorläuferprotein in die Partikel eingebaut werden. Dies ist im Western-Blot in Abb. 22 dargestellt.

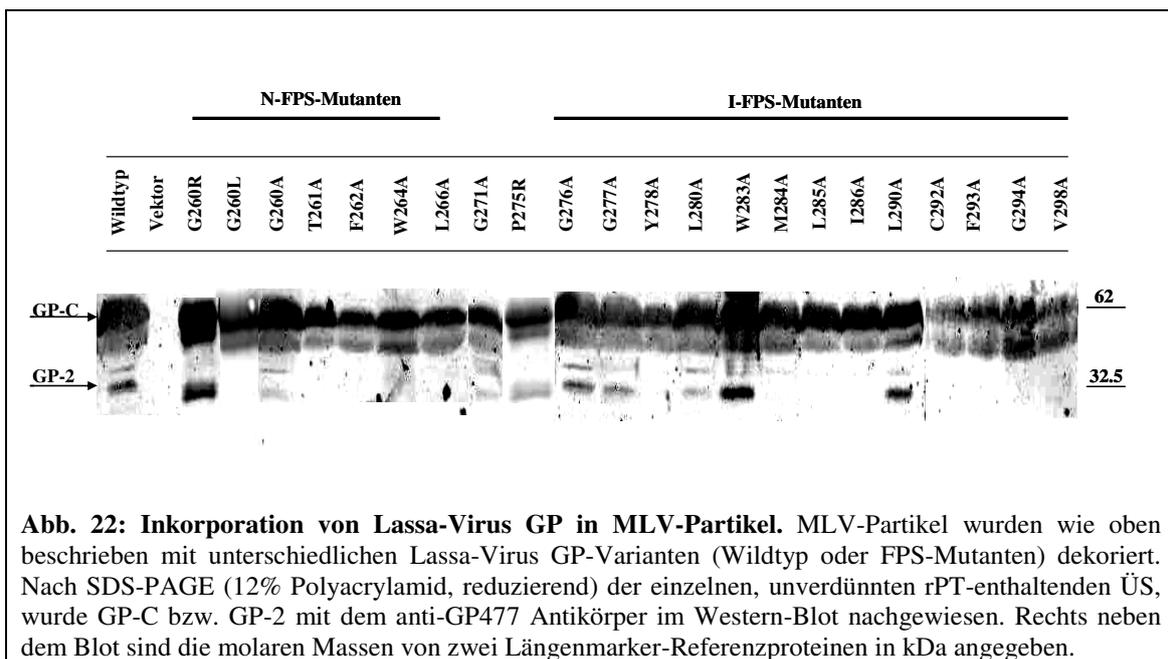


Abb. 22: Inkorporation von Lassa-Virus GP in MLV-Partikel. MLV-Partikel wurden wie oben beschrieben mit unterschiedlichen Lassa-Virus GP-Varianten (Wildtyp oder FPS-Mutanten) dekoriert. Nach SDS-PAGE (12% Polyacrylamid, reduzierend) der einzelnen, unverdünnten rPT-enthaltenden ÜS, wurde GP-C bzw. GP-2 mit dem anti-GP477 Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. Rechts neben dem Blot sind die molaren Massen von zwei Längenmarker-Referenzproteinen in kDa angegeben.

Diese Experimente zeigten, dass Lassa-Virus GP retrovirale Vektoren pseudotypisieren konnte. Allerdings waren die rPT-Titer gering, und nicht alle GP-/FPS-Mutanten wurden als gespaltenes GP-2 inkorporiert. Im Unterschied zur *in vivo* Situation, in der kein ungespaltenes GP-C auf der Lassa-Virushülle zu finden ist (Lenz *et al.* 2000), wurde es demgegenüber im hier vorgestellten Assay-System sehr wohl als

ungespaltener Vorläufer in MLV-Partikel eingebaut. Gleiches wurde bereits früher für LCMV GP-pseudotypisierte MLV-Partikel gezeigt (Beyer *et al.* 2002).

3. 7. 5. rPT-Infektiosität der Lassa-Virus FPS-Mutanten

Die titrierten MLV-Lassa-Virus-GP-rPT der unterschiedlichen GP-2-Mutanten sowie des Wildtyps und der Negativkontrolle (Leervektor) wurden nachfolgend für die Transduktion von Vero-Zellen verwendet. Dabei wurde die Transduktionseffizienz (Infektiosität) mittels der jeweiligen β -gal-Expressionsstärken in lysierten, transduzierten Ansätzen zwei Tage nach der Infektion quantifiziert. Die dabei gefundenen unterschiedlichen β -gal-Expressionraten der einzelnen Mutanten sind in Abb. 23 dargestellt. Zusätzlich wurde die rPT-Infektiosität der Mutanten in zwei verschiedenen Versuchsansätzen verglichen: Zunächst wurde die Infektion in Gegenwart des kationischen Polymers Polybrene durchgeführt (schwarze Balken in Abb. 23). Polybrene verstärkt die rPT-Adsorption an Zellen dadurch, dass es elektrische Ladungen der Zelloberfläche neutralisiert und somit die Diffusion und Adsorption der Partikel beschleunigt (Davis *et al.* 2004). Da dieser adsorptionsverstärkende Effekt bei Retrovirusinfektionen rezeptorunabhängig ist, wurden die hier durchgeführten Transduktionsexperimente mit Lassa-Virus GP-Mutanten-rPT in einem Parallelansatz ohne Polybrene durchgeführt (weiße Balken in Abb. 23).

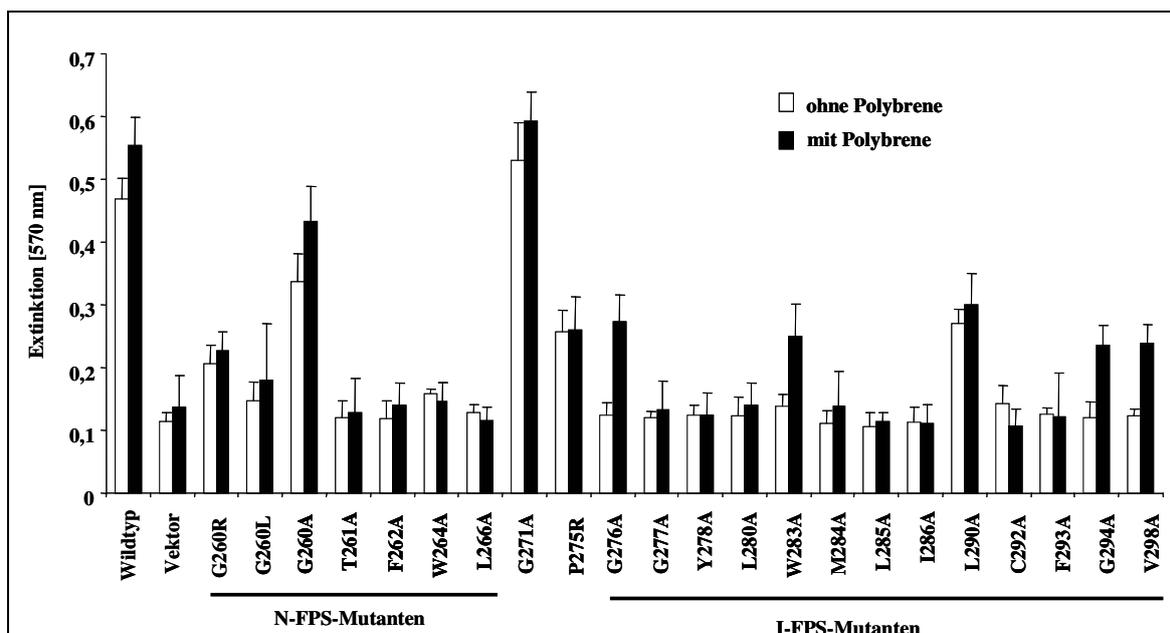


Abb. 23: rPT-Infektiosität von Lassa-Virus FPS-Mutanten. MLV wurde mit den angegebenen Lassa-Virus GP-Varianten pseudotypisiert, und Vero-Zellen wurden mit diesen ohne (weiße Balken) oder mit Zugabe von 8 μ g/ml Polybrene (schwarze Balken) infiziert. Zwei Tage nach der Infektion wurde die

Transduktionseffizienz als Reporterogenaktivität bestimmt (als Extinktion bei 570 nm). Während Lassa-Virus-Wildtyp-GP-rPT-Partikel Vero-Zellen effizient transduzierten, konnten nur die Mutanten G260A, G260R, G271A, P275R und L290A ebenfalls transduzieren. In Gegenwart von Polybrene zeigten zusätzlich zu den erwähnten auch die Mutanten G276A, W283A, G294A und V298A ebenfalls Transduktion von Vero-Zellen. Gezeigt sind die Resultate von zwei Versuchsreihen von jeweils drei unabhängigen Versuchsansätzen, die jeweils mit Dreifachansätzen durchgeführt wurden (Balken: eine Standardabweichung).

Wie Abb. 23 zeigt, transduzierten einige Lassa-Virus GP-Mutanten Vero-Zellen effizient, wohingegen andere dies nicht vermochten. Dabei konnte beobachtet werden, dass insgesamt neun FPS-Mutanten in der Lage waren, Vero-Zellen zu transduzieren. Es waren dies die Mutanten G260R und G260A (im N-FPS lokalisiert, erster AS-Rest des Lassa-Virus GP-2), G271A und P275R (zwischen beiden postulierten FPS liegend) und G276A, W283A, L290A, G294A und V298A (im I-FPS befindlich). In Gegenwart von Polybrene zeigten alle transduzierenden rPT höhere Reporterogenaktivitäten als ohne Polybrene. Vier Mutanten, die ohne Polybrenezugabe keine Transduktion von Vero-Zellen aufwiesen, zeigten Transduktion sogar nur in Gegenwart von Polybrene (G276A, W283A, G294A und V298A).

Für alle anderen FPS-Mutanten wurde – korrelierend mit deren fehlender Zell-Zellfusogenität – keine Transduktionsfähigkeit festgestellt.

3. 8. Inhibitionsstudien

Um mögliche anti-Lassa-virale Substanzen zu identifizieren, wurden die nachfolgend benannten synthetischen Peptide aus dem Lassa-Virus GP-2 im RZZFA und im rPT-Assay getestet:

- (i) N-FPS-Analogon (AS-Sequenz: GTFTWTL)
- (ii) I-FPS-Analogon (AS-Sequenz: GGYCLTRWMLIEAELKCFGNTAV) und
- (iii) CPI-Helix-Analogon (AS-Sequenz: DDIEQQADNMITEMLQKEYMERQ).

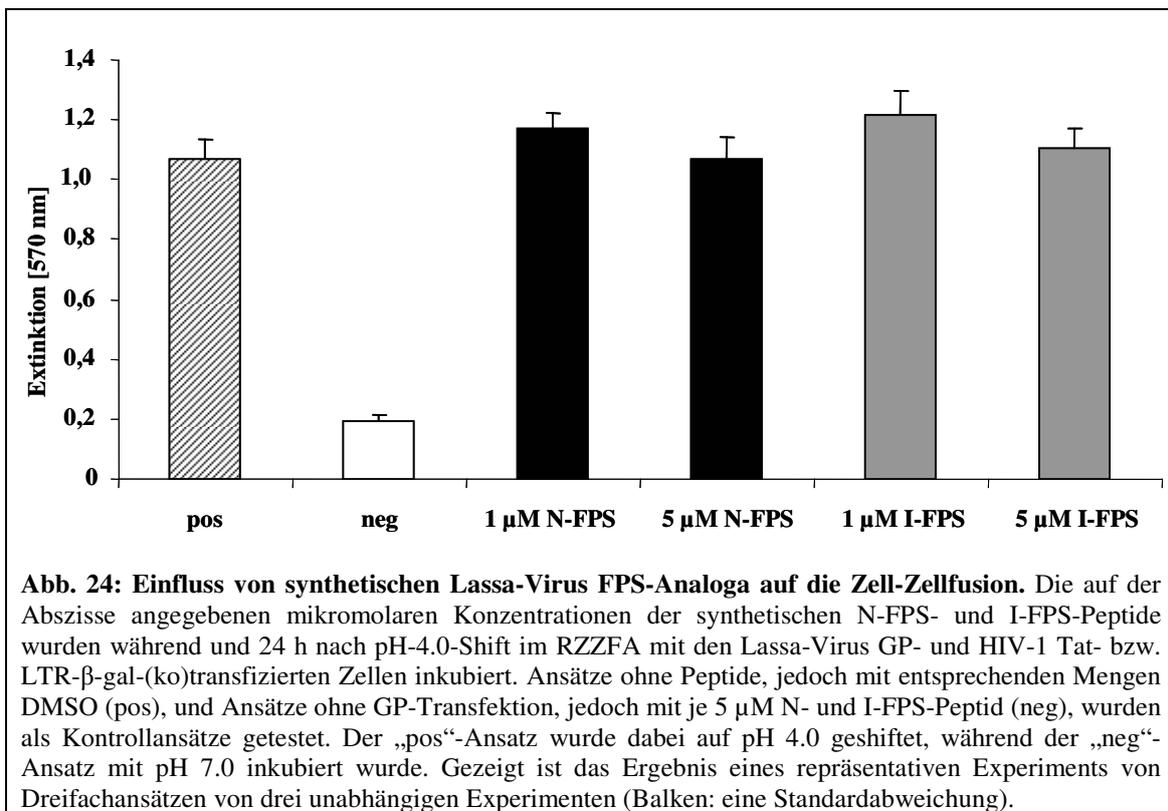
Ebenso wurden acht Seren von rekonvaleszenten Lassafieberpatienten aus der westafrikanischen Republik Guinea in beiden Assays getestet.

3. 8. 1. Inhibition mit synthetischen Peptiden

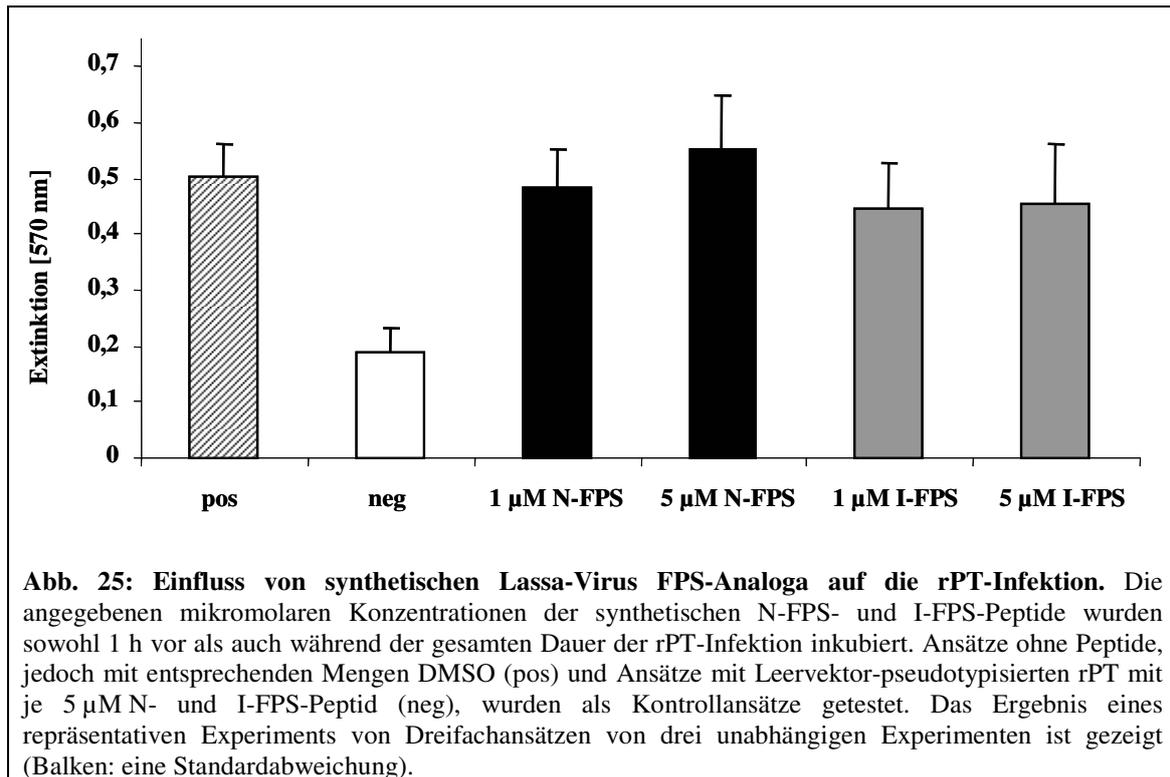
In diesem Versuch wurde analysiert, wie die Lassa-Virus GP-vermittelte Zell-Zellfusion und Infektiosität von rPT-Partikeln durch synthetische Peptide beeinflusst wird. Dazu wurden Peptide verwendet, die den beiden postulierten Lassa-Virus FPS und der

C-terminalen Alpha-Helix (CPI-Helix) entsprechen. Von einem I-FPS-Peptidanalogen wurde berichtet, dass es Liposomen fusionierte (Glushakova *et al.* 1991), und das CPI-Helix-Analogen T-20 des HIV Fusionsproteins gp41 ist ein potenter Fusionshemmer (Kap. 1. 7. 7., Kilby *et al.* 1998).

Im RZZFA wurden die Analoga beider postulierter Lassa-Virus FPS jeweils in mikromolaren Konzentrationen sowohl während als auch 24 h nach dem pH-Shift mit den Zellen inkubiert. Abb. 24 zeigt, dass beide Peptide in den getesteten Konzentrationen keine Wirkung im Vergleich zu pH-geshifteten aber ohne Peptid inkubierten Zellen auf die Zell-Zellfusion hatten.

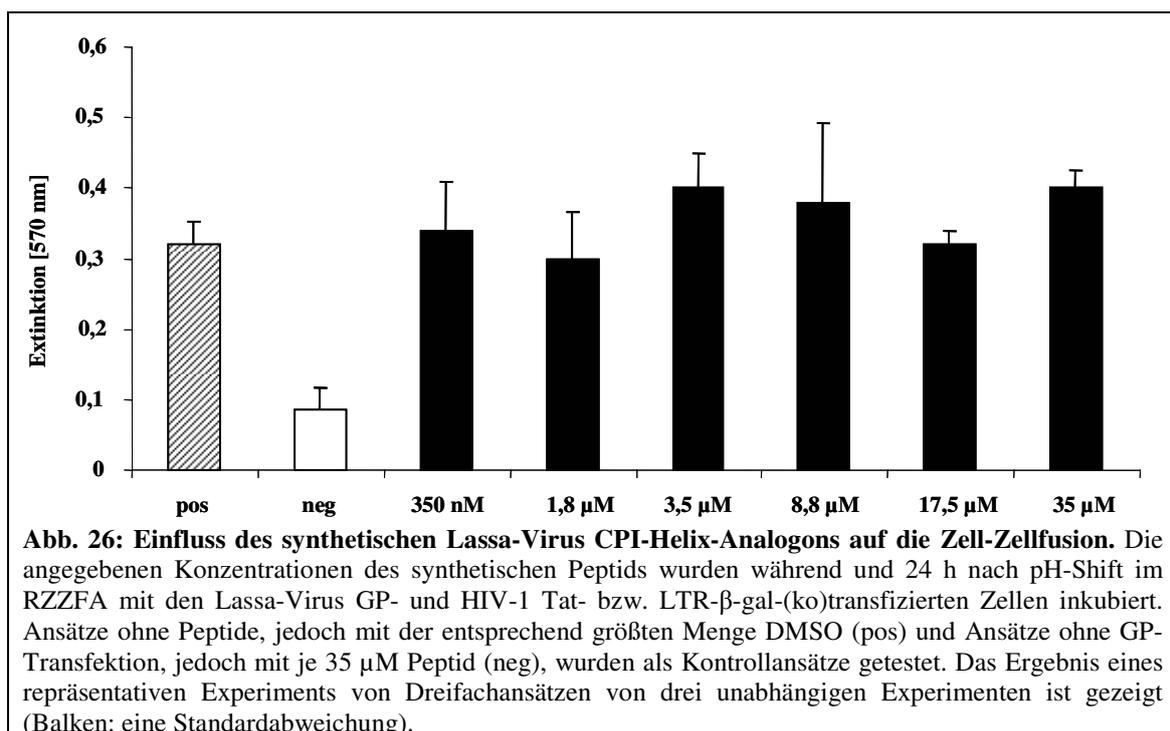


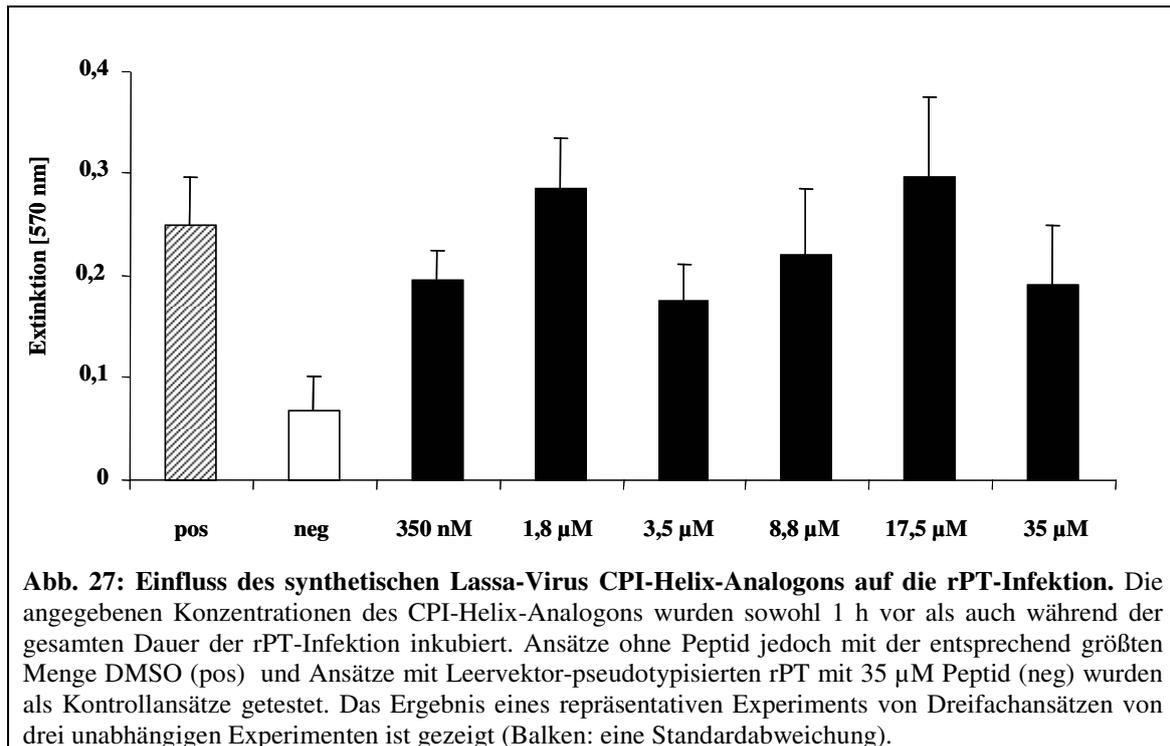
Die Inhibitionsexperimente mit Lassa-Virus Wildtyp-GP-exprimierenden rPT wurden ebenfalls mit den N- und I-FPS-Peptidanaloga in den entsprechenden Konzentrationen durchgeführt. Dabei wurden Vero-Zellen mit den Peptiden sowohl 1 h vor als auch während der Infektion inkubiert. Abb. 25 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experiments aus Dreifachansätzen.



Für beide FPS-Analoga konnte weder ein Effekt auf die Zell-Zellfusion noch auf die rPT-Infektiosität beobachtet werden.

Das CPI-Helix-Analogon mit der Sequenz DDIEQQADNMITEMLQKEYMERQ wurde entsprechend den FPS-Peptiden im RZZFA und im rPT-Infektionsassay verwendet. Abb. 26 und 27 zeigen die beobachteten Effekte von unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids (von 350 nM bis 35 µM) in beiden Assay-Systemen.





3. 8. 2. Inhibition mit Seren von Lassafieberpatienten

Versuche, die arenavirusinduzierte Zell-Zellfusion zu inhibieren wurden für Seren von Junín-Virusinfizierten beschrieben (Castilla *et al.* 2005). Hier wurden Seren von Personen aus Guinea, die eine Lassa-Virusinfektion erlitten hatten, auf ihre Effekte auf die Zell-Zellfusion und die rPT-Infektiosität getestet. Die Seren stammten von gesunden Probanden, bei denen eine abgelaufene Lassa-Virusinfektion serologisch nachgewiesen worden war (ter Meulen *et al.* 2000 und 2004).

Die Seren wurden, wie oben für die synthetischen Peptide beschrieben, in den beiden Assays eingesetzt, wobei 1:20-Verdünnungen der Seren in den entsprechenden Zellmedien verwendet wurden. Abb. 28 und 29 zeigen die Effekte der Seren auf die Zell-Zellfusion, und Abb. 30 zeigt deren Effekte auf die rPT-Infektiosität von Lassa-Virus GP-pseudotypisierten MLV-Partikeln.

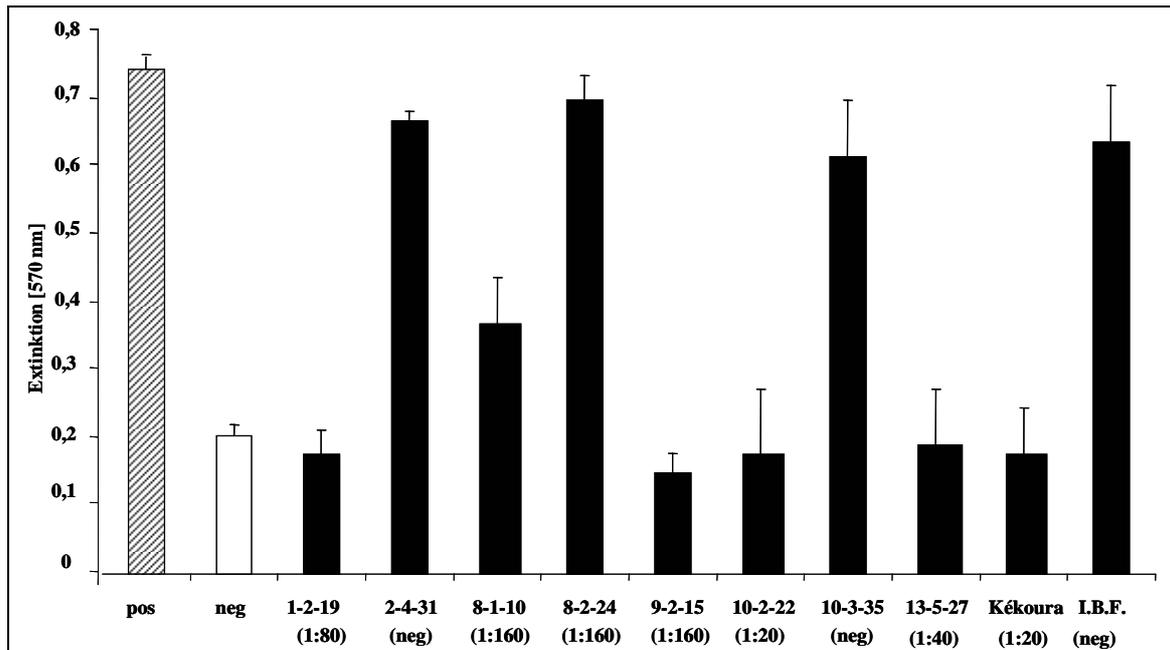


Abb. 28: Hemmung der Lassa-Virus GP-induzierten Zell-Zellfusion mit humanen Seren. Die Reporterogenaktivität im RZZFA nach Lassa-Virus GP-Transfektion wurde nach pH-4.0-Shift ohne Serum (pos), ohne GP-Transfektion (neg) oder in Gegenwart von 1:20-verdünnten, humanen Seren der auf der Abszisse benannten Serenspenders durchgeführt. Die Benennungen der Seren erfolgte gemäß früher veröffentlichter Daten mit den dabei zuletzt 1999 bestimmten anti-Lassa-Virus-NP-Titern (ter Meulen *et al.* 2000). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von dreien, die jeweils in Dreifachansätzen durchgeführt wurden (Balken: eine Standardabweichung). Anmerkung: Das mit Kékoura gekennzeichnete Serum wies im Lassa-Virus Neutralisationstest einen Titer von 1:80 auf (ter Meulen *et al.* 2004).

Drei Seren, die im RZZFA unterschiedliche Effekte auf die Lassa-Virus Wildtyp-GP-induzierte Zell-Zellfusion bewirkten (komplette Inhibition (Kékoura), 50%ige Inhibition (8-1-10) und keine Inhibition (I. B. F.)), wurden im nachfolgend dargestellten Experiment verwendet, um das oben beschriebene einzigartige Fusions- und Infektionsverhalten der vier FPS-Mutanten G276A, W283A, G294A und V298A genauer zu untersuchen. Diese Mutanten zeigten zwar Zell-Zellfusion (geringer als der Wildtyp, Kap. 3. 6.), in rPT-Partikel inkorporiert jedoch, zeigten sie lediglich in Gegenwart von Polybrene Transduktion von Vero-Zellen (Kap. 3. 7. 5.). Daher lag die Vermutung nahe, dass die rPT-Infektion dieser Mutanten bereits an einem Schritt vor der Fusion, mutmaßlich der Rezeptorbindung, durch die eingebrachten Mutationen beeinflusst sein könnte. Daher wurden diese Mutanten mit folgenden humanen Lassafieberpatientenseren, wie oben für Wildtyp-GP beschrieben, im RZZFA-Inhibitionsexperiment eingesetzt: Serum A (Kékoura), Serum B (Patient 8-1-10) und Serum C (I. B. F.). Abb. 29 zeigt das Ergebnis dieses Experiments.

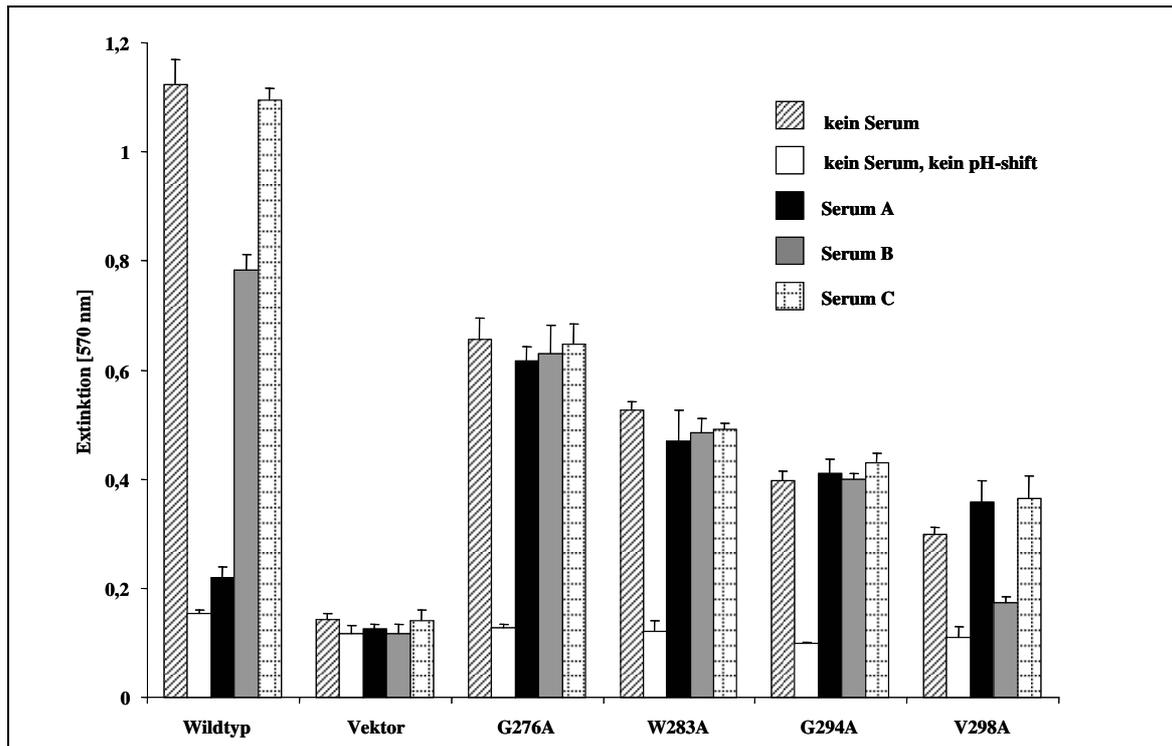


Abb. 29: Effekte humaner Seren auf die Lassa-Virus GP-induzierte Zell-Zellfusion der FPS-Mutanten G276A, W283A, G294A und V298A. Die auf der Abszisse bezeichneten Lassa-Virus GP-Mutanten sowie der Wildtyp und die Leervektorkontrolle wurden analog der Beschreibung zu Abb. 28 im RZZFA eingesetzt und mit drei humanen Lassa-Fieberpatientenseren während und nach dem pH-4.0-Shift inkubiert. Die Balken zeigen die gemessenen Reporter-genaktivitäten als Extinktion bei 570 nm im RZZFA. Die Benennung der einzelnen Ansätze ist über dem Diagramm dargestellt, wobei die Seren folgendermaßen bezeichnet sind: Serum A (Kékoura), Serum B (8-1-10), Serum C (I. B. F.), siehe Erläuterung zu Abb. 28. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von dreien, die jeweils in Dreifachansätzen durchgeführt wurden (Balken: eine Standardabweichung).

Die drei getesteten Seren zeigten keinen Einfluss auf die Zell-Zellfusion der jeweiligen Lassa-Virus FPS-Mutanten. Lediglich das Serum von Patient 8-1-10 zeigte eine ca. 60%ige Inhibition der V298A-induzierten Zell-Zellfusion.

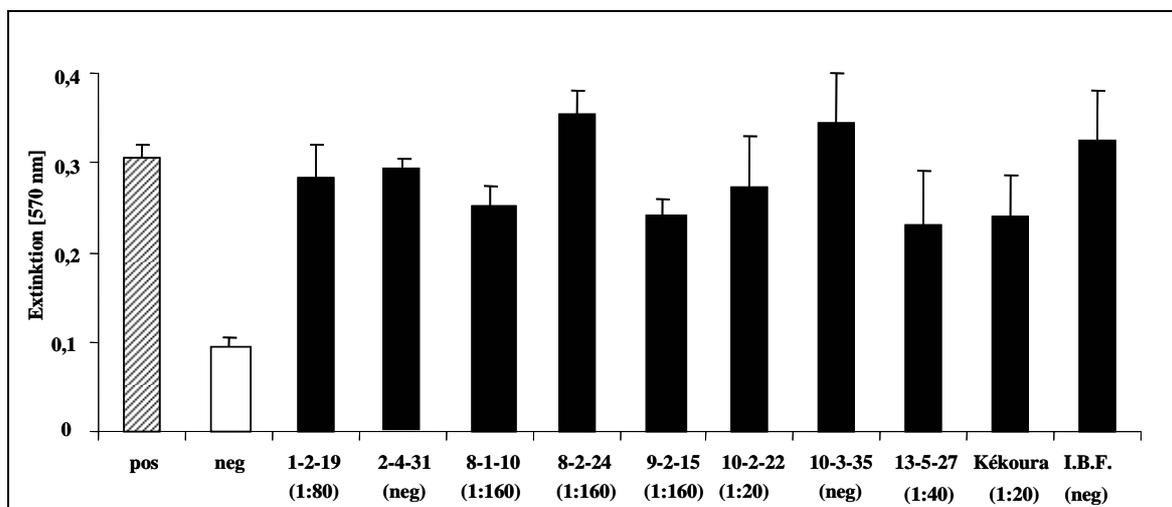


Abb. 30: Effekte humaner Seren auf die Lassa-Virus GP-vermittelte rPT-Infektiosität. Die β -gal-Reportergenaktivität nach Infektion mit Lassa-Virus GP-dekorierten rPT wurde ohne Serum (pos), nach

Infektion mit undekorierten rPT (neg), oder in Gegenwart von 1:20-verdünnten Seren von Lassa-Virusinfizierten bestimmt. Dabei wurden die Seren 1 h vor der Infektion und während der gesamten Dauer der Infektion mit den Seren inkubiert und die β -gal-Aktivität 2 d nach Infektion bestimmt. Die Benennung der Seren und der anti-Lassa-Virus-NP-Titer erfolgte wie im Text zu Abb. 28 beschrieben. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von dreien, die jeweils in Dreifachansätzen durchgeführt wurden (Balken: eine Standardabweichung).

Für wildtypisches Lassa-Virus GP lassen sich die Inhibitionsstudien mit den Lassa-fieberpatientenseren wie folgt zusammenfassen: Diese Seren zeigten weder einen Effekt auf die Zell-Zellfusion noch auf die rPT-Infektiosität: 2-4-31, 8-2-24, 10-3-35 und I.B.F. Demgegenüber zeigten folgende Seren eine hemmende Wirkung auf die Zell-Zellfusion: 1-2-19, 8-1-10, 9-2-15, 10-2-22, 13-5-27 und Kékoura. Im rPT-Infektionsassay jedoch zeigten diese fusionshemmenden Seren und das Serum mit nachgewiesenen neutralisierenden Antikörpern (Kékoura) nur eine geringe, jedoch nichtsignifikante, Reduktion der Infektiosität im Vergleich zum Wildtyp.

4. DISKUSSION

Anhand der hier vorgestellten Testsysteme und den daraus gewonnenen Ergebnissen werden nachfolgend vier wichtige Punkte des molekularen Lassa-Viruseintrittsmechanismus diskutiert: (i) die Bedeutung der beobachteten Unterschiede zwischen Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren im RZZFA, (ii) die Bedeutung des extrem niedrigen pH-Wertes zur Induktion der Fusion, (iii) die Bedeutung der FPS-Mutationsanalyse sowie ein daraus entwickeltes Modell des Lassa-Viruseintritts und (iv) die Bedeutung der Inhibitionsstudien.

4. 1. Unterschiede zwischen Alt- und Neuwelt-Arenaviren beim Zelleintritt

Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren scheinen unterschiedliche Zelleintrittsmechanismen aufzuweisen, da das GP des Junín-Neuwelt-Arenavirus Zellfusion bei einem weniger sauren pH-Wert auslöste, als dies bei den GP der Altwelt-Arenaviren von Lassa- und LCMV-Virus der Fall war.

Auch in anderen Aspekten des viralen Replikationszyklus scheinen wichtige Unterschiede zwischen Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren zu bestehen. Ein wesentlicher Unterschied liegt in der Nutzung verschiedener Rezeptoren als erstem Schritt in der Virus-Wirtszellinteraktion. So nutzen alle Altwelt-, jedoch nur die Neuwelt-Arenaviren der Untergruppe C, α -DG als zellulären Rezeptor, wohingegen die humanpathogenen Neuwelt-Arenaviren der Untergruppen A und B (zu der alle hämorrhagischen Neuwelt-Arenaviren zählen) Zellen ohne α -DG-Expression infizieren können (Spiropoulou *et al.* 2002). Neuere Arbeiten zeigten zusätzlich, dass α -DG nicht der einzige Rezeptor zu sein scheint, den oben erwähnte Arenaviren nutzen. Es zeigte sich, dass mit LCMV-C113-GP-pseudotypisierte MLV-Partikel Zellen unabhängig von α -DG infizieren konnten. Dieser Befund kontrastierte frühere Befunde, die besagten, dass LCMV-C113 α -DG-Knock-out-Zellen nicht infizieren konnte, was dafür spricht, dass LCMV-C113 mindestens einen weiteren Rezeptor aufweist, den die Zellen aus den Infektionsexperimenten der früheren Arbeit nicht trugen (Kunz *et al.* 2005; Reignier *et al.* 2006). Für Lassa-Virus GP konnte jedoch sowohl im Viruskontext als auch in rPT-Partikel inkorporiert gezeigt werden, dass α -DG absolut notwendig für die Infektion ist. Daher ist fraglich, ob auch Lassa-Viren einen weiteren Rezeptor zum Infizieren nutzen (Kunz *et al.* 2005, Reignier *et al.* 2006). Für die hämorrhagischen Neuwelt-Arenaviren

wurde bei Infektionsexperimenten mit MLV-basierenden rPT beobachtet, dass diese ein α -DG-unabhängiges Infektionsmuster zeigten und viele verschiedene Mäuse- und Human-Zelllinien infizieren konnten, darunter Lymphozyten (Reignier *et al.* 2006).

Ein weiterer wichtiger Unterscheid zwischen Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren besteht bei der „sichtbaren Zellfusion“ (Synzytien- oder Polykaryonbildung). Wohingegen Junín-Virusinfektion zur Synzytienbildung in Vero-Zellen führte (Castilla *et al.* 1994), führte eine LCMV-Infektion (Stamm Arm-4) von BHK21-Zellen nicht zur Synzytienbildung (Di Simone *et al.* 1994). Di Simone *et al.* diskutieren, dass LCMV insgesamt wohl ein eher schwaches Fusogen sei, was durch die in dieser Arbeit durchgeführten Vergleiche der Hydrophobizitäten der postulierten Arenavirus-FPS mit denen des Influenza-Virus HA2-N-Terminus gestützt wird. Im Vergleich zum HA2-N-Terminus zeigten die postulierten FPS von Lassa- und LCM-Virus nämlich ein deutlich kleineres hydrophobes Moment (0.44 [Lassa], 2.11 [LCMV], 1.12 [Junín] sowie 2.35 [Influenza], s. Tab. 3). Auch Lassa-Virusinfektion von Vero-Zellen mit bis zu 3.0 moi führte nicht zur Synzytienbildung (persönliche Beobachtung von O. Lenz). Aufgrund der publizierten Daten und unserer Beobachtungen lässt sich spekulieren, dass die Membranfusion bei Arenaviren in verschiedenen Untergruppen unterschiedlich verläuft.

4. 2. Ort der Fusion von Virus und Wirtszellmembran

Die Mutationsanalyse der mittels des RZZFA simulierten Fusionsreaktion des Lassa-Virus GP zeigte, dass die virale Fusion ein GP-2-abhängiger Prozess ist und dass das GP-2 das Fusionsprotein des Lassa-Virus ist. Ein vergleichbares Testsystem für die Virus-Zellfusion wurde für Arenaviren bisher nur für Neuwelt-, nicht jedoch für Altwelt-Arenaviren etabliert (York *et al.* 2004). Die dabei gefundenen Daten zeigten, dass Junín-Virus bei pH 5.0 fusionierte. In der hier durchgeführten Studie jedoch wurde beobachtet, dass die Altwelt-Arenavirus GP-induzierte Membranfusion erst bei pH-Werten unterhalb pH 4.5 stattfand, das Optimum bei pH 4.0 erreichend.

Neben den Unterschieden zur Junín-Virusfusion steht dieser Befund auch im Gegensatz zu bisherigen experimentellen Daten, die besagten, dass Arenaviren nach endosomaler Aufnahme mit endosomalen Membranen bei pH-Werten von ca. 5.5 fusionieren (Di Simone *et al.* 1995). Allerdings konnte im RZZFA nach einem pH-5.5-Shift keine Arenavirus GP-induzierte Zell-Zellfusion beobachtet werden.

Die überraschend niedrigen pH-Werte, die zur Auslösung von LCM- und Lassa-Virus GP-vermittelter Fusion erforderlich sind, wurden bisher für virale Typ I Fusionsproteine noch nicht beobachtet. Jedoch zeigten die Befunde von Glushakova *et al.* (1992) und Di Simone *et al.* (1995), dass bei Dequenching-Experimenten mit einem Lassa-Virus I-FPS-Peptid (Glushakova) sowie mit fluoreszenzmarkierten LCM-Viren (Di Simone), der Dequenching-Prozess zwar bei pH 5.5 beobachtet werden konnte, er allerdings bei pH 4.5 jeweils am stärksten war. Da pH 4.5 als physiologisch nicht relevant angesehen wurde, wurde eine weiterführende Kinetik des LCMV-induzierten Dequenchings bei pH 5.3 durchgeführt, weil dieser am besten zum vermuteten Modell der endosomalen Fusion passte (Di Simone *et al.* 1995).

Der hier vorgestellte RZZFA stellt ein Modellsystem für die Virus-Zellmembranfusion dar, und das saure Milieu der Endosomen/Lysosomen konnte durch unterschiedliche pH-Shift-Medien simuliert werden. Dabei zeigte sich, dass das Lassa-Virus GP-2 einen pH-Wert von ≤ 4.5 benötigt, um fusionsaktiv zu werden. Um die Gültigkeit des Assays zu untersuchen, wurden daher die Glykoproteine anderer Viren verwendet, von denen die pH-Optima der Fusion bereits bestimmt waren. Dass Junín-Virus GP und Influenza-Virus HA bei typischen endosomalen pH-Werten fusionierten, zeigt, dass der RZZFA valide Daten liefert.

Die pH-Werte in endosomalen Kompartimenten reichen von pH 6.3 in frühen Endosomen bis pH 3.8 in Lysosomen (Maxfield und Yamashiro 1991). Zelluläre Kompartimente, die über einen pH-Wert verfügen, mit dem im hier etablierten System Lassa-Virus GP-induzierte Fusion ausgelöst wurde, sind Lysosomen. Diese weisen pH-Werte von 3.8 bis 4.8 auf (Van Dyke 1996).

Wichtig sind in diesem Zusammenhang auch Befunde von Sakai *et al.*, die die Influenza-Virus HA2-induzierte Fusion untersuchten (2006). Dabei wurde festgestellt, dass eine Widersprüchlichkeit existiert zwischen endosomalen und optimalen pH-Werten für die biologische Aktivität des HA2. Influenza-Viren fusionierten bereits in frühen Endosomen (pH 6.3), obwohl das pH-Optimum der HA2-induzierten Fusionsreaktion in rekombinanten Fusionsassays zwischen 5.25 und 5.75 (für unterschiedliche HA-Subtypen) beobachtet wurde (Huang *et al.* 1981; White *et al.* 1982). Interessant ist dabei auch, dass die Genauigkeit von pH-Werten in frühen Endosomen mit Vorsicht zu bewerten ist: Ein pH 6.0 entspricht lediglich zwei bis drei Protonen in kleinen Endosomen (200 nm Durchmesser) (Sakai *et al.* 2006).

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde deuten darauf hin, dass das Lassa-Virus spät im endosomalen Pathway, evtl. sogar in Lysosomen, fusioniert. Falls die Fusion in Lysosomen stattfindet, müsste das Virus resistent gegen die dort stattfindende Proteolyse sein. Dies wäre vereinbar mit dem hohen Glykosylierungsgrad der Glykoproteine (11 N-Glykosylierungsstellen), der deren Degradation verhindern könnte (Eichler *et al.* 2006).

Weiterhin ließe sich spekulieren, dass das Lassa-Virus GP-2 nach Transit in die Lysosomen gespalten wird. Dort sind bestimmte Cystein-Proteasen (Cathepsine) resident, von denen unter anderem gezeigt wurde, dass sie für den Ebola-Viruseintritt in Zellen unabdingbar sind. Über die subzelluläre Verteilung von Cathepsinen existieren Studien mit Monozyten, die zeigten, dass die beiden Cathepsine CatB und CatL in den Lysosomen residieren, wohingegen CatS in späten Endosomen lokalisiert ist (Schmid *et al.* 2002, Greiner *et al.* 2003). Für CatB und CatL wurde mit Gen-Knock-out-Zellen und mit spezifischen CatB- und CatL-Inhibitoren gezeigt, dass diese für den Ebola-Viruseintritt in infizierte Zellen benötigt werden. Mit Ebola-Virus GP-pseudotypisierte VSV-Partikel konnten CatB- und CatL-Knock-Out-Zellen nicht infizieren, wohingegen CatB^{+/+}- und CatL^{+/+}-Zellen infizierbar waren (Chandran *et al.* 2005). Auch für das Fusionsprotein S des SARS-Coronavirus (SARS-CoV) wurde beschrieben, dass dieses durch CatL-Behandlung (nicht jedoch durch CatB-Behandlung) fusionsaktiviert wird. In einem Pseudotypen-Fusionsassay, bei dem SARS-CoV-S-(SARS-CoV-Fusionsprotein)-Pseudotypen mit ACE-2-(SARS-CoV-Rezeptor)-Pseudotypen fusioniert wurden, erfolgte die Fusion nur nach pH-abhängiger CatL-Behandlung der Pseudotypen (pH-Optimum bei pH 5.0) (Simmons *et al.* 2005).

Dass Viren erst nach endosomaler Aufnahme und Transit in Lysosomen mit der Wirtszelle fusionieren, wurde bisher nur für Reoviren beschrieben (Chandran *et al.* 1999). Reoviren sind nichtumhüllte Vogel- und Säugetierpathogene mit doppelsträngigem RNA-Genom. Ihre Hülle besteht hauptsächlich aus den beiden Proteinen $\mu 1$ und $\sigma 3$, wobei letzteres das Fusionsprotein darstellt (Shmulevitz *et al.* 2004). Neben der lysosomalen Aufnahme können Reoviren aber auch pH-unabhängig und ohne endosomale Aufnahme mit der Plasmamembran fusionieren und Zellen somit infizieren (Nibert *et al.* 1996).

Für das Lassa-Virus wäre jedoch neben der lysosomalen Aufnahme auch denkbar, dass bestimmte zelluläre Faktoren früher im endosomalen Pathway mit Lassa-Virus GP-2 interagieren und dieses somit bereits bei weniger saurem pH-Wert fusionskompetent

machen könnten. Dies könnten beispielsweise Rab-Proteine oder endosomale Cathepsine sein (siehe oben). Auch eine Interaktion mit Proteinen des endosomalen „Vesicular-Protein-Sorting-Pathways“ (wie z.B. der AAA-ATPase hVsp4 oder dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) wäre denkbar, wie sie als essentiell für den Influenza-Viruseintritt beschrieben wurde (Khor *et al.* 2003).

Ob Lassa-Viren allerdings wirklich erst nach endosomaler Aufnahme und Transit in die Lysosomen Zellen betreten, wurde hier nicht untersucht. Weiterführende Studien dazu, etwa mittels Koimmunfluoreszenzmikroskopie von lysosomalen Markerproteinen mit GP, wären dazu nötig. Ebenso würden Studien zur Cathepsin-Hemmung, ähnlich den oben beschriebenen, eine Klärung dieser Frage voranbringen.

4. 3. FPS-Mutationsanalyse / Fusionsmodell

Im Allgemeinen sind FPS reich an hydrophoben AS sowie an Alanin- und Glyzin-Resten. In dieser Arbeit wurden hydrophobe AS in den postulierten Lassa-Virus FPS gegen Alanin ausgetauscht, da Alanin eine Alpha-Helix-formende Tendenz zeigt, und so der Effekt der Mutationen auf die Struktur des FPS im GP-2 minimiert wurde (Lyu *et al.* 1990).

Das Einführen von Alanin-Austauschmutationen in die FPS-Domänen des Lassa-Virus GP-2 führte zu vielfältigen Auswirkungen: Mutanten, deren Reifespaltungen beeinträchtigt waren, Mutanten, die nicht mehr an die Zelloberfläche transportiert wurden, Mutanten, deren Fusogenität verloren ging oder stark abgeschwächt wurde und Mutanten, deren Infektiosität in rPT reduziert wurde oder komplett verloren ging. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse müssen daher vorsichtig diskutiert werden, und letztlich kann man nicht immer ausschließen, dass eventuell weitere Einflüsse die Funktionen der GP-2-Mutanten verändert haben könnten (z. B. unterschiedliche Proteinfaltungen und damit einhergehende Strukturveränderungen oder Veränderungen der Wechselwirkungen mit benachbarten Proteindomänen). Insgesamt gesehen scheinen die postulierten, fusionsaktiven Domänen des Lassa-Virus jedoch sehr sensitiv für Mutationen zu sein, was auch der hohe Konservierungsgrad dieser Regionen innerhalb der *Arenaviridae* unterstreicht (vgl. Tab. 3). Da die hohe Konservierung und Mutationssensitivität auch ein positives Kriterium der FPS-Identifikation darstellt (Epan 2003), unterstreichen die beobachteten Ergebnisse, dass der gesamte N-Terminus des GP-2 bzw. beide postulierten FPS tatsächlich die Fusionsdomänen sind.

4. 3. 1. FPS-Analyse

Mutationsanalysen von viralen FPS liefern wichtige Erkenntnisse über den Fusionsprozess der betreffenden Viren. Nachfolgend sind einige wichtige Parameter der Virus-Zellfusion beschrieben, die durch Mutationsanalysen ermittelt wurden.

Glyzin- zu Alanin-Mutationen in den FPS der Paramyxoviren Simian-Virus 5, Newcastle-Disease-Virus und des humanen Parainfluenza-Virus-Typ-3 erzeugten Virusmutanten, die im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp verstärkte Zell-Zellfusion erzeugten (Russell *et al.* 2004). Glyzin-Reste scheinen beim Fusionsprozess generell eine wichtige Rolle zu spielen. Mutationsanalysen im Influenza-Virus HA2, bei denen die Glyzin-Reste der Positionen eins und vier gegen Glutaminsäure ausgetauscht wurden, ergaben, dass die resultierenden Mutanten entweder keine Fusion mehr zeigten (G1E) oder eine verringerte Fusion mit erhöhtem pH-Schwellenwert – pH 5.6 anstatt pH 5.2 – (G4E) im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Gething *et al.* 1986). Position eins des Influenza-Virus FPS wurde in weiteren Studien gegen sechs verschiedene AS ausgetauscht (Alanin, Serin, Valin, Glutaminsäure, Glutamin und Lysin). Dabei konnten neben dem Wildtyp nur die Alanin- und die Serin-Mutanten Lipidmixing erzeugen (Übergang eines lipidlöslichen Farbstoffes aus dem Membranraum einer Zelle in den Membranraum einer anderen; Erzeugung der Hemifusion), und nur der Wildtyp und die Alanin-Mutante konnten komplette Fusion erzeugen (Übergang eines wasserlöslichen Farbstoffs von einer Zelle in die andere). Somit konnte die G1S-Mutante als Hemifusionsphänotyp postuliert werden (Qiao *et al.* 1999). Bei Analysen mit synthetischen Peptiden des Influenza-Virus FPS wurden durch Einzel-AS-Austauschmutationen der hydrophoben AS an Position drei (Phenylalanin) und Position sieben (Alanin) zu Glutaminsäure Mutanten erzeugt, deren Membranpenetrationstiefe im Vergleich zum Wildtyp geringer war (Kantchev *et al.* 2004).

Um beide putativen Lassa-Virus FPS-Kandidaten im GP-2 (N-FPS und I-FPS) hinsichtlich ihrer Rolle beim Fusionsprozess zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine Mutationsanalyse durchgeführt, bei der hydrophobe AS in beiden FPS ausgetauscht wurden. Dabei konnten vier Mutanten identifiziert werden, die aufgrund ineffizienter Reifespaltung und darauf folgendem fehlendem Oberflächentransport weder Fusion zeigten noch Infektiosität vermittelten: T261A im N-FPS sowie M284A, L285A und F293A im I-FPS. Vier Mutanten – lokalisiert in beiden FPS – wurden identifiziert, welche alle im Vergleich zum Wildtyp veränderte Reifespaltung,

Zelloberflächenexpression, Fusogenität und Infektiosität zeigten (F262, L266, I286, C292). Diese Mutanten wiesen zwar eine dem Wildtyp ähnliche Reifespaltung auf, GP-2 konnte allerdings bei keiner dieser Mutanten an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Möglicherweise haben diese Mutanten Konformationsänderungen, oder sie können nicht mehr an Chaperone binden, wie beispielsweise das Signalpeptid des GP (Kap. 1. 6. 7., Eichler *et al.* 2003a).

Folgende Mutanten zeigten trotz wildtypischer Reifespaltung und Zelloberflächenexpression beeinträchtigte Fusion: zwei Mutationen im N-FPS (G260A und W264A) und acht Mutationen im I-FPS (G276A, G277A, Y278A, L280A, W283A, L290A, G294A, V298A). Dabei ließ sich feststellen, dass diese fusionsreduzierenden Auswirkungen auf aromatische AS-Reste am ausgeprägtesten waren. Im rPT-Assay zeigten G260A und L290A sowohl mit als auch ohne Polybrene Transduktion von Vero-Zellen, wohingegen G276A, W283A, G294A und V298A nur in Gegenwart von Polybrene transduzierten. Dies lässt vermuten, dass diese vier I-FPS-Mutationen nicht nur die Fusion, sondern auch Schritte vor der Fusion, möglicherweise bereits bei der Rezeptorbindung, beeinflussen. Polybrene erhöhte in den hier durchgeführten rPT-Transduktionsexperimenten durch die Neutralisierung elektrischer Ladungen der Zelloberfläche die rPT-Adsorption an die Zellen (Davis *et al.* 2004). Da dieser Effekt rezeptorunabhängig ist (Davis *et al.* 2002), könnte bei den erwähnten Mutanten die Gegenwart von Polybrene dazu führen, dass trotz gestörter Rezeptorbindung eine Transduktion von Vero-Zellen möglich ist.

Demgegenüber zeigte die Mutante G271A, die zwischen beiden FPS lokalisiert ist, ca. 60% Zellfusion im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 18) und im rPT-Assay in Gegenwart von Polybrene eine dem Wildtyp vergleichbare Infektiosität, welche ohne Polybrenezugabe sogar höher als diejenige des Wildtyps war (Abb. 23). Diese Hyperinfektiosität könnte damit erklärt werden, dass im rPT-Assay möglicherweise eine stärkere Bindung von G271A an α -DG als beim Wildtyp erfolgte. G271A fusionierte dann möglicherweise weniger stark als der Wildtyp, allerdings waren relativ zum Wildtyp mehr rPT-Partikel an Vero-Zellen gebunden. Für Ebola-Virus GP-2-Mutanten, bei denen Alanin-Austausche in den C- und N-terminalen Alpha-Helices durchgeführt wurden, wurde gezeigt, dass die Mutante L585A eine 1,5fach stärkere Bindung an ein anti-Ebola-GP-2-Kaninchen-Serum als der Wildtyp aufwies, wenn diese als rekombinante Proteine exprimiert wurden. Bei Infektionsstudien mit VSV-Pseudotypen, welche mit den Ebola-Virus GP-2-Mutanten dekoriert waren, zeigte L585A eine

dementsprechend größere Infektiosität als der Wildtyp (Watanabe *et al.* 2000). In Gegenwart von Polybrene zeigte die Lassa-Virus FPS-Mutante G271A dann die gleiche rPT-Infektiosität wie der Wildtyp, weil Polybrene die möglicherweise stärkere Rezeptorbindung durch Ladungsneutralisierung der Zelloberflächen reduziert haben könnte (Davis *et al.* 2004).

Mindestens vier wichtige Mutanten wurden hier identifiziert, die bei 100%iger Konservierung innerhalb der Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren und trotz dem Wildtyp vergleichbarer Spaltung und Oberflächenexpression keine Fusion zeigten: W264A im N-FPS sowie G277A, Y278A und L280A im I-FPS. Diese stellen deshalb entscheidende AS-Position für den Fusionsprozess dar und legen den Schluss nahe, dass beide FPS-Regionen am Fusionsprozess beteiligt sind.

Viren mit zwei FPS wurden bereits beschrieben (Peisajovich und Shai 2003). So wurde für das Sendai-Virus (SV), ein RNA-Virus aus der Familie der *Paramyxoviridae*, postuliert, dass dieses ebenfalls über mehrere Fusionsdomänen verfügt. Für das fusionsaktive Oberflächenglykoprotein F₁ des SV, welches ebenfalls durch Reifespaltung eines inaktiven Vorläufers generiert wird, wurde eine Organisation postuliert, wie für Typ I Fusionsproteine beschrieben. Zusätzlich zum N-FPS wurde ein I-FPS nachfolgend der N-terminalen Heptad-Repeat-Helix charakterisiert. Peptide, die die AS-Sequenz dieser Region aufwiesen, zeigten neben der Fähigkeit zur Fusion von unilamellaren Vesikeln auch die Fähigkeit SV-Infektion zu hemmen, wahrscheinlich durch Blockierung der Konformationsänderungen im Fusionsprotein (vgl. auch Kap. 4. 4.). Neuere Studien zeigten des Weiteren eine zusätzliche fusionsaktive Domäne im F₁-Protein von SV (Peisajovich *et al.* 2002). Eine Region, direkt auf das N-FPS folgend und vor der N-terminalen Heptad-Repeat-Helix liegend, zeigte Fusion von unilamellaren Vesikeln, und zwar mit gleicher Stärke wie das N-FPS allein. Ein Peptid, das die AS-Sequenz beider fusionsaktiver Regionen aufwies (das N-FPS und die folgende Region, exklusive Helix-Region), zeigte eine noch höhere Fusionsaktivität als beide Regionen für sich allein genommen. Diese Befunde ließen auf eine Beteiligung beider Domänen am Fusionsprozess schließen. Da die dem N-FPS folgende fusionsaktive Region weniger hydrophob war als das N-FPS selbst, wurde allerdings spekuliert, dass keine direkte Interaktion dieser Region mit der Membran stattfinden konnte (Peisajovich *et al.* 2002). Dennoch verdeutlichen diese Studien, dass mehrere Regionen eines viralen Fusionsproteins an den komplexen Prozessen während der Membranfusion beteiligt sind.

4. 3. 2. Fusionsmodell

Nach der pH-abhängigen Aktivierung des Lassa-Virus Fusionsproteins GP-2 könnte dieses laut den hier vorgestellten Daten mit beiden FPS in die Zielzellmembran inserieren und so den Fusionsprozess von Virus- und Zielzellmembran initiieren. Die Insertion der beiden FPS ist der Auslöser für weitere Konformationsänderungen des GP-2, die nachfolgend den Fusionsprozess vollenden (Kap. 1. 7. 6.). In Abb. 31 ist schematisch dargestellt, wie die Doppel-FPS-Membraninsertion stattfinden könnte.

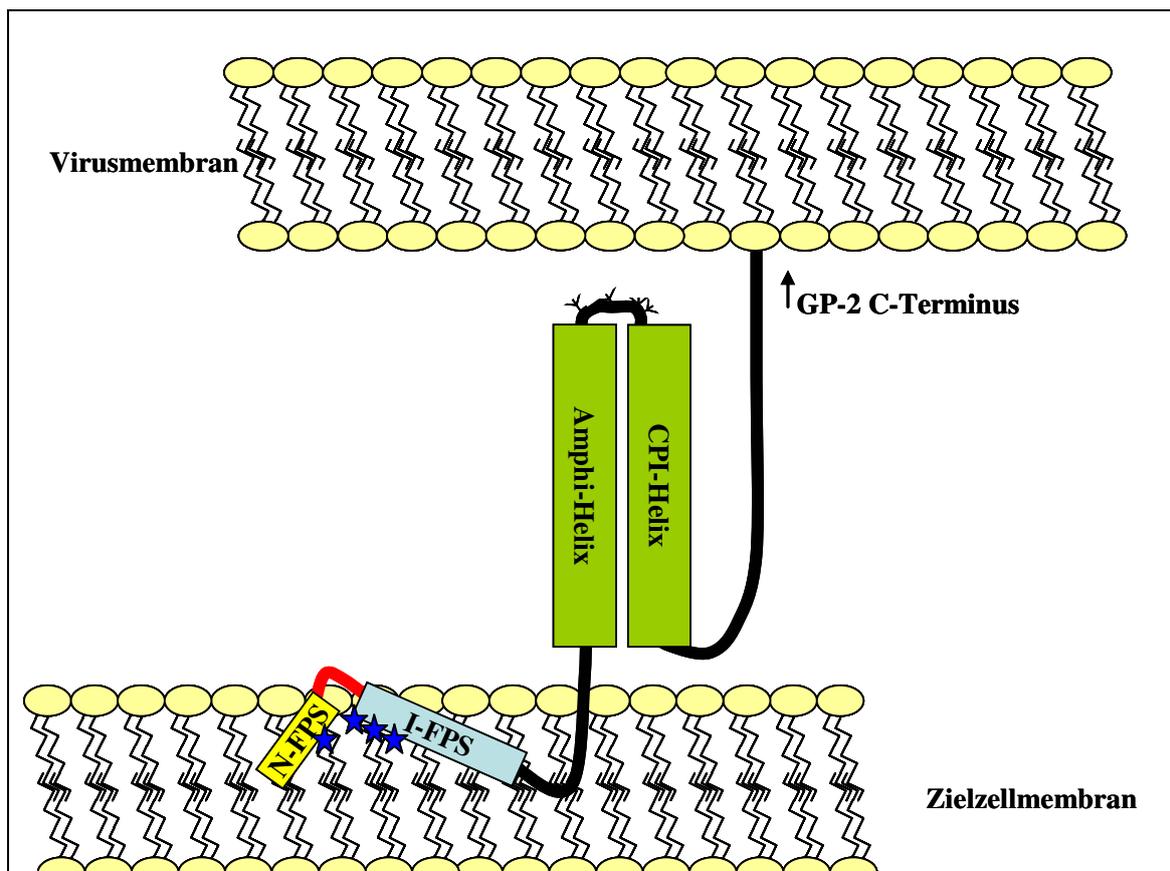


Abb. 31: Schematische Darstellung des möglichen Penetrationsmechanismus des Lassa-Virus GP-2 in die Zielzellmembran. GP-2 (hier aus Gründen der Übersichtlichkeit als Monomer abgebildet; *in vivo* Trimer oder Tetramer) liegt während der Membranfusion C-terminal in der Virusmembran verankert vor, während der N-Terminus in die Zielzellmembran eindringt. Dabei inseriert womöglich sowohl das N-FPS (gelbes Rechteck) als auch das I-FPS (hellblaues Rechteck) direkt in die Membran. Der zwischen den FPS gelegene hydrophile Teil ist nicht in die Membran inseriert, und aufgrund eines zentralen Prolin-Restes mit Knick dargestellt (rote Linie). Die beiden α -Helices mit Heptad-Wiederholung (Amphi- bzw. CPI-Helix) liegen antiparallel zueinander (grüne Rechtecke), wobei sie *in vivo* als trimerer Komplex ein stabiles Sechs-Helix-Bündel ausbilden, das den fusogenen Zustand des GP-2 stabilisiert. Der zwischen den Membranen gelegene antigenische Apex mit vier N-Glysylierungsstellen (Dreizacke) ist angedeutet. Die blauen Sterne in den FPS zeigen die AS-Positionen an, die in der vorliegenden Arbeit als wichtige Fusionsdeterminanden bestimmt wurden (W264A, G277A, Y278A und L280A). Abb. angelehnt an Lai *et al.* 2006.

Dass die Region zwischen den beiden FPS eine geknickte Form einnehmen könnte, könnte an dem hochkonservierten Prolin-Rest in der Region zwischen den beiden FPS liegen. Dieser Rest wurde als essentiell für die Fusion beim Ebola-Viruseintritt beschrieben (Gómara *et al.* 2004). So zeigte eine P537R-Austauschmutante des Ebola-Virus Fusionsproteins GP-2 zwar Assoziation an Lipidmembranen, jedoch konnte es diese nicht mehr destabilisieren, sprich keine Fusion auslösen. Durch „Begradigung“ des Knicks konnte das Ebola-Virus FPS der Mutante P537R also hydrophob mit der Membran wechselwirken, allerdings lag das FPS dann parallel zur Membran und die Penetration blieb aus. Gleiches wurde für das N-FPS von Influenza-Virus HA2 beschrieben. Eine G1V-Austauschmutante konnte zwar an Membranen binden, allerdings verhinderte die Mutation die FPS-Penetration (Tamm 2003).

Da auch für das Lassa-Virus GP-2 eine „Turn-Struktur“ zwischen N-FPS und I-FPS vorhergesagt wird (Gallaher *et al.* 2001), wurde im Schema der Abb. 31 die Zwischen-FPS-Region ebenfalls mit Knick dargestellt. Das darin befindliche Prolin (P275) wurde in dieser Arbeit zur Arginin mutiert, um den Knick zu entfernen. Die P275R Mutante zeigte zwar reduzierte Zell-Zellfusion, allerdings löste sie nur noch etwa 50% Fusion im Vergleich zum Wildtyp aus (Abb. 18), und auch ein ca. 50%iger Infektiositätsverlust im Vergleich zum Wildtyp im rPT-Experiment wurde bei dieser Mutante beobachtet (Abb. 23). Bei Mutationsanalysen des I-FPS des Ebola-Virus zeigte lediglich eine P537A Mutante noch etwa 75% Wildtyp-Infektiosität, wenn mittels VSV-Pseudotypen analysiert, wohingegen die P537R-Mutante (siehe auch oben) keine Infektiosität vermittelte (Ito *et al.* 1999). Im Unterschied zum Ebola-Virus FPS scheint das Lassa-Virus FPS den Austausch des Prolins also zu tolerieren, was dafür spricht, dass im Falle dieser P275R-Mutation das Lassa-Virus N-FPS das alleinige fusionsauslösende FPS sein könnte. Das I-FPS lagert sich bei dieser Mutante dann möglicherweise nur parallel zur Membran an, ohne diese zu penetrieren.

Ein ähnlicher Knick wie im Ebola-Virus Fusionsprotein findet sich ebenfalls im Influenza-Virus HA2-FPS, allerdings wird dieser nicht durch ein Prolin gebildet. Der Knick an sich ist aber essentiell für die Fusionsreaktion, wie neuere Arbeiten von Lai *et al.* zeigten (2006). Alanin-Austauschmutationen, die den Knick innerhalb einer amphipathischen Region des N-FPS des Influenza-Virus HA2 zerstörten (E11A und W14A) führten dazu, dass Hemifusion zwar noch möglich war, d.h. die äußeren Membranblätter verschmelzen konnten, die Porenöffnung für die komplette Fusion war allerdings bei diesen Mutanten nicht mehr möglich. Auch für das FPS des p10 des

Nelson-Bay-Reovirus wurde eine Knickstruktur beschrieben (Shmulevitz *et al.* 2004). Diese Befunde zeigen, dass unterschiedliche Viren ähnliche mechanistische Elemente aufweisen, die dem Membranfusionsprozess zugrunde liegen.

Eine Nutzung der beiden FPS für die Membranpenetration und dadurch induzierte GP-2-Konformationsänderungen mit nachfolgender Fusion wie hier vorgeschlagen wäre also möglich. Für das Lassa-Virus könnte die extrem lange hydrophobe FPS-Domäne (N-FPS und I-FPS sind zusammen neununddreißig AS-Reste lang) eine verbesserte Verankerung in der Zielzellemembran bedeuten, was die Fusion effizienter und den Membranverankerungskomplex stabiler machen könnte. Da die komplette neununddreißig AS-Reste lange FPS-Region im Vergleich zu anderen Viren allerdings eine relativ geringere Hydrophobizität aufweist (Kap. 4. 2.), fusionieren Altwelt-Arenaviren jedoch insgesamt schwächer als andere Viren.

4. 4. Inhibitionsstudien

Die hier gewonnenen Erkenntnisse über den molekularen Fusionsmechanismus des Lassa-Virus könnten von großer Bedeutung im Hinblick auf die Entwicklung antiviral wirkender Medikamente sein. Eine Viruserkrankung bei einem der frühesten Schritte der Infektion zu inhibieren ist ein wünschenswertes Ziel, da das Virus an seiner weiteren Ausbreitung gehindert wird und schwerwiegende Schädigungen von Infizierten vermieden werden könnten. In dieser Arbeit wurden drei synthetische Peptide (N-, I-FPS und CPI-Helix des Lassa-Virus GP-2) und acht humane Seren mit Lassa-Virus Antikörpern auf ihre Effekte auf Fusion und rPT-Infektiosität untersucht. Inhibitionen der Fusionsreaktionen mit Analoga der FPS wurden beispielsweise bei Paramyxoviren beobachtet (Inocencio *et al.* 1990). Im Falle des Lassa-Virus zeigten die beiden nichtoptimierten FPS-Peptide allerdings keine Effekte auf Fusion oder Infektion. Das Lassa-Virus CPI-Helix-Analogon, das dem HIV-Fusionsinhibitor T-20 homolog ist, zeigte ebenfalls keine Effekte auf Zell-Zellfusion und rPT-Infektiosität. T-20 ist bereits im klinischen Einsatz in Kombinationstherapie mit anderen antiretroviralen Medikamenten. Allerdings haben sich in letzter Zeit T-20-resistente Escapemutanten herausgebildet. Die AS 36 des HIV-1 gp41 (ein Glyzin) ist dabei von besonderer Bedeutung, obwohl diese nicht in der alpha-helikalen, C-terminalen Proteindomäne lokalisiert ist, deren AS-Sequenz T-20 entspricht. Ist G36 nach D mutiert, fusioniert das resultierende Virus zwar schwächer, aber die Fusion ist noch ausreichend für effiziente

Infektion. Und diese Escapemutation, obwohl nicht im HIV-1 FPS lokalisiert, beeinflusst die gp41 Struktur in ihrer fusionsaktiven Form dergestalt, dass sie das Ausbilden der Sechs-Helix-Bündel trotz Präsenz von T-20 möglich macht (Kinomoto *et al.* 2005). Für pH-abhängige Viren wurden ebenfalls T-20-Homologe getestet, allerdings verhinderten diese die Fusion nicht. Nur die Fusion von pH-unabhängigen Viren konnte bisher mit solchen Substanzen inhibiert werden (Earp *et al.* 2004).

Für die Neuwelt-Arenaviren wurde mit einem CPE-Assay (*engl.*: cytopathic effect) eine Substanzklasse identifiziert, die den Viruseintritt von Tacaribe- und Junín-Virus hemmte. Das fluorierte Hyrazinamid ST-294, welches in nanomolekularen Konzentration die Virusreplikation beider Neuwelt-Arenaviren hemmte, wurde dabei als optimaler Inhibitor beschrieben (Bolken *et al.* 2006). In erwähnter Studie wurden vier Tacaribe-Virus ST-294-Escapemutanten identifiziert, und alle charakterisierten Einzel-AS-Escapemutanten wiesen Mutationen in oder um die Transmembrandomäne des GP-2 auf. Interessanterweise wies die Mutante DR#3.1 einen Austausch von Serin (Tacaribe-Virus GP-2) nach Isoleuzin innerhalb der Transmembrandomäne auf, und der entsprechende im Lassa-Virus GP-2 befindliche AS-Rest ist ebenfalls ein Isoleuzin. Gegen Lassa-Virusinfektion war ST-294 nicht wirksam, wobei allerdings nicht klar ist, ob dieser Transmembrandomänen-AS-Rest für die Unwirksamkeit gegen Lassa-Virusinfektion verantwortlich ist. Allerdings ist dieser Befund möglicherweise ein zusätzlicher Anhaltspunkt dafür, dass Neuwelt- und Altwelt-Arenaviren unterschiedliche Viruseintrittsmechanismen aufweisen (Kap. 4. 1.). Außerdem unterstreichen die Befunde von Bolken *et al.*, dass mehrere Domänen des arenaviralen GP-2 am Fusionsprozess beteiligt sind (Kap. 4. 3.). Denkbar wäre, dass bei Mutationen innerhalb der Transmembrandomäne das GP-2 in einem anderen Winkel in der Membran verankert ist, und somit die zur Fusion nötigen Proteinfaltungsprozesse nicht mehr möglich sind oder dass die postulierte Interaktion des FPS mit den Alpha-Helices im Postfusionszustand gestört ist.

Auch die Antigenität von Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren zeigt interessanterweise große Unterschiede. So weist die GP-1-Untereinheit des Glykoproteins eine heterogene N-Glykosylierung (N-Gly) auf. Während Tacaribe-Virus eine extreme starke GP-1-Verzuckerung mit elf potentiellen N-Gly-Stellen aufweist, zeigen Lassa- und LCM-Viren mit sechs bis sieben N-Gly-Stellen eine moderatere Verzuckerung. Junín-Virus besitzt dagegen nur vier N-Gly-Stellen, und damit die wenigsten innerhalb der Arenavirus-Familie (Eichler *et al.* 2006). In offensichtlichem Zusammenhang stehen

damit Befunde, die zeigten, dass das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern (nAK) bei Virusinfizierten komplementär zum GP-1-N-Gly-Muster ist. Während bei Tacirbe-Virusinfektionen keine nAK gegen GP-1 gefunden werden, finden sich nAK gegen LCM- und Lassa-Virusinfektionen zwar spät im Krankheitsverlauf, sie sind aber detektierbar und charakteristisch (Fischer-Hoch *et al.* 2000; Pinschewer *et al.* 2004). Junín-Virus allerdings erzeugte gute nAK-Antworten in Infizierten, und es existiert ein abgeschwächtes Junín-Virus als Impfstoff (Candid-1), das diese ebenfalls hervorrufen kann. Das Junín-Virus ist damit das einzige Arenavirus, gegen das eine wirksame, humorale Immunität aufgebaut werden kann (Ambrosio *et al.* 2006). Gegen alle anderen Arenaviren existiert zur Zeit kein Impfstoff.

Für fünf Seren von Lassafieberpatienten wurden ausgeprägte, inhibitorische Effekte im RZZFA beobachtet. Im rPT-Infektionsassay jedoch zeigten diese fusionshemmenden Seren und das Serum mit nachgewiesenen neutralisierenden Antikörpern („Kékoura“) keine signifikante Inhibition, allerdings einen „inhibierenden Trend“. Diese Ergebnisse könnten dahingehend interpretiert werden, dass (i) Inhibition der Fusion im RZZFA und Neutralisation der rPT-Infektiosität nicht korrelieren oder (ii) der rPT-Assay möglicherweise kein geeignetes Substitut für einen Virus-Neutralisationstest ist, da das eine Serum mit Lassa-Virus neutralisierenden Antikörpern in diesem Assay negativ reagierte. Diese Hypothesen müssen anhand einer größeren Anzahl von Seren überprüft werden. Alle die Zell-Zellfusion inhibierenden Seren wiesen im Jahre 1999 einen positiven anti-Lassa-Virus-NP-Titer auf (ter Meulen *et al.* 2000). Die fusionsreduzierenden Eigenschaften der Seren könnten darauf beruhen, dass die enthaltenen Antikörper Fusionsdomänen des GP-2 binden. Der RZZFA als gentechnisches Werkzeug zur Identifizierung von Fusionsinhibitoren lieferte damit erste potentiell anwendungsrelevante Ergebnisse.

4. 5. Ausblick

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigten, (i) dass die Fusion des Lassa-Virus mit der Zielzelle ein GP-2-gesteuerter Prozess ist, (ii) dass der komplette hydrophobe N-Terminus (AS 1-39) des GP-2 für die Fusion essentiell ist, seine Struktur und Funktion analog zum Ebola-Virus GP-2 sein könnten sowie (iii) dass die entwickelten Assay-Systeme zum Testen potentiell antiviral wirksamer Substanzen verwendet werden können.

Zur Validierung des hier vorgeschlagen Membranpenetrationsmodells (Abb. 31) wären Daten zur Auflösung der atomaren Struktur des Lassa-Virus GP-2 wichtig. Mit einem solchen Modell ließe sich möglicherweise auch die Interaktion des GP-2-FPS mit der Zielzellmembran analysieren. Die für diese Arbeit erzeugten FPS-Mutationen, die eine Vielzahl von unterschiedlichen Effekten induzierten (z.B. veränderte Reifespaltung und Oberflächentransport sowie verändertes Fusions- und Infektionsverhalten), könnten eventuell anhand eines atomaren Modells genauer erklärt werden.

Um die endosomalen Kompartimente zu bestimmen, in denen die Fusion des Lassa-Virus mit der Zelle stattfindet, wären Kolokalisationsstudien des GP-2 mit Markerproteinen der einzelnen endosomalen Kompartimente wichtig. Diese könnten den genauen Viruseintrittsort bestimmen helfen, am besten durch Infektionsexperimente mit Lassa-Virus, da die rPT-Titer zu niedrig sind.

Des Weiteren wären Studien wichtig, die die Rolle von Cathepsinen im Lassa-Virusaufnahmeprozess untersuchen. Ein zweite Spaltung des Lassa-Virus Glykoproteins in den Lysosomen – eventuell durch Cathepsine – wäre denkbar, und ein weitere Erklärung dafür, warum Lassa-Viren erst im Lysosom fusionieren. Möglicherweise führt eine weitere Spaltung im Endosom oder Wechselwirkungen mit Rab- oder anderen Endosomen-Proteinen zur Fusion bei physiologischem pH.

Die Entwicklung und das Austesten weiterer antiviraler Substanzen mit den beiden in dieser Arbeit vorgestellten Assay-Systemen wären weitere, wichtige Schritte hin zur Identifizierung von anti-Lassa-viralen Medikamenten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5. 1. Zusammenfassung (deutsch)

Ein wichtiger Schritt beim Eintritt des Lassa-Virus in die Zielzelle ist die Fusion von Virus- und Zellmembran nach endosomaler Aufnahme. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das GP-2-Hüllprotein des Lassa-Virus das funktionelle Fusionsprotein des Virus darstellt und welche Aminosäuren des N-Terminus des Proteins maßgeblich daran beteiligt sein könnten. Hierzu wurde ein rekombinanter Assay (RZZFA) entwickelt, der auf Expression des Glykoproteins und Quantifizierung der Fusion von Indikatorzellen beruht. Mit Hilfe des RZZFA wurde GP-2 als das Fusionsprotein des Lassa-Virus identifiziert, und es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Reifespaltung des GP-2-Vorläuferproteins GP-C als auch seine Aktivierung durch ungewöhnlich sauren pH-Wert die Voraussetzungen für die Fusogenität darstellen. Experimente mit anderen Vertretern derselben Familie *Arenaviridae* zeigten, dass sich die Fusionsproteine der sogenannten Altwelt-Arenaviren (Lassa-Virus, Lymphozytären-Choriomeningitis-Virus) von denen der Neuwelt-Arenaviren (Junín-Virus) in Bezug auf das pH-Optimum der Fusion deutlich unterscheiden. Um den für die Fusion verantwortlichen Bereich des N-Terminus des GP-2 zu bestimmen, wurden zweiundzwanzig individuelle Aminosäuren nach Alanin ausgetauscht und die rekombinanten Konstrukte auf Reifespaltung, Oberflächenexpression und Aktivität im RZZFA getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zu den Fusionsproteinen anderer Viren, der gesamte N-Terminus des Lassa-Virus GP-2 in die Fusion involviert ist.

Um die Infektiosität der Konstrukte zu testen, wurde zudem ein retroviraler Pseudotypen-Infektionsassay entwickelt, bei dem Partikel erzeugt werden, die aus einem Retrovirus-Capsid mit einer Lassa-Virushülle bestehen. Die Untersuchung der GP-2-Mutanten ergab, dass Fusogenität funktionell eng mit Infektiosität korreliert. Anhand der beobachteten Ergebnisse wurde ein Modell der Interaktion des N-Terminus des Lassa-Virus GP-2 mit der endosomalen Zellmembran entwickelt. Dieses Modell weist Ähnlichkeiten mit dem vermuteten Fusionsprozess des Ebola-Virus auf.

Versuche, die Fusion des GP-2 mittels kurzer Peptide zu inhibieren, gelangen nicht, jedoch zeigten Seren von rekonvaleszenten Lassafieberpatienten zum Teil starke inhibitorische Wirkung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5. 2. Zusammenfassung / Summary (englisch)

An important step of Lassa virus entry is the fusion of viral and cellular membranes after endosomal uptake. In the present work it was examined if the Lassa virus envelope protein GP-2 is the functional fusion protein of the virus, and additionally it was tested which amino acids within the N-terminus of the protein are crucially involved in the fusion process. To examine these questions a quantitative GP-2-expression-based recombinant cell-cell fusion assay (RCCFA) was developed, which identified GP-2 as the fusion protein of the virus. Additionally it was shown that the cleavage of the GP-2-precursor protein GP-C as well as activation by unusually low pH are prerequisites for fusogenicity. Experiments with other members of the same viral family *Arenaviridae* revealed differences between the fusion proteins of old world arenaviruses (Lassa virus, Lymphocytic choriomeningitis virus) and new world arenaviruses (Junín virus) in regard to the pH-optimum of the fusion process.

In order to map the region responsible for fusion in the N-terminus of GP-2 twenty-two individual amino acids were exchanged to alanine and the recombinant constructs were tested for cleavage, cell surface expression and activity in the RCCFA. It was found that – in contrast to fusion proteins of other viruses – the entire N-terminus of Lassa virus GP-2 is involved in the fusion process.

To additionally test the infectivity of the constructs a retroviral pseudotype assay was developed in which particles are generated consisting of a retroviral capsid and a Lassa virus envelope.

Examination of the GP-2 mutants revealed that fusogenicity strongly correlated with infectivity. Based on the observed results a membrane interaction model of Lassa virus GP-2 with the endosomal target membrane was developed. This model showed similarities with the presumed fusion process of Ebola virus.

Attempts to inhibit fusion with short synthetic peptides failed, whereas several sera of convalescent Lassa fever patients showed a strong inhibitory effect.

6. ANHANG

6. 1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Geographische Verbreitung der wichtigsten Arenaviren	2
Abb. 2A: Schematische Darstellung der Lassa-Virusmorphologie	6
Abb. 2B: Elektronenkryomikroskopische Aufnahmen von Arenaviren	7
Abb. 3. Das oberflächenständige Lassa-Virus Glykoprotein GP	12
Abb. 4. Schematische Darstellung der Sekundärstrukturvorhersage des Lassa-Virus GP-2	16
Abb. 5: Internalisierungsprozess von Altwelt-Arenaviren durch Viropexis	18
Abb. 6: Funktionsmechanismus der Typ I Fusionsproteine	24
Abb. 7: Funktionsmechanismus der Typ II Fusionsproteine	25
Abb. 8: pAdApt-Vektor für die codon-optimierte Expression von Lassa-Virus GP	33
Abb. 9: Prinzip des RZZFA	57
Abb. 10: Prinzip der Lassa-Virus GP-vermittelten Pseudotypisierung von retroviralen Partikeln	59
Abb. 11A: RZZFA mit Lassa-, LCM-, Junín- und Influenza-Virus Glykoproteinen	63
Abb. 11B: Zellzahlkontrolle im RZZFA	64

Abb. 12: Die Reifespaltung von GP-C in die Untereinheiten GP-1 und GP-2 ist Voraussetzung für dessen Fusogenität	65
Abb. 13A: Beeinflussung der Fusogenität von Lassa-Virus GP durch Koexpression mit Lassa-Virus Z und/oder Lassa-Virus NP	67
Abb. 13B: Verifikation der Lassa-Virusproteinexpressionen mittels Western-Blot-Analyse	67
Abb. 14: Schema der FPS-Mutanten, die für diese Arbeit hergestellt wurden	71
Abb. 15: Erzeugung der Lassa-Virus FPS-Mutanten mittels rekombinanter PCR	72
Abb. 16: Spaltung der Lassa-Virus FPS-Mutanten	73
Abb. 17A: Zelloberflächenexpression der Lassa-Virus FPS-Mutanten	75
Abb. 17B: Zellzahlkontrolle beim Oberflächenbiotinylierungsexperiment	75
Abb. 18: Relative Fusogenität der Lassa-Virus FPS-Mutanten	77
Abb. 19A: Transfektionseffizienz der rPT-Produktion	78
Abb. 19B: Transduktion von Vero-Zellen mit MLV-Lassa-Virus-GP-rPT	79
Abb. 20: NH ₄ Cl-induzierte Hemmung der MLV-Lassa-Virus-GP-rPT-Transduktion	80
Abb. 21: rPT-Titration mittels quantitativer Western-Blot-Analyse	81
Abb. 22: Inkorporation des Lassa-Virus GP in MLV-Partikel	82
Abb. 23: rPT-Infektiosität von Lassa-Virus FPS-Mutanten	83

Abb. 24: Einfluss von synthetischen Lassa-Virus FPS-Analoga auf die Zell-Zellfusion	85
Abb. 25: Einfluss von synthetischen Lassa-Virus FPS-Analoga auf die rPT-Infektion	86
Abb. 26: Einfluss des synthetischen Lassa-Virus CPI-Helix-Analogons auf die Zell-Zellfusion	86
Abb. 27: Einfluss des synthetischen Lassa-Virus CPI-Helix-Analogons auf die rPT-Infektion	87
Abb. 28: Hemmung der Lassa-Virus GP-induzierten Zell-Zellfusion mit humanen Seren	88
Abb. 29: Effekte humaner Seren auf die Lassa-Virus GP-induzierte Zell-Zellfusion der FPS-Mutanten G276A, W283A, G294A und V298A	89
Abb. 30: Effekte humaner Seren auf die Lassa-Virus GP-vermittelte rPT-Infektiosität	89
Abb. 31: Schematische Darstellung des möglichen Penetrationsmechanismus des Lassa-Virus GP-2 in die Zielzellmembran	99

6. 2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1A: Primer zur Herstellung von Einzel-AS-Austauschmutationen innerhalb der postulierten Lassa-Virus GP-2-FPS	31
Tab. 1B: Flankierungsprimer	32
Tab. 2: Synthetische Peptide für Fusions- und Infektionsinhibitionsstudien	35
Tab. 3: WWHI-Vorhersage der N-Termini der membranverankerten Glykoproteinuntereinheiten von Altwelt- und Neuwelt- Arenaviren sowie von Influenza-, Ebola- und HI-Virus	69
Tab. 4: Zusammenfassende strukturelle und biochemische Charakterisierung der Lassa-Virus FPS-Mutanten	76

6. 3. Literaturverzeichnis

1. **Ambrosio, A. M., L. M. Riera, M. C. Saavedra, and M. S. Sabattini.** 2006. Immune response to vaccination against argentine hemorrhagic fever in an area where different arenaviruses coexist. *Viral Immunol.* **19**:196-201.
2. **Baize, S., J. Kaplon, C. Faure, D. Pannetier, M. C. Georges-Courbot, and V. Deubel.** 2004. Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. *J. Immunol.* **172**:2861-2869.
3. **Bär, S., A. Takada, Y. Kawaoka, and M. Alizon.** 2006. Detection of cell-cell fusion mediated by Ebola virus glycoproteins. *J. Virol.* **80**:2815-2822.
4. **Beyer, W. R., D. Popplau, W. Garten, D. von Laer, and O. Lenz.** 2003. Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J. Virol.* **77**:2866-2872.
5. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
6. **Bolken, T. C., S. Laguerre, Y. Zhang, T. R. Bailey, D. C. Pevear, S. S. Kickner, L. E. Sperzel, K. F. Jones, T. K. Warren, S. Amanda-Lund, D. L. Kirkwood-Watts, D. S. King, A. C. Shurtleff, M. C. Guttieri, Y. Deng, M. Bleam, and D. E. Hruby.** 2006. Identification and characterization of potent small molecule inhibitor of hemorrhagic fever New World arenaviruses. *Antiviral Res.* **69**:86-97.
7. **Borden, K. L., E. J. Campbell Dwyer, G. W. Carlile, M. Djavani, and M. S. Salvato.** 1998. Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J. Virol.* **72**:3819-3826.
8. **Borden, K. L., E. J. Campbell Dwyer, and M. S. Salvato.** 1998. An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J. Virol.* **72**:758-766.
9. **Borrow, P., and M. B. Oldstone.** 1994. Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* **198**:1-9.

10. **Brown, D., and G. Lloyd.** 1999. Zoonotic viruses, p. 11.1-11.14. *In* D. Armstrong and J. Cohen (ed.), *Infectious Diseases*, vol. 2. Mosby, Philadelphia, USA.
11. **Bruns, M., W. Zeller, H. Rohdewohld, and F. Lehmann-Grube.** 1986. Lymphocytic choriomeningitis virus. IX. Properties of the nucleocapsid. *Virology* **151**:77-85.
12. **Buchmeier, M. J.** 2002. Arenaviruses: protein structure and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **262**:159-173.
13. **Buckley, S. M., and J. Casals.** 1970. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**:680-691.
14. **Burns, J. W., and M. J. Buchmeier.** 1993. Glycoproteins of the arenaviruses, p. 17-35. *In* M. S. Salvato (ed.), *The Arenaviridae*. Plenum Press, New York, N. Y.
15. **Burns, J. W., and M. J. Buchmeier.** 1991. Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **183**:620-629.
16. **Cameron, C. E., and C. Castro.** 2001. The mechanism of action of ribavirin: lethal mutagenesis of RNA virus genomes mediated by the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **14**:757-764.
17. **Campbell Dwyer, E. J., H. Lai, R. C. MacDonald, M. S. Salvato, and K. L. Borden.** 2000. The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *J. Virol.* **74**:3293-3300.
18. **Cao, W., M. D. Henry, P. Borrow, H. Yamada, J. H. Elder, E. V. Ravkov, S. T. Nichol, R. W. Compans, K. P. Campbell, and M. B. Oldstone.** 1998. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**:2079-2081.
19. **Castilla, V., M. Contigiani, and S. E. Mersich.** 2005. Inhibition of cell fusion in Junín virus-infected cells by sera from Argentine hemorrhagic fever patients. *J. Clin. Virol.* **32**:286-288.
20. **Castilla, V., S. E. Mersich, N. A. Candurra, and E. B. Damonte.** 1994. The entry of Junín virus into Vero cells. *Arch. Virol.* **136**:363-374.

21. **Chandran, K., N. J. Sullivan, U. Felbor, S. P. Whelan, and J. M. Cunningham.** 2005. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**:1643-1645.
22. **Chandran, K., S. B. Walker, Y. Chen, C. M. Contreras, L. A. Schiff, T. S. Baker, and M. L. Nibert.** 1999. *In vitro* recoating of reovirus cores with baculovirus-expressed outer-capsid proteins $\mu 1$ and $\sigma 3$. *J. Virol.* **73**:3941-3950.
23. **Charrel, R. N., J. J. Lemasson, M. Garbutt, R. Khelifa, P. DeMicco, H. Feldmann, and X. de Lamballerie.** 2003. New insights into the evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segment sequences. *Virology* **317**:191-196.
24. **Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:2172-2175.
25. **Colman, P. M., and M. C. Lawrence.** 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:309-319.
26. **Crotty, S., and R. Andino.** 2002. Implications of high RNA virus mutation rates: lethal mutagenesis and the antiviral drug ribavirin. *Microbes Infect.* **4**:1301-1307.
27. **Cummins, D., J. B. McCormick, D. Bennett, J. A. Samba, B. Farrar, S. J. Machin, and S. P. Fisher-Hoch.** 1990. Acute sensorineural deafness in Lassa fever. *JAMA* **264**:2093-2096.
28. **Davis, H. E., J. R. Morgan, and M. L. Yarmush.** 2002. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys. Chem.* **97**:159-172.
29. **Davis, H. E., M. Rosinski, J. R. Morgan, and M. L. Yarmush.** 2004. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys. J.* **86**:1234-1242.
30. **Di Simone, C., and M. J. Buchmeier.** 1995. Kinetics and pH dependence of acid-induced structural changes in the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein complex. *Virology* **209**:3-9.
31. **Di Simone, C., M. A. Zandonatti, and M. J. Buchmeier.** 1994. Acidic pH triggers lymphocytic choriomeningitis virus membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology* **198**:455-465.

32. **Djavani, M., I. S. Lukashevich, A. Sanchez, S. T. Nichol, and M. S. Salvato.** 1997. Completion of the Lassa fever virus sequence and identification of a RING finger open reading frame at the L RNA 5'-end. *Virology* **235**:414-418.
33. **Drosten, C., B. M. Kümmerer, H. Schmitz, and S. Günther.** 2003. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res.* **57**:61-87.
34. **Durbeej, M., M. D. Henry, M. Ferletta, K. P. Campbell, and P. Ekblom.** 1998. Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **46**:449-457.
35. **Earp, L. J., S. E. Delos, H. E. Park, and J. M. White.** 2004. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**:25-66.
36. **Eichler, R., O. Lenz, W. Garten, and T. Strecker.** 2006. The role of single N-glycans in proteolytic processing and cell surface transport of the Lassa virus glycoprotein GP-C. *Virology J.* **3**:41.
37. **Eichler, R., O. Lenz, T. Strecker, M. Eickmann, H. D. Klenk, and W. Garten.** 2003. Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a *trans*-acting maturation factor. *EMBO Rep.* **4**:1084-1088.
38. **Eichler, R., O. Lenz, T. Strecker, M. Eickmann, H. D. Klenk, and W. Garten.** 2004. Lassa virus glycoprotein signal peptide displays a novel topology with an extended endoplasmic reticulum luminal region. *J. Biol. Chem.* **279**:12293-12299.
39. **Eichler, R., O. Lenz, T. Strecker, and W. Garten.** 2003. Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length. *FEBS Lett.* **538**:203-206.
40. **Eichler, R., T. Strecker, L. Kolesnikova, J. ter Meulen, W. Weissenhorn, S. Becker, H. D. Klenk, W. Garten, and O. Lenz.** 2004. Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Res.* **100**:249-255.
41. **Epand, R. M.** 2003. Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**:116-121.
42. **Ervasti, J. M., and K. P. Campbell.** 1991. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* **66**:1121-1131.

43. **Ervasti, J. M., and K. P. Campbell.** 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell. Biol.* **122**:809-823.
44. **Eschli, B., K. Quirin, A. Wepf, J. Weber, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 2006. Identification of an N-terminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins. *J. Virol.* **80**:5897-5907.
45. **Fisher-Hoch, S. P., L. Hutwagner, B. Brown, and J. B. McCormick.** 2000. Effective vaccine for Lassa fever. *J. Virol.* **74**:6777-6783.
46. **Freed, E. O., D. J. Myers, and R. Risser.** 1990. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4650-4654.
47. **Fuller-Pace, F. V., and P. J. Southern.** 1989. Detection of virus-specific RNA-dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: *In vitro* synthesis of full-length viral RNA species. *J. Virol.* **63**:1938-1944.
48. **Gallaher, W. R., C. Di Simone, and M. J. Buchmeier.** 2001. The viral transmembrane superfamily: possible divergence of arenavirus and filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol.* **1**:1.
49. **Garcin, D., S. Rochat, and D. Kolakofsky.** 1993. The Tacaribe arenavirus small zinc finger protein is required for both mRNA synthesis and genome replication. *J. Virol.* **67**:807-812.
50. **Garten, W., S. Hallenberger, D. Ortmann, W. Schäfer, M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, and H. D. Klenk.** 1994. Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* **76**:217-225.
51. **Gee, S. H., F. Montanaro, M. H. Lindenbaum, and S. Carbonetto.** 1994. Dystroglycan-alpha, a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell* **77**:675-686.
52. **Gething, M. J., R. W. Doms, D. York, and J. White.** 1986. Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of Influenza virus. *J. Cell Biol.* **102**:11-23.

53. **Glushakova, S. E., I. S. Lukashevich, and L. A. Baratova.** 1990. Prediction of arenavirus fusion peptides on the basis of computer analysis of envelope protein sequences. *FEBS Lett.* **269**:145-147.
54. **Glushakova, S. E., V. G. Omelyanenko, I. S. Lukashevitch, A. A. Bogdanov Jr., A. B. Moshnikova, A. T. Kozytch, and V. P. Torchilin.** 1992. The fusion of artificial lipid membranes induced by the synthetic arenavirus 'fusion peptide'. *Biochim. Biophys. Acta.* **1110**:202-208.
55. **Gómara, M. J., P. Mora, I. Mingarro, and J. L. Nieva.** 2004. Roles of a conserved proline in the internal fusion peptide of Ebola glycoprotein. *FEBS Lett.* **569**:261-266.
56. **Greiner, A., A. Lautwein, H. S. Overkleeft, E. Weber, and C. Driessen.** 2003. Activity and subcellular distribution of cathepsins in primary human monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **73**:235-242.
57. **Haas, J., E. C. Park, and B. Seed.** 1996. Codon usage limitation in the expression of human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.* **6**:315-324.
58. **Han, J. Y., P. M. Cannon, K. M. Lai, Y. Zhao, M. V. Eiden, and W. F. Anderson.** 1997. Identification of envelope protein residues required for the expanded host range of 10A1 murine leukemia virus. *J. Virol.* **71**:8103-8108.
59. **Harman, A., H. Browne, and T. Minson.** 2002. The transmembrane domain and cytoplasmic tail of Herpes Simplex virus type 1 glycoprotein H play a role in membrane fusion. *J. Virol.* **76**:10708-10716.
60. **Hass, M., U. Golnitz, S. Müller, B. Becker-Ziaja, and S. Günther.** 2004. Replicon system for Lassa virus. *J. Virol.* **78**:13793-13803.
61. **Havenga, M. J., A. A. Lemckert, J. M. Grimbergen, R. Vogels, L. G. Huisman, D. Valerio, A. Bout, and P. H. Quax.** 2001. Improved adenovirus vectors for infection of cardiovascular tissues. *J. Virol.* **75**:3335-3342.
62. **Henry, M. D., and K. P. Campbell.** 1999. Dystroglycan inside and out. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**:602-607.
63. **Henry, M. D., and K. P. Campbell.** 1998. A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* **95**:859-870.

64. **Higuchi, R., B. Krummel, and R. K. Saiki.** 1988. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**:7351-7367.
65. **Hohenester, E., D. Tisi, J. F. Talts, and R. Timpl.** 1999. The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin. *Mol. Cell* **4**:783-792.
66. **Horvath, C. M., and R. A. Lamb.** 1992. Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J. Virol.* **66**:2443-2455.
67. **Huang, R. T. C., R. Rott, and H. D. Klenk.** 1981. Influenza viruses cause hemolysis and fusion of cells. *Virology* **110**:243-247.
68. **Inocencio, N. M., B. Gotoh, T. Toyoda, C. Kitada, and Y. Nagai.** 1990. Evaluation of the antiviral effect of synthetic oligopeptides whose sequences are derived from paramyxovirus F1 N-termini. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **179**:87-94.
69. **Ito, H., S. Watanabe, A. Sanchez, M. A. Whitt, and Y. Kawaoka.** 1999. Mutational analysis of the putative fusion domain of Ebola virus glycoprotein. *J. Virol.* **73**:8907-8912.
70. **Jardetzky, T. S., and R. A. Lamb.** 2004. A class act. *Nature* **427**:307-308.
71. **Jaysinghe, S., K. Hristova, W. Wimley, C. Snider, and S. H. White** 2006, posting date. <http://blanco.biomol.uci.edu/mpex>. [Online.]
72. **Jiang, S., Q. Zhao, and A. K. Debnath.** 2002. Peptide and non-peptide human immunodeficiency virus fusion inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **8**:563-580.
73. **Kantchev, E. A. B., S. F. Cheng, C. W. Wu, H. J. Huang, and D. K. Chang.** 2004. Secondary structure, phospholipid membrane interactions, and fusion activity of two glutamate-rich analogs of Influenza hemagglutinin fusion peptide. *Arch. Biochem. Biophys.* **425**:173-183.
74. **Khor, R., L. J. McElroy, and G. R. Whittaker.** 2003. The ubiquitin-vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of Influenza virus into host cells. *Traffic* **4**:857-868.
75. **Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag.** 1998. Potent

- suppression of human immunodeficiency virus type-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.* **4**:1302-1307.
76. **Kimpton, J., and M. Emerman.** 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J. Virol.* **66**:2232-2239.
77. **Kinomoto, M., M. Yokoyama, H. Sato, A. Kojima, T. Kurata, K. Ikuta, T. Sata, and K. Tokunaga.** 2005. Amino acid 36 in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J. Virol.* **79**:5996-6004.
78. **Kunz, S., P. Borrow, and M. B. Oldstone.** 2002. Receptor structure, binding, and cell entry of arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **262**:111-137.
79. **Kunz, S., J. M. Rojek, M. Perez, C. F. Spiropoulou, and M. B. Oldstone.** 2005. Characterization of the interaction of Lassa fever virus with its cellular receptor alpha-dystroglycan. *J. Virol.* **79**:5979-5987.
80. **Kunz, S., N. Sevilla, D. B. McGavern, K. P. Campbell, and M. B. Oldstone.** 2001. Molecular analysis of the interaction of lymphocytic choriomeningitis virus with its cellular receptor alpha-dystroglycan. *J. Cell Biol.* **155**:301-310.
81. **Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**:203-209.
82. **Lai, A. L., H. Park, J. M. White, and L. K. Tamm.** 2006. Fusion peptide of Influenza hemagglutinin requires a fixed angle boomerang structure for activity. *J. Biol. Chem.* **281**:5760-5770.
83. **Lecompte, E., E. Fichet-Calvet, S. Daffis, K. Koulémou, O. Sylla, F. Kourouma, A. Doré, B. Soropogui, V. Aniskin, B. Allali, S. Kouassi Kan, A. Lalis, L. Koivogui, S. Günther, C. Denys, and J. ter Meulen.** 2006. *Mastomys natalensis* and Lassa fever, West Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1971-1974 [*in press*].
84. **Lee, K. J., M. Perez, D. D. Pinschewer, and J. C. de la Torre.** 2002. Identification of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) proteins required to rescue LCMV RNA analogs into LCMV-like particles. *J. Virol.* **76**:6393-6397.

85. **Lenz, O., J. ter Meulen, H. Feldmann, H. D. Klenk, and W. Garten.** 2000. Identification of a novel consensus sequence at the cleavage site of the Lassa virus glycoprotein. *J. Virol.* **74**:11418-11421.
86. **Lenz, O., J. ter Meulen, H. D. Klenk, N. G. Seidah, and W. Garten.** 2001. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:12701-12705.
87. **Leung, W. C., and W. E. Rawls.** 1977. Virion-associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus. *Virology* **81**:174-176.
88. **Levy-Mintz, P., and M. Kielian.** 1991. Mutagenesis of the putative fusion domain of the Semliki Forest virus spike protein. *J. Virol.* **65**:4292-4300.
89. **Liao, M., and M. Kielian.** 2005. Domain III from class II fusion proteins functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion. *J. Cell Biol.* **171**:111-120.
90. **Lukashevich, I. S., R. Maryankova, A. S. Vladyko, N. Nashkevich, S. Koleda, M. Djavani, D. Horejsh, N. N. Voitenok, and M. S. Salvato.** 1999. Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression. *J. Med. Virol.* **59**:552-560.
91. **Lyu, P. C., M. I. Liff, L. A. Marky, and N. R. Kallenbach.** 1990. Side chain contributions to the stability of alpha-helical structure in peptides. *Science* **250**:669-673.
92. **Maxfield, F. R., and D. J. Yamashiro.** 1991. Acidification of organelles and the intracellular sorting of proteins during endocytosis., p. 157-182. *In* C. J. Steer and J. A. Hanover (ed.), *Intracellular trafficking of proteins*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
93. **McCormick, J. B., I. J. King, P. A. Webb, K. M. Johnson, R. O'Sullivan, E. S. Smith, S. Trippel, and T. C. Tong.** 1987. A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *J. Infect. Dis.* **155**:445-455.
94. **Meyer, B. J., and P. J. Southern.** 1993. Concurrent sequence analysis of 5' and 3' RNA termini by intramolecular circularization reveals 5' nontemplated bases and 3' terminal heterogeneity for lymphocytic choriomeningitis virus mRNAs. *J. Virol.* **67**:2621-2627.

95. **Monath, T. P., V. F. Newhouse, G. E. Kemp, H. W. Setzer, and A. Cacciapuoti.** 1974. Lassa virus isolation from *Mastomys natalensis* rodents during an epidemic in Sierra Leone. *Science* **185**:263-265.
96. **Murphy, F. A., and S. G. Whitfield.** 1975. Morphology and morphogenesis of arenaviruses. *Bull. World Health Org.* **52**:409-419.
97. **Neuman, B. W., B. D. Adair, J. W. Burns, R. A. Milligan, M. J. Buchmeier, and M. Yeager.** 2005. Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis. *J. Virol.* **79**:3822-3830.
98. **Nibert, M. L., L. A. Schiff, and B. N. Fields.** 1996. Reoviruses and their replication, p. 1557-1596. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 3rd ed, vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.
99. **Nussbaum, O., C. C. Broder, and E. A. Berger.** 1994. Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation. *J. Virol.* **68**:5411-5422.
100. **Pall, E. A., K. M. Bolton, and J. M. Ervasti.** 1996. Differential heparin inhibition of skeletal muscle alpha-dystroglycan binding to laminins. *J. Biol. Chem.* **271**:3817-3821.
101. **Peisajovich, S. G., R. F. Epand, R. M. Epand, and Y. Shai.** 2002. Sendai virus N-terminal fusion peptide consists of two similar repeats, both of which contribute to membrane fusion. *Eur. J. Biochem.* **269**:4342-4350.
102. **Peisajovich, S. G., and Y. Shai.** 2003. Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**:122-129.
103. **Pinschewer, D. D., M. Perez, E. Jeetendra, T. Bachi, E. Horvath, H. Hengartner, M. A. Whitt, J. C. de la Torre, and R. M. Zinkernagel.** 2004. Kinetics of protective antibodies are determined by the viral surface antigen. *J. Clin. Invest.* **114**:988-993.
104. **Qiao, H., R. T. Armstrong, G. B. Melikyan, F. S. Cohen, and J. M. White.** 1999. A specific point mutant at position 1 of the Influenza hemagglutinin fusion peptide displays a hemifusion phenotype. *Mol. Biol. Cell* **10**:2759-2769.
105. **Rambukkana, A., H. Yamada, G. Zanazzi, T. Mathus, J. L. Salzer, P. D. Yurchenco, K. P. Campbell, and V. A. Fischetti.** 1998. Role of alpha-

- dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* **283**:2076-2079.
106. **Rawson, R. B., R. DeBose-Boyd, J. L. Goldstein, and M. S. Brown.** 1999. Failure to cleave sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) causes cholesterol auxotrophy in Chinese hamster ovary cells with genetic absence of SREBP cleavage-activating protein. *J. Biol. Chem.* **274**:28549-28556.
107. **Reignier, T., J. Oldenburg, B. Noble, E. Lamb, V. Romanowski, M. J. Buchmeier, and P. M. Cannon.** 2006. Receptor use by pathogenic arenaviruses. *Virology* **353**:111-120.
108. **Richmond, J. K., and D. J. Baglole.** 2003. Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences. *BMJ* **327**:1271-1275.
109. **Russell, C. J., T. S. Jardetzky, and R. A. Lamb.** 2004. Conserved glycine residues in the fusion peptide of the paramyxovirus fusion protein regulate activation of the native state. *J. Virol.* **78**:13727-13742.
110. **Sakai, T., M. Ohuchi, M. Imai, T. Mizuno, K. Kawasaki, K. Kuroda, and S. Yamashina.** 2006. Dual wavelength imaging allows analysis of membrane fusion of Influenza virus inside cells. *J. Virol.* **80**:2013-2018.
111. **Salazar-Bravo, J., L. A. Ruedas, and T. L. Yates.** 2002. Mammalian reservoirs of arenaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **262**:25-63.
112. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
113. **Schmid, H., R. Sauerbrei, G. Schwarz, E. Weber, H. Kalbacher, and C. Driessen.** 2002. Modulation of the endosomal and lysosomal distribution of cathepsins B, L and S in human monocytes/macrophages. *Biol. Chem.* **383**:1277-1283.
114. **Schwartz, S., B. K. Felber, D. M. Benko, E. M. Fenyo, and G. N. Pavlakis.** 1990. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**:2519-2529.
115. **Sena-Esteves, M., J. C. Tebbets, S. Steffens, T. Crombleholme, and A. W. Flake.** 2004. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. *J. Virol. Meth.* **122**:131-139.
116. **Shmulevitz, M., R. F. Epand, R. M. Epand, and R. Duncan.** 2004. Structural and functional properties on an unusual internal fusion peptide in a nonenveloped virus membrane fusion protein. *J. Virol.* **78**:2808-2818.

117. **Simmons, G., D. N. Gosalia, A. J. Rennekamp, J. D. Reeves, S. L. Diamond, and P. Bates.** 2005. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:11876-11881.
118. **Soneoka, Y., P. M. Cannon, E. E. Ramsdale, J. C. Griffiths, G. Romano, S. M. Kingsman, and A. J. Kingsman.** 1995. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* **23**:628-633.
119. **Spiropoulou, C. F., S. Kunz, P. E. Rollin, K. P. Campbell, and M. B. Oldstone.** 2002. New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J. Virol.* **76**:5140-5146.
120. **Stegmann, T., R. W. Doms, and A. Helenius.** 1989. Protein-mediated membrane fusion. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**:187-211.
121. **Stieneke-Grober, A., M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, G. Thomas, C. Roberts, H. D. Klenk, and W. Garten.** 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* **11**:2407-2414.
122. **Strecker, T., R. Eichler, J. ter Meulen, W. Weissenhorn, H. D. Klenk, W. Garten, and O. Lenz.** 2003. Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles. *J. Virol.* **77**:10700-10705.
123. **Takada, A., C. Robison, H. Goto, A. Sanchez, K. G. Murti, M. A. Whitt, and Y. Kawaoka.** 1997. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:14764-14769.
124. **Talts, J. F., Z. Andac, W. Gohring, A. Brancaccio, and R. Timpl.** 1999. Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *EMBO J.* **18**:863-870.
125. **Tamm, L. K.** 2003. Hypothesis: spring-loaded boomerang mechanism of Influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**:14-23.
126. **ter Meulen, J., M. Badusche, K. Kuhnt, A. Doetze, J. Satoguina, T. Marti, C. Loeliger, K. Koulémou, L. Koivogui, H. Schmitz, B. Fleischer, and A. Hoerauf.** 2000. Characterization of human CD4(+) T-cell clones recognizing conserved and variable epitopes of the Lassa virus nucleoprotein. *J. Virol.* **74**:2186-2192.

127. **ter Meulen, J., M. Badusche, J. Satoguina, T. Strecker, O. Lenz, C. Loeliger, M. Sakho, K. Koulémou, L. Koivogui, and A. Hoerauf.** 2004. Old and New World arenaviruses share a highly conserved epitope in the fusion domain of the glycoprotein 2, which is recognized by Lassa virus-specific human CD4+ T-cell clones. *Virology* **321**:134-143.
128. **Urata, S., T. Noda, Y. Kawaoka, H. Yokosawa, and J. Yasuda.** 2006. Cellular factors required for Lassa virus budding. *J. Virol.* **80**:4191-4195.
129. **Van Dyke, R. W.** 1996. Acidification of lysosomes and endosomes. *Subcell. Biochem.* **27**:331-360.
130. **Vieth, S., A. E. Torda, M. Asper, H. Schmitz, and S. Günther.** 2004. Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology* **318**:153-168.
131. **Vogelstein, B., and D. Gillespie.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:615-619.
132. **Volchkov, V. E., H. Feldmann, V. A. Volchkova, and H. D. Klenk.** 1998. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:5762-5767.
133. **Wagner, R., A. Herwig, N. Azzouz, and H. D. Klenk.** 2005. Acylation-mediated membrane anchoring of avian Influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. *J. Virol.* **79**:6449-6458.
134. **Watanabe, S., A. Takada, T. Watanabe, H. Ito, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 2000. Functional importance of the coiled-coil of the Ebola virus glycoprotein. *J. Virol.* **74**:10194-10201.
135. **Weber, E. L., and M. J. Buchmeier.** 1988. Fine mapping of a peptide sequence containing an antigenic site conserved among arenaviruses. *Virology* **164**:30-38.
136. **White, J., J. Kartenbeck, and A. Helenius.** 1982. Membrane fusion activity of Influenza virus. *EMBO J.* **1**:217-222.
137. **Whitt, M. A., P. Zagouras, B. Crise, and J. K. Rose.** 1990. A fusion-defective mutant of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J. Virol.* **64**:4907-4913.
138. **Winn, W. C., Jr., and D. H. Walker.** 1975. The pathology of human Lassa fever. *Bull. World Health Org.* **52**:535-545.
139. **World Health Organization.** 1997. Lassa fever in Sierra Leone. *Weekly Epidem. Rec.* **72**:157-164.
140. **Yamada, H., A. Chiba, T. Endo, A. Kobata, L. V. Anderson, H. Hori, H. Fukuta-Ohi, I. Kanazawa, K. P. Campbell, T. Shimizu, and**

- K. Matsumura.** 1996. Characterization of dystroglycan-laminin interaction in peripheral nerve. *J. Neurochem.* **66**:1518-1524.
141. **York, J., S. S. Agnihothram, V. Romanowski, and J. H. Nunberg.** 2005. Genetic analysis of heptad-repeat regions in the G2 fusion subunit of the Junín arenavirus envelope glycoprotein. *Virology* **343**:267-274.
142. **York, J., and J. H. Nunberg.** 2006. Role of the stable signal peptide of Junín arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *J. Virol.* **80**:7775-7780.
143. **York, J., V. Romanowski, M. Lu, and J. H. Nunberg.** 2004. The signal peptide of the Junín arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *J. Virol.* **78**:10783-10792.
144. **Zhang, L., and H. P. Ghosh.** 1994. Characterization of the putative fusogenic domain in vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *J. Virol.* **68**:2186-2193.

6. 4. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AK	Antikörper
Abb.	Abbildung
Ad5	Adenovirus-5
α	anti
α -DG	Alpha-Dystroglykan
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
β -gal	Beta-Galactosidase
BSA	Rinderserumalbumin
BSL-4	Biosafety Level 4 (höchste biologische Sicherheitsstufe)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	<i>circa</i>
CatB	Cathepsin B
CatL	Cathepsin L
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CH	Schweiz
CMV	Cytomegalie-Virus
CPE	cytopathic effect
CPI-Helix	C-terminale Alpha-Helix im Lassa-Virus GP-2
C-Terminus	Carboxyterminus
d	Tage
D	Deutschland
Da	Dalton
ΔG	freie Transferenergie
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
def	deficient
DG	Dystroglykan
d. h.	das heißt
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>engl.</i>	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

F ₁	Fusionsprotein-Untereinheit der <i>Paramyxoviridae</i>
FCS	fötales Kälberserum
FPS	Fusionspeptidsegment
FPV	fowl plague virus
g	Gramm
g	Gravitationskoeffizient
G	Guanin
GP	Glykoprotein
GP-C	Glykoproteinvorläufer
GTP	Guanosidtriphosphat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HIV-1	Humanes-Immundefizienz-Virus Typ-1
HR	Heptad-Repeat
I-FPS	Internes Fusionspeptidsegment
IGR	Intergenische-Region
inkl.	inklusive
K	Kalium
kDa	Kilodalton
l	Liter
LCMV	Lymphozytäres-Choriomeningitis-Virus
LTR	long terminal repeat (retrovirale Nukleotidsequenz)
m	Milli-
M	Molar
moi	multiplicity of infection
MEM	Minimal Essential Medium
mAK	monoklonaler Antikörper
μ	Mikro-
MLV	Murines-Leukämie-Virus
min	Minuten
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n	Nano-
Na	Natrium
NaAc	Natriumazetat
nAK	neutralisierende Antikörper
NC	Nitrozellulose
N-FPS	N-terminales Fusionspeptidsegment
N-Gly	Asparagin-Glykosylierung
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
NIAID	National Institut of Allergy and Infectious Diseases (USA)
NL	Niederlande
NP	Nukleoprotein
N-Terminus	Aminoterminus
NWA	Neuwelt-Arenavirus
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
p	Piko-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

PFA	Paraformaldehyd
PFU	plaque forming unit
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
ΦNXgp	293-Zellen mit ins Genom integrierten MLV gag- und pol-Genen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PM	Plasmamembran
PML	Promyelozytisches-Leukämie-Protein
RIPA	radio immunoprecipitation assay
RMP	Ribavirin-Monophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
rPT	retroviraler Pseudotyp
RT	Raumtemperatur
RZZFA	Rekombinanter Zell-Zellfusionsassay
SAP	shrink alkaline phosphatase
SARS	severe acute respiratory syndrome
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome coronavirus
sec	Sekunden
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
S-NHS	Sulfosuccinimidobiotin
sog.	sogenannt
SP	Signalpeptid
SPase	Signalpeptidase
SRD	sterol regulatory deficient
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
SSP	stabiles Signalpeptid
SV	Sendai-Virus
SV40	Simian-Virus-40
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Tat	transactivator of transcription (retroviraler Transkriptionsfaktor)
TBE-Virus	tick borne encephalitis virus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	transformation and storage solution
TTP	Thymidintriphosphat
TU	transfer units (Transfereinheiten)
U	internationale Einheit
ÜNK	Übernachtkultur
ÜS	Überstand
USA	United States of America
UpM	Umdrehungen pro Minute
VSV	Vesikuläres-Stomatitis-Virus
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WWHI	Wimley-White-Hydrophobizitäts-Index
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen der Aminosäuren

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

6. 5. Veröffentlichungen

1. **Klewitz, C.** 2006. Mutations- und Funktionsanalyse der Fusionsdomäne des Lassa-Virus Glykoproteins / Abschlussbericht, S. 76-80. *In* H. E. Blum, J. Dichgans und W. Kaminsky (Hrsg.), Publikationen der Jung-Stiftung für Wissenschaft und Forschung. Wachstum und Altern – Von Chancen und Lasten des Lebenszyklus, Band 14. Thieme-Verlag, Stuttgart, D.
2. **Klewitz, C., H.-D. Klenk, and J. ter Meulen.** 2006. Both putative fusion peptide segments of the Lassa virus envelope glycoprotein GP-2 are involved in pH-dependent fusogenicity and infectivity. *J. Biol. Chem.*, submitted.
3. **ter Meulen, J., M. Sakho, K. Koulémou, N. Magassouba, A. Bah, W. Preiser, S. Daffis, C. Klewitz, H.-G. Bae, M. Niedrig, H. Zeller, M. Heinzl-Gutenbrunner, L. Koivogui, and A. Kaufmann.** 2004. Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. *J. Infect. Dis.* **190**:1821-1827.

6. 6. Präsentationen

Posterpräsentationen auf folgenden Virologischen Fachtagungen:

1. **Klewitz, C., H.-D. Klenk, and J. ter Meulen.** 2005. Mapping of two possible fusion peptides in the N-terminus of the Lassa virus glycoprotein-2 using a recombinant cell-cell fusion and a pseudotype assay. Gesellschaft für Virologie, GfV, Annual Meeting Hannover, Germany. Poster ERT-32, p. 457.
2. **Klewitz, C., H.-D. Klenk, and J. ter Meulen.** 2005. Mapping of two possible fusion peptides in the N-terminus of the Lassa virus glycoprotein-2 using a recombinant cell-cell fusion and a pseudotype assay. International Union of Microbiological Societies, IUMS, Meeting 2005, San Francisco, USA. Poster V-79, p. 42-V-79.

6. 7. Verzeichnis der akademischen Lehrer

An der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg waren folgende Damen und Herren meine Lehrer:

Benz, Colditz, Dabauvalle, Dietz, Gimmler, Goebel, Gronenberg, Gross, Hartung, Hedrich, Heisenberg, Hölldobler, Horstmann, Kaiser, Kerth, Kiefer, Klöck, Kreft, Krohne, Linsenmair, Mahsberg, Meyer, Quast, Rdest, Riederer, Röseler, Scheer, Schreiber, Sukhorukov, Tacke, Tautz, Vogt, Wolbert und Zimmermann.

An der Ecole Supérieure de Biotechnologie Strasbourg (ESBS) waren folgende Damen und Herren meine Lehrer:

Abdallah, Anlauf, Barth, Beck, Bock, Boulanger, Burger, Carbon, Crégut, Daune, Dejaegère, Deryckere, Deseniss, Devyes, Didier, Drillien, Egli, Ehresmann, Florentz, Gavériaux, Gonard, Guillemot, Hanauer, Harter, Hibert, Higgs, Hochstein, Jeltsch, Jonard, Kastner, Kédinger, Kellenberger, Kieffer, Koenig, Landry, Laux, Ling, Mandel, Matt, Mehtali, Merkle, Metzger, Muller, Nagel, Neuhaus, Nicolau, Orfanoudakis, Pagès, Pareira, Pastore, Pattus, Phalip, Philippsen, Poch, Pons, Posten, Poterszman, Rognan, Rohe, Sauvaget, Schaeffer, Sanglier, Schäfer, Schwob, Snozzi, Sibler, Stevenin, Stoclet, Thompson, Travé, Wagner, Weiss, Wellmann, Wolf und Wongkoefft.

6. 8. Danksagung

Mein erster und besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. Jan ter Meulen, der mir das Arbeiten an dem hier vorgestellten spannenden Forschungsprojekt ermöglichte und mich jederzeit sowohl theoretisch als auch praktisch vollends unterstützte.

Genauso herzlich möchte ich dem Leiter des Instituts für Virologie der Philipps-Universität Marburg Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk danken, der mir immer mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand.

Für das in mich gesetzte Vertrauen und die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit möchte ich mich bei der Jung-Stiftung für Wissenschaft und Forschung bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich auch beim Team des PFHG (Project des Fièvres Hémorragique en Guinée) in Guinea, Westafrika, und den Serumspendern aus Guinea bedanken. Gesondert möchte ich dabei den Herren Dr. Lamine Koivogui, Dr. Kékoura Koulémou und Dr. N’Faly Magassouba danken, die mir den Forschungsaufenthalt in Guinea unvergesslich und wunderschön gestaltet haben.

Vielen Dank auch an alle, die mit Plasmiden und Antikörpern ausgeholfen haben: Dr. V. Bosch, Dr. O. Lenz, Dr. R. Wagner, Dr. P. M. Cannon und Dr. J. Nunberg.

Ganz herzlichen Dank schulde ich allen, die diese Arbeit in allen Phasen immer wieder korrektur gelesen haben, und mir zeigten, was alles verbessert werden konnte: Dr. M. Matrosovich, Prof. Dr. W. Garten, Thomas Strecker, Beatrix Schultheis, Doris Maul und Julia Schultheis.

Vielen Dank auch an meine „Labmates“ aus E206 und in der Nach-Umzugs-Phase +1/63450 für das angenehme Arbeitsklima und die hilfreichen Diskussionen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie bedanken, die alle ein sehr gutes Arbeitsumfeld geschaffen haben, in dem zu arbeiten eine Freude war.