

Aus dem Institut für Virologie  
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**Der Einfluss der Neuwelt-Arenaviren  
Junín und Tacaribe  
auf die Apoptose der Wirtszelle**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

**Svenja Wolff**  
aus Langenfeld

Marburg 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 17.12.13

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

**Dekan:** Prof. Dr. H. Schäfer

**Referent:** Prof. Dr. S. Becker

**Korreferent:** Prof. Dr. S. Bauer

Für meine Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>10</b>
1.1 Die Familie der Arenaviren .....	10
1.2 Das Junínvirus (JUNV) .....	12
1.2.1 Epidemiologie .....	12
1.2.2 Pathogenese und Therapie.....	13
1.2.3 Behandlung und Prophylaxe.....	14
1.3 Das Tacaribevirus (TCRV).....	15
1.4 Morphologie und Molekularbiologie der Arenaviren .....	15
1.5 Arenavirale Proteine .....	17
1.5.1 Glykoprotein GP .....	17
1.5.2 Polymerase L.....	18
1.5.3 Nukleoprotein NP .....	18
1.5.4 Matrixprotein Z.....	19
1.6 Replikationszyklus von Arenaviren .....	21
1.7 Apoptose .....	24
1.7.1 Caspasen .....	25
1.7.2 Rezeptor-vermittelte Apoptose - extrinsischer Signalweg .....	26
1.7.3 Mitochondrien-vermittelte Apoptose - intrinsischer Signalweg .....	27
1.8 Apoptose und Virusinfektion .....	29
1.8.1 Apoptose als antiviraler Abwehrmechanismus.....	29
1.8.2 Modulation von Apoptose durch Viren .....	30
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	33
<b>2 Material .....</b>	<b>34</b>
2.1 Wachstumsmedien und Lösungen.....	34
2.1.1 Wachstumsmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	34
2.1.2 Wachstumsmedien und Lösungen für Bakterien.....	34
2.2 Lösungen und Puffer .....	35
2.3 Chemikalien.....	36
2.4 Verbrauchsmaterialien.....	37
2.5 Geräte .....	38
2.6 Molekularbiologische und biochemische Kits.....	39
2.7 Material für molekularbiologische Arbeiten .....	40
2.8 Material für biochemische Arbeiten.....	40
2.9 Zellen.....	40
2.9.1 Eukaryotische Zellen .....	40
2.9.2 Prokaryotische Zellen .....	40
2.10 Viren .....	40

2.11	Rekombinante Plasmide und Vektoren .....	41
2.11.1	Rekombinante Plasmide .....	41
2.11.2	Vektoren .....	42
2.12	Primer für Sequenzierungen und Mutagenese .....	42
2.13	Antikörper .....	43
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>44</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	44
3.1.1	Polymerase-Ketten Reaktion .....	44
3.1.2	Reverse Transkriptions-PCR .....	45
3.1.3	Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA .....	45
3.1.4	Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	46
3.1.5	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	46
3.1.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	47
3.1.7	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	47
3.1.8	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren .....	48
3.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren .....	48
3.1.10	Transformation und Selektion von Plasmid-DNA in Bakterienzellen .....	49
3.1.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	49
3.1.12	DNA-Sequenzierung .....	50
3.2	Zellbiologische Methoden .....	50
3.2.1	Kultivierung von Zellen .....	50
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	51
3.2.3	Transiente DNA-Transfektion .....	51
3.2.4	Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot .....	52
3.2.5	Behandlung von VeroE6-Zellen für die Aktivierung oder Hemmung von Apoptose .....	52
3.2.6	<i>Virus like particle</i> (VLP)- Assay .....	53
3.3	Virologische Methoden .....	53
3.3.1	Infektion von Zellen .....	53
3.3.2	Anzucht und Isolierung von JUNV und TCRV .....	53
3.3.3	Virusaufreinigung .....	54
3.3.4	Bestimmung von Virustitern mittels Plaque Test .....	54
3.3.5	Wachstumskinetik .....	55
3.3.6	UV-Inaktivierung von Viren .....	55
3.4	Proteinbiochemische und immunologische Methoden .....	55
3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	55
3.4.2	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot) .....	56
3.4.3	Immunfärbung von Proteinen .....	56
3.4.4	Immunfluoreszenz-Analyse .....	57
3.4.5	Caspase-Glo <sup>®</sup> Assay .....	58

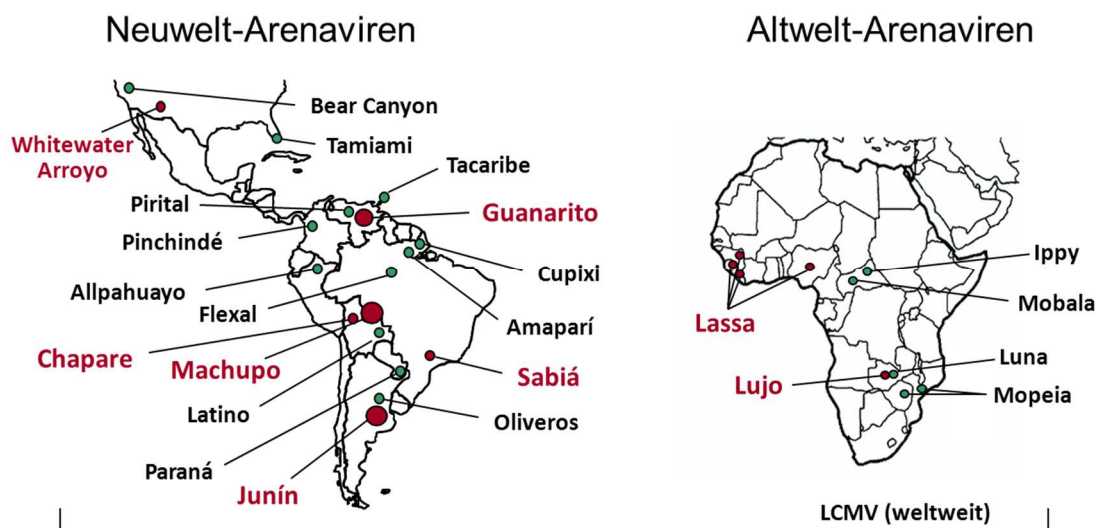
3.5	Statistische Analyse.....	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
4.1	Expression und Spaltung von JUNV NP und TCRV NP .....	59
4.1.1	Immunfluoreszenzanalyse von JUNV NP und TCRV NP .....	59
4.1.2	Expression von rekombinantem JUNV NP und TCRV NP in VeroE6-Zellen	60
4.1.3	Spaltung von rekombinantem JUNV NP in verschiedenen Zelllinien.....	61
4.1.4	Spaltung von JUNV NP in infizierten Zellen .....	62
4.1.5	Einbau der JUNV NP-Spaltprodukte in Viruspartikel.....	62
4.2	Identifizierung und Mutationsanalyse potentieller Caspase-Spaltstellen in JUNV NP .....	63
4.2.1	Identifizierung potentieller Caspase-Spaltstellen in JUNV NP.....	64
4.2.2	Mutation potentieller Caspase-Spaltstellen in JUNV NP .....	65
4.2.3	Charakterisierung der einzelnen Mutanten mittels IFA und VLP-Assay..	65
4.2.4	Mutationsanalyse der potentiellen Caspase-Spaltstellen in JUNV NP ...	67
4.3	Einfluss der Aktivität von Caspasen auf die Spaltung von JUNV NP.....	70
4.3.1	Der Apoptose-Aktivator Camptothecin.....	70
4.3.2	Der Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK.....	71
4.3.3	JUNV NP-Spaltung in Anwesenheit des Apoptose-Aktivators Camptothecin.....	72
4.3.4	JUNV NP-Spaltung in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK	73
4.4	JUNV NP, nicht aber TCRV NP, besitzt anti-apoptotische Eigenschaften....	74
4.4.1	JUNV NP, nicht aber TCRV NP, verringert die Spaltung von Caspase 3 in apoptotischen VeroE6-Zellen .....	75
4.4.2	Die NP-Spaltung ist wichtig für die anti-apoptotische Eigenschaft von JUNV NP .....	76
4.5	JUNV-Infektion induziert keine Apoptose in VeroE6-Zellen.....	77
4.5.1	CPE-Bildung und Chromatinkondensation in JUNV-infizierten VeroE6-Zellen	77
4.5.2	Kein Nachweis von Caspase 3- oder PARP-Spaltung in JUNV-infizierten VeroE6-Zellen .....	78
4.6	TCRV-Infektion induziert Apoptose in VeroE6-Zellen.....	79
4.6.1	TCRV-infizierte VeroE6-Zellen zeigen Caspase 3-Spaltung .....	79
4.6.2	TCRV-infizierte VeroE6-Zellen zeigen Chromatinkondensation und CPE-Bildung .....	80
4.6.3	TCRV-infizierte VeroE6-Zellen zeigen eine Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7.....	81
4.7	Virale Replikation als Auslöser TCRV-induzierter Apoptose .....	82
4.7.1	UV-inaktiviertes TCRV induziert keine CPE-Bildung oder Chromatinkondensation .....	82
4.7.2	UV-Inaktivierung von TCRV verhindert Caspase 3- und PARP-Spaltung in infizierten VeroE6-Zellen .....	83

4.7.3	Infektion mit UV-inaktiviertem TCRV führt in VeroE6-Zellen zu keiner signifikanten Aktivitätssteigerung der Effektorcaspasen 3 und 7 .....	84
4.8	TCRV-induzierte Apoptose aktiviert die Initiatorcaspasen 8 und 9 .....	85
4.9	TCRV-induzierte Apoptose ist Zelltyp-abhängig.....	86
4.9.1	TCRV-Infektion von verschiedenen Zelllinien.....	86
4.9.2	TCRV-induzierte Apoptose in verschiedenen Zelllinien.....	87
4.10	Einfluss der Caspase-Aktivität auf das Wachstum von TCRV .....	88
4.10.1	Die Inhibition von Caspasen hat keinen verstärkenden Effekt auf das Wachstum von TCRV.....	88
4.10.2	Die Aktivierung von Caspasen verstärkt das Wachstum von TCRV .....	89
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>91</b>
5.1	JUNV NP vermittelt die Umgehung von Apoptose in JUNV-infizierten Zellen 91	
5.2	Die Spaltung von JUNV NP durch Caspasen als anti-apoptotischer Mechanismus.....	93
5.3	Die JUNV NP Spaltung führt zur Produktion von spezifischen, potentiell funktionellen JUNV NP Spaltprodukten.....	95
5.4	TCRV besitzt keine NP-vermittelte anti-apoptotische Funktion und induziert Apoptose in infizierten Zellen .....	96
5.5	TCRV-induzierte Apoptose beeinflusst das Viruswachstum positiv.....	98
5.6	Charakterisierung der NP Spaltung zeigt signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Arenavirus Spezies .....	99
5.7	Vorläufiges Modell der Apoptose-Modulation durch JUNV und TCRV .....	101
5.8	Ausblick .....	102
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>131</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>135</b>
A.	Publikationen .....	135
B.	Vorträge & Poster Präsentationen auf Kongressen.....	135
C.	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	136
D.	Danksagung .....	137
E.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	138

## 1 Einleitung

### 1.1 Die Familie der Arenaviren

Die Familie der *Arenaviridae* besteht aus dem Genus *Arenavirus* und umfasst derzeit 25 durch das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) eingeordnete Virusspezies sowie einige neue Vertreter, deren taxonomischer Status noch nicht definiert wurde (Abb. 1.2) (Briese et al, 2009; Cajimat et al, 2007; Charrel et al, 2008; Coulibaly-N'Golo et al, 2011; Delgado et al, 2008; Günther et al, 2009; Inizan et al, 2010; Ishii et al, 2011; Lecompte et al, 2007; Milazzo et al, 2008; Palacios et al, 2010). Basierend auf serologischen Untersuchungen und Sequenzanalysen werden Arenaviren taxonomisch in den Serokomplex der Altwelt-Arenaviren (Serokomplex des Lymphozytären Choriomeningitis Virus) und der Neuwelt-Arenaviren (Serokomplex des Tacaribe Virus) eingeordnet. Diese Einteilung reflektiert neben der Phylogenese auch die durch das Wirtsvorkommen bedingte geographische Verteilung der Viren: Altwelt-Arenaviren kommen hauptsächlich in Süd- und Westafrika vor, Neuwelt-Arenaviren hingegen sind in Süd- und Nordamerika endemisch. Eine Ausnahme stellt lediglich das Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) dar, das phylogenetisch und serologisch zu den Altwelt-Arenaviren gehört, jedoch bedingt durch das ubiquitäre Vorkommen des Wirtes *Mus musculus* weltweit verbreitet ist (Abb.1.1).



**Abb. 1.1: Geographische Verbreitung der Arenaviren.** Die Familie der *Arenaviridae* umfasst derzeit 25 durch das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) eingeordnete Virusspezies, die taxonomisch in die Serokomplexe der Altwelt-Arenaviren und der Neuwelt-Arenaviren eingeteilt werden. Altwelt-Arenaviren kommen, bis auf das weltweit verbreitete Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV), hauptsächlich in Süd- und Westafrika vor, während Neuwelt-Arenaviren in Süd- und Nordamerika endemisch sind. Vertreter, die hämorrhagisches Fieber im Menschen auslösen, sind rot markiert.



	Virus	Vorkommen	Reservoir	Pathogenität
Altwelt-Arenaviren	Dandenong Virus*	Jugoslawien (?) Australien (?)	?	Fieberhafte Erkrankung mit Enzephalopathie
	Gbagroube Virus*	Elfenbeinküste	<i>Mus (Nannomys) setulosus</i>	
	Ippy Virus	Zentralafrikanische Republik	<i>Arvicanthus spp.</i>	
	Lassa Virus	Westafrika	<i>Mastomys natalensis</i>	Hämorrhagisches Fieber
	Lymphocytäres Choriomeningitis Virus	Weltweit	<i>Mus musculus</i>	Fieberhafte Erkrankung, in schweren Fällen mit aseptischer Meningitis
	Lujo Virus	Sambia	?	Hämorrhagisches Fieber
	Luna Virus	Sambia	<i>Mastomys natalensis</i>	
	Kodoko Virus*	Guinea	<i>Mus (Nannomys) minutoides</i>	
	Menekre Virus*	Elfenbeinküste	<i>Hylomyscus spp.</i>	
	Merino Walk Virus*	Südafrika	<i>Myotomis unisulcatus</i>	
	Mobala Virus	Zentralafrikanische Republik	<i>Praomys jacksoni</i>	
	Mopeia Virus	Mozambique	<i>Mastomys natalensis</i>	
	Morogoro Virus*	Tansania	<i>Mastomys spp.</i>	
Neuwelt-Arenaviren	Allpahuayo Virus	Peru	<i>Oecomys spp.</i>	
	Amapari Virus	Brasilien	<i>Oryzomys gaeldi Neacomys guianae</i>	
	Bear Canyon Virus	USA	<i>Peromyscus californicus</i>	
	Big Brushy Tank Virus*	USA	<i>Neotoma albigula</i>	
	Catarina Virus*	USA	<i>Neotoma micropus</i>	
	Chapare Virus	Bolivien	?	Hämorrhagisches Fieber
	Cupixi Virus	Brasilien	<i>Oryzomys spp.</i>	
	Flexal Virus	Brasilien	<i>Oryzomys spp.</i>	Fieberhafte Erkrankung (Laborant)
	Guanarito Virus	Venezuela	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Hämorrhagisches Fieber
	Junín Virus	Argentinien	<i>Calomys musculinus</i>	Hämorrhagisches Fieber
	Latino Virus	Bolivien	<i>Calomys callosus</i>	
	Machupo Virus	Bolivien	<i>Calomys callosus</i>	Hämorrhagisches Fieber
	Oliveros Virus	Argentinien	<i>Bolomys spp.</i>	
	Paraná Virus	Paraguay	<i>Oryzomys buccinatus</i>	
	Pichinde virus	Kolumbien	<i>Oryzomys albigularis</i>	
	Pinhal virus*	Brasilien	<i>Calomys tener</i>	
	Piritai virus	Venezuela	<i>Sigmodon alstoni</i>	
	Real de Catorce Virus*	Mexiko	<i>Neotoma leucodon</i>	
	Sabiá Virus	Brasilien	?	Hämorrhagisches Fieber
	Skinner Tank Virus*	USA	<i>Neotoma mexicana</i>	
	Tacaribe Virus	Trinidad	<i>Artibeus spp.(bat)</i>	Fieberhafte Erkrankung (Laborant)
	Tamiami Virus	USA	<i>Sigmodon hispidus</i>	
Tonto Creek Virus*	USA	<i>Neotoma albigula</i>		
Whitewater Arroyo Virus	USA	<i>Neotoma albigula</i>	evtl. Hämorrhagisches Fieber	

**Abb. 1.2: Die Familie der Arenaviren.**

Die Tabelle umfasst die 25 derzeit durch das ICTV eingeordneten Virusspezies sowie einige neue Vertreter, deren taxonomischer Status noch nicht definiert wurde (mit \* gekennzeichnet). Aufgeführt werden soweit bekannt das Vorkommen der Viren, ihr Reservoir und die Pathogenität der humanpathogenen Vertreter. Abbildung nach (Wolff et al, 2013b).

Zu der Gruppe der Altwelt-Arenaviren gehören neben dem prototypischen LCMV auch das Lassavirus (LASV) und das Lujovirus (LUJV) (Briese et al, 2009). LASV und LUJV sind die humanpathogenen Vertreter der Altwelt-Arenaviren, die schwere hämorrhagische Fieber im Menschen auslösen können. Während die Anzahl der bisher verifizierten Lujovirus-Infektionen minimal ist, stellt LASV ein großes Problem für die öffentliche Gesundheit dar und führt jährlich zu 300.000 bis 500.000 Infektionen mit 3.000 bis 5.000 Todesfällen in Westafrika (McCormick et al, 1987; Paweska et al, 2009).

Der Serokomplex der Neuwelt-Arenaviren umfasst ebenfalls mehrere humanpathogene Vertreter und wird phylogenetisch nach der Sequenz des viralen Nukleoproteins in die drei Stämme A, B und C unterteilt, die sich im Phänotyp der Erkrankung und in der Rezeptorbindespezifität unterscheiden (Charrel et al, 2008). Zwischen den einzelnen Stämmen sind zudem Rekombinationsereignisse möglich. Ein Beispiel ist das Whitewater-Arroyo Virus (WWAV), das eine Rekombinante der Gruppen A und B darstellt (Charrel et al, 2001). Die epidemiologisch wichtigen Virusspezies Junín (JUNV), Machupo (MACV), Chapare (CHPV), Guanarito (GTOV) und Sabiá (SABV), die als die Erreger des Argentinischen, Bolivianischen, Venezuelanischen und Brasilianischen Hämorrhagischen Fiebers identifiziert wurden, werden alle der Gruppe B zugeordnet.

Während der Serokomplex der Altwelt-Arenaviren mit LASV und LUJV zwei Erreger, die hämorrhagische Fieber im Menschen auslösen, umfasst, sind Neuwelt-Arenaviren für mindestens fünf *South American Hemorrhagic Fevers* (SAHF) verantwortlich. Damit bilden Arenaviren die bisher größte bekannte Virusfamilie von hämorrhagischen Fieber-verursachenden Viren.

## 1.2 Das Junínvirus (JUNV)

### 1.2.1 Epidemiologie

Das JUNV wurde erstmals 1958 als Erreger des Argentinischen Hämorrhagischen Fiebers (AHF) während einer Epidemie östlich von Buenos Aires City in der Provinz Buenos Aires in Argentinien identifiziert (Charrel & de Lamballerie, 2003). JUNV ist seitdem für die meisten durch Neuwelt-Arenaviren verursachten Infektionen verantwortlich und es werden, trotz Vakzinierung von Hochrisikogruppen seit den 90er Jahren, immer noch 50 bis 100 Fälle pro Jahr verzeichnet (Enria et al, 2008). Endemische JUNV-Infektionen betreffen zumeist argentinische Feldarbeiter und treten saisonal gehäuft in der Kornerntesaison (März bis Juni) auf (Charrel & de Lamballerie, 2003). Die Letalitätsrate des AHFs liegt ohne Therapie bei etwa 15 bis 30%, zudem

kann eine erhöhte Letalitätsrate bei JUNV-infizierten, schwangeren Frauen beobachtet werden (Charrel & de Lamballerie, 2003). Die natürlichen Wirte und Überträger des JUNV sind Nager der Gattung *Calomys musculinus* sowie *Calomys laucha* (Carballal et al, 1988). Die chronisch infizierten Tiere erkranken selbst nicht an der Infektion und übertragen das Virus untereinander über horizontale und vertikale Transmission. Sie sind das gesamte Leben virämisch und scheiden das Virus in großen Mengen aus, so dass die virushaltigen Exkremente der Nager bzw. dadurch kontaminierte Lebensmittel und infektiöse Aerosole direkte und indirekte Infektionsquellen für den Menschen darstellen (Charrel & de Lamballerie, 2003). Das Virusvorkommen wird durch das natürliche Reservoir limitiert und beschränkt sich auf Regionen von Bolivien bis ins südliche Argentinien. Beobachtungen des Endemiegebiets zeigen jedoch, dass sich das Areal vom Zeitpunkt der Identifizierung bis heute von 15.000 km<sup>2</sup> auf mehr als 150.000 km<sup>2</sup> ausgeweitet hat und erstmals beginnt Großstädte zu umfassen (Enria et al, 2008).

Trotz einer vorhandenen Vakzine und effektiver Behandlungsmaßnahmen wird JUNV von der CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) als Erreger schwerer hämorrhagischer Fieber in die höchste biologische Sicherheitsstufe der Klasse 4 (*biosafety level 4*, BSL-4) eingestuft (CDC, 2000).

### 1.2.2 Pathogenese und Therapie

Die meisten JUNV-Infektionen (etwa 80%) führen zu einer klinischen Erkrankung, die in schweren Fällen mit hämorrhagischen und/oder neurologischen Symptomen sowie hohen Letalitätsraten einhergeht (Enria et al, 2008). Das durch das JUNV verursachte AHF hat eine Inkubationszeit von etwa 6 bis 14 Tagen, wobei die Übertragung hauptsächlich durch die Inhalation virushaltigen Materials infizierter Nager und nur selten durch eine Mensch-zu-Mensch Übertragung erfolgt (Charrel & de Lamballerie, 2003). Der Krankheitsverlauf des AHF lässt sich in die prodromale, die neurologisch-hämorrhagische und die Konvaleszenz-Phase einteilen (Enria et al, 2008). Das Prodromalstadium umfasst hierbei die erste Woche mit Einsetzen von meist unspezifischen Symptomen wie Fieber, Unwohlsein, Schwindel, Kopf-, Rücken- und Gliederschmerzen, zudem können bereits erste Petechien in Haut und Gaumen auftreten. Bis zu 30% der Patienten entwickeln dann hämorrhagische und/oder neurologische Symptome, die separat oder kombiniert auftreten können und in den meisten Fällen letal sind (neurologisch-hämorrhagische Phase). Hämorrhagische Manifestationen zeigen sich meist 8 bis 12 Tage nach Einsetzen der ersten Symptome mit Petechien und Blutungen aus Rachen-, Vaginal- und Gastrointestinaltrakt, die mit Thrombozytopenie sowie veränderter Koagulation und Plättchenfunktion einhergehen

und im weiteren Verlauf zu Schock und Multiorganversagen führen können. Neurologische Symptome wie mentale Verwirrung, Tremor der Hände, Sprach- und Schluckschwierigkeiten bis hin zu Ataxie und Krämpfen können ebenfalls im weiteren Verlauf, auch in Abwesenheit von Hämorrhagien, zu Koma und Tod führen. Bakterielle Superinfektionen können die Erkrankung in dieser Phase erschweren. Eine AHF-Erkrankung führt im schlimmsten Fall nach etwa 7 bis 12 Tagen zum Tod. Im Falle einer Genesung kommt es zu einem langwierigen Heilungsprozess, der mit Gedächtnisproblemen, Schwäche und Haarverlust einhergeht (Konvaleszenzphase, 1 bis 3 Monate) (Enria et al, 2008).

Die Diagnose einer JUNV-Infektion kann mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) oder Immunfluoreszenz erfolgen. Das Probenmaterial wird hierfür meist aus dem Serum des Patienten, seltener aus einem Rachenabstrich oder dem Urin gewonnen. Außerdem kann die virale RNA schon in sehr geringen Mengen durch eine RT-PCR in Serum, Plasma und Urin detektiert werden (Charrel & de Lamballerie, 2003).

### 1.2.3 Behandlung und Prophylaxe

Für eine erfolgreiche Behandlung von AHF sind eine frühe Diagnose und ein unverzüglicher Beginn der Therapie wichtig (Charrel & de Lamballerie, 2003). Es hat sich gezeigt, dass die frühe Gabe von neutralisierenden Immunsereen zu einer Reduktion der Letalitätsrate von etwa 30% auf weniger als 2% führen kann (Enria et al, 1984; Enria et al, 2008; Harrison et al, 1999; Maiztegui et al, 1979). Die Behandlung von AHF mit Immunsereen trägt jedoch das Risiko, dass 8 bis 19% der so behandelten Patienten im späteren Verlauf der Therapie neurologische Symptome entwickeln. Zudem ist die Bereitstellung von Immunsereen aus Rekonvaleszenten schwierig (Maiztegui et al, 1979). Die Effektivität einer Behandlung von AHF mit dem Nukleosid-Analogon Ribavirin, einem Virostatikum, das erfolgreich gegen das verwandte Lassafieber eingesetzt wird, ist fraglich (Enria et al, 1987; Enria et al, 2008; McKee et al, 1988). Effektive Therapiemaßnahmen sowie die dazu nötige Infrastruktur und angemessene Richtlinien des öffentlichen Gesundheitswesens in Argentinien gewährleisten gegenwärtig eine erfolgreiche Kontrolle des AHF. Im Zentrum der Maßnahmen steht die Impfung der Hochrisikogruppen in Endemiegebieten mit der attenuierten Lebendvakzine *Candid #1*. Die Vakzine wurde in den 90er Jahren aus einem virulenten Patientenstamm (XJ) entwickelt, der durch mehrere Passagen in verschiedenen Zelllinien und den dadurch erworbenen genomischen Mutationen stark attenuiert wurde (Albarino et al, 1997; Ambrosio et al, 2011; Goni et al, 2006). Die gezielte Vakzinierung der Hochrisikogruppen (heute sind mehr als 250.000 Personen

geimpft) führte zu einer erheblichen Reduktion der AHF-Erkrankungen. Die Anzahl der jährlichen Infektionen fiel von etwa 300 bis 1000 auf 50 bis 100 (Enria et al, 2008).

### 1.3 Das Tacaribevirus (TCRV)

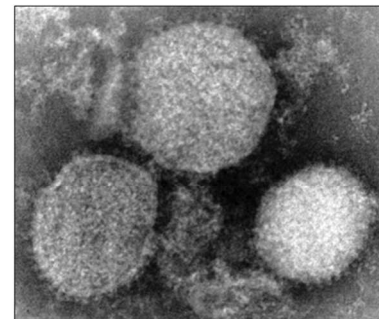
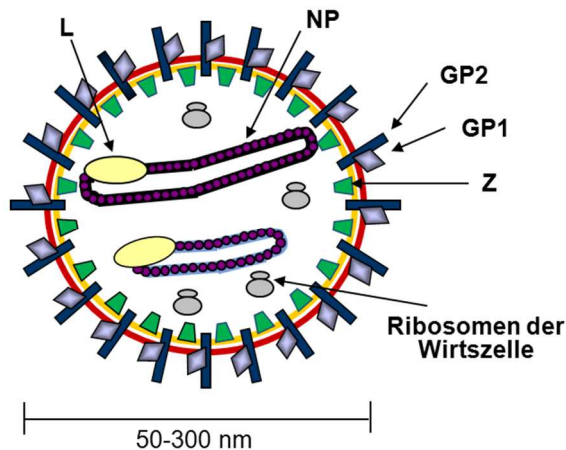
TCRV ist der Prototyp der Neuwelt-Arenaviren. Es wird ebenfalls der Gruppe B zugeordnet und weist eine enge Verwandtschaft zu JUNV und MACV auf. TCRV wurde 1956 zufällig während einer Rabiesvirus-Studie in Trinidad und Tobago identifiziert und aus einigen Moskitospezies sowie Fledermäusen der Gattung *Artibeus (A.) jamaicensis* und *A. lituratus* isoliert (Downs et al, 1963). In diesen Fledermausspezies sowie in den Spezies *Sturnira liliium*, *Vampyrops helleri* und *Desmodus rotundus* konnten bisher neutralisierende Antikörper detektiert werden (Price, 1978). Während für sämtliche Spezies der Neuwelt- und Altwelt-Arenaviren Nager das natürliche Reservoir darstellen, konnte für TCRV bisher kein Nager als natürlicher Wirt identifiziert werden (Charrel & de Lamballerie, 2003; Downs et al, 1963). Lange Zeit wurde *A. jamaicensis* als der natürliche Wirt für TCRV postuliert; neueste Studien zeigen jedoch, dass auch TCRV-infizierte *A. jamaicensis* schwer erkranken und vermutlich nicht das natürliche Reservoir für TCRV darstellen. Die Frage des Wirtes bleibt somit weiterhin ungeklärt (Cogswell-Hawkinson et al, 2012). Da bis heute lediglich ein Fall einer fieberhaften Erkrankung mit ZNS-Beteiligung bekannt ist, die möglicherweise auf eine Laborinfektion mit TCRV zurückzuführen ist, wird TCRV als nicht signifikant humanpathogen betrachtet (Peters, 1996). Auch der Versuch, TCRV aus humanen Seren zu isolieren oder spezifische anti-TCRV Antikörper im Menschen nachzuweisen, führte zu keinem positiven Ergebnis (Downs et al, 1963).

### 1.4 Morphologie und Molekularbiologie der Arenaviren

Arenaviren sind sphärische, von einer Lipidhülle umgebene Partikel mit pleomorpher Gestalt und hochvariablem Durchmesser von 50 bis 300 nm (Abb. 1.3). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen körnige Strukturen innerhalb der Partikel, bei denen es sich um Ribosomenuntereinheiten handelt, die während der Virusmorphogenese von der Wirtszelle aufgenommen und mitgeführt werden, deren Funktion im viralen Vermehrungszyklus jedoch unbekannt ist. Das körnige, an Sand erinnernde Aussehen wurde für Arenaviren namensgebend (lat.: arena = Sand).

Das Genom der Arenaviren besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Segmenten, die jeweils für zwei virale Proteine in entgegengesetzter (ambisense-) Orientierung kodieren: das L-Segment (7,4 kb) kodiert die virale Polymerase L und das

Matrixprotein Z, während das S-Segment (3,4 kb) die Gene für das Nukleoprotein NP und für den Glykoproteinvorläufer prä-GPC trägt (Abb. 1.4).



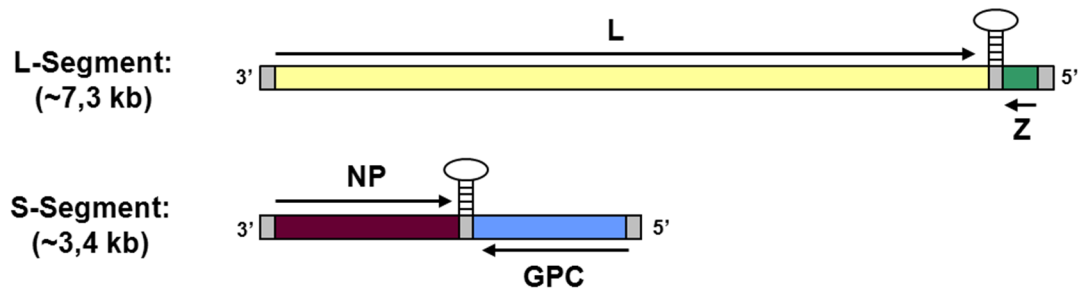
Elektronenmikroskopische Aufnahme von Arenaviruspartikeln (Dr. L. Kolesnikova, Dr. T. Strecker)

**Abb. 1.3: Struktur eines Arenaviruspartikels.**

Schematische Darstellung eines Arenaviruspartikels. Arenaviren sind von einer Lipidschicht umhüllt, in die das virale Glykoprotein, bestehend aus den Untereinheiten GP1, GP2 und dem stabilen Signalpeptid SSP, als Trimer integriert ist (hier vereinfacht ohne SSP und als Monomer dargestellt). Das Virion besitzt ein bi-segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom, das gemeinsam mit dem Nukleoprotein NP und der viralen RNA-Polymerase L den Ribonukleoproteinkomplex bildet. Das Matrixprotein Z kleidet die Innenseite der Membran aus. Abbildung nach (Wolff et al, 2013b). Das rechte Bild zeigt exemplarisch eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Lassaviren. Die Virionen variieren in Gestalt und Durchmesser und tragen deutliche Glykoproteinspikes auf ihrer Oberfläche. EM-Aufnahme von Dr. L. Kolesnikova und Dr. T. Strecker.

Die einzelnen Leserahmen werden bei beiden Segmenten durch intergenische Regionen (IGR) voneinander getrennt. Diese nicht-kodierenden Sequenzen bilden eine Haarnadelstruktur aus und dienen als Terminationssignal bei der viralen Transkription (Lopez & Franze-Fernandez, 2007; Pinschewer et al, 2005). Die konservierten, komplementären Endbereiche der Segmente bilden pfannenstielähnliche Konfigurationen aus, enthalten die Promotoren für die virale Transkription und Replikation und sind für diese Vorgänge essentiell (Gunther & Lenz, 2004; Hass et al, 2004; Perez et al, 2003; Perez & de la Torre, 2003; Young & Howard, 1983).

Beide RNA-Segmente sind über ihre gesamte Länge mit dem Nukleoprotein NP zum viralen Nukleokapsid komplexiert und assoziieren mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase L und dem Matrixprotein Z (Young & Howard, 1983). Das Matrixprotein Z lagert sich an die Innenseite der Membran an. Das virale Glykoprotein ist als Trimer in die Membran eingelagert und besteht aus dem in die Membran integrierten GP2, dem peripheren GP1, das nicht-kovalent an den membranverankerten Teil gebunden ist sowie dem stabilen Signalpeptid SSP (Abb. 1.3) (Neuman et al, 2005).



**Abb. 1.4: Struktur der Arenavirus-Genomsegmente.**

Das Genom der Arenaviren besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Segmenten, die jeweils für zwei virale Proteine in entgegengesetzter (*ambisense*-) Orientierung kodieren. Das große RNA-Segment (L-Segment) kodiert mit einer Größe von 7,4 kb das Matrixprotein Z und die RNA-Polymerase L. Das kleinere RNA-Segment (S-Segment) ist 3,4 kb groß und enthält die Leserahmen für das Nukleoprotein NP und den Vorläufer des Glykoproteins prä-GPC. Zwischen den Leserahmen befindet sich eine intergenische Region mit einer Haarnadelstruktur, die als Terminationssignal bei der Transkription dient. Die 3'-gelegenen Gene sind in negativer, die 5'-gelegenen Gene in positiver Orientierung kodiert. Abbildung nach (Wolff et al, 2013b).

## 1.5 Arenavirale Proteine

### 1.5.1 Glykoprotein GP

Das Arenavirus Glykoprotein ist ein in die Virushülle eingelagertes Typ-1-Transmembranprotein, das die Virusbindung an den Rezeptor sowie die Fusion von Virus- und Zellmembran vermittelt. Es wird zunächst als Vorläuferprotein (prä-GPC, ~82 kDa) exprimiert und benötigt für die Reifung ko- und posttranslationale Modifikationen. Durch das am N-Terminus lokalisierte Signalpeptid wird zunächst die Translokation ins endoplasmatische Retikulum (ER) vermittelt, wo die N-Glykosylierung der Ektodomäne sowie die Abspaltung des Signalpeptids durch die zelluläre Signalpeptidase erfolgt (York et al, 2004). Das nach der Spaltung generierte stabile Signalpeptid (SSP) bleibt weiterhin mit dem GP-Komplex assoziiert und ist essentiell für die proteolytische Reifespaltung in die Untereinheiten GP1 (~40 kDa) und GP2 (~36 kDa) (Eichler et al, 2003). Diese posttranslationale Spaltung ist wichtig für die Entstehung infektiöser Virionen und findet im ER und Golgi-Apparat durch die Protease SKI-1/S1P (Subtilisin Kexin Isoenzyme 1/Site 1 Protease) statt (Beyer et al, 2003; Kunz et al, 2003; Lenz et al, 2001). Weiterhin spielt das SSP eine wichtige Rolle beim intrazellulären GP-Transport und der pH-abhängigen Fusion von Virushülle und Endosomenmembran (Agnihothram et al, 2006; York et al, 2008; York & Nunberg, 2006). Der reife Glykoprotein-Komplex, bestehend aus den nicht-kovalent miteinander verbundenen Untereinheiten GP1/GP2/SSP, wird als Trimer in die Virushülle integriert (Eschli et al, 2006). Die Bindung an den Oberflächenrezeptor der Wirtszelle wird durch das exponierte GP1 vermittelt, während GP2 wichtig für die pH-abhängige Fusion von

Virus- und Endosomenmembran ist (Gunther & Lenz, 2004; Weissenhorn et al, 1999; York et al, 2005).

Das Glykoprotein geht mit dem Matrixprotein Z Interaktionen ein, die wichtig für den finalen Zusammenbau infektiöser Virionen sind. Es konnte gezeigt werden, dass GP durch Z in Virus-ähnliche Partikel (*virus-like particles*, VLPs) rekrutiert wird (Burns & Buchmeier, 1991; Capul et al, 2007; Groseth et al, 2010b; Schlie et al, 2010; Wolff, 2009).

### 1.5.2 Polymerase L

Die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase L der Arenaviren besteht aus etwa 2200 Aminosäuren (aa) und bildet zusammen mit dem Nukleoprotein NP und der viralen RNA den Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex aus. Das L-Protein spielt eine zentrale Rolle bei der viralen Replikation und Transkription und umfasst vier konservierte Domänen, denen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden konnten (Brunotte et al, 2011; Fuller-Pace & Southern, 1989; Lee et al, 2000; Lee et al, 2002; Lopez et al, 2001; Loureiro et al, 2011; Vieth et al, 2004). Die zentrale Domäne repräsentiert die enzymatische Funktion der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase und ist homolog zu katalytischen Domänen anderer viraler RNA-abhängiger RNA Polymerasen (Hass et al, 2008; Vieth et al, 2004). Der N-Terminus besitzt zudem eine Endonuklease-Domäne, die unter Arena-, Bunya- und Orthomyxoviren konserviert ist und vermutlich das *cap-snatching* vermittelt, das wichtig für die Translationsinitiation der viralen mRNA ist (Lelke et al, 2010; Morin et al, 2010). Durch die Bindung von Z innerhalb der Polymerasedomäne und des N-Terminus von L kommt es zu einer Inhibition und somit negativen Regulation der viralen RNA-Synthese (Jacamo et al, 2003; Kranzusch et al, 2010; Wilda et al, 2008).

### 1.5.3 Nukleoprotein NP

Das Nukleoprotein NP besitzt ein Molekulargewicht von ca. 60 bis 65 kDa und ist das häufigste virale Protein im Viruspartikel (Strecker et al, 2003). NP ist mit der viralen RNA assoziiert und ist essentiell für die Bildung der RNP-Komplexe und für die virale Genomreplikation und Transkription (Albarino et al, 2009; Hass et al, 2004; Kerber et al, 2011; Lee et al, 2000; Lee et al, 2002; Lopez et al, 2001; Pinschewer et al, 2003; Tortorici et al, 2001; Young & Howard, 1983). Über den C-Terminus interagiert NP mit dem Matrixprotein Z, wodurch die Rekrutierung der RNP-Komplexe in die Virionen vermittelt wird (Casabona et al, 2009; Eichler et al, 2004; Groseth et al, 2010b; Schlie et al, 2010; Shtanko et al, 2010). Im Falle von TCRV wird neben Z zudem die



Anwesenheit von NP für eine effiziente Freisetzung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) benötigt (Groseth et al, 2010b; Wolff, 2009; Wolff et al, 2013b).

Der N-Terminus von NP konnte als Bindestelle für die NP-NP Interaktion identifiziert werden, die die Bildung von Homooligomeren vermittelt (Levingston Macleod et al, 2011).

Für einige Alt- und Neuwelt-Arenaviren, so auch für JUNV, nicht jedoch für TCRV, konnte gezeigt werden, dass NP die Interferon-Typ I (IFN-I) Produktion der Wirtszelle hemmt und so eine entscheidende Rolle bei der Überwindung der angeborenen Immunantwort spielt (Harmon et al, 2013; Martinez-Sobrido et al, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass NP die zelluläre Kinase IKK $\epsilon$  (*interferon regulatory factor-activating kinase*) in einem inaktiven Komplex bindet und die Phosphorylierung und Translokation von IRF-3 (*interferon regulatory transcription factor 3*) in den Zellkern gehemmt wird (Martinez-Sobrido et al, 2007; Martinez et al, 2009; Pythoud et al). Der Interferon-Antagonismus wird hierbei über den C-Terminus von NP vermittelt, welcher zudem eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität aufweist (Hastie et al, 2011; Martinez et al, 2009; Qi et al, 2010). Neueste Studien zeigen, dass das Arenavirus NP auch die Translokation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) in den Nukleus und somit die NF $\kappa$ B-abhängige Immunantwort hemmen kann, wobei TCRV NP hier erneut eine Ausnahme darstellt (Rodrigo et al, 2012).

#### 1.5.4 Matrixprotein Z

Das Z-Protein ist mit einer Länge von 89 bis 103 aa das kleinste bisher bekannte Arenavirusprotein und spielt unter anderem eine wichtige Rolle für die Regulation der RNA-Synthese, für die Umgehung der Immunantwort in der Wirtszelle sowie für die effiziente Freisetzung von Nachkommenviren (Fehling et al, 2012; Gunther & Lenz, 2004).

Die Regulation der viralen RNA-Synthese wird durch die zentrale RING-Domäne vermittelt, die ca. 60 Aminosäurereste inklusive hochkonservierter Cystein- und Histidin-Reste, welche die Bindung von zwei Zink-Atomen ermöglichen, umfasst. Es konnte gezeigt werden, dass die RING-Domäne die Interaktion mit der viralen Polymerase vermittelt, wodurch es zur Inhibition und negativen Regulation der viralen Replikation und Transkription kommt (Cornu & de la Torre, 2001; Jacamo et al, 2003; Kranzusch et al, 2010; Lopez et al, 2001; Loureiro et al, 2011; Wilda et al, 2008).

Neben regulatorischen Funktionen besitzt das Z-Protein der Arenaviren charakteristische Eigenschaften eines Matrixproteins (Perez et al, 2003; Strecker et al, 2003; Urata et al, 2009). Durch die N-terminale Myristylierung des Glycinrestes an Position 2 kommt es zur Assoziation von Z mit zellulären Membranen und zur

Ausbildung einer einheitlichen Schicht auf der Innenseite der Virushülle (Strecker et al, 2006). Die rekombinante Expression von Z in Abwesenheit anderer viraler Proteine ist ausreichend für die Freisetzung von VLPs, die in Größe und Form den reifen Viruspartikeln entsprechen (Eichler et al, 2004; Perez et al, 2003; Strecker et al, 2003). Das Z-Protein interagiert zudem mit NP und GP und vermittelt die Rekrutierung aller Komponenten in die Viruspartikel (Capul et al, 2007; Casabona et al, 2009; Eichler et al, 2004; Groseth et al, 2010b; Shtanko et al, 2010). Für die meisten arenaviralen Z-Proteine konnte gezeigt werden, dass die Funktion als Matrixprotein von den im C-Terminus lokalisierten prolinreichen L-Domänen (*late domains*) abhängt, die sich zwischen den einzelnen Virusspezies in Anzahl und Art unterscheiden und die Interaktion mit Komponenten des zellulären ESCRT- (*endosomal sorting complex required for transport*) Komplexes vermitteln (Casabona et al, 2009; Garrus et al, 2001; Perez et al, 2003; Strecker et al, 2003). TCRV stellt hier erneut eine Ausnahme dar und zeigt eine L-Domänen-unabhängige Virusfreisetzung, die jedoch die Anwesenheit von NP benötigt (Groseth et al, 2010b; Urata et al, 2009; Wolff, 2009; Wolff et al, 2013b).

Das Z-Protein der Neuwelt-, nicht jedoch der Altwelt-Arenaviren, wirkt interessanterweise zusätzlich zu NP als IFN-Antagonist und blockiert durch die direkte Interaktion mit RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1 product*) die IFN-I Produktion (Fan et al, 2010). Weiterhin ermöglicht die Interaktion von Z mit bestimmten zellulären Proteinen die Regulation verschiedener Wirtszellfunktionen. Es konnte gezeigt werden, dass Z u.a. mit dem eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 4E (eIF4E), dem Promyelozytischen-Leukämie-Protein (PML) und dem ribosomalen Protein P0 interagiert (Fehling et al, 2012). Die direkte Interaktion mit eIF4E führt zur Unterdrückung der zellulären, eIF4E-abhängigen Proteinbiosynthese, die u.a. die Expression von immunregulatorischen Faktoren betrifft, wodurch eine chronische Infektion erleichtert werden könnte (Campbell Dwyer et al, 2000; Volpon et al, 2010). PML spielt eine Rolle in Prozessen der antiviralen Abwehr und Apoptose und wird durch Z in das Zytoplasma relokalisiert, so dass auch diese Interaktion die Immunantwort in der infizierten Zelle zum Vorteil des Virus zu modulieren scheint (Borden et al, 1998a; Borden et al, 1997; Regad & Chelbi-Alix, 2001; Regad et al, 2001). Ein weiterer zellulärer Interaktionspartner ist das ribosomale Protein P0, das eine Endonukleaseaktivität besitzt und während der Replikation möglicherweise bei der Prozessierung viraler Nukleinsäure involviert sein könnte (Borden et al, 1998b). Die Bindung von Z an die nukleäre Fraktion des P0 könnte zudem erklären, warum ribosomale Untereinheiten in die Virionen inkorporiert werden. Auch wenn die genauen Mechanismen dieser Interaktionen nicht komplett geklärt sind zeigt sich, dass es durch

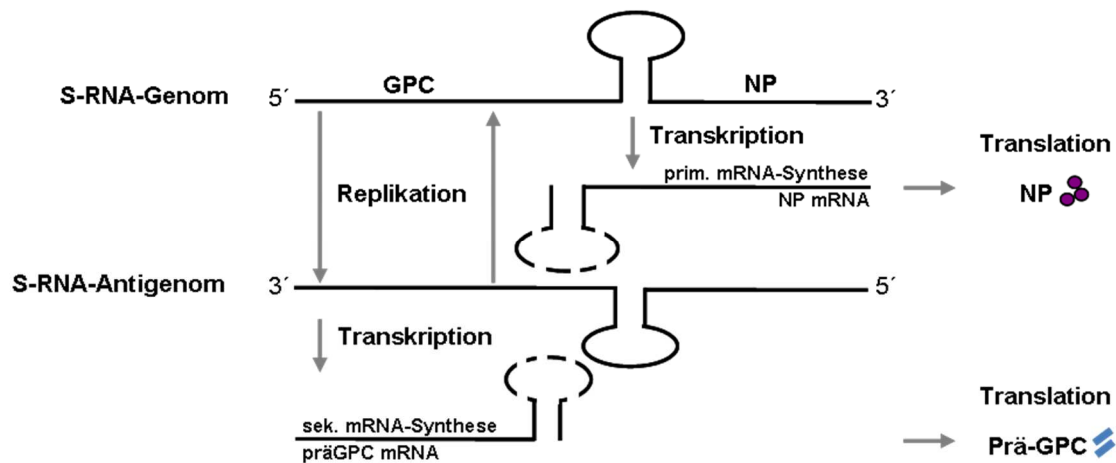
die Unterdrückung der Immunantwort, der zellulären Proteinbiosynthese oder Apoptose zu für die Virusreplikation optimierten Bedingungen innerhalb der Wirtszelle kommt.

## 1.6 Replikationszyklus von Arenaviren

Die Bindung der Arenaviruspartikel an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird über die Glykoproteinuntereinheit GP1 vermittelt (Abb. 1.6<sub>(1)</sub>) (Gunther & Lenz, 2004). Altwelt-Arenaviren sowie Neuwelt-Arenaviren der Gruppe C binden an  $\alpha$ -Dystroglycan, ein peripheres, hochglykosyliertes Membranprotein, das auf der Zelloberfläche der meisten Organe und Gewebe vorkommt und an der Interaktion mit der extrazellulären Matrix beteiligt ist (Cao et al, 1998; Reignier et al, 2006; Spiropoulou et al, 2002). Die Rezeptorspezifität von Neuwelt-Arenaviren der Gruppe A hingegen ist bisher nicht bekannt. Neuwelt-Arenaviren der Gruppe B nutzen für den Viruseintritt den Transferrin-Rezeptor-1 (TfR1), wobei JUNV und die humanpathogenen Vertreter zusätzlich zum TfR1 ihrer Wirtsspezies an den humanen TfR1 (hTfR1) adaptiert sind, der ubiquitär, insbesondere aber auf Immun- und Epithelzellen exprimiert wird (Abraham et al, 2009; Flanagan et al, 2008; Radoshitzky et al, 2007; Rojek & Kunz, 2008). Es zeigt sich somit, dass die Rezeptorspezifität eine wichtige Determinante der Wirtsspezifität und Pathogenität darstellt und dass u.a. Variationen in GP1 für die Apathogenität von TCRV für den Menschen verantwortlich sein könnten (Abraham et al, 2009; Flanagan et al, 2008). Dies würde jedoch auch bedeuten, dass geringe Variationen in GP1 ausreichen könnten, um eine Adaptation an den hTfR1 herbeizuführen. Des Weiteren ist bekannt, dass TCRV humane Zellen infizieren kann, auch wenn der Rezeptor noch nicht identifiziert wurde (Flanagan et al, 2008). Neueste Studien mit LASV GP als Oberflächenprotein auf rekombinanten Humanen Immundefizienz- und Vesiculären Stomatitis Viren identifizierten zudem vier weitere Rezeptoren, die möglicherweise ebenfalls eine Rolle für den Eintritt von Arenaviren in die Zelle spielen (Shimojima et al, 2012).

Nach der Bindung an den Rezeptor kommt es zur Endozytose der Viruspartikel (Abb. 1.6<sub>(2)</sub>). Für JUNV wurde eine Aufnahme der Virionen über Clathrin- und Dynamin-vermittelte Endozytose beschrieben, die abhängig von zellulären Mikrotubuli- und Aktinfilamenten ist (Martinez et al, 2007; Martinez et al, 2009; Rojek & Kunz, 2008). Der Viruseintritt von Altwelt-Arenaviren hingegen erfolgt unabhängig von Clathrin, Aktin, Caveolin oder Dynamin, jedoch in Abhängigkeit von Cholesterol (Borrow & Oldstone, 1994; Rojek & Kunz, 2008). Ferner wird vermutet, dass der Viruseintritt von Altwelt-Arenaviren über späte Endosomen und *multivesicular bodies* (MVBs), entsprechend der natürlichen Internalisierungs- und Degradationsroute des  $\alpha$ -Dystroglycan-Rezeptors, vermittelt wird (Kunz, 2009; Quirin et al, 2008).

Die anschließende Fusion von Virushülle und Endosomenmembran ist pH-abhängig und benötigt für JUNV einen pH-Wert  $< 5,5$  und für LASV einen auffallend niedrigen pH-Wert von 3 bis 4,5 (Abb. 1.6<sub>(3)</sub>) (Cosset et al, 2009; York & Nunberg, 2006). Die Ansäuerung der Vesikel bewirkt die Dissoziation der beiden Glykoprotein-Untereinheiten GP1 und GP2 sowie eine Serie von Konformationsänderungen, durch welche ein internes Fusionspeptid am N-Terminus von GP2 exponiert wird und die Fusion der beiden Lipiddoppelschichten induziert (Gallaher et al, 2001; Glushakova et al, 1992; Klewitz et al, 2007; Weissenhorn et al, 1999). Durch die Fusion von Virushülle und Endosomenmembran gelangen die Nukleokapside in das Zytoplasma der infizierten Zelle, wo im weiteren Verlauf die virale Replikation und Transkription sowie die Translation der viralen Proteine stattfinden (Gunther & Lenz, 2004).



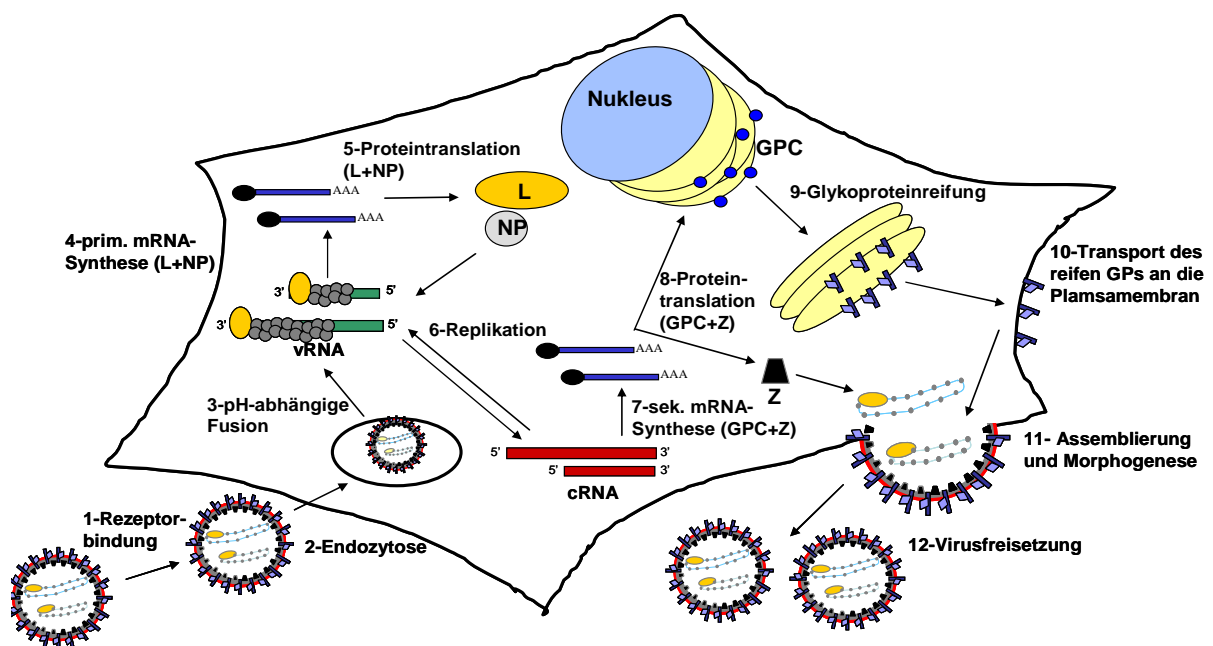
**Abb. 1.5: Schematische Darstellung der arenaviralen Transkription und Replikation.**

Nach der Infektion der Zelle werden die 3'-Bereiche der Genom-Segmente durch die mit in die Zelle gebrachte, RNA-abhängige RNA-Polymerase L in die mRNA für NP und L transkribiert. Es folgt ein Wechsel von Transkription zu Replikation und die Bildung durchgehender Antigenome, die als Matrizen für die Synthese der mRNAs von präGPC und Z dienen. Die Synthese der mRNA endet an haarnadelähnlichen Sekundärstrukturen der intergenischen Regionen. Exemplarische Darstellung für das S-Segment, Abbildung nach (Fehling et al, 2012).

Die Genome der Arenaviren liegen in *ambisense*-Orientierung vor. Die Proteine L und NP werden jeweils in der 3'-Region der beiden RNA-Segmente kodiert und liegen in negativer Orientierung vor, so dass die Sequenzen von der viralen RNA-Polymerase direkt in mRNA transkribiert (primäre mRNA-Synthese) und von der Zelle translatiert werden können (Abb. 1.5, Abb. 1.6<sub>(4,5)</sub>). Prä-GPC und Z werden dagegen in der 5'-Region der Segmente in positiver Orientierung kodiert. Da die verpackte genomische RNA jedoch nicht als mRNA für die Synthese der Proteine Z und prä-GPC fungieren kann, wird die genomische RNA zunächst in ein Antigenom umgeschrieben (Abb. 1.6<sub>(6)</sub>). Die Antigenome der S- beziehungsweise L-Segmente dienen dann als Matrize sowohl für die Transkription der mRNAs (sekundäre mRNA-Synthese) von prä-GPC

und Z (Abb. 1.6<sub>(7)</sub>) als auch für die Replikation, so dass neue Genomsegmente synthetisiert werden können (Abb. 1.6<sub>(6)</sub>). Der Mechanismus, durch welchen der Wechsel von Transkription zu Replikation erfolgt, ist unklar und erfolgt unabhängig von einer NP-Akkumulation (Pinschewer et al, 2003). Die neu synthetisierten mRNA-Moleküle haben ein nicht-polyadenyliertes 3'-Ende und am 5'-Ende eine sogenannte Cap-Struktur, die vermutlich von zellulärer mRNA stammt (durch das *cap-snatching* von L) und notwendig für die Translationsinitiation und die Interaktion mit freien Ribosomen ist (Lopez & Franze-Fernandez, 2007; Morin et al, 2010; Raju et al, 1990). Die Translation der viralen mRNAs findet an freien Ribosomen der Wirtszelle statt (Abb. 1.6<sub>(5,8)</sub>) (Gunther & Lenz, 2004).

Das Glykoprotein wird am rauen ER synthetisiert und über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert, wo die reifen GP Komplexe GP1/GP2/SSP in *non-lipid raft* Mikrodomänen der Zytoplasmamembran GP-reiche Regionen ausbilden (Agnihothram et al, 2009; Eichler et al, 2003; Lenz et al, 2001; Rojek & Kunz, 2008; York et al, 2004).



**Abb. 1.6: Replikationszyklus von Arenaviren.**

Der Replikationszyklus beginnt mit der Bindung des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle (1). Die Viruspartikel werden mittels Endozytose (2) aufgenommen und die Ribonukleoprotein-Komplexe gelangen über eine pH-abhängige Fusion (3) ins Zytoplasma. Dort finden zunächst die primäre mRNA-Synthese (4) und die Translation (5) von L und NP statt. Nach der Antigenom-Synthese (6) können die sekundäre mRNA-Synthese (7) und die Translation (8) von präGPC und Z sowie die Replikation (6) für die Genomsynthese stattfinden. Nach dem Transport der viralen Komponenten an die Zellmembran (9) finden der Zusammenbau und die Morphogenese der Virionen (10) sowie die anschließende Freisetzung der fertigen Viruspartikel statt (11).

Das Matrixprotein Z assoziiert über eine N-terminale Myristylierung und eine hydrophobe Domäne mit der Plasmamembran (Perez et al, 2004; Strecker et al, 2006). Die Myristylierung von Z ist zudem für die Interaktion zwischen Z und GP erforderlich und wichtig für die Freisetzung neuer Nachkommenviren an der Zelloberfläche (Capul et al, 2007). Durch die Interaktion von Z mit NP werden auch die RNP-Komplexe in Membrannähe rekrutiert, wo dann die Virusassemblierung stattfindet (Abb. 1.6 <sup>(10)</sup>) (Eichler et al, 2004). Über Interaktionen von Z mit den zellulären Komponenten der ESCRT-Maschinerie, die die endosomalen Sortierungsprozesse in der Zelle vermittelt, kommt es zur Abschnürung und Freisetzung neuer membranumhüllter Virionen von der Zellmembran in den extrazellulären Raum (Abb. 1.6 <sup>(11)</sup>).

## 1.7 Apoptose

Apoptose ist ein Prozess des programmierten Zelltods, der insbesondere an der Embryogenese und Entwicklung des Organismus, dem normalen Zellumsatz sowie der Immunantwort beteiligt ist (Milligan & Schwartz, 1997; Opferman, 2008; Raff et al, 1993). Er ist zwischen verschiedenen Spezies konserviert und induziert anders als Nekrose die Elimination von apoptotischen Zellen, ohne eine Entzündungsreaktion oder Schädigung des umliegenden Gewebes hervorzurufen (Assuncao Guimaraes & Linden, 2004; Proskuryakov et al, 2003). Apoptose ist zudem ein wichtiger Bestandteil der antiviralen Immunantwort, so dass die Regulation apoptotischer Prozesse in der infizierten Zelle ein entscheidender Faktor für das Überleben des Wirts sein kann.

Apoptose kann über extrinsische und intrinsische Signale induziert werden, durch die es zu einer charakteristischen proteolytischen Aktivierungskaskade von Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen) in der Zelle kommt (Kohler et al, 2002). Aktivierte Caspasen spalten ihrerseits Effektoren, wie beispielsweise die *poly-ADP-ribose-polymerase-1* (PARP), um den Prozess der kontrollierten Zelldegradierung zu vermitteln (Earnshaw et al, 1999; Fischer et al, 2003; Ivana Scovassi & Diederich, 2004). PARP ist an der DNA-Reparatur der Zelle beteiligt und kann durch aktivierte Caspase 3 gespalten und inaktiviert werden, so dass sich der Spaltungsnachweis als Apoptosemarker eignet (Ivana Scovassi & Diederich, 2004).

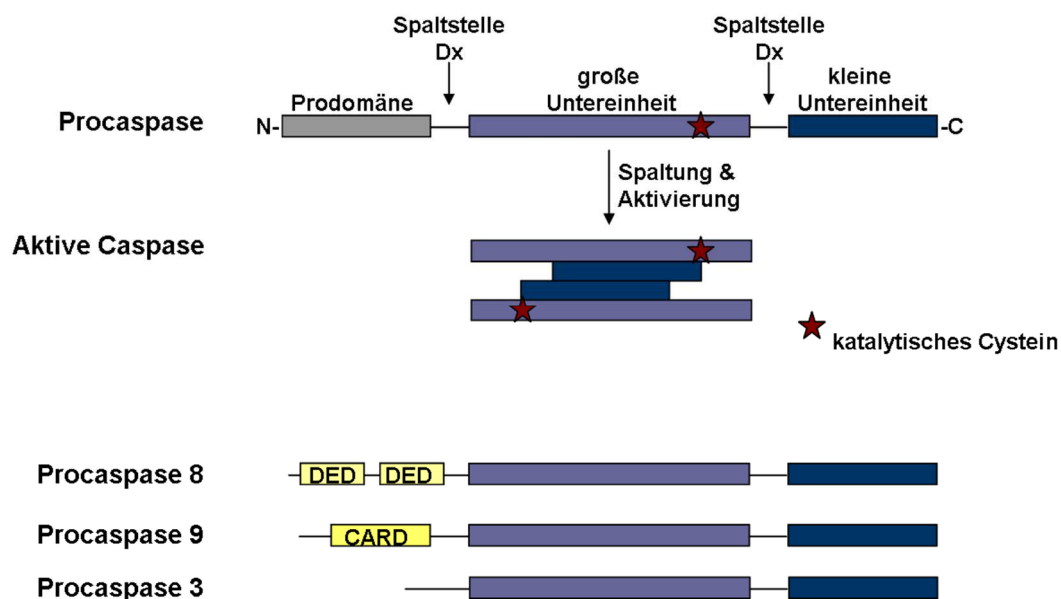
Apoptose kann weiterhin Caspase-unabhängig z.B. durch den *apoptosis inducing factor* (AIF) vermittelt werden. AIF ist im Intermediärraum der Mitochondrien lokalisiert und transloziert nach Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (s.u.) in den Zellkern, wodurch die für Apoptose charakteristische Chromatinkondensation induziert wird (Borner & Monney, 1999; Cande et al, 2002; Daugas et al, 2000; Green & Kroemer, 1998).

Der Vorgang der Apoptose wird von spezifischen zellulären Veränderungen begleitet. Apoptose-Charakteristika sind, neben der Spaltung von Caspasen und ihrer Substrate, u.a. die Kondensation des Chromatins sowie die Fragmentierung der zellulären DNA. Weiterhin kommt es zu einer Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche und zur Abschnürung Membran-umhüllter Vesikel von der apoptotischen Zelle (*apoptotic bodies*), die dann, ohne eine Immunreaktion auszulösen, über Phagozytose von umgebenden Zellen aufgenommen werden (Henson et al, 2001; Henson & Hume, 2006).

Die Einleitung von Apoptose und die gezielte Elimination der einzelnen Zellen ist ein hochdynamischer Prozess, für dessen kontrollierten Ablauf eine sensible und exakte Regulation der einzelnen Signalwege entscheidend ist.

### 1.7.1 Caspasen

Die Aktivierung von Caspasen ist eines der Hauptmerkmale der Apoptose. Bisher wurden mehr als 12 verschiedene Caspasen beschrieben, wobei den Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9 und 10 eine Funktion in apoptotischen, den Caspasen 1, 4, 5, 11 und 12 hingegen in inflammatorischen Prozessen zugeschrieben wird (Ma & Chang, 2011; Nadiri et al, 2006).



**Abb. 1.7: Schematische Darstellung von Caspasen.**

Die inaktiven Procaspasen bestehen aus einer Prodomäne sowie einer großen und einer kleinen Untereinheit. Nach Spaltung der beiden Untereinheiten und Entfernung der Prodomäne setzt sich die aktive Protease aus einem Heterotetramer, bestehend aus Heterodimeren zweier Vorläufermoleküle, zusammen. Die Initiatorcaspasen (u.a. Caspasen 8 und 9) besitzen eine lange Prodomäne, in der die DED- (*death effector domain*) oder die CARD- (*caspase activation and recruitment domain*) Domänen lokalisiert sind, über die die Bindung von Adapterproteinen und die Rekrutierung der Initiatorcaspasen in hochmolekulare Aktivierungskomplexe vermittelt werden. Die Effektorcaspasen (u.a. Caspase 3) besitzen nur eine kurze Prodomäne. Abbildung nach (Rupinder et al, 2007).

Caspasen liegen intrazellulär als inaktive Vorläuferproteine (Procaspasen) vor und bestehen aus einer Prodomäne sowie einer großen und einer kleinen Untereinheit (Abb. 1.7). Durch die Spaltung der beiden Untereinheiten und die Entfernung der Prodomäne können sie aktiviert werden.

Die aktive Protease wird aus einem Heterotetramer gebildet, das sich aus Heterodimeren zweier Vorläufermoleküle zusammensetzt (Earnshaw et al, 1999; Kumar, 2007; Saini & Walker, 1998). Caspasen spalten ihre Substrate immer hinter einem Aspartatrest (D), wobei Substratspezifität und Spaltstelle (Spaltung an P1) durch ein spezifisches Tetrapeptidmotiv definiert werden (Degterev et al, 2003; Thornberry, 1999; Thornberry et al, 1997).

Die apoptotischen Caspasen werden ferner in die zwei Gruppen der Initiator- und Effektorcaspasen unterteilt. Die Initiatorcaspasen (Caspasen 2, 8, 9, 10) besitzen eine lange Prodomäne, in der die DED- (*death effector domain*) oder die CARD- (*caspase activation and recruitment domain*) Domänen lokalisiert sind, die wichtig für die Bindung von Adapterproteinen und die Rekrutierung der Initiatorcaspasen in hochmolekulare Aktivierungskomplexe sind. Die aktivierten Initiatorcaspasen aktivieren wiederum durch Spaltung die Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6, 7). Diese besitzen nur eine kurze Prodomäne, da für die Aktivierung keine Protein-Interaktion benötigt wird. Aktivierte Effektorcaspasen können dann zelluläre Zielproteine spalten, die weitere Prozesse des kontrollierten Abbaus der Zelle einleiten (Alenzi et al, 2010; Chowdhury et al, 2008).

### 1.7.2 Rezeptor-vermittelte Apoptose - extrinsischer Signalweg

Die Aktivierung des extrinsischen Signalwegs wird über die spezifische Bindung an sogenannte Todesrezeptoren der *tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptorfamilie auf der Zelloberfläche vermittelt (Abb. 1.8<sub>(1)</sub>) (Ashkenazi & Dixit, 1998). Apoptose-induzierende Liganden sind z.B. Zytokine wie TNF oder Proteine der TNF-Superfamilie wie der Fas-Ligand (CD95L/Apo1L) oder TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L*), deren Bindung eine über Proteininteraktionen-vermittelte intrazelluläre Signalkaskade auslöst. Die Apoptose-induzierenden Todesrezeptoren rekrutieren nach Ligandenbindung die Adaptermoleküle TRADD (*TNF-receptor-associated death domain protein*) und FADD (*Fas-associated death domain protein*), die wiederum über DED-Domänen die inaktive Procaspase 8 rekrutieren (Abb. 1.8<sub>(2)</sub>) (Ashkenazi & Dixit, 1998; Boldin et al, 1995; Chinnaiyan et al, 1995; Kimberley & Screaton, 2004; Locksley et al, 2001; Wang & El-Deiry, 2003). Durch die Akkumulation der Faktoren kommt es zur Bildung des Multiproteinkomplexes DISC (*death-inducing signalling complex*), in dem sich die gebundenen Procaspasen gegenseitig mittels autokatalytischer Spaltung



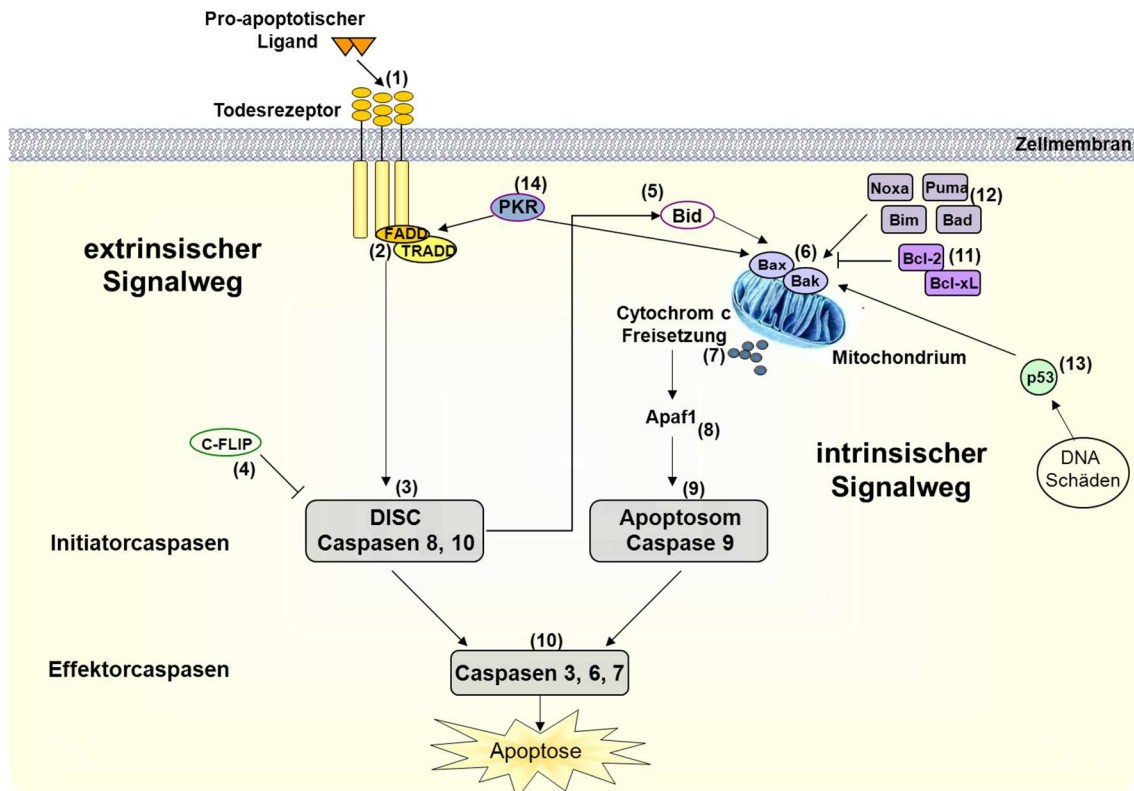
aktivieren (Abb. 1.8<sub>(3)</sub>) (Chang et al, 2003; Chen et al, 2002; Kischkel et al, 1995; Sprick & Walczak, 2004; Zimmermann et al, 2001). Neben der Aktivierung der Caspase 8 ist auch die Rekrutierung und Aktivierung der Caspase 10 beschrieben (Kischkel et al, 2001; Sprick et al, 2002).

Die aktivierte Initiatorcaspase 8 dissoziiert vom DISC ins Zytoplasma und aktiviert wiederum die Effektorcaspase 3, die dann durch die Spaltung zellulärer Substrate weitere Schritte der Zelldegradierung einleitet (Abb. 1.8<sub>(10)</sub>) (Alenzi et al, 2010; Chowdhury et al, 2008; Stennicke et al, 1998). Für eine Signalverstärkung kann Caspase 8 zudem das pro-apoptotische Bcl-2-Protein (*B-cell lymphoma 2*) Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) aktivieren (Abb. 1.8<sub>(5)</sub>), wodurch eine Signalkaskade aktiviert wird, die über Cytochrom c-Freisetzung und Caspase 9-Aktivierung den intrinsischen Signalweg (1.7.3) einleitet (Li et al, 1998; Luo et al, 1998; Yin, 2000).

Da der Signalweg der TNF-Rezeptoren neben Apoptose auch die Differenzierung, Proliferation und das Überleben der Zelle beeinflusst, ist eine genaue Regulation dieser Vorgänge wichtig und sehr komplex. So kann z.B. über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF<sub>κ</sub>B die Expression des anti-apoptotischen Caspase 8-Homologs c-FLIP (*cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1β-converting enzyme-inhibitory protein*) induziert werden, dessen Bindung die DISC-Bildung und somit die Apoptose-Transduktion verhindert (Abb. 1.8<sub>(4)</sub>) (Krueger et al, 2001).

### 1.7.3 Mitochondrien-vermittelte Apoptose - intrinsischer Signalweg

Die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs kann über verschiedene Auslöser innerhalb der Zelle wie zellulärer Stress oder DNA-Schäden erfolgen und führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zur Ausschüttung von pro-apoptotischen Faktoren wie Cytochrom c oder AIF aus den Mitochondrien in das Zytoplasma (Abb. 1.8<sub>(7)</sub>) (Fan et al, 2001; Finkel, 2001; Glazunova & Shtil, 2008; Jeong & Seol, 2008; Joza et al, 2001; Kluck et al, 1997; Li et al, 2001; Rich et al, 2000; van Loo et al, 2001; Verhagen et al, 2000). Das freigesetzte Cytochrom c bindet an Apaf1 (*apoptotic protease activating factor-1*) (Abb. 1.8<sub>(8)</sub>), der daraufhin oligomerisiert und über dadurch freigewordene CARD-Domänen mehrere Moleküle Procaspase 9 rekrutiert (Green & Kroemer, 1998; Jiang & Wang, 2000; Li et al, 1997; Rodriguez & Lazebnik, 1999). Der durch die Aktivierung der Initiatorcaspasen 9 gebildete Proteinkomplex, das Apoptosom (Abb. 1.8<sub>(9)</sub>), rekrutiert und aktiviert schließlich die Effektorcaspasen 3 und 7, die durch Spaltung ihrer Zielsubstrate die Zelldegradation einleiten (Abb. 1.8<sub>(10)</sub>) (Yin et al, 2006; Yuan et al, 2011).



**Abb. 1.8: Schematische Darstellung von Apoptose.**

Die Aktivierung des extrinsischen Signalwegs (linker Signalweg) wird über die spezifische Bindung von Apoptose-induzierenden Liganden an Todesrezeptoren der *tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptorfamilie auf der Zelloberfläche vermittelt (1). Über die Adaptermoleküle TRADD (*TNF-receptor-associated death domain protein*) und FADD (*Fas-associated death domain protein*) (2) kommt es zur Bildung des Multiproteinkomplexes DISC (*death-inducing signalling complex*), in dem sich rekrutierte Procaspasen 8 und 10 durch autokatalytische Spaltung aktivieren (3). Die aktivierten Initiatorcaspasen dissoziieren vom DISC ins Zytoplasma und aktivieren die Effektorcaspasen (10). Für eine Signalverstärkung kann Caspase 8 zudem das pro-apoptische Bcl-2-Protein (*B-cell lymphoma 2*) Bid (*BH3 interacting-domain death agonist*) aktivieren (5), wodurch eine Signalkaskade aktiviert wird, die über Cytochrom c Freisetzung und Caspase 9-Aktivierung den intrinsischen Signalweg einleitet. Eine Regulation kann über die NF $\kappa$ B-vermittelte Expression des anti-apoptischen Caspase 8-Homologs c-FLIP (*cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein*) erfolgen, das die DISC-Bildung verhindert (4).

Der intrinsische Signalweg (rechter Signalweg) kann durch Auslöser wie zellulärer Stress oder DNA-Schäden aktiviert werden und führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zur Ausschüttung von pro-apoptischen Faktoren wie Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma (7). Das freigesetzte Cytochrom c bindet an Apaf1 (*apoptotic protease activating factor-1*) (8), der daraufhin oligomerisiert und mehrere Procaspasen 9 rekrutiert. Der durch die Aktivierung der Initiatorcaspasen 9 gebildete Proteinkomplex, das Apoptosom (9), rekrutiert und aktiviert schließlich die Effektorcaspasen, die durch Spaltung ihrer Zielsubstrate die Zelldegradation einleiten (10). Die Regulation des Signalwegs an den Mitochondrien erfolgt durch Proteine der Bcl-2-Familie. Die pro-apoptischen Proteine Bak und Bax (6) vermitteln nach Aktivierung die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und den Ausstrom von Cytochrom c ins Zytoplasma. In der gesunden Zelle wird der Cytochrom c Ausstrom über die Interaktion von anti-apoptischen Bcl-2 Proteinen wie Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> mit Bak und Bax verhindert (11). Durch apoptotische Stimuli werden jedoch pro-apoptische Bcl-2-Proteine (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad etc.) aktiviert, die direkt oder über die Interaktion mit anti-apoptischen Proteinen zur Aktivierung und Oligomerisierung von Bax und Bak führen (12). Die Regulation der Bcl-2-Proteine erfolgt u.a. durch den Transkriptionsfaktor p53, der Apoptose über die verstärkte Expression von pro-apoptischen Bcl-2 Proteinen induzieren kann (13). Die Apoptose in Virus-infizierten Zellen wird häufig über die Proteinkinase R (PKR) vermittelt, die virale RNA erkennt und den extrinsischen sowie den intrinsischen Apoptose-Signalweg induzieren kann (14).

Die Regulation des Signalwegs an den Mitochondrien und die komplexe Signaltransduktion erfolgt durch Proteine der Bcl-2-Familie, der sowohl anti-apoptotische als auch pro-apoptotische Vertreter angehören (Burlacu, 2003; Kluck et al, 1997; Ola et al, 2011). Die pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax vermitteln nach Aktivierung die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und den Ausstrom von apoptotischen Mediatoren, wie beispielsweise Cytochrom c ins Zytoplasma (Abb. 1.8<sub>(6)</sub>) (Leber et al, 2007; Ola et al, 2011; Sharpe et al, 2004). In der gesunden Zelle wird der Cytochrom c- Ausstrom durch die Interaktion von Bak und Bax mit anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen (Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub>) verhindert (Abb. 1.8<sub>(11)</sub>). Durch apoptotische Stimuli werden jedoch pro-apoptotische Bcl-2 Proteine (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad etc.) aktiviert, die direkt oder über die Interaktion mit anti-apoptotischen Proteinen zur Aktivierung und Oligomerisierung von Bax und Bak führen (Abb. 1.8<sub>(12)</sub>) (Eskes et al, 2000; Jabbour et al, 2009; Korsmeyer et al, 2000; Ming et al, 2006; Villunger et al, 2003; Wang et al, 2009; Zhang et al, 2008).

## 1.8 Apoptose und Virusinfektion

### 1.8.1 Apoptose als antiviraler Abwehrmechanismus

Apoptose ist ein wichtiger Bestandteil der antiviralen Immunantwort und kann über verschiedene Wege induziert werden, um einzelne infizierte Zellen zu eliminieren und eine effiziente Vermehrung und Ausbreitung des Virus zu verhindern (Thompson et al, 2011).

Die antivirale Abwehr der infizierten Wirtszelle basiert auf einem komplexen Netzwerk von Signalkaskaden, die nach der Detektion von viralen Komponenten durch *pattern recognition receptors* (PRRs) aktiviert werden und die Zelle in einen antiviralen Status versetzen. Eine wichtige Rolle spielen hierbei u.a. *toll-like* Rezeptoren (TLRs), die sich auf der Zelloberfläche und in endosomalen Kompartimenten befinden, sowie zytosolische Mitglieder der RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) Rezeptorfamilie, wie beispielsweise RIG-I und MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene-5*) (Perry et al, 2005; Thompson et al, 2011; Yoneyama & Fujita, 2004).

Die Detektion von Viren durch Sensoren wie TLRs, RIG-I und MDA5 führt über die Induktion verschiedener Signalkaskaden zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF-3, IRF-7 und NF $\kappa$ B sowie zur Produktion von IFN-I, das nach Sekretion an IFN $\alpha$ -Rezeptoren der gleichen oder der umliegenden Zellen bindet und die Produktion von IFN-stimulierten Effektormolekülen induziert (Fitzgerald et al, 2003; Sadler & Williams, 2008; Seth et al, 2005; Sharma et al, 2003; Thompson et al, 2011; Wilkins & Gale, 2010). Zu den zahlreichen IFN-stimulierten Molekülen gehören u.a. die 2'-5'-

Oligoadenylatsynthetase (OAS) und die dsRNA-abhängige Proteinkinase R (PKR), die eine zentrale Rolle als Apoptose-Effektoren in der Abwehr von Virusinfektionen spielen (Chawla-Sarkar et al, 2003; Goodbourn et al, 2000; Randall & Goodbourn, 2008; Rebouillat & Hovanessian, 1999; Samuel, 2001; Stark et al, 1998; Tan & Katze, 1999; Zhou et al, 1997). Die Aktivierung der PKR erfolgt u.a. über die Bindung von dsRNA, die in der infizierten Zelle als virales Replikationsintermediat entsteht und kann durch die Phosphorylierung verschiedener Substrate wie den eukaryotischen Initiationsfaktor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) einen Proteinbiosynthesestopp oder Apoptose in der Zelle auslösen, um Replikation und Ausbreitung der Viren zu verhindern (Garcia et al, 2007; Gil & Esteban, 2000a; Saelens et al, 2001; Zhang & Samuel, 2007). Die Aktivierung der PKR führt dann zur Bildung von dsRNA-DISCs (*dsRNA-triggered death inducing signalling complexes*), wodurch die Initiatorcaspase 8 rekrutiert und aktiviert wird. Die Caspase 8-Aktivierung ist in dieser Signalkaskade entsprechend des extrinsischen Apoptosesignalwegs TRADD- und FADD-vermittelt, läuft jedoch unabhängig von den Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche ab (Abb. 1.8<sub>(14)</sub>) (Balachandran et al, 1998; Gil & Esteban, 2000b; Jordanov et al, 2005). Die PKR induziert weiterhin die Expression pro-apoptotischer Proteine wie Fas und Bax sowie die Aktivierung der Initiatorcaspase 9 des intrinsischen Apoptosesignalwegs (Abb. 1.8<sub>(14)</sub>) (Balachandran et al, 1998; Garcia et al, 2007; Gil et al, 2002).

Ferner kann eine Caspase-Aktivierung nach Virus-Detektion durch das Adaptermolekül *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS oder IPS-1, Cardif, VISA) des RIG-I/MDA5-Signalwegs erfolgen, wodurch ebenfalls Apoptose in der infizierten Zelle induziert wird (Besch et al, 2009; Okazaki et al, 2013).

Insgesamt ist die Apoptose ein wichtiger Bestandteil der antiviralen Immunantwort und kann während der Infektion über verschiedene Faktoren induziert werden. Hierbei kann es zu einer Aktivierung des extrinsischen und/oder intrinsischen Signalwegs kommen, die zu einer proteolytischen Aktivierungskaskade von Caspasen führt, welche im weiteren Verlauf durch Spaltung ihrer Substrate die Zelldegradation einleiten.

Die Tatsache, dass viele Viren mittels unterschiedlicher Strategien in den Prozess des programmierten Zelltods intervenieren, verdeutlicht die Bedeutsamkeit von Apoptose.

### **1.8.2 Modulation von Apoptose durch Viren**

Die virale Infektion führt häufig zu einer Modulation zellulärer Stoffwechselwege mit dem Ziel, die antivirale Immunantwort der Wirtszelle zu umgehen und optimale Bedingungen für die Virusreplikation zu garantieren. Um die antivirale Immunantwort zu regulieren, können Viren an verschiedenen Stellen eingreifen. Neben der Hemmung

des IFN-Systems der Wirtszelle modulieren viele Viren durch verschiedene Mechanismen die Apoptose in der infizierten Zelle (Hay & Kannourakis, 2002; Roulston et al, 1999; Teodoro & Branton, 1997; Versteeg & Garcia-Sastre, 2010). Die Induktion und/oder Inhibition der Apoptose während der Infektion konnte u.a. bereits für Vertreter der *Adenoviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Paramyxoviridae*, *Retroviridae*, *Papillomaviridae*, *Poxviridae* und *Togaviridae* beobachtet werden (Hay & Kannourakis, 2002; Richard & Tulasne; Roulston et al, 1999).

Die Virus-vermittelte Unterdrückung der Apoptose gewährleistet eine verlängerte Überlebensdauer der Zelle und damit die Bereitstellung der zellulären Proteinsynthesemaschinerie, die Viren für eine effiziente Replikation und Vermehrung nutzen. Häufig wird hierbei der anti-apoptotische Effekt durch einzelne virale Proteine vermittelt (Erdtmann et al, 2003; Kawanishi et al, 2002; Poenisch et al, 2009; Roulston et al, 1999; Won et al, 2007).

Um die Abwehrstrategie der Wirtszelle zu umgehen, dienen Caspasen aufgrund ihrer zentralen Rolle häufig als direktes oder indirektes Ziel der viralen anti-apoptotischen Regulation (Cassens et al, 2003). Eine indirekte Unterdrückung der Caspase-Aktivierung kann beispielsweise durch Blockieren der einzelnen Signalkaskaden bewirkt werden. So kodieren manche Viren für Bcl-2 Homologe und verhindern die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und den Ausstrom von Cytochrom c und somit die Signaltransduktion des intrinsischen Signalwegs (Boya et al, 2004; Everett et al, 2002; Perez & White, 2000; Su et al, 2006; Wang et al, 2004; Young et al, 1999). Die Inhibition der Rezeptor-vermittelten Signalkaskade auf der Zelloberfläche durch Virus-vermittelte Herunterregulierung der TNF-Rezeptoren oder Expression viraler Rezeptor-Homologe wurde ebenfalls beschrieben (Benedict et al, 2002; Filippova et al, 2004; Shisler et al, 1997; Tollefson et al, 1998; Xu et al, 2000). Ferner kann der extrinsische Weg durch virale vFLIP-Proteine gehemmt werden, die analog zu zellulärem c-FLIP die für die Caspase-Aktivierung benötigte DISC-Bildung mittels kompetitiver Hemmung verhindern (Wang et al, 1997).

Viren unterdrücken Apoptose zudem durch die direkte Hemmung von Caspasen. So kann die direkte Interaktion von viralen Proteinen mit bestimmten Caspasen zu einer Hemmung der enzymatischen Caspase-Aktivität führen (Filippova et al, 2007; Skaletskaya et al, 2001). Eine weitere anti-apoptotische Strategie der Viren stellt die Bindung und Spaltung viraler Proteine durch Caspasen dar. So dienen diese viralen Proteine als Substrat von einzelnen Caspasen und bleiben nach der Spaltung irreversibel an das katalytische Zentrum gebunden, wodurch die Caspasen direkt inhibiert werden (Bertin et al, 1996; Fisher et al, 1999; Guy & Friesen, 2008; Leu et al, 2010; Richard & Tulasne, 2012; Xu et al, 2001; Zoog et al, 2002).

Während eine Vielzahl von Viren mittels unterschiedlichster Strategien Apoptose in infizierten Zellen unterdrückt, induzieren manche Viren Apoptose gezielt, um die damit verbundenen zellulären Bedingungen für eine effiziente Vermehrung und Ausbreitung zu nutzen (Hay & Kannourakis, 2002; Richard & Tulasne, 2012; Roulston et al, 1999; Teodoro & Branton, 1997). Für viele Viren, u.a. Influenzaviren, Astroviren oder das Aleutian Mink Disease Virus ist beobachtet worden, dass die durch die Infektion ausgelöste Apoptose in der Wirtszelle für eine effiziente Virusreplikation und Freisetzung benötigt wird (Best et al, 2003; Mendez et al, 2004; Olsen et al, 1996; Wurzer et al, 2003). Häufig spielt hierbei die Caspase-vermittelte Spaltung viraler Proteine eine Rolle (Richard & Tulasne, 2012).

Die Apoptose-Induktion durch Viren kann über den extrinsischen wie auch den intrinsischen Signalweg vermittelt werden und erfolgt meistens durch die virale Replikation/Transkription sowie die Akkumulation bestimmter viraler Proteine im Zytoplasma (Acrani et al, 2009; Chirillo et al, 1997; Hay & Kannourakis, 2002; Kleinschmidt et al, 2007; Lowe & Ruley, 1993; Purvis et al, 1995; Ravindra et al, 2008; Roulston et al, 1999; Shih et al, 2008; Tripathi et al, 2013; Webster et al, 2000).

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass Apoptose für die Infektion vieler Viren eine entscheidende Rolle spielt. Für Arenaviren hingegen wurden entsprechende Untersuchungen noch nicht durchgeführt. Bisher ist unklar, ob Arenaviren Apoptose während der Infektion modulieren, indem sie den Prozess des programmierten Zelltods für den eigenen Vorteil gezielt aktivieren oder im Gegenteil über bestimmte Mechanismen inhibieren.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die Spezies JUNV und TCRV werden beide dem Stamm B der Neuwelt-Arenaviren zugeordnet und sind phylogenetisch eng miteinander verwandt. JUNV löst im Menschen hämorrhagisches Fieber aus und ist mit einer Mortalitätsrate von 30% ein hochpathogenes Virus innerhalb der Arenaviren, wohingegen TCRV keine Infektion im Menschen auslöst. Aufgrund der signifikanten Pathogenitätsunterschiede und der engen Phylogenese sind vergleichende Analysen der einzelnen viralen Komponenten von JUNV und TCRV von besonderem Interesse.

Das Nukleoprotein NP der Arenaviren ist die Hauptkomponente des Viruspartikels (Strecker et al, 2003). Sequenzanalysen zur Homologie zwischen JUNV und TCRV NP zeigen eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 78% (NCBI Basic Local Alignment Search Tool (Blast): Protein Sequence). Interessanterweise gibt es trotz dieser ausgeprägten Sequenzhomologie deutliche Unterschiede zwischen JUNV und TCRV NP. Es konnte gezeigt werden, dass JUNV NP, anders als TCRV NP, die NFκB-abhängige Immunantwort hemmen kann und Unterschiede beim IFN-Antagonismus aufweist (Martinez-Sobrido et al, 2007; Rodrigo et al, 2012). Ferner wiesen die ersten Analysen meiner Arbeit deutliche Abweichungen in der Expression von JUNV und TCRV NP auf. Für JUNV NP konnten NP-spezifische Spaltprodukte beobachtet werden, die im Falle von TCRV NP jedoch unerwartet ausblieben. Basierend auf diesen Daten ist es das Ziel meiner Arbeit, weitere Funktionen des Arenavirus NP zu identifizieren und ggf. Analogien oder Unterschiede zwischen den beiden Spezies nachzuweisen, die zu einer genaueren Charakterisierung von JUNV und TCRV NP sowie einem besseren Verständnis von Arenaviren beitragen. Neben der Identifizierung der spezifischen JUNV NP-Spaltstellen und der für die Spaltung verantwortlichen Proteasen soll insbesondere geklärt werden, ob die Spaltung von JUNV NP eine spezifische Funktion während der Infektion erfüllt bzw. welche Bedeutung diese für das Virus und die infizierte Wirtszelle hat. Da im Falle von TCRV NP keine entsprechenden Spaltprodukte beobachtet wurden, ist es von besonderem Interesse zu analysieren, welche Folgen das Ausbleiben dieser Spaltung und der damit verbundene Effekt in der infizierten Zelle für TCRV haben.

Insgesamt sollen in dieser Arbeit durch vergleichende Analysen von JUNV und TCRV NP weitere Unterschiede zwischen den beiden Arenavirus-Spezies identifiziert werden, die eine entscheidende Auswirkung auf die Virus-Wirtszell-Interaktion haben und helfen könnten, die signifikanten Pathogenitätsunterschiede der Viren besser zu verstehen.

## 2 Material

### 2.1 Wachstumsmedien und Lösungen

#### 2.1.1. Wachstumsmedien und Lösungen für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)		Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
DMEM (+++)	500 ml 50 ml 5 ml 5 ml	DMEM FCS (Fötale Kälberserum) L-Glutamin 200 mM Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml
DMEM (+Q)	500 ml 5 ml	DMEM L-Glutamin 200 mM
DMEM (+Q +P/S +3% FCS)	500 ml 10 ml 5 ml 5 ml	DMEM FCS (Fötale Kälberserum) L-Glutamin 200 mM Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml
Fötale Kälberserum (FCS)		PAN Biotech GmbH, Aidenbach (D)
L-Glutamin (200 mM)		Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
MEM (2x) Modified Eagle Medium		Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
MycoKill AB (50x)		PAA, Pasching (A)
Opti-MEM® I		Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Penicillin / Streptomycin (P/S)		Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
TransIT®-LT1 Transfection Reagent		Mirus® Bio, Madison (USA)
Trypsin-EDTA (0,5%)		Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)

#### 2.1.2 Wachstumsmedien und Lösungen für Bakterien

Ampicillin-Stammlösung	100 mg ad 1 ml	Ampicillin dH <sub>2</sub> O
LB-Medium	10 g 5 g 10 g ad 1 l	NaCl Hefeextrakt Pepton dH <sub>2</sub> O
NZY <sup>+</sup> -Medium	10 g 5 g 5 g ad 1 l + 12,5 ml + 12,5 ml + 20 ml	Caseinhydrolysat Hefeextrakt NaCl dH <sub>2</sub> O, pH 7.5 1 M MgCl <sub>2</sub> 1 M MgSO <sub>4</sub> 20% Glucose in dH <sub>2</sub> O



## 2.2 Lösungen und Puffer

Blockierungspuffer für Immunfluoreszenzanalysen	2 %	Bovines Serumalbumin (BSA)
	5 %	Glycerin
	0,2 %	Tween <sup>®</sup> 20
	0,05 %	Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) in PBS <sub>def</sub>
Blockierungspuffer für Western Blot	10 %	Magermilchpulver in PBS <sub>def</sub>
DNA-Probenpuffer (6x)	0,09 %	Bromphenolblau
	0,09 %	Xylene Cyanol FF
	60 %	Glycerin
	60 mM	EDTA
PBS <sub>def</sub> , pH 7.5 (Phosphatpuffer deficient)	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,15 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
Proteingellaufpuffer (10x)	10 g	SDS
	30 g	Tris
	144 g	Glycin
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	1 M	Tris/HCl, pH 6.8
	0,4 %	SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M	Tris/HCl, pH 8.8
	0,4 %	SDS
TNE-Puffer (1x)	10 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA, pH 8
Transferpuffer (1x)	300 mg	Tris
	144 mg	Glycin
	100 ml	Ethanol
	ad 1 l	dH <sub>2</sub> O
Verdünnungspuffer für Western Blot	1 %	Magermilchpulver
	0,1 %	Tween <sup>®</sup> 20 in PBS <sub>def</sub>
Waschpuffer für Western Blot	0,1 %	Tween <sup>®</sup> 20 in PBS <sub>def</sub>

### 2.3 Chemikalien

Agarose PeqGold universal	Peqlab, Erlangen (D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Hercules (USA)
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg (D)
Avicel	FMC Biopolymers, Brüssel (B)
Bacto™-Agar	Becto, Dickinson & Company, Sparks (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich®, München (D)
Bromphenolblau (BPB)	Roth, Karlsruhe (D)
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt (D)
Caseinhydrolysat	Merck, Darmstadt (D)
Chloroform	Acros Organics, Geel (B)
D(+) - Glucose	Merck, Darmstadt (D)
Dextranblau	Sigma-Aldrich®, München (D)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich®, München (D)
1,4 Diazabicyclo-(2.2.2)-octan (DABCO)	Sigma-Aldrich®, München (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Dinatriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Merck, Darmstadt (D)
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt (D)
Dinatriummethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe (D)
Essigsäure (HAc)	Merck, Darmstadt (D)
Ethanol absolut (EtOH)	Sigma-Aldrich®, München (D)
Ethanol vergällt (EtOH)	Fischar, Saarbrücken (D)
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim (D)
Fluoprep	BioMérieux, Nürtingen (D)
Formvar	Sigma-Aldrich®, München (D)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (D)
Glycin	Roth, Karlsruhe (D)
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt (D)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'2-Ethan-Sulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich®, München (D)
Isopropanol	Sigma-Aldrich®, München (D)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Roth, Karlsruhe (D)
L-Glutamin 200 mM (100x)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg (D)
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt (D)

Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt (D)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich®, München (D)
Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich®, München (D)
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Merck, Darmstadt (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel-de-Haën, Seelze (D)
N(onidet)P40	Merck, Darmstadt (D)
Nycodenz	Axis-Shield, Oslo (N)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe (D)
Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Pepton	Merck, Darmstadt (D)
Phosphorwolframsäure	Serva, Heidelberg (D)
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich®, München (D)
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe (D)
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt (D)
Stickstoff (99,996 %)	Messer-Griesheim, Siegen (D)
Saccharose	Serva, Heidelberg (D)
N, N, N', N' - Tetramethylethylethylendiamin (TEMED)	Biorad, Hercules (USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics, Geel (B)
TritonX-100	Sigma-Aldrich, München (D)
Tween® 20	neoLab®, Heidelberg (D)
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich®, München (D)

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

6-, 12-, 24-, 96-well Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Blottingmembran Immobilon PVDF	Millipore, Billerica (USA)
Blottingpapier GB 002 (Whatman® 3 mm)	Whatman, Maidstone (UK)
Cellulosenitratfolie PROTRAN®, Ø 0,45 µm	Whatman, Maidstone (UK)
Deckgläser, Ø 12 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Indikatorpapier	Merck, Darmstadt (D)
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Objektträger 76 x 22 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Parafilm	Pechiney Plastic, Menasha (USA)

PCR R�hrchen, 0,2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf (D)
Petrischalen	Sarstedt, N�rnbrecht (D)
Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml, Cellstar <sup>®</sup>	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen TipOne <sup>®</sup> , (0,1-1 �l, 10-100 Öl, 100-1000 Öl)	Starlab, Ahrensburg (D)
Pipettenspitzen, 1250 Öl, Matrix <sup>®</sup>	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml/ 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbrecht (D)
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Skalpell no.22	Feather, Osaka (J)
Spritzen 30 ml, Omnifix <sup>®</sup>	Braun, Melsungen (D)
Sterilfilter � 0,2 �m	Schleicher & Schuell, Maidstone (UK)
Zellschaber	Sarstedt, Nürnbrecht (D)
Zentrifugenröhrchen, Ultraclear <sup>TM</sup> (SW32, SW41)	Beckmann, Palo Alto (USA)

## 2.5 Geräte

Brutschrank HERAcell150, HERAcell240	Thermo Fisher, Hudson (USA)
DNA-Gelkammern	bsb11, Schauenburg (D)
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen (D)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen (D)
Fluoreszenzmikroskop Apotome	Zeiss, Jena (D)
Folienschweißgerät	Severin, Sundern (D)
Geldokumentationssystem Chemi-Doc XRS <sup>TM</sup>	Bio-Rad, Hercules (USA)
Geldokumentationssystem GelDoc 2000	Bio-Rad, Hercules (USA)
Horizontalschüttler	GFL, Burgwedel (D)
Horizontalschüttler TR	Infors AG, Bottmingen (CH)
Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)
Kühlzentrifuge Multifuge 3S-R	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Lichtmikroskop Wilovert <sup>®</sup>	Will, Wetzlar (D)
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim (D)
Metallblockthermostat TCS	neoLab <sup>®</sup> , Heidelberg (D)
Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen-Schillerh�he (D)
Minizentrifuge GMC-060	neoLab <sup>®</sup> , Heidelberg (D)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
PCR Cyclyer Primus 25	Peqlab, Erlangen (D)
pH-Meter �32	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)

Pipetten Reference® Eppendorf, (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	BRAND, Wertheim (D)
Stromquelle PowerPac™ HC	Bio-Rad, Hercules (USA)
Stromquelle Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen (D)
Reagenzglasnischer Vortex	neoLab®, Heidelberg (D)
Rotor Ultrazentrifuge SW32, SW41, SW55	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
SDS-Gelkammern Mini-Protean	Bio-Rad, Hercules (USA)
SemiDry Blotapparatur Trans-Blot SD	Bio-Rad, Hercules (USA)
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Haraeus, Frankfurt (D)
Spektralphotometer Nanodrop ND1000	Peqlab, Erlangen (D)
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischfuge Spectrafuge®	neoLab®, Heidelberg (D)
Ultrazentrifuge Optima™ L-100K/-80XP	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
Ultrazentrifuge TL100	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
UV-Lampe Chroma 41 (254 nm)	Laborgeräte Vetter (Wiesloch)
UV-Schirm 302 nm	Bachofer, Reutlingen (D)
Vakuumpumpe Mini-Vac E1	Axonlab, Reichenbach (D)
Waage Explorer®Pro	Ohaus, Nänikon (CH)
Wasserbad MT	Lauda, Lauda-Königshofen (D)

## 2.6 Molekularbiologische und biochemische Kits

Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, Mannheim (D)
Caspase-Glo® 8 Assay	Promega, Mannheim (D)
Caspase-Glo® 9 Assay	Promega, Mannheim (D)
HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden (D)
iProof High Fidelity DNA-Polymerase (2 U/µl)	Biorad, Hercules (USA)
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden (D)
PageSilver™ Silver Staining Kit	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen (D)
Pfu-Ultra AD High Fidelity Polymerase	Agilent Technologies, Santa Clara USA
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden (D)
QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Qiagen, Hilden (D)
Z-Competent <i>E.coli</i> Transformation Kit™	Zymo Research, Orange (USA)

## 2.7 Material für molekularbiologische Arbeiten

6x DNA-Probenpuffer, Loading Dye Solution	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
O'Gene Ruler™ 1 kb plus DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
Proteinkinase K (0,9 U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
Restriktionsendonukleasen:	NEB, Frankfurt (D)
DpnI (20 U/μl), EcoRI (20 U/μL), XhoI (20 U/μl)	
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (1 U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
T4-DNA-Ligase (1 U/μl)	NEB, Frankfurt (D)

## 2.8 Material für biochemische Arbeiten

Camptothecin (CPT)	Sigma-Aldrich®, München (D)
Cell Extraction Buffer (CEB)	Biosource, Darmstadt (D)
Complete Protease Inhibitor	Roche, Basel (CH)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, 10-250 kDa	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher, Hudson (USA)
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Z-VAD-FMK Caspase Inhibitor	Promega, Mannheim (D)

## 2.9 Zellen

### 2.9.1 Eukaryotische Zellen

HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzellen
HUH7-Zellen	humane Hepatomzelllinie
VeroE6-Zellen	Nierenzellen der grünen Meerkatze

### 2.9.2 Prokaryotische Zellen

<i>E. coli</i> Stamm XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg (D)
<i>E. coli</i> Stamm XL10-Gold® ultrakompetent	Stratagene, Heidelberg (D)

## 2.10 Viren

Junín Virus, Stamm Romero (JUNV)	H. Feldmann (Public Health Agency of Canada)
Sendai Virus (SV)	M. Nain (Institut für Virologie, Marburg)

Tacaribe Virus (TCRV)

D. Kolakofsky (Universität Genf)

Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV)

F. Weber (Institut für Virologie, Marburg)

## 2.11 Rekombinante Plasmide und Vektoren

### 2.11.1 Rekombinante Plasmide

pC-JUNV NP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pC-JUNV NPn-Flag	Institut für Virologie, Marburg (D)
pC-JUNV NPc-Flag	Institut für Virologie, Marburg (D)
pC-TCRV NP	Diplomarbeit Svenja Wolff 2009
pC-TCRV NPn-Flag	Diplomarbeit Svenja Wolff 2009
pC-TCRV NPc-Flag	Diplomarbeit Svenja Wolff 2009
pTM1-JUNV NPc-Flag	Institut für Virologie, Marburg (D)

Klonierte Plasmide	Matrizen	Primer/Enzyme	Zielvektor
pTM1-JUNV NPc-Flag DSID_NSIN	pTM1-JUNV NPc-Flag	# 2897, 2898	pTM1
pTM1-JUNV NPc-Flag LASD_LASN	pTM1-JUNV NPc-Flag	# 2950, 2951	pTM1
pTM1-JUNV NPc-Flag DVKD_NVKN	pTM1-JUNV NPc-Flag	# 2899, 2900	pTM1
pTM1-JUNV NPc-Flag QEHD_QEHN	pTM1-JUNV NPc-Flag	# 2952, 2953	pTM1
pTM1-JUNV NPc-Flag NVKN+QEHN	pTM1-JUNV NPc-Flag QEHD_QEHN	# 2899, 2900	pTM1
pTM1-JUNV NPc-Flag LASD+NVKN+ QEHN	pTM1-JUNV NPc-Flag NVKN+QEHN	# 2950, 2951	pTM1
pTM1-JUNV NPc-Flag DSID +LASD+NVKN+QEHN	pTM1-JUNV NPc-Flag LASD+NVKN+QEHN	# 2897, 2898	pTM1
pC-JUNV NPc-Flag DSID_NSIN	pTM1-JUNV NPc-Flag DSID_NSIN	Umklonierung EcoRI + XhoI	pC
pC -JUNV NPc-Flag LASD_LASN	pTM1-JUNV NPc-Flag LASD_LASN	Umklonierung EcoRI + XhoI	pC
pC-JUNV NPc-Flag DVKD_NVKN	pTM1-JUNV NPc-Flag DVKD_NVKN	Umklonierung EcoRI + XhoI	pC
pC-JUNV NPc-Flag QEHD_QEHN	pTM1-JUNV NPc-Flag QEHD_QEHN	Umklonierung EcoRI + XhoI	pC
pC-JUNV NPc-Flag NVKN+QEHN	pTM1-JUNV NPc-Flag NVKN+QEHN	Umklonierung EcoRI + XhoI	pC
pC-JUNV NPc-Flag LASD+NVKN+ QEHN	pTM1-JUNV NPc-Flag LASD+NVKN+QEHN	Umklonierung EcoRI + XhoI	pC
pC-JUNV NPc-Flag DSID +LASD+NVKN+QEHN	pTM1-JUNV NPc-Flag DSID+LASD+NVKN+ QEHN	Umklonierung EcoRI + XhoI	pC

**Tabelle 2.1:** Für Klonierungen verwendete DNA-Matrizen und Oligonukleotide

Die Bezeichnung der Oligonukleotide erfolgte mit der internen Labornummer (#n), deren genaue Bezeichnung und Sequenz unter 2.12 verzeichnet sind.

### 2.11.2 Vektoren

pCAGGS-MCS (pC)

Institut für Virologie, Marburg (D)

pTM1

Institut für Virologie, Marburg (D)

### 2.12 Primer für Sequenzierungen und Mutagenese

Nr.	Name	Sequenz
# 1233	pCAGGS-fwd	CCTTCTTCTTTTCCTACAG
# 1234	pCAGGS-rev	CCTTTATTAGCCAGAAGTCAG
# 2677	TCRV NP (XhoI)rev	GATCTCGAGTCACAGTGCAAAGCTGTTTT GG
# 2678	TCRV NP (EcoRI)fwd	CGAATTCATGGCTCAATCCAAGGAAGTGC
# 2724	TCRV NP (EcoRI)f-Flag	CGAATTCATGGACTACAAGGACGACGATGA CAAGGCTCAATCCAAGGAAGTGC
# 2725	TCRV NP (XhoI)r-Flag	GATCTCGAGTCACTTGTTCATCGTCGTCCTT GTAGTCCAGTGCAAAGCTGTTTTGG
# 2774	TCRV NP HA-tag fwd	CGAATTCATGTACCCATACGATGTTCCAGAT TACGCTGCTCAATCCAAGGAAGTGC
# 2775	TCRV NP HA-tag rev	GATCTCGAGTCAAGCGTAATCTGGAACATC GTATGGGTACAGTGCAAAGCTGTTTTGG
# 2897	pTM1 J NP DSID_NSIN fwd	GACGCCAAGCTGATTGCTAACAGCATTAAAC TTCAACCAAGTGG
# 2898	pTM1 J NP DSID_NSIN rev	CCACTTGGTTGAAGTTAATGCTGTTAGCAAT CAGCTTGGCGTC
# 2899	pTM1 J NP DVKD_NVKN fwd	AATGGTGTGGTGAGGATATGGAATGTTAAA AACCCCTCAAAGCTAAACAATC
# 2900	pTM1 J NP DVKD_NVKN rev	GATTGTTTAGCTTTGAAGGGTTTTTAACATT CCATATCCTCACCACACCATT
# 2950	pTM1 J NP LASD_LASN fwd	GGATGAACTGATGGAGTTAGCGTCTAACCT TGAGAAATT
# 2951	pTM1 J NP LASD_LASN rev	AATTTCTCAAGGTTAGACGCTAACTCCATCA GTTTCATCC
# 2952	pTM1 J NP QEHD_QEHN fwd	CCTTGACAGATTGACTCAAGAACATAACTG CCTTCAGATTG
# 2953	pTM1 J NP QEHD_QEHN rev	CAATCTGAAGGCAGTTATGTTCTTGAGTCAA TCTGTCAAGG

**Tabelle 2.2:** Für Sequenzierungen und PCR verwendete Oligonukleotide. Die Primer #1233 und #1234 wurden von der Firma MWG Biotech (München), alle weiteren Primer von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.



### 2.13 Antikörper

<b><u>Erstantikörper</u></b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>
α-Aktin monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, München (D)	WB 1:5.000
α-Caspase 3, Kaninchen	Cell Signaling, Danvers (USA)	WB 1:1.000
α-Flag M2 monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, München (D)	WB 1:1.000
α-Flag, Kaninchen	Sigma-Aldrich, München (D)	IFA 1:500
α-JUNV NP, Meerschweinchen	Institut für Virologie, Marburg (D)	WB 1:500 IFA 1:250
α-PARP, Kaninchen	Cell Signaling, Danvers (USA)	WB 1:1.000
α-TCRV NP, Meerschweinchen	Institut für Virologie, Marburg (D)	WB 1:500 IFA 1:250
α-Tubulin monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, München (D)	WB 1:5.000
α-Vinculin monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich, München (D)	WB 1:5.000
<b><u>Zweitantikörper</u></b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>
α-Ziege, AlexaFluor®800, Esel	Invitrogen, Carlsbad (USA)	1:5.000
α-Meerschweinchen POD, Kaninchen	Dianova, Hamburg (D)	1:30.000
α-Kaninchen POD, Schwein	Dianova, Hamburg (D)	1:30.000
α-Kaninchen AlexaFluor®549, Ziege	Invitrogen, Carlsbad (USA)	1:500
α-Maus AlexaFluor®549, Ziege	Invitrogen, Carlsbad (USA)	1:500
α-Maus AlexaFluor®680, Ziege	Invitrogen, Carlsbad (USA)	1:5.000
α-Maus POD, Ziege	Dianova, Hamburg (D)	1:30.000
α-Meerschweinchen AlexaFluor®488, Ziege	Invitrogen, Carlsbad (USA)	1:500
α-Meerschweinchen AlexaFluor®549, Ziege	Invitrogen, Carlsbad (USA)	1:500

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Polymerase-Ketten Reaktion

Für die effiziente Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro* wurde die Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) verwendet. Je nach Klonierungsstrategie enthielten die verwendeten Primer (2.12) zusätzliche Sequenzen für Restriktionsschnittstellen, um das PCR-Produkt nach einem Restriktionsverdau in geeignete Vektoren ligieren zu können. Auch die Insertion eines Flag- Epitops wurde mittels PCR und entsprechender Primer durchgeführt. Die PCR erfolgte mit der iProof™ High-Fidelity DNA-Polymerase.

Reaktionsansatz:	10 ng	cDNA
	2,5 µl	10 µM Vorwärts-Primer
	2,5 µl	10 µM Rückwärts-Primer
	je 1 µl	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	10 µl	5x HF / GC Puffer für iProof DNA-Polymerase
	0,5 µl	MgCl <sub>2</sub>
	1,5 µl	DMSO
	ad 49 µl	dH <sub>2</sub> O
	1 µl	iProof DNA-Polymerase

Programm	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	98°C	30 sec
Denaturierung		98°C	10 sec
Annealing	40	T <sub>m</sub> + 3°C	30 sec
Elongation		72°C	0,5 -1min / kb Plasmidlänge
Finale Elongation	1	72°C	10 min
Ende der Synthese	1	8°C	∞

Für die Überprüfung der PCR wurden im Anschluss 10% des Reaktionsansatzes im analytischen DNA-Agarosegel (3.1.5) aufgetrennt. Die Aufreinigung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte mittels QIAquick® PCR Purification Kit (3.1.4) oder im Fall von zusätzlichen Banden unspezifischer PCR-Produkte durch eine Gelextraktion nach Auftrennung der DNA-Fragmente über ein präparatives DNA-Agarosegel (3.1.5).

### 3.1.2 Reverse Transkriptions-PCR

Für die Umschreibung viraler RNA in cDNA (komplementäre DNA) wurde das Omniscript®-Kit verwendet. Das Kit nutzt eine reverse Transkriptase, die ausgehend von einer RNA-Sequenz die 5'-3'-Synthese einer einzelsträngigen, komplementären DNA katalysiert, die dann mittels PCR amplifiziert werden kann. Der folgende Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Reaktionsansatz:	1 µl	Virale RNA (50 ng - 2 µg)
	2 µl	Primer (10 µM)
	2 µl	10x RT-Puffer
	0,5 µl	RNase Inhibitor (40 U/µl)
	1 µl	Omniscript Reverse Transkriptase
	2 µl	5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	ad 20 µl	dH <sub>2</sub> O

### 3.1.3 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Für die Mutation von Plasmiden wurde das QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Das Kit ermöglicht *in vitro* das Einbringen von Punktmutationen, kurzen Deletionen oder Insertionen in die Plasmid-DNA. Die Methode beruht auf einer PCR-Reaktion, bei der das zu mutagenisierende Plasmid mittels eines spezifischen Enzymmixes amplifiziert wird, welcher die PfuTurbo® DNA-Polymerase sowie einen entsprechenden Primer für die einzuführenden Mutationen beinhaltet (2.12).

Reaktionsansatz:	100 ng	DNA
	100 ng	Vorwärts- oder Rückwärts-Primer
	0,5 µl	Quik Solution
	1 µl	dNTP Mix
	2,5 µl	10x QuikChange® Multi Reaktionspuffer
	1 µl	QuikChange® Enzymmix (2,5 U/µl)
	ad 25 µl	dH <sub>2</sub> O

Programm	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95°C	1 min
Denaturierung		95°C	1 min
Annealing	30	55°C	1 min
Elongation		65°C	2 min / kb Plasmidlänge
Ende der Synthese	1	8°C	∞

Die anschließende Selektion der neusynthetisierten DNA erfolgte mit der Restriktionsendonuklease DpnI, welche methylierte DNA vollständig abbaut und so die aus Bakterienzellen isolierte Template-DNA, welche Methylierungen aufweist, aus dem Ansatz entfernt. Nach der DNA-Aufreinigung mittels QIAquick™ PCR Purification Kit (3.1.4) wurden zur Kontrolle 5 µl des Reaktionsproduktes mit einem analytischen Agarosegel (3.1.5) dargestellt. Anschließend wurden die amplifizierten Plasmide in kompetente *E.coli* XL10Gold-Zellen transformiert (3.1.10).

### 3.1.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Aufreinigung von DNA:

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde das QIAquick® PCR Purification Kit verwendet. DNA-Fragmente (>100 bp) werden hier an eine Säulenmatrix gebunden und so nach biochemischen Reaktionen, wie z.B. PCR (3.1.1) oder Restriktionsverdau (3.1.7), vom restlichen Ansatz, der ggf. Detergenzien, Salze, Proteine, Primer, etc. enthält, getrennt. Die Aufreinigung wurde entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung durchgeführt und die DNA in 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

Aufreinigung von RNA:

Für die Isolierung von viraler RNA wurde das QIAamp® Viral RNA Mini Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend des beiliegenden Handbuchs und die RNA wurde in 60 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Proben aus dem BSL4-Labor wurden durch die Zugabe von 560 µl AVL-Puffer und dem gleichen Volumen an 100%igem Ethanol inaktiviert. Die Proben wurden gründlich gemischt, in frische Safe-Lock Reaktionsgefäße überführt und durch das Ausschleusbad aus dem Labor gebracht.

### 3.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurden Agarosegele mit, je nach erwarteter Fragmentgröße, einer Agarosekonzentration von 0,5% bis 2% verwendet. Die jeweilige Menge an Agarose wurde in 1x TAE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer (2.7) versetzt und zusammen mit einem DNA-Längenstandard (2.7) im polymerisierten Agarosegel bei 100 Volt und maximaler Stromstärke aufgetrennt. Das Probenvolumen für analytische DNA-Agarosegele betrug 5 µl (10% der PCR oder des Endonukleaseverdau). Die DNA wurde anschließend durch in die DNA interkalierendes Ethidiumbromid (1 µg/ml, 15 bis 30 min) markiert und unter UV-Licht ( $\lambda = 302$  nm) visualisiert. Für die Analyse und Dokumentation der DNA-Bandenmuster wurde das Dokumentationssystem GelDoc 2000 (Biorad)

verwendet. Im Falle von präparativen DNA-Agarosegelen wurden 40 bis 60  $\mu$ l Probenvolumen aufgetragen. Nach Anfärben der DNA in frischer Ethidiumbromidlösung (1  $\mu$ g/ml, 15 bis 30 min) wurden die gewünschten DNA-Banden auf einem UV-Schirm ( $\lambda = 360$  nm) mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel isoliert. Die DNA wurde anschließend mit dem QIAquick™ Gel Extraction Kit (3.1.6) isoliert und aufgereinigt.

### 3.1.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus präparativen DNA-Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung. Die DNA wurde nach der Reinigung über eine Säulenmatrix in 50  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.1.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für den analytischen Verdau zur Identifizierung entstandener Klonierungsprodukte sowie für den präparativen Verdau von DNA-Fragmenten wurden verschiedene Restriktionsenzyme (2.7) verwendet.

Ansatz analytischer Verdau:        0,1 – 0,5  $\mu$ g DNA  
  1  $\mu$ l 10x Puffer geeigneter Ionenstärke  
  (1  $\mu$ l 10% BSA, falls notwendig)  
  1-5 U Restriktionsendonuklease  
  ad 10  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O

Ansatz präparativer Verdau:        5  $\mu$ g DNA  
  5  $\mu$ l 10x Puffer geeigneter Ionenstärke  
  (5  $\mu$ l 10% BSA, falls notwendig)  
  10-20 U Restriktionsendonuklease  
  ad 50  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O

Die Reaktionsansätze wurden entsprechend der Herstellerangaben bezüglich Pufferbedingung, Temperaturoptimum und BSA-Zusatz für 1 bis 6 h inkubiert. Der analytische Verdau (Analyse von Minipräparation) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l mit 1 bis 5 Units des entsprechenden Enzyms, das Ergebnis wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.1.5) ermittelt.

Das Gesamtvolumen des Verdau von PCR Fragmenten oder Vektoren erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 bis 50  $\mu$ l mit 10 bis 20 Units des entsprechenden Enzyms. Die geschnittene DNA des präparativen Verdau wurde im Anschluss mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (3.1.4) oder über ein präparatives

Agarosegel (3.1.5) mit anschließender Gelextraktion (3.1.6) aufgereinigt, um Enzym- und Pufferrückstände sowie kleine DNA-Fragmente zu entfernen.

Wurde der Restriktionsverdau zeitgleich mit zwei verschiedenen Endonukleasen durchgeführt, so wurden Reaktions- und Temperaturbedingungen entsprechend der Herstellerempfehlung gewählt.

### 3.1.8 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Für die Dephosphorylierung linearisierter Vektoren wurde eine alkalische Phosphatase aus Garnelen (SAP, *shrimp alkaline phosphatase*) verwendet. Der Vektor-DNA wurde nach dem präparativen Restriktionsendonukleaseverdau (3.1.7) zunächst 2 µl SAP zugegeben. Nach 1h Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe weiterer 2 µl SAP und 30 min Inkubation bei 52°C. Nach der Inaktivierung des Enzyms (30 min 65°C) wurde die DNA mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit (3.1.4) gereinigt und in 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert.

Ansatz:	0,5 µg/µl	Vektor-DNA
	6 µl	10x SAP-Puffer
	4µl	SAP (1 U/µl)
	ad 50 µl	dH <sub>2</sub> O

### 3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren

Für die Ligation eines linearisierten und dephosphorylierten Vektors (3.1.7, 3.1.8) mit einem über PCR (3.1.1) und Restriktionsverdau (3.1.7) erhaltenen Insert mit kompatiblen Enden wurde die T4-DNA-Ligase (2.7) verwendet. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug 10 µl. Die Ansätze wurden für 12 bis 16 h bei 14°C inkubiert und im Anschluss vollständig in Z-kompetente *E.coli*-Zellen (XL1-Blue) transformiert (3.1.10).

Ansatz:	100 – 200 ng	verdaute, gereinigte Insert-DNA (Religationskontrolle: dH <sub>2</sub> O)
	25 – 50 ng	verdaute, gereinigte, SAP-behandelte Vektor-DNA
	2 µl	5x Ligationspuffer
	0,5 µl	T4 DNA-Ligase (1 U/µl)
	ad 10 µl	dH <sub>2</sub> O

Zur Abschätzung des Verhältnisses von religierten Plasmiden zu Plasmiden, die bei der Ligation das gewünschte DNA-Fragment inseriert haben, wurde zudem eine Religationskontrolle mitgeführt.

### 3.1.10 Transformation und Selektion von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Für die Vermehrung rekombinanter Plasmide wurden Z-kompetente *E.coli*-Zellen (XL1-Blue) verwendet, die mithilfe des Z-Competent *E.coli* Transformation Kit™ und Puffer Sets entsprechend dem beiliegenden Protokoll behandelt, aliquotiert und bei -80°C gelagert wurden. Die Z-kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und transformiert, indem 100 µl Bakteriensuspension mit der DNA-Lösung (z.B. 10 µl Ligationsansatz oder 10 ng Plasmid-DNA) gemischt und für 30 bis 60 min auf Eis inkubiert wurden. Der gesamte Ansatz wurde anschließend auf einer ampicillinhaltigen (100 µg/ml), vorgewärmten LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 16 bis 18 h wurden die einzelnen Kolonien gepickt und in einer Flüssigkultur amplifiziert (2.1.2).

Im Falle des QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit wurden kompetente *E.coli*-Zellen (XL10Gold) mitgeliefert und entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung vorbehandelt. Für die Transformation wurden 45 µl der Bakteriensuspension mit 3 µl des PCR-Produkts gemischt, auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock (30 sec bei 42°C) unterzogen. Die transformierte XL10Gold-Zellen wurden dann 1 h bei 37°C in 500 µl NZY<sup>+</sup>-Medium schüttelnd vorinkubiert und im Anschluss auf eine antibiotikahaltige LB-Agarplatte ausgestrichen.

### 3.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Kleiner Maßstab / Mini-Präparation:

Zur Isolierung rekombinanter Plasmide aus Bakterien und deren späterer Charakterisierung wurden einzelne Bakterienkolonien in 3 ml ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB-Medium aufgenommen und 16 bis 18 h auf einem Schüttler bei 200 Upm und 37°C inkubiert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte aus 2 ml dieser Bakteriensuspension mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I entsprechend des Arbeitsprotokolls. Nach der alkalischen Lyse der Bakterien, der Präzipitation der genomischen DNA sowie der Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA über ein Säulensystem wurde die Plasmid-DNA in 50 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. 5 µl des Eluats wurden zur Analyse mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (3.1.7) und auf einem Agarosegel (3.1.5) aufgetrennt. Klone, die das entsprechende Bandenmuster im Verdau zeigten, wurden anschließend sequenziert (3.1.12), bevor Maxi-Präparationen zur Vermehrung der DNA angefertigt wurden.

Großer Maßstab / Maxi-Präparation:

Die Plasmidpräparation großen Maßstabes erfolgte unter Verwendung des HiSpeed® Plasmid Maxi Kits entsprechend der Anleitung des Herstellers.

Zur Anzucht des gewünschten Bakterienklons (nach Sequenzierung) wurden 100 µl einer Übernachtskultur in 100 ml ampicillinhaltiges (100 µg/ml) LB-Medium gegeben und bei 37°C 16 bis 18 h schüttelnd inkubiert. Die Isolierung erfolgte auch hier nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gefolgt von einer Reinigung über eine Anionenaustauschersäule, an welche die DNA bei bestimmten pH-Werten und Salzbedingungen bindet bzw. abgelöst wird. Die DNA wurde in 500 µl dH<sub>2</sub>O eluiert. Mittels Spektralphotometer (Nanodrop® ND1000) wurden dann Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA bestimmt.

### 3.1.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Für die Analyse der zu sequenzierenden DNA wurden „extended hot shot“ Reaktionen (bis 900 bp) bestellt und die DNA-Proben wie folgt vorbereitet und versendet.

Ansatz:	200 – 600 ng	gereinigte Plasmid-DNA
	20 pmol	Primer
	ad 7 µl	dH <sub>2</sub> O

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von Zellen

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um permanente Zelllinien, die in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert wurden. Als Wachstumsmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium versetzt mit 10% fötalem Kälber Serum (FCS), L-Glutamin (Q), 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (P/S) (DMEM(+++)) verwendet. Die Passage der Zelllinien fand alle 3 bis 4 Tage unter einer Sicherheitswerkbank statt, wobei die zur Passage verwendeten Medien und Substanzen im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurden. Der konfluente Zellrasen wurde nach Dekantieren des Zellkulturmediums zwei Mal mit PBS<sub>def</sub> gewaschen und durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden bei 37°C abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde durch Zugabe von 8 ml DMEM (+Q +P/S +10% FCS) die Reaktion abgestoppt, die Zellen resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturflaschen bzw. -platten ausgesät.



### 3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für eine längerfristige Aufbewahrung von Zellen wurden diese oberhalb von flüssigem Stickstoff, d.h. bei  $-132^{\circ}\text{C}$ , gelagert. Für das Einfrieren wurden konfluent bewachsene  $75\text{ cm}^2$ -Kulturflaschen mit PBS<sub>def</sub> gewaschen und die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA von der Flasche gelöst. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml DMEM (+10% FCS) gestoppt. Die Zellsuspension wurde 3 min bei  $120\times g$  und RT zentrifugiert und das Pellet in 1 ml einer eiskalten 4:1 Mischung von FCS und DMEM aufgenommen. Zu dem Ansatz wurde 1 ml einer eiskalten 4:1 Mischung von FCS und DMSO gegeben. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein gekühltes ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) 2 ml Kryoröhrchen aliquotiert und in einer gekühlten ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox über Nacht langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt ( $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), um dann in die Gasphase oberhalb flüssigen Stickstoffs transferiert zu werden. Für die Reaktivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen bei  $37^{\circ}\text{C}$  rasch aufgetaut. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine  $75\text{ cm}^2$ -Kulturflasche, in die 20 ml warmes DMEM (+10% FCS) vorgelegt wurde, überführt und für einige Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel zu DMEM (+++).

### 3.2.3 Transiente DNA-Transfektion

Für die DNA-Transfektion wurde TransIT<sup>®</sup>-LT1 (Mirus) verwendet. Das Reagenz enthält kationische Lipide, die sich an die DNA anlagern und gemeinsam als Lipidkomplexe von der Zelle endozytiert werden. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion so umgesetzt, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 30 bis 60% aufwiesen (3.2.1). Für die Immunfluoreszenzanalysen (3.4.4) wurden die Zellen auf Deckgläschen ( $\varnothing 12\text{ mm}$ ) ausgesät. Für die Transfektion wurden 500 ng (12-well Zellkulturplatte) bis 1  $\mu\text{g}$  (6-well Zellkulturplatte) Plasmid-DNA pro Vertiefung eingesetzt. Die Transfektionsansätze wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers von TransIT<sup>®</sup>-LT1 angesetzt.

Pro Vertiefung einer Zellkulturplatte: 3  $\mu\text{l}$  TransIT<sup>®</sup>-LT1 /  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA  
100  $\mu\text{l}$  Opti-MEM<sup>®</sup>

TransIT<sup>®</sup>-LT1 und Opti-MEM<sup>®</sup> wurden zunächst zueinander gegeben, gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe der DNA wurde der Ansatz erneut gründlich gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das FCS-haltige Wachstumsmedium von den Zellen abgenommen und diese einmal mit auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtem DMEM (+Q) gewaschen. Pro well einer 6- oder 12-well Zellkulturplatte wurden 2 bzw. 1 ml warmes DMEM (+Q +P/S +3% FCS) vorgelegt und

nach Ablauf der Inkubationszeit 100 µl des Transfektionsansatzes hinzugegeben. Die Transfektion erfolgte anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Nach etwa 12 h erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM (+Q +P/S +3% FCS).

### 3.2.4 Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot

Ernte von Zellen zur Expressionskontrolle:

Für die Analyse der Zelllysate im Western Blot wurden die Zellen an entsprechenden Zeitpunkten (Tag 1 bis 6) nach der Transfektion (*post transfectionem*, p.t.) einmal mit PBS<sub>def</sub> gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml PBS<sub>def</sub> pro well einer 6- oder 12- well Zellkulturplatte wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt, in ein Eppendorfröhrchen überführt und 5 min bei 7000x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in PBS<sub>def</sub> aufgenommen und mit ¼ Volumen 4x Proteinprobenpuffer (+20% 2-Mercaptoethanol) versetzt. Die Proben wurden bei 99°C für 5 min inkubiert und zur Analyse auf ein SDS-Gel aufgetragen oder bei -20°C aufbewahrt. Im Falle von BSL-4 Proben wurden diese nach Zugabe des Proteinprobenpuffers für 10 min bei 99°C aufgeköcht, in ein neues Schraubröhrchen überführt und durch das Ausschleusbad aus dem Labor gebracht. Es folgte eine erneute 10-minütige Inkubation der Proben bei 99°C.

Ernte in Zelllysis-Puffer (Cell Extraction Buffer, CEB):

Für alle Western Blot Analysen mit Caspase 3- oder PARP-spezifischen Antikörpern wurden Zellen in CEB (Invitrogen) geerntet, welcher zuvor mit 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid; Sigma-Aldrich) und einem Protease Inhibitor Mix (1x Complete Tablette, Roche) versetzt wurde. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion, Transfektion, Inhibitor- oder CPT-Behandlung wurden die Zellen wie im vorherigen Abschnitt beschrieben geerntet und in 30 bis 50 µl CEB für 30 min unter regelmäßigem Vortexen bei 4°C lysiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 20.000x g und 4°C. Der Überstand wurde im Anschluss mit ¼ Volumen 4x Proteinprobenpuffer vermischt und für Western Blot Analysen verwendet (3.4.2). Proben aus dem BSL4-Labor wurden wie oben beschrieben inaktiviert.

### 3.2.5 Behandlung von VeroE6-Zellen für die Aktivierung oder Hemmung von Apoptose

VeroE6-Zellen wurden in 12-well Zellkulturlatten (50 bis 60% konfluent) kultiviert und für die Versuche mit rekombinant exprimierten Proteinen wie beschrieben transfiziert (3.2.3). Für die Induktion von Apoptose wurden die Zellen mit in DMSO gelösten Camptothecin (CPT, Sigma-Aldrich) 24 bis 48 h p.t. in variierenden Konzentrationen

(2,5 bis 10  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Die Zellen wurden weitere 24 h inkubiert und für Western Blot Analysen geerntet (3.4.2). Für die Hemmung von Caspasen wurde direkt nach der Transfektion der in DMSO gelöste Inhibitor Z-VAD-FMK (Promega) mit einer finalen Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Behandlung mit DMSO diente zur Kontrolle. Für die Wachstumskinetiken der Viren wurden VeroE6-Zellen direkt im Anschluss an die Infektion (3.3.1) je nach Versuch mit DMSO, CPT (0,5 bis 1  $\mu\text{M}$ ) oder Z-VAD-FMK (50  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Um die Hemmung der Caspasen zu gewährleisten, wurden täglich nochmals 20  $\mu\text{M}$  pro Vertiefung hinzugegeben.

### 3.2.6 *Virus like particle (VLP)- Assay*

Für die Analyse von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) wurden HEK293-Zellen mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Für die Aufreinigung der VLPs aus dem Zellkulturüberstand, wurde dieser 48 h p.t. abgenommen und 10 min bei 4°C und 800x g zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. In UltraClear™ SW41-Zentrifugenröhrchen wurden 3 ml einer 20%igen Saccharose-Lösung in TNE-Puffer vorgelegt und vorsichtig mit dem zuvor zentrifugierten Zellkulturüberstand überschichtet. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit PBS<sub>def</sub> aufgefüllt, austariert und für 3 h bei 4°C und 32.000 Upm (164.000x g) in einem SW41-Rotor ultrazentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands wurden die Röhrchen vorsichtig trocken gewischt und das Pellet in 150  $\mu\text{l}$  PBS<sub>def</sub> und 50  $\mu\text{l}$  4x Probenpuffer aufgenommen.

## 3.3 Virologische Methoden

### 3.3.1 Infektion von Zellen

Die Infektion der Zellen mit TCRV, SV und VSV wurde unter BSL-2-, die Infektion mit JUNV unter BSL-4-Bedingungen im Hochsicherheitslabor des Instituts für Virologie, Marburg durchgeführt.

Die Virusverdünnung wurde in serumfreien DMEM angesetzt und die Infektion der Zellen erfolgte für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Für die Mock-Kontrolle wurde serumfreies DMEM ohne Virus auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde das Inokulum durch DMEM (+Q +P/S +3% FCS) ersetzt um an entsprechenden Zeitpunkten analysiert zu werden.

### 3.3.2 Anzucht und Isolierung von JUNV und TCRV

Zur Anzucht wurden JUNV und TCRV in VeroE6-Zellen vermehrt und aus dem Überstand geerntet. Für JUNV wurden diese Arbeiten unter BSL-4-Bedingungen im

Hochsicherheitslabor des Institutes für Virologie, Marburg durchgeführt. Zellen mit einer Dichte von etwa 60 bis 80% wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit 5 ml Virusverdünnung (multiplicity of infection (MOI) 0,01 bis 0,1) der bestehenden Stocks in serumfreien DMEM infiziert (3.3.1). Nach einer einstündigen Inkubation wurde die Virusverdünnung abgenommen und 25 ml DMEM (+Q +P/S +3% FCS) pro Flasche zugegeben. Als Mock-Kontrolle wurde eine Flasche nicht infizierter Zellen verwendet. 5 bis 6 Tage nach der Infektion (*post infectionem*, p.i.) wurde der Überstand in 50 ml-Falconröhrchen überführt und 5 min bei 3500x g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der aufgereinigte Überstand von JUNV- bzw. TCRV-infizierten Zellen wurde aliquotiert und bei -80°C zur weiteren Verwendung gelagert. Der Virustiter wurde mit Hilfe eines Plaque Tests bestimmt (3.3.4).

### 3.3.3 Virusaufreinigung

Für die Virusaufreinigung wurden VeroE6-Zellen (80% konfluent) mit JUNV (MOI 0,01) in 10 ml serumfreiem DMEM in einer Zellkulturflasche (175 cm<sup>2</sup>) für 1 h bei 37°C infiziert. Anschließend wurde das Inokulum durch DMEM (+Q +P/S +3% FCS) ersetzt. An Tag 7 p.i. wurde der Überstand geerntet und mittels Ultrazentrifugation (2 h, 4°C, 76,000x g) über ein 20%iges Saccharosekissen aufgereinigt. Das Pellet wurde in 600 µl PBS<sub>def</sub> aufgenommen.

### 3.3.4 Bestimmung von Virustitern mittels Plaque Test

Zur Bestimmung des Titers von JUNV bzw. TCRV wurde ein Plaque Test auf VeroE6-Zellen in 12-well Zellkulturplatten durchgeführt. Für die Bestimmung der Viruskonzentration wurden Verdünnungen des zu testenden Virusüberstands von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-7</sup> in serumfreiem DMEM angesetzt. Die einstündige Infektion der Zellen (3.3.1) erfolgte mit 500 µl der angesetzten, gut durchmischten Virusverdünnung pro Vertiefung. Anschließend wurde das Inokulum abgenommen und pro Vertiefung 1 ml einer 1:1 Mischung von 3%igem Avicel und 2x MEM (+2Q +2xP/S +3% FCS) zugegeben. Die überschichteten Zellen wurden dann für 6 bis 7 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Da sich die freigesetzten Viren aufgrund der Überschichtung mit dem Avicel-Medium-Gemisch nur auf die direkt angrenzenden Zellen ausbreiten, bilden sich spezifische Plaques (Löcher) im Zellrasen, wobei ein Plaque einem infektiösen Viruspartikel entspricht. Für die Visualisierung der einzelnen Plaques wurden das Avicel-Medium-Gemisch und der Zellrasen mit Kristallviolett-Lösung für 10 min bei RT inkubiert. Da Kristallviolett die Zellwände der Zellen färbt werden die lysierten bzw. zerstörten Zellen der Plaques nicht angefärbt und heben sich

deutlich vom violetten Hintergrund ab. Nach Waschen der gefärbten Zellen mit PBS<sub>def</sub> wurden die Platten bei RT getrocknet und die Plaques ausgezählt. Da jeder gebildete Plaque einem infektiösen Viruspartikel entspricht, wird durch das Auszählen der Plaques unter Berücksichtigung der Virusverdünnung die Anzahl der infektiösen Partikel = plaque forming units pro ml (pfu/ml) errechnet.

Beispielrechnung: Bei der Verdünnung  $10^{-6}$  sind 4 Plaques im Zellrasen entstanden. Da für die Infektion 500  $\mu$ l verwendet wurden, ergibt sich ein Virustiter von  $4 \times 2 \times 1/10^{-6}$  pfu/ml  $\rightarrow 8 \times 10^6$  pfu/ml.

### 3.3.5 Wachstumskinetik

Die Erstellung der Wachstumskinetik erfolgte in einem Abstand von 24 h an Tag 1 bis Tag 6 p.i.. Nach der Infektion der Zellen (VeroE6-Zellen, 80% konfluent) in 12-well Zellkulturplatten wurden die Zellen in DMEM (+Q +P/S +3% FCS) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Je nach Probe wurden die Zellen zusätzlich mit Apoptose-hemmenden (Z-VAD-FMK) oder -aktivierenden (Camptothecin) Substanzen behandelt (3.2.5). Für die Kinetik wurde täglich je 1ml Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert, bis mittels Plaque Test (3.3.4) die Virustiter bestimmt werden sollten.

### 3.3.6 UV-Inaktivierung von Viren

Für die Inaktivierung der Viren wurden Virusstocks mit bekanntem Titer (pfu/ml) in einer offenen 6-well Zellkulturplatte (500  $\mu$ l/well) einer einstündigen UV-Bestrahlung von 254 nm ausgesetzt, bevor sie für weitere Versuche genutzt wurden (Groseth et al, 2010a).

## 3.4 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

### 3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

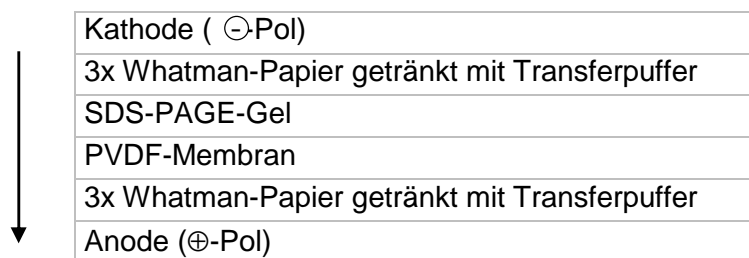
Für die Analyse von Proteinen wurden diese an das anionische Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) gebunden und die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe mittels denaturierender SDS-PAGE entsprechend ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Die Polyacrylamidgele bestanden aus einem 4%igen Sammelgel und, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine, einem höherprozentigen Trenngel (8% bis 15%). Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie mit  $\frac{1}{4}$  Volumen 4x Probenpuffer versetzt und für 5 bis 10 min bei 99°C denaturiert. Zusätzlich wurde ein Größenmarker (2.8) für die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer

Biorad®-Minigelkammer mit 1x Proteingellaufpuffer bei 20 mA pro Gel und maximaler Spannung. Anschließend wurden die Proben im Western Blot (3.4.2) analysiert.

	Sammelgel	Trenngel			
	4%	8%	10%	12%	15%
dH <sub>2</sub> O	1,4 ml	2,3 ml	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml
30% Polyacrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel 30)	0,33 ml	1,3 ml	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml
PAGE-Sammelgelpuffer	0,27 ml	-	-	-	-
PAGE-Trenngelpuffer	-	1,35 ml	1,35 ml	1,35 ml	1,35 ml
10% APS	0,02 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	0,003 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

### 3.4.2 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen in Zelllysaten wurden diese zunächst mittels SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt (3.4.1). Mittels Western Blot (Semi-Dry-Blot-Prinzip) wurden die Proteine dann auf eine PVDF-Membran transferiert, welche zuvor für 2 bis 5 min in Methanol aktiviert und in Transferpuffer gewaschen wurde. Pro SDS-Gel wurden je drei Lagen Whatman-3MM Papier mit Transferpuffer benetzt und der Western Blot wie folgt aufgebaut:



Luftblasen zwischen den Schichten wurden durch Ausstreichen mit einer Glaspipette beseitigt. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 90 min (= 43 mA pro Gel) oder bei 20 Volt für 30 min (Fast-Blot).

### 3.4.3 Immunfärbung von Proteinen

Zur Absättigung unbesetzter, unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Proteintransfer für mindestens 1 h bei RT auf dem Schüttler oder über Nacht bei 4°C in PBS<sub>def</sub> versetzt mit 10% Magermilchpulver inkubiert. Im Anschluss wurde die

Membran 3x 10 min mit PBS<sub>def</sub>/0,1% Tween<sup>®</sup>20 gewaschen und für 1 h bei RT mit einem proteinspezifischen Erstantikörper (2.13) auf einer mit Parafilm bezogenen Platte inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran für je 10 min in PBS<sub>def</sub>/0,1% Tween<sup>®</sup>20 entfernt. Es folgte die Inkubation der Membran mit einem Zweitantikörper (2.13) für 1 h auf dem Schüttler. Abschließend erfolgten 3x 10 min Waschen mit PBS<sub>def</sub>/0,1% Tween<sup>®</sup>20 und 1x 10 min Waschen mit PBS<sub>def</sub>.

Detektion mit Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpern:

Zur Detektion der POD-gekoppelten Antikörper mittels Chemilumineszenz wurden SuperSignal Reagenzien (Thermo Scientific; je nach Signalstärke Dura- oder Femto-Substrat) verwendet. Je 500 µl der beiden Detektionslösungen wurden vermischt, auf der Membran gleichmäßig verteilt und für 5 min in einer Plastiktasche inkubiert. Die Lösung wurde mit einem Papiertuch vollständig ausgestrichen und die Membran in der Tasche luftdicht eingeschweißt. Es folgte die Exposition eines Röntgenfilms oder die Analyse mittels Chemi Doc XRS+ System (Bio-Rad, Image Lab software version 4.0). Je nach Effizienz des verwendeten Antikörpers und der Menge des detektierbaren Materials variierte die Exposition von 1 sec bis 1 h.

Detektion mit Infrarotfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern:

Die Detektion von Proteinen mit fluoreszierenden Infrarotfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern (Alexa Fluor<sup>®</sup>680: rot; IRDye<sup>™</sup> 800:grün) erfolgte direkt durch Messung der Fluoreszenz mit dem Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR), welches in der Lage ist zwei Fluorophore bei ihrem Absorptionsmaximum von 680 nm und 800 nm gleichzeitig anzuregen. Die Auswertung erfolgte mit der dazugehörigen Software (Version 2.1.12).

#### 3.4.4 Immunfluoreszenz-Analyse

Die für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse benötigten Zellen (30 bis 60% konfluent) wurden in 6-well Zellkulturschalen auf Deckgläschen (Ø 12 mm, rund) kultiviert. Nach der Infektion oder Transfektion wurden die Zellen an den zu analysierenden Zeitpunkten mit PBS<sub>def</sub> gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 4% PFA in DMEM fixiert bzw. inaktiviert (Proben aus dem BSL4-Labor wurden mindestens 16 h vor dem Ausschleusen in 4% PFA inaktiviert. Nach Transferieren der Deckgläschen in eine neue Platte mit frischem 4% PFA erfolgte das Ausschleusen sowie eine weitere Inkubation von 16 h). Die Proben wurden mit 0,1 M Glycin für 10 min bei RT abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Für die Permeabilisierung wurden die Zellen für 10 min mit 0,1% TritonX-100 behandelt, bevor eine Inkubation in

Blocking-Reagenz für 10 min bei RT oder über Nacht bei 4°C folgte. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde je einmal mit PBS<sub>def</sub> gewaschen. Die Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen Erstantikörper (2.13) erfolgte für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer. Auf einer mit Parafilm überzogenen Platte wurden je 25 µl der Antikörperverdünnung getropft und die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf den Tropfen gelegt. Es folgte dreimaliges Waschen mit PBS<sub>def</sub> für je 10 min, bevor die einstündige Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper (2.13) analog zu der des Erstantikörpers durchgeführt wurde. Für die Visualisierung der Zellkerne wurde in die Verdünnung des Zweitantikörpers zusätzlich 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI (1mg/ml); 1:2.000, Sigma-Aldrich), ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die DNA einlagert, gegeben. Nach der Inkubation mit DAPI und dem Zweitantikörper wurden die Deckgläschen dreimal 10 min mit PBS<sub>def</sub> gewaschen, in dH<sub>2</sub>O getaucht und mit der Zellseite nach unten mittels FluorSafe auf einem Objektträger fixiert. Das Präparat wurde über Nacht bei 4°C getrocknet und die Zellen am nächsten Tag mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

#### **3.4.5 Caspase-Glo<sup>®</sup> Assay**

Für die Detektion von aktivierten Caspasen in Zellen wurden Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7, 8, 9 Assays (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden hierfür in weißen 96-well Zellkulturplatten ausgesät (50% konfluent) und zu entsprechenden Zeitpunkten nach der Infektion (3.3.1) mit den Caspase-Glo<sup>®</sup> Reagenzien 30 bis 60 min lysiert. Das durch aktivierte Caspasen gespaltene Substrat ermöglicht die Freisetzung von Lumineszenz durch eine Luziferase Reaktion. Die Aktivität der Caspasen ist somit proportional zur Lumineszenz, die dann mittels eines Luminometers (Centro LB 960, MicroWin 2000 Version 4) gemessen und analysiert wurde.

### **3.5 Statistische Analyse**

Die in den einzelnen Graphen dargestellten Daten repräsentieren jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. Die Sternchen zeigen die signifikanten Unterschiede (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001) im Vergleich zu Mock oder NP Wildtyp Fraktionen. Nicht-signifikante Unterschiede wurden ebenfalls in einigen Fällen (n.s.) markiert.



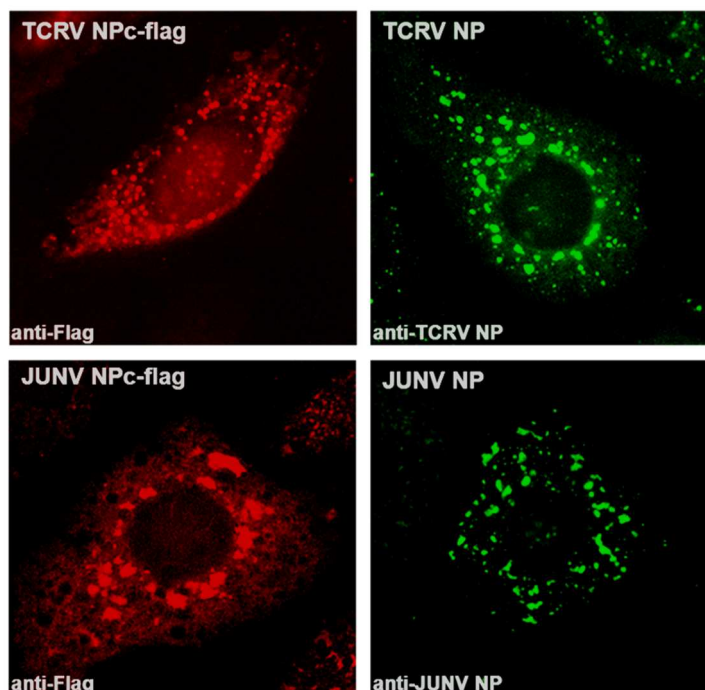
## 4 Ergebnisse

Die Neuwelt-Arenaviren JUNV und TCRV sind phylogenetisch eng miteinander verwandt, unterscheiden sich jedoch signifikant in ihrer Pathogenität. Durch die Charakterisierung von JUNV und TCRV NP und vergleichende Analysen sollen in dieser Arbeit Unterschiede zwischen den Spezies identifiziert werden, die eine entscheidende Auswirkung auf die Virus-Wirtszell-Interaktion haben und möglicherweise zu den signifikanten Pathogenitätsunterschieden der Viren beitragen.

### 4.1 Expression und Spaltung von JUNV NP und TCRV NP

#### 4.1.1 Immunfluoreszenzanalyse von JUNV NP und TCRV NP

Für die Charakterisierung von JUNV und TCRV NP wurde zunächst die zelluläre Lokalisation analysiert. Für die Immunfluoreszenzanalyse (IFA) von rekombinant exprimiertem NP wurden HUH7-Zellen (humane Hepatomzellen) verwendet, da sich diese besonders gut für IFA eignen und gut transfizierbar sind.



**Abb. 4.1: Immunfluoreszenzanalyse von JUNV und TCRV NP.**

HUH7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für JUNV und TCRV NP (pC-JUNV NP, pC-TCRV NP) sowie für Flag-markiertes JUNV und TCRV NP (pC-JUNV NPc-Flag, pC-TCRV NPc-Flag) transfiziert und 48 h p.t. fixiert, permeabilisiert, mit NP-spezifischen bzw. Flag-spezifischen Antikörpern und den jeweiligen AlexaFluor®488- bzw. AlexaFluor®549-gekoppelten Zweitantikörpern gefärbt und analysiert.

Die Zellen wurden mit eukaryotischen Expressionsplasmiden, die für JUNV und TCRV NP kodieren, transfiziert und 48 h p.t. analysiert. Neben den Expressionsplasmiden ohne Markierung (pC-JUNV NP, pC-TCRV NP) wurden auch Plasmide mit Flag-markiertem JUNV und TCRV NP (pC-JUNV NPc-Flag, pC-TCRV NPc-Flag) verwendet, um Antikörper-bedingte Detektionsunterschiede auszuschließen.

Die intrazelluläre Verteilung von JUNV und TCRV NP wies keine signifikanten Unterschiede auf. Sowohl JUNV als auch TCRV NP zeigten eine zytosolische Verteilung mit verstärkter Lokalisation in punktförmigen Ansammlungen, sogenannten „inclusion bodies“ (Abb. 4.1), die sich verstärkt in perinukleären Regionen aber auch in der Peripherie ansammelten.

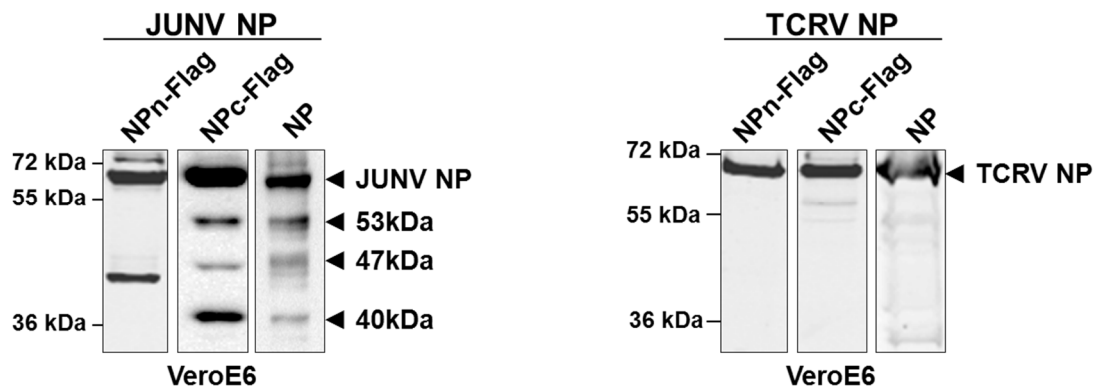
#### 4.1.2 Expression von rekombinantem JUNV NP und TCRV NP in VeroE6- Zellen

Um die Funktion von JUNV und TCRV NP genauer zu untersuchen, wurde die Expression zunächst in VeroE6-Zellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze) analysiert. VeroE6-Zellen stellen eine etablierte Zelllinie dar, die sich gut mit Arenaviren infizieren lässt und aus diesem Grund in dieser Arbeit vorwiegend verwendet wurde. Die Zellen wurden mit N- oder C-terminal Flag-markierten NP-Expressionsplasmiden (pC-JUNV NPn-Flag, pC-JUNV NPc-Flag, pC-TCRV NPn-Flag, pC-TCRV NPc-Flag) transfiziert und 48 h p.t. mittels SDS-PAGE und Western Blot, unter Verwendung von NP- bzw. Flag-spezifischen Antikörpern, analysiert.

Der Vergleich des Laufverhaltens von JUNV und TCRV NP zeigte zunächst eine geringe Abweichung im Molekulargewicht zwischen den beiden Proteinen, die vermutlich auf die unterschiedliche Aminosäureanzahl (TCRV NP 570 Aminosäuren (aa); JUNV NP 564 aa) zurückzuführen ist.

Die Expression von unmarkiertem als auch Flag-markiertem TCRV NP zeigte eine prominente Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 68 kDa, die der erwarteten Größe entspricht. Die Western Blot Analyse von JUNV NP hingegen zeigte nicht nur eine Bande in der erwarteten Höhe des JUNV NP (~65 kDa), sondern interessanterweise zusätzliche Banden geringerer Größe, die offensichtlich Spalt- oder Abbauprodukte von JUNV NP darstellen und deren Molekulargewicht in etwa 53 kDa, 47 kDa und 40 kDa betrug (Abb. 4.2). Diese drei charakteristischen Spaltprodukte zeigten sich bei der Expression des nicht-markierten JUNV NP und des C-terminal Flag-markierten NP. Dies zeigt, dass die Präsenz der Flag-Markierung keinen Einfluss auf die Degradierung von JUNV NP in die einzelnen, spezifischen Produkte nimmt bzw. dass es sich nicht um unspezifische Signale der Flag-Markierung handelt. Da der Nachweis der charakteristischen Spaltprodukte durch NP-spezifische Antikörper sowie über die Flag-Markierung am C-Terminus von JUNV NP erfolgte, reflektieren die

beobachteten Produkte C-terminale Fragmente des verkürzten Proteins. Die Expression des N-terminal Flag-markierten JUNV NP hingegen zeigte lediglich eine zusätzliche, prominente Bande in der Höhe von etwa 45 kDa (Abb. 4.2). Da die Expression des nahe verwandten TCRV NP im Vergleich zu JUNV NP keine charakteristische Spaltung im Western Blot zeigte (Abb. 4.2), scheint der beobachtete Spaltungsprozess von NP spezifisch für JUNV zu sein.

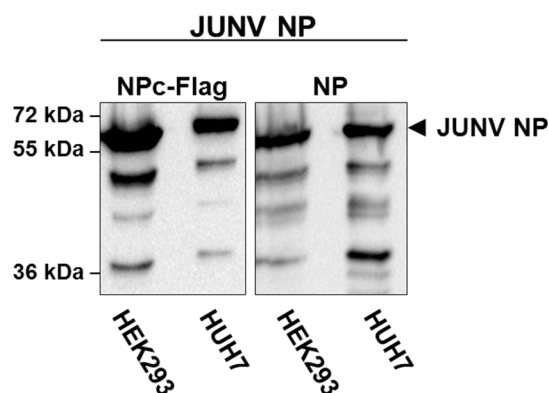


**Abb. 4.2: Rekombinante Expression von JUNV NP und TCRV NP in VeroE6-Zellen.**

VeroE6-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für unmarkiertes oder Flag-markiertes JUNV und TCRV NP (pC-JUNV NPn-Flag, pC-JUNV NPc-Flag, pC JUNV NP, pC-TCRV NPn-Flag, pC-TCRV NPc-Flag, pC-TCRV NP) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zelllysate geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines Flag-spezifischen (Flag-markiertes NP) oder JUNV/TCRV NP-spezifischen Antikörpers (unmarkiertes NP) analysiert.

#### 4.1.3 Spaltung von rekombinantem JUNV NP in verschiedenen Zelllinien

In den vorangegangenen Versuchen ließ sich eine spezifische Spaltung von rekombinant exprimiertem JUNV NP in VeroE6-Zellen nachweisen.



**Abb. 4.3: Spaltung von rekombinant exprimiertem JUNV NP in verschiedenen Zelllinien.**

HEK293- und HUH7-Zellen wurden mit den eukaryotischen Expressionsplasmiden pC-JUNV NPc-Flag oder pC-JUNV NP transfiziert. Nach 48 h wurden die Zelllysate geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines Flag-spezifischen (Flag-markiertes NP) oder eines JUNV NP-spezifischen Antikörpers (unmarkiertes NP) analysiert.

Um zu zeigen, dass es sich hierbei nicht um einen Zelltyp-spezifischen Phänotyp handelt, wurde die Expression von JUNV NP in den Zelllinien HEK293 (humane embryonale Nierenzellen) und HUH7 analysiert.

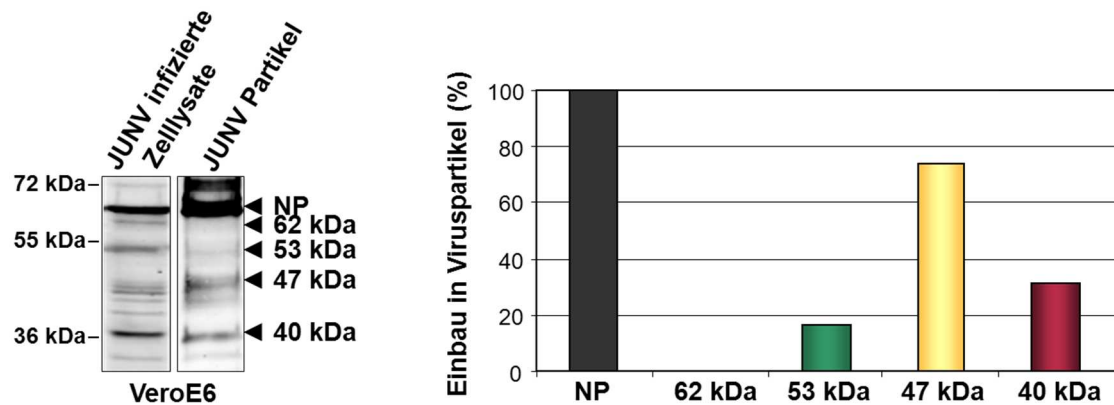
Die Ergebnisse sowohl für unmarkiertes als auch für Flag-markiertes JUNV NP machten deutlich, dass auch in den Zelllinien HEK293 und HUH7 eine spezifische Spaltung von JUNV NP erfolgt (Abb. 4.3). Die beobachteten Abbaubanden zeigten hierbei eine vergleichbare Größe mit den in VeroE6-Zellen gebildeten Spaltprodukten.

#### **4.1.4 Spaltung von JUNV NP in infizierten Zellen**

Nachdem gezeigt wurde, dass die rekombinante Expression von JUNV NP die Bildung charakteristischer Spaltprodukte in verschiedenen Zelltypen induziert, war es von besonderem Interesse, die Situation in infizierten Zellen zu untersuchen. Hierfür wurden VeroE6-Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert und 48 h p.i. im Western Blot mit einem JUNV NP-spezifischen Antikörper analysiert. Die Lysate JUNV-infizierter Zellen zeigten deutlich, dass es auch hier zu einer Spaltung von JUNV NP kam (Abb. 4.4). Die spezifischen Spaltprodukte wiesen zudem eine vergleichbare Größe mit denen der bereits für rekombinant exprimiertes NP beobachteten charakteristischen Abbaubanden auf.

#### **4.1.5 Einbau der JUNV NP-Spaltprodukte in Viruspartikel**

Zusätzlich zu den infizierten Zelllysaten wurden auch die Überstände der JUNV-infizierten VeroE6-Zellen untersucht, um den Einbau der einzelnen Spaltprodukte in die viralen Partikel zu überprüfen. Die Überstände wurden hierfür über ein 20%iges (w/v) Saccharosekissen aufgereinigt und die ankonzentrierten Virionen im Western Blot analysiert. Interessanterweise zeigte sich, dass die meisten Spaltprodukte von JUNV NP auch in die viralen Partikel eingebaut wurden. Zusätzlich zu NP (~65 kDa) konnten die NP-Fragmente mit einem Molekulargewicht von 53 kDa, 47 kDa und 40 kDa detektiert werden (Abb. 4.4). Ein etwa 62 kDa großes Spaltprodukt, welches in JUNV-infizierten Zellen, nicht jedoch in JUNV NP-transfizierten Zellen nachweisbar war, wurde hingegen nicht in die Partikel eingebaut. Die Menge der einzelnen Spaltprodukte in infizierten Zellen und aufgereinigten Viruspartikeln wurde im Vergleich zu NP quantifiziert und verglichen. Die Daten zeigen, dass die einzelnen Spaltprodukte in unterschiedlichen Mengen in die Partikel eingebaut wurden, bzw. ein bevorzugter Einbau der 47 kDa und 40 kDa Fragmente erfolgte (Abb. 4.4, Graph). Während 74% und 31% der 47 kDa und 40 kDa Spaltprodukte in die Partikel integriert wurden, waren es für das 53 kDa Produkt nur 17%.



**Abb. 4.4: JUNV NP-Spaltprodukte in infizierten VeroE6-Zellen und aufgereinigten Viruspartikeln.**

VeroE6-Zellen wurden mit JUNV (MOI= 0,1) infiziert. Nach 48 h wurden die Zellysate geerntet und die Überstände über ein 20%iges (w/v) Saccharosekissen gereinigt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines JUNV NP-spezifischen Antikörpers. Der Graph zeigt die Quantifizierung der in virale Partikel eingebauten NP-Spaltprodukte. Inkorporiertes JUNV NP und die Spaltprodukte wurden quantifiziert und als prozentualer Anteil der korrespondierenden Banden der Zellysatfraktionen dargestellt.

Obwohl sich JUNV und TCRV NP in ihrer zellulären Lokalisation (IFA, Abb. 4.1) ähnelten, unterschieden sie sich deutlich im Expressionsmuster. Die Expression in der Western Blot Analyse von JUNV NP, nicht jedoch von TCRV NP, zeigte eine charakteristische und spezifische Spaltung in transfizierten wie auch in infizierten Zellen (Abb. 4.2-4.4). Die drei prominentesten Spaltprodukte wiesen ein Molekulargewicht von etwa 53 kDa, 47 kDa und 40 kDa auf und wurden zudem in unterschiedlicher Menge in die viralen Partikel inkorporiert (Abb. 4.4).

## 4.2 Identifizierung und Mutationsanalyse potentieller Caspase-Spaltstellen in JUNV NP

JUNV NP zeigt eine spezifische Spaltung in einzelne, charakteristische Fragmente definierter Größe, die wahrscheinlich durch zelluläre Proteasen verursacht wird. Im nächsten Schritt sollte die Aminosäuresequenz des NP auf konservierte Protease-Spaltstellen untersucht werden, um einen ersten Anhaltspunkt für die Identität der beteiligten zellulären Proteasen zu erhalten. Da vergleichbare Spaltprodukte bei anderen Viren beobachtet wurden (Backes et al, 2005; Best et al, 2003; Karlberg et al, 2010), die durch eine Spaltung durch zelluläre Caspasen entstehen, wurde mit Hilfe des Programmes GraBCas die NP-Sequenz zunächst auf Caspase-Spaltmotive untersucht.

#### 4.2.1 Identifizierung potentieller Caspase-Spaltstellen in JUNV NP

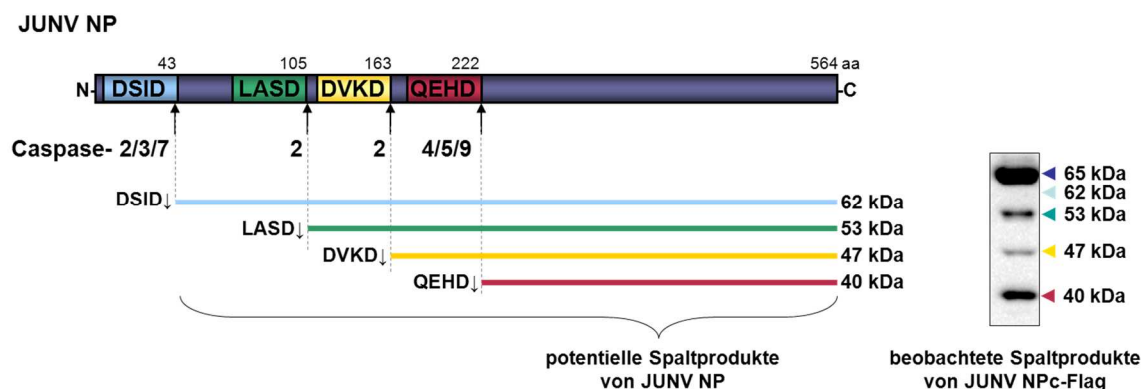
Unter Verwendung des Programmes GraBCas (Backes et al, 2005) konnten mindestens vier potentielle Spaltmotive identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit als Spaltstellen für Caspasen dienen (Tabelle 4.1).

Motiv	Position aa	Caspase	GraBCas Vorhersagewert
DSID↓F	43	Caspase 2	6.12
		Caspase 3	21.84
		Caspase 7	15.55
LASD↓L	105	Caspase 2	16.97
DVKD↓P	163	Caspase 2	19.63
QEHD↓C	222	Caspase 4	9.6
		Caspase 5	8.4
		Caspase 9	18.0

**Tabelle 4.1:**

Lokalisation potentieller Caspase-Spaltmotive in JUNV NP mit einem GraBCas-Vorhersagewert >15 für mindestens eine Caspase (aa= Aminosäure).

Bei den ermittelten potentiellen Caspase-Spaltmotiven DSID, LASD, DVKD und QEHD handelt es sich um vier mit einem Aspartat endende Tetrapeptidfolgen, die in der N-terminalen Hälfte von JUNV NP lokalisiert sind (Abb. 4.5). Die einzelnen Motive könnten hierbei theoretisch von einer Vielfalt von Caspasen, inklusive der Caspasen 2, 3, 4, 5, 7 und 9 erkannt und gespalten werden (Tabelle 4.1). Ermittelt man das Molekulargewicht der vier potentiellen Spaltprodukte (ExpASy-Translation, Compute pl/Mw), so ergeben sich vier NP-Spaltfragmente mit einer Größe von etwa 62 kDa, 53 kDa, 47 kDa und 40 kDa (Abb. 4.5).



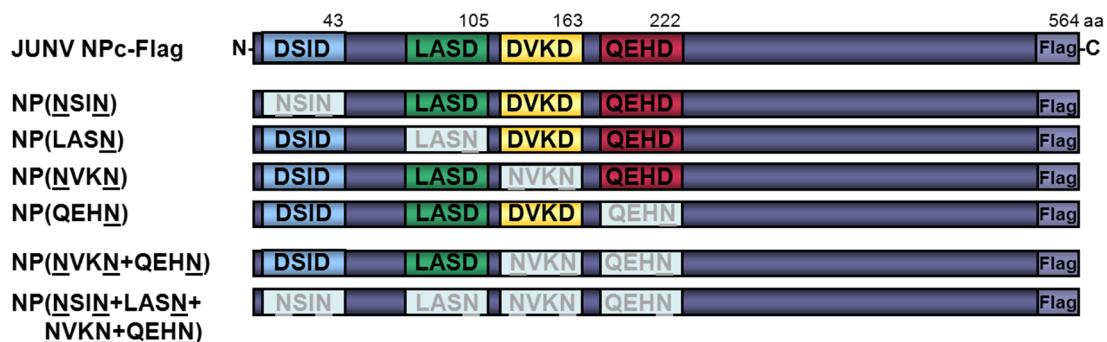
**Abb. 4.5: Schematische Darstellung der linearen JUNV NP-Struktur mit potentiellen Caspase-Spaltmotiven.**

Die schematische Darstellung zeigt vier, mittels GraBCas ermittelte potentielle Caspase-Spaltmotive in JUNV NP. Dargestellt sind deren jeweilige Positionen (Aspartatrest, an dem die Spaltung erfolgen sollte), die entsprechenden Caspasen sowie die aus der Spaltung resultierenden Produkte mit ihrem ermittelten Molekulargewicht. Der Western Blot zeigt das tatsächlich beobachtete Spaltungsmuster von JUNV NP, das auffallend stark mit den theoretisch ermittelten Größen der potentiellen Spaltprodukte übereinstimmt (aa= Aminosäure, D=Aspartat an dem die Spaltung erfolgen sollte, A=Alanin, E=Glutaminsäure, H=Histidin, I=Isoleucin, K=Lysin, Q=Glutamin, S=Serin, V=Valin).

Interessanterweise entsprachen die zu erwartenden Größen der jeweiligen Spaltprodukte bei Nutzung der potentiellen Spaltmotive DSID (~62 kDa), LASD (~53 kDa), DVKD (~47 kDa) und QEHD (~40 kDa) in etwa den im Western Blot beobachteten Abbaubanden von JUNV NP, wodurch die Vermutung bestärkt wird, dass Caspasen für die Spaltung von JUNV NP verantwortlich sein könnten.

#### 4.2.2 Mutation potentieller Caspase-Spaltstellen in JUNV NP

Eine Mutationsanalyse des NP sollte nun klären, ob die vermuteten Protease-Spaltmotive tatsächlich genutzt werden. Um die Spaltmotive einzeln oder in Kombination auszuschalten, wurde die innerhalb der jeweiligen Tetrapeptidfolge liegende Aminosäure Aspartat (D) (Position P1 und ggf. P4) gegen Asparagin (N) ausgetauscht. Für die Detektion der Spaltprodukte enthielten alle generierten Plasmide (pC-NP(NSIN), pC-NP(LASN), pC-NP(NVKN) und pC-NP(QEHN)) eine für eine C-terminale Flag-Markierung kodierende Sequenz (Abb. 4.6).



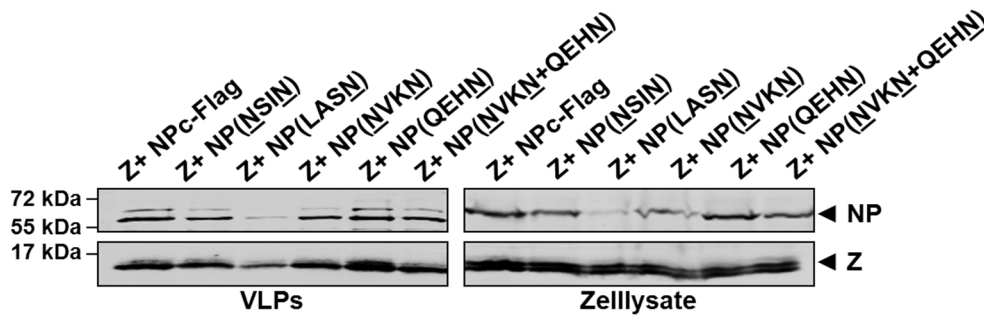
**Abb. 4.6: Mutation potentieller Caspase-Spaltstellen in JUNV NP.**

Schematische Darstellung des C-terminal Flag-markierten JUNV NP mit den durch GraBCas ermittelten potentiellen Caspase-Spaltmotiven sowie den jeweils generierten Mutanten. Um die Motive einzeln oder in Kombination auszuschalten, wurde mittels Punktmutagenese das in der jeweiligen Tetrapeptidfolge enthaltene Aspartat (D) durch Asparagin ersetzt (N) (aa= Aminosäure, D=Aspartat an dem die Spaltung erfolgen sollte, A=Alanin, E=Glutaminsäure, H=Histidin, I=Isoleucin, K=Lysin, Q=Glutamin, S=Serin, V=Valin).

#### 4.2.3 Charakterisierung der einzelnen Mutanten mittels IFA und VLP-Assay

Die Charakterisierung der einzelnen Mutanten erfolgte mittels VLP- (*virus like particle*) Assay und IFA. Für den VLP-Assay wurden die Expressionsplasmide der einzelnen Mutanten in HEK293-Zellen transfiziert. Die Zelllysate und die Zellkulturüberstände wurden 48 h p.t. geerntet. Für die Aufreinigung der VLPs wurden die Überstände über ein 20%iges Saccharosekissen (w/v) zentrifugiert. Die Analyse der Zelllysate im Western Blot zeigte eine mit dem wildtypischen NP vergleichbare Expressionsstärke der einzelnen Mutanten, lediglich die Expression der Mutante NP(LASN) war etwas schwächer (Abb. 4.7). Die Analyse der aufgereinigten Zellkulturüberstände zeigte, dass

alle NP Mutanten in freigesetzte Z-induzierte VLPs eingebaut werden (Abb. 4.7). Dies entspricht den Beobachtungen für JUNV NP (Groseth et al, 2010b; Wolff, 2009).



**Abb. 4.7: Einbau der JUNV NP Mutanten in Z-induzierte VLPs.**

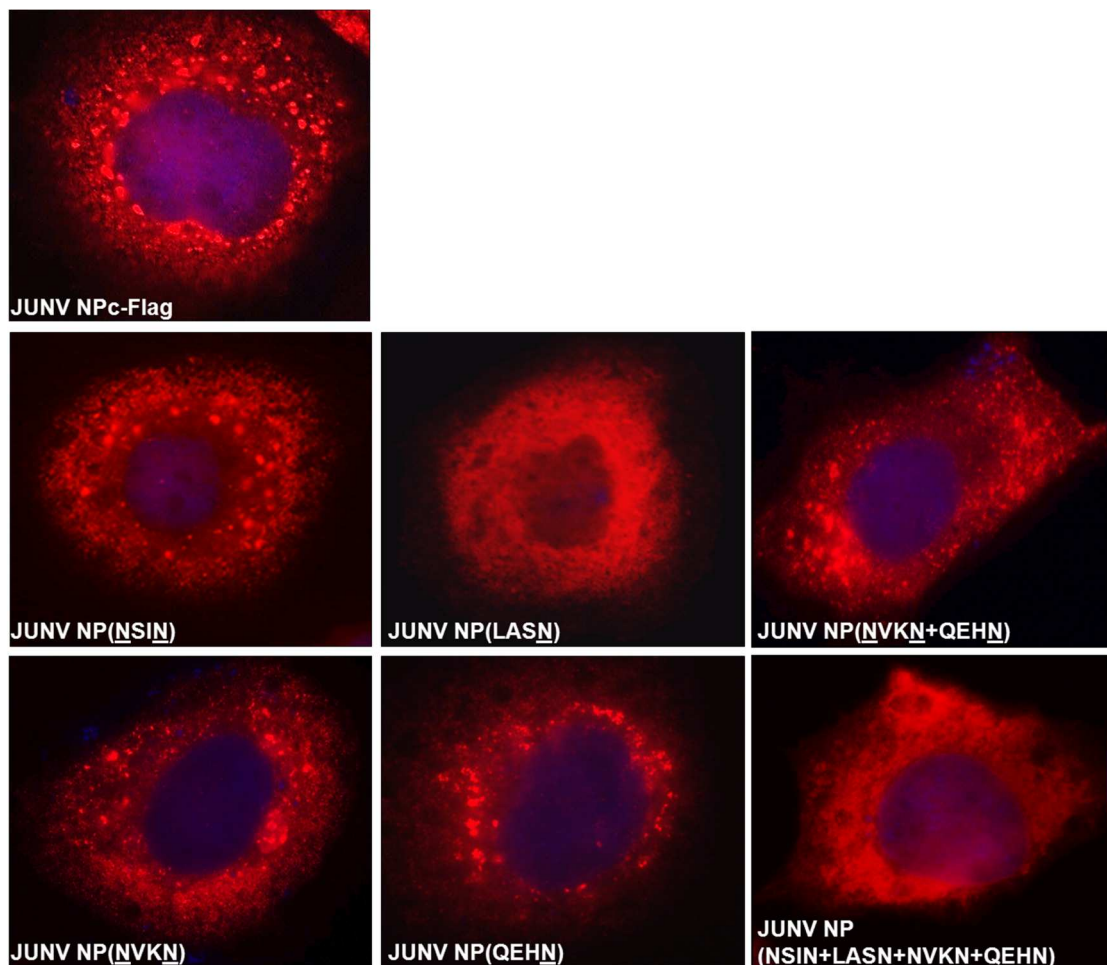
HEK293-Zellen wurden mit JUNV NP (Wildtyp oder den einzelnen Mutanten) und dem Matrixprotein Z co-transfiziert. Die Zelllysate und die Zellkulturüberstände wurden 48 h p.t. geerntet und die Überstände über ein 20%iges Saccharosekissen (w/v) zentrifugiert. Die Zelllysate sowie die pelletierten VLPs wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Anwesenheit von Z und NP bzw. der NP Mutanten analysiert.

Der Einbau der einzelnen Mutanten in Z-induzierte VLPs zeigte, dass die Interaktion mit dem Matrixprotein Z funktionell ist bzw. durch die einzelnen Mutationen nicht gestört wird. Da die Interaktion von Arenavirus NP mit Z nicht über den N-Terminus, sondern über den C-terminalen Bereich von NP vermittelt wird (Levingston Macleod et al, 2011; Ortiz-Riano et al, 2011; Shtanko et al, 2010), entsprach der Einbau der NP Mutanten in VLPs den Erwartungen und bestätigte, dass die einzelnen im N-Terminus lokalisierten Mutationen keinen Einfluss auf den C-terminalen Bereich des NP haben. So lässt die Interaktion mit Z und die folgende Inkorporation der NP Mutanten in VLPs vermuten, dass die NP-Faltung durch die einzelnen Mutationen nicht stark beeinträchtigt bzw. unverändert zum Wildtyp ist.

Die intrazelluläre Verteilung der NP Mutanten wurde außerdem mittels IFA untersucht. Dazu wurden HUH7-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für NP sowie die NP Mutanten kodieren, nach 24 h p.t. fixiert und die Expression der rekombinanten Proteine mittels eines Flag-spezifischen Antikörpers detektiert. Auch hier zeigten die Mutanten die für JUNV NP beobachtete intrazelluläre Lokalisation sowie die Bildung von *inclusion bodies* (Abb. 4.8). Auffällig war hier erneut der Phänotyp der Mutante NP(LASN). Die Mutante unterschied sich nicht nur in Hinblick auf die Expressionsstärke von JUNV NP (Abb. 4.7), sondern zeigte auch eine andere intrazelluläre Verteilung, wobei die Konzentrierung in den *inclusion bodies* ausblieb. Da für TCRV NP gezeigt wurde, dass die Region aa 92 bis aa 119 für die NP-NP-Interaktion entscheidend ist, lässt sich vermuten, dass die Mutation des LASD Motivs, genauer der Austausch der aa 105 von D zu N, einen Einfluss auf die



Selbstassemblierung nehmen könnte und dadurch keine *inclusion bodies* mehr gebildet werden (Levingston Macleod et al, 2011; Ortiz-Riano et al, 2011).



**Abb. 4.8: Immunfluoreszenzanalyse der JUNV NP Mutanten.**

HUH7-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für JUNV NP (pC-JUNV NPc-Flag) sowie den einzelnen JUNV NP Mutanten (pC-NP(NSIN), pC-NP(LASN), pC-NP(NVKN), pC-NP(QEHN), pC-NP(NVKN+QEHN), pC-NP(NSIN+LASN+NVKN+QEHN)) transfiziert und 48 h p.t. fixiert, permeabilisiert und mit einem Flag-spezifischen Erstantikörper sowie einem AlexaFluor®549-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt und analysiert.

#### 4.2.4 Mutationsanalyse der potentiellen Caspase-Spaltstellen in JUNV NP

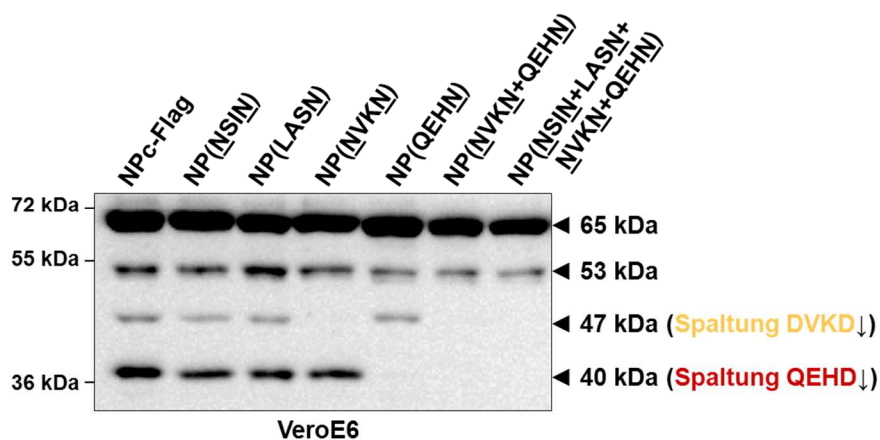
Die für NP und die NP Mutanten kodierenden Plasmide wurden analog zu Absatz 4.1 in VeroE6-Zellen transfiziert und die Zelllysate im Western Blot mittels eines Flag-spezifischen Antikörpers auf Veränderungen hinsichtlich der Spaltprodukte von JUNV NP analysiert (Abb. 4.9). Die Mutationsanalyse machte deutlich, dass die beiden Spaltmotive DSID und LASD nicht für die Bildung der beobachteten NP Spaltprodukte genutzt werden, da das Bandenmuster der Mutanten NP(NSIN) und NP(LASN) unverändert blieb. Interessanterweise zeigte die Expression der Mutanten NP(NVKN)

und NP(QEHN) im Vergleich mit wildtypischen NP eine deutliche Abweichung in den jeweiligen Spaltungsmustern. Während die Mutation des DVKD Motivs mit einer deutlichen Reduktion des 47 kDa Spaltprodukts einherging, resultierte das Ausschalten des QEHD Motivs in dem Verlust des 40 kDa Fragments.

Während für die Entstehung der Spaltprodukte von 47 kDa und 40 kDa die beiden Motive DVKD und QEHD verantwortlich waren, ist die Bildung des 53 kDa Fragments durch keines der vier untersuchten Spaltmotive zu erklären.

Zusätzlich zu den Mutanten mit den einzeln ausgeschalteten Spaltmotiven wurden eine Doppelmutante mit mutierten DVKD- und QEHD-Motiven (pC-NP(NVKN+QEHN)) sowie eine Vierfachmutante (pC-NP(NSIN+LASN+NVKN+QEHN)), bei welcher alle vier potentiellen Spaltmotive ausgeschaltet wurden, generiert und analysiert (Abb. 4.6).

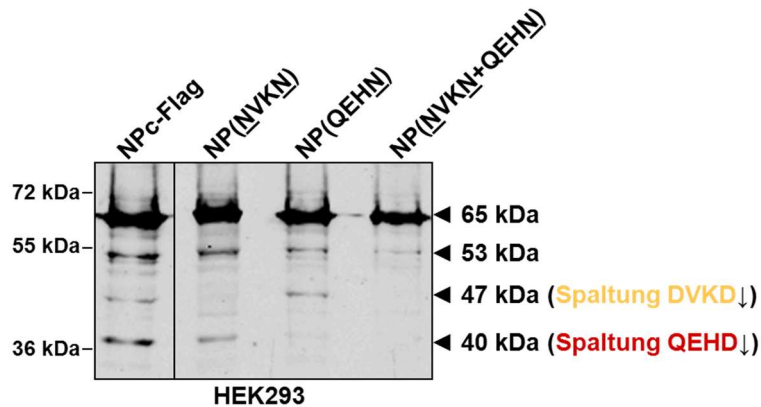
Die Mutation der Motive DVKD und QEHD in Kombination (NP(NVKN/QEHN)) verhinderte die Bildung der beiden entsprechenden 47 kDa und 40 kDa Spaltprodukte. Die Vierfachmutante (NP(NSIN/LASN/NVKN/QEHN)) zeigte den gleichen Phänotyp wie die Doppelmutante, was verdeutlicht, dass das Fehlen der DVKD und QEHD Motive keinen Einfluss auf die DSID und LASD Motive hatte (Abb. 4.7).



**Abb. 4.9: Mutationsanalyse der potentiellen Caspase-Spaltstellen in JUNV NP.**

VeroE6-Zellen wurden mit den eukaryotischen Expressionsplasmiden für JUNV NP (pC-JUNV NPc-Flag) und die einzelnen Mutanten (pC-NP(NSIN), pC-NP(LASN), pC-NP(NVKN), pC-NP(QEHN), pC-NP(NVKN+QEHN), pC-NP(NSIN+LASN+NVKN+QEHN)) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellysate geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines Flag-spezifischen Antikörpers analysiert.

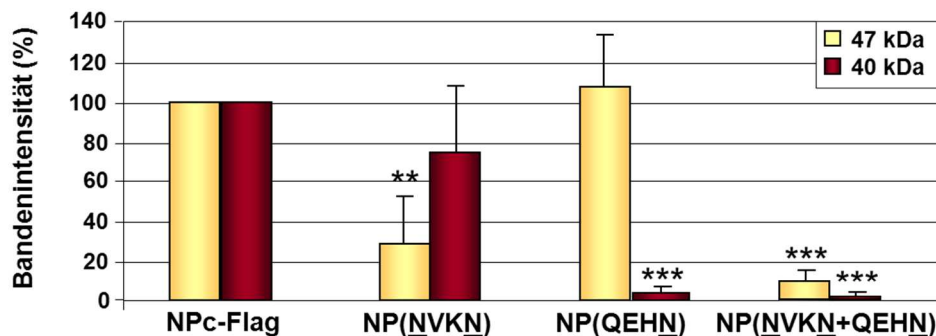
Analog zu der Mutationsanalyse in VeroE6-Zellen wurden zusätzlich HEK293-Zellen als weiteres Zellsystem verwendet. Die in VeroE6-Zellen beobachteten Veränderungen im Bandenmuster der einzelnen Mutanten konnten auch bei rekombinanter Expression in HEK293-Zellen beobachtet werden (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10: Mutationsanalyse der JUNV NP Mutanten in HEK293-Zellen.**

HEK293-Zellen wurden mit den eukaryotischen Expressionsplasmiden für JUNV NP (pC-JUNV NPC-Flag) und die Mutanten (pC-NP(NVKN), pC-NP(QEHN), pC-NP(NVKN+QEHN)) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zelllysate geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung eines Flag-spezifischen Antikörpers analysiert.

Insgesamt zeigt die Quantifizierung der einzelnen Spaltprodukte in Relation von Mutante zu Wildtyp, dass die Mutation des DVKD Motivs in einer 70%igen Reduktion der Bildung des 47 kDa Produkts resultierte, während die Mutation des QEHD Motivs zu einer 95%igen Abnahme der 40 kDa Bande führte (Abb. 4.11). Die Mutation beider Motive in Kombination resultierte in einer Reduktion von mehr als 90% (47 kDa) und 95% (40 kDa) der jeweiligen Spaltprodukte.



**Abb. 4.11: Quantifizierung der JUNV NP-Spaltprodukte.**

Die 47 kDa und 40 kDa großen NP-Spaltprodukte von Zelllysaten, transfiziert mit den Mutanten NP(NVKN), NP(QEHN) oder NP(NVKN/QEHN), wurden quantifiziert und als prozentualer Anteil der entsprechenden Banden der NP-Zelllysatfraktionen dargestellt. Der Graph repräsentiert Mittelwert und Standardabweichung der Daten von vier unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t* Test ermittelt. Die Sterne kennzeichnen die statistisch signifikanten Unterschiede (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) im Vergleich zu NP Zelllysatfraktionen.

Die Caspase-Spaltmotive DVKD und QEHD in JUNV NP konnten folglich als wichtige Spaltstellen für die Entstehung der beobachteten Spaltprodukte identifiziert werden. Sie sind verantwortlich für die Bildung der 47 kDa (DVKD↓) und 40 kDa (QEHD↓)

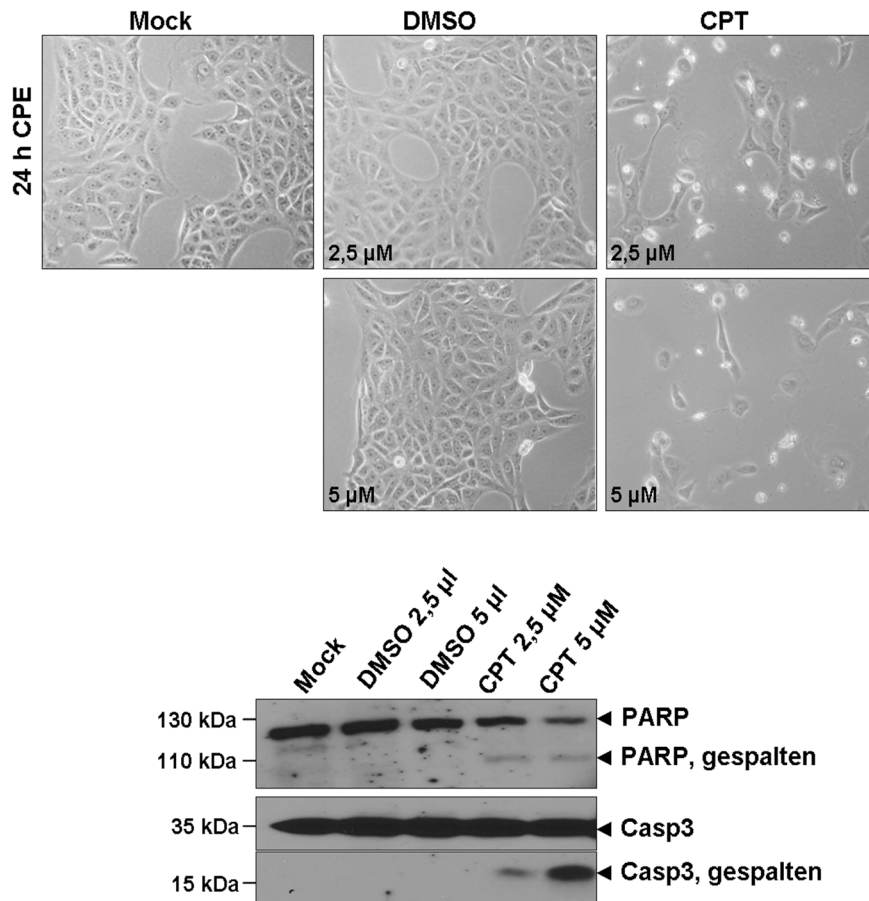
Spaltprodukte. Mit der Bildung des für JUNV NP beobachteten 53 kDa Spaltprodukts hingegen konnte keines der vier potentiellen Spaltmotive in Verbindung gebracht werden.

### **4.3 Einfluss der Aktivität von Caspasen auf die Spaltung von JUNV NP**

Mit den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die mittels GraBCas ermittelten Caspase-Spaltstellen DVKD und QEHD genutzt werden, um die JUNV NP Fragmente mit einer Größe von 47 kDa und 40 kDa zu generieren. Ausgehend von der Hypothese, dass diese Sequenzen durch Caspasen erkannt und gespalten werden, bzw. JUNV NP als Substrat von Caspasen dient, sollte der Einfluss der Caspase-Aktivität auf die Ausprägung der JUNV NP-Spaltung analysiert werden. Für die Beeinflussung der Caspase-Aktivität wurde zum einen Camptothecin als Apoptose-Aktivator, zum anderen Z-VAD-FMK als Caspase-Inhibitor verwendet.

#### **4.3.1 Der Apoptose-Aktivator Camptothecin**

Camptothecin (CPT) ist ein Apoptose-Aktivator, welcher die zelluläre Topoisomerase I hemmt (Pommier, 2006). Die Folge sind DNA-Schäden, die in der Zelle zur Induktion von Apoptose über den intrinsischen Signalweg führen, so dass es zur Aktivierung von Caspasen kommt. Getestet wurden CPT-Konzentrationen von 2,5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  in VeroE6-Zellen. CPT-behandelte Zellen sowie DMSO-behandelte Zellen (Kontrolle) wurden 24 h nach der Behandlung auf Apoptose-Merkmale wie Ausbildung eines zytopathischen Effekts (CPE) oder Caspase 3- und PARP-Spaltung untersucht. Die CPT-behandelten VeroE6-Zellen zeigten bereits 24 h nach der Behandlung in der mikroskopischen Analyse einen deutlichen CPE im Vergleich zu Mock oder DMSO-behandelten Zellen. Die Zellen wurden anschließend geerntet und im Western Blot mittels spezifischer Antikörper auf die Spaltung der Effektorcaspase 3 und deren Substrat PARP untersucht (Abb. 4.12). Die CPT-behandelten Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen auch im Western Blot deutliche Anzeichen von Apoptose. Die CPT-Konzentrationen von 2,5  $\mu\text{M}$  oder 5  $\mu\text{M}$  reichten aus, um innerhalb von 24 h die Spaltung von Caspase 3 und PARP zu induzieren, wobei die Apoptose-Induktion Dosis-bedingt bei 5  $\mu\text{M}$  CPT stärker als bei 2,5  $\mu\text{M}$  CPT ausfiel. Auf diesen Daten basierend wurden für die folgenden Versuche CPT-Konzentrationen von 2,5  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  verwendet.

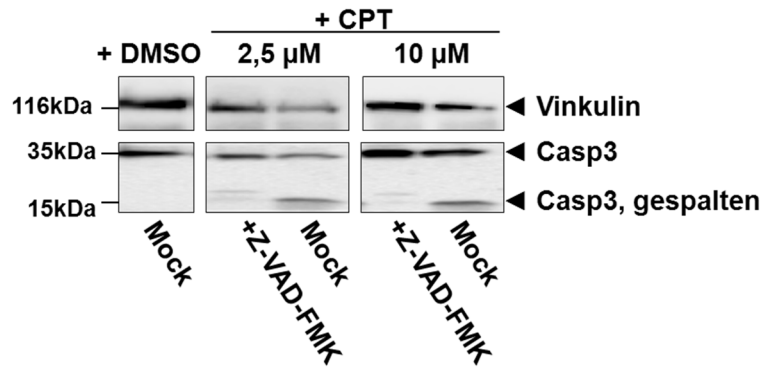


**Abb. 4.12: Apoptose-Induktion in VeroE6-Zellen durch Camptothecin-Behandlung.**

Für den Nachweis von Camptothecin- (CPT) induzierter Apoptose wurden VeroE6-Zellen mit CPT in den Konzentrationen 2,5 µM und 5 µM behandelt. Die Zellen wurden weiterhin zur Kontrolle mit der äquivalenten Menge DMSO behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen auf Apoptose-Merkmale wie CPE-Bildung oder Caspase 3- und PARP-Spaltung untersucht.

#### 4.3.2 Der Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK

Der verwendete Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK ist ein Inhibitor, der irreversibel an das katalytische Zentrum von Caspasen bindet und somit deren enzymatische Aktivität blockiert. Um zu gewährleisten, dass die Inhibitor-Konzentration von 50 µM ausreicht, um Caspasen und somit Apoptose zu hemmen, wurde der Inhibitor zunächst in apoptotischen VeroE6-Zellen getestet. Hierfür wurde mittels CPT (2,5 µM und 10 µM) Apoptose induziert und die Zellen zeitgleich mit dem Inhibitor behandelt. Die Zellen wurden 24 h nach der Behandlung geerntet und im Western Blot auf die Spaltung von Caspase 3 als Apoptose-Indikator untersucht (Abb. 4.13). Der Versuch zeigte, dass eine Konzentration des Inhibitors Z-VAD-FMK von 50 µM ausreicht, um die durch CPT stimulierte Caspase 3-Spaltung zu unterdrücken. Selbst nach der Apoptose-Induktion mit 10 µM CPT war in den Z-VAD-FMK-behandelten Zellen kein Caspase 3-Spaltprodukt im Western Blot nachweisbar.

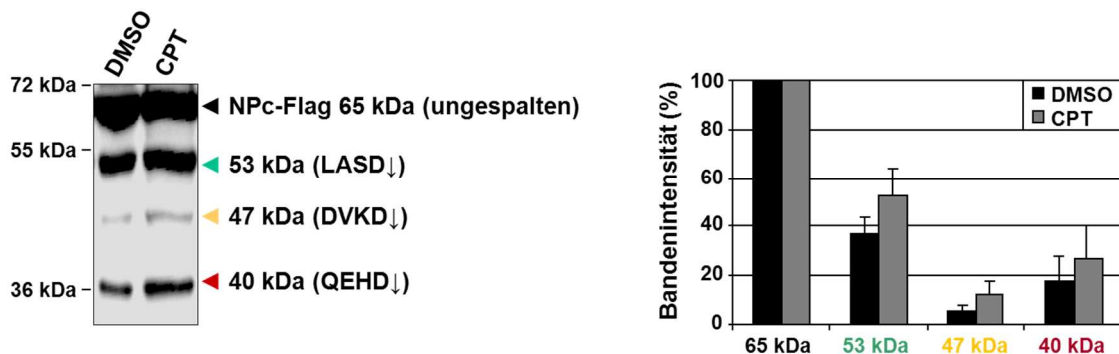


**Abb. 4.13: Caspase-Hemmung durch den Inhibitor Z-VAD-FMK.**

VeroE6-Zellen wurden mit CPT (2,5 µM und 10 µM) und zeitgleich mit dem Inhibitor Z-VAD-FMK (50 µM) behandelt. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und im Western Blot auf Caspase 3-Spaltung als Apoptose-Indikator untersucht. Die intrazellulären Vinkulinlevel dienten als Ladekontrolle.

#### 4.3.3 JUNV NP-Spaltung in Anwesenheit des Apoptose-Aktivators Camptothecin

Um den Einfluss der Caspase-Aktivität auf die Ausprägung der Spaltung von JUNV NP zu analysieren, wurden JUNV NPc-Flag exprimierende VeroE6-Zellen mit DMSO (Kontrolle) oder CPT (2,5 µM) behandelt.



**Abb. 4.14: JUNV NP-Spaltung in Anwesenheit des Caspase-Aktivators Camptothecin.**

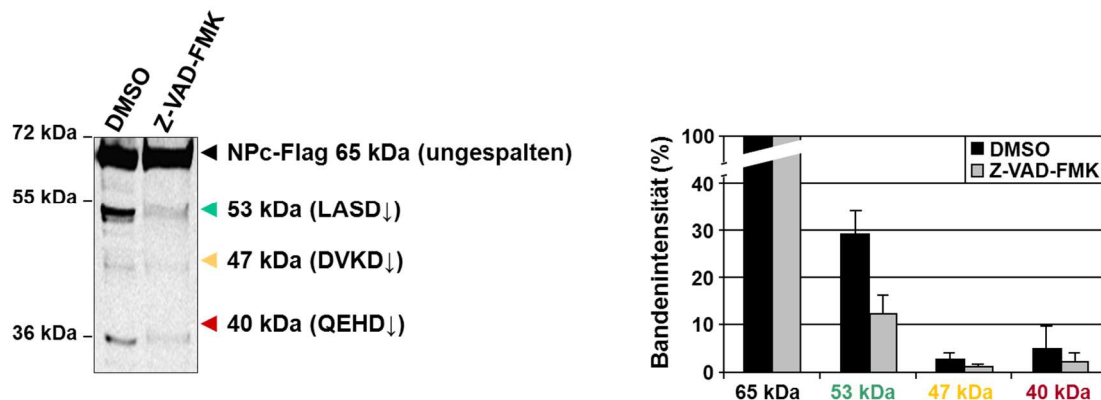
VeroE6-Zellen wurden mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid pC-JUNV NPc-Flag transfiziert und 24 bis 48 h später die Apoptose mittels CPT (2,5 µM) induziert. 24 h nach der CPT-Behandlung wurden die Zelllysate geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der Graph zeigt die Quantifizierung der einzelnen NP-Spaltprodukte nach Zugabe von CPT. Die 53 kDa, 47 kDa und 40 kDa NP-Banden wurden quantifiziert und in Relation zu ungespaltenem NP (65 kDa) gesetzt. Die Werte zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen resultierte die Behandlung mit dem Caspase-Aktivator CPT erwartungsgemäß in einer generell verminderten Proteinexpression der Zellen. Um dennoch unter diesen Bedingungen die Ausprägung der JUNV NP-Spaltung analysieren zu können, wurde die Menge der mittels SDS-

PAGE untersuchten Proben dem Expressionslevel von ungespaltenem JUNV NP angepasst. Die Quantifizierung der einzelnen NP-Spaltprodukte erfolgte dann in Abhängigkeit der Menge des ungespaltenen NP. Der Vergleich mit DMSO-behandelten Zellen zeigt, dass die CPT-Behandlung und die damit einhergehende Aktivierung von Caspasen zu einer verstärkten Spaltung von JUNV NP führten. Die Menge der 53 kDa, 47 kDa und 40 kDa Spaltprodukte stieg hierbei um jeweils etwa 40% bis 80% (Abb. 4.14).

#### 4.3.4 JUNV NP-Spaltung in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK

Anschließend wurden JUNV NPc-Flag exprimierende Zellen mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M) behandelt und analysiert. Auch hier zeigte sich im Vergleich zur Kontrollprobe (DMSO-behandelte Zellen), dass die Aktivität der Caspasen entscheidend für die Stärke der Spaltung von JUNV NP ist. Die Quantifizierung der einzelnen Spaltprodukte in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors zeigt die Reduktion der NP-Spaltung nach Caspase-Inhibition um jeweils etwa 50% (Abb. 4.15). Auch hier hatte die Aktivität der Caspasen einen Einfluss auf alle drei Spaltprodukte von JUNV NP.



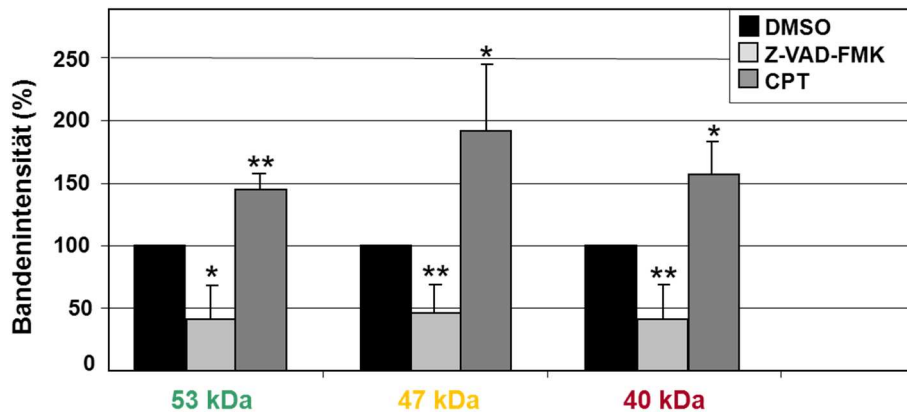
**Abb. 4.15: JUNV NP-Spaltung in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK.**

VeroE6-Zellen wurden mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid pC-JUNV NPc-Flag transfiziert und mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M) behandelt. 48 h später wurden die Zelllysate geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der Graph zeigt die Quantifizierung der einzelnen NP-Spaltprodukte nach Zugabe des Inhibitors Z-VAD-FMK. Die 53 kDa, 47 kDa und 40 kDa NP-Banden wurden quantifiziert und in Relation zu ungespaltenem NP (65 kDa) gesetzt. Die Werte zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Insgesamt zeigte sich, dass die Intensität der intrazellulären JUNV NP-Spaltung direkt von der Aktivität zellulärer Caspasen abhängt. Während eine gesteigerte Caspase-Aktivität mit einer verstärkten Spaltung von JUNV NP einherging, führte die Hemmung von Caspasen zu einer verringerten Bildung der einzelnen Spaltprodukte. Die

enzymatische Aktivität der Caspasen hatte hierbei einen Einfluss auf die 53 kDa, 47 kDa und 40 kDa Spaltprodukte von JUNV NP (Abb. 4.16).

Obwohl keine der vier potentiellen Spaltstellen mit der Entstehung des 53 kDa Fragments in Verbindung gebracht werden konnte (4.2.4), lassen die Daten vermuten, dass auch dieses NP-Fragment durch eine Spaltung durch Caspasen entsteht.



**Abb. 4.16: Bildung der JUNV NP-Spaltprodukte in Abhängigkeit der Caspase-Aktivität.**

Die 53 kDa, 47 kDa und 40 kDa NP-Banden von Lysaten DMSO-, CPT- (2,5  $\mu$ M) oder Z-VAD-FMK- (50  $\mu$ M) behandelter Zellen wurden zunächst in Abhängigkeit der Menge von ungespaltenem NP quantifiziert. Die Menge der einzelnen Spaltprodukte der Kontroll-Zelllysatzfraktionen (+DMSO) wurden dann auf 100% gesetzt und die entsprechenden Banden der behandelten Zellen als prozentualer Anteil dargestellt. Die Werte zeigen den Mittelwert drei unabhängiger Experimente. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t* Test ermittelt. Die Sterne kennzeichnen die statistisch signifikanten Unterschiede (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001) im Vergleich zu den Kontroll-Zelllysatzfraktionen.

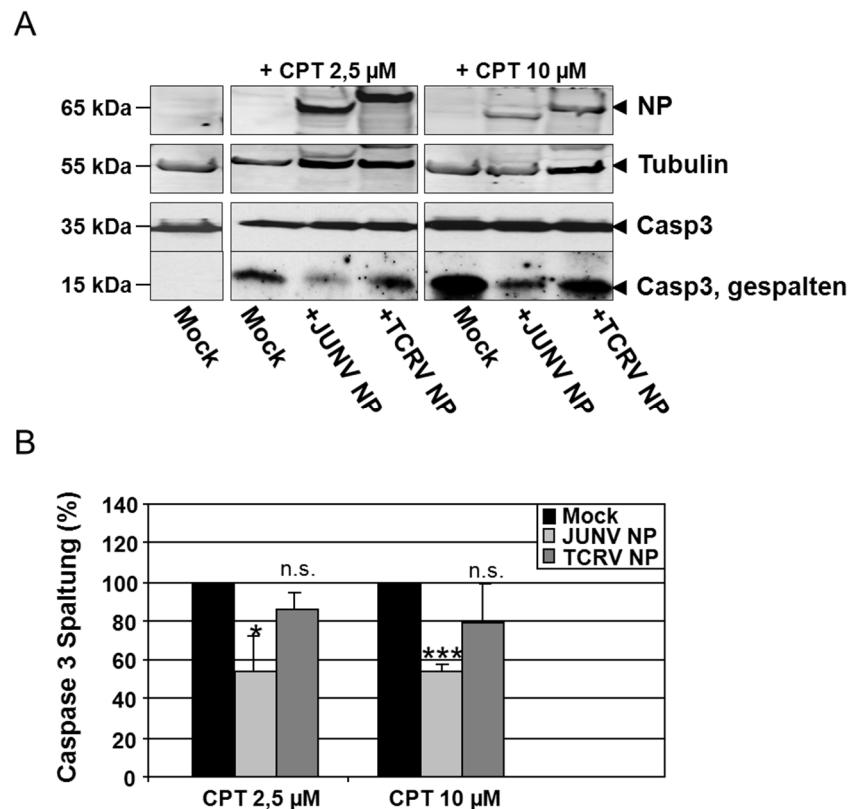
#### 4.4 JUNV NP, nicht aber TCRV NP, besitzt anti-apoptische Eigenschaften

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass JUNV NP als Substrat von Caspasen dient. Die Spaltung von JUNV NP durch Caspasen könnte dann apoptotische Prozesse innerhalb der Zelle beeinflussen, da die Spaltung des viralen Proteins bedingt, dass die Caspasen nicht mehr für die Spaltung und Aktivierung ihrer zellulären pro-apoptischen Substrate zu Verfügung stehen. Die Folge wäre eine Abschwächung der Apoptose in Anwesenheit von JUNV NP, die in den folgenden Versuchen überprüft werden sollte. Als Kontrolle wurde TCRV NP verwendet, welches kein entsprechendes Spaltungsmuster aufweist (4.1) und somit vermutlich kein Substrat für Caspasen darstellt bzw. entsprechend der aufgestellten Hypothese keinen Einfluss auf apoptotische Prozesse haben sollte.



#### 4.4.1 JUNV NP, nicht aber TCRV NP, verringert die Spaltung von Caspase 3 in apoptotischen VeroE6-Zellen

Um die aufgestellte Hypothese zu untersuchen, wurde die Spaltung von Caspase 3 als Apoptose-Indikator in apoptotischen VeroE6-Zellen in An- und Abwesenheit von JUNV NP bzw. TCRV NP analysiert. VeroE6-Zellen, untransfiziert (Mock) oder transfiziert mit pC-JUNV NP oder pC-TCRV NP, wurden 48 h p.t. mit CPT behandelt, um Apoptose zu induzieren. Nach weiteren 24 h wurden die Lysate geerntet und im Western Blot analysiert (Abb. 4.17).



**Abb. 4.17: Caspase 3-Spaltung in apoptotischen VeroE6-Zellen in Anwesenheit von JUNV NP oder TCRV NP.**

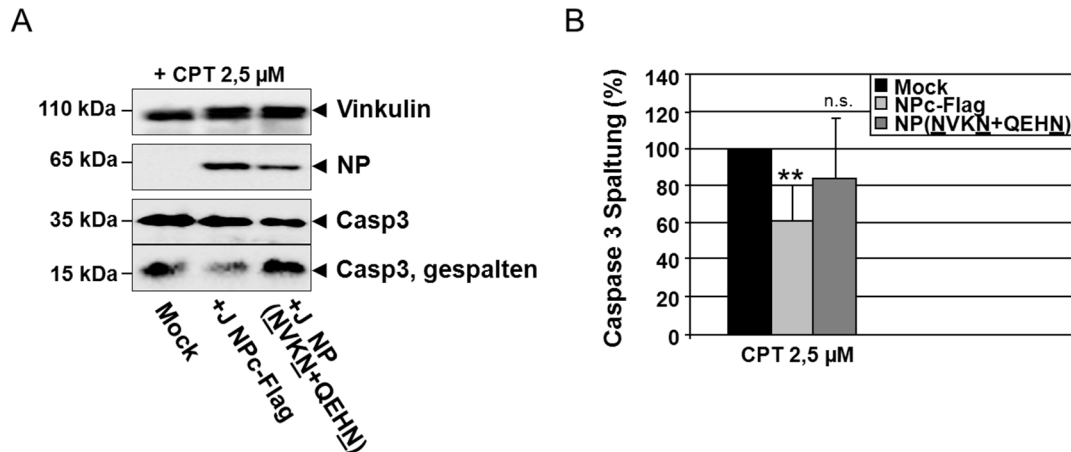
(A) VeroE6-Zellen, untransfiziert (Mock) oder transfiziert mit den eukaryotischen Expressionsplasmiden pC-JUNV NP oder pC-TCRV NP, wurden 48 h p.t. mit 2,5 µM oder 10 µM CPT behandelt, um Apoptose zu induzieren. Nach weiteren 24 h wurden die Zelllysate geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Proben wurden gegen NP sowie ungespaltene und gespaltene Caspase 3 (Casp3) gefärbt. Die intrazellulären Tubulinlevel dienten als Ladekontrolle. (B) Der Graph zeigt die Quantifizierung der Caspase 3-Spaltung. Quantifiziert wurde die Stärke der Caspase 3-Spaltung in An- bzw. Abwesenheit von JUNV NP nach Apoptose-Induktion. Als Kontrolle diente die parallele Analyse der Caspase 3-Spaltung in Anwesenheit von TCRV NP. Die dargestellten Werte zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t* Test ermittelt. Die Sterne kennzeichnen die statistisch signifikanten Unterschiede (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) im Vergleich zu den Kontroll-Zelllysatfraktionen. Nicht-signifikante Unterschiede wurden ebenfalls gekennzeichnet (n.s.).

Der Vergleich der Menge von ungespaltener und gespaltener Caspase 3 in Zellen, die JUNV NP exprimieren, mit den Kontrollzellen zeigte, dass die Anwesenheit von JUNV NP die Spaltung der Caspase 3 hemmt. Die Expression von TCRV NP hingegen hatte keinen Einfluss auf die Spaltung von Caspase 3 in den apoptotischen Zellen. Die Quantifizierung des Verhältnisses von ungespaltener und gespaltener Caspase 3 zeigt, dass in Anwesenheit von JUNV NP die Spaltung von Caspase 3 um etwa 55% verringert war, während die Anwesenheit von TCRV NP zu keinem signifikanten Unterschied führte (Abb. 4.17).

#### 4.4.2 Die NP-Spaltung ist wichtig für die anti-apoptotische Eigenschaft von JUNV NP

Um ferner zu untersuchen, ob die Spaltung von NP eine Rolle für die anti-apoptotische Funktion von JUNV NP spielt, wurde der Versuch entsprechend mit der Doppelmutante JUNV NP(NVKN+QEHN) durchgeführt, die nicht effizient gespalten wird.

Interessanterweise führte die Mutation der Caspase-Spaltmotive DVKD und QEHD in JUNV NP dazu, dass das Protein die Caspase 3-Spaltung in apoptotischen Zellen deutlich weniger effizient reduzieren konnte (Abb. 18).



**Abb. 4.18: Caspase 3-Spaltung in apoptotischen VeroE6-Zellen in Anwesenheit von JUNV NP oder JUNV NP(NVKN+QEHN).**

(A) VeroE6-Zellen, untransfiziert (Mock) oder transfiziert mit den eukaryotischen Expressionsplasmiden pC-JUNV NPc-Flag oder pC-JUNV NP(NVKN+QEHN), wurden 48 h p.t. mit 2,5 μM CPT behandelt um Apoptose zu induzieren. Die Proben wurden gegen NP und Caspase 3 (Casp3) und die entsprechenden Spaltprodukte gefärbt. Die intrazellulären Vinkulinlevel dienen als Ladekontrolle. (B) Der Graph zeigt die Quantifizierung der Caspase 3-Spaltung. Quantifiziert wurde die Stärke der Caspase 3-Spaltung in Anwesenheit von JUNV NP sowie der Spaltungs-defizienten Mutante NP(NVKN+QEHN). Die dargestellten Werte zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t* Test ermittelt. Die Sterne kennzeichnen die statistisch signifikanten Unterschiede (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) im Vergleich zu den Kontroll-Zellysfrac-tionen. Nicht-signifikante Unterschiede wurden ebenfalls gekennzeichnet (n.s.).

Der direkte Vergleich zwischen CPT-behandelten Zellen (2,5  $\mu$ M), die entweder JUNV NP oder NP(NVKN+QEHN) exprimierten, zeigt, dass das Fehlen der NP-Spaltung mit einer starken Reduktion des anti-apoptotischen Effekts von JUNV NP einhergeht. Während die Spaltung von Caspase 3 im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen durch die Anwesenheit von NP um etwa 50% reduziert war, zeigte sich in Anwesenheit der Spaltungs-defizienten Mutante NP(NVKN+QEHN) keine signifikante Reduktion.

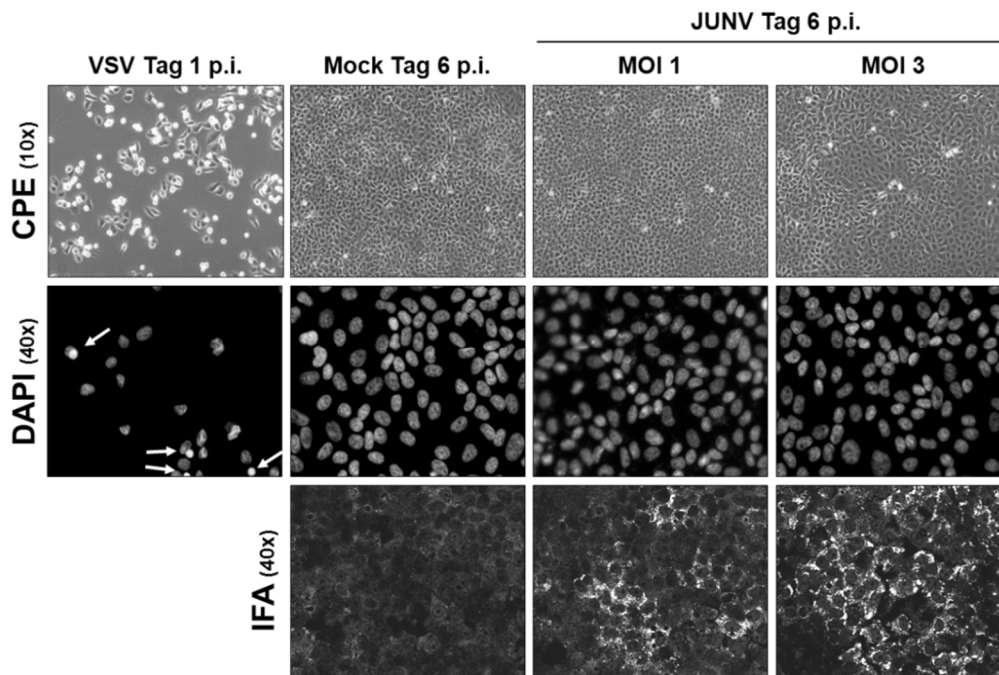
Insgesamt konnte gezeigt werden, dass rekombinant exprimiertes JUNV NP ein Substrat zellulärer Caspasen darstellt und anders als TCRV NP die Fähigkeit besitzt, die Spaltung von Caspase 3 in apoptotischen Zellen zu reduzieren. Diese anti-apoptotische Eigenschaft von JUNV NP hängt direkt mit der Spaltung von NP in die Produkte 47 kDa und 40 kDa zusammen.

#### **4.5 JUNV-Infektion induziert keine Apoptose in VeroE6-Zellen**

Da die Spaltung von JUNV NP eine anti-apoptotische Funktion in VeroE6-Zellen vermittelt, sollten die Auswirkungen dieser Aktivität im Kontext einer Infektion mit JUNV untersucht werden. JUNV-infizierte VeroE6-Zellen wurden hierfür auf Apoptose-Indikatoren wie CPE-Bildung, Chromatinkondensation sowie Spaltung von Caspase 3 und PARP analysiert.

##### **4.5.1 CPE-Bildung und Chromatinkondensation in JUNV-infizierten VeroE6-Zellen**

VeroE6-Zellen wurden mit JUNV mit einer MOI von 1 und, um eine 100%ige Infektionsrate zu gewährleisten, mit einer MOI von 3 infiziert. Die Infektion mit Vesikulärem Stomatitis Virus (VSV), die eine starke Apoptose-Antwort in der infizierten Zelle auslöst, wurde als Positivkontrolle verwendet (Gadaleta et al, 2002). Für den Nachweis von Apoptose in den infizierten Zellen wurde die CPE-Bildung täglich (Tag 1 bis 6 p.i.) dokumentiert (Abb. 4.19, obere Reihe; nicht alle Zeitpunkte gezeigt) und die Zellen im Anschluss für eine Western Blot Analyse der Caspase 3- und PARP-Spaltung geerntet (4.5.2). Parallel wurden auf Deckgläschen wachsende, infizierte Zellen fixiert und die Zellkerne mit 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt, um eine mögliche Chromatinkondensation, welche charakteristisch für späte Apoptose-Stadien ist, sichtbar zu machen (Abb. 4.19, mittlere Reihe; nicht alle Zeitpunkte gezeigt). Für den Nachweis der Virusinfektion wurden die Zellen zudem mit einem JUNV NP-spezifischen Antikörper gefärbt (Abb. 4.19, untere Reihe; nicht alle Zeitpunkte gezeigt).



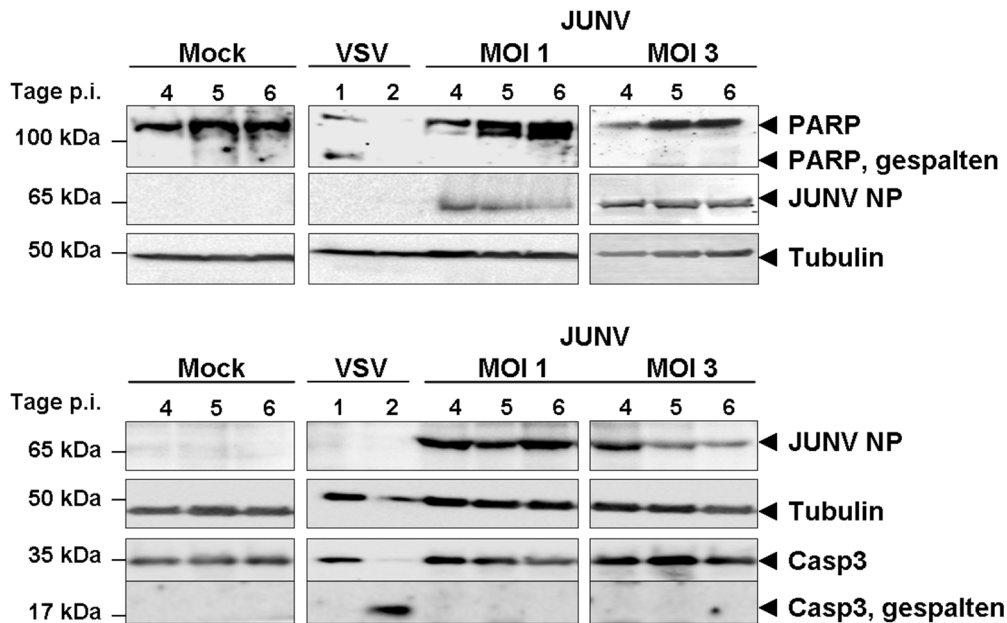
**Abb. 4.19: Mikroskopische Analyse auf CPE-Bildung und Chromatinkondensation in JUNV-infizierten VeroE6-Zellen.**

VeroE6-Zellen wurden mit JUNV (MOI 1 oder 3) oder mit VSV (MOI 0,01) als Positivkontrolle infiziert. Täglich wurde der CPE analysiert (hier gezeigt für VSV Tag 1 p.i. und für Mock und JUNV Tag 6 p.i.). Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mittels DAPI gefärbt, um eine mögliche Chromatinkondensation zu visualisieren (siehe weiße Pfeile). Für den Nachweis von viralem Antigen erfolgte zudem die Färbung der Zellen mit einem JUNV NP-spezifischen Antikörper.

Während die VSV-Infektion schon an Tag 1 p.i. einen starken CPE sowie eine deutliche Chromatinkondensation aufwies, konnten diese Apoptose-Merkmale zu keiner Zeit (Tag 1 bis 6 p.i.) während der JUNV-Infektion beobachtet werden. Selbst an Tag 6 p.i. waren JUNV-infizierte Zellen mit Mock Zellen vergleichbar und es zeigte sich weder ein Hinweis auf einen CPE noch auf Chromatinkondensation oder apoptotische Zellkerne.

#### 4.5.2 Kein Nachweis von Caspase 3- oder PARP-Spaltung in JUNV-infizierten VeroE6-Zellen

Die Mock-, VSV- oder JUNV-infizierten Zellen (4.5.1) wurden nach der Dokumentation des CPEs geerntet und im Western Blot auf Caspase 3- oder PARP-Spaltung untersucht. Die entsprechenden Zelllysate zeigten im Falle der VSV-Infektion bereits nach 1 bis 2 Tagen p.i. eine deutliche Caspase 3- sowie PARP-Spaltung (Abb. 4.20). Die JUNV-infizierten Zellen hingegen wiesen auch an Tag 6 p.i. keine Spaltung von Caspase 3 oder PARP und somit keinen Hinweis auf Apoptose auf.



**Abb. 4.20: Analysen von Caspase 3- und PARP-Spaltung in JUNV-infizierten VeroE6-Zellen.**

VeroE6-Zellen wurden mit JUNV (MOI 1 oder 3) oder mit VSV (MOI 0,01) als Positivkontrolle infiziert. Die Zellen wurden geerntet (hier gezeigt für VSV Tag 1-2 p.i. und für Mock und JUNV Tag 4-6 p.i.) und mittels SDS-PAGE und Western Blot auf Caspase 3- oder PARP-Spaltung untersucht. Die Proben wurden gegen JUNV NP sowie PARP und Caspase 3 und deren Spaltprodukte gefärbt. Die intrazellulären Tubulinlevel dienten als Ladekontrolle.

Insgesamt zeigen die unter 4.5 zusammengefassten Daten, dass die Infektion von VeroE6-Zellen mit JUNV, auch unter Verwendung hoher MOIs, bis einschließlich Tag 6 p.i. zu keiner nachweisbaren Induktion von Apoptose führt. In JUNV-infizierten Zellen konnten weder CPE, Chromatinkondensation noch Caspase 3- oder PARP-Spaltung detektiert werden.

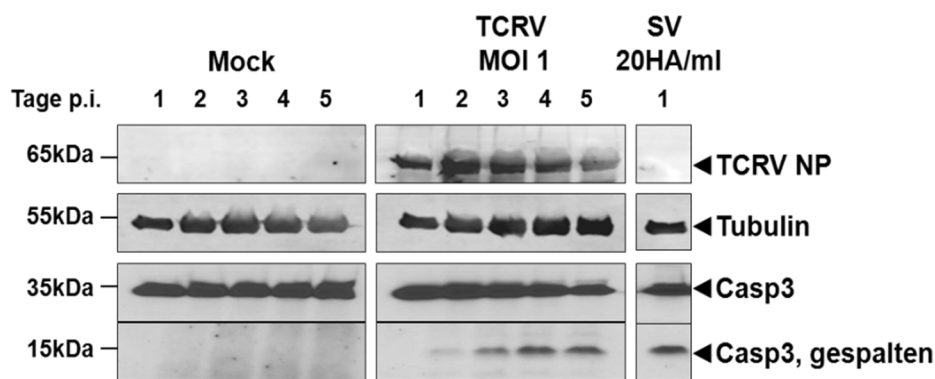
#### 4.6 TCRV-Infektion induziert Apoptose in VeroE6-Zellen

Anders als JUNV NP zeigte rekombinant exprimiertes TCRV NP weder eine charakteristische Spaltung in einzelne Fragmente (4.1.1) noch einen anti-apoptotischen Effekt in CPT-behandelten Zellen (4.4.1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Unterdrückung von Apoptose durch NP bei der TCRV-Infektion keine Rolle spielt. Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die TCRV-Infektion in Zellen Apoptose auslösen kann.

##### 4.6.1 TCRV-infizierte VeroE6-Zellen zeigen Caspase 3-Spaltung

Für den Nachweis von Apoptose-Indikatoren in TCRV-infizierten Zellen wurden zunächst VeroE6-Zellen (MOI 1) infiziert. Die Zelllysate wurden geerntet und mittels

SDS-PAGE und Western Blot auf Caspase 3-Spaltung untersucht. Die Infektion mit Sendai Virus (SV, 20HA/ml), die eine starke Apoptose-Antwort in der infizierten Zelle auslöst, diente als Positivkontrolle (Bitzer et al, 1999). Die als Infektionskontrolle dienende TCRV NP-Färbung zeigte bereits 24 h p.i. die Expression von NP. Interessanterweise konnte in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen eine deutliche Induktion von Apoptose beobachtet werden. Um neben dem Nachweis auch den zeitlichen Verlauf der TCRV-induzierten Apoptose zu charakterisieren, wurden die Zelllysate täglich bis einschließlich Tag 5 p.i. geerntet und analysiert. Die Spaltung von Caspase 3, die als Apoptose-Indikator gewählt wurde, war an Tag 2 p.i. schwach und ab Tag 3 p.i. deutlich detektierbar (Abb. 4.21).

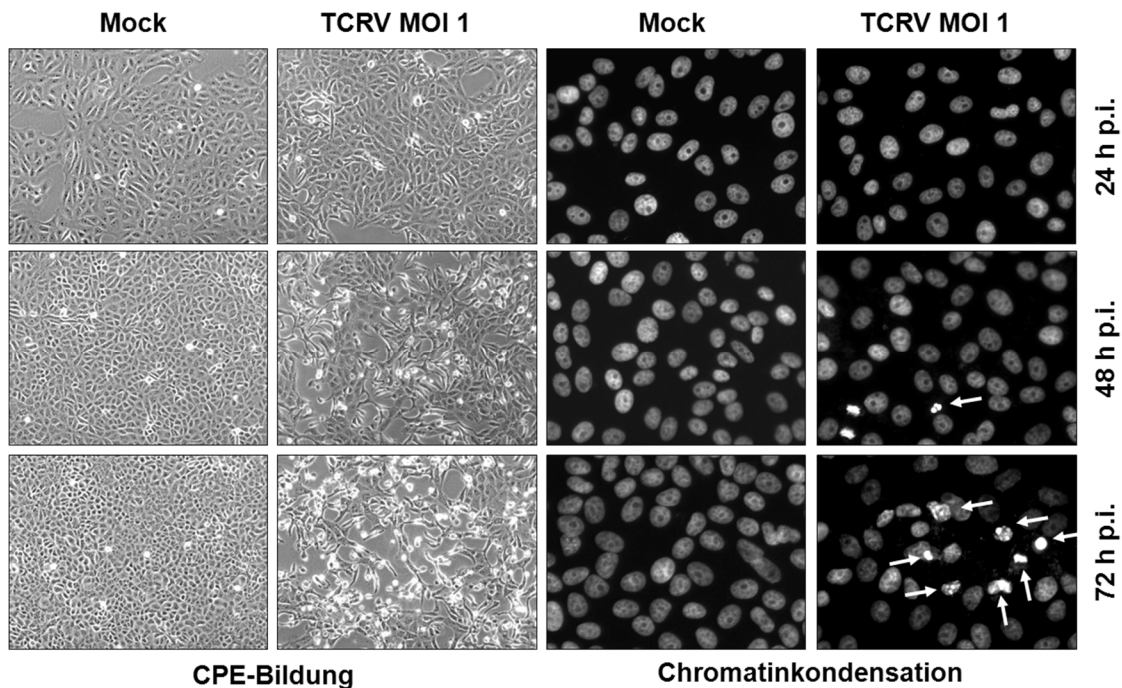


**Abb. 4.21: Caspase 3-Spaltung in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen.**

VeroE6-Zellen wurden mit TCRV (MOI 1) infiziert. Die Zellen wurden täglich bis einschließlich Tag 5 p.i. geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot auf Caspase 3-Spaltung untersucht. Die Infektion mit Sendai Virus (SV, 20HA/ml) diente als Positivkontrolle. Die Proben wurden mittels spezifischer Antikörper gegen TCRV NP sowie Caspase 3 gefärbt. Die intrazelluläre Menge an Tubulin diente zur Kontrolle.

#### 4.6.2 TCRV-infizierte VeroE6-Zellen zeigen Chromatinkondensation und CPE-Bildung

Anlehnend an die unter 4.6.1 beobachtete Apoptose-Induktion durch TCRV wurden VeroE6-Zellen mit TCRV (MOI 1) infiziert und 24 h, 48 h und 72 h p.i. auf CPE-Bildung untersucht (Abb. 4.22, linke Spalte). Parallel wurden auf Deckgläschen wachsende TCRV-infizierte Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt, um Chromatinkondensation und apoptotische Zellkerne (gekennzeichnet durch weiße Pfeile) zu detektieren (Abb. 4.22, rechte Spalte). Auch hier begann die Ausbildung der ersten Apoptose-Merkmale 48 h p.i. bzw. waren 72 h p.i. deutlich sichtbar.



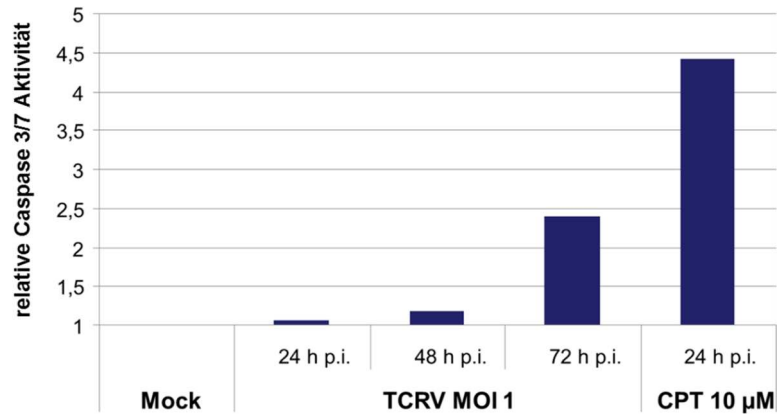
**Abb. 4.22: Mikroskopische Analyse auf CPE-Bildung und Chromatinkondensation in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen.**

VeroE6-Zellen wurden mit TCRV (MOI 1) infiziert und der CPE 24 h, 48 h, 72 h p.i. analysiert. Parallel wurden die Zellen fixiert und die Chromatinkondensation sowie die Bildung von apoptotischen Zellkernen mittels DAPI-Färbung untersucht.

#### 4.6.3 TCRV-infizierte VeroE6-Zellen zeigen eine Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7

Um die erzielten Ergebnisse zu verifizieren, wurde mit einer weiteren Methode die für Apoptose charakteristische Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 gemessen. Hierfür wurden VeroE6-Zellen mit TCRV (MOI 1) infiziert und 24 h, 48 h und 72 h p.i. mittels Caspase-Glo 3/7 Assay die Caspase-Aktivität bestimmt. Die Zellen der Positivkontrolle wurden 24 h mit CPT (10  $\mu$ M) behandelt. Die TCRV-infizierten Zellen zeigten eine Caspase 3 und 7 Aktivierung, wobei die relative Aktivität der Effektorcaspasen an Tag 3 p.i. im Vergleich zu den Kontrollzellen (Mock) um den Faktor 2,4 erhöht war (Abb. 4.23).

Insgesamt zeigen die Daten, dass die Infektion von VeroE6-Zellen mit TCRV (MOI 1) zur Induktion von Apoptose führt. In den infizierten Zellen konnten Apoptose-Indikatoren wie Caspase 3-Spaltung, CPE-Bildung, Chromatinkondensation und apoptotische Zellkerne sowie die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 beobachtet werden. Der zeitliche Verlauf zeigte zudem, dass der apoptotische Phänotyp der TCRV-infizierten Zellen etwa 48 h p.i. begann, bzw. ab 72 h p.i. deutlich ausgeprägt war.



**Abb. 4.23: Caspase 3/7-Aktivität in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen.**

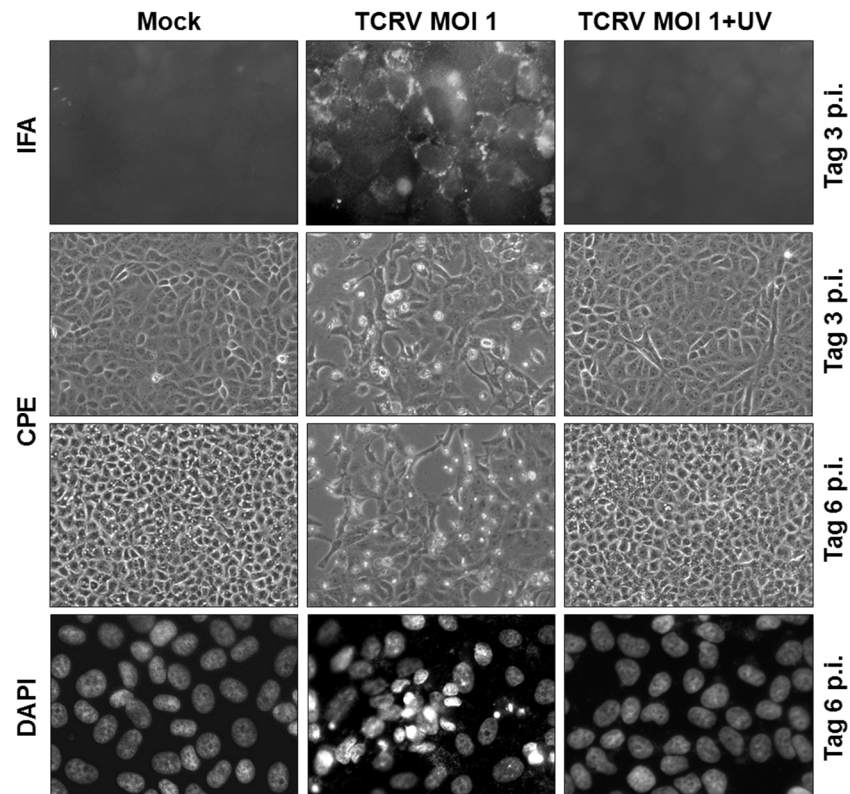
VeroE6-Zellen wurden mit TCRV (MOI 1) infiziert. Die Zellen wurden 24 h, 48 h, 72 h p.i. geerntet und mittels Caspase-Glo 3/7 Assay auf die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 untersucht. Der Graph zeigt die x-fache Steigerung der Caspase 3/7-Aktivität in TCRV-infizierten Zellen an entsprechenden Zeitpunkten im Vergleich zu der Aktivität in Kontrollzellen (Mock), welche gleich 1 gesetzt wurde. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen 24 h mit CPT (10 µM) behandelt.

## 4.7 Virale Replikation als Auslöser TCRV-induzierter Apoptose

### 4.7.1 UV-inaktiviertes TCRV induziert keine CPE-Bildung oder Chromatinkondensation

Um zu differenzieren, ob TCRV-induzierte Apoptose in VeroE6-Zellen durch Rezeptorbindung (extrinsischer Signalweg) oder virale Replikation/Transkription (intrinsischer Signalweg) vermittelt wird, wurden zusätzlich Infektionen mit inaktivierten TCRV-Partikeln durchgeführt. Die Inaktivierung des Virus erfolgte hierbei zunächst durch eine einstündige UV-Bestrahlung (254 nm), deren Protokoll bereits etabliert war (Groseth et al, 2010a). UV-inaktiviertes Virus ist in der Lage, an die Rezeptoren der Zelle zu binden, jedoch können die für die Virusvermehrung entscheidenden Vorgänge der Replikation und Transkription nicht mehr ablaufen. Für die Infektion wurden VeroE6-Zellen mit TCRV (MOI 1) und parallel mit der gleichen Partikelmenge von UV-inaktiviertem TCRV infiziert (wie unter 4.6.1 beschrieben) und anschließend auf die Bildung von CPE und Chromatinkondensation untersucht. Während die TCRV-Infektion von VeroE6-Zellen ab Tag 3 p.i. eine deutliche CPE-Bildung sowie Chromatinkondensation und apoptotische Zellkerne zeigte, wurde keines dieser Apoptose-Merkmale durch UV-inaktiviertes TCRV induziert und die Zellen wiesen selbst an Tag 6 p.i. keinen Unterschied zu den Mock Zellen auf (Abb. 4.24).



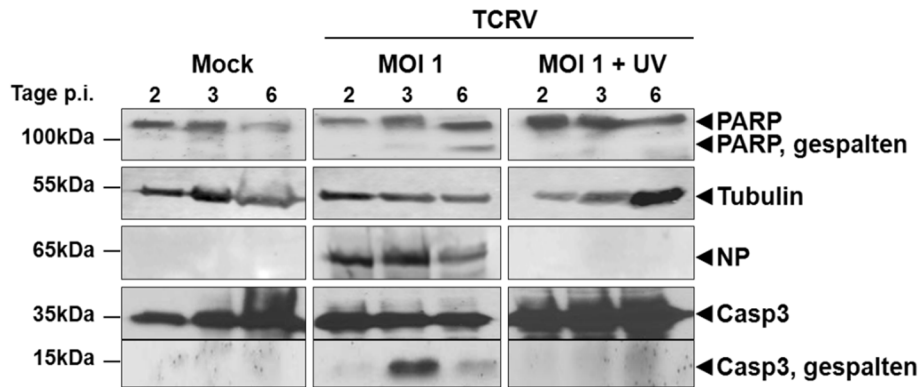


**Abb. 4.24: Mikroskopische Analyse von VeroE6-Zellen auf CPE-Bildung und Chromatinkondensation nach Zugabe von TCRV und UV-inaktiviertem TCRV.**

VeroE6-Zellen wurden mit TCRV (MOI 1) oder mit der gleichen Partikelanzahl von UV-inaktiviertem TCRV inkubiert. Für den Nachweis von Apoptose wurde die CPE-Bildung täglich analysiert (hier gezeigt für Tag 3 und 6 p.i.). Ferner wurden die Zellen fixiert und mit DAPI gefärbt, um apoptotische Zellkerne und Chromatinkondensation zu detektieren (hier gezeigt für Tag 6 p.i.). Für den Infektionsnachweis erfolgte zudem die Färbung der Zellen mit einem TCRV NP-spezifischen Antikörper.

#### 4.7.2 UV-Inaktivierung von TCRV verhindert Caspase 3- und PARP-Spaltung in infizierten VeroE6-Zellen

TCRV-infizierte VeroE6-Zellen (MOI 1) wurden an Tag 2, 3 und 6 p.i. geerntet und im Western Blot mittels spezifischer Antikörper auf die Apoptose-Indikatoren Caspase 3- und PARP-Spaltung untersucht. Die TCRV-Infektion führte an Tag 3 p.i. zu einer deutlichen Spaltung von Caspase 3, zudem konnte auch eine PARP-Spaltung detektiert werden. Die Infektion mit UV-inaktiviertem TCRV induzierte hingegen keine Spaltung von Caspase 3 oder PARP und wies somit keinen Hinweis auf Apoptose auf (Abb. 4.25).

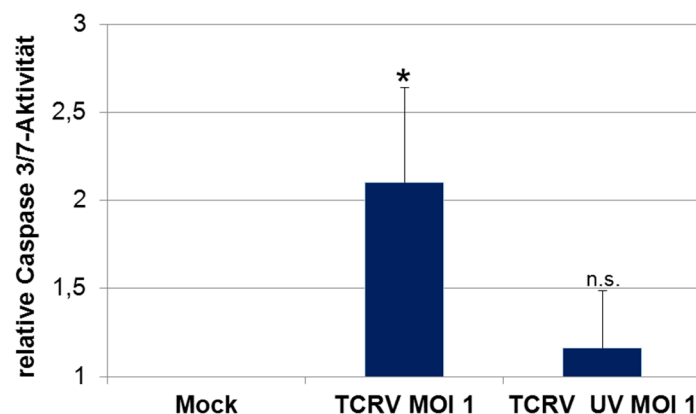


**Abb. 4.25: Analyse von Caspase 3- und PARP-Spaltung in VeroE6-Zellen nach Zugabe von TCRV und UV-inaktiviertem TCRV.**

VeroE6-Zellen wurden mit TCRV (aktiv, MOI 1 und UV-inaktiviert) inkubiert. Die Zellen wurden an den gezeigten Zeitpunkten geerntet und mittels SDS-PAGE und Western Blot auf Caspase 3- und PARP-Spaltung als Apoptose-Indikatoren untersucht. Für den Infektionsnachweis erfolgte zudem die Färbung von TCRV NP, während die intrazellulären Tubulinlevel als Ladekontrolle dienen.

#### 4.7.3 Infektion mit UV-inaktiviertem TCRV führt in VeroE6-Zellen zu keiner signifikanten Aktivitätssteigerung der Effektorcaspasen 3 und 7

Basierend auf den Beobachtungen, dass inaktiviertes TCRV keine Apoptose in VeroE6-Zellen auslöst, sollte mit einer weiteren Methode zusätzlich die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen analog zu 4.7.2 infiziert und an Tag 3 p. i. mittels des Caspase-Glo 3/7 Assays untersucht (Abb. 4.26).



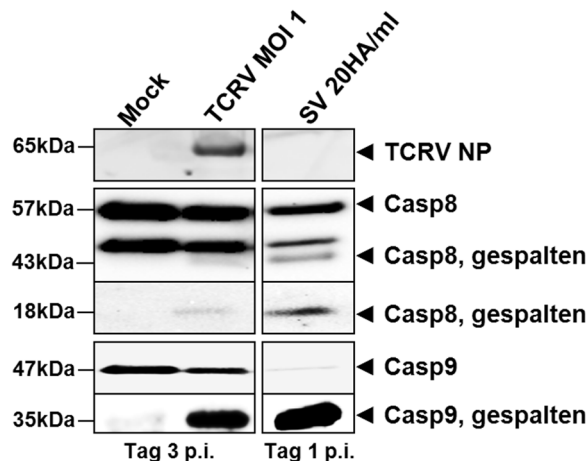
**Abb. 4.26: UV-Inaktivierung von TCRV verhindert die Aktivierung von Effektorcaspasen in VeroE6-Zellen.** VeroE6-Zellen wurden mit TCRV (aktiv, MOI 1 und UV-inaktiviert) inkubiert. Die Zellen wurden an Tag 3 p.i. geerntet und mittels Caspase-Glo 3/7 Assays wurde die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 untersucht. Der Graph zeigt die x-fache Steigerung der Caspase 3/7-Aktivität in TCRV- (aktiv und UV-inaktiviert) infizierten Zellen im Vergleich zu den Werten in den Kontrollzellen (Mock), welche gleich 1 gesetzt wurden. Die dargestellten Werte zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t* Test ermittelt. Die Sterne kennzeichnen die statistisch signifikanten Unterschiede (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) im Vergleich zu den Mock Zellen. Nicht-signifikante Unterschiede wurden ebenfalls gekennzeichnet (n.s.).

Verglichen mit der Aktivität der Effektorcaspasen in Mock-infizierten Zellen, zeigte sich eine signifikante Aktivitätssteigerung durch die TCRV-Infektion. Die Infektion mit UV-inaktiviertem TCRV hingegen induzierte keine signifikante Aktivitätssteigerung (Abb. 4.26).

Insgesamt zeigten TCRV-infizierte Zellen deutliche Anzeichen von Apoptose. In infizierten VeroE6-Zellen konnten eine Spaltung von PARP und Caspase 3, eine Aktivitätssteigerung der Effektorcaspasen 3 und 7, die Bildung eines CPEs sowie Chromatinkondensation und apoptotische Zellkerne beobachtet werden. Interessanterweise wurde durch UV-inaktiviertes TCRV keines dieser Anzeichen ausgelöst, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die Induktion der Apoptose durch TCRV hauptsächlich intrinsisch über intrazelluläre Mechanismen wie virale Replikation und Transkription und weniger extrinsisch über die Rezeptorbindung erfolgt.

#### 4.8 TCRV-induzierte Apoptose aktiviert die Initiatorcaspasen 8 und 9

Vorangegangene Analysen zeigten bereits, dass der TCRV-induzierte Zelltod in Abhängigkeit von Caspasen vermittelt wird. Für eine genauere Charakterisierung der Aktivierungskaskade wurden TCRV-infizierte VeroE6-Zellen (MOI 1) an Tag 3 p.i. geerntet und mittels spezifischer Antikörper im Western Blot auf die Spaltung der Initiatorcaspasen 8 und 9 untersucht.



**Abb. 4.27: Caspase 8- und 9-Spaltung in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen.**

VeroE6-Zellen wurden mit TCRV (MOI 1) infiziert und die Zellen an Tag 3 p.i. geerntet. Die Infektion mit SV (20HA/ml) diente der Positivkontrolle. Mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden die Zelllysate auf Caspase 8- und 9-Spaltung untersucht. Für den Infektionsnachweis erfolgte zudem die Färbung von TCRV NP.

Die Infektion mit SV (20HA/ml) diente als Positivkontrolle und zeigte eine deutliche Spaltung beider Caspasen. Die TCRV-Proben wiesen ebenfalls Spaltprodukte der Initiatorcaspasen 8 und 9 auf. Die Spaltung der Caspase 9 war hierbei besonders

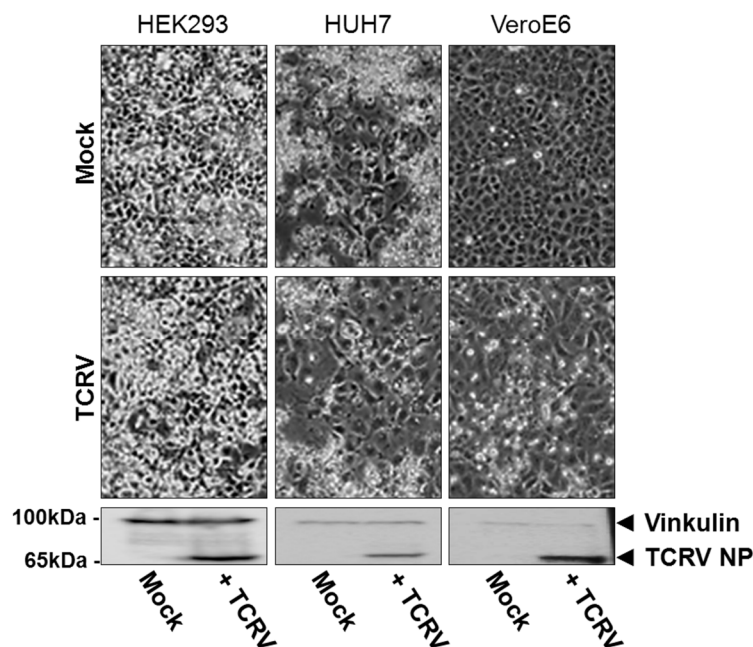
deutlich und unterstützt die in 4.7 erstellte These, dass TCRV-induzierte Apoptose hauptsächlich über den intrinsischen Signalweg vermittelt wird.

#### 4.9 TCRV-induzierte Apoptose ist Zelltyp-abhängig

Da die Induktion von Apoptose durch TCRV bisher nur in VeroE6-Zellen analysiert wurde, sollten zusätzliche Zelllinien untersucht werden. Die Verwendung weiterer Zelltypen war wichtig um auszuschließen, dass es sich bei der TCRV-induzierten Apoptose um ein Zelltyp-spezifisches Phänomen handelt, welches lediglich in VeroE6-Zellen beobachtet werden kann, zumal bekannt ist, dass diese Zelllinie eine defekte IFN-Produktion aufweist (Desmyter et al, 1968). Hierfür sollten die humanen Zelllinien HEK293 und HUH7 analysiert werden. Zunächst wurde die Infizierbarkeit der einzelnen Zelllinien durch TCRV getestet.

##### 4.9.1 TCRV-Infektion von verschiedenen Zelllinien

Die Zelllinien HEK293 und HUH7 wurden parallel zu VeroE6-Zellen mit TCRV (MOI 1) infiziert. Nach der Dokumentation des CPEs erfolgte der Infektionsnachweis mittels Expressionskontrolle von TCRV NP im Western Blot.



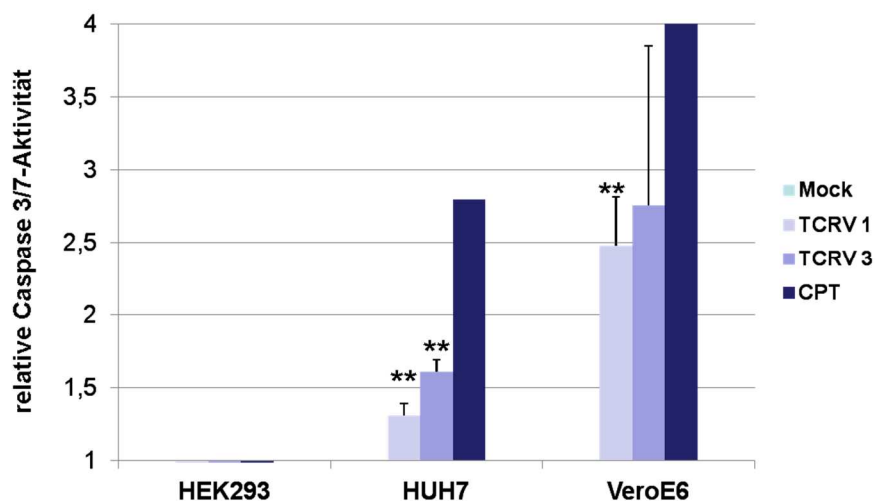
**Abb. 4.28: TCRV-Infektion von verschiedenen Zelllinien.**

Die verschiedenen Zellen wurden mit TCRV (MOI 1) infiziert. Der CPE wurde verglichen und die Zellen an Tag 5 p.i. geerntet. Die Infektion wurde mittels spezifischer Antikörper gegen TCRV NP im Western Blot nachgewiesen. Die intrazelluläre Menge an Vinkulin diente als Ladekontrolle.

Interessanterweise konnte die Infektion in allen Zelltypen nachgewiesen werden (Abb. 4.28). Es fiel jedoch auf, dass die CPE-Bildung in VeroE6-Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien (Tag 5 p.i.) besonders ausgeprägt war (Abb. 4.28).

#### 4.9.2 TCRV-induzierte Apoptose in verschiedenen Zelllinien

Da die unter 4.9.1 getesteten Zelllinien mit TCRV infiziert werden konnten, sollte die Apoptose-Induktion in diesen nach einer TCRV-Infektion analysiert werden. Hierfür wurden die Zellen infiziert (MOI 1 und 3) und an Tag 3 p.i. analysiert, da zu diesem Zeitpunkt die Apoptose in VeroE6-Zellen besonders deutlich detektiert wurde. Mittels Caspase-Glo 3/7 Assays wurde die Aktivität der Effektorcaspasen in den verschiedenen TCRV-infizierten Zellen bestimmt. Als Positivkontrolle dienten CPT-behandelte Zellen (5  $\mu$ M, 24 h). Zudem wurden parallel VeroE6-Zellen mitgeführt, in denen der Assay bereits erfolgreich durchgeführt wurde.



**Abb. 4.29: Caspase 3/7-Aktivierung in TCRV-infizierten Zellen.**

Die aufgeführten Zelllinien wurden mit TCRV (MOI 1 und 3) infiziert. Die Zellen wurden an Tag 3 p.i. geerntet und mittels Caspase-Glo 3/7 Assays auf die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 untersucht. Als Positivkontrolle dienten CPT-behandelte Zellen (5  $\mu$ M, 24 h). Der Graph zeigt die x-fache Steigerung der Caspase 3/7-Aktivität in TCRV-infizierten Zellen im Vergleich zu der Caspase-Aktivität in den Kontrollzellen (Mock, Werte gleich 1 gesetzt). Die Werte stellen den Mittelwert drei unabhängiger Experimente dar. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t* Test ermittelt. Die Sterne kennzeichnen die statistisch signifikanten Unterschiede (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001) im Vergleich zu den nicht-infizierten Mock-Zellen.

Zunächst fiel auf, dass in HEK293 Zellen selbst nach starker Stimulation durch CPT keine Caspase-Aktivierung detektierbar war und somit vermutlich keine Apoptose aktiviert wurde. In HUH7-Zellen hingegen induzierte die TCRV-Infektion (MOI 3) eine schwache Steigerung der Caspase-Aktivität um den Faktor 1,6. Somit scheint die Infektion mit TCRV nicht nur in VeroE6-Zellen apoptotische Vorgänge auszulösen,

auch wenn, wie bereits die CPE-Bildung zeigte, die TCRV-induzierte Apoptose in VeroE6-Zellen besonders stark ausgeprägt ist. Die Aktivität der Effektorcaspasen war in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen 3 Tage p.i um den Faktor 2,4 (MOI 1) bzw. um den Faktor 2,7 (MOI 3) erhöht (Abb. 4.29).

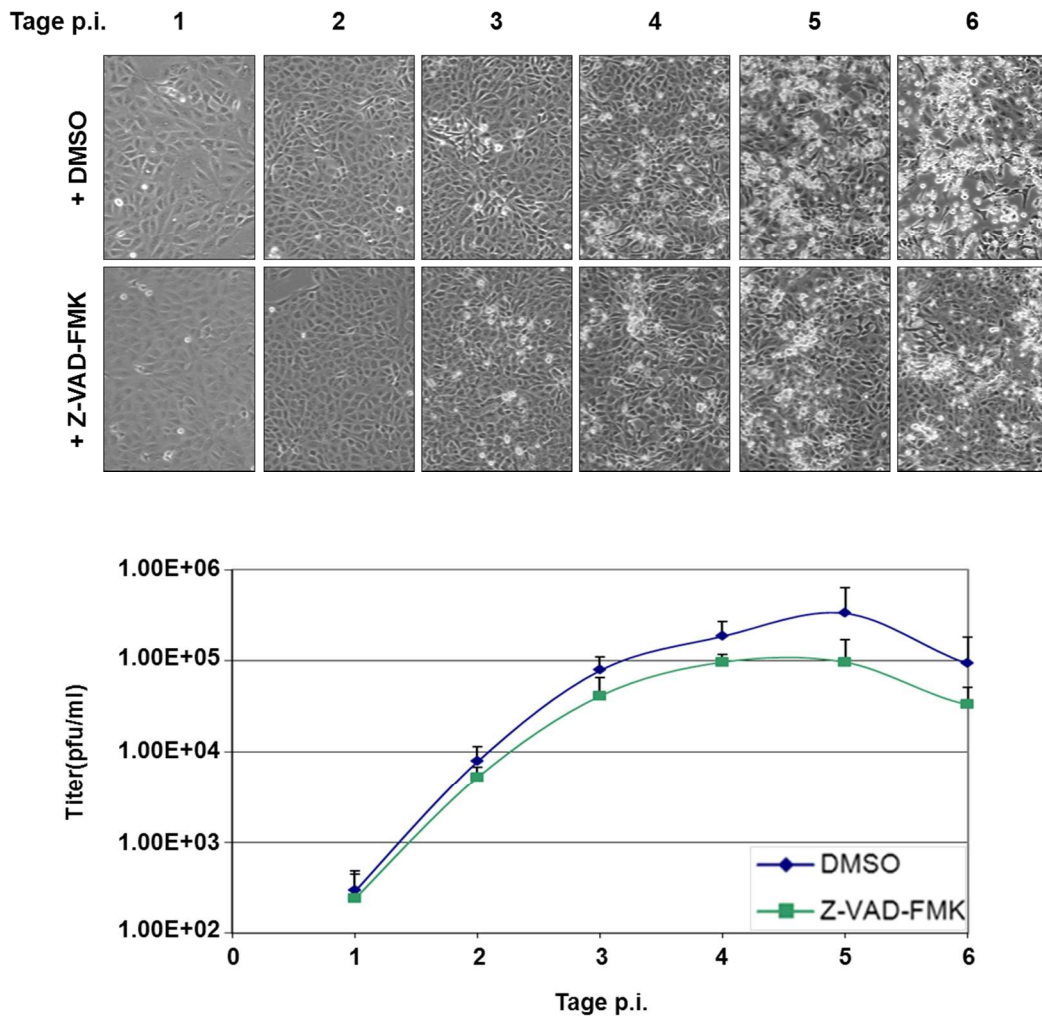
Die Infektion verschiedener Zelllinien zeigt, dass TCRV nicht nur in VeroE6-Zellen Apoptose induziert. Eine leichte Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 konnte auch in HUH7-Zellen beobachtet werden. Dennoch ist die Induktion von Apoptose durch TCRV in VeroE6-Zellen besonders stark ausgeprägt. TCRV-infizierte HEK293-Zellen hingegen zeigten keine Anzeichen für Apoptose.

#### **4.10 Einfluss der Caspase-Aktivität auf das Wachstum von TCRV**

Die in 4.1 bis 4.4 aufgeführten Daten zeigen, dass TCRV NP, anders als JUNV NP, nicht durch zelluläre Caspasen gespalten wird und somit auch keine anti-apoptotische Funktion besitzt. Um nun genauer zu charakterisieren, ob TCRV durch das Fehlen dieser für JUNV NP beobachteten Eigenschaft benachteiligt ist, sollten Wachstumskinetiken von TCRV erstellt werden. Diese wurden in Anwesenheit eines Caspase-Inhibitors (Z-VAD-FMK) oder eines Caspase-Aktivators (CPT) durchgeführt, um den Einfluss der Caspase-Aktivität auf die virale Wachstumseffizienz zu analysieren.

##### **4.10.1 Die Inhibition von Caspasen hat keinen verstärkenden Effekt auf das Wachstum von TCRV**

Für die TCRV-Wachstumskinetik wurden VeroE6-Zellen mit TCRV in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M) infiziert (MOI 0,1). Die virushaltigen Überstände wurden täglich abgenommen, um eine Titer-Bestimmung mittels Plaque Test durchzuführen. Die Kontrollzellen wurden äquivalent mit DMSO behandelt. Die Dokumentation der CPE-Bildung zeigt, dass die Anwesenheit des Caspase-Inhibitors den TCRV-induzierten CPE abschwächt und dass dieser Effekt im Laufe des Versuchs zunahm bzw. an den Tagen 5 und 6 p.i. besonders deutlich war (Abb. 4.30, oberer Abschnitt). Interessanterweise zeigt die Titer-Bestimmung, dass die Anwesenheit des Caspase-Inhibitors keinen Wachstums-fördernden Effekt auf TCRV hatte, so dass sich vermuten lässt, dass sich die Caspase-Aktivität bzw. Apoptose nicht nachteilig auf das Viruswachstum auswirkt. Im Gegenteil bewirkte die Inhibition der Caspasen eine Reduktion des Virus-Titers um eine halbe log Stufe (Abb. 4.30, unterer Abschnitt, Tag 5 und 6 p.i.).



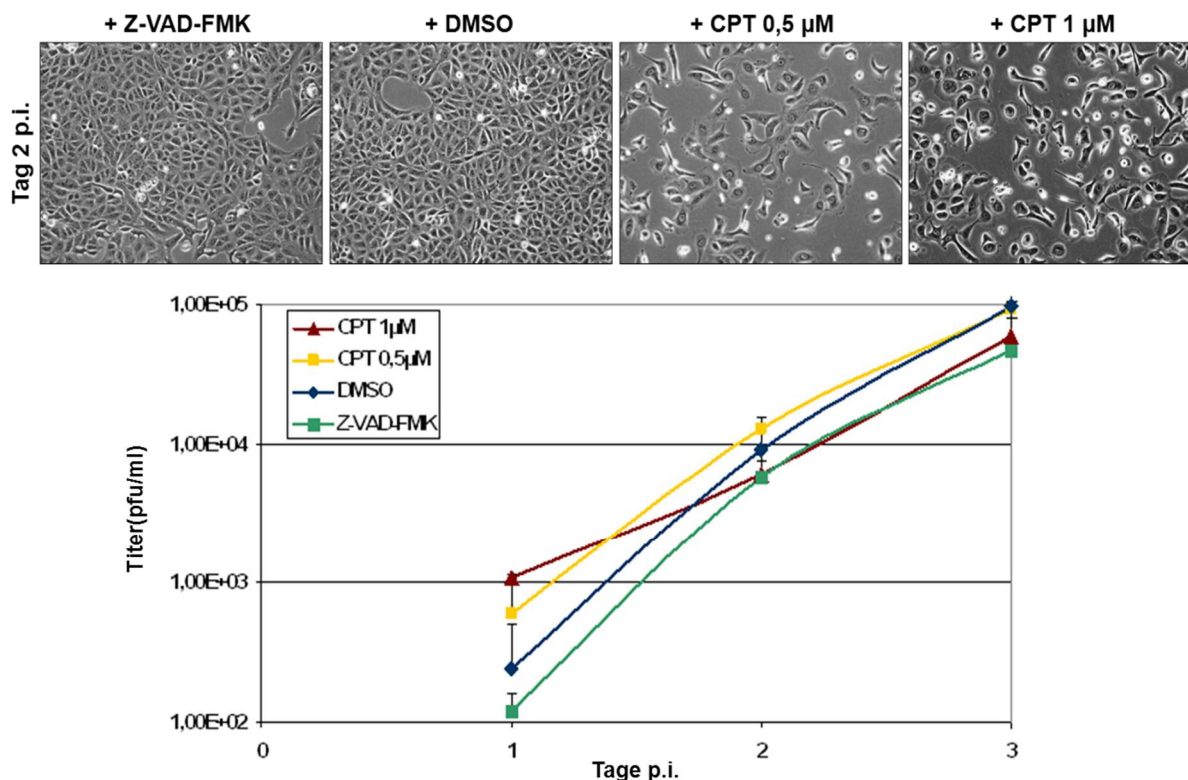
**Abb. 4.30: TCRV-Wachstum in infizierten VeroE6-Zellen nach Caspase-Inhibition.**

VeroE6-Zellen wurden mit TCRV (MOI 0,1) infiziert und mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (50  $\mu$ M) behandelt. Um die Stabilität des Inhibitors zu gewährleisten, wurden täglich nochmals 20  $\mu$ M hinzugefügt. Die Kontrollzellen wurden äquivalent mit DMSO behandelt. Täglich, über einen Zeitraum von 6 Tagen, wurde die CPE-Bildung dokumentiert (oberer Abschnitt) und der Überstand abgenommen, um eine Titer-Bestimmung mittels Plaque Test durchzuführen (Graph unterer Abschnitt). Die Werte zeigen den Mittelwert fünf unabhängiger Experimente.

#### 4.10.2 Die Aktivierung von Caspasen verstärkt das Wachstum von TCRV

Da die Hemmung der Caspase-Aktivität in TCRV-infizierten Zellen zu keiner verstärkten Virusproduktion führte, sollte analysiert werden, ob im Rückkehrschluss die Aktivierung von Caspasen zu höheren TCRV-Titern führt. Die Wachstumskinetik wurde analog zu Absatz 4.10.1 durchgeführt, wobei die Aktivierung der Caspasen durch eine einmalige Zugabe von CPT (0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) nach der Infektion erfolgte. Die Kontrollzellen wurden äquivalent mit DMSO behandelt, außerdem wurden die Zellen für den direkten Vergleich wie unter 4.10.1 beschrieben mit Z-VAD-FMK behandelt. Da die CPT-Behandlung für die Aktivierung der Caspasen trotz der besonders geringen Konzentrationen innerhalb von 48 h zum Tod der Zellen führte, konnten in diesem Versuch nur die Tage 1 und 2 p.i. analysiert werden. Die Dokumentation der CPE-

Bildung zeigt deutlich, dass bereits an Tag 2 p.i. die CPT-behandelten Zellen tot und folglich nicht mehr in der Lage waren, Virus zu produzieren (Abb. 4.31, oberer Abschnitt). Es ist somit fraglich ob die an Tag 2 erhaltenen Werte noch repräsentativ sind. Die mittels Plaque Test ermittelten Virus-Titer an Tag 1 p.i zeigen, dass die Aktivierung von Caspasen zu einer gesteigerten TCRV-Produktion führte, während die TCRV-Titer in den Z-VAD-FMK-behandelten Zellen erneut niedriger lagen (Abb. 4.31, unterer Abschnitt).



**Abb. 4.31: TCRV-Wachstum in infizierten VeroE6-Zellen nach Caspase-Aktivierung.**

VeroE6-Zellen wurden mit TCRV (MOI 0,1) infiziert und mit dem Caspase-Aktivator CPT (0,5 µM, 1 µM) behandelt. Die Kontrollzellen wurden äquivalent mit DMSO behandelt, bzw für den direkten Vergleich mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK. An den Tagen 1 bis 3 p.i. wurde die CPE-Bildung dokumentiert (oberer Abschnitt, gezeigt für Tag 2 p.i.) und der Überstand abgenommen, um eine Titer-Bestimmung mittels Plaque Test durchzuführen (Wachstumskurve). Die Werte zeigen den Mittelwert drei unabhängiger Experimente.

Anders als JUNV NP ist TCRV NP kein Substrat für Caspasen und bietet folglich keinen anti-apoptotischen Effekt. Wachstumskinetiken zeigen jedoch, dass dies keinen Nachteil für TCRV bedeutet. Interessanterweise scheint die Hemmung der Caspase-Aktivität in infizierten Zellen keinen fördernden, sondern im Gegenteil einen Wachstums-mindernden Effekt auf die TCRV-Produktion zu haben. Die Aktivierung von Caspasen hingegen führte zu einem Anstieg des Viruswachstums.

Die Wachstumskinetiken wurden in Kooperation mit B. Meyer, St. Andrews University Scotland, durchgeführt.



## 5 Diskussion

Arenaviren sind die bisher größte bekannte Familie hämorrhagische Fieberverursachender Viren. Sie sind vorwiegend in Afrika (Altwelt-Arenaviren) und Südamerika (Neuwelt-Arenaviren) endemisch und für mindestens sieben hämorrhagische Fieber verantwortlich. Die Neuwelt-Arenaviren Junín und Tacaribe sind phylogenetisch eng miteinander verwandt, unterscheiden sich jedoch signifikant in ihrer Pathogenität, so dass vergleichende Analysen zwischen beiden Spezies von besonderem Interesse sind. Das Nukleoprotein NP der Arenaviren ist die Hauptkomponente des Viruspartikels und besitzt je nach Virusspezies ein Molekulargewicht von etwa 60 bis 68 kDa (Strecker et al, 2003). Es umhüllt die virale RNA und spielt eine wichtige Rolle bei der viralen Replikation und Transkription (Albarino et al, 2009; Hass et al, 2004; Lee et al, 2000; Lee et al, 2002; Lopez et al, 2001). Zusätzlich fungiert NP als IFN-Antagonist und trägt entscheidend zur Umgehung bzw. Unterdrückung der Immunantwort in der infizierten Wirtszelle bei (Hastie et al, 2011; Martinez-Sobrido et al, 2007; Qi et al, 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine bisher unbekannt Funktion von NP für die Unterdrückung der Apoptose in der Wirtszelle identifiziert werden (Wolff et al, 2013a). Apoptose ist der programmierte Zelltod der Zelle und spielt in vielen Virus-Infektionen eine wichtige Rolle. Die apoptotischen Prozesse in der infizierten Wirtszelle können hierbei je nach Virus-Spezies anti- oder pro-virale Wirkungen haben. Dem entsprechend werden für verschiedene Viren unterschiedliche Strategien beobachtet, die Apoptose unterdrücken oder aber gezielt auslösen können (Hay & Kannourakis, 2002). Interessanterweise zeigte sich der in dieser Arbeit für JUNV beobachtete NP-vermittelte Mechanismus zur Unterdrückung der Apoptose nicht bei TCRV, welches im Gegensatz zu JUNV die Apoptose in der infizierten Zelle aktiviert.

Dieser Unterschied zwischen den phylogenetisch eng verwandten Virus-Spezies JUNV und TCRV macht erneut deutlich, dass Viren unterschiedliche Strategien nutzen, um intrazelluläre Vorgänge wie Apoptose zu beeinflussen und so die Bedingungen in der infizierten Wirtszelle für das Virus individuell zu optimieren.

### 5.1 JUNV NP vermittelt die Umgehung von Apoptose in JUNV-infizierten Zellen

Viele Viren unterschiedlicher Familien nutzen Strategien, um apoptotische Prozesse der antiviralen Abwehr in der Wirtszelle zu unterdrücken. Die Virus-vermittelte Inhibition von Apoptose führt hierbei zu einer Verlängerung der Lebensdauer der Zelle und garantiert die weitere Bereitstellung der zellulären Maschinerie, die von Viren für eine

effiziente Replikation genutzt wird (Best, 2008). Die entwickelten viralen Strategien zur Unterdrückung von Apoptose variieren stark, meistens stellen jedoch Caspasen das direkte Ziel der anti-apoptotischen Regulation dar. Dabei wird die Aktivierung der Caspasen und die darauffolgende Induktion apoptotischer Prozesse in der infizierten Zelle verhindert. Viren können Apoptose bzw. die Aktivität von Caspasen über verschiedene direkte oder indirekte Mechanismen beeinflussen. Das Verhindern oder Verzögern des Cytochrom c Ausstroms aus den Mitochondrien, beschrieben für Myxoma-Viren und das Epstein-Barr-Virus (Boya et al, 2004; Everett et al, 2000; Everett et al, 2002) oder das Blockieren der Fas-Rezeptor-vermittelten Signalkaskade auf der Zelloberfläche durch u.a. Adenoviren oder Humane Papillomaviren (Benedict et al, 2002; Filippova et al, 2004; Tollefson et al, 1998) stellen hierbei nur einige Beispiele für eine indirekte Hemmung dar. Die Inhibition von Caspasen kann jedoch auch direkt über eine Interaktion mit dem katalytischen Zentrum oder durch eine kompetitive Hemmung des Enzyms vermittelt werden (Filippova et al, 2007; Skaletskaya et al, 2001). Häufig sind einzelne virale Proteine für den anti-apoptotischen Effekt verantwortlich, beispielsweise das Bhf1 Protein des Epstein-Barr-Virus (Kawanishi et al, 2002), das NS2 Protein des Hepatitis C Virus (Erdtmann et al, 2003), das NSm Protein des Rift Valley Fieber Virus (Won et al, 2007) oder das X-Protein des Borna Virus (Poenisch et al, 2009).

Für Arenaviren war bislang nicht bekannt, ob in der infizierten Zelle eine Induktion und/oder Modulation von Apoptose stattfindet. Der in dieser Arbeit für JUNV NP, nicht jedoch für TCRV NP, beobachtete Apoptose-reduzierende Effekt zeigt zum ersten Mal die Inhibition von Apoptose durch Arenaviren, die im Falle von JUNV durch NP vermittelt ist. Die Vermutung, dass das Verhindern des Zelltods von entscheidender Bedeutung für den viralen Lebenszyklus von JUNV ist, steht im Einklang mit Studien, die belegen, dass während einer JUNV-Infektion eine positive Beeinflussung der Zellvitälität beobachtet werden kann. Zum einen wird die Bildung von Stresskörperchen in JUNV-infizierten Zellen, bedingt durch die GPC- und NP-vermittelte Hemmung der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung, unterdrückt (Linero et al, 2011), zum anderen aktiviert die JUNV-Infektion den PI3K/Proteinkinase B (Akt) Signalweg (Linero & Scolaro, 2009), der das Überleben der Zelle durch die Unterdrückung pro-apoptotischer Proteine fördert.

Zusätzlich zu der Identifikation einer anti-apoptotischen Eigenschaft von JUNV konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das virale Protein NP hierfür verantwortlich ist und seine Funktion in Abwesenheit anderer viraler Komponenten ausführen kann (4.4). Weitere Analysen ergaben, dass die Inhibition der Apoptose durch die Caspase-abhängige Spaltung von JUNV NP vermittelt wird.

## 5.2 Die Spaltung von JUNV NP durch Caspasen als anti-apoptotischer Mechanismus

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass JUNV NP ein Substrat zellulärer Caspasen darstellt und durch diese in der Zelle mehrfach gespalten wird. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass durch diesen Spaltungsprozess ein anti-apoptotischer Effekt vermittelt wird.

Ausgangspunkt der Studien war die Beobachtung, dass JUNV NP, jedoch nicht TCRV NP, im Western Blot ein charakteristisches Bandenmuster zeigt, das auf einen spezifischen proteolytischen Abbau hindeutete. Die charakteristischen JUNV NP-Fragmente waren in JUNV NP-transfizierten wie auch in JUNV-infizierten Zellen nachweisbar und wurden durch eine spezifische Spaltung des NP hervorgerufen (4.1). Ähnliche Arenavirus NP-Spaltprodukte wurden bereits in Pichindevirus- und LASV-infizierten Zellen nachgewiesen, ohne dass die Funktion der einzelnen NP-Fragmente genauer definiert werden konnte (Clegg & Lloyd, 1983; Harnish et al, 1981; Young et al, 1987). Die Tatsache, dass die Bildung solcher Spaltprodukte von NP auch bei anderen Arenaviren beobachtet wurde und somit die NP-Spaltung zwischen einigen Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren konserviert erscheint, lässt eine biologische Bedeutung vermuten. Interessant ist in diesem Zusammenhang die in dieser Arbeit vorgestellte Beobachtung, dass sich die eng miteinander verwandten Spezies JUNV und TCRV in diesem Spaltungsprozess von NP unterscheiden.

Die beobachteten JUNV NP-spezifischen Fragmente stellen C-terminale Bereiche des trunkierten Proteins dar und konnten in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden (4.1). Die Aktivierung von Caspasen durch CPT-Behandlung verstärkte die NP-Spaltung, während die Anwesenheit des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK zu einer reduzierten NP-Spaltung führte (4.3). Mittels Mutationsanalyse konnten zudem die Caspase-Spaltmotive DVKD und QEHD als wichtige Spaltstellen identifiziert werden, die für die Bildung der 47 kDa (DVKD↓) und 40 kDa (QEHD↓) Spaltprodukte verantwortlich sind (4.2). Mit der Entstehung des 53 kDa Fragments konnte keine der vier potentiellen Spaltstellen in Verbindung gebracht werden. Da die Aktivierung oder die Hemmung von Caspasen die Bildung des 53 kDa Spaltprodukts ebenfalls direkt beeinflussten, entsteht dieses NP-Fragment vermutlich ebenfalls durch eine Spaltung durch Caspasen, auch wenn das entsprechende Spaltmotiv hierfür noch nicht identifiziert werden konnte. Es muss beachtet werden, dass die in dieser Studie untersuchten Motive durch das Computerprogramm GraBCas vorhergesagte Tetrapeptidfolgen waren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit als Erkennungssequenz für Caspasen fungieren. Die Existenz weiterer Caspase-Spaltmotive in JUNV NP kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin ist es möglich, dass das 53 kDa

Fragment durch eine Protease entsteht, deren Aktivität durch die Induktion von Apoptose bzw. Caspase-Aktivität beeinflusst wird. Welcher Faktor während der JUNV-Infektion für die Aktivierung der Caspasen verantwortlich ist, muss noch geklärt werden. Studien zeigen, dass es während der JUNV-Infektion zu einer Aktivierung der IFN-Immunantwort über RIG-I sowie zur Hochregulierung pro- und anti-apoptotischer Faktoren kommt, die einen Einfluss auf die Caspase-Aktivität haben könnten (Huang et al, 2012; Kolokoltsova et al, 2012).

Eine Spaltung des Nukleoproteins durch zelluläre Caspasen wurde auch für Nukleoproteine weiterer Viren wie Coronaviren, humane Influenza-Viren, dem Krim-Kongo-Fieber-Virus (CCHFV) oder dem Transmissible-Gastroenteritis-Virus beobachtet, die alle Substrate für Caspasen darstellen (Diemer et al, 2008; Eleouet et al, 2000; Karlberg et al, 2010; Tripathi et al, 2013; Zhirnov et al, 1999).

Zusätzlich zu der Erkenntnis, dass JUNV NP ein Substrat für Caspasen darstellt und gespalten wird, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Anwesenheit von JUNV NP und dessen Spaltung in apoptotischen VeroE6-Zellen zu einer Abschwächung pro-apoptotischer Prozesse wie der Caspase 3-Spaltung führt. JUNV NP erfüllt somit eine anti-apoptotische Funktion in Abwesenheit anderer viraler Proteine (4.4). Der fehlende Apoptose-unterdrückende Effekt der Spaltungs-defizienten JUNV NP-Mutante oder des TCRV NP zeigt zudem, dass diese anti-apoptotische Funktion durch die Caspase-abhängige Spaltung von JUNV NP vermittelt wird.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Hypothese erstellt, dass JUNV NP als Substrat für aktivierte Caspasen dient und in Konkurrenz mit deren natürlichen Substraten tritt. Diese werden folglich weniger effizient gespalten, wodurch Apoptose und Zelltod JUNV-infizierter Zellen unterdrückt werden. Diese These wird durch die Beobachtung untermauert, dass in JUNV-infizierten Zellen keine Apoptose-Indikatoren wie CPE-Bildung, Chromatinkondensation, Caspase 3- oder PARP-Spaltung nachgewiesen werden konnten (4.5).

Dass die Spaltung viraler Proteine eine Strategie darstellen kann um Apoptose in infizierten Zellen zu unterdrücken, wird durch Studien zu Baculoviren oder dem White Spot Syndrom Virus gestützt (Bertin et al, 1996; Leu et al, 2010; Richard & Tulasne, 2012; Xu et al, 2001; Zoog et al, 2002). Hier konnte gezeigt werden, dass die Spaltung viraler Proteine durch Caspasen Spaltprodukte generiert, die kovalent an die Caspase gebunden bleiben und so deren Aktivität irreversibel hemmen (Fisher et al, 1999; Guy & Friesen, 2008; Xu et al, 2001). Ob die JUNV NP-Spaltprodukte einen ähnlichen Effekt haben und die Aktivität der Caspasen durch direkte Bindung hemmen können, muss noch genauer untersucht werden. Neueste Daten zu Bunyaviren konnten weiterhin zeigen, dass auch die Spaltung des Hantavirus NP durch Caspasen die

Apoptose inhibiert und vermutlich eine ähnliche Funktion wie JUNV NP erfüllt (Gupta et al, 2013).

### **5.3 Die JUNV NP Spaltung führt zur Produktion von spezifischen, potentiell funktionellen JUNV NP Spaltprodukten**

Da NP viele wichtige Prozesse innerhalb der infizierten Zelle reguliert (Hastie et al, 2011; Lee et al, 2000; Levingston Macleod et al, 2011; Lopez et al, 2001; Martinez-Sobrido et al, 2007; Qi et al, 2010) und in großer Anzahl in infizierten Zellen und viralen Partikeln vorkommt (Strecker et al, 2003) ist es denkbar, dass die durch die Caspase-Spaltung gebildeten NP-Produkte eine spezifische Funktion haben und eine Rolle für die virale Replikation, die Freisetzung und/oder die Pathogenese spielen könnten. In diesem Fall würde die Spaltung von JUNV NP nicht nur eine anti-apoptotische Funktion darstellen, sondern gezielt erfolgen, um trunkierte funktionelle NP-Untereinheiten zu produzieren, die eine eigene biologische Aktivität besäßen.

Für Arenaviren ist ein solcher Mechanismus jedoch noch nicht beschrieben worden. Für andere Viren konnte bereits beobachtet werden, dass die enzymatische Aktivität von Caspasen genutzt wird, um virale Proteine in funktionelle Produkte zu spalten bzw. proteolytisch zu aktivieren. Bei Parvoviren (Aleutian Mink Disease Virus) beispielsweise wird die Spaltung des Nichtstrukturproteins NS1 durch Caspasen für die NS1-Kernlokalisierung und die Regulation der viralen Replikation/Transkription benötigt (Best et al, 2003). Für Influenza Viren wurde zudem gezeigt, dass die Aktivierung von Caspase 3 während der Infektion und die daraus resultierende Spaltung des viralen NP essentiell für die Virusausbreitung und Pathogenität sind bzw. die Mutation der Caspase-Spaltstellen in NP zu einer starken Attenuierung der Viren führt (Wurzer et al, 2003; Zhirnov et al, 2008). Ferner ist für Bunyaviren beschrieben, dass es während der Infektion mit CCHFV zur Aktivierung von Caspasen und dadurch zur Spaltung des viralen NP kommt (Karlberg et al, 2010). Ob diese Spaltprodukte eine weitere Funktion erfüllen, ist jedoch noch unklar.

Interessanterweise zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die 47 kDa und 40 kDa Spaltprodukte von JUNV NP in virale Partikel eingebaut werden. Da die Interaktion mit dem Matrixprotein Z über den C-Terminus von NP vermittelt wird (Levingston Macleod et al, 2011; Ortiz-Riano et al, 2011), erscheint die Inkorporierung zunächst nicht überraschend, da der C-Terminus von NP bei den Spaltprodukten weiterhin vorhanden und intakt ist. Dennoch ist es denkbar, dass den mitgeführten trunkierten Fragmenten eine Funktion im Replikationszyklus von JUNV zukommt. Folglich müsste eine ausgewogene Balance zwischen Caspase-Aktivierung und Apoptose-Hemmung während einer JUNV-Infektion gewährleistet sein, um die NP-Spaltung durch

Caspasen und zeitgleich das Überleben der Zelle zu gewährleisten und so optimale Bedingungen für die Virusproduktion zu sichern.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diesen Sachverhalt zu klären.

#### **5.4 TCRV besitzt keine NP-vermittelte anti-apoptotische Funktion und induziert Apoptose in infizierten Zellen**

Interessanterweise fanden sich in der vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede zwischen JUNV und TCRV. Obwohl beide Viren phylogenetisch sehr eng miteinander verwandt sind, zeigte TCRV NP weder bei Einzelexpression noch in TCRV-infizierten Zellen die für JUNV NP charakteristischen Spaltprodukte. Das Fehlen einer spezifischen Spaltung weist darauf hin, dass TCRV NP kein funktionelles Substrat für Caspasen darstellt. In Anlehnung an die zuvor für JUNV aufgestellte Hypothese sollte TCRV NP somit keine anti-apoptotische Funktion in der infizierten Zelle vermitteln können. Tatsächlich zeigte sich, dass TCRV NP, anders als JUNV NP, nicht in der Lage ist, die Spaltung von Caspase 3 in apoptotischen VeroE6-Zellen zu reduzieren (4.4). Im Gegenteil zeigten TCRV-infizierte Zellen signifikante Anzeichen von Apoptose. Anders als für JUNV beobachtet, konnten in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen Apoptose-Indikatoren wie CPE-Bildung, Chromatinkondensation, Caspase 3- und PARP-Spaltung deutlich ab Tag 3 p.i. nachgewiesen werden (4.6). Auffallend ist, dass die Induktion von Apoptose durch TCRV in etwa mit dem Zeitpunkt der beginnenden Freisetzung von Nachkommenviren übereinstimmt; eine Beobachtung, die auch für VSV-Infektionen gemacht wurde (Hommel-Berrey et al, 1997; Koyama, 1995). Die in dieser Arbeit zur Kontrolle durchgeführten Infektionen mit VSV führten bei einer geringen MOI (MOI 0,01) bereits nach wenigen Stunden zum Tod der infizierten Zelle (4.5). Die Anzeichen TCRV-induzierter Apoptose hingegen zeigten sich erst zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt bzw. in einer fortgeschrittenen Phase der Infektion. Ob dieser Unterschied durch verschieden schnelle Replikation und Freisetzung der Viren oder unterschiedliche pro-apoptotische Faktoren bedingt ist, lässt sich jedoch nicht sagen. Apoptose-induzierende Viren der Familie *Bunyaviridae* wie Oropuche-, CCHF- oder Hantaviren weisen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Apoptose-Induktion wie TCRV auf (Acrani et al, 2009; Karlberg et al, 2010). Hier konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Apoptose nicht über die Bindung des Virus und den Viruseintritt in die Wirtszelle, sondern über die virale Replikation erfolgt (Acrani et al, 2009; Li et al, 2004; Rodrigues et al, 2013). Im Falle des Hantavirus Tula wurde sogar postuliert, dass die Aktivität zellulärer Endonukleasen, die für die DNA-Degradierung entscheidend sind, zunächst in frühen Infektionsstadien gehemmt wird, um einen vollständigen

Replikationszyklus des Virus zu gewährleisten, bevor es dann zur Apoptose-Induktion kommt (Li et al, 2004).

Die große Zeitspanne bis zur Apoptose-Induktion von TCRV lässt ebenfalls vermuten, dass die Rezeptorbindung des Virus auf der Zelloberfläche und der Viruseintritt nicht für die Induktion der Apoptose verantwortlich sind. Wahrscheinlicher ist die Aktivierung der Apoptose über in der Zelle ablaufende Prozesse wie die virale Replikation/Transkription und die darauf folgende Akkumulation viraler RNA und viraler Proteine im Zytoplasma. Unterstützt wird diese Vermutung durch Infektionen mit UV-inaktiviertem TCRV, welches nicht mehr zur Replikation fähig ist. Es zeigte sich, dass UV-inaktiviertes TCRV, anders als aktives TCRV, nicht mehr in der Lage war, Apoptose auszulösen (4.7). Versuche mit UV-inaktivierten Viren identifizierten auch für West Nil Virus, Newcastle Disease Virus, Oropuche Virus oder Enteroviren die virale Replikation als Apoptose-auslösenden Faktor (Acrani et al, 2009; Kleinschmidt et al, 2007; Ravindra et al, 2008; Shih et al, 2008).

Eine Induktion von Apoptose in Abwesenheit viraler Replikation durch Rezeptorbindung oder Eintritt des Virus in die Zelle, meist vermittelt durch ein virales Protein, wird ebenfalls beschrieben und konnte unter anderem für Reovirus Typ 3, Sindbis Virus oder Vaccinia Virus beobachtet werden (Jan & Griffin, 1999; Ramsey-Ewing & Moss, 1998; Tyler et al, 1995). Für Afrikanisches Schweinefieber Virus und aviäres Reovirus konnte ferner der Schritt des Entpackens (*viral uncoating*) als Apoptose-Auslöser bestimmt werden (Carrascosa et al, 2002; Labrada et al, 2002).

Weitere Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die TCRV-induzierte Apoptose Caspase-abhängig ist und durch die Aktivierung der Caspasen 3, 7, 8 und 9 vermittelt wird. Die Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 9 bedeutet, dass die TCRV-induzierte Apoptose über extrinsische (Caspase 8) sowie intrinsische (Caspase 9) Signalkaskaden vermittelt wird. Für viele Viren wie CCHFV, Simian Varicella Virus, Transmissiblen Gastroenteritis Virus oder humanem Astrovirus ist gezeigt, dass es in der infizierten Zelle durch Vernetzungen der Signalwege zur Aktivierung beider Caspasen kommen kann (Banos-Lara Mdel & Mendez, 2010; Eleouet et al, 1998; Kleinschmidt et al, 2007; Pugazhenti et al, 2009; Rodrigues et al, 2013). So führt auch die Infektion mit West Nil Virus, für welches ebenfalls die virale Replikation als Apoptose-auslösender Faktor identifiziert wurde, zu einer Aktivierung beider Apoptose-Signalwege (Kleinschmidt et al, 2007).

Häufig kommt es zudem während einer Virusinfektion zu einer PKR-Aktivierung, die ebenfalls den intrinsischen (Caspase 9) und den extrinsischen Signalweg (Caspase 8) parallel induziert. Die Caspase 8-Aktivierung ist hierbei TRADD- und FADD-vermittelt, läuft jedoch unabhängig der Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche ab (Balachandran

et al, 1998; Gil & Esteban, 2000b; Iordanov et al, 2005). Eine Virus-induzierte Caspase-unabhängige Apoptose hingegen wird selten beobachtet, konnte jedoch parallel zur Caspase-abhängigen Apoptose-Induktion bei Infektionen mit Rabies Viren und humanen Herpesviren Typ 6 nachgewiesen werden (Gu et al, 2011; Sarmiento et al, 2006). Ob TCRV-induzierte Apoptose zu einer Aktivierung der PKR führt und/oder zusätzlich durch Caspase-unabhängige Signalwege vermittelt wird, ist unklar. Generell muss der genaue Mechanismus der TCRV-induzierten Apoptose noch untersucht werden.

Obwohl die TCRV-induzierte Apoptose in VeroE6-Zellen besonders deutlich war, zeigten auch HUH7-Zellen eine Aktivierung der Effektorcaspasen nach Infektion mit TCRV. VeroE6-Zellen stellen ein besonders geeignetes System für Arenavirus-Infektionen dar, da sie effizientes Viruswachstum mit hohen Virustitern ermöglichen. Anders als HUH7-Zellen sind VeroE6-Zellen jedoch nicht in der Lage, IFN zu sezernieren (Desmyter et al, 1968). Ob die besonders deutliche Induktion von Apoptose durch die effiziente Virusreplikation in diesen Zellen bedingt ist oder mit dem gestörten IFN-System zusammenhängt, ist unklar. Insgesamt belegen die Versuche, dass es sich bei der TCRV-induzierten Apoptose nicht um ein Zelltyp-spezifisches Phänomen für VeroE6-Zellen handelt und diese unabhängig von einem funktionellen IFN-System in der Zelle ausgelöst wird.

### **5.5 TCRV-induzierte Apoptose beeinflusst das Viruswachstum positiv**

Interessanterweise haben die Caspase-Aktivität und der programmierte Tod der infizierten Zelle keinen negativen Einfluss auf das Wachstum von TCRV. Die Fähigkeit des JUNV, in der infizierten Zelle Apoptose zu unterdrücken, hat mit großer Wahrscheinlichkeit entscheidende Vorteile für eine effiziente Virusvermehrung. Folglich ist es erstaunlich, dass TCRV ohne diese anti-apoptotische Eigenschaft nicht benachteiligt ist und keine schlechtere Virusausbreitung zeigt. Bereits veröffentlichte Daten zeigen, dass trotz der in dieser Arbeit entdeckten Unterschiede in der Virus-Wirtszell-Interaktion, JUNV und TCRV eine ähnliche Wachstumskinetik mit vergleichbar hohen Virustitern zeigen (Groseth et al, 2010a). Interessant ist zudem, dass TCRV-infizierte Zellen, in denen die Apoptose durch die Zugabe eines Caspase-Inhibitors gehemmt wurde, keine verstärkte Virusproduktion zeigten. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition der Caspase-Aktivität während der TCRV-Infektion zu einer leichten Reduktion des Virustiters und des CPEs. Im Einklang mit der Beobachtung, dass die Inhibition der Caspase-Aktivität bzw. Apoptose in TCRV-infizierten Zellen zu reduzierten Virus-Titern führte, wurde die TCRV-Produktion durch eine zusätzliche Caspase-Aktivierung leicht gesteigert. Durch welche Faktoren die Induktion von



Apoptose in der infizierten Zelle das TCRV-Wachstum positiv beeinflusst, muss jedoch noch geklärt werden.

Generell ist für viele Viren beobachtet worden, dass die durch die Infektion ausgelöste Apoptose in der Wirtszelle die Virusreplikation begünstigen kann (Best et al, 2003; Mendez et al, 2004; Olsen et al, 1996; Wurzer et al, 2003). So kommt es durch die apoptotischen Prozesse zu Veränderungen zellulärer Strukturen, die die Virusfreisetzung erleichtern können oder helfen, die Immunantwort der Wirtszelle zu umgehen (Best et al, 2003; Gliedman et al, 1975; Jeurissen et al, 1992; Teodoro & Branton, 1997). Ferner können aktivierte Caspasen die Spaltung viraler Proteine vermitteln, deren Spaltprodukte wiederum eine wichtige Rolle im viralen Replikationszyklus spielen (Best et al, 2003; Moody et al, 2007; Richard & Tulasne, 2012). Ähnlich wie für TCRV beobachtet nutzen Influenzaviren, Astroviren oder das Aleutian Mink Disease Virus die Caspasen der infizierten Zelle für die effiziente Virusreplikation und Freisetzung (Best et al, 2003; Mendez et al, 2004; Olsen et al, 1996; Wurzer et al, 2003). Für andere Apoptose-induzierende Viren wurde hingegen beschrieben, dass die Unterdrückung der Apoptose mittels eines Caspase-Inhibitors fördernd ist (CCHFV) oder aber keinen Einfluss (Oropuche Virus, West Nil Virus, VSV) auf die Virusreplikation hat (Acrani et al, 2009; Hobbs et al, 2001; Karlberg et al, 2010; Kleinschmidt et al, 2007).

Die Daten lassen insgesamt vermuten, dass TCRV den Prozess der Apoptose für die eigene Replikation und Freisetzung nutzt. Die Frage inwieweit apoptotische Prozesse den Infektionszyklus von TCRV beeinflussen und wo genau sie eingreifen, ist bislang noch offen.

## **5.6 Charakterisierung der NP Spaltung zeigt signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Arenavirus Spezies**

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass JUNV und TCRV während der Infektion signifikante Unterschiede aufweisen. Während TCRV deutlich Apoptose in den infizierten Zellen induziert, unterdrückt JUNV diese gezielt durch die spezifische NP-Spaltung (4.4-4.6). Dennoch wachsen beide Viren ähnlich schnell zu vergleichbaren Titern heran (Groseth et al, 2010a). Ob sich diese anti- und pro-apoptotischen Mechanismen unabhängig voneinander entwickelt haben und welche Faktoren (Wirtstropismus etc.) die Entwicklung einer so differenten Wirtszellmodulation trotz enger Phylogenese beeinflusst haben, bleibt zu klären.

Generell sind die in dieser Arbeit analysierte NP-Spaltung und der dadurch bedingte anti-apoptotische Effekt nicht die einzigen Eigenschaften, in denen sich die eng verwandten Spezies JUNV und TCRV voneinander unterscheiden. So wurden neben

verschiedenen Freisetzungsmechanismen auch unterschiedliche IFN-antagonistische Strategien beschrieben, hinzu kommen weitere Unterschiede in der Immunantwort der infizierten Zellen, im Wirtstropismus sowie in der Pathogenität (Charrel et al, 2008; Cogswell-Hawkinson et al, 2012; Downs et al, 1963; Groseth et al, 2010b; Martinez-Sobrido et al, 2007; Rodrigo et al, 2012; Wolff et al, 2013b).

Da jedoch eine charakteristische NP-Spaltung nicht nur bei JUNV, sondern auch bei weiteren Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren beobachtet wurde (Clegg & Lloyd, 1983; Harnish et al, 1981; Young & Howard, 1983), liegt die Vermutung nahe, dass die NPs einiger weiterer Spezies (ausgenommen TCRV) ebenfalls als Substrat für Caspasen dienen und in der infizierten Zelle gespalten werden. Während die Arenavirus NP-Sequenz (GenBank) eine hohe Konservierung für das Motiv DVKD zwischen Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren aufweist, ist das QEHD Motiv weniger stark konserviert (Abb. 5.1), so dass vergleichende Experimente zwischen den einzelnen Arenavirus-Spezies Aufschluss darüber geben könnten, inwieweit die NP-Spaltung durch Caspasen einen konservierten Mechanismus darstellt.

JUNV NP	N	DSID	LASD	DVKD	QEHD	C
TCRV NP	N	DSID	LASD	DVKD	NHEC	C
PICV NP		SALD	LASD	DIKD	QQHS	
MACV NP		DSID	LASD	DVSD	LEHE	
GTOV NP		DSLK	LASD	DVSD	LEHD	
SABV NP		DGLD	LASD	DVAD	AEHD	
CHPV NP		DGLD	LASD	DVAD	AEHD	
LCMV NP		NGLD	LAAD	DVKD	DKHP	
LASV NP		HGLD	LAAD	DVKN	QSHP	
LUJV NP		NGLD	LATD	DVKD	NKHP	

**Abb. 5.1: Konservierung der vier potentiellen für JUNV NP ermittelten Caspase-Spaltstellen (GraBCas) in anderen Arenavirus Spezies.**

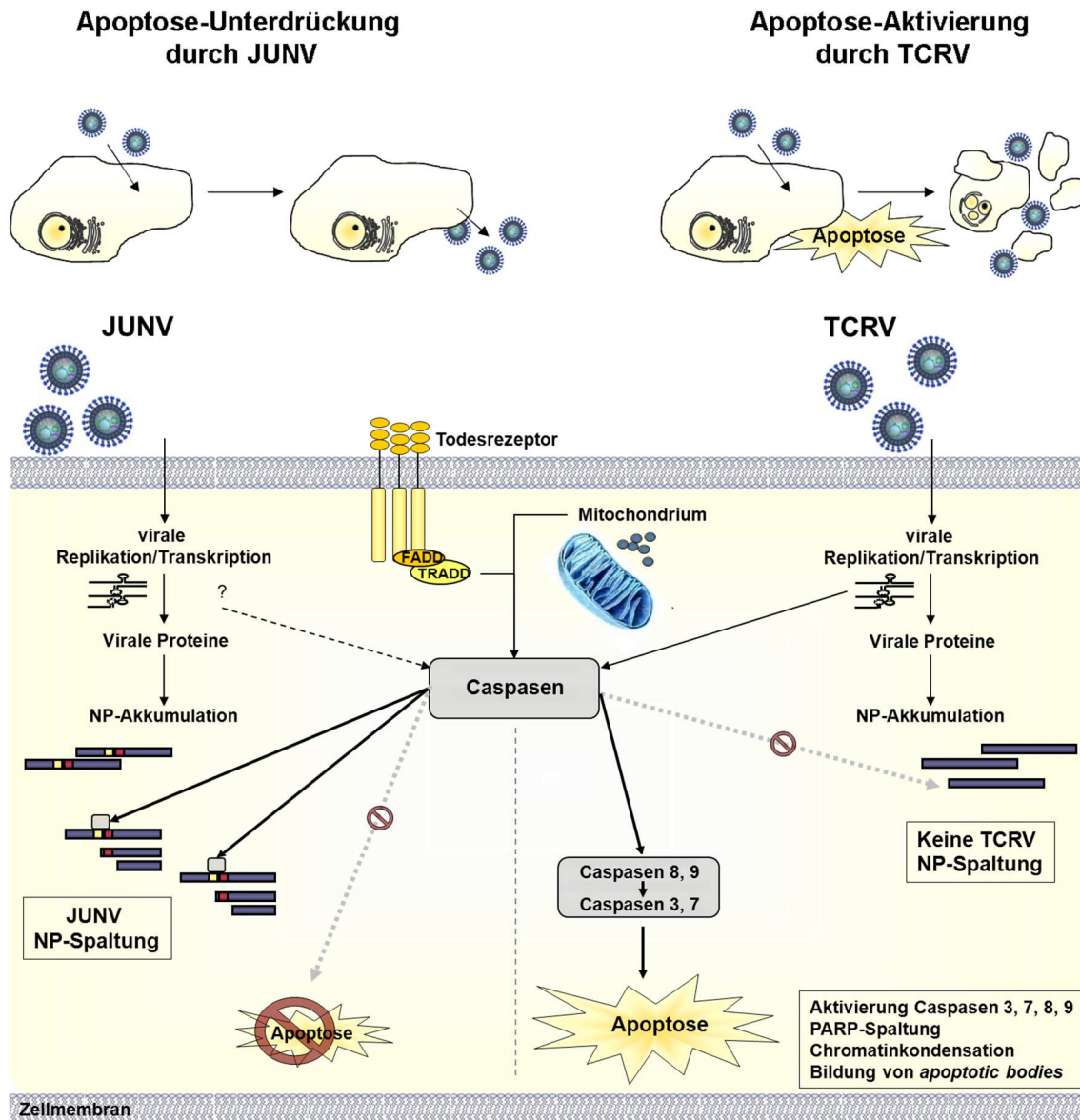
Die Abbildung zeigt die an den entsprechenden Positionen lokalisierten Tetrapeptidfolgen anderer Arenaviren. Während die Arenavirus NP-Sequenz (GenBank) eine hohe Konservierung für das Motiv DVKD zwischen Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren aufweist, ist das QEHD Motiv weniger stark konserviert.

Unklar ist, warum TCRV NP, obwohl es das DVKD Motiv besitzt, keine entsprechende Spaltung aufweist. Eine mögliche Erklärung wäre das Fehlen des QEHD Motivs und dessen Spaltung, die evtl. vorab benötigt wird, um die Spaltung am DVKD Motiv zu ermöglichen. Auch wäre eine schlechtere Zugänglichkeit der einzelnen Motive, bedingt durch Unterschiede in der NP-Struktur, denkbar, wenn auch aufgrund der hohen Homologie zwischen JUNV und TCRV NP eher unwahrscheinlich.

Die Divergenz der NP-Spaltung und der Apoptose-Regulation zwischen JUNV und TCRV NP zeigt, dass es signifikante Unterschiede zwischen diesen Virus-Spezies gibt.

Ob die Unterdrückung von Apoptose während der Infektion, wie für JUNV gezeigt, eine Eigenschaft von humanpathogenen Arenaviren bzw. ein Grund für die Pathogenitätsunterschiede ist, könnte in Zukunft durch vergleichende Studien mit anderen Arenavirus-Spezies untersucht werden.

### 5.7 Vorläufiges Modell der Apoptose-Modulation durch JUNV und TCRV



**Abb. 5.2: Modell zur Apoptose-Modulation durch JUNV und TCRV.**

In JUNV- und TCRV-infizierten Zellen kommt es zur viralen Replikation/Transkription und Akkumulation viraler RNA und Proteine sowie zur Aktivierung von Caspasen.

Das in großer Menge synthetisierte JUNV NP dient als Substrat für aktivierte Caspasen. Durch die NP-Spaltung kommt es zu einer Abschwächung der Signalkaskade und Unterdrückung der Apoptose in JUNV-infizierten Zellen. Das TCRV NP hingegen dient nicht als Substrat für die aktivierten Caspasen und wird nicht durch diese gespalten. Die aktivierten Caspasen spalten ihre natürlichen Substrate und die Degeneration der Zelle wird eingeleitet. In den TCRV-infizierten Zellen kommt es zur Aktivierung der Caspasen 3, 7, 8, 9 sowie zur PARP-Spaltung, Chromatinkondensation und Bildung von *apoptotic bodies*.

Basierend auf den in dieser Arbeit ermittelten Daten lässt sich folgendes Modell erstellen:

In JUNV- und TCRV-infizierten Zellen kommt es zur viralen Replikation/Transkription und Akkumulation viraler RNA und Proteine sowie zur Aktivierung von Caspasen.

In JUNV-infizierten Zellen erfolgt eine Caspase-vermittelte Spaltung des NP an den Motiven DVKD und QEHD und eine Generierung spezifischer NP-Spaltprodukte. JUNV NP dient als Substrat für aktivierte Caspasen und tritt in Konkurrenz mit deren natürlichen Substraten, die folglich weniger effizient gespalten werden. Durch die Abschwächung der Apoptose-Signalkaskade wird die Apoptose unterdrückt und der Zelltod JUNV-infizierter Zellen verhindert. In TCRV-infizierten Zellen hingegen kommt es zu keiner Caspase-vermittelten Spaltung des NP. Die Caspasen stehen weiterhin für die Spaltung und Aktivierung der natürlichen Substrate zur Verfügung und die Apoptose-Signalkaskade kann ungehindert ablaufen. Die TCRV-Infektion führt zur Induktion von Apoptose in der Wirtszelle sowie zur Aktivierung der Caspasen 3, 7, 8, 9, zur PARP-Spaltung, Chromatinkondensation sowie zur Bildung von *apoptotic bodies*.

## 5.8 Ausblick

Mit dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die Regulation und der Einfluss apoptotischer Prozesse in der Wirtszelle während einer Arenavirus-Infektion untersucht. Für JUNV konnte hierbei erstmals ein anti-apoptotischer Mechanismus identifiziert werden, der mittels Spaltung von JUNV NP durch Caspasen an mindestens zwei Motiven vermittelt wird und eine bislang unbekannte Funktion von NP darstellt. Für TCRV konnte die Induktion von Apoptose in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Das unter 5.7 dargelegte Modell fasst die ermittelten Ergebnisse, die ein neues Kapitel in der Arenavirus-Forschung öffnen, zusammen. Aufbauend auf diesen Daten lassen sich weitere Versuche planen, die folgende Fragen klären und das aufgestellte, vorläufige Modell erweitern könnten:

*Induziert rekombinantes JUNV ohne die NP Caspase-Spaltstellen DVKD und QEHD Apoptose in der infizierten Zelle?*

Rekombinante Viren stellen ein authentisches System dar, um einzelne Sequenzen der viralen Proteine auf ihre Funktion in der Infektion zu untersuchen. Um die oben beschriebenen Ergebnisse zu verifizieren, würde sich die Generierung und Charakterisierung eines rekombinanten JUNV eignen, dessen NP keine der ermittelten Caspase-Spaltstellen (DVKD, QEHD) trägt und somit keinen anti-apoptotischen Effekt in der Infektion vermitteln sollte. Neben Analysen von Apoptose-Indikatoren und Infektiosität wären weiterhin Wachstumskinetiken sowie Untersuchungen zur Pathogenität dieser rekombinanten Viren in Tiermodellen interessant.

*Haben die 47 kDa und 40 kDa Spaltprodukte von JUNV NP eine Funktion?*

Die Charakterisierung der einzelnen Fragmente (bzgl. RNA-Enkapsidierung, Einfluss auf virale Replikation/Transkription, IFN-Antagonismus, Interaktionen mit viralen oder zellulären Proteinen) könnte klären, ob die 47 kDa und 40 kDa Spaltprodukte von JUNV NP, die auch in die viralen Partikel inkorporiert werden, nur als ein Nebenprodukt der NP-Spaltung bzw. des anti-apoptotischen Mechanismus entstehen, oder ob sie gezielt produzierte NP-Untereinheiten mit spezifischer Funktion darstellen.

*Wie induziert TCRV Apoptose und wie beeinflusst die Caspase-Aktivität das Virus-Wachstum?*

Mittels Real Time PCR Assays und Microarrays könnte die Regulierung pro- oder anti-apoptotischer Gene in der TCRV-infizierten Zelle analysiert werden, um zu klären, über welchen spezifischen Mechanismus und unter Beteiligung welcher Faktoren Apoptose induziert wird.

*Kann allein durch das Einfügen einer Caspase-Spaltstelle in NP eine anti-apoptotische Funktion für Arenaviren generiert werden?*

Da JUNV und TCRV eng miteinander verwandt sind und hohe NP-Homologien aufweisen, wäre es auch interessant, ein funktionelles QEHD Motiv in die TCRV NP Sequenz einzufügen und zu analysieren, ob dies zu einer Spaltung von TCRV NP und zur Generierung eines anti-apoptotischen Effekts führt bzw. welchen Einfluss diese Veränderung auf das Virus-Wachstum hat.

*Sind die NP-Spaltung und der anti-apoptotische Mechanismus unter Arenaviren konserviert und haben sie einen Einfluss auf die Pathogenität?*

Vergleichende Studien zwischen weiteren Arenavirus-Spezies wären aufschlussreich um zu klären, ob es sich bei der NP-Spaltung und den dadurch vermittelten anti-apoptotischen Mechanismus um einen konservierten Mechanismus handelt.

Ferner stellt sich bei der Betrachtung der Daten für JUNV (humanpathogen) und TCRV (nicht-humanpathogen) die Frage, ob die Hemmung von Apoptose in der infizierten Zelle eine Rolle für die Pathogenität spielt. Neben vergleichenden Studien zwischen weiteren humanpathogenen und apathogenen Arenaviren könnten Infektionen geeigneter Tiermodelle mit JUNV, TCRV und den oben beschriebenen rekombinanten Viren die Rolle der Apoptose (-Inhibition) für die Pathogenität näher erläutern und womöglich helfen, die signifikanten Pathogenitätsunterschiede der Viren zu verstehen.

## 6 Zusammenfassung

Arenaviren gehören zu den segmentierten negativsträngigen RNA-Viren und werden in die zwei Serogruppen der Alt- und Neuwelt-Arenaviren unterteilt. Die in dieser Arbeit untersuchten Virusspezies Junín (JUNV) und Tacaribe (TCRV) werden den Neuwelt-Arenaviren zugeordnet und stellen die Prototypen für hämorrhagische Fieberverursachende bzw. apathogene Neuwelt-Arenaviren dar. Das in Argentinien endemische JUNV löst im Menschen hämorrhagisches Fieber aus und ist mit einer Mortalitätsrate von 30% ein hochpathogenes Arenavirus, wohingegen das eng verwandte TCRV nicht humanpathogen ist. Den Hauptbestandteil der Virionen stellt das Nukleoprotein NP dar. NP spielt eine entscheidende Rolle für die virale Replikation/Transkription sowie für die Unterdrückung der Immunantwort.

Die ersten Analysen dieser Arbeit zur JUNV und TCRV NP-Charakterisierung zeigten interessanterweise, trotz einer 78%igen Übereinstimmung in der NP-Aminosäuresequenz, einen deutlichen Unterschied bei der Expression von JUNV und TCRV NP. Für JUNV NP konnten sowohl bei rekombinanter NP-Expression als auch in der Infektion NP-spezifische Spaltprodukte mit einer Größe von etwa 62, 53, 47 und 40 kDa beobachtet werden, die im Falle von TCRV NP nicht auftraten. Die Analyse der JUNV NP-Aminosäuresequenz wies potentielle Caspase-Spaltmotive auf. Mittels Punktmutationen, die zu einer Veränderung im JUNV NP-Expressionsmuster und dem Ausbleiben bestimmter Spaltprodukte führten, wurden die Motive DVKD und QEHD als die Spaltstellen identifiziert, die für die Generierung der 47 kDa und 40 kDa Spaltprodukte genutzt werden. Es konnte ferner beobachtet werden, dass die Intensität der JUNV NP-Spaltung direkt mit der Caspase-Aktivität zusammenhängt, da eine Steigerung der Caspase-Aktivität zu einer verstärkten NP-Spaltung, die Inhibition der Caspase hingegen zu einer verringerten NP-Spaltung führte. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte JUNV NP als ein spezifisches Substrat zellulärer Caspasen identifiziert werden. Interessanterweise zeigte sich, dass JUNV NP, nicht jedoch TCRV NP, in Abwesenheit weiterer viraler Proteine in der Lage ist, die Caspase 3-Spaltung in apoptotischen Zellen zu unterdrücken und dass diese anti-apoptotische Eigenschaft durch den Spaltungsprozess von JUNV NP vermittelt wird. Zusammengefasst zeigt sich, dass JUNV NP, im Gegensatz zu TCRV NP, ein Substrat von Caspasen darstellt und durch die Caspase-vermittelte JUNV NP-Spaltung eine anti-apoptotische Eigenschaft besitzt.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde die Bedeutung der fehlenden NP-Spaltung und anti-apoptotischen Funktion für TCRV untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass TCRV deutlich Apoptose in der infizierten Zelle induziert. In TCRV-

infizierten Zellen wurden Apoptosemerkmale wie Caspase 3- und PARP-Spaltung, Chromatinkondensation sowie die Bildung von *apoptotic bodies* detektiert. Eine genauere Charakterisierung der TCRV-induzierten Apoptose ergab, dass die Induktion zu einem späten Zeitpunkt der Infektion erfolgt und Zelltyp-abhängig ist. Ferner wurde mittels UV-inaktiviertem TCRV demonstriert, dass die Apoptose vermutlich durch virale Replikation/Transkription und Akkumulation viraler Proteine im Zytoplasma und nicht durch die Bindung und den Eintritt in die Zelle ausgelöst wird. Die Spaltung von Caspase 8 und 9 in TCRV-infizierten Zellen deutete zudem daraufhin, dass die TCRV-induzierte Apoptose unter Beteiligung des extrinsischen und des intrinsischen Signalwegs vermittelt wird. Interessanterweise zeigten TCRV-Wachstumskinetiken, dass die Inhibition der Caspasen zu verminderten Virustitern, die Aktivierung von Caspasen hingegen zu erhöhten Virustitern führt. TCRV hat somit durch die fehlende NP-Spaltung als anti-apoptotischen Mechanismus keinen Nachteil während der Infektion, sondern benötigt im Gegenteil die apoptotischen Prozesse für eine effiziente Virusproduktion und -freisetzung.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals für Arenaviren eine anti-apoptotische Funktion identifiziert werden, die über die NP-Spaltung durch zelluläre Caspasen vermittelt wird. Zusätzlich zeigen die aufgeführten Daten zum ersten Mal, dass JUNV und TCRV, trotz enger phylogenetischer Verwandtschaft, unterschiedliche Mechanismen besitzen, um Apoptose in der Wirtszelle zu modulieren. Während JUNV mittels NP-Spaltung Apoptose in der infizierten Wirtszelle gezielt unterdrückt, benötigt TCRV apoptotische Prozesse, um zu vergleichbaren Titern wie JUNV heranzuwachsen.

Durch die vergleichenden Analysen von JUNV und TCRV NP konnten in dieser Arbeit Funktionen und Unterschiede zwischen den beiden Spezies identifiziert werden, die eine entscheidende Auswirkung auf die Virus-Wirtszell-Interaktion haben und in Zukunft helfen könnten, die signifikanten Pathogenitätsunterschiede der Viren zu erklären.

Schlüsselwörter:

Arenavirus, Junínvirus, Tacaribevirus, Nukleoprotein NP, Virus-Wirtszell-Interaktion, Apoptose, Caspasen

## 7 Summary

Arenaviruses belong to the segmented negative-strand RNA-viruses and are divided into the two serogroups known as the Old World and New World arenaviruses. In this study the New World arenavirus species Junín (JUNV) and Tacaribe (TCRV), which can be considered prototypes for hemorrhagic fever-causing and non-pathogenic New World arenaviruses, respectively, were investigated. JUNV is a human pathogen endemic to Argentina that causes hemorrhagic fever with a high case fatality rate, while its close relative TCRV is not known to be a significant human pathogen.

The nucleoprotein NP is the most abundant structural component of the viral particle. It plays an essential role for viral replication/transcription as well as overcoming the interferon response in the host cell. JUNV and TCRV NP show 78% identity between their NP amino acid sequences, nevertheless the characterisation of JUNV and TCRV NP at the beginning of this work revealed significant differences in the expression pattern of JUNV and TCRV NP. In the case of JUNV NP, NP-specific cleavage products with a size of 62, 53, 47, 40 kDa were observed during recombinant expression as well as during JUNV infection. TCRV NP, however, did not show a comparable specific degradation pattern.

Examination of the JUNV NP sequence revealed several putative caspase cleavage motifs. Point mutations of these motifs led to alterations in the observed degradation pattern and the loss of certain cleavage events. The DVKD and QEHD motives in JUNV NP were identified as the responsible cleavage sites for the generation of the 47 kDa and 40 kDa cleavage products, respectively. Further it could be shown that the intensity of JUNV NP cleavage directly depended on caspase activity, with increased caspase activity resulting in increased cleavage of NP, while inhibition of caspases decreased cleavage of NP. Based on these data JUNV NP was identified as a substrate of caspases. Interestingly it was further shown that expression of JUNV NP alone, but not of TCRV NP, suppresses the induction of apoptosis in cells treated with an apoptosis activator and that this anti-apoptotic effect also depends on cleavage of JUNV NP. Taken together, these data reveal that JUNV NP, in contrast to TCRV NP, serves as a target for caspase cleavage and is, therefore, able to prevent the induction of apoptosis in JUNV infected cells, possibly by serving as a decoy substrate.

To better understand the role of caspase activation in arenavirus infection, the biological relevance of non-cleavage of TCRV NP was also analysed. TCRV, having no anti-apoptotic function mediated by NP, showed significant hallmarks of apoptosis during infection. In the case of TCRV, but not JUNV, a strong cleavage of caspase 3 and PARP, as well as chromatin condensation and the formation of apoptotic bodies,



could be detected during infection. Further, characterisation of TCRV-induced apoptosis revealed an induction of apoptosis at late stages of infection and was dependent on cell type. Studies with UV-inactivated TCRV further demonstrated that apoptosis-induction is mediated not by binding or entry of the virus into the cell, but by down-stream steps in virus replication (e.g. viral replication/transcription and/or the accumulation of viral proteins in the cytoplasm). Cleavage of caspases 8 and 9 however, indicated that both, the extrinsic as well as the intrinsic apoptosis pathways are involved in signal transduction during the induction of apoptosis. Interestingly, caspase inhibition during TCRV infection results in a reduced virus titre, while caspase activation increased the virus titre. Therefore, the absence of NP-cleavage and its corresponding anti-apoptotic effect is unlikely to present a disadvantage for TCRV during infection. In contrast, TCRV seems to rely on apoptotic processes to yield efficient virus replication and release.

The data presented in this work show for the first time that, in some species, the arenavirus nucleoprotein exerts a novel anti-apoptotic function related to its cleavage by caspases. In addition, this work has shown that JUNV and TCRV, despite their close phylogenetic relationship, are using different mechanisms to modulate apoptosis in the infected host cell to achieve efficient virus production and spread. While JUNV inhibits apoptosis by using NP as a decoy substrate for caspases, TCRV depends on apoptotic processes in the infected cell to replicate efficiently and reach virus titres equivalent to those achieved by JUNV. Based on the comparative analysis used in this study, differences between JUNV and TCRV NP that have a crucial effect on virus-host cell-interaction were identified and may help in future to explain the fact that JUNV and TCRV differ dramatically in their pathogenicity, as well as to predict the virulence of newly emerging arenavirus species.

**Key words:**

Arenavirus, Junín virus, Tacaribe virus, nucleoprotein NP, virus-host cell-interaction, apoptosis, caspases

## 8 Literaturverzeichnis

Abraham J, Kwong JA, Albarino CG, Lu JG, Radoshitzky SR, Salazar-Bravo J, Farzan M, Spiropoulou CF, Choe H (2009) Host-species transferrin receptor 1 orthologs are cellular receptors for nonpathogenic new world clade B arenaviruses. *PLoS Pathog* **5**: e1000358

Acrani GO, Gomes R, Proenca-Modena JL, da Silva AF, Carminati PO, Silva ML, Santos RI, Arruda E (2009) Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *Virus Res* **149**: 56-63

Agnihothram SS, Dancho B, Grant KW, Grimes ML, Lyles DS, Nunberg JH (2009) Assembly of arenavirus envelope glycoprotein GPC in detergent-soluble membrane microdomains. *J Virol*

Agnihothram SS, York J, Nunberg JH (2006) Role of the stable signal peptide and cytoplasmic domain of G2 in regulating intracellular transport of the Junin virus envelope glycoprotein complex. *J Virol* **80**: 5189-5198

Albarino CG, Bergeron E, Erickson BR, Khristova ML, Rollin PE, Nichol ST (2009) Efficient reverse genetics generation of infectious junin viruses differing in glycoprotein processing. *J Virol* **83**: 5606-5614

Albarino CG, Ghiringhelli PD, Posik DM, Lozano ME, Ambrosio AM, Sanchez A, Romanowski V (1997) Molecular characterization of attenuated Junin virus strains. *J Gen Virol* **78 ( Pt 7)**: 1605-1610

Alenzi FQ, Lotfy M, Wyse R (2010) Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **11**: 271-280

Ambrosio A, Saavedra M, Mariani M, Gamboa G, Maiza A (2011) Argentine hemorrhagic fever vaccines. *Hum Vaccin* **7**: 694-700

Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**: 1305-1308

Assuncao Guimaraes C, Linden R (2004) Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *European journal of biochemistry / FEBS* **271**: 1638-1650

Backes C, Kuentzer J, Lenhof HP, Comtesse N, Meese E (2005) GraBCas: a bioinformatics tool for score-based prediction of Caspase- and Granzyme B-cleavage sites in protein sequences. *Nucleic Acids Res* **33**: W208-213

Balachandran S, Kim CN, Yeh WC, Mak TW, Bhalla K, Barber GN (1998) Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *EMBO J* **17**: 6888-6902

Banos-Lara Mdel R, Mendez E (2010) Role of individual caspases induced by astrovirus on the processing of its structural protein and its release from the cell through a non-lytic mechanism. *Virology* **401**: 322-332

Benedict CA, Norris PS, Ware CF (2002) To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* **3**: 1013-1018

- Bertin J, Mendrysa SM, LaCount DJ, Gaur S, Krebs JF, Armstrong RC, Tomaselli KJ, Friesen PD (1996) Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. *J Virol* **70**: 6251-6259
- Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Hacker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S, Hartmann G (2009) Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *The Journal of clinical investigation* **119**: 2399-2411
- Best SM (2008) Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. *Annu Rev Microbiol* **62**: 171-192
- Best SM, Shelton JF, Pompey JM, Wolfenbarger JB, Bloom ME (2003) Caspase cleavage of the nonstructural protein NS1 mediates replication of Aleutian mink disease parvovirus. *J Virol* **77**: 5305-5312
- Beyer WR, Popplau D, Garten W, von Laer D, Lenz O (2003) Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* **77**: 2866-2872
- Bitzer M, Prinz F, Bauer M, Spiegel M, Neubert WJ, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Lauer U (1999) Sendai virus infection induces apoptosis through activation of caspase-8 (FLICE) and caspase-3 (CPP32). *J Virol* **73**: 702-708
- Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, Wallach D (1995) Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* **270**: 387-391
- Borden KL, Campbell Dwyer EJ, Salvato MS (1998a) 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
- Borden KL, CampbellDwyer EJ, Carlile GW, Djavani M, Salvato MS (1998b) 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
- Borden KL, CampbellDwyer EJ, Salvato MS (1997) The promyelocytic leukemia protein PML has a pro-apoptotic activity mediated through its RING domain. *FEBS Lett* **418**: 30-34
- Borner C, Monney L (1999) Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* **6**: 497-507
- Borrow P, Oldstone MB (1994) Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* **198**: 1-9
- Boya P, Pauleau AL, Poncet D, Gonzalez-Polo RA, Zamzami N, Kroemer G (2004) Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. *Biochim Biophys Acta* **1659**: 178-189
- Briese T, Paweska JT, McMullan LK, Hutchison SK, Street C, Palacios G, Khristova ML, Weyer J, Swanepoel R, Egholm M, Nichol ST, Lipkin WI (2009) Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS Pathog* **5**: e1000455

- Brunotte L, Lelke M, Hass M, Kleinsteuber K, Becker-Ziaja B, Gunther S (2011) Domain structure of Lassa virus L protein. *J Virol* **85**: 324-333
- Burlacu A (2003) Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of cellular and molecular medicine* **7**: 249-257
- Burns JW, Buchmeier MJ (1991) Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **183**: 620-629
- Cajimat MN, Milazzo ML, Bradley RD, Fulhorst CF (2007) Catarina virus, an arenaviral species principally associated with *Neotoma micropus* (southern plains woodrat) in Texas. *Am J Trop Med Hyg* **77**: 732-736
- Campbell Dwyer EJ, Lai H, MacDonald RC, Salvato MS, Borden KL (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
- Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* **115**: 4727-4734
- Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov EV, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MB (1998) Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**: 2079-2081
- Capul AA, Perez M, Burke E, Kunz S, Buchmeier MJ, de la Torre JC (2007) Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains. *J Virol* **81**: 9451-9460
- Carballal G, Videla CM, Merani MS (1988) Epidemiology of Argentine hemorrhagic fever. *Eur J Epidemiol* **4**: 259-274
- Carrascosa AL, Bustos MJ, Nogal ML, Gonzalez de Buitrago G, Revilla Y (2002) Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into vero cells does not require virus replication. *Virology* **294**: 372-382
- Casabona JC, Levingston Macleod JM, Loureiro ME, Gomez GA, Lopez N (2009) The RING domain and the L79 residue of Z protein are involved in both the rescue of nucleocapsids and the incorporation of glycoproteins into infectious chimeric arenavirus-like particles. *J Virol* **83**: 7029-7039
- Cassens U, Lewinski G, Samraj AK, von Bernuth H, Baust H, Khazaie K, Los M (2003) Viral modulation of cell death by inhibition of caspases. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* **51**: 19-27
- CDC (2000) Fatal illnesses associated with a New World arenavirus--California, 1999-2000. *JAMA* **284**: 1237-1238
- Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang X (2003) Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J* **22**: 4132-4142
- Charrel RN, de Lamballerie X (2003) Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Res* **57**: 89-100

- Charrel RN, de Lamballerie X, Emonet S (2008) Phylogeny of the genus Arenavirus. *Curr Opin Microbiol* **11**: 362-368
- Charrel RN, de Lamballerie X, Fulhorst CF (2001) The Whitewater Arroyo virus: natural evidence for genetic recombination among Tacaribe serocomplex viruses (family Arenaviridae). *Virology* **283**: 161-166
- Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC (2003) Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **8**: 237-249
- Chen M, Orozco A, Spencer DM, Wang J (2002) Activation of initiator caspases through a stable dimeric intermediate. *J Biol Chem* **277**: 50761-50767
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505-512
- Chirillo P, Pagano S, Natoli G, Puri PL, Burgio VL, Balsano C, Levrero M (1997) The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8162-8167
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008) Caspases - an update. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* **151**: 10-27
- Clegg JC, Lloyd G (1983) Structural and cell-associated proteins of Lassa virus. *J Gen Virol* **64**: 1127-1136
- Cogswell-Hawkinson A, Bowen R, James S, Gardiner D, Calisher CH, Adams R, Schountz T (2012) Tacaribe virus causes fatal infection of an ostensible reservoir host, the Jamaican fruit bat. *J Virol* **86**: 5791-5799
- Cornu TI, de la Torre JC (2001) RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome. *J Virol* **75**: 9415-9426
- Cosset FL, Marianneau P, Verney G, Gallais F, Tordo N, Pecheur EI, ter Meulen J, Deubel V, Bartosch B (2009) Characterization of Lassa virus cell entry and neutralization with Lassa virus pseudoparticles. *J Virol* **83**: 3228-3237
- Coulibaly-N'Golo D, Allali B, Kouassi SK, Fichet-Calvet E, Becker-Ziaja B, Rieger T, Olschlager S, Dosso H, Denys C, Ter Meulen J, Akoua-Koffi C, Gunther S (2011) Novel arenavirus sequences in *Hylomyscus* sp. and *Mus (Nannomys) setulosus* from Cote d'Ivoire: implications for evolution of arenaviruses in Africa. *PLoS One* **6**: e20893
- Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (2000) Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* **476**: 118-123
- Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**: 8543-8567
- Delgado S, Erickson BR, Agudo R, Blair PJ, Vallejo E, Albarino CG, Vargas J, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG, Olson JG, Nichol ST (2008) Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathog* **4**: e1000047

- Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE (1968) Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol* **2**: 955-961
- Diemer C, Schneider M, Seebach J, Quaas J, Frosner G, Schatzl HM, Gilch S (2008) Cell type-specific cleavage of nucleocapsid protein by effector caspases during SARS coronavirus infection. *J Mol Biol* **376**: 23-34
- Downs WG, Anderson CR, Spence L, Aitken TH, Greenhall AH (1963) Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg* **12**: 640-646
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry* **68**: 383-424
- Eichler R, Lenz O, Strecker T, Eickmann M, Klenk HD, Garten W (2003) Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor. *EMBO Rep* **4**: 1084-1088
- Eichler R, Strecker T, Kolesnikova L, ter Meulen J, Weissenhorn W, Becker S, Klenk HD, Garten W, Lenz O (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
- Eleouet JF, Chilmonczyk S, Besnardeau L, Laude H (1998) Transmissible gastroenteritis coronavirus induces programmed cell death in infected cells through a caspase-dependent pathway. *J Virol* **72**: 4918-4924
- Eleouet JF, Slee EA, Saurini F, Castagne N, Poncet D, Garrido C, Solary E, Martin SJ (2000) The viral nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) is cleaved by caspase-6 and -7 during TGEV-induced apoptosis. *J Virol* **74**: 3975-3983
- Enria DA, Briggiler AM, Fernandez NJ, Levis SC, Maiztegui JI (1984) Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. *Lancet* **2**: 255-256
- Enria DA, Briggiler AM, Levis S, Vallejos D, Maiztegui JI, Canonico PG (1987) Tolerance and antiviral effect of ribavirin in patients with Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* **7**: 353-359
- Enria DA, Briggiler AM, Sanchez Z (2008) Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* **78**: 132-139
- Erdtmann L, Franck N, Lerat H, Le Seyec J, Gilot D, Cannie I, Gripon P, Hibner U, Guguen-Guillouzo C (2003) The hepatitis C virus NS2 protein is an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 18256-18264
- Eschli B, Quirin K, Wepf A, Weber J, Zinkernagel R, Hengartner H (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
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and cellular biology* **20**: 929-935

- Everett H, Barry M, Lee SF, Sun X, Graham K, Stone J, Bleackley RC, McFadden G (2000) M11L: a novel mitochondria-localized protein of myxoma virus that blocks apoptosis of infected leukocytes. *J Exp Med* **191**: 1487-1498
- Everett H, Barry M, Sun X, Lee SF, Frantz C, Berthiaume LG, McFadden G, Bleackley RC (2002) The myxoma poxvirus protein, M11L, prevents apoptosis by direct interaction with the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp Med* **196**: 1127-1139
- Fan L, Briese T, Lipkin WI (2010) Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J Virol* **84**: 1785-1791
- Fan TJ, Xia L, Han YR (2001) Mitochondrion and Apoptosis. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica* **33**: 7-12
- Fehling SK, Lennartz F, Strecker T (2012) Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z. *Viruses* **4**: 2973-3011
- Filippova M, Johnson MM, Bautista M, Filippov V, Fodor N, Tungteakkhun SS, Williams K, Duerksen-Hughes PJ (2007) The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol* **81**: 4116-4129
- Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ (2004) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 25729-25744
- Finkel E (2001) The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* **292**: 624-626
- Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003) Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**: 76-100
- Fisher AJ, Cruz W, Zoog SJ, Schneider CL, Friesen PD (1999) Crystal structure of baculovirus P35: role of a novel reactive site loop in apoptotic caspase inhibition. *EMBO J* **18**: 2031-2039
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T (2003) IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* **4**: 491-496
- Flanagan ML, Oldenburg J, Reignier T, Holt N, Hamilton GA, Martin VK, Cannon PM (2008) New world clade B arenaviruses can use transferrin receptor 1 (TfR1)-dependent and -independent entry pathways, and glycoproteins from human pathogenic strains are associated with the use of TfR1. *J Virol* **82**: 938-948
- Fuller-Pace FV, Southern PJ (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
- Gadaleta P, Vacotto M, Coulombie F (2002) Vesicular stomatitis virus induces apoptosis at early stages in the viral cycle and does not depend on virus replication. *Virus Res* **86**: 87-92

Gallaher WR, DiSimone C, Buchmeier MJ (2001) The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor. *BMC Microbiol* **1**: 1

Garcia MA, Meurs EF, Esteban M (2007) The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* **89**: 799-811

Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Cote M, Rich RL, Myszkowski DG, Sundquist WI (2001) Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**: 55-65

Gil J, Esteban M (2000a) Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **5**: 107-114

Gil J, Esteban M (2000b) The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* **19**: 3665-3674

Gil J, Garcia MA, Esteban M (2002) Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: molecular mechanism and relevance. *FEBS Lett* **529**: 249-255

Glazunova VA, Shtil AA (2008) [Mitochondrial mechanisms of apoptosis in response to DNA damage]. *Molekuliarnaia biologiya* **42**: 765-771

Gliedman JB, Smith JF, Brown DT (1975) Morphogenesis of Sindbis virus in cultured *Aedes albopictus* cells. *J Virol* **16**: 913-926

Glushakova SE, Omelyanenko VG, Lukashevitch IS, Bogdanov AA, Jr., Moshnikova AB, Kozytch AT, Torchilin VP (1992) The fusion of artificial lipid membranes induced by the synthetic arenavirus 'fusion peptide'. *Biochim Biophys Acta* **1110**: 202-208

Goni SE, Iserte JA, Ambrosio AM, Romanowski V, Ghiringhelli PD, Lozano ME (2006) Genomic features of attenuated Junin virus vaccine strain candidate. *Virus Genes* **32**: 37-41

Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* **81**: 2341-2364

Green D, Kroemer G (1998) The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* **8**: 267-271

Groseth A, Hoenen T, Weber M, Wolff S, Herwig A, Kaufmann A, Becker S (2010a) Tacaribe virus but not junin virus infection induces cytokine release from primary human monocytes and macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e1137

Groseth A, Wolff S, Strecker T, Hoenen T, Becker S (2010b) Efficient budding of the tacaribe virus matrix protein z requires the nucleoprotein. *J Virol* **84**: 3603-3611

Gu B, Zhang GF, Li LY, Zhou F, Feng DJ, Ding CL, Chi J, Zhang C, Guo DD, Wang JF, Zhou H, Yao K, Hu WX (2011) Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways. *Virology* **438**: 530



Günther S, Hoofd G, Charrel R, Roser C, Becker-Ziaja B, Lloyd G, Sabuni C, Verhagen R, van der Groen G, Kennis J, Katakweba A, Machang'u R, Makundi R, Leirs H (2009) Mopeia virus-related arenavirus in natal multimammate mice, Morogoro, Tanzania. *Emerg Infect Dis* **15**: 2008-2012

Gunther S, Lenz O (2004) Lassa virus. *Crit Rev Clin Lab Sci* **41**: 339-390

Gupta S, Braun M, Tischler ND, Stoltz M, Sundstrom KB, Bjorkstrom NK, Ljunggren HG, Klingstrom J (2013) Hantavirus-infection confers resistance to cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *PLoS Pathog* **9**: e1003272

Guy MP, Friesen PD (2008) Reactive-site cleavage residues confer target specificity to baculovirus P49, a dimeric member of the P35 family of caspase inhibitors. *J Virol* **82**: 7504-7514

Harmon B, Kozina C, Maar D, Carpenter TS, Branda CS, Negrete OA, Carson BD (2013) Identification of critical amino acids within the nucleoprotein of Tacaribe virus important for anti-interferon activity. *J Biol Chem* **288**: 8702-8711

Harnish DG, Leung WC, Rawls WE (1981) Characterization of polypeptides immunoprecipitable from Pichinde virus-infected BHK-21 cells. *J Virol* **38**: 840-848

Harrison LH, Halsey NA, McKee KT, Jr., Peters CJ, Barrera Oro JG, Briggiler AM, Feuillade MR, Maiztegui JI (1999) Clinical case definitions for Argentine hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* **28**: 1091-1094

Hass M, Golnitz U, Muller S, Becker-Ziaja B, Gunther S (2004) Replicon system for Lassa virus. *J Virol* **78**: 13793-13803

Hass M, Lelke M, Busch C, Becker-Ziaja B, Gunther S (2008) Mutational evidence for a structural model of the Lassa virus RNA polymerase domain and identification of two residues, Gly1394 and Asp1395, that are critical for transcription but not replication of the genome. *J Virol* **82**: 10207-10217

Hastie KM, Liu T, Li S, King LB, Ngo N, Zandonatti MA, Woods VL, Jr., de la Torre JC, Saphire EO (2011) Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 19365-19370

Hay S, Kannourakis G (2002) A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* **83**: 1547-1564

Henson PM, Bratton DL, Fadok VA (2001) Apoptotic cell removal. *Current biology : CB* **11**: R795-805

Henson PM, Hume DA (2006) Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends in immunology* **27**: 244-250

Hobbs JA, Schloemer RH, Hommel-Berrey G, Brahmi Z (2001) Caspase-3-like proteases are activated by infection but are not required for replication of vesicular stomatitis virus. *Virus Res* **80**: 53-65

Hommel-Berrey GA, Bochan MR, Montel AH, Goebel WS, Froelich CJ, Brahmi Z (1997) Granzyme B independently of perforin mediates noncytolytic intracellular inactivation of vesicular stomatitis virus. *Cell Immunol* **180**: 1-9

Huang C, Kolokoltsova OA, Yun NE, Seregin AV, Poussard AL, Walker AG, Brasier AR, Zhao Y, Tian B, de la Torre JC, Paessler S (2012) Junin virus infection activates the type I interferon pathway in a RIG-I-dependent manner. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1659

Inizan CC, Cajimat MN, Milazzo ML, Barragan-Gomez A, Bradley RD, Fulhorst CF (2010) Genetic evidence for a tacaribe serocomplex virus, Mexico. *Emerg Infect Dis* **16**: 1007-1010

Iordanov MS, Kirsch JD, Ryabinina OP, Wong J, Spitz PN, Korcheva VB, Thorburn A, Magun BE (2005) Recruitment of TRADD, FADD, and caspase 8 to double-stranded RNA-triggered death inducing signaling complexes (dsRNA-DISCs). *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **10**: 167-176

Ishii A, Thomas Y, Moonga L, Nakamura I, Ohnuma A, Hang'ombe B, Takada A, Mweene A, Sawa H (2011) Novel arenavirus, Zambia. *Emerg Infect Dis* **17**: 1921-1924

Ivana Scovassi A, Diederich M (2004) Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochemical pharmacology* **68**: 1041-1047

Jabbour AM, Heraud JE, Daunt CP, Kaufmann T, Sandow J, O'Reilly LA, Callus BA, Lopez A, Strasser A, Vaux DL, Ekert PG (2009) Puma indirectly activates Bax to cause apoptosis in the absence of Bid or Bim. *Cell Death Differ* **16**: 555-563

Jacamo R, Lopez N, Wilda M, Franze-Fernandez MT (2003) Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *J Virol* **77**: 10383-10393

Jan JT, Griffin DE (1999) Induction of apoptosis by Sindbis virus occurs at cell entry and does not require virus replication. *J Virol* **73**: 10296-10302

Jeong SY, Seol DW (2008) The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports* **41**: 11-22

Jeurissen SH, Wagenaar F, Pol JM, van der Eb AJ, Noteborn MH (1992) Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection. *J Virol* **66**: 7383-7388

Jiang X, Wang X (2000) Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* **275**: 31199-31203

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**: 549-554

Karlberg H, Tan YJ, Mirazimi A (2010) Induction of caspase activation and cleavage of the viral nucleocapsid protein in different cell types during Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection. *J Biol Chem* **286**: 3227-3234

Kawanishi M, Tada-Oikawa S, Kawanishi S (2002) Epstein-Barr virus BHRF1 functions downstream of Bid cleavage and upstream of mitochondrial dysfunction to inhibit TRAIL-induced apoptosis in BJAB cells. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 682-687

- Kerber R, Rieger T, Busch C, Flatz L, Pinschewer DD, Kummerer BM, Gunther S (2011) Cross-species analysis of the replication complex of Old World arenaviruses reveals two nucleoprotein sites involved in L protein function. *J Virol* **85**: 12518-12528
- Kimberley FC, Screaton GR (2004) Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell research* **14**: 359-372
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **14**: 5579-5588
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* **276**: 46639-46646
- Kleinschmidt MC, Michaelis M, Ogbomo H, Doerr HW, Cinatl J, Jr. (2007) Inhibition of apoptosis prevents West Nile virus induced cell death. *BMC Microbiol* **7**: 49
- Klewitz C, Klenk HD, ter Meulen J (2007) Amino acids from both N-terminal hydrophobic regions of the Lassa virus envelope glycoprotein GP-2 are critical for pH-dependent membrane fusion and infectivity. *J Gen Virol* **88**: 2320-2328
- Gluck RM, Bossy-Wetzell E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**: 1132-1136
- Kohler C, Orrenius S, Zhivotovsky B (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* **265**: 97-110
- Kolokoltsova OA, Smith JK, Poussard AL, Huang C, Zhao Y, Tian B, Brasier AR, Paessler S (2012). RIG-I-mediated induction of programmed cell death upon infection with Junin virus. *American Society for Virology, 31st Annual Meeting*; Madison, Wisconsin.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* **7**: 1166-1173
- Koyama AH (1995) Induction of apoptotic DNA fragmentation by the infection of vesicular stomatitis virus. *Virus Res* **37**: 285-290
- Kranzusch PJ, Schenk AD, Rahmeh AA, Radoshitzky SR, Bavari S, Walz T, Whelan SP (2010) Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 20069-20074
- Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**: 20633-20640
- Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* **14**: 32-43
- Kunz S (2009) The role of the vascular endothelium in arenavirus haemorrhagic fevers. *Thromb Haemost* **102**: 1024-1029

- Kunz S, Edelmann KH, de la Torre JC, Gorney R, Oldstone MB (2003) Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* **314**: 168-178
- Labrada L, Bodelon G, Vinuela J, Benavente J (2002) Avian reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction. *J Virol* **76**: 7932-7941
- Leber B, Lin J, Andrews DW (2007) Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **12**: 897-911
- Lecompte E, ter Meulen J, Emonet S, Daffis S, Charrel RN (2007) Genetic identification of Kodoko virus, a novel arenavirus of the African pigmy mouse (*Mus Nannomys minutoides*) in West Africa. *Virology* **364**: 178-183
- Lee KJ, Novella IS, Teng MN, Oldstone MB, de La Torre JC (2000) NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol* **74**: 3470-3477
- Lee KJ, Perez M, Pinschewer DD, de la Torre JC (2002) Identification of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) proteins required to rescue LCMV RNA analogs into LCMV-like particles. *J Virol* **76**: 6393-6397
- Lelke M, Brunotte L, Busch C, Gunther S (2010) An N-terminal region of Lassa virus L protein plays a critical role in transcription but not replication of the virus genome. *J Virol* **84**: 1934-1944
- Lenz O, ter Meulen J, Klenk HD, Seidah NG, Garten W (2001) The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12701-12705
- Leu JH, Chen LL, Lin YR, Kou GH, Lo CF (2010) Molecular mechanism of the interactions between white spot syndrome virus anti-apoptosis protein AAP-1 (WSSV449) and shrimp effector caspase. *Dev Comp Immunol* **34**: 1068-1074
- Levingston Macleod JM, D'Antuono A, Loureiro ME, Casabona JC, Gomez GA, Lopez N (2011) Identification of two functional domains within the arenavirus nucleoprotein. *J Virol* **85**: 2012-2023
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**: 491-501
- Li LY, Luo X, Wang X (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**: 95-99
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489
- Li XD, Kukkonen S, Vapalahti O, Plyusnin A, Lankinen H, Vaheri A (2004) Tula hantavirus infection of Vero E6 cells induces apoptosis involving caspase 8 activation. *J Gen Virol* **85**: 3261-3268
- Linero FN, Scolaro LA (2009) Participation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in Junin virus replication in vitro. *Virus Res* **145**: 166-170

Linero FN, Thomas MG, Boccaccio GL, Scolaro LA (2011) Junin virus infection impairs stress-granule formation in Vero cells treated with arsenite via inhibition of eIF2alpha phosphorylation. *J Gen Virol* **92**: 2889-2899

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**: 487-501

Lopez N, Franze-Fernandez MT (2007) A single stem-loop structure in Tacaribe arenavirus intergenic region is essential for transcription termination but is not required for a correct initiation of transcription and replication. *Virus Res* **124**: 237-244

Lopez N, Jacamo R, Franze-Fernandez MT (2001) Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *J Virol* **75**: 12241-12251

Loureiro ME, Wilda M, Levingston Macleod JM, D'Antuono A, Foscaldi S, Marino Buslje C, Lopez N (2011) Molecular determinants of arenavirus Z protein homo-oligomerization and L polymerase binding. *J Virol* **85**: 12304-12314

Lowe SW, Ruley HE (1993) Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes & development* **7**: 535-545

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**: 481-490

Ma YB, Chang HY (2011) Caspase work model during pathogen infection. *Virologica Sinica* **26**: 366-375

Maiztegui JI, Fernandez NJ, de Damilano AJ (1979) Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome. *Lancet* **2**: 1216-1217

Martinez-Sobrido L, Giannakas P, Cubitt B, Garcia-Sastre A, de la Torre JC (2007) Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *J Virol* **81**: 12696-12703

Martinez MG, Cordo SM, Candurra NA (2007) Characterization of Junin arenavirus cell entry. *J Gen Virol* **88**: 1776-1784

Martinez MG, Forlenza MB, Candurra NA (2009) Involvement of cellular proteins in Junin arenavirus entry. *Biotechnol J* **4**: 866-870

McCormick JB, King IJ, Webb PA, Johnson KM, O'Sullivan R, Smith ES, Trippel S, Tong TC (1987) A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *J Infect Dis* **155**: 445-455

McKee KT, Jr., Huggins JW, Trahan CJ, Mahlandt BG (1988) Ribavirin prophylaxis and therapy for experimental argentine hemorrhagic fever. *Antimicrob Agents Chemother* **32**: 1304-1309

Mendez E, Salas-Ocampo E, Arias CF (2004) Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. *J Virol* **78**: 8601-8608

- Milazzo ML, Cajimat MN, Haynie ML, Abbott KD, Bradley RD, Fulhorst CF (2008) Diversity among tacaribe serocomplex viruses (family Arenaviridae) naturally associated with the white-throated woodrat (*Neotoma albigula*) in the southwestern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* **8**: 523-540
- Milligan CE, Schwartz LM (1997) Programmed cell death during animal development. *British medical bulletin* **53**: 570-590
- Ming L, Wang P, Bank A, Yu J, Zhang L (2006) PUMA Dissociates Bax and Bcl-X(L) to induce apoptosis in colon cancer cells. *J Biol Chem* **281**: 16034-16042
- Moody CA, Fradet-Turcotte A, Archambault J, Laimins LA (2007) Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19541-19546
- Morin B, Coutard B, Lelke M, Ferron F, Kerber R, Jamal S, Frangeul A, Baronti C, Charrel R, de Lamballerie X, Vonrhein C, Lescar J, Bricogne G, Gunther S, Canard B (2010) The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS Pathog* **6**: e1001038
- Nadiri A, Wolinski MK, Saleh M (2006) The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *Journal of immunology* **177**: 4239-4245
- Neuman BW, Adair BD, Burns JW, Milligan RA, Buchmeier MJ, Yeager M (2005) Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis. *J Virol* **79**: 3822-3830
- Okazaki T, Higuchi M, Gotoh Y (2013) Mitochondrial localization of the antiviral signaling adaptor IPS-1 is important for its induction of caspase activation. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **18**: 493-501
- Ola MS, Nawaz M, Ahsan H (2011) Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* **351**: 41-58
- Olsen CW, Kehren JC, Dybdahl-Sissoko NR, Hinshaw VS (1996) bcl-2 alters influenza virus yield, spread, and hemagglutinin glycosylation. *J Virol* **70**: 663-666
- Opferman JT (2008) Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ* **15**: 234-242
- Ortiz-Riano E, Cheng BY, de la Torre JC, Martinez-Sobrido L (2011) The C-terminal region of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein contains distinct and segregable functional domains involved in NP-Z interaction and counteraction of the type I interferon response. *J Virol* **85**: 13038-13048
- Palacios G, Savji N, Hui J, Travassos da Rosa A, Popov V, Briese T, Tesh R, Lipkin WI (2010) Genomic and phylogenetic characterization of Merino Walk virus, a novel arenavirus isolated in South Africa. *J Gen Virol* **91**: 1315-1324
- Paweska JT, Sewlall NH, Ksiazek TG, Blumberg LH, Hale MJ, Lipkin WI, Weyer J, Nichol ST, Rollin PE, McMullan LK, Paddock CD, Briese T, Mnyaluza J, Dinh TH, Mukonka V, Ching P, Duse A, Richards G, de Jong G, Cohen C, Ikalafeng B, Mugero C, Asomugha C, Malotle MM, Nteo DM, Misiyani E, Swanepoel R, Zaki SR (2009) Nosocomial outbreak of novel arenavirus infection, southern Africa. *Emerg Infect Dis* **15**: 1598-1602

- Perez D, White E (2000) TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K. *Molecular cell* **6**: 53-63
- Perez M, Craven RC, de la Torre JC (2003) The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12978-12983
- Perez M, de la Torre JC (2003) Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* **77**: 1184-1194
- Perez M, Greenwald DL, de la Torre JC (2004) Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *J Virol* **78**: 11443-11448
- Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G (2005) The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell research* **15**: 407-422
- Peters CJ, Buchmeier, M., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G. (1996) Arenaviruses. *Fields Virology 3rd ed Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA:pp 1521-1551*
- Pinschewer DD, Perez M, de la Torre JC (2003) Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J Virol* **77**: 3882-3887
- Pinschewer DD, Perez M, de la Torre JC (2005) Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *J Virol* **79**: 4519-4526
- Poenisch M, Burger N, Staeheli P, Bauer G, Schneider U (2009) Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-infected rats. *J Virol* **83**: 4297-4307
- Pommier Y (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer* **6**: 789-802
- Price JL (1978) Serological evidence of infection of Tacaribe virus and arboviruses in Trinidadian bats. *Am J Trop Med Hyg* **27**: 162-167
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental cell research* **283**: 1-16
- Pugazhenth S, Gilden DH, Nair S, McAdoo A, Wellish M, Brazeau E, Mahalingam R (2009) Simian varicella virus induces apoptosis in monkey kidney cells by the intrinsic pathway and involves downregulation of bcl-2 expression. *J Virol* **83**: 9273-9282
- Purvis SF, Jacobberger JW, Sramkoski RM, Patki AH, Lederman MM (1995) HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells. *AIDS research and human retroviruses* **11**: 443-450
- Pythoud C, Rodrigo WW, Pasqual G, Rothenberger S, Martinez-Sobrido L, de la Torre JC, Kunz S Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKKepsilon. *J Virol* **86**: 7728-7738

- Qi X, Lan S, Wang W, Schelde LM, Dong H, Wallat GD, Ly H, Liang Y, Dong C (2010) Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* **468**: 779-783
- Quirin K, Eschli B, Scheu I, Poort L, Kartenbeck J, Helenius A (2008) Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. *Virology* **378**: 21-33
- Radoshitzky SR, Abraham J, Spiropoulou CF, Kuhn JH, Nguyen D, Li W, Nagel J, Schmidt PJ, Nunberg JH, Andrews NC, Farzan M, Choe H (2007) Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* **446**: 92-96
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* **262**: 695-700
- Raju R, Raju L, Hacker D, Garcin D, Compans R, Kolakofsky D (1990) Nontemplated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mRNAs. *Virology* **174**: 53-59
- Ramsey-Ewing A, Moss B (1998) Apoptosis induced by a postbinding step of vaccinia virus entry into Chinese hamster ovary cells. *Virology* **242**: 138-149
- Randall RE, Goodbourn S (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* **89**: 1-47
- Ravindra PV, Tiwari AK, Ratta B, Chaturvedi U, Palia SK, Subudhi PK, Kumar R, Sharma B, Rai A, Chauhan RS (2008) Induction of apoptosis in Vero cells by Newcastle disease virus requires viral replication, de-novo protein synthesis and caspase activation. *Virus Res* **133**: 285-290
- Rebouillat D, Hovanessian AG (1999) The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **19**: 295-308
- Regad T, Chelbi-Alix MK (2001) Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* **20**: 7274-7286
- Regad T, Saib A, Lallemand-Breitenbach V, Pandolfi PP, de The H, Chelbi-Alix MK (2001) PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO J* **20**: 3495-3505
- Reignier T, Oldenburg J, Noble B, Lamb E, Romanowski V, Buchmeier MJ, Cannon PM (2006) Receptor use by pathogenic arenaviruses. *Virology* **353**: 111-120
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH (2000) Defying death after DNA damage. *Nature* **407**: 777-783
- Richard A, Tulasne D (2012) Caspase cleavage of viral proteins, another way for viruses to make the best of apoptosis. *Cell Death Dis* **3**: e277
- Rodrigo WW, Ortiz-Riano E, Pythoud C, Kunz S, de la Torre JC, Martinez-Sobrido L (2012) Arenavirus nucleoproteins prevent activation of nuclear factor kappa B. *J Virol* **86**: 8185-8197



Rodrigues R, Paranhos-Baccala G, Vernet G, Peyrefitte CN (2013) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus-infected hepatocytes induce ER-stress and apoptosis crosstalk. *PLoS One* **7**: e29712

Rodriguez J, Lazebnik Y (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & development* **13**: 3179-3184

Rojek JM, Kunz S (2008) Cell entry by human pathogenic arenaviruses. *Cell Microbiol* **10**: 828-835

Roulston A, Marcellus RC, Branton PE (1999) Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* **53**: 577-628

Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S (2007) Cell suicide and caspases. *Vascular pharmacology* **46**: 383-393

Sadler AJ, Williams BR (2008) Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature reviews Immunology* **8**: 559-568

Saelens X, Kalai M, Vandenabeele P (2001) Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. *J Biol Chem* **276**: 41620-41628

Saini KS, Walker NI (1998) Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry* **178**: 9-25

Samuel CE (2001) Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews* **14**: 778-809, table of contents

Sarmiento L, Tseggai T, Dhingra V, Fu ZF (2006) Rabies virus-induced apoptosis involves caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Virus Res* **121**: 144-151

Schlie K, Maisa A, Freiberg F, Groseth A, Strecker T, Garten W (2010) Viral protein determinants of Lassa virus entry and release from polarized epithelial cells. *J Virol* **84**: 3178-3188

Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**: 669-682

Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**: 1148-1151

Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ (2004) Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta* **1644**: 107-113

Shih SR, Weng KF, Stollar V, Li ML (2008) Viral protein synthesis is required for Enterovirus 71 to induce apoptosis in human glioblastoma cells. *J Neurovirol* **14**: 53-61

Shimajima M, Stroher U, Ebihara H, Feldmann H, Kawaoka Y (2012) Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry. *J Virol* **86**: 2067-2078

Shisler J, Yang C, Walter B, Ware CF, Gooding LR (1997) The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J Virol* **71**: 8299-8306

Shtanko O, Imai M, Goto H, Lukashevich IS, Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y (2010) A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. *J Virol* **84**: 5415-5422

Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS (2001) A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7829-7834

Spiropoulou CF, Kunz S, Rollin PE, Campbell KP, Oldstone MB (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

Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H (2002) Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J* **21**: 4520-4530

Sprick MR, Walczak H (2004) The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1644**: 125-132

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry* **67**: 227-264

Stennicke HR, Jurgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS (1998) Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem* **273**: 27084-27090

Strecker T, Eichler R, Meulen J, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W, Lenz O (2003) Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles. *J Virol* **77**: 10700-10705

Strecker T, Maisa A, Daffis S, Eichler R, Lenz O, Garten W (2006) The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z. *Virology* **3**: 93

Su J, Wang G, Barrett JW, Irvine TS, Gao X, McFadden G (2006) Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria. *J Virol* **80**: 1140-1151

Tan SL, Katze MG (1999) The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death? *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **19**: 543-554

Teodoro JG, Branton PE (1997) Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* **71**: 1739-1746

Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA (2011) Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* **3**: 920-940

- Thornberry NA (1999) Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ* **6**: 1023-1027
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**: 17907-17911
- Tollefson AE, Hermiston TW, Lichtenstein DL, Colle CF, Tripp RA, Dimitrov T, Toth K, Wells CE, Doherty PC, Wold WS (1998) Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* **392**: 726-730
- Tortorici MA, Albarino CG, Posik DM, Ghiringhelli PD, Lozano ME, Rivera Pomar R, Romanowski V (2001) Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Res* **73**: 41-55
- Tripathi S, Batra J, Cao W, Sharma K, Patel JR, Ranjan P, Kumar A, Katz JM, Cox NJ, Lal RB, Sambhara S, Lal SK (2013) Influenza A virus nucleoprotein induces apoptosis in human airway epithelial cells: implications of a novel interaction between nucleoprotein and host protein Clusterin. *Cell Death Dis* **4**: e562
- Tyler KL, Squier MK, Rodgers SE, Schneider BE, Oberhaus SM, Grdina TA, Cohen JJ, Dermody TS (1995) Differences in the capacity of reovirus strains to induce apoptosis are determined by the viral attachment protein sigma 1. *J Virol* **69**: 6972-6979
- Urata S, Yasuda J, de la Torre JC (2009) The z protein of the new world arenavirus tacaribe virus has bona fide budding activity that does not depend on known late domain motifs. *J Virol* **83**: 12651-12655
- van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, Rodriguez I, Ruiz-Carrillo A, Vandekerckhove J, Declercq W, Beyaert R, Vandenaabeele P (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* **8**: 1136-1142
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**: 43-53
- Versteeg GA, Garcia-Sastre A (2010) Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr Opin Microbiol* **13**: 508-516
- Vieth S, Torda AE, Asper M, Schmitz H, Gunther S (2004) Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology* **318**: 153-168
- Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**: 1036-1038
- Volpon L, Osborne MJ, Capul AA, de la Torre JC, Borden KL (2010) Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 5441-5446
- Wang G, Barrett JW, Nazarian SH, Everett H, Gao X, Bleackley C, Colwill K, Moran MF, McFadden G (2004) Myxoma virus M11L prevents apoptosis through constitutive interaction with Bak. *J Virol* **78**: 7097-7111

- Wang GH, Bertin J, Wang Y, Martin DA, Wang J, Tomaselli KJ, Armstrong RC, Cohen JI (1997) Bovine herpesvirus 4 BORFE2 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis and contains death effector domains shared with other gamma-2 herpesviruses. *J Virol* **71**: 8928-8932
- Wang S, El-Deiry WS (2003) TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* **22**: 8628-8633
- Wang X, Xing D, Liu L, Chen WR (2009) BimL directly neutralizes Bcl-xL to promote Bax activation during UV-induced apoptosis. *FEBS Lett* **583**: 1873-1879
- Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, Gaston K (2000) The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* **275**: 87-94
- Weissenhorn W, Dessen A, Calder LJ, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC (1999) Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol* **16**: 3-9
- Wilda M, Lopez N, Casabona JC, Franze-Fernandez MT (2008) Mapping of the tacaribe arenavirus Z-protein binding sites on the L protein identified both amino acids within the putative polymerase domain and a region at the N terminus of L that are critically involved in binding. *J Virol* **82**: 11454-11460
- Wilkins C, Gale M, Jr. (2010) Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr Opin Immunol* **22**: 41-47
- Wolff S (2009) Die Rolle des Z-Proteins der Neuwelt-Arenaviren Junin und Tacaribe für die Freisetzung von Virus-ähnlichen Partikeln. Institute of Virology, Philipps-University Marburg
- Wolff S, Becker S, Groseth A (2013a) Cleavage of the Junin virus nucleoprotein serves a decoy function to inhibit the induction of apoptosis during infection. *J Virol* **87**: 224-233
- Wolff S, Ebihara H, Groseth A (2013b) Arenavirus budding: a common pathway with mechanistic differences. *Viruses* **5**: 528-549
- Won S, Ikegami T, Peters CJ, Makino S (2007) NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus-induced apoptosis. *J Virol* **81**: 13335-13345
- Wurzer WJ, Planz O, Ehrhardt C, Giner M, Silberzahn T, Pleschka S, Ludwig S (2003) Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* **22**: 2717-2728
- Xu G, Cirilli M, Huang Y, Rich RL, Myszkka DG, Wu H (2001) Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature* **410**: 494-497
- Xu X, Nash P, McFadden G (2000) Myxoma virus expresses a TNF receptor homolog with two distinct functions. *Virus Genes* **21**: 97-109
- Yin Q, Park HH, Chung JY, Lin SC, Lo YC, da Graca LS, Jiang X, Wu H (2006) Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine. *Molecular cell* **22**: 259-268

- Yin XM (2000) Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell research* **10**: 161-167
- Yoneyama M, Fujita T (2004) [RIG-I: critical regulator for virus-induced innate immunity]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme* **49**: 2571-2578
- York J, Agnihothram SS, Romanowski V, Nunberg JH (2005) Genetic analysis of heptad-repeat regions in the G2 fusion subunit of the Junin arenavirus envelope glycoprotein. *Virology* **343**: 267-274
- York J, Dai D, Amberg SM, Nunberg JH (2008) pH-induced activation of arenavirus membrane fusion is antagonized by small-molecule inhibitors. *J Virol* **82**: 10932-10939
- York J, Nunberg JH (2006) Role of the stable signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *J Virol* **80**: 7775-7780
- York J, Romanowski V, Lu M, Nunberg JH (2004) The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *J Virol* **78**: 10783-10792
- Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG (1999) Epstein-Barr virus and apoptosis: viral mimicry of cellular pathways. *Biochemical Society transactions* **27**: 807-812
- Young PR, Chanas AC, Lee SR, Gould EA, Howard CR (1987) Localization of an arenavirus protein in the nuclei of infected cells. *J Gen Virol* **68 ( Pt 9)**: 2465-2470
- Young PR, Howard CR (1983) Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. *J Gen Virol* **64 (Pt 4)**: 833-842
- Yuan S, Yu X, Asara JM, Heuser JE, Ludtke SJ, Akey CW (2011) The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and interactions with caspase-3. *Structure* **19**: 1084-1096
- Zhang L, Xing D, Chen M (2008) Bim(L) displacing Bcl-x(L) promotes Bax translocation during TNFalpha-induced apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **13**: 950-958
- Zhang P, Samuel CE (2007) Protein kinase PKR plays a stimulus- and virus-dependent role in apoptotic death and virus multiplication in human cells. *J Virol* **81**: 8192-8200
- Zhirnov OP, Konakova TE, Garten W, Klenk H (1999) Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. *J Virol* **73**: 10158-10163
- Zhirnov OP, Syrtsev VV, Vorob'eva IV, Klenk HD (2008) [Site-directed modification of caspase cleavage site regions in avian influenza virus proteins]. *Vopr Virusol* **53**: 16-21
- Zhou A, Paranjape J, Brown TL, Nie H, Naik S, Dong B, Chang A, Trapp B, Fairchild R, Colmenares C, Silverman RH (1997) Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *EMBO J* **16**: 6355-6363
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR (2001) The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & therapeutics* **92**: 57-70

Zoog SJ, Schiller JJ, Wetter JA, Chejanovsky N, Friesen PD (2002) Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 in vivo. *EMBO J* **21**: 5130-5140

## 9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1.1: Geographische Verbreitung der Arenaviren
- Abb. 1.2: Die Familie der Arenaviren
- Abb. 1.3: Struktur eines Arenaviruspartikels
- Abb. 1.4: Struktur der Arenavirus-Genomsegmente
- Abb. 1.5: Schematische Darstellung der arenaviralen Transkription und Replikation
- Abb. 1.6: Replikationszyklus von Arenaviren
- Abb. 1.7: Schematische Darstellung von Caspasen
- Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Apoptose
- Abb. 4.1: Immunfluoreszenzanalyse von JUNV und TCRV NP
- Abb. 4.2: Rekombinante Expression von JUNV und TCRV NP in VeroE6-Zellen
- Abb. 4.3: Spaltung von rekombinant exprimiertem JUNV NP in verschiedenen Zelllinien
- Abb. 4.4: JUNV NP-Spaltprodukte in infizierten VeroE6-Zellen und aufgereinigten Viruspartikeln
- Abb. 4.5: Schematische Darstellung der linearen JUNV NP-Struktur mit potentiellen Caspase-Spaltmotiven
- Abb. 4.6: Mutation potentieller Caspase-Spaltstellen in JUNV NP
- Abb. 4.7: Einbau der JUNV NP Mutanten in Z-induzierte VLPs
- Abb. 4.8: Immunfluoreszenzanalyse der JUNV NP Mutanten
- Abb. 4.9: Mutationsanalyse der potentiellen Caspase-Spaltstellen in JUNV NP
- Abb. 4.10: Mutationsanalyse der JUNV NP Mutanten in HEK293-Zellen
- Abb. 4.11: Quantifizierung der JUNV NP-Spaltprodukte
- Abb. 4.12: Apoptose-Induktion in VeroE6-Zellen durch Camptothecin-Behandlung
- Abb. 4.13: Caspase-Hemmung durch den Inhibitor Z-VAD-FMK
- Abb. 4.14: JUNV NP-Spaltung in Anwesenheit des Caspase-Aktivators Camptothecin
- Abb. 4.15: JUNV NP-Spaltung in Anwesenheit des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK
- Abb. 4.16: Bildung der JUNV NP-Spaltprodukte in Abhängigkeit der Caspase-Aktivität
- Abb. 4.17: Caspase 3-Spaltung in apoptotischen VeroE6-Zellen in Anwesenheit von JUNV NP oder TCRV NP
- Abb. 4.18: Caspase 3-Spaltung in apoptotischen VeroE6-Zellen in Anwesenheit von JUNV NP oder JUNV NP (NVKN+QEHN)

- Abb. 4.19: Mikroskopische Analyse auf CPE-Bildung oder Chromatinkondensation in JUNV-infizierten VeroE6-Zellen
- Abb. 4.20: Analysen von Caspase 3- und PARP-Spaltung in JUNV-infizierten VeroE6-Zellen
- Abb. 4.21: Caspase 3-Spaltung in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen
- Abb. 4.22: CPE-Bildung und Chromatinkondensation in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen
- Abb. 4.23: Caspase 3/7-Aktivität in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen
- Abb. 4.24: Mikroskopische Analyse von VeroE6-Zellen auf CPE-Bildung und Chromatinkondensation nach Zugabe von TCRV und UV-inaktiviertem TCRV
- Abb. 4.25: Analyse von Caspase 3- und PARP-Spaltung in VeroE6-Zellen nach Zugabe von TCRV und UV-inaktiviertem TCRV
- Abb. 4.26: UV-Inaktivierung von TCRV verhindert die Aktivierung von Effektorcaspasen in infizierten VeroE6-Zellen
- Abb. 4.27: Caspase 8 und 9-Spaltung in TCRV-infizierten VeroE6-Zellen
- Abb. 4.28: TCRV-Infektion von verschiedenen Zelllinien
- Abb. 4.29: Caspase 3/7-Aktivierung in TCRV-infizierten Zellen
- Abb. 4.30: TCRV-Wachstum in infizierten VeroE6-Zellen nach Caspase-Inhibition
- Abb. 4.31: TCRV-Wachstum in infizierten VeroE6-Zellen nach Caspase-Aktivierung
- Abb. 5.1: Konservierung der vier potentiellen für JUNV NP ermittelten Caspase-Spaltstellen (GraBCas) in anderen Arenavirus Spezies
- Abb. 5.2: Modell zur Apoptose-Modulation durch JUNV und TCRV
- Tabelle 2.1: Für Klonierungen verwendete DNA-Matrizen und Oligonukleotide
- Tabelle 2.2: Für Sequenzierungen und PCR verwendete Oligonukleotide
- Tabelle 4.1: Lokalisation potentieller Caspase-Spaltmotive in JUNV NP



## 10 Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen. Die Abkürzungen der chemischen Substanzen wurden im Materialteil aufgeführt.

A	<i>Artibeus</i>
aa	<i>Amino Acid</i> = Aminosäure
Abb	Abbildung
AHF	<i>Argentinic Hemorrhagic Fever</i> = Argentinisches hämorrhagisches Fieber
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
Apaf1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i>
AP	Adapterprotein
Bcl	<i>B-cell Lymphoma</i>
Bid	<i>BH3 Interacting-Domain Death Agonist</i>
bp	Basenpaar
BSL 4	<i>Biosafety Level 4</i> = Biologische Sicherheitsstufe 4
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
CCHFV	<i>Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus</i> = Krim-Kongo-Fieber-Virus
CDC	Center for Disease Control (Atlanta/USA)
cDNA	<i>complementary DNA</i> = komplementäre DNA
CHPV	Chaparevirus
CPE	<i>Cytopathic Effect</i> = zytopathischer Effekt
c-FLIP	<i>Cellular Fas-associated Death Domain-like Interleukin-1<math>\beta</math>-converting Enzyme-I nhibitory Protein</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
d (bei dH <sub>2</sub> O)	Deionisiert
DD	<i>Death Domain</i>
ddNTP	2'3' –Didesoxynukleosidtriphosphat
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DISC	<i>Death lnducing Signaling Complexes</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2' –Desoxynukleosidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
E.coli	<i>Escherichia coli</i>

eIF2 $\alpha$	Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktors 2 $\alpha$
eIF4E	Eukaryotischer Translations-Initiationsfaktor 4E
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required For Transport</i>
FADD	<i>Fas-associated Death Domain Protein</i>
FCS	Fötale Kälberserum
GPC	Glykoproteinvorläufer
GP	Glykoprotein
GTOV	Guanorivirus
h	Stunden
HA	<i>Hemagglutination Assay</i>
HBS	<i>HEPES Buffered Saline</i>
hTfR1	Humaner Transferrin-1-Rezeptor
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFA	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IGR	Intergenische Region
IKK	<i>Interferon Regulatory Factor-activating Kinase</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Transcription Factor</i>
JUNV	Junivirus
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L (-Protein)	<i>Large-Protein</i> (Polymerase L)
LASV	Lassavirus
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LUJV	Lujovirus
min	Minuten
MACV	Machupovirus
MAVS	<i>Mitochondrial Antiviral Signaling Protein</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-associated Gene-5</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i> = Botenribonukleinsäure
MVB	<i>Multi Vesicular Bodies</i> = multivesikuläre Strukturen
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>

NP	Nukleoprotein
N-Terminus	Aminoterminus
OAS	2'-5'-Oligoadenylatsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i> = offener Leserahmen
p.i.	<i>Post Infectionem</i> = nach der Infektion
p.t.	<i>Post Transfectionem</i> = nach der Transfektion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	<i>Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1</i>
PCR	<i>Polymerase-chain Reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
pfu	<i>Plaque-forming Units</i>
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
PKR	Proteinkinase R
PML	Promyelozytische-Leukämie-Protein
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
P/S	PenStrep
RIG-I	<i>Retinoic Acid-inducible Gene I Product</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP-Komplex	Ribonukleoproteinkomplex
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SABV	Sabiavirus
SAHF	<i>South American Hemorrhagic Fever</i> = Südamerikanisches hämorrhagisches Fieber
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
sec	Sekunden
siRNA	<i>Short Interfering RNA</i>
SKI-1/S1P	Subtilisin Kexin Isoenzyme 1 / Site 1 Protease
SSP	Signalpeptid
SV	Sendai Virus
Tab	Tabelle
TCRV	Tacaribevirus
TfR1	Transferrin-1-Rezeptor
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

TRADD	<i>TNF-Receptor-associated Death Domain Protein</i>
TRAIL	<i>TNF-related Apoptosis-inducing Ligand</i>
U	<i>Unit</i> = Einheit
ü.N.	über Nacht
ÜS	Überstand
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VLP	<i>Virus-like Particles</i> = Virus-ähnliche Partikel
vRNA	virale RNA
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
WT/wt	Wildtyp
WWAV	Whitewater-Arroyo Virus
$\lambda$	Lambda = Wellenlänge
Z (-Protein)	Matrixprotein der Arenaviren
ZNS	Zentrales Nervensystem

#### Abkürzungen der kanonischen Aminosäuren

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

## 11 Anhang

### A. Publikationen

- 01/2013            **S. Wolff**, S. Becker, A. Groseth  
*Cleavage of the Junín virus nucleoprotein serves a decoy function to inhibit the induction of apoptosis during infection*  
 J Virol. 2013 Jan;87(1):224-33.
- 01/2013            **S. Wolff**, H. Ebihara, A. Groseth  
*Arenavirus budding: a common pathway with mechanistic differences*  
 Viruses. 2013 Jan 31;5(2):528-49.
- 05/2011            A. Groseth, T. Hoenen, M. Weber, **S. Wolff**, A. Herwig, A. Kaufmann, S. Becker  
*Tacaribe virus but not Junín virus infection induces cytokine release from primary human monocytes and macrophages*  
 PLoS Negl Trop Dis. 2011 May 10;5(5):e1137.
- 04/2010            A. Groseth, **S. Wolff**, T. Strecker, T. Hoenen, S. Becker  
*Efficient budding of Tacaribe virus Z requires interaction with the nucleoprotein*  
 J Virol. 2010 Apr;84(7):3603-11.

### B. Vorträge & Poster Präsentationen auf Kongressen

- 06/2013            **S. Wolff**, A. Groseth, S. Becker  
*Junín virus NP but not Tacaribe NP serves a decoy-function to prevent apoptosis induction during infection*  
 15<sup>th</sup> International Conference on Negative Strand Viruses (NSV), Granada, Spanien (Poster Präsentation)
- 03/2013            **S. Wolff**, A. Groseth, S. Becker  
*Junín virus NP but not Tacaribe NP serves a decoy-function to prevent apoptosis induction during infection*  
 22. Treffen der Deutschen Gesellschaft für Virologie (GfV), Kiel (Vortrag)
- 07/2012            **S. Wolff**, A. Groseth, S. Becker  
*Cleavage of the Junín virus nucleoprotein serves a decoy-function to prevent apoptosis induction during infection*  
 31. Treffen der American Society for Virology (ASV), Madison, USA (Vortrag)
- 03/2011            **S. Wolff**, M. Weber, T. Hoenen, S. Becker, A. Groseth  
*Arenavirus matrix protein budding and its enhancement by the nucleoprotein*

- 06/2010 20. Treffen der Deutschen Gesellschaft für Virologie (GfV), Freiburg (Vortrag)  
A. Groseth, T. Hoenen, **S. Wolff**, A. Herwig, A. Kaufmann, S. Becker  
*Tacaribe virus but not Junin virus infection induces cytokine release from primary human monocytes and macrophages*  
14<sup>th</sup> International Conference on Negative Strand Viruses (NSV), Brügge, Belgien (Poster Präsentation A. Groseth)
- 07/2009 A. Groseth, **S. Wolff**, L. Kolesnikova, T. Hoenen, S. Becker  
*A virus-like particle assay for the characterization of budding in New World Arenaviruses.*  
28. Treffen der American Society for Virology (ASV), Vancouver, Canada (Vortrag A. Groseth)
- 03/2009 A. Groseth, **S. Wolff**, T. Hoenen, S. Becker  
*Virus-like particle formation for the characterization of budding in New World Arenaviruses.*  
19. Treffen der Deutschen Gesellschaft für Virologie (GfV), Leipzig (Poster Präsentation A. Groseth)

### C. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine Akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg:

Baranovski, Bauer S., Bauer U., Becker, Bette, Brehm, Bröring, Burchert, Daut, Del Rey, Eilers, Elsässer, Feuser, Garten, Glorius, Gudermann, Hasilik, Hassel, Hertl, Homberg, Huber, Jacob, Jungclas, Kirchner, Klenk, Knöller, Krebber, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Lüers, Maisner, Matrosovich, Moll, Mühlberger, Müller, Müller-Brüsselbach, Roeper, Röhm, Schäfer, Schütz, Schwarz, Suske, Voigt, Weihe, Westermann.

## D. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stephan Becker, an dessen Institut diese Arbeit verfasst wurde, für die hervorragende Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit.

Dr. Allison Groseth möchte ich besonders herzlich für die Bereitstellung des Themas sowie die Betreuung meiner Arbeit danken. Durch ihre Ideen und aufschlussreichen Diskussionen trug sie maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit bei.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Verena Krähling, Dr. Thomas Hoenen und den Arenavirus-Mitstreitern Dr. Ina Fehling, Dr. Thomas Strecker und Dr. Frank Lennartz für die Unterstützung und die zahlreichen Anregungen bedanken.

Ein ganz großer Dank gilt meinen Kollegen der Arbeitsgruppe AG Becker, die mir immer zur Seite standen und zu einem einmalig tollen Arbeitsklima beitrugen: Dirk Becker, Dr. Nadine Biedenkopf, Anne Brüggemann, Dr. Olga Dolnik, Astrid Herwig, Michael Klüver, Dr. Larissa Kolesnikova, Katharina Kowalski, Dr. Verena Krähling, Gordian Schudt, Dr. Hosam Shams-Eldin und Dr. Julia Vergara.

Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die jederzeit erwiesene Hilfsbereitschaft, insbesondere auch beim gesamten Team des BSL-4 Labors.

Mein besonderer Dank gilt meiner ganzen Familie, allen voran meinen Eltern und Tanja und Paul sowie meinen Marburger und Solinger Mädels, die mir während meiner Arbeit zur Seite standen und mich immer unterstützt und in meinem Weg bestärkt haben.

Für die finanzielle Förderung möchte ich mich herzlich bei der Jürgen Manchot Stiftung aus Düsseldorf bedanken, die mich mit einem Promotionsstipendium unterstützt und diese Arbeit ermöglicht hat.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Weber (Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg) und Dr. Nain (Institut für Immunologie, Philipps-Universität Marburg) für die Bereitstellung von Vesikulärem Stomatitis Virus und Sendai Virus, sowie bei Bjoern Meyer (School of Biology, St. Andrews University) für die gute Zusammenarbeit.

## E. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

### **Der Einfluss der Neuwelt-Arenaviren Junín und Tacaribe auf die Apoptose der Wirtszelle**

im Institut für Virologie unter Leitung und mit Unterstützung von Prof. Dr. Becker ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Journal of Virology

Marburg, den 17.12.2013