



BERNHARD-NOCHT-INSTITUT FÜR TROPENMEDIZIN

# „Etablierung und Charakterisierung von Mausmodellen für Lassa-Fieber“

## **Dissertation**

vorgelegt dem Fachbereich 2 (Biologie / Chemie) der  
**Universität Bremen**  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Angefertigt am  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

Vorgelegt von

**Toni Rieger**

Hamburg, 2011

Tag des öffentlichen Kolloquiums:  
20. Dezember 2011

Gutachter der Dissertation:

1. Prof. Dr. Andreas Dotzauer  
Universität Bremen

2. Prof. Dr. Stephan Günther  
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Lassa-Virus.....	1
1.1.1 Die Familie der <i>Arenaviridae</i> .....	1
1.1.2 Morphologie und Genomreplikation der Arenaviren.....	2
1.1.3 Lassa-Fieber .....	5
1.1.3.1 Klinik.....	5
1.1.3.2 Therapie und Impfung .....	6
1.1.3.3 Diagnostik.....	7
1.1.3.4 Pathogenese .....	7
1.1.3.5 Tiermodelle für das Lassa-Fieber.....	9
1.2 Zielsetzung.....	11
<b>2 MATERIAL.....</b>	<b>12</b>
2.1 Nukleinsäuren .....	12
2.2 Zelllinien, Virusstämme und Mäuse .....	12
2.3 Antikörper.....	13
2.4 Enzyme und Kits für molekularbiologisches Arbeiten .....	14
2.5 Chemikalien, Medien und Reagenzien .....	14
2.6 Puffer und Lösungen.....	15
2.7 Verbrauchsmaterial .....	16
2.8 Geräte .....	16
2.9 Software .....	17
<b>3 METHODEN.....</b>	<b>18</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	18
3.1.1 <i>In vitro</i> Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	18
3.1.2 Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	19
3.1.3 Standard-Agarosegelelektrophorese.....	20
3.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	20
3.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten .....	20
3.1.6 Sequenzierung von DNA.....	20
3.1.7 Isolation von Virus-RNA .....	20
3.1.8 ELISA zur IL-12p40-Bestimmung.....	21
3.1.9 Blutchemische Analysen .....	21
3.2 Zellbiologische Methoden .....	21

3.2.1 Kultivierung adhärenter Zellen .....	21
3.2.2 Bestimmung der Zahl lebender Zellen .....	22
3.2.3 Anzucht von Arenaviren .....	22
3.2.4 Immunofocus-Assay .....	23
3.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz .....	23
3.3 Tierexperimentelle Methoden .....	24
3.3.1 Virusinfektion .....	24
3.3.2 Blutabnahmen .....	24
3.3.3 Organentnahmen .....	25
3.3.4 T-Zell-Depletion .....	25
3.3.5 Applikation von Ribavirin .....	25
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>26</b>
4.1 Etablierung des B6/HLA-A2.1 Mausmodells für Lassa-Fieber .....	26
4.1.1 Identifizierung eines geeigneten Lassa-Virusisolates .....	26
4.1.2 Optimierung der Infektionsdosis und -route .....	28
4.1.3 Bedeutung von MHC-I und MHC-II bei der Kontrolle einer Lassa-Virusinfektion. ....	30
4.1.4 Rolle der T-Zellen bei der Erkrankung von LASV-infizierten HHD-Mäusen .....	32
4.1.5 Histopathologische Veränderungen in LASV-infizierten HHD-Mäusen .....	34
4.1.5.1 Histopathologische Veränderungen in der Lunge .....	35
4.1.5.2 Histopathologische Veränderungen in der Leber .....	35
4.1.5.3 Histopathologische Veränderungen in der Milz .....	36
4.1.6 Weiterführende Untersuchungen zur Aktivierung von Monozyten/Makrophagen .....	38
4.1.7 Verteilung von LASV im Gewebe .....	41
4.1.8 Mopeia-Virus induziert Immunität gegenüber LASV in HHD-Mäusen .....	42
4.2 Etablierung eines Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor-defizienten Mausmodells für LASV- Infektionen .....	43
4.2.1 Infektion von A129-Mäusen mit Altwelt-Arenaviren .....	43
4.2.2 MOPV als Surrogat für LASV im A129-Mausmodell .....	47
4.2.3 Eignung der A129-Maus zur Testung antiviraler Substanzen gegen LASV .....	48
4.2.4 Bestimmung weitere biochemischer Parameter in Arenavirus-infizierten A129- Mäusen .....	52
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
5.1 Etablierung des B6/HLA-A2.1 Mausmodells für Lassa-Fieber .....	53
5.2 Etablierung des IFN $\alpha/\beta$ -Rezeptor-defizienten Mausmodells für Lassa-Virusinfektionen .....	58
5.2.1 Virulenzunterschiede zwischen Altwelt-Arenaviren in der A129-Maus .....	59
5.2.2 Effekt von Ribavirin auf die Erkrankung nach LASV-Infektion in A129-Mäusen ..	60

<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>62</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>64</b>
<b>8 ANHANG</b> .....	<b>79</b>
8.1 Abkürzungsverzeichnis .....	79
8.2 Aminosäuren .....	82
8.3 Synthetische Oligonukleotide .....	83
8.4 Veröffentlichungen .....	85
8.5 Erklärung zur Dissertation .....	86

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Lassa-Virus

### 1.1.1 Die Familie der *Arenaviridae*

Die Familie der *Arenaviridae* (*arena* lat. Sand) umfasst Viren mit einem bisegmentierten RNA-Genom in negativer Orientierung. Auf jedem Segment sind zwei Gene in gegenläufiger Orientierung angeordnet, was als *ambisense*-Kodierungsstrategie bezeichnet wird [1]. Die freien sphärischen Virionen sind von einer Lipidmembran umhüllt, die sich von der Wirtszelle ableitet, und haben im elektronenmikroskopischen Bild eine körnige Struktur [2,3,4]. Einige Vertreter dieser Familie können beim Menschen virale hämorrhagische Fieber (VHF) hervorrufen.

Die Erstisolierung eines Arenavirus erfolgte 1933 mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) durch Armstrong und Lille [5]. Erst 1969 wurde das humanpathogene Lassa-Virus (LASV) im Dorf Lassa (Nigeria) aus einer verstorbenen amerikanischen Missionsschwester isoliert [3,6]. Mittlerweile (Stand 2009) sind 23 Arenaviruspezies offiziell in der Datenbank des *International Comitee on Taxonomy of Viruses* aufgenommen [7]. Arenaviren werden stetig neu in Nagetieren oder VHF-Patienten entdeckt [8,9,10,11,12].



Abbildung 1: Geographische Verteilung der Altwelt- und Neuwelt-Arenaviren.

Anhand ihrer geografischen Verbreitung sowie serologischer und phylogenetischer Eigenschaften werden Arenaviren in zwei Gruppen, die Altwelt- (Afrika und Europa) und Neuwelt- (Nord- und Südamerika) Arenaviren, eingeteilt (Abbildung 1) [13]. Die

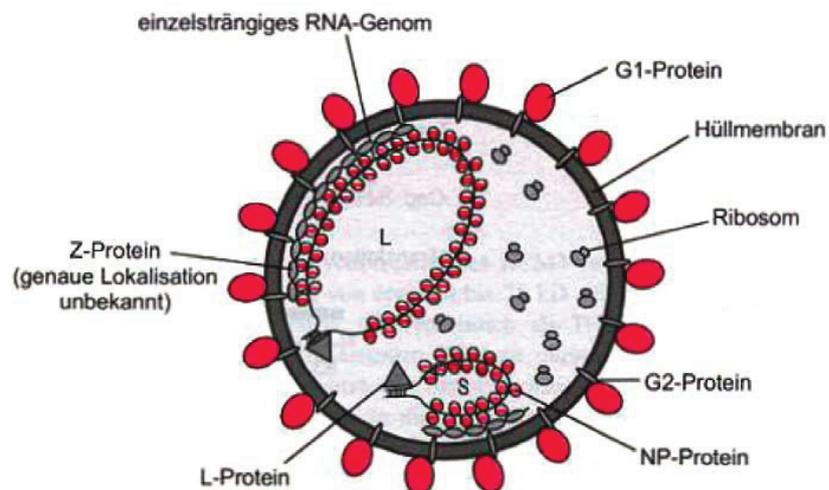
spezifischen Wirtstiere der meisten Arenaviren sind in der Nagetierfamilie *Muridae* zu finden [14]. Das Tacaribe-Virus, dessen natürliches Wirtstier zur Fledermausgattung *Artibeus* gehört, stellt derzeit die einzige bekannte Ausnahme dar [15]. Entsprechend der eingeschränkten geografischen Verbreitung der Wirtstiere treten die einzelnen Mitglieder der *Arenaviridae* nur regional begrenzt auf. Eine Ausnahme stellt LCMV dar, das mit seinem Wirtstier, der Hausmaus (*Mus musculus*), weltweit verbreitet ist. Daher liegt die Vermutung nahe, dass sich die Arenaviren mit ihren Wirtstieren über Millionen von Jahren koevolutionär entwickelt haben [16,17]. Allerdings zeigen auch neuere Sequenzuntersuchungen, dass Arenaviren nur wenige hundert Jahre alt sind und die Wirtstieranpassungen erst nach zufällig auftretenden, speziesübergreifenden Infektionen erfolgt sein könnten [18].

Ein Großteil der Arenaviren sind für den Menschen apathogen. Daneben werden arenavirale Zoonosen beschrieben, die beim Menschen ein virales hämorrhagisches Fieber (VHF) hervorrufen können. Humanpathogene Arenaviren der Neuweltgruppe sind das Sabia-Virus (Brasilianisches HF) [19], Guanarito-Virus (Venezolanisches HF) [20], Junin-Virus (Argentinisches HF) [21] und das Machupo-Virus (Bolivianisches HF) [22,23,24] sowie das ebenfalls in Bolivien isolierte Chapare-Virus [25]. Bei den Altwelt-Arenaviren sind das erst kürzlich in Südafrika isolierte Lujo-Virus [12] und das Lassa-Virus (Lassa-Fieber) [3,6] humanpathogen. Aufgrund ihrer hohen Pathogenität sind diese Arenaviren als Kategorie-A-Pathogene eingestuft und ihre Handhabung nur in Laboren der Biosicherheitsstufe 4 erlaubt. LCMV kann eine meist mild verlaufende Meningitis beim Menschen verursachen [26], wobei bei Organtransplantierten eine schwere systemische Infektion mit meist fatalem Ausgang auftreten kann [27]. Eine LCMV-Infektion von Schwangeren ist stark fruchtschädigend und führt entweder zum Tod des Fötus oder zu schweren Behinderungen des Neugeborenen [28,29,30,31].

### 1.1.2 Morphologie und Genomreplikation der Arenaviren

Die Virionen sind von einer Lipidmembran umhüllt und besitzen eine sphärische Form mit einem Durchmesser von 90-110 nm [32]. In die Hüllmembran sind die Glykoproteine GP1 und GP2 integriert, wobei das GP2 die Lipidmembran durchspannt während das GP1 nur peripher an der Membran assoziiert ist (Abbildung 2). Beide Proteine bilden durch nichtkovalente Bindung Homotetramere [33] oder Homotrimere [34] aus, die im elektronenmikroskopischen Bild als *spikes* auf der Virusoberfläche zu sehen sind. Die genomische RNA der Arenaviren wird im Viruspartikel vom Nukleoprotein umhüllt und bildet mit dem L-Protein, die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase, den replikationskompetenten Ribonukleoprotein-(RNP)-Komplex [35,36,37]. Im Virion ist zudem das Matrix-Protein Z in Membrannähe lokalisiert [38]. Außerdem werden bei der Virusreifung zufällig Wirtszellribosomen inkorporiert, die keine essentielle Rolle bei der

Virusreplikation spielen, aber im elektronenmikroskopischen Bild für eine granuläre, sandige Struktur ursächlich sind [2,39].



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Arenaviruspartikels.** In der Hüllmembran sind die Glykoproteine G1 und G2 verankert. Das einzelsträngige bisegmentierte RNA-Genom negativer Orientierung (S und L) ist mit dem L-Protein, als RNA-abhängige RNA Polymerase und dem oligomerformenden Nukleoprotein (NP) assoziiert [40].

Wie auch bei Viren der Familien *Orthomyxoviridae* und *Bunyaviridae* ist das Genom der *Arenaviridae* segmentiert und liegt in negativer Orientierung auf zwei unterschiedlich großen einzelsträngigen RNA-Molekülen verteilt vor. Das ca. 7,2 kb große Segment, als L-Segment bzw. L-RNA (engl. *large*) bezeichnet, kodiert ausgehend vom 5'-Ende in *sense* Orientierung das Matrix-Protein Z und in *antisense* Orientierung das L-Protein, welches eine N-terminale Endonuklease-Domäne und eine zentrale RNA-abhängige RNA-Polymerase-Domäne besitzt. Auf dem S-Segment (ca. 3,5 kb), auch S-RNA (engl. *small*) genannt, befindet sich am 5'-Ende das Gen für das Vorläufer-Glykoprotein (GPC) in *sense* und am 3'-Ende das Gen für das Nukleoprotein (NP) in *antisense* Orientierung [32,41,42,43,44,45]. Entsprechend der Genanordnung auf den Segmenten spricht man von einer *ambisense*-Kodierungsstrategie [1]. Auf beiden Segmenten sind die Gene nicht überlappend und durch eine GC-reiche Intergenregion (IGR) voneinander getrennt. Aufgrund von Sequenzunterschieden zwischen den Arenaviren bildet die IGR spezies- und segmentabhängig eine oder zwei stabile Haarnadelstrukturen aus und fungiert vermutlich als Terminationssignal für die virale Transkription [45,46,47,48]. Die virale Replikation und Transkription erfolgen im Zytosol der Wirtszelle und werden an den Segmentenden, den sogenannten Promotoren, initiiert. Die Promotorregion umfasst im Speziellen die terminalen 19 Nukleotide (nt) beider Segmentenden, die unter den Arenaviren hochkonserviert sind und aufgrund ihrer komplementären Eigenschaften intramolekular eine doppelsträngige sogenannte *panhandle*-Struktur ausbilden

[49,50,51,52]. *Down-* bzw. *upstream* davon befinden sich die sequenz- und längenvariablen 5'- bzw. 3'-untranslatierten Regionen (UTR), deren Einfluss auf die verschiedenen viralen Prozesse allerdings noch nicht geklärt ist. Die IGR und die 5'- und 3'-UTRs mit dem Promotorbereich werden als *cis*-aktive Elemente der Transkription und Replikation bezeichnet. Das N- und das L-Protein stellen die trans-aktiven Elemente dar [53].

Der Replikationszyklus stellt sich in der Wirtszelle wie folgt dar. Das Virion wird nach Bindung von GP1 an den zellulären Rezeptor, Transferrin Rezeptor 1 (TfR1) bei Gruppe A und B Neuwelt-Arenaviren [54] bzw.  $\alpha$ -Dystroglycan bei Altwelt-Arenaviren und Gruppe C Neuwelt-Arenaviren [55,56], über einen Clathrin-unabhängigen Endozytoseweg internalisiert [57]. Durch die Ansäuerung des Endosoms kommt es zur Konformationsänderung des Glykoproteins, insbesondere des GP2, das die Membranfusion zwischen Virion und Lysosom vermittelt [58]. Die mit NP umhüllten Genomsegmente gelangen so ins Zytosol. Das L-Protein ist vermutlich an den Genomsegmentenden (Promotoren) angelagert und kann so die primäre Transkription initiieren. Zunächst werden ausgehend von den 3'-UTR's beider Segmente die Transkripte des N- bzw. L-Proteins durch das L-Protein synthetisiert [32]. Die viralen Transkripte sind nicht polyadenyliert und tragen 5'-ständig eine *Cap*-Struktur, die über 4-7 nichtvirkuskodierte Nukleotide mit dem viralen Transkript verbunden ist [59,60]. Vermutlich schneiden Arenaviren die *Cap*-Strukturen von zellulären mRNAs ab und initiieren damit die Transkription der eigenen mRNAs [61,62]. Dieser als *cap snatching* bekannte Prozess wird auch bei Bunya- und Influenza-Viren beschrieben [63,64].

Hohe Konzentrationen von NP im Zytosol hemmen die Transkription, sodass die genomische RNA vermehrt als Matritze zur Herstellung antigenomischer RNA dient [48,65]. Dieses Antigenom ist wiederum das Template für Transkripte von GPC und Z-Protein sowie für neue genomische RNA. Vermutlich wird die RNA aller Replikationsintermediate prozessbegleitend von NP umhüllt und teilweise durch eine C-terminale 3'-5'-Exonukleaseaktivität abgebaut [66,67], so dass zelluläre *pattern recognition receptors* (PRRs), wie z.B. *dsRNA-activated protein kinase R* (PKR), *retinoic acid-inducible gene* (RIG-I) und *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA5), diese nur schwer erkennen können und so die antivirale Immunantwort der Zelle inhibiert ist [68]. Sind Z-Protein und GPC entsprechend prozessiert [69,70], vermitteln diese durch Rekrutierung aller nötigen viralen Bestandteile den Zusammenbau und die Freisetzung der Virionen an der Zellmembran [71,72]. Die neuen Virionen können anschließend weitere Zellen infizieren. Die infizierte Zelle bleibt dabei intakt, so dass man von einem nicht-lytischen Replikationszyklus bei Arenaviren spricht [32].

### 1.1.3 Lassa-Fieber

#### 1.1.3.1 Klinik

Lassa-Virus (LASV) wurde 1969 in der nigerianischen Stadt Lassa aus dem Blut von Missionskrankenschwestern isoliert und mit einer hämorrhagischen Fiebererkrankung in Verbindung gebracht [6]. Das Virus ist neben Nigeria [73] in weiteren westafrikanischen Ländern, wie z.B. Sierra Leone [74], Mali [75], Guinea [76] und Liberia [77] endemisch. In der Elfenbeinküste sind vermutlich ebenso Lassa-Viren zu finden [78], allerdings steht der Nachweis aus.

Der natürliche Wirt des Lassa-Virus ist die Natal-Vielzitzenratte *Mastomys natalensis* [74], die in Afrika südlich der Sahara vorkommt. Als Kulturfolger lebt sie teils in sehr enger Nachbarschaft mit dem Menschen [79] und scheidet das Virus über den Speichel, Urin und Kot aus. Viruskontaminierte Nahrungsmittel sowie der Verzehr der Vielzitzenratte sind mögliche Infektionsquellen für den Menschen. Auch das Manipulieren gejagter Tiere stellt ein Infektionsrisiko dar [80]. Mensch-zu-Mensch-Übertragungen der Lassa-Viren können aufgrund mangelnder Hygienemaßnahmen ebenfalls auftreten [81,82]. Älteren Schätzungen nach infizieren sich im Endemiegebiet jährlich 100.000 bis 300.000 Menschen mit Lassa-Virus, wovon etwa 1-2% am Lassa-Fieber versterben [83]. Bei nosokomialen Lassa-Fiebersausbrüchen in Endemiegebieten kann sich die Sterblichkeitsrate bei hospitalisierten Patienten auf 65% erhöhen [84]. Für Schwangere und ihre Föten sind mit 25% bzw. 85% erhöhte Letalitätsraten beschrieben worden [85]. Neben dieser Dramatik in den westafrikanischen Ländern verstarben in der Vergangenheit auch Lassa-Fieberpatienten in anderen Teilen der Welt. Aufgrund der langen Inkubationszeit und des regen internationalen Reiseverkehrs treten immer wieder importierte Fälle auf [86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97]. Trotz neuester intensivmedizinischer Behandlungsmethoden konnte vielen Patienten nicht mehr geholfen werden.

Die Lassa-Virusinfektion verläuft klinisch sehr variabel und zeigt keine pathognomonischen Symptome. Nach einer Inkubationszeit von bis zu 21 Tagen treten meist unspezifische grippeähnliche Symptome auf. Entsprechend stellen sich allgemeine Schwäche, hohes Fieber, Konjunktividen, Thorax- und Abdominalschmerzen bei begleitendem Erbrechen und Durchfall ein. Häufig treten dabei auch trockener Husten mit retrosternalen Schmerzen und exsudative Pharyngitis auf [98].

Die Mehrzahl der Infizierten gesundet nach etwa 10 Tagen. Fieber und Schmerzen verschwinden, der Reizhusten und das Schwächegefühl nehmen ab [99]. Auffällig hierbei ist, dass eine uni- oder bilaterale Innenohrschwerhörigkeit häufig als Spätfolge bei den Patienten zu finden ist [100].

Bei schweren Infektionsverläufen hingegen leiden die Patienten an Erbrechen und entwickeln Hals- sowie Gesichtsoedeme. Ebenso sind massive Atemprobleme mit zentraler Zyanose häufig. Eine Enzephalopathie, Hämorrhagien an Schleimhäuten und ein Pleuraerguss treten häufig unmittelbar vor dem Tod, meist um Tag 12 nach Erkrankungsbeginn, auf. Als Todesursache wird allgemeines Kreislauf- und Organversagen sowie hypovolämischer Schock mit Symptomatik eines *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) angenommen [98]. Bei Kindern kann sich zudem das *swollen baby syndrome* manifestieren, wobei sich ausgeprägte Ödeme und Blutungen ausbilden. Die Prognose ist dann entsprechend schlecht [101].

Biochemische Analysen zeigen krankheitsbegleitend starke Anstiege der Serumkonzentrationen von Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Laktat-Dehydrogenase (LDH), Amylase, Lipase, Kreatin-Kinase (CK) und Kreatinin, was auf ein allgemeines Organversagen hindeutet [86,98,102].

Zwischen Tag 4 und 9 der Erkrankung erreichen die Viruskonzentrationen  $10^3$  bis  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml. Ist parallel die AST-Aktivität im Serum auf über 150 U/l erhöht, ist die Prognose für den Patienten häufig infaust. Bei Genesung ist das Virus nach 2 bis 3 Wochen aus dem Blut entfernt [99]. Dagegen kann bis zu 6 Wochen nach einer akuten Infektion das Virus in Urin, Sperma und Muttermilch noch nachgewiesen werden [100]. IgG- und IgM-Antikörper gegen Lassa-Virus sind schon früh nach einer Infektion nachweisbar, wirken jedoch nicht neutralisierend. Erst Monate nach der akuten Infektion treten neutralisierende Antikörper mit niedrigen Titern auf, was darauf hinweist, dass die zelluläre aber weniger die humorale Immunantwort das Lassa-Virus eliminiert [99,103,104].

### 1.1.3.2 Therapie und Impfung

Die Behandlung erfolgt unter speziellen Quarantänebedingungen (*barrier nursing*) teilweise intensivmedizinisch, ist weitestgehend symptomatisch und wird durch Gabe des Ribonukleosidanalogs Ribavirin (1-D-Ribofuranosyl-1,2,4,-triazol-3-carboxamid) standardmäßig ergänzt. Die Ribavirintherapie sollte aber, um therapeutisch wirksam zu sein, in der ersten Erkrankungswoche beginnen. Der Therapieerfolg bei späterem Beginn ist deutlich reduziert [105]. Alternative Medikamente, die im späteren Krankheitsverlauf zur Genesung beitragen können, sind bis heute nicht bekannt. Rekonvaleszenzseren mit neutralisierenden Antikörpern gegen Lassa-Virus führten zwar in Einzelfällen zu guten Erfolgen, aber geringe Kreuzreaktivitäten und niedrige Konzentrationen der neutralisierenden Antikörper im Serum Überlebender führten zum Scheitern als geeignetes Therapeutikum [106,107].

Für den Menschen steht zur Zeit kein zugelassenes Vakzin gegen Lassa-Fieber zur Verfügung [108], obwohl in Tierversuchen durchaus Erfolge mit apathogenen Arenaviren,

Reassortanten von Mopeia- und Lassa-Virus sowie Pseudotypviren mit Lassa-viralem NP bzw. GPC erzielt wurden [109,110,111,112,113,114,115,116,117].

### 1.1.3.3 Diagnostik

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik ist differenzialdiagnostisch gegen andere febrile Erkrankungen abzugrenzen [98]. Das enge Zeitfenster für eine erfolgversprechende Ribavirinbehandlung und die besonderen hygienischen Schutzmaßnahmen verlangen eine schnelle Diagnose des Lassa-Fiebers. Dazu ist der Nachweis der viralen RNA aus Serum, Urin oder Liquor mittels RT-PCR die Methode der Wahl, da mit ihr auch geringe Konzentrationen von LASV-RNA ( $10^2$  bis  $10^3$  RNA Kopien/ml Serum) nachgewiesen werden können. Entsprechende Protokolle werden anhand verfügbarer Sequenzinformationen ständig angepasst und publiziert [118,119,120,121,122].

Standardmäßig werden die Lassa-Virus-spezifischen IgM- und IgG-Antikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz oder ELISA nachgewiesen [86,123]. Bei schweren Krankheitsverläufen kann eine komplett ausbleibende humorale Immunantwort auftreten und zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

Die Virusisolation durch Anzucht des Lassa-Virus ist *in vitro* als auch *in vivo* möglich. Dieser sehr spezifische Nachweis ist jedoch zeitaufwendig, bedarf eines Sicherheitslabors der Stufe 4 und findet in Endemiegebieten daher keine Anwendung [124,125]. Sind entsprechende technische Voraussetzungen gegeben, findet die Anzucht krankheitsbegleitend zur Absicherung der Diagnose oder retrospektiv statt. Auch ein direkter Antigennachweis (NP oder GP) aus inaktiviertem Probenmaterial ist mittels ELISA außerhalb eines Hochsicherheitslabor möglich [123,126,127]. Allerdings ist dieser gegenüber der RT-PCR weniger sensitiv.

### 1.1.3.4 Pathogenese

Die Pathogenese des Lassa-Fiebers ist bis heute weitgehend ungeklärt. Nach Infektion von Makrophagen und dendritische Zellen in der Haut, Mukosa oder den Alveolen kann das Lassa-Virus über das periphere Kapillarsystem in das lymphatische System und den Blutkreislauf gelangen. Aufgrund der nahezu ubiquitären Expression des zellulären Rezeptors  $\alpha$ -Dystroglycan [55,128] kann sich das Lassa-Virus systemisch ausbreiten und viele Organe, wie Leber, Nieren, Milz, Lunge, Herz und Bauchspeicheldrüse sowie Schwannsche Zellen des zentralen Nervensystems infizieren. Diese Eigenschaft wird als Pantropismus bezeichnet. Entsprechend sind hohe Lassa-Virustiter in verstorbenen Patienten und experimentell infizierten Versuchstieren zu finden [102,103,129,130,131,132]. Vor allem die Leber wird massiv infiziert, niedrige ALT-Werte im Serum deuten aber auf einen geringen Schädigungsgrad der Leberzellen hin

[102,133,134]. Die erhöhten AST-Werte im Serum spiegeln vermutlich generalisierte Schädigungen von verschiedenen Geweben wider. Erhöhte LDH-, Lipase und Kreatin-Kinase-Werte in Seren akut Erkrankter unterstützen diese Vermutung [86]. Allerdings zeigen die histopathologischen Befunde insgesamt nur geringe Schädigungen der Gewebe und erklären nicht Organversagen und Tod [102,133]. Zudem konnte sowohl in Patienten als auch in experimentellen Tierstudien kein dramatischer Abfall von Gerinnungsfaktoren oder eine disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC) beobachtet werden, die zum schweren Krankheitsverlauf hätten beitragen können [135,136,137].

Auch wenn der Virustiter im Serum mit der Sterberate korreliert [99], ist vermutlich weniger die direkte Schädigung der Organe durch Virusreplikation ursächlich für Erkrankung und Tod. Vielmehr scheint eine durch Virusvermehrung ausgelöste pathophysiologische Kaskade den Tod herbeizuführen [138].

Eine mögliche Hypothese zur Pathogenese des Lassa-Fiebers ist die Dysregulation der Zytokinexpression, ähnlich einer Sepsis, während der Lassa-Virusinfektion. Unterstützt wird die These durch longitudinale Messungen verschiedenster Zytokine einer in Deutschland hospitalisierten Lassa-Fieberpatientin [86]. Dabei ging dem Tod unmittelbar eine starke Erhöhung proinflammatorischer Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  voraus. Allerdings zeigten andere Studien keinen Zusammenhang zwischen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ -Erhöhung und fatalem Ausgang der Lassa-Virusinfektion [139].

Verschiedene *in vitro* Experimente zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen virusinduzierter Immunsuppression und Pathogenese des Lassa-Fiebers geben könnte. So kann Lassa-Virus humane Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und Endothelzellen (HUVEC) infizieren und in ihnen replizieren. Jedoch werden von den Zellen proinflammatorische Zytokine (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 und CXC-Chemokine) nicht verstärkt exprimiert oder sekretiert. Ebenso wenig werden kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86) oder Aktivierungsmarker (CD69) vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert [140,141,142].

Dagegen werden diese Zellen durch Infektion des apathogen Mopeia-Virus aktiviert. Trotz vergleichbarer Virustiter exprimieren die Zellen verstärkt die Zelloberflächenmarker CD86, CD80, CD54, CD40 und Zytokine IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 [143]. Zudem konnte in Kokultivierungsexperimenten mit humanen dendritischen Zellen und T-Zellen gezeigt werden, dass mit Mopeia-Virus infizierte DCs früh und stark CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aktivieren und proliferieren lassen. Dagegen war die Aktivierung von T-Zellen durch Lassa-Virusinfizierte DCs in diesen *in vitro* Studien eher gering [144]. Werden diese *in vitro* Daten auf die Situation *in vivo* übertragen, lässt sich eine Kontrolle der Mopeia-Virusinfektion durch die frühe Aktivierung der DCs und Makrophagen (*antiviral state*-Induktion durch IFN- $\beta$ ) im Zusammenspiel mit früh aktivierten T-Zellen vermuten und

würde den Unterschied in der Pathogenität zur Lassa-Virusinfektion erklären. Eine entscheidende Rolle von Typ-I-Interferonen bei der Kontrolle der Lassa-Virusinfektion konnte durch künstliche Stimulation der Interferonexpression mit LPS und poly(IC) in mit Lassa-Virus infizierten Makrophagen und DCs abgeleitet werden [145].

#### **1.1.3.5 Tiermodelle für das Lassa-Fieber**

Neben der Optimierung von Diagnose und Therapie steht die Charakterisierung der zu Grunde liegenden Pathogenesemechanismen des Lassa-Fiebers im Mittelpunkt der Lassa-Virusforschung. Schon wenige Jahre nach der Erstbeschreibung des Lassa-Fiebers wurden tierexperimentelle Studien durchgeführt, die den Krankheitsverlauf im Menschen widerspiegeln sollten. So wurden experimentelle Lassa-Virusinfektionen vor allem in Rhesusaffen beschrieben, die im klinischen und histopathologischen Bild dem humanen Lassa-Fieber entsprechen [146]. Weitere Tiermodelle für Lassa-Fieber, teilweise auch mit Surrogatviren, folgten schnell. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick zu bestehenden Tiermodellen für das Lassa-Fieber. Dennoch gelang es nicht, Labormäuse verschiedener Inzuchtstämme als geeignetes Tiermodell zur Beschreibung der Lassa-Fieberpathogenese zu etablieren. Die getesteten Inzuchtmausstämme waren nicht suszeptibel für Lassa-Viren. Lediglich die intrazerebrale Injektion von LASV bei jungen Tieren führte zu uniletalen Ausgängen, spiegelten aber nicht die typische Lassa-Fiebererkrankung beim Menschen wider [147].

**Tabelle 1: Übersicht zu bestehenden Tiermodellen für das Lassa-Fieber.**

Tiermodell	Virus	Anwendung	Referenz
nichtmenschliche Primaten			
Rhesusaffe ( <i>Macaca mulatta</i> )	LASV	Pathogenese Vakzinierung Substanztestung	[115,116,129,132,137, 146,148]
	LCMV	Pathogenese Vakzinierung	[149,150,151,152,153, 154,155]
Weißbüschelaffe ( <i>Callithrix jacchus</i> )	LASV	Pathogenese Vakzinierung	[114,156]
Javaneraffe ( <i>Macaca fascicularis</i> )	LASV	Pathogenese Vakzinierung	[157,158,159,160,161]
	LCMV	Pathogenese	[149]
Totenkopffäffchen ( <i>Saimiri sciureus</i> )	LASV	Pathogenese	[131]
Mantelpavian ( <i>Papio hamadryas</i> )	LASV	Pathogenese Substanztestung	[162,163,164]
Nagetiere			
Meerschweinchen Inzuchtstamm 13 Inzuchtstamm 2 Hartley	LASV	Pathogenese Vakzinierung Substanztestung	[103,109,110,112,113, 115,131,165,166,167, 168]
	PICV	Pathogenese Substanztestung	[169,170,171,172,173, 174,175,176,177,178, 179]
Syrischer Hamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> )	LCMV	Pathogenese	[180]
	PICV	Pathogenese Substanztestung	[181,182,183,184,185]
	PIRV	Pathogenese	[186,187]
Inzuchtmäuse CBA C57BL/6 BALB/c	LASV	Pathogenese * Vakzinierung	[115,147,188,189,190, 191,192]
Vielzitzenratte ( <i>Mastomys natalensis</i> )	LASV	Pathogenese	[131]

\* intrazerebrale Infektion ohne widerspiegeln der LF-Erkrankung des Menschen

LASV = Lassa-Virus

LCMV = Lymphozytäres Choriomeningitis Virus

PICV = Pichinde-Virus

PIRV = Pirital-Virus

## 1.2 Zielsetzung

Das Lassa-Fieber ist in Westafrika jährlich für tausende Tote verantwortlich. Bei ungünstigen nosokomialen Lassa-Fiebersausbrüchen werden Letalitätsraten von bis zu 65% berichtet. Trotz intensiver Bemühungen, neue Therapeutika zu entwickeln, steht lediglich Ribavirin zur Behandlung von Lassa-Fieber zur Verfügung. Aufgrund der begrenzten Therapierbarkeit, dem Fehlen zugelassener Impfstoffe und nicht zuletzt aufgrund seiner Gefährlichkeit wird das LASV als Erreger der Kategorie A eingestuft und in Laboratorien der Sicherheitsstufe 4 gehandhabt.

Die pathophysiologischen Prozesse von der Virusinokulation bis zum Tod sind nur begrenzt am Menschen erforschbar. Daher sind Tiermodelle für das Lassa-Fieber von großer Bedeutung. Die Verfügbarkeit nichtmenschlicher Primaten oder Inzucht-Meerschweinchen und entsprechender Testsysteme sowie immunologischer und molekularbiologischer Basisdaten ist allerdings stark begrenzt. Auch bestehen massive Tierschutzbedenken besonders hinsichtlich der Primaten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher mausbasierte Tiermodelle für das Lassa-Fieber etabliert und der Pathogeneseprozess genauer charakterisiert werden. Da Mäuse nicht suszeptibel sind, sollten die transgene B6/HLA-A2.1-Maus (HHD-Maus) und die A129-Maus genutzt werden. Die HHD-Maus ist auf Basis der Inzuchtmaus C57BL/6 genetisch verändert und exprimiert homozygot das humane MHC-I HLA-A.2.1 anstatt der murinen MHC-I-Moleküle ( $H-2D^b(-/-) \beta 2m(-/-)$ ). Dadurch ist das Repertoire an präsentierten Epitopen auf das humane HLA-A.2.1-Molekül eingeschränkt, was die Suszeptibilität erhöhen könnte. Zudem zeigten experimentelle Infektionen mit LCMV WE eine schwere systemische Infektion (persönliche Mitteilung von Dr. Flatz).

Eine fehlende Typ-I-Interferonantwort in der Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor-defizienten Maus (A129) lässt ebenfalls eine erhöhte Suszeptibilität erwarten und macht sie zugleich interessant für ein potentielles Tiermodell. Die Eignung der Tiermodelle zur Testung von antiviralen Substanzen sollte auch überprüft werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Nukleinsäuren

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen. Eine detaillierte Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang dieser Arbeit zu finden.

### 2.2 Zelllinien, Virusstämme und Mäuse

<b>Zelllinie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Vero Riems-Zellen	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Insel Riems
<i>Baby Hamster Kidney-J</i> Zellen (BHK-21/J; Abkömmlinge der BHK-21-Zellen [193])	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie
Mausfibroblasten L929	Dr. Bruns, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg

<b>Viren</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Lassa-Virus Stamm AV	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie, Stammsammlung
Lassa-Virus Stamm Nig10	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie, Stammsammlung
Lassa-Virus Stamm CSF	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie, Stammsammlung
Lassa-Virus Stamm Josiah	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie, Stammsammlung
Lassa-Virus Stamm NL	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie, Stammsammlung
Lassa-Virus Stamm Lib90	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie, Stammsammlung
Lassa-Virus Stamm Ba366	Ter Meulen J., Marburg
Lassa-Virus Stamm Ba289	Ter Meulen J., Marburg
Lassa-Virus Stamm Ba377	Ter Meulen J., Marburg
Lassa-Virus Stamm Ba283	Ter Meulen J., Marburg
Lassa-Virus Stamm Ta491	Ter Meulen J., Marburg
Lassa-Virus Stamm Dgd43	Ter Meulen J., Marburg
Mopeia-Virus Stamm BNI	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie, Stammsammlung
LCMV WE	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie, Stammsammlung

<b>Maus</b>	<b>Genetischer Hintergrund</b>	<b>Bezugsquelle</b>
HLA A2.1 (HHD)	H-2K <sup>b+/+</sup> , H-2D <sup>b-/-</sup> , $\beta$ 2m <sup>-/-</sup> [194]	Prof. Pinschewer, Universität Zürich
HLA A2.1xB6 F1	H-2K <sup>b+/+</sup> , H-2D <sup>b+/-</sup> , HLA A2.1 <sup>+/-</sup> , $\beta$ 2m <sup>+/-</sup>	Prof. Pinschewer, Universität Zürich
MHC-I <sup>-/-</sup>	H-2K <sup>b+/+</sup> , H-2D <sup>b+/+</sup> , $\beta$ 2m <sup>-/-</sup> [195]	Prof. Pinschewer, Universität Zürich
MHC-II <sup>-/-</sup>	H-2K <sup>b+/+</sup> , H-2D <sup>b+/+</sup> , MHC-II <sup>-/-</sup> [196]	Prof. Pinschewer, Universität Zürich
C57BL/6 (B6)	H-2K <sup>b+/+</sup> , H-2D <sup>b+/+</sup>	Prof. Pinschewer, Universität Zürich
A129	129Sv/Ev, IFNAR <sup>-/-</sup> [197]	Prof. Pinschewer, Universität Zürich

Von den Mausstämmen HHD und A129 wurden Zuchtpaare am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin angelegt.

## 2.3 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-LASV NP (2F1) monoklonaler Maus-Antikörper	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie
Anti-MOPV NP (5D9/2) monoklonaler Maus-Antikörper	Bernhard-Nocht-Institut, Virologie
Anti-LCMV NP (mAb Nr.53 Ascites) monoklonaler Maus-Antikörper	Dr. Bruns, Heinrich-Pette- Institut, Hamburg
AffiniPure Schaf Anti-Maus IgG (H+L), Peroxidase-Konjugat (515-035-003)	Jackson Immuno Research Laboratories
AffiniPure Ziege Anti-Maus IgG (H+L), FITC-Konjugat (115-095-003)	Jackson Immuno Research Laboratories
Esel anti-Ratte IgG (H+L) Alexa488-Konjugat	Molecular Probes
YTS169.4 (Ratte anti-CD8)	Prof. Pinschewer, Universität Zürich
YTS191.6 (Ratte anti-CD4)	Prof. Pinschewer, Universität Zürich

## 2.4 Enzyme und Kits für molekularbiologisches Arbeiten

Enzyme	Bezugsquelle
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Kits	Bezugsquelle
DNA Größenmarker, Gene Ruler™ 1 kB	Fermentas
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey & Nagel
OneStep RT-PCR-Kit	Qiagen
QIAamp® Viral RNA Kit	Qiagen

## 2.5 Chemikalien, Medien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
Agarose <i>SeaKem</i> ®	Roth
Ampuwa®, Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi
Bromphenolblau	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
DMEM	PAA
Earle's MEM	PAA
Ethanol 100%	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Formaldehyd, 37% zur Synthese	Roth
Fötale Kälberserum	PAA
Hank's BSS	PAA
Heparin-Natrium	Braun
Isofluran, Forane®	Abbott
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumhydrogenphosphat	Roth
L-Glutamin	PAA
Methylenblau	Roth
Methylcellulose	Sigma
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumchlorid-Lösung 0,9%, steril	Fresenius Kabi
Natriumcitrat	Merck
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA
Penicillin (100x)	PAA
Pyruvat (100x)	PAA
Ribavirin	MP Biomedicals
Sucrose	Roth
SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain	Roth
TMB-Substrat	Mikrogen
Tris/HCl	Roth
Triton X-100	Roth
Xylencyanol FF	Roth

## 2.6 Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
<u>Zellkulturmedien</u>		
Komplett-DMEM	DMEM	430 ml
	FKS	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (100x)	5 ml
	L-Glutamin (100x)	5 ml
	nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	5 ml
	Pyruvat (100x)	5 ml
Komplett-MEM	MEM	442,5 ml
	FKS	37,5 ml
	Penicillin/Streptomycin (100x)	5 ml
	L-Glutamin (100x)	5 ml
	Pyruvat (100x)	5 ml
	nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	5 ml
Infektionsmedium	MEM	97 ml
	FKS	2 ml
	Penicillin/Streptomycin (100x)	1 ml
Methylcellulose-Overlay Medium für Immunofocus-Assay, 0,96%	Methylcellulose	8,4 g
	ddH <sub>2</sub> O	300 ml
	Über mehrere Stunden bei RT mit Magnetrührer lösen und anschließend autoklavieren. Bei 8°C lagern.	
	gelöste Methylcellulose	17 ml
	DMEM	33 ml
<u>Allgemeine Lösungen</u>		
10x PBS, steril, pH 7,5	NaCl	80 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	26,8 g/l
	KCl	2 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g/l
	dH <sub>2</sub> O	ad 1 l
<u>Agarosegelelektrophorese</u>		
50x TAE (Tris-Acetat), pH 7,8	Tris/HCl	2 M
	Natriumacetat	0,25 M
	EDTA	0,05 M
6x Probenauftragspuffer	Xylencyanol FF	0,15 %
	Bromphenolblau	0,15 %
	Sucrose	40 %
	in dH <sub>2</sub> O	

Immunofocus-Assay

Inaktivierungslösung	Formaldehyd in 1x PBS	4 %
Permeabilisierungslösung	Triton X-100 in 1x PBS	0,5 %
<i>Blocking</i> -Lösung	FKS in 1x PBS	10 %
<u>Blutchemische Analyse</u>		
Probeninaktivierungslösung	Triton-X-100 in 0,9% NaCl-Lösung	1 %

**2.7 Verbrauchsmaterial**

<b>Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Insulinspritzen 29G, 0,5 ml oder 1ml	BD Becton Dickinson
Kodak Scientific Imaging Film 18 x 24 cm X-OMAT™ LS	Kodak
Lysing Matrix D	MP Biomedicals
Reflotron® Teststreifen: AST, ALT, Amylase	Roche
Serumröhrchen	BD Becton Dickinson
Skalpell Fig. 11	Swann-Morton
Spotchem™ Liver-1	Axonlab

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten, hier nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien, sowie sämtliche Plastikwaren, wurden von den Firmen Sarstedt, PAA, Millipore, Biozym, Greiner, Roth und Nunc bezogen.

**2.8 Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Agarose-Gelelektrophoresekammer Sub Cell GT	Biorad
Blaulicht Transilluminator Bio View	Biostep
FastPrep® Instrument	Q BIOgene
Fluoreszenzmikroskop Leica DM RA	Leica
Inkubator mit CO <sub>2</sub> -Begasung (Hera Cell 150)	Thermo Electron Corporation
Neubauer-Zählkammer	Brand
Photometer	Eppendorf
Reflotron®	Roche
Rotlichtlampe	Philips
Spotchem™ EZ SP4430	Axonlab
Thermocycler Advanced Primus 25	PeqLab
Thermomixer comfort	Eppendorf
UV-Geldokumentationsanlage	Kodak
UV-Tisch	Roth
Waage	KERN

Zentrifugen:

Gekühlte Tischzentrifuge „Centrifuge 5415 R“	Eppendorf
Tischzentrifuge „Centrifuge 5415 D“	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5804 R	Eppendorf

**2.9 Software****Software****Bezugsquelle**Bildbearbeitung:

Photoshop CS3 Extended	Adobe
------------------------	-------

Textverarbeitung:

Word 2011	Microsoft
Endnote X4	ISI

Graphiken:

CorelDraw 12 (CorelDraw Graphics Suite 12)	Corel
Powerpoint 2011	Microsoft

Tabellenkalkulation:

Excel 2011	Microsoft
Prism® 5	GraphPad Software

Sequenzanalysen:

MacVector	MacVector, Inc.
Lasergene® Core Suite	DNASTAR, Inc

## 3 METHODEN

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 *In vitro* Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: *Polymerase Chain Reaction*, PCR) ermöglicht die gezielte Amplifikation eines DNA-Abschnittes, der durch die Bindungsstellen zweier spezifischer Oligonukleotid-Primer definiert wird. In einer zyklischen Wiederholung wird die doppelsträngige Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 94-98°C in Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Anschließend wird, abhängig von der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Oligonukleotid-Primer, bis zu einer Temperatur abgekühlt, die die Anlagerung der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz ermöglicht (*Annealing*). Die enzymatische Kettenverlängerung (Elongation) findet im Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase (72°C) statt und richtet sich in ihrer Dauer nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes und der Prozessivität der Polymerase. Mit jedem Zyklus wird die Kopienzahl der Zielsequenz verdoppelt.

#### Standard PCR mit der Phusion-Polymerase

Zur Amplifikation zur Reamplifikation von PCR-Produkten wurde die Phusion High Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes) verwendet. Verbunden mit einer hohen Prozessivität verfügt diese Polymerase über eine 3'-5'-Exonuklease (*proofreading*) Aktivität, durch die 3' fehlgepaarte Basen korrigiert und somit auch bei sehr langen PCR-Produkten äußerst niedrige Fehlerraten erreicht werden. Im Folgenden ist ein Standardansatz dargestellt:

#### Standard-PCR-Ansatz

Template DNA (10 ng)	1	µl
Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	1	µl
Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	1	µl
dNTP-Gemisch (10 mM)	1	µl
5x PCR Reaktionspuffer <i>Phusion HF</i>	10	µl
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,5	µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 50	µl

Innerhalb des folgenden allgemeinen PCR-Temperaturprofils wurden die angezeigten Reaktionsparameter für *Annealing* und *Elongation* entsprechend der verwendeten Primer und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes variiert.

Initiale Denaturierung	98°C	1 min	
Denaturierung	98°C	10 s	} 30 x
<i>Annealing</i>	55°C	10 s	
<i>Elongation</i>	72°C	30 s/kb	
<i>Final-Elongation</i>	72°C	5 min	
	8°C	∞	

### 3.1.2 Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der reversen Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) katalysieren RNA-abhängige DNA-Polymerasen das Umschreiben von RNA zu komplementären DNA-Strängen (cDNA). Die cDNA wird anschließend als Matrize zur Amplifikation definierter Sequenzen in Standard-PCRs eingesetzt. Zur Sequenzierung von isolierter LASV-RNA (3.1.7) wurde die RNA mittels das OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) in DNA umgeschrieben und amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden im Gel aufgetrennt (3.1.3), aufgereinigt (3.1.4 bzw. 3.1.5) und zur Sequenzierung (3.1.6) versandt.

#### RT-PCR-Ansatz

Template RNA	2	µl
Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	0,4	µl
Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	0,4	µl
dNTP-Gemisch (10 mM)	0,4	µl
5x Reaktionspuffer	4	µl
Enzymgemisch	1	µl
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st.	ad 20	µl

Der Ansatz wurde bis zur Verwendung bei 4°C im Kühlblock gekühlt. Im Primus25 advanced-Thermocycler (PeqLab) wurde folgendes Temperaturprogramm genutzt.

Reverse Transkription	50°C	30 min	
Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase	95°C	15 min	
Denaturierung	95°C	15 s	} 30 x
<i>Annealing</i>	55°C	15 s	
<i>Elongation</i>	72°C	1 min/kb	
	8°C	∞	

### 3.1.3 Standard-Agarosegelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA erfolgte größenabhängig mittels horizontaler Flachbettgelelektrophorese. Die Agarosekonzentration wurde je nach Größe der zu analysierenden Nukleinsäurefragmente gewählt und lag zwischen 0,7-2% (w/v) gelöst in 1x TAE-Puffer. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,17-fachem Volumen 6x Probenpuffer versetzt. Zur Größenbestimmung der Nukleinsäurefragmente wurde parallel zu den Proben ein Längenstandard bekannter DNA-Molekül-Größen bei konstanter Spannung von 100-140 V in TAE-Puffer aufgetrennt. In analytischen Gelen wurde die DNA anschließend mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder 366 nm einer Photodokumentationsanlage detektiert und dokumentiert. In einem 0,8-1%-igen präparativen Agarosegel aufgetrennte DNA-Fragmente konnten bei Bedarf, nach Visualisierung der Nukleinsäuren auf dem Blautisch mittels SYBR-Green (1:1000 in 1x TAE-Puffer), ausgeschnitten und wie unter Abschnitt 3.1.4 beschrieben zurückgewonnen werden.

### 3.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Gewinnung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels *NucleoSpin Extract II* Kit der Firma Macherey & Nagel. Die gewünschten, mit SYBR-Green angefärbten DNA-Fragmente wurden aus einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und nach den Angaben des Herstellers extrahiert. Die erfolgreiche Elution wurde abschließend mittels Agarosegelelektrophorese (3.1.3) überprüft.

### 3.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden, sofern die Auftrennung in einem präparativen Agarosegel und anschließende Extraktion wie unter 3.1.4 beschrieben unnötig waren, direkt nach der PCR-Reaktion mit dem *NucleoSpin Extract II* Kit der Firma Macherey & Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Aufreinigungskontrolle erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (3.1.3).

### 3.1.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA Proben erfolgte durch SeqLab Sequence Laboratories Göttingen. Die zu sequenzierenden Proben wurden den Empfehlungen der Sequenzierungsfirma entsprechend vorbereitet.

### 3.1.7 Isolation von Virus-RNA

Die Isolation von viraler RNA aus Zellkulturüberstand erfolgte mittels *QiaAmp<sup>®</sup> Viral RNA Mini* Kit der Firma Qiagen, wobei die RNA selektiv an eine Silicagelmembran gebunden

und aufgereinigt wurde. Die Aufreinigung wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wird die RNA durch 560 µl AVL-Puffer (10 mg/ml *Carrier*-RNA) unter stark denaturierenden Bedingungen aus 140 µl virushaltigem Zellkulturüberstand isoliert, in 560 µl Ethanol aufgenommen und durch Zentrifugation an die Silicagelmembran gebunden. Kontaminationen wurden durch Waschen der Säule mit zwei verschiedenen Ethanol-haltigen Puffern entfernt, die RNA durch RNase-freies Wasser von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### **3.1.8 ELISA zur IL-12p40-Bestimmung**

Bestimmung der IL-12p40 Konzentration erfolgte im IL-12p40-ELISA (eBioscience) nach Herstellervorgaben. Dazu wurde Serum mit Triton-X-100 ( $f_c = 1\%$  [v/v]) in Natriumchlorid-Lösung virusinaktiviert. Die Analyse wurde von Dr. Doron Merkler (Göttingen) durchgeführt.

### **3.1.9 Blutchemische Analysen**

Mittels Reflotron® wurden im Serum die Parameter Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Amylase bestimmt. Laktat-Dehydrogenase (LDH) wurden mittels Spotchem™ analysiert. Aufgrund der geringen Serummengen musste zur Analyse in steriler Natriumchlorid-Lösung verdünntes Material eingesetzt werden. Zur Bestimmung der Parameter außerhalb des Hochsicherheitslabors wurde das Probenmaterial mit Triton-X-100 ( $f_c = 1\%$  [v/v]) in Natriumchlorid-Lösung inaktiviert. Sollten mehr als drei Parameter untersucht werden, wurden die Seren einer Mausgruppe an jedem Abnahmetag gepoolt.

## **3.2 Zellbiologische Methoden**

### **3.2.1 Kultivierung adhärenter Zellen**

Die adhärent wachsenden eukaryotischen Zelllinien wurden in entsprechendem Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in sterilen Zellkulturflaschen gehalten. Die Kultivierung von BHK-21/J-Zellen erfolgte in Komplett-MEM, die von Vero Riems- und L929-Zellen in Komplett-DMEM. Zur Passage wurden die 70-100% konfluent gewachsenen Zellen mit sterilem 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung für etwa 5 min bei 37°C vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Um die durch Trypsin/EDTA verursachte Proteolyse abzustoppen, wurden die Zellen in mindestens 2x Vol Medium aufgenommen, resuspendiert, gezählt und in einer gewünschten Konzentration in einer neuen Gewebekulturflasche ausgesät und weiter kultiviert.

Sollten die Säugerzellen längerfristig gelagert werden, wurden die konfluent gewachsenen Zellen gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zentrifugation bei 500 x g für 5 min wurde der Überstand verworfen, die Zellen in entsprechendem Nährmedium mit 10% DMSO aufgenommen, geeignete Volumina in Kryoröhrchen aliquotiert und umgehend bei -70°C für 24 h eingefroren. Anschließend wurden die Zellen zur Lagerung bei -180°C in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Reaktivieren derart gelagerter Zellen wurde der gesamte Inhalt eines Kryoröhrchens bei 37°C aufgetaut, tropfenweise mit Vollmedium gemischt und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 10 ml Vollmedium aufgenommen, in eine 25cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflasche ausgesät und im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.2.2 Bestimmung der Zahl lebender Zellen

Um nach Trypsin/EDTA-Behandlung die Zahl lebender Zellen zu ermitteln, wurde die Zellsuspension in einem Volumenverhältnis von 1:4 mit 0,04% Trypanblaulösung (in PBS) verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Da sich Trypanblau in die Zellmembran toter Zellen einlagert und blau anfärbt wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskopes nur die ungefärbten, lebenden Zellen in den vier Quadraten der Zählkammer gezählt. Anschließend konnte unter Betrachtung des definierten Zählkammervolumens und durch Verrechnung der gezählten Zellen mit dem Verdünnungsfaktor auf die Zellkonzentration/ml geschlossen werden:

$$\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ausgezählte Quadrate}^{-1}$$

### 3.2.3 Anzucht von Arenaviren

Sollten Zellen mit LASV, MOPV oder LCMV infiziert werden, wurden zunächst  $1 \times 10^6$  Zellen in einer 75cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflasche ausgesät und für 24 h kultiviert. Zur Infektion wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit Infektionsmedium mit einer MOI von 0,01-0,1 der verschiedenen Virusisolate für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Inokulat entfernt, die Zellen erneut gewaschen und schließlich in entsprechendem Vollmedium für 3-4 d bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Je nach Experiment wurde der Zellkulturüberstand zu bestimmten Zeiten nach Infektion abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Die Virusquantifizierung erfolgte mittels Immunofocus-Assay. Geerntete und in die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzte, infizierte Zellen wurden zur Kontrolle der Infektionsrate herangezogen.

### 3.2.4 Immunofocus-Assay

Die Quantifizierung nicht zytopathischer infektiöser Viruspartikel erfolgte durch Immunodetektion des Virusantigens innerhalb infizierter Zellareale (Foci). Hierzu wurden pro Kavität einer 24-*well*-Platte  $4,17 \times 10^4$  Vero-Zellen ausgesät und 24 h später mit 200 µl virushaltigem Probenmaterial in seriellen 10-fach Verdünnungen infiziert. Nach 1 h wurde das Inokulat entfernt und durch 1,5 ml Methylcellulose-DMEM-Overlay ersetzt. Nach fünf Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Overlay entfernt, die Zellen 20 min lang durch 4% Formaldehyd-PBS fixiert und die Viren inaktiviert. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, 20 min mit 0,5% Triton-X-100-PBS (400 µl/Kavität) permeabilisiert, erneut gewaschen und mit 200 µl/Kavität *Blocking*-Lösung) versetzt. Nach Inkubation für 1 h bei RT oder für 16 h bei 4°C wurde die *Blocking*-Lösung entfernt und der primäre, virusspezifische Antikörper in entsprechender Verdünnung in *Blocking*-Lösung (LASV L2F1: 1:30, MOPV, MOBV und Morogoro-Virus 5D9/2: 1:1000, LCMV mAB Nr.53: 1:250; 200 µl/Kavität) innerhalb 1 h bei RT gebunden. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Schaf Anti-Maus IgG, Peroxidase-Konjugat) für 1 h bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit 1x PBS erfolgte die Detektion mittels präzipitierendem Peroxidasesubstrat (TMB-Substrat, 200 µl/Kavität), das solange auf den Zellen verblieb, bis die infizierten Zellen als deutlich blaue Foci erschienen. Aus der Anzahl an Zellfoci einer Kavität, die auf einzelnen infektiösen Partikeln basieren, lässt sich im Anschluss der Virustiter als *Focus forming Unit*, FFU, pro ml berechnen.

Als Probenmaterial wurde Zellkulturüberstand, Blut in Heparin-HBSS und Organlysate genutzt. Nach Bestimmung des Gewichts wurden die Organe mittels Lysing Matrix D im FastPrep Instrument bei Stufe 5 für 2x 30 s lysiert. Bis zum Zentrifugieren bei 12000 x g für 1 min wurden die Lysate auf Eis gelagert. Für längere Aufbewahrungen wurden die Lysate bei -80°C gelagert.

### 3.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Kontrolle des Viruswachstums in infizierten Zellen und zur Testung des anti-LASV-NP-Serums wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet. Dabei kann das virale Antigen durch Bindung eines virusspezifischen Primärantikörpers, der seinerseits durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gebunden wird, indirekt unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Hierzu wurde ein Teil der infizierten Zellen nach Passage in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 900 x g für 1 min sedimentiert und sorgfältig in einem Volumenverhältnis von 1:1 in 1x PBS resuspendiert. Anschließend wurde ein geeignetes Volumen der Zellsuspension in die Vertiefung eines Objektträgers gegeben und unmittelbar danach wieder entfernt. Die verbliebene dünne Zellschicht

wurde bei RT getrocknet, für 15 min in Aceton fixiert und gleichzeitig das Virus inaktiviert. Nach erneutem Trocknen wurden 10 µl des ersten Antikörpers pro Vertiefung zugegeben. Zur Detektion des LASV-NP wurde der monoklonale Antikörper L2F1 1:10 in PBS verdünnt. Während für den Nachweis des MOPV-NP der monoklonale anti-MOPV Antikörper 5D9/2 (1:10 in PBS) verwendet wurde, erfolgte die Detektion des LCMV NP durch einen monoklonalen anti-LCMV-NP mAB Nr.53 Antikörper in einer 1:100 Verdünnung in PBS. Nach einer einstündigen Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C entfernte dreimaliges Waschen mit 1x PBS überschüssige Antikörper. Die Bindung des zweiten Antikörpers (anti-Maus Ziege IgG, FITC-Konjugat, 1:40 in PBS) wurde durch eine Inkubationszeit von 1 h bei 37° C in einer feuchten Kammer gewährleistet. Die Zellen wurden erneut gewaschen und fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

Zur Analyse der Spezifität des anti-LASV-NP-Serum aus der Ratte (hergestellt von Dr. Doron Merkler, Göttingen) wurden verschiedene Arenavirus-infizierte Zellen (LASV AV, Josiah, NL, LCMV, MOPV, Morogoro-Virus und Junin-Virus) auf 12well-Objektträger genutzt. Das Serum wurde in zweifach-Verdünnungsstufen von 1:40 bis 1:10240 in PBS getestet und ersetzte den Standard-Erstantikörper. Der Zweitantikörper Esel anti-Ratte IgG-Alexa 488 wurde 1:1000 in PBS eingesetzt.

### **3.3 Tierexperimentelle Methoden**

Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg und im Labor der Sicherheitsstufe 4 durchgeführt. Die eingesetzten Mäuse waren weiblich und zwischen 8 und 12 Wochen alt.

#### **3.3.1 Virusinfektion**

Die Infektion der Mäuse mit den Arenaviren erfolgte intravenös (i.v.) über eine Schwanzvene, intraperitoneal (i.p.), subkutan (s.c.) in die Nackenfalte, intramuskulär (i.m.) in die Oberschenkelmuskulatur oder intranasal (i.n.). Bei den beiden letztgenannten Techniken wurden die Tiere zuvor mit Isofluran narkotisiert. Das Virusmaterial wurde verdünnt in Infektionsmedium verabreicht.

#### **3.3.2 Blutabnahmen**

Im Versuchszeitraum wurden die Tiere ein- bis zweitägig hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes unter Berücksichtigung des Körpergewichtes beurteilt. Longitudinale Blutabnahmen zur Bestimmung blutchemischer, immunologischer und virologischer Parameter erfolgten zu den im Ergebnisteil angegebenen Tagen (meist an den Tagen 2, 4, 8, 11, 16 und 21 nach Infektion) durch Anritzen der Schwanzvene. Die Tiere waren dabei in einer Röhre fixiert und zuvor unter einer Rotlichtlampe für 4-5 min

erwärmt worden. Zur Viruslastbestimmung (3.2.4) wurden ca. 50 µl Vollblut in 950 µl HBSS-Puffer versetzt mit 2 U/ml Heparin überführt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Des Weiteren wurde Blut in Serumröhrchen gesammelt und nach 30 min Standzeit bei RT für 3 min 12000 x g zentrifugiert. Das Serum wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

### 3.3.3 Organentnahmen

Für Organentnahmen wurden an ausgewählten Tagen zufällig bestimmte Tiere einer Gruppe durch Isofluranüberdosierung und anschließender zervikalen Dislokation euthanasiert. Die entnommenen Organe wurden halbiert, wobei eine Hälfte bis zur Bestimmung der Viruslast (3.2.4) bei -80°C gelagert und die zweite Hälfte zum Teil weiter zerkleinert und zur histologischen Analyse in 4% (v/v) Formaldehyd in PBS überführt wurden. Nach 24 h Inkubation bei 4°C im Hochsicherheitslabor wurden die virusinaktivierten, fixierten Organe in 0,1% [w/v] Natriumazid in PBS umgelagert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4°C gelagert. Das Einbetten, Schneiden, Färben und Beurteilen der histologischen Präparate erfolgte durch Dr. Doron Merkler (Göttingen).

### 3.3.4 T-Zell-Depletion

Zur Depletion der CD4<sup>+</sup>- und/oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden an Tag drei und eins vor einer LASV-Infektion den Mäusen i.p. jeweils 250 µg der monoklonalen Antikörper YTS169.4 (anti-CD8) und/oder YTS191.6 (anti-CD4) gelöst in PBS appliziert. Die Depletionskontrolle erfolgte mit peripherem Blut am Tag der LASV-Infektion mittels Durchflusszytometer.

### 3.3.5 Applikation von Ribavirin

Ribavirin wurde in einer Konzentration von 40 mg x kg<sup>-1</sup> x d<sup>-1</sup> bzw. 80 mg x kg<sup>-1</sup> x d<sup>-1</sup> einmal täglich i.p. für 10 Tage beginnend 1 h nach Infektion appliziert. Dazu wurde Ribavirin in *Aqua dest.* gelöst, in Tagesverbrauchsmengen aliquotiert und bei -20°C zwischengelagert. Die Stammkonzentration von Ribavirin wurde so eingestellt, dass pro g Körpergewicht 10 µl Ribavirinlösung appliziert werden konnte. Die Placebobehandlung erfolgte mit 0,9%-iger Natriumchlorid-Lösung (10 µl/g Körpergewicht).

## 4 ERGEBNISSE

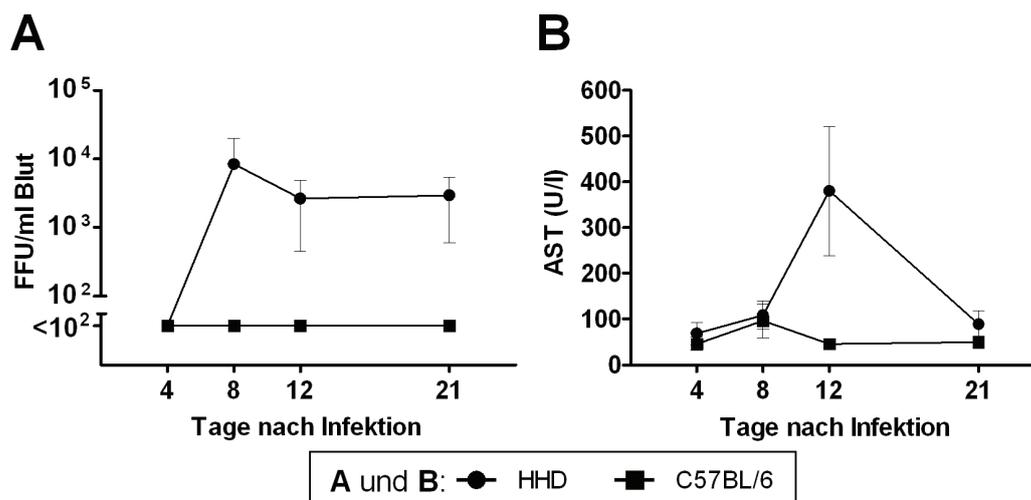
### 4.1 Etablierung des B6/HLA-A2.1 Mausmodells für Lassa-Fieber

#### 4.1.1 Identifizierung eines geeigneten Lassa-Virusisolates

Die transgene B6/HLA-A2.1-Maus (HHD) basiert auf der Standardinzuchtmaus C57BL/6. Durch doppelten *knock out* der Gene für die Moleküle H-2D<sup>b</sup> und  $\beta$ 2m werden keine murinen MHC-I-Moleküle exprimiert. Mit der Insertion des chimären HLA-A2.1-H $\beta$ 2m-cDNA in das Genom der H-2D<sup>b/-</sup>- $\beta$ 2m<sup>-/-</sup>-Maus wird das humane MHC-I-Molekül HLA-A2.1 exprimiert. Da die extrazelluläre  $\alpha$ 3-Domäne, die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne des MHC-I-Moleküls noch murinen Ursprungs sind, bleibt die Interaktion mit dem CD8-Molekül der T-Zellen und die intrazelluläre Signaltransduktion erhalten. Entsprechend sind die T-Zellen in der HHD-Maus ausschließlich auf das HLA-A2.1-Epitop restringiert [194]. Diese Maus steht im besonderen Fokus der T-Zell-Forschung. Experimentelle Infektionen mit LCMV WE zeigten eine schwere systemische Infektion in HHD-Mäusen nicht aber in C57BL/6 (persönliche Mitteilung von Dr. Flatz, Universität Zürich, Schweiz).

Zunächst sollte die Lassa-Fieber ähnliche Erkrankung der HHD-Maus, welche bei einer Infektion mit dem LCMV WE-Stamm auftritt, reproduziert werden. Dazu wurden in zwei unabhängigen Experimenten jeweils zwei HHD- und C57BL/6-Mäuse mit LCMV WE intravenös infiziert. Longitudinale Blutabnahmen dienten zur Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum und der Viruslast, sodass Rückschlüsse auf den Erkrankungszustand möglich waren [99].

In den C57BL/6-Mäusen konnte zu keinem Zeitpunkt Virus über dem Detektionshintergrund im Blut gefunden werden. Die AST-Werte im Serum waren nicht erhöht. Bei der HHD-Maus konnte dagegen eine massive Erkrankung beobachtet werden. Diese äußerte sich durch reduzierte Aktivität, gesträubtes Fell und den Tod einer Maus an Tag 8 nach Infektion. Makroskopisch war an der toten Maus ein Pleuraerguss zu erkennen. Im Exsudat war ein stark erhöhter AST-Wert von 4240 U/l messbar. Mit 380 U/l AST-Aktivität im Serum an Tag 12 nach Infektion zeigten auch die anderen HHD-Mäuse starke Anzeichen einer Erkrankung. Die Viruslast im Serum war an Tag 12 nach Infektion auf dem Maximalwert von etwa  $8,4 \times 10^3$  FFU/ml. Der Titer fiel zum Versuchsende nur leicht auf etwa  $2,9 \times 10^3$  FFU/ml an Tag 21 ab (Abbildung 3).



**Abbildung 3: LCMV WE Infektion von HHD- und C57BL/6-Mäusen.** Viruslast im Blut (A) und AST im Serum (B) von LCMV WE infizierten HHD- und C57BL/6-Mäusen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n = 4).

Diese Ergebnisse deuten an, dass MHC-Klasse-I-Moleküle, der einzige Unterschied zwischen HHD- und C57BL/6-Mäusen, wichtige Determinanten bei der Viruskontrolle und der Ausbildung einer Erkrankung infolge von LCMV WE-Infektionen in Mäusen sind. Infektionsversuche in der HHD-Maus sollten nun zeigen, ob eine Infektion mit Lassa-Virus eine ähnliche Erkrankung wie eine LCMV WE-Infektion hervorruft.

In ersten Experimenten sollte ein geeignetes Isolat gefunden werden, das eine Lassa-Fieber ähnliche Erkrankung hervorruft. Die Auswahl der Isolate aus dem institutsinternen Virusarchiv erfolgte unter der Berücksichtigung aller genetischen Linien des Lassa-Virus und des geographischen Isolationsursprunges. Lediglich aus der Linie I stand kein Virusisolat zur Verfügung. Mit je einem Virusisolat waren die Linien II und III vertreten. Von der Linie IV standen mit zehn Virusisolaten, darunter sechs direkt aus *Mastomys natalensis* isoliert, die meisten Lassa-Viren zur Verfügung. Lassa-Virusisolate, die zur Infektion von HHD-Mäusen genutzt wurden, sind in der Tabelle 2 aufgelistet. In diesem Screeningansatz wurden je Virusisolat 2-3 Tiere mit je 10<sup>5</sup> bzw. 10<sup>6</sup> FFU intravenös infiziert. Die Tiere wurden auf AST-Erhöhung im Serum hin untersucht.

Von allen getesteten Isolaten löste nur LASV Ba366 eine Erkrankung in den transgenen Mäusen aus, was sich durch einen erhöhten AST-Aktivitätswert von 134 U/l im Serum an Tag 8 zeigte. Insbesondere induzierte LASV Ba366 als einziges Isolat den Tod einer Maus. Aufgrund seiner Pathogenität wurde in weiteren Experimenten LASV Ba366 zur Etablierung und Beschreibung des Tiermodells für Lassa-Fieber genutzt (Tabelle 2).

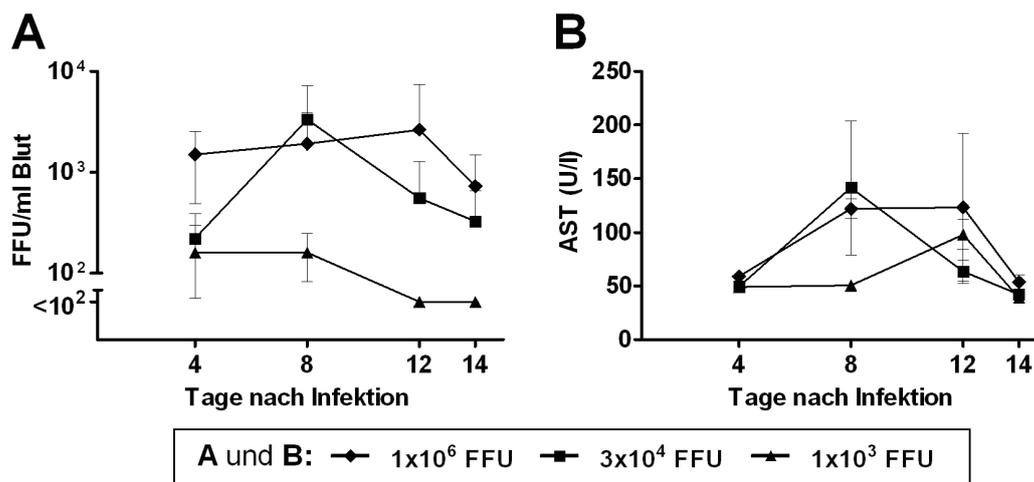
**Tabelle 2: Infektion von HHD-Mäusen mit verschiedenen LASV-Isolaten.** Je LASV-Isolat wurden 2-3 Tiere mit je  $10^5$  bzw.  $10^6$  FFU intravenös infiziert.

LASV-Isolat	Genetische Linie (Ursprung)	Erstisolation	Max. AST-Aktivität im Serum in U/l (Tag)
LASV Nig10	II (Nigeria)	Patient	38 (9)
LASV CSF	III (Nigeria)	Patient	52 (3)
LASV AV	IV (Elfenbeinküste)	Patient	60 (3)
LASV Josiah	IV (Sierra Leone)	Patient	60 (4)
LASV Lib90	IV (Liberia)	Patient	61 (20)
LASV NL	IV (Sierra Leone)	Patient	55 (3)
LASV Ba289	IV (Guinea)	<i>M. natalensis</i>	41 (6)
LASV Ba366	IV (Guinea)	<i>M. natalensis</i>	138 (8) #
LASV Ba377	IV (Guinea)	<i>M. natalensis</i>	83 (3)
LASV Ba384	IV (Guinea)	<i>M. natalensis</i>	56 (6)
LASV Dgd43	IV (Guinea)	<i>M. natalensis</i>	54 (20)
LASV Ta491	IV (Guinea)	<i>M. natalensis</i>	88 (3)

# an Tag 8 nach Infektion verstarb eine von 2 Mäusen

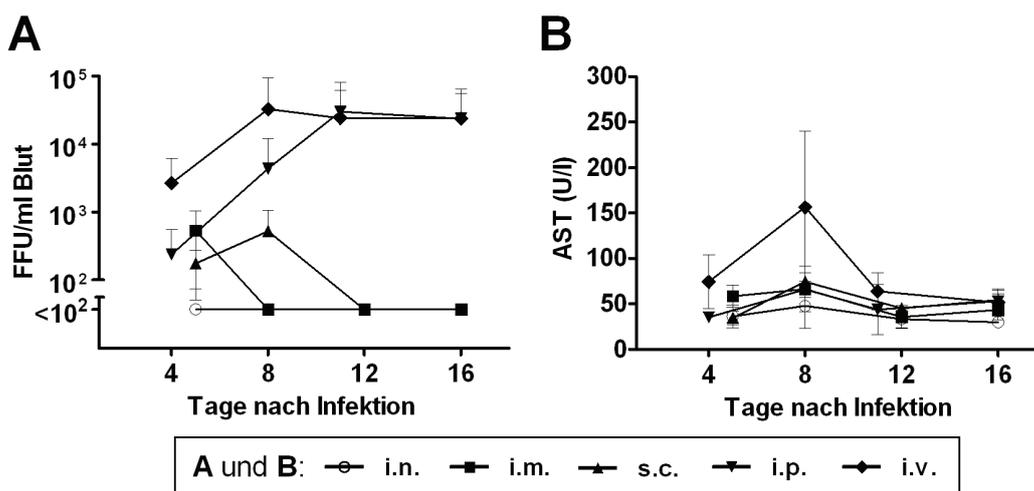
#### 4.1.2 Optimierung der Infektionsdosis und -route

Nachdem beim Screening intravenös und mit einer hohen Infektionsdosis operiert wurde, sollten Infektionsroute und -dosis optimiert werden. Ziel des Versuchs war es, einen möglichst schweren Krankheitsverlauf mit minimaler Infektionsdosis zu erzielen. Entsprechend wurden die Infektionsdosen  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^4$  und  $1 \times 10^3$  FFU ausgewählt. Jeweils 5 HHD-Mäuse wurden pro Dosis intravenös infiziert und mindestens 14 Tage beobachtet. Bei allen Infektionsdosen konnte LASV Ba366 eine systemische Infektion erzeugen. Es waren dosisabhängige Unterschiede in der Viruslast und der Höhe der AST-Werte im Serum festzustellen (Abbildung 4). Zudem starb in diesem Experiment jeweils ein Tier an der höchsten bzw. mittleren Lassa-Virusdosis. Der Grad der Erkrankung korrelierte mit der Infektionsdosis. Da bei der höchsten Infektionsdosis von  $1 \times 10^6$  FFU die schwersten Krankheitszeichen und höchsten Viruskonzentrationen gefunden wurden, erfolgten alle weiteren Mausexperimente mit LASV Ba366 und dieser Infektionsdosis.



**Abbildung 4: LASV Ba366-Infektion von HHD-Mäusen zur Optimierung der Infektionsdosis.** Viruslast im Blut (A) und AST im Serum (B) von LASV-infizierten HHD-Mäusen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=3). Die Infektion erfolgte intravenös mit drei verschiedenen Virusdosen (siehe Legende). Der Bruch der Messgrößenachse (A) repräsentiert die Nachweisgrenze.

Zur Optimierung der Infektionsroute wurden jeweils drei bis fünf HHD-Mäuse  $1 \times 10^6$  FFU LASV Ba366 entweder intranasal (i.n.), intramuskulös (i.m.), subkutan (s.c.), intraperitoneal (i.p.) oder intravenös (i.v.) appliziert. Über alle Infektionsrouten, bis auf intranasal, konnte eine Erkrankung hervorgerufen werden. Bei intravenöser Injektion der Lassa-Viren konnten die höchsten Viruslasten und AST-Werte gemessen werden (Abbildung 5).



**Abbildung 5: LASV Ba366 Infektion von HHD-Mäusen zur Optimierung der Infektionsroute.** Viruslast im Blut (A) und AST im Serum (B) von LASV-infizierten HHD-Mäusen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=3). Die Infektion erfolgte mit  $1 \times 10^6$  FFU. Der Bruch der Messgrößenachse (A) repräsentiert die Nachweisgrenze.

Dementsprechend wurden aufgrund des einheitlicheren Phänotyps innerhalb einer Gruppe in Bezug auf Erkrankung und Virusreplikation in weiteren Mausexperimenten mit LASV Ba366 die Infektionsdosis  $1 \times 10^6$  FFU und die intravenöse Route gewählt.

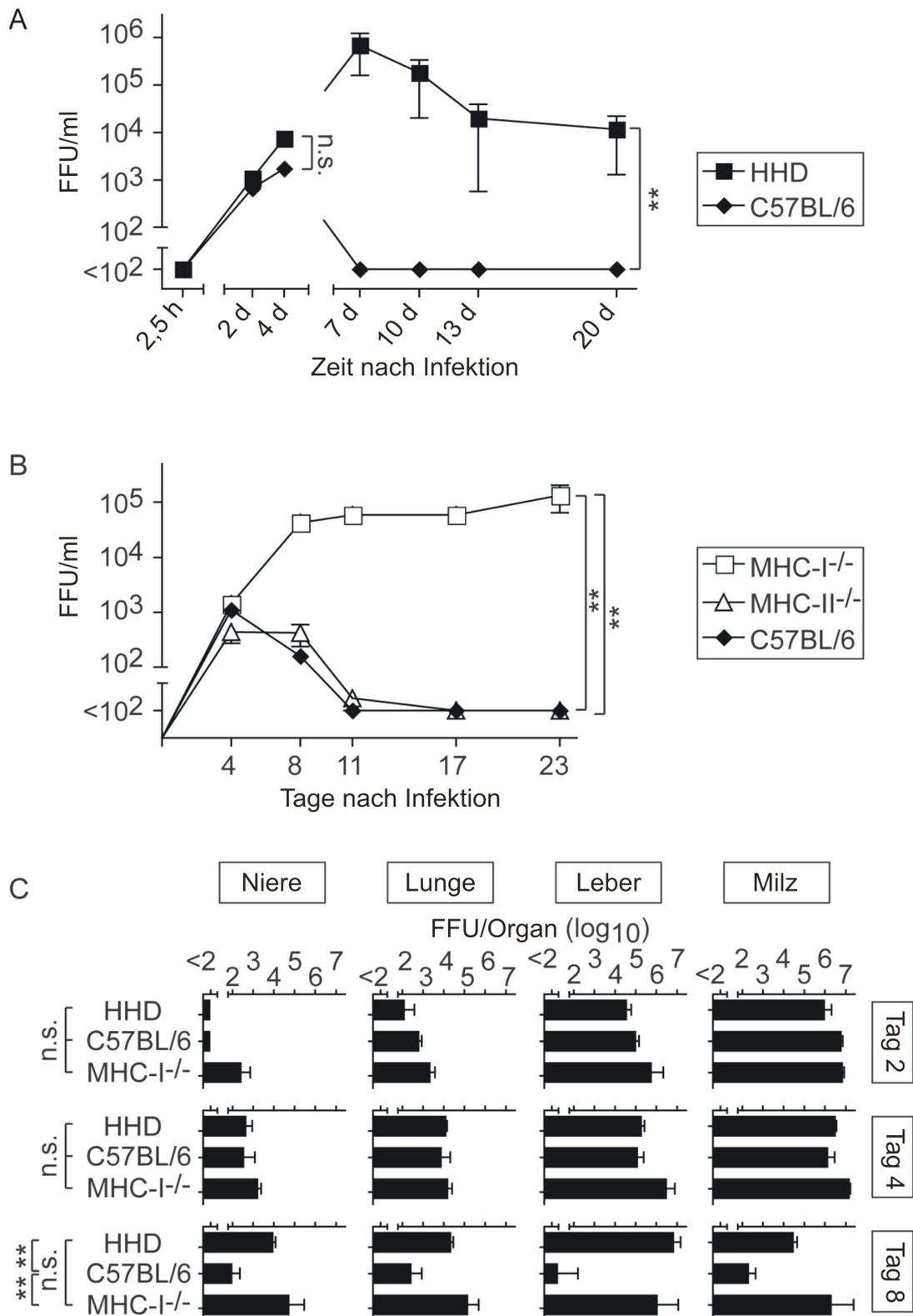
#### **4.1.3 Bedeutung von MHC-I und MHC-II bei der Kontrolle einer Lassa-Virusinfektion**

Wie auch LCMV WE verursachte LASV Ba366 in HHD-Mäusen nach intravenöser Inokulation eine Lassa-Fieber ähnliche Erkrankung mit teilweise tödlichem Ausgang und temporär sehr hohen Viruslasten im Blut. Nun sollte die Rolle der MHC-I-Moleküle, der einzige Unterschied zum genetischen Hintergrund C57BL/6, bei der Kontrolle der Virusreplikation und bei der Ausbildung der Erkrankung geklärt werden.

Dazu wurden zunächst HHD-Mäuse und C57BL/6-Wildtypmäuse mit LASV Ba366 infiziert. Bei der Analyse der initialen Infektionsphase konnte nach 2,5 h kein Virus mehr im Blut nachgewiesen werden. Bis an Tag 4 konnte in beiden Maus-Stämmen ein vergleichbarer Viruslastverlauf beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass alle Viren ins Gewebe aufgenommen wurden und an späteren Abnahmetagen im Blut detektierte Viren aus infizierten Zellen stammen. Erst nach 7 Tagen zeigten sich klare Unterschiede bei der Viruskontrolle. C57BL/6-Mäuse entfernten erfolgreich Viren aus der Blutbahn, HHD-Mäuse dagegen nicht. Wahrscheinlich ist die unterschiedliche Viruskontrolle auf die Unterschiede im adaptiven Immunsystem der Mausstämmen zurückzuführen (Abbildung 6 A).

Zur genauen Analyse der mechanistischen Ursachen wurde die Rolle der MHC-I- und MHC-II-restringierten T-Zellantwort bei der Kontrolle der Lassa-Virusinfektion genauer untersucht. MHC-II-defiziente Mäuse, die dementsprechend keine  $CD4^+$ -T-Zellantwort erzeugen können, und MHC-I-defiziente Mäuse ( $MHC-I^{-/-}$ ), die keine  $CD8^+$ -T-Zellantwort erzeugen können, wurden mit LASV Ba366 infiziert. Die MHC-II defizienten Mäuse kontrollierten die Infektion wie die C57BL/6-Mäuse effizient und eliminierten LASV mit vergleichbarer Kinetik. Dagegen etablierte sich eine persistente Infektion mit hohen Virustitern in MHC-I-defizienten Mäusen (Abbildung 6 B)

Virustiterbestimmungen in Niere, Lunge, Leber und Milz von infizierten HHD-, C57BL/6- und  $MHC-I^{-/-}$ -Mäusen an den Tagen 2, 4 und 8 nach Infektion zeigten eine vergleichbare Virusreplikation an den Tagen 2 und 4 in allen Mausstämmen. An Tag 8 nach Infektion war in den Organen der C57BL/6-Mäusen LASV Ba366 nur noch marginal nachweisbar. Dagegen zeigten die Organe von  $MHC-I^{-/-}$  und HHD an Tag 8 hohe Viruslasten. Unabhängig vom Mausstamm wiesen Milz, Leber und Lunge die höchsten Virustiter auf. In den Nieren waren jeweils die geringsten Viruslasten festzustellen (Abbildung 6 C).



**Abbildung 6: Bedeutung von MHC-I und MHC-II bei der Kontrolle einer LASV-Infektion.** Jeweils 5 Mäuse eines jeden Genotyps wurden mit LASV Ba366 infiziert. **A, B)** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut entnommen und die Viruslast bestimmt. **A)** Die Daten von den Abnahmezeitpunkten 2,5 h, 2 und 4 Tage stammen aus einem Experiment. In einem weiteren Experiment wurde das Blut von Tag 7 bis 20 analysiert. **C)** Jeweils 3 Mäuse wurden an Tag 2, 4 und 8 nach Infektion euthanasiert und die Viruslast in den Organen bestimmt. Der Bruch der Messgrößenachse repräsentiert die Nachweisgrenze. (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes)

Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass im wesentlichen die MHC-I-restringierte T-Zellantwort (CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) für die Kontrolle einer LASV-Infektion verantwortlich ist. Die MHC-II-restringierte T-Zellantwort (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) ist weniger bedeutsam.

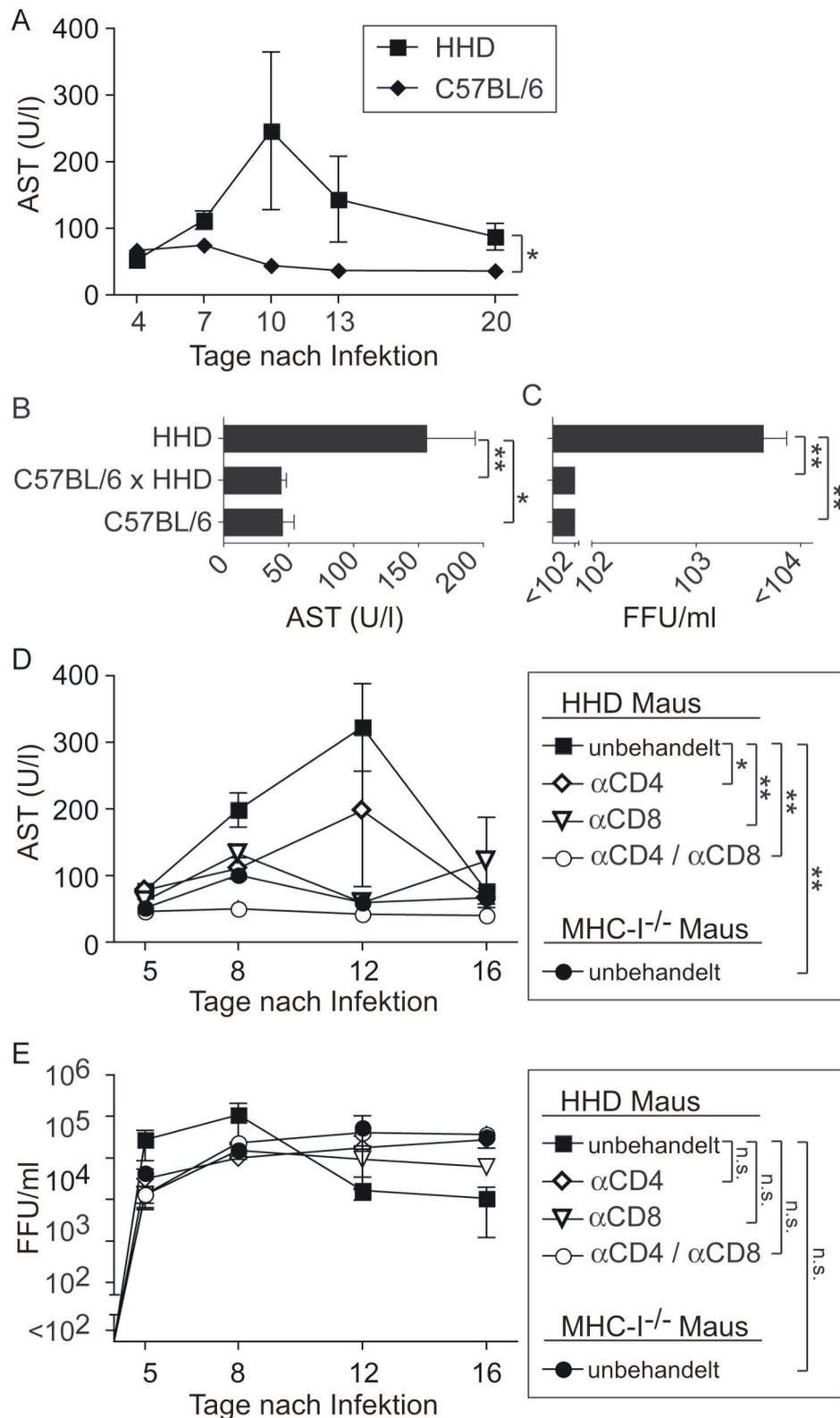
#### **4.1.4 Rolle der T-Zellen bei der Erkrankung von LASV-infizierten HHD-Mäusen**

Da in den Pilotexperimenten mit LASV Ba366 und LCMV WE einige der infizierten HHD-Mäuse verstarben und deutlich erhöhte AST-Werte im Serum zeigten, sollten die Immundeterminanten für die Ausbildung der Erkrankung genauer beschrieben werden.

Nach Infektion von HHD-Mäusen mit LASV Ba366 erreichte die Erkrankung der Tiere zwischen den Tagen 7 und 12 nach Infektion ihren Höhepunkt und äußerte sich durch reduzierte Aktivität und leicht gesträubtes Fell. Zum Teil verschlechterte sich der Zustand einiger Tiere innerhalb weniger Stunden so stark, dass sie verstarben. So wurde bei 5 von 23 LASV Ba366 infizierten HHD-Mäusen (ca. 20%) der Tod an Tag 7 oder 8 nach Infektion festgestellt. Dagegen zeigten alle 13 C57BL/6-Mäuse keine Anzeichen einer Erkrankung. Dies spiegelte sich auch in den gemessenen AST-Werten im Serum wieder, die in den C57BL/6-Mäusen an den untersuchten Tagen hauptsächlich im Normalbereich blieben. Dagegen waren insbesondere an den Tagen 8 bis 12 stark erhöhte AST-Werte im Serum der HHD-Mäuse messbar (Abbildung 7 A).

Um die Rolle der H-2K<sup>b</sup>/H-2D<sup>b</sup>- bzw. HLA-A2.1-restringierten T-Zellantwort bei der Kontrolle und Pathogenese einer LASV-Infektion genauer zu untersuchen, wurden C57BL/6- und HHD-Mäuse miteinander gekreuzt (Prof. Pinschewer, Universität Zürich). Die C57BL/6xHHD F1-Generation sollte die entsprechenden Gene für die H-2K<sup>b</sup>-, H-2D<sup>b</sup>- und HLA-A2.1-Moleküle hemizygot tragen. Die Infektion mit LASV Ba366 zeigte in den C57BL/6xHHD-F1-Mäusen einen vergleichbaren Verlauf wie in C57BL/6-Mäusen mit gleicher Kinetik in der Viruskontrolle und AST-Werten (Abbildung 7 B, C). Dies lässt den Schluss zu, dass H-2K<sup>b</sup>/H-2D<sup>b</sup>-restringierte T-Zellen auch in Anwesenheit HLA-A2.1-restringierter T-Zellen die Infektion kontrollieren und so vor einer Erkrankung schützen.

Dass immunpathologische T-Zell-abhängige Prozesse zur Erkrankung führen und nicht etwaige direkte Schädigungen durch eine hohe Viruslast, konnte bis jetzt nur indirekt gezeigt werden. Als nächstes wurde die Rolle der T-Zellen bei der Kontrolle und Pathogenese einer LASV-Infektion in der HHD-Maus direkt untersucht. Durch Applikation spezifischer Antikörper gegen Oberflächenmoleküle von T-Zellen ist es möglich, diese im Körper temporär bis zur Neubildung zu depletieren.



**Abbildung 7: Bedeutung der T-Zellen bei der Pathogenese.** **A)** C57BL/6 und HHD-Mäuse wurden mit LASV infiziert. Es sind die AST-Aktivitäten im Serum dargestellt. **B, C)** Vergleichende Darstellung der AST-Aktivität im Serum (**B**) und Virämie (**C**) an Tag 8 nach LASV-Infektion von C57BL/6-, HHD- und C57BL/6 x HHD F1-Mäusen. **D, E)** Infektion von unbehandelten oder CD8<sup>+</sup>- und/oder CD4<sup>+</sup>-T-Zell-depletierten HHD-Mäusen sowie MHC-I<sup>-/-</sup>-Mäusen mit LASV. Darstellung der AST-Aktivität im Serum (**D**) und Virämie (**E**) im Untersuchungszeitraum. Der Bruch der Messgrößenachse (**C, E**) repräsentiert die Nachweisgrenze. (Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes)

So wurden drei verschiedene Depletionsansätze von T-Zellen in HHD-Mäusen durchgeführt. An Tag drei und eins vor Infektion mit LASV Ba366 wurden den HHD-Mäuse entweder  $\alpha$ -CD4-,  $\alpha$ -CD8-Antikörper oder eine Kombination aus beiden intraperitoneal verabreicht. Die Depletionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie einmalig unmittelbar vor der Virusinokulation gemessen und lag bei >99%. Die T-Zell-depletierten Mäuse wurden parallel zu unbehandelten HHD-Mäusen und MHC-I-defizienten Mäusen untersucht. Alle Tiere hatten eine deutliche Virämie nach 5 Tagen, die bis zum Versuchsende anhielt. Trotz dieser hohen Viruslasten blieben die AST-Werte im Serum bei den CD4/CD8-doppeldepletierten HHD-Mäusen im normalen Bereich. Die Depletion nur einer T-Zellpopulation, CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>, bzw. das Fehlen der MHC-I-Moleküle in der MHC-I<sup>-/-</sup>-Maus war nicht hinreichend, um die Ausbildung einer Lassa-Fieber ähnlichen Erkrankung zu verhindern (Abbildung 7 D, E). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die T-Zellen der HHD-Mäuse zwar nicht in der Lage sind, die LASV-Infektion effizient zu kontrollieren, aber hinreichend sind, um eine essentielle Rolle bei der Pathogenese von Lassa-Fieber zu spielen.

#### **4.1.5 Histopathologische Veränderungen in LASV-infizierten HHD-Mäusen**

Zur Beurteilung von Gewebsschädigungen in LASV-infizierten Mäusen wurden histopathologische Analysen durchgeführt. Diese sollten Rückschlüsse auf direkte virusinduzierte Schädigungen oder immunpathologische Prozesse ermöglichen, die in der Pathogenese des humanen Lassa-Fiebers eine Rolle spielen können. Neben H/E-Färbungen zur Beurteilung des Gewebes wurden auch immunhistochemische Färbungen von T-Zellen (anti-CD3), Makrophagen (anti-Ibal) und Lassa-Virus infizierten Zellen (anti-LASV NP) in den Organschnitten durchgeführt. Die Spezifität des anti-LASV NP-Serums wurde zuvor mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Arenavirus infizierten Vero-Zellen sowie an LASV-infiziertem und nicht infiziertem Gewebe im Vergleich zum Präimmunserum ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Zur Analyse wurden Niere, Milz, Leber, Lunge, Herz und Hirn aus LASV-infizierten C57BL/6-, MHC-I<sup>-/-</sup>- sowie anti-CD8/CD4-behandelten und unbehandelten HHD-Mäusen entnommen. Dazu wurden die verstorbenen Tiere oder Mäuse, die in der ersten Infektionsphase euthanasiert worden waren, aufgearbeitet. Die entnommenen Organe wurden halbiert, wobei die eine Hälfte zur Bestimmung der Viruslast und die andere Hälfte zur histologischen Analyse genutzt wurden. Die histopathologische Analyse der Organproben erfolgte durch Dr. Doron Merkler (Neuropathologie, Universitätsklinikum Göttingen).

Bei der Analyse der Organproben zeigten sich die größten Veränderungen in Lunge, Leber und Milz der LASV-infizierten Mäuse. Detaillierte Befunde für Nieren, Herz und Hirn wurden nicht angefertigt.

#### 4.1.5.1 Histopathologische Veränderungen in der Lunge

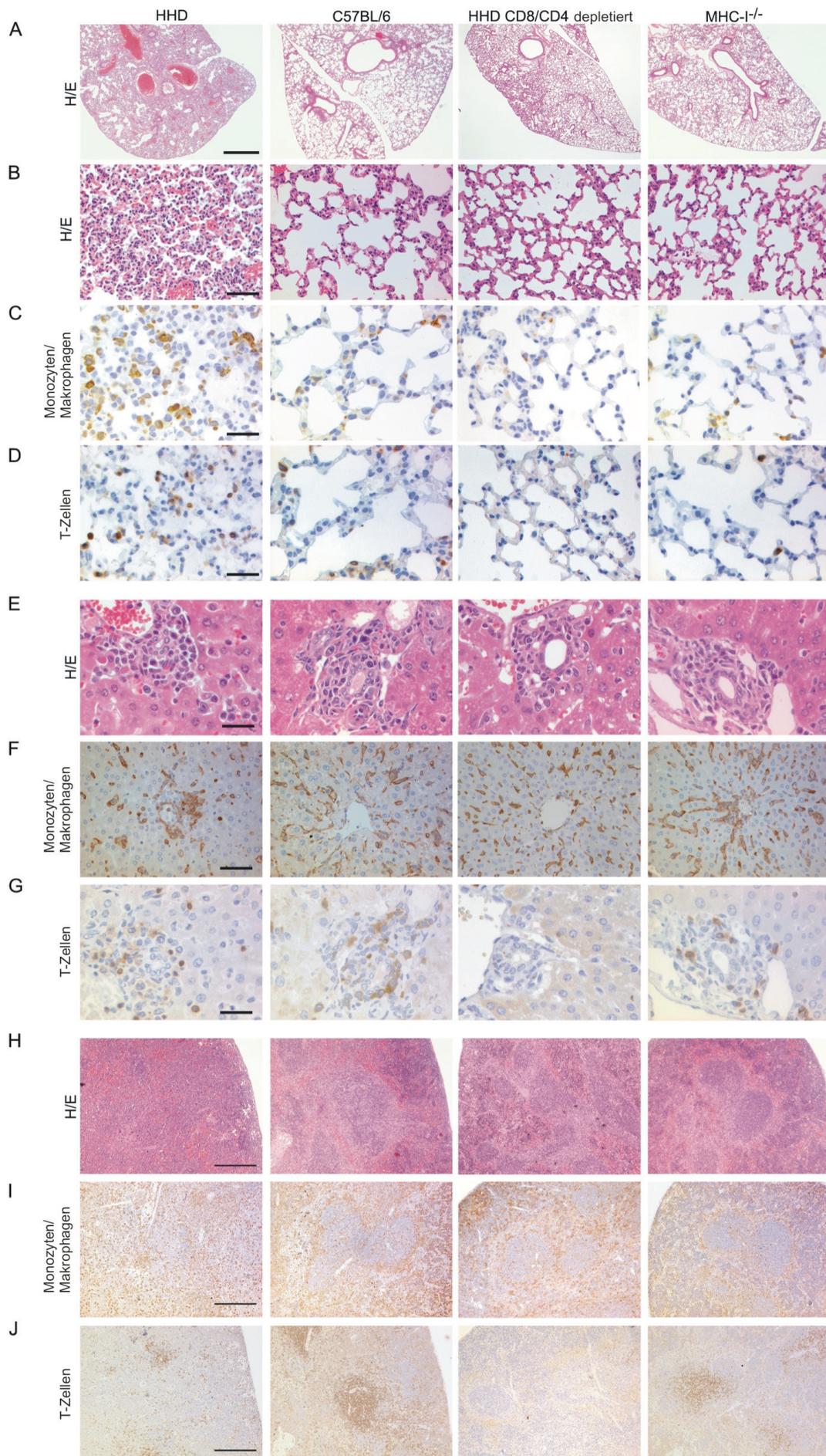
Am offenen Thorax LASV-infizierter HHD-Mäuse war am Krankheitshöhepunkt (um Tag 8 nach Infektion) häufig bis zu 0,5 ml Pleuralflüssigkeit festzustellen. Im mikroskopischen Bild war eine schwere Pneumonitis mit Alveolarwandverdickungen und kollabierten Alveolarlumen sichtbar. Beide Beobachtungen decken sich mit Beschreibungen beim humanen Lassa-Fieber [134,198]. Dagegen waren in den Lungen von C57BL/6-Mäusen an Tag 8 keine oder nur milde Anzeichen einer Erkrankung sichtbar. CD8/CD4-depletierte HHD-Mäuse, die keine AST-Erhöhungen im Serum zeigten, aber hoch virämisch waren, entwickelten keine pathologischen Veränderungen. In den Lungen von MHC-I<sup>-/-</sup>-Mäusen waren nur milde Zeichen einer Pneumonitis sichtbar. Bei der immunhistologischen Darstellung von Monozyten/Makrophagen mittels anti-Iba-1-Antikörper waren in den Lungen von HHD-Mäusen dichte Infiltrationen von abgerundeten Monozyten/Makrophagen sichtbar, ein Befund, der in den Lungen C57BL/6-, CD8/CD4-depletierter HHD- und MHC-I<sup>-/-</sup>-Mäusen weniger stark bzw. gar nicht vorhanden war. Eine geringe Akkumulation von T-Zellen wurde ebenfalls in den Lungen der HHD-Mäuse beobachtet. Da in den Lungen der LASV-resistenten C57BL/6-Mäuse ähnliche Infiltrationen sichtbar waren, scheinen diese nicht mit einer Erkrankung zu korrelieren (Abbildung 8 A-D).

#### 4.1.5.2 Histopathologische Veränderungen in der Leber

Mikroskopische Untersuchungen der Leberpräparate zeigten an Tag 8 Ansammlungen mononukleärer Zellen um die Periportalfelder. Der entscheidende Unterschied zwischen den Mausgruppen lag in der Verteilung, Form und Orientierung der Monozyten/Makrophagen (auch Kupffer-Zellen). Wie in nicht infizierten Mäusen (nicht dargestellt) formten die Monozyten/Makrophagen von C57BL/6- und CD8/CD4-depletierter HHD-Mäusen überwiegend eine dünne Zellschicht um die Lebersinusoide, die sternförmig zur Zentralvene orientiert waren. Dagegen war diese Zellschicht in HHD-Mäusen aufgelöst, die verbliebenen Zellen waren abgerundet, unorganisiert und zu Haufen akkumuliert. Diese Verteilung deutet stark auf eine Aktivierung der Monozyten/Makrophagen hin und ist ebenfalls ein markantes Merkmal des humanen Lassa-Fiebers [6,102,133,134,198]. In MHC-I<sup>-/-</sup>-Mäusen war wiederum ein intermediärer Zustand mit Anzeichen geringer Aktivierung der Monozyten/Makrophagen sichtbar. Im Leberparenchym und in den Periportalfeldern von HHD- und C57BL/6-Mäusen waren, wie auch in der Lunge, vergleichsweise wenige, gleichmäßig verteilte T-Zellen zu finden (Abbildung 8 E-G).

#### 4.1.5.3 Histopathologische Veränderungen in der Milz

Virale hämorrhagische Fieber gehen oft mit einer Immunsuppression einher. In einem Affenmodell für Lassa-Fieber wurde z.B. der Verlust der normalen Mikroarchitektur sekundärer lymphatischer Organe beobachtet [156]. Die Milz der LASV-infizierten HHD-Mäuse zeigte an Tag 8 vergleichbare Desorganisation mit Aufbruch der weißen und roten Pulpa. Die Milzen der C57BL/6-, CD8/CD4-depletierten HHD- und MHC-I<sup>-/-</sup>-Mäuse waren dagegen weniger stark verändert. Entsprechend waren Unterschiede auch bei Marginalzonen-Makrophagen zu sehen. Bei den HHD-Mäusen ging diese Schicht verloren, bei den anderen drei Mausgruppen dagegen nicht. Hier waren die Makrophagen gleichmäßig im gesamten Milzgewebe verteilt. T-Zellen waren in den anti-CD8/CD4-behandelten HHD-Mäusen wie erwartet weitestgehend depletiert. Eine LASV-induzierte T-Zelldepletion, wie sie im Affenmodell beobachtet wurde [156], war in HHD-Mäusen nur ansatzweise sichtbar. Eine Quantifizierung der T-Zelldichte in Milzen von LASV-infizierten HHD- und C57BL/6-Mäusen wurde von Toni Regen (Göttingen) durchgeführt und ergab jedoch vergleichbare Werte (am Tag 8:  $3339 \pm 925$  CD3<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> in HHD,  $3826 \pm 2057$  CD3<sup>+</sup>-Zellen/mm<sup>2</sup> in C57BL/6; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n= 6; p= 0,61). Das deutet darauf hin, dass eine T-Zelldepletion im Gewebe nicht ursächlich für die ineffiziente Viruseliminierung in der HHD-Maus ist (Abbildung 8 H-J).

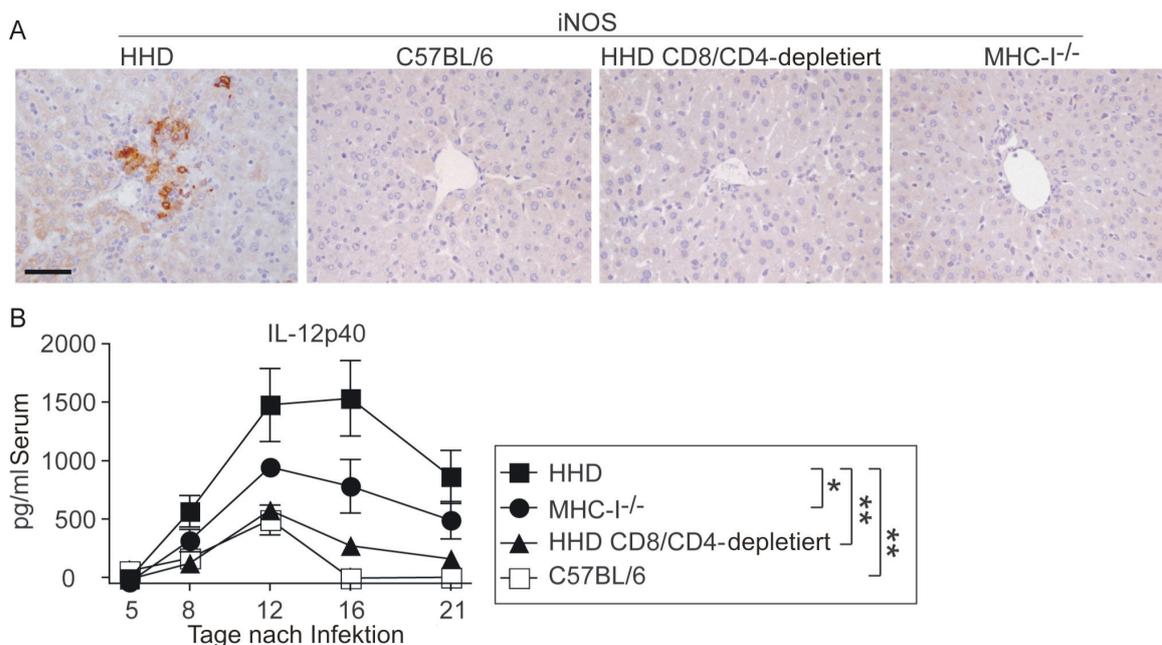


**Abbildung 8: Histopathologische Veränderungen in LASV-infizierten Geweben.** HHD-, C57BL/6-, MHC-I<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie CD8/CD4-depletierte HHD-Mäuse wurden mit LASV infiziert. An Tag 8 nach Infektion wurden die Tiere euthanasiert und Lunge (A-D), Leber (E-G) und Milz (H-J) für histologische Untersuchungen entnommen. H/E- (A, B, E, H) und immunhistochemische Färbungen der Monozyten/Makrophagen (anti-Iba-1: C, F, I) und T-Zellen (anti-CD3: D, G, J) sind gezeigt. Vergrößerungsbalken stehen für 1000 µm (A), 100 µm (B), 50 µm (C, D, F), 30 µm (E, G) und 200 µm (H, J). Bilder wurden von Dr. Doron Merkler (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.6 Weiterführende Untersuchungen zur Aktivierung von Monozyten/Makrophagen

Die beschriebenen morphologischen Veränderungen in Lunge, Leber und Milz von LASV-infizierten HHD-Mäusen deuten auf eine T-Zell-abhängige Aktivierung der Monozyten/Makrophagen in diesen Organen hin. Die klassische Aktivierung der Monozyten/Makrophagen erfolgt zum Beispiel durch das T-Zell-Zytokin IFN-γ oder durch Zell-Zellkontakt [199,200,201,202]. Aktivierte Monozyten/Makrophagen reagieren mit komplexen morphologischen Änderungen und mit Sekretion inflammatorischer Zytokine und Mediatoren, wie Stickstoffmonoxid (NO). Die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) synthetisiert NO und wird erst nach Aktivierung der Monozyten/Makrophagen exprimiert [199,200,201,202,203]. Demnach kann die iNOS als Marker für die inflammatorische Aktivierung der Monozyten/Makrophagen dienen [204].

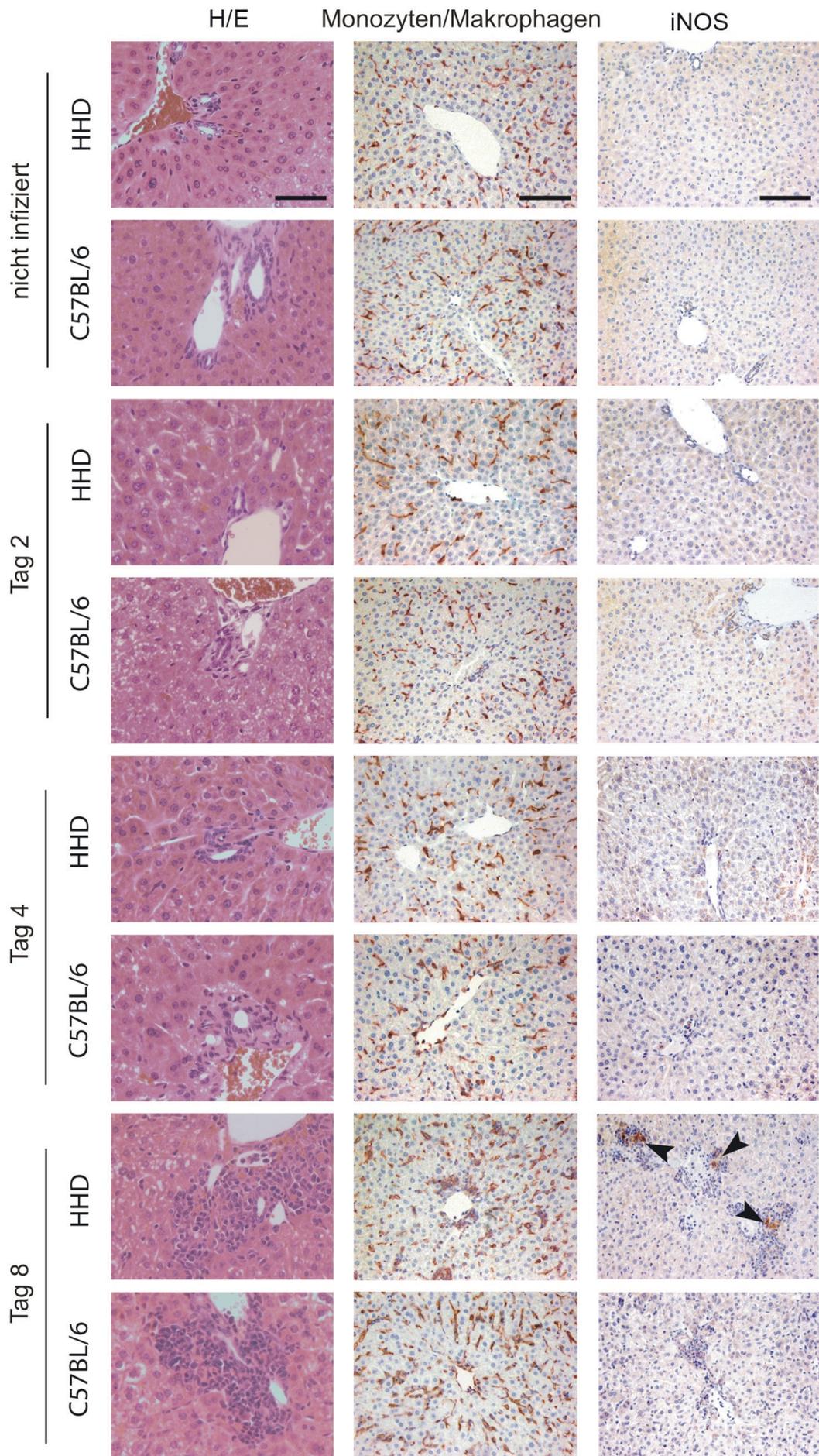
Durch spezifische Färbung mit anti-iNOS-Antikörper konnten an Tag 8 nach Infektion im Leberparenchym LASV-infizierter HHD-Mäuse zahlreiche iNOS-exprimierende Monozyten/Makrophagen detektiert werden. Dieser Befund war in der Leber von C57BL/6-, CD8/CD4-depletierten oder MHC<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag 8 nach LASV Ba366-Infektion nicht zu beobachten war (Abbildung 9 A). Es stellte sich die Frage, wann die iNOS-Expression in Monozyten/Makrophagen in LASV-infizierten HHD-Mäusen beginnt. Dazu wurden jeweils drei HHD- und C57BL/6-Mäuse an Tag 2, 4 und 8 euthanasiert und Makrophagen auf iNOS-Expression untersucht. Vor Tag 8 konnte keine iNOS-Expression in HHD- und C57BL/6-Mäusen beobachtet werden (Abbildung 10).



**Abbildung 9: Monozyten/Makrophagen produzieren inflammatorische Mediatoren.**

**A, B)** HHD-, C57BL/6-, MHC-I<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie CD8/CD4-depletierte HHD-Mäuse wurden mit LASV infiziert. **A)** An Tag 8 wurden zwei von fünf Tieren euthanasiert und das Lebergewebe auf iNOS-Expression untersucht. iNOS-positive Zellen sind braun und nach morphologischen Kriterien als Monozyten/Makrophagen identifiziert worden. Repräsentative Bilder sind gezeigt. Der Vergrößerungsbalken steht für 50 µm. **B)** Bestimmung der IL-12p40-Konzentration im Serum mittels ELISA. Bilder und Daten wurden von Dr. Doron Merkler (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Neben den histologischen Untersuchungen wurde Serum infizierter Mäuse auf erhöhte Monozyten/Makrophagen-spezifische Zytokine getestet. IL-12p40 wird insbesondere durch T-Zell-Stimulation exklusiv von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert und stellte daher einen geeigneten Parameter dar [202,205]. Im Serum LASV-infizierter HHD-Mäuse konnten hohe IL-12p40-Konzentrationen ab Tag 8 nach Infektion gemessen werden. Um Tag 12 und 16 war ein Maximum von etwa 1500 pg/ml zu verzeichnen. Deutlich niedrigere IL-12p40-Konzentrationen um 500 pg/ml an Tag 12 waren in den Seren der LASV-infizierten C57BL/6- und CD8/CD4-depletierten Mäuse festzustellen. Auch hier zeigten die MHC-I<sup>-/-</sup>-Mäuse einen intermediären Phänotyp mit IL-12p40-Konzentrationen von ca. 950 pg/ml an Tag 12 (Abbildung 9 B).

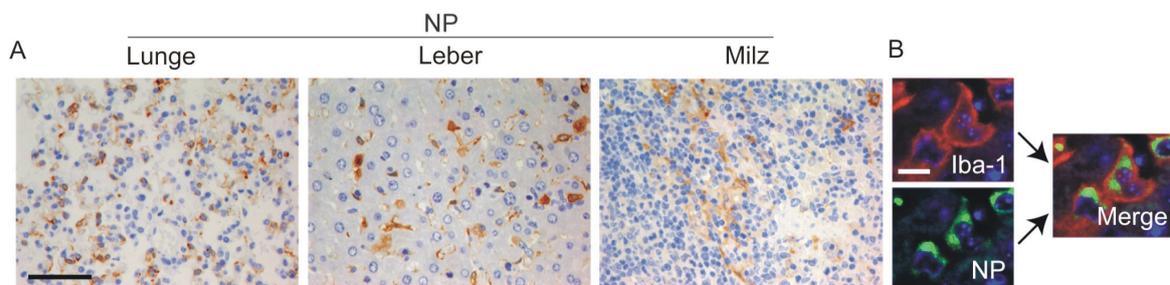


**Abbildung 10: Monozyten/Makrophagen-Aktivierung während der frühen Phase einer LASV-Infektion.** HHD- und C57BL/6-Mäuse wurden mit LASV infiziert. Jeweils drei Tiere wurden an Tag 2, 4 oder 8 euthanasiert. Repräsentative Bilder der H/E-Färbung sowie immunhistochemische Detektion von Monozyten/Makrophagen (anti-Iba-1) und iNOS (anti-iNOS) in der Leber sind gezeigt. Pfeile weisen auf iNOS-positive Zellen hin. Als Referenz diente uninfiziertes Lebergewebe. Vergrößerungsbalken stehen für 50 µm (H/E-Färbung) und 100 µm (Monozyten/Makrophagen- und iNOS-Färbung). Bilder wurden von Dr. Doron Merkler (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.7 Verteilung von LASV im Gewebe

Wie in der Abbildung gezeigt, waren in Lunge, Leber und Milz an Tag 8 hohe Viruslasten und pathologische Veränderungen zu beobachten. Da der Zelltropismus von LASV *in vivo* und dessen pathologischer Einfluss weitgehend ungeklärt ist, sollten immunhistochemische Färbungen die Verteilung von LASV im Gewebe zeigen.

LASV-NP wurde in Zellen der Lunge, Leber und Milz nachgewiesen (Abbildung 11 A). Diese Zellen waren nach morphologischen Gesichtspunkten hauptsächlich Monozyten/Makrophagen. Durch Doppelfärbung des Monozyten/Makrophagen-Oberflächenmarkers Iba-1 und LASV-NP sollte der Zelltyp viruspositiver Zellen genauer bestimmt werden (Abbildung 11 B). So waren in der Leber 82% ( $\pm 6,8\%$ ), in der Lunge 65% ( $\pm 8,5\%$ ) und in der Milz 79% ( $\pm 11\%$ ) der LASV-NP-positiven Zellen Monozyten/Makrophagen. Diese Zellen sind daher vermutlich die primären Zielzellen für LASV.

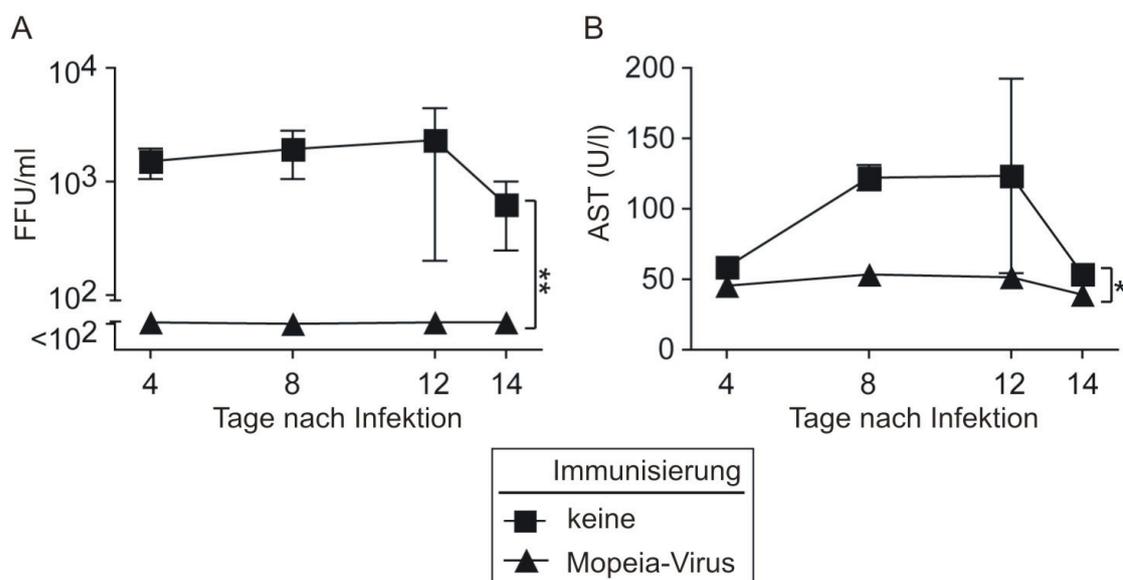


**Abbildung 11: Verteilung von LASV im Gewebe. A, B)** HHD-Mäuse wurden mit LASV infiziert und an Tag 8 euthanasiert. **A)** Immunhistochemische Färbung von LASV-NP in Lunge, Leber und Milz. Viruspositive Zellen sind braun gefärbt und nach morphologischen Kriterien hauptsächlich Monozyten/Makrophagen. **B)** Repräsentatives Beispiel einer Doppelfärbung von Monozyten/Makrophagen-Marker Iba-1 (rot) und LASV-NP (grün) in der Leber. Vergrößerungsbalken stehen für 50 µm (**A**) und 10 µm (**B**). Bilder wurden von Dr. Doron Merkler (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.8 Mopeia-Virus induziert Immunität gegenüber LASV in HHD-Mäusen

Im Folgenden sollte die Anwendbarkeit des HHD-Mausmodells für die Testung von Vakzinen gegen LASV geprüft werden. Als geeigneter Vakzinkandidat wurde Mopeia-Virus (MOPV) ausgewählt. MOPV ist ein apathogenes Arenavirus der Altweltgruppe, von dem bekannt ist, dass es in Affen eine kreuzprotektive Immunität gegen LASV-Infektionen erzeugt. Zunächst wurde getestet, ob MOPV in HHD-Mäusen repliziert und eine Erkrankung induziert. Dafür wurden drei HHD-Mäuse mit MOPV intravenös infiziert. Zu keinem Zeitpunkt konnte das Virus im Blut der HHD-Mäuse detektiert werden. Ebenso waren keine AST-Erhöhungen im Serum messbar.

Im Immunisierungsexperiment erhielten 5 HHD-Mäusen zwei Wochen vor einer LASV-Infektion  $10^6$  FFU MOPV intravenös. Zur Kontrolle wurden 5 HHD-Mäuse ohne vorherige MOPV-Infektion mit LASV infiziert. Es zeigte sich, dass eine vorhergehende MOPV-Infektion gegen eine LASV-Infektion schützt. Zu keinem Zeitpunkt waren eine Virämie oder erhöhte AST-Werte messbar (Abbildung 12). Dies zeigt, dass Vakzine im HHD-Mausmodell getestet werden können.



**Abbildung 12: Vakzinierung der HHD-Maus mit MOPV und anschließender LASV-Infektion.** Zehn HHD-Mäuse wurden mit LASV infiziert. Fünf davon wurden 2 Wochen vorher mit MOPV ( $10^6$  FFU) immunisiert (Dreieck). LASV-Titer (A) und AST-Werte (B) im Blut bzw. Serum wurden bestimmt. Der Bruch der Messgrößenachse (A) repräsentiert die Nachweisgrenze. (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, n= 5)

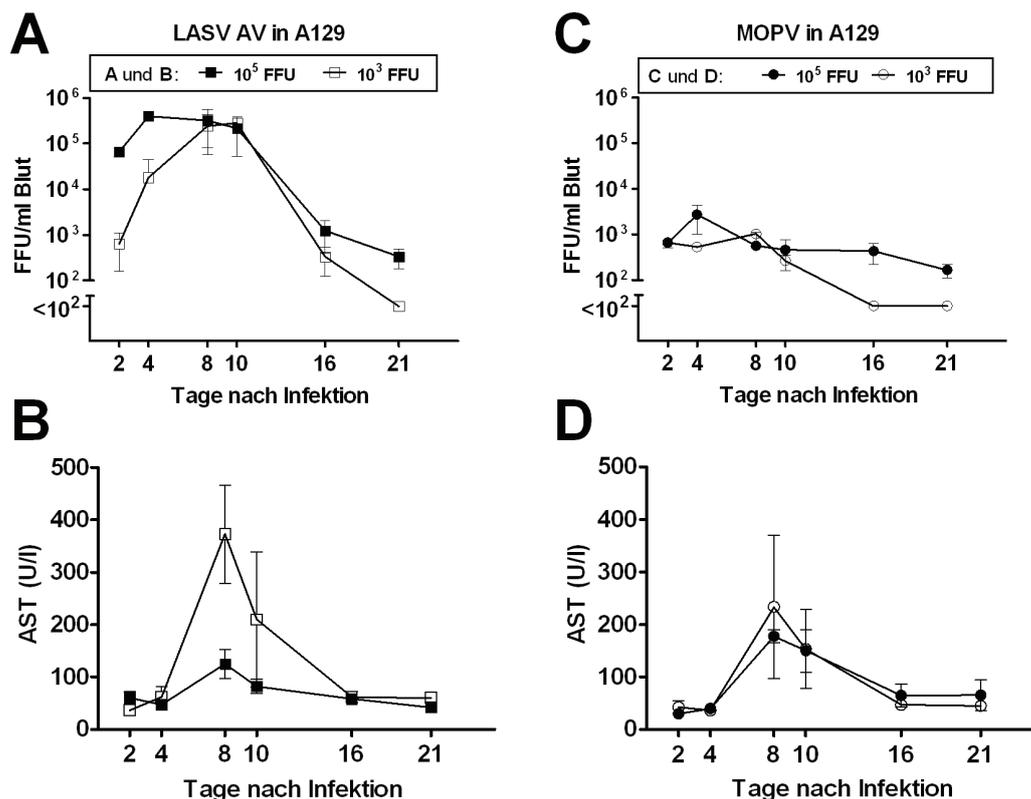
## 4.2 Etablierung eines Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor-defizienten Mausmodells für LASV-Infektionen

Bei A129-Mäusen fehlt der Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor, sodass zwar Interferon induziert wird, dieses aber nicht wirken kann. Die Mäuse sind im Gegensatz zur genetischen Hintergrundmaus (129Sv/Ev) suszeptibel für einige hämorrhagische Fieberviren. Mit dem Ziel auch Arenaviren, die im HHD-Mausmodell keine Pathogenese erzeugten und schnell aus dem Blutsystem entfernt wurden, hinsichtlich *in vivo*-Replikationsverhalten, Organotropismus, Pathogenität und Therapierbarkeit zu untersuchen, wurden A129-Mäuse für weitere Infektionsstudien genutzt.

### 4.2.1 Infektion von A129-Mäusen mit Altwelt-Arenaviren

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf den afrikanischen Altwelt-Arenaviren, die den gemeinsamen natürlichen Wirt *Mastomys natalensis* haben. Diese Altwelt-Arenaviren können entsprechend ihrer Virulenz im Menschen bzw. Affenmodell in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zur Gruppe der apathogenen Altwelt-Arenaviren zählen MOPV, Mobala-Virus (MOBV) und Morogoro-Virus. Die humanpathogene Virusgruppe wurde von den Lassa-Virusstämmen Ba366, AV, Nig-10 und Josiah gebildet.

Als Parameter zur Beschreibung des Infektionsverlaufs wurden die Serumtransaminasen, die Viruslast im Blut und teilweise in den Organen sowie das Gewicht der Tiere bestimmt. In Anlehnung an das HHD-Mausmodell wurde ein Dosisfindungsexperiment mit je einem Vertreter der obigen Gruppen und intravenöser Inokulation durchgeführt. Jeweils drei A129-Mäuse wurden mit je  $10^3$  und  $10^5$  FFU MOPV bzw. LASV AV infiziert. Es zeigte sich, dass LASV AV bei beiden Inokulumdosen eine Infektion mit Viruslasten von  $10^5$  FFU/ml Blut induzieren konnte. Die MOPV-Viruslast war geringer aber deutlich über der Nachweisgrenze detektierbar. LASV AV und MOPV wurden nach mehr als 21 Tagen aus der Zirkulation eliminiert. Obwohl MOPV in der A129-Maus weniger repliziert, waren wie bei LASV AV, um Tag 8 stark erhöhte AST-Werte messbar. Beide Viren induzierten unabhängig von der Infektionsdosis in den A129-Mäusen temporär eine akute Erkrankung (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Infektion von Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor-defizienten Mäusen (A129) mit LASV AV bzw. MOPV.** Jeweils 3 A129-Mäuse wurden mit  $10^3$  und  $10^5$  FFU LASV AV (A,B) oder MOPV (C,D) infiziert. Viruslast (A,C) und AST-Aktivitäten (B,D) wurden im Blut bestimmt. Der Bruch der Messgrößenachse (A,C) repräsentiert die Nachweisgrenze. (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n=3$ )

Da mit der niedrigen Infektionsdosis von  $10^3$  FFU eine Infektion mit hoher Viruslast und sogar höheren AST-Werte als bei  $10^5$  FFU induziert werden konnten, wurden die Studien mit weiteren Arenaviren ebenfalls mit  $10^3$  FFU durchgeführt.

Alle weiteren getesteten Lassa-Virusisolate (LASV Ba366, Nig10 und Josiah) induzierten eine Infektion mit vergleichbarer Wachstumskinetik und sehr hohen AST-Werten an Tag 8 nach Infektion. In allen Organen von an Tag 9 nach LASV-Infektion euthanasierten Mäusen waren sehr hohe Viruslasten messbar, was auf eine systemische Infektion hinweist. Es wurden keine isolatabhängigen Unterschiede im Organtropismus festgestellt. Klare Anzeichen für eine Erkrankung durch LASV waren rapider Gewichtsverlust, reduzierte Aktivität und gesträubtes Fell. Binnen weniger Tage erholten sich die Tiere, was mit einem Abfall der Viruslast und der AST-Werte sowie einer Gewichtszunahme einherging (Abbildung 14 A-D). Histopathologisch waren insbesondere in Lunge und Leber an Tag 9 gravierende Entzündungszeichen sichtbar (Tabelle 3, persönliche

Mitteilung Dr. Merkler), was mit den erhöhten AST-Werten und der Gewichtsreduktion übereinstimmt.

**Tabelle 3: Zusammenfassung der histologischen Befunde in A129-Mäuse nach Arenavirus-Infektion.**

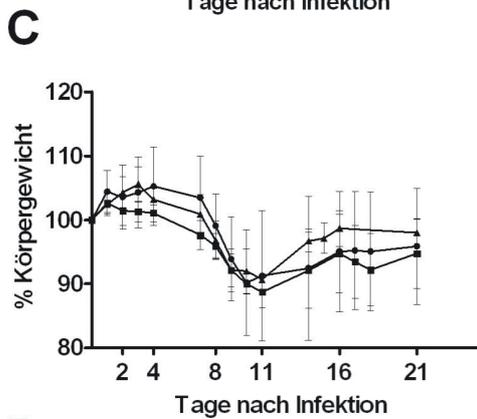
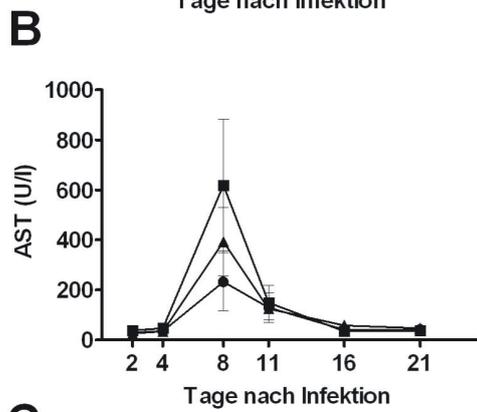
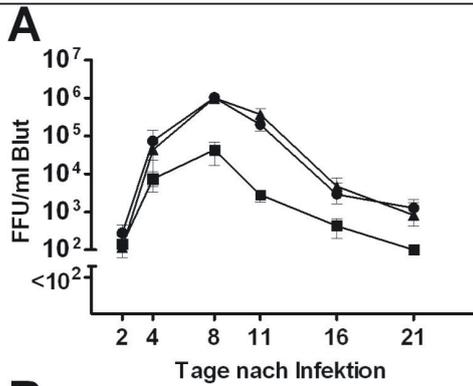
Virus	Score	Lunge Beschreibung	Score	Leber Beschreibung
LASV Ba366, Nig10	2	mäßiggradige interstitielle Pneumonie, kein Alveolarkollaps	3	deutliche periportale Infiltrate, teils mit Mottenfrassnekrosen, fokale <i>inflammatory foci</i> im Parenchym mit Nekrosen
LASV Josiah	0	keine vermehrten Infiltrate	2	mäßiggradige periportale Infiltrate, gelegentlich Mottenfrassnekrosen
MOBV	0	keine vermehrten Infiltrate	0	keine Hepatitis
Morogoro- Virus	1	gering bis mäßiggradige interstitielle Pneumonie, kein Alveolarkollaps	1	geringgradige periportale Infiltrate, keine Nekrosen
MOPV	2	mäßiggradige interstitielle Pneumonie, partieller Alveolarkollaps	3	ausgeprägte periportale Infiltration mit Mottenfrassnekrosen, <i>inflammatory foci</i> im Parenchym mit umschriebenen Nekrosen

Score: 0 keine, 1 geringe, 2 mittel, 3 starke Entzündung  
Beurteilungen durch Dr. Doron Merkler (Göttingen)

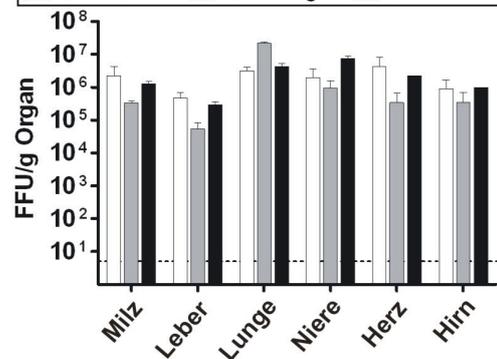
Ein konträres Bild stellte sich nach Inokulation von Morogoro- und Mobala-Virus in den A129-Mäusen dar. Die Viren waren im Blut an den Tagen 4 und 8 nach Infektion nur knapp über dem Detektionslimit nachweisbar. Anzeichen einer Erkrankung wurden nicht beobachtet. Die Mäuse verhielten sich unauffällig und nahmen im Versuchszeitraum an Gewicht zu. Auch blieben die AST-Werte im Normalbereich (Abbildung 14 E-H). Die histologischen Untersuchungen zeigten keine bzw. nur geringe pathologische Veränderungen in Lunge und Leber an Tag 9 (Tabelle 3, persönliche Mitteilung Dr. Merkler). Die Viruslasten in den Organen bestätigten die geringe Replikation beider Viren in den A129-Mäusen.

LASV-Isolate in A129

A bis C: ● LASV Ba366 ■ LASV Nig10 ▲ LASV Josiah

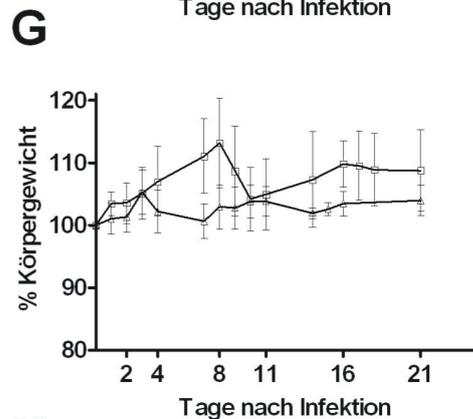
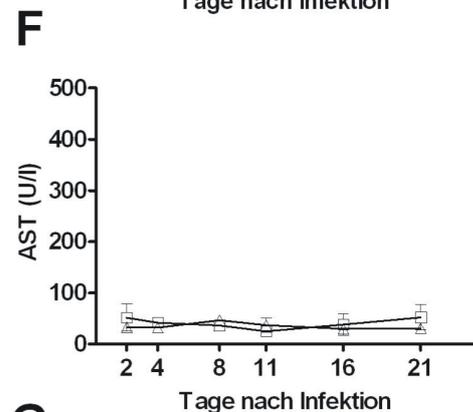
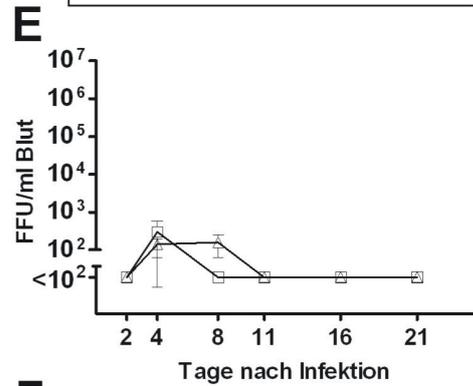


D: □ LASV Ba366 ■ LASV Nig10 ■ LASV Josiah

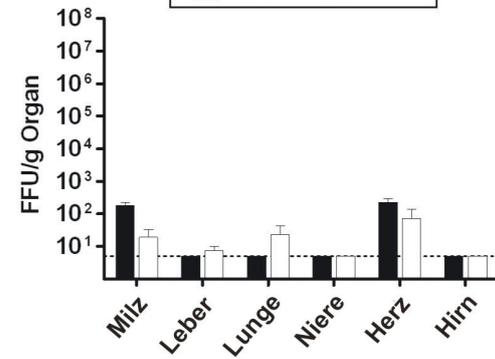


MOBV und MORV in A129

E bis G: □ MOBV ▲ MORV



H: ■ MOBV □ MORV

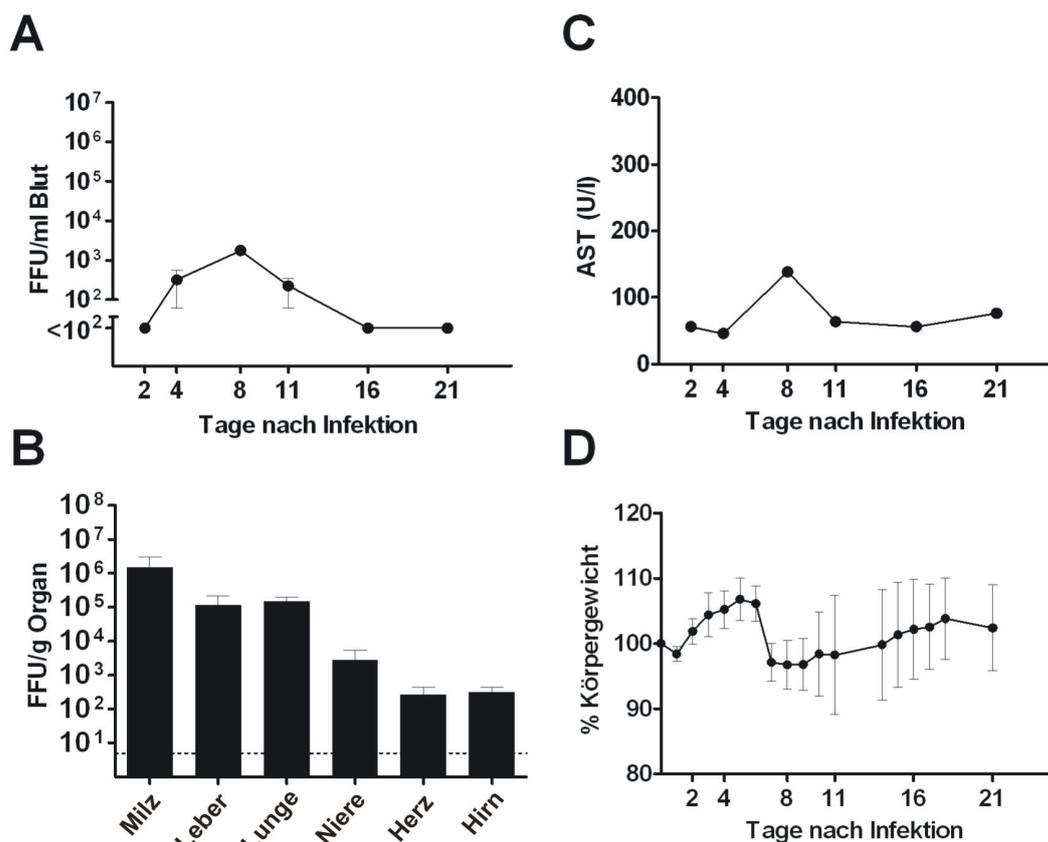


**Abbildung 14: Suszeptibilität von A129-Mäuse gegenüber LASV-Isolaten und apathogenen Altwelt-Arenaviren MOBV und Morogoro-Virus (MORV).** Jeweils 5 A129-Mäuse wurden mit  $10^3$  FFU des jeweiligen Virus inokuliert. Die Virämie (**A, E**), AST im Serum (**B, F**) und Körpergewicht (**C, G**) wurden erfasst. Der Virustiter in den Organen von jeweils zwei an Tag 9 euthanasierten Tieren wurde bestimmt (**D, H**). Der Bruch der Messgrößenachse (**A, E**) und die gestrichelte Linie (**D, H**) repräsentieren die Nachweisgrenze. (**A-C, E-G**: Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; **D, H**: Mittelwert  $\pm$  Spannweite)

#### 4.2.2 MOPV als Surrogat für LASV im A129-Mausmodell

Die A129-Maus war für Mopeia-Virus als einzigem Vertreter der apathogenen Altwelt-Arenaviren suszeptibel. Auch wenn nur geringe Viruslasten ( $10^3$  FFU/ml Blut an Tag 8) festzustellen waren, erkrankten die Tiere deutlich. Dieser Befund sollte nochmals bestätigt und genauer untersucht werden. Eventuell eignet sich MOPV als Surrogat für LASV-Infektionen in A129-Mäusen unter reduzierten Sicherheitsbedingungen (S2). So wurden sechs 129-Mäuse mit  $10^3$  FFU infiziert. Neben regelmäßigen Blutabnahmen wurden zwei zufällig ausgewählte Tiere an Tag 9 für Viruslastbestimmungen in den Organen und für histologische Untersuchungen euthanasiert.

Wieder waren niedrige Viruslasten im Blut mit einem Maximum von  $10^3$  FFU/ml und erhöhte AST-Werte (140 U/l) im Serum an Tag 8 nach Infektion messbar. An Tag 7 war ein Gewichtsverlust von fast 10% gegenüber dem Vortag festzustellen, was gut mit dem Viruslast- und AST-Maximum an Tag 8 korreliert und als Krankheitszeichen bewertet wurde. Dieser Gewichtsverlust wurde bis zum Versuchsende wieder ausgeglichen. Überraschend war allerdings, dass in Lunge, Leber und Milz der geopferten Tiere deutliche Viruslasten von bis zu  $10^6$  FFU/g Organ vorlagen (Abbildung 15). Ebenso wurden in Herz, Niere und Hirn geringe bis mäßig hohe Viruskonzentrationen gefunden. In Lunge, Leber und Milz waren zudem histopathologische Veränderungen festzustellen, die mit denen einer LASV-Infektion in A129-Mäusen vergleichbar waren (Tabelle 3, persönliche Mitteilung Dr. Doron Merkler).

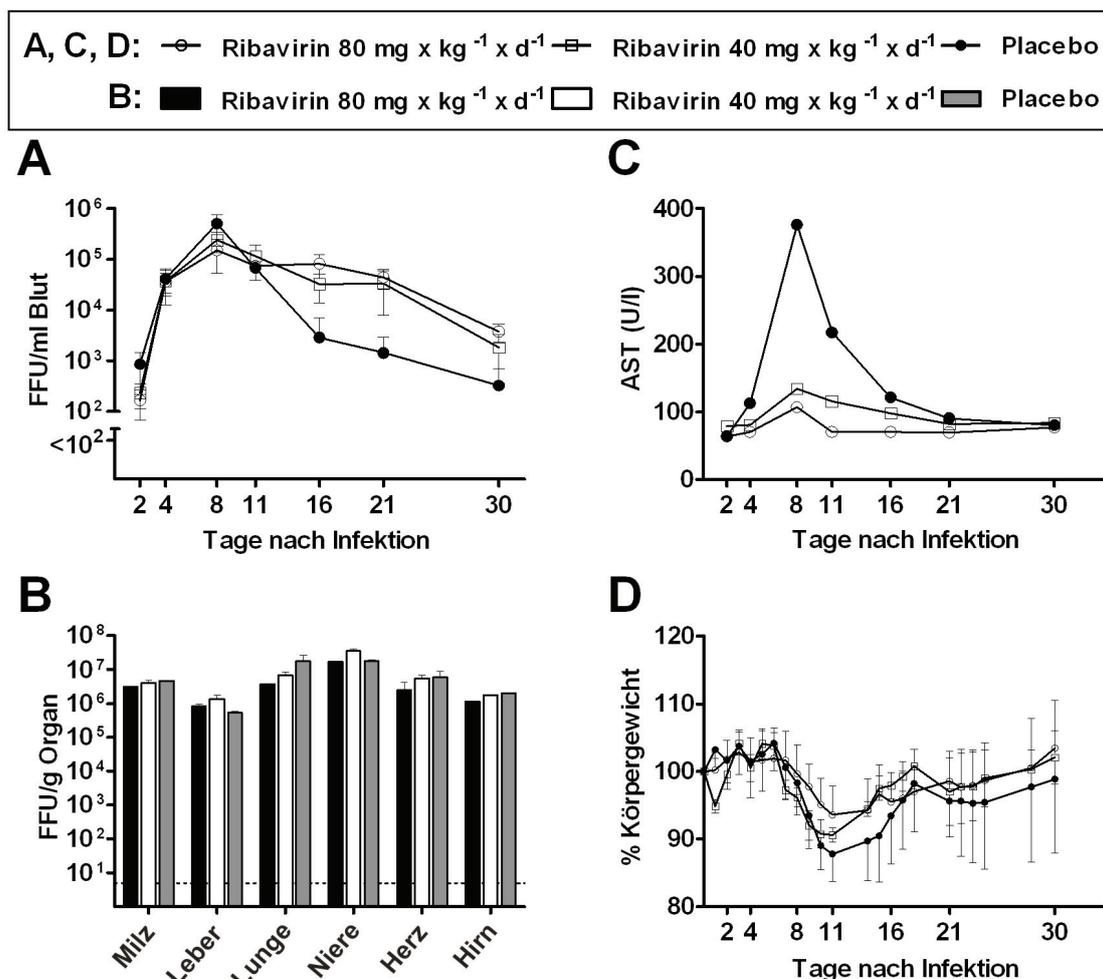


**Abbildung 15: MOPV-Infektion in der A129-Maus.** Fünf A129-Mäuse wurden mit  $10^3$  FFU MOPV inokuliert. Die Virämie (A), AST im gepoolten Serum (C) und Körpergewicht (D) wurden erfasst. Der Virustiter in den Organen von zwei an Tag 9 euthanasierten Tieren wurde bestimmt (B). Der Bruch der Messgrößenachse (A) und die gestrichelte Linie (B) repräsentieren die Nachweisgrenze. (A, D: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) (C: Mittelwert des Serumpools; B: Mittelwert  $\pm$  Spannweite)

#### 4.2.3 Eignung der A129-Maus zur Testung antiviraler Substanzen gegen LASV

Die Suszeptibilität der Interferon- $\alpha/\beta$ -Rezeptor-defizienten Maus A129 gegenüber einer Reihe von Lassa-Virusisolaten bietet die Möglichkeit, antivirale Substanzen *in vivo* zur Behandlung von Lassa-Virusinfektionen zu testen. Eine Studie mit Ribavirin, dem Standardtherapeutikum bei Lassa-Fieber, sollte die Eignung der A129-Maus als Tiermodell für die Testung neuer Substanzen zeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde den A129-Mäusen einmal täglich Ribavirin in sterilem *Aqua dest.* in einer Dosis von 40 bzw. 80 mg  $\times$  kg $^{-1}$   $\times$  d $^{-1}$  für 10 Tage intraperitoneal verabreicht. Die Verträglichkeit von Ribavirin in der Maximaldosis wurde an drei uninfizierten A129-Mäusen getestet. Bei keiner der drei Mäuse wurden erhöhte AST-Werte oder Gewichtsverlust beobachtet (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 16: Testung der antiviralen Aktivität von Ribavirin in LASV-infizierten A129-Mäusen.** Jeweils 5 A129-Mäuse wurden mit  $10^3$  FFU LASV AV inokuliert und anschließend einmal täglich mit Ribavirin bzw. Placebo für 10 d behandelt. Virämie (A), AST-Werte im gepoolten Serum (C) und Körpergewicht (D) wurden erfasst. Der Virustiter in den Organen von jeweils zwei an Tag 9 euthanasierten Tieren wurde bestimmt (B). Der Bruch der Messgrößenachse (A) und die gestrichelte Linie (B) repräsentieren die Nachweisgrenze. (A, D: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; C: Mittelwert des Serumpools; B: Mittelwert  $\pm$  Spannweite)

Für die Ribavirinbehandlung wurden jeweils fünf A129-Mäuse pro Gruppe mit  $10^3$  FFU LASV AV infiziert und 1 h nach Infektion entweder mit steriler isotonischer NaCl-Lösung (Placebo) oder mit Ribavirin (40 bzw. 80 mg x kg<sup>-1</sup> x d<sup>-1</sup>) für 10 Tage behandelt. Die Placebobehandlung hatte keinen Effekt auf den Verlauf der LASV-Infektion. Die mit Ribavirin behandelten Tiere waren dagegen im gesamten Beobachtungszeitraum aktiver, verloren weniger Gewicht und hatten keine bzw. nur geringe AST-Erhöhen im Serum. Allerdings war eine starke Virämie sowie eine verlangsamte Viruseliminierung messbar. Auch die Titer in den Organen unterschieden sich zwischen behandelten und unbehandelten Tieren nicht (Abbildung 16). Im histologischen Bild von Lunge und Leber waren bei den placebobehandelten Tieren starke Entzündungszeichen sichtbar. Die

Ribavirinbehandlung reduzierte diese Zeichen deutlich (Tabelle 4, persönliche Mitteilung Dr. Doron Merkler).

**Tabelle 4: Zusammenfassung der histologischen Veränderungen nach einer LASV-Infektion in A129-Mäusen mit und ohne Ribavirinbehandlung.**

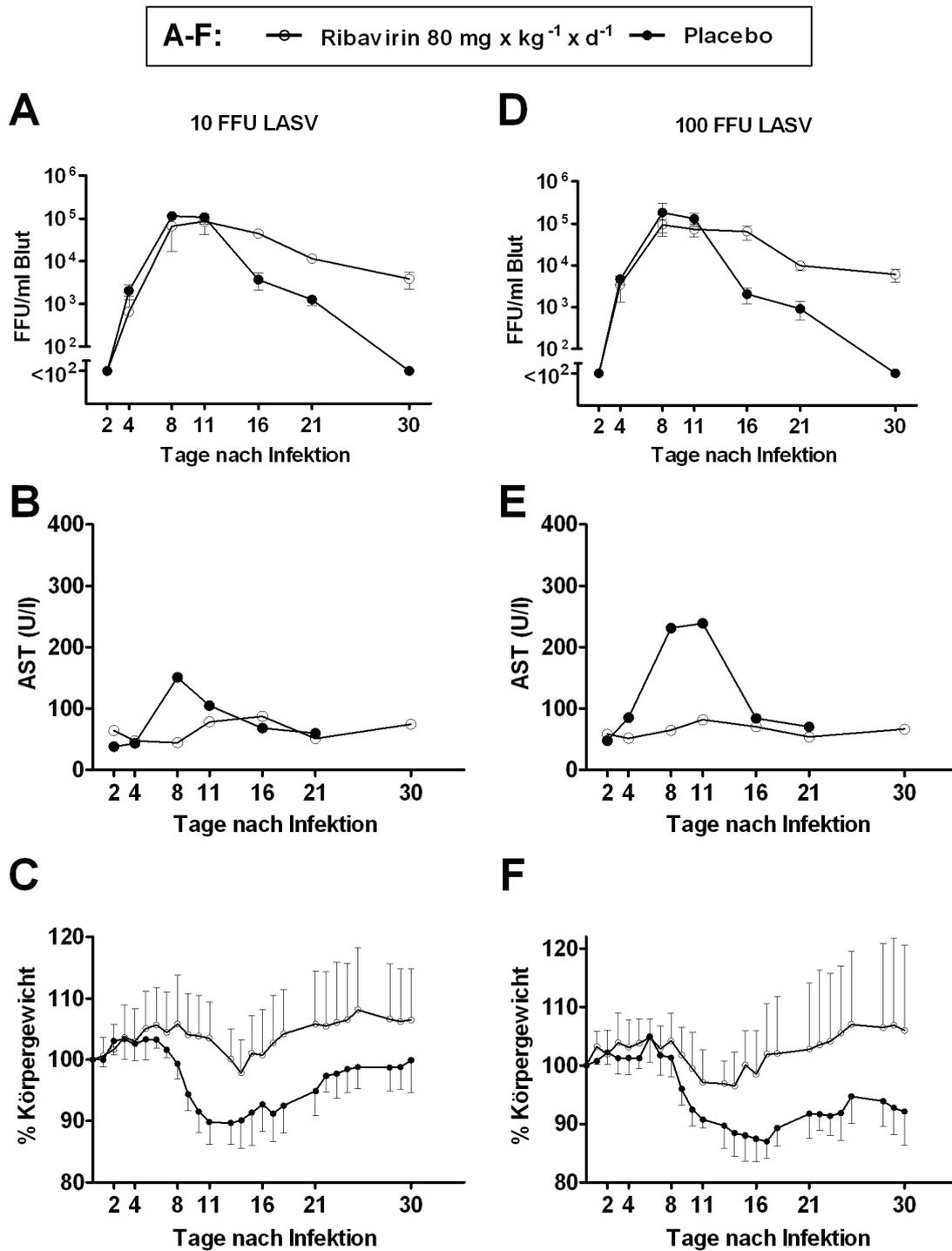
Virus und Behandlung	Score	Lunge Beschreibung	Score	Leber Beschreibung
LASV AV 40 mg x kg <sup>-1</sup> x d <sup>-1</sup> Ribavirin	1	gering bis mäßiggradige interstitielle Pneumonie	1	mäßiggradige periportal betonte Infiltration, keine flächigen Nekrosen, keine Apoptosen
LASV AV 80 mg x kg <sup>-1</sup> x d <sup>-1</sup> Ribavirin	1	gering bis mäßiggradige interstitielle Pneumonie	1	mäßiggradige periportal betonte Infiltration, keine flächigen Nekrosen, keine Apoptosen
LASV AV Placebo	2	mäßiggradige interstitielle Pneumonie, partieller Alveolarollaps	2-3	mäßiggradige bis ausgeprägte periportale infiltratation, mit „ <i>inflammatory foci</i> “ im Parenchym mit Nekrosen

Score: 0 keine, 1 geringe, 2 mittel, 3 starke Entzündung  
Beurteilungen durch Dr. Doron Merkler (Göttingen)

Mit 80 mg x kg<sup>-1</sup> x d<sup>-1</sup> für 10 Tage lag die Behandlungsdosis von Ribavirin bereits dreifach über der in anderen Tiermodellen für Lassa-Fieber angewandten Dosierung [104,132,148,168]. Um eine mögliche replikationsinhibierende Wirkung von Ribavirin auf LASV *in vivo* eventuell doch nachweisen zu können, wurde die Infektionsdosis von 1000 FFU auf 100 bzw. 10 FFU reduziert. Die Ribavirindosis wurde bei 80 mg x kg<sup>-1</sup> x d<sup>-1</sup> für 10 Tage belassen.

Die Reduktion der Infektionsdosis führte in beiden placebobehandelten Gruppen zu reduzierten AST-Maxima gegenüber den mit 1000 FFU infizierten Tieren. Die mit geringer Dosis infizierten Tiere hatten an Tag 8 allerdings das gleiche Virämieniveau, wie die mit 10<sup>3</sup> FFU infizierten Tiere, und eliminierten die Lassa-Viren mit gleicher Kinetik. Der Gewichtsverlust war bei allen placebobehandelten Mäusen vergleichbar, hingegen etwas stärker bei den mit 100 FFU infizierten Tieren. Durch Behandlung mit Ribavirin konnte auch bei den mit geringer Dosis infizierten Mäusen die Ausprägung der Erkrankung hinsichtlich Gewicht und AST-Aktivität im Serum positiv beeinflusst werden. Die Virämie konnte nicht reduziert werden. Die Wachstums- und Eliminierungskinetik von LASV war identisch zu der, die in den mit 10<sup>3</sup> FFU LASV infizierten Tieren beobachtet wurde (Abbildung 17).

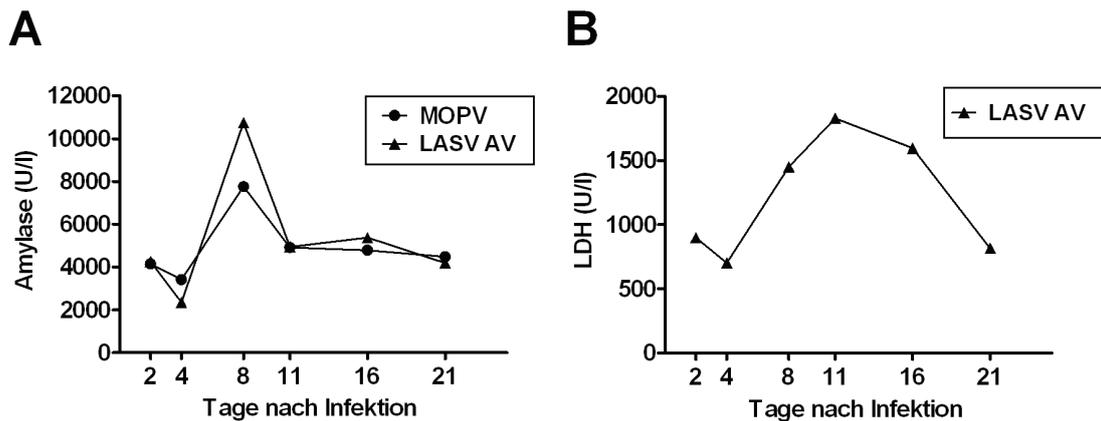
Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Ribavirin in der verabreichten Dosis von 80 mg x kg<sup>-1</sup> x d<sup>-1</sup> in der A129-Maus einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf einer LASV-Infektion hat. Dabei wird die Viruslast in Blut und Gewebe nicht entscheidend reduziert. Im Gegenteil, es wurde sogar eine prolongierte virämische Phase im Vergleich zur Placebobehandlung beobachtet.



**Abbildung 17: Ribavirin zeigt keine replikationsinhibitorische Wirkung gegen LASV in A129-Mäusen.** Jeweils 4 A129-Mäuse wurden mit 10 FFU (A, B, C) oder 100 FFU (D, E, F) LASV AV inokuliert und anschließend einmal täglich mit Ribavirin bzw. Placebo für 10 d behandelt. Virämie (A, D), AST-Werte im gepoolten Serum (B, E) und Körpergewicht (C, F) wurden erfasst. Der Bruch der Messgrößenachse (A, D) repräsentiert die Nachweisgrenze. (A, C, D, F: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; B, E: Mittelwert des Serumpools)

#### 4.2.4 Bestimmung weitere biochemischer Parameter in Arenavirus-infizierten A129-Mäusen

Johnson et al. berichteten, dass sowohl die Höhe der AST-Werte, als auch die Viruslast mit der Schwere des Lassa-Fiebers beim Menschen korrelieren [99]. In Fallberichten von Lassa-Fieberpatienten wurden auch erhöhte Laktatdehydrogenase- (LDH) und Amylase-Werte im Serum festgestellt [86,102]. Daher sollten LDH- und Amylase-Werte auch im A129-Tiermodell gemessen werden.



**Abbildung 18: LDH und Amylase im Serum nach LASV bzw. MOPV-Infektion in A129-Mäusen.** Jeweils 5 A129-Mäuse wurden mit  $10^3$  FFU LASV AV oder MOPV inokuliert. Amylase (A) und LDH (B) wurden im gepoolten Serum erfasst.

Im Serum LASV- bzw. MOPV-infizierter A129-Mäuse wurde ebenfalls eine Erhöhung von Amylase und LDH im Serum festgestellt (Abbildung 18). Beide Enzymaktivitäten eignen sich daher ergänzend zur Bestimmung der AST im Serum, um eine arenavirale Infektion in A129-Mäusen zu beschreiben.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Etablierung des B6/HLA-A2.1 Mausmodells für Lassa-Fieber

Mäuse sind nicht suszeptibel für LASV. Lediglich intrazerebrale Inokulation führt zu zerebralen Infektionen mit letalem Ausgang, die aber nicht mit einer Lassa-Fiebererkrankung beim Menschen vergleichbar sind [147]. Für die Untersuchung der Pathogenese von Lassa-Fieber ist dieses Modell nicht anwendbar.

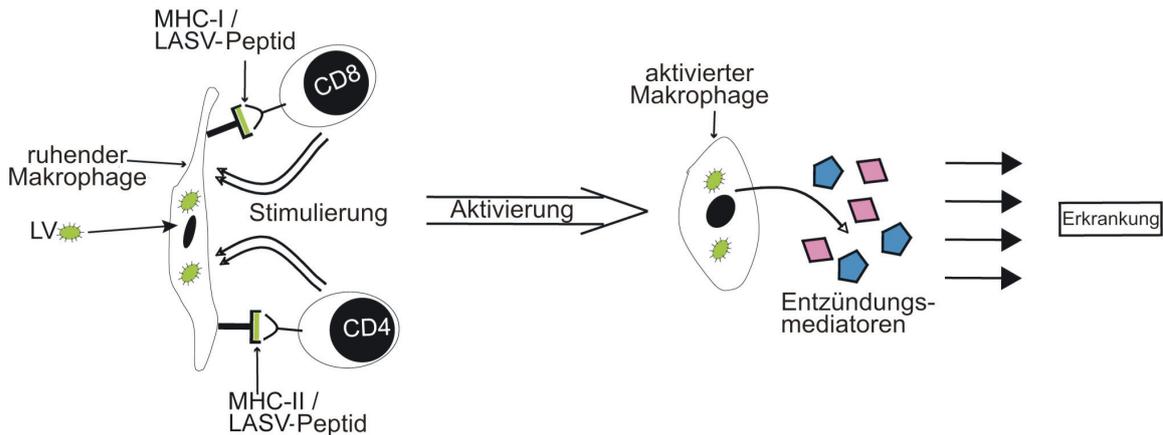
In dieser Arbeit konnte in zahlreichen Infektionsexperimenten gezeigt werden, dass die transgene HHD-Maus nach i.v. Infektion suszeptibel für LASV Ba366 ist. Es entwickelte sich eine Lassa-Fieber ähnliche Erkrankung mit z.T. letalem Ausgang. Pathologische Veränderungen wurden insbesondere in Lunge, Leber und Milz gefunden. Parallel wurde eine hohe Viruslast im Blut und in allen untersuchten Organen festgestellt. Durch vergleichend durchgeführte Infektionsversuche in MHC-*knock-out*-Mäusen, T-Zell-depletierten HHD-Mäusen sowie der genetischen Hintergrundmaus C57BL/6 kristallisierte sich eine duale Rolle der T-Zellen während einer LASV-Infektion heraus. Zum einen scheinen sie ein essentieller Faktor für die Viruseliminierung zu sein und zum anderen spielen sie eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der LF-ähnlichen Erkrankung. Eine ähnliche durch T-Zellen stimulierte bzw. verstärkte Ausbildung der Erkrankung wird beim Dengue Hämorrhagischen Fieber (DHF) beobachtet und als *original antigenic sin*-Phänomen beschrieben [206,207,208]. Allerdings sind beim DHF Gedächtnis-T-Zellen während einer Zweitinfektion mit einem anderen Serotyp für die schwere Pathogenese ausschlaggebend, während beim LF in der HHD-Maus bereits die T-Zellantwort auf eine Erstinfektion die Erkrankung induziert.

Die Daten aus den verschiedenen Mausmodellen lassen sich in drei Szenarien zusammenfassen, die durch zwei Faktoren charakterisiert sind. Das sind zum einen „T-Zellen“, die für die Effizienz der antiviralen T-Zellantwort stehen, und zum anderen „Virus“, das für eine Viruspersistenz steht.

Szenario I („T-Zellen > Virus“) beschreibt eine schnelle und effiziente T-Zell-abhängige Viruseliminierung, welche die Ausbildung einer Erkrankung verhindert (naive C57BL/6-, vakzinierte HHD-Maus).

Szenario II („T-Zellen = Virus“) beschreibt die Beobachtung in der HHD-Maus, in der die ineffiziente antivirale T-Zellantwort LASV nicht eliminieren kann, aber eine Erkrankung erzeugt (Abbildung 19).

Szenario III („T-Zellen < Virus“) fasst die Beobachtungen zusammen, bei denen ein Ausbleiben der T-Zellantwort zwar zu einer persistenten LASV-Infektion führt, aber keine oder nur milde Krankheitszeichen induziert (CD8/CD4-depletierte HHD-Maus, teilweiser Schutz in MHC-I<sup>-/-</sup>-Maus).



**Abbildung 19: Schematische Beschreibung des Szenarios II.** Detaillierte Beschreibung siehe Text.

Man kann daher verschiedenen Mechanismen, in denen die T-Zellantwort zur Ausprägung der LF-Erkrankung beiträgt, ins Auge fassen. So unterstützt das histologische Bild in der HHD-Maus die gegenwärtige Annahme, dass eine direkte T-Zell-vermittelte Zytolyse [209] nicht der Hauptmechanismus für die Organschädigungen beim LF ist [138]. Die Daten dieser Arbeit deuten eher auf eine Stimulation von Monozyten/Makrophagen durch T-Zellen hin. Während der Viruspersistenz, die auf eine ineffiziente Viruseliminierung zurückzuführen ist, könnten LASV-epitopspezifische CD8- und CD4-positive T-Zellen infizierte Monozyten/Makrophagen z.B. über MHC-I und -II sowie durch kostimulatorische Moleküle und sezernierte Zytokine stimulieren. Dadurch werden diese zur Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren angeregt [199,202,203,204]. Eine Überstimulation von Makrophagen kann zu schweren Leber- und Lungenschädigungen führen [210,211,212] und könnte eine ursächliche Rolle in der Pathogenese von LF spielen. Zugleich impliziert diese Hypothese eine indirekte Beteiligung der T-Zellen an der Pathogenese von LF. So ist bekannt, dass LASV in kultivierten Makrophagen replizieren kann ohne eine zelluläre Aktivierung oder Produktion von inflammatorischen Zytokinen zu verursachen [141,142,151]. In der *in vivo* Situation könnten infizierte Monozyten/Makrophagen von T-Zellen über IFN- $\gamma$  und Zell-Zell-Kontakte [199,200,201,202] zur Freisetzung von Zytokinen angeregt werden [86,139,151], ähnlich wie es LPS *in vitro* bei LASV-infizierten Makrophagen vermag [141,142,151]. Die anhaltende Stimulation der Makrophagen durch T-Zellen könnte zur Etablierung eines systemischen Entzündungssyndroms führen [213], das Symptome des LF, wie Schock und Blutungen, erklären würde.

Diese Rolle von T-Zellen beim LF wird auch durch das Szenario I unterstützt, in der die Beobachtungen von LASV-infizierte C57BL/6- und immunisierten HHD-Mäusen zusammengefasst sind. Die effiziente Viruseliminierung führt nur zur transienten LASV-Antigenpräsentation auf wenigen LASV-infizierten Monozyten/Makrophagen und

minimaler Stimulation durch T-Zellen, was zum Ausbleiben einer Erkrankung führt. Auch Scenario III unterstützt die postulierte Rolle der T-Zellen bei der LF-Pathogenese. Fehlen T-Zellen zur Aktivierung von Monozyten/Makrophagen, z.B. durch Depletion von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen in der HHD-Maus, werden keine oder nur milde Krankheitszeichen beobachtet.

Die Rolle der T-Zellen bei der Pathogenese von Lassa-Fieber wird auch durch zwei an sich paradoxe Beobachtungen bei LASV-infizierten Affen unterstützt. Peters *et al.* beobachteten, dass eine Hochdosisinfektion zu geringeren Letalitätsraten führt als eine Niedrigdosisinfektion [104]. Dieses Phänomen könnte durch die Mechanismen der *T cell exhaustion* oder *T cell deletion* während einer Hochdosisinfektion erklärt werden [214]. Die daraus resultierende Abschwächung der T-Zellantwort könnte zur Reduktion der Monozyten/Makrophagen-Aktivierung und Krankheitsausbildung in den Affen geführt haben. Entsprechend müsste man dieses Phänomen als *shift* von Scenario II zu Scenario III ansehen.

Die zweite paradoxe Beobachtung ist aus Vakzinierungsstudien in Affen mit einem rekombinanten Vakzinia-Virus, welches das LASV-Nukleoprotein exprimiert, bekannt. Es zeigte sich, dass der Impfstoff nur eine Minderheit der Tiere vor einer Erkrankung schützt. Die vakzinierten und an einer LASV-Infektion verstorbenen Tiere zeigten sogar stärkere Anzeichen einer Erkrankung als die Tiere der nicht vakzinierten Kontrollgruppe [215]. Dieses Phänomen könnte man dadurch erklären, dass durch die Vakzinierung generierte LASV-NP-spezifische Gedächtnis-T-Zellen bei der LASV-Infektion Makrophagen stimulierten und dadurch die Erkrankung verstärken. Ähnliches ist auch bei Vakzinierungsstudien mit LCMV in Mäusen beobachtet worden. LCMV induziert eine T-Zell-abhängige immunpathologische Erkrankung des zentralen Nervensystems. Findet die LCMV-Infektion nach Vakzinierung mit einem rekombinanten Vakzinia-Virus, das LCMV-Antigene exprimiert, statt, wird die Erkrankung sogar verstärkt [216].

In dieser Arbeit konnte mit der HHD-Maus ein neues Tiermodell für Lassa-Fieber etabliert werden. In diesem Modell sind mechanistische Untersuchungen zur Pathogenese und Immunologie des LF sowie zur Impfstofftestung möglich. Letzteres wurde auch in dieser Arbeit verfolgt. Eine vorherige MOPV-Infektion schützte vor einer LASV-Infektion. Eine kreuzprotektive T-Zellantwort könnte die Immunität gegenüber einer LASV-Infektion in der HHD-Maus erklären. Für das MHC-I-Molekül HLA-A2.1 sind immunogene CD8-Epitope im GPC von LASV identifiziert worden (GPC<sub>42-50</sub>, GPC<sub>60-68</sub> und GPC<sub>441-449</sub>) [217]. In Zusammenarbeit mit Dr. Lukas Flatz konnten aus der Milz von HHD-Mäuse nach Immunisierung mit MOPV spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegen zwei dieser Peptide (GPC<sub>42-50</sub> und GPC<sub>60-68</sub>) identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Dies bietet eine mögliche Erklärung für die Kreuzprotektion nach MOPV-Infektion gegenüber einer LASV-Infektion.

Kreuzreaktive und kreuzprotektive neutralisierende Antikörper sind im Meerschweinchen nach einer protektiven MOPV-Vakzinierung gegen LASV nicht nachgewiesen worden [218]. Die Übertragbarkeit dieses Befundes auf das HHD-Modell erscheint möglich, müsste aber noch untersucht werden.

Dennoch hat dieses Tiermodell auch einige Schwächen. So wurde in der HHD-Maus nur eine Letalität von ca. 20% durch LASV Ba366 beobachtet. In einem Versuch, das Virus besser an die Maus zu adaptieren und die Letalität zu steigern, wurde LASV Ba366 mehrfach auf Mausfibroblasten (L929) passagiert und anschließend hochdosiert den HHD-Mäusen injiziert. Eine Änderung des Phänotyps nach vier Passagen erfolgte nicht. Weder erhöhten sich Virämie und AST im Serum, noch starben mehr Tiere (Daten nicht gezeigt). Infektionen mit LASV Josiah im Meerschweinchen Stamm 13 oder in Affen sind uniform letal und wären für antivirale Substanztestungen und Pathogenesestudien besser geeignet [104]. Andererseits sind die Letalitätsraten bei LASV Josiah-Infektionen in Hartley-Meerschweinchen und mit denen dieser Arbeit vergleichbar [103]. Aufgrund der geringen Letalität muss davon ausgegangen werden, dass das HHD-Mausmodell wesentliche Aspekte der terminalen Phase des humanen Lassa-Fiebers nicht widerspiegelt. Weitere kritische Aspekte sind die hohe Infektionsdosis von  $10^6$  FFU und die intravenöse Inokulationsroute. Zwar konnte LASV Ba366 auch bei reduzierten Infektionsdosen und anderen Injektionsrouten in HHD-Mäusen replizieren, doch waren Virämie und AST-Erhöhung geringer. Die hohe Infektionsdosis, die zur Induktion einer schweren Erkrankung erforderlich ist, deutet auf mangelnde Adaptation des LASV an die Maus hin. Dies wird ebenfalls dadurch verdeutlicht, dass nur LASV Ba366 und keiner der 11 weiteren getesteten LASV-Isolate eine Erkrankung in der HHD-Maus induzierte. Zu den in der HHD-Maus apathogenen LASV-Isolaten gehörte das zum LASV Ba366 genetisch eng verwandte LASV Ba289, das sich in den *open reading frames* (ORFs) der vier arenaviralen Gene nur geringfügig zu LASV Ba366 unterscheidet (Tabelle 5). In den ORFs für GPC und Z waren nur stille Nukleotidaustausche festgestellt worden. Nur ein Aminosäureaustausch war im Nukleoprotein und sechs im L-Protein zu finden. Zwei dieser Aminosäureaustausche befinden sich in der Polymerase-Domäne. Virulenzunterschiede in Hartley-Meerschweinchen, z.B. zwischen den Pichinde-Virusisolaten (PICV) P2 (avirulent) und P18 (virulent), konnten auf wenige Aminosäureaustausche insbesondere im L-Protein zurückgeführt werden [178]. Ebenso konnte der Phänotyp von LCMV Arm Klon13, der durch systemische Infektion und Persistenz gekennzeichnet ist, in der C57BL/6-Maus auf nur zwei Aminosäureaustausche gegenüber dem parentalen Virus LCMV Arm zurückgeführt werden. Ein Austausch liegt in der Polymerase-Domäne [219,220]. Auch bei Influenza-Viren können Virulenzunterschiede teilweise auf nur eine oder wenige Aminosäuren zurückgeführt

[221]. Rekombinante LASV Ba366/289-Chimären könnten in zukünftigen Versuchen zur Identifizierung von Aminosäuren genutzt werden, die zur Ausbildung von LF im Mausmodell wichtig sind.

**Tabelle 5: Nukleotid und Aminosäuresequenzvergleich der vier ORFs von LASV Ba289 und Ba366.**

ORF	Nukleotidsequenz		AS-Sequenz	
	Länge (nt)	Differenzen	Länge (AS)	Differenzen*
GPC	1473	7	491	0
NP	1707	8	569	1
Z	297	2	99	0
L	6651	43	2217	6

\* LASV Ba289 zu LASV Ba366: NP: I525M; L: Q913R, R920K, D939N, V1286I, G1491S, V2075I  
 LASV Ba366: NCBI-GI: GPC: 297381013; NP: 297381014; Z: 316308916; L: 316308917  
 LASV Ba289-Sequenzierung (diese Arbeit)  
 AS = Aminosäure; ORF = *open reading frame* (offener Leserahmen)

Die zentrale Hypothese des postulierten Pathogenesemechanismus in der HHD-Maus ist die ineffiziente Viruseliminierung durch T-Zellen. Eine T-Zelldepletion, wie sie bei LASV-infizierten Weißbüschelaffen zu sehen ist [156], konnte durch histologische Untersuchungen als Ursache weitgehend ausgeschlossen werden. Dennoch sind weitere Studien nötig, um die protektive (C57BL/6-Maus) bzw. krankheitsinduzierende (HHD-Maus) T-Zellantwort genauer zu charakterisieren. Ein Augenmerk sollte dabei auf Stärke, Kinetik und Zytokinprofil [222] der LASV-spezifischen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort gelegt werden. Auch weiterführende Analysen zur Monozyten/Makrophagen-Antwort während einer LASV-Infektion werden benötigt. Zwar wurden mit der IL-12p40-Bestimmung im Serum und der iNOS-Expression in Gewebsmakrophagen deutliche Indikatoren für eine Aktivierung der Monozyten/Makrophagen identifiziert, dennoch sollten weitere Parameter charakterisiert werden. Dazu zählen Bestimmungen von weiteren Zytokinen, Chemokinen und inflammatorischen Mediatoren wie NO, Leukotrienen und Prostaglandine in Blut und Gewebe. Ebenso könnten eine Inhibition der Monozyten/Makrophagen-Aktivierung und die Depletion inflammatorischer Zytokine zur Klärung des Pathogenesemechanismus beitragen und die Hypothese vom „Zytokinsturm“ [213] detaillierter beleuchten.

Zusammenfassend verdeutlichen die Studien, dass T-Zellen während einer LASV-Infektion in der HHD-Maus eine duale Rolle spielen: Zum einen bei der Viruseliminierung und zum anderen in der Pathogenese. Dementsprechend könnten die Heterogenität in MHC-I und damit Qualität und Quantität der T-Zellantwort die unterschiedlichen klinischen Verläufe bei humanen LASV-Infektionen erklären. Ebenso wird deutlich, dass für zukünftige Vakzinierungsstrategien auch die nachteiligen Aspekte einer Gedächtnis-T-Zellantwort berücksichtigt werden sollten [215,216].

## 5.2 Etablierung des IFN $\alpha$ / $\beta$ -Rezeptor-defizienten Mausmodells für Lassa-Virusinfektionen

Interferone spielen bei der Kontrolle einer Virusinfektion eine Schlüsselrolle. Man unterscheidet anhand ihrer antiviralen Aktivität und Struktur Typ-I-Interferone (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ), Typ-II-Interferone (IFN- $\gamma$ ) und Typ-III-Interferone (IFN- $\lambda$ ). Alle Interferone entfalten ihre Wirkung über eine spezifische Rezeptorbindung, die über Induktion eines spezifischen JAK/STAT-Signaltransduktionsweges in einer erhöhten Expression von antiviral, antiproliferativ oder immunmodulatorisch wirksamen Genprodukten resultiert [223].

Soll die Rolle des Interferonsystems *in vivo* in Bezug auf Virusinfektionen genauer untersucht werden, bietet es sich an, die Interferonrezeptoren durch genetischen *knock out* (KO) auszuschalten. Derzeit stehen KO-Mäuse mit fehlenden Rezeptoren für Typ-I, II und/oder III-Interferone zur Verfügung [197,224,225,226,227].

Typ-III-Interferone scheinen bei LASV-Infektionen keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle zu spielen [228]. Interferon- $\gamma$  wirkt immunmodulatorisch und könnte bei der T-Zell-abhängigen Immunpathogenese von Lassa-Fieber entscheidend mitwirken. Starke IFN- $\gamma$ -Erhöhungen im Serum wurden bei einem Patienten mit fatalem Lassa-Fieverlauf beobachtet [86]. Für das Nukleoprotein von Altwelt-Arenaviren ist eine antagonistische Wirkung auf die IFN- $\alpha$ / $\beta$ -Expression beschrieben [67,68,229,230,231,232,233]. NP kann über mehrere Mechanismen die Interferoninduktion blockieren. Dazu zählen der Abbau viraler doppelsträngiger RNA durch eine Exoribonuklease sowie die direkte Interaktion mit den zellulären Proteinen RIG-I, Mda5 und *interferon regulatory factor 3* (IRF-3), die eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Interferonantwort spielen. Dies scheint nötig zu sein, da Altwelt-Arenaviren sensitiv auf Interferon- $\alpha$  sind, und so ihr Viruswachstum inhibiert wird [234].

Für die Studie wurde die A129-Maus ausgewählt, in der zwar IFN- $\alpha$ / $\beta$  induziert werden, aber nicht wirken können. Arenaviren, die in der HHD-Maus keine Pathogenese erzeugten und nicht nachweisbar replizierten, wurden hinsichtlich *in vivo* Replikationsverhalten, Organtropismus und Pathogenität in der A129-Maus untersucht.

### 5.2.1 Virulenzunterschiede zwischen Altwelt-Arenaviren in der A129-Maus

Die in dieser Arbeit eingesetzten afrikanischen Arenaviren wurden hinsichtlich ihrer Pathogenität im Menschen bzw. in nichtmenschlichen Primaten unterteilt. Zu den apathogenen Arenaviren zählten MORV, MOBV und MOPV. Zu den pathogenen Arenaviren zählten die Lassa-Virusisolate Nig10, Josiah, AV und Ba366. Das Lujo-Virus, welches ebenfalls humanpathogen ist [12], stand nicht zur Verfügung. Die bekannte Pathogenität der Arenaviren wurde auch in A129-Mäusen mit einer Ausnahme widergespiegelt.

So war die A129-Maus für alle getesteten LASV-Isolate suszeptibel. Hohe Virustiter im Blut und in den Organen verdeutlichen die prinzipielle Replikationskompetenz und den breiten Organtropismus von Lassa-Viren in der Maus, sobald der Rezeptor für Interferon- $\alpha/\beta$  fehlt. Suszeptibilitätsunterschiede zwischen der A129-Maus und ihrer genetischen Hintergrundmaus (129Sv/Ev) wurden auch für andere RNA-Viren, wie zum Beispiel Semliki Forest Virus (SFV), Vesicular Stomatitis Virus (VSV), Krim-Kongo hämorrhagisches Fieberevirus (CCHFV), Ebola-Zaire-Virus (ZEBOV) und Marburg-Virus (MARV) beschrieben [235,236,237].

Die nach Tag 8 einsetzende Viruseliminierungskinetik ist mit der in LASV Ba366-infizierten HHD-Mäusen vergleichbar. Alle LASV-Isolate induzierten in der A129-Maus eine starke Erkrankung mit reduzierter Aktivität, z.T. gestäubtem Fell, Gewichtsverlust und hohen AST-Werten. Amylase-, LDH- und ALT-Erhöhungen im Serum waren ebenfalls festzustellen. Dies entspricht Beobachtungen bei Lassa-Fieberpatienten. Die Befunde lassen die Vermutung zu, dass eine systemische Erkrankung in der Maus vorliegt. Zusammen mit dem histologischen Bild, das insbesondere in Leber und Lunge massive Entzündungszeichen zeigte, spiegeln diese Daten einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie in LASV Ba366-infizierten HHD-Mäusen wider [238].

Morogoro- und Mobala-Virus konnten in der A129-Maus keine systemische Infektion induzieren. Alle inokulierten Tiere blieben gesund und zeigten bis auf einen sehr geringen Gewichtsverlust keine Krankheitssymptome. Ebenso war das histologische Bild unauffällig. Es ist zu vermuten, dass intrinsische Faktoren unabhängig von IFN- $\alpha/\beta$  die Infektion der A129-Maus mit diesen apathogenen Arenaviren verhindern. So könnte der virale Replikationszyklus nur ineffizient ablaufen. Beispielsweise sind bei verschiedenen LCMV-Isolaten unterschiedliche Affinitäten vom Glykoprotein zum Rezeptor  $\alpha$ -Dystroglycan bekannt, die über den Infektionsverlauf entscheiden [239]. Da genaue Analysen zu den Wechselwirkungen zwischen den getesteten Arenaviren und den zellulären Komponenten der A129-Maus fehlen, bleiben diese Vermutungen spekulativ.

Eine ähnliche Beobachtung wurde erst kürzlich in den gleichen Mäusen bei Suszeptibilitätsstudien mit Filoviren gemacht. Während die A129-Maus suszeptibel für

humanpathogene MARV und ZEBOV war, konnte keine systemische Infektion mit schweren Krankheitszeichen nach Inokulation von Ebola-Sudan-Virus (SEDOV) oder Ebola-Reston-Virus (REBOV) gefunden werden [240].

Die Inokulation von Mopeia-Virus führte in der A129-Maus zu Erkrankungszeichen, die im Wesentlichen mit denen der LASV-Infektion in den A129-Mäusen übereinstimmten. Lediglich die Viruskonzentration im Blut war geringer. MOPV könnte als Surrogat für die LASV-Infektion in der A129-Maus dienen. Weitere Arbeiten mit dem Tiermodell könnten unter Laborbedingungen der Sicherheitsstufe 2 erfolgen. Die Verwendung gering pathogener Viren als Surrogate für hochpathogene Viren, wurde z.B. für Pichinde-Virus als Surrogat für LASV im Hamster-Modell [183] oder LCMV als Surrogat für LASV in Affen [155] beschrieben.

### **5.2.2 Effekt von Ribavirin auf die Erkrankung nach LASV-Infektion in A129-Mäusen**

Die prinzipielle Eignung des A129-Mausmodells zur Testung antiviraler Substanzen sollte mit dem Nukleosidanalogen Ribavirin überprüft werden. Derzeit wird es als Therapeutikum bei humanen Lassa-Virusinfektionen eingesetzt [241].

In ribavirinbehandelten wurden gegenüber placebobehandelten A129-Mäusen drei Effekte beobachtet: 1. Eine Reduktion der Krankheitszeichen (AST-Werte im Serum, Gewichtsverlust und Entzündungszeichen in Lunge und Leber), 2. eine unverändert hohe Viruslast in Blut und Gewebe und 3. eine Verlängerung der Viruseliminierung über Tag 30 hinaus.

Dass Ribavirin die Krankheitsschwere und die Letalitätsraten von LASV-Infektionen senken kann, ist bei Menschen und nichtmenschlichen Primaten gezeigt worden [105,132]. Für Meerschweinchen werden verschiedene Beobachtungen durch Ribavirinbehandlung beim LF beschrieben. Eine protektive Wirkung zeigte Peters *et al.* [242]. Keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Überlebensrate sowie verlängerte Überlebensdauer beobachteten Huggins *et al.* und Cashman *et al.* [166,168]. Parallel zur antiviralen Wirkung wurde eine AST-Reduktion gezeigt.

Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass Ribavirin in der A129-Maus unabhängig von der LASV-Infektionsdosis und der gewählten Behandlungsdosis von 40 bzw. 80 mg x kg<sup>-1</sup> x d<sup>-1</sup> für 10 Tage die Viruslast im Blut und in den Organen nicht entscheidend reduzieren kann. Vergleichbares konnte teilweise erst kürzlich in einem neuen IFN-α/β- und IFN-γ-Rezeptor-defizienten Mausmodell (AG129-Maus) für Tacaribe-Virusinfektionen gezeigt werden. Die Ribaviringabe von 40 mg x kg<sup>-1</sup> x d<sup>-1</sup> für 7 Tage reduzierte die Viruslast in der Lunge, Leber und im Serum aber nicht in der Milz [185].

Die hier eingesetzten Ribavirinmengen von 40 bzw. 80 mg x kg<sup>-1</sup> x d<sup>-1</sup> lagen deutlich unter der LD<sub>50</sub> von 220 mg x kg<sup>-1</sup> x d<sup>-1</sup> in Mäusen [243], aber dennoch im wirksamen Bereich

gegen LASV-Infektionen in anderen Tiermodellen [168]. Die Wirkweise von Ribavirin gegen LASV ist derzeit nicht abschließend geklärt. Eine Error-Katastrophe scheint ebenso wahrscheinlich [244,245] wie eine allosterische oder kompetitive Hemmung der Polymeraseaktivität und/oder der Endonukleaseaktivität des L-Proteins [246,247,248]. *In vitro* Analysen konnten eine Inhibition der Inosinmonophosphat Dehydrogenase (IMPDH) und damit die Hemmung der Purinsynthese nicht als Hauptmechanismus zur Hemmung vom LASV-Wachstum nachweisen [249]. *In vivo* ist diese Inhibition allerdings relevant. Purine werden in sich schnell teilenden Zellen, wie z.B. Zellen des hämatopoietischen Systems, ständig benötigt. Für Ribavirin ist eine antiproliferative Wirkung auf T-Lymphozyten beschrieben [250]. Diese Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Viruseliminierung und Pathogenese von Lassa-Fieber im HHD-Mausmodell. Werden sie depletiert, tritt bei persistenter Virämie kein LF auf [238]. Ribavirinbehandelten A129-Mäusen zeigten einen ähnlichen Krankheits- und Viruseliminierungsverlauf wie LASV-infizierte HHD-Mäuse, denen die T-Zellen depletiert worden waren. Dies lässt den Schluss zu, dass Ribavirin möglicherweise suppressiv auf die zelluläre Immunantwort wirkt und so Viruseliminierung und Pathogenese in der Maus massiv beeinflusst. Es wäre denkbar, dass der therapeutische Effekt von Ribavirin gegen Lassa-Fieber im Menschen im Wesentlichen auch auf diesem Effekt beruht. Daher könnten Wirkstoffe, wie Mycophenolsäure (MPA) [251] und 5-Ethynyl-1- $\beta$ -D-Ribofuranosylimidazole-4-carboxamid (EICAR) [252], die eine stärkere Inhibition der IMPDH als Ribavirin hervorrufen, für weitere tierexperimentelle Testungen gegen LASV-Infektionen interessant sein. Beide Substanzen zeigten *in vitro* einen deutlichen antiviralen Effekt gegen LASV [249].

Die A129-Maus scheint sich als Tiermodell zur Testung antiviraler Substanzen gegen LASV-Infektionen zu eignen, auch wenn die Ergebnisse mit Ribavirin neue Fragen zur Wirkung des Medikaments aufwerfen. Dabei sollten die Parameter AST im Serum, Körpergewicht sowie Viruslast in Blut und Organen zur Beschreibung des Krankheitsverlaufs Berücksichtigung finden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Lassa-Virus (LASV) ist in Westafrika endemisch und verursacht beim Menschen ein hämorrhagisches Fieber mit häufig tödlichem Ausgang. Die Pathogenese des Lassa-Fiebers ist weitgehend unklar. Histopathologisch sind nur geringe Organschädigungen sichtbar, die ein Organversagen und den Tod nicht erklären können. Daher scheinen immunpathologische Prozesse ursächlich für den Krankheitsverlauf zu sein. In Tiermodellen für Lassa-Fieber sind Analysen zur Charakterisierung pathologischer Prozesse unter einheitlichen und kontrollierten Bedingungen möglich. Für Lassa-Fieber stand bis zu Beginn dieser Arbeit kein geeignetes murines Tiermodell zur Verfügung.

In dieser Arbeit sollten transgene HHD-Mäuse, die das humane HLA A2.1-Molekül statt den murinen MHC-I-Molekülen exprimieren, als Tiermodell für Lassa-Virusinfektionen etabliert werden. Es zeigte sich, dass die HHD-Maus im Gegensatz zur Wildtypmaus (C57BL/6) für den LASV-Stamm Ba366 suszeptibel ist und im Infektionsverlauf eine schwere Erkrankung mit teilweise tödlichem Ausgang entwickelt. Durch genetische und funktionelle T-Zell-Depletion wurde gezeigt, dass  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese in HHD-Mäusen spielen. Interleukin-12p40 im Serum und induzierte Stickstoffmonoxidsynthase in Makrophagen wurden verstärkt exprimiert. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Erkrankung mit einer Aktivierung von Makrophagen einhergeht, die vermutlich T-Zell-abhängig ist. Andererseits schützen T-Zellen die C57BL/6- Wildtypmaus und Mopeia-Virus (MOPV)-immunisierte HHD-Mäuse vor einer LASV-Infektion.

Ein weiteres murines Tiermodell für LASV-Infektionen wurde auf der Basis der Interferon (IFN)- $\alpha/\beta$ -Rezeptor-defizienten Maus (A129) etabliert. A129-Mäuse waren für alle getesteten LASV-Stämme suszeptibel und erkrankten an der Infektion. Biochemische, virologische und histologische Analysen ergaben ein zu Lassa-Fieber vergleichbares Krankheitsbild. Die apathogenen Arenaviren Morogoro und Mobala replizierten in den A129-Mäusen nicht und induzierten keine Erkrankung. Das ebenfalls für Menschen nicht-pathogene MOPV dagegen führte zu Erkrankung mit teilweise hohen Viruslasten in den Organen. Demnach könnte sich MOPV als Surrogat für LASV-Infektionen in A129-Mäusen eignen; entsprechende Experimente wären unter Schutzstufe 2 Bedingungen möglich. Die Eignung des Mausmodells für antivirale Substanztestungen wurde mit Ribavirin, dem Standardtherapeutikum für Lassa-Fieber des Menschen, überprüft. Ribavirin reduzierte deutlich die Erkrankungszeichen LASV-infizierter Mäuse, allerdings ohne die Viruslast in Blut und Organen zu verringern. Die Eliminierung des Virus war sogar verzögert. Da vermutlich immunpathologische Prozesse die Erkrankung induzieren,

könnte Ribavirin aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung (es hemmt den Nukleotidmetabolismus der Zelle) die Schwere der Erkrankung reduzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Mausmodelle für das humane Lassa-Fieber etabliert. Diese Tiermodelle können für weitere Untersuchungen zur Pathogenese des Lassa-Fiebers, sowie zur Testung von Impfstoffen und Therapeutika genutzt werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Auperin DD, Romanowski V, Galinski M, Bishop DH (1984) Sequencing studies of pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. *J Virol* 52: 897-904.
2. Speir RW, Wood O, Liebhaber H, Buckley SM (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. IV. Electron microscopy of Vero cell cultures infected with Lassa virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 19: 692-694.
3. Buckley SM, Casals J (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 19: 680-691.
4. Rowe WP, Murphy FA, Bergold GH, Casals J, Hotchin J, et al. (1970) Arenoviruses: proposed name for a newly defined virus group. *J Virol* 5: 651-652.
5. Armstrong C, Lille R (1934) Experimental lymphocytic coriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St.Louis encephalitis epidemic. *Pub Health Rep* 49: 1019-1027.
6. Frame JD, Baldwin JM, Jr., Gocke DJ, Troup JM (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description and pathological findings. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 19: 670-676.
7. Carstens EB (2009) Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology* 155: 133-146.
8. 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.
9. Coulibaly-N'golo D, Allali B, Kouassi SK, Fichet-Calvet E, Becker-Ziaja B, et al. (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.
10. Ishii A, Thomas Y, Moonga L, Nakamura I, Ohnuma A, et al. (2011) Novel arenavirus, zambia. *Emerging infectious diseases* 17: 1921-1924.
11. Milazzo ML, Campbell GL, Fulhorst CF (2011) Novel arenavirus infection in humans, United States. *Emerging infectious diseases* 17: 1417-1420.
12. Briese T, Paweska JT, McMullan LK, Hutchison SK, Street C, et al. (2009) Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS pathogens* 5: e1000455.
13. Wulff H, Lange JV, Webb PA (1978) Interrelationships among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence. *Intervirolgy* 9: 344-350.
14. Charrel RN, de Lamballerie X (2010) Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Veterinary microbiology* 140: 213-220.
15. Downs WG, Anderson CR, Spence L, Aitken THG, 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.
16. Gonzalez JP, Georges AJ, Kiley MP, Meunier DM, Peters CJ, et al. (1986) Evolutionary biology of a Lassa virus complex. *Medical microbiology and immunology* 175: 157-159.

17. Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST (1997) Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Molecular phylogenetics and evolution* 8: 301-316.
18. Ehichioya DU, Hass M, Becker-Ziaja B, Ehimuan J, Asogun DA, et al. (2011) Current molecular epidemiology of Lassa virus in Nigeria. *Journal of clinical microbiology* 49: 1157-1161.
19. Lisieux T, Coimbra M, Nassar ES, Burattini MN, de Souza LT, et al. (1994) New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet* 343: 391-392.
20. Salas R, de Manzione N, Tesh RB, Rico-Hesse R, Shope RE, et al. (1991) Venezuelan haemorrhagic fever. *Lancet* 338: 1033-1036.
21. Parodi AS, Greenway DJ, Rugiero HR, Frigerio M, De La Barrera JM, et al. (1958) [Concerning the epidemic outbreak in Junin]. *El Dia medico* 30: 2300-2301.
22. Mackenzie RB (1965) Epidemiology of Machupo virus infection. I. Pattern of human infection, San Joaquin, Bolivia, 1962-1964. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 14: 808-813.
23. Kuns ML (1965) Epidemiology of Machupo virus infection. II. Ecological and control studies of hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 14: 813-816.
24. Johnson KM (1965) Epidemiology of Machupo virus infection. 3. Significance of virological observations in man and animals. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 14: 816-818.
25. Delgado S, Erickson BR, Agudo R, Blair PJ, Vallejo E, et al. (2008) Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS pathogens* 4: e1000047.
26. Rousseau MC, Saron MF, Brouqui P, Bourgeade A (1997) Lymphocytic choriomeningitis virus in southern France: four case reports and a review of the literature. *European journal of epidemiology* 13: 817-823.
27. Fischer SA, Graham MB, Kuehnert MJ, Kotton CN, Srinivasan A, et al. (2006) Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *The New England journal of medicine* 354: 2235-2249.
28. Mets MB, Barton LL, Khan AS, Ksiazek TG (2000) Lymphocytic choriomeningitis virus: an underdiagnosed cause of congenital chorioretinitis. *American journal of ophthalmology* 130: 209-215.
29. Mets MB (1999) Childhood blindness and visual loss: an assessment at two institutions including a "new" cause. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 97: 653-696.
30. Pearce BD, Po CL, Pisell TL, Miller AH (1999) Lymphocytic responses and the gradual hippocampal neuron loss following infection with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Journal of neuroimmunology* 101: 137-147.
31. Pearce BD, Valadi NM, Po CL, Miller AH (2000) Viral infection of developing GABAergic neurons in a model of hippocampal disinhibition. *Neuroreport* 11: 2433-2438.
32. Peters CJ, Buchmeier M, Rollin PE, Ksiazek TG (1996) Arenaviruses. In *Fields Virology*. Edited by Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman R, Straus SE Lippincott-Raven Publishers: 1521-1551.
33. Burns JW, Buchmeier MJ (1991) Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 183: 620-629.
34. Eschli B, Quirin K, Wepf A, Weber J, Zinkernagel R, et al. (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.

35. 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.
36. 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.
37. Raju R, Raju L, Hacker D, Garcin D, Compans R, et al. (1990) Nontemplated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mRNAs. *Virology* 174: 53-59.
38. Salvato MS, Schweighofer KJ, Burns J, Shimomaye EM (1992) Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus research* 22: 185-198.
39. Leung WC, Rawls WE (1977) Virion-associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus. *Virology* 81: 174-176.
40. Modrow S, Falke D (1998) *Molekulare Virologie*. 1 korrigierter Nachdruck ed Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin.
41. Lukashevich IS, Stelmakh TA, Golubev VP, Stchesljenok EP, Lemeshko NN (1984) Ribonucleic acids of Machupo and Lassa viruses. *Arch Virol* 79: 189-203.
42. Harnish DG, Dimock K, Bishop DH, Rawls WE (1983) Gene mapping in Pichinde virus: assignment of viral polypeptides to genomic L and S RNAs. *Journal of virology* 46: 638-641.
43. Salvato MS, Shimomaye EM (1989) The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* 173: 1-10.
44. Riviere Y, Ahmed R, Southern PJ, Buchmeier MJ, Dutko FJ, et al. (1985) The S RNA segment of lymphocytic choriomeningitis virus codes for the nucleoprotein and glycoproteins 1 and 2. *Journal of virology* 53: 966-968.
45. Clegg JC, Wilson SM, Oram JD (1991) Nucleotide sequence of the S RNA of Lassa virus (Nigerian strain) and comparative analysis of arenavirus gene products. *Virus research* 18: 151-164.
46. Wilson SM, Clegg JC (1991) Sequence analysis of the S RNA of the African arenavirus Mopeia: an unusual secondary structure feature in the intergenic region. *Virology* 180: 543-552.
47. Auperin DD, Sasso DR, McCormick JB (1986) Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of the Lassa virus S genome RNA. *Virology* 154: 155-167.
48. Pinschewer DD, Perez M, de la Torre JC (2005) Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *Journal of virology* 79: 4519-4526.
49. Hass M, Westerkofsky M, Muller S, Becker-Ziaja B, Busch C, et al. (2006) Mutational analysis of the lassa virus promoter. *Journal of virology* 80: 12414-12419.
50. Auperin DD, Compans RW, Bishop DH (1982) Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New World and Old World arenaviruses. *Virology* 121: 200-203.
51. Perez M, de la Torre JC (2003) Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology* 77: 1184-1194.
52. Kranzusch PJ, Schenk AD, Rahmeh AA, Radoshitzky SR, Bavari S, et al. (2010) Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20069-20074.

53. 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. *Journal of virology* 74: 3470-3477.
54. Radoshitzky SR, Abraham J, Spiropoulou CF, Kuhn JH, Nguyen D, et al. (2007) Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* 446: 92-96.
55. Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, et al. (1998) Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282: 2079-2081.
56. 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. *Journal of virology* 76: 5140-5146.
57. Borrow P, Oldstone MB (1994) Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* 198: 1-9.
58. Marsh M, Helenius A (2006) Virus entry: open sesame. *Cell* 124: 729-740.
59. Garcin D, Kolakofsky D (1990) A novel mechanism for the initiation of Tacaribe arenavirus genome replication. *Journal of virology* 64: 6196-6203.
60. Meyer BJ, Southern PJ (1993) Concurrent sequence analysis of 5' and 3' RNA termini by intramolecular circularization reveals 5' nontemplated bases and 3' terminal heterogeneity for lymphocytic choriomeningitis virus mRNAs. *Journal of virology* 67: 2621-2627.
61. Morin B, Coutard B, Lelke M, Ferron F, Kerber R, et al. (2010) The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS pathogens* 6: e1001038.
62. 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. *Journal of virology* 84: 1934-1944.
63. Shih SR, Krug RM (1996) Surprising function of the three influenza viral polymerase proteins: selective protection of viral mRNAs against the cap-snatching reaction catalyzed by the same polymerase proteins. *Virology* 226: 430-435.
64. Reguera J, Weber F, Cusack S (2010) Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS pathogens* 6: e1001101.
65. Tortorici MA, Albarino CG, Posik DM, Ghiringhelli PD, Lozano ME, et al. (2001) Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus research* 73: 41-55.
66. Bruns M, Zeller W, Rohdewohld H, Lehmann-Grube F (1986) Lymphocytic choriomeningitis virus. IX. Properties of the nucleocapsid. *Virology* 151: 77-85.
67. Qi X, Lan S, Wang W, Schelde LM, Dong H, et al. (2010) Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* 468: 779-783.
68. Hastie KM, Kimberlin CR, Zandonatti MA, MacRae IJ, Saphire EO (2011) Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 2396-2401.
69. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 12701-12705.
70. Perez M, Greenwald DL, de la Torre JC (2004) Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *Journal of virology* 78: 11443-11448.

71. Strecker T, Eichler R, Meulen J, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, et al. (2003) Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *Journal of virology* 77: 10700-10705.
72. 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.
73. Troup JM, White HA, Fom AL, Carey DE (1970) An outbreak of Lassa fever on the Jos plateau, Nigeria, in January-February 1970. A preliminary report. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 19: 695-696.
74. Monath TP, Newhouse VF, Kemp GE, Setzer HW, Cacciapuoti A (1974) Lassa virus isolation from *Mastomys natalensis* rodents during an epidemic in Sierra Leone. *Science* 185: 263-265.
75. Safronetz D, Lopez JE, Sogoba N, Traore SF, Raffel SJ, et al. (2010) Detection of Lassa virus, Mali. *Emerging infectious diseases* 16: 1123-1126.
76. Lukashevich IS, Clegg JC, Sidibe K (1993) Lassa virus activity in Guinea: distribution of human antiviral antibody defined using enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant antigen. *Journal of medical virology* 40: 210-217.
77. Monath TP, Mertens PE, Patton R, Moser CR, Baum JJ, et al. (1973) A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March-April 1972. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 22: 773-779.
78. Gunther S, Emmerich P, Laue T, Kuhle O, Asper M, et al. (2000) Imported lassa fever in Germany: molecular characterization of a new lassa virus strain. *Emerging infectious diseases* 6: 466-476.
79. Fichet-Calvet E, Lecompte E, Koivogui L, Soropogui B, Dore A, et al. (2007) Fluctuation of abundance and Lassa virus prevalence in *Mastomys natalensis* in Guinea, West Africa. *Vector borne and zoonotic diseases* 7: 119-128.
80. Ter Meulen J, Lukashevich I, Sidibe K, Inapogui A, Marx M, et al. (1996) Hunting of peridomestic rodents and consumption of their meat as possible risk factors for rodent-to-human transmission of Lassa virus in the Republic of Guinea. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 55: 661-666.
81. Cummins D, Bennett D, Machin SJ (1991) Exchange transfusion of a patient with fulminant Lassa fever. *Postgraduate medical journal* 67: 193-194.
82. McCormick JB (1987) Epidemiology and control of Lassa fever. *Current topics in microbiology and immunology* 134: 69-78.
83. McCormick JB, Webb PA, Krebs JW, Johnson KM, Smith ES (1987) A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *The Journal of infectious diseases* 155: 437-444.
84. Fisher-Hoch SP, Tomori O, Nasidi A, Perez-Oronoz GI, Fakile Y, et al. (1995) Review of cases of nosocomial Lassa fever in Nigeria: the high price of poor medical practice. *Bmj* 311: 857-859.
85. McCormick JB, Fisher-Hoch SP (2002) Lassa fever. *Current topics in microbiology and immunology* 262: 75-109.
86. Schmitz H, Kohler B, Laue T, Drosten C, Veldkamp PJ, et al. (2002) Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4: 43-50.
87. Freedman DO, Woodall J (1999) Emerging infectious diseases and risk to the traveler. *The Medical clinics of North America* 83: 865-883, v.
88. Amorosa V, MacNeil A, McConnell R, Patel A, Dillon KE, et al. (2010) Imported Lassa fever, Pennsylvania, USA, 2010. *Emerging infectious diseases* 16: 1598-1600.

89. Atkin S, Anaraki S, Gothard P, Walsh A, Brown D, et al. (2009) The first case of Lassa fever imported from Mali to the United Kingdom, February 2009. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 14.
90. Kitching A, Addiman S, Cathcart S, Bishop L, Krahe D, et al. (2009) A fatal case of Lassa fever in London, January 2009. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 14.
91. Anonymus (2006) E-alert 24 July: Case of Lassa fever imported into Germany from Sierra Leone. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 11: E060727 060721.
92. Anonymus (2004) Imported Lassa fever--New Jersey, 2004. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 53: 894-897.
93. Anonymus (2000) Lassa fever, imported case, Netherlands. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 75: 265.
94. Anonymus (2000) Lassa fever imported to England. *Communicable disease report CDR weekly* 10: 99.
95. Anonymus (2000) Lassa fever, case imported to Germany. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 75: 17-18.
96. Mahdy MS, Chiang W, McLaughlin B, Derksen K, Truxton BH, et al. (1989) Lassa fever: the first confirmed case imported into Canada. *Canada diseases weekly report = Rapport hebdomadaire des maladies au Canada* 15: 193-198.
97. Hirabayashi Y, Oka S, Goto H, Shimada K, Kurata T, et al. (1989) [The first imported case of Lassa fever in Japan]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* 47: 71-75.
98. McCormick JB, King IJ, Webb PA, Johnson KM, O'Sullivan R, et al. (1987) A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *J Infect Dis* 155: 445-455.
99. Johnson KM, McCormick JB, Webb PA, Smith ES, Elliott LH, et al. (1987) Clinical virology of Lassa fever in hospitalized patients. *The Journal of infectious diseases* 155: 456-464.
100. Cummins D, McCormick JB, Bennett D, Samba JA, Farrar B, et al. (1990) Acute sensorineural deafness in Lassa fever. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 264: 2093-2096.
101. Monson MH, Cole AK, Frame JD, Serwint JR, Alexander S, et al. (1987) Pediatric Lassa fever: a review of 33 Liberian cases. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 36: 408-415.
102. Walker DH, McCormick JB, Johnson KM, Webb PA, Komba-Kono G, et al. (1982) Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man. *The American journal of pathology* 107: 349-356.
103. Jahrling PB, Smith S, Hesse RA, Rhoderick JB (1982) Pathogenesis of Lassa virus infection in guinea pigs. *Infection and immunity* 37: 771-778.
104. Peters CJ, Jahrling PB, Liu CT, Kenyon RH, McKee KT, Jr., et al. (1987) Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Current topics in microbiology and immunology* 134: 5-68.
105. McCormick JB, King IJ, Webb PA, Scribner CL, Craven RB, et al. (1986) Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med* 314: 20-26.

106. Frame JD, Verbrugge GP, Gill RG, Pinneo L (1984) The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78: 319-324.
107. Leifer E, Gocke DJ, Bourne H (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. II. Report of a laboratory-acquired infection treated with plasma from a person recently recovered from the disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 19: 677-679.
108. Fisher-Hoch SP, McCormick JB (2001) Towards a human Lassa fever vaccine. *Reviews in medical virology* 11: 331-341.
109. Clegg JC, Lloyd G (1987) Vaccinia recombinant expressing Lassa-virus internal nucleocapsid protein protects guineapigs against Lassa fever. *Lancet* 2: 186-188.
110. Auperin DD, Esposito JJ, Lange JV, Bauer SP, Knight J, et al. (1988) Construction of a recombinant vaccinia virus expressing the Lassa virus glycoprotein gene and protection of guinea pigs from a lethal Lassa virus infection. *Virus research* 9: 233-248.
111. Fisher-Hoch SP, McCormick JB, Auperin D, Brown BG, Castor M, et al. (1989) Protection of rhesus monkeys from fatal Lassa fever by vaccination with a recombinant vaccinia virus containing the Lassa virus glycoprotein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 317-321.
112. Morrison HG, Bauer SP, Lange JV, Esposito JJ, McCormick JB, et al. (1989) Protection of guinea pigs from Lassa fever by vaccinia virus recombinants expressing the nucleoprotein or the envelope glycoproteins of Lassa virus. *Virology* 171: 179-188.
113. Carrion R, Jr., Patterson JL, Johnson C, Gonzales M, Moreira CR, et al. (2007) A ML29 reassortant virus protects guinea pigs against a distantly related Nigerian strain of Lassa virus and can provide sterilizing immunity. *Vaccine* 25: 4093-4102.
114. Lukashevich IS, Carrion R, Jr., Salvato MS, Mansfield K, Brasky K, et al. (2008) Safety, immunogenicity, and efficacy of the ML29 reassortant vaccine for Lassa fever in small non-human primates. *Vaccine* 26: 5246-5254.
115. Lukashevich IS, Patterson J, Carrion R, Moshkoff D, Ticer A, et al. (2005) A live attenuated vaccine for Lassa fever made by reassortment of Lassa and Mopeia viruses. *Journal of virology* 79: 13934-13942.
116. Kiley MP, Lange JV, Johnson KM (1979) Protection of rhesus monkeys from Lassa virus by immunisation with closely related Arenavirus. *Lancet* 2: 738.
117. Geisbert TW, Jones S, Fritz EA, Shurtleff AC, Geisbert JB, et al. (2005) Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med* 2: e183.
118. Lunkenheimer K, Hufert FT, Schmitz H (1990) Detection of Lassa virus RNA in specimens from patients with Lassa fever by using the polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology* 28: 2689-2692.
119. Demby AH, Chamberlain J, Brown DW, Clegg CS (1994) Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology* 32: 2898-2903.
120. Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, et al. (2002) Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology* 40: 2323-2330.
121. Vieth S, Drosten C, Lenz O, Vincent M, Omilabu S, et al. (2007) RT-PCR assay for detection of Lassa virus and related Old World arenaviruses targeting the L gene. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101: 1253-1264.

122. Olschlager S, Lelke M, Emmerich P, Panning M, Drosten C, et al. (2010) Improved detection of Lassa virus by reverse transcription-PCR targeting the 5' region of S RNA. *Journal of clinical microbiology* 48: 2009-2013.
123. Niklasson BS, Jahrling PB, Peters CJ (1984) Detection of Lassa virus antigens and Lassa virus-specific immunoglobulins G and M by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of clinical microbiology* 20: 239-244.
124. Buckley SM, Casals J, Downs WG (1970) Isolation and antigenic characterization of Lassa virus. *Nature* 227: 174.
125. Monath TP, Casals J (1975) Diagnosis of Lassa fever and the isolation and management of patients. *Bull World Health Organ* 52: 707-715.
126. Jahrling PB, Niklasson BS, McCormick JB (1985) Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen and antibody. *Lancet* 1: 250-252.
127. Branco LM, Matschiner A, Fair JN, Goba A, Sampey DB, et al. (2008) Bacterial-based systems for expression and purification of recombinant Lassa virus proteins of immunological relevance. *Virology* 381: 74.
128. Durbeej M, Henry MD, Ferletta M, Campbell KP, Ekblom P (1998) Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 46: 449-457.
129. Walker DH, Johnson KM, Lange JV, Gardner JJ, Kiley MP, et al. (1982) Experimental infection of rhesus monkeys with Lassa virus and a closely related arenavirus, Mozambique virus. *The Journal of infectious diseases* 146: 360-368.
130. Walker DH, Wulff H, Murphy FA (1975) Experimental Lassa virus infection in the squirrel monkey. *The American journal of pathology* 80: 261-278.
131. Walker DH, Wulff H, Lange JV, Murphy FA (1975) Comparative pathology of Lassa virus infection in monkeys, guinea-pigs, and *Mastomys natalensis*. *Bull World Health Organ* 52: 523-534.
132. Jahrling PB, Hesse RA, Eddy GA, Johnson KM, Callis RT, et al. (1980) Lassa virus infection of rhesus monkeys: pathogenesis and treatment with ribavirin. *J Infect Dis* 141: 580-589.
133. McCormick JB, Walker DH, King IJ, Webb PA, Elliott LH, et al. (1986) Lassa virus hepatitis: a study of fatal Lassa fever in humans. *Am J Trop Med Hyg* 35: 401-407.
134. Edington GM, White HA (1972) The pathology of Lassa fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66: 381-389.
135. Fisher-Hoch S, McCormick JB, Sasso D, Craven RB (1988) Hematologic dysfunction in Lassa fever. *Journal of medical virology* 26: 127-135.
136. Lange JV, Mitchell SW, McCormick JB, Walker DH, Evatt BL, et al. (1985) Kinetic study of platelets and fibrinogen in Lassa virus-infected monkeys and early pathologic events in Mopeia virus-infected monkeys. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 34: 999-1007.
137. Fisher-Hoch SP, Mitchell SW, Sasso DR, Lange JV, Ramsey R, et al. (1987) Physiological and immunologic disturbances associated with shock in a primate model of Lassa fever. *J Infect Dis* 155: 465-474.
138. Gunther S, Lenz O (2004) Lassa virus. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41: 339-390.
139. Mahanty S, Bausch DG, Thomas RL, Goba A, Bah A, et al. (2001) Low levels of interleukin-8 and interferon-inducible protein-10 in serum are associated with fatal infections in acute Lassa fever. *The Journal of infectious diseases* 183: 1713-1721.
140. Mahanty S, Hutchinson K, Agarwal S, McRae M, Rollin PE, et al. (2003) Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *Journal of immunology* 170: 2797-2801.

141. Baize S, Kaplon J, Faure C, Pannetier D, Georges-Courbot MC, et al. (2004) Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. *Journal of immunology* 172: 2861-2869.
142. Lukashevich IS, Maryankova R, Vladyko AS, Nashkevich N, Koleda S, et al. (1999) Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression. *Journal of medical virology* 59: 552-560.
143. Pannetier D, Faure C, Georges-Courbot MC, Deubel V, Baize S (2004) Human macrophages, but not dendritic cells, are activated and produce alpha/beta interferons in response to Mopeia virus infection. *Journal of virology* 78: 10516-10524.
144. Pannetier D, Reynard S, Russier M, Journeaux A, Tordo N, et al. (2011) Human dendritic cells infected with the nonpathogenic Mopeia virus induce stronger T-cell responses than those infected with Lassa virus. *Journal of virology* 85: 8293-8306.
145. Baize S, Pannetier D, Faure C, Marianneau P, Marendat I, et al. (2006) Role of interferons in the control of Lassa virus replication in human dendritic cells and macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8: 1194-1202.
146. Callis RT, Jahrling PB, DePaoli A (1982) Pathology of Lassa virus infection in the rhesus monkey. *Am J Trop Med Hyg* 31: 1038-1045.
147. Lukashevich IS (1985) Lassa virus lethality for inbred mice. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale* 65: 207-209.
148. Stephen EL, Jahrling PB (1979) Experimental Lassa fever virus infection successfully treated with ribavirin. *Lancet* 1: 268-269.
149. Danes L, Benda R, Fuchsova M (1963) [Experimental Inhalation Infection of Monkeys of the *Macacus Cynomolgus* and *Macacus Rhesus* Species with the Virus of Lymphocytic Choriomeningitis (We)]. *Bratislavske lekarske listy* 2: 71-79.
150. Lukashevich IS, Djavani M, Rodas JD, Zapata JC, Osborne A, et al. (2002) Hemorrhagic fever occurs after intravenous, but not after intragastric, inoculation of rhesus macaques with lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of medical virology* 67: 171-186.
151. Lukashevich IS, Tikhonov I, Rodas JD, Zapata JC, Yang Y, et al. (2003) Arenavirus-mediated liver pathology: acute lymphocytic choriomeningitis virus infection of rhesus macaques is characterized by high-level interleukin-6 expression and hepatocyte proliferation. *Journal of virology* 77: 1727-1737.
152. Lukashevich IS, Rodas JD, Tikhonov, II, Zapata JC, Yang Y, et al. (2004) LCMV-mediated hepatitis in rhesus macaques: WE but not ARM strain activates hepatocytes and induces liver regeneration. *Arch Virol* 149: 2319-2336.
153. Djavani MM, Crasta OR, Zapata JC, Fei Z, Folkerts O, et al. (2007) Early blood profiles of virus infection in a monkey model for Lassa fever. *J Virol* 81: 7960-7973.
154. Rodas JD, Cairo C, Djavani M, Zapata JC, Ruckwardt T, et al. (2009) Circulating natural killer and gammadelta T cells decrease soon after infection of rhesus macaques with lymphocytic choriomeningitis virus. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 583-591.
155. Zapata JC, Pauza CD, Djavani MM, Rodas JD, Moshkoff D, et al. (2011) Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection of macaques: A model for Lassa fever. *Antiviral Res* 92: 125-138.
156. Carrion R, Jr., Brasky K, Mansfield K, Johnson C, Gonzales M, et al. (2007) Lassa virus infection in experimentally infected marmosets: liver pathology and immunophenotypic alterations in target tissues. *Journal of virology* 81: 6482-6490.

157. Jahrling PB, Peters CJ (1984) Passive antibody therapy of Lassa fever in cynomolgus monkeys: importance of neutralizing antibody and Lassa virus strain. *Infection and immunity* 44: 528-533.
158. Jahrling PB, Peters CJ, Stephen EL (1984) Enhanced treatment of Lassa fever by immune plasma combined with ribavirin in cynomolgus monkeys. *The Journal of infectious diseases* 149: 420-427.
159. Stephenson EH, Larson EW, Dominik JW (1984) Effect of environmental factors on aerosol-induced Lassa virus infection. *Journal of medical virology* 14: 295-303.
160. Baize S, Marianneau P, Loth P, Reynard S, Journeaux A, et al. (2009) Early and strong immune responses are associated with control of viral replication and recovery in lassa virus-infected cynomolgus monkeys. *Journal of virology* 83: 5890-5903.
161. Hensley LE, Smith MA, Geisbert JB, Fritz EA, Daddario-DiCaprio KM, et al. (2011) Pathogenesis of Lassa fever in cynomolgus macaques. *Virology* 428: 205.
162. Dvoretzkaia VI, Bogatkov GV, Pshenichnov VA, Evseev AA (1991) [The therapeutic efficacy of ribamidil and virazole in experimental Lassa fever in monkeys]. *Voprosy virusologii* 36: 55-57.
163. Evseev AA, Dvoretzkaia VI, Bogatkov GV, Pshenichnov VA, Mustafin RM (1991) [Experimental Lassa fever in hamadryas baboons]. *Voprosy virusologii* 36: 150-152.
164. Dvoretzkaia VI, Evseev AA, Bogatkov GV, Pshenichnov VA (1990) [Comparative evaluation of the antiviral efficacy of virazole and ribamidil in experimental Lassa fever in monkeys]. *Voprosy virusologii* 35: 151-152.
165. Jahrling PB (1983) Protection of Lassa virus-infected guinea pigs with Lassa-immune plasma of guinea pig, primate, and human origin. *Journal of medical virology* 12: 93-102.
166. Cashman KA, Smith MA, Twenhafel NA, Larson RA, Jones KF, et al. (2011) Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model. *Antiviral Res* 90: 70-79.
167. Firsova IV, Shatokhina IV, Borisevich IV, Evseev AA, Maksimov VA, et al. (2003) [Use of guinea pigs for assessing the efficacy of vaccines against Lassa fever]. *Voprosy virusologii* 48: 43-45.
168. Huggins JW (1989) Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 4: S750-761.
169. Jahrling PB, Hesse RA, Rhoderick JB, Elwell MA, Moe JB (1981) Pathogenesis of a pichinde virus strain adapted to produce lethal infections in guinea pigs. *Infection and immunity* 32: 872-880.
170. Cosgriff TM, Jahrling PB, Chen JP, Hodgson LA, Lewis RM, et al. (1987) Studies of the coagulation system in arenaviral hemorrhagic fever: experimental infection of strain 13 guinea pigs with Pichinde virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 36: 416-423.
171. Lucia HL, Coppenhaver DH, Baron S (1989) Arenavirus infection in the guinea pig model: antiviral therapy with recombinant interferon-alpha, the immunomodulator CL246,738 and ribavirin. *Antiviral Res* 12: 279-292.
172. Aronson JF, Herzog NK, Jerrells TR (1994) Pathological and virological features of arenavirus disease in guinea pigs. Comparison of two Pichinde virus strains. *Am J Pathol* 145: 228-235.
173. Qian C, Jahrling PB, Peters CJ, Liu CT (1994) Cardiovascular and pulmonary responses to Pichinde virus infection in strain 13 guinea pigs. *Laboratory animal science* 44: 600-607.

174. Zhang L, Marriott KA, Harnish DG, Aronson JF (2001) Reassortant analysis of guinea pig virulence of pichinde virus variants. *Virology* 290: 30-38.
175. Fennewald SM, Aronson JF, Zhang L, Herzog NK (2002) Alterations in NF-kappaB and RBP-Jkappa by arenavirus infection of macrophages in vitro and in vivo. *Journal of virology* 76: 1154-1162.
176. Scott EP, Aronson JF (2008) Cytokine patterns in a comparative model of arenavirus haemorrhagic fever in guinea pigs. *J Gen Virol* 89: 2569-2579.
177. Lan S, McLay Schelde L, Wang J, Kumar N, Ly H, et al. (2009) Development of infectious clones for virulent and avirulent pichinde viruses: a model virus to study arenavirus-induced hemorrhagic fevers. *J Virol* 83: 6357-6362.
178. Liang Y, Lan S, Ly H (2009) Molecular determinants of Pichinde virus infection of guinea pigs--a small animal model system for arenaviral hemorrhagic fevers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171 Suppl 1: E65-74.
179. Mendenhall M, Russell A, Smee DF, Hall JO, Skirpstunas R, et al. (2011) Effective oral favipiravir (T-705) therapy initiated after the onset of clinical disease in a model of arenavirus hemorrhagic Fever. *PLoS neglected tropical diseases* 5: e1342.
180. Genovesi EV, Johnson AJ, Peters CJ (1988) Susceptibility and resistance of inbred strains of Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) to wasting disease caused by lymphocytic choriomeningitis virus: pathogenesis of lethal and non-lethal infections. *The Journal of general virology* 69 ( Pt 9): 2209-2220.
181. Buchmeier MJ, Rawls WE (1977) Variation between strains of hamsters in the lethality of Pichinde virus infections. *Infection and immunity* 16: 413-421.
182. Gowen BB, Barnard DL, Smee DF, Wong MH, Pace AM, et al. (2005) Interferon alfacon-1 protects hamsters from lethal pichinde virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2378-2386.
183. Gowen BB, Smee DF, Wong MH, Pace AM, Jung KH, et al. (2006) Combinatorial ribavirin and interferon alfacon-1 therapy of acute arenaviral disease in hamsters. *Antivir Chem Chemother* 17: 175-183.
184. Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mendenhall M, et al. (2007) In vitro and in vivo activities of T-705 against arenavirus and bunyavirus infections. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3168-3176.
185. Gowen BB, Wong MH, Larson D, Ye W, Jung KH, et al. (2010) Development of a new tacaribe arenavirus infection model and its use to explore antiviral activity of a novel aristeromycin analog. *PloS one* 5.
186. Xiao SY, Zhang H, Yang Y, Tesh RB (2001) Pirital virus (Arenaviridae) infection in the syrian golden hamster, *Mesocricetus auratus*: a new animal model for arenaviral hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 64: 111-118.
187. Sbrana E, Mateo RI, Xiao SY, Popov VL, Newman PC, et al. (2006) Clinical laboratory, virologic, and pathologic changes in hamsters experimentally infected with Pirital virus (Arenaviridae): a rodent model of Lassa fever. *Am J Trop Med Hyg* 74: 1096-1102.
188. Lukashevich IS (1992) Generation of reassortants between African arenaviruses. *Virology* 188: 600-605.
189. Ignatyev G, Steinkasserer A, Streltsova M, Atrasheuskaya A, Agafonov A, et al. (2000) Experimental study on the possibility of treatment of some hemorrhagic fevers. *Journal of biotechnology* 83: 67-76.
190. Ignat'ev GM (2002) [Immunogenic and protective characteristics of recombinant Lassa virus NP protein]. *Voprosy virusologii* 47: 28-31.

191. Uckun FM, Petkevich AS, Vassilev AO, Tibbles HE, Titov L (2004) Stampidine prevents mortality in an experimental mouse model of viral hemorrhagic fever caused by lassa virus. *BMC infectious diseases* 4: 1.
192. Uckun FM, Venkatachalam TK, Erbeck D, Chen CL, Petkevich AS, et al. (2005) Zidampidine, an aryl phosphate derivative of AZT: in vivo pharmacokinetics, metabolism, toxicity, and anti-viral efficacy against hemorrhagic fever caused by Lassa virus. *Bioorganic & medicinal chemistry* 13: 3279-3288.
193. Lindenbach BD, Rice CM (1997) trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol* 71: 9608-9617.
194. Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, et al. (1997) HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *The Journal of experimental medicine* 185: 2043-2051.
195. Koller BH, Marrack P, Kappler JW, Smithies O (1990) Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* 248: 1227-1230.
196. Kontgen F, Suss G, Stewart C, Steinmetz M, Bluethmann H (1993) Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. *International immunology* 5: 957-964.
197. Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, et al. (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264: 1918-1921.
198. Winn WC, Jr., Walker DH (1975) The pathology of human Lassa fever. *Bull World Health Organ* 52: 535-545.
199. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* 3: 23-35.
200. Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, Flavell RA (1996) Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *Journal of immunology* 156: 8-11.
201. Tian L, Noelle RJ, Lawrence DA (1995) Activated T cells enhance nitric oxide production by murine splenic macrophages through gp39 and LFA-1. *European journal of immunology* 25: 306-309.
202. Shu U, Kuniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, et al. (1995) Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *European journal of immunology* 25: 1125-1128.
203. Lowenstein CJ, Padalko E (2004) iNOS (NOS2) at a glance. *Journal of cell science* 117: 2865-2867.
204. Fong CH, Bebien M, Didierlaurent A, Nebauer R, Hussell T, et al. (2008) An antiinflammatory role for IKKbeta through the inhibition of "classical" macrophage activation. *The Journal of experimental medicine* 205: 1269-1276.
205. Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, et al. (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological reviews* 202: 96-105.
206. Fink J, Gu F, Vasudevan SG (2006) Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Reviews in medical virology* 16: 263-275.
207. Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, et al. (2001) Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *The Journal of infectious diseases* 184: 1369-1373.
208. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, et al. (2003) Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine* 9: 921-927.

209. Zinkernagel RM, Haenseler E, Leist T, Cerny A, Hengartner H, et al. (1986) T cell-mediated hepatitis in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Liver cell destruction by H-2 class I-restricted virus-specific cytotoxic T cells as a physiological correlate of the 51Cr-release assay? *The Journal of experimental medicine* 164: 1075-1092.
210. Feldmann H, Bugany H, Mahner F, Klenk HD, Drenckhahn D, et al. (1996) Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *Journal of virology* 70: 2208-2214.
211. Sato K, Kadiiska MB, Ghio AJ, Corbett J, Fann YC, et al. (2002) In vivo lipid-derived free radical formation by NADPH oxidase in acute lung injury induced by lipopolysaccharide: a model for ARDS. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16: 1713-1720.
212. Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, et al. (2000) Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *The American journal of pathology* 157: 1671-1683.
213. Clark IA (2007) The advent of the cytokine storm. *Immunology and cell biology* 85: 271-273.
214. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R (2003) Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *Journal of virology* 77: 4911-4927.
215. Fisher-Hoch SP, Hutwagner L, Brown B, McCormick JB (2000) Effective vaccine for lassa fever. *Journal of virology* 74: 6777-6783.
216. Oehen S, Hengartner H, Zinkernagel RM (1991) Vaccination for disease. *Science* 251: 195-198.
217. Botten J, Alexander J, Pasquetto V, Sidney J, Barrowman P, et al. (2006) Identification of protective Lassa virus epitopes that are restricted by HLA-A2. *Journal of virology* 80: 8351-8361.
218. Jahrling PB, Peters CJ (1986) Serology and virulence diversity among Old-World arenaviruses, and the relevance to vaccine development. *Medical microbiology and immunology* 175: 165-167.
219. Bergthaler A, Flatz L, Hegazy AN, Johnson S, Horvath E, et al. (2010) Viral replicative capacity is the primary determinant of lymphocytic choriomeningitis virus persistence and immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 21641-21646.
220. Sullivan BM, Emonet SF, Welch MJ, Lee AM, Campbell KP, et al. (2011) Point mutation in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is necessary for receptor binding, dendritic cell infection, and long-term persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 2969-2974.
221. Xu L, Bao L, Zhou J, Wang D, Deng W, et al. (2011) Genomic polymorphism of the pandemic A (H1N1) influenza viruses correlates with viral replication, virulence, and pathogenicity in vitro and in vivo. *PloS one* 6: e20698.
222. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, et al. (2007) Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *The Journal of experimental medicine* 204: 2473-2485.
223. Janeway CA, Travers P, Walport M (2008) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Current Biology Publications, London; Garland Publishing, New York 8th Edition.

224. Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, et al. (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259: 1742-1745.
225. van den Broek MF, Muller U, Huang S, Aguet M, Zinkernagel RM (1995) Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *Journal of virology* 69: 4792-4796.
226. Mordstein M, Kochs G, Dumoutier L, Renauld JC, Paludan SR, et al. (2008) Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS pathogens* 4: e1000151.
227. Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, et al. (2006) Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *Journal of virology* 80: 4501-4509.
228. Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, Jessen B, Rieger T, et al. (2010) Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *Journal of virology* 84: 5670-5677.
229. Zhou S, Cerny AM, Zacharia A, Fitzgerald KA, Kurt-Jones EA, et al. (2010) Induction and inhibition of type I interferon responses by distinct components of lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology* 84: 9452-9462.
230. 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. *Journal of virology* 81: 12696-12703.
231. Martinez-Sobrido L, Zuniga EI, Rosario D, Garcia-Sastre A, de la Torre JC (2006) Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology* 80: 9192-9199.
232. Borrow P, Martinez-Sobrido L, de la Torre JC (2010) Inhibition of the type I interferon antiviral response during arenavirus infection. *Viruses* 2: 2443-2480.
233. Martinez-Sobrido L, Emonet S, Giannakas P, Cubitt B, Garcia-Sastre A, et al. (2009) Identification of amino acid residues critical for the anti-interferon activity of the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology* 83: 11330-11340.
234. Asper M, Sternsdorf T, Hass M, Drosten C, Rhode A, et al. (2004) Inhibition of different Lassa virus strains by alpha and gamma interferons and comparison with a less pathogenic arenavirus. *J Virol* 78: 3162-3169.
235. van den Broek MF, Muller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M (1995) Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 148: 5-18.
236. Berezky S, Karlberg H, Ackerstrom S, Klingstrom J, Lindegren G, et al. (2010) Crimean–Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice. *J Gen Virol* 91: 1473–1477.
237. Bray M (2001) The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection. *J Gen Virol* 82.
238. Flatz L, Rieger T, Merkler D, Bergthaler A, Regen T, et al. (2010) T cell-dependence of Lassa fever pathogenesis. *PLoS Pathog* 6: e1000836.
239. Smelt SC, Borrow P, Kunz S, Cao W, Tishon A, et al. (2001) Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor alpha-dystroglycan correlate with viral tropism and disease kinetics. *J Virol* 75: 448-457.
240. Lever MS, Piercy TJ, Steward JA, Eastaugh LS, Smither SJ, et al. (2011) Lethality and pathogenesis of airborne infection with filoviruses in A129 {alpha}/{beta} -/- interferon receptor-deficient mice. *J Med Microbiol*.

241. Bausch DG, Hadi CM, Khan SH, Lertora JJ (2010) Review of the literature and proposed guidelines for the use of oral ribavirin as postexposure prophylaxis for Lassa fever. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51: 1435-1441.
242. Peters CJ, Jahrling PB, Liu CT, Kenyon RH, McKee KT, Jr., et al. (1987) Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Curr Top Microbiol Immunol* 134: 5-68.
243. Sidwell RW, Bailey KW, Wong MH, Barnard DL, Smee DF (2005) In vitro and in vivo influenza virus-inhibitory effects of viremide. *Antiviral Res* 68: 10-17.
244. Moreno H, Gallego I, Sevilla N, de la Torre JC, Domingo E, et al. (2011) Ribavirin can be mutagenic for arenaviruses. *J Virol* 85: 7246-7255.
245. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, et al. (2000) The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat Med* 6: 1375-1379.
246. Eriksson B, Helgstrand E, Johansson NG, Larsson A, Misiorny A, et al. (1977) Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrob Agents Chemother* 11: 946-951.
247. Fernandez-Larsson R, O'Connell K, Koumans E, Patterson JL (1989) Molecular analysis of the inhibitory effect of phosphorylated ribavirin on the vesicular stomatitis virus in vitro polymerase reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 1668-1673.
248. Gumina G, Song GY, Chu CK (2001) L-Nucleosides as chemotherapeutic agents. *FEMS Microbiol Lett* 202: 9-15.
249. Olschlager S, Neyts J, Gunther S (2011) Depletion of GTP pool is not the predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral effect on Lassa virus. *Antiviral Res* 91: 89-93.
250. Powers CN, Peavy DL, Knight V (1982) Selective inhibition of functional lymphocyte subpopulations by ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* 22: 108-114.
251. Sweeney MJ, Hoffman DH, Esterman MA (1972) Metabolism and biochemistry of mycophenolic acid. *Cancer Res* 32: 1803-1809.
252. Balzarini J, Stet L, Matsuda A, Wiebe L, Knauss E, et al. (1998) Metabolism of EICAR (5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide), a potent inhibitor of inosinate dehydrogenase. *Adv Exp Med Biol* 431: 723-728.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ad	Zu
$\alpha$ -DG	Alpha-Dystroglycan
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARDS	engl. <i>acute respiratory distress syndrome</i>
AS	Aminosäure(n)
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta$ 2m	B2-Mikroglobulin
BHK	Baby-Hamster-Niere (engl. <i>Baby Hamster Kidney</i> )
bp	Basenpaare
bidest.	Bidestilliert
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
CD	Immunphänotypischer Oberflächenmerkmal (engl. <i>Cluster of Differentiation</i> )
CK	Kreatin-Kinase
cDNA	<i>Copy</i> DNA (revers transkribierte DNA)
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
DC	Dendritische Zellen
DIC	engl. <i>disseminated intravascular coagulation</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleic Acid</i> )
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	dopplesträngig (engl. <i>double-stranded</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid

---

EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FFU	Engl. <i>Foci forming unit</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm; bei x g: Vielfaches der Erdbeschleunigung
GP	Arenavirus Glykoprotein
GPC	Vorläufer-Glykoprotein (engl. <i>Glycoprotein Precursor</i> )
GTOV	Guanarito-Virus
h	Stunde
HBSS	Hanks (engl. <i>buffered salt solution</i> )
HCl	Salzsäure
HF	Hämorrhagisches Fieber
HLA	humanes Leukozytenantigen (engl. <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
H-2D/H-2K	Murines Leukozytenantigen
i.m.	Intramuskulär
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IGR	Intergenregion (engl. <i>Intergenic Region</i> )
IL	Interleukin
iNOS	induzierte Stickstoffmonoxidsynthase
JUNV	Junin-Virus
l	Liter
L	Arenavirus L-Protein
LASV	Lassa-Virus
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LF	Lassa-Fieber
LPS	Lipopolysaccharid
LUJV	Lujo-Virus
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

---

m	Milli
M	Molar
μ	Mikro
mAB	monoklonaler Antikörper
MACV	Machupo-Virus
max.	Maximal
Mda5	engl. <i>Melanoma differentiation associated gene 5</i>
MEM	Minimal Essential Medium
MHC	engl. <i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute/n
MOI	Infektionsdosis ( <i>Multiplicity of Infection</i> )
MOBV	Mobala-Virus
MOPV	Mopeia-Virus
MORV	Morogoro-Virus
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NEAA	nichtessentielle Aminosäuren (engl. <i>Non Essential Amino Acids</i> )
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NP	Arenavirus Nukleoprotein
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
nt	Nukleotid
ORF	offener Leserahmen (engl. <i>Open Reading Frame</i> )
p	Piko
PBS	Phosphate gepufferte Saline (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pH	Potentia Hydrogenii (Konzentration des Wasserstoffs)
PICV	Pichinde-Virus
PKR	engl. <i>dsRNA-activated protein kinase R</i>
POD	Meerrettich-Peroxidase
PRR	engl. <i>pattern recognition receptors</i>
RdRP	RNA-abhängige ( <i>dependent</i> ) RNA-Polymerase
RIG-I	engl. <i>retinoic acid-inducible gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion

SABV	Sabia-Virus
s	Sekunde
s.c.	subkutan
ss	einzelsträngig ( <i>single-stranded</i> )
T	Thymin
TACV	Tacaribe-Virus
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Temp.	Temperatur
TfR1	Transferrin Rezeptor 1
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur von Primern
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit; Ribonukleotid Uracil
Ü.N.	Über Nacht
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VHF	Virales hämorrhagisches Fieber
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis
Z	Arenavirus Z-Protein

## 8.2 Aminosäuren

<b>A</b>	(Ala)	Alanin	<b>M</b>	(Met)	Methionin
<b>C</b>	(Cys)	Cystein	<b>N</b>	(Asn)	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

### 8.3 Synthetische Oligonukleotide

Sequenzierprimer	Sequenz (5'-3')
<i>S-Segment</i>	
LVS_613+	TCTTACAGACTTTYATGAGRATGGC
LVS_675+	GGGAAYTGGGAYTYATAATGAC
LVS_1271+	AGCAGACAACATGATMACWGA
LVS_1303+	AGGAATACATGGAGAGRCARGG
LVS_2006+	CCATGWGAATAYTTGGCATCYTG
LVS_2656a+	GTTGGGGTACTTTGCTGTGTA
LVS_2656b+	GTTAGGATATTTAGCTGTATA
LVS_754-	GAAAAYTGRCAGTGRTCTTCCC
LVS_811-	TATATGTCTCTGGTYCTYTGTGA
LVS_1474-	ATGCCCATGTGRTTSAGYCTRIG
LVS_2158-	CCCAARTGCCAAAACNTGGAT
LVS_2784a-	AACAACCAGTTCGGCACCATGCC
LVS_2784b-	AACAACCAGTTCGGRACMATGCC
LVS_2158-	CCCAARTGCCAAAACNTGGAT
LV_Ba_S_1240+	TGATGATATAGAGCAGCAAGCTGAC
LV_Ba_S_1305+	GACAGGGGAAGACACCATTAGGTCT
LV_Ba_S_1648+	TGTGTGCTTAATCCTCCCGACACT
LV_Ba_S_3004+	GTTAGGGTCCCAACTCTTAAGACTC
LV_Ba_S_1707-	CTGTGCACTGATGGATTGCATCATG
LV_Ba_S_2279	AGAGCTTGGGAGAACACCATAGTTG
OWS0001+	GCG CAC CGG GGA TCC TAG GC
OWS3400-	GCGCACAGTGGATCCTAGGC
<i>L-Segment</i>	
LVL_602+	AATGAACAGATACCTGAYTGGG
LVL_1118+	CAATGCARTGYTGGAGATC
LVL_1814a+	CAGAAGACAGGTGAATGYTCRAARTG
LVL_1814b+	CAGAAGACAGGTGAATGYTCYAARTG
LVL_2320a+	GATCAGATAAAATGTTTTGARAAG
LVL_2320b+	GACCAAATCAAATGCTTTGARAAA
LVL_2774a+	TATGAATATAAAGTGCAACARGCRATGAG
LVL_2774b+	TATGATTACAAGATACAACARGCRATGAG
LVL_3569a+	GGTGACCTTAGGACAAARATGTTTAC
LVL_3569b+	GGAGATCTTAGGACRAAGATGTTTAC
LVL_4232+	GACTTCCACTATTAYATGAG

---

LVL_4253+	GATCAGCTCAATAARTTTGTGAGYCC
LVL_4847a+	CAGAAATTATATACTCAGGTGC
LVL_4847b+	CAAAARATAATYTATTCAGGTGCTGT
LVL_5753a+	GGGTCYTTACATGGTTYCCACA
LVL_5753b+	GGGTCATTCACATGGTTCCTCA
LVL_6581a+	CAGTGGTCAAGCGTGGAYATMGT
LVL_6581b+	CAATGGTCRGGGGTGGAYATTGT
LVL_807a-	CTTGTTGTTAATGCCYTGRTGAC
LVL_807b-	CTTGTTGTTAATGCCYTGRTGGC
LVL_1334-	TCTTTAGATCYCTTTTTGTTGANTC
LVL_1886-	CATAAAATGAGCARACYTCWCCAAC
LVL_2665a-	TCCTTTTCCTTAAACAGSGARCCATTATT
LVL_2665b-	TCCTTTTCCTTAAACAAGARCCATTATT
LVL_2665c-	TCCTTTTCCTTAAATAGWGARCCATTGTT
LVL_3078-	TCAAAATCTTCAACCATRTGRT
LVL_3750-	GGGCCCCATTTACTRTGRTCCAT
LVL_4413-	GCCAGTTGATGTGGCTCTTTRCAYTT
LVL_4440-	TGATCAATGATTGTATCAATTGTYTC
LVL_4992a-	TGGAATGCAGATTTGTTGATRGCCTC
LVL_4992b-	TGGAATGCAGATTTGTTTATTGCTTCAG
LVL_5010-	CARAGYTCCATTGCATCTGG
LVL_5910-	TCTATCCATGCATARCCCATCAT
LVL_6783a-	AACTCCTCACAYGTYCTGCCYTT
LVL_6783b-	AACTCTGAACATGTTCTYCCYTT
LVL_5753b+	GGGTCATTCACATGGTTCCTCA
LVL_6581b+	CAATGGTCRGGGGTGGAYATTGT
LVL_6581a+	CAGTGGTCAAGCGTGGAYATMGT
LV_Ba_L_400+	CTGATGGTTACAACTGACAGGCAA
LV_Ba_L_1020+	GAGCATCACCAATATTGAGATTCT
LV_Ba_L_1190+	GATGCATTGATTCTCCTTGCCAGT
LV_Ba_L_5950+	TTGGTTGGCCCCAGGTTTGATTATTAGA
LV_Ba_L_7070+	TCATTGCATTCAACTAGGCCCTTGT
LV_Ba_L_7106+	AGCTTTTGCAGAATTGTGGCCCTAG
LV_Ba_L_6450-	ATCCTGATCCTGCACGACAGGGGTGAAAGA
LV_Ba_L_6505-	CAATCAGCAGATCAAGCGAGGAGTCTCCAA
LV_Ba_L_7115-	AGACGCCACACACCTAGGGCCACAATTCTG
LV_Ba_L_7135	AAGAGCCAGTCTGATCCCAGACGCCACACA
LV_Ba_L_300-	AACCATTTGCATTGCAGGAGTCAA
LV_Ba_L_720-	CTACTCCTGACAACCTCCCTGATG

## 8.4 Veröffentlichungen

### Originalpublikationen

Flatz, L.\*, **Rieger, T.\***, Merkler, D.\*, Bergthaler, A., Regen, T., Schedensack, M., Bestmann, L., Verschoor, A., Kreuzfeldt, M., Brück, W., Hanisch, U. K., Günther, S.\*, and Pinschewer, D. D.\*, *T cell-dependence of Lassa fever pathogenesis*. PLoS Pathog. 2010. **6**(3): e1000836. doi:10.1371/journal.ppat.1000836

\* gleichberechtigte Autorenschaft

Mordstein, M., E. Neugebauer, V. Ditt, B. Jessen, **T. Rieger**, V. Falcone, F. Sorgeloos, S. Ehl, D. Mayer, G. Kochs, M. Schwemmler, S. Gunther, C. Drosten, T. Michiels, and P. Staeheli. *Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections*. J Virol. 2010. **84**:5670-5677.

Coulibaly-N'Golo, D., B. Allali, S. K. Kouassi, E. Fichet-Calvet, B. Becker-Ziaja, **T. Rieger**, S. Olschlager, H. Dosso, C. Denys, J. Ter Meulen, C. Akoua-Koffi, and S. Gunther. *Novel arenavirus sequences in Hylomyscus sp. and Mus (Nannomys) setulosus from Cote d'Ivoire: implications for evolution of arenaviruses in Africa*. PLoS One. 2011. **6**:e20893.

Kerber R, **Rieger T**, Busch C, Flatz L, Pinschewer DD, Kümmerer BM, Günther S., *Cross-species analysis of the replication complex of Old World arenaviruses reveals two sites in nucleoprotein involved in L protein function*. J Virol. 2011. **85**(23):12518-28

### Konferenzteilnahmen mit Posterpräsentation

Flatz, L.\*, **Rieger, T.\***, Merkler, D.\*, Bergthaler, A., Schedensack, M., Bestmann, L., Brück, W., Günther, S., and Pinschewer, D. D., *Mouse model for Lassa fever*. GfV-Tagung, Leipzig, 2009

\* gleichberechtigte Autorenschaft

## 8.5 Erklärung zur Dissertation

Erklärung gemäß § 6 (5) Nr. 1-3 Promo

Ich erkläre, dass ich

1. die Arbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe,
2. keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und
3. die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Hamburg, den

---

Toni Rieger

## Danksagung

An erste Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stephan Günther für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit des selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens und die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge bedanken.

Herrn Prof. Andreas Dotzauer danke ich für die Hilfsbereitschaft, Flexibilität und Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Daniel D. Pinschewer und Herrn Dr. Lukas Flatz für die lehrreiche und anregende Zusammenarbeit.

Dr. Doron Merkler sei hier besonders für seine ausgezeichnete histopathologische Arbeit gedankt.

Maria Lehmann, Hanna Jeromé und Lisa Oestereich gilt mein Dank für das schnelle Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei allen Kollegen der Abteilung Virologie möchte ich mich für das angenehme und humorvolle Arbeitsklima bedanken.

Ganz herzlich danke ich meinen langjährigen Kollegen Romy Kerber, Stephan Ölschläger, Linda Brunotte, Michaela Lelke, Meike Pahlmann, Beate Becker-Ziaja, Carola Busch und Stephanie Wurr für die hervorragende Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung „auf und neben dem Platz“.

Von ganzem Herzen danke ich meiner lieben Familie!