

Expression und Charakterisierung des Andes-Virus L-Proteins

Dissertation

vorgelegt dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie) der

Universität Bremen

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

angefertigt in der Abteilung Virologie am

Bernhard-Nocht-Institut

für Tropenmedizin, Hamburg

vorgelegt von

Patrick Heinemann

aus Marsberg

Hamburg, 2013

Tag des öffentlichen Kolloquiums:

31. Mai 2013

Gutachter der Dissertation:

1. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Dotzauer

Universität Bremen, FB 2

2. Prof. Dr. med. Stephan Günther

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Reservoirre von Neuwelt-Hantaviren	2
1.3 Epidemiologie.....	3
1.4 Bedeutung von Hantaviren als Krankheitserreger.....	7
1.4.1 Krankheitsverlauf	7
1.4.2 Pathogenese des Hantavirus kardiopulmonalen Syndroms.....	8
1.4.3 Labordiagnostik.....	10
1.4.4 Therapie und Prophylaxe.....	11
1.5 Molekularbiologie der Hantaviren	12
1.5.1 Aufbau von Hantaviruspartikeln	12
1.5.2 Der virale Replikationszyklus	13
1.5.3 Die Proteine von Hantaviren	14
1.5.3.1 Die Glykoproteine (Gn & Gc).....	14
1.5.3.2 Das Nukleoprotein.....	16
1.5.3.3 Das Nichtstrukturprotein (NSs)	17
1.5.3.4 Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L-Protein)	18
1.6 Zielsetzung der Doktorarbeit.....	23
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Plasmide	24
2.1.2 Chemikalien.....	24
2.1.3 Verbrauchsmaterial	26
2.1.4 Geräte	27
2.1.5 Enzyme.....	27
2.1.6 Kits	28
2.1.7 Antikörper	28
2.1.8 Zellkulturmedien	29
2.1.9 Medien für die Bakterienkultur	29
2.1.10 Zelllinien	30

2.1.11	Bakterien	30
2.1.12	Viren	30
2.1.13	Puffer	30
2.2	Methoden	33
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.1.1	Isolierung von Virus-RNA mit Trizol	33
2.2.1.2	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	34
2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.4	DNA-Gelelektrophorese	36
2.2.1.5	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	36
2.2.1.6	Bestimmung von DNA/RNA-Konzentrationen	37
2.2.1.7	Restriktionsverdau von DNA	37
2.2.1.8	Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen	37
2.2.1.9	Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	38
2.2.1.10	Herstellung und Transformation z-kompetenter <i>E. coli</i>	38
2.2.1.11	Isolierung von Plasmid-DNA	39
2.2.1.12	Sequenzierung von DNA	39
2.2.1.13	Aufreinigung von RNA aus Zellen	39
2.2.1.14	Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)	40
2.2.1.15	Radioaktive <i>In vitro</i> -Transkription von Northern Blot-Sonden	41
2.2.1.16	Northern Blot	41
2.2.2	Zellbiologische Methoden	42
2.2.2.1	Zucht und Passagierung eukaryotischer Zelllinien	42
2.2.2.2	Transfektion von eukaryotischen Zellen	42
2.2.3	Virologische Methoden	43
2.2.3.1	Anzucht von MVA-T7	43
2.2.3.2	MVA-T7-Titrierung mittels Luciferase-Assay	43
2.2.3.3	Infektion von Zellen mit MVA-T7 für transiente Genexpression	44
2.2.3.4	Anzucht von ANDV und anderen Hantaviren	44
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	44
2.2.4.1	Radioaktive Markierung von Proteinen in Zellkultur	44
2.2.4.2	Immunpräzipitation	45
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
2.2.4.4	Western Blot	46

2.2.4.5	Nachweis radioaktiv markierter Proteine	47
2.2.4.6	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	48
2.2.4.7	Luciferase-Aktivitäts-Messung (Luciferase-Assay)	48
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Klonierung und Expression von ANDV-Genen.....	50
3.2	Expression von L-Protein, Nukleoprotein, Glykoprotein und Nichtstrukturprotein	53
3.3	Expression verkürzter Fragmente des L-Proteins.....	54
3.4	Untersuchung der 5'-terminalen Sequenz des L-Gens	56
3.5	Grobe Kartierung von Aminosäuren im N-Terminus des L-Proteins, welche die Expression beeinflussen	57
3.6	Feinkartierung von Aminosäuren im N-Terminus des L-Proteins, welche die Expression beeinflussen	58
3.7	Expression von verkürzten SNV- PUUV- und HTNV-L-Proteinen	58
3.8	Untersuchung eines möglichen beschleunigten proteasomalen Abbaus des L-Proteins.....	60
3.9	Gezielte Mutagenese katalytischer Aminosäuren in der vermuteten Endonukleasedomäne	63
3.10	Mutagenese konservierter Aminosäuren im Endonuklease-Motiv	65
3.11	Einfluss der L-Protein-Expression auf das mRNA-Niveau.....	66
3.12	Einfluss des L-Proteins auf die zelluläre Proteinsynthese.....	68
3.13	Versuche zur Etablierung eines ANDV-Replikonsystems.....	69
3.14	Intrazelluläre Lokalisation des L-Proteins und Kolo­kalisierung mit dem N- bzw. Gc- Protein	72
3.15	Kolo­kalisierung des NSs-Proteins mit dem L- bzw. N-Protein.....	72
3.16	Kolo­kalisierung zwischen L-Mutanten, N und <i>processing bodies</i>	75
4	Diskussion	77
4.1	Expression und Mutagenese des L-Proteins.....	77
4.2	Replikonsystem	81
4.3	Intrazelluläre Lokalisation von ANDV-L	82
4.4	Ausblick.....	84

5 Literatur	85
6 Anhang.....	104
6.1 Oligonukleotide	104
6.2 Einbuchstabencode der Aminosäuren	111
6.3 Abkürzungsverzeichnis	112
6.4 Lebenslauf	115
6.5 Wissenschaftliche Publikationen.....	116
6.6 Erklärung zur Dissertation	117

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Das Andes-Virus (ANDV) ist ein Vertreter der Hantaviren aus der Familie der *Bunyaviridae*. Viren dieser Familie zeichnen sich durch ein trisegmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Polarität aus (Enria et al., 1996). Das natürliche Reservoir stellen Nagetiere und Insektivoren dar, welche humanpathogene Hantaviren auf Menschen übertragen können.

Zur Entdeckung der Hantaviren führte ein großer Krankheitsausbruch unter alliierten Soldaten während des Koreakrieges in den Jahren 1951 bis 1953. Nach intensivem Forschungseinsatz gelang es erst über 20 Jahre später dem koreanischen Forscher Ho-Wang Lee 1978 den verursachenden Erreger zu identifizieren. Dieser wurde als Hantaan-Virus benannt, nach dem gleichnamigen Fluss, der einen Teil der innerkoreanischen Grenze bildet (Lee et al., 1978). Im Laufe der Jahre gelang es Wissenschaftlern auf der ganzen Welt verwandte Viren nachzuweisen, welche dem Genus der Hantaviren zugeordnet werden können. Bekannte Vertreter auf dem eurasischen Kontinent stellen neben dem Hantaan-Virus (HTNV) das Seoul-Virus (SEOV), das Dobrava-Belgrad-Virus (DOBV) und das Puumala-Virus (PUUV) dar. Diese sind in der Lage, beim Menschen das hämorrhagische Fieber mit renalem Syndrom (HFRS) oder dessen milde Variante *Nephropathia epidemica* (NE) auszulösen.

1993 kam es im Südwesten der Vereinigten Staaten von Amerika zu einem Ausbruch einer neuartigen, bisher unbekanntem respiratorischen Infektionskrankheit, welche über 50 Todesopfer forderte und zur Entdeckung von humanpathogenen Hantaviren auf dem amerikanischen Kontinent führte (Nichol et al., 1993). Als Verursacher wurde das Sin-Nombre-Virus (SNV) identifiziert und die Erkrankung „Hantavirus cardiopulmonales Syndrom (HCPS)“ benannt. In der Folge wurden eine Reihe weiterer Hantavirus-Spezies mit und ohne humanpathogener Relevanz auf diesem Erdteil entdeckt, darunter das Choclo-Virus, das Laguna-Negra-Virus, das Jucituba-Virus und auch das Andes-Virus. Im Jahr 2006 wurde mit dem Sangassou-Virus die lange vermutete Präsenz der Hantaviren auf dem afrikanischen Kontinent bestätigt (Klempa et al., 2006).

1.2 Reservoirire von Neuwelt-Hantaviren

Auf dem amerikanischen Kontinent zirkulieren über 30 verschiedene Hantavirus-Spezies. Nicht wenige können das „Hantavirus cardiopulmonale Syndrom“ beim Menschen hervorrufen. Andere Spezies sind dagegen nicht von humanpathogener Bedeutung oder ihr gesundheitsgefährdendes Potential ist bislang unbekannt. Einen Überblick über die verschiedenen Stämme gibt Tab. 1. Mehrheitlich sind es Nagetiere aus der Familie *Cricetidae* (Wühler) welche als Virusreservoir und direkter Vektor für die Übertragung auf den Menschen dienen. Vor einigen Jahren wurden darüber hinaus auch einige Insektivoren, wie Spitzmäuse (*Soricidae*) und Maulwürfe (*Talpidae*) als weitere Hantavirus-Reservoirire identifiziert. In der Regel ist jeder Virusstamm mit einer bestimmten Wirtsspezies assoziiert (Plyusnin et al., 1996). Allerdings gibt es eine Reihe von Ausnahmen: *Oryzomys fulvescens* kann sowohl in Panama als Wirt für das Choclo-Virus als auch in Venezuela als Reservoir für das Maporal-Virus dienen (Fulhorst et al., 2004; Vincent et al., 2000). Ferner besteht die Möglichkeit, dass ein Virusstamm in der Lage ist, verschiedene Wirtsspezies zu infizieren. Die Übertragung über die Speziesgrenze hinweg wird begünstigt, wenn sich die Lebensräume potentieller Wirte überlappen. Vorteilhaft wirkt sich dabei auch die Höhe des Verwandtschaftsgrades zwischen den Reservoiriren aus (Allen et al., 2006; Allen et al., 2009; Hjelle and Yates, 2001). Das Laguna-Negra-Virus (LANV) wurde zum Beispiel mit *Calomys laucha* und *Calomys caulosus* assoziiert (Carroll et al., 2005; Johnson et al., 1997). Auch ANDV ist in der Lage, in mehr als einem Wirt zu replizieren. Eine intensive Untersuchung von Nagetieren in Chile zeigte, dass neben *Oligoryzomys longicaudatus* (Abb. 1) auch *Abrothrix longilis* als sekundäres Reservoir dienen kann (Medina et al., 2009). Phylogenetische Studien indizieren zudem, dass in der Vergangenheit mehrere Wirtswechsel unter den Hantaviren auftraten. Das Oxbow-Virus (OXBV) weist eine hohe Homologie zu Hantaviren aus Wühlmäusen auf, obwohl es in Maulwürfen entdeckt wurde (Kang et al., 2009). Noch auffälliger ist die phylogenetische Stellung des Rockport-Virus (RKPV). Dieses gliedert sich zu den Hantaviren aus *Sigmodontinae* (ANDV, SNV) in den Stammbaum ein. Der natürliche Wirt ist aber ebenfalls ein Maulwurf (Kang et al., 2011). Die basale phylogenetische Stellung mancher Hantaviren aus Insektivoren lässt außerdem vermuten, dass diese in der Vergangenheit sogar das ursprüngliche Reservoir darstellten (Kang et al., 2011). Die Übertragung von Hantaviren innerhalb der Wirtspopulationen erfolgt ausschließlich horizontal. Maternale Antikörper schützen die Nachkommenschaft schon im Mutterleib sowie in den ersten Lebensmonaten vor einer Infektion (Borucki et al., 2000; Kallio et al., 2006;

Taruishi et al., 2008). Die Virusübertragung zwischen den Wirtstieren erfolgt durch Biss- und Kratzwunden oder durch Aufnahme von virushaltigem Saliva bzw. Exkrementen (Botten et al., 2002; Glass et al., 1988; Glass et al., 1998; Hinson et al., 2004; Hutchinson et al., 2000; Kallio et al., 2006). Es wird davon ausgegangen, dass die Infektion des Wirtes weitestgehend asymptomatisch und chronisch verläuft (LeDuc, 1987; Mills et al., 1999). Diese Hypothese wird jedoch durch einige Studien, in denen Krankheitsanzeichen gefunden wurden, in Frage gestellt. SEOV infizierte *Rattus norvegicus* zeigten ein verringertes Wachstum der Wirtstiere (Childs et al., 1989; Kariwa et al., 1996). Die SNV- und NYV-Reservoire *Peromyscus maniculatus* bzw. *Peromyscus leucopus* können außerdem Anzeichen von Hepatitis und pulmonale Ödeme aufweisen (Lyubsky et al., 1996; Netski et al., 1999). SNV-Infektionen verringern einer aktuellen Studie zufolge auch die durchschnittliche Überlebensrate von *P. maniculatus* (Luis et al., 2012).

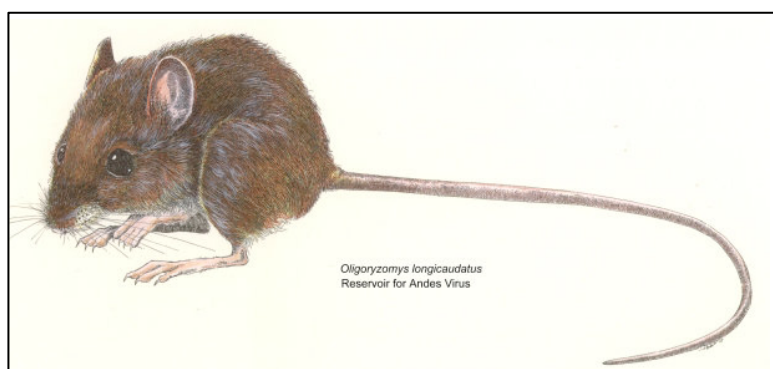


Abb. 1. Der natürliche Wirt von ANDV. Die Zwergreisratte *Oligoryzomys longicaudatus* aus der Familie der *Cricetidae* ist weit verbreitet in Argentinien und Chile und stellt das natürliche Reservoir für ANDV dar. (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/images/mice/mailmice/longi/longid.jpg>)

1.3 Epidemiologie

HCPS-Endemiegebiete liegen vor allem im ländlichen Raum und Erkrankungsfälle stehen entsprechend häufig in Zusammenhang mit agrikulturellen Tätigkeiten (Armien et al., 2009; Figueiredo et al., 2009). Es sind besonders peridomestische Expositionen zu Hantavirus-infizierten Nagetieren, die eine HCPS-Erkrankung herbeiführen können. Infektionen erfolgen in der Regel durch Inhalation von kontagiösen Aerosolen, die mit Speichel, Kot oder Urin von infizierten Nagern ausgeschieden wird. (Botten et al., 2002; Padula et al., 2004). Häufig werden Staub verwirbelnde Aktivitäten in schlecht belüfteten Räumlichkeiten, welche von

Nagern infestiert sind, mit HCPS-Infektionen assoziiert (Klein and Calisher, 2007). Ein geringeres Infektionsrisiko besteht bei Tätigkeiten im Freien, da Viruspartikel durch Wind verteilt werden können und sie zudem sensitiv gegenüber UV-Strahlung sind. Ferner wurden einige wenige Fälle dokumentiert, in denen sich HCPS-Infektionen nach Nagetierbissen ereignet haben (Merino et al., 2002; St Jeor, 2004).

ANDV ist das einzige Hantavirus, welches nachweislich auch von Mensch zu Mensch übertragbar ist, wobei die Transmissionswege nur unzureichend beschrieben sind (Ferres et al., 2007; Martinez et al., 2005; Padula et al., 1998; Wells et al., 1998; Wells et al., 1997). Das Infektionsrisiko scheint bei Haushaltskontakten und besonders bei Sexualpartnern von Indexpatienten deutlich erhöht zu sein (Ferres et al., 2007).

Der erste dokumentierte HCPS-Ausbruch auf dem amerikanischen Kontinent ereignete sich von 1993 bis 1994 und wurde durch das Sin-Nombre-Virus ausgelöst. Hierbei erkrankten 52 Menschen, die Hälfte davon in den US-Bundesstaaten New Mexico, Colorado, Utah und Arizona (*Four Corners Region*) (Hjelle and Glass, 2000; Nichol et al., 1993). Bis 2011 infizierten sich in den USA 580 Personen von denen ca. 35% verstarben (Macneil et al., 2011). Retrospektive Untersuchungen haben ergeben, dass HCPS-Erkrankungen keinesfalls erst seit 1993 aufgetreten sind. Der nachweislich älteste Fall ereignete sich bereits 1959 (Frampton et al., 1995). Eine zweite Epidemie wurde 1995 durch das Laguna-Negra-Virus (LANV) im Westen Paraguays verursacht und zählte 17 Erkrankungsfälle (Williams et al., 1997). In Chile sind HCPS-Erkrankungen, welche hier durch ANDV hervorgerufen werden, seit 1995 bekannt. Bis Ende 2011 wurden 738 Fälle registriert. Diese ereigneten sich größtenteils in den Regionen südlich der Hauptstadt Santiago, vornehmlich in Bío Bío, Araucanía und De los Lagos (Ministerio de Salud Chile, 2011). 1996 erkrankten in Argentinien 18 Personen im Skiort El Bolson an HCPS. Bei drei Personen handelte sich um medizinisches Personal, das HCPS-Patienten betreute (Enria et al., 1996; Padula et al., 1998; Wells et al., 1997). Bis 2009 kamen über 1000 neue Fälle hinzu (Bellomo et al., 2009). Grundsätzlich gibt es drei endemische Regionen, in denen HCPS-Erkrankungen auftreten. Im Norden sind es die Provinzen Salta und Jujuy; im Zentrum des Landes Buenos Aires, Entre Rios und Santa Fe. Im südlichen Patagonien sind die westlichen Gebiete der Provinzen Chubut, Neuquén und Rio Negro betroffen. Vornehmlich zirkuliert hier, vergleichbar mit Chile, das Andes-Virus und verwandte genetische Linien (Bellomo et al., 2009). Ein weiteres Land mit gehäufte HCPS-Inzidenz repräsentiert Brasilien, in dem zwischen 1993 und 2012 über 1500 Infektionen registriert wurden (de Araujo et al., 2012).

Tabelle 1. Übersicht über verschiedene Hantaviruspezies des amerikanischen Kontinents. Virusspezies, welche nicht humanpathogen sind oder bei welchen eine Pathogenität unbekannt ist, sind mit n.n. (nicht nachgewiesen) gekennzeichnet.

Virusspezies	Wirtsspezies	Verbreitung	Erkrankung
Fam. Cricetidae, Unterfam.			
Arvicolinae			
Prospect Hill (PHV)	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	Nordamerika	
Isla Vista (ISLAV)	<i>Microtus californicus</i>	Nordamerika	n.n.
Fam. Cricetidae, Unterfam.			
Neotominae			
Sin Nombre (SNV)	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Nordamerika	HCPS
New York (NYV)	<i>Peromyscus leucopus</i>	Nordamerika	HCPS
Fam. Cricetidae, Unterfam.			
Sigmodontinae			
Bayou (BAYV)	<i>Oryzomys palustris</i>	Nordamerika	HCPS
Black Creek Canal (BCCV)	<i>Sigmodon hispidus</i>	Nordamerika	HCPS
Monongahela (MGLV)	<i>Peromyscus leucopus</i>	Nordamerika	HCPS
Limestone Canyon	<i>Peromyscus boylii</i>	Nordamerika	n.n.
Playa de Oro	<i>Oryzomys couesi</i>	Mexiko	n.n.
Catacamas	<i>Oryzomys couesi</i>	Honduras	n.n.
Choclo	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	Panama	HCPS
Calabazo	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Panama	n.n.
Rio Segundo (RIOSV)	<i>Reithrodontomys mexicanus</i>	Costa Rica	n.n.
Cano Delgadito (CADV)	<i>Sigmodon alstoni</i>	Venezuela	n.n.
Andes (ANDV)	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	Argentinien, Chile	HCPS
Bermejo (BMJV)	<i>Oligoryzomys chocoensis</i>	Argentinien	HCPS
Pergamino (PRGV)	<i>Akodon azarae</i>	Argentinien	n.n.
Lechiguanas (LECV)	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Argentinien	HCPS
Maciel (MCLV)	<i>Bolomys obscurus</i>	Argentinien	HCPS
Oran (ORNV)	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	Argentinien	HCPS
Laguna Negra (LANV)	<i>Calomys laucha</i>	Paraguay, Bolivien, Argentinien	HCPS
Alto Paraguay	<i>Holochilus chacoensis</i>	Paraguay	n.n.
Ape Aime	<i>Akodon montensis</i>	Paraguay	n.n.

Fortsetzung Tabelle 1.

Virusspezies	Wirtsspezies	Verbreitung	Erkrankung
Itapúa	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Paraguay	n.n.
Rio Mamore	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Bolivien, Peru	n.n.
Araraquara	<i>Bolomys lasiurus</i>	Brasilien	HCPS
Juquitiba	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Brasilien	HCPS
Jaborá	<i>Akodon montensis</i>	Brasilien, Paraguay	n.n.
Fam. Soricidae, Unterfam.			
<i>Soricinae</i>			
Camp Ripley	<i>Blarina brevicauda</i>	USA	n.n.
Ash River (ARRV)	<i>Sorex cinereus</i>	USA	n.n.
Jemez Springs (JMSV)	<i>Sorex monticolus</i>	USA	n.n.
Fam. Talpidae, Unterfam.			
<i>Talpinae</i>			
Oxbow (OXBV)	<i>Neurotrichus gibbsii</i>	USA	n.n.
Fam. Talpidae, Unterfam.			
<i>Scalopinae</i>			
Rockport (RKPV)	<i>Scalopus aquaticus</i>	USA	n.n.

Dafür verantwortlich sind vornehmlich die Stämme Araucéria, Araraquara, Castelo dos Sonhos, Anajatuba und LANV-ähnliche Hantaviren (Johnson et al., 1999; Mendes et al., 2004). Die Lethalität variiert zwischen den einzelnen endemischen Regionen und Virusspezies. Sie beträgt in Argentinien und Chile ca. 30% (Bellomo et al., 2009; Ministerio de Salud Chile, 2011) und bis zu 54% in Brasilien (Figueiredo et al., 2009). Bis auf wenige Ausnahmen sind in fast allen Ländern des amerikanischen Kontinents Fälle von HCPS dokumentiert worden.

HCPS-Infektionen sind Zoonosen, und bei der Untersuchung von Ausbruchereignissen darf die Ökologie der Vektorpopulationen nicht außer Acht gelassen werden. Deren Dynamik wird von einer Vielzahl biotischer und abiotischer Faktoren beeinflusst, die in ihrer Komplexität nur unzureichend erforscht sind. Die Infektionsrate in Wirtspopulationen hängt unter anderem von der Kontaktrate zwischen den Tieren ab. Eine höhere Populationsdichte verstärkt die Kontaktrate und die Durchseuchung (Mills et al., 1999). Da Hantaviren nur horizontal übertragen werden, kann ein schnelles Populationswachstum initial die Prävalenz verringern

(Verdünnungseffekt). Die Kontaktrate wird zwischen den Tieren jedoch erhöht und mit zeitlicher Verzögerung kommt es zu einer gesteigerten Prävalenz (Adler et al., 2008; Carver et al., 2011; Madhav et al., 2007). Diese wird ebenso durch Fragmentierung des Wirtshabitats begünstigt (Langlois et al., 2001). Dagegen wird die Kontaktrate und Prävalenz in Wirtshabitaten mit höherer Speziesdiversität verringert. (Allen et al., 2009; Disney and Ruedas, 2009; Suzan et al., 2009).

Ferner gilt es zu beachten, dass menschliche Eingriffe in zuvor unberührte Landschaften das Risiko für HCPS-Erkrankungen und andere Zoonosen erhöhen kann. Waldrodungen, Besiedlungen oder agrikulturelle Nutzungen führen zu Veränderungen der Habitatstrukturen, Vektorpopulationen und Speziesdiversitäten. Dabei kann es zu gehäuften Kontakten zwischen Wirt und Mensch kommen, aber auch zur Etablierung neuer Wirtsspezies mit der Folge von HCPS-Ausbrüchen (Allen et al., 2009; Sauvage et al., 2007; Weiss and McMichael, 2004).

Klimatische Faktoren sind ebenfalls von entscheidender Rolle für die Wirtspopulationsdynamik (Clement et al., 2009). Jahreszeitliche Schwankungen in Wirtspopulationen beeinflussen deren Durchseuchung und Infektionsereignisse beim Menschen (Buceta et al., 2004; Kallio et al., 2006; Kallio et al., 2007).

In den USA wurde für die größeren Hantavirus-Ausbrüche 1993 und 1997 ein Zusammenhang mit *El Niño Southern Oscillation* (ENSO)-Ereignissen in den Vorjahren vermutet. Im Folgejahr war eine deutliche Zunahme der Populationsdichte von *Peromyscus maniculatus* und Anstieg der SNV-Seroprävalenz messbar (Abramson and Kenkre, 2002; Hjelle and Glass, 2000; Yates et al., 2002). Auch in Südamerika nahm die Populationsdichte von potentiellen Hantavirus-Reservoiren nach ENSO-Ereignissen zu (Jaksic and Lima, 2003).

1.4 Bedeutung von Hantaviren als Krankheitserreger

1.4.1 Krankheitsverlauf

Infektionen mit Altwelt-Hantaviren können Erkrankungen mit mildem bis mittelschwerem Verlauf hervorrufen. Sie sind mit Fieber und hämorrhagischen Manifestationen in der Niere assoziiert. Die Schwere des Verlaufs ist abhängig von der Virusspezies. Die milden Erkrankungen, auch als *Nephroptia epidemica* (NE) bezeichnet, finden sich vor allem in Mittel- und Nordeuropa und werden durch das Puumala-Virus ausgelöst. Das Hantaan-Virus oder das Dobrava-Belgrad-Virus sind hingegen für schwere Erkrankungen, das sogenannte

hämorrhagische Fieber mit renalem Syndrom (HFRS) verantwortlich. (Kanerva et al., 1998; Kramski et al., 2009; Lee and van der Groen, 1989; Peters et al., 1999).

Neuwelt-Hantaviren können eine besonders schwere Erkrankung auslösen, das „Hantavirus cardiopulmonale Syndrom (HCPS)“. Nach Ansteckung kommt es zunächst zu einer bis zu dreiwöchigen Inkubationsphase (Young et al., 2000). Anschließend entwickeln Patienten ein febriles Syndrom, einhergehend mit Fieber, Myalgie, fortschreitender Thrombozytopenie, Kopfschmerzen, Rücken- und Bauchschmerzen sowie Durchfall. Nach 2 bis 4 Tagen beginnt die kardiopulmonale Phase, in welcher Husten, Kurzatmigkeit und bilaterale pulmonale Infiltrate nachweisbar sind. Innerhalb weniger Stunden verschlechtert sich der Zustand der Patienten und es kommt zum Versagen der Atmung, nicht selten in Begleitung eines Schocks, wobei letzterer zum Tode führt. Üblicherweise tritt der Tod 24 bis 48 h nach Beginn der kardiopulmonalen Phase ein (Campos et al., 2009; Duchin et al., 1994; Moolenaar et al., 1995). Bei günstiger Prognose geht der Patient nach 5-7 Tagen in eine diuretische Phase über, die Viruslast sinkt rapide und der Gesundheitszustand bessert sich (Nolte et al., 1995; Zaki et al., 1995). Die anschließende konvaleszente Phase kann Monate bis Jahre dauern, in der Patienten mit allgemeiner Schwäche, Müdigkeit und Atmungsproblemen zu kämpfen haben, wofür die schwerwiegenden Lungenschädigungen verantwortlich sind (Gracia et al., 2010).

1.4.2 Pathogenese des Hantavirus kardiopulmonalen Syndroms

Die Pathogenese von Hantavirus-Infektionen ist nicht vollständig aufgeklärt und unterliegt wahrscheinlich einer Reihe verschiedener Mechanismen. Studien in Patienten und Tiermodellen, sowie *in-vitro*-Experimente lieferten in den letzten Jahren eine Reihe interessanter, zum Teil aber auch sich widersprechender Hinweise auf die Pathogenese.

Eine grundlegende Eigenschaft aller Hantavirus-Erkrankungen, sei es HCPS, HFRS oder NE ist die Zerstörung der vaskulären endothelialen Barriere in infizierten Geweben. In HCPS-Patienten resultiert dies in schweren pulmonalen Ödemen. Jay Hooper und Kollegen entwickelten ein ANDV-Tiermodell in syrischen Goldhamstern. Bei diesen Tieren zeichnet sich ein Krankheitsbild ab, das mit dem von Menschen vergleichbar ist (Hooper et al., 2001).

Direkte Virus-induzierte Pathogenese:

Das vaskuläre Endothel (VE) bildet die innere Schicht der Blutgefäße. Durch Ausbildung einer dichten Barriere reguliert es den Blutdruck und den Stoffaustausch mit dem

umliegenden Gewebe. VE-Cadherine an den Kontaktstellen der Zellen verknüpfen diese zu einem dichten Geflecht, welches i.d.R. nur zum Wachstum und zur Neubildung von Gefäßen partiell aufgelöst wird. Die Regulierung dessen erfolgt durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), bei dessen Ausschüttung VE-Cadherine deassembliert werden.

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass ANDV die Integrität der endothelialen Barriere direkt beeinflussen kann. Die *in vitro*-Infektion von kapillaren Lungenendothelzellen führt zu einer erhöhten Ausschüttung von VEGF und in Folge dessen zur Permeabilisierung des Gewebes (Shrivastava-Ranjan et al., 2010). Mit ANDV-infizierte HUVECs (Humane umbilikale venöse Endothelzellen) reagieren auf Zugabe von externem VEGF in einer verstärkten Auflösung der Gewebsbarriere (Gavrilovskaya et al., 2008; Gorbunova et al., 2010). HCPS-Patienten mit akutem Lungenödem weisen ebenfalls erhöhte VEGF-Konzentrationen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und der pulmonalen Ödemflüssigkeit auf (Gavrilovskaya et al., 2012).

Thrombozytopenie:

Thrombozytopenie ist ein weiteres charakteristisches Merkmal von HCPS- und HFRS-Erkrankungen. $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine auf der Oberfläche von Thrombozyten regulieren deren Aktivierung und somit die Koagulation. $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine dienen auch als Rezeptor für Hantaviren, durch deren Bindung die Plättchenaktivierung und Koagulation inhibiert wird (Gavrilovskaya et al., 2010). Es wird vermutet, dass die Komplexe aus Virus und Plättchen durch Phagozytose oder dass Komplementsystem zerstört werden und dadurch ein Thrombozytenmangel entsteht. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass ANDV-Glykoproteine in infizierten Endothelien in der Lage sind, Thrombozyten auf die Oberfläche von Endothelzellen zu rekrutieren. Dieses Ereignis könnte den mikrovaskulären O_2 -Austausch negativ beeinflussen und in einer verstärkten VEGF-Ausschüttung resultieren. Dies wiederum würde die Integrität der endothelialen Barriere beeinflussen (Mackow and Gavrilovskaya, 2009).

Adaptives Immunsystem:

Schwere HCPS-Verläufe korrelieren häufig mit hohen Titern an $CD8^+$ -T-Lymphozyten (CTL's). Darüberhinaus wurde eine Assoziation mit den HL-Antigenvarianten HLA-B* 3501 und HLA-B8-DR3 gezeigt, welche stärkere CTL-Antworten induzieren können (Kilpatrick et al., 2004). Auch *in vitro*-Experimente belegen den Einfluss von CTL's auf die Infektion. Mit ANDV infizierte Endothelien werden durch Zugabe von zytotoxischen T-Lymphozyten

verstärkt permeabilisiert (Hayasaka et al., 2007). Das ANDV-Tiermodell im Goldhamster lieferte jedoch widersprüchliche Daten. Histologische Befunde konnten keine Beteiligung von T-Lymphozyten bestätigen (Hammerbeck and Hooper, 2011).

Zytokine:

Bei verschiedenen Virusinfektionen wird eine massive, systemische und unkontrollierte Zytokinausschüttung für die Pathogenese verantwortlich gemacht (Anaphylaxie). Auch in HCPS-Patienten wurden erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Chemokine (z.B. TNF α , IL-1 β und IL-6) nachgewiesen (Borges et al., 2008; Mori et al., 1999). Außerdem besteht eine Assoziation zwischen einem Polymorphismus im TNF α -Promotor (TNF2-Allel) und dem Risiko für schwere HCPS-Verlaufsformen. Träger des TNF2-Allels besitzen einen besonders starken Promotor und neigen zu einer starken TNF α -Reaktion (Borges et al., 2010). Die Pathogenese könnte außerdem durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies begünstigt werden, welche ebenfalls in erhöhten Konzentrationen nachweisbar sind (Davis et al., 2002).

1.4.3 Labordiagnostik

Hantavirus-Infektionen gehen initial mit unspezifischen Symptomen einher, verlangen aber aufgrund der raschen Progression, besonders bei HCPS-Fällen, eine schnelle und sichere Diagnose. Als direkte Nachweismethode hat sich in den letzten Jahren die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) etabliert, um Virusgenome in Blut, Serum oder Organbiopsien nachweisen zu können (Hjelle, 1998). Weit verbreitet ist ebenfalls der serologische Nachweis von Antikörpern gegen Hantavirus-Antigene im Serum von Patienten. Mit Einsetzen einer symptomatischen Erkrankung bilden sich bei fast allen Patienten IgM- und mit leichter Verzögerung IgG-Antikörper, die gegen das N-Protein und die Glykoproteine (G_N und G_C) gerichtet sind (Elgh et al., 1997; Figueiredo et al., 2008; Kallio-Kokko et al., 2001). Diese Antikörper lassen sich mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie durch ihre Reaktivität mit Hantavirus-infizierten Zellen auf Objektträgern nachweisen. Häufig werden die Virusantigene N, Gn und Gc rekombinant hergestellt und finden Anwendung in verschiedenen serologischen Tests, wie z.B. im enzymgekoppelten Immunabsorptionstest (ELISA) (Feldmann et al., 1993; Padula et al., 2000), Strip-Immunoblot-Test (SIA) (Hjelle et al., 1997) oder auch in immuno-chromatographischen Schnelltests (Figueiredo et al., 2008).

1.4.4 Therapie und Prophylaxe

Es gibt gegenwärtig keinen spezifischen Wirkstoff, welcher für die Therapie von HFRS, NE- und HCPS-Patienten zugelassen ist. Bei einer Reihe von viralen hämorrhagischen Fiebererkrankungen hat sich das Breitband-Nukleosidanalogen Ribavirin als wirksam erwiesen (z.B. Krim-Kongo-hämorrhagisches-Fieber und Lassa-Fieber). Klinische Studien in China belegen, dass bei Administration in den ersten sieben Tagen nach Einsetzen von Symptomen eine Therapie von HFRS-Erkrankungen mit Ribavirin möglich ist und die Lethalität reduziert werden kann (Huggins, 1989; Huggins et al., 1991). Weitere Studien zeigten, dass durch eine rechtzeitige Gabe von Ribavirin auch das Auftreten von Niereninsuffizienz und Oligurie signifikant verringert werden (Rusnak et al., 2009). Ribavirin hat sich dagegen nicht zur Therapie von HCPS-Erkrankten bewährt. In einer kleinen *Open-label*-Studie konnte kein positiver Effekt festgestellt werden. (Chapman et al., 1999; Mertz et al., 2004). *In vitro*- und Tierexperimente zeigen allerdings, dass eine Therapie von SNV- und ANDV-Infektionen bei rechtzeitiger Verabreichung von Ribavirin wirksam ist (Medina et al., 2007; Safronetz et al., 2011).

In Chile wird gegenwärtig eine klinische Studie mit dem antiinflammatorischen Glucocorticoid Methylprednisolon durchgeführt, um dessen Wirksamkeit an ANDV-Patienten zu untersuchen (Mertz et al., 2006). Eine Therapie mit neutralisierenden Immunglobulinen wird diskutiert. Studien in Hamstern belegen deren Wirksamkeit (Custer et al., 2003; Ye et al., 2004). Für den effektiven Einsatz im Menschen sprechen Forschungsergebnisse, welche belegen, dass die Konzentration von neutralisierenden Antikörpern in HCPS-Patienten mit mildem Krankheitsverlauf höher sind als die in Patienten mit schwerem Krankheitsbild (Valdivieso et al., 2006; Ye et al., 2004). In einer *Open-label*-Studie verabreichten chilenische Mediziner Blutplasma mit neutralisierenden Antikörpern von HCPS-Überlebenden an Patienten und konnten so die Lethalität von 35% auf 13% senken (Dolgin, 2012).

Da gegenwärtig keine HCPS-Therapie zur Verfügung steht, können lediglich nur die auftretenden Symptome gelindert werden. Bei Ausbildung eines Lungenödems spielt die Sicherung der Sauerstoffversorgung eine zentrale Rolle. Es kommen künstliche Beatmung oder extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) zum Einsatz. Zusätzlich muss der Flüssigkeitsaustritt in die Lunge reguliert werden. Ferner bedarf es des Einsatzes von Inotropika zur Stabilisierung der Herzfunktion (Castillo et al., 2001; Mertz et al., 2006).

Zur Prävention von HFRS-Erkrankungen sind in China und Südkorea verschiedene Impfstoffe erhältlich (z.B. Hantavax), welche vor Infektionen mit dem Hantaan-Virus

schützen und unter Umständen eine Kreuzprotektion gegen nahe verwandte Spezies verleihen (Hooper and Li, 2001). Gegen HCPS-Infektionen gibt es zur Zeit keine zugelassene Vakzine. Vor allem bei Neuwelt-Hantaviren kommt daher der Expositionsprophylaxe eine große Bedeutung zu. Wichtig sind die Eindämmung und Kontrolle von Nagetierpopulationen in Hantavirus-endemischen Arealen. Darüber hinaus ist es nötig, Risikogruppen (z.B. Farmer, Waldarbeiter) über gesundheitliche Gefahren bei Kontakt zu Nagetieren aufzuklären. Nester oder Fäkalien sollten nur mit Mundschutz und Handschuhen beseitigt und kontaminierte Räumlichkeiten anschließend gut belüftet werden.

1.5 Molekularbiologie der Hantaviren

1.5.1 Aufbau von Hantaviruspartikeln

Viren der Familie *Bunyaviridae* sind strukturell sehr ähnlich. Diese bestehen aus sphärischen, von Lipidmembranen umhüllten Partikeln mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm. In der Membran verankert finden sich die Glykoproteine Gn und Gc. Drei Genomfragmente verschiedener Länge lagern im Inneren der Partikel und befinden sich in Assoziierung mit dem Nukleoprotein (N-Protein) und der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (L-Protein) unter Ausbildung von Ribonukleoproteinkomplexen (RNP) (Abb.2A). Das Hantavirusgenom besitzt eine negative Polarität (*anti-sense*) und besteht aus dem 1,6 bis 2 kb langen S-Segment (small), dem 3,6 kb langen M-Segment (medium) sowie dem L-Segment (large) mit einer Größe von 6,5 kb (Abb. 2B) (Schmaljohn and Nichol, 2007). Jedes dieser Segmente trägt an den Enden nicht-translatierte Sequenzabschnitte (UTRs). Diese beherbergen Promotoren für die Regulation von Transkription und Replikation. Das S-Segment kodiert sowohl für das N-Protein, und in einem zweiten Leserahmen auch für das Nichtstrukturprotein (NSs). Die ORFs für die Glykoproteine und das L-Protein befinden sich auf dem M- bzw. L-Segment (Schmaljohn and Nichol, 2007).

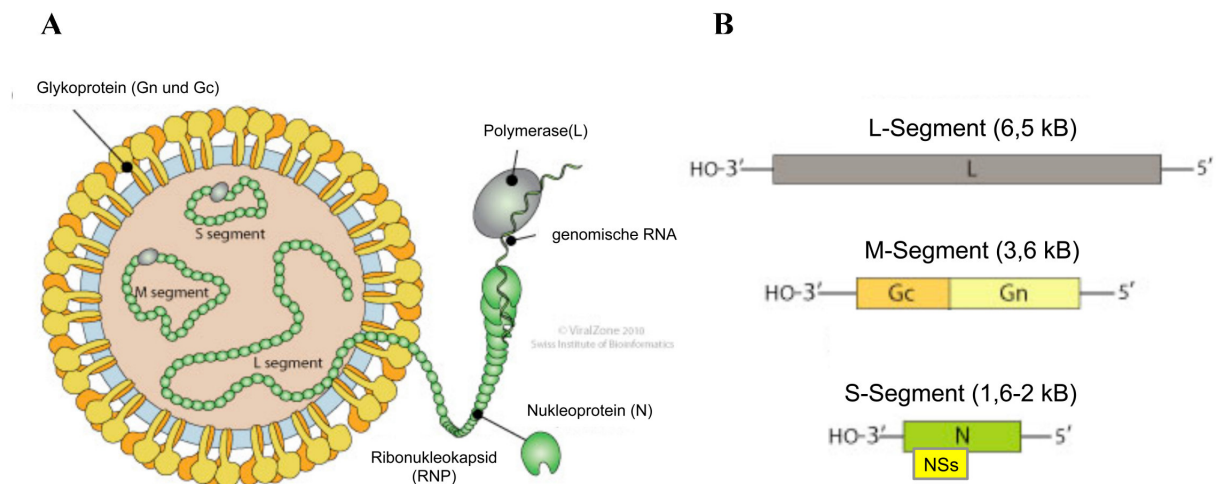


Abb. 2. Schematischer Aufbau und Genomorganisation von Hantaviren. A) Die Viruspartikel sind von einer Lipidmembran umhüllt, aus deren Oberfläche die Glykoproteine G_N und G_C herausragen. Im Inneren befinden sich drei Ribonukleoproteinkomplexe bestehend aus den Genomsegmenten, welche von Nukleoproteinen enkapsidiert und mit einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase assoziiert sind. B) Die drei Genomsegmente sind unterschiedlich groß und kodieren für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L), die Glykoproteine Gn und Gc (M) sowie das Nukleoprotein und Nichtstrukturprotein (S). Abbildung modifiziert.

(http://viralzone.expasy.org/all_by_species/213.html)

1.5.2 Der virale Replikationszyklus

Hantaviren können eine Vielzahl von Zell- und Gewebetypen infizieren, darunter Endothelien, Epithelien, Makrophagen und Lymphozyten. Initial bindet das virale Glykoprotein G_N an β -Integrine auf der Wirtszelle. Hierbei gilt es zu unterscheiden, dass apathogene Erreger mit dem Subtyp β_1 und pathogene Hantaviren mit β_3 -Integrinen interagieren (Gavrilovskaya et al., 1999; Gavrilovskaya et al., 1998). Mit DAF/CD55 (*decay accelerating factor*) existiert ein alternativer Rezeptor, der eine Integrin-unabhängige Infektion erlaubt (Choi et al., 2008; Krautkramer and Zeier, 2008). Gebundene Viren werden Clathrin-abhängig endozytiert. Im frühen Endosom erfolgt die Freisetzung der RNPs ins Zytoplasma durch Fusion von Virus- mit Endosomenmembran (Jonsson et al., 2010).

Die Transkription viraler Gene durch die RNA-abhängige RNA-Polymerase erfolgt im Zytoplasma. Die Translation des Glykoproteinvorläufers und dessen Spaltung in die Untereinheiten Gn und Gc geschieht am rauen ER. Nach Anreicherung von Nukleoproteinen wird vermutlich ein Wechsel von Transkription zu Replikation des Genoms ausgelöst.

Neusynthetisierte Genome werden daraufhin enkapsidiert. Die Glykoproteine von Neu- und Altwelt-Hantaviren reichern sich in unterschiedlichen Bereichen an. Die erstgenannten werden vom Golgi zur Plasmamembran befördert, die letzteren werden im Golgi zurückgehalten. Auch der Ort der Virusassemblierung und Freisetzung ist unterschiedlich. Neuwelt-Hantaviren knospen an der Plasmamembran, Altwelt-Hantaviren an der Golgimembran und werden exozytotisch ausgeschleust (Abb. 3) (Jonsson et al., 2010).

1.5.3 Die Proteine von Hantaviren

1.5.3.1 Die Glykoproteine (Gn & Gc)

Die viralen Glykoproteine werden als Vorläuferprotein GPC am rauhen ER synthetisiert. Kotranslational erfolgt die Translokation in das ER und eine Spaltung in die Untereinheiten Gn und Gc, sowie deren Verankerung in der ER-Membran (Abb.4). Sowohl Gn als auch Gc sind Typ I-Transmembranproteine. Die Prozessierung von GPC erfolgt durch eine unbekannte zelluläre Protease an einem hochkonservierten Sequenzmuster (WAASA) am C-terminalen Ende des Gc-Signalpeptids (Lober et al., 2001). Die Untereinheiten werden durch N-Glykosylierung modifiziert und erhalten in Folge dessen ein Molekulargewicht von 75 bzw. 55 kDa. Der zytoplasmatische Abschnitt (CT) des Gc ist mit 141 AS ungewöhnlich lang und beherbergt eine Cystein-/Histidin-reiche Region (Zink-Finger-Motif) (Estrada et al., 2009).

Gn interagiert mit β_3 -Integrinen auf Wirtszellen (Gavrilovskaya et al., 1999; Gavrilovskaya et al., 1998) und vermittelt die endozytotische Aufnahme von Viruspartikeln (Jin et al., 2002). Gc wurde als Klasse II-Fusionsprotein identifiziert, welches die Freisetzung von RNPs ins Zytosol initiiert (Tischler et al., 2005).

Darüberhinaus spielen Gn und Gc eine entscheidende Rolle bei der Assemblierung und Freisetzung der Virusnachkommenschaft. Die CT's beider Glykoproteine können RNPs durch Interaktion mit Nukleoproteinen binden. Gc-CT besitzt außerdem die Fähigkeit der RNA-Bindung (Hepojoki et al., 2010; Strandin et al., 2011; Wang et al., 2010). Hierbei scheint das Zink-Finger-Motiv eine Rolle zu spielen. Interessanterweise beherbergt diese Domäne auch das Endozytosesignal YXXL, welches sich auch in Matrixproteinen anderer Viren befindet und essentiell für deren Freisetzung ist (Bieniasz, 2006).

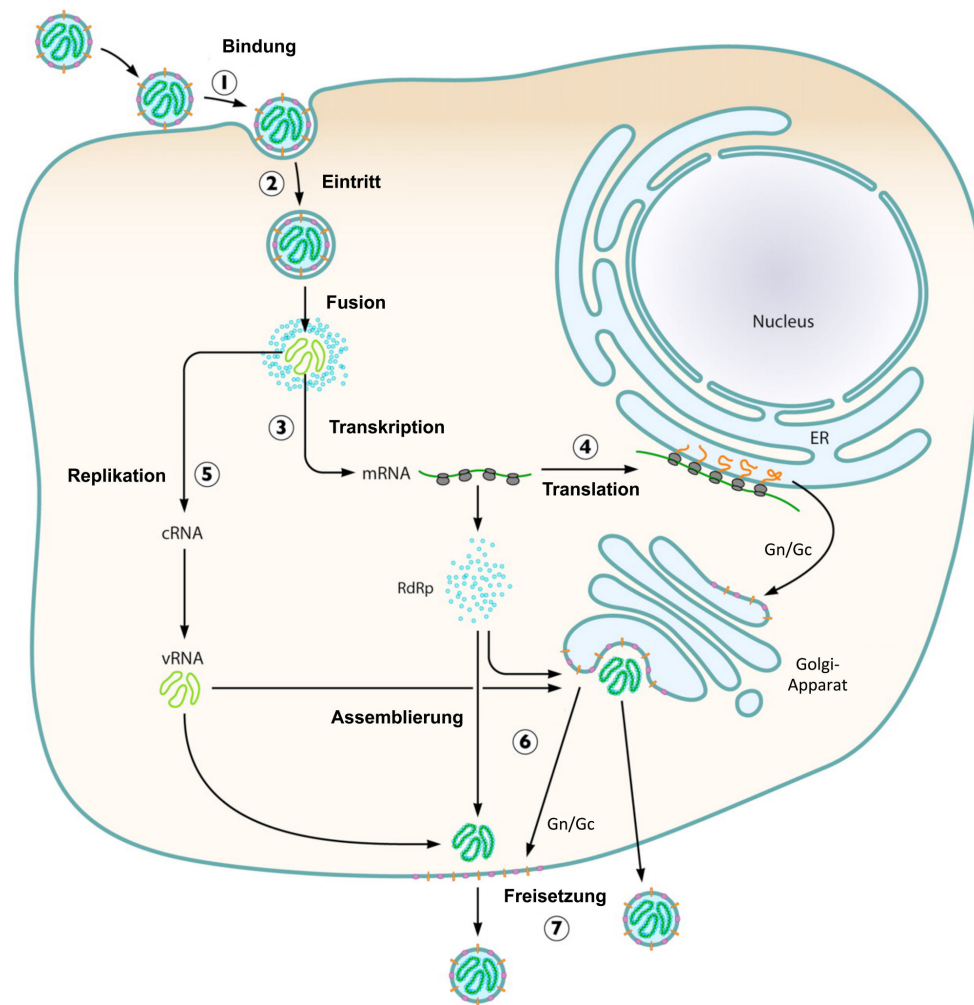


Abb. 3. Replikationszyklus der Hantaviren. Viruspartikel binden an Rezeptoren auf der Wirtszelle (1) und werden durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert. Genomsegmente werden im Zytosol freigesetzt (2) und von der viralen RNA-Polymerase transkribiert (3). Die mRNAs dienen der zellulären Translationsmaschinerie als Matrizen für die Proteinsynthese (4). Nach Anreicherung viraler Strukturproteine beginnt das L-Protein mit der Replikation der Virusgenome (5). Die Assemblierung der Virusnachkommenschaft erfolgt am Golgi-Kompartiment oder, wie man es für die Neuwelt-Hantaviren vermutet, auch an der Plasmamembran (6). Die Ausschleusung von Viruspartikeln erfolgt über Golgivesikel oder Knospung von der Zellmembran (7). Abbildung modifiziert (Jonsson et al., 2010).

Die Glykoproteine gelten ebenfalls als potentieller Virulenzfaktor. Gn-CT des pathogenen NYV inhibiert die Auslösung der RIG-I (*retinoic acid inducible gene 1*)-vermittelten Interferonantwort und interferiert so mit dem angeborenen Immunsystem (Alff et al., 2006; Alff et al., 2008). Gn-CTs enthalten außerdem Tyrosin-basierte Immunrezeptor-Aktivierungsmotive (ITAM), welche bei der immunregulatorischen Signaltransduktion eine Rolle spielen (Geimonen et al., 2003a; Geimonen et al., 2003b). Dagegen scheint sich die

infizierte Zelle zu wehren, indem sie die CTs von pathogenen, nicht jedoch von apathogenen Hantavirus Gn-Proteinen proteasomal degradiert (Geimonen et al., 2003a). Diese Hypothese wurde allerdings relativiert, da auch der zytoplasmatische Abschnitt von Gn-Proteinen nichtpathogener Erreger wie TULV und PHV degradiert wird (Wang et al., 2009).

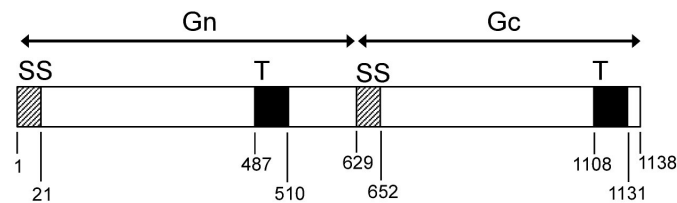


Abb. 4. Das Vorläufer-Glykoprotein. Signalpeptide (SS) dienen der Translokation ins ER. Die Spaltung in die Untereinheiten Gn und Gc erfolgt am Ende des zweiten Signalpeptids hinter der Sequenz WAASA. Die Transmembranhelices (T) dienen zur Verankerung in der ER-Membran.

1.5.3.2 Das Nukleoprotein

Das Nukleoprotein besitzt ca. 430 Aminosäuren, ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa und bildet Homotrimere (Alfadhli et al., 2001). Das N-Protein ist in der Lage, die viralen Genome zu enkapsidieren. Die RNA-Bindung erfolgt bevorzugt an den terminalen nicht-translatierten Regionen der RNA (Mir and Panganiban, 2004; Severson et al., 1999). In infizierten Zellen akkumuliert das N-Protein im Zytoplasma, ist aber bevorzugt perinukleär lokalisiert. Hier ist es höchstwahrscheinlich eng mit dem Golgi-Apparat assoziiert (Kaukinen et al., 2005; Ruusala et al., 1992). Die Akkumulation am Golgi-Apparat ist Dynein-abhängig, einem Motorprotein, welches für den Transport entlang von Mikrotubuli verantwortlich ist (Ramanathan et al., 2007). In späteren Studien wurde allerdings gezeigt, dass nur N-Proteine der Altwelt-Hantaviren diesen Transportweg nehmen und Neuwelt-Hantaviren, wie z.B. ANDV stattdessen mit Aktinfilamenten interagieren (Ramanathan and Jonsson, 2008; Ravkov et al., 1998).

Die Funktionen des N-Proteins sind vielfältig und nur unzulänglich erforscht. Durch die Enkapsidierung von viraler RNA wird diese in erster Linie vor dem zellulären Abbau durch Nukleasen geschützt. Des Weiteren übernimmt N wichtige Aufgaben bei der Transkriptions- und Translationsinitiation. Das N-Protein dient als RNA-Chaperon, wodurch der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase der Zugang zur vRNA erleichtert wird (Mir and Panganiban, 2006). N ist in infizierten Zellen mit sogenannten *p Bodies* (*processing bodies*)

assoziiert. Diese Strukturen sind für den Abbau fehlerhafter oder ausgedienter mRNAs verantwortlich. N bindet hier an 5' Cap-Strukturen und schützt diese vor dem weiterem Abbau. Diese Cap-Strukturen dienen dem Virus wahrscheinlich zur Initiation der Transkription (Cheng and Mir, 2012; Mir et al., 2008). Ferner dient das N-Protein als Ersatz für eIF4F, einen Komplex aus eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren. Ähnlich der Untereinheit eIF4G bindet N an Cap-Strukturen der viralen mRNAs und präsentiert diese dem 43S-Präinitiationskomplex des Ribosoms. Darüberhinaus kann das N-Protein den Faktor eIF4A ersetzen. Beide besitzen eine Helikaseaktivität zur Auflösung komplexer Sekundärstrukturen in mRNAs (Mir and Panganiban, 2008; Panganiban and Mir, 2009). Die hantaviralen Nukleoproteine sind außerdem für die Beeinflussung einer Reihe von zellulären Prozessen verantwortlich. So bindet das PUUV N-Protein an den zellulären Faktor SUMO-1 (Kaukinen et al., 2003). Außerdem wurde eine Assoziation mit dem Protein DAXX beschrieben, welche sich proapoptotisch auf die infizierte Zelle auswirkt (Li et al., 2002). Darüberhinaus inhibiert das N-Protein NF κ B-abhängige inflammatorische Prozesse, indem die Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Zellkern verhindert wird (Taylor et al., 2009).

1.5.3.3 Das Nichtstrukturprotein (NSs)

2007 konnte erstmals gezeigt werden, dass die Hantavirus-Spezies TULV und PUUV ein Nichtstrukturprotein besitzen (Jaaskelainen et al., 2007; Jaaskelainen et al., 2008; Virtanen et al., 2010). Im Jahr 2011 erfolgte der Nachweis auch für das Neuwelt-Hantavirus ANDV (Vera-Otarola et al., 2011). Das NSs-Protein wird durch einen zweiten Leserahmen kodiert, dessen Transkription von einem alternativen Startcodon initiiert wird. Dieses liegt bei PUUV und TULV 40 nt und bei ANDV 79 nt stromabwärts des Startcodons für das N-Gen.

Die Funktion des ANDV-NSs-Proteins ist unerforscht. Ob es die gleichen Aktivitäten wie das TULV- und PUUV-NSs besitzt, gilt es noch zu untersuchen. Letzteres besitzt die Aktivität eines Interferon-Antagonisten, indem es den IFN- β -Promotor und durch NF- κ B und IRF-3 aktivierte Elemente inhibiert (Jaaskelainen et al., 2007). Das NSs scheint vorteilhaft, aber nicht essentiell für die Replikation in Interferon-kompetenten Zellen zu sein (Jaaskelainen et al., 2008).

1.5.3.4 Die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L-Protein)

Polymerasen werden allgemein in vier verschiedene Klassen unterteilt: DNA-abhängige DNA-Polymerasen (DdDP), DNA-abhängige RNA-Polymerasen (DdRP), RNA-abhängige DNA-Polymerasen (RdDP) und RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRP). Sequenzvergleiche ergaben dass alle Klassen 4 konservierte Domänen beherbergen (Motif A, B, C und D). Am C-Terminus befindet sich bei RdDPs und RdRPs ein zusätzliches Motif E. In RdRPs befindet sich darüber hinaus noch ein Motiv F (Prä-Motif A) am N-Terminus. Die Anordnung der konservierten Motive lässt vermuten, dass die räumliche Struktur des hantaviralen L-Proteins weitestgehend dem Aufbau anderer Polymerasen entspricht. Diese gleicht einer „rechten Hand“ und besteht aus den Unterdomänen Handfläche, Finger und Daumen (Kohlstaedt et al., 1992). Die Kristallstruktur der Hepatitis-C-Polymerase zeigt, dass bei RdRPs die Daumen- und Fingerdomäne miteinander verknüpft sind, sodass sich eine ringförmige Öffnung ergibt, welche als „geschlossene Hand“ bezeichnet wird (Lesburg et al., 1999). Diese Verknüpfung besteht nicht bei anderen Polymerase-Klassen, deren Struktur einer „offenen Hand“ ähnelt (Butcher et al., 2001; Lesburg et al., 1999; Ng et al., 2008).

RdRPs von Positiv- und Negativstrang-RNA-Viren sind in der Lage, homooligomere Strukturen auszubilden, welche essentiell für die Polymeasefunktion sind. Dies wurde an den Transkriptasen des Rift-Valley-Fieber-Virus (Zamoto-Niikura et al., 2009), des Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (Sanchez and de la Torre, 2005) oder des Sendai-Virus (Smallwood et al., 2002) demonstriert.

Aus dem Sequenzvergleich des Lassa-Virus-L-Proteins mit der Hepatitis-C-Polymerase wurde ein Strukturmodell errechnet. Dieses lässt vermuten, dass RdRPs von segmentierten Negativstrang-RNA-Viren eine exponierte Schleife aus zwei zusätzlichen Helices besitzen, deren biologische Funktion aber bisher ungeklärt ist (Vieth et al., 2004).

In den N-terminalen Domänen des L-Proteins des La-Crosse-Virus (Reguera et al., 2010a) sowie des Lymphozytären Choriomeningitis-Virus (Morin et al., 2010) wurde kürzlich eine Endonuklease entdeckt. Dieses Enzym findet sich auch in der PA-Untereinheit des Influenza A-Virus (IAV) (Dias et al., 2009). Die Endonuklease trennt Cap-Strukturen von zellulären mRNAs, die die RdRP zur Initiation der Transkription nutzt. Auch im Lassa-Virus-L-Protein fand man einen Bereich mit Aminosäuren, die ausschließlich für die Transkription essentiell sind (Lelke et al., 2010). Verschiedene konservierte, essentielle Aminosäuren wurden bisher in RdRPs entdeckt. Arginine und Lysine in Prä-Motiv A sowie ein Aspartat in Motiv A sind an der Bindung von Nukleosidtriphosphaten beteiligt (Arnold and Cameron,

2004; Bressanelli et al., 2002; Gohara et al., 2004; Gohara et al., 2000). Im katalytischen Zentrum (Motiv A und C) interagieren divalente Metallionen mit weiteren essentiellen Aspartaten, deren Mutation eine Inhibierung der Polymerasefunktion hervorrufen kann (Arnold et al., 1999; Dunn et al., 1995; Jablonski and Morrow, 1995; Vazquez et al., 2000). Bisher konnte bei viralen RdRPs keine Funktion zur Korrektur fehlerhaft eingebauter Nukleotide (*proof reading*) nachgewiesen werden. Als Folge kommt es bei jedem Replikationszyklus zu Mutationen, welche die virale Evolution fördern können. Durch die fortwährende Veränderung des genetischen Materials kann eine Anpassung an neue Wirte oder eine Veränderung in der Pathogenität erfolgen. Die durchschnittliche Evolutionsrate von Hantaviren beträgt 10^{-2} bis 10^{-4} Nukleotidaustausche pro Position und Jahr (Ramsden et al., 2009; Ramsden et al., 2008). Die hantavirale Polymerase ist ebenfalls in der Lage, durch den Wechsel der RNA-Matrize Genomsegmente verschiedener Virusstämme homolog zu rekombinieren (Plyusnin et al., 2002). Darüberhinaus können Hantaviren durch Reassortierung untereinander Genomsegmente auszutauschen, was sowohl im Laborversuch (Rodriguez et al., 1998) als auch in der Natur (Henderson et al., 1995; Li et al., 1995; Plyusnin et al., 1997) möglich ist.

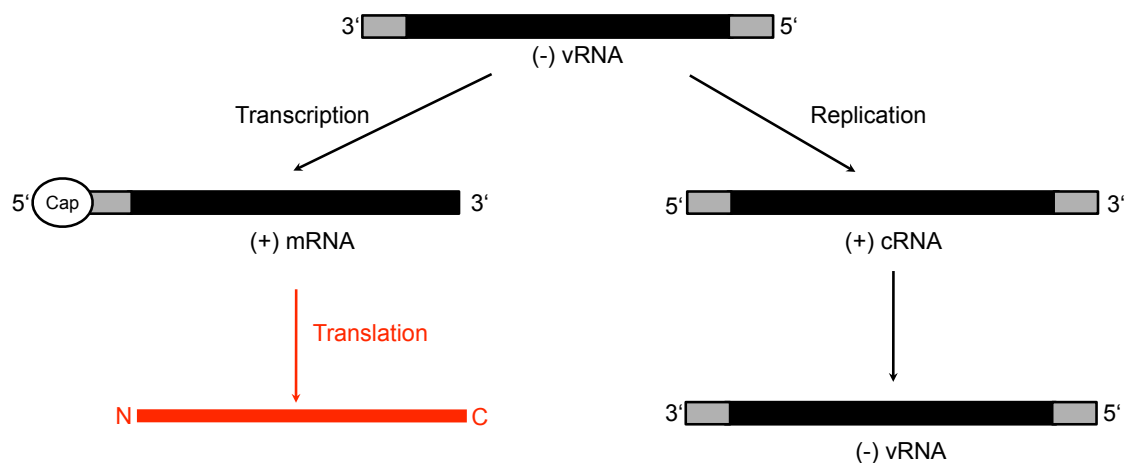
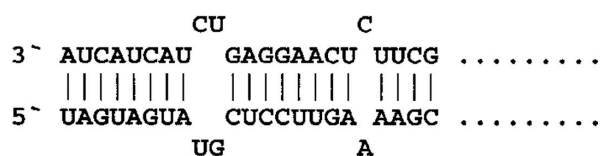


Abb. 5. Transkription und Replikation durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase. Ausgehend vom negativ-orientierten Genomsegment (vRNA) werden positiv-orientierte, gecappte mRNA's synthetisiert. Diese dienen als Vorlage für die Proteinsynthese (links). Bei der Replikation der Genomsegmente entstehen zuerst revers komplementäre Antigenome (cRNA), die im Folgenden als Matrizen für die Herstellung neuer vRNA's dienen.

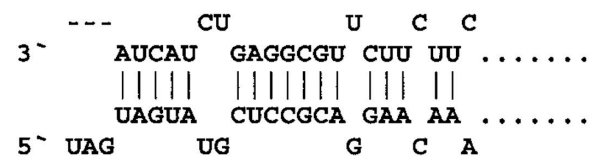
Die Replikation und Transkription der Hantaviren ist bisher kaum untersucht worden. Man geht im allgemeinen davon aus, dass diese Prozesse denen anderer Bunyaviren ähneln.

Mit Hilfe von Replikonsystemen für verschiedene Bunya- und Arenaviren konnte gezeigt werden, dass die nicht-translatierten Genomenden (UTRs) der viralen Polymerase als Promotoren für die Initiation von Transkription und Replikation dienen (Blakqori et al., 2003; Dunn et al., 1995; Hass et al., 2004; Lopez et al., 1995). Die UTRs der *Arena-* und *Bunyaviridae* besitzen hochkonservierte, revers-komplementäre Enden, die durch Basenpaarung Pfannenstiel-Strukturen bilden (Abb. 6). Eine Aufhebung der Basenpaarung in den UTRs durch Mutation reduziert die Promotoreffizienz (Barr and Wertz, 2004; Kohl et al., 2004). Die Analyse von verschiedenen bunyaviralen mRNAs hat ergeben, dass diese am 5'-Ende 12-18 nt-lange, nicht vom Virus kodierte Sequenzen mit einer Cap-Struktur tragen. Diese werden höchstwahrscheinlich von der Wirtszelle akquiriert. (Bishop et al., 1983; Garcin et al., 1995; Simons and Pettersson, 1991). Sie sind einerseits erforderlich damit die zelluläre Translationsmaschinerie die mRNAs für die Proteinsynthese nutzen kann und andererseits dienen sie der Transkriptionsinitiation. Ferner maskieren die zellulären Caps virale mRNAs vor dem Immunsystem des Wirtes, da sie so nicht als fremdartig erkannt werden können. Das Übertragen zellulärer Caps auf die virale mRNA ist nötig, weil Hantaviren, und auch alle anderen segmentierten Negativstrang-RNA-Viren, keine Enzyme für die Synthese von Cap-

S segment



M segment



L segment

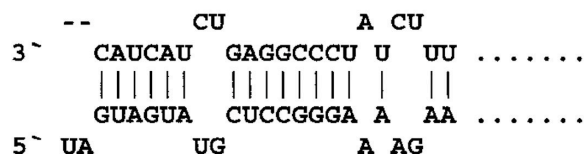


Abb. 6. Termini der ANDV-Genomsegmente. Die 5'- und 3'-Enden der ANDV-Genome besitzen hochkonservierte Triplet-Wiederholungen (AUC) welche zueinander revers komplementär sind und miteinander hybridisieren (Padula et al., 2002).

Strukturen besitzen. Der Vorgang wird auch als *cap snatching* bezeichnet und wurde erstmals 1978 von Bouloy et al. am Influenzavirus demonstriert (Bouloy et al., 1978; Krug, 1981). Hierbei schneidet eine virale Endonuklease ein ca. 15 nt-langes Fragment samt Cap vom 5'-Terminus einer Wirts-mRNA. Die Spaltung erfolgt dabei hinter einem Guanosin-Rest. Auch die Transkription des Hantaan-Virus wird durch ein 5'-gecapptes Oligonukleotid mit einem 3'-terminalen Guanosin gestartet (Garcin et al., 1995). Wahrscheinlich erfolgt die mRNA-Synthese nach einem *Prime-and-Realign-Mechanismus* (Abb. 7A). Der Guanosin-Rest des zellulären Oligonukleotids hybridisiert mit einem Cytosin. Die Polymerase verlängert das Fragment in 3'-Richtung um einige Basen, dieses löst sich, um dann wieder mit dem 5'-Terminus der Matrize zu hybridisieren. Im Anschluss wird die mRNA vervollständigt (Garcin et al., 1995).

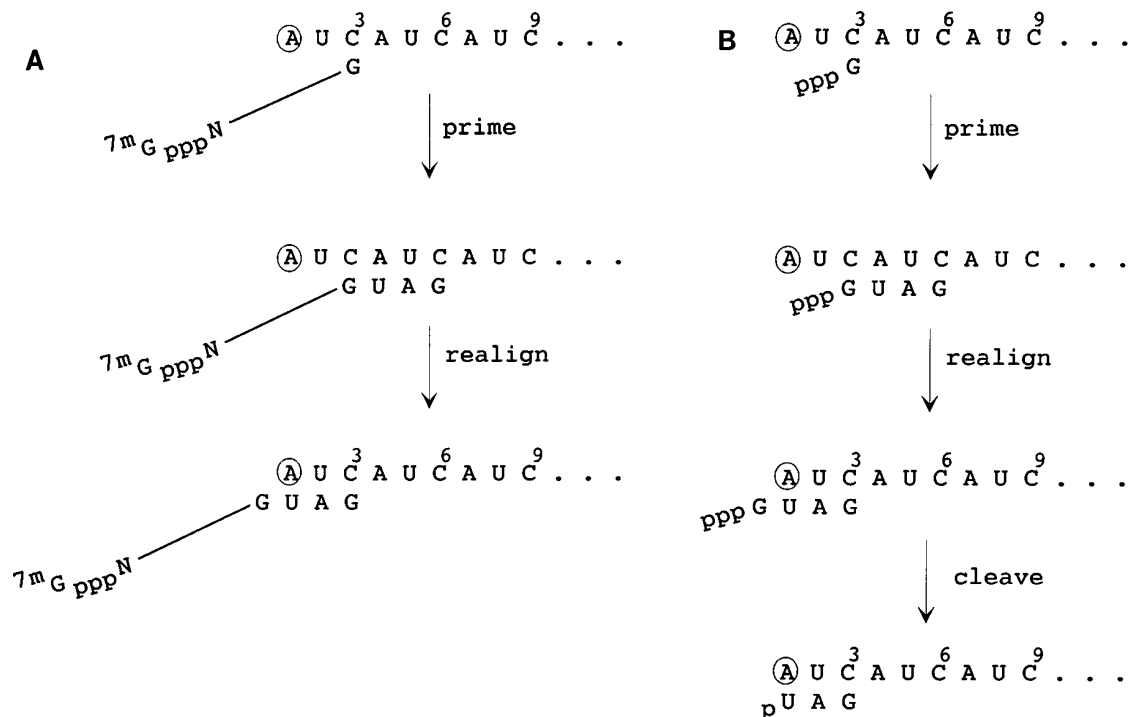


Abb. 7. Prime-and-Realign-Mechanismus. **A** Transkriptionsinitiation: Das 5'-terminale G des gecappten zellulären Oligonukleotids hybridisiert mit dem C an Position +3 der vRNA (oberer Strang). Nach initialer Verlängerung löst sich das Oligonukleotid und kann an das äußere 3'-Ende der vRNA binden, wobei ein Überhang entsteht. **B** Replikationsinitiation: GTP hybridisiert mit dem C an Position +3. Auch hier muss nach initialer Elongation eine Verlagerung des Oligonukleotids an das 3'-Ende der Matrize erfolgen, da sonst zwei Nucleotide verloren würden. Bei der Umlagerung entsteht ein GTP-Überhang. Nach Abspaltung desselbigen verbleibt ein UMP am 3'-Ende des neusynthetisierten Strangs (Garcin et al., 1995).

Die Transkriptionstermination wurde am Sin-Nombre-Virus untersucht. In der 5'-UTR des S-Segments liegt ein CCACCC-Motiv, an welchem die mRNA-Synthese stoppt. Die L-mRNA-Synthese erfolgt bis zum Ende des kompletten Segments. Interessanterweise trägt das M-Segment dagegen ein Polyadenylierungssignal in der 3'-UTR hinter welchem die mRNA-Synthese endet (Hutchinson et al., 1996). Für die Replikation der viralen Genome (vRNA) erstellt das L-Protein zuerst exakt revers-komplementäre Antigenome (cRNA), welche daraufhin als Matrize für die Synthese neuer vRNAs dienen. (Bishop et al., 1983; Garcin et al., 1995; Raju and Kolakofsky, 1987). Die Synthese neuer vRNA wird nicht durch Oligonukleotide initiiert sondern erfolgt *de novo* durch ein einzelnes Nukleosidtriphosphat (Abb. 7B). Das 3'-Ende der Genom-/Antigenommatrize beginnt mit einem Adenosin. Allerdings geht man nicht davon aus, dass hier ein Uridintriphosphat (UTP) hybridisiert. Man nimmt an, dass Pyrimidinbasen nicht geeignet sind, um eine effiziente Polymerasereaktion zu starten. In der Tat findet sich am 5'-Ende von vRNAs und cRNAs kein UTP sondern ein Uridinmonophosphat (UMP) (Chizhikov et al., 1995; Garcin et al., 1995). Daher wird vermutet, dass auch die Replikation nach dem *Prime-and-Realign*-Mechanismus erfolgt, bei welcher die Purinbase GTP mit einem Cytosin an Position +3 hybridisiert. Nach Ablösen und Rehybridisierung der naszierenden RNA entsteht ein GTP-Überhang, der von der viralen Polymerase abgespaltet wird, wodurch das 3'-terminale UMP resultiert (Garcin et al., 1995).

1.6 Zielsetzung der Doktorarbeit

Über das L-Protein der Hantaviren sind im Gegensatz zu L-Proteinen verwandter Viren aus der Familie der *Bunyaviridae* nur wenige Informationen verfügbar. Kenntnisse über Funktionen des hantaviralen L-Proteins brachten in erster Linie nur Aminosäuresequenzvergleiche. Dabei wurden verschiedene konservierte Bereiche nachgewiesen, die homologen Domänen in L-Proteinen der *Orthobunyaviridae* oder *Arenaviridae* entsprechen. Im Zentrum der hantaviralen L-Proteine wurde auf diesem Weg eine RNA-abhängige RNA-Polymerase identifiziert. Diese ist nötig, um das Virusgenom zu transkribieren und zu replizieren. Zusätzlich besitzt eine konservierte Domäne am N-Terminus der hantaviralen L-Proteine eine signifikante Homologie zu RNA-Endonukleasen, welche in L-Proteinen der *Orthobunyaviridae* und *Arenaviridae* bzw. dem PA-Protein der Influenza A-Viren charakterisiert wurde.

Als ein essentieller Faktor für die virale Replikation stellt das Hantavirus L-Protein einen interessanten Angriffspunkt für antivirale Therapien dar. Um Substanzen zu entwickeln, die die enzymatischen Funktionen des L-Proteins inhibieren, ist allerdings eine nähere Charakterisierung dieses Proteins erforderlich. Untersuchungen an hantaviralen L-Proteinen werden jedoch durch ihre ineffiziente rekombinante Expression in Zellkulturen erheblich erschwert.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Expression hantaviraler L-Proteine am Beispiel des ANDV-L-Proteins in eukaryotischen Zellkulturen zu optimieren. Mittels zielgerichteter Mutagenese sollten Motive im L-Gen bzw. L-Protein identifiziert werden, die für die ineffiziente Proteinsynthese verantwortlich sind. Darüber hinaus sollte der molekulare Mechanismus charakterisiert werden, welcher die Expression des ANDV-L-Proteins inhibiert. Nach erfolgter Optimierung der L-Protein-Expression sollte ein Replikonsystem für ANDV etabliert werden. Dieses System soll in Zukunft dazu dienen, die molekularen Mechanismen der viralen Replikation zu analysieren. Darüber hinaus können in dem Replikonsystem antivirale Substanzen getestet werden, welche die Replikation inhibieren. Zusätzlich sollten mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie Kolokalisationsstudien durchgeführt werden, um aufzuklären, ob und mit welchen ANDV-Proteinen bzw. zellulären Kompartimenten das L-Protein assoziiert ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plasmide

pCITE-2a	Novagen
pX12dT-MOPV-MG	BNI, Virologie
pCITE-LASV-L	BNI, Virologie
pCITE-LASV-NP	BNI, Virologie
pX12dT-LASV-MG	BNI, Virologie
pCITE-FF	BNI, Virologie
phRL	Promega

2.1.2 Chemikalien

1kb DNA Ladder	Fermentas
[α - ³² P]CTP	Hartmann Analytik
ϵ -Amino-n-capronsäure	Sigma-Aldrich
Agarose-Tabletten	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA
Bromphenolblau	Merck
Carbenicillin	Carl Roth
Carrier-RNA	Qiagen
Chloroform	Carl Roth
Complete Proteaseinhibitor Cocktail	Roche
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Boehringer Ingelheim
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	Serva
DNA Loading Dye (6x)	Fermentas
Ethidiumbromid	Carl Roth
Essigsäure	Carl Roth

Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Ficoll 400	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Carl Roth
Formamid (deionisiert)	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
LDS Loading Buffer (4x)	Invitrogen
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Magnesiumsulphat-heptahydrat	Merck
Mercaptoethanol	Carl Roth
Met-[³⁵ S]-Label	Haartmann Analytik
Methylenblau	Merck
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth
Natriumacetat	Carl Roth
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumhydroxid	Merck
NuPAGE MOPS SDS-Running Buffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Tris-Acetat Running Buffer (20x)	Invitrogen
Nukleosidtriphosphate (ATP, CTP, UTP, GTP)	Fermentas
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	NEB
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Passive Lysis Buffer (5x)	Promega
Polyvinylpyrolidon	Sigma-Aldrich
Prolong Gold Antifade Reagent	Invitrogen
Protein A Sepharose Fast Flow	GE
RiboRuler High Range RNA Ladder	Fermentas
RNasin	Promega
RotiBlock	Carl Roth

Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	Carl Roth
Saccharose	Merck
Salzsäure, 37%	Carl Roth
Saponin	Carl Roth
Sheared Salmon Sperm DNA	Ambion
SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain	Roche
TEMED	Carl Roth
Tetramethylbenzidin (TMB), <i>recomBlot</i>	Microgen
Tricin	AppliChem
Trinatriumcitrat	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Promega
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trizol LS	Invitrogen
Tween 20	Sigma-Aldrich
UltraPure Agarose	Invitrogen
Xylencyanol FF	Merck

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Menzel
Filterpapier	Whatman
Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns	GE
Nitrozellulosemembran Roti-NC	Carl Roth
Nylonmembran Amersham Hybond-N+	GE
NuPage 4-12% Bis-Tris Gele, 1 mm x 12-Well	Invitrogen
NuPage 4-12% Bis-Tris Gele, 1 mm x 26-Well	Invitrogen
NuPage 3-8% Tris-Acetat Gele, 1 mm x 12-Well	Invitrogen
Objektträger	Engelbrecht
XAR Film Biomax	Kodak

2.1.4 Geräte

Brutschrank	Memmert
Konfokales Laserscan-Mikroskop Fluoview 1000	Olympus
Lightcycler 1.5	Roche
Luminometer Junior	Berthold
Phosphoimager FLA-7000	Fujifilm
Thermocycler Primus 96 Advanced	Peqlab
UV Stratalinker 1800	Stratagene

2.1.5 Enzyme

Restriktionsendonucleasen:

ApaI	Fermentas
BamHI	Fermentas
DpnI	Fermentas
Eam1105I	Fermentas
EcoRI	Fermentas
HindIII	Fermentas
KpnI	Fermentas
MluI	Fermentas
PstI	Fermentas
XbaI	Fermentas
XhoI	Fermentas

Weitere Enzyme:

FastAP	Fermentas
DNaseI	Qiagen
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase	NEB
RNaseH	Promega
Superscript III Reverse Transkriptase	Invitrogen
T7 RNA Polymerase	Fermentas

2.1.6 Kits

Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
GeneJET PCR Purification Kit	Fermentas
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate	Thermo Scientific
TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega
Z-Competent E. Coli Transformation Buffer Set	Zymo Research

2.1.7 Antikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung Immunfluoreszenz	Verdünnung Western Blot	Hersteller
Anti-HA	Kaninchen	1:250	1:10.000	Sigma-Aldrich; H6908
Anti-HA F-7	Maus	1:100		Santa Cruz; sc-7392
Anti-ANDV-N	Kaninchen	1:500	1:1.000	J. Schmidt-Chanasit, BNI
Anti-Flag	Kaninchen	1:2.000		Bethyl; A190-102A
Anti-Flag M2	Maus			Sigma-Aldrich; F1804
Anti-DCP1a	Maus	1:100		Abcam; ab57654
Anti-Kaninchen-IgG; Peroxidase-konj.	Ziege		1:50.000	Jackson; 111-035-003
Anti-Maus-IgG; Rhodamin-konj.	Ziege	1:100		Jackson; 115-025-072
Anti-Kaninchen-IgG; FITC- konj.	Schaf	1: 1:250		SIFIN; PA1104

2.1.8 Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAA
Zusätze: 50 ml Fötale Kälberserum	PAA
5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	PAA
5 ml Natriumpyruvat (100x)	PAA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium ohne Methionin und Cystein (DMEM/-M-C)	Sigma-Aldrich
Zusätze: 5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	PAA
5 ml Natriumpyruvat (100x)	PAA
Glasgow Minimum Essential Medium (GMEM)	Gibco
Zusätze: 25 ml Fötale Kälberserum	PAA
20 ml Tryptosephosphat-Lösung	Sigma-Aldrich
5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	PAA
0,4 ml Geneticin (G-418) (jede zweite Passage)	PAA
OptiMEM	Gibco
Zusätze: keine	

2.1.9 Medien für die Bakterienkultur

Difco LB-Medium, Miller (Luria-Bertani) 25 g/l	BD
Zusätze: 100 µg/ml Carbenicillin	Carl-Roth
Difco LB-Agar, Miller (Luria-Bertani), 40 g/l	BD
Zusätze: 100 µg/ml Carbenicillin	Carl-Roth

2.1.10 Zelllinien

BHK-21, embryonale Nieren-Fibroblasten aus *Mesocricetus auratus*, kultiviert in DMEM, ATCC CCL-10

BHK-J, embryonale Nieren-Fibroblasten aus *Mesocricetus auratus*, kultiviert in DMEM,

BSR-T7/5, modifizierte BHK-21-Zellen, stabile Expression der T7-Polymerase, kultiviert in GMEM, erhalten von Prof. K.K. Conzelmann, LMU München

HeLa, humane Zervixkarzinomzellen, kultiviert in DMEM, ATCC CCL-2

Vero E6, renale Epithelzellen aus *Cercopithecus aethiops*, ATCC CRL-1586, kultiviert in DMEM, erhalten von Dr. A. Rang, Charité Berlin

2.1.11 Bakterien

E. cloni 10G, F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) *endA1 recA1* Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74 araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK rpsL nupG* λ - *tonA*, Lucigen

2.1.12 Viren

Andes-Virus, Stamm Chile-9717869, erhalten von Dr. H. Feldmann, Hamilton, USA

Hantaan-Virus, Stamm 76-118, erhalten von Dr. A. Rang, Charité Berlin

Puumala-Virus, Stamm Sootkamo, erhalten von Dr. A. Rang, Charité Berlin

Sin-Nombre-Virus, Stamm Convict Creek 107, erhalten von der Health Protection Agency, Porton Down, UK

Modifizierter Vaccinia-Ankara-Virus (MVA-T7), erhalten von Prof. G. Sutter, Universität München

2.1.13 Puffer

10x PBS (Phosphat- gepufferte Salzlösung)	NaCl	1,37 M
	KCl	26,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	78,1 mM

KH ₂ PO ₄	14,7 mM
pH 7,4	

DNA-Gelelektrophorese:**10x TAE-Puffer**

Tris	0,4 M
EDTA	0,01 M
Essigsäure	0,2 M
pH 8,5	

RNA-Gelelektrophorese:**5x Formaldehyd-Laufpuffer**

Natriumacetat	40 mM
EDTA	5 mM
MOPS	0,1 M

Proben-Laufpuffer

Formaldehyd-Laufpuffer	1x
Formaldehyd	2,2 M
Formamid	50%

Formaldehyd-Gel-Auftragspuffer

EDTA	1 mM
Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol FF	0,25%
Glycerin	50%

SDS-PAGE:**10x SDS-Laufpuffer**

SDS	1%
Tris	0,25 M
Glycin	1,92 M

SDS-Page-Fixierlösung

Essigsäure	100 ml
Ethanol	300 ml
dH ₂ O	600 ml

Western Blot:

Anodenpuffer I	1 M Tris	300 ml
	Ethanol	200 ml
	dH ₂ O	500 ml

Anodenpuffer II	1 M Tris	25 ml
	Ethanol	200 ml
	dH ₂ O	775 ml

Kathodenpuffer	1 M Tris	25 ml
	Ethanol	200 ml
	Aminocaprinsäure	5,25 g
	dH ₂ O	ad 1000 ml

Immunpräzipitation:

Triton-Lysepuffer	NaCl	200 mM
	Tris	50 mM
	EDTA	1 mM
	Triton X-100	0,5%
	Roche Complete Proteaseinhibitor	40 µl/ml
	pH 7,5	

Northern Blot:

20x SSC-Puffer	NaCl	3 M
	Natriumcitrat	0,3 M
	pH 7,0	
0,04% Methylenblau-Lösung	3M Natriumacetat pH 5,2	0,5 mM
	Methylenblau	0,04%
100x Denhard-Regenz	BSA	2%
	Ficoll 400	2%
	Polyvinylpyrrolidone	2%

Vorhybridisierungslösung	deionisiertes Formamid	50%
	SDS	0,5%
	SSC	5x
	Denhard's-Reagenz	5x
	Lachssperma-DNA	10 mg/ml
	(denaturiert bei 95°C)	
Hybridisierungslösung	deionisiertes Formamid	50%
	SDS	0,5%
	SSC	5x
	Denhard's-Reagenz	5x
	Renilla- <i>Anitsense</i> -Sonde	40 µl
Waschpuffer A	SSC	2x
	SDS	0,1%
Waschpuffer A	SSC	1x
	SDS	0,1%
Waschpuffer A	SSC	0,1x
	SDS	0,1%

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Virus-RNA mit Trizol

Für die Klonierung von hantaviralen Genen wurde Virus-RNA als Matrize für die Reverse Transkriptase-PCR benötigt. Dazu mussten die entsprechenden Viren in 75-cm² Kulturflaschen angezogen werden. Der virushaltige Kulturüberstand wurde bei 1000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde der

Überstand in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit 20% Saccharose in 50 mM Tris [pH 7,4] unterschichtet. Durch Ultrazentrifugation in einem SW 28-Rotor wurden die Viren bei 110.000 x g für 6 h bei 4°C vom Überstand getrennt und das virushaltige Pellet in 250 µl 50 mM Tris [pH 7,4] aufgenommen. Der Suspension wurden 20 µl (= 20 µg) Carrier-RNA zugefügt, um die Ausfällung der Virus-RNA zu verstärken. Die RNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben mittels Zugabe von 750 µl Trizol LS (Invitrogen). Die gereinigte RNA wurde in 100 µl RNase-freiem dH₂O gelöst und bei -70°C gelagert.

2.2.1.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Hantaviren besitzen ein RNA-Genom. Die Klonierung von Virusgenen erforderte daher eine Umwandlung der RNA in cDNA. Dies wurde durch den Einsatz einer reversen Transkriptase (RT) ermöglicht. Das verwendete Protokoll ist für die Generierung von langen cDNA-Fragmenten (>1500 kb) optimiert. Die eingesetzte *Superscript III*-RT arbeitet bei einem Temperaturoptimum von 50°C, Temperaturerhöhungen über das Optimum hinaus dienen der Auflösung von RNA-Sekundärstrukturen und somit der Effizienzsteigerung. Die generierte cDNA wurde im Anschluss durch Einsatz der *Phusion-High Fidelity-Polymerase* (NEB) vervielfältigt. Diese zeichnet sich durch eine hohe Genauigkeit aus.

RNA/Primer-Mix:

RNA	6 µl
Vorwärtsprimer	2 µl
Rückwärtsprimer	2 µl

µl

RT-Mix:

5x First Strand Buffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP's	1 µl
dH ₂ O	2,5

Der RNA/Primer-Mix wurde für 15 min bei 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen, anschließend auf 4°C abgekühlt und mit dem RT-Mix vereinigt. Dieser Ansatz wurde im Thermocycler für 2 min bei 50°C zur Primerhybridisierung vorinkubiert. Erst dann wurden 0,5 µl der *Superscript III*-RT zugefügt und das Standard-Temperaturprofil durchlaufen.

Standard-Temperaturprofil:

50°C	30 min
55°C	5 min
50°C	20 min
60°C	1 min
50°C	10 min
70°C	15 min

Im Anschluss an die Reaktion wurden dem RT-Ansatz 1 µl RNaseH (2 U) zugesetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Dies diente der Entfernung von Matrizen-RNA, welche mit der folgenden PCR interferieren könnte.

2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR wurden spezifisch doppelsträngige DNA-Abschnitte vervielfältigt. Nach Denaturierung der Doppelstränge bei 98°C erfolgte eine Hybridisierung mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden an jeweils einem Ende der beiden Stränge. Diese dienten zur Initiation der Neusynthese eines komplementären Strangs durch die hitzestabile *Phusion-High Fidelity-Polymerase* (NEB). Durch Wiederholung von Denaturierung, Hybridisierung und Synthese in einem Thermocycler wurde der eingesetzte DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt. Die Kontrolle der Amplifikate erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid. Teilweise wurde die DNA anschließend mit dem *GeneJET PCR Purification Kit* (Fermentas) aufgereinigt, um sie in weiteren Reaktionen einsetzen zu können (Restriktionsverdau, Sequenzierung).

Standard-PCR-Ansatz:

H ₂ O dest.	35,5 µl
5x High Fidelity PCR Puffer	10 µl
dNTP's (10 mM)	1 µl
Vorwärtsprimer (10 µM)	1 µl
Rückwärtsprimer (10 µM)	1 µl
DNA (10 ng)	1 µl
<i>Phusion-HF</i> (2 U/µl)	0,5 µl

Standard-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	98°C	1 min	
Denaturierung	98°C	10 s	} 30 Zyklen
Primerhybridisierung	58°C	10 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Finale Elongation	72°C	5 min	

2.2.1.4 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente der Längenbestimmung und Auftrennung von polyanionischen DNA-Sequenzen. Die Gele wurden durch Aufkochen von 0,7 bis 2% Agarose in TAE-Puffer hergestellt und als Horizontalgel gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:6 mit 6x Ladepuffer (Fermentas) versetzt. Zur Kontrolle wurde eine Geltasche mit 5 µl eines Größenstandards (Fermentas) beladen. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 5 V/cm Elektrodenabstand. Durch anschließende Anfärbung der Gele mit dem fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid und Bestrahlung mit UV-Licht wurden die Nukleinsäuren sichtbar gemacht.

2.2.1.5 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

RNA-Proben wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. 500 ng Probenmaterial wurden mit 15,5 µl Proben-Laufpuffer versetzt und für 15 min bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Vor der Gelbeladung wurden darüber hinaus 2 µl Formaldehyd-Proben-Auftragspuffer zugesetzt. Die Auftrennung erfolgte in 1,5% Agarosegelen. Die Agarose wurde in 1x Formaldehydlaufpuffer mit 6,6% Formaldehyd gelöst. Der Lauf erfolgte für ca. 4 h bei 120 V.

2.2.1.6 Bestimmung von DNA/RNA-Konzentrationen

Der Gehalt und die Reinheit von Nukleinsäuren wurden mit einem Photometer ermittelt. Proben wurden 1:50 mit dH₂O verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dH₂O als Referenzwert vermessen.

2.2.1.7 Restriktionsverdau von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurden Nukleinsäuren an bestimmten Sequenzmustern gezielt zerschnitten, um Fragmente spezifischer Länge und mit definierten Enden zu produzieren. Diese dienten der Herstellung neuer Expressionsvektoren. Das Verfahren wurde außerdem eingesetzt, um neugenerierte Plasmide auf ihre korrekte Länge hin zu überprüfen. Es kamen ausschließlich *Fast Digest*-Enzyme des Herstellers Fermentas zum Einsatz, welche sich durch eine schnelle Aktivität auszeichnen und nur einen universellen Puffer benötigen. Darüberhinaus wurde beim Verdau von Vektor-DNA zusätzlich eine alkalische Phosphatase zugegeben (*FastAP*), welche Phosphatgruppen von freien 5'Enden entfernt. Dadurch lässt sich eine Religation des geschnittenen Vektors unterbinden.

Standard-Reaktionsansatz:

dsDNA	max. 1 µg
10x Fast Digest Puffer	2 µl
<i>Fast Digest</i> -Restriktionsendonuclease	1 µl
Ggf. <i>FastAP</i>	1 µl
dH ₂ O	ad 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 5 bis 20 min bei 37°C inkubiert.

2.2.1.8 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Um restriktionsverdaute DNA oder PCR-Amplifikate in einer Ligation einsetzen zu können, ist es erforderlich, diese vorher von ungebundenen Primern und unerwünschten

Nukleinsäuren zu befreien. Dazu wurde die zu reinigende Probe mittels Agarose-Gel aufgetrennt, das Gel mit *SYBR Green I* (Roche) gefärbt und die gewünschte Bande auf einem Blaulicht-Tisch ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem *QIAEX II Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.9 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Mit Hilfe des *Rapid Ligation Kits* (Fermentas) wurden die Enden von ein oder zwei verschiedenen DNA-Molekülen miteinander verknüpft, um neue Plasmide zu generieren. Im Kit ist eine T4-Ligase enthalten, welche freie 5'-Phosphatgruppen mit 3'-OH-Gruppen verbindet. Im Standardansatz wurden jeweils 100 ng des dephosphorylierten Vektors mit der 3-fachen Menge an zu inserierender DNA verknüpft. Die Menge an Insert-DNA wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Masse Insert (ng)} = 3 * \frac{\text{Länge Insert (kb)} * \text{Masse Vektor (ng)}}{\text{Länge Vektor (kb)}}$$

Standard-Reaktionsansatz:

100 ng Vektor-DNA

x ng Insert-DNA

5 µl 4x Ligase Puffer

1 µl Rapid T4 Ligase

Die Inkubation erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur.

Mit dem Ligationsprodukt wurden im Anschluss z-kompetente *E. coli* transformiert.

2.2.1.10 Herstellung und Transformation z-kompetenter *E. coli*

Bakterien der Gattung *Escherichia coli* sind in der Lage, nach chemischer oder physikalischer Behandlung Fremd-DNA aufzunehmen. Diese sogenannten kompetenten Zellen finden Anwendung in der Expression oder Replikation synthetisch hergestellter Plasmid-DNA welche durch Transformation in die Bakterien übertragen wird. *E. coli*-Bakterien wurden mit

Hilfe des *Z-CompetentTM E. coli Transformation Buffer Sets* (Zymo Research) nach Herstellerangaben behandelt. Die Transformation z-kompetenter Bakterien erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben.

2.2.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von extrachromosomaler DNA (Plasmide) aus transformierten *E. coli*-Zellen erfolgte durch alkalische Lyse und Präzipitation von chromosomaler DNA und Proteinen. Plasmide wurden dabei über Silikamembranen extrahiert. Hierbei kamen das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas) und das *QIAfilter Plasmid Midi Kit* (Qiagen) zur Anwendung, wobei nach dem Protokoll der Hersteller verfahren wurde.

2.2.1.12 Sequenzierung von DNA

PCR-Produkte und Plasmide wurden sequenziert, um sie auf Vollständigkeit und korrekte Basenabfolge zu überprüfen. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma SeqLab in Göttingen. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Computerprogramme Seqman (DNASTAR) bzw. Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) zum Einsatz.

2.2.1.13 Aufreinigung von RNA aus Zellen

Um die Transkription transfizierter Gene mittels qRT-PCR zu bestimmen, musste zuerst virale bzw. mRNA aus Zellen isoliert werden. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach einem modifiziertem Herstellerprotokoll:

Zellen wurde in 350 µl RLT-Puffer (+ 1% β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Anschließend wurde der Überstand mit 350 µl Ethanol gemischt und durch eine RNeasy-Säule zentrifugiert (10000 x g, 30 s). Die Säule wurde mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen. Für mRNA-Aufreinigungen wurde die Säulenmembran mit 10 µl DNase1 (in 70 µl RDD-Puffer) für 30 min bei RT inkubiert, um den Hintergrund an Plasmid-DNA möglichst komplett zu entfernen. Im Anschluss wurde die Säule abermals mit 350 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl

RPE-Puffer gewaschen und für 60 s bei 10000 x g getrocknet. Zuletzt erfolgte die Elution der RNA mit 50 µl dH₂O.

2.2.1.14 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Dieses Verfahren diente sowohl der Quantifizierung von Virusgenomen in Probenmaterial als auch der relativen Quantifizierung von mRNA aus transfizierten Zellen. Unter Verwendung des *QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kits* (Qiagen) wird hierbei initial die eingesetzte RNA-Matrize durch eine reverse Transkriptase in einen einzelsträngigen komplementären DNA-Strang umgeschrieben (cDNA). Dieser wiederum dient als Matrize zur Amplifikation in einer anschließenden konventionellen PCR-Reaktion. In die Amplifikate interkaliert der fluoreszierender Farbstoff *SYBR Green I*, dessen Intensität mit Zunahme der PCR-Produkte proportional ansteigt. Die Fluoreszenzintensität wird nach jedem Zyklus gemessen und ermöglicht eine Quantifizierung der Produkte. Die Spezifität der Reaktion wird anhand einer Schmelzkurvenanalyse ermittelt. Hierbei werden die entstandenen Amplifikate bei langsam steigender Temperatur in Einzelstränge denaturiert. Spezifische PCR-Produkte lassen sich anhand ihrer Schmelztemperatur von unspezifischen Amplifikaten oder Primerdimeren differenzieren.

Standard-Reaktionsansatz:

2x SYBR Green RT-PCR Master Mix	10 µl
Vorwärtsprimer 10 µM	2 µl
Rückwärtsprimer 10µM	2 µl
QuantiTECT RT Mix	0,2 µl
dH ₂ O	2,8 µl
RNA	3 µl

Standard-Temperaturprofil:

Reverse Transkription	50°C	30 min	
Inaktivierung RT	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	15 s	} 45 Zyklen
Primerhybridisierung	58°C	20 s	
Elongation	72°C	30 s	

2.2.1.15 Radioaktive *In vitro*-Transkription von Northern Blot-Sonden

Für die Detektion von Reporter-gen-RNA im Northern Blot wurde eine *Renilla-antisense*-Sonde hergestellt.

Reaktionsansatz:

4 µl	5x Transkriptions Buffer (Fermentas)
2 µl	100 mM DTT
0,5 µl	RNasin (Promega)
2,5 mM	ATP
2,5 mM	UTP
2,5 mM	GTP
50 µCi	[α - ³² P] CTP (Hartman-Analytik)
100 ng	Matrize für <i>Renilla-antisense</i> -Sonde
20 U	T7 RNA Polymerase (Fermentas)
2,5µl	dH ₂ O (RNase-frei)

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Matrizen-DNA wurde durch Zugabe von 1 µl RNasefreie DNase (Promega) und Inkubation für 15 min bei 37°C degradiert. Die Produkte wurden anschließend über *Illustra ProbeQuant G-50 Micro Säulen* (GE) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.1.16 Northern Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde mittels Northern Blot nachgewiesen. Die Nukleinsäuren wurden zu diesem Zweck über einen Kapillartransfer auf Nylonmembranen übertragen. Die Detektion spezifischer RNA erfolgte mit Hilfe einer reversers-komplementären, radioaktiv markierten RNA, welche mittels *in vitro*-Transkription hergestellt wurde. Als Transferpuffer diente 20x SSC-Puffer. Der Transfer erfolgte für mindestens 16 h. Anschließend wurde die RNA mittels UV-Strahlung bei 120 mJ/cm³ dauerhaft auf der Membran fixiert (*UV-Crosslinking*). Die Banden des RNA-Längenstandards und der ribosomalen 18S- und 28S-RNA wurden durch Anfärbung mit 0,04%-iger Methylenblau-Lösung sichtbar gemacht. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 68°C in Vorhybridisierungs-lösung und anschließend in Hybridisierungslösung (+ *Renilla-antisense*-

Sonde) für 16 h bei 68°C. Am Folgetag wurden die Membranen einmal kurz mit Waschlösung A, 1 h mit Waschlösung B und 20 min mit Waschlösung C bei 68°C gewaschen. Die Blots wurden in Folie eingeschweißt und radioaktive Signale mittels Phosphoimager detektiert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zucht und Passagierung eukaryotischer Zelllinien

Verschiedene Zelllinien wurden in 75-cm² Kulturflaschen bei 37°C und CO₂-Begasung (5%) kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 3 ml Trypsin/EDTA zugegeben und die Zellen ca. 15 min bei 37°C inkubiert bis sie sich vom Flaschenboden ablösten. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 7 ml frischem Nährmedium inaktiviert und ein Teil der Zellsuspension (1:20 bis 1:10) in eine neue Flasche überführt. Zur Zellsuspension wurden ca. 20 ml frisches Nährmedium gegeben.

2.2.2.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

PCR-Fragmente oder Plasmid-DNA wurde mittels *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) in Zellen transient transfiziert. *Lipofectamine 2000* besteht aus kationischen Liposomen, welche polyanionische DNA binden und von Zellen aufgenommen werden können.

Transfektionsansatz 24-Well-Platte (pro Well):

A:	0,75 µl <i>Lipofectamine 2000</i>	B:	250 ng DNA
	100 µl OptiMEM		100 µl OptiMEM

Transfektionsansatz 6-Well-Platte (pro Well):

A:	3,75 µl <i>Lipofectamine 2000</i>	B:	1,25 µg DNA
	250 µl OptiMEM		250 µl OptiMEM

Lösung A wurde für 5 min bei RT inkubiert, anschließend mit Lösung B gemischt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde der komplette Reaktionsansatz auf die Zellen

pipettiert und für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium gegen frisches Nährmedium ausgetauscht und für weitere 9 bis 20 h inkubiert.

2.2.3 Virologische Methoden

2.2.3.1 Anzucht von MVA-T7

Zur Herstellung eines MVA-T7-Stocks wurden 175-cm² Kulturflaschen mit konfluenten BHK-J-Zellen benötigt. Diese wurden mit 1 ml MVA-T7-Suspension für 1 h bei 37°C + 5% CO₂ im Brutschrank inokuliert. Ungebundene Viruspartikel wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Dann wurde 30 ml frisches DMEM (+ 3% FKS) auf die Zellen pipettiert. Zur Virusvermehrung wurden die Zellen weitere 36 h inkubiert, um das Virus zu vermehren. Die Ernte erfolgte durch Pelletieren bei 1000 x g für 10 min. Das virushaltige Zellpellet wurde in 2 ml 10 mM Tris [pH 9,0] resuspendiert und bei -70°C eingefroren, um die Zellen aufzubrechen. Nach Auftauen der Zellen wurde mit 25 Schlägen im Dounce-Homogenisator weiter lysiert. Das Lysat wurde mittels Zentrifugation geklärt und bei -70°C eingefroren.

2.2.3.2 MVA-T7-Titrierung mittels Luciferase-Assay

Diese Methode dient zur Ermittlung der geeigneten Menge an MVA-T7, welche benötigt wird, um eine maximale Expression T7-Promotor gesteuerter Gene zu erhalten. Dazu wurden ca. 10⁵ BHK-J-Zellen/Well in einer 24-Well-Platte ausgesät und mit einer Verdünnungsreihe MVA-T7 für 60 min inokuliert. Jedes Well wurde im Folgenden mit 10 mg pCITE-FF transfiziert. pCITE-FF kodiert eine *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle eines T7-Promotors. Nach 24 h wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Luciferase-Aktivität steigt in Abhängigkeit der eingesetzten MVA-T7-Menge bis zum Erreichen einer Sättigungsgrenze an. Diese kennzeichnet die optimale Menge an MVA-T7 mit der Zellen infiziert werden sollten.

2.2.3.3 Infektion von Zellen mit MVA-T7 für transiente Genexpression

Für die Expression von T7-Promotor-kontrollierten Genen (pCITE-Vektoren) in Zellkulturen, benötigen diese eine funktionelle T7-RNA-Polymerase. Diese wurde durch Infektion mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus MVA-T7 in die Zellen eingeschleust. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer geeigneten Menge an Virus in 200 µl OptiMEM infiziert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 1 h wurde das Inokulum entfernt und der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben.

2.2.3.4 Anzucht von ANDV und anderen Hantaviren

Ein zu 80% konfluenten Zellrasen (Vero E6) in einer 75-cm² Zellkulturflasche wurde zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml Virussuspension in DMEM (ohne FKS) zu den Zellen gegeben. Die MOI (Multiplizität der Infektion) war je nach Virus unterschiedlich, betrug aber in der Regel zwischen 0.01 und 1. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden nicht gebundene Viruspartikel durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit 20 ml frischem DMEM (+ 3% FKS) überschichtet. Es folgte eine Inkubation für 6 bis 10 Tage. Für die Einlagerung des neuen Virus-Stocks bei 70°C wurden die Kulturen bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Gehalt an FKS wurde auf ca. 15% erhöht, die Kulturen in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Hantavirus-Anzuchten erfolgten in einem Labor der Sicherheitsstufe 3.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Radioaktive Markierung von Proteinen in Zellkultur

Durch Zugabe der Aminosäuren [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein in das Zellkulturmedium wurden Proteine während ihrer Synthese radioaktiv markiert. Zellen in 6-Well-Platten wurden transfiziert, um das zu untersuchende Protein zu exprimieren. 20 h nach der Transfektion wurden die Kulturen zweimal mit 2 ml DMEM/-M-C gewaschen und anschließend mit 2 ml des selben Mediums für 2 h im Brutschrank inkubiert, um den intrazellulären Methionin- und Cysteingehalt zu senken (Aushungerung). Im Anschluss wurden 50 µCi *Met*-[³⁵S]-Label

(Hartmann Analytik) in 0,5 ml DMEM/-M-C auf die Kultur gegeben und diese im Brutschrank inkubiert (Pulse). Proteine, die in dieser Zeit neu translatiert wurden, wurden metabolisch markiert. Zur Halbwertszeitbestimmung wurde das radioaktive Medium entfernt, dreimal mit nicht-radioaktivem Medium gewaschen und bis zu 2 h in nicht-radioaktivem Medium inkubiert. In dieser Zeit lässt sich der Abbau von markierten Proteinen nachverfolgen (Chase). Die zu untersuchenden, markierten Proteine wurden durch Immunpräzipitation gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert. Alternativ wurde auch das gesamte Zelllysate elektrophoretisch aufgetrennt. Die Versuchsauswertung erfolgte am Phosphorimager. Die gemessenen Proteinintensitäten wurden gegen die Zeit graphisch dargestellt. Der Kurvenverlauf nimmt exponentiell ab und lässt sich durch die folgende Formel berechnen: $N(t) = N_0 * e^{-\lambda t}$. Daraus wiederum konnte die Halbwertszeit abgeleitet werden: $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda}$.

2.2.4.2 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient der spezifischen Fällung von Proteinen aus einem Proteingemisch (z.B. Zelllysate). Dabei werden makroskopische Protein A-gekoppelte Sepharose-Kügelchen eingesetzt. Protein A, ein rekombinantes Protein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, bindet mit hoher Affinität Immunglobuline. Durch Verwendung von Antikörpern, die das zu präzipitierende Protein binden, entsteht ein Komplex, welcher sich durch Zentrifugation vom Zelllysate trennen lässt. Proteine aus radioaktiv markierten Zellen wurden mittels Immunpräzipitation aufgereinigt. Die Kulturen wurden 3x mit PBS gewaschen und Zellen in 1 ml Triton-Lysepuffer für 30 min aufgeschlossen. Unlösliche Zelltrümmer wurden bei 10000 x g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 µl (0,5 bis 0,7 mg/ml) Kaninchen-αHA-Antikörper über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 50 µl Protein A-Sepharose (1:1 in Triton-Lysepuffer) zugegeben und weitere 2 h auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proteinkomplexe mittels Zentrifugation (4000 x g, 2 min) präzipitiert. Das Pellet wurde 2x mit Triton-Lysepuffer und 2x mit 50 mM Tris-HCl [pH 7,5] gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet mit 50 µl 1x LDS Laufpuffer + 0,1 M DTT versetzt, für 5 min bei 95°C hitzedenaturiert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Mit Hilfe dieser Methode werden Proteingemische anhand ihrer Größe aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:4 mit 4x LDS Probenpuffer (Invitrogen) und 1:10 mit 1M DTT versetzt und für 5 min bei 95°C hitzedenaturiert. Es fanden verschiedene Gelsysteme Anwendung:

Invitrogen XCell Midigel- und Minigel-System:

Hierbei kamen gekaufte Gele zum Einsatz. Je nach Größe der Proteine wurden entweder NuPage 4-12% Bis-Tris-Gele oder 3-8% Tris-Acetat-Gele (Invitrogen) verwendet. Als Laufpuffer diente 1x MOPS bzw. 1x Tris-Acetat-Puffer bei einer Spannung von 150 V für ca. 1,5 h.

Biometra Minigel-System:

Bei diesem System wurden selbsthergestellte Gele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x SDS-Laufpuffer bei 150 V für ca. 1,5 h. Sammel- und Trenngele waren wie folgt zusammengesetzt:

	4% Sammelgel	10% Trenngel	16% Trenngel
dH₂O	1,6 ml	3,6 ml	3,25 ml
1,5 M Tris [pH 8,8]	---	1,9 ml	1,9 ml
0,5 M Tris [pH 6,8]	0,63 ml	---	---
Rotiphorese Gel 40	0,25 ml	1,9 ml	2,25 ml
10% SDS	25 µl	150 µl	150 µl
10% Ammoniumperoxodisulfat	25 µl	150 µl	150 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl

2.2.4.4 Western Blot

Diese Technik ermöglicht einen irreversiblen Transfer von Proteinen von einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Proteine in Richtung Anode.

Aufbau:	Anode
	3 Filterpapiere in Anodenpuffer I
	3 Filterpapiere in Anodenpuffer II
	Nitrozellulosemembran in Anodenpuffer II
	Acrylamidgel in Kathodenpuffer
	3 Filterpapiere in Kathodenpuffer
	Kathode

Filterpapiere, Membran und Proteingel wurden in den entsprechenden Puffern equilibriert und nach dem obigen Schema auf der Western Blot-Apparatur zwischen Anode und Kathode gestapelt. Der Elektrotransfer erfolgte bei 1 mA/cm^2 Blotfläche für 60 min. Der Proteinnachweis erfolgte immunochemisch bei Raumtemperatur. Die verwendeten Antikörperkonzentrationen sind unter 2.1.8 nachzulesen. Die Membran wurde nach dem Blotten mit 10% RotiBlock/PBS für 1 h geblockt, um unspezifische Antikörperreaktionen zu verhindern. Im Anschluss wurde die Membran mit einer Primärantikörperverdünnung in 2% RotiBlock/PBS für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit 0,05% Tween 20/PBS wurde ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt. Dieser war ebenfalls in 2% RotiBlock/PBS verdünnt und wurde 1 h mit der Membran inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde abermals durch dreifaches Waschen mit 0,05% Tween 20/PBS entfernt. Der Nachweis von Antikörpern, die an das Zielprotein gebunden haben, geschah über eine Peroxidasereaktion. Es wurde das Substrat Luminol (SuperSignal West Pico Chemoluminescence Kit, Thermo Fisher) eingesetzt, welches durch die Peroxidase oxidiert wurde. Bei dieser Reaktion werden Elektronen angeregt und als Folge Licht emittiert, das durch Auflegen eines Röntgenfilms (Biomax XAR, Kodak) detektiert wurde.

2.2.4.5 Nachweis radioaktiv markierter Proteine

[^{35}S]-Methionin-markierte Proteine wurden wie oben beschrieben im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nachfolgend wurde das Gel für ca. 15 min in Fixierlösung getränkt, dann auf ein Filterpapier gelegt, in Folie eingeschweißt und eine Imager-Platte aufgelegt. Diese wurde nach der Belichtung im Phosphoimager ausgelesen.

2.2.4.6 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Die indirekte Immunfluoreszenz ermöglicht eine Visualisierung von zellulären Strukturen und Molekülen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Die zu untersuchenden Moleküle werden mit einem spezifischen Primärantikörper markiert. An diese werden wiederum Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper gebunden, welche nach Anregung durch Licht bestimmter Wellenlängen ihrerseits Licht emittieren. Für diese Versuche wurden Zellen auf Deckgläschen ($d = 1 \text{ cm}$) in 24-Well-Platten ausgesät und transfiziert. 10 bis 24 h später wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und auf den Deckgläschen mit 4% Paraformaldehyd/4% Saccharose/PBS für 10 min fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,2% Saponin/PBS für 10 min permeabilisiert, gefolgt von einer Absättigung mit 10% BSA/PBS für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde der Primärantikörper zugefügt. Dieser wurde in 10% BSA/0,2% Saponin/PBS verdünnt. Eine Übersicht über die eingesetzten Antikörperverdünnungen ist unter 2.1.8 zu finden. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 min entfernt. Danach wurden die Zellen mit entsprechenden FITC- bzw. TRITC-konjugierten Sekundärantikörperverdünnungen und DAPI (1:1000) in 10% BSA/0,02% Saponin/PBS überschichtet. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde erneut dreimal für je 5 min mit PBS und einmal kurz mit dH_2O gewaschen. Zuletzt wurden die Deckgläschen mit *Prolong Gold Antifade* Reagenz (Invitrogen) auf Objektträgern eingebettet. Nach dessen Auspolymerisierung erfolgte die Auswertung der Präparate an einem konfokalen Laserscan Mikroskop (Olympus FV 1000). Einzelbilder wurden mit der Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) zugeschnitten und überlagert.

2.2.4.7 Luciferase-Aktivitäts-Messung (Luciferase-Assay)

Die Luciferase aus *Photinus pyralis* (*Firefly*) oxidiert das Substrat D-Luciferin zu Oxyluciferin, die Luciferase der Koralle *Renilla reniformis* hingegen kann das Substrat Coelenterazin zu Coelenteramid umwandeln. In beiden Reaktionen kommt es zur Emission von Lichtenergie, welche sich mit Hilfe eines Photodetektors messen lässt. *Renilla*- und *Firefly*-Luciferasen (als auch weitere Proteine) finden Anwendung als Reporter für die Messung von Genexpression und -regulation. Verschiedene Reportergene wurden nach

Transfektion in 24-Well-Zellkulturen exprimiert. Für die Messung der Reporterogenaktivität mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay Systems* (Promega) wurden die Zellen mit 100 µl/Well *Passive Lysis Buffer* für ca. 20 min lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation von unlöslichen Bestandteilen befreit. Die Messung der Reporterogenaktivität erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Expression von ANDV-Genen

Die Untersuchung der Expression des ANDV-L-Proteins in eukaryotischen Zellkulturen erforderte die Klonierung des L-Gens in einen geeigneten Expressionsvektor. Für Kolokalisationsstudien zwischen dem ANDV-L-Protein und dem N-, NSs bzw. Glykoprotein mussten auch deren Gene in einen Vektor kloniert werden. Um die Replikationsaktivität des L-Proteins untersuchen zu können wurde außerdem ein Reportergen (Minigenom) kloniert.

Als Expressionsvektor wurde pCITE2a verwendet, der einem T7-Promotor besitzt. Für eine erfolgreiche Genexpression von pCITE2a muss die transfizierte Zelle eine T7-Polymerase enthalten. Die natürlicherweise aus dem Bakteriophagen T7 stammende Polymerase wurde in den durchgeführten Experimenten durch Infektion mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus (MVA-T7) in die Zelle eingebracht (Sutter et al., 1995). Alternativ wurden BSR-T7/5-Zellen verwendet. Bei dieser Zelllinie ist durch stabile Transfektion das T7-Gen in das Zellgenom inseriert worden (Buchholz et al., 1999). Direkt hinter dem T7-Promoter befindet sich auf pCITE2a eine interne Ribosomenbindestelle (IRES). Diese ermöglicht eine Cap-unabhängige Translation der Transkripte. Mit Ausnahme des N-ORF's wurden alle zu klonierenden Gene mit Sequenzen für ein HA- oder Flag-Epitop fusioniert. Die Epitope dienen der Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern.

Für die Klonierung erfolgte initial eine ANDV-Anzucht in Zellkulturen. ANDV-Partikel im Zellkulturüberstand wurden mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert und daraus die Virus-RNA aufgereinigt. In einer RT-PCR wurden die offenen Leserahmen der ANDV-Gene, welche für die Proteine L, N und GPC kodieren, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und amplifiziert. Die cDNA wurde mittels Fusions-PCR in pCITE2a eingefügt. Im Gegensatz zur klassischen Klonierung, bei der das zu inserierende Fragment über Restriktionsschnittstellen ligiert wird, lassen sich mit der Fusions-PCR DNA-Fragmente unabhängig von der Sequenz in einen Vektor einfügen. Bei dieser Methode werden sowohl Insert und Vektor in zwei getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert (Abb. 8). Hierbei tragen der Rückwärtsprimer aus der Insert-PCR und der Vorwärtsprimer der Vektor-PCR zueinander revers komplementäre Überhänge. In einer anschließenden PCR-Reaktion hybridisieren diese Überhänge, wodurch es ermöglicht wird, beide Stränge zu fusionieren. Um das Fusionsprodukt anschließend ligieren zu können, ist es nötig, dass einer der Primer eine 5'-Phosphatgruppe trägt.

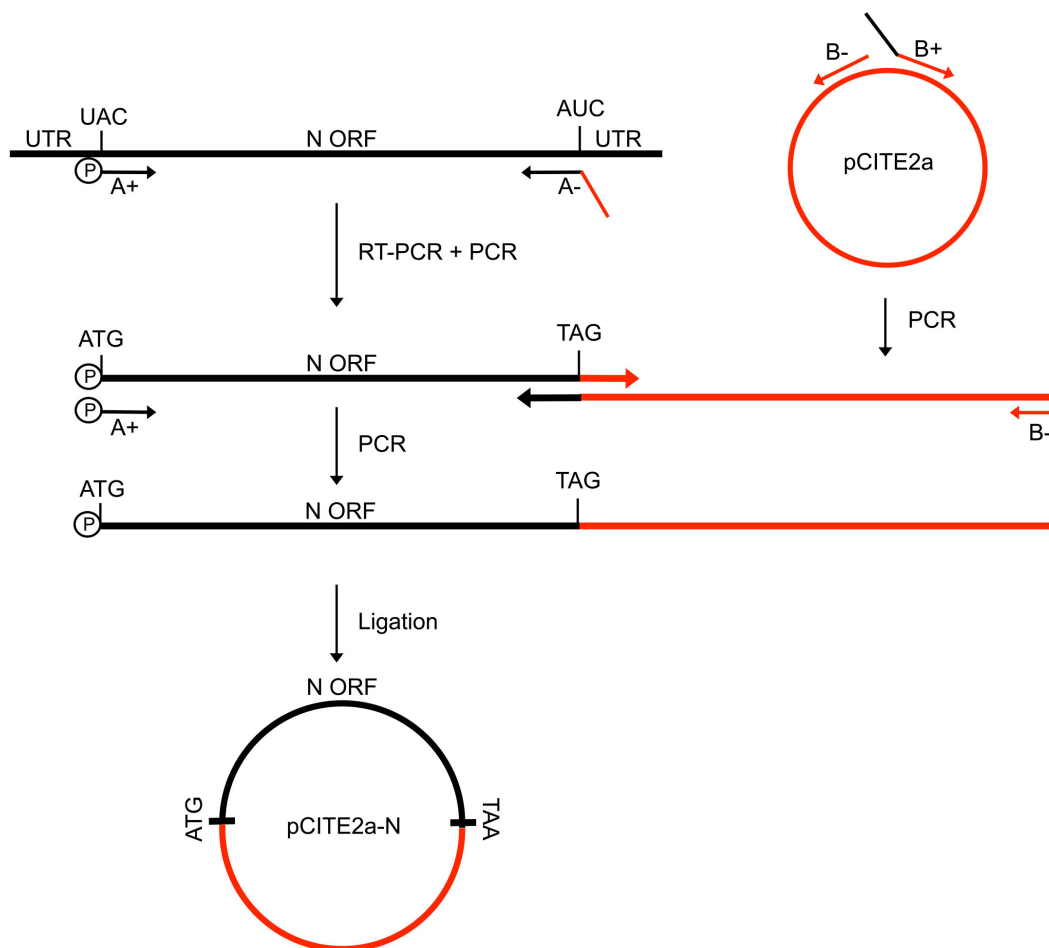


Abb. 8. Klonierung mittels Fusions-PCR am Beispiel des N-Gens. Der N-ORF wurde mit dem phosphorylierten Vorwärtsprimer A+ und dem Rückwärtsprimer A- in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Letzterer Primer besitzt einen Überhang, welcher revers komplementär zu einem Sequenzabschnitt auf dem Vektor pCITE2a ist. Der Vektor wird mit den Vorwärts- und Rückwärtsprimern B+ und B- amplifiziert. B+ trägt einen Überhang, der revers komplementär zum 3' Ende des N-ORFs ist. In einer anschließenden Fusions-PCR wurden beide Fragmente verknüpft und daraufhin zum geschlossenen Plasmidring ligiert.

Die ORFs des L- bzw. M-Segments waren zu groß, um sie in einem Schritt in cDNA umzuschreiben. Daher wurde das L-Gen in vier Fragmenten und das Glykoprotein-Gen in zwei Fragmenten getrennt amplifiziert und kloniert. Über Restriktionsschnittstellen wurden die einzelnen Abschnitte anschließend zusammengefügt. Das NSs-Gen, welches durch einen alternativen ORF im S-Segment kodiert wird, wurde mit Hilfe des N-Expressionsplasmids hergestellt. Aus letzterem Konstrukt wurden die Elemente, die nur das N-Protein kodieren und den NSs-ORF flankieren, mittels PCR deletiert.

Die Sequenzen der klonierten Gene entsprachen weitestgehend den in der Genbank hinterlegten Sequenzen (GenBank-Nr. von ANDV-L: AF291704, ANDV-GPC: AF291703,

ANDV-N, AF291702, HTNV-L: X55901, PUUV-L: Z66548, SNV-L: AF425256). Es fanden sich jedoch einige abweichende Nukleotide in den Virusstämmen des BNI, welche durch Sequenzierung bestätigt wurden: ANDV-L: G541A (Aminosäureaustausch V181I), ANDV-GPC: C2580T (stille Mutation) und G3405T (Aminosäureaustausch K1135N), HTNV-L: C47A (Aminosäureaustausch P16H), SNV-L: C124A (Aminosäureaustausch L42M) und G6343A (Aminosäureaustausch V2115I). Die Vektoren zur Expression von ANDV-L, GPC, N und NSs wurden pCITE-L-HA, pCITE-GPC-HA, pCITE-N und pCITE-NSs-HA benannt (Abb. 9).

Als Ausgangsbasis zur Herstellung der Minigenome diente ein bereits bestehendes Konstrukt aus einem Mopeia-Virus-Replikonsystem (pX12dT-MOPV-MG) (Kerber et al., 2011). Mittels PCR wurden die Mopeia-Virus-spezifischen Elemente gegen die UTRs des ANDV S-Segments bzw. M-Segments ausgetauscht. Für die Expression der artifiziellen Genomsegmente besitzen die so generierten S- und M-Minigenom-Vektoren (pX12dT-S-MG und pX12dT-M-MG) eine Genkassette aus den folgenden Einheiten: T7-Polymerase-Promotor, 3' UTR, Renilla-Luciferase-Gen in *antisense*-Orientierung, 5' UTR, Hepatitis Delta Ribozym (HDR), T7 Terminator (Abb. 10). Das HDR spaltet sich selbst direkt hinter der 5' UTR ab, sodass ein 5' Terminus entsteht, welcher dem authentischen Genomende entspricht.

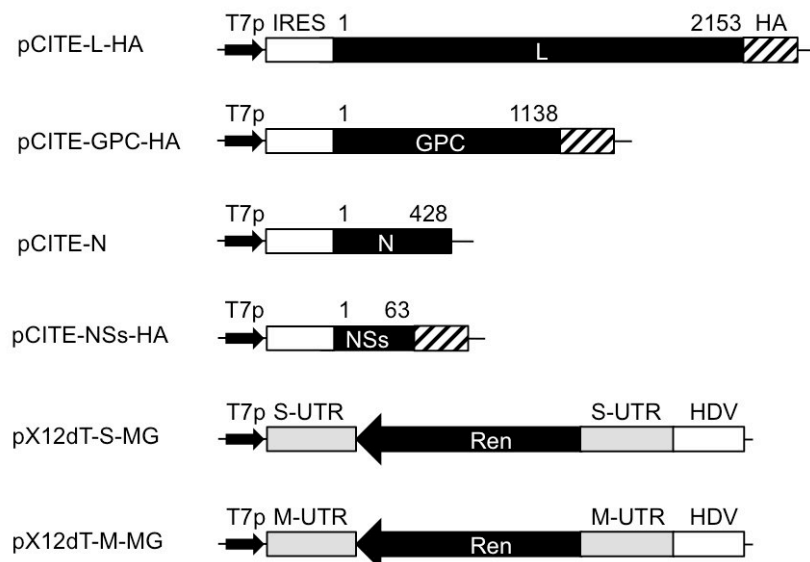


Abb. 9. Schematische Darstellung der Plasmide für die Expression des ANDV-Proteine L, GPC und N sowie der zwei Minigenome. T7p: T7-Promotor, IRES: Interne Ribosomenbindestelle, HA: Hämagglutinin-Epitop, S-UTR: untranslatierte Region des S-Segments, M-UTR: untranslatierte Region des M-Segments.

3.2 Expression von L-Protein, Nukleoprotein, Glykoprotein und Nichtstrukturprotein

Die Expression der verschiedenen ANDV-Proteine L, N, GPC und NSs erfolgte durch Transfektion von BSR-T/7-Zellen mit den Plasmiden pCITE-L-HA, pCITE-N, pCITE-GPC-HA und pCITE-NSs-HA. Vor der Transfektion wurden die Zellen zusätzlich mit MVA-T7 infiziert, um eine hohe T7-Polymerase-Synthese und folglich eine optimale Expression der Zielproteine zu erhalten. Die Zellen wurden 20 h nach der Transfektion geerntet. Das Zelllysate wurde im Polyacrylamidgel aufgetrennt und die exprimierten Proteine in einem anschließenden Western Blot analysiert. Für die Proteindetektion wurden Antikörper benutzt, die mit dem fusionierten HA-Epitop reagierten. Eine Ausnahme stellt das N-Protein dar, welches mit einem polyklonalen Anti-N-Kaninchen-Serum detektiert werden konnte.

Mit dem Anti-N-Serum wurde auf einer Höhe von ca. 50 kDa eine einzige Bande detektiert (Abb. 10A). Das Nukleoprotein besitzt 428 Aminosäuren und rechnerisch ein Molekulargewicht von 48 kDa. Es ist somit davon auszugehen, dass das korrekte Protein exprimiert wurde. Die rechnerische Größe des HA-markierten NSs beträgt nur 9 kDa. Auf dieser Laufhöhe konnte es auch im Immunoblot detektiert werden (Abb. 10B).

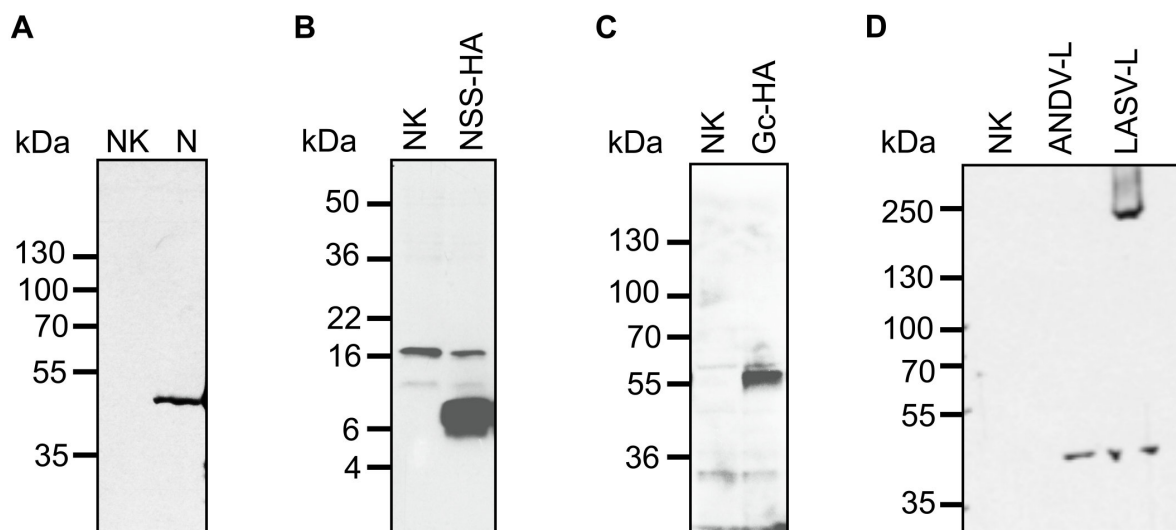


Abb. 10. Expression von ANDV-Proteinen in eukaryotischen Zellen. BSR-T7/5-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und mit Plasmiden pCITE-N (A), pCITE-NSs-HA (B), pCITE-GPC-HA (C) bzw. pCITE-L-HA und pCITE-LASV-L-HA (D) transfiziert. Bis auf das Nukleoprotein sind alle Proteine C-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert. Die Detektion der Proteine erfolgte im Immunoblot mittels polyklonalem Anti-N-Serum (A) oder Anti-HA-Antikörper (B-D). Als Negativkontrolle (NK) wurden Zellen mit MVA-T7 infiziert und nur mit dem pCITE2a-Vektor transfiziert.

Der HA-getaggte Glykoproteinvorläufer GPC-HA besitzt theoretisch ein Molekulargewicht von 127 kDa. Hierbei sind allerdings nicht die Glykosylierungen mit einberechnet, welche die Molekülmasse erhöhen. Das Vorläuferprotein wird kotranslational in die Untereinheiten Gn und Gc gespalten. Theoretisch sollte Gc ein Molekulargewicht von 55 kDa aufweisen. Im Western Blot wird nur ein Protein mit einer Molekülmasse von ca. 60 kDa mit dem Anti-HA-Antikörper detektiert (Abb. 10C). Dabei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um die C-terminale Untereinheit Gc. Weil das Protein im Western Blot etwas größer erscheint als errechnet, lässt sich vermuten, dass es glykosyliert wurde. Die Tatsache, dass der unprozessierte Vorläufer GPC nicht detektierbar war lässt zusätzlich darauf schließen, dass GPC vollständig in das ER transloziert und gespalten wurde.

Im Vergleich zu den anderen Proteinen konnte keine Expression des L-Proteins im Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 10D). Es wurde erwartet, dass das Protein ein Molekulargewicht von ca. 250 kDa besitzt. Als Kontrolle wurde das Lassa-Virus-L-Protein exprimiert (LASV-L-HA), welches einwandfrei detektiert wurde. Darüber hinaus wurde versucht, eine FLAG-markierte Variante des ANDV-L-Proteins zu exprimieren. Dieses zeigte aber den selben Phänotyp wie ANDV-L-HA und wurde nicht exprimiert (ohne Abbildung). Diese Beobachtung ist technisch nicht erklärbar, da das T7-Expressionssystem in der Regel eine hohe Proteinsynthese gewährleistet. Die Ursache für die geringe Expression des L-Proteins musste daher genauer untersucht werden.

3.3 Expression verkürzter Fragmente des L-Proteins

Methodische Mängel konnten als Ursache für die schwache L-Protein-Expression ausgeschlossen werden. Daher wurde vermutet, dass das Protein ineffizient translatiert wird oder instabil sein könnte. Im folgenden Experiment wurde versucht, verkürzte Fragmente von ANDV-L zu exprimieren, um Elemente zu identifizieren, welche die Synthese oder die Stabilität des Proteins beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden mittels PCR unterschiedliche Abschnitte des L-ORF's amplifiziert bei denen entweder Teile des 5'-Endes oder des 3'-Endes deletiert wurden. Die Fragmente wurden in den Expressionsvektor pCITE2a kloniert und 3'-terminal an eine kodierende Sequenz für ein HA-Epitop fusioniert. Bei Konstrukten denen das 5'-Ende entfernt wurde, musste zusätzlich ein Startcodon inseriert werden, um die Translation zu initiieren. Eine schematische Übersicht dieser Konstrukte findet sich in

Abb. 11A. BSR-T7/5-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und direkt im Anschluss mit den angegebenen Deletionsmutanten sowie mit dem Wildtyp-Plasmid transfiziert.

Wie in Abb. 11B ersichtlich wird, hatte die Deletion des C-Terminus keinen positiven Einfluss auf die Expression des L-Proteins. Keines der drei verkürzten Konstrukte (Δ C-535, Δ C-1102, Δ C-1568) konnte im Immunoblot nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wirkte sich eine Deletion am N-Terminus signifikant auf die Proteinsynthese aus (Abb. 11C). Die Deletion von 12 Aminosäuren (Δ N-12) reicht aus, um die Expression positiv zu beeinflussen. Die stärksten Signale konnten im Immunoblot ab einer Verkürzung von 45 Aminosäuren festgestellt werden (Δ N-45). Daher lässt sich vermuten, dass Sequenzen innerhalb der N-terminalen 45 Aminosäuren bzw. 135 Basenpaare für die schwache Expression des L-Proteins verantwortlich sind.

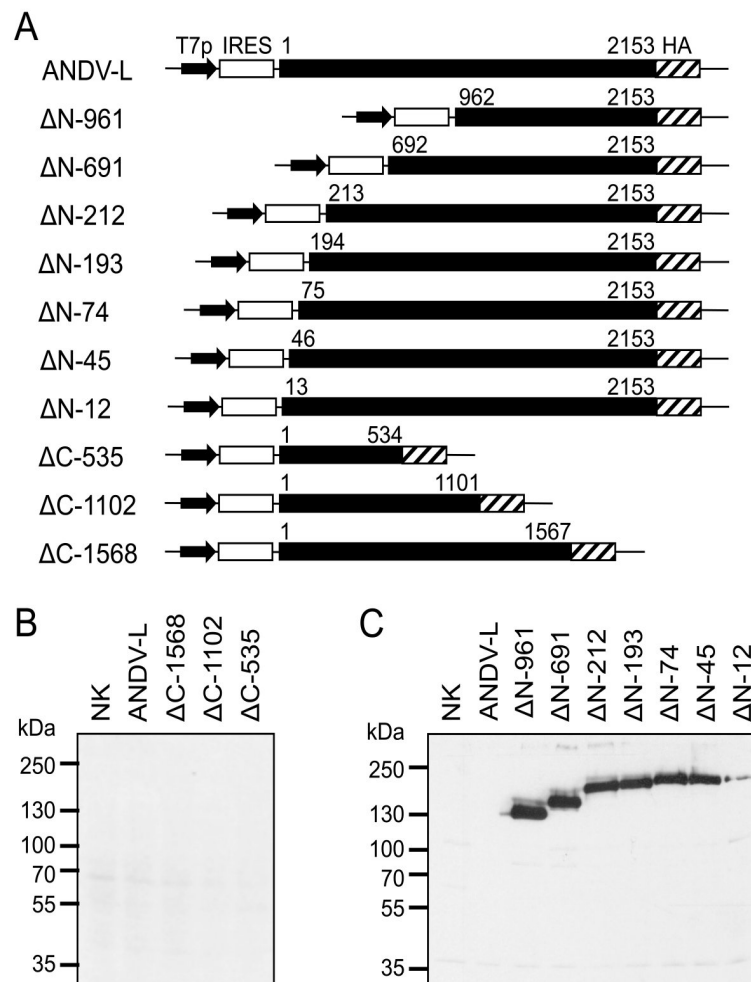


Abb. 11. Expression trunkierter L-Konstrukte. (A) Schematische Übersicht des Wildtyp-Expressionsplasmids (ANDV-L) und von trunkierten L-Mutanten. BSR-T7/5-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Die Detektion der C-terminal trunkierten (B) und N-terminal trunkierten Proteine (C) erfolgte im Western Blot mittels polyklonalem Anti-HA-Antikörper.

3.4 Untersuchung der 5'-terminalen Sequenz des L-Gens

Im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass N-terminale Sequenzen im L-Gen mit der Expression interferieren. Daher wurde untersucht, ob die 5'-terminalen 135 Nukleotide die Translationseffizienz der L-mRNA beeinflussen können. Dieser Abschnitt wurde stark mutiert, ohne die Aminosäuresequenz zu ändern. Es wurden zwei verschiedene Plasmide (Mut-1 und Mut-2) auf Basis des Konstrukts pCITE-L- Δ C-535 generiert. pCITE-L- Δ C-535 hat den gleichen Expressionsphänotyp wie pCITE-L und wird im Folgenden als ANDV-L_N bezeichnet. Die Synthese der Codon-veränderten 135 bp-DNA-Fragmente erfolgte durch die Firma Geneart. Diese wurden mittels Fusions-PCR in den ANDV-L_N-ORF integriert. Die 5'-terminale Sequenz in Konstrukt Mut-1 wurde optimiert für die Expression in humanen Zellen und stimmt zu 71% mit der Sequenz von ANDV-L_N überein. Bei Konstrukt Mut-2 wurde jedes Codon zwischen Position 1 und 135 in mindestens einer Base verändert und es bestehen nur noch 65% Homologie zu ANDV-L_N (Abb. 12A). Durch die hohe Zahl an Basen-Austauschen sollten potentielle Sequenzelemente, welche mit der Translation interferieren, inaktiviert werden. Die Expression der modifizierten Konstrukte führte jedoch nicht zu einer effizienteren Proteinsynthese. Mut-1 und Mut-2 zeigten den gleichen Phänotyp wie ANDV-L_N (Abb. 12B). Somit ist nicht davon auszugehen, dass RNA-Elemente die Translation des Proteins negativ beeinflussen.

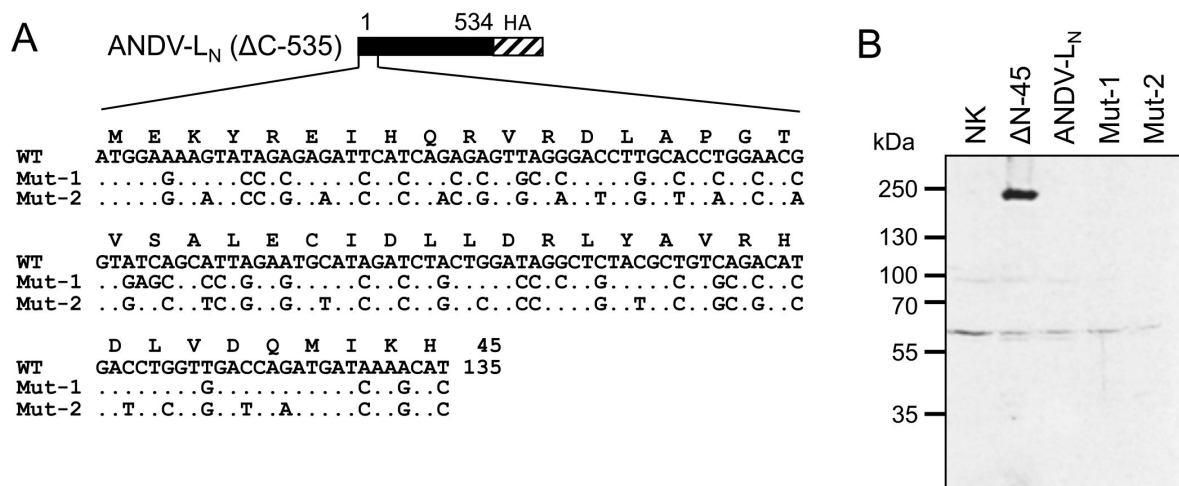


Abb. 12. Codon-Modifizierung im 5'-Ende des L-Gens. (A) Schematische Darstellung des C-terminal verkürzten Konstrukts Δ C-535 sowie der Varianten Mut-1 und Mut-2. Im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz des L-Gens wurden die Codons von Mut-1 und Mut-2 zwischen Position 1 und 135 stark verändert. (B) BSR-T7/5-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Die Detektion erfolgte im Western Blot mittels polyklonalem Anti-HA-Antikörper.

3.5 Grobe Kartierung von Aminosäuren im N-Terminus des L-Proteins, welche die Expression beeinflussen

Um Aminosäurereste zwischen Position 1 und 45 zu identifizieren, welche die L-Expression evtl. regulieren, wurde dieser Sequenzabschnitt einer Mutagenese unterzogen. Zuerst wurden ganze Sequenzblöcke mit einer Länge von 3 bis 5 Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht. Wie bereits zuvor wurde nicht pCITE-ANDV-L, sondern das trunkierte Konstrukt pCITE-ANDV-L_N mutiert. Insgesamt wurden 9 verschiedene Mutanten hergestellt, die den Bereich zwischen Position 2 und 46 abdeckten (Abb. 13A). Von diesen 9 Mutanten wurden nach

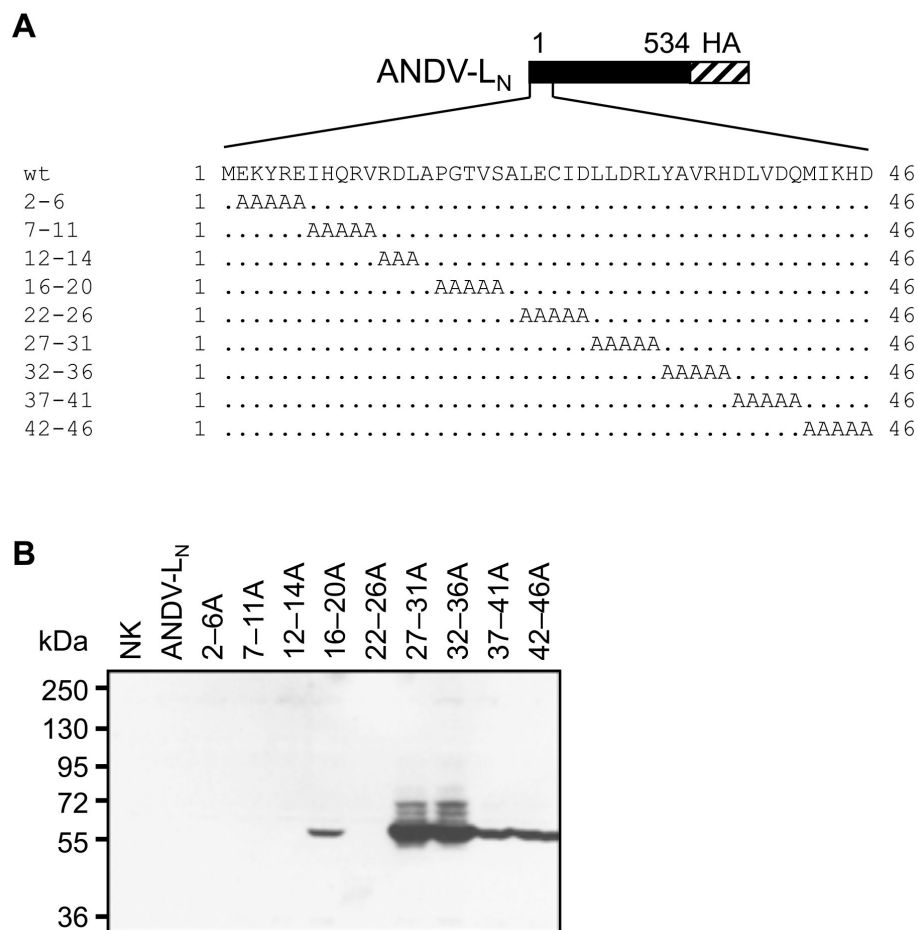


Abb. 13. Expression von trunkierten L-Konstrukten mit 3- bis 5-fachen Alanin-Substitutionen. (A) Schematische Darstellung von Mutanten, die auf Basis des trunkierten Konstrukts pCITE-ANDV-L_N generiert wurden und 3- bis 5-fache Alanin-Substitutionen zwischen Position 2 und 46 tragen. (B) MVA-T7-infizierte BSR-T7/5-Zellen wurden mit den Mutanten bzw. mit dem Wildtyp-Plasmid pCITE-ANDV-L_N transfiziert. Die Expressionskontrolle erfolgte im Western Blot mit Hilfe des Anti-HA-Antikörpers.

Transfektion in BSR-T7/5-Zellen, 5 Mutanten stark exprimiert und konnten im Western Blot nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um die Konstrukte 16-20, 27-31, 32-36, 37-41A und 42-46 (Abb. 13B). Die Expression der Mutanten 2-6, 7-11, 12-14 und 22-26 hingegen dem Wildtyp und lag unterhalb der Detektionsgrenze. Das bedeutet, dass Aminosäurereste an den Positionen 16 bis 20 sowie 27 bis 46 mit der Expression des L-Proteins interferieren. Weitere Untersuchungen waren allerdings nötig, um Aufschluss über die einzelnen beteiligten Aminosäuren zu bringen.

3.6 Feinkartierung von Aminosäuren im N-Terminus des L-Proteins, welche die Expression beeinflussen

Für eine weitere Eingrenzung der Aminosäure-Positionen, welche die L-Protein-Synthese beeinträchtigen, wurden zwischen Position 16 und 20 sowie 27 und 46 insgesamt 24 verschiedene Alanin-Substitutionen im Konstrukt pCITE-ANDV-L_N eingefügt (Abb. 14A). Die Expression dieser Mutanten in MVA-T7-infizierten BSR-T7/5-Zellen führte zur Identifizierung von 7 Aminosäuren, welche die Expression des L-Proteins reduzieren: Y32, R35, H36, D37, D40, I43 und K44 (Abb. 14B). Mutationen an diesen Positionen führten zu einer stärkeren Expression. Die Mutante D37A wurde allerdings nicht so stark exprimiert, wie R35A, H36A, D40A, I43A oder K44A, deren Expressionsniveau ungefähr äquivalent erscheint. Obwohl die Konstrukte 16-20 und 27-31 im vorangegangenen Versuch exprimiert wurden, lässt sich die Proteinsynthese nicht durch Substitution einer einzelnen Aminosäuren in den Positionen 16 bis 20 und 27 bis 31 verstärken. Evtl. ist in diesen Abschnitten der Austausch mehrerer Reste notwendig.

3.7 Expression von verkürzten SNV- PUUV- und HTNV-L-Proteinen

Ein Aminosäurevergleich zwischen bekannten L-Protein-Sequenzen weiterer Hantavirus-Spezies verdeutlicht, dass die Aminosäuren Y32, R35, H36, D37, D40, I43 und K44, welche die Expression des ANDV-L-Proteins beeinflussen hochkonserviert sind (ABB. 26). Im Folgenden wurde untersucht, ob dieser Effekt auch bei L-Proteinen anderer Hantaviren zu beobachten ist. Zu diesem Zweck wurden die kodierenden Sequenzen für die Aminosäuren 1 bis 534 des SNV, PUUV und HTNV L-Gens kloniert und C-terminal mit einem HA-Tag

fusioniert. Die Genabschnitte sind homolog zur Sequenz von ANDV-L_N. Als Kontrolle wurden Mutanten produziert, die an Position 44 eine Alanin-Substitution tragen. Die Expression dieser Gene in MVA-T7-infizierten BSR-T7/5-Zellen war vergleichbar mit ANDV-L_N. Weder SNV-, PUUV- noch das HTNV-L_N konnten in detektierbaren Konzentrationen synthetisiert werden (Abb. 15, Spur 2, 4, 6, 8). Im Gegensatz dazu verstärkte - wie bei ANDV-L_N - der Austausch von Lysin zu Alanin an Position 44 die Proteinproduktion

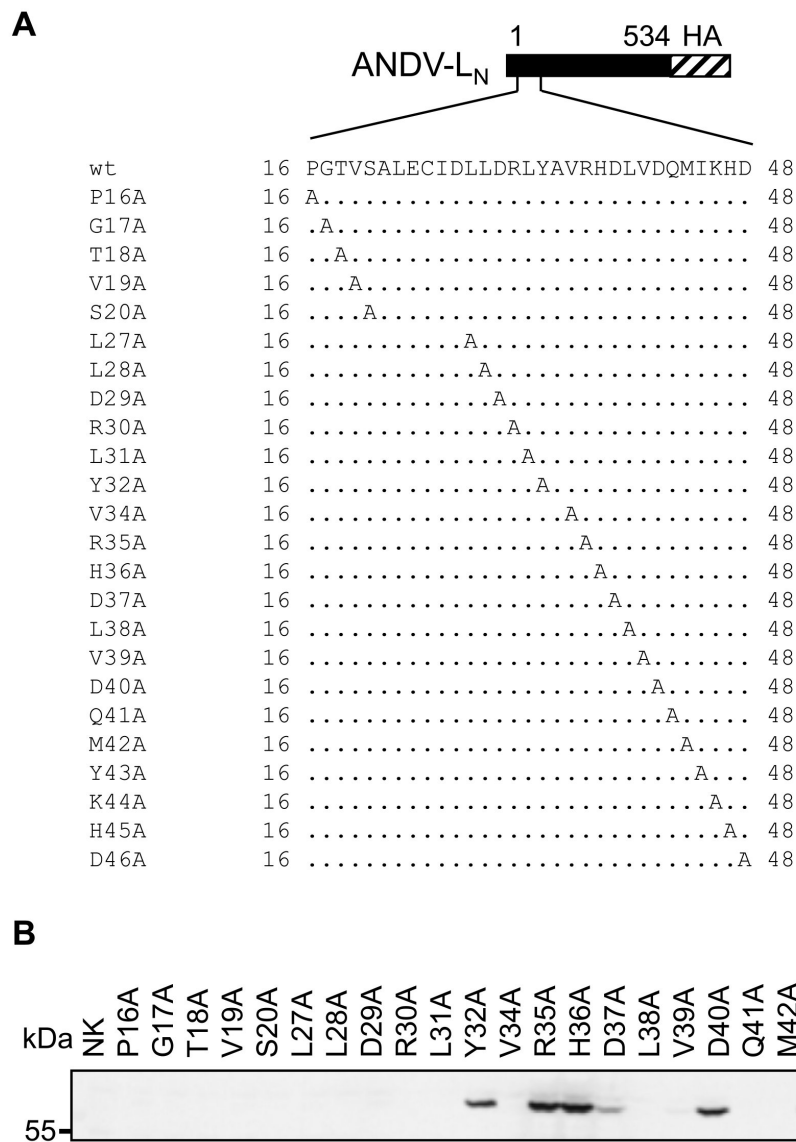


Abb. 14. Kartierung von Aminosäuren im N-Terminus des L-Proteins, welche die Proteinexpression limitieren. (A) Zwischen Position 16 und 48 wurden verschiedene Punktmutationen im HA-markierten Konstrukt pCITE-ANDV-L_N generiert. (B) MVA-T7-infizierte BSR-T7/5-Zellen wurden mit den Mutanten transfiziert. Die Detektion der exprimierten Proteine erfolgte mittels Anti-HA-Antikörper im Western Blot.

signifikant (Abb. 15, Spur 3, 5, 7, 9). Es zeigte sich also, dass die L-Expression nicht nur bei ANDV einer starken Limitierung unterliegt, sondern auch bei anderen Hantaviren. Dies gilt nicht nur für Neuwelt-Hantaviren (SNV, ANDV) sondern auch für Spezies aus Europa (PUUV) und Asien (HTNV). Ferner konnte bei allen getesteten Spezies die Proteinexpression durch Mutation von K44 gesteigert werden.

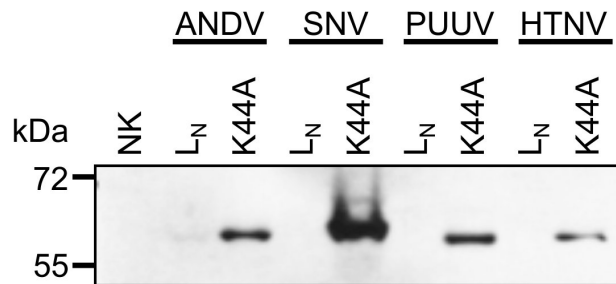


Abb. 15. Expression von C-terminal verkürzten SNV, PUUV und HTNV L-Plasmiden mit und ohne Mutation an Position 44. In Analogie zu dem Konstrukt pCITE-ANDV-L_N wurden die kodierenden Sequenzen für die Aminosäuren 1 bis 534 des SNV, PUUV und HTNV L-Gens in den Expressionsvektor pCITE2a kloniert und C-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert. Zusätzlich wurden Mutanten generiert, bei denen die Aminosäure Lysin an Position 44 gegen Alanin ausgetauscht wurde (K44). MVA-T7-infizierte BSR-T7/5-Zellen wurden mit den genannten Konstrukten transfiziert. Die Detektion der exprimierten Proteine erfolgte mittels Anti-HA-Antikörper im Immunoblot.

3.8 Untersuchung eines möglichen beschleunigten proteasomalen Abbaus des L-Proteins

Die gewonnenen Daten könnten darauf hindeuten, dass das ANDV-L-Protein eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt und schnell degradiert wird. Unter den Aminosäuren, welche die Expression des L-Proteins limitieren, fällt das Lysin an Position 44 (K44) ins Auge. Lysine spielen bei der Regulierung des Proteasom-abhängigen Proteinabbaus eine wichtige Rolle. Proteine, die diesem Degradationsweg zugeführt werden sollen, werden i.d.R. durch Ubiquitinierung an einem Lysin-Rest markiert, um sie an die Proteasommachinerie weiterzuleiten (Lecker et al., 2006). Es erscheint durchaus möglich, dass das Wildtyp-L-Protein einer starken Degradation unterliegt, welche durch ein Motiv am N-Terminus vermittelt wird, bei dem K44 eine zentrale Funktion einnimmt. Auch das hantavirale Glykoprotein wurde zuvor schon als ein Substrat für den proteasomalen Abbau identifiziert (Geimonen et al., 2003). In einem initialen Versuch wurde das basische Lysin in ANDV-L_N

durch Aminosäuren mit anderen chemischen Eigenschaften ausgetauscht. Neben dem zuvor generierten Alanin (ungeladen), wurden Mutanten erstellt, die an Position 44 ein Phenylalanin (aromatisch), Prolin (hydrophob), Serin (nukleophil), Glutamin (Amid), Glutamat (sauer) oder Arginin (basisch) besitzen. Alle Mutanten wurden in MVA-T7-infizierten BSR-T7/5-Zellen transfiziert. Die Analyse im Immunoblot zeigt deutlich, dass im Gegensatz zum Wildtyp alle Mutanten exprimiert wurden (Abb. 16A). Nicht einmal das nah verwandte Arginin konnte den Lysin-Rest substituieren und den Wildtyp-Phänotyp erhalten. Von den verschiedenen Aminosäuren, die an Position 44 untersucht wurden, interferierte nur Lysin mit der Expression des L-Proteins. Das könnte bedeuten, dass es den proteasomalen Abbau des L-Proteins fördert. Für eine nähere Untersuchung dieser Hypothese wurde ANDV-L_N unter Zugabe eines Proteasominhibitors exprimiert, sowie die Halbwertszeit des Proteins ermittelt. ANDV-L_N wurde als Wildtyp und als K44A-Mutante in MVA-T7-infizierte BSR-T7-Zellen transfiziert und anschließend der Proteasominhibitor MG-132 (Carbobenzoxy-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal) in den Konzentrationen 0, 1, 10 und 100 µM zugefügt. Die Expression des Wildtyps blieb in allen Ansätzen allerdings unbeeinflusst auf einem niedrigen Niveau (Abb. 16B). Um sicherzustellen, dass eine Proteasominhibierung erfolgte, wurde die Proteasomaktivität im Zelllysate untersucht (durchgeführt von U. Kuckelkorn, Charité Berlin). Dem Zelllysate wurde das synthetische Peptid LLVY-AMC (Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-Amino-4-Methylcumarin) zugesetzt. Durch proteasomalen Verdau wurde die fluorogene AMC-Gruppe freigesetzt, dessen Konzentration fluorometrisch gemessen wurde. Bei einer Konzentration von 100 µM MG-132 war die Proteasomaktivität nachweislich komplett inhibiert, ohne sich positiv auf die Expression von ANDV-L_N auszuwirken (Abb. 16C). Da die Mutante K44A in Anwesenheit des Inhibitors unverändert exprimiert wurde, ist nicht davon auszugehen, dass MG-132 die Viabilität der Zellen beeinträchtigt hat.

Die Bestimmung der Halbwertszeit von ANDV-L_N im Vergleich zur K44A-Mutante sollte weiteren Aufschluss über die Proteininstabilität geben. Für diesen Test wurden beide Konstrukte wiederum in MVA-T7-infizierte BSR-T7-Zellen transfiziert. Die Proteine wurden in einem *Pulse-Chase*-Experiment während ihrer Synthese mit [³⁵S]-Methionin markiert. Das radioaktive Methionin wurde nach 1 h durch kaltes Methionin ersetzt und Zelllysate nach 0, 1 bzw. 2 h geerntet, um die Abbauraten der markierten Proteine zu ermitteln. Da [³⁵S]-Methionin in alle neusynthetisierten Proteine in der Zelle eingebaut wurde, mussten ANDV-L_N und die K44A-Mutante mit Anti-HA-Antikörpern immunpräzipitiert werden, um sie gezielt nachzuweisen. Im Autoradiogramm in Abb. 16D ist erstmalig die Expression des Wildtyp-Konstrukts ANDV-L_N zu erkennen. Im Vergleich mit der K44A-Mutante ist die präzipitierte

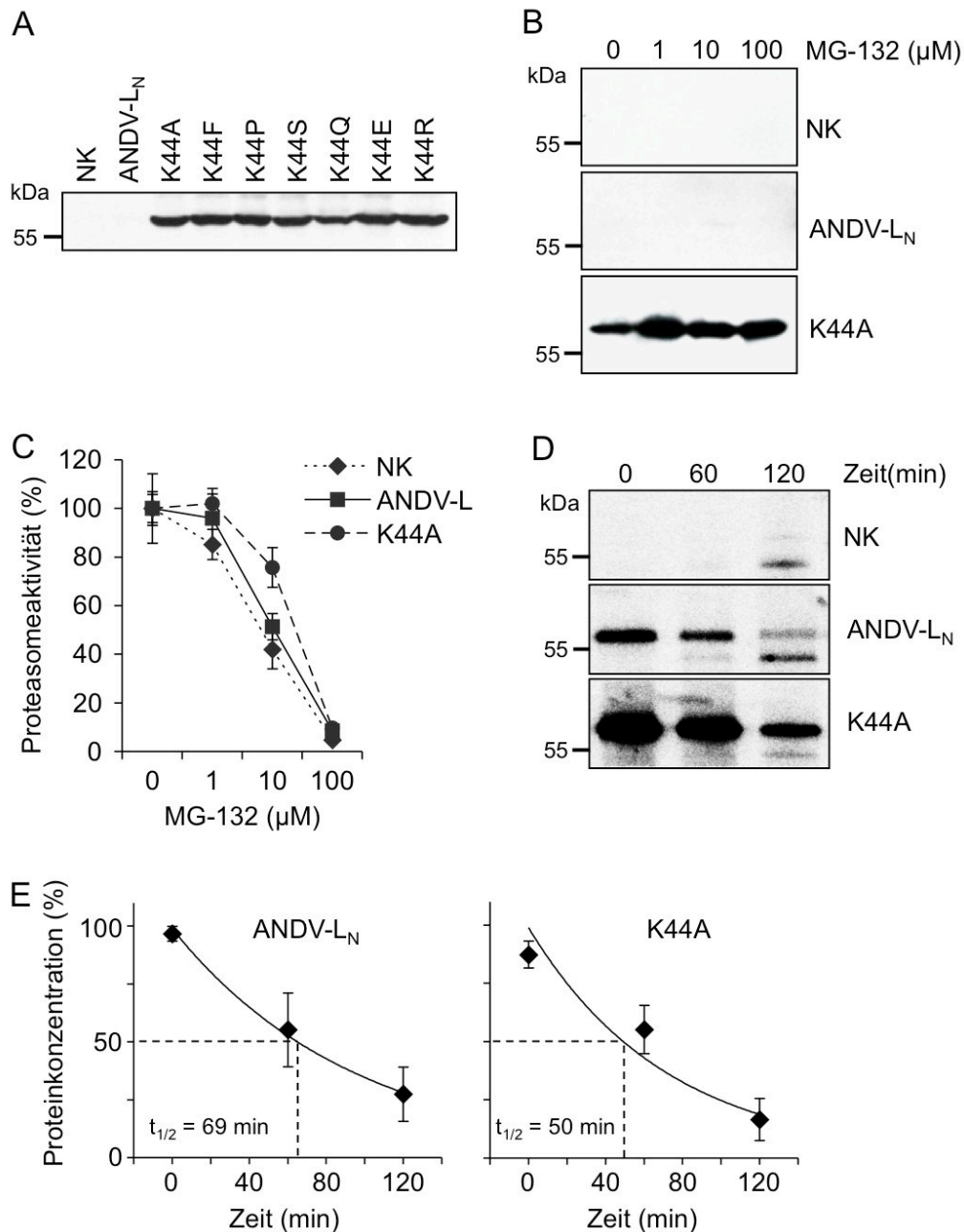


Abb. 16. Untersuchung der Stabilität des L-Proteins. (A) Lysin an Position 44 des verkürzten Konstrukts ANDV-L_N wurde gegen verschiedene Aminosäuren mit anderen chemischen Eigenschaften ausgetauscht. Die Mutanten wurden in MVT-7-infizierten BHK/T7-Zellen nach Transfektion exprimiert. Die Proteindetektion erfolgte mittels Anti-HA-Antikörper im Western Blot. (B) MVA-T7 infizierte und mit pCITE-ANDV-L_N- bzw. K44A-transfizierte BSR-T7/5-Zellen wurden mit 1, 10 und 100 μM MG-132 behandelt, um die Proteasomaktivität zu inhibieren. (D) Die Proteasominhibition im Zelllysate wurde durch Zugabe und Verdau des fluorogenen Peptids LLVY-AMC kontrolliert. (E) Außerdem wurden ANDV-L_N und K44A-transfizierte BSR-T7/5-Zellen metabolisch mit [³⁵S]-Methionin markiert. Zelllysate wurden 0 h, 1 h und 2 h nach der Markierung geerntet. Die Zielproteine wurden mit Anti-HA-Antikörpern und Protein A-Sepharose immunpräzipitiert und mittels PAGE aufgetrennt. Für die Proteindetektion kam ein Phosphoimager zum Einsatz. (E) Die Intensität der Banden und deren prozentuale Abnahme wurden grafisch dargestellt und daraus die Proteinhalbzeit abgeleitet.

Proteinmenge jedoch viel geringer. Beide Proteine werden schon nach kurzer Zeit abgebaut. Die Intensität der Proteinbanden wurde in einem Diagramm grafisch dargestellt (Abb. 16E). Die daraus berechnete Halbwertszeit $t_{1/2}$ war für ANDV-L_N 69 min. Für die K44A-Mutante wurde mit nur 50 min eine sogar noch geringere Halbwertszeit gemessen. Somit scheinen beide Proteine nicht besonders stabil zu sein. Entscheidend ist jedoch die Beobachtung, dass sich die Halbwertszeit durch Einfügen der Mutation an Position 44 nicht erhöht. Sowohl letzterer Versuch als auch die Proteasominhibition widerlegen die Hypothese, dass das Wildtyp-L-Protein verstärkt proteasomal verdaut wird. Die Zugabe eines Proteasominhibitors zeigte keinen verstärkenden Effekt auf die Proteinkonzentration und auch die Proteinstabilität unterscheidet sich nicht von der Vergleichsmutante. Die ähnlichen Halbwertszeiten von ANDV-L_N und K44A sprechen außerdem dagegen, dass der Wildtyp ggf. durch andere proteolytische Abbauege (z.B. lysosomal) verstärkt degradiert wird.

3.9 Gezielte Mutagenese katalytischer Aminosäuren in der vermuteten Endonukleasedomäne

Die bisherigen Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die schwache L-Protein-Expression weder auf einen verstärkten Proteinabbau noch auf eine Hemmung der Translation zurückzuführen ist. Die Ursache könnte folglich auf posttranskriptioneller Ebene zu finden sein. Allerdings ist es schwer zu erklären, dass die Proteinexpression durch einzelne Aminosäuresubstitutionen verstärkt werden kann (Abb. 14), nicht aber durch eine Vielzahl an stillen Mutationen (Abb. 12). Eine Hypothese wäre, dass das L-Protein sowohl das Ziel der Expressionsinhibition als auch selbst der Auslöser dieses Vorgangs ist. Aus diesem Grund wurde getestet, ob das verkürzte Wildtyp-Fragment ANDV-L_N die Expression der K44A-Mutante beeinflussen kann. ANDV-L_N-K44A wurde mit verschiedenen Mengen ANDV-L_N kotransfiziert (Abb. 17A). Interessanterweise wurde ein deutlicher Effekt auf die Expression von K44A im Westernblot beobachtet. Mit ansteigender Menge an kotransfiziertem ANDV-L_N-Plasmid verringerte sich die Synthese von K44A. Selbst in einem überaus geringen Verhältnis von 1:100 unterdrückte ANDV-L_N die Expression von K44A. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das N-terminale Wildtyp-L-Fragment nicht nur als Ziel sondern auch als Auslöser für die geringe Proteinexpression in Betracht zu ziehen ist.

Vor Kurzem wurden die Strukturen der N-terminalen Domänen des LCMV (*Arenaviridae*) bzw. LACV (*Bunyaviridae*) L-Proteins gelöst. Es wurde beschrieben, dass diese Domänen

eine funktionelle Endonuklease aus der PD-(D/E)xK-Superfamilie beherbergen (Morin et al., 2010; Reguera et al., 2010). Sequenzvergleiche legen nahe, dass diese Endonuklease auch bei Hantaviren zu finden ist (Abb 26). Das Motiv PD-(D/E)xK entspräche bei ANDV den Resten P96, D97, E110 und K124. Diese Reste wurden in einem nächsten Schritt durch Alanin substituiert, um eine Auswirkung der Endonuklease-Aktivität auf die Proteinexpression zu untersuchen. Ferner wurde eine Doppelmutante generiert, bei welcher sowohl P96 als auch D97A gegen Alanin ersetzt wurden. Die Expression der Mutanten erfolgte in MVA-T7-infizierten BSR-T7/5-Zellen. Als Kontrolle wurden ebenfalls der Wildtyp (ANDV-L_N) und die K44A-Mutante transfiziert. Interessanterweise hatte die Mutation des katalytischen Motivs der vermuteten Endonuklease einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinsynthese. Alle Mutanten konnten exprimiert werden und waren im Immunoblot nachzuweisen (Abb. 17B). Die reduzierte L-Protein-Expression könnte von der Funktionalität der Endonuklease abhängen und es ist zu vermuten, dass die Endonuklease die mRNA des L-Gens degradiert. Die Konsequenz hieraus wäre, dass nicht ausreichend Transkripte zur Verfügung stehen, um eine effektive Proteinsynthese zu gewährleisten.

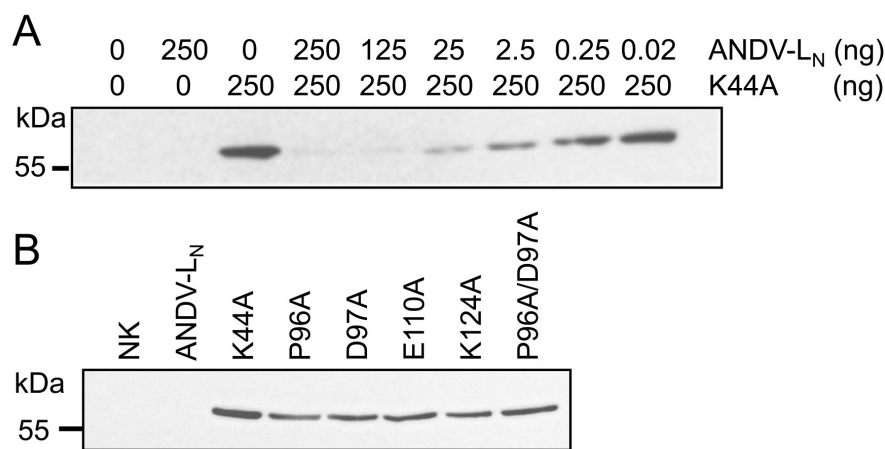


Abb. 17. Koexpression von L-Konstrukten und Mutation des vorhergesagten katalytischen Zentrums der Endonuklease. (A) pCITE-ANDV-L_N und das pCITE-ANDV-L_N-K44A wurden in MVA-T7-infizierten BSR-T7/5-Zellen koexprimiert. Für die Transfektion wurden unterschiedliche Verhältnisse an Plasmid-DNA eingesetzt, welche über dem Blot angegeben sind. (B) Die Aminosäuren P96, D97, E110, K124, welche vermutlich das katalytische Zentrum der Endonuklease bilden wurden in pCITE-ANDV-L_N gegen Alanin substituiert, um gezielt deren Aktivität zu ausschalten. Die Mutanten K44A, P96A, D97A, E110A, K124A und die Doppelmutante PD96/97A wurden in MVA-T7-infizierten BSR-T7/5-Zellen exprimiert und im Immunoblot mittels Anti-HA-Antikörper detektiert.

3.10 Mutagenese konservierter Aminosäuren im Endonuklease-Motiv

Es wurde angenommen, dass die L-Expression verstärkt wird, wenn Aminosäuren mutiert werden, die wichtig für die katalytische Aktivität und strukturelle Integrität der Endonuklease sind. Aus dem Vergleich mit der LACV- bzw. LCMV-Endonuklease lässt sich schließen, dass die Endonuklease der Hantaviren maximal 220 Aminosäuren im N-Terminus umfasst. Aus diesem Grund wurde dieser Bereich für die Mutagenese in Betracht gezogen. In einem Alignment von Hantavirus L-Protein-Sequenzen wurden zuerst alle konservierten Aminosäuren mit negativ (D, E) und positiv (R, H, K) geladenen Seitenketten sowie Amid-Seitenketten (N, Q) identifiziert. Diese sind häufig für Substratbindungen verantwortlich oder für die Komplexierung von Ionen in aktiven Zentren von Enzymen. Insgesamt wurden folgende Positionen zu Alanin substituiert: E23, D49, N50, K51, K76, N98, D116, E123, K124, D164, N167, Q171, R176, Q182, R185, Q188, R195, N212 und K214. Zur Vereinfachung wurden die Mutanten in diesem Fall nicht kloniert, sondern nur PCR-Produkte generiert, die den mutierten ORF im Konstrukt pCITE-ANDV-L_N sowie den T7-Promotor und die IRES umfassen. Die PCR-Produkte wurden in MVA-T7-infizierte BSR-T7/5-Zellen transfiziert und die Proteinexpression im Western Blot nachgewiesen. Als Vergleichskontrolle wurden PCR-Produkte für die Expression von ANDV-L_N und die K44A-Mutante generiert und ebenfalls transfiziert. Von den getesteten Mutanten wurden N50A, N98A, K124A und N167A am besten exprimiert (Abb. 18). Im Vergleich zu K44A war die Signalstärke aber deutlich niedriger. Einige andere Mutanten erzeugten noch schwächere Signale (z.B. K51A). Diese wurden nicht weiter untersucht. Insgesamt wurden vier weitere, basische, Aminosäuren identifiziert, die die L-Protein-Expression reduzieren und ggf. für eine funktionierende Endonuklease erforderlich sind.

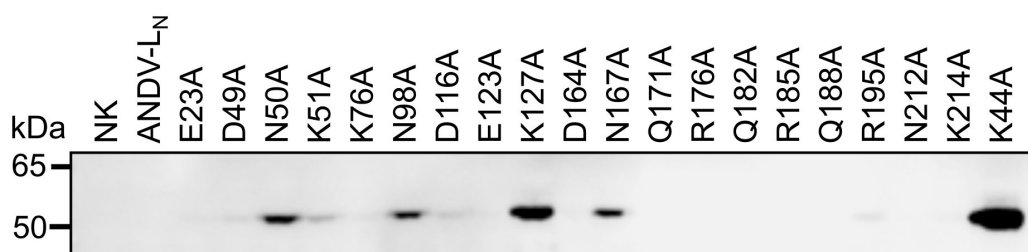


Abb. 18. Mutation von konservierten Asparagin- und Glutamin-Resten sowie geladener Aminosäuren in der vermuteten Endonuklease. Die konservierten Positionen wurden anhand eines Vergleichs zwischen unterschiedlichen Hantavirus L-Protein-Sequenzen identifiziert und im Konstrukt pCITE-ANDV-L_N gegen Alanin substituiert. Die Mutanten wurden in MVA-T7-infizierten BSR-T7/5-Zellen exprimiert und mit dem Anti-HA-Antikörper nachgewiesen.

3.11 Einfluss der L-Protein-Expression auf das mRNA-Niveau

Die vorangegangenen Mutagenese-Studien basierten alle auf dem verkürzten Konstrukt ANDV-L_N. Im Folgenden wurden alle kritischen Mutationen, welche die L-Expression beeinträchtigen auch auf ANDV-L übertragen, um die Auswirkung auf die Synthese des Gesamtlänge-L-Proteins zu untersuchen. Zum Teil wurden nicht nur Alanin-Substitutionen sondern auch Austausche gegen chemisch verwandte Reste eingefügt. Bei den generierten Mutanten handelt es sich um Y32V, R35H, H36R, D37A, D40E, I43A, K44A, N50A, P96A, D97E, N98A, E110A, K124A, K127A und N167A. Die Expression der Gesamtlänge-L-Mutanten ist signifikant stärker als die Expression des Wildtyps und vergleichbar mit der Expression der C-terminal trunkierten Mutanten (Abb. 19A). Ferner wurde der Einfluss des ANDV-L-Proteins auf die Stabilität der ANDV-L-mRNA und die Stabilität heterologer mRNAs untersucht. Das Gesamtlänge-L-Protein wurde zusammen mit den Reportergen-Plasmiden pCITE-FF und phRL kotransfiziert. Ersteres kodiert eine *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle eines T7-Promotors und einer IRES. Das letztere Konstrukt kodiert eine *Renilla*-Luciferase unter Kontrolle eines CMV-Promotors. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, die Expression des L-Proteins im Immunoblot untersucht, sowie RNA isoliert. Die Menge an ANDV-L-, *Firefly*- und *Renilla*-Transkripten wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die ANDV-L-mRNA-Menge korrelierte größtenteils mit den Proteinkonzentrationen, welche im Western Blot nachgewiesen wurden (Abb. 19B). Die geringste mRNA-Menge wurde für den Wildtyp ermittelt. Dagegen waren die mRNA-Konzentrationen der schwach exprimierten Mutanten D37A, N50A, N98A, N167A, Y32A und K127A ungefähr 2 bis 3 mal höher als die des Wildtyps. Die höchsten mRNA-Mengen (4- bis 7-fach über Wildtyp) konnten dagegen bei den stark exprimierten Mutanten ermittelt werden. Parallel dazu waren die Konzentrationen der *Firefly*- und *Renilla*-mRNAs bei Koexpression mit dem Wildtyp-L-Protein stark unterdrückt. Im Gegensatz dazu ließen sich mehr Reportergen-Transkripte nachweisen, wenn sie mit L-Mutanten koexprimiert wurden. Auch hierbei korrelieren *Firefly*- und *Renilla*-mRNA-Konzentrationen mit der Expressionsstärke der Mutanten. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit dem dominant-negativen trans-Effekt von ANDV-L_N, das die Expression der K44A-Mutante inhibieren kann (Abb. 17A). Ferner wird die Vermutung gestützt, dass ANDV-L die Konzentration seiner eigenen mRNA und die Konzentration von Fremd-mRNA aktiv herabreguliert.

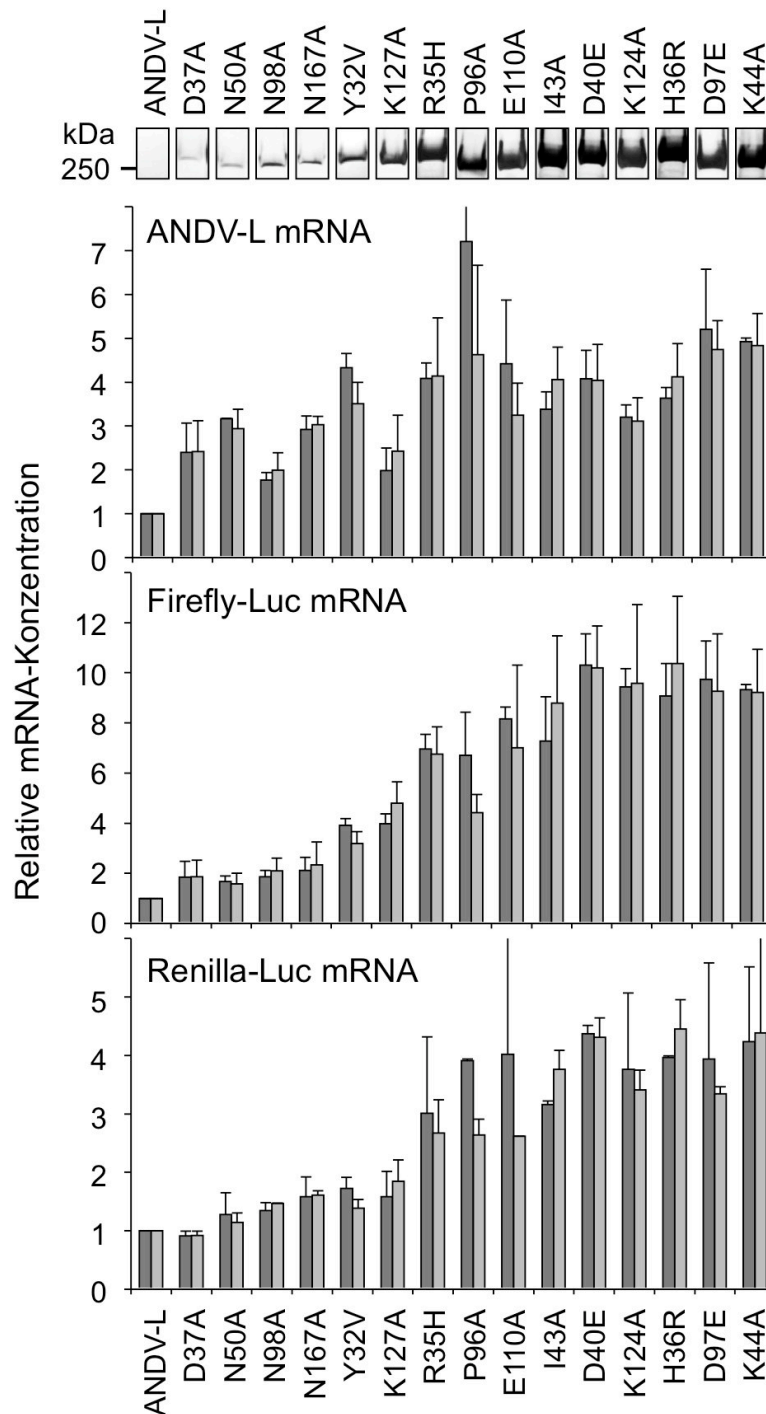


Abb. 19. Einfluss der L-Expression auf die mRNA-Konzentration. BHK-21-Zellen wurden mit ANDV-L bzw. verschiedenen ANDV-L-Mutanten und den Reportergenen pCITE-FF und phRL kotransfiziert. Ein Drittel der Zellen diente dem Nachweis der L-Protein-Expression mittels Immunoblot (A). Aus den restlichen zwei Dritteln Zellmaterial wurde die Gesamt-RNA isoliert und die ANDV-L-, *Firefly*- bzw. *Renilla*-mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert (B). Die Immunoblot Signale aus Abb. 21A wurden ihrer Intensität nach geordnet und die mRNA-Konzentrationen von ANDV-L (Oben), der *Firefly*-Luciferase (Mitte) sowie der *Renilla*-Luciferase (Unten) in Relation zum Wildtyp-L-Protein grafisch dargestellt. Werte in dunkelgrau wurden nicht normalisiert. Werte in hellgrau wurden mit der eingesetzten RNA-Menge normalisiert. Die Messwerte wurden entsprechend des Expressionslevels von Wildtyp-L und der Mutanten im Immunoblot geordnet.

3.12 Einfluss des L-Proteins auf die zelluläre Proteinsynthese

Nachdem im vorangegangenen Versuch gezeigt wurde, dass ANDV-L die Stabilität seiner eigenen mRNA und heterologer Reporter-gen-mRNA beeinflusst, lässt sich mutmaßen, dass das L-Protein ebenfalls mit der zellulären Genexpression interferiert. Diese Hypothese wurde näher untersucht. ANDV-L_N bzw. die N-terminal verkürzte K44A-Mutante wurden in BSR-T7/5-Zellen exprimiert und neusynthetisierte Proteine anschließend metabolisch für 1 h mit [³⁵S]-Methionin markiert. Nach der Markierung folgte eine Inkubation mit nicht-radioaktivem Medium für 0, 1 bzw. 2 h. Zu jedem Zeitpunkt wurden Proben entnommen und anschließend mittels PAGE aufgetrennt. Radioaktiv-markierte Proteine wurden autoradiografisch nachgewiesen (Abb. 20A). Die Signalintensität der hochmolekularen Proteinfraction (Fraktion a) war in ANDV-L_N-transfizierten Zellen ca. 50% niedriger als in Zellen, die mit der K44A-Mutante transfiziert wurden. (Abb.20B). Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und K44A-exprimierenden Zellen in den niedermolekularen Fraktionen (Fraktion b) nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass ANDV-L_N die Genexpression zellulärer Gene negativ beeinflusst.

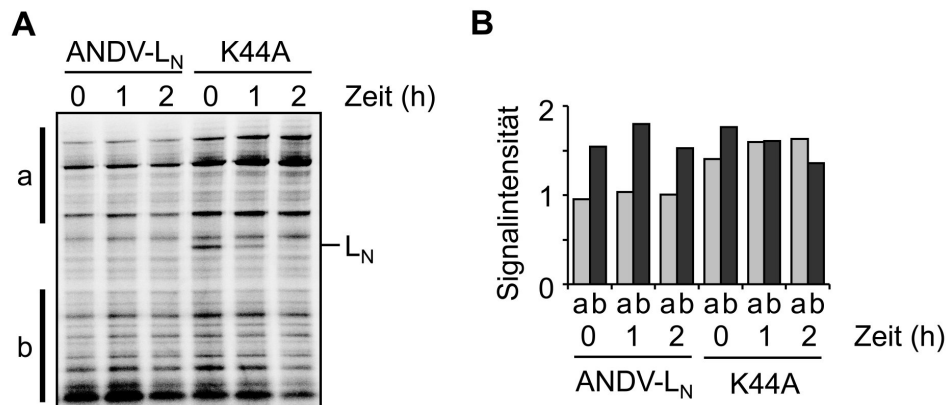


Abb. 20. Einfluss des L-Proteins auf die zellulären Proteinsynthese. (A) BSR-T7/5-Zellen wurden mit ANDV-L_N bzw. der K44A-Mutante transfiziert und anschließend mit [³⁵S]-Methionin für 1h markiert. Es folgte eine Inkubation mit nicht-radioaktivem Medium. Zelllysate wurden nach 0 h, 1 h und 2 h geerntet, mittels PAGE aufgetrennt und radioaktiv-markierte Proteine im Phosphorimager nachgewiesen. (B) Die Signalintensität der Gesamtproteinmenge oberhalb (a) und unterhalb (b) der Laufhöhe von L_N wurde quantifiziert und grafisch dargestellt.

3.13 Versuche zur Etablierung eines ANDV-Replikonsystems

Es wird angenommen, dass das L- und N-Protein die notwendigen Komponenten für die Transkription und Replikation der hantaviralen Gene sind. Studien an verwandten Viren aus den Familien der *Bunyaviridae* und *Arenaviridae* haben gezeigt, dass diese beiden Proteine ausreichend sind, um virale Gene zu replizieren ((Dunn et al., 1995; Hass et al., 2004). Zusammen mit der viralen RNA bilden L- und N-Protein die funktionelle Einheit des RNP-Komplexes. Ein Replikonsystem ermöglicht es, die virale Transkription und Replikation zu studieren, ohne dass eine Virusinfektion erfolgen muss. Stattdessen werden artifizielle RNP-Komplexe mittels Transfektion von Plasmiden in einer Zelle erzeugt. Diese kodieren für das L- und N-Protein, sowie für ein artifizielles Genomsegment. Das Genomsegment besitzt die viralen UTRs und somit die regulatorischen Elemente für Transkription und Replikation. Anstelle eines Virusgens flankieren die UTRs allerdings ein Reporterogen (*Renilla*-Luciferase). Die Expression der *Renilla*-Luciferase wird anschließend in einem Luciferase-Assay gemessen und dient als Maß für die transkriptionelle Aktivität des L-Proteins (Abb.21).

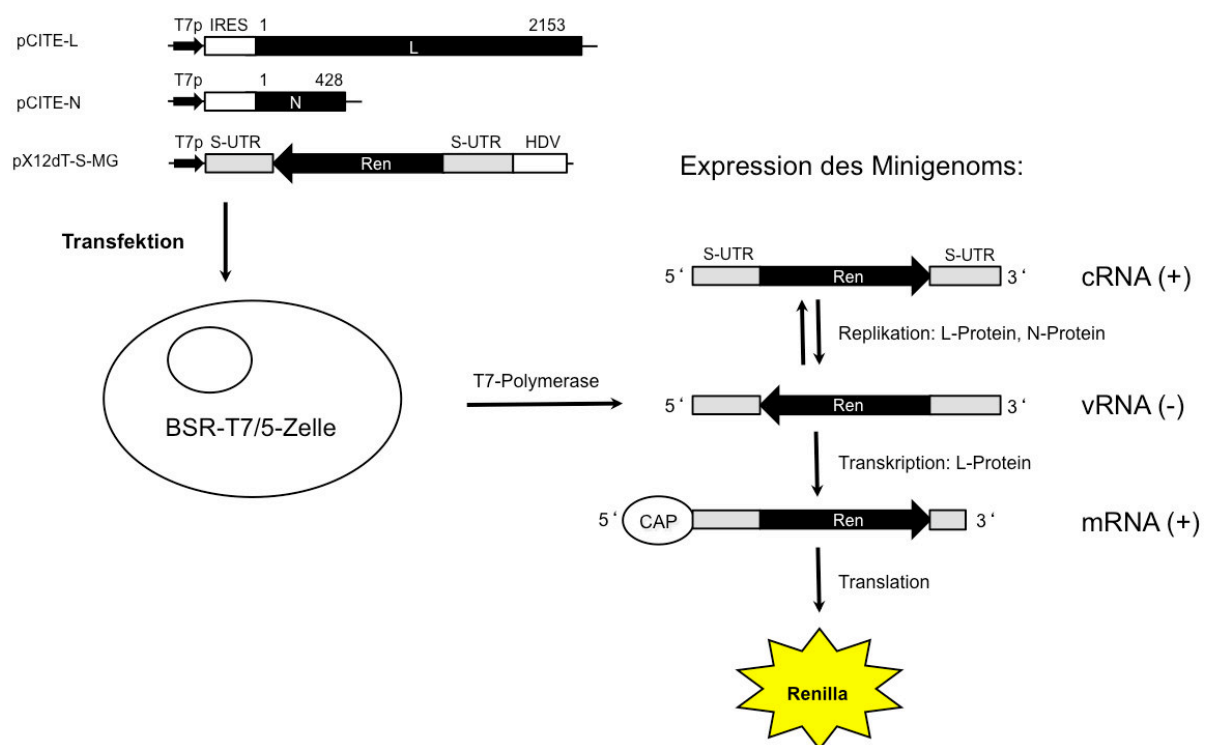


Abb. 21. Schematische Darstellung des Replikonsystems. L- und N-Expressionsplasmide werden zusammen mit dem Minigenom in BSRT7-Zellen transfiziert. Die T7-Polymerase transkribiert das Minigenom, wodurch eine artifizielles, virales Genomsegment entsteht (vRNA). Dieses kann vom L-Protein in ein komplementäres Antigenom (cRNA) oder in mRNA umgeschrieben werden. Die Expression des Reporterproteins *Renilla*-Luciferase wird mit einem biochemisches Aktivitäts-Assay bestimmt.

Ein Northern Blot dagegen sollte Aufschluss über transkribierte Reporter-mRNA bzw. die Synthese antigenomischer Reporter-Transkripte geben. Um auszuschließen, dass sich das HA-Epitop am C-Terminus des L-Proteins negativ auf dessen Aktivität auswirkt, wurde ein unmarkiertes L-Konstrukt kloniert (pCITE-L) sowie zwei unmarkierte Endonukleasemutanten hergestellt (D97E und E110A). BSR-T7/5-Zellen wurden mit pCITE-N und pCITE-L bzw. den korrespondierenden Mutanten D97E oder E110A kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde statt pCITE-L der pCITE-2a-Vektor verwendet. Zusätzlich wurde eines der beiden Minigenome pX12dT-S-MG bzw. pX12dT-M-MG (Abb. 9) als PCR-Produkt transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde ein Expressionsplasmid für eine *Firefly*-Luciferase (pCITE-FF) kotransfiziert. Auf diese Weise lassen sich die *Renilla*-Messwerte normalisieren und unterschiedliche Transfektionseffizienzen ausgleichen.

Im Luciferase-Assay wurde nur die Expression von S-MG untersucht. Es wurde eine sehr geringe Aktivität des Wildtyp-L-Proteins detektiert (Abb. 22A). Diese lag 10-fach über der Negativ-Kontrolle (pCITE-2a) bzw. den Endonuklease-Mutanten. Im Vergleich mit anderen Replikonsystemen, wie z.B. dem Lassa-Virus-Replikonsystem sind die Werte sehr gering. Hierbei werden i.d.R. Aktivitäten beobachtet, die ungefähr 100- bis 1000-fach über dem Hintergrund liegen (Hass et al., 2004).

Die Northern Blot-Analyse sollte weiteren Aufschluss darüber geben, ob die Minigenome in transfizierten Zellen durch ANDV-L transkribiert oder repliziert werden können. BSR-T7/5-Zellen wurden mit S-MG- bzw. M-MG-DNA, pCITE-N sowie pCITE-L transfiziert. Darüberhinaus wurden die beiden Endonukleasemutanten D97E und E110A getestet. Obwohl nicht zu erwarten war, dass diese erfolgreich eine Transkription durchführen können, wäre es möglich, dass diese die Minigenome replizieren können. Als Negativkontrolle wurde wiederum anstatt pCITE-L nur der Vektor pCITE-2a eingesetzt. Ferner wurden in einem Parallelansatz die Komponenten des Lassa-Virus-Replikonsystems transfiziert. Dieses bereits etablierte System diente als Positivkontrolle und somit der Überprüfung eines korrekten Versuchsablaufs. 20 h nach der Transfektion wurde die gesamte RNA aufgereinigt und im denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Danach erfolgte eine Übertragung der RNA auf eine Nylonmembran per Northern Blot und die Detektion mittels einer *Renilla-antisense*-Sonde. Die Signale von Antigenom und mRNA des S-MGs sollten auf einer Höhe von 1500 nt bzw. 1200 nt zu detektieren sein. Antigenom und mRNA des M-MGs sollten dagegen identische Signale auf einer Höhe von ca. 1100 nt liefern. Diese Annahme beruht auf Untersuchungen an SNV-mRNAs. Dabei wurde gezeigt, dass die Transkription des S-Segments im Zentrum der 3'-UTR terminiert. Dagegen wird die mRNA des M-Segments bis

zum Ende der 3'-UTR transkribiert (Hutchinson et al., 1996). Im Northern Blot wurde allerdings nur ein Schmier bei Kotransfektion mit Wildtyp-L detektiert (Abb 22B). Dieser hat auf Höhe von ca. 900 (S-MG) bzw. 750 nt (M-MG) seine höchste Intensität. Es erscheint durchaus möglich, dass das Wildtyp-L einen Teil der Minigenome umschreibt, diese aber gleichzeitig degradiert werden. Die Endonukleasemutanten sind offensichtlich nicht in der Lage, Minigenome zu replizieren. Dies deutet darauf hin, dass eine funktionelle Endonuklease auch beim Replikationsschritt unabdingbar ist. Im Kontrollexperiment dagegen wurde das Lassa-Virus-Minigenom korrekt transkribiert und repliziert (Abb. 22B, Spur 9). Hier konnten die korrespondierenden Banden für Antigenom und mRNA auf einer Höhe von 1900 bzw. 1200 nt nachgewiesen werden. Es ist folglich auszuschließen, dass bei diesem Versuch

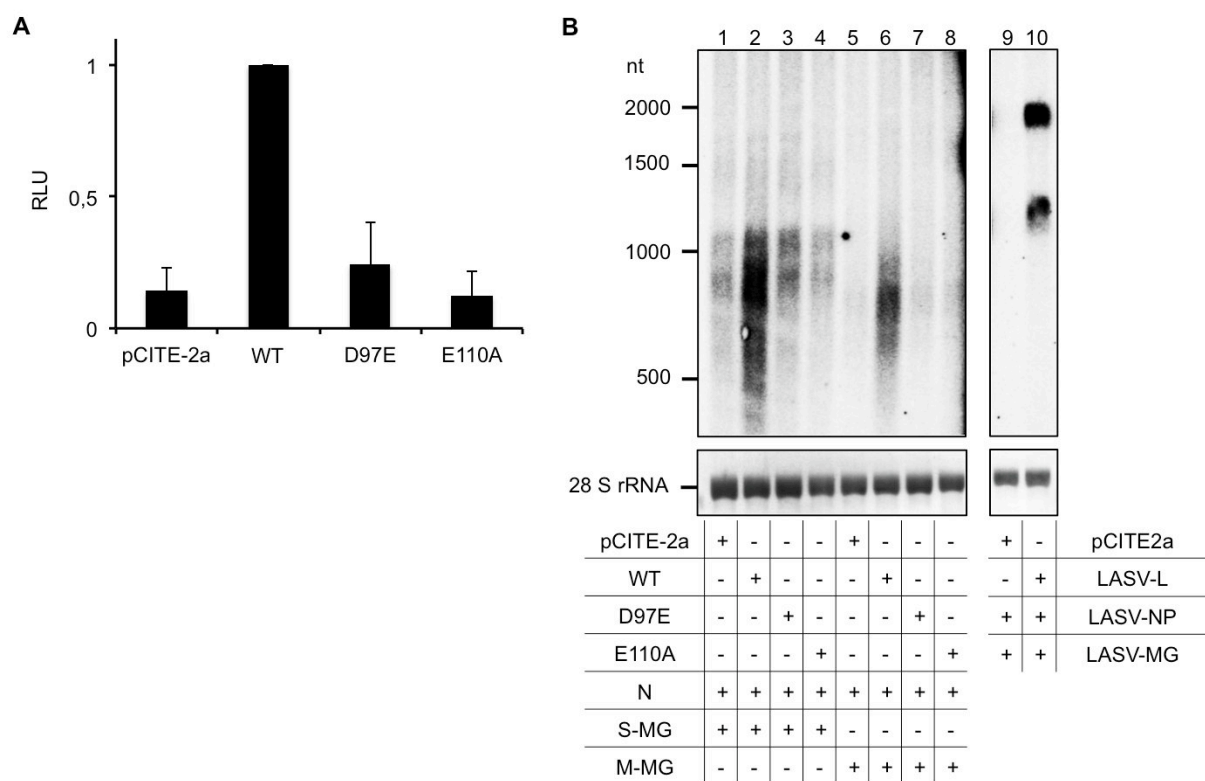


Abb. 22. Aktivität von ANDV-L im Replikonsystem. (A) BSR-T7/5-Zellen wurden mit dem ANDV-Replikonsystem (WT-L/D97E/E110A + N + S-MG) sowie pCITE-FF transfiziert und die Luciferase-Aktivität 20 h später im Zelllysate bestimmt. Die Renilla-Messwerte wurden mit *Firefly*-Werten normalisiert und die relative Aktivität grafisch dargestellt. (B) BSR-T7/5-Zellen wurden mit dem ANDV-Replikonsystem transfiziert (WT-L/D97E/E110A + N + S-MG bzw. M-MG). Als Kontrolle diente das LASV-Replikonsystem. 24 h nach der Transfektion wurde die Gesamt-RNA aufgereinigt und unter denaturierenden Bedingungen im Agarosegel aufgetrennt. Es folgte ein Northern Blot und die Detektion von antigenomischer RNA und mRNA der Minigenome mittels einer *antisense*-Renilla-Sonde. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Gels sind die Banden zellulärer 28 S rRNA nach Methylenblau-Färbung dargestellt.

methodische Fehler gemacht wurden. Weder Luciferase-Versuch noch Northern Blot konnten eindeutigen Aufschluss geben, ob das rekombinant exprimierte ANDV-L eine Replikations- oder Transkriptionsaktivität besitzt.

3.14 Intrazelluläre Lokalisation des L-Proteins und Kollokalisierung mit dem N- bzw. Gc-Protein

Die hohen Expressionslevel von L-Mutanten mit Aminosäuresubstitutionen im N-Terminus ermöglichten es erstmals, die intrazelluläre Lokalisation des L-Proteins tiefergehend zu untersuchen. Plasmide für die Expression von L-Mutanten, GPC und N wurden in verschiedenen Kombinationen in MVA-T7-infizierte BHK-21-Zellen transfiziert. Die Verteilung der Proteine in der Zelle wurde durch konfokale indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die solitäre Expression von L-K44A-Flag, des N-Proteins und des NSs-Proteins sind in Abb. 23A dargestellt. Sowohl bei einzelner Expression als auch bei Koexpression mit dem N-Protein besitzt die Mutante L-K44A-Flag eine diffuse, granuläre, teilweise perinukleäre Lokalisation. Das N-Protein zeigt eine fast deckungsgleiche räumliche Verteilung, wie in der Überlagerung der Einzelaufnahmen (Merge) zu sehen ist (Abb. 23B). Eine Interaktion zwischen L-Mutante und N-Protein ist somit sehr wahrscheinlich. In Abb. 23C ist die Koexpression von L-K44A-Flag und dem C-terminal HA-markierten Glykoprotein dargestellt. Es muss beachtet werden, dass nur das C-terminale Spaltprodukt Gc des Proteinvorläufers detektiert werden kann, nicht jedoch die Untereinheit Gn. Wie auf den Aufnahmen zu erkennen ist, kollokalisieren L-K44A-Flag und Gc-HA nicht und eine direkte Interaktion beider Proteine ist unwahrscheinlich.

3.15 Kollokalisierung des NSs-Proteins mit dem L- bzw. N-Protein

In einem weiteren Versuch wurde die Kollokalisierung zwischen L-Mutanten und dem kürzlich entdeckten Nichtstrukturprotein NSs mikroskopisch untersucht. Bei solitärer Expression reicherte sich das NSs-Protein im Kern an (Abb. 24A). Aufgrund seiner geringen Größe von nur 9 kDa (inkl. HA-Epitop) ist es wahrscheinlich, dass dieses Protein passiv durch die Kernporen in den Nukleus diffundiert. Interessanterweise wurde die Translokalisierung in den Nukleus bei Koexpression mit der Gesamtlänge-Mutante L-K44A-Flag unterbunden.

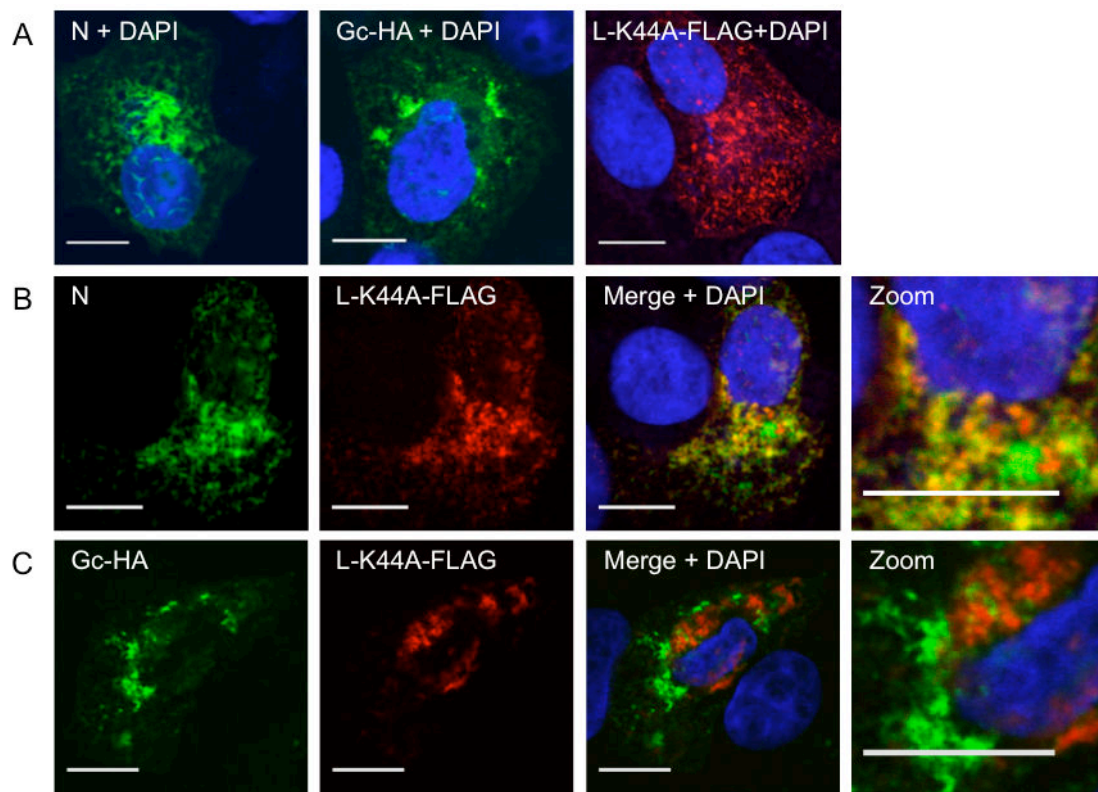


Abb. 23. Intrazelluläre Lokalisation der Mutante L-K44A-Flag nach Koexpression mit dem N- bzw. Glykoprotein. (A) MVA-T7-infizierte BHK-21-Zellen wurden mit pCITE-N, pCITE-GPC-HA oder der Mutante pCITE-L-K44A-Flag einzeln transfiziert. (B) Zellen wurden mit pCITE-L-K44A-Flag und pCITE-N kotransfiziert. (C) Zellen wurden mit pCITE-L-K44A und GPC-HA kotransfiziert. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die L-Mutante wurde mit einem Maus-Anti-FLAG-Antikörper sowie Rhodamin-konjugierten Anti-Maus-Antikörpern markiert. Die Detektion des N-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen Anti-ANDV-N-Serum, die des Gc-Glykoproteinfragments mittels Kaninchen-Anti-HA-Antikörpern. Als Sekundärantikörper wurde Rhodamin-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG eingesetzt. Die Mikroskopie erfolgte bei 100-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht einem Abstand von 10 μm

Zusätzlich kolokalisierten beide Proteine im Zytoplasma. Dieses Phänomen spricht deutlich für eine direkte Interaktion beider Proteine (Abb 24B). NSs-HA wurde zusätzlich mit einer C-terminal verkürzten Mutante L_N -K44A-Flag (Abb. 24C) bzw. der N-terminal tranktierten Mutante L_C -Flag (Abb. 24D) koexprimiert. L_N -K44A-Flag besteht aus den Aminosäuren 1 bis 534 des L-Proteins und besitzt die Mutation K44A. L_C -Flag dagegen besteht aus den Aminosäuren 692 bis 2153 des L-Proteins. Bei Koexpression mit diesen Mutanten zeigte NSs eine ähnliche räumliche Verteilung wie bei Koexpression mit L-K44A-Flag. Beide L-Mutanten waren in der Lage mit NSs zu kolokalisieren. Allerdings wurde bei Koexpression mit L_N -Flag ein großer Anteil an NSs-Protein in den Kern transloziert. Diese Beobachtung könnte darauf deuten, dass die Interaktion zwischen NSs und dem N-Terminus des L-Proteins

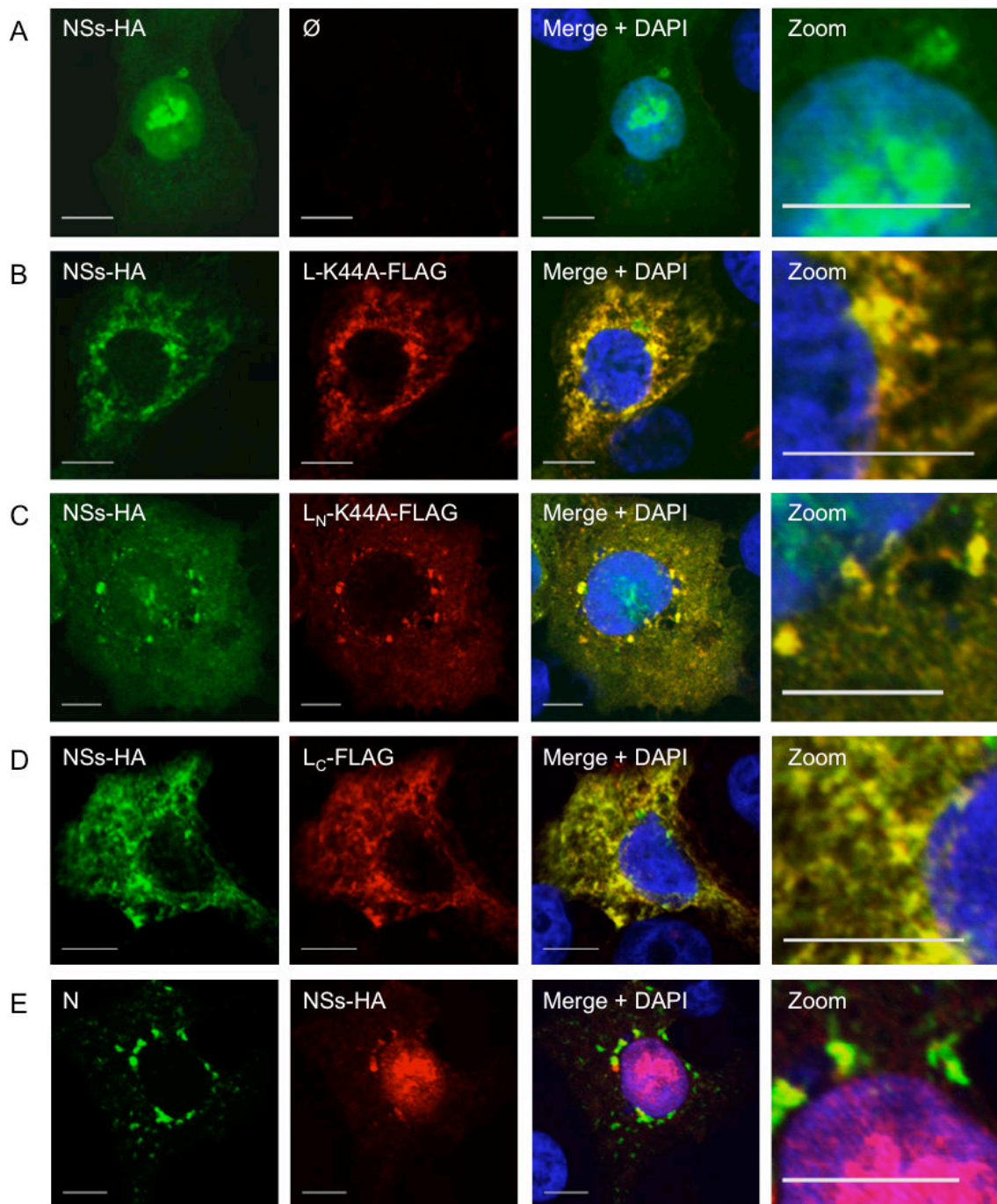


Abb. 24. Kolokalisation zwischen L-Mutanten und NSs-Protein. MVA-T7-infizierte BHK-21-zellen wurden mit NSs-HA transfiziert (A). Außerdem erfolgte eine Koexpression von NSs-HA mit der Gesamtlänge-Mutante L-K44A-Flag (B), den verkürzten Mutanten L_N-K44A-Flag (C), L_C-Flag (D) bzw. dem N-Protein (E). L-Mutanten wurden mit Maus-Anti-Flag-IgG markiert. NSs-HA wurde mit Kaninchen-Anti-HA-IgG (A-D) bzw. Maus-Anti-HA-IgG (E) markiert. Für den Nachweis des N-Proteins wurde polyklonales Anti-ANDV-N-Serum benutzt. Des Weiteren wurden FITC- und Rhodamin-gekoppelten Sekundär-Antikörper verwendet. Die Mikroskopie erfolgte bei 100-facher Vergrößerung. Der Maßstabsbalken entspricht einem Abstand von 10 µm.

verhältnismäßig schwach ist und weitestgehend durch den C-Terminus vermittelt wird. Eine schwache Kolokalisation in perinukleärer Nähe wurde auch bei Koexpression von Nss- und dem N-Protein beobachtet (Abb. 24E). Der hauptsächliche Anteil an NSs wurde aber im Nukleus detektiert. Eine Interaktion ist somit auszuschließen oder ggf. nur sehr schwach.

3.16 Kolokalisation zwischen L-Mutanten, N-Protein und *processing bodies*

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Kolokalisation zwischen L-Mutanten und dem Markerprotein DCP1a, welches Bestandteil von *processing bodies* (*p bodies*) ist, näher untersucht. *p bodies* sind komplexe Strukturen aus verschiedenen Proteinen deren Zweck es ist, zelluläre mRNA zu speichern und zu degradieren. Es wurden zwei verschiedene Gesamtlänge-L-Mutanten (L-R35H-HA und L-K44A-HA) auf eine mögliche Kolokalisation mit dem *p body*-Markerprotein DCP1a (*Decapping enzyme 1a*) untersucht. (Abb. 25A und B). Zytoplasmatische *p bodies* waren deutlich als punktförmige Strukturen zu erkennen. Die L-Mutanten hingegen waren erwartungsgemäß wie in den vorherigen Experimenten diffus, granulär verteilt. Ein Teil der L-Fraktion überlagerte allerdings mit DCP1a punktuell. Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Beobachtungen um zufällige Ereignisse handelte, wurde auch die Kolokalisation zwischen *p bodies* und der C-terminal verkürzten Mutante L_N-K44A-Flag (Abb. 25C) und dem N-terminal tranktierten Konstrukt L_C-Flag (Abb. 25D) untersucht. Interessanterweise war von den zwei Proteinen nur L_N-K44A-Flag in der Lage, mit DCP1a zu kolokalisieren. Trotz starker Expression und gleichmäßiger Verteilung im Zytoplasma überlagerte sich L_C-Flag nicht mit DCP1a. Als Positivkontrolle ist die Kolokalisation zwischen ANDV-N und DCP1a dargestellt (Abb. 25E). Es war zu erwarten, dass das N-Protein in der Lage ist, an *p body*-Strukturen zu binden, da vergleichbare Ergebnisse bereits in Untersuchungen mit dem SNV-N-Protein gezeigt wurden (Mir et al., 2008). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass das L-Protein mit *p bodies* lokalisieren kann. Wahrscheinlich wird diese Lokalisation durch den N-Terminus des Proteins vermittelt. DCP1a muss jedoch nicht zwangsläufig ein Interaktionspartner des Proteins sein. Die Interaktion mit *p bodies* kann ebenso über andere Proteine oder die dort gespeicherte zelluläre mRNA erfolgen.

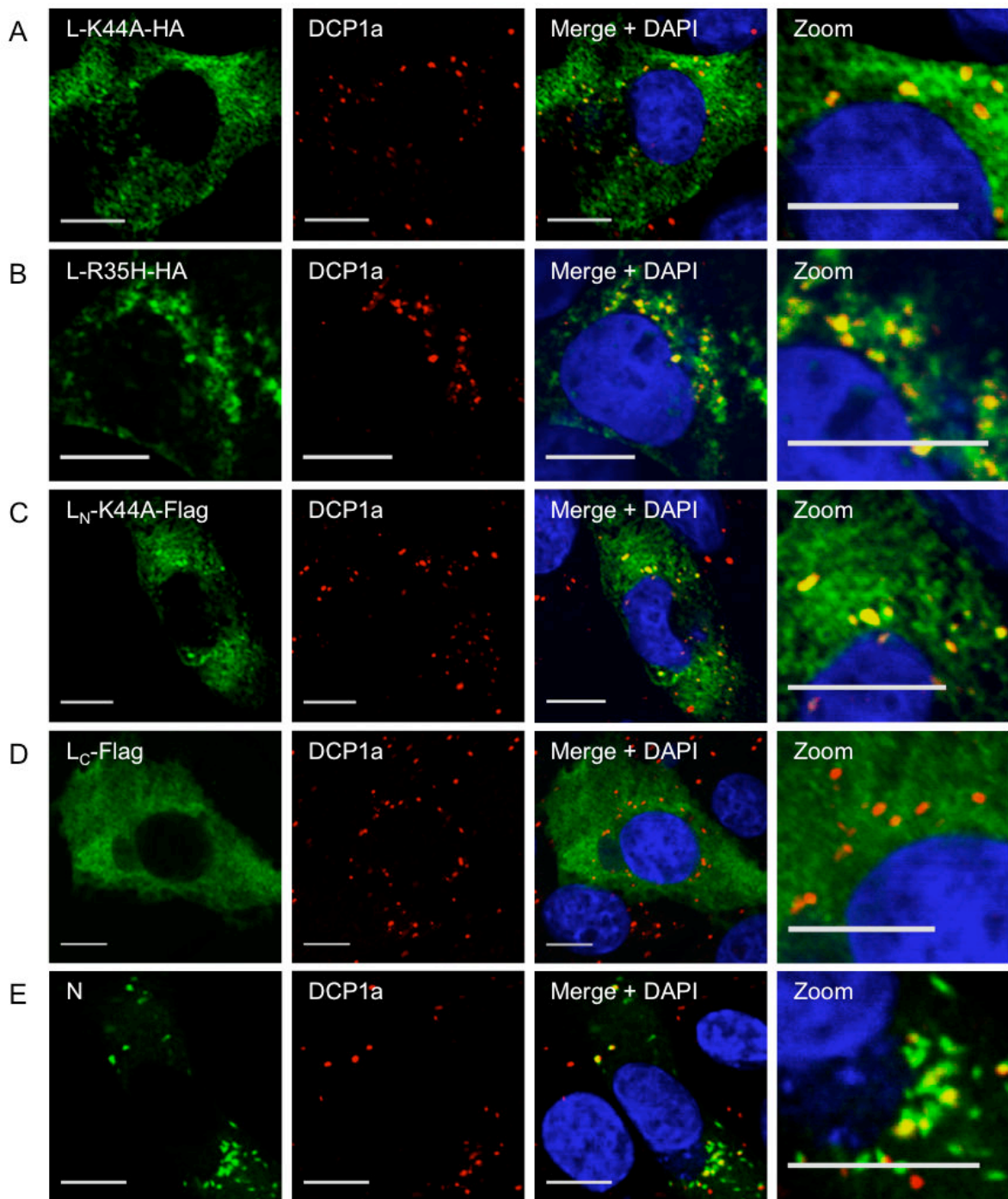


Abb. 25. Kolokalisation zwischen L-Mutanten und *p* bodies. MVA-T7-infizierte BHK-21-Zellen wurden mit Plasmiden für die Expression verschiedener L-Mutanten (A-E) bzw. ANDV-N (E) transfiziert und bei 100-facher Vergrößerung mikroskopisch untersucht. Die Zellkerne wurden zuvor mit DAPI, L-Mutanten mit Kaninchen-Anti-HA-IgG (A-B) bzw. Kaninchen-Anti-Flag-IgG (C-D) und N-Proteine mit polyklonalem Anti-ANDV-N-Serum gefärbt. *P Body*-Strukturen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen DCP1a nachgewiesen. Der Maßstabsbalken entspricht einem Abstand von 10 μm .

4 Diskussion

4.1 Expression und Mutagenese des L-Proteins

Bislang gibt es nur wenige Erkenntnisse über die Funktionen von hantaviralen L-Proteinen. Die wenigen vorhandenen Informationen lieferten weitestgehend Sequenzvergleiche mit näher charakterisierten L-Proteinen verwandter Viren. Untersuchungen an Hantavirus-L-Proteinen werden jedoch erheblich erschwert, da diese Proteine nur ineffizient in Zellkulturen exprimiert werden können. Ein Ziel der Arbeit war es, die Synthese des ANDV-L-Proteins in Säugerzellen zu untersuchen und zu optimieren. Außerdem sollte geklärt werden, warum das ANDV-L-Protein, im Vergleich zu L-Proteinen anderer Bunyaviren nur sehr schwach exprimiert wird.

Diese Doktorarbeit lieferte Aufschluss darüber, dass die rekombinante Expression des L-Proteins durch ein Sequenzmotiv in seinen 534 N-terminalen Aminosäuren beeinträchtigt wird. Durch Veränderung der Codonzusammensetzung im 5'-Terminus des L-ORF's konnte ausgeschlossen werden, dass diese für die schwache Expression verantwortlich ist. Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass die ineffiziente Expression auf eine reduzierte Translationseffizienz oder Instabilität der mRNA zurückzuführen ist. Darüber hinaus besitzt das ANDV-L_N-Protein eine ähnliche Halbwertszeit wie die Mutante K44A und die Expression von ANDV-L_N konnte nicht durch Zugabe eines Proteasominhibitors gesteigert werden. Aus diesem Grund kann ausgeschlossen werden, dass das L-Protein instabiler ist als die exprimierbaren Mutanten. Interessanterweise wurde die Synthese der exprimierbaren Mutante L_N-K44A bei Kotransfektion mit Wildtyp-L_N inhibiert. Diese Beobachtung lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass ANDV-L selbst verantwortlich für die geringe Proteinsynthese ist.

Erst kürzlich wurden in den N-Termini der L-Proteine verwandter Viren aus der Familie der *Bunyaviridae* (LACV) und *Arenaviridae* (LCMV) sowie der Polymeraseuntereinheit PA des Influenza A-Virus aktive RNA-Endonukleasen nachgewiesen (Dias et al., 2009; Morin et al., 2010; Reguera et al., 2010a). Mittels Röntgenstrukturanalyse wurde ebenfalls die Struktur dieser Endonukleasen aufgeklärt. Diese Endonukleasen dienen der Generierung von kurzen 5'-gecappten Oligonukleotiden durch Spaltung zellulärer mRNAs. Diese werden für die Initiation der viralen Transkription genutzt. Die vorhergesagte Sekundärstruktur des N-Terminus des ANDV-L-Proteins zeigt einen hohen Grad an Homologie zu diesen bekannten Endonukleasen (Abb. 26). Ferner lässt sich ein homologes katalytisches PD-E-K-Motiv im

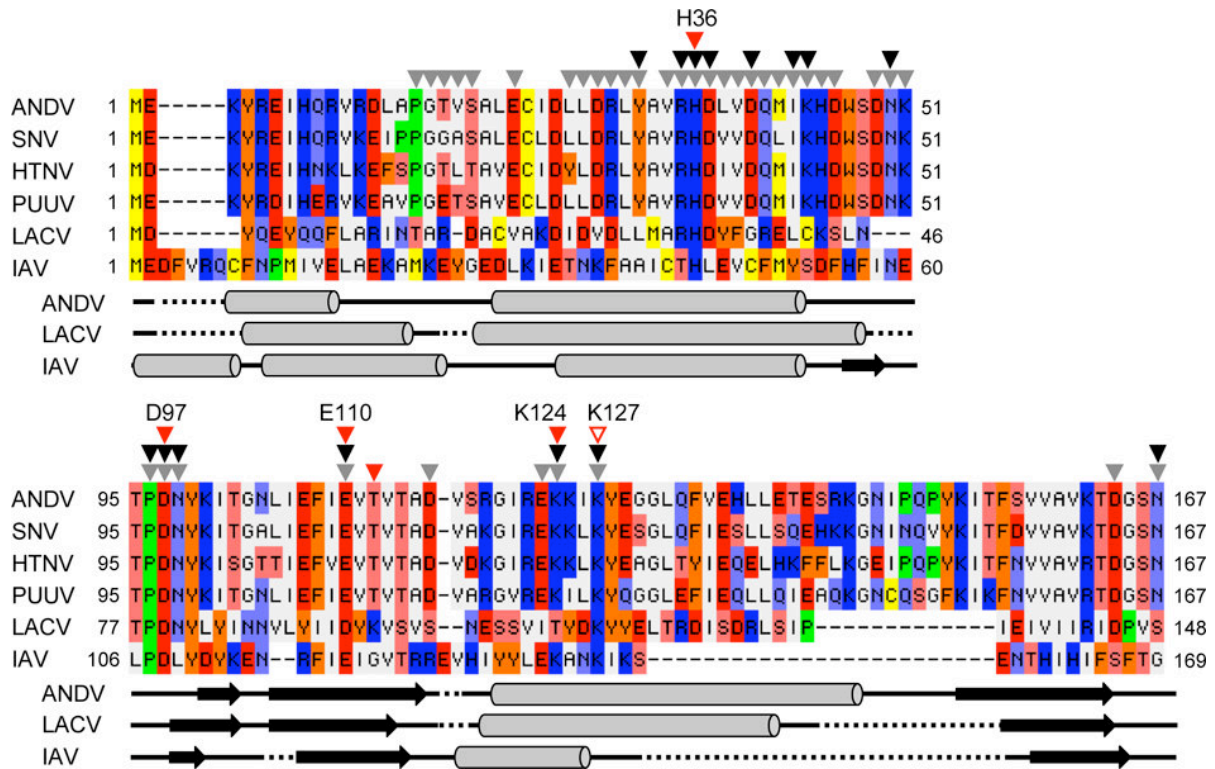


Abb. 26. Sequenzvergleich der vorhergesagten ANDV-Endonuklease mit bekannten Endonukleasen der *Orthobunyaviridae* und *Orthomyxoviridae*. Mit Hilfe der Software ClustalW (Larkin et al., 2007) und MacVector (MacVector) wurden die N-Termini der L-Proteine von ANDV, SNV, HTNV und PUUV mit den N-terminalen Enden des LACV-L-Proteins und IAV-PA-Proteins verglichen. Aminosäuren wurden entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften koloriert. Die N-Termini des LACV-L-Proteins IAV-PA-Proteins besitzen eine Endonukleaseaktivität (Dias et al., 2009; Reguera et al., 2010b). Das Alignment zeigt nur Abschnitte der hantaviralen L-Proteine, die eine signifikante Homologie zu diesen Enzymen aufweisen (Aminosäuren 1 bis 51 und 95 bis 167). Die Sekundärstruktur des ANDV-L-Proteins wurden mit der Software Jpred vorhergesagt (Cole et al., 2008). Die Sekundärstrukturen der LACV- und IAV-Endonuklease hingegen wurden von der Proteindatenbank PDB bezogen (Zugangsnr. 2X15 bzw. 2W69). Aminosäuren deren Einfluss auf die Expression des ANDV-L-Proteins getestet wurde sind mit einem grauen Dreieck gekennzeichnet. Aminosäuren, die für die schwache Expression des ANDV-L-Proteins verantwortlich sind, wurden mit schwarzen Dreiecken markiert. Katalytische Aminosäuren, in der LACV- und IAV-Endonuklease sind mit roten Dreiecken hervorgehoben und jene, welche an einer RNA-Bindung beteiligt sind durch ein offenes rotes Dreieck. Die vorhergesagten katalytischen und RNA-bindenden Reste der Hantaviren - H36, D97, E110, K124 und K127 - entsprechen H34, D79, D92, K94 und K108 in der LACV-L-Sequenz (Reguera et al., 2010b) bzw. H41, D108, E119, K134 und K137 in der IAV-PA-Sequenz (Dias et al., 2009). Zwischen den Hantaviren und IAV stimmen diese Aminosäuren vollständig überein. Die Übereinstimmung zwischen den Hantaviren und LACV ist jedoch nicht perfekt, da das katalytische Lysin an Position 94 des LACV-L-Proteins einem Threonin an Position 112 der Hantavirus-L-Proteine entspricht. Das katalytische Zentrum der hantaviralen Endonuklease könnte demzufolge eher den Orthomyxoviren als den Orthobunyaviren ähneln.

aktiven Zentrum der vermuteten Endonuklease im ANDV-L-Protein finden (P96, D97, E110 und K124). Lysine im LACV-L-Protein und IAV-PA-Protein, welche homolog zu dem in Hantaviren konservierten K127 sind, wird eine Rolle bei der Substratbindung zugeschrieben. Darüber hinaus besitzen hantavirale L-Proteine an Position 36 ein konserviertes Histidin. Ein homologes Histidin gibt es ebenfalls bei den bekannten Endonukleasen. Dieses Histidin bildet bei den LACV- und Influenza-Endonukleasen einen Teil des aktiven Zentrums und ist an der Koordinierung des Zentralions beteiligt (Dias et al., 2009; Kowalinski et al., 2012; Reguera et al., 2010a). Einen weiteren Hinweis auf die Anwesenheit einer Endonuklease im hantaviralen L-Protein lieferten Nachweise von Nukleotidesequenzen nicht-viralen Ursprungs an den 5'-Termini viraler mRNA's (Cheng and Mir, 2012; Garcin et al., 1995). Diese, so wird vermutet, besitzen einen zellulären Ursprung und wurden mittels *Cap-Snatching* generiert.

Diese Arbeit liefert einen entscheidenden Hinweis darauf, dass die RNA-Endonukleasefunktion für die schwache Synthese des L-Proteins und koexprimierter Proteine verantwortlich ist. Durch Mutagenese der vorhergesagten katalytischen und anderer konservierter Aminosäuren in dieser Domäne konnte die L-Expression signifikant verbessert werden. Parallel konnte demonstriert werden, dass bei Mutagenese dieser Endonuklease die L-mRNA-Level sowie die mRNA-Level von koexprimierten Reportergenen ansteigen. Ferner konnte gezeigt werden, dass das Wildtyp- L_N -Protein, nicht jedoch eine exprimierbare L_N -Mutante (K44A) in der Lage ist, die zelluläre Proteinsynthese zu beeinträchtigen. Allerdings wurde nur die Expression von Proteinen mit hohem Molekulargewicht in ANDV- L_N -transfizierten Zellen signifikant reduziert.

Die gewonnenen Daten legen nahe, dass die N-terminale Endonuklease im ANDV-L-Protein seine eigene mRNA schneidet und somit seine eigene Proteinsynthese unterdrückt. Ferner scheint die Endonuklease in der Lage zu sein, mRNA von heterolog exprimierten Genen sowohl zellulären als auch transfizierten Ursprungs zu schneiden und die Genexpression zu unterdrücken. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass nicht nur ANDV-L, sondern auch L-Proteine anderer Hantaviren wie SNV, PUUV und HTNV einer verminderten Expression unterliegen, welche sich ebenfalls durch Mutagenese der N-terminalen Endonukleasedomäne verstärken lässt.

Neben den putativen katalytischen Resten H36, D97, E110, K124 und der RNA-bindenden Aminosäure K127 wurden weitere Aminosäuren entdeckt, die für eine Endonukleaseaktivität von Bedeutung zu sein scheinen: Y32, R35, D37, D40, I43, K44, N50, P98, N98 und N167. Es wäre möglich, dass diese Positionen wichtig für die strukturelle Integrität des Proteins sind. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass z.B. die positiv geladenen Reste an einer RNA-

Bindung beteiligt sein können oder die negativ geladenen Aminosäuren an einer Zentralionenbindung. Ein Sequenzvergleich aller verfügbaren Hantavirus-L-Sequenzen zeigte, dass alle in dieser Arbeit charakterisierten Aminosäuren, welche mit der L-Expression interferieren, hochkonserviert sind und somit für die Endonukleasefunktion essentiell sein müssen.

Die ANDV-Endonuklease scheint zumindest bei rekombinanter Expression eine überaus hohe Aktivität zu besitzen. Da sie in der Lage ist ihre eigene Expression soweit zu unterdrücken, dass das Protein nicht mehr zu detektieren ist, lässt sich schlussfolgern, dass nur sehr wenige L-Moleküle für eine effiziente RNA-Degradierung ausreichen. L-Proteine anderer Bunyaviren bzw. L-Proteine der Arenaviren lassen sich im Gegensatz zu hantaviralen L-Proteinen problemlos in Säugerzellen rekombinant synthetisieren (Brennan et al., 2011; Hass et al., 2004; Shi and Elliott, 2009). Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Beobachtungen wird die Expression verwandter L-Proteine nicht durch Mutation der katalytischen Aminosäuren verstärkt (Lelke et al., 2010). Die mRNA-Degradierung durch die ANDV-Endonuklease erfolgt offenbar unspezifisch und nicht anhand bestimmter Sequenzmuster. Daher ist anzunehmen, dass hantavirale Endonukleasen andere Eigenschaften besitzen und ihre Aktivität keiner strengen Kontrolle unterliegt.

Interessanterweise besitzt das ANDV-L-Protein einige Gemeinsamkeiten mit der Endonuklease der Influenza A-Viren, die in der Polymeraseuntereinheit PA lokalisiert ist. Vergleichbar mit ANDV-L führt die Expression von PA zu einer Reduzierung sowohl von koexprimierten Proteinen als auch von PA selbst. Diese Beobachtungen wurden schon vor einigen Jahren gemacht. Fälschlicherweise wurde damals jedoch vermutet, dass PA die Proteinhalbwertszeit beeinflusst (Sanz-Ezquerro et al., 1995; Sanz-Ezquerro et al., 1996). Erst kürzlich wurde erkannt, dass das PA-Gen einen zweiten ORF besitzt, welcher durch einen ribosomalen Rasterschub entsteht (Jagger et al., 2012). In Folge dessen kann ein stark verkürztes PA-Protein (PA-X) synthetisiert werden, welches nur aus der N-terminalen Endonukleasedomäne und, bedingt durch den Rasterschub, aus einem kurzen C-terminalen X-Peptid besteht. Es wurde nachgewiesen, dass PA-X für die Unterdrückung der Proteinsynthese verantwortlich ist, indem es die mRNA von zellulären und heterolog exprimierten Genen degradiert. In infizierten Zellen kann somit eine Immunantwort des Wirts unterdrückt werden (Jagger et al., 2012). Vergleichbar mit dem ANDV-L-Protein kann die Degradation durch Mutagenese des Endonukleasemotivs in PA-X verhindert werden. Die Fähigkeit, die zelluläre Proteinsynthese zu inhibieren wird nur dem verkürzten Protein PA-X zugeschrieben, nicht jedoch dem Gesamtlänge-PA-Protein. Es lässt sich daher spekulieren, ob

auch Hantaviren in der Lage sind, ein ähnliches, verkürztes L-Protein zu exprimieren. Eine Sequenzanalyse lieferte jedoch keinen Hinweis auf ein mit den Influenza-Viren vergleichbares Sequenzmotiv, das einen ribosomalen Rasterschub begünstigt. Es konnte auch kein konservierter +1 oder +2 ORF nachgewiesen werden, der dem X-Anteil des PA-X entspräche. Darüber hinaus konnten keine konservierten, alternativen Stop-Codons in hantaviralen L-Genen identifiziert werden. Es lässt sich jedoch keineswegs ausschließen, dass doch ein verkürztes hantavirales L-Protein in geringen Mengen auf anderen Wegen produziert wird, das für die Reduzierung der L-mRNA und Reporter-gen-mRNA verantwortlich ist.

Bisher gab es nur 3 verschiedene Studien, in denen die Expression von hantaviralen L-Proteinen beschrieben wurde. In einer Arbeit, in welcher ebenfalls das ANDV-L untersucht wurde, konnte keine Expression nachgewiesen werden (Brown et al., 2012). In zwei weiteren Studien, fokussiert auf das HTNV-L, konnte hingegen eine schwache Proteinexpression beschrieben werden (Kukkonen et al., 2004; Zhang et al., 2008). Diese ist jedoch wesentlich schwächer als die Expression der L-Mutanten, die für diese Doktorarbeit angefertigt wurden. Interessanterweise wurden die L-Proteine in den letzteren beiden Arbeiten N-terminal mit einem grün-fluoreszierenden Protein (eGFP) fusioniert. Dieses besitzt eine Länge von über 230 Aminosäuren. Unter Annahme der Hypothese, dass die Endonukleasedomäne im L-Protein für die Degradation seiner eigenen mRNA verantwortlich ist, lässt sich spekulieren, dass eine große artifizielle Modifikation durch eGFP die Endonukleaseaktivität des L-Proteins reduziert und dessen mRNA somit stabilisiert wird. Dadurch könnte erklärt werden, warum die Autoren in der Lage waren, das L-Protein zu detektieren.

4.2 Replikonsystem

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit stellte die Entwicklung eines Replikonsystems für ANDV dar. Das Replikonsystem soll eine schnelle und effektive Untersuchung von Replikation und Transkription ermöglichen. Die Entwicklung von Hantavirus-Replikonsystemen scheint ausgesprochen schwierig zu sein. Versuche solche Systeme zu entwickeln wurden in der Vergangenheit bereits unternommen (Flick et al., 2003; Zhang et al., 2008). Allerdings scheinen diese sich nicht bewährt zu haben, da mit ihnen keine funktionellen Elemente des hantaviralen Replikationskomplexes charakterisiert wurden.

Für das ANDV-Replikonsystem, das in dieser Arbeit etabliert werden sollte wurden in einen bestehenden Reporter-genvektor die UTRs des S- bzw. M-Segments kloniert, so dass sie eine

Renilla-Luciferase flankieren. Diese Reportergene wurden zusammen mit dem N-Protein und L-Protein bzw. verschiedenen L-Mutanten in Säugerzellen exprimiert. Eine Transkriptions- bzw. Replikationsaktivität konnte weder für das Wildtyp-L-Protein noch für eine der beiden getesteten Mutanten D97E und E110A zweifelsfrei nachgewiesen werden. Für die Versuchsreihen wurden L-Konstrukte angefertigt, die nicht mit einem Fremdepitop fusioniert waren (HA- oder FLAG-Tag), um zu vermeiden, dass diese mit den Funktionen des L-Proteins interferieren. Im Northern Blot konnten nur unspezifische Signale bei Einsatz des Wildtyp-L-Proteins detektiert werden, die nicht einer Reporter-gen-mRNA oder (Anti-)Genomsegmenten zugeordnet werden konnten. Die detektierten Signale besaßen eine geringere Größe als erwartet. Anstatt distinkter Banden konnte nur ein Schmier detektiert werden. Diese Beobachtungen deuten auf Degradationsprodukte hin. Evtl. wurde mRNA oder Antigenom-RNA generiert, welche im Anschluss oder parallel degradiert wurde. Es erscheint möglich, dass die N-terminale Endonuklease des Wildtyp-L-Proteins dafür verantwortlich ist. Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, dass die Reportergene unvollständig transkribiert wurden. Im Luciferase-Assay konnte nur eine sehr geringe Expression des Reportergens vom Minigenoms bei Koexpression mit dem Wildtyp-L-Protein detektiert werden. Auch hier erscheint es möglich dass eine überschießende Endonukleaseaktivität im L-Protein die transkribierte mRNA des Reportergens degradiert und somit eine effektive Expression verhindert wird. Eine Replikations- oder Transkriptionsaktivität des L-Proteins im Replikonsystem konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Daher muss das Replikonsystem weiter optimiert werden.

4.3 Intrazelluläre Lokalisation von ANDV-L

Nur wenige Studien befassten sich bisher mit der intrazellulären Lokalisierung von L-Proteinen aus der Familie der *Bunyaviridae*. Daher stellten Kolokalisationsstudien zwischen den verschiedenen ANDV-Proteinen einen wichtigen Aspekt der Doktorarbeit dar. Da das Wildtyp-L-Protein nur in geringen, nicht-detektierbaren Mengen exprimiert wurde, dienten exprimierbare L-Mutanten als Versuchsobjekt. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass ein Einfluss der Mutationen auf die Lokalisierung des Proteins nicht ausgeschlossen werden kann. Ferner könnten ggf. die C-terminalen Antikörper-Epitope (HA-, Flag-Epitop) die Proteinverteilung beeinflusst haben. Allerdings wurden unterschiedliche Gesamtlänge-L-Mutanten mit verschiedenen Mutationen und Fremdepitopen (Flag- oder HA-Epitop)

koexprimiert. Dabei wurde zwischen den Proteinen eine vollständige Kolokalisation festgestellt (ohne Abb.). Somit besitzen die verschiedenen L-Mutanten eine vergleichbare räumliche Verteilung.

Mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass das L-Protein in diffuser, granulärer Verteilung im Zytoplasma vorliegt. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen an L-Proteinen von verwandten Vertretern der *Bunyaviridae*, wie dem Bunyamwera-Virus und dem Rift-Valley-Fieber-Virus (Brennan et al., 2011; Shi and Elliott, 2009). Ferner ähnelt die Verteilung dem L-Protein der Arenaviren (Brunotte et al., 2011). Dieses bildet jedoch definiertere Aggregate im Zytoplasma der Zelle. Die mikroskopischen Beobachtungen legen nahe, dass ANDV-L nicht mit dem Glykoprotein, jedoch mit dem N-Protein kolokalisiert. Eine direkte Interaktion ist nicht auszuschließen, da anzunehmen ist, dass beide Proteine Komponenten der viralen RNPs darstellen. Allerdings wäre es aber auch möglich, dass eine Kolokalisation beider Proteine durch einen weiteren Faktor vermittelt wird, wie z.B. durch gemeinsame Bindung von RNA. In weiteren Versuchen wurde eine Kolokalisation zwischen ANDV-L und dem NSs nachgewiesen. Interessanterweise wird das NSs in den Nukleus translokalisiert, wenn es solitär exprimiert wird. Aufgrund seiner geringen Größe von nur 9 kDa (inkl. HA-Epitop) kann es mittels Diffusion durch die Kernporen gelangen. Bei Koexpression mit dem L-Protein verbleibt es jedoch im Zytoplasma, was stark darauf hindeutet, dass eine Interaktion zwischen beiden Proteinen besteht.

Ein kleiner Anteil an L-Protein kann ebenfalls mit *p bodies* kolokalisieren. Diese granulären Kompartimente im Zytoplasma dienen der Speicherung und Degradierung von zellulärer mRNA. Da in der Zelle nur wenige *p bodies* zu detektieren sind und das L-Protein stark überexprimiert wurde, ist es naheliegend, dass ein Großteil nicht mit diesen Strukturen kolokalisieren kann. Ein C-terminales L-Fragment war nicht in der Lage war mit den *p bodies* zu kolokalisieren, daher wird die Kolokalisation wahrscheinlich durch ein Motiv im N-Terminus des L-Proteins vermittelt. In frühere Studien wurde bereits gezeigt, dass das N-Protein die 5'-Termini von gecappten mRNAs bindet und diese in den *p bodies* vor einer Degradierung bewahrt (Cheng and Mir, 2012; Mir et al., 2008). Es ist durchaus denkbar, dass das L-Protein die gecappten 5'-Enden der vom N-Protein geschützten mRNAs in den *p bodies* abschneidet und hier ebenfalls eine Transkription der viralen Gene initiiert wird.

4.4 Ausblick

Die gewonnenen Ergebnisse bilden eine Ausgangsbasis für zukünftige Arbeiten zum Replikationskomplex der Hantaviren. Neben den zwei bereits getesteten Mutanten D97E und E110A können auch weitere Endonukleasemutanten auf eine Replikationsaktivität hin im Replikonsystem untersucht werden. Idealerweise bieten sich dafür die mäßig exprimierbaren Mutanten Y32A, D37A, N50A, N98A oder N167A an. Diese lassen sich effizienter exprimieren als Wildtyp-L, besitzen aber vermutlich noch endonukleolytische Restaktivität, welche essentiell für die Transkription und ggf. die Replikation ist. Diese Mutanten könnten ebenfalls für die Entwicklung eines reversen Genetik-Systems in Betracht gezogen werden, um ein rekombinantes Andes-Virus herzustellen. Darüber hinaus könnte auch das NSs-Protein, das durch einen alternativen ORF im N-Gen kodiert wird mit einer effizienten Transkription und Replikation interferieren. Auch NSs-Proteine der *Orthobunyaviridae* und *Phleboviridae* sind in der Lage die Transkription in Replikonsystemen zu inhibieren (Brennan et al., 2011; Weber et al., 2001). Daher muss getestet werden, ob eine Mutation des NSs-Startcodons und folglich der *Knock-out* der NSs-Expression einen positiven Effekt auf die Transkription oder Replikation im Replikonsystem hat.

Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie lieferte einen ersten Einblick in die intrazelluläre Verteilung des ANDV-L-Proteins. Kollokalisierungen zwischen L und N, NSs bzw. *p bodies* deuten auf mögliche Interaktionen zwischen diesen Komponenten hin. Mittels Koimmunpräzitationsstudien können diese bestätigt werden. Darüberhinaus kann untersucht werden, welche der *p body*-Komponenten für eine etwaige L-Interaktion verantwortlich ist.

Außerdem gilt es zu bestätigen, dass tatsächlich die N-terminale Endonuklease im L-Protein für die Degradierung seiner eigenen und heterologer mRNAs verantwortlich ist. Den endgültigen Beweis dafür kann nur ein *in vitro*-Endonuklease-Versuch liefern. Hierfür werden größere Mengen an gereinigtem L-Protein benötigt, um damit eine artifizielle Reporter-RNA zu degradieren. Da das Wildtyp-L-Protein nicht rekombinant in Säugetierzellen zu exprimieren ist, bietet sich an, ANDV-L für diesen Versuch in Bakterien zu synthetisieren.

5 Literatur

- Abramson, G., Kenkre, V.M., 2002. Spatiotemporal patterns in the Hantavirus infection. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 66, 011912.
- Adler, F.R., Pearce-Duvet, J.M., Dearing, M.D., 2008. How host population dynamics translate into time-lagged prevalence: an investigation of Sin Nombre virus in deer mice. *Bull Math Biol* 70, 236-252.
- Alfadhli, A., Love, Z., Arvidson, B., Seeds, J., Willey, J., Barklis, E., 2001. Hantavirus nucleocapsid protein oligomerization. *J Virol* 75, 2019-2023.
- Alff, P.J., Gavrilovskaya, I.N., Gorbunova, E., Endriss, K., Chong, Y., Geimonen, E., Sen, N., Reich, N.C., Mackow, E.R., 2006. The pathogenic NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail inhibits RIG-I- and TBK-1-directed interferon responses. *J Virol* 80, 9676-9686.
- Alff, P.J., Sen, N., Gorbunova, E., Gavrilovskaya, I.N., Mackow, E.R., 2008. The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation. *J Virol* 82, 9115-9122.
- Allen, L.J., McCormack, R.K., Jonsson, C.B., 2006. Mathematical models for hantavirus infection in rodents. *Bull Math Biol* 68, 511-524.
- Allen, L.J., Wesley, C.L., Owen, R.D., Goodin, D.G., Koch, D., Jonsson, C.B., Chu, Y.K., Shawn Hutchinson, J.M., Paige, R.L., 2009. A habitat-based model for the spread of hantavirus between reservoir and spillover species. *J Theor Biol* 260, 510-522.
- Armien, A.G., Armien, B., Koster, F., Pascale, J.M., Avila, M., Gonzalez, P., de la Cruz, M., Zaldivar, Y., Mendoza, Y., Gracia, F., Hjelle, B., Lee, S.J., Yates, T.L., Salazar-Bravo, J., 2009. Hantavirus infection and habitat associations among rodent populations in agroecosystems of Panama: implications for human disease risk. *Am J Trop Med Hyg* 81, 59-66.
- Arnold, J.J., Cameron, C.E., 2004. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): pre-steady-state kinetic analysis of ribonucleotide incorporation in the presence of Mg²⁺. *Biochemistry* 43, 5126-5137.
- Arnold, J.J., Ghosh, S.K., Cameron, C.E., 1999. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)). Divalent cation modulation of primer, template, and nucleotide selection. *J Biol Chem* 274, 37060-37069.
- Barr, J.N., Wertz, G.W., 2004. Bunyamwera bunyavirus RNA synthesis requires cooperation of 3'- and 5'-terminal sequences. *J Virol* 78, 1129-1138.

- Bellomo, C., Nudelman, J., Kwaszka, R., Vazquez, G., Cantoni, G., Weinzettel, B., Larrieu, E.G., Padula, P., 2009. [Geographic expansion of hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. The southernmost case report]. *Medicina* 69, 647-650.
- Bieniasz, P.D., 2006. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344, 55-63.
- Bishop, D.H., Gay, M.E., Matsuoko, Y., 1983. Nonviral heterogeneous sequences are present at the 5' ends of one species of snowshoe hare bunyavirus S complementary RNA. *Nucleic Acids Res* 11, 6409-6418.
- Blakqori, G., Kochs, G., Haller, O., Weber, F., 2003. Functional L polymerase of La Crosse virus allows in vivo reconstitution of recombinant nucleocapsids. *The Journal of general virology* 84, 1207-1214.
- Borges, A.A., Campos, G.M., Moreli, M.L., Moro Souza, R.L., Saggiaro, F.P., Figueiredo, G.G., Livonesi, M.C., Moraes Figueiredo, L.T., 2008. Role of mixed Th1 and Th2 serum cytokines on pathogenesis and prognosis of hantavirus pulmonary syndrome. *Microbes Infect* 10, 1150-1157.
- Borges, A.A., Donadi, E.A., Campos, G.M., Moreli, M.L., de Sousa, R.L., Saggiaro, F.P., de Figueiredo, G.G., Badra, S.J., Deghaide, N.H., Figueiredo, L.T., 2010. Association of -308G/A polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter with susceptibility to development of hantavirus cardiopulmonary syndrome in the Ribeirao Preto region, Brazil. *Archives of virology* 155, 971-975.
- Borucki, M.K., Boone, J.D., Rowe, J.E., Bohlman, M.C., Kuhn, E.A., DeBaca, R., St Jeor, S.C., 2000. Role of maternal antibody in natural infection of *Peromyscus maniculatus* with Sin Nombre virus. *J Virol* 74, 2426-2429.
- Botten, J., Mirowsky, K., Ye, C., Gottlieb, K., Saavedra, M., Ponce, L., Hjelle, B., 2002. Shedding and intracage transmission of Sin Nombre hantavirus in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) model. *J Virol* 76, 7587-7594.
- Bouloy, M., Plotch, S.J., Krug, R.M., 1978. Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 4886-4890.
- Brennan, B., Li, P., Elliott, R.M., 2011. Generation and characterization of a recombinant Rift Valley fever virus expressing a V5 epitope-tagged RNA-dependent RNA polymerase. *The Journal of general virology* 92, 2906-2913.
- Bressanelli, S., Tomei, L., Rey, F.A., De Francesco, R., 2002. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J Virol* 76, 3482-3492.

- Brown, K.S., Ebihara, H., Feldmann, H., 2012. Development of a minigenome system for Andes virus, a New World hantavirus. *Archives of Virology* 157, 2227-2233.
- Brunotte, L., Lelke, M., Hass, M., Kleinstauber, K., Becker-Ziaja, B., Gunther, S., 2011. Domain structure of Lassa virus L protein. *J Virol* 85, 324-333.
- Buceta, J., Escudero, C., de la Rubia, F.J., Lindenberg, K., 2004. Outbreaks of Hantavirus induced by seasonality. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 69, 021906.
- Buchholz, U.J., Finke, S., Conzelmann, K.K., 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 73, 251-259.
- Butcher, S.J., Grimes, J.M., Makeyev, E.V., Bamford, D.H., Stuart, D.I., 2001. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature* 410, 235-240.
- Campos, G.M., Borges, A.A., Badra, S.J., Figueiredo, G.G., Souza, R.L., Moreli, M.L., Figueiredo, L.T., 2009. [Pulmonary and cardiovascular syndrome due to hantavirus: clinical aspects of an emerging disease in southeastern Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 42, 282-289.
- Carroll, D.S., Mills, J.N., Montgomery, J.M., Bausch, D.G., Blair, P.J., Burans, J.P., Felices, V., Gianella, A., Iihoshi, N., Nichol, S.T., Olson, J.G., Rogers, D.S., Salazar, M., Ksiazek, T.G., 2005. Hantavirus pulmonary syndrome in Central Bolivia: relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 72, 42-46.
- Carver, S., Trueax, J.T., Douglass, R., Kuenzi, A., 2011. Delayed density-dependent prevalence of Sin Nombre virus infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) in central and western Montana. *Journal of wildlife diseases* 47, 56-63.
- Castillo, C., Naranjo, J., Sepulveda, A., Ossa, G., Levy, H., 2001. Hantavirus pulmonary syndrome due to Andes virus in Temuco, Chile: clinical experience with 16 adults. *Chest* 120, 548-554.
- Chapman, L.E., Mertz, G.J., Peters, C.J., Jolson, H.M., Khan, A.S., Ksiazek, T.G., Koster, F.T., Baum, K.F., Rollin, P.E., Pavia, A.T., Holman, R.C., Christenson, J.C., Rubin, P.J., Behrman, R.E., Bell, L.J., Simpson, G.L., Sadek, R.F., 1999. Intravenous ribavirin for hantavirus pulmonary syndrome: safety and tolerance during 1 year of open-label experience. Ribavirin Study Group. *Antiviral therapy* 4, 211-219.
- Cheng, E., Mir, M.A., 2012. Signatures of host mRNA 5' terminus for efficient hantavirus cap-snatching. *J Virol*.

- Childs, J.E., Glass, G.E., Korch, G.W., LeDuc, J.W., 1989. Effects of hantaviral infection on survival, growth and fertility in wild rat (*Rattus norvegicus*) populations of Baltimore, Maryland. *J Wildl Dis* 25, 469-476.
- Chizhikov, V.E., Spiropoulou, C.F., Morzunov, S.P., Monroe, M.C., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1995. Complete genetic characterization and analysis of isolation of Sin Nombre virus. *J Virol* 69, 8132-8136.
- Choi, Y., Kwon, Y.C., Kim, S.I., Park, J.M., Lee, K.H., Ahn, B.Y., 2008. A hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome requires gC1qR/p32 for efficient cell binding and infection. *Virology* 381, 178-183.
- Clement, J., Vercauteren, J., Verstraeten, W.W., Ducoffre, G., Barrios, J.M., Vandamme, A.M., Maes, P., Van Ranst, M., 2009. Relating increasing hantavirus incidences to the changing climate: the mast connection. *Int J Health Geogr* 8, 1.
- Cole, C., Barber, J.D., Barton, G.J., 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* 36, W197-201.
- Custer, D.M., Thompson, E., Schmaljohn, C.S., Ksiazek, T.G., Hooper, J.W., 2003. Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine. *J Virol* 77, 9894-9905.
- Davis, I.C., Zajac, A.J., Nolte, K.B., Botten, J., Hjelle, B., Matalon, S., 2002. Elevated generation of reactive oxygen/nitrogen species in hantavirus cardiopulmonary syndrome. *J Virol* 76, 8347-8359.
- de Araujo, J., Thomazelli, L.M., Henriques, D.A., Lautenschlager, D., Ometto, T., Dutra, L.M., Aires, C.C., Favorito, S., Durigon, E.L., 2012. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in Sao Paulo, Brazil. *BMC Res Notes* 5, 690.
- Dias, A., Bouvier, D., Crepin, T., McCarthy, A.A., Hart, D.J., Baudin, F., Cusack, S., Ruigrok, R.W., 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458, 914-918.
- Dizney, L.J., Ruedas, L.A., 2009. Increased host species diversity and decreased prevalence of Sin Nombre virus. *Emerg Infect Dis* 15, 1012-1018.
- Dolgin, E., 2012. Hantavirus treatments advance amidst outbreak in US park. *Nature medicine* 18, 1448.
- Duchin, J.S., Koster, F.T., Peters, C.J., Simpson, G.L., Tempest, B., Zaki, S.R., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Nichol, S., Umland, E.T., et al., 1994. Hantavirus pulmonary syndrome: a clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. The Hantavirus Study Group. *N Engl J Med* 330, 949-955.

- Dunn, E.F., Pritlove, D.C., Jin, H., Elliott, R.M., 1995. Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. *Virology* 211, 133-143.
- Elgh, F., Lundkvist, A., Alexeyev, O.A., Stenlund, H., Avsic-Zupanc, T., Hjelle, B., Lee, H.W., Smith, K.J., Vainionpaa, R., Wiger, D., Wadell, G., Juto, P., 1997. Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes. *J Clin Microbiol* 35, 1122-1130.
- Enria, D., Padula, P., Segura, E.L., Pini, N., Edelstein, A., Posse, C.R., Weissenbacher, M.C., 1996. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission. *Medicina (B Aires)* 56, 709-711.
- Estrada, D.F., Boudreaux, D.M., Zhong, D., St Jeor, S.C., De Guzman, R.N., 2009. The Hantavirus Glycoprotein G1 Tail Contains Dual CCHC-type Classical Zinc Fingers. *J Biol Chem* 284, 8654-8660.
- Feldmann, H., Sanchez, A., Morzunov, S., Spiropoulou, C.F., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1993. Utilization of autopsy RNA for the synthesis of the nucleocapsid antigen of a newly recognized virus associated with hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Res* 30, 351-367.
- Ferres, M., Vial, P., Marco, C., Yanez, L., Godoy, P., Castillo, C., Hjelle, B., Delgado, I., Lee, S.J., Mertz, G.J., 2007. Prospective evaluation of household contacts of persons with hantavirus cardiopulmonary syndrome in Chile. *J Infect Dis* 195, 1563-1571.
- Figueiredo, L.T., Moreli, M.L., Borges, A.A., Figueiredo, G.G., Souza, R.L., Aquino, V.H., 2008. Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. *Braz J Med Biol Res* 41, 596-599.
- Figueiredo, L.T., Moreli, M.L., de-Souza, R.L., Borges, A.A., de-Figueiredo, G.G., Machado, A.M., Bisordi, I., Nagasse-Sugahara, T.K., Suzuki, A., Pereira, L.E., de-Souza, R.P., de-Souza, L.T., Braconi, C.T., Harsi, C.M., de-Andrade-Zanotto, P.M., 2009. Hantavirus pulmonary syndrome, central plateau, southeastern, and southern Brazil. *Emerg Infect Dis* 15, 561-567.
- Flick, K., Hooper, J.W., Schmaljohn, C.S., Pettersson, R.F., Feldmann, H., Flick, R., 2003. Rescue of Hantaan virus minigenomes. *Virology* 306, 219-224.
- Frampton, J.W., Lanser, S., Nichols, C.R., 1995. Sin Nombre virus infection in 1959. *Lancet* 346, 781-782.

- Fulhorst, C.F., Cajimat, M.N., Utrera, A., Milazzo, M.L., Duno, G.M., 2004. Maporal virus, a hantavirus associated with the fulvous pygmy rice rat (*Oligoryzomys fulvescens*) in western Venezuela. *Virus research* 104, 139-144.
- Garcin, D., Lezzi, M., Dobbs, M., Elliott, R.M., Schmaljohn, C., Kang, C.Y., Kolakofsky, D., 1995. The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. *J Virol* 69, 5754-5762.
- Gavrilovskaya, I., Gorbunova, E., Koster, F., Mackow, E., 2012. Elevated VEGF Levels in Pulmonary Edema Fluid and PBMCs from Patients with Acute Hantavirus Pulmonary Syndrome. *Adv Virol* 2012, 674360.
- Gavrilovskaya, I.N., Brown, E.J., Ginsberg, M.H., Mackow, E.R., 1999. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J Virol* 73, 3951-3959.
- Gavrilovskaya, I.N., Gorbunova, E.E., Mackow, E.R., 2010. Pathogenic hantaviruses direct the adherence of quiescent platelets to infected endothelial cells. *J Virol* 84, 4832-4839.
- Gavrilovskaya, I.N., Gorbunova, E.E., Mackow, N.A., Mackow, E.R., 2008. Hantaviruses direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiopoietin 1 and sphingosine 1-phosphate inhibit hantavirus-directed permeability. *J Virol* 82, 5797-5806.
- Gavrilovskaya, I.N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M.H., Mackow, E.R., 1998. beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7074-7079.
- Geimonen, E., Fernandez, I., Gavrilovskaya, I.N., Mackow, E.R., 2003a. Tyrosine residues direct the ubiquitination and degradation of the NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail. *J Virol* 77, 10760-10868.
- Geimonen, E., LaMonica, R., Springer, K., Farooqui, Y., Gavrilovskaya, I.N., Mackow, E.R., 2003b. Hantavirus pulmonary syndrome-associated hantaviruses contain conserved and functional ITAM signaling elements. *J Virol* 77, 1638-1643.
- Glass, G.E., Childs, J.E., Korch, G.W., LeDuc, J.W., 1988. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect* 101, 459-472.
- Glass, G.E., Livingstone, W., Mills, J.N., Hlady, W.G., Fine, J.B., Biggler, W., Coke, T., Frazier, D., Atherley, S., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Peters, C.J., Childs, J.E., 1998.

- Black Creek Canal Virus infection in *Sigmodon hispidus* in southern Florida. *Am J Trop Med Hyg* 59, 699-703.
- Gohara, D.W., Arnold, J.J., Cameron, C.E., 2004. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): kinetic, thermodynamic, and structural analysis of ribonucleotide selection. *Biochemistry* 43, 5149-5158.
- Gohara, D.W., Crotty, S., Arnold, J.J., Yoder, J.D., Andino, R., Cameron, C.E., 2000. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): structural, biochemical, and biological analysis of conserved structural motifs A and B. *J Biol Chem* 275, 25523-25532.
- Gorbunova, E., Gavrilovskaya, I.N., Mackow, E.R., 2010. Pathogenic hantaviruses Andes virus and Hantaan virus induce adherens junction disassembly by directing vascular endothelial cadherin internalization in human endothelial cells. *J Virol* 84, 7405-7411.
- Gracia, F., Armien, B., Simpson, S.Q., Munoz, C., Broce, C., Pascale, J.M., Koster, F., 2010. Convalescent pulmonary dysfunction following hantavirus pulmonary syndrome in Panama and the United States. *Lung* 188, 387-391.
- Hammerbeck, C.D., Hooper, J.W., 2011. T cells are not required for pathogenesis in the Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. *J Virol* 85, 9929-9944.
- Hass, M., Golnitz, U., Muller, S., Becker-Ziaja, B., Gunther, S., 2004. Replicon system for Lassa virus. *J Virol* 78, 13793-13803.
- Hayasaka, D., Maeda, K., Ennis, F.A., Terajima, M., 2007. Increased permeability of human endothelial cell line EA.hy926 induced by hantavirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res* 123, 120-127.
- Henderson, W.W., Monroe, M.C., St Jeor, S.C., Thayer, W.P., Rowe, J.E., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1995. Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology* 214, 602-610.
- Hepojoki, J., Strandin, T., Wang, H., Vapalahti, O., Vaheri, A., Lankinen, H., 2010. Cytoplasmic tails of hantavirus glycoproteins interact with the nucleocapsid protein. *The Journal of general virology* 91, 2341-2350.
- Hinson, E.R., Shone, S.M., Zink, M.C., Glass, G.E., Klein, S.L., 2004. Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats. *Am J Trop Med Hyg* 70, 310-317.
- Hjelle, B., 1998. Virus detection and identification with genetic tests, in: Schmaljohn, C.C.H.W.L.a.C. (Ed.), *Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome*. WHO Collaborating Center for Virus Reference and

- Research (Hantaviruses), Asian Institute for Life Sciences, Seoul, South Korea, pp. 132-137.
- Hjelle, B., Glass, G.E., 2000. Outbreak of hantavirus infection in the Four Corners region of the United States in the wake of the 1997-1998 El Nino-southern oscillation. *J Infect Dis* 181, 1569-1573.
- Hjelle, B., Jenison, S., Torrez-Martinez, N., Herring, B., Quan, S., Polito, A., Pichuantes, S., Yamada, T., Morris, C., Elgh, F., Lee, H.W., Artsob, H., Dinello, R., 1997. Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. *J Clin Microbiol* 35, 600-608.
- Hjelle, B., Yates, T., 2001. Modeling hantavirus maintenance and transmission in rodent communities. *Curr Top Microbiol Immunol* 256, 77-90.
- Hooper, J.W., Larsen, T., Custer, D.M., Schmaljohn, C.S., 2001. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 289, 6-14.
- Hooper, J.W., Li, D., 2001. Vaccines against hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 256, 171-191.
- Huggins, J.W., 1989. Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 4, S750-761.
- Huggins, J.W., Hsiang, C.M., Cosgriff, T.M., Guang, M.Y., Smith, J.I., Wu, Z.O., LeDuc, J.W., Zheng, Z.M., Meegan, J.M., Wang, Q.N., et al., 1991. Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 164, 1119-1127.
- Hutchinson, K.L., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1996. Sin Nombre virus mRNA synthesis. *Virology* 224, 139-149.
- Hutchinson, K.L., Rollin, P.E., Shieh, W.J., Zaki, S., Greer, P.W., Peters, C.J., 2000. Transmission of Black Creek Canal virus between cotton rats. *J Med Virol* 60, 70-76.
- Jaaskelainen, K.M., Kaukinen, P., Minskaya, E.S., Plyusnina, A., Vapalahti, O., Elliott, R.M., Weber, F., Vaheri, A., Plyusnin, A., 2007. Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter. *J Med Virol* 79, 1527-1536.
- Jaaskelainen, K.M., Plyusnina, A., Lundkvist, A., Vaheri, A., Plyusnin, A., 2008. Tula hantavirus isolate with the full-length ORF for nonstructural protein NSs survives for more consequent passages in interferon-competent cells than the isolate having truncated NSs ORF. *Virol J* 5, 3.

- Jablonski, S.A., Morrow, C.D., 1995. Mutation of the aspartic acid residues of the GDD sequence motif of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase results in enzymes with altered metal ion requirements for activity. *J Virol* 69, 1532-1539.
- Jagger, B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.A., Wills, N.M., Xiao, Y.L., Dunfee, R.L., Schwartzman, L.M., Ozinsky, A., Bell, G.L., Dalton, R.M., Lo, A., Efstathiou, S., Atkins, J.F., Firth, A.E., Taubenberger, J.K., Digard, P., 2012. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science* 337, 199-204.
- Jaksic, F.M., Lima, M., 2003. Myths and facts on ratadas: Bamboo blooms, rainfall peaks and rodent outbreaks in South America. *Austral Ecology* 28, 237-251.
- Jin, M., Park, J., Lee, S., Park, B., Shin, J., Song, K.J., Ahn, T.I., Hwang, S.Y., Ahn, B.Y., Ahn, K., 2002. Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology* 294, 60-69.
- Johnson, A.M., Bowen, M.D., Ksiazek, T.G., Williams, R.J., Bryan, R.T., Mills, J.N., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1997. Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238, 115-127.
- Johnson, A.M., de Souza, L.T., Ferreira, I.B., Pereira, L.E., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1999. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J Med Virol* 59, 527-535.
- Jonsson, C.B., Figueiredo, L.T., Vapalahti, O., 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev* 23, 412-441.
- Kallio, E.R., Poikonen, A., Vaheri, A., Vapalahti, O., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., 2006. Maternal antibodies postpone hantavirus infection and enhance individual breeding success. *Proc Biol Sci* 273, 2771-2776.
- Kallio, E.R., Voutilainen, L., Vapalahti, O., Vaheri, A., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., 2007. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecology* 88, 1911-1916.
- Kallio-Kokko, H., Leveelahti, R., Brummer-Korvenkontio, M., Lundkvist, A., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2001. Human immune response to Puumala virus glycoproteins and nucleocapsid protein expressed in mammalian cells. *J Med Virol* 65, 605-613.
- Kanerva, M., Mustonen, J., Vaheri, A., 1998. Pathogenesis of puumala and other hantavirus infections. *Rev Med Virol* 8, 67-86.

- Kang, H.J., Bennett, S.N., Dizney, L., Sumibcay, L., Arai, S., Ruedas, L.A., Song, J.W., Yanagihara, R., 2009. Host switch during evolution of a genetically distinct hantavirus in the American shrew mole (*Neurotrichus gibbsii*). *Virology* 388, 8-14.
- Kang, H.J., Bennett, S.N., Hope, A.G., Cook, J.A., Yanagihara, R., 2011. Shared ancestry between a newfound mole-borne hantavirus and hantaviruses harbored by cricetid rodents. *J Virol* 85, 7496-7503.
- Kariwa, H., Kimura, M., Yoshizumi, S., Arikawa, J., Yoshimatsu, K., Takashima, I., Hashimoto, N., 1996. Modes of Seoul virus infections: persistency in newborn rats and transiency in adult rats. *Archives of Virology* 141, 2327-2338.
- Kaukinen, P., Vaheri, A., Plyusnin, A., 2003. Non-covalent interaction between nucleocapsid protein of Tula hantavirus and small ubiquitin-related modifier-1, SUMO-1. *Virus research* 92, 37-45.
- Kaukinen, P., Vaheri, A., Plyusnin, A., 2005. Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. *Archives of virology* 150, 1693-1713.
- Kerber, R., Rieger, T., Busch, C., Flatz, L., Pinschewer, D.D., Kummerer, B.M., Gunther, S., 2011. Cross-species analysis of the replication complex of Old World arenaviruses reveals two nucleoprotein sites involved in L protein function. *J Virol* 85, 12518-12528.
- Kilpatrick, E.D., Terajima, M., Koster, F.T., Catalina, M.D., Cruz, J., Ennis, F.A., 2004. Role of specific CD8+ T cells in the severity of a fulminant zoonotic viral hemorrhagic fever, hantavirus pulmonary syndrome. *J Immunol* 172, 3297-3304.
- Klein, S.L., Calisher, C.H., 2007. Emergence and persistence of hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 315, 217-252.
- Klempa, B., Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Auste, B., Aniskin, V., Meisel, H., Denys, C., Koivogui, L., ter Meulen, J., Kruger, D.H., 2006. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis* 12, 838-840.
- Kohl, A., Dunn, E.F., Lowen, A.C., Elliott, R.M., 2004. Complementarity, sequence and structural elements within the 3' and 5' non-coding regions of the Bunyamwera orthobunyavirus S segment determine promoter strength. *The Journal of general virology* 85, 3269-3278.
- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., Steitz, T.A., 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256, 1783-1790.

- Kowalinski, E., Zubieta, C., Wolkerstorfer, A., Szolar, O.H., Ruigrok, R.W., Cusack, S., 2012. Structural analysis of specific metal chelating inhibitor binding to the endonuclease domain of influenza pH1N1 (2009) polymerase. *PLoS Pathog* 8, e1002831.
- Kramski, M., Achazi, K., Klempa, B., Kruger, D.H., 2009. Nephropathia epidemica with a 6-week incubation period after occupational exposure to Puumala hantavirus. *J Clin Virol* 44, 99-101.
- Krautkramer, E., Zeier, M., 2008. Hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome enters from the apical surface and requires decay-accelerating factor (DAF/CD55). *J Virol* 82, 4257-4264.
- Krug, R.M., 1981. Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Current topics in microbiology and immunology* 93, 125-149.
- Kukkonen, S.K., Vaeheri, A., Plyusnin, A., 2004. Tula hantavirus L protein is a 250 kDa perinuclear membrane-associated protein. *The Journal of general virology* 85, 1181-1189.
- Langlois, J.P., Fahrig, L., Merriam, G., Artsob, H., 2001. Landscape structure influences continental distribution of hantavirus in deer mice. *Landscape Ecol* 16, 255-266.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L., Mitch, W.E., 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* 17, 1807-1819.
- LeDuc, J.W., 1987. Epidemiology of Hantaan and related viruses. *Lab Anim Sci* 37, 413-418.
- Lee, H.W., Lee, P.W., Johnson, K.M., 1978. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 137, 298-308.
- Lee, H.W., van der Groen, G., 1989. Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog Med Virol* 36, 62-102.
- Lelke, M., Brunotte, L., Busch, C., Gunther, S., 2010. An N-terminal region of Lassa virus L protein plays a critical role in transcription but not replication of the virus genome. *J Virol* 84, 1934-1944.
- Lesburg, C.A., Cable, M.B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A.F., Weber, P.C., 1999. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 6, 937-943.

- Li, D., Schmaljohn, A.L., Anderson, K., Schmaljohn, C.S., 1995. Complete nucleotide sequences of the M and S segments of two hantavirus isolates from California: evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 206, 973-983.
- Li, X.D., Makela, T.P., Guo, D., Soliymani, R., Koistinen, V., Vapalahti, O., Vaheri, A., Lankinen, H., 2002. Hantavirus nucleocapsid protein interacts with the Fas-mediated apoptosis enhancer Daxx. *The Journal of general virology* 83, 759-766.
- Lober, C., Anheier, B., Lindow, S., Klenk, H.D., Feldmann, H., 2001. The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology* 289, 224-229.
- Lopez, N., Muller, R., Prehaud, C., Bouloy, M., 1995. The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. *J Virol* 69, 3972-3979.
- Luis, A.D., Douglass, R.J., Hudson, P.J., Mills, J.N., Bjornstad, O.N., 2012. Sin Nombre hantavirus decreases survival of male deer mice. *Oecologia*.
- Lyubsky, S., Gavrilovskaya, I., Luft, B., Mackow, E., 1996. Histopathology of *Peromyscus leucopus* naturally infected with pathogenic NY-1 hantaviruses: pathologic markers of HPS viral infection in mice. *Lab Invest* 74, 627-633.
- Mackow, E.R., Gavrilovskaya, I.N., 2009. Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thromb Haemost* 102, 1030-1041.
- Macneil, A., Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., 2011. Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus research* 162, 138-147.
- Madhav, N.K., Wagoner, K.D., Douglass, R.J., Mills, J.N., 2007. Delayed density-dependent prevalence of Sin Nombre virus antibody in Montana deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and implications for human disease risk. *Vector borne and zoonotic diseases* 7, 353-364.
- Martinez, V.P., Bellomo, C., San Juan, J., Pinna, D., Forlenza, R., Elder, M., Padula, P.J., 2005. Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerg Infect Dis* 11, 1848-1853.
- Medina, R.A., Mirowsky-Garcia, K., Hutt, J., Hjelle, B., 2007. Ribavirin, human convalescent plasma and anti-beta3 integrin antibody inhibit infection by Sin Nombre virus in the deer mouse model. *The Journal of general virology* 88, 493-505.

- Medina, R.A., Torres-Perez, F., Galeno, H., Navarrete, M., Vial, P.A., Palma, R.E., Ferres, M., Cook, J.A., Hjelle, B., 2009. Ecology, genetic diversity, and phylogeographic structure of andes virus in humans and rodents in Chile. *J Virol* 83, 2446-2459.
- Mendes, W.S., da Silva, A.A., Aragao, L.F., Aragao, N.J., Raposo Mde, L., Elkhoury, M.R., Suzuky, A., Ferreira, I.B., de Sousa, L.T., Pannuti, C.S., 2004. Hantavirus infection in Anajatuba, Maranhao, Brazil. *Emerg Infect Dis* 10, 1496-1498.
- Merino, C., Arias, A., Castillo, C., 2002. First case of hantavirus cardiopulmonary syndrome secondary to a rodent bite. *Rev Chil Enf Respir*, 199-205.
- Mertz, G.J., Hjelle, B., Crowley, M., Iwamoto, G., Tomicic, V., Vial, P.A., 2006. Diagnosis and treatment of new world hantavirus infections. *Curr Opin Infect Dis* 19, 437-442.
- Mertz, G.J., Miedzinski, L., Goade, D., Pavia, A.T., Hjelle, B., Hansbarger, C.O., Levy, H., Koster, F.T., Baum, K., Lindemulder, A., Wang, W., Riser, L., Fernandez, H., Whitley, R.J., 2004. Placebo-controlled, double-blind trial of intravenous ribavirin for the treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome in North America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 39, 1307-1313.
- Mills, J.N., Ksiazek, T.G., Peters, C.J., Childs, J.E., 1999. Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: a synthesis. *Emerg Infect Dis* 5, 135-142.
- Ministerio de Salud Chile, 2011. Boletín Epidemiológico de Hantavirus. Semana Epidemiológica 1 a 52, 2011
- Mir, M.A., Duran, W.A., Hjelle, B.L., Ye, C., Panganiban, A.T., 2008. Storage of cellular 5' mRNA caps in P bodies for viral cap-snatching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19294-19299.
- Mir, M.A., Panganiban, A.T., 2004. Trimeric hantavirus nucleocapsid protein binds specifically to the viral RNA panhandle. *J Virol* 78, 8281-8288.
- Mir, M.A., Panganiban, A.T., 2006. Characterization of the RNA chaperone activity of hantavirus nucleocapsid protein. *J Virol* 80, 6276-6285.
- Mir, M.A., Panganiban, A.T., 2008. A protein that replaces the entire cellular eIF4F complex. *EMBO J* 27, 3129-3139.
- Moolenaar, R.L., Dalton, C., Lipman, H.B., Umland, E.T., Gallaher, M., Duchin, J.S., Chapman, L., Zaki, S.R., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., et al., 1995. Clinical features that differentiate hantavirus pulmonary syndrome from three other acute respiratory illnesses. *Clin Infect Dis* 21, 643-649.

- Mori, M., Rothman, A.L., Kurane, I., Montoya, J.M., Nolte, K.B., Norman, J.E., Waite, D.C., Koster, F.T., Ennis, F.A., 1999. High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients with fatal hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis* 179, 295-302.
- Morin, B., Coutard, B., Lelke, M., Ferron, F., Kerber, R., Jamal, S., Frangeul, A., Baronti, C., Charrel, R., de Lamballerie, X., Vonnrhein, C., Lescar, J., Bricogne, G., Gunther, S., Canard, B., 2010. The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS Pathog* 6, e1001038.
- Netski, D., Thran, B.H., St Jeor, S.C., 1999. Sin Nombre virus pathogenesis in *Peromyscus maniculatus*. *J Virol* 73, 585-591.
- Ng, K.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E., 2008. Structure-function relationships among RNA-dependent RNA polymerases. *Current topics in microbiology and immunology* 320, 137-156.
- Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., Morzunov, S., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Feldmann, H., Sanchez, A., Childs, J., Zaki, S., Peters, C.J., 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262, 914-917.
- Nolte, K.B., Feddersen, R.M., Foucar, K., Zaki, S.R., Koster, F.T., Madar, D., Merlin, T.L., McFeeley, P.J., Umland, E.T., Zumwalt, R.E., 1995. Hantavirus pulmonary syndrome in the United States: a pathological description of a disease caused by a new agent. *Hum Pathol* 26, 110-120.
- Padula, P., Figueroa, R., Navarrete, M., Pizarro, E., Cadiz, R., Bellomo, C., Jofre, C., Zaror, L., Rodriguez, E., Murua, R., 2004. Transmission study of Andes hantavirus infection in wild sigmodontine rodents. *J Virol* 78, 11972-11979.
- Padula, P.J., Edelstein, A., Miguel, S.D., Lopez, N.M., Rossi, C.M., Rabinovich, R.D., 1998. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 241, 323-330.
- Padula, P.J., Rossi, C.M., Della Valle, M.O., Martinez, P.V., Colavecchia, S.B., Edelstein, A., Miguel, S.D., Rabinovich, R.D., Segura, E.L., 2000. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. *J Med Microbiol* 49, 149-155.
- Padula, P.J., Sanchez, A.J., Edelstein, A., Nichol, S.T., 2002. Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Andes virus and analysis of the variability of the termini of the virus S, M and L RNA segments. *The Journal of general virology* 83, 2117-2122.

- Panganiban, A.T., Mir, M.A., 2009. Bunyavirus N: eIF4F surrogate and cap-guardian. *Cell Cycle* 8, 1332-1337.
- Peters, C.J., Simpson, G.L., Levy, H., 1999. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annu Rev Med* 50, 531-545.
- Plyusnin, A., Horling, J., Kanerva, M., Mustonen, J., Cheng, Y., Partanen, J., Vapalahti, O., Kukkonen, S.K., Niemimaa, J., Henttonen, H., Niklasson, B., Lundkvist, A., Vaheri, A., 1997. Puumala hantavirus genome in patients with nephropathia epidemica: correlation of PCR positivity with HLA haplotype and link to viral sequences in local rodents. *J Clin Microbiol* 35, 1090-1096.
- Plyusnin, A., Kukkonen, S.K., Plyusnina, A., Vapalahti, O., Vaheri, A., 2002. Transfection-mediated generation of functionally competent Tula hantavirus with recombinant S RNA segment. *The EMBO journal* 21, 1497-1503.
- Plyusnin, A., Vapalahti, O., Vaheri, A., 1996. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 77 (Pt 11), 2677-2687.
- Raju, R., Kolakofsky, D., 1987. Unusual transcripts in La Crosse virus-infected cells and the site for nucleocapsid assembly. *J Virol* 61, 667-672.
- Ramanathan, H.N., Jonsson, C.B., 2008. New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology* 374, 138-150.
- Ramsden, C., Holmes, E.C., Charleston, M.A., 2009. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Mol Biol Evol* 26, 143-153.
- Ramsden, C., Melo, F.L., Figueiredo, L.M., Holmes, E.C., Zanotto, P.M., 2008. High rates of molecular evolution in hantaviruses. *Mol Biol Evol* 25, 1488-1492.
- Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Peters, C.J., Compans, R.W., 1998. Role of actin microfilaments in Black Creek Canal virus morphogenesis. *J Virol* 72, 2865-2870.
- Reguera, J., Weber, F., Cusack, S., 2010a. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS Pathog* 6, e1001101.
- Reguera, J., Weber, F., Cusack, S., 2010b. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS Pathog* 6, e1001101.
- Rodriguez, L.L., Owens, J.H., Peters, C.J., Nichol, S.T., 1998. Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 242, 99-106.

- Rusnak, J.M., Byrne, W.R., Chung, K.N., Gibbs, P.H., Kim, T.T., Boudreau, E.F., Cosgriff, T., Pittman, P., Kim, K.Y., Erlichman, M.S., Rezvani, D.F., Huggins, J.W., 2009. Experience with intravenous ribavirin in the treatment of hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Antiviral Res* 81, 68-76.
- Ruusala, A., Persson, R., Schmaljohn, C.S., Pettersson, R.F., 1992. Coexpression of the membrane glycoproteins G1 and G2 of Hantaan virus is required for targeting to the Golgi complex. *Virology* 186, 53-64.
- Safronetz, D., Haddock, E., Feldmann, F., Ebihara, H., Feldmann, H., 2011. In vitro and in vivo activity of ribavirin against Andes virus infection. *PLoS One* 6, e23560.
- Sanchez, A.B., de la Torre, J.C., 2005. Genetic and biochemical evidence for an oligomeric structure of the functional L polymerase of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 79, 7262-7268.
- Sanz-Ezquerro, J.J., de la Luna, S., Ortin, J., Nieto, A., 1995. Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol* 69, 2420-2426.
- Sanz-Ezquerro, J.J., Zurcher, T., de la Luna, S., Ortin, J., Nieto, A., 1996. The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis. *J Virol* 70, 1905-1911.
- Sauvage, F., Langlais, M., Pontier, D., 2007. Predicting the emergence of human hantavirus disease using a combination of viral dynamics and rodent demographic patterns. *Epidemiol Infect* 135, 46-56.
- Schmaljohn, C.S., Nichol, S.T., 2007. *Bunyaviridae*, in: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1746-1751.
- Severson, W., Partin, L., Schmaljohn, C.S., Jonsson, C.B., 1999. Characterization of the Hantaan nucleocapsid protein-ribonucleic acid interaction. *J Biol Chem* 274, 33732-33739.
- Shi, X., Elliott, R.M., 2009. Generation and analysis of recombinant Bunyamwera orthobunyaviruses expressing V5 epitope-tagged L proteins. *The Journal of general virology* 90, 297-306.
- Shrivastava-Ranjan, P., Rollin, P.E., Spiropoulou, C.F., 2010. Andes virus disrupts the endothelial cell barrier by induction of vascular endothelial growth factor and downregulation of VE-cadherin. *J Virol* 84, 11227-11234.

- Simons, J.F., Pettersson, R.F., 1991. Host-derived 5' ends and overlapping complementary 3' ends of the two mRNAs transcribed from the ambisense S segment of Uukuniemi virus. *J Virol* 65, 4741-4748.
- Smallwood, S., Cevik, B., Moyer, S.A., 2002. Intragenic complementation and oligomerization of the L subunit of the sendai virus RNA polymerase. *Virology* 304, 235-245.
- St Jeor, S.C., 2004. Three-week incubation period for hantavirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 23, 974-975.
- Strandin, T., Hepojoki, J., Wang, H., Vaheiri, A., Lankinen, H., 2011. The cytoplasmic tail of hantavirus Gn glycoprotein interacts with RNA. *Virology* 418, 12-20.
- Sutter, G., Ohlmann, M., Erfle, V., 1995. Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett* 371, 9-12.
- Suzan, G., Marce, E., Giermakowski, J.T., Mills, J.N., Ceballos, G., Ostfeld, R.S., Armien, B., Pascale, J.M., Yates, T.L., 2009. Experimental evidence for reduced rodent diversity causing increased hantavirus prevalence. *PLoS One* 4, e5461.
- Taruishi, M., Yoshimatsu, K., Hatsuse, R., Okumura, M., Nakamura, I., Arikawa, J., 2008. Lack of vertical transmission of Hantaan virus from persistently infected dam to progeny in laboratory mice. *Archives of virology* 153, 1605-1609.
- Taylor, S.L., Frias-Staheli, N., Garcia-Sastre, A., Schmaljohn, C.S., 2009. Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin alpha proteins and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced activation of nuclear factor kappa B. *J Virol* 83, 1271-1279.
- Tischler, N.D., Gonzalez, A., Perez-Acle, T., Roseblatt, M., Valenzuela, P.D., 2005. Hantavirus Gc glycoprotein: evidence for a class II fusion protein. *J Gen Virol* 86, 2937-2947.
- Valdivieso, F., Vial, P., Ferres, M., Ye, C., Goade, D., Cuiza, A., Hjelle, B., 2006. Neutralizing antibodies in survivors of Sin Nombre and Andes hantavirus infection. *Emerg Infect Dis* 12, 166-168.
- Vazquez, A.L., Alonso, J.M., Parra, F., 2000. Mutation analysis of the GDD sequence motif of a calicivirus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 74, 3888-3891.
- Vera-Otarola, J., Solis, L., Soto-Rifo, R., Ricci, E.P., Pino, K., Tischler, N., Ohlmann, T., Darlix, J.L., Lopez-Lastra, M., 2011. The Andes Hantavirus NSs protein is expressed from the viral Small mRNA by a leaky scanning mechanism. *J Virol*.
- Vieth, S., Torda, A.E., Asper, M., Schmitz, H., Gunther, S., 2004. Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology* 318, 153-168.

- Vincent, M.J., Quiroz, E., Gracia, F., Sanchez, A.J., Ksiazek, T.G., Kitsutani, P.T., Ruedas, L.A., Tinnin, D.S., Caceres, L., Garcia, A., Rollin, P.E., Mills, J.N., Peters, C.J., Nichol, S.T., 2000. Hantavirus pulmonary syndrome in Panama: identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs. *Virology* 277, 14-19.
- Virtanen, J.O., Jaaskelainen, K.M., Djupsjobacka, J., Vaheri, A., Plyusnin, A., 2010. Tula hantavirus NSs protein accumulates in the perinuclear area in infected and transfected cells. *Archives of virology* 155, 117-121.
- Wang, H., Alminait, A., Vaheri, A., Plyusnin, A., 2010. Interaction between hantaviral nucleocapsid protein and the cytoplasmic tail of surface glycoprotein Gn. *Virus research* 151, 205-212.
- Wang, H., Strandin, T., Hepojoki, J., Lankinen, H., Vaheri, A., 2009. Degradation and aggresome formation of the Gn tail of the apathogenic Tula hantavirus. *The Journal of general virology* 90, 2995-3001.
- Weber, F., Dunn, E.F., Bridgen, A., Elliott, R.M., 2001. The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virology* 281, 67-74.
- Weiss, R.A., McMichael, A.J., 2004. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nat Med* 10, S70-76.
- Wells, R.M., Sosa Estani, S., Yadon, Z.E., Enria, D., Padula, P., Pini, N., Gonzalez Della Valle, M., Mills, J.N., Peters, C.J., 1998. Seroprevalence of antibodies to hantavirus in health care workers and other residents of southern Argentina. *Clin Infect Dis* 27, 895-896.
- Wells, R.M., Sosa Estani, S., Yadon, Z.E., Enria, D., Padula, P., Pini, N., Mills, J.N., Peters, C.J., Segura, E.L., 1997. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerg Infect Dis* 3, 171-174.
- Williams, R.J., Bryan, R.T., Mills, J.N., Palma, R.E., Vera, I., De Velasquez, F., Baez, E., Schmidt, W.E., Figueroa, R.E., Peters, C.J., Zaki, S.R., Khan, A.S., Ksiazek, T.G., 1997. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome in western Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* 57, 274-282.
- Yates, T.L., Mills, J.N., Parmenter, C.A., Ksiazek, T.G., Parmenter, R.R., Vande Castle, J.R., Calisher, C.H., Nichol, S.T., Abbott, K.D., Young, J.C., Morrison, M.L., Beaty, B.J., Dunn, J.L., Baker, R.J., Salazar-Bravo, J., Peters, C.J., 2002. The ecology and

- evolutionary history of an emergent disease: Hantavirus pulmonary syndrome. *Bioscience* 52, 989-998.
- Ye, C., Prescott, J., Nofchissey, R., Goade, D., Hjelle, B., 2004. Neutralizing antibodies and Sin Nombre virus RNA after recovery from hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Emerg Infect Dis* 10, 478-482.
- Young, J.C., Hansen, G.R., Graves, T.K., Deasy, M.P., Humphreys, J.G., Fritz, C.L., Gorham, K.L., Khan, A.S., Ksiazek, T.G., Metzger, K.B., Peters, C.J., 2000. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 62, 714-717.
- Zaki, S.R., Greer, P.W., Coffield, L.M., Goldsmith, C.S., Nolte, K.B., Foucar, K., Feddersen, R.M., Zumwalt, R.E., Miller, G.L., Khan, A.S., et al., 1995. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 146, 552-579.
- Zamoto-Niikura, A., Terasaki, K., Ikegami, T., Peters, C.J., Makino, S., 2009. Rift valley fever virus L protein forms a biologically active oligomer. *J Virol* 83, 12779-12789.
- Zhang, Y., Li, X.H., Jiang, H., Huang, C.X., Wang, P.Z., Mou, D.L., Sun, L., Xu, Z., Wei, X., Bai, X.F., 2008. Expression of L protein of Hantaan virus 84FLi strain and its application for recovery of minigenomes. *Apmis* 116, 1089-1096.

6 Anhang

6.1 Oligonukleotide

Klonierung pCITE-ANDV-L

Teil A

L-PartA-513-F-P AACACCATGGAAAAGTATAGAGAGAT
 L-PartA-1491-R AAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGTACTGGTGTCTTCTGGTTG
 L-PartA-1491-F CAACCAGAAACACCAGTACACCTGCAGGCATGCAAGCTTT
 L-PartA-493-R ATCATCGTGTTTTTCAAAGGAA

Teil B

L-PartB-549-F-P TCAGAAATTACAACAAGCACCTGCAGGCATGCAAGCTTT
 L-PartB-2506-R AAAGCTTGCATGCCTGCAGGGTGTCTTGTGTAATTTCTGA
 L-PartB-2506-F TCAGAAATTACAACAAGCACCTGCAGGCATGCAAGCTTT
 L-PartB-529-R GATCCGATATCCATATGGGT

Teil C

L-PartC-513-F-P AAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCTTACTCTGATTGTTTTAA
 L-PARTC-2517-R AAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCTTACTCTGATTGTTTTAA
 L-PartC-2517-F TTAACAATCAGAGTAAGACCTGCAGGCATGCAAGCTTT
 L-PartA-493-R ATCATCGTGTTTTTCAAAGGAA

Teil D

L-PartD-513-F-P AACACCATGGAGTTCTAAATATTCAGAATG
 L-PartD-2259-R AAAGCTTGCATGCCTGCAGGAACACTACAATATACATACT
 L-PartD-2259-F AGTATGTATATTGTAGTGTCTCCTGCAGGCATGCAAGCTTT
 L-PartA-493-R ATCATCGTGTTTTTCAAAGGAA

Klonierung pCITE-GPC-HA

Teil A

AND-GP-1-F ATGGAAGGGTGGTATCTGGTTG
 AND-GP-1739-R GCATGCCTGCAGGTTCGATCGGGCACTTTCAGTTGCTTCAG
 AND-GP-1739-F CTGAAGCAACTGAAAGTGCCCGATCGACCTGCAGGCATGC
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTTTTTC

Teil B

AND-GP-1681-F CTTGAATCACATAGACAGAG
 AND-GP-3395-R GTCCGGGACGTCGTACGGGTAGACAGTTTTCTTGTGCCCTC
 AND-GP-3395-F GAGGGCACAAGAAAAGTGTCTACCCGTACGACGTCCCGGAC

Klonierung pCITE-N

NP-516-F-P ACTCCGGACCATGAGCACCTCCAA
 NP-1844-R AAAGCTTGCATGCCTGCAGGATGTGGCACAAGCCCGGAAA

NP-1844-F TTTCCGGGCTTGTGCCACATCCTGCAGGCATGCAAGCTTT
 NP-496-R GTTATCATCGTGTITTTTCAA

Klonierung pCITE-NSS-HA

Nss-C-HA-498-F GAAAAACACGATGATAACACCATGCCGAGAAGGCAGTGGA
 Nss-C-HA-688-R CATCGTATGGGTAGATGATCATCAGGCTCAAGC
 pCITE-HA-F-P TTCCAGATTACGCTTAGCCTGCAGGCATGCAAGCTT
 NSS-C-HA-498-R TCCACTGCCTTCTCGGCATGGTGTATCATCGTGTITTTTC

Klonierung pCITE-ANDV-L-HA

L-C-HA-F GACCCTGTATCAACATTCTATTACCCGTACGACGTCCCGGAC
 L-C-HA-R GTCCGGGACGTTCGTACGGGTAATAGAATGTTGATACAGGGTC

Klonierung pCITE-ANDV-L-Flag

L-C-Flag-6990-F-P GACGACGATAAGTAGCCTGCAGGCATGCAAGC
 L-C-Flag-6958-R ATCCTTGTAATCATAGAATGTTGATACAGGGT

Klonierung DN 961

L-Ntrunk-F CCATGGCAAGTGCTGATGCCACAAAATGGTCAC
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTITTTTC

Klonierung DN 691

AND-L-Nco-2589-F CACCATGGTTGATCACTCCACGGTC
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTITTTTC

Klonierung DN 212

AND-L-Nco-1152-F CACCATGGGAAACTTAAAGTTCCATGTA
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTITTTTC

Klonierung DN 193

AND-L-Nco-1095-F CACCAATGGGATATGTCAGAGAGCATTTA
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTITTTTC

Klonierung DN 74

AND-L-Nco-737-F CACCATGGAGAAGAAGATTATAC
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTITTTTC

Klonierung DN 45

AND-L-Nco-652-F CACCATGGACTGGTCTGATAATAAAG
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTITTTTC

Klonierung DN 12

AND-L-Nco-555-F CACCATGGACCTTGACCTGGAACG
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTITTTTC

Klonierung DC**1619**

pUC_fwd_(-110) TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCA
 ANDV-LA-HA-R GACTCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAATCTTTAAATACTGTGAA
 AT

Klonierung DC**1052**

pUC_fwd_(-110) TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCA
 ANDV-LB-HA-R GACTCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATGCATCATCTGAATGATG
 TG

Klonierung DC 586

pUC_fwd_(-110) TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCA
 ANDV-LC-HA-R GACTCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATGCCTTATATAAATAGTGG
 TG

Klonierung L-Opt1

L-Opt1-F ATACCATGGAGAAATACCGGGAAA
 L-Opt1-Fus-R CTTTATTATCAGACCAGTCGTGCTTGATCATTGATCC
 L-Opt1-Fus-F GGATCAAATG ATCAAGCACG ACTGGTCTGA TAATAAAG
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTTTTTC

Klonierung L-Opt2

L-Opt2-F ATACCATGGAGAAGTACCGCGAGA
 L-Opt2-Fus-R GGACCAGATGATCAAGCACGACTGGTCTGATAATAAAG
 L-Opt2-Fus-F CTTTATTATCAGACCAGTCGTGCTTGATCATCTGGTCC
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTTTTTC

Klonierung ANDV Minigenom

MG-3'UTR-21147-F ATCATGATTTTCATTAAGCACTTACTGCTCGTTCTTCAGCA
 MG-3'UTR-632-R CTATAGTGAGTCGTATTAAGCT
 MG-3'UTR-652-F-P TAGTAGTATGCTCCTTGAAAAGC
 MG-3'UTR-1147-R TGCTGAAGAACGAGCAGTAAGTGCTTAATGAAATCATGAT
 MG-5'UTR-2150-F CTTCTCAAGGAGTCTACTACTAGGGTCGGCATGGCATCTC
 MG-5'UTR-2110-R CTACTGCTGCGAAAGCTGGAATGGCTTCCAAGGTGTACGA

Herstellung Minigenom-Segmente mittels PCR

pUC_fwd_(-110) TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCA
 MG-2150-R CTTCTCAAGGAGTCTACTACTA

Klonierung SNV DC 1619

SNV-LA-519-F ATGGAAAAATATAGAGAGATTC
 SNV-LTA-HA-R GGACTCTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAATCTTTGAATACTGTAA
 AATA
 SNV-LTA-HA-F TATTTTACAGTATTCAAAGATTACCCATAGATGTTCCAGATTACGCTTAGAG
 TCC
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTTTTTTC

Mutagenese SNV DC 1619

SNV-L-K44A-F GTAGTTGATCAACTGATCGCGCATGATTGGTCTGATAATAAG
 SNV-L-K44A-R CTTATTATCAGACCAATCATGCGCGATCAGTTGATCAACTAC

Klonierung PUUV DC 1619

PUU-L-1-F GACCATGGAGAAATACAGAGATATTC
 PUU-LTA-1600-R CTGGAACATCGTATGGGTATTCCTTAAATACAGTAAAGAAC
 PUU-LTA-1600-F GTTCTTTACTGTATTTAAGGAATACCCATACGATGTTCCAG
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTTTTTTC

Mutagenese PUUV DC 1619

PUU-L-K44A-F GTAGACCAGATGATAGCACATGACTGGTCTGAC
 PUU-L-K44A-R GTCAGACCAGTCATGTGCTATCATCTGGTCTAC

Klonierung HTNV DC 1619

HTN-L-1-F GACCATGGATAAATATAGAGAAATTC
 HTN-LTA-1600-R CTGGAACATCGTATGGGTATATTCTGAAAACGTAAATGAAC
 HTN-LTA-1600-F GTTCATTACAGTTTTTCAGAATATACCCATACGATGTTCCAG
 pCITE-498-R-P GGTGTTATCATCGTGTTTTTTC

Mutagenese HTNV DC 1619

HTN-L-K44A-F GTAGACCAAATGATTGCGCATGACTGGTCTG
 HTN-L-K44A-R CAGACCAGTCATGCGCAATCATTTGGTCTAC

Mutagenese ANDV-L

L-X2-6A-F CACGATGATAACACCATGGCAGCCGAGCCGCAATTCATCAGAGAGTTAGG
 G
 L-X2-6A-R CCCTAACTCTCTGATGAATTGCGGCTGCGGCTGCCATGGTGTATCATCGTG
 L-X7-11A-F CATGGAAAAGTATAGAGAGGCAGCCGAGCCGCAAGGGACCTTGCACCTG
 GAA
 L-X7-11A-R TTCCAGGTGCAAGGTCCCTTGC GGCTGCGGCTGCCTCTCTATACTTTTCCATG
 L-X12-14A-F GAGAGATTCATCAGAGAGTTGCCGAGCCGCACCTGGAACGGTATCAGC
 L-X12-14A-R GCTGATACCGTTCCAGGTGCGGCTGCGGCAACTCTCTGATGAATCTCTC

L-X16-20A-F GAGAGTTAGGGACCTTGCAGCCGCAGCCGCAGCCGCATTAGAATGCATAGATC
TC

L-X16-20A-R GATCTATGCATTCTAATGCGGCTGCGGCTGCGGCTGCAAGGTCCCTAACTCT
C

L-X22-26A-F CACCTGGAACGGTATCAGCATTAGAATGCATAGATCTACTGGATAGGCTCT
ACGC

L-X22-26A-R GCGTAGAGCCTATCCAGTAGATCTATGCATTCTAATGCTGATACCGTTCCAG
GTG

L-X27-31A-F CAGCATTAGAATGCATAGATGCAGCCGCAGCCGCATACGCTGTCAGACATG
ACC

L-X27-31A-R GGTCATGTCTGACAGCGTATGCGGCTGCGGCTGCATCTATGCATTCTAATGC
TG

L-X32-36A-F AGATCTACTGGATAGGCTCGCAGCCGCAGCCGCAGACCTGGTTGACCAGAT
GA

L-X32-36A-R TCATCTGGTCAACCAGGTCTGCGGCTGCGGCTGCGAGCCTATCCAGTAGATC
T

L-X37-41A-F GCTCTACGCTGTCAGACATGACCTGGTTGACCAGATGATAAAACATGACTG
GTC

L-X37-41A-R GACCAGTCATGTTTTATCATCTGGTCAACCAGGTCATGTCTGACAGCGTAGA
GC

L-X42-46A-F CATCTTTATTATCAGACCAGTCATGTTTTATCATCTGGTCAACCAGGTCATGT
C

L-X42-46A-R GACATGACCTGGTTGACCAGATGATAAAACATGACTGGTCTGATAATAAAG
ATG

L-P16A-F GACCTTGCAGCTGGAACGGTATCAGC

L-P16A-R GCTGATACCGTTCCAGCTGCAAGGTC

G17A-F GACCTTGCACCTGCAACGGTATCAGC

G17A-R GCTGATACCGTTGCAAGGTGCAAGGTC

L-T18A-F CCTTGCACCTGGAGCGGTATCAGCATTAG

L-T18A-R CTAATGCTGATACCGCTCCAGGTGCAAGG

L-V19A-F GCACCTGGAACGGCATCAGCATTAG

L-V19A-R CTAATGCTGATGCCGTTCCAGGTGC

L-S20A-F CTGGAACGGTAGCAGCATTAGAATGC

L-S20A-R GCATTCTAATGCTGCTACCGTTCCAG

L-L27A-F CATTAGAATGCATAGATGCACTGGATAGGCTC

L-L27A-R GAGCCTATCCAGTGCATCTATGCATTCTAATG

L-L28A-F GAATGCATAGATCTAGCTGATAGGCTCTAC

L-L28A-R GTAGAGCCTATCAGCTAGATCTATGCATTC

L-D29A-F CATAGATCTACTGGCTAGGCTCTACGC

L-D29A-R GCGTAGAGCCTAGCCAGTAGATCTATG

L-R30A-F GATCTACTGGATGCGCTCTACGCTGTC

L-R30A-R GACAGCGTAGAGCGCATCCAGTAGATC
L-L31A-F GATCTACTGGATAGGGCCTACGCTGTCAGAC
L-L31A-R GTCTGACAGCGTAGGCCCTATCCAGTAGATC
L-Y32A-F CTA CTGGATAGGCTCGCCGCTGTCAGACATGAC
L-Y32A-R GTCATGTCTGACAGCGGCGAGCCTATCCAGTAG
L-V34A-F GGATAGGCTCTACGCTGCCAGACATGACCTGG
L-V34A-R CCAGGTCATGTCTGGCAGCGTAGAGCCTATCC
L-R35A-F GGCTCTACGCTGTCGCACATGACCTGGTTGAC
L-R35A-R GTCAACCAGGTCATGTGCGACAGCGTAGAGCC
L-H36A-F GCTCTACGCTGTCAGAGCTGACCTGGTTGACC
L-H36A-R GGTC AACCAGGTCAGCTCTGACAGCGTAGAGC
L-D37A-F CTACGCTGTCAGACATGCCCTGGTTGACCAGATG
L-D37A-R CATCTGGTCAACCAGGGCATGTCTGACAGCGTAG
L38A-F CTGTCAGACATGACGCGTTGACCAGATGATAAAAC
L38A-R GTTTTATCATCTGGTCAACC GCGTCATGTCTGACAG
L-V39A-F CAGACATGACCTGGCTGACCAGATGATAAAAC
L-V39A-R GTTTTATCATCTGGTCAGCCAGGTCATGTCTG
D40A-F GACATGACCTGGTTGCCAGATGATAAAACATG
D40A-R CATGTTTTATCATCTGGGCAACCAGGTCATGTC
L-Q41A-F GACATGACCTGGTTGACGCGATGATAAAACATGACTG
L-Q41A-R CAGTCATGTTTTATCATCGCGTCAACCAGGTCATGTC
L-M42A-F GACCTGGTTGACCAGGCGATAAAACATGACTG
L-M42A-R CAGTCATGTTTTATCGCCTGGTCAACCAGGTC
I43A-F GGTTGACCAGATGGCAAACATGACTGGTCTG
I43A-R CAGACCAGTCATGTTTTGCCATCTGGTCAACC
K44A-F GACCAGATGATAGCACATGACTGGTC
L-K44A-R GACCAGTCATGTGCTATCATCTGGTC
H45A-F CCAGATGATAAAAGCTGACTGGTCTGATAATAAAG
H45A-R CTTTATTATCAGACCAGTCAGCTTTTATCATCTGG
D46A-F GATGATAAAACATGCCTGGTCTGATAATAAAG
D46A-R CTTTATTATCAGACCAGGCATGTTTTATCATC
L-K44F-F CTGGTTGACCAGATGATATTCCATGACTGGTCTG
L-K44F-R CAGACCAGTCATGGAATATCATCTGGTCAACCAG
L-K44P-F GGTTGACCAGATGATACCACATGACTGGTCTG
L-K44P-R CAGACCAGTCATGTGGTATCATCTGGTCAACC
L-K44S-F GGTTGACCAGATGATATCACATGACTGGTCTG
L-K44S-R CAGACCAGTCATGTGATATCATCTGGTCAACC
L-K44Q-F GGTTGACCAGATGATACAACATGACTGGTCTG
L-K44Q-R CAGACCAGTCATGTTGTATCATCTGGTCAACC
L-K44E-F GGTTGACCAGATGATAGAACATGACTGGTCTG
L-K44E-R CAGACCAGTCATGTTCTATCATCTGGTCAACC

L-K44R-F GACCAGATGATAAGACATGACTGGTC
L-K44R-R GACCAGTCATGTCTTATCATCTGGTC
L-P96A-F CTTTTTCCGAATGACAGCAGATAATTATAAAATTAC
L-P96A-R GTAATTTTATAATTATCTGCTGTCATTCGGAAAAAG
L-D97A-F CCGAATGACACCAGCTAATTATAAAATTACAG
L-D97A-R CTGTAATTTTATAATTAGCTGGTGTTCATTCGG
L-E110A-F GATTGAGTTTATTGCAGTACTGTAACAGCTG
L-E110A-R CAGCTGTTACAGTCACTGCAATAAACTCAATC
L-K127A-F GGGAGAAGAAAATAGCGTATGAAGGAGGCCTC
L-K127A-R GAGGCCTCCTTCATACGCTATTTTCTTCTCCC
L-P96A-D97A-F CTTTTTCCGAATGACAGCAGCTAATTATAAAATTAC
L-P96A-D97A-R GTAATTTTATAATTAGCTGCTGTCATTCGGAAAAAG
E23A-F GTATCAGCATTAGCATGCATAGATCTAC
E23A-R GTAGATCTATGCATGCTAATGCTGATAC
D49A-F CATGACTGGTCTGCTAATAAAGATGTAG
D49A-R CTACATCTTTATTAGCAGACCAGTCATG
N50A-F CATGACTGGTCTGATGCTAAAGATGTAGAAAG
N50A-R CTTTCTACATCTTTAGCATCAGACCAGTCATG
K51A-F CTGGTCTGATAATGCAGATGTAGAAAGAC
K51A-R GTCTTTCTACATCTGCATTATCAGACCAG
K76A-F CAAGGCATGGAGGCGAAGATTATACC
K76A-R GGTATAATCTTCGCCTCCATGCCTTG
N98A-F GAATGACACCAGATGCTTATAAAATTACAG
N98A-R CTGTAATTTTATAAGCATCTGGTGTTCATTC
D116A-F GACTGTAACAGCTGCTGTGTACGAGG
D116A-R CCTCGTGACACAGCAGCTGTTACAGTC
E123A-F CGAGGTATTAGGGCGAAGAAAATAAAG
E123A-R CTTTATTTTCTTCGCCCTAATACCTCG
K124A-F GAGGTATTAGGGAGGCGAAAATAAAGTATG
K124A-R CATACTTTATTTTCGCCTCCCTAATACCTC
D164A-F GCAGTTAAAACAGCTGGATCAAACATC
D164A-R GATGTTTGATCCAGCTGTTTAACTGC
N167A-F CAGATGGATCAGCCATCTCGACTCAG
N167A-R CTGAGTCGAGATGGCTGATCCATCTG
Q171A-F CAAACATCTCGACTGCGTGGCCCAGTCGG
Q171A-R CCGACTGGGCCACGCAGTCGAGATGTTTG
R176A-F GTGGCCCAGTCGGGCGAACGATGGGGTAG
R176A-R CTACCCCATCGTTCGCCCGACTGGGCCAC
Q182A-F CGATGGGGTAGTTGCGCACATGCGTCTAG
Q182A-R CTAGACGCATGTGCGCAACTACCCCATCG
R185A-F GTTCAGCACATGGCTCTAGTCCAAGCTG

R185A-R	CAGCTTGGACTAGAGCCATGTGCTGAAC
Q188A-F	CATGCGTCTAGTCGCAGCTGATATAAATTATG
Q188A-R	CATAATTTATATCAGCTGCGACTAGACGCATG
R195A-F	GATATAAATTATGTCGCAGAGCATTTAATAAAG
R195A-R	CTTTATTAATGCTCTGCGACATAATTTATATC
N212A-F	GGAGGCAATGTTTGCTTAAAGTTCCATG
N212A-R	CATGGAAC TTAAAGCAAACATTGCCTCC
K214A-F	CAATGTTTAACTTAGCGTTCCATGTATCAG
K214A-R	CTGATACATGGAACGCTAAGTTAAACATTG

Real-time RT-PCR-Primer ANDV-L

ANDVLF75	TTGCACCTGGAACGGTATC
ANDVLR292	TGTCCAGAAGGGCTATTTGG

Real-time RT-PCR-Primer FF-Luc

FF-Luc-F	AGATCGTGGATTACGTCGCCAG
FF-Luc-R	TGCGTCCAGTTTTCCGGTAAG

Real-time RT-PCR-Primer Ren-Luc

Renilla-F	GACAAGATCAAGGCCATCGTCC
Renilla-R	GCACCATTTTCTCGCCCTCTTC

Herstellung Renilla-Antisense-Sonde

Ren-001-plus	ATGGCTTCCAAGGTGTACGACCCCG
Ren-935-T7(-)	ATTTGTAATACGACTCACTATAGGGACTGCTCGTTCTTCAGCACGCGCT

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Eurofins Operon synthetisiert. Alle Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

6.2 Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin

I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

6. 3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Acc.	Accession-Nummer
ad	zu
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
µM	Mikromol pro Liter
AK	Antikörper
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cDNA	Komplementäre DNA

cm ²	Quadratcentimeter
d	Durchmesser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dH ₂ O	destilliertes Wasser
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
FF	Firefly-Luziferase
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
Gc	C-terminales Spaltprodukt des Glykoproteinvorläufers
Gn	N-terminales Spaltprodukt des Glykoproteinvorläufers
GMEM	Glasgow Minimum Essential Medium
h	Stunde
IRES	Interne ribosomale Bindestelle
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
M	mol pro liter
mA	Miliampere
min	Minuten
mJ	Milijoule
ml	Milliliter
mM	Milimol pro Liter
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVA	modifiziertes Vaccinia-Virus Ankara
nm	Nanometer
N	Nukleoprotein
nt	Nukleotide
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymeraseketteneaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentraion
RdRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
Ren	Renilla-Luziferase
RLU	Relative Lichteinheiten
pmol	Picomol
RLU	Relative Luciferase-Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCID	<i>Tissue culture infective dose</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt

6.4 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Patrick Heinemann
 Geburtsdatum: 02.04.1981
 Geburtsort: Marsberg
 Anschrift: Hopfenstr. 2
 20359 Hamburg

Studium:

Seit 04/2008 Promotion am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Abteilung für Virologie zum Thema „Expression und Charakterisierung des Andes-Virus L-Proteins

10/2002-9/2007 Philipps Universität Marburg, Studium Diplom-Biologie
 Hauptfächer: Virologie, Parasitologie, Mikrobiologie

Diplomarbeit am Universitätsklinikum Marburg, Institut für Virologie
 Thema: Interaktion und Oligomerisierung von Glykoproteindomänen des Lassa-Virus, Betreuer: Prof. W. Garten

Berufsausbildung:

2000-2002 Berufskolleg Olsberg, Ausbildung zum Biologisch-technischen Assistenten

Schulbildung:

1987 – 1991 Katholische Grundschule Marsberg
 1991 – 2000 Carolus Magnus Gymnasium Marsberg, Abschluss: Abitur

6.5 Wissenschaftliche Publikationen

Heinemann, P., Schmidt-Chanasit, J., Guenther S., in press. The N terminus of Andes Virus L Protein Suppresses mRNA and Protein Expression in Mammalian Cells. *J Virol*.

Schmidt-Chanasit, J., Bialonski, A., Heinemann, P., Ulrich, R.G., Guenther, S., Rabenau, H.F., Doerr, H.W., 2010. A 12-year molecular survey of clinical herpes simplex virus type 2 isolates demonstrates the circulation of clade A and B strains in Germany. *J Clin Virol* 48, 208-211.

Schmidt-Chanasit, J., Bialonski, A., Heinemann, P., Ulrich, R.G., Günther, S., Rabenau, H.F., Doerr, H.W., 2009. A 10-year molecular survey of herpes simplex virus type 1 in Germany demonstrates a stable and high prevalence of genotypes A and B. *J Clin Virol* 44, 235-237.

Schmidt-Chanasit, J., Olschlager, S., Bialonski, A., Heinemann, P., Bleyemehl, K., Gross, G., Guenther, S., Ulrich, R.G., Doerr, H.W., 2009. Novel approach to differentiate subclades of varicella-zoster virus genotypes E1 and E2 in Germany. *Virus Res* 145, 347-349.

6.6 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 _____

Patrick Heinemann