

Wirkung von Cytokinen und cytokininduzierten Proteinen auf die Replikation von Lassa-Virus und Lymphocytärem Choriomeningitis Virus

vorgelegt dem

Fachbereich 2 (Biologie / Chemie) der

Universität Bremen

als Dissertation zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Juni 2003

vorgelegt von

Marcel Asper

Tag des öffentlichen Kolloquiums: 24. Juli 2003 (Universität Bremen)

Gutachter der Dissertation:

1. Prof. Dr. rer. nat. Angelika Vallbracht

Universität Bremen, FB 2

2. Prof. Dr. med. Herbert Schmitz

Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	1
2.	Akürzungsverzeichnis	3
3.	Einleitung	4
3.1	Die Arenaviren	4
3.1.1	Die Familie der Arenaviridae	4
3.1.2	Molekularbiologie der Arenaviren	4
3.1.3	Transmission von Arenaviren	7
3.1.4	Die LCMV-Infektion des Menschen	7
3.1.5	Die LCMV-Infektion der Callitrichidae - Callitrichid-Hepatitis	8
3.1.6	Die Lassa-Virusinfektion des Menschen - das Lassa-Fieber	9
3.2	Cytokine	11
3.2.1	Cytokininduzierte Proteine: Protein der Promyelozytenleukämie (PML) und Sp100	12
3.2.2	Einfluß von PML / Sp100 auf die Virusreplikation	14
3.3	Aufgabenstellung	14
4.	Material und Methoden	16
4.1	Material	16
4.1.1	Primersequenzen	16
4.1.2	Antikörper	17
4.1.3	Plasmide	17
4.1.4	Zellen	18
4.1.5	Virusstämme	18
4.1.6	Primäre Materialien von Tier und Mensch	18
4.1.7	Kits	19
4.1.8	Puffer und Lösungen	19
4.2	Methoden	21
4.2.1	Epidemiologische Basisdaten der Affen-Kolonie	21
4.2.2	Zellbiologie und Virologie	21
4.2.3	Molekularbiologie	32
5.	Resultate	40
5.1	Untersuchung eines Callitrichid-Hepatitis-Ausbruchs	40
5.1.1	Klinik und Histopathologie	40
5.1.2	Nachweis einer LCMV-Infektion durch RT-PCR und Isolierung eines neuen LCMV-Stammes aus Callitrichiden	42
5.1.3	Molekulare und phylogenetische Charakterisierung der LCMV-CH-Isolate	45
5.2	Isolierung von drei neuen Lassa-Virusstämmen aus humanen Primärmaterialien	50
5.2.1	Anzucht von Lassa-Virus Isolaten	51
5.2.2	Elektronenmikroskopischer Nachweis der Lassa-Virus Replikation	54
5.3	Etablierung von Testverfahren zur Quantifizierung von Lassa-Virus und LCMV	56
5.3.1	Korrelation von RT-PCR und Immunfocus-Assay und Bestimmung der RNA-Kopien pro infektiöser Einheit	60
5.3.2	Replikationskinetik der Lassa- und LCM-Virusstämme auf HuH7- bzw. Vero-Zellen	62
5.3.3	Effizienzbestimmung der RNA-Extraktion mit Diatomeenerde.	64
5.4	Untersuchungen zur physikalischen Stabilität und Lagerung von Proben	65
5.4.1	Viruslagerung	65
5.4.2	Thermische Inaktivierung	67

5.5	Einfluß von Cytokinen	69
5.5.1	Der Einfluß von Cytokinen auf die Vitalität von HuH7- und Vero-Zellen	69
5.5.2	Einfluß von Cytokinen auf das Vesikuläre Stomatitis Virus	70
5.5.3	Kontrolle der TNF- α Reaktionswege in HuH7- und Vero-Zellen	72
5.5.4	Einfluß von TNF- α , IFN- α und IFN- γ auf den Titer von Lassa-Virus- und LCMV-Stämmen	74
5.5.5	Einfluß von Cytokinen auf das Verhältnis von RNA-Molekülen zu infektiöser Einheit	80
5.5.6	Bestimmung der intrazellulären Lassa-NP Moleküle per Western-Blot	81
5.5.7	Einfluß von Cytokinen während der initialen Infektionsphase	81
5.7	Einfluß der PML- und Sp100-Überexpression auf die Replikation von Lassa-Virus und LCMV	85
5.7.1	Der Einfluß von PML- und Sp100-Überexpression auf die Replikation von VSV	87
5.7.2	Einfluß der PML-Überexpression auf die Replikation von Arenaviren	89
5.7.3	Einfluß der Sp100-Überexpression auf die Replikation von Arenaviren	92
6.	Diskussion	96
6.1	Isolierung und charakterisierung neuer LCMV- und Lassa-Virusstämme	96
6.2	Einfluß von Cytokinen	103
6.3	Wirkung der Cytokin-induzierten Proteine PML und Sp100 auf die Lassa-Virus und LCMV-Replikation	107
6.4	Ausblick	109
7.	Zusammenfassung	110
8.	Literatur- und Quellenverzeichnis	111
9.	Danksagung	121
10.	Anhang	122
10.1	Publikationsliste	122
10.2	Lebenslauf	123
10.3	Erklärung zur Dissertation	124

2. Akürzungsverzeichnis

abs.	absolut
AK	Antikörper
BNI	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
bp	Basenpaar
BSL	Bio Safety Level
CH	Callitrichid-Hepatitis
cp	<i>centipoises</i>
CPE	Cytopathischer Effekt
GAS	<i>Interferon-g activation site</i>
GPC	Glykoprotein Vorläufer
h	Stunde
HPI	Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie an der Universität Hamburg
IFN	Interferon
IFU	Immunfocus-Forming-Unit
ISRE	<i>Interferon-stimulated response element</i>
LCMV	Virus der Lymphozytären Choriomeningitis
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min.	Minute
ML	<i>maximum likelihood</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NJ	<i>neighbour joining</i>
NP	Nukleoprotein
p.a.	<i>per analysis</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PFU	Plaque-forming Unit
PML	Protein der Promyelozytenleukämie
RT	Reverse Transkription
RTemp.	Raumtemperatur
sec.	Sekunde
Tet	Tetracyclin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	Units
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus

3. Einleitung

3.1 Die Arenaviren

3.1.1 Die Familie der Arenaviridae

Die Familie der *Arenaviridae* umfasst 19 unterschiedliche Virusspezies, wobei sechs Spezies als humanpathogen gelten (CLEGG *et al.*, 2002, MCCORMICK *et al.*, 2002). Die Einteilung der Arenaviren erfolgt aufgrund ihres geografischen Vorkommens in Altwelt und Neuwelt-Viren. Zu den Altwelt-Viren gehören das Lassa-Virus und das Lymphocytäre Choriomeningitis Virus (LCMV), zu den Neuwelt-Viren u.a. Pichinde-, Junin-, Machupo- und Guanarivovirus. Der Name "Arenavirus" resultiert von den im Elektronenmikroskop körnig oder sandig (lat., *arenosus*) erscheinenden, pleomorphen Partikeln. Die granuläre Struktur wird vermutlich von Ribosomen gebildet, die bei der Morphogenese inkorporiert werden. Arenaviren persistieren in chronisch und asymptomatisch infizierten Nagetieren und können von diesen auf den Menschen übertragen werden. Das zuerst isolierte Arenavirus war 1933 LCMV. In den 60er Jahren folgten dann weitere Viren, die die gleiche Morphologie und ähnliche immunologische Eigenschaften besaßen. Auffällig war, daß einige dieser Viren schwere Hämorrhagien mit einer Letalität von bis zu 30% verursachten, andere hingegen für den Menschen nicht pathogen zu sein schienen (PETERS *et al.*, 1996; CLEGG, 2002).

3.1.2 Molekularbiologie der Arenaviren

Arenaviren sind umhüllte Viren mit einem mittleren Durchmesser von 92 nm (62 bis 150 nm) (BUCHMEIER, 2002). Das RNA-Genom besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen. Die S-RNA (*small*)- und L-RNA (*large*)-Moleküle enthalten jeweils zwei Gene, die in ambisens-Orientierung vorliegen und nicht überlappend sind. Innerhalb eines Virions und in infizierten Zellen liegen beide Fragmente nicht in gleichen Mengen vor, das L- zu S-RNA Verhältnis beträgt rund 1 zu 2,5. Die Länge der RNA-Genomsegmente kann bei den unterschiedlichen Arenavirus-Spezies variieren, die generelle Organisation der S- und L-genomischen-RNA ist hingegen innerhalb der Arenaviridae konserviert (MEYER *et al.*, 2002). Die durchschnittliche Länge des S-RNA Segments ist 3,4 kb. Es codiert am 5'-Ende für das Glykoprotein-Vorläufermolekül (GP-C) in positiver Orientierung sowie am 3'-Ende für das Nukleoprotein (NP) in negativer Orientierung. Das L-RNA Segment ist rund 7,2 kb lang und codiert für die virale Polymerase (am 3'-Ende in negativer Orientierung) und das Z-Protein (am 5'-Ende in positiver Orientierung).

Das Nukleoprotein ist das am häufigsten vorkommende Protein (70% der viralen Proteine bei Pichinde-Virus). Es hat ein Molekulargewicht von 60 bis 68 kDa, bei Lassa-Virus rund 61 kDa. Das NP liegt mit der viralen RNA assoziiert vor und bildet so das Nukleocapsid. GPC ist ein 70 bis 80 kDa großes Polyprotein, welches posttranslational in GP-1 (40 bis 46 kDa) und GP-2 (35 kDa) gespalten wird. Im Virion sind equimolare Mengen beider Glykoproteine vorhanden. Das GP-1 ist ein peripheres Membranglykoprotein, das sich über Disulfidbrücken zu homotetrameren Komplexen zusammenlagert. Es bildet den globulären Kopfteil der elektronenmikroskopisch sichtbaren Glykoprotein-"Spikes". Das GP-2 ist ein integrales Membranprotein, das sich ebenfalls zu Homotetrameren zusammenlagert und den Stiel des Glykoprotein-"Spike" bildet. Die beiden Homotetramere GP-1 und GP-2 binden über ionische Interaktionen aneinander. Das L (*large*)-Protein hat die Funktion der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Es hat ein Molekulargewicht von rund 200 kDa und ist Teil des Nukleocapsids. Das kleinste von Arenaviren codierte Protein ist das Z-Protein mit einem Molekulargewicht von 11 kDa. Es enthält ein RING-Finger-Motif welches Zink bindet. Die genaue Funktion dieses Proteins ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, vermutlich besitzt es regulatorische Funktionen. In LCMV infizierten Zellen konnte das Z-Protein im Zytoplasma, aber auch im Zellkern nachgewiesen werden (BUCHMEIER, 2002).

Die Gene jedes Genomsegmentes werden durch eine *stem-loop*-Struktur voneinander getrennt, die sich in der *intergenic noncoding region* befinden (Abbildung 1A). Diese *stem-loop*-Struktur ist eventuell für die Regulation der transkriptionellen Termination verantwortlich. Modellvorstellungen zufolge könnte die virale Polymerase aufgrund dieser *stem-loop*-Struktur von der Matrizen-RNA dissoziieren und somit die Transkription beenden (MEYER *et al.*, 2002).

Die Replikation der genomischen RNA erfolgt durch Umschreibung in eine komplementäre RNA-Kopie. Diese antigenomische RNA dient einerseits als Matrize für die Synthese der genomischen RNA (Replikation) und andererseits für die Synthese von mRNA (Transkription) (Abbildung 1B). Die ambisense Orientierung der Gene und ihre Expression vom RNA-Genom bzw. Antigenom ermöglicht eine zeitliche Regulation der Genexpression in infizierten Zellen (MEYER *et al.*, 2002).

Die absoluten 3'- und 5'-Enden der beiden RNA Segmente weisen eine konservierte Nukleotidsequenz von 19 Basen auf. Das 5'-Ende ist reverse-komplementär zu der Sequenz am 3'-Ende und 17 der ersten 19 Nukleotide sind zwischen der S- und der L-RNA homolog. Daher ist die Bildung von intramolekularen Duplexen bei der Hybridisierung der Enden eines RNA-Moleküls bzw. intermolekularer Duplexe bei Hybridisierung der Enden von S- und L-RNA möglich (MEYER *et al.*, 2002).

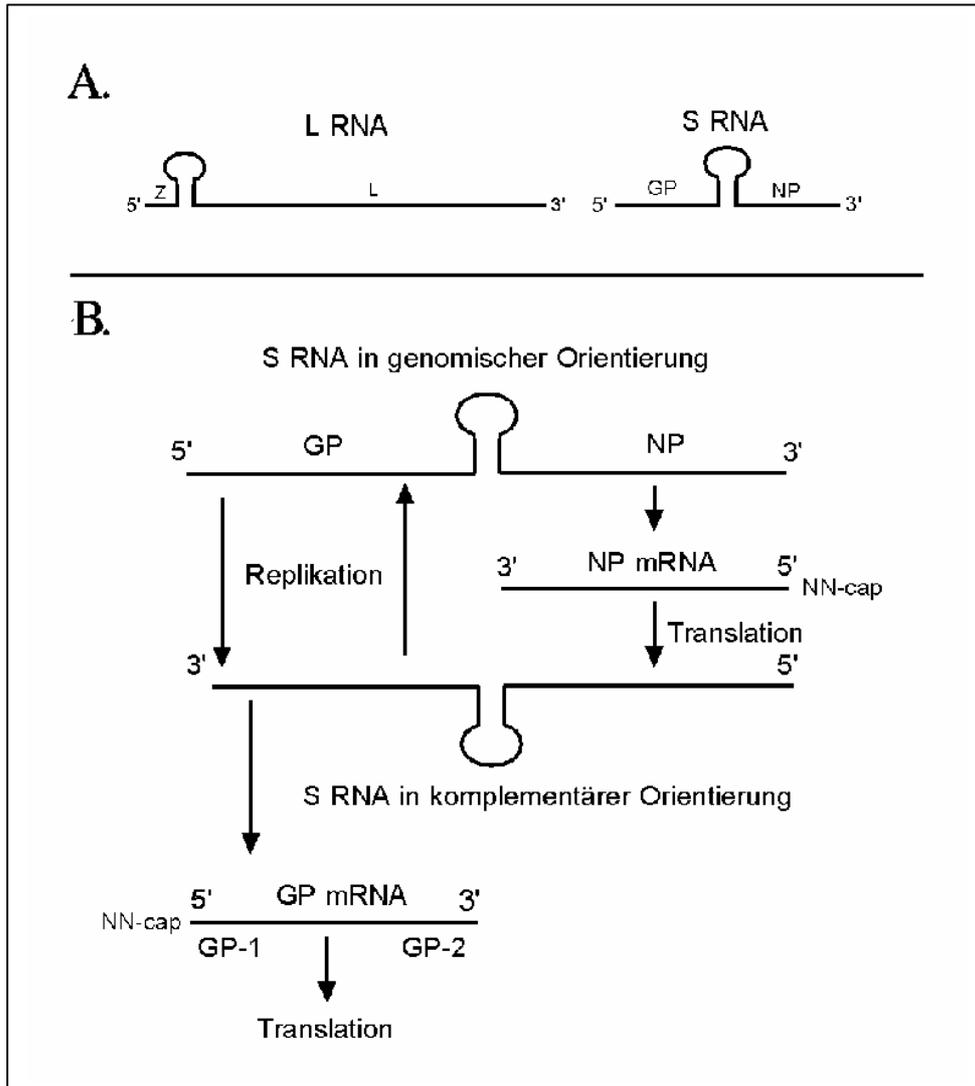


Abbildung 1: Genomorganisation und Genexpression der Arenaviren.

A. Schematische Darstellung der L-RNA und S-RNA von Arenaviren.

B. Die GP-mRNA (und auch Z-mRNA) Transkription erfolgt über die in komplementärer Orientierung synthetisierte RNA-Kopie als Matrize.

Die 5'-Enden der subgenomischen mRNA enthalten ein bis sieben zusätzliche Basen (NN) und eine 7-Methyl-Guanosin-Cap-Struktur.

Die stem-loop-Struktur repräsentiert die *intergenic noncoding region*. (nach MEYER *et al.*, 2002)

Der Lebenszyklus der Arenaviren findet im Zytoplasma der infizierten Zelle statt. Die Freisetzung neu synthetisierter Viruspartikel erfolgt innerhalb von 12 bis 24 Stunden nach Infektion über das *Budding* der Plasmamembran in den extrazellulären Raum. Da Arenaviren im natürlichen Wirt nicht cytopathogen sind, ist eine über einen längeren Zeitraum anhaltende Infektion möglich. Arenaviren weisen einen breiten Zell- und Wirtstropismus auf. Der einzige bisher bekannte zelluläre Rezeptor, α -Dystroglycan, weist ebenfalls ein nahezu universelles Vorkommen auf (CAO *et al.*, 1998; SMELT *et al.*, 2001).

3.1.3 Transmission von Arenaviren

Arenaviren werden fast ausschließlich von persistierend infizierten Nagetieren übertragen. Die angeborene Infektion bewirkt eine lang andauernde oder gar lebenslange Infektion des natürlichen Wirtes, der zumindest keine offensichtlichen Symptome zeigt. Über den Urin werden hohe Virustiter (bei Pichinde Virus rund 10^5 pfu / ml) ausgeschieden, so daß eine Übertragung auf den Menschen durch z.B. kontaminierte Nahrungsmittel oder über Aerosole denkbar ist.

Aus diesem Grund werden in den vom NIH und CDC herausgegebenen Richtlinien (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)) Arbeiten mit LCMV infizierten Nagetieren in die Sicherheitsstufe BSL-3 eingestuft (PETERS *et al.*, 1996).

Bisher wurden erst wenige Studien bezüglich der Transmission der Arenaviren innerhalb ihres Wirtes durchgeführt. Vermutlich wird das Virus überwiegend transovariell vom Muttertier auf das ungeborene Nachkommen übertragen. Eine horizontale Übertragung wäre über Nasalsekrete, Speichel, Urin sowie direkt über Bißwunden denkbar. Die horizontale Virusübertragung von LCMV über Mundschleimhäute, Bindehäute oder intakter Haut ist experimentell gezeigt (PETERS *et al.*, 1996).

3.1.4 Die LCMV-Infektion des Menschen

LCMV wurde 1933 als erstes Arenavirus von C. ARMSTRONG und R.D. LILLIE beschrieben. Der natürliche Wirt von LCMV ist *Mus domesticus*, *Mus musculus* und *Mus castaneus*. Beim Menschen ist das klinische Bild einer Infektion durch eine aseptische Meningitis charakterisiert, in schweren Verläufen erfolgt auch eine Beteiligung des zentralen Nervensystems. Eine fiebrige Erkrankung ohne neurologische Beteiligung ist das häufigste Krankheitsbild. Diese wird jedoch selten diagnostiziert. Die Letalität der LCMV-Infektion liegt bei unter einem Prozent (PETERS *et al.*, 1996).

Die initiale Phase der LCMV-Infektion ist durch Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen, Photophobie, Übelkeit und Erbrechen gekennzeichnet. Rund 10 Tage nach Beginn des Fiebers sind meningeale Symptome zu beobachten - häufig sogar nach einer vorläufigen Besserung. Normalerweise bleiben die Symptome auf eine aseptische Meningitis beschränkt. Enzephalitiden konnten in 5 bis 34% der diagnostizierten LCMV-Infektionen beobachtet werden (PETERS *et al.*, 1996). Darüberhinaus ist eine LCMV-Infektion von Schwangeren stark fruchtschädigend und führt entweder zum Tod des Fötus oder zu schweren Behinderungen des Neugeborenen (STEINBERGAS, 1976; METS, 1999; PEARCE *et al.*, 2000).

LCMV-Infektionen sind entsprechend der geographischen Verteilung des natürlichen Wirtes, der Hausmaus [*Mus domesticus* (Westeuropa, Afrika, Mittlerer Osten, Arabische Halbinsel), *Mus musculus* (Dänemark, Deutschland, Österreich, Jugoslawien bis zum Schwarzen Meer) und *Mus*

castaneus (von Russland bis nach Tibet)] weit verbreitet (SALAZAR-BRAVO, 2002). In den 30er Jahren in den USA durchgeführte Studien zeigten eine Seroprevalenz von 11% gegenüber LCMV in der Bevölkerung (ARMSTRONG, 1941). Anhand neuerer Daten konnte eine innerstädtische Prävalenz in Baltimore von 4,7% und in Birmingham von 5% gezeigt werden (CHIELDS *et al.*, 1991; STEPHENSEN *et al.*, 1992). In Norddeutschland findet man in ländlichen Gegenden eine Rate von 9,1%, in Süddeutschland hingegen von nur 1,2%. Entsprechend konnten im Süden weniger infizierte Mäuse beobachtet werden. In den kälteren Wintermonaten nehmen LCMV-Infektionen deutlich zu, denn Mäuse dringen dann vermehrt in den Lebensraum des Menschen ein und erhöhen damit die Wahrscheinlichkeit einer Virusübertragung (PETERS *et al.*, 1996).

Weitere Überträger von LCMV sind Hamster, die als Haustiere gehalten werden. Im Zeitraum von Dezember 1973 bis April 1974 wurden in den USA 181 derart vermittelte LCMV-Infektionen beschrieben (BRIGGAR *et al.*, 1975; DEIBEL *et al.*, 1975; GREGG, 1975) in Deutschland waren es von 1968 bis 1971 47 Fälle (ACKERMANN *et al.*, 1972; BLECHSCHMIDT *et al.*, 1977). Dabei sind nicht nur Personen erkrankt, die direkten Kontakt zu den Tieren hatten, sondern auch solche, die sich im gleichen Wohnumfeld aufgehalten hatten, d.h. das Virus wurde offenbar über Aerosole innerhalb einer Wohnung übertragen (PETERS *et al.*, 1996).

Von LCMV sind nur relativ wenig Sequenzinformationen bekannt, die meisten beschränken sich auf die Laborstämme Armstrong und Western (WE), deren komplette S und L RNA Sequenzen in den Datenbanken zugänglich sind (ROMANOWSKI *et al.*, 1985; SALVATO *et al.*, 1988, 1989; DJAVANI *et al.*, 1998).

Die LCMV-Laborstämme Armstrong und WE unterscheiden sich in der Pathogenese im Meerschweinchen-Modell. Während Infektionen mit weniger als 10 PFU des Stammes WE zu einem tödlichen Krankheitsverlauf in adulten Meerschweinchen führen, ist die Infektion mit Stamm Armstrong mit bis zu 10^6 PFU nicht letal (DJAVANI *et al.*, 1998).

3.1.5 Die LCMV-Infektion der Callitrichidae - Callitrichid-Hepatitis

Die Familie der Callitrichidae gehört zu den Neuwelt-Primaten. Spezies dieser Familie sind unter anderem Goeldi-Springtamarine (*Callimico goeldii*) und Zwergseidenaffen (*Cebuella pygmaea*). Goeldi-Springtamarine leben auf Bäumen und sind rund 360 Gramm schwer. Sie ernähren sich hauptsächlich von Früchten, fangen jedoch auch Insekten oder kleinere Tiere. Die Flüssigkeitsaufnahme erfolgt am Boden und nicht wie bei vielen anderen Arten der Callitrichiden durch Lecken an feuchten Blättern (ANONYMUS, 2003a). Die Tiere der ebenfalls baumlebenden Art Zwergseidenaffen sind nur 100 Gramm schwer und bilden die kleinste Art der Neuwelt-Primaten. Sie ernähren sich hauptsächlich von Früchten, jedoch auch von Insekten (ANONYMUS, 2003b).

LCMV kann neben dem Menschen auch die Neuwelt-Primaten der Callitrichidae infizieren. Nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Wochen können Symptome wie erhöhte Leberenzymwerte, Gelbsucht und Hämorrhagien auftreten. Sie sind Anzeichen eines schweren, oft letalen Krankheitsverlaufs. Im Gegensatz zum Menschen verursacht LCMV in Callitrichiden eine Multiorganerkrankung unter Beteiligung von Leber, Milz, Nebennierendrüsen, Bauchspeicheldrüse und des zentralen Nervensystems. Histopathologisch und klinisch ähnelt diese LCMV-Infektion dem Lassa-Fieber beim Menschen. Aufgrund der charakteristischen Leberbeteiligung bei dieser Spezies (Callitrichidae) bezeichnet man diese LCMV vermittelte Infektion als Callitrichid-Hepatitis (CH) (MONTALI *et al.*, 1989, 1993, 1995; RAMSY *et al.*, 1989). Bis in die frühen 80er Jahre wurden mehrere Ausbrüche von CH in nordamerikanischen Zoos beobachtet (RAMSAY *et al.*, 1989), wobei die Krankheit erst 1991 mit LCMV in Verbindung gebracht wurde (STEPHENSEN *et al.*, 1991, 1995). Diese CH-Ausbrüche wurden unwissentlich durch infizierte Zuchtmäuse verursacht, die den Affen verfüttert wurden (MONATLI *et al.*, 1993). Für die CH-vermittelnden LCMV-Stämme sind kaum Sequenzinformationen bekannt. Bisher wurde nur ein Teilstück des S-RNA Segmentes eines einzigen CH-LCMV-Stammes veröffentlicht (STEPHENSEN *et al.*, 1995).

3.1.6 Die Lassa-Virusinfektion des Menschen - das Lassa-Fieber

Das Lassa-Fieber wurde erstmals 1969 beschrieben. Im Nordosten Nigerias in dem Ort Lassa (Koordinaten: 10°16'N 13°18'E) erkrankten amerikanische Missionare an einer Lassa-Virusinfektion (FRAME *et al.*, 1970). Das Endemiegebiet ist auf Länder West Afrikas wie Guinea, Sierra Leone, Liberia und Nigeria beschränkt. Das klinische Bild einer Lassa-Virusinfektion ist durch Symptome einer schweren systemischen Erkrankung gekennzeichnet, die in schweren Verläufen mit Blutungen assoziiert ist. Die Letalität von hospitalisierten Patienten liegt bei rund 16% (PETERS *et al.*, 1996). Jedoch wurden bei einzelnen Ausbrüchen in Nigeria 50% und bei zwei nosokomialen Ausbrüchen sogar eine Letalität von 70% beobachtet (HOLMES *et al.*, 1990). Zwischen 1996 und 1997 wurden im östlichen Teil Sierras Leones über 1000 Fälle mit 148 Toten von Lassa-Fieber beobachtet (MCCORMICK *et al.*, 2002). Eine saisonale Häufung der Krankheitsfälle ist in den Trockenmonaten von April bis Mai zu erkennen, die durch eine höhere Stabilität des Virus bei Trockenheit und der vermehrten Annäherung des Wirtes (Nagetiere) an den Menschen erklärt werden könnte (MCCORMICK *et al.*, 2002). Für gesamt Westafrika werden pro Jahr 100.000 bis 300.000 Lassa-Fieber Fälle mit bis zu 10.000 Toten geschätzt (CLEGG, 2002, MCCORMICK *et al.*, 2002). In Sierra Leone liegt die Seroprevalenz gegenüber dem Lassa-Virus in küstennahen Regionen bei rund 5% und im Landesinnern bei bis zu 40% (MCCORMICK, 1987).

Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 10 Tagen (5 bis 21 Tage) beginnt das Lassa-Fieber mit allgemeinem Unwohlsein und Fieber. Bei schweren Verlaufsformen steigt das Fieber stark an, in über 50% der Fälle ist es von Muskel- und Gliederschmerzen begleitet (KNOBLOCH *et al.*, 1980). Ein Drittel der hospitalisierten Lassa-Fieber-Patienten zeigen starke Bauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen sowie Durchfälle. Sehr starke Halsschmerzen werden in zwei Dritteln aller Patienten beobachtet und gehen mit einer Pharyngitis einher. Außerdem treten häufig retrosternale Schmerzen und in zwei Drittel der Fälle starker Husten auf. Schleimhaut-, gastrointestinale- oder vaginale Blutungen sind bei 15% bis 20% der erkrankten Patienten zu beobachten und geben den Hinweis auf eine schlechte Prognose. Ebenfalls wurden in einzelnen Fällen neurologische Manifestationen beobachtet: aseptische Meningitis, Encephalitis oder eine globale Encephalopathie mit Krämpfen (KNOBLOCH *et al.*, 1980, MCCORMICK *et al.*, 2002; PETERS *et al.*, 1996).

Bei überlebenden Patienten dauert die Erkrankung 2 bis 3 Wochen an. Im Serum dieser Patienten konnten hohe IgM und IgG Antikörpertiter nachgewiesen werden. Bei schweren Krankheitsverläufen sterben die meisten Patienten vor der Antikörperbildung (MCCORMICK *et al.*, 2002; PETERS *et al.*, 1996). Nach Entfieberung ist das Virus im Blut nicht mehr nachweisbar, die Virusausscheidung über Urin, Sperma und Muttermilch konnte hingegen noch 6 Wochen nach einer akuten Infektion beobachtet werden. Als Spätfolge der Lassa-Virusinfektion konnte bei 29% der untersuchten Patienten ein unilateraler bzw. bilateraler Hörverlust beobachtet werden (CUMMINS *et al.*, 1990).

Der natürliche Wirt des Lassa-Virus sind Nagetiere, und zwar *Mastomys*, die südlich der Sahara vorkommen und mehrere Subspezies einer noch ungeklärten Taxonomie umfassen. Welche davon die natürlichen Wirte des Lassa-Virus sind und in welchen Gegenden sie vorkommen ist bisher nicht genau bekannt. Eine Vorhersage über Endemiegebiete des Lassa-Virus ist somit nicht genau möglich (PETERS *et al.*, 1996; ROBBINS *et al.*, 1989). *Mastomys natalensis* wird als der natürliche Wirt des Lassa-Virus angesehen. Die Nagetiere leben direkt in den Wohnhäusern. Bei Untersuchungen in Sierra Leone waren durchschnittlich 2,4 Nagetiere pro Haus zu finden, wovon 5 bis 10% mit Lassa-Virus infiziert waren. In einigen Häusern wurden sogar 50 bis 75 Nagetiere gefunden, von denen ungefähr die Hälfte Lassa-Virus ausschieden (MCCORMICK *et al.*, 2002). Die Übertragung auf den Menschen erfolgt vermutlich über Aerosole oder über direkten Kontakt mit Ausscheidungen, z.B. über Urinkontaminationen auf Nahrungsmitteln, Schlafstellen, Tischen und Fußböden. Außerdem könnte eine Infektion über direkten Blutkontakt beim Jagen und Töten der *Mastomys* zu Nahrungszwecken erfolgen (PETERS *et al.*, 1996; Salazar-Bravo *et al.*, 2002, TER MEULEN *et al.*, 1996). Eine Mensch-zu-Mensch Übertragung des Virus erfolgt besonders innerhalb der Familie und durch schlechte hygienische Zustände im Krankenhaus. Das Virus wird dabei weniger über Aerosole als vielmehr über direkten Kontakt mit kontaminierten menschlichen Ausscheidungen oder über

nicht sterilisierte medizinische Instrumente übertragen (FRAME *et al.*, 1970; MCCORMICK *et al.*, 2002).

Während der langen Inkubationszeit von bis zu 3 Wochen kann das Lassa-Virus durch Reisende auch in andere Regionen der Welt verbreitet werden. Dennoch ist das Risiko einer Mensch-zu-Mensch Übertragung außerhalb von Endemiegebieten sehr gering. Bei rund 20 importierten Lassa-Viruserkrankungen weltweit konnte nur in einem Fall eine Sekundärübertragung gezeigt werden (HAAS *et al.*, 2003).

3.2 Cytokine

Cytokine sind sekretorische Proteine, die den Zustand anderer Zellen über die Bindung an deren Rezeptoren und der daraus resultierenden Aktivierung von Signalkaskaden beeinflussen können. Sie sind Teil der unspezifisch wirkenden, nichtadaptiven Immunabwehr. Die Cytokinwirkung erfolgt häufig bevor spezifische Antikörper oder cytotoxische T-Zellen vorhanden sind. Cytokine werden überwiegend von immunologisch aktiven Zellen gebildet und sezerniert. Zu den Cytokinen gehören z.B. Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren und Chemokine (CHELBI-ALIX *et al.*, 1998; SAMUEL, 2001).

Cytokine können eine antivirale Aktivität besitzen, wie Interferon-alpha (IFN- α) und Interferon-beta (IFN- β). IFN- α kann von allen infizierten Zellen synthetisiert werden, hauptsächlich jedoch von Makrophagen, Monocyten und Granulocyten. IFN- β hingegen wird hauptsächlich von infizierten Fibroblasten sezerniert und wirkt immunregulatorisch. Es bewirkt eine erhöhte *major histocompatibility complex* (MHC)-Expression und eine Aktivierung von Makrophagen. IFN- α und IFN- β sind säurestabil und werden als Typ-I-Interferone bezeichnet. Die Expression dieser Cytokine wird in infizierten Zellen direkt durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren initiiert. Während einer Infektion wird meist mehr IFN- α als IFN- β gebildet (SAMUEL, 2001)

IFN- γ ist säurelabil und zählt zum Typ-II-Interferon. Eine Homologie zu den Typ-I-Interferonen besteht nicht. IFN- γ wird von stimulierten T-Helferzellen, aktivierten Makrophagen und natürlichen Killerzellen gebildet (SAMUEL, 2001; SEN, 2001).

Durch die Bindung der Interferone an Rezeptoren (IFN- α und IFN- β an Typ-I-Rezeptoren bzw. IFN- γ an Typ-II-Rezeptoren) werden diese konformationell verändert, was zu einer Aktivierung von Proteinkinasen der Jak-Familie führt. Dies führt zur Phosphorylierung von STAT-1 (*signal transducers and activators of transcription*) und STAT-2-Proteinen. Die STAT-Proteine können dann Komplexe bilden, die in den Zellkern wandern und mit zusätzlichen Regulatorproteinen an die transkriptionellen Kontrollelemente ISRE (*interferon stimulated regulatory elements*) binden. ISRE regulieren die Expression von *interferon stimulated genes* (ISG) wie die 2',5'-

Oligoadenylatsynthetase, MHC-Klasse-I und -II Moleküle, Mx-Proteine (SAMUEL, 2001; SEN, 2001).

Der Tumor-Necrose-Faktor-alpha bzw. -beta (TNF- α bzw. TNF- β) wird von Makrophagen, Monocyten und B- und T-Lymphocyten gebildet. Induziert wird die TNF- α Expression durch Lipopolysaccharide, durch Aktivierung von Interleukin-Rezeptoren oder durch phagozytierte Mikroorganismen. Die Rezeptoren von TNF- α und TNF- β sind identisch, vermutlich auch ihre biologische Aktivität. In Endothelzellen induzieren die Tumornekrosefaktoren u.A. die Synthese von Cytokinen und NO-Synthetasen. Des weiteren regulieren Tumornekrosefaktoren die Aktivität von Makrophagen. Außerdem findet eine Aktivierung von neutrophilen Granulocyten und B-Lymphocyten statt. Durch seine vielseitige Wirkung ist TNF an der Abwehr von viralen, bakteriellen und parasitären Infektionen beteiligt (SAMUEL, 2001; SEN, 2001).

3.2.1 Cytokininduzierte Proteine: Protein der Promyelozytenleukämie (PML) und Sp100

Bisher sind mehr als 100 verschiedene Gene bekannt, die durch Interferone induzierbar sind. Ihre physiologische Aufgabe ist oft unbekannt. Eine antivirale Aktivität konnte bisher nur bei wenigen der interferoninduzierten Proteine gezeigt werden. Zu ihnen gehören die p68 Proteinkinase, die 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase und einige Mx-Proteine (CHELBI-ALIX *et al.*, 1998). Mx-Proteine sind Polypeptide und durch Typ-I-Interferone induzierbar. Sie besitzen GTPase Aktivität und hemmen die Transkription z.B. von VSV und Influenza-Virus. Außerdem gehören zu den interferoninduzierbaren Proteinen das Protein der Promyelozytenleukämie (PML) und das Sp100-Protein, die Teil der im Folgenden beschriebenen Zellkernstruktur sind (STERNSDORF *et al.*, 1997b). Diese Strukturen werden als ND (*nuclear domain*), ND10 oder PML *oncogenic domains* (PODs) bezeichnet (ASCOLI *et al.*, 1991; DYCK *et al.*, 1994). Die zuerst beschriebenen Bestandteile sind das PML- und das Sp100-Protein. Ein PML-Fusionsprotein wurde bei Patienten mit einer akuten Promyelozytenleukämie und Sp100 als Autoantigen bei Patienten mit einer primär-biliären Zirrhose (PBZ) isoliert (STERNSDORF *et al.*, 1997b).

Innerhalb des Zellzyklus variieren Anzahl und Größe der NDs: in der G₀-Phase sind die wenigsten, in der G₁-Phase mehr und in der S-Phase die meisten NDs zu erkennen. In der S-Phase sind die NDs in der Nähe der Replikationsorte zu finden. Im gesamten Zellzyklus liegen PML und Sp100 co-lokalisiert vor, nur während der Mitose dissoziieren beide Proteine voneinander. PML bildet große Aggregate in der Peripherie der mitotischen Zelle und Sp100 ist diffus verteilt. Schwermetalle und Stressfaktoren können eine Änderung der ND-Morphologie verursachen (STERNSDORF *et al.*, 1997a).

Das Sp100-Protein ist ein 53 kDa großes Protein, welches durch alternatives *Splicen* in unterschiedlichen Isoformen vorkommen kann. Im ND ist Sp100 mit der nukleären Matrix

verbunden. Transkriptionell transaktiviert es unterschiedliche Promotoren, die genaue Wirkungsweise ist jedoch unklar. Am N-Terminus besitzt Sp100 Sequenzhomologien mit der peptidbindenden Domäne der MHC Klasse I Moleküle. In der zentralen Region des Sp100 konnte eine transkriptionelle Transaktivator-domäne lokalisiert werden, die Sequenzhomologien zu verschiedenen viralen transaktivierenden Proteinen (z.B. zum HIV-1 Nef) aufweist. Einige Splicevarianten des Sp100 enthalten Domänen, die interferoninduzierbaren, humanen nukleären Phosphoproteinen (HNPP1/2) entsprechen (STERNSDORF *et al.*, 1997a).

Vom PML-Protein ist ebenfalls ein Teil mit der nukleären Matrix verbunden. Funktionelle Studien mit PML weisen in APL-Zellen (APL = *acute promyelocytic leukemia*) und anderen Zellen auf eine Suppression des Zellwachstums hin (AHN *et al.*, 1995; LE *et al.*, 1996; MU *et al.*, 1994). Außerdem wird PML eine transkriptionelle Repressorfunktion zugeschrieben (STERNSDORF *et al.*, 1997a). Der N-Terminus enthält drei cysteinreiche Metallbindungsstellen, die wahrscheinlich Zink komplexieren. Diese Domänen sind für die Lokalisation des PML in den NDs wichtig und lassen die Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen vermuten. Bei der ersten Domäne handelt es sich um ein weit verbreitetes RING-Finger-Motif, welches von zwei ebenfalls Zink bindenden *B-Boxen* und einer *coiled-coil* Domäne gefolgt wird. Dieses *RING-B-Box-coiled-coil* (RBCC) Muster bzw. auch als "*TRlpartite Motif*" (TRIM) bezeichnete Motif (JENSEN *et al.*, 2001) ist für eine Untergruppe der RING-Finger-Proteine charakteristisch. Dem sich anschließenden serinreichen Bereich wird eine regulatorische Funktion zugeschrieben. Unterschiedliche Splicevarianten des PML haben ein Molekulargewicht von 47 bis 160 kDa (STERNSDORF *et al.*, 1997a). Die Isoformen des PML werden in sieben unterschiedliche Gruppen auf der Basis von C-terminalen Sequenzunterschieden eingeteilt (JENSEN *et al.*, 2001). Die Sp100- und PML-Genexpression wird durch Typ-I (α , β)- und Typ-II (γ)-Interferone hochreguliert. Hierfür sind *Interferon-stimulated response elements* (ISRE) und *Interferon-g activation sites* (GAS) in der Promotorregion der Gene verantwortlich. Bei Sp100 sind beide Elemente für eine Induktion durch IFN- α/β notwendig. Hingegen sind in Promotoren anderer Interferon-induzierter Gene entweder ISRE- oder GAS-Elemente für die Aktivierung notwendig (STERNSDORF *et al.* 1997a). Somit hat Sp100 einen bisher einmaligen Interferon-induzierbaren Promotor. Auch der PML-Promotor enthält ein ISRE- und ein GAS-Element, wobei das ISRE-Element alleine ausreicht, um eine Interferon Typ-I vermittelte Genexpression zu induzieren. Die Wirkungsweise des PML-GAS Elements wurde bisher nicht weiter untersucht. In Interferon-stimulierten Zellen nimmt außerdem die Halbwertszeit der Sp100-mRNA gegenüber nicht-stimulierten Zellen zu. Auch treten einige Sp100- und PML-Isoformen ausschließlich in Interferon-stimulierten Zellen auf (STERNSDORF *et al.*, 1997a).

Weil die Expression der PML- und Sp100-Proteine Interferon-induzierbar ist, stellt sich die Frage, ob auch virale Infektionen NDs beeinflussen können. So konnte gezeigt werden, daß verschiedene DNA-Viren (z.B. Adenovirus) eine Modifikation der ND-Morphologie verursachen

können (CARVALHO *et al.*, 1995; DOUCAS *et al.*, 1996). Unbekannt ist allerdings, ob dies daran liegt, daß das Virus die zelluläre Maschinerie nutzt, oder ob die Zelle sich im Zuge antiviraler Aktivität hierdurch schützt (STERNSDORF *et al.*, 1997a).

3.2.2 Einfluß von PML / Sp100 auf die Virusreplikation

Eine Hemmung der Replikation von VSV erfolgte in stabil PML-transfizierten Hamster-CHO bzw. Maus-GP+E-86 Zellen. Dabei wurde gegenüber Kontrollzellen eine Reduktion um 2 Log₁₀ erreicht. Ähnliche Reduktionen wurden bei Influenza-A-Virus beobachtet. Hingegen konnte PML den Titer von Encephalomyokarditisvirus (EMCV) nicht beeinflussen. In Sp100 transfizierten Zellen zeigte sich kein Einfluß auf alle drei untersuchten Viren (CHELBI-ALIX *et al.*, 1998).

Eine in-vivo Studie zeigte, daß das Fehlen von PML bei LCMV-infizierten Mäusen zu höheren Virustitern führt (BONILLA *et al.*, 2002). Auch in der Zellkultur besitzt PML eine antivirale Aktivität gegenüber LCMV (SALVATO *et al.*, 1999; DJAVANI *et al.*, 2001). Das Arenavirus Z-Protein bindet am PML-N-Terminus und bewirkt damit eine Relokalisation ins Zytoplasma (BORDEN *et al.*, 1997, 1998 und 1998a). Ob es einen Zusammenhang zwischen dieser Interaktion und der antiviralen Wirkung des PMLs gibt, ist nicht bekannt.

3.3 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten LCMV- und Lassa-Virusstämme aus klinischem Material isoliert werden. Für diesen Zweck standen Organ- und Serumproben von Callitrichiden für die LCMV-Isolierung, sowie Serum- und Liquorproben für die Lassa-Virusisolierung zur Verfügung. Anhand der Primärisolate sollten quantifizierte Virusstocks angelegt werden, auf deren Basis die Experimente durchgeführt werden sollten.

Zur Quantifizierung infektiöser Partikel von VSV-, LCMV- und Lassa-Virus sollten entsprechende Methoden etabliert werden. Zu diesem Zweck sollte mit einem Methylcellulose-Overlay für VSV ein Plaque-Assay und für die nicht-cytopathogenen Lassa- bzw. LCM-Viren ein Immunfocus-Assay etabliert werden. Als Alternative sollte eine quantitative *real-time* RT-PCR für Lassa-Virus bzw. für LCMV etabliert werden. Hierfür sollte eine neue, schnell durchführbare und kostengünstige RNA-Extraktionsmethode als Alternative zu gängigen RNA-Extraktionsmethoden etabliert und deren Verlässlichkeit gezeigt werden. Mit Hilfe der neuen Quantifizierungsmethoden sollte der Einfluß von Cytokinen und Cytokin-induzierten Proteinen auf die Virusreplikation untersucht werden. Dabei sollte ein Vergleich der Ergebnisse beider Methoden erfolgen, um Rückschlüsse auf das Verhältnis aus infektiösen Einheiten und RNA-

Menge ziehen zu können. Außerdem sollten mögliche virusstamm- und zelltyp-spezifische Unterschiede, sowie Unterschiede zwischen LCMV und Lassa-Virus hinsichtlich des Ansprechens auf Cytokine untersucht werden. Anhand dieser Daten sollte geklärt werden, ob die unterschiedliche Virulenz von Arenaviren mit einer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Cytokinen assoziiert ist.

Als weitergehende Untersuchung sollte geklärt werden, ob interferon-induzierbare Proteine, wie Sp100 und PML, antivirale Aktivität gegenüber Lassa-Virus und LCMV besitzen.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Primersequenzen

Die Primernummer gibt die Position des 5'-Nukleotids in der genomischen S-RNA Sequenz von LCMV-Stamm WE an. * heterologe Ascl Schnittstelle

 ** DEMBY *et al.*, 1994; DROSTEN *et al.*, 2002

 *** GÜNTHER *et al.*, 2001

Target / Name		Sequenz
arena	1 +	5' - CGCACCGDGGATCCTAGGC
arena	1a +	5' - tatggcgcgCGCACCGAGGATCCTAGGCATT *
arena	1b +	5' - tatggcgcgCGCACCGGGGATCCTAGGCAAT *
arena	1c +	5' - tatggcgcgCGCACCGGGGATCCTAGGCTT *
Lassa-S	36 E2	5' - ACCGGGGATCCTAGGCATT **
Lassa-S	80 F2	5' - ATATAATGATGACTGTTGTTCTTTGTGCA **
Lassa-S	80F2CSF	5' - ATGTAGTGGTGACTAGTTTTTTGTGCA ***
LCMV-S	13 +	5' - tatggcgcgCTAGGCTTTTTGGATTGCGCTTT *
LCMV-S	1634 +	5' - GGGTCTTAGAGTGTCACAACATT
LCMV-S	1765 -	5' - ACTGTGCACTCATGGACTGCATCAT
LCMV-S	1920 +	5' - AGTCCAGAAGCTTTCTGATGTCATC
LCMV-S	2325 +	5' - TCGTGTTCTCCCATGCTCTCCCCAC
LCMV-S	2390 -	5' - CAGGTGAAGGATGGCCATACATAGC
LCMV-S	2814 +	5' - GAAGTGATGAGTCCTTCACATCCCA
LCMV-S	2886 -	5' - GTTGGGATGAGAAGRCCTCAGCA
LCMV-S	301 +	5' - AGTCAGTGGAGTTTGAYATGTC
LCMV-S	322 -	5' - GACATRTCAAACCTCCACTGA
LCMV-S	3363 -	5' - CCTAGGCATTTGATTGCGCWTTT
LCMV-S	437 -	5' - GTGACTGATGATGGAGTCATTGGTG
LCMV-S	861 -	5' - AGGAGACTTGCAGGCACATTCAC
LCMV-S	966 -	5' - TGAGCTCTGCAGCAAGGATCATCCA

4.1.2 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
anti-Affen IgG AK, FITC-markiert	Sigma-Aldrich
anti Lassa-Virus NP (L2F1) monoklonaler AK (Maus)	Bernhard-Nocht-Institut, Abteilung Virologie, Hamburg
anti Lassa-Virus NP (19.12.02) polyklonaler AK (Kaninchen)	Haß M., Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg
anti LCMV NP (mAb Nr. 53 Ascites) monoklonaler AK (Maus)	Dr. Bruns M., Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
anti LCMV (WE3(KN)-12) polyklonaler AK	Dr. Bruns M., Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
anti LCMV IgG positives humanes Serum	Labor Prof. Enders und Partner, Stuttgart
anti PML Ratte AK (PML N _{3/0})	Dr. Sternsdorf T., Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
anti Sp100 Ratte AK (Sp26 27.10.84)	Dr. Sternsdorf T., Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
anti Kaninchen AK, HPOD-markiert	Dianova, Hamburg
anti Maus AK, FITC-markiert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti Maus AK, HPOD-markiert	Dianova, Hamburg
anti Maus AK, Rhodamine-markiert	Dianova, Hamburg
anti Ratte AK, FITC-markiert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.1.3 Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pT-Adv	Clontech
pNF κ B-Luc	Clontech
pTAL-Luc	Clontech

4.1.4 Zellen

Zelllinie	Bezugsquelle
HuH7	Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
L	Dr. Bruns M., Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
HtTA-PML ⁺⁺	Dr. Sternsdorf T., Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
HtTA-Sp100 ⁺⁺	Dr. Sternsdorf T., Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
Vero E6	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Insel Riems

4.1.5 Virusstämme

Virusstamm (Titer)	Ursprung	Bezugsquelle
Lassa Stamm AV (Isolat 15-3: $1,37 \times 10^5$ IFU/ml)	Mensch, Serum	diese Arbeit
Lassa Stamm CSF (Isolat 7: $2,5 \times 10^5$ IFU/ml)	Mensch, Liquor	diese Arbeit
Lassa Stamm NL (Isolat 4: $1,3 \times 10^6$ IFU/ml)	Mensch, Serum	diese Arbeit
LCMV-Stamm Armstrong (Isolat 10-12-99: $1,48 \times 10^6$ IFU/ml)	Laborstamm (Mensch)	Dr. Bruns M., Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
LCMV-Stamm CH-5692 (Isolat 16-11-01: 3×10^6 IFU/ml)	Zwergseidenaffe, Milz	diese Arbeit
LCMV-Stamm CH-5871 (Titer nicht bestimmt)	Goeldi-Springtamarin, Serum	diese Arbeit
LCMV-Stamm WE (Isolat 18-02-00: $1,33 \times 10^7$ IFU/ml)	Laborstamm (Mensch)	Dr. Bruns M., Heinrich-Pette-Institut, Hamburg
VSV Stamm Indiana (Isolat PI10: $2,5 \times 10^8$ PFU/ml)	Laborstamm	Dr. Pfeffer M., Tierärztliche Fakultät MÜNCHEN

4.1.6 Primäre Materialien von Tier und Mensch

Material	Bezugsquelle
Affengewebe (Gehirn, Niere, Leber, Milz, Herz, Lunge, Magen, Dünn- und Dickdarm, Bauchspeicheldrüse, Lymphknoten, Muskeln, Nebennieren und Geschlechtsorgane) - frisch, eingefroren, formalin-fixiert oder in Paraffin eingebettet	Dr. Osmann C., Zoo Dortmund Dr. Hofmann P., Deutsches Primatenzentrum, Göttingen
humanes Serum AV 14.01.00 und 15.01.00	Diagnostische Abteilung des Bernhard-Nocht-Instituts, Hamburg
humaner Liquor 1527/2000 (04.04.2000)	Diagnostische Abteilung des Bernhard-Nocht-Instituts, Hamburg
humanes Serum NL (22.07.2000)	Diagnostische Abteilung des Bernhard-Nocht-Instituts, Hamburg

4.1.7 Kits

Kit	Bezugsquelle
AdvanTAge PCR-Cloning Kit	Clontech, Heidelberg
Big Dye Terminator AmpliTaq Kit	Applied Biosystems, Lincoln Centre Drive, USA
Brilliant Single-Step Quantitative RT-PCR Core Reagent Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Expand High Fidelity PCR System	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
FuGENE6 Transfection Reagent	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Luciferase Reporter Gene Assay	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
MEGAscript Kit	Ambion, Cambridgeshire, Großbritannien
Platinum Quantitative RT-PCR ThermoScript One-Step System	Life Technologies, Karlsruhe
Plasmid Mini Kit	Machery & Nagel, Düren
QIAamp Viral RNA Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat	Pierce, Rockford, Illinois, USA

4.1.8 Puffer und Lösungen

DMEM

500 ml Dulbeccos Modified Eagles Medium (PAA) wurden mit 50 ml FCS (PAA), 5 ml Penicillin / Streptomycin (100x, PAA), 10 ml 50x Mix und 5 ml Glutamin (100x, PAA) versetzt.

DMEM +Tetracyclin / -Tetracyclin

DMEM Vollmedium	500 ml
Geneticin (G418; 50 mg/ml, PAA)	5 ml
Hygromycin (50 mg/ml, PAA)	2 ml
<i>mit Tetracyclin zusätzlich:</i>	
Tetracyclin (5 mg/ml, PAA)	200 µl

50x Mix

5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100x, PAA)

5 ml Pyruvat (100x, Gibco)

10 ml Lösung bei 4°C lagern und pro 500 ml DMEM einsetzen.

Kristallviolett-Lösung

500ml 10x Lösung: 10 g Kristallviolett (Merck), 50 ml Formaldehyd 37% p.a. (Carl Roth), 100 ml Ethanol vergällt (96%, Carl Roth) und 350 ml ddH₂O

1Liter 1x Lösung: 100 ml 10x Kristallviolett Stammlösung, 100 ml Formaldehyd 37% p.a. (Carl Roth) und 800 ml ddH₂O

Methylcellulose-Overlay Medium für Immunfocus- und Plaque-Assay

Es werden 8,4 g Methylcellulose (400 cp, Sigma) in 300 ml ddH₂O (2,8%) über mehrere Stunden bei Raumtemperatur (RTemp.) im Schüttelinkubator gelöst. Anschließend wird die Lösung autoklaviert. Hierbei denaturiert die Methylcellulose, die beim Abkühlen jedoch wieder renaturiert. Von dieser Lösung werden 17 ml mit 33 ml DMEM gemischt, so daß sich eine 0,96%ige Methylcellulose-DMEM-Lösung als Overlaymedium ergibt.

PBS 1 Liter 10x

NaCl 80 g

KCl 2 g

Na₂HPO₄ (Anhydrat) 14,4 g

KH₂PO₄ 2,4 g

pH 7,4

Triton X-100 Lösung

1,5 g Triton X-100 (ICN) in 300 ml 1x PBS lösen.

SDS Ladepuffer 2 x

100 mM Tris (pH 6,8), 20% Glycerol, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau

Ponceau Rot

0,5% Ponceau Rot (Pulver), 1% Essigsäure (p.a.) in ddH₂O

4.2 Methoden

Die virologischen Arbeiten wurden für VSV unter der Sicherheitsstufe 2 (BSL-2), für LCMV unter der Sicherheitsstufe 3 (BSL-3) und für Lassa-Virus unter der Sicherheitsstufe 4 (BSL-4) durchgeführt.

4.2.1 Epidemiologische Basisdaten der Affen-Kolonie

Der CH-Ausbruch wurde im Zoo in Dortmund im Amazonas-Haus in der Zeit von September 1999 bis Juni 2000 beobachtet. Das Amazonas-Haus ist in drei Ebenen aufgeteilt. Auf der dritten Ebene sind die Zwergseidenaffen (Gehege B) und Goeldi-Springtamarine (Gehege C) gegenüber von einem Besuchergang separat untergebracht. Die Zwergseidenaffen sind von den Besuchern durch eine Glasscheibe getrennt. Der männliche Zwergseidenaffe 5625/99 lebte zusammen mit einem weiblichen Zwergseidenaffen in einem separaten Gehege (A), welches nicht für Besucher zugänglich ist. Ein Kontakt zwischen den Tieren der einzelnen Gehegen bestand nicht. Die Affen wurden nicht mit Mäusen gefüttert. Mäusefallen und Mäusegift wurden auf allen drei Ebenen des Amazonas-Haus ausgebracht, außer innerhalb der Gehege bzw. außerhalb des Amazons-Haus.

4.2.2 Zellbiologie und Virologie

4.2.2.1 Zellkultur

HuH7-, L- und Vero-Zellen wurden in DMEM kultiviert. Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage wie folgt geteilt: das Medium wurde verworfen, die Zellen ein Mal mit 1x PBS gespült und mit 1x Trypsin-EDTA (PAA) in Lösung gebracht. Für eine 75 cm²-Flasche wurden 3 ml und eine 25 cm²-Flasche 1 ml Trypsin-EDTA eingesetzt. 600 µl bzw. 200 µl dieser Zelllösung wurden mit 20 ml bzw. 9 ml DMEM versetzt und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

HtTA-PML⁺⁺ - und HtTA-Sp100⁺⁺ -Zellen wurden mit tetracyclinhaltigem DMEM in Kultur gehalten, so daß eine Protein-Überexpression verhindert wurde. Die Expression des PML- bzw. Sp100-Proteins erfolgte in DMEM ohne Tetracyclin, jedoch mit den Antibiotika Genitacin und Hygromycin. Die Zellpassagierung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

4.2.2.2 Virusisolation

LCMV

Virusisolation aus gefrorenem frischen Geweben

Homogenisation von Geweben wie unter "RNA-Präparation aus gefrorenen Callitrichid-Organen" beschrieben, jedoch in 600 µl Zellkulturmedium ohne FCS-Zusatz. Die Zelllysat Lösung wurde für 2 min. bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand für die Virusisolation eingesetzt. L-Zellen (Mausfibroblasten) wurden in einer Dichte von $1,25 \times 10^6$ Zellen pro Kulturschale (Durchmesser 50 mm) ausgesät. Nachdem die Zellen adhärent waren (ca. 4 h später) wurde das Medium von den Zellen entfernt und durch 3 ml verdünntes Homogenat ersetzt (Verdünnung in DMEM, 1:10 bzw. 1:100). Nach 40 min. wurde das Inokulum durch DMEM ausgetauscht und die Zellen alle 3 bis 4 Tage passagiert. Per indirekter Immunfluoreszenz wurden die Zellen jeweils hinsichtlich einer LCMV-Infektion untersucht.

Lassa-Virus

Lassa-Virus Primärisolate

Die Lassa-Virus Stämme AV, CSF und NL, mit denen die Versuche dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind primär aus Patientenseren (Stamm AV, NL) bzw. Liquor (Stamm CSF) isoliert worden. Die entsprechenden Titer sind der Tabelle "Virusstämme" zu entnehmen. Die Lagerung der Virusstocks erfolgte bei -70°C .

Lassa-Virus Stamm AV

Vom Serum AV 14.01.00 und 15.01.00 wurden jeweils 20 µl mit 3 ml Medium versetzt. Mit dieser Lösung wurden in einer 25 cm²-Zellkulturflasche 3×10^5 Vero-Zellen für 1 h bei 37°C , 5% CO₂ infiziert. Anschließend wurden weitere 7 ml Medium hinzugefügt und die Zellen alle 4 bis 5 Tage geteilt. Die Infektion wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz kontrolliert.

Lassa-Virus Stamm CSF

Vorgehen wie Primärisolat Lassa-Virus Stamm AV. Patientenmaterial: Liquor 1527/2000 (04.04.2000) 10 bzw. 20 µl.

Lassa-Virus Stamm NL

Vorgehen wie Primärisolat Lassa-Virus Stamm AV. Patientenmaterial Serum NL (22.07.2000) 20 µl, Inkubation für 8 Tage, 37°C , 5% CO₂.

VSV

Das VSV-Stamm Indiana Lyophilisat (103. Passage auf Vero-Zellen, 29.02.2000) wurde in 2 ml ddH₂O resuspendiert, der Virustiter war unbekannt. Zu 10⁶ Vero-Zellen (25 cm²-Zellkulturflasche, 9 ml DMEM) wurden 10 µl des VSV-Stocks pipettiert. Die Zellen wiesen nach der Inkubationszeit von 24 h (37°C, 5% CO₂) einen deutlich sichtbaren cytopathischen Effekt auf. Die am Flaschenbode adhärenen Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Oberfläche geschabt und mit dem Zellkulturmedium zusammen 10 min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Lösung wurde bei -70°C gelagert.

4.2.2.3 Virusassays

Untersuchung der Stabilität der Lassa-Virusstocks nach mehrmaligem Auftauen

Je ein Aliquot von Lassa-Virus Stamm AV und NL wurde 1 bis 4 bzw. 1 bis 5 mal aufgetaut und wieder eingefroren. Anschließend wurde die relative RNA Konzentration per quantitativer RT-PCR und die Infektiosität per Lassa-Virus Immunfocus-Assay bestimmt.

Thermische Inaktivierung von Lassa-Virus

Zur Bestimmung der Infektiositätsabnahme durch eine thermische Behandlung von Lassa-Virus Stamm NL wurden 7 mal jeweils 135 µl DMEM mit 15 µl humanem negativ-Serum (thermisch präinaktiviert: 30 min., 60°C) gemischt (Gesamtvolumen 150 µl). Es wurde im Medium ein Anteil von 10% humanen Serums erreicht. Jeweils ein Aliquot dieser Lösung wurde mit 5 x 10³ IFU von Lassa NL Isolat 4 versetzt. Die Tubes wurden anschließend für 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min. bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Der Inkubationsansatz von 0 min. wurde mit thermisch prä-inkubierten DMEM (30 min., 60°C) durchgeführt, um Effekte durch eventuell entstehende toxische Substanzen auszuschließen. Die Infektiositätsuntersuchung erfolgte mit Hilfe von Vero-Zellen. In sieben 25 cm²-Zellkulturflaschen wurden jeweils 5 x 10⁵ Zellen ausgesät. 4 h später erfolgte die Infektion mit den inaktivierten Proben. Der obige 150 µl Inaktivierungsansatz wurde hierfür komplett zu den 8 ml Medium in die Zellkulturflasche pipettiert und für 4 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Eine weitere Passagierung erfolgte für 3 bzw. 5 Tage. Für jede neue Zellpassage wurden ¼ der abtrypsinierten Zellen wieder mit 1,5 ml Zellkulturüberstand versetzt und in 8 ml frischem Medium in eine neue 25 cm²-Zellkulturflasche gegeben. Die Analyse der Zellkulturberstände erfolgte per quantitativer RT-PCR. Hierfür wurde die virale RNA mit Hilfe der Diatomeenerde-Extraktionsmethode präpariert.

Kontrolluntersuchung für die Inaktivierung: Vom Lassa-Virus Stamm NL Isolat 4 wurden 900 µl für 60 min. bei 60°C inaktiviert. Hiervon wurden jeweils 50 µl bzw. 150 µl wie zuvor beschrieben auf Vero-Zellen passagiert. Nach 3 bis 4 Tagen wurden die Zellen passagiert und hinsichtlich

einer Infektion mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und die letzte Passage wurde zusätzlich per quantitativer RT-PCR untersucht. In der 21 tägigen Inkubationszeit wurden die Zellen 6 mal passagiert.

Immunfocus-Assay von Lassa-Virus und LCMV

Die gängige Methoden zur Quantifizierung der Infektiosität von Viren ist der Plaque-Assay. Aufgrund des geringen oder gar fehlenden cytopathischen Effekts bei Lassa-Virus und LCMV (McCORMICK *et al.*, 2002) kann eine Quantifizierung über die Plaque-Ausbildung jedoch nicht zuverlässig erfolgen. Ein cytopathischer Effekt konnte ausschließlich bei dem Primärisolat Stamm NL beobachtet werden. Um dennoch eine Quantifizierung infektiöser Partikel durchführen zu können, wurde eine für LCMV als Immunfocus-Assay beschriebene Methode modifiziert (BATTEGAY *et al.*, 1991). Mit Hilfe dieses Assays konnte hier in 24-Well-Platten eine LCMV und, erstmals mit dieser Methode, auch eine Lassa-Virusquantifizierung vorgenommen werden. Der infizierte Zellrasen wird mit einem Medium-Methylcellulose-Overlay überschichtet, so daß eine freie Diffusion der freigesetzten Viruspartikel in die Nährlösung verhindert wird. Eine Neuinfektion kann nur in unmittelbarer Nachbarschaft von bereits infizierten Zellen erfolgen. Nach der Inkubationszeit von 5 Tagen ist ein kleiner Infektionsherd rund um die primär infizierte Zelle vorhanden. An diese Foci binden virusspezifische Antikörper, an die wiederum Peroxidase markierte sekundäre Antikörper gebunden werden. Mit Peroxidase-spezifischem Substrat ist es möglich, die virusinfizierten Zellfoci als farblichen Niederschlag kenntlich zu machen und auszuzählen. Neben der Vermessung von nicht-cytopathischen Viren bietet diese Methode den Vorteil, daß sie auch auf Erreger der BSL-4 Kategorie angewendet werden kann. Durch die einfache Handhabung des Overlaymediums und der Desinfektionsmglichkeit nach Ende der Inkubation, ist dieser Assay mit geringem Aufwand auch unter erschwerten Bedingungen eines Sicherheitslabores durchzuführen. Die immunologische Detektion kann dann außerhalb des Sicherheitslabores erfolgen.

Die Sensitivität dieses Assays hinsichtlich der detektierten Infektiosität wird, ähnlich wie bei LCMV im Vergleich zur direkten intracranialen Inokulation in Mäusen oder Meerschweinchen, eine rund 10 fach geringere Sensitivität aufweisen (PETERS *et al.*, 1996).

Immunfocus-Assay für Lassa-Virus und LCMV auf Vero-Zellen

Vorbereitung und Infektion: 1×10^6 Verozellen wurden in einer 24-Well-Platte ausgesät (pro Well $4,17 \times 10^4$ Zellen) und nach 24 h (100 μ l pro Well) infiziert (60 min., 37°C, 5% CO₂). Anschließend wurde das Inokulum entfernt und durch ein Methylcellulose-DMEM-Overlay (0,96%, 2 ml / Well) ersetzt. Die Lösung in jedem Well wurde durch horizontales Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Inkubation erfolgte für 5 Tage bei 37°C, 5% CO₂. Die Platte wurde während dieser Zeit nicht bewegt.

Immundetektion: Der Overlay wurde aus den Wells entnommen und die Zellen wurden zwei Mal mit 1x PBS gewaschen. Die gesamte 24-Well-Platte wurde dann in ein Gefäß mit einer 4%-igen Formaldehyd-Lösung (in 1x PBS) gestellt (30 min.), so daß ein Ausschleusen aus den Sicherheitslaboren möglich war. Neben der Zerstörung der Infektiosität werden die Zellen durch das Formaldehyd fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit einer 0,5%-igen Triton X-100 Lösung (20 min., RTemp). Die Platte wurde anschließend 4 mal mit 1x PBS gewaschen. Dann wurden die Wells mit Blocking-Reagenz versetzt (FCS 10% in 1x PBS (200 µl / Well)). Inkubation für 20 min. bei RTemp. Ohne weiteren Waschschrift wurde der primäre AK (200 µl / Well) für eine Stunde bei RTemp gebunden. Folgende AK wurden eingesetzt: Lassa-Virusdetektion - monoklonaler Maus AK gegen Lassa NP (L2F1, Hufert *et al.*, 1989), 1:50 verdünnt. LCMV-Detektion - monoklonaler Maus AK (anti LCMV Nukleoprotein Maus mAb Nr. 53 Ascites in 50% Glycerol, Dr. Michael Bruns), 1:800 verdünnt (Antikörperverdünnungen in 1x PBS, 10% FCS). Die Wells wurden 3 mal mit 1x PBS gewaschen. Der sekundäre anti-Maus Antikörper ist Peroxidase markiert (Dianova) und wurde 1:3300 verdünnt eingesetzt (200 µl / Well, Verdünnung in 1x PBS, 10% FCS). Bindungsreaktion: 1h bei RTemp. Anschließend wurden die Wells 3 mal mit 1x PBS waschen. Die Farbreaktion erfolgte mit präzipitierender TMB-Substratlösung (Mikrogen, Martinsried, Deutschland) für 1 h bei RTemp. Die Reaktion wird gestoppt, in dem das Substrates entfernt wird und die Wells mit 1x PBS gewaschen werden. Anschließend erfolgte das Auszählen der Focusforming Units und die Berechnung des Titters.

Immunfocus-Assay auf HtTA-PML⁺⁺-Zellen

10⁶ HtTA-PML⁺⁺-Zellen aus einer Tetracyclin⁺-Kultur (PML⁻) wurden in eine 24-Well-Platte ausgesät. 4 h später wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, u.z. mit Tet⁺- und Tet⁻-Medium. Jeweils 1 ml Medium pro Well. Die 24-Well-Platte wurde für 4 Tage bei 37°C, 5% CO₂ prä-inkubiert. Die Infektion erfolgte in der Verdünnung 10⁻¹ bis 10⁻⁴ der Virusstammlösung (100 µl / Well). Für das weitere Vorgehen siehe oben.

Das Vesicular-Stomatitis-Virus

Das Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) gehört zum Genus der Vesiculoviren und der Familie der Rhabdoviridae. Es ist durch die Negativstrangorientierung des nicht-segmentierten Einzelstranggenoms charakterisiert. Die Virionen sind geschoßähnlich, stäbchenförmige, umhüllte Partikel mit einer Länge von rund 180 nm und einem Durchmesser von 65 nm. VSV wird von Insekten (Stechmücken und Fliegen) auf Säugetiere übertragen und kann bei Rindern und Pferden zur Bläschenkrankheit führen. Eine Übertragung auf den Menschen wurde nur durch Laborkontaminationen beobachtet. Beim Menschen verursacht die VSV Infektion grippeähnliche Symptome (WAGNER und ROSE, 1996).

Aufgrund der für dieses Virus in der Literatur beschriebenen Charakteristiken (CHELBI-ALIX *et al.*, 1998; MESTAN *et al.*, 1988; NOVELLA *et al.*, 1996), soll es in dieser Arbeit als Modellvirus dienen, an dem die Funktionalität der Teste gezeigt werden sollte.

Plaque-Assay Vermessung der VSV Kultur

Im Gegensatz zu gängigen Plaque-Assays mit einem Agarose-Overlay für cytopathogene Viren wurde wie beim Immunfocus-Assay ein Methylcellulose-Overlay verwendet. In einer 6-Well-Platte wurden $7,5 \times 10^5$ bzw. in einer 24-Well-Platte $2,5 \times 10^5$ Vero-Zellen pro Well ausgesät und nach 24 h mit 1 ml bzw. 100 μ l entsprechender VSV-Verdünnung infiziert. Inkubation: 1 h, 37°C, 5% CO₂. Das Inokulum wurde abgenommen und die Zellen mit 5 ml bzw. 2 ml Methylcellulose-Overlaymedium überschichtet. Inkubation: 3 Tage, 37°C, 5% CO₂. Anschließend wurde das Overlaymedium aus den Wells entnommen. Die Wells wurden 2 mal mit 1x PBS gewaschen, um restliche Methylcellulose zu entfernen. Die gesamte Platte wurde dann in einer 4%-igen Formaldehyd-Lösung (in 1x PBS) inkubiert (30 min.). Die Färbung der Zellen erfolgte mit einer 1x Kristallviolett-Lösung (500 μ l / Well). Durch das Virus verursachte cytopathogene, scharf abgegrenzte Bereiche im Zellmonolayer bleiben ungefärbt und sind als helle Bereiche (Plaques) auszählbar. Die *Plaque-forming Units* pro ml (PFU/ml) wurde errechnet.

Cytokin-Assay auf Vero- und HuH7-Zellen

Für Lassa-Virus und LCMV: In einer 24-Well-Zellkulturplatte wurden pro Well $4,1 \times 10^4$ HuH7- bzw. Vero-Zellen in 600 μ l DMEM ausgesät und 6 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Jeweils im Dreifachansatz wurden anschließend die entsprechenden Cytokine (Biochrom) hinzugegeben: IFN- α , IFN- γ , TNF- α und die Kombinationen aus IFN- α +IFN- γ , IFN- α +TNF- α , IFN- γ +TNF- α , IFN- α +IFN- γ +TNF- α sowie die Positivkontrolle mit DMEM. Die Cytokine wurden in einem Volumen von 20 μ l in die entsprechenden Wells zu den 600 μ l des DMEM hinzugefügt. Die Endkonzentration jedes Cytokins betrug 1000 U pro ml. Der Ansatz wurde für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, anschließend wurden die Zellen mit LCMV-Stamm Armstrong, CH-5692 bzw. WE und Lassa-Virus Stamm AV, CSF bzw. NL mit einer MOI von 0,01 infiziert. Hierfür wurde das cytokinhaltige-Medium aus den Well verworfen und die Viruslösung zur Infektion in einem Volumen von 100 μ l / Well auf die Zellen gegeben. Inkubation für 1 h bei 37°C, 5% CO₂. Das Inokulum wurde anschließend abgenommen und die Zellen zwei mal mit 1x PBS gespült. Anschließend wurden wieder 600 μ l Medium und die entsprechenden Cytokine (s.o.) auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für LCMV-Stamm Armstrong und WE sowie Lassa-Virus Stamm AV und NL für 48 h sowie für LCMV-Stamm CH-5692 und Lassa-Virus Stamm

CSF für 72 h bei 37°C, 5% CO₂. Das Medium wurde abgenommen und bei -70°C gelagert. Die Zellen in den Wells wurden mit Kristallviolett gefärbt, um die Zelldichte begutachten zu können.

Für VSV: Vorgehen wie zuvor beschrieben. 2×10^5 HuH7- bzw. Vero-Zellen wurden in eine 6-Well-Platte ausgesät und nach 24 h Cytokine in entsprechender Konzentration auf die Zellen gegeben (pro Well 3 ml Medium-Cytokin-Lösung). Präinkubation für 24 h bei 37°C, 5% CO₂. Die Infektion erfolgte mit einer MOI 0,01 für 1 h. Anschließende Abnahme des Inokulums und zweimaligem Waschen mit 1x PBS. Die Zellen wurden mit frischem cytokinhaltigem Medium für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Einfluß der PML- und Sp100-Überexpression auf die Virusreplikation

In eine 24-Well-Zellkulturplatte werden pro Well $4,2 \times 10^4$ HtTA-PML⁺⁺ - bzw. HtTA-Sp100⁺⁺ - Zellen (in tetracyclinhaltigem Medium vorkultiviert) in Medium ohne Tetracyclin ausgesät. Nach 4 h erfolgt ein Mediumwechsel mit bzw. ohne Tetracyclin (1 ml / Well). Inkubation für 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂. Eine Infektion der Zellen wird mit LCMV-Stamm Armstrong in einer MOI von 0,1; 0,01 und 0,001 durchgeführt. Infektion für 1 h bei 37°C, 5% CO₂. Entnahme des Inokulums und zwei maliges waschen der Zellen mit 1x PBS. Anschließend werden die Zellen mit frischem Medium entsprechend mit und ohne Tetracyclin für 48 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Mediumüberstände werden abgenommen und bei -70°C gelagert. Eine RNA Präparation aus 140 µl Überstand erfolgt nach beschriebenem Protokoll mit Diatomeenerde.

Die Infektion von HtTA-Sp100⁺⁺ -Zellen mit Lassa-Virus Stamm AV und NL erfolgt mit einer MOI von 0,1 nach oben genanntem Protokoll.

Die Kontrollinfektionen von HtTA-Sp100⁺⁺ und HtTA-PML⁺⁺ mit VSV wurden in 6-Well Platten ($1,6 \times 10^5$ Zellen / Well) durchgeführt. Infektion mit MOI 0,01 für 24 h bei 37°C, 5% CO₂. Anschließende Titerbestimmung per Plaque-Assay auf Vero-Zellen.

4.2.2.4 Vitalitätsbestimmung mit Hilfe des MTT Tests

Die Aktivität lebender Zellen kann mit Hilfe des MTT Tests quantifiziert werden (MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid). In die Zelle aufgenommenes MTT wird von mitochondrialen Dehydrogenasen zu einem dunkelblauen, wasserunlöslichen, kristallisierenden Farbstoff (Formazan) umgesetzt. Wird dieser Farbstoff durch Alkohol wieder in Lösung gebracht, so kann eine photometrische Bestimmung (560 nm) der umgesetzten Farbstoffmenge vorgenommen werden. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der Menge an Dehydrogenasen in der Zelle, die in aktivierten oder proliferierenden Zellen besonders hoch ist. Zellschädigungen oder eine reduzierte Proliferation können so quantitativ bestimmt werden (LINDL UND BAUER, 1994).

Um zellproliferative Einflüsse von Cytokinen auf HuH7- und Vero-Zellen zu untersuchen, wurde die Lebensfähigkeit cytokinbehandelter Zellen mit dem MTT-Test bestimmt. Auf die mit Cytokinen inkubierten Zellen wurden pro Well 50 µl MTT-Lösung (5 mg MTT (Sigma) / ml in 1x PBS). Dabei befand sich pro Well 200 µl Restmedium. Die Inkubation erfolgte für 90 min. bei 37°C, 5% CO₂. Der Überstand aus den Wells wurde verworfen und die Zellen mit einer 4%-igen Formaldehydlösung (in 1x PBS) 30 min. fixiert. Der sich in den Zellen gebildete blaue Niederschlag (Tetrazoliumkristalle) ist nicht wasserlöslich und wurde somit durch den Fixierungsschritt nicht beeinflusst. Das Tetrazolium wurde mit 1 ml EtOH (vergällt) pro Well aus den Zellen gelöst (10 min. leicht schüttelnd, RTemp). Die gesamte 24-Well-Platte wurde photometrisch im ELISA-Meßgerät ausgewertet. Testwellenlänge 560 nm, Referenzwellenlänge 630 nm. Je höher der erhaltene Extinktionswert, desto mehr vitale Zellen waren vorhanden.

4.2.2.5 Transfektion

Die Transfektion wurde mit Hilfe des FuGENE6 Transfection Reagents (Roche) durchgeführt. In einer 24-Well-Platte wurden pro Well $1,25 \times 10^5$ HuH7- bzw. Vero-Zellen ausgesät. Vor der Transfektion waren die Zellen zwischen 50 und 80% konfluent. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen (500 µl DMEM (inkl. 10% FCS pro Well)). 2 h später wurden die Zellen von 10 Wells transfiziert.

Ansatz pro Well:

Plasmid	0,25 µg (HuH7-Zellen) bzw. 0,5 / 2 µg Vero-Zellen
FuGENE6	3 fache DNA Menge in µl
DMEM (ohne FCS)	ad 100 µl

Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt und bei RTemp für 30 min. präinkubiert, pro Well wurden hiervon 100 µl tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Kontrolle der TNF-α Pathways in HuH7- und Vero-Zellen

Die NFκB-vermittelte Luciferase-Expression wurde dann durch TNF-α (1000 U / ml) induziert. Hierfür wurde das Medium verworfen und durch 600 µl frisches Medium ersetzt. In 5 Wells wurden die Plasmide durch 600 U TNF-α induziert. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6 und 8 Stunden (HuH7-Zellen) bzw. 4 und 6 Stunden (Vero-Zellen) wurde jeweils ein Well mit induzierten und nicht induzierten Zellen für den Luciferase Reporter Gene Assay (Roche) vorbereitet. Für diesen Assay wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Luciferase Lysispuffer abgeschabt. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Cup überführt

und 15 min. bei RTemp inkubiert. Anschließende Zentrifugation bei 14.000 rpm für 3 min. Der Überstand kann bei -20°C gelagert werden. 20 µl dieses Überstandes wurden mit 80 µl Luciferase Reagenz versetzt (kurz mischen) und die Lichtemission im Luminometer (Junior, EG&G Berthold, Bad Wildbad) gemessen.

4.2.2.6 indirekte Immunfluoreszenz

Serologische Untersuchungen der Affenserum

LCMV-spezifische Antikörper in Affen-Seren wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dazu wurden 2×10^6 Vero-Zellen in einer 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und in 20 ml DMEM (PAA) bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. 20 h später wurden die Zellen mit dem LCMV-Stamm Armstrong infiziert, MOI 0,01. 48 h p.i. wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA (PAA) vom Flaschenboden gelöst. Die in Lösung befindlichen Zellen wurden mit 2 ml DMEM versetzt und in Cups für 3 min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Bis auf 100-150 µl wurde die Lösung über dem Zellpellet verworfen. Die Zellen wurden resuspendiert und auf die Wells eines Immunfluoreszenzobjektträgers (Carl Roth) pipettiert. Es wurden pro Well 20 µl Zell-Lösung aufgetragen, die anschließend wieder herunterpipettiert wurden. So blieb auf den Wells eine einlagige Zellschicht übrig, die an der Luft bei RTemp. getrocknet wurde. Die Fixierung der Zellen und Inaktivierung des Virus erfolgt für 15 min. in Aceton. Pro 75 cm²-Zellkulturflasche wurden ca. 30 Immunfluoreszenz-Objektträger mit jeweils 12 Wells hergestellt. Nicht benötigte Objektträger wurden im Vakuum verschweißt und bei -70°C gelagert.

10 µl einer 1:20 bzw. 1:40 Verdünnung wurde von jedem Serum pro Well aufgetragen und für eine 1 h bei 37°C (feuchte Atmosphäre) inkubiert. Als Positivkontrollen wurden eine 1:2000 Verdünnung vom monoklonalen AK anti-LCMV NP (mAb Nr. 53 Ascites) (Maus) und eine 1:80 Verdünnung eines LCMV IgG-positiven humanen Serums eingesetzt. Der Objektträger wurde anschließend dreimal für 4 min. mit 1x PBS gewaschen, RTemp. Humanes bzw. Affen-IgG wird mit Hilfe von Fluorescein Isothiocyanat (FITC) - markierten anti-Human IgG und anti-Affen IgG Antikörpern (Sigma-Aldrich), der Maus-monoklonale Antikörper per Rhodamin markierten anti-Maus Antikörpern detektiert (Dianova). Jeweils 10 µl einer 1:200 Verdünnung wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Waschen wie zuvor beschrieben.

Infektionskontrolle bei LCMV und Lassa-Virus Kulturen

Die Immunfluoreszenzobjektträger werden wie oben beschrieben hergestellt.

Kontrolle der LCMV-CH-Infektion auf L-Zellen. Primäre AK: LCMV-spezifisches Kaninchen-AK WE3(KN)-12 (1:750 Verdünnung in 1x PBS), sekundäre AK: FITC-markierter anti-Kaninchen IgG AK (1:100 Verdünnung in 1x PBS, Fa. Dianova, Hamburg).

Kontrolle der LCMV Armstrong bzw. WE Infektion auf Vero- und HuH7-Zellen. Primärer AK: LCMV-spezifischer monoklonaler Maus AK (1:2000, anti-LCMV Nukleoprotein Maus mAb Nr. 53 Ascites in 50% Glycerol), sekundärer AK: anti Maus Rhodamine markiert (1:200, Dianova)

Kontrolle der Lassa-Virus AV, CSF und NL Infektion auf Vero- und HuH7-Zellen. Primärer AK: Maus monoklonaler AK (1:50, L2F1), sekundärer AK: anti Maus Rhodamine markiert (1:200, Dianova)

Indirekte Immunfluoreszenz von PML- und Sp100-Protein

Vorgehen wie für die indirekte Immunfluoreszenz beschrieben.

Primäre Antikörper:

Sp100-Protein: RAT Sp26 27.10.84 in 1x PBS 1:100 verdünnt

PML-Protein: RAT anti PML N_{3/0} in 1x PBS 1:100 verdünnt

Sekundäre Antikörper:

anti Ratte FITC markiert (Dianova), in 1x PBS 1:100 verdünnt

Doppelimmunfluoreszenz auf HtTA-PML⁺⁺ -Zellen

Vorbereitung der Immunfluoreszenzobjektträger: In einer 25 cm²-Zellkulturflasche werden 2 x 10⁵ HtTA-PML⁺⁺-Zellen in DMEM ohne Tetracyclin ausgesät. Die Zellen wurden zuvor in Medium mit Tetracyclin kultiviert, so daß PML nicht expremiert wurde. Nach 4 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen entsprechend mit und ohne Tetracyclin 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Dann wurden die Zellen mit einer MOI von 0,01 ausgehend von der Anfangszellzahl mit Lassa-Virus Stamm AV infiziert. Inkubation für 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂. Der Mediumüberstand wurde bis auf 1,5 ml verworfen, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin-EDTA (PAA) in Lösung gebracht und mit den zurückbehaltenen 1,5 ml Mediumüberstand gemischt. Zusätzlich wurden 3 ml frisches Medium (entsprechend mit und ohne Tetracyclin) zu den Zellen pipettiert. Auf einen sterilen 12-Well-Immunfluoreszenzobjektträger (Carl-Roth) werden von dieser Lösung 25 µl pro Well pipettiert und bei 37°C, 5% CO₂ in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen haben so die Möglichkeit an der Glasoberfläche zu adhären. Die Objektträger werden nach 24 h mit 1x PBS gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend werden die Zellen für 15 min. in Aceton fixiert.

Durchführung der Doppelimmunfluoreszenz: Es wurden jeweils 2 primäre und zwei sekundäre Antikörper miteinander inkubiert. Als primären AK für die PML-Detektion wurde der anti PML N_{3/0} Ratten AK in einer Verdünnung von 1:100 und für die Lassa-Virusdetektion der Lassa-Virus NP-spezifische monoklonale Antikörper L2F1 in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Beide primären Antikörper wurden für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit 1x PBS gewaschen. Inkubation der sekundären Antikörper (1 h, 37°C): anti Ratte FITC markiert (1:200 Verdünnung) und anti Maus Rhodamin markiert (1:100 Verdünnung). Die Objektträger wurden 3 mal mit 1x PBS gewaschen und für die Mikroskopie mit einem Deckgläschen verschlossen.

4.2.2.7 Western-Blot

Neben der RT-PCR und dem Immunfocus-Assay sollten Lassa Nukleoproteine von IFN- α und IFN- γ induzierten HuH7-Zellen intrazellulär im Western-Blot untersucht werden. In 6-Well Platten wurden jeweils $1,7 \times 10^5$ HuH7-Zellen / Well ausgesät und nach 4 Stunden im Doppelansatz 0, 100 und 1000 U / ml von IFN- α bzw. IFN- γ hinzugefügt. 24 h später wurden die Zellen mit einer MOI von 0,01 mit Lassa-Virus Stamm AV infiziert. 48 h p.i. wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 0,7 ml 1x Lysispuffer (Luciferase Reporter Gene Assay, Roche) abgeschabt und die Lösung für 15 min. bei RTemp inkubiert. Dann wurde das Lysat bei 13.000 rpm, 3 min. zentrifugiert und 600 μ l des Überstandes mit dem gleichen Volumen 2x SDS Ladepuffer versetzt. Mit 120 μ l DTT (1M) wird die Lösung für 10 min. bei 90°C denaturiert und jeweils 25 μ l auf ein Gradienten-Polyacrylamidgel (4-16%, NuPAGE Novex Bis-Tris Gels, Invitrogen) aufgetragen. Die Proteine wurden für 60 min., 200 Volt und 150 mA aufgetrennt. *Gelblot*: Der Blot erfolgte für 60 min., 30 Volt, 320 mA auf eine Nitrocellulosemembran (Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher&Schuell). Abblocken der Membran mit 1x Roti Block (Carl-Roth) ü.N. bei 4°C, Färbung mit Ponceau Rot für 10 min. bei RTemp., Entfärben mit ddH₂O für ca. 3 min.

NP Detektion - primärer AK rabbit anti NP (19.12.02) 1:1000 verdünnt in TBS-(0,2x) Roti-Block Lösung, 120 min., RTemp, anschließend 3x mit TBS + 0,5% Tween 20 gewaschen.

sekundärer AK anti rabbit HPOD gelabelt (Dianova) 1:10.000 verdünnt in TBS-(0,2x) Roti-Block Lösung, 60 min., RTemp, anschließend 3x mit TBS + 0,1% Tween 20 gewaschen.

Lumineszenzmessung mit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat (Pierce), pro Blot 0,5 ml Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution und 0,5 ml Super Signal West Pico Luminol / Enhancer Solution mischen und auftragen. Inkubation für 5 min. bei RTemp, restliche Flüssigkeit wurde entfernt und für 1 min., 5 bzw. 10 min. Kodak Scientific Imaging Film (18x24 mm) belichtet und entwickelt.

4.2.3 Molekularbiologie

4.2.3.1 RNA-Präparation

Gefrorene Callitrichid-Organen

Von gefrorenen Callitrichid-Organen wurden ungefähr 30 mg in ein 2 ml Bead-Mill-Gefäß gegeben und mit Hilfe des Fast Prep™ FP 120 (SAVANT Instruments Inc., Farmingdale, NY) in 600 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit, QIAgen) homogenisiert, 2 x 20 sec., 6.000 rpm. Die Zellysat-Lösung wurde zweimal für 2 min. bei 12.000 rpm zentrifugiert, das Pellet wurde jeweils verworfen. Aus dem Überstand erfolgte die RNA-Extraktion mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach Herstellerangaben. Elution in 2 x 40 µl Elutionspuffer.

Paraffinfixierte Mikrotomschnitte von Callitrichid-Organen

Ein Paraffinschnitt wird mit 560 µl AVL-Puffer (QIAamp Viral RNA Kit, Qiagen) für 10 min. bei 62°C, 1400 rpm im Thermomixer inkubiert. Anschließende Zentrifugation (12.000 rpm, RTemp.) und Entnahme der flüssigen Phase unter dem erstarrten Paraffin. RNA-Extraktion mit Hilfe des QIAamp Viral RNA Kits nach Herstellerangaben. Elution in 2 x 40 µl Elutionspuffer.

Serum und Urin von Callitrichiden sowie von LCMV-CH-haltigen Zellkulturüberständen

Jeweils 140 µl Serum, Urin oder Zellkulturüberstand werden mit Hilfe des QIAamp Viral RNA Kits nach Herstellerangaben extrahiert. Elution in 2 x 40 µl Elutionspuffer.

RNA-Präparation mit Diatomeenerde aus virushaltigen Zellkulturüberständen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine kostengünstige und leicht durchzuführende RNA-Extraktionsmethode aus virushaltigen Zellkulturüberständen in Anlehnung an die Methode von BOOM *et al.* (1990) entwickelt. In einem chaotropen Guanidinium-Thiocyanat-Lysispuffer bindet Nukleinsäure an Diatomeenerde (überwiegend Siliziumoxid, fossilisierte Zellwände unicellulärer Algen). Über zwei Ethanol Waschschrte werden unspezifisch gebundene Moleküle entfernt, so daß im Eluat gereinigte und mit dem Faktor 1,4 aufkonzentrierte Nukleinsäuremoleküle erhalten werden.

In einem festschließenden 1,5 ml Cup wurde 140 µl virushaltiger Zellkulturüberstand und 560 µl AVL-Lysis-Puffer (Fa. Qiagen) gemischt und 15 - 20 min. bei RTemp inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend in ein 1,5 ml Cup mit ca. 100 mg Diatomeenerde (*Approx 95% SiO₂, acid washed, not further calcined*; Sigma-Aldrich) und 560 µl Ethanol (abs.) gegeben. Die Diatomeenerde wurde durch vortexen in der Lösung verteilt und für 30 min. (RTemp) im Thermoschüttler unter ständigem Schütteln inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, daß die

Diatomeenerde nicht sedimentierte. Anschließend wurde die Diatomeenerde in einer Tischzentrifuge pelletiert (14.000 rpm, 1 min., RTemp). Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl AW1 Waschpuffer (Fa. Qiagen) versetzt und gevortext, Zentrifugation siehe oben. Anschließend wird das Pellet in 500 µl AW2 Waschpuffer (Fa. Qiagen) resuspendiert, Zentrifugation siehe oben. Abschließend wird das Pellet in 400 µl Aceton gewaschen, um Ethanolreste zu entfernen. Das Pellet wird anschließend für 20 min. bei 56°C getrocknet. Die Elution der RNA erfolgte in 100 µl ddH₂O durch stark vortexen (15 sec.) und anschließende Zentrifugation (2 min., 14.000 rpm). Das Eluat wurde in ein neues Cup überführt und erneut zentrifugiert (2 min., 14.000 rpm). Eluate werden bei 4°C bzw. -20°C gelagert.

Effizienzbestimmung der RNA-Präparationsmethode

Die Wiederfindungsrate der in eine Präparation gegebenen RNA-Moleküle muß bestimmt werden, um die Zuverlässigkeit der neu entwickelten Extraktionsmethode einschätzen zu können.

Von synthetisch hergestellter RNA (LCMV-RNA Transkript) wurden Verdünnungen in Logstufen von 10⁻⁶ bis 10⁻¹¹ in ddH₂O hergestellt. 140 µl jeder Verdünnung wurde mit Diatomeenerde extrahiert. Die Elution erfolgte anschließend in 100 µl H₂O, d.h. es erfolgte eine Aufkonzentrierung um den Faktor 1,4. In der quantitativen RT-PCR wurden 2 µl von jedem Extrakt und zum Vergleich (= Standardreihe) 2 µl direkt aus jeder Verdünnung eingesetzt. Die synthetisierte Amplifikatmenge und die damit verbundene Wiederfindungsrate wurde anhand einer Standardreihe bestimmt.

4.2.3.2 konventionelle RT-PCR, quantitative RT-PCR

Diagnostische LCMV-RT-PCR zur Analyse der Callitrichiden

Ein 310 bp langes Fragment aus dem S-Segment wurde mit Hilfe des Platinum Quantitative RT-PCR Thermoscript One-Step Systems (Life Technologies) amplifiziert. Der 20 µl RT-PCR Ansatz enthielt 2 µl RNA Extrakt, 0,2 µM Primer LCMV-S 13+ und 0,2 µM Primer LCMV-S 322-. Für die *seminested* PCR wurden 0,2 µM Primer arena-1+ (bindet im konservierten Terminus der Arenavirus RNA) anstatt des Primers LCMV-S 13+ verwendet.

Die Reaktion wurde wie folgt im Termocycler Perkin Elmer 9600 durchgeführt: Reverse Transkription 50°C, 30 min.; 95°C, 5 min. Touch-down Amplifikation, 10 Zyklen 95°C, 10 sec.; 60°C (-1°C pro Zyklus), 5 sec. und 72°C, 25 sec. Weitere 40 Zyklen bei 95°C, 10 sec.; 50°C, 10 sec. und 72°C, 30 sec. Finale Extinktion 72°C, 5 min.

Seminested LCMV PCR

Konnten aus der oben beschriebenen Amplifikation keine Produkte im Ethidiumbromid Agarosegel detektiert werden, wurde 1 µl dieser Reaktion in einer *seminested* PCR reamplifiziert. In einem 25 µl Ansatz wurden jeweils 0,4 µM von Primer LCMV-S 13+ und LCMV-S 322-, 1x Reaktionspuffer, 150 µM MgCl₂, 200 µM dNTP und 1,5 U *Taq* DNA-Polymerase (Pharmacia) eingesetzt.

Die Reaktion wurde im Thermocycler Perkin Elmer 9600 durchgeführt: 95°C, 2 min.; 25 Zyklen 95°C, 10 sec.; 50°C, 10 sec. und 72°C, 30 sec. Finale Extinktion 72°C, 5 min.

Full-length RT-PCR der LCMV S-RNA

Reverse Transkription - cDNA-Synthese: 6 µl RNA Eluat wurden mit 20 pmol Primer arena 1+ in einem 8 µl Ansatz bei 70°C, 15 min. inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden dann auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert. Ein 19 µl Reaktions-Vormix mit 8 µl RNA Primermix, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT und 500 µM dNTP wurde bei 50°C für 2 min. inkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von 200 units Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies) und 15 µl Mineralöl. Die Reaktion wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 50°C, 30 min.; 55°C, 5 min., 50°C, 20 min., 60°C, 1 min. und 50°C, 10 min. Die Enzyminaktivierung erfolgte bei 70°C für 15 min. Ein Abbau der RNA erfolgte durch Zugabe von 2 U RNase H (Life Technologies), 37°C für 20 min.

cDNA Amplifikation: Die Amplifikation der cDNA wurde mit Hilfe des Expand High Fidelity PCR Systems (Roche Molecular Biochemicals) durchgeführt. Der 45 µl Reaktionsvormix enthielt 1 µl cDNA, 1x Puffer mit 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP und jeweils 0,2 µM Primer arena 1a+, arena 1b+ und arena 1c+. Alternativ wurden jeweils 0,3 µM vom Primer LCMV-S 13+ und LCMV-S 966- eingesetzt. Der Premix wurde auf 95°C, 1 min. erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 55°C wurden pro Reaktion 5 µl Enzym-Mix [2,6 U *Taq* und *Pwo* Polymerase (im 1x Puffer verdünnt)] hinzugefügt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. PCR Temperaturprofil: 40 Zyklen 94°C, 1 min.; 55°C, 90 sec. und 72°C, 3 min. - eine Zunahme der Elongationszeit jede 10 Zyklen um 2 min. Die Reaktion lief im Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA) (GÜNTHER *et al.*, 2000).

Quantitative Lassa- bzw. LCMV real-time RT-PCR

SybrGreen I (Biozym) interkaliert reversibel in doppelsträngige DNA. Die *real-time* RT-PCR im LightCycler wurde mit Hilfe dieses Fluoreszenzfarbstoffes detektiert. Weil SybrGreen die reverse Transkription hemmt, muß es in diesem Reaktionsschritt getrennt von der reversen Transkriptase vorliegen. Diese Aufgabe übernahm in diesen Versuchen das SybrGreen bindende Molekül SGS (Patent Nr. 101 50 121.8, Deutsches Patentamt, München), was SybrGreen in reversibler Weise binden kann. Weitere Funktionen dieses Moleküls sind der

Patentschrift zu entnehmen. Nach Beendigung der RT während der Denaturierungsphase wird der Farbstoff freigesetzt und kann in der PCR während jedes Zyklus in die Amplifikate interkalieren. Dabei ist die Menge an PCR-Produkten und der eingelagerten SybrGreen-Moleküle proportional. Ausschließlich in die DNA interkalierte Moleküle werden mit Licht einer Wellenlänge von 495 nm angeregt, so daß deren Fluoreszenz gemessen werden kann. Die Zunahme der Fluoreszenz ist dabei proportional der Zunahme synthetisierter Amplifikate. Anhand einer Standardreihe aus in-vitro transkribierter partieller S-RNA läßt sich die Konzentration der zu untersuchenden Probe bestimmen. Auch in PCR-Nebenprodukte interkaliert SybrGreen, so daß eine Zunahme der Fluoreszenz zu fälschlicherweise erhöhten Produktbestimmungen führen kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Lassa bzw. LCMV RT-PCRs sind hinsichtlich der Nebenprodukvermeidung optimiert.

Die Amplifikation erfolgte mit dem Brilliant™ Single-Step Quantitative RT-PCR Core Reagent Kit (Stratagene). Der Zusatz von 0,8 µg BSA ist aufgrund der LightCycler Glaskapillaren notwendig. Das BSA sättigt die Glasoberfläche ab, so daß daran eine Bindung der Enzyme verhindert wird. 20 µl Ansatz: 2µl Template; 1x Core Buffer; 2,5 mM MgCl₂; 800 µM dNTP; 0,8 µg BSA (Sigma); 5 µM SGS; 1:10.000 Verdünnt SybrGreen; StrataScript 1,25 U; SureTaq 1U; ad 20µl mit ddH₂O

LCMV Primer: 250 µM LCMV S-13+ und 250 µM LCMV S-322-

Lassa Primer: 200 µM 36 E2 und 300 µM 80 F2 (Stamm AV, NL, in-vitro RNA

Transkript) sowie 200 µM 36 E2 und 300 µM 80 F2-CSF (Stamm CSF)

Temperaturprofil der LCMV RT-PCR

	Traget Temp. (°C)	Incubation Time hrs:min:sec	Temp Transition Rate °C / s	Sec. Target Temp °C	Step Size °C	Step Delay cycles	Acquisition Mode
RT (1x)	45	00:20:00	20.0	0	0.0	0	NONE
Denat. (1x)	95	00:12:40	20.0	0	0.0	0	NONE
Precycle (10x)	95	00:00:10	20.0	0	0.0	0	NONE
	60	00:00:10	20.0	52.0	0.8	0	NONE
	72	00:00:20	20.0	0	0.0	0	NONE
Cycle (25x)	95	00:00:05	20.0	0	0.0	0	NONE
	52	00:00:10	20.0	0	0.0	0	NONE
	65	00:00:30	20.0	0	0.0	0	NONE
	83	00:00:20	20.0	0	0.0	0	SINGLE
Schmelzkurve	95	00:00:05	20.0	0	0.0	0	NONE
	60	00:00:15	20.0	0	0.0	0	NONE
	95	00:00:01	0.1	0	0.0	0	CONT.
Cooling	40	00:02:00	20.0	0	0.0	0	NONE

Temperaturprofil der Lassa-Virus RT-PCR

	Traget Temp. °C	Incubation Time hrs:min:sec	Temp. Transition Rate °C/s	Sec. Target Temp °C	Step Size °C	Step Delay cycles	Acquisition Mode
RT (1x)	45	00:20:00	20.0	0	0.0	0	NONE
Denat. (1x)	95	00:12:40	20.0	0	0.0	0	NONE
Precycle (10x)	95	00:00:10	20.0	0	0.0	0	NONE
	60	00:00:10	20.0	50.0	1.0	0	NONE
	72	00:00:20	20.0	0	0.0	0	NONE
Cycle (25x)	95	00:00:05	20.0	0	0.0	0	NONE
	55	00:00:10	20.0	0	0.0	0	NONE
	65	00:00:30	20.0	0	0.0	0	NONE
	80	00:00:20	20.0	0	0.0	0	SINGLE
Schmelzkurve	95	00:00:05	20.0	0	0.0	0	NONE
	60	00:00:15	20.0	0	0.0	0	NONE
	95	00:00:01	0.1	0	0.0	0	CONT.
Cooling	40	00:02:00	20.0	0	0.0	0	NONE

Die Versuche wurden mit der LightCycler Software 3.0 und 3.5 (Roche) durchgeführt und ausgewertet.

3.2.3.3 RNA in-vitro Transkription

RNA in-vitro-Transkripte dienen als Positivkontrolle und RNA-Standard in der quantitativen Lassa und LCMV RT-PCR. Aus klonierten PCR Amplifikaten wird RNA in-vitro transkribiert. Die in dieser Arbeit verwendete revers transkribierte Lassa RNA wurde freundlicherweise von Christian Drosten, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, zur Verfügung gestellt. Die Sequenz dieses Standards ist Lassa-Virus Stamm Josiah.

Der LCMV Standard wurde mit der Sequenz des Stammes WE wie folgt transkribiert:

Ligation eines PCR-Amplifikates (LCMV WE S-RNA PCR mit Primer LCMV S 13+ und 322-) in Vektor pT-Adv (AdvanTAge PCR-Cloning Kit, Clontech). Vorgehen nach Herstellerangaben. Klonierung in DH5 α kompetente E. coli Zellen: zu den auf Eis aufgetauten Zellen (100 μ l) wurden 10 μ l des Ligationsansatzes pipettiert. Inkubation für 30 min. auf Eis. Danach wurden die Zellen im Wasserbad für 90 sec. bei 42°C und anschließend für 2 min. auf Eis inkubiert. Zu den Zellen wurden 900 μ l LB - Medium (Gibco) gegeben und die Zellen 60 min. bei 37°C unter ständigem schütteln inkubiert. Zentrifugation der Zellen bei 14.000 rpm, 2 min. Anschließend wurden die Zellen in 200 μ l LB-Medium resuspendiert, um davon jeweils 150 μ l bzw. 50 μ l auf eine LB-Agar Platte (mit Ampicillin, 100 μ g / ml) aufzutragen. Das blau-weiß Screening wurde mit X-GAL und IPTG durchgeführt (jeweils 0,8 mg / Platte nachträglich in einem Volumen von

100 µl aufgetragen). Von 7 weißen Klonen wurde eine Plasmid-Miniprep Kultivierung mit anschließender Plasmid-Aufreinigung nach Herstellerangaben vorgenommen (Plasmid Mini Kit, Machery & Nagel). Untersuchung der Fragment-Orientierung per PCR. 25 µl PCR Ansatz: 1x Reaktionspuffer, 0,2 mM dNTP-Mix, 0,4 µM Primer LCMV S 322- und M13 (-40), 2 µl Template, 1 U taq DNA-Polymerase (GL Bioscience, Bremen). Die Reaktion wurde im Perkin-Elmer 9600 Thermocycler nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt: initiale Denaturierung 95°C für 3 min.; Amplifikation 95°C, 30 sec., 55°C - 30 sec., 72°C - 1 min. (30 Zyklen), terminale Elongation 72°C für 10 min. Fragmentanalyse auf einem 1%-igem Agarosegel.

Ein Plasmid, daß das LCMV WE Amplifikat in richtiger Orientierung enthielt, wurde mit Hilfe von M13 Universalprimern (Clontech) (0,4 µM) nach obigem PCR-Schema amplifiziert. Die resultierenden rund 500 bp langen Amplifikate wurden mit Natrium-Acetat gefällt. 365 µl Ansatz: 25 µl PCR Ansatz, 70% EtOH (p.a.), 80 mM NaAc (pH 4,6), ad 365 µl ddH₂O. Lösung mischen und 15 min. bei 14.000 rpm zentrifugieren. Überstand abnehmen und Pellet mit 250 µl 70% EtOH waschen, Zentrifugation 5 min. 14.000 rpm. Pellet bei 37°C trocknen lassen und Amplifikate in 20 µl resuspendieren. 8 µl dieser Lösung wurde in einem 14 µl Ansatz nach Herstellerangaben revers-transkribiert (MEGAscript Ambion-Kit). Inkubation für 12 h bei 37°C. Ein deutlich sichtbares weiß-flockiges Pellet wurde gebildet. Die DNA wurde mit Hilfe von 10 U DNase1 (Promega) für 2 h bei 37°C restringiert. RNA Aufreinigung mit Hilfe des Qia Viral RNA Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben, Elution in 2 x 40 µl und photometrische Bestimmung der RNA Konzentration. Das gewonnene in-vitro Transkript wird als Standard in jeder quantitativen LCMV RT-PCR verwendet, anhand dessen die Konzentration der zu testenden Probe bestimmt wird.

LCMV in-vitro Transkript: Länge 500 bp, $3,19 \times 10^{12}$ Moleküle / µl (Nachweisgrenze in der quantitativen RT-PCR: ca. 60 Moleküle)

Lassa in-vitro Transkript: Länge 450 bp, $9,84 \times 10^{11}$ Moleküle / µl (Nachweisgrenze in der quantitativen RT-PCR: ca. 20 Moleküle)

4.2.3.4 Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit Hilfe des BigDye Terminator AmpliTaq kits (Applied Biosystems) sequenziert (ABI 377, Applied Biosystems).

20 µl Reaktionsmix: 4 µl BigDye Ready Reaction Mix, 1 µg PCR-Produkt, 50 µM Primer, ad 20 µl ddH₂O.

Für die Sequenzierung der diagnostischen RT-PCR Fragmente wurden die Primer LCMV-S 13+ und LCMV-S 322- verwendet. Für die full-length S-RNA Produkte wurden folgende LCMV-S

Primer verwendet: 13+, 966-, 301+, 437-, 861+, 1634+, 1765-, 1920+, 2325+, 2390-, 2814+, 2886-, und 3363-.

Cycle Programm: 96°C, 10 sec.; 50°C, 5 sec.; 60°C, 4 min. (25 Zyklen).

Aufreinigung der Fragmente: 360 µl Ansatz: 20 µl Fragmente; 80 µl ddH₂O; 83,3 nM NaAC (10 µl, 3 M NaAc pH 4,6); 70% EtOH (250 µl, EtOH abs.). Der Ansatz wurde bei RTemp. gemischt und für 15 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2x mit 250 µl EtOH 70% gewaschen. Zentrifugation: 14.000 rpm, 5 min. bei RTemp. Der Überstand wurde erneut verworfen. Zentrifugation wie zuvor. Der restliche EtOH wurde abgenommen und das Pellet für 10 min. bei 37°C getrocknet. Lagerung bei -20°C. Der Sequenzierservice wurde vom Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin bereitgestellt. Jede Nukleotidposition wurde mindestens 2 mal sequenziert. Die S-RNA Sequenzen des LCMV-Stammes CH-5692 (Accession No. AF 325214) und CH-5871 (AF 325215) wurden in die Datenbank *GenBank* eingetragen.

4.2.3.5 Phylogenesse, Datenanalyse

Für phylogenetische Untersuchungen der LCMV-CH-Stämme wurde ein Fragment aus dem GPC-Gen (Position 78-470 von LCMV-Stamm WE) analysiert. Für dieses Fragment liegen die meisten LCMV-Sequenzdaten vor. Das Alignment der GP-Gensequenz wurde initial mit dem Programm Clustal X (1.8) (THOMPSON *et al.*, 1997) durchgeführt und anschließend manuell, basierend auf Aminosäure-Ähnlichkeiten, mit dem Programm Sequence Navigator (1.0.1, Perkin-Elmer) verfeinert. Zusätzlich zu den beschriebenen LCMV-Stämmen wurden folgende Arenavirus-Sequenzen verwendet:

Stamm	Accession No.	Stamm	Accession No.
Tacaribe TRVL11573	M20304	Lassa AV	AF246121
Mopeia 800150	M33879	Lassa Josiah	J04324
JuninMC2	D10072	LCMV Armstrong	M20869
SabiaSPH114202	U41071	LCMV WE	M22138
Pichinde 3739	K02734	LCMV AEv I	AJ233160
Pichinde 4763-P2	AF081553	LCMV Docile	AJ249149
Lassa LP	AF181853	LCMV CHV-2/4	U10158
Lassa 803213	AF181854	LCMV CIPV97001	AF079517
Lassa GA391	X52400	LCMV CIPV76001 Pasteur	AF095783
Lassa CSF	AF333969		

Die Phylogenetischen Untersuchungen wurden mit dem Program PHYLIP 3.57c (FELSENSTEIN, 1995) erstellt. Neighbor-joining (NJ) Analysen wurden mit Hilfe von DNADIST und NEIGHBOR sowie Maximum likelihood (ML) Analysen mit DNAML durchgeführt. NJ Analysen wurden auf der Basis eines *bootstrapped* Datensatzes erstellt (100 *replicates*).

5. Resultate

5.1 Untersuchung eines Callitrichid-Hepatitis-Ausbruchs

In einem Zeitraum von 10 Monaten starben im Zoo Dortmund drei Zwergseidenaffen (*Cebuella pygmaea*) und ein Goeldi-Springtamarin (*Callimico goeldii*) mit klinischen und histopathologischen Symptomen der Callitrichid-Hepatitis. Die Detektion des LCMV wurde per RT-PCR und per Viruskultivierung durchgeführt und ist in dieser Arbeit näher beschrieben. Dies ist die erste Beschreibung eines CH-Ausbruchs in Deutschland.

5.1.1 Klinik und Histopathologie

In Tabelle 1 sind die histopathologischen Befunde zusammengefaßt. Charakteristische Befunde einer LCMV-vermittelten Callitrichid-Hepatitis wurden bei allen vier Tieren gefunden, ohne große Unterschiede zwischen den beiden Spezies.

Vor seinem Tod konnte nur der Goeldi-Springtamarin 5871/00 untersucht werden. Klinische Symptome waren Gelbsucht, Apathie und Bewegungsstörungen. Untersuchungen des Blutes zeigten eine Hepatitis [Aspartat Aminotransferase außerhalb (oberhalb) des Meßbereiches; γ -Glutamyltransferase 9,3 x des oberen Normalwertes (oN); Bilirubin 107 x UNV] und ein Nierenversagen (Kreatinin 103 x oN).

Die Hepatitis war generell durch multifocale Degenerationen und Nekrosen der Hepathozyten charakterisiert. Außerdem waren diffuse fettige Degenerationen und moderate Infiltrationen von mononukleären Zellen im periportal Gewebe zu erkennen (Abbildung 2A). Acidophile Einschluß-Körperchen ähnlich den apoptotischen (*Councilman-like*) *bodies* wurden bei den meisten Tieren in der Leber gefunden (Abbildung 2B). Sie sind typische Anzeichen einer Callitrichid-Hepatitis. Die Lymphknoten zeigten eine folliculäre Hyperplasie und einen Substanzverlust in den germinativen Zentren (Abbildung 2C). Die Beteiligung des zentralen Nervensystems war durch eine leichte lymphocytäre Infiltration der Meningen oder einer cerebralen Perivasculitis gekennzeichnet.

Tabelle 1: Klinische, epidemiologische und histopathologische Daten der Callitrichidae mit einer akuten LCMV-Infektion.

Spezies Geschlecht / Alter Tiernummer	Gehege Tod Symptome	histopathologische Befunde	LCMV Detektion ^a
<i>Cebuella pygmaea</i> m/2 Jahre 5625/99	A 10. Sep. 99	Leber: multiple Foci entzündlicher Zellen; leichte bis mittlere periportale, mononukleäre Infiltrationen; diffuse Aktivierung von Kupffer Zellen; Lymphknoten: Hyperplasia	PA
<i>Cebuella pygmaea</i> m/4 Jahre 1893/99	B 15. Nov. 99	Gehirn: leichte Encephalitis mit perivaskulären Infiltrationen mononukleärer Zellen. Leber: hepatozelluläre Nekrosen und Degenerationen mit wenigen acidophilen (<i>Councilman-like</i>) <i>Bodies</i> ; mäßige Fettumverteilungen	PA LE
<i>Cebuella pygmaea</i> m/4 Jahre 5692/99	B 18. Nov. 99 Gelbsucht	Gehirn: leichte lymphohistocytische Meningitis und im Cortex fokale Gliosis. Leber: multiple foci hepatocellulärer Degeneration und Nekrosen; Fettumverteilungen; wenige acidophile (<i>Councilman-like</i>) <i>Bodies</i> ; mittlere periportale, mononukleäre Infiltrationen. Lymphknoten / Milz: Substanzverlust in den germinativen Zentren; folliculäre Hyperplasia	PA MI VK
<i>Callimico goeldii</i> m/4 Jahre 5871/00	C 14. Jun. 00 Gelbsucht	Gehirn: leichte lymphozytäre Meningitis. Leber: multiple foci hepatocellulärer Degeneration und Nekrosen; Fettumverteilungen; wenige acidophile (<i>Councilman-like</i>) <i>Bodies</i> ; leichte periportale und perivaskuläre lymphocytische Infiltration. Lymphknoten / Milz: Substanzverlust in den germinativen Zentren	UR SE VK

^a Analysemethode und Material für die RNA-Präparation zur LCMV-Detektion und -Sequenzierung.

Abkürzungen:

PA, *seminested* PCR aus paraffinfixierten Leber und Milzschnitten;

LE und MI, *single-round* RT-PCR aus gefrorener frischer Leber (LE) und Milz (MI);

UR und SE, *single-round* RT-PCR aus Urin (UR) und Serum (SE);

VK, Viruskultivierung aus Leber und Milz Gewebe (5692/99) oder Serum (5871/00)

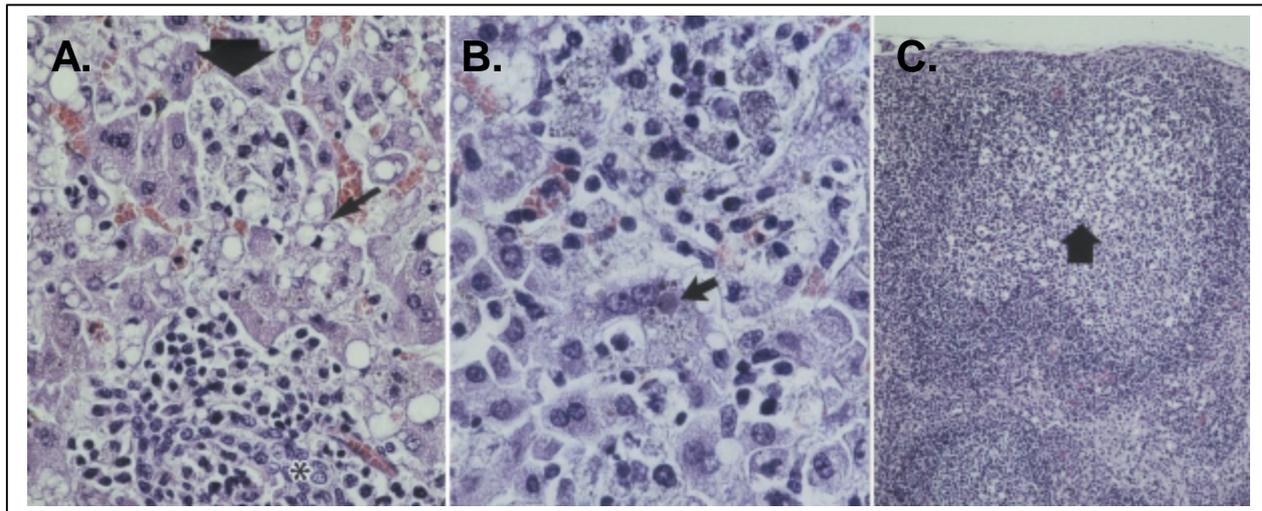


Abbildung 2: Histopathologische Befunde von Zwergseidenaffe 5692/99.

A. Leberschnitt, nekrotische Bereiche (breiter Pfeil) mit Schwellungen und Degenerationen angrenzender Leberzellen (schmaler Pfeil), Infiltrationen von mononukleären Zellen in periportale Bereiche (Stern: Gallengang) und diffuser Fettverteilung (Vergrößerung X376, H&E)

B. Leberschnitt, typische acidophile (Councilman-like) *Bodies* (Pfeil) (Vergrößerung X592, H&E).

C. Lymphknotenschnitt, Hyperplasia von folliculärer und parafolliculärer Region mit Substanzverlust in den germinativen Zentren (Pfeil) (Vergrößerung X94, H&E)

Die histopathologischen Untersuchungen wurden am Deutschen Primatenzentrum, Dr. Hofmann (Göttingen) durchgeführt.

5.1.2 Nachweis einer LCMV-Infektion durch RT-PCR und Isolierung eines neuen LCMV-Stammes aus Callitrichiden

Um den klinischen und histopathologischen Verdacht einer CH zu bestätigen, wurde eine LCMV-Infektion mit Hilfe der RT-PCR und Viruskultivierung in unterschiedlichen Callitrichid-Proben nachgewiesen (Tabelle 1). Gefrorenes Leber- und Milzgewebe, Serum- und / oder Urinproben lagen von den Zwergseidenaffen 1893/99 und 5692/99 sowie vom Goeldi-Springtamarin 5871/00 vor. Die initiale RT-PCR wurde mit einem Homogenat aus Milzgewebe von Zwergseidenaffe 5692/99 und unterschiedlichen LCMV S-RNA-spezifischen Primerkombinationen durchgeführt. Nur mit dem Primerpaar LCMV-S 13+ und LCMV-S 966 konnte ein spezifisches Produkt amplifiziert werden. Dieses wurde sequenziert. Basierend auf dieser Sequenzinformation wurde der Primer LCMV-S 322- synthetisiert, so daß eine *short-range* LCMV RT-PCR für diagnostische Zwecke mit dem Primerpaar LCMV-S 13+ und 322- etabliert werden konnte. Alle oben genannten Gewebe waren in dieser RT-PCR positiv. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 3A in Spur "1893 Leber" dargestellt.

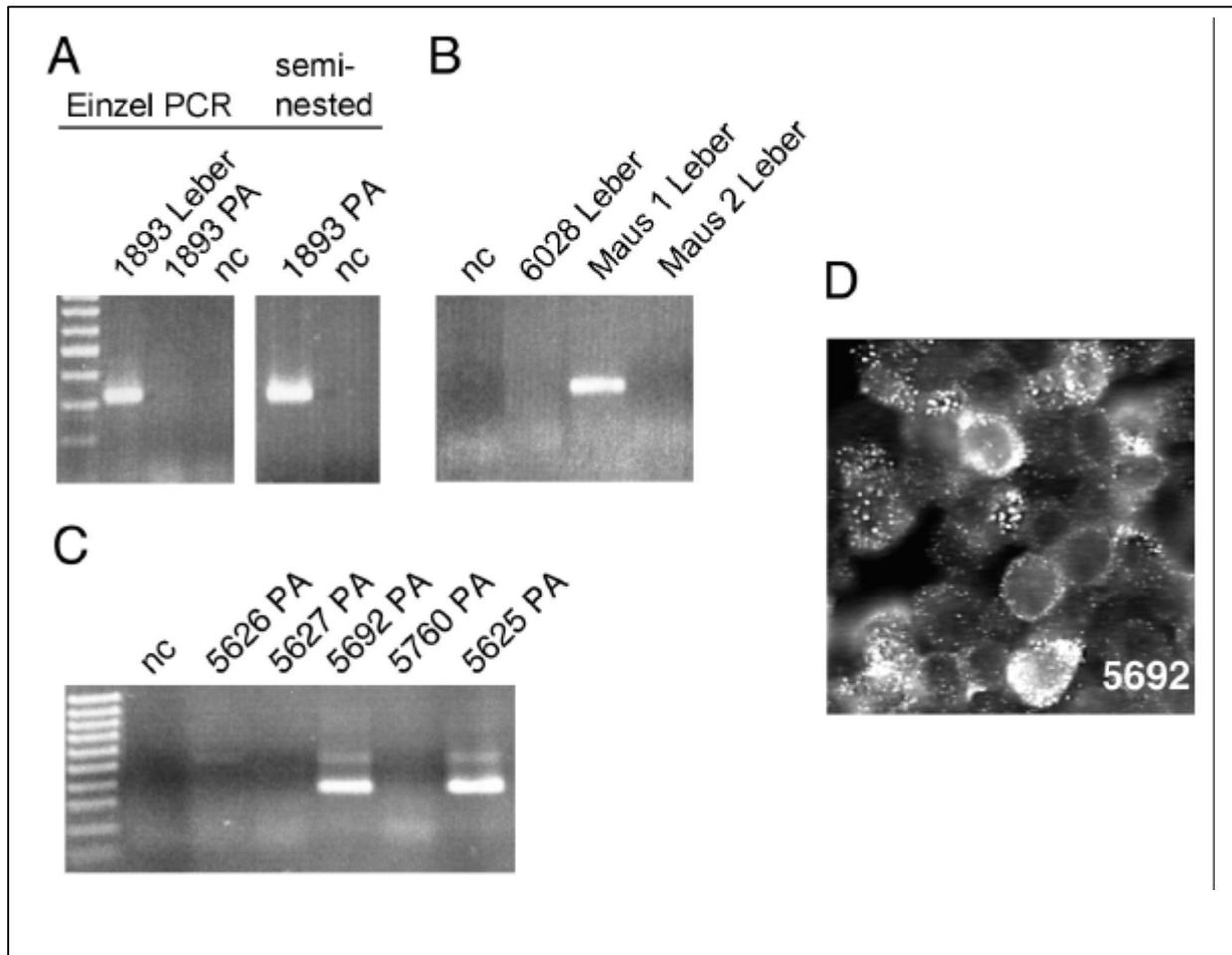


Abbildung 3: Nachweis von LCMV durch RT-PCR und Viruskultivierung.

A. PCR von gefrorenen und in Paraffin fixierten Geweben von Zwergseidenaffe 1893/99. Die gefrorenen frischen Leberproben waren in der *single-round* PCR positiv (links), während die paraffinfixierten Leber- und Milz-Proben nochmals mit der *seminested* PCR amplifiziert werden mußten (rechts).

B. PCR aus frischem Lebergewebe gefangener Mäuse (nahe der Affengehege). Eine Leberprobe aus dem Affen 6028/00 diente als Negativkontrolle. Dieser Affe verstarb nicht an einer LCMV-Infektion.

C. Detektion von LCMV in paraffinfixierten Proben von Zwergseidenaffe 5625/99 durch eine *seminested* PCR. Die Stichhaltigkeit der Methode wurde an Proben von Affen 5760/99 (LCMV negativ) und an dem LCMV infizierten Zwergseidenaffe 5692/99 (Positivkontrolle) demonstriert. Der Tod der Callitrichiden 5626/99 und 5627/99 konnte nicht geklärt werden.

D. Immunfluoreszenzaufnahme von LCMV in Kulturzellen. LCMV wurde aus Milzproben des Zwergseidenaffen 5692/99 nach mehreren Passagen in L-Zellen isoliert. Das LCMV-Antigen wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und LCMV-spezifischen Kaninchen AK (WE3(KN)-12) detektiert. Die Negativkontrolle (nc) ist Wasser. PA, paraffinfixierte Leber und Milzproben.

Ein positiver LCMV-Befund in der Urinprobe von Goeldi-Springtamarin 5871 ist charakteristisch für eine Arenavirus-Infektion und zeigte, daß Urin eine mögliche Quelle der sekundären Transmission - auf andere Callitrichiden aber auch auf den Menschen - darstellt.

Darüber hinaus konnte LCMV ebenfalls in Leber und Milz aus einer von zwei Mäusen detektiert werden, die während des Callitrichid-Hepatitis-Ausbruchs nahe der Affengehege gefangen worden waren (Abbildung 3B).

Von dem nur retrospektiv zu untersuchenden Zwergseidenaffen 5625/99 lagen nur paraffinfixierte Leber und Milzproben vor. Diese Proben waren in der *single-round* PCR negativ,

nicht aber in der *seminested* PCR. Diese RT-PCR wurde mit dem Primerpaar arena-1+ und LCMV-S 322- durchgeführt, gefolgt von einer Reamplifikation mit den Primern LCMV-S 13+ und LCMV-S 322- (Abbildung 3C). Diese Analyse wurde zusammen mit paraffinfixierten Leber- und Milzproben eines LCMV-CH negativen Affen als Negativkontrolle und der LCMV-CH positiven Zwergseidenaffen (1893/99 und 5692/99) als Positivkontrolle durchgeführt. Wie auch beim positiv getesteten Zwergseidenaffen 5625/99 mußte von beiden Positivkontrollen eine *seminested* PCR durchgeführt werden, um Produkte nachweisen zu können (Abbildung 3A, vergleiche 1893 PA im linken und rechten Bild). In den Negativkontrollen konnten keine Produkte amplifiziert werden (Abbildung 3C). Alle positiven PCR-Ergebnisse wurden mit jeweils unabhängigen RNA-Präparationen bestätigt.

Zusätzlich zur PCR wurde vom Zwergseidenaffen 5692/99 (Leber und Milzproben) und vom Goeldi-Springtamarin 5871/00 (Serumprobe) eine Viruskultivierung in L-Zellen vorgenommen. Die L-Zellen wurden 4 Tage p.i. das erste Mal geteilt und mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz hinsichtlich einer LCMV-Infektion untersucht. In Abbildung 4 ist eine infizierte Zelle unter ca. 50 nicht-infizierten Zellen zu erkennen. Bereits 3 Tage später (7 Tage p.i.) konnten wesentlich mehr positive Zellen detektiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 18 Tagen p.i. waren nahezu alle Zellen in der Kultur mit LCMV infiziert. Die Immunfluoreszenz mit LCMV-spezifischen Antikörpern ergab ein granuläres, zytoplasmatisches Muster, welches charakteristisch für eine mit LCMV infizierte Zellkultur ist (Abbildung 3D und Abbildung 4). Im folgenden wird das Virusisolat aus der Milz des Zwergseidenaffen 5692/99 als LCMV CH-5692 und das Isolat aus dem Serum vom Goeldi-Springtamarin 5871/00 als LCMV CH-5871 bezeichnet.

Während den Untersuchungen wurde deutlich, daß das LCMV hinsichtlich äußerer Einflüsse relativ stabil ist. Die Organproben wurden mehr als 24 h nach dem Tod der Tiere entnommen, wurden mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen unterzogen oder wurden per Post bei mittleren bis hohen Außentemperaturen ungekühlt transportiert. Dennoch war ein Virusnachweis und sogar die Virusanzucht möglich.

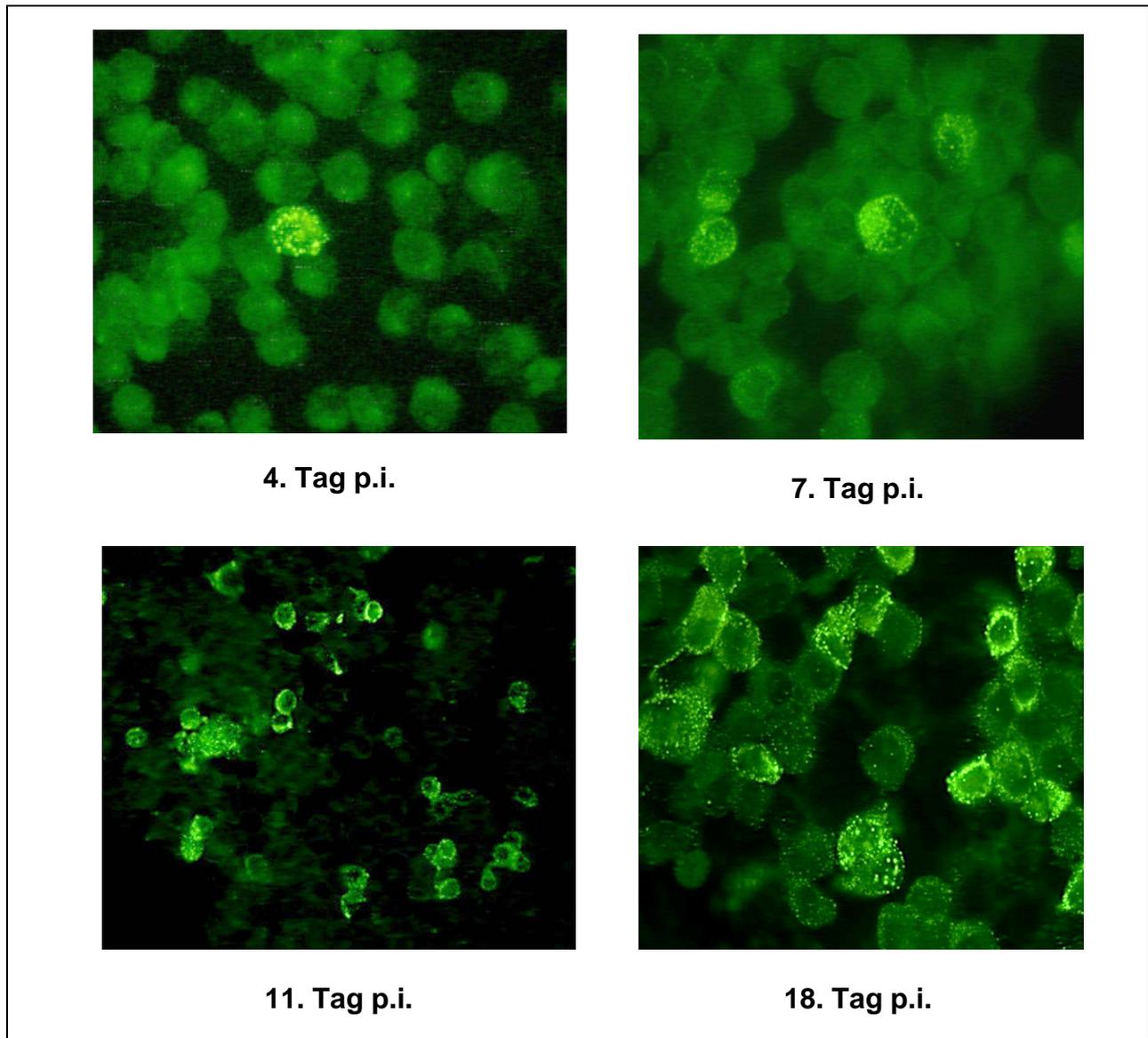


Abbildung 4: Nachweis einer positiven Virusanzucht mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz.

Homogenisiertes Lebergewebe von Zwergseidenaffe 5692/99 diente als Inokulum auf L-Zellen. LCMV-Nachweis erfolgte nach 4, 7, 11 und 18 Tagen p.i. mit LCMV-spezifischen Kaninchen-Antikörper (WE3(KN)-12) und FITC-markiertem sekundären Antikörper in der Immunfluoreszenz.

5.1.3 Molekulare und phylogenetische Charakterisierung der LCMV-CH-Isolate

Alle amplifizierten PCR-Produkte wurden sequenziert. Obwohl die Infektionen der Affen über einen Zeitraum von 10 Monaten verliefen, war das 310-bp Fragment der S-RNA in allen Callitrichiden und der nahe der Gehege gefangenen Maus bis auf einen einzigen Nukleotid-Polymorphismus an der Position 83 indentisch. Der Zwergseidenaffe 5625/99, welcher im September 1999 starb, war mit einem LCMV-Stamm infiziert, der an dieser Position ein C aufwies. Die Zwergseidenaffen 1893/99 und 5692/99, welche im November 1999 starben,

hatten an dieser Position ein T, wobei der im Juni 2000 gestorbene Goeldi-Springtamarin im amplifizierten LCMV-Fragment an dieser Position ebenfalls ein C besaß. Im LCMV-Stamm aus Leber und Milzgewebe der Maus wurde ebenfalls ein C an der Position 83 gefunden. Die Maus wurde im Mai 2000 gefangen.

Es wurden keine Sequenzunterschiede in unterschiedlichen Proben des gleichen Tieres beobachtet (Tabelle 1 listet die unterschiedlichen Proben auf, die von jedem Tier untersucht wurden).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die epidemiologischen Daten und die Sequenzen darauf hinweisen, daß der LCMV-CH-Ausbruch durch primäre Transmission eines LCMV-Stammes von Mäusen auf die Callitrichiden verursacht wurde.

Um den verursachenden Virusstamm näher zu charakterisieren, wurde das gesamte 3,4-kb S-RNA-Genom der kultivierten LCMV-Stämme CH-5692 und CH-5871 sequenziert. Hierfür wurde das zuvor etablierte *long-range* RT-PCR Protokoll verwendet (Günther *et al.*, 2000). Mit Hilfe dieser PCR ist eine reverse Transkription und Amplifikation der gesamten S-RNA von Arenaviren möglich, da die Primer an den hochkonservierten Enden des Genoms binden. Übereinstimmend zu den Analysen der 310-bp PCR-Fragmente sind die *full-length* Fragmente von den Stämmen CH-5692 und CH-5871 mit 99,5% sehr homolog. Insgesamt konnten nur 19 Nukleotidunterschiede - inklusive des oben genannten 83-T/C Polymorphismus - nachgewiesen werden. Diese führten zu 6 Aminosäure-Austausche im GPC und NP (Abbildung 5A). 90% der Sequenzunterschiede sind Transitionen. Die Mutationen sind nicht gleichmäßig verteilt, der mittlere Teil der S-RNA ist am stärksten konserviert. Das Passagieren des Virus in L-Zellen scheint hingegen nur wenige Mutationen bewirkt zu haben. Innerhalb eines 0,9-kb großen GPC-Genfragmentes, welches vor und nach Virusisolierung sequenziert wurde, war nur ein einziger Basenaustausch zu finden. Der gleiche Sequenzabschnitt variierte zwischen LCMV CH-5692 und LCMV CH-5871 hingegen in sieben Positionen. Dies verdeutlicht, daß die meisten Unterschiede zwischen beiden LCMV-CH Isolaten nicht auf die Passage in Zellkultur zurückzuführen sind.

Um beide LCMV-CH Isolate mit dem LCMV-Stamm der gefangenen Maus zu vergleichen, wurde das 0,9-kb GPC Fragment ebenfalls mit Material der Maus amplifiziert und sequenziert. Die Sequenz des Mausisolates war zu 99,2% mit dem LCMV CH-5692 und zu 99,8% mit dem LCMV CH-5871 Stamm identisch.

Zusammenfassend zeigt der Sequenzvergleich der LCMV-Stämme aus den Callitrichiden sowie der Maus eine große Homologie zwischen den Isolaten, jedoch keine vollständige Identität.

Tabelle 2: Nukleotid- und Aminosäure-Differenzen zwischen den neuen LCMV-CH-Stämmen und bekannten LCMV-Stämmen im codierenden Bereich der S-RNA.

LCMV-Stamm	% Nukleotid Differenz		% Aminosäure Differenz	
	GPC	NP	GPC	NP
CH-5692 vs. WE	17,2	15,0	7,8	4,3
CH-5692 vs. Arm	16,0	14,7	5,4	4,6
WE vs. Arm	15,2	15,5	6,0	4,1
CH-5692 vs. CHV-2/4	16,3	- ^a	6,0	- ^a

^a Die Sequenz von NP ist bei LCMV CHV-2/4 nicht bekannt.

Der Vergleich der GPC-Aminosäuresequenz zeigte, daß nur einzelne Aminosäure-Reste innerhalb der CH-assoziierten LCMV-Stämme relativ konserviert sind (105-K, 177-A, 181-L, 477-S) (Abbildung 6). An Position 260 haben LCMV CH-5692 und LCMV CH-5871 ein Isoleucin statt eines Leucin (assoziiert mit Lymphotropismus) oder Phenylalanin (assoziiert mit Neurotropismus). Position 260 co-determiniert den Tropismus von LCMV und ist an der Rezeptorbindung beteiligt (AHMED *et al.*, 1991; SEVILLA *et al.*, 2000). Diese Mutation war ebenfalls in der LCMV-RNA vom Zwergseidenaffen 5692/99 (also vor der Viruskultivierung auf L-Zellen) und in der LCMV-RNA von der Maus zu beobachten. Dies zeigt, daß Isoleucin-260 kein Artefakt der Zellkulturpassagierung ist. Der GP1-GP2 proteolytische Prozessierungs- / Spaltungsort und die *N-linked* Glykosylierungsstellen sind vollkommen konserviert. Im NP haben die CH-assoziierten LCMV-Stämme 14 Aminosäure Austausch gemeinsam, welche nicht in den LCMV-Prototypstämmen Armstrong und WE vorkommen (Abbildung 6). Ein Mutations *hot spot* fand sich im NP zwischen den Positionen 335 und 350.

GPC												
WE	MGQIVTMFEA	LPHIIDEVIN	IVIIIVLIIT	SIKAVYNFAT	CGILALVSFL	FLAGRSCGMV	GLNGPDIYKG	VYQFKSVEFD	MSHLNLTMPN	ACSVNNSHHY	100	
ARMV..	G.....	..F..I..	L.....	..K.....A.....		
CHV-2/4E.....	..LF.....	L.....	..S.....A.....		
CH-5692M.FT.....	L.....	..K.....	..L.....A.....		
CH-5871M.FT.....	L.....	..K.....	..L.....	..Y.....	..A.....		
ISMGSSGLEP	TFTNDSILNH	NFCNLTSALN	KKSPDHTLMS	IVSSLHLSIR	GNSNYKAVSC	DFNNGITIQY	NLSSSDPOSA	MSQCRTPFRGR	VLDMFRTPFG	200		
.....	..T...LISF..TTP..R..	Q.....		
.....	..K...LISF..HTF..A..	LN.....		
.....	..K...LIS	..H...F..	..TL.....	..I.....TF..A..	L.....		
.....	..K...LIS	..H...F..	..ET.....	..I.....TF..A..	L.....		
GKYMRSWGWW	TGSDGKTTWC	SQTSYQYLII	QNRTWENHCR	YAGPFGMSRI	LFAQEKTKF	LTRRLSGTFTW	TLSDSSGVEN	PGGYCLTKWM	ILAAELKCPG	300		
.....TLS.....			
.....D...K	..E..VA.....		
.....N.D..TA.....R..	..I..D..		
.....N.D..TA.....R..	..I..D..		
NTAVAKCNVN	HDEEFCDMRL	LIDYNKAALS	KFKQDVESAL	HVFKTTLNSL	ISDQLLMRNH	LRDLMGVPC	NYSKFWYLEH	AKTGETSVPK	CWLVTNGSYL	400		
.....A.E.....	..L..V.			
.....E.....	..L..V.			
.....E.....	..L..V.			
.....R	..E.....	..L..V.			
NETHFSDQIE	QEADNMITEM	LRKDYIKRQG	STPLALMDLL	MFSTSAYLIS	IFLHFVRIPT	HRHIKGGSCP	KPHRLTNKGI	CSCGAPKVPG	VKTIWKRR	498		
.....G.	..L.....V.		
.....M.LMKS.R.V.		
.....M.LMKS.R.V.		
NP												
WE	MSLSKEVKSF	QWTOALRREL	QGFTSDVKAA	VIKDATSLLN	GLDFSEVSNV	QRIMRKERRD	DKDLQRLRSL	NQTVHSLVDP	KSTSKKNVLK	VGRLSABEELM	100	
ARMS.....N.K.L		
CH-5692S.....K.Y..L		
CH-5871S.....K.Y..LT.		
TLAADLEKLK	AKIMRTERPQ	ASGVYMGNLT	AQQLDQRSQI	LQVMGMRPQ	QGASGVVRVW	DVKDSSLN	QFGTMPSLTM	ACMAKQSQTP	LNDVVQALTD	200		
.....SSTI..K.			
.....SI.SHT			
.....ST.I.SHT			
LGLLYTVKYP	NLSDLERLKD	KHPVLGVITE	QSSINISGY	NFSLGAAVKA	GAALLHGGNM	LESILIKPSN	SEDLLKAVLG	AKKKLNMFVS	DQVGDNRNPE	300		
.....N.D.R.			
.....K.D.V.			
.....K.D.V.			
NILYKVCLSG	EGWPYIACRT	SVVGRARENT	TIDLTNEKLV	ANSSRPVPGA	AGPPQVGLSY	SQTMLLKDLM	GGIDPNAPTW	IDIEGRFNPD	VEIAIFQPQN	400		
.....I..P.A.S..P.A.V..P.A.			
.....I.S..R.A	TS.P..S			
.....I.S..R.A	TS.P..S			
GQFIHFYREP	TDQKQFKQDS	KYSHGMDLAD	LFNAQAGLTS	SVIGALPQGM	VLSCQGSDDI	RKLLDSQNR	DIKLIDVEMT	KEASREYEDK	VWDKYGWLCK	500		
.....V.P.KR.			
.....T.P.			
.....T.P.			
MHTGVVRDKK	KKEITPHCAL	MDCIIFESAS	KARLPDLKTV	HNILPHDLIF	RGNPVVTL	558						
.....I						
.....I.KI						
.....I.KI						

Abbildung 6: Vergleich der GPC- und NP-Aminosäuresequenz der LCMV-Stämme WE, Armstrong, CHV-2/4 (nur GPC), CH-5692 und CH-5871.

Regionen, die vermutliche B-Zell Epitope enthalten (WEBER und BUCHMEIER, 1988; WRIGHT *et al.*, 1989; SEILER *et al.*, 1999; CIUREA *et al.*, 2000) sind durch Linien über der Sequenz gekennzeichnet. Die GP1-GP2 Schnittstelle (BURNS und BUCHMEIER, 1993; LENZ *et al.*, 2000) ist durch einen Pfeil markiert. Die Aminosäure an Position 260, welche an der Rezeptorbindung und am Tropismus beteiligt ist (AHMED *et al.*, 1991; SEVILLA *et al.*, 2000), wurde umrahmt.

Die phylogenetischen Untersuchungen wurden am 5'-Ende des GPC-Gens, einer sehr variablen Region des Arenavirusgenoms, vorgenommen (Abbildung 7). Diese Region wurde deshalb ausgewählt, weil hier die meisten Sequenzen von LCMV-Stämmen bekannt sind. Die allgemeine Topologie des phylogenetischen Baums stimmt mit bereits beschriebenen Phylogenese auf der Basis von kompletten GPC- oder GP1-Sequenzen überein (BOWEN *et al.*, 1997, 2000). Dies bestätigt die Validität der hier verwendeten Methode. LCMV-CH 5692 und LCMV CH-5871 ordnen sich eindeutig in den LCMV-Ast ein, obwohl keine enge Verwandtschaft zu irgend einem anderen bekannten LCMV-Stamm besteht. Außerdem besteht kein Hinweis auf besondere phylogenetische Verwandtschaft der CH-assoziierten Stämme.

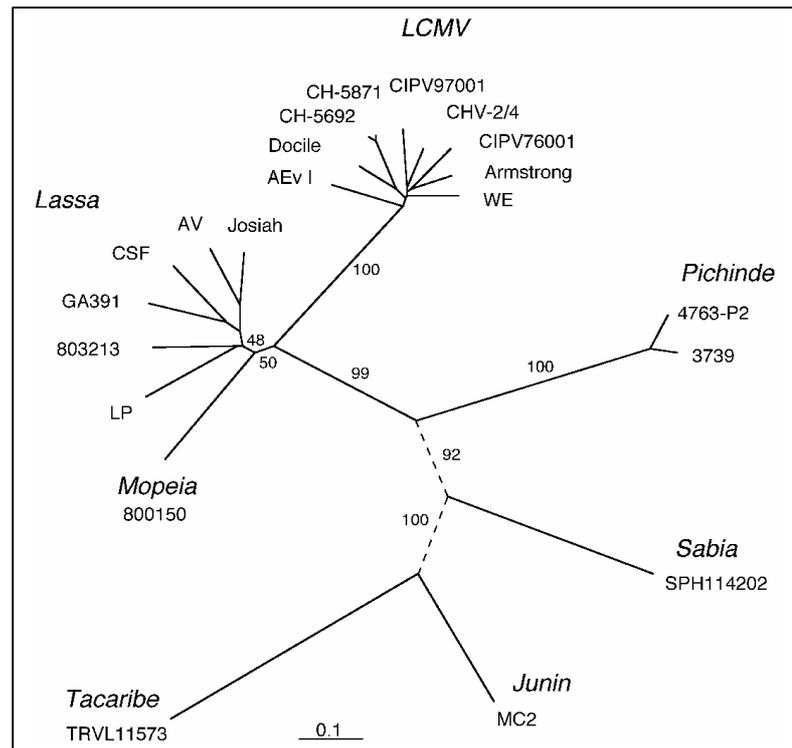


Abbildung 7: Phylogenetischer Baum der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Arenaviren.

Der Baum wurde mit Hilfe der NJ-Methode an einem 400-bp GPC-Genfragment errechnet. Die *Bootstrap*-Werte (in Prozent) sind am jeweiligen Ast notiert. Die *Bootstrap*-Werte der distal liegenden Lassa-Virus-Äste reichen von 38% bis 85%. Die Verwandtschaft innerhalb des Lassa-Virus Taxons korrespondiert mit den bereits beschriebenen Verhältnissen (BOWEN *et al.*, 2000). Die *Bootstrap*-Werte innerhalb des LCMV-Taxons reichen nur von 7% bis 54%. Wenn man die ML-Methode verwendet, zeigen die terminalen LCMV-Äste eine unterschiedliche Topologie, wobei die generelle Topologie der Bäume aus der NJ- und der ML-Methode identisch sind. Aus Platzgründen sind die langen Äste gekürzt dargestellt (gestrichelte Linien).

5.2 Isolierung von drei neuen Lassa-Virusstämmen aus humanen Primärmaterialien

Im Verlauf dieser Arbeit standen Materialien von drei Patienten mit Lassa-Fieber zur Verfügung. Aus diesen Materialien wurden drei neue Lassa-Virusstämme isoliert und per Immunfocus-Assay bestimmt. Die direkt aus den Patientenproben (Serum bzw. Liquor) kultivierten Virusstämme werden als Primärisolate bezeichnet. Aus den Primärisolaten der Stämme AV und NL wurden durch ein bis zwei weitere Passagen Isolate für experimentelle Studien hergestellt.

5.2.1 Anzucht von Lassa-Virus Isolaten

Im Folgenden sind die Krankengeschichten der entsprechenden Patienten und die Virusisolierung beschrieben.

Lassa-Virus Stamm AV

Fallbeschreibung: Eine 23-jährige Frau bekam Fieber, nachdem sie als Rucksacktouristin durch drei Länder Westafrikas (Burkina Faso, Côte D'Ivoire und Ghana) gereist war. In einem Krankenhaus in Abidjan (Côte D'Ivoire) wurde ihre Krankheit als Malaria diagnostiziert. Am 6. Tag der Krankheit war sie wieder in Deutschland und wurde im Diakonissen-Krankenhaus Schwäbisch Hall aufgenommen. Nach einem Malaria-Ausschluß am 9. Tag wurde sie in die Missionsärztliche Klinik nach Würzburg verlegt. Dort hatte die Patientin Fieber, Pharyngitis und Durchfall. Im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (Hamburg) konnte nach einem Anfangsverdacht eine Lassa-Virusinfektion per RT-PCR und per Virusanzucht bestätigt werden. Obwohl die Patientin sofort mit Ribavirin behandelt wurde, verstarb sie am 14. Tag der Krankheit mit Hämorrhagien, multiplen Organversagen und Encephalopathie (SCHMITZ *et al.*, 2001).

Virusanzucht: Mit dem Lassa-Virus-Primärisolat aus dem Serum vom Todestag der Patientin wurde ein Virusstock angelegt, mit dem die weiteren Versuche in dieser Arbeit durchgeführt wurden (Stamm AV Isolat 15-3). Nach 4 Tagen Inkubation (1. Passage) mit Serum der Patientin AV vom 14.01.00 waren nahezu alle, mit dem Serum vom 15.01.00 weniger Zellen infiziert. Die Bestimmung des Virustiters ergab für das Primärisolat AV-14 rund $1,57 \times 10^6$ IFU / ml und für AV-15 rund $1,64 \times 10^5$ IFU / ml (AV-14 = Isolat aus dem Serum vom 14.01.00, AV-15 = Isolat aus dem Serum vom 15.01.00).

Anzucht von Lassa-Virus AV Stocks

Mit den Primärisolaten AV-14 und AV-15 wurden ausreichend große Virusstocks angelegt, mit denen die Versuche dieser Arbeit durchgeführt werden konnten. In Zellkulturüberständen von Vero-Zellen, die mit den Primärisolaten infiziert wurden (MOI 0,01), wurden im zeitlichen Verlauf folgende Virustiter mit Hilfe des Immunofocus-Assays quantifiziert:

Infektion mit Primärisolat AV-14:

48 h p.i. $2,6 \times 10^3$ IFU / ml (Isolat AV-14-2)

72 h p.i. $9,7 \times 10^4$ IFU / ml (Isolat AV-14-3)

Infektion mit Primärisolat AV-15:

48 h p.i. 3×10^3 IFU / ml (Isolat AV-15-2)

72 h p.i. $1,37 \times 10^5$ IFU / ml (Isolat AV-15-3)

Aufgrund des höchsten Virustiters wurde das Lassa-Virus-Isolat AV-15-3 für die weiteren Versuche verwendet. Ein Ausschnitt der Infektionskontrolle während der Viruspassagierung ist in Abbildung 8A dargestellt.

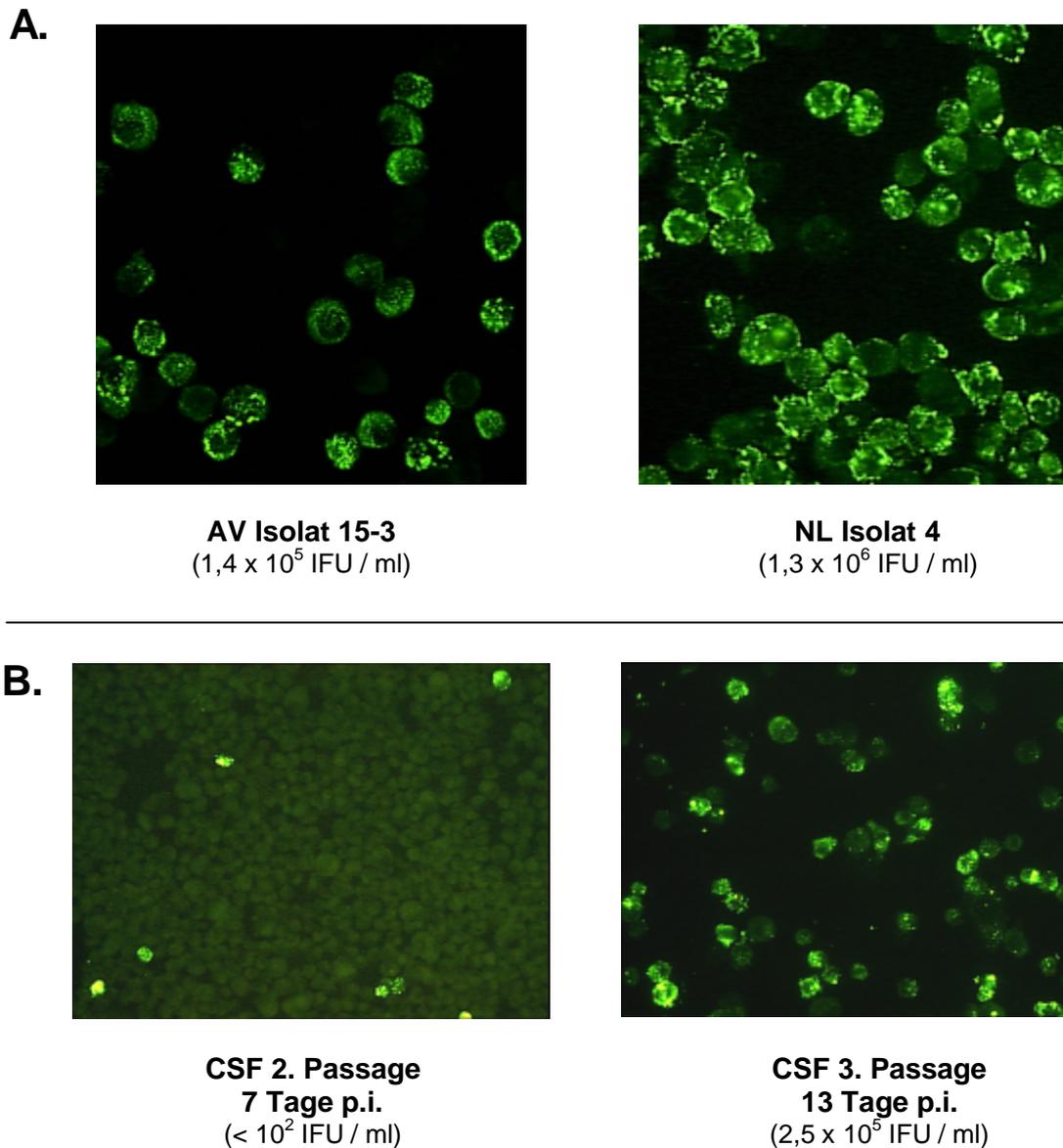


Abbildung 8: Präparation von Lassa-Virus Isolaten.

Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen von Lassa-Virus infizierten Vero-Zellen. Nachweis mit Lassa-Virus spezifischen Maus-monoklonalen AK und anti-Maus FITC-markierten sekundären AK. Der Virustiter ist jeweils unter dem entsprechenden Foto angegeben.

- A.** Lassa-Virus-Isolate, die aus Primärisolaten kultiviert wurden. Die Lassa-Virus Primärisolation erfolgte aus humanem Serum. Stamm AV (Isolat 15-3), NL (Isolat 4)
- B.** Lassa-Virus-Primärisolate aus humanem Liquor. Lassa-Virusstamm CSF von Probe 1527/2000 nach der 2. und 3. Passage.

Lassa-Virus Stamm NL

Fallbeschreibung: Ein 48-jähriger Mann, der als Chirurg für 5 Monate in einem ländlich gelegenen Krankenhaus in Sierra Leone arbeitete, bekam am 10. Juli 2000 Fieber. Daraufhin nahm er eine Malaria Prophylaxe ein. Am 14. Juli kam er zurück in die Niederlande und wurde mit hohem Fieber (39,5°C) in das Leidener University Medical Center gebracht. Er klagte über Übelkeit, starke Durchfälle, Kopf- und Gliederschmerzen. Am 11. Krankheitstag entwickelte der Patient eine leichte Encephalopathie und ein Nierenversagen. Ein Lassa-Fieber Verdacht wurde gestellt, der durch das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin per RT-PCR bestätigt werden konnte. Am 15. Krankheitstag wurde der Patient wegen des Nierenversagens und wegen einer Lungenbeteiligung auf die Intensivstation verlegt. Am 16. Tag verstarb der Patient (SCHMITZ *et al.*, 2001).

Virusanzucht: Nach Inokulation mit dem Serum von Patient NL konnte im Überstand nach 8 Tagen p.i. ein Virustiter per Immunfocus-Assay von $2,8 \times 10^6$ IFU pro ml detektiert werden. Dieser Überstand ist das Lassa-Virus Stamm NL Primärisolat PI-20. 12 Tage p.i. wurde ein starker CPE der Vero-Zellen beobachtet. Bis zum Auftreten des CPE wuchsen die Zellen außergewöhnlich langsam.

Anzucht von Lassa-Virus NL Stocks

Wie anhand der AV-Primärisolate, wurden auch vom Primärisolat NL PI-20 ausreichend großer Lassa-Virusstock angelegt. Die resultierenden Virustiter wurden mit Hilfe des Immunfocus-Assays quantifiziert:

48 h p.i. $1,5 \times 10^3$ IFU / ml (Isolat NL-2)

72 h p.i. 4×10^4 IFU / ml (Isolat NL-3)

7 d p.i. $1,3 \times 10^6$ IFU / ml (Isolat NL-4).

Aufgrund des höchsten Virustiters wurde das Lassa-Virus Isolat NL-4 für die weiteren Versuche verwendet (Abbildung 8A).

Lassa-Virus Stamm CSF

Fallbeschreibung: Ein 56-jähriger Mann wurde am 21. März 2000 in das Emdee Medical Center in Jos (Nigeria) gebracht, nachdem er zwei Wochen Fieber (38,2°C) und Durchfall hatte. Am 23. März wurde er dann mit 39,6°C Fieber in die Life Camp Clinic nach Abuja (Nigeria) verlegt. Der Patient war schläfrig und zwischenzeitlich nicht orientiert. Am 25. März bekam der Patient einen 30 minütigen Krampfanfall ohne Bewußtseinsverlust. Am 27. März wurde er in die neurologische Abteilung der Dr.-Horst-Schmidt-Kliniken nach Wiesbaden verlegt. Bei der Ankunft in Deutschland hatte der Patient kein Fieber mehr, war somnolent sowie zeitlich und räumlich desorientiert. Es wurden keine weiteren Krämpfe beobachtet und der Zustand des Patienten besserte sich. Am 1. April verstarb der Patient unerwartet an einer Lungenembolie.

Die Lassa-Fieber-Diagnose wurde erst kurz nach seinem Tod gestellt, nachdem die Proben in das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin geschickt worden waren. Lassa-Virus spezifische Antikörper konnten mit der indirekten Immunfluoreszenz im Liquor (IgM Titer: 1:10; IgG Titer 1:320) und im Serum (IgM Titer 1:320; IgG Titer 1:2560) nachgewiesen werden (Proben vom 28. März). Die RNA der Liquor- und Serumproben vom 27., 28. März und 1. April wurde isoliert, um mit Hilfe einer spezifischen Lassa-Virus RT-PCR virale RNA nachzuweisen. Interessanterweise konnte die virale RNA ausschließlich im Liquor, nicht aber im Serum detektiert werden. Diese Ergebnisse wurden durch eine Viruskultivierung aus dem Liquor bestätigt. Diese Kultur mußte über 7 Tage (2. Passage) für eine in der indirekten Immunfluoreszenz nachzuweisenden Infektion kultiviert werden. In den mikroskopischen Aufnahmen sind Lassa-Virus infizierte Zellen zu erkennen, die ein charakteristisches, punktförmiges Fluoreszenzbild aufweisen (Abbildung 8B). Obwohl nach der 7-tägigen Inkubationszeit in der Immunfluoreszenz einige infizierte Zellen zu erkennen waren, lag der Virustiter im Zellkulturüberstand unterhalb der Nachweisgrenze des Immunfocus-Assays von rund 10^2 IFU / ml. Erst nach einer weiteren Kultivierung von 6 Tagen konnte ein Virustiter von $2,5 \times 10^5$ IFU / ml nachgewiesen werden. Dieses in dritter Passage befindliche Virusisolat (CSF Isolat 7) war die Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsexperimente.

5.2.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis der Lassa-Virus Replikation

Vom Lassa-Virus Stamm AV wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen in der späten Infektionsphase gemacht. Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden freundlicherweise von Christel Schmetz, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, durchgeführt.

In Abbildung 9A und B sind Viruspartikel zu erkennen, die an der Zytoplasmamembran der Vero-Zellen *budden* (mit einem Pfeil markiert). Auf der Oberfläche der Viruspartikel lassen sich Spike-Strukturen (Glykoprotein) erkennen (Abbildung 9C und D).

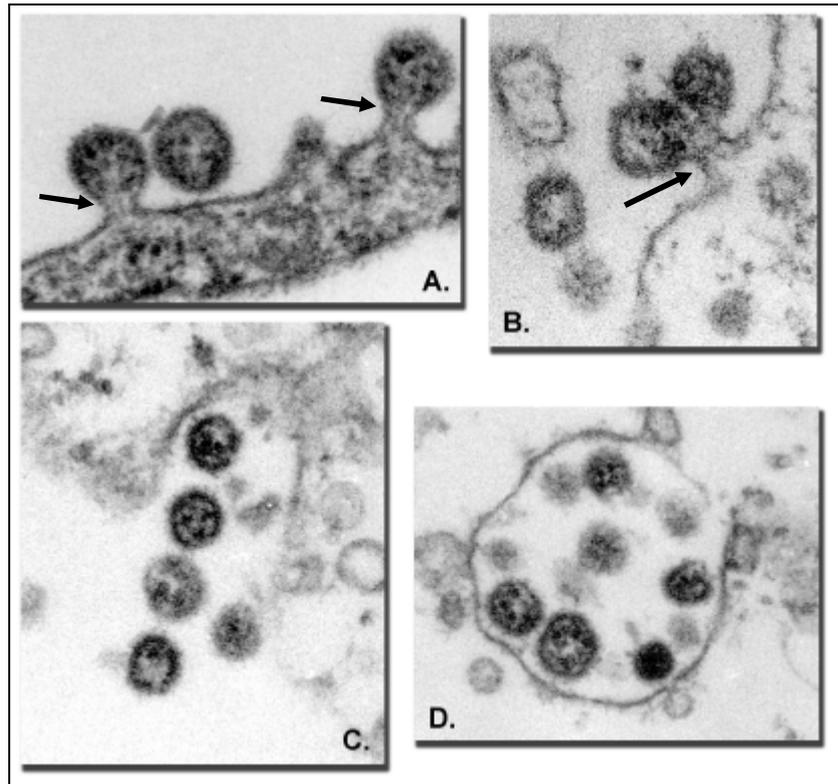


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Lassa-Virusstamm AV.

Lassa-Virusstamm AV infizierte Vero-Zellen in einer Vergrößerung von rund 100.000x., 72h p.i.. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,01.

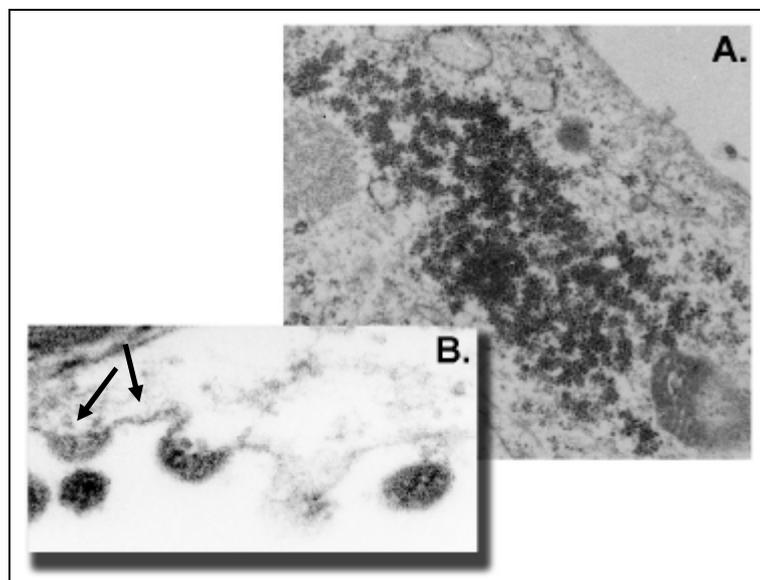


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Lassa-Virus infizierten Zellen.

Lassa-Virusstamm AV infizierte Vero-Zellen (72h p.i.) in einer Vergrößerung von A. 40.000x und B. 80.000x. Die Infektion der Zellen erfolgte mit einer MOI von 0,01.

Die Morphogenese der Lassa-Viruspartikel erfolgte direkt an der Zytoplasmamembran (Abbildung 10B). Die Zytoplasmamembran scheint sich an der Stellen, an der das Virus *buddet*,

zunehmend zu verdicken (Pfeile), bis sich ein Viruspartikel direkt aus der Membran abschnürt. Intrazellulär sind keine reifen Viruspartikel zu erkennen (Abbildung 10A). Vielmehr können an einigen Stellen der infizierten Zelle großflächige, granuläre Bereiche beobachtet werden, bei denen es sich eventuell um aggregierte virale Proteine handelt.

5.3 Etablierung von Testverfahren zur Quantifizierung von Lassa-Virus und LCMV

Um eine Quantifizierung der vier neuen Lassa- und LCMV-Virusstämme vorzunehmen, wurde initial der Virustiter mit Hilfe des Immunfocus-Assays bestimmt. Diese zumindest für das Lassa-Virus neue Methode ist jedoch besonders zeitintensiv. Aus diesem Grund wurden quantitative RT-PCRs für Lassa-Virus und LCMV etabliert, mit deren Hilfe eine schnelle Bestimmung der viralen RNA-Konzentration möglich ist.

Auch für alle weiteren Fragestellungen dieser Arbeit, z.B. in welchem Maße Cytokine die Replikation von Lassa-Virus bzw. LCMV beeinflussen, ist eine Quantifizierung der Virusreplikation notwendig. Eine geeignete Quantifizierungsmethode muß die Abnahme viraler Partikel exakt messen können. Folgende Fragestellungen sollten daher untersucht werden:

1. Trifft dies für den Immunfocus-Assay und die RT-PCR zu?
2. Lassen sich die Ergebnisse beider Methoden miteinander vergleichen?
3. Gibt es Unterschiede zwischen der Menge an infektiösen Partikeln bzw. der Menge an RNA-Molekülen?

Die Funktionalität der in dieser Arbeit eingesetzten Methoden, d.h. der quantitativen RT-PCR mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen im LightCycler und des Immunfocus-Assays wird im folgenden gezeigt. Die Lassa- bzw. LCMV-Virusstämme wurden anhand eines in-vitro transkribierten S-RNA-Fragmentes quantifiziert. Aus den so quantifizierten Zellkulturüberständen wird zusätzlich mit Hilfe des Immunfocus-Assays die Infektiosität bestimmt.

Eine spezifische *real-time*-Amplifikation von Lassa-Virus und LCMV S-RNA-Fragmenten war mit Hilfe der RT-PCR unter Einsatz des SybrGreens möglich. SybrGreen interkaliert Sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA, so daß Neben- und Hauptprodukte gleichermaßen detektiert werden. Der Einsatz spezifischer Sonden, mit denen ausschließlich Hauptprodukte detektiert werden, war für Arenaviren aufgrund der geringen Sequenzhomologien zwischen den Virusstämmen nicht möglich. Jeder Virusstamm würde deshalb eine eigene Sonde benötigen. Mit SybrGreen ist hingegen unabhängig des Virusstammes eine Detektion möglich.

Auf Basis der SybrGreen Detektion, konnten in der LightCycler RT-PCR alle drei Lassa-Virusstämme (AV, CSF und NL) amplifiziert und detektiert werden. Exemplarisch ist dies für virushaltige Zellkulturüberstände in Abbildung 11A gezeigt. Die RNA-Konzentrationen lagen zwischen 10^6 und 10^8 RNA-Molekülen pro PCR. Die daraus errechnete Molekülanzahl im Zellkulturüberstand ergab rund 2×10^8 (AV), 6×10^8 (CSF) bzw. 5×10^9 (NL) RNA-Moleküle pro ml. In den Negativkontrollen der RNA-Präparation wurden mit beiden Primerpaarkombinationen [36E2 / 80F2 (AV und NL), 36E2 / 80F2-CSF (CSF)] keine Produkte amplifiziert.

Ebenfalls wurden in-vitro RNA Transkripte in \log_{10} Verdünnungen von 2×10^9 bis 2×10^4 Moleküle pro ml detektiert. Mit diesen Standards wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer eine Quantifizierung der Lassa-Virusstämme möglich war (Abbildung 11A, separates Bild).

Die sich an die RT-PCR anschließende Schmelzkurvenanalyse zeigte für jeden Virusstamm die Bildung von PCR-Produkten unterschiedlicher Schmelztemperatur. Die Schmelztemperatur der Lassa-Virus Stämme lag für AV bei $85,4^\circ\text{C}$, für CSF bei $85,0^\circ\text{C}$ und für NL bei $85,6^\circ\text{C}$. Das in-vitro Transkript, welches auf der Basis des Stammes Josiah hergestellt worden war, hatte eine Schmelztemperatur von $84,7^\circ\text{C}$ (Abbildung 11B).

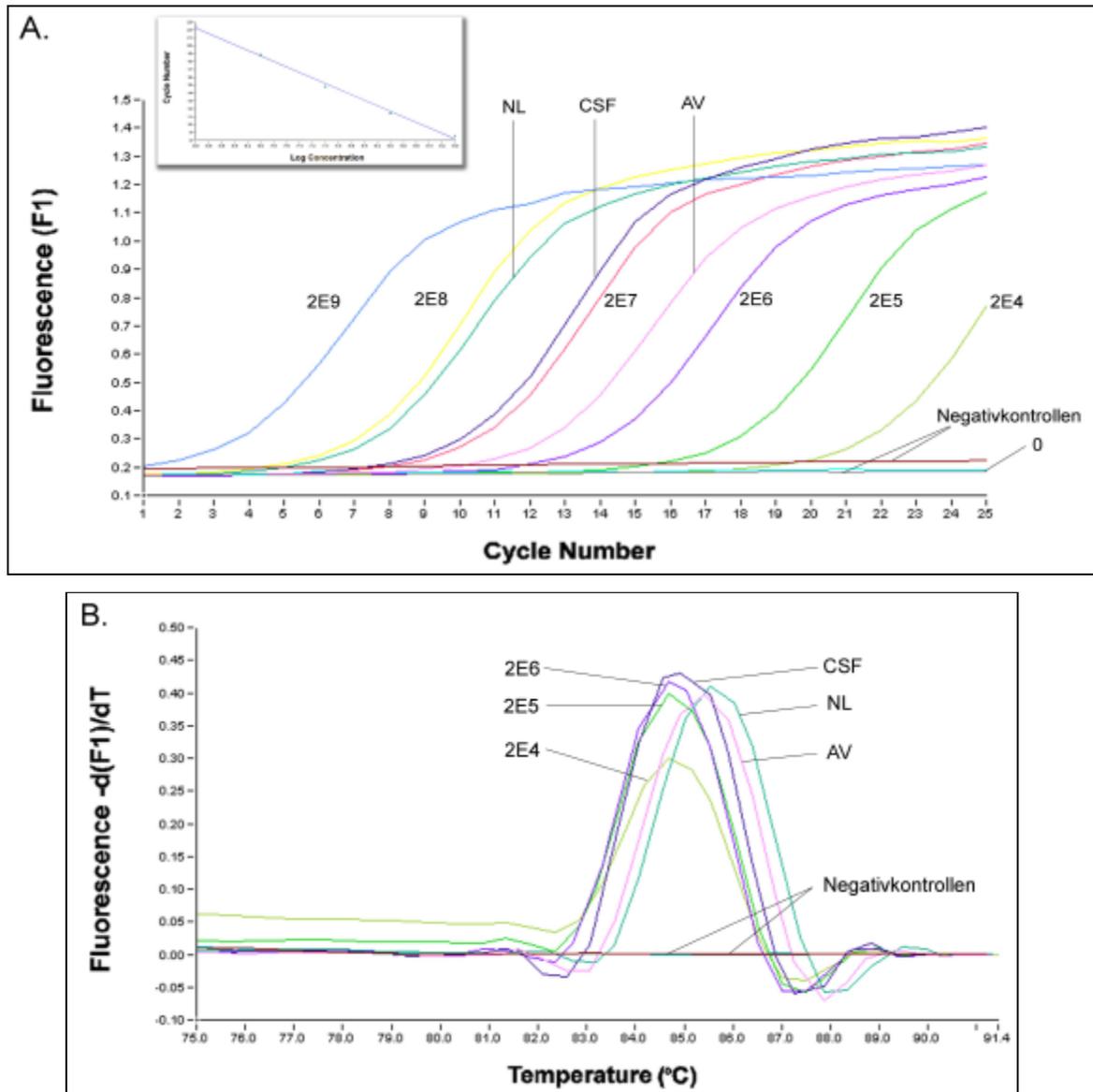


Abbildung 11: Quantitative Lassa-Virus RT-PCR im LightCycler.

A. *Real-time*-Detektion mit Hilfe des LightCyclers der Lassa-Virusstämme AV, CSF und NL in der RT-PCR. Die Detektion extrahierter Virus-RNA aus 1:10 verdünnten Zellkulturüberständen erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen. Die Konzentration des in-vitro Transkripts ist in Kopien pro PCR-Reaktion angegeben.

Im separaten Bild ist die Eichgerade des Lassa-Virus RNA-Standards (in-vitro Transkript) dargestellt.

B. Darstellung der Schmelzkurvenanalyse von Amplifikaten der Stämme AV, CSF, NL und dem Lassa-Virus in-vitro Transkript in erster negativer Ableitung.

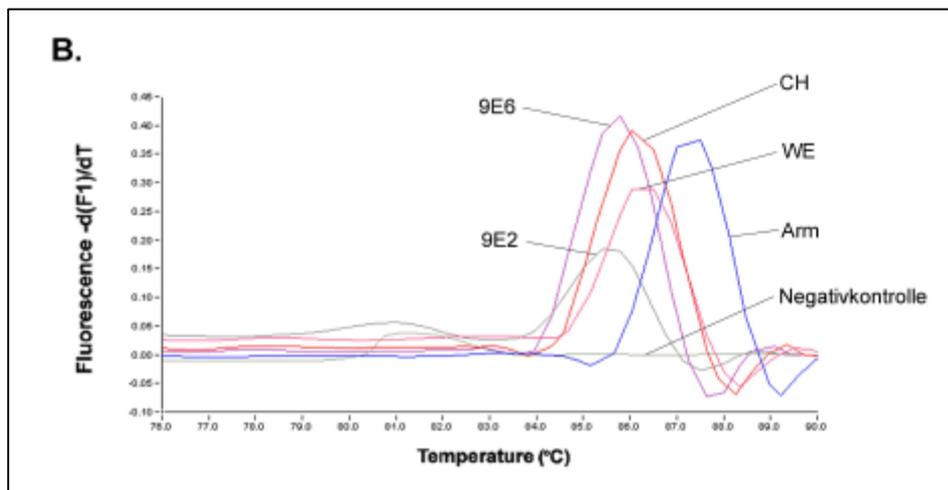
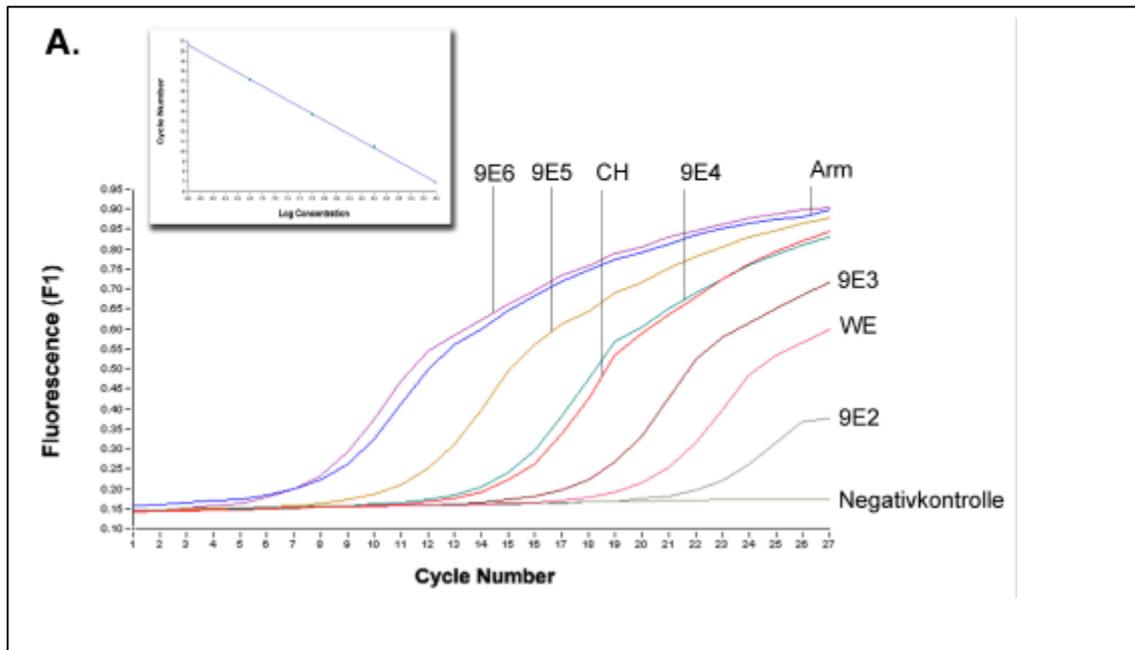


Abbildung 12: Quantitative LCMV RT-PCR im LightCycler.

A. *Real-time*-Detektion mit Hilfe des LightCyclers der LCMV-Stämme Armstrong (Arm), CH-5692 (CH) und WE in der LCMV RT-PCR. Die Detektion erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen. Bei der extrahierten Virus-RNA handelte es sich 1:10 verdünnte Zellkulturüberstände. Die Konzentration des in-vitro Transkripts ist in Kopien pro PCR-Reaktion angegeben.

Im separaten Bild ist die Eichgerade der LCMV-RNA in-vitro Transkripte dargestellt.

B. Darstellung der Schmelzkurvenanalyse von Amplifikaten der LCMV-Stämme Arm, CH-5692, WE sowie des LCMV in-vitro Transkriptes in erster negativer Ableitung.

Mit Hilfe der quantitativen LCMV RT-PCR war eine Detektion der drei Stämme Arm, CH-5692, WE und dem LCMV-RNA in-vitro Transkript möglich. Dies ist exemplarisch in Abbildung 12A dargestellt. Mit Hilfe des Transkriptes konnte eine Eichgerade berechnet werden (Abbildung 12A, separates Bild), anhand derer eine Quantifizierung der Amplifikate durchgeführt wurde. Die in-vitro Transkripte wurden in \log_{10} Verdünnung von 9×10^2 bis 9×10^6 Moleküle pro Reaktionsansatz eingesetzt. Somit hatten die LCMV-Stämme eine Konzentration von $8,5 \times 10^{10}$ (Arm), $9,5 \times 10^9$ (CH-5692) bzw. $3,7 \times 10^7$ (WE) RNA-Molekülen pro ml Zellkulturüberstand.

Eine Nebenproduktbildung konnte nicht beobachtet werden. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte, daß alle Stämme und das in-vitro Transkript eine unterschiedliche Schmelztemperatur haben (Abbildung 12B): Stamm Armstrong 87,3°C, CH-5692 86,2°C, WE 86,4°C und das in-vitro Transkript 85,7°C. Somit war eine genaue Differenzierung zwischen Arm, CH oder WE und dem in-vitro Transkript möglich.

Die Detektion der beschriebenen Lassa- und LCMV-Stämme im Immunfocus-Assay ist exemplarisch in Abbildung 13 dargestellt.

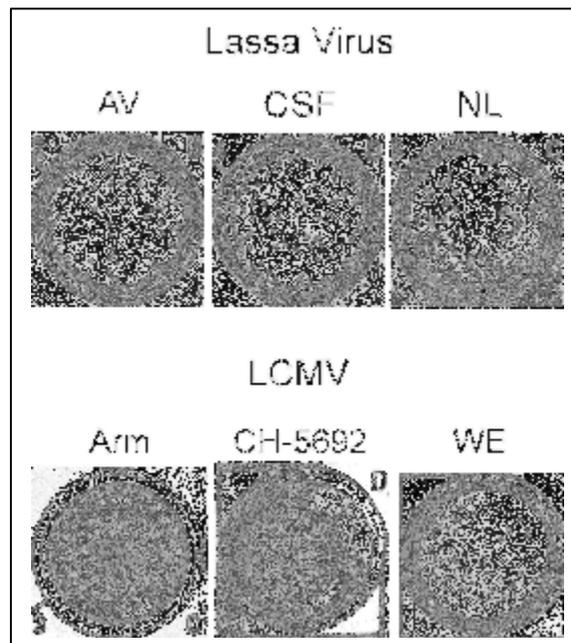


Abbildung 13: Immunfocus-Assay von Lassa-Virus bzw. LCMV.

Beispiel eines Immunfocus-Assays der Lassa-Virusstämme AV, CSF und NL bzw. der LCMV-Stämme Arm, CH-5692 und WE. Die Detektion erfolgte mit Peroxidase und TMB-Substrat.

Der Immunfocus-Assay ermöglichte die Quantifizierung infektiöser Partikel der drei in den weiteren Versuchen eingesetzten Lassa-Virus bzw. LCMV-Stämme. Der Lassa-Virus Stamm NL und LCMV-Stamm WE bildeten im Vergleich zu den anderen Virusstämmen teilweise größere und stärker angefärbte Foci.

Zusammengefasst zeigen die vorgestellten Daten, daß die quantitative RT-PCR und der Immunfocus-Assay als Analysemethoden für alle Virusstämme geeignet sind.

5.3.1 Korrelation von RT-PCR und Immunfocus-Assay und Bestimmung der RNA-Kopien pro infektiöser Einheit

Anhand des Lassa-Virusstamms AV wurde die Replikationskinetik bei unterschiedlicher MOI bestimmt. Im Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR die Konzentration der S-RNA-Moleküle und im Immunfocus-Assay die der infektiösen Partikel bestimmt. Ver-

Zellen wurden mit einer MOI von 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} infiziert und Proben nach 24, 48, 72, 96 h p.i. entnommen (Abbildung 14). Die Replikationskinetik war bei allen MOI ähnlich, bei niedrigerer MOI (10^{-4}) wurde das Maximum der Virusfreisetzung jedoch etwas später erreicht. Die Höhe des Maximums war bei den unterschiedlichen Infektionsdosen mit rund 10^8 S-RNA-Kopien pro ml und einer IFU von rund 10^6 pro ml nach einer Inkubationszeit von 72 h vergleichbar.

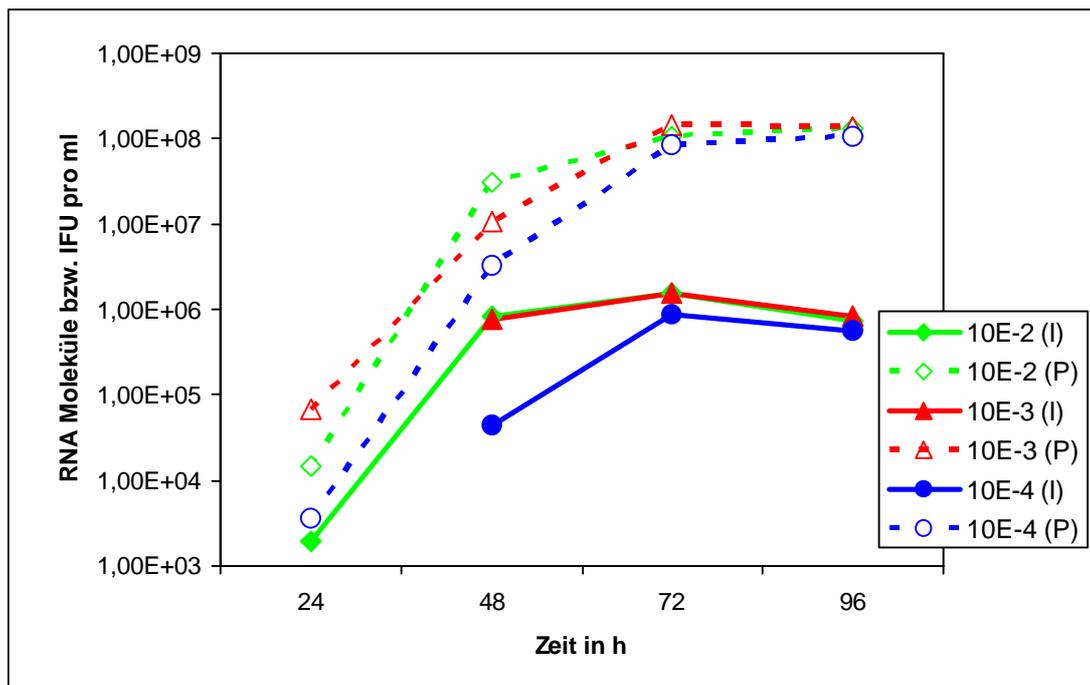


Abbildung 14: Replikationskinetik von Lassa-Virusstamm AV.

Darstellung des Virustiters und der S-RNA Konzentration nach 24, 48, 72 und 96 h p.i.. Vero-Zellen wurden mit einer MOI von 10^{-2} (grün), 10^{-3} (rot) bzw. 10^{-4} (blau) infiziert. Abkürzungen: I = Immunfocus-Assay, P = quantitative Lassa-Virus RT-PCR

Die Nachweisgrenze des Immunfocus-Assays (rund 10^3 IFU / ml) lag oberhalb der der RT-PCR. 24 h p.i. war ein quantitativer Virusnachweis mit Hilfe des Immunfocus-Assay nur bei höchstem Infektionstiter (MOI 10^{-2}) möglich. Eine quantitative IFU-Bestimmung war erst aus den Überständen nach 48 h p.i. möglich.

Die Daten beider Assays ermöglichten die Bestimmung der Anzahl von S-RNA Molekülen pro infektiöser Einheit. Die Konzentrationen aus der RT-PCR und des dazugehörigen Immunfocus-Assays (Abbildung 14) wurden dividiert; die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Mit zunehmender Inkubationsdauer veränderte sich das Verhältnis von S-RNA Kopien zu IFU. Wurden zu Beginn der Infektion (MOI 10^{-2} , 24 h p.i.) rund 16 RNA-Kopien pro IFU detektiert, so waren es nach 96 h 380 RNA-Kopien (Steigerung um ca. Faktor 24). Vergleichbare Ergebnisse konnten bei der Infektion mit einer MOI von 10^{-3} beobachtet werden. Bei der Infektion mit einer MOI von 10^{-4} war im zeitlichen Verlauf nur eine geringe Änderung des Verhältnisses aus RNA

und IFU zu erkennen. Der Maximalwert von rund 390 RNA-Kopien pro IFU nach 96 p.i. war jedoch vergleichbar mit dem der anderen Infektionen.

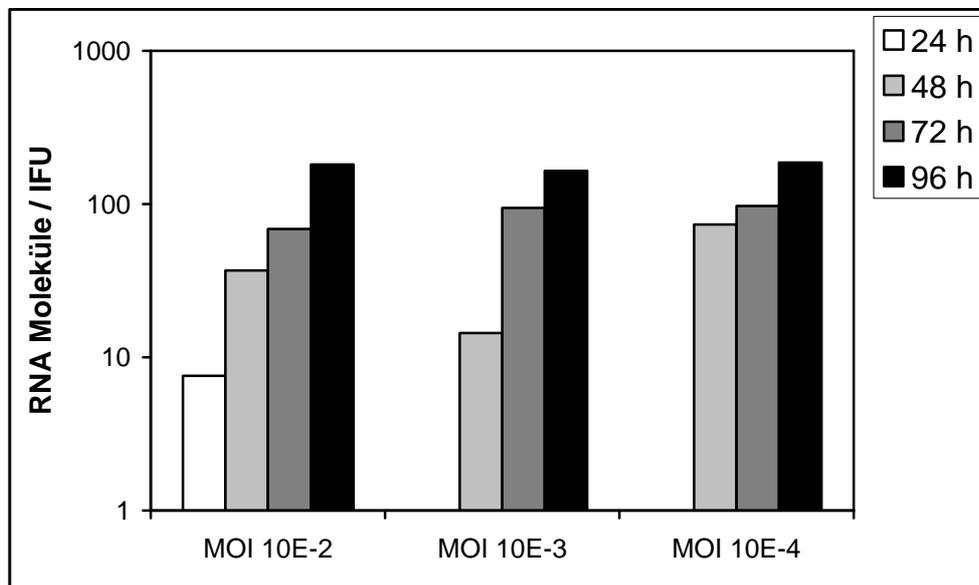


Abbildung 15: Anzahl von RNA-Molekülen pro Immunfocus forming Unit (IFU).

Es ist das Verhältnis aus S-RNA-Molekülen pro IFU während der Zeitpunkte 24, 48, 72 und 96 h p.i. dargestellt. Die Infektion der Vero-Zellen erfolgte mit Lassa-Virus AV mit einer MOI von 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} . Bei MOI 10^{-3} und 10^{-4} konnte nach 24 h p.i. mit Hilfe des Immunfocus-Assays noch keine zuverlässige Quantifizierung durchgeführt werden.

Diese Daten zeigen, daß die RNA-Molekülzahl pro infektiöser Einheit abhängig von der Inkubationszeit variiert. Je länger die Infektion andauerte, desto mehr RNA-Moleküle waren pro IFU nachzuweisen. Es lagen zwischen 10 und 500 S-RNA-Moleküle pro infektiöser Einheit vor. Die Ergebnisse von PCR und Immunfocus-Assay korrelieren nur zum Teil. Abhängig von der Infektionsdauer kommt es zu einem relativen Anstieg der RNA-Konzentration. Trotzdem kann die schneller durchführbare RT-PCR den Immunfocus-Assay für viele Fragestellungen ersetzen.

5.3.2 Replikationskinetik der Lassa- und LCM-Virusstämme auf HuH7- bzw. Vero-Zellen

Bei der Durchführung von Infektionsexperimenten ist es notwendig, die Replikationskinetik der Virusstämme zu kennen. Für die Experimente wurde der Zeitpunkt gewählt, bei dem eine exponentielle Virusreplikation zu beobachten war. Die Viruskonzentrationen müssen außerdem eindeutig oberhalb der Nachweisgrenze der eingesetzten Quantifizierungsmethode liegen. Im Folgenden wurden die Replikationskinetiken der Lassa- bzw. LCM-Virusstämme auf HuH7- und

Vero-Zellen untersucht. Die Probenentnahmen erfolgten vom 1. Tag bis zum 4. Tag (LCMV) bzw. 5. Tag p.i. (Lassa-Virus) (Abbildung 16).

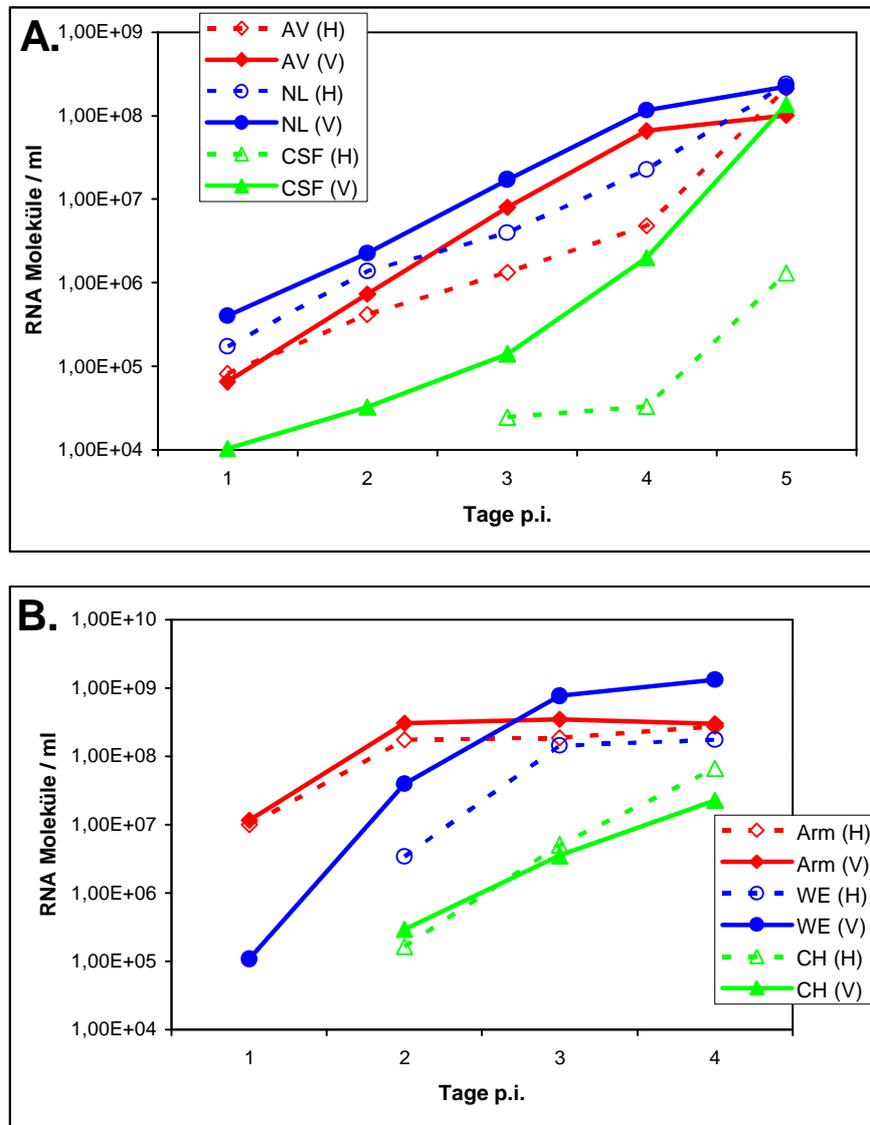


Abbildung 16: Lassa-Virus- und LCMV-Replikationskinetik auf HuH7- und Vero-Zellen.

Mit Hilfe der RT-PCR wurden Virustiter in Zellkulturüberständen nach 1 bis 5 tägiger Inkubation p.i. quantifiziert. Die Infektion der Zellen erfolgte mit einer MOI von 0,01.

Abkürzungen: H = HuH7-Zellen; V = Vero-Zellen

A. Replikationskinetiken von den Lassa-Virus Isolaten AV 15-3 und NL 4, sowie von dem Primärisolat CSF 7.

B. Replikationskinetiken von LCMV Armstrong (Arm) und WE, sowie dem Primärisolat CH-5692 (CH).

Die Lassa-Virus Isolate AV 15-3 und NL 4 hatten auf Vero-Zellen eine vergleichbare Replikationskinetik (Abbildung 16A). Am 4. Inkubationstag (p.i.) war in den Kulturen die exponentielle Replikationsphase beendet. Zuvor wurde der Virustiter alle 24 h ungefähr verzehnfacht ($1 \log_{10}$). Die Replikation von AV und NL auf HuH7-Zellen (gestrichelte Linien) war im Vergleich zu den Vero-Zellen (durchgezogene Linien) zeitlich verlangsamt. Nach 5-tägiger Inkubation wurde auf beiden Zelllinien der höchste Titer von rund 10^8 RNA-Molekülen pro ml

erreicht. In der Replikation verlangsamt war das Primärisolat CSF 7. Auf Vero-Zellen wurde allerdings 5 Tage p.i. ein mit den anderen Stämmen vergleichbar hoher Titer erreicht.

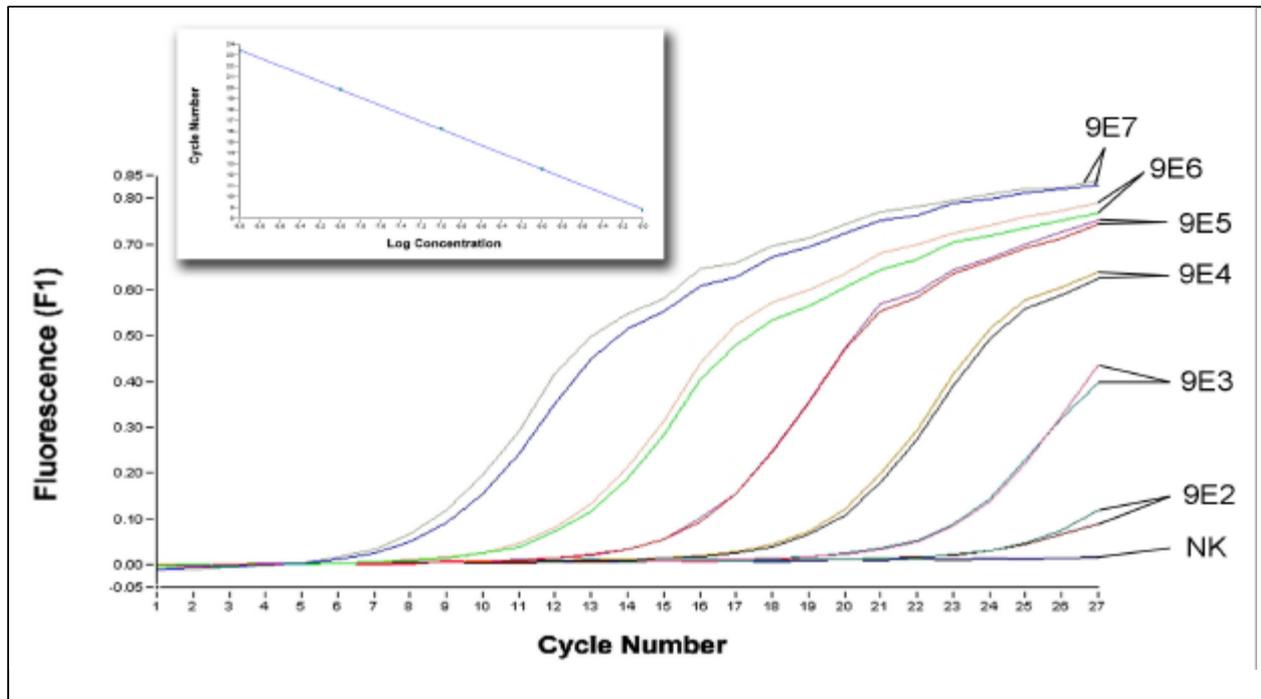
Der Vergleich der LCMV-Replikationskinetiken zeigte, daß Stamm Armstrong am schnellsten replizierte (Abbildung 16B). Bereits nach 48 h war auf beiden Zelllinien das Maximum von rund 5×10^8 RNA-Molekülen pro ml erreicht. Stamm WE erreichte das Maximum 24 h später, wobei der Virustiter auf Vero-Zellen um ein zehnfaches höher als auf HuH7-Zellen lag. Vergleichbar zu Lassa-Virusstamm CSF zeigte auch das LCMV-Primärisolat CH-5692 eine verzögerte Replikation. Die Detektion viraler RNA-Moleküle war auf beiden Zelllinien erst nach 48 h möglich. Der exponentielle Titeranstieg war nach 4 Tagen p.i. noch nicht beendet. Die laboradaptierten Stämme Armstrong und WE zeigten also einen wesentlich schnelleren Titeranstieg als das wenig passagierte Primärisolat aus den Callitrichiden (LCMV CH-5692).

5.3.3 Effizienzbestimmung der RNA-Extraktion mit Diatomeenerde.

Aus finanziellen Gründen wurde die teure Qiagen-RNA Extraktionsmethode vor der quantitativen RT-PCR durch die deutlich kostengünstigere Extraktion mit Diatomeenerde ersetzt. Um ihre Eignung nachzuweisen, wurde die Effizienz der Methode bestimmt.

Zu diesem Zweck wurden in-vitro-Transkripte der LCMV S-RNA mit der neuen Methode präpariert und mit Hilfe der LCMV-RT-PCR quantifiziert. Der Verlust an RNA-Molekülen während der Präparation wurde anhand nicht präparierter RNA-Aliquots der gleichen Verdünnung, die ebenfalls der RT-PCR unterzogen wurden, errechnet. In Abbildung 17 ist das RT-PCR LightCycler-Diagramm und die berechneten Extraktionseffizienzen für unterschiedliche Konzentrationen dargestellt. Mit und ohne Präparation war die bestimmte Konzentration nahezu identisch. Die Effizienz schwankte in den Verdünnungsschritten zwischen 59,6% und 70,1%, durchschnittlich lag sie bei rund 65% (Abbildung 17, Tabelle). Auch bei geringerer RNA-Konzentration (9×10^3 bzw. 9×10^2 RNA-Moleküle pro Reaktion) wurden hohe Präparationseffizienzen erreicht. Damit liegt diese Methode etwas unterhalb des kommerziell erhältlichen QIAamp Viral RNA Kits (Qiagen) (Effizienz rund 95 bis 99%, persönliche Mitteilung Christian Drosten, Bernhard-Nocht-Institut).

Die Analyse zeigt, daß die etablierte Präparationsmethode hoch effizient ist und zur Quantifizierung eingesetzt werden kann.



RNA-Moleküle pro PCR	9×10^7	9×10^6	9×10^5	9×10^4	9×10^3	9×10^2
Effizienz	64,1%	59,6%	70,1%	62,5%	63,3%	69,1%

Abbildung 17: Effizienzbestimmung der LCMV-RNA-Extraktion mit Diatomeenerde.

Die Konzentrationen der präparierten / nicht-präparierten RNA-Verdünnungen sind an den Kurven notiert. Die Konzentrationen sind in RNA-Moleküle pro Reaktion angegeben. In dem separaten Bild ist die Eichgerade aus den Verdünnungen der nicht-präparierten RNA-Moleküle dargestellt. Anhand dieser Eichgeraden wurde die Konzentrationsbestimmung der präparierten Proben vorgenommen. In der Tabelle sind die Effizienzen der RNA-Extraktion notiert.

5.4 Untersuchungen zur physikalischen Stabilität und Lagerung von Proben

Im Folgenden sind Untersuchungen beschrieben, die hinsichtlich der thermischen Stabilität bezüglich der Lagerung bzw. der Inaktivierung von Arenaviren durchgeführt wurden.

5.4.1 Viruslagerung

Alle Lassa-Virus- und LCMV-Stocks wurden bei -70°C aliquotiert gelagert. Da für die Versuchsabläufe mindestens ein Einfrier- und Auftauzyklus notwendig war, sollte eine dadurch bedingte mögliche Abnahme der viralen RNA bzw. des infektiösen Virustiters untersucht werden. Hierfür wurden Aliquots von Lassa-Virus Stamm AV und NL mehrmals eingefroren und

wieder aufgetaut. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung der viralen S-RNA mit Hilfe der RT-PCR (Abbildung 18) und eine Bestimmung der Infektiosität mit Hilfe des Immunfocus-Assays.

Im Vergleich zur Kontrollprobe konnte durch drei Einfrierzyklen keine Reduktion der RNA-Konzentration festgestellt werden. Es waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Lassa-Virusstämmen AV bzw. NL zu erkennen (Abbildung 18).

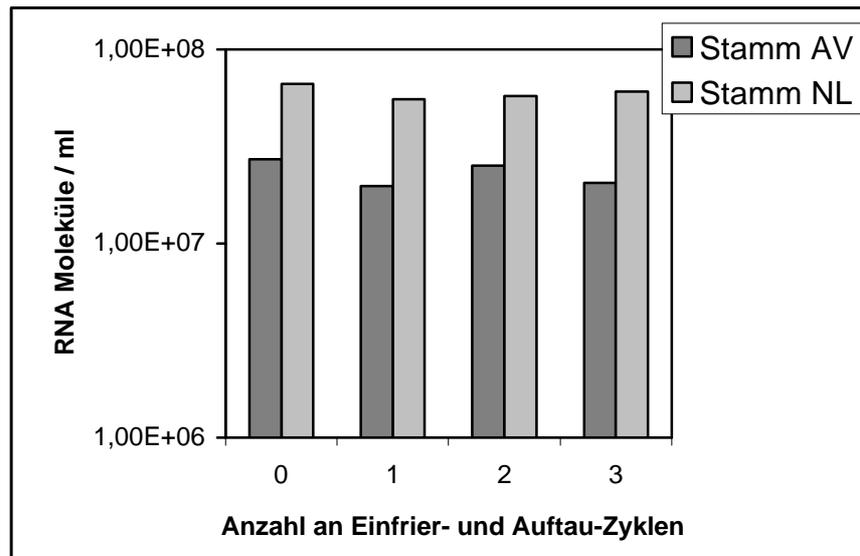


Abbildung 18: Untersuchung der Lassa-Virus RNA-Stabilität durch Einfrier- und Auftauzyklen.

Aliquots von Lassa-Virusstamm AV und NL wurden 0, 1, 2 bzw. 3 mal bei -70°C eingefroren und wieder aufgetaut und die S-RNA Konzentration per RT-PCR quantifiziert.

Zusätzlich zur RNA-Konzentration wurde die Veränderung der Infektiosität mit Hilfe des Immunfocus-Assays untersucht. Alle Proben wurden im Doppelansatz bestimmt. Der Titer infektiöser Viruspartikel wurde durch bis zu fünf Einfrier-Auftau-Zyklen nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Das 3 bzw. 5-malige Einfrieren und Auftauen von Lassa-Virus Stamm AV und NL bewirkte keine Verringerung der RNA-Menge und ebenfalls keine Reduktion in der Infektiosität. Ein Einfrieren von Proben im Verlauf von Experimenten beeinflusst folglich nicht das Ergebnis der Quantifizierung.

5.4.2 Thermische Inaktivierung

Im Folgenden ist die Untersuchung zur thermischen Inaktivierung von Lassa-Virus dargestellt. Es sollte eine möglichst schonende Inaktivierung infektiöser Viruspartikel etabliert werden, wobei die RNA für weitere Analysen intakt bleiben sollte. Hierfür wurden pro Ansatz 5×10^3 IFU des Lassa-Virusstocks NL 4 für 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min. bei 60°C inkubiert. Die Überstände wurden anschließend auf Vero-Zellen über einen Zeitraum von 13 Tagen passagiert. Die Zellkulturüberstände jeder Passage wurden mit Hilfe der quantitativen RT-PCR kontrolliert. In Abbildung 19 ist eine Foto der Agarose-Gelelektrophorese der Kontroll RT-PCR von Tag 13 dargestellt. Ab einer Denaturierungszeit von 20 Minuten (Spur 3 bis 7) konnte in den Kulturen keine S-RNA mehr nachgewiesen werden, d.h. eine produktive Infektion war nicht mehr möglich.

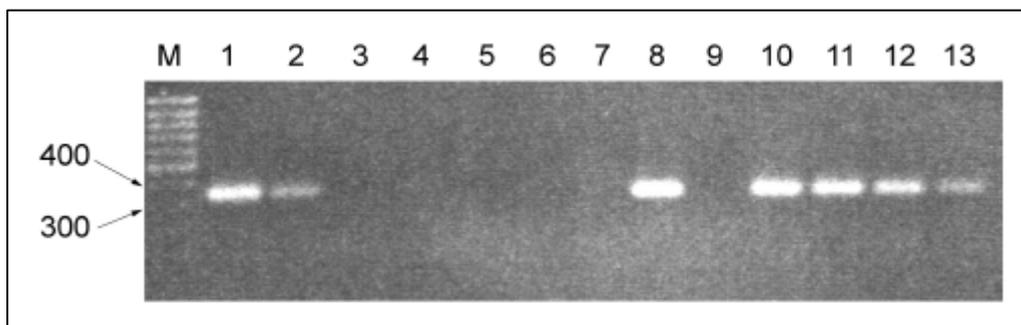


Abbildung 19: Lassa-Virus RT-PCR mit extrahierten Zellkulturüberständen.

Unterschiedlich lang inaktivierte Virusstocks wurden 13 Tage p.i. nach Passagierung auf Vero-Zellen quantifiziert. Probenbelegung des Agarosegels:

Spur M=Marker, 100 bp Leiter;

denaturierte Proben: **Spur 1**=0 min., **2**=10 min., **3**=20 min., **4**=30 min., **5**=40 min., **6**=50 min., **7**=60 min.

Spur 8=Lassa Stamm NL RNA, **Spur 9**=RT-PCR Negativkontrolle,

Lassa in-vitro Transkript **Spur 10**= 2×10^6 , **11**= 2×10^5 , **12**= 2×10^4 , **13**= 2×10^3 RNA-Moleküle pro Reaktionsansatz.

Zur Kontrolle dieses Ergebnisses wurden von Lassa-Virus Stamm NL rund 5×10^4 bzw. $1,5 \times 10^5$ IFU für 60 Minuten bei 60°C inaktiviert. Mit den inaktivierten Partikeln wurde anschließend versucht, eine Infektion von Vero-Zellen durchzuführen. Dies entspräche vor der Inaktivierung einer MOI von rund 0,1 bzw. 0,3. Hierfür wurden die inaktivierten Partikel direkt in das Zellkulturmedium gegeben und über einen Zeitraum von 21 Tagen passagiert. Das Inokulum wurde erst mit der ersten Zellkulturpassage (nach 4 Tagen) verworfen, so daß infektiöse Partikel während der gesamten Zeit Zellen hätten infizieren können. Die Zellen wurden nach jeder Passage mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz hinsichtlich einer Lassa-Virusinfektion untersucht. Während des gesamten Versuchszeitraumes konnte keine Lassa-Virusinfektion beobachtet werden. Abschließend wurden die Kulturüberstände (21 Tage p.i.) mit Hilfe der quantitativen RT-PCR analysiert. In den Zellkulturüberständen konnte keine Lassa-Virus S-RNA nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde die Veränderung der RNA-Konzentration während der Inaktivierung mit Hilfe der LightCycler RT-PCR quantifiziert. Hierfür wurden Lassa-Virus Stamm NL Proben in Log_{10} Verdünnungen thermisch inaktiviert und quantifiziert (Abbildung 20).

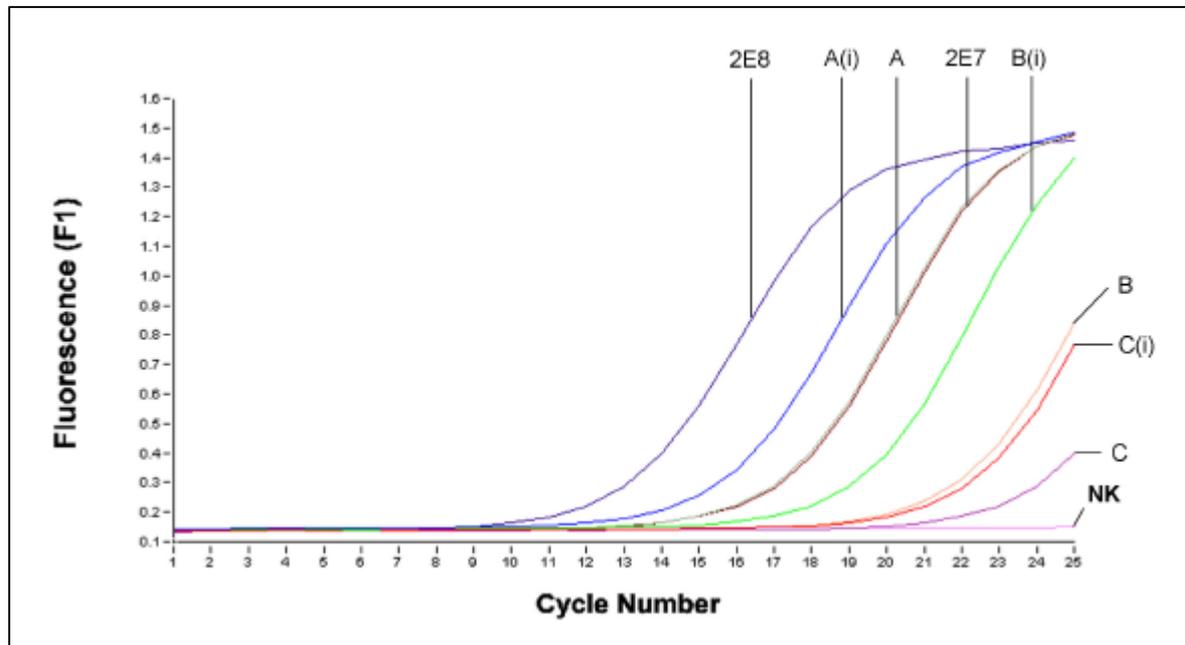


Abbildung 20: Quantifizierung von Lassa-Virus-RNA nach thermischer Inaktivierung.

Lassa-Virus NL Proben wurden bei 60°C für 60 min. inaktiviert und in Log_{10} -Verdünnungen im LightCycler quantifiziert. Lassa-Virus-Standard mit einer Konzentration von 2×10^7 und 2×10^8 RNA-Molekülen / PCR. Bei den mit (i) gekennzeichneten Proben handelt es sich um inaktivierte Proben, bei den nicht zusätzlich gekennzeichneten um nicht-inaktivierte Proben. Probe A: $2,0 \times 10^7$; Probe A(i): $5,8 \times 10^7$, Probe B: $1,2 \times 10^8$, Probe B(i): $6,2 \times 10^8$, Probe C: $3,3 \times 10^9$, Probe C(i): $1,0 \times 10^8$ Angaben in RNA-Moleküle / PCR.

Es konnte gezeigt werden, daß eine Inaktivierung von 60°C für 60 min. in keiner der Verdünnungen eine Abnahme der RNA-Konzentration bewirkte. In den thermisch inaktivierten Proben konnte sogar eine leichte Steigerung der RNA-Konzentration festgestellt werden, die vermutlich auf das Inaktivieren von möglichen PCR-Hemmstoffen zurückzuführen ist. Außerdem wäre eine stärkere Denaturierung der RNP-Partikel denkbar, so daß eine höhere Konzentration freier RNA-Moleküle resultiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Inaktivierungsbedingung von 60°C für 60 Minuten ausreichen, um Lassa-Viren thermisch zu denaturieren. Diese Bedingung wird auch in der Literatur als ausreichende Denaturierungszeit für Lassa-, Ebola- oder Marburg-Virus angegeben (MITCHELL UND MCCORMICK, 1984). Durch die Inaktivierung war darüberhinaus keine Reduktion der RNA-Konzentration zu beobachten, was die exakte Quantifizierung in einer sich anschließenden RT-PCR erlaubt.

5.5 Einfluß von Cytokinen

In den folgenden Versuchen sollte der Einfluß der Cytokine IFN- α , IFN- γ und TNF- α sowie deren Kombinationen auf die Virusreplikation untersucht werden. Die Untersuchungen basierten im wesentlichen auf die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Lassa-Virusstämme AV, NL und CSF sowie dem LCMV-Stamm CH-5692. Darüberhinaus wurden die beiden existierenden Laborstämme LCMV Armstrong und WE verwendet. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte mit Hilfe der quantitativen RT-PCR und für ausgewählte Experimente mit Hilfe des Immunfocus-Assays. Die initialen Experimente zur Etablierung der Versuchssysteme wurden mit dem bekannterweise durch Cytokine beeinflussbaren Virus der Vesikulären Stomatitis (VSV) durchgeführt (NOVELLA *et al.*, 1996). Die Bestimmung des VSV-Titers erfolgte mit Hilfe des Plaque-Assays.

5.5.1 Der Einfluß von Cytokinen auf die Vitalität von HuH7- und Vero-Zellen

Weil Cytokine das Zellwachstum hemmen können, sollte initial untersucht werden, ob die verwendeten Cytokinkonzentrationen hemmend auf das Wachstum von HuH7- bzw. Vero-Zellen wirken. Die Untersuchung der zellulären Lebensfähigkeit wurde mit Hilfe des MTT-Tests durchgeführt.

Die eingesetzten Cytokine bzw. deren Kombination hatten keinen Einfluß auf die Vitalität der HuH7-Zellen (Abbildung 21). Auch in der mikroskopischen Betrachtung konnten keine Unterschiede zwischen Zellen mit und ohne Cytokinen im Medium festgestellt werden.

Das schnellere Zellwachstum und die damit verbundene höhere Zelldichte bewirkte bei Kontrollkulturen von Vero-Zellen einen rund 2,8 fach höheren MTT-Wert als bei HuH7-Zellen (Abbildung 21). Die höhere Vero-Zellzahl ermöglichte eine stärkere Synthese an photometrisch gemessenem Formazan. TNF- α hatte als einziges Cytokin keinen nennenswerten Einfluß auf das Wachstum von Vero-Zellen. IFN- α und IFN- γ reduzierten die Zellzahl um rund 25%, die additive Gabe von TNF- α bewirkte keine wesentliche zusätzliche Reduktion. Erst die Kombination beider Interferone bzw. die Dreierkombination aller Cytokine bewirkte eine Reduktion der Extinktion um rund 50%. Keine Unterschiede wurden jedoch in der Anzahl toter Zellen festgestellt.

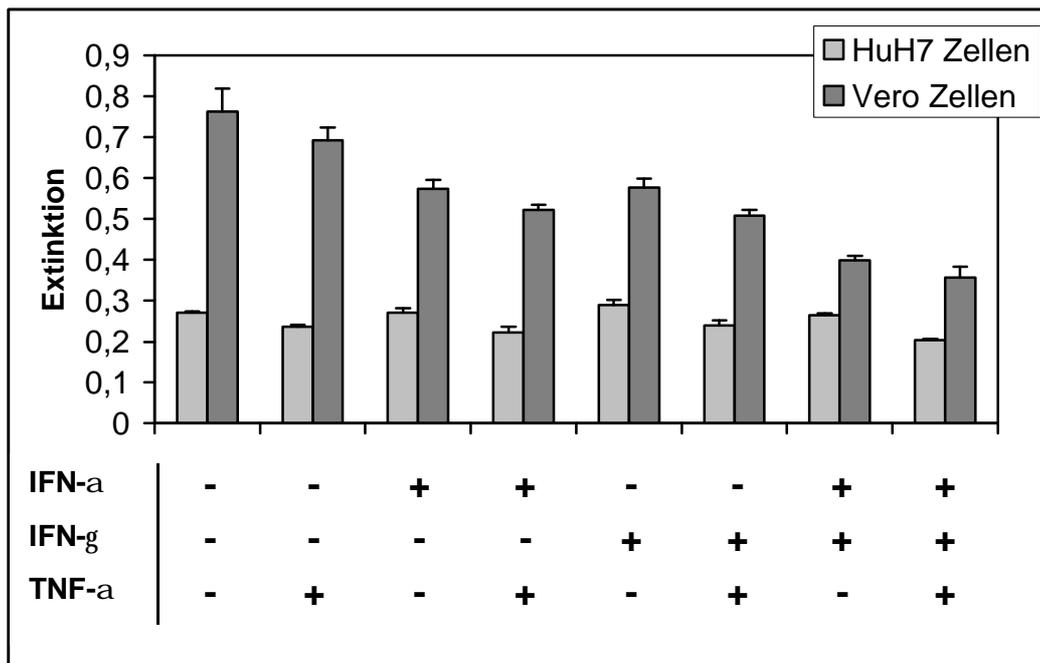


Abbildung 21: Vitalitätsbestimmung von HuH7- und Vero-Zellen nach Cytokininkubation.

Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 1000 U / ml mit IFN- α , IFN- γ und TNF- α und deren Kombinationen für 72 h inkubiert. Ein Mediumwechsel mit neuen Cytokinen erfolgte nach 48 h. Die Vitalitätsbestimmung mit Hilfe des MTT-Tests wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

5.5.2 Einfluß von Cytokinen auf das Vesikuläre Stomatitis Virus

Um die Funktionalität des Assays zu zeigen, wurde untersucht, ob die VSV-Replikation in HuH7- (humane Zelllinie) bzw. Vero-Zellen (Affenzelllinie) durch IFN- α , IFN- γ und TNF- α humanen Ursprungs beeinflussbar ist. Für diese Fragestellung wurden HuH7- bzw. Vero-Zellen jeweils mit einer Cytokinkonzentration von 0, 10, 100 bzw. 1000 Units pro ml für 24 Stunden zur Aktivierung zellulärer Reaktionswege präinkubiert. Die VSV-Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,01. Der im Kulturüberstand befindliche VSV-Titer wurde per Plaque-Assay bestimmt (Abbildung 22).

Auf die in Kultur gehaltenen adhärenenten HuH7- und Vero-Zellen hatte VSV eine ausgeprägt cytopathogene Wirkung. Somit war eine erfolgreich verlaufende Infektion anhand des cytopathischen Effekts (CPE) zu erkennen. In der Kontrolle (0 Units / ml) war 24 Stunden p.i. ein CPE zu erkennen. Eine IFN- α Konzentration von 1000 U / ml verhinderte vollständig, IFN- γ größtenteils die Bildung eines CPE. Im Gegensatz dazu konnte in beiden Zelllinien keine der drei eingesetzten TNF- α Konzentrationen den CPE verhindern.

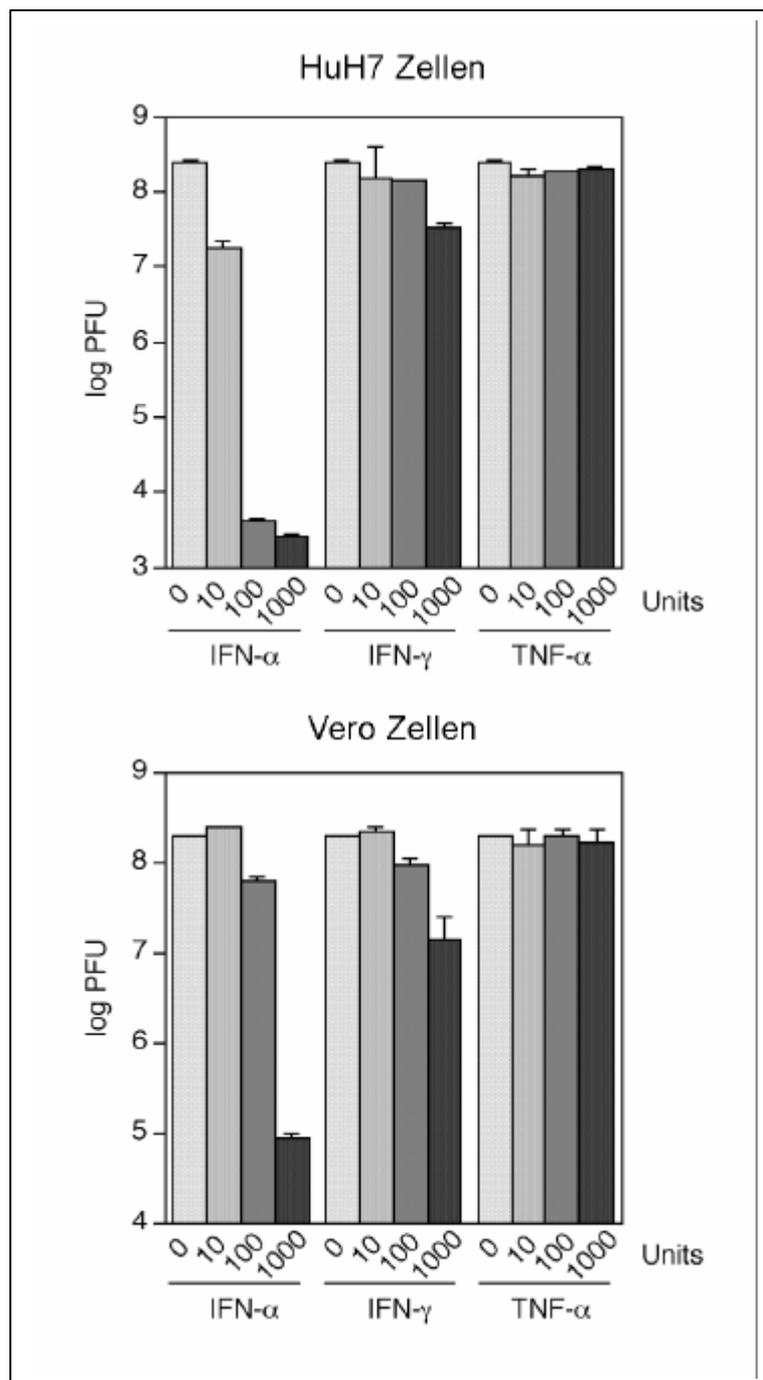


Abbildung 22: Einfluß von IFN- α , IFN- γ und TNF- α auf die VSV-Replikation.

Auf HuH7- und Vero-Zellen wurden IFN- α , IFN- γ und TNF- α mit einer Konzentration von 0, 10, 100 bzw. 1000 Units / ml für 24 h präinkubiert. Die VSV-Titerbestimmung erfolgte aus Kulturüberständen 24 h p.i. Die grafisch aufgetragenen Meßwerte sind PFU-Werte in logarithmischer Skalierung. Jede Bestimmung wurde im Doppelansatz durchgeführt.

In HuH7-Zellen hatte IFN- α einen wesentlich höheren antiviralen Effekt auf VSV als IFN- γ (Abbildung 22). Bei 10 Units / ml IFN- α zeigte sich bereits eine Titerreduktion im Vergleich zur Kontrolle um rund 1 \log_{10} . Die Konzentrationssteigerung von IFN- α auf 100 bzw. 1000 U / ml reduzierte den Virustiter um rund 4,5 bzw. 5 \log_{10} . Bereits mit einer IFN- α Konzentration von

100 U/ml schien die maximale Hemmdosis erreicht worden zu sein, eine zusätzliche Verzehnfachung bewirkte nur eine unwesentlich höhere Reduktion. Der antivirale Einfluß von IFN- γ auf HuH7-Zellen war hingegen niedriger. Der Einsatz von 10 bzw. 100 U pro ml ermöglichte eine Reduktion der Infektiosität um rund 30%. Erst eine Konzentration von 1000 U/ml bewirkte eine Reduktion des Virustiter um rund 1 log₁₀. Ein konzentrationsabhängiger, antiviraler Einfluß von TNF- α auf den Virustiter konnte nicht gezeigt werden.

Die oben dargestellten Versuche mit HuH7-Zellen wurden ebenfalls mit Vero-Zellen durchgeführt (Abbildung 22). In diesen Zellen konnte durch IFN- α und IFN- γ bei einer Konzentration von 10 U/ml keine Hemmung der VSV Replikation festgestellt werden. Erst eine Konzentration von 100 U/ml des entsprechenden Interferons bewirkte eine leichte Abnahme des infektiösen Titers. Bei einer Konzentration von 1000 U/ml konnte eine starke Titerreduktion gezeigt werden. IFN- α hat dabei wie in HuH7-Zellen eine wesentlich größere antivirale Wirkung als IFN- γ . TNF- α hatte in keiner der eingesetzten Konzentrationen eine eindeutig antivirale Wirkung auf VSV, die entsprechenden Virustiter waren mit denen der Kontrolle vergleichbar.

Zusammenfassend wurde nachgewiesen, daß im Zellkultursystem Interferone einen konzentrationsabhängigen, negativen Einfluß auf den Titer von VSV haben. Der Einfluß von IFN- α war bei einer Konzentration von 1000 U/ml deutlich größer als von IFN- γ . Die durch Interferone aktivierten antiviralen Reaktionswege sind folglich in HuH7- und Vero-Zellen intakt. Im Gegensatz dazu hatte TNF- α nahezu keinen antiviralen Effekt auf die VSV-Infektion.

5.5.3 Kontrolle der TNF- α Reaktionswege in HuH7- und Vero-Zellen

TNF- α hatte im Gegensatz zu den Interferonen- α und - γ in HuH7- bzw. Vero-Zellen nur einen sehr geringen bzw. keinen Einfluß auf den VSV-Titer. Aus diesem Grund wurde eine Kontrolle der TNF- α -Pathways in HuH7- bzw. Vero-Zellen durchgeführt. Diese wurden mit einem Luciferase-exprimierenden Vektor transient transfiziert, dessen Promotor (3 x NF κ B Orte) durch TNF- α aktiviert wird, was zur Bindung von aktiviertem NF κ B an den Promotor führt. Die dadurch initiierte Luciferase-Expression kann mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Gene Assays im Luminometer als Lichtemission gemessen werden (CLONTECH, 1999). In Abbildung 23 ist der zeitliche Verlauf der NF κ B-vermittelten Luciferase-Expression in TNF- α behandelten *versus* unbehandelten HuH7-Zellen gezeigt.

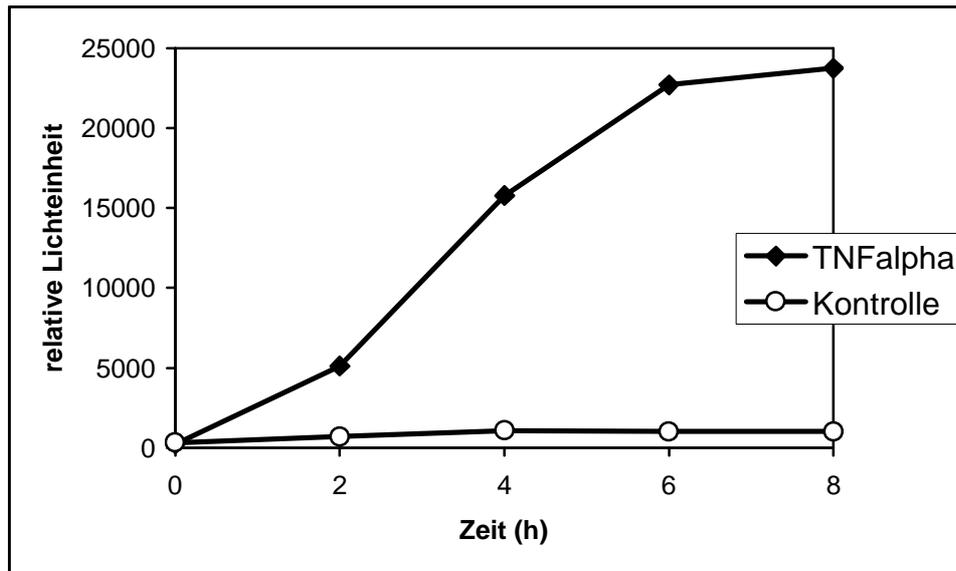


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der NF κ B-Induktion von transfizierten HuH7-Zellen mit TNF- α .

Die Lichtemissionsmessungen erfolgten zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Induktion mit TNF- α (1000 U / ml).

Bereits 2 Stunden nach TNF- α Induktion konnte eine rund 7,5 fach höhere Luciferase-Aktivität als in nicht-induzierten Zellen gemessen werden. Nach 4 Stunden war schon eine 15 fach bzw. nach 6 Stunden eine 22 fach höhere Aktivität zu detektieren. Weitere zwei Stunden Inkubation erbrachten hingegen keine wesentliche Steigerung.

Aufgrund der eindeutigen Reaktionsdifferenz zwischen den induzierten und den nicht-induzierten Zellen ist von der Funktionalität der TNF- α Reaktionswege auszugehen.

Neben HuH7-Zellen sollten auch Vero-Zellen hinsichtlich ihrer TNF- α Reaktionswege untersucht werden.

Tabelle 3: Lichteinheiten von aktivierten / nicht-aktivierten transfizierten Vero-Zellen.

Plasmidmenge / Induktionszeit	TNF- α induziert	nicht-induziert	Verhältnis induziert / nicht-induziert
2 μ g / 5 h	66877	43421	1,54
2 μ g / 7 h	229236	156743	1,46
0,5 μ g / 4 h	16665	11514	1,45
0,5 μ g / 6 h	37331	22602	1,65

Die Differenz in Vero-Zellen zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen lag unabhängig von der eingesetzten Plasmidmenge sehr viel niedriger als in HuH7-Zellen. Das Verhältnis von induzierten zu nicht-induzierten Zellen schien nach einer Inkubation von 4 Stunden nicht mehr

wesentlich beeinflusst worden zu sein. Der geringe Unterschied bestätigte sich jedoch in allen Transfektionsexperimenten und weist auf die Funktionalität der TNF- α Reaktionswege in Vero-Zellen hin. Es ist unklar, warum bereits in nicht-induzierten Zellen eine hohe Luciferase-Aktivität gemessen werden konnte. Die Transfektion eines TNF-unabhängigen Kontrollvektors (mit einem Thymidin-Kinase-Promotor vor dem Luciferase-Gen) erbrachte ebenfalls eine hohe Genexpression, d.h. zelluläre Faktoren verursachten aus unbekanntem Gründen einen sehr hohen Expressions-Hintergrund.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß die TNF- α Reaktionswege in HuH7- und Vero-Zellen intakt sind.

5.5.4 Einfluß von TNF- α , IFN- α und IFN- γ auf den Titer von Lassa-Virus- und LCMV-Stämmen

Im Folgenden ist der Einfluß von TNF- α , IFN- α und IFN- γ und deren Kombinationen auf die Lassa-Virus- bzw. LCMV-Infektion von Vero- und HuH7-Zellen dargestellt. Hierfür wurden beide Zelllinien unter dem Einfluß der Cytokine (jeweils 1000 U / ml) mit Lassa-Virusstamm AV, CSF bzw. NL oder mit LCMV-Stamm Armstrong, CH-5692 bzw. WE infiziert. Folgende Fragestellungen sollten mit diesen Versuchen beantwortet werden:

1. Haben Cytokine einen antiviralen Einfluß auf die Replikation von Lassa-Virus und LCMV?
2. Resultieren aus der Kombination von Cytokinen additive oder synergistische Effekte?
3. Gibt es zellspezifische Unterschiede?
4. Gibt es stammspezifische Effekte bzw. unterschiedliche Effekte zwischen den hochpathogenen Lassa- und den minder pathogenen LCM-Viren?

Es wurden Kulturüberstände von HuH7- und Vero-Zellen per quantitativer RT-PCR und für ausgewählte Experimente auch per Immunfocus-Assay bestimmt. Die Zellen wurden mit entsprechenden Cytokinen präinkubiert, um antivirale Reaktionswege in der Zelle schon vor der Infektionsphase zu aktivieren.

In Abbildung 24 ist ein Beispiel für die LCMV LightCycler- und Immunfocus-Quantifizierung der virushaltigen Zellkulturüberstände dargestellt.

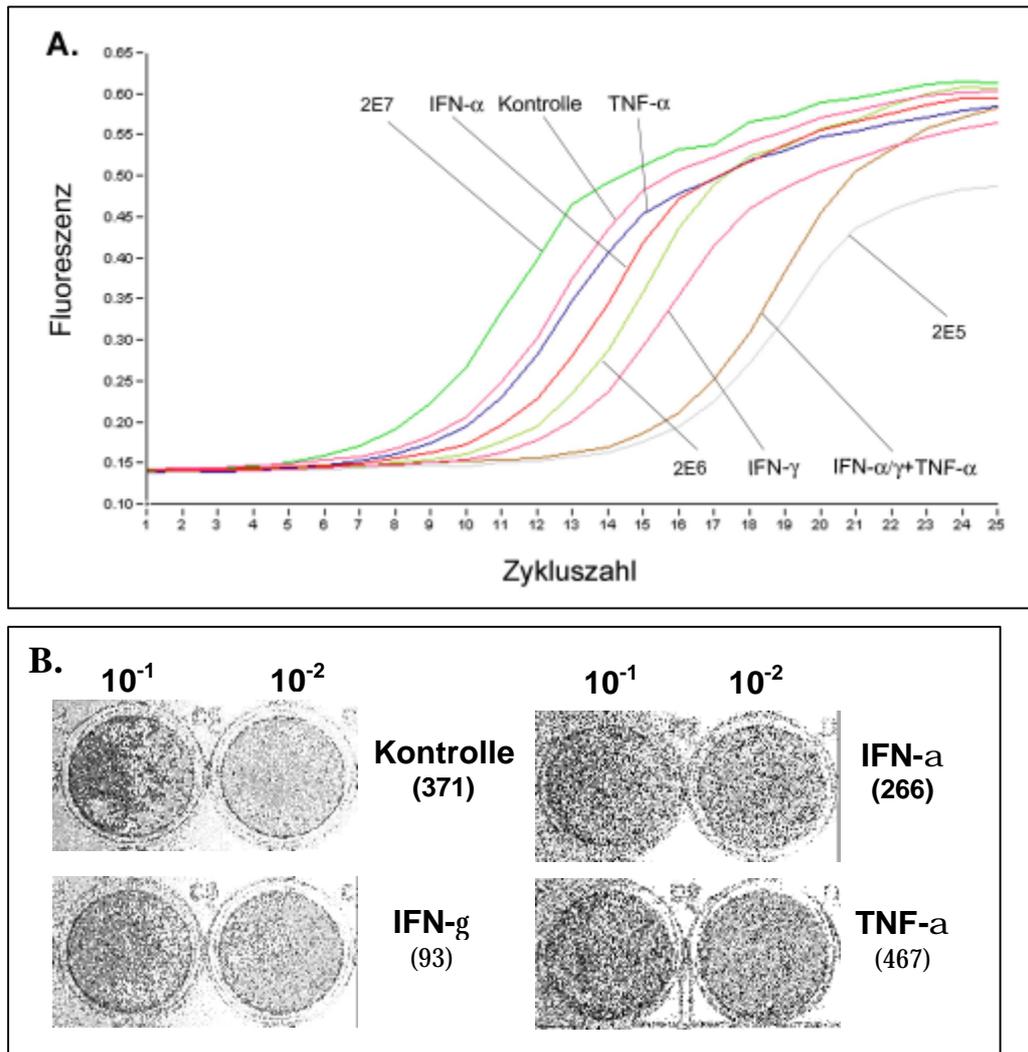


Abbildung 24: Einfluß von Cytokinen auf die Replikation von LCMV Armstrong in Vero-Zellen.

A. Ein Beispiel für ein LightCycler Diagramm ist dargestellt. Ein LCMV in-vitro RNA-Transkript dient als Standardreihe, Angaben in RNA-Moleküle pro Reaktion. Die Quantifizierung erfolgte aus Zellkulturüberständen 48h p.i. von Verozellen, die mit IFN- α , IFN- γ und TNF- α sowie deren Kombination (1000 U / ml) inkubiert wurden.

B. Quantifizierung der Zellkulturüberstände aus A mit Hilfe des Immunfocus-Assays. Verdünnungen von 10^{-1} und 10^{-2} sind aufgetragen. Die Zahl in Klammern gibt den Mittelwert der Plaqueanzahl in der 10^{-1} Verdünnung an (Dreifachansatz). Die Focusmorphologie ist bei allen Experimenten nahezu identisch.

LCMV Armstrong wurde für 48 h unter dem Einfluß von IFN- α , IFN- γ und TNF- α kultiviert und der RNA- Titer mit der quantitativen LCMV-RT-PCR bestimmt (Abbildung 24A). Eine eindeutige Quantifizierung war ebenfalls mit Hilfe des Immunfocus-Assays möglich (Abbildung 24B). Die angegebenen Mittelwerte aus einem Dreifachansatz zeigten eine deutliche Reduktion des Virustiters durch IFN- γ . Keine Reduktion war durch den Einfluß von TNF- α zu beobachten, nur eine geringe durch IFN- α .

In Abbildung 25 ist die Beeinflussung der Virustiter durch Cytokine 48 h nach Inokulation für verschiedene Viren und Zellen zusammenfassend dargestellt. Für einen Vergleich der Einzelexperimente wurde die RNA-Konzentration der Kontrollen gleich eins gesetzt und die Änderungen der Virusreplikation in behandelten Zellen relativ zu den Kontrollen logarithmisch dargestellt (Abbildung 25).

Der Lassa-Virusstamm AV wurde in HuH7-Zellen in Anwesenheit von IFN- α (1000 U / ml) um rund 1,2 log₁₀ reduziert, wohingegen TNF- α keinen reduzierenden Einfluß zeigte. Auch die Kombination beider Cytokine bewirkte keine weitere Titerreduktion. IFN- γ wirkte im Gegensatz zu IFN- α weniger antiviral. Dafür schien die kombinierte Inkubation aus IFN- γ mit TNF- α einen zusätzlichen antiviralen Effekt zu bewirken. Die Inkubation der beiden Interferone bzw. die Inkubation aller drei Cytokine verursachte eine Virushemmung um rund 1,5 log₁₀.

Die RNA-Konzentrationsreduktion von Lassa-Virus AV auf Vero-Zellen war vergleichbar mit der der HuH7-Zellen, allerdings bewirkte IFN- α auf diesen Zellen eine geringere Reduktion. Auch auf diesen Zellen verursachte die Kombination aus Interferon und TNF- α im Vergleich zu den Interferon-Einzelhemmungen keine zusätzliche Hemmung.

Lassa-Virusstamm NL wurde in HuH7- bzw. Vero-Zellen durch TNF- α nicht in der Replikation gehemmt. Die Inkubation mit IFN- α bewirkte im Vergleich zum Stamm AV eine geringere Hemmung. Erst die co-Inkubation mit TNF- α führte zu einer Abnahme der viralen RNA um rund 1 log₁₀. Dieser zusätzliche inhibitorische Effekt konnte nicht auf den Vero-Zellen beobachtet werden. IFN- γ wirkte in HuH7-Zellen auf NL nur unwesentlich antiviral, auch die zusätzliche Gabe von TNF- α verstärkte dies nicht. Auf Vero-Zellen war die Hemmung ca. doppelt so groß. Auf beiden Zelllinien resultierten aus der Kombination der Cytokine vergleichbare Hemmungen wie mit der alleinigen Interferon-Gabe. Sie lagen bei HuH7-Zellen ungefähr in dem Bereich der IFN- α Einzelhemmung, bei Vero-Zellen hingegen höher als bei den Einzelhemmungen. Gleiches konnte bei Stamm AV beobachtet werden. Die Kombination der Cytokine scheint also einen geringen additiven antiviralen Effekt zu bewirken.

Auch bei Lassa-Virusstamm CSF bewirkte das zusätzlich zu den Interferonen verabreichte TNF- α auf beiden Zelllinien keine weitere antivirale Aktivität. Auf HuH7-Zellen war die Reduktion durch IFN- α mit der durch IFN- γ vergleichbar. Die Kombination beider Interferone lag im Bereich der Einzelhemmungen. Auf Vero-Zellen hatte IFN- α nur einen unwesentlichen, IFN- γ einen mit dem Stamm NL vergleichbaren antiviralen Effekt. Die durch die co-Inkubation aller Cytokine verursachte Hemmung lag ungefähr bei der des IFN- γ Einzelwertes.

Der Vergleich der drei unterschiedlichen Lassa-Virusstämme zeigte, daß der Stamm AV speziell auf HuH7-Zellen am sensitivsten gegenüber Cytokinen ist und der Stamm CSF am wenigsten sensitiv zu sein scheint. Auf Vero-Zellen konnte gleiches beobachtet werden, wobei die Effekte generell etwas geringer ausfielen als auf HuH7-Zellen.

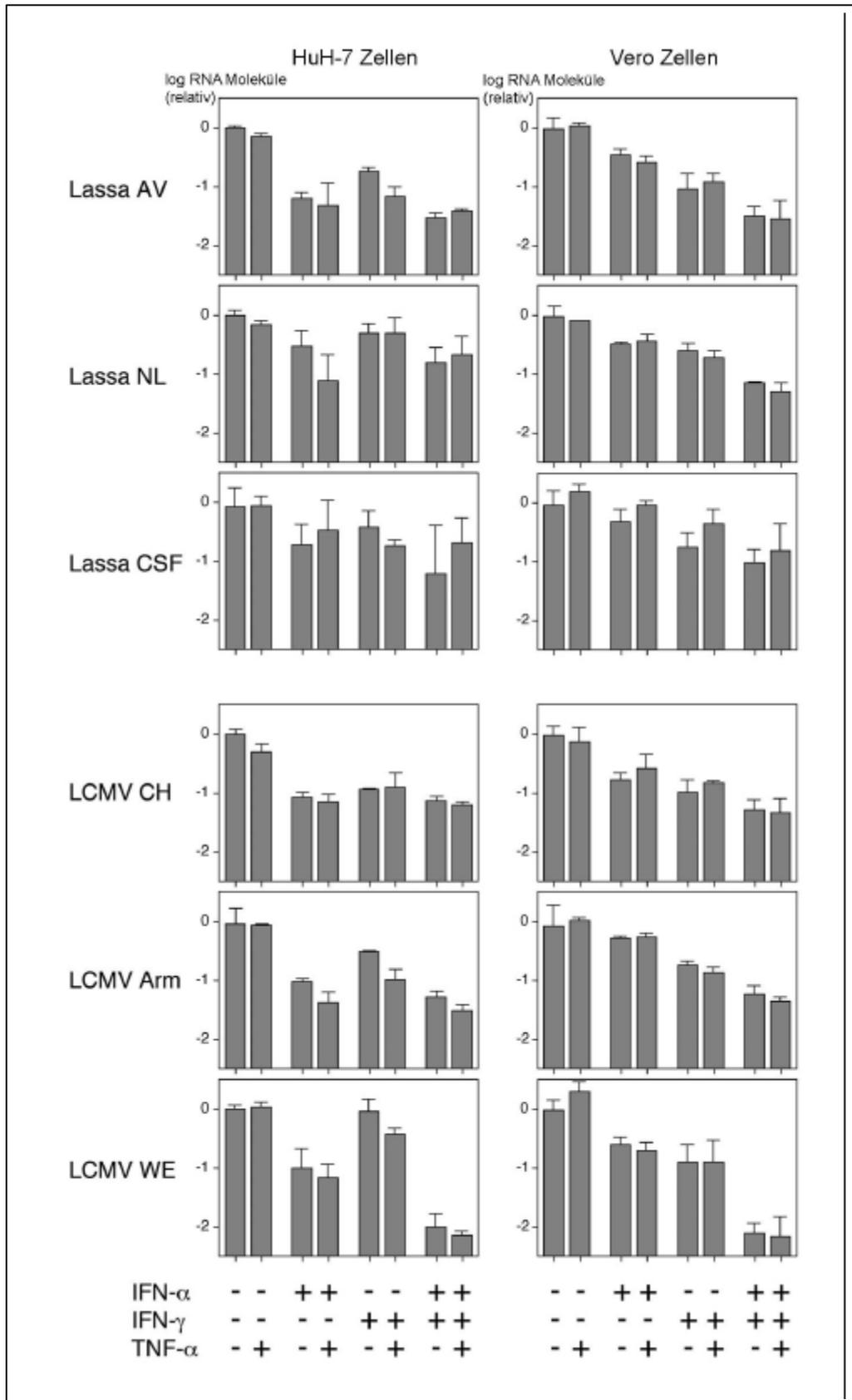


Abbildung 25: Einfluß von Cytokinen auf die Replikation verschiedener Lassa-Virus und LCMV-Stämme.

Die Infektionen wurden mit einer MOI von 0,01 durchgeführt, die Probenentnahme erfolgte 48 h p.i. (AV, NL, Arm, WE) bzw. 72 h p.i. (CSF, CH-5692). Die RNA-Konzentration wurde per RT-PCR bestimmt und ist relativ zur Kontrolle dargestellt.

Die Untersuchung von LCMV CH-5692 zeigte, daß TNF- α unabhängig der Zelllinie keinen großen antiviralen Einfluß hatte. Die co-Inkubation von TNF- α mit den beiden Interferonen bewirkte in keinem Fall eine zusätzliche antivirale Aktivität. Auf HuH7-Zellen hatten IFN- α und IFN- γ einen nahezu identischen Hemmeffekt. Auch deren Kombination bewirkte keine zusätzliche Reduktion. Auf Vero-Zellen hatte IFN- α im Vergleich zu IFN- γ eine etwas geringere antivirale Aktivität. Die Kombination lag mit 1,3 log₁₀ Reduktion etwas unterhalb der Einzelhemmung von IFN- γ .

Auf HuH7-Zellen wurde der LCMV-Stamm Armstrong durch IFN- α um 1 log₁₀ gehemmt. IFN- γ bewirkte hingegen nur eine Hemmung um 0,5 log₁₀. Beide Interferone zusammen hatten eine leicht höhere antivirale Aktivität als in Einzelwirkung. Die Dreierkombination aller Cytokine bewirkte die größte Reduktion. Auf Vero-Zellen hatte die co-Inkubation von TNF- α keine zusätzliche Wirkung. IFN- α reduzierte die Virusreplikation nur sehr gering, IFN- γ hingegen um 0,7 log₁₀. Die gemeinsame Inkubation beider Interferone bewirkte eine Hemmung um 1,2 log₁₀, was mit dem Effekt auf HuH7-Zellen vergleichbar war. Der antivirale Effekt der Dreierkombination war auf LCMV Armstrong nicht wesentlich stärker.

Der LCMV-Stamm WE war auf HuH7-Zellen durch 1000 U / ml IFN- α um rund 1 log₁₀ reduziert. Bei diesem Stamm konnte in mehrfach durchgeführten Experimenten durch IFN- γ keine Hemmung beobachten werden. Erst die zusätzliche Inkubation mit TNF- α bewirkte eine Hemmung um 0,4 log₁₀. Die Kombination beider Interferone bewirkte die stärkste in allen Versuchen beobachtete Hemmung um rund 2 log₁₀. Auf Vero-Zellen hatten IFN- α und IFN- γ in Kombination einen ähnlichen, antiviralen Einfluß wie auf HuH7-Zellen, d.h. auch auf Vero-Zellen brachte die Kombination der Interferone eine zusätzliche antivirale Aktivität. Aufgrund der geringeren Einzelhemmungen kann diese Aktivität als additive Hemmung bezeichnet werden. Die Dreierkombination der Cytokine bewirkte keine zusätzliche Hemmung.

Die Cytokine hatten auf die drei LCMV-Stämme ein unterschiedliches Wirkprofil. Während der Stamm WE in Kombination sehr stark gehemmt werden konnte, war dies bei dem Stamm CH-5692 und Arm nicht zu beobachten. Auch die Lassa-Virusstämme wiesen kein vergleichbares Muster auf. Der Stamm CH-5692 wurde wie kein weiterer Stamm von beiden Cytokinen und durch deren Kombination gleichermaßen gehemmt.

Insgesamt kann gesagt werden, daß unabhängig vom Virus oder Virusstamm die Cytokine zu einer vergleichbaren Hemmung der Virusreplikation führen. Geringe Unterschiede waren zwischen den beiden Zelllinien zu sehen. Im Vergleich zu VSV ist die Hemmung deutlich geringer.

Da es sich bei den in Abbildung 25 dargestellten Ergebnissen um RT-PCR Daten handelte, sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse aus RT-PCR und Immunfocus-Assay miteinander korrelierten. Die normierten Titerveränderungen beider Assays sind in Abbildung 26 graphisch dargestellt.

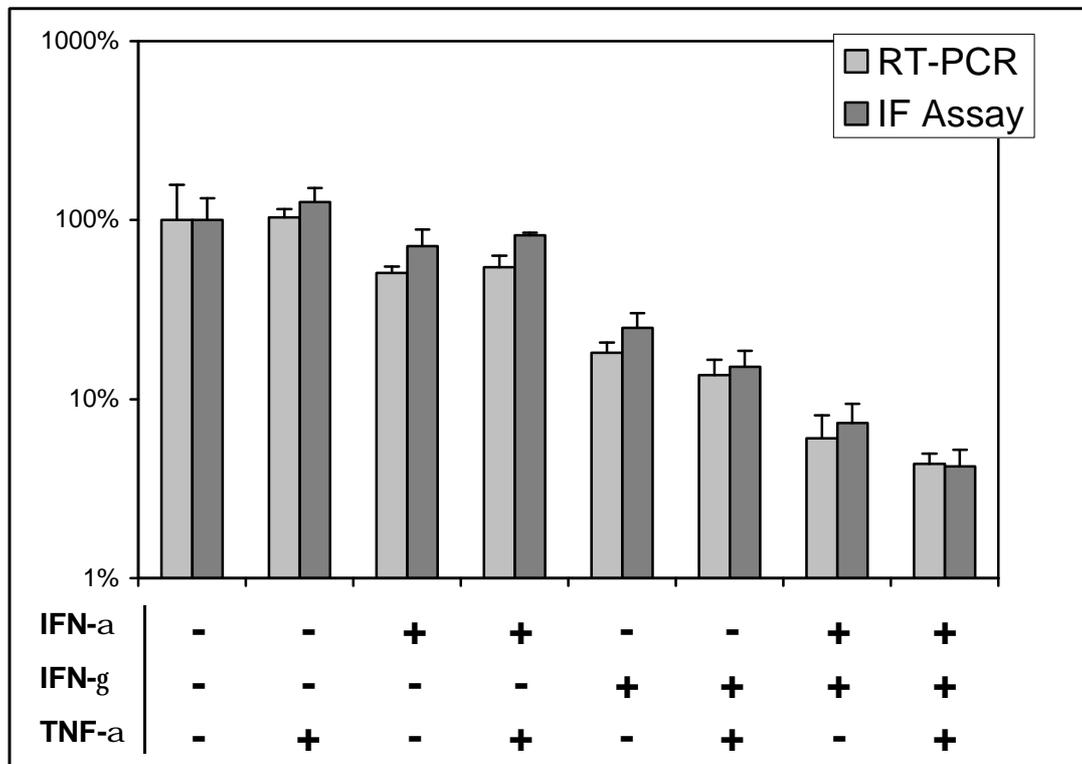


Abbildung 26: Vergleich von RT-PCR und Immunfocus-Assay am Beispiel von LCMV Armstrong auf Vero-Zellen.

Eine Probenentnahme aus Zellkulturüberständen von LCMV Armstrong auf Vero-Zellen wurde 48h p.i. vorgenommen. Die Analyse erfolgte mit quantitativer LCMV RT-PCR und Immunfocus-Assay. Es ist die logarithmisch aufgetragene prozentuale Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (=100%) dargestellt. Mittelwerte aus drei unabhängigen Messwerten.

Es konnte gezeigt werden, daß auf Vero-Zellen mit LCMV-Stamm Armstrong keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Nachweisverfahren bestanden. Die in der RT-PCR gemessenen Reduktionen der RNA-Moleküle entsprachen denen der infektiösen Virustiterreduktionen im Immunfocus-Assay. Der Einfluß von Cytokinen in Vero-Zellen auf die Virusreplikation konnte mit beiden quantitativen Systemen vergleichbar analysiert werden. Gleiches gilt auch für HuH7-Zellen und Lassa-Virus (Daten nicht gezeigt). Die in dieser Arbeit überwiegend verwendete Methode der quantitativen RT-PCR konnte aus diesem Grund die zeitaufwendigere Methode des Immunfocus-Assays ersetzen.

5.5.5 Einfluß von Cytokinen auf das Verhältnis von RNA-Molekülen zu infektiöser Einheit

Als nächstes wurde untersucht, ob Cytokine eine Änderung des Verhältnisses von RNA-Molekülen zu infektiöser Einheit beeinflussen. Hierfür wurde die Konzentration an RNA-Molekülen und infektiösen Einheiten bestimmt (Abbildung 26) und ihr Verhältnis errechnet (Abbildung 27). Das Verhältnis von RNA-Molekülen zu IFU war bei LCMV Armstrong deutlich höher als bei Lassa-Virus AV. Bei LCMV Armstrong wurden rund 30.000 S-RNA-Moleküle pro infektiöser Einheit detektiert, wohingegen bei Lassa-Virusstamm AV nur 4.000 (Vero-Zellen) bzw. 120 (HuH7-Zellen) RNA-Moleküle pro IFU gemessen wurden. Der antivirale Einfluß der Cytokine hatte keinen wesentlichen Einfluß auf das Verhältnis der beiden Meßgrößen.

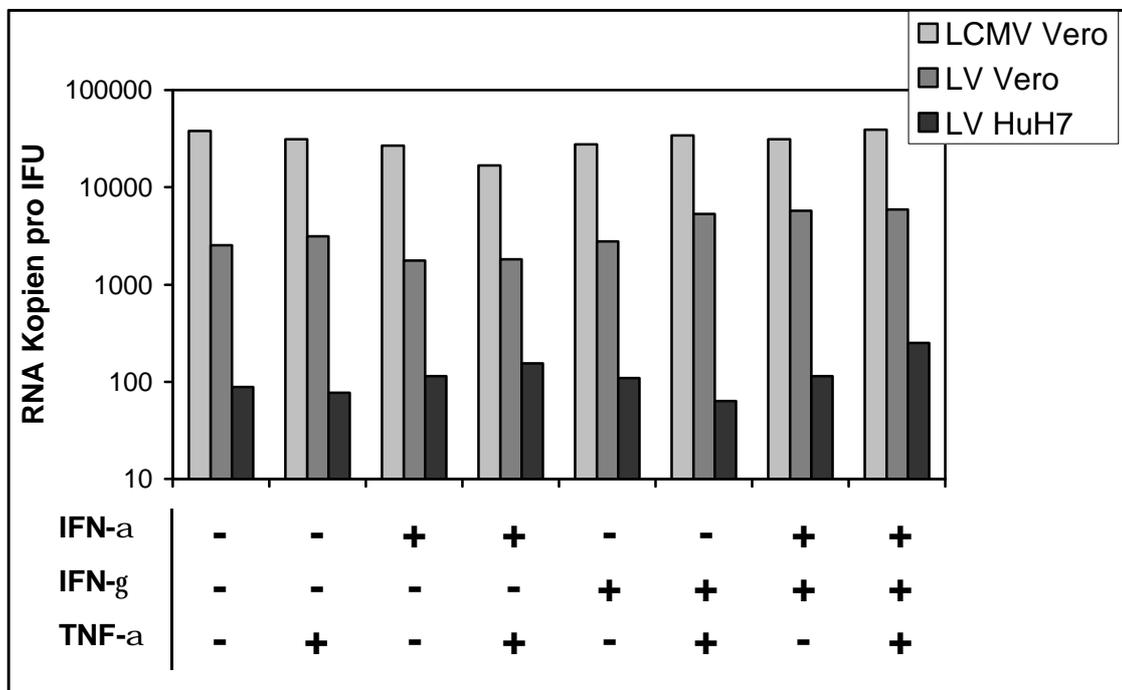


Abbildung 27: Verhältnis aus RNA-Molekülen zu IFU.

LCMV Armstrong und Lassa-Virus AV im Überstand infizierter HuH7- bzw. Vero-Zellen wurden mit Hilfe der quantitativen RT-PCR und des Immunofocus-Assays bestimmt (siehe Abbildung 26). Anschließend wurde das Verhältnis von RNA zu IFU errechnet.

Anhand des gleichbleibenden Verhältnisses zwischen der RNA-Konzentration zu infektiösen Partikeln konnte gezeigt werden, daß Interferone keinen Einfluß auf die spezifische Infektiosität von Lassa-Virus und LCMV haben.

5.5.6 Bestimmung der intrazellulären Lassa-NP Moleküle per Western-Blot

Alle zuvor dargestellten Messungen erfolgten aus Zellkulturüberständen, d.h. es erfolgte eine Quantifizierung freigesetzter Partikel. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die antivirale Aktivität der Cytokine auch intrazellulär nachweisbar ist. Die Detektion des viralen NP erfolgte mit Hilfe eines Lassa-Virus Nukleoprotein-spezifischen Antikörpers im Western-Blot.

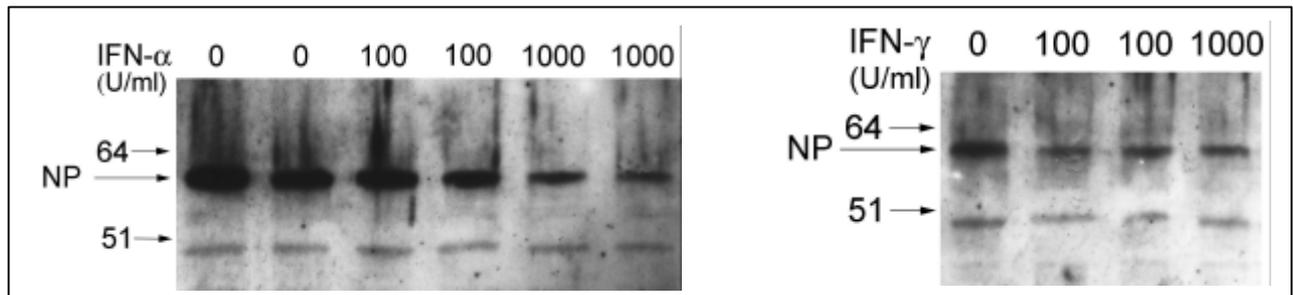


Abbildung 28: Lassa-NP-Detektion im Western-Blot.

HuH7-Zellen wurden mit 0, 100 bzw. 1000 U / ml IFN- α bzw. IFN- γ inkubiert und 24 h später mit Lassa-Virus AV infiziert (MOI 0,01). 48 h p.i. erfolgte die Detektion vom Zelllysate mit Lassa-Virus-spezifischen AK gegen NP. Das Molekulargewicht (jeweils rechts notiert) ist in kDa angegeben. In nicht-infizierten HuH7-Zellen konnten keine NP-spezifischen Banden (rund 61 kDa) detektiert werden.

Lassa-Virus Nukleoprotein hat ein Molekulargewicht von rund 61 kDa (Abbildung 28). In unbehandelten Kontrollzellen waren deutliche Banden in der Western-Blot Analyse zu erkennen, die unter dem Einfluß von IFN- α 100 U / ml gering und bei 1000 U / ml eindeutig reduziert waren. In nicht infizierten Kontrollzellen wurde kein NP detektiert.

Auch unter dem Einfluß von IFN- γ wurde eine konzentrationsabhängige Reduktion der NP-spezifischen Bande beobachtet. Bereits bei einer Konzentration von 100 U / ml war die intrazelluläre NP-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne IFN- γ reduziert. Eine Steigerung auf 1000 U / ml bewirkte keine weitere Reduktion der NP-Konzentration. Die IFN- α Hemmung läßt sich also auch intrazellulär nachweisen. Diese Beobachtung korreliert mit den zuvor dargestellten RT-PCR bzw. Immunfocus-Assay Daten.

5.5.7 Einfluß von Cytokinen während der initialen Infektionsphase

Nachdem gezeigt wurde, daß Cytokine einen Einfluß auf die Virusreplikation haben, sollte untersucht werden, ob sie eventuell die frühe Infektionsphase beeinflussen. Hierzu wurden Vero-Zellen 24 h mit entsprechenden Cytokinen ausschließlich präinkubiert. Die Infektion erfolgte mit Lassa-Virus AV bzw. LCMV Armstrong. Nach der Adsorptionsphase wurden die

Zellen mit Overlaymedium überschichtet, welchem keine Cytokine zugefügt wurden. Die Immundetektion infizierter Zellen erfolgte entsprechend dem Immunfocus-Assay Protokoll.

Ein Ausschnitt des Lassa-Virus und LCMV-Assays ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Vorbehandlung der Zellen führte zu Unterschieden in der Anzahl und in der Morphologie der Foci. Nach Cytokinbehandlung waren die Foci kleiner und in der Anzahl geringer. Das bedeutet, daß die Präinkubation mit Cytokinen einen Einfluß auf die Virusreplikation hatte.

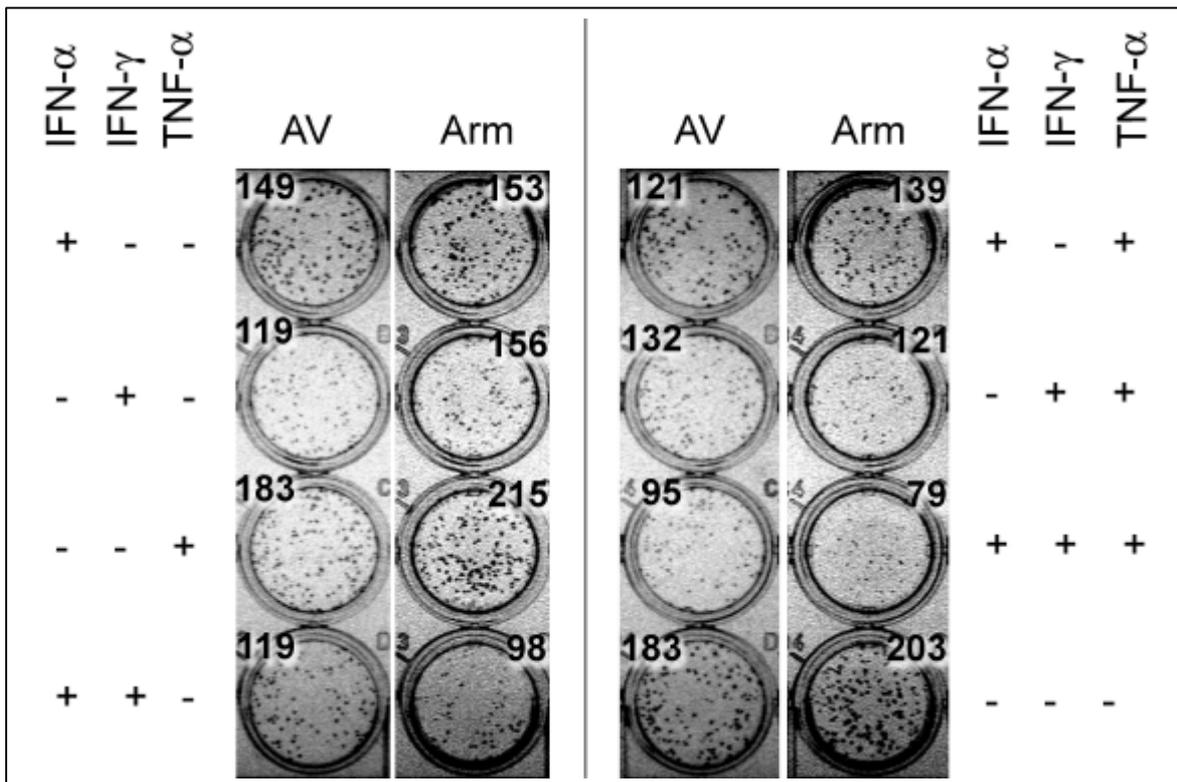


Abbildung 29: Cytokin-Immunfocus-Assay mit Lassa-Virus AV und LCMV Armstrong auf Vero-Zellen.

Vero-Zellen wurden 24 h mit Cytokinen präinkubiert (1000 U / ml), bevor sie mit Lassa-Virus AV und LCMV Armstrong infiziert (MOI 0,01) wurden. Anschließend erfolgte die Detektion wie im Immunfocus-Assay.

Die antivirale Wirkung durch die alleinige Vorinkubation der Cytokine fiel nicht so stark aus, wie bei Versuchen, in denen die Cytokine während der gesamten Infektionsphase wirken konnten. Aus diesem Grund wurden die Daten in Abbildung 30 im Gegensatz zu anderen Darstellungen dieser Arbeit nicht logarithmisch aufgetragen. Dennoch war der gleiche Trend in der antiviralen Aktivität zu erkennen (vgl. Abbildung 25). TNF- α zeigte keine antivirale Wirkung, die Wirkung von IFN- α und IFN- γ war vergleichbar. Die stärksten Reduktionen wurden bei der Inkubation mit allen drei Cytokinen beobachtet. Dies bedeutet, daß das TNF- α eine geringe zusätzliche Hemmung bewirkt hat, obwohl es alleine keinen Einfluß auf den Virustiter besaß.

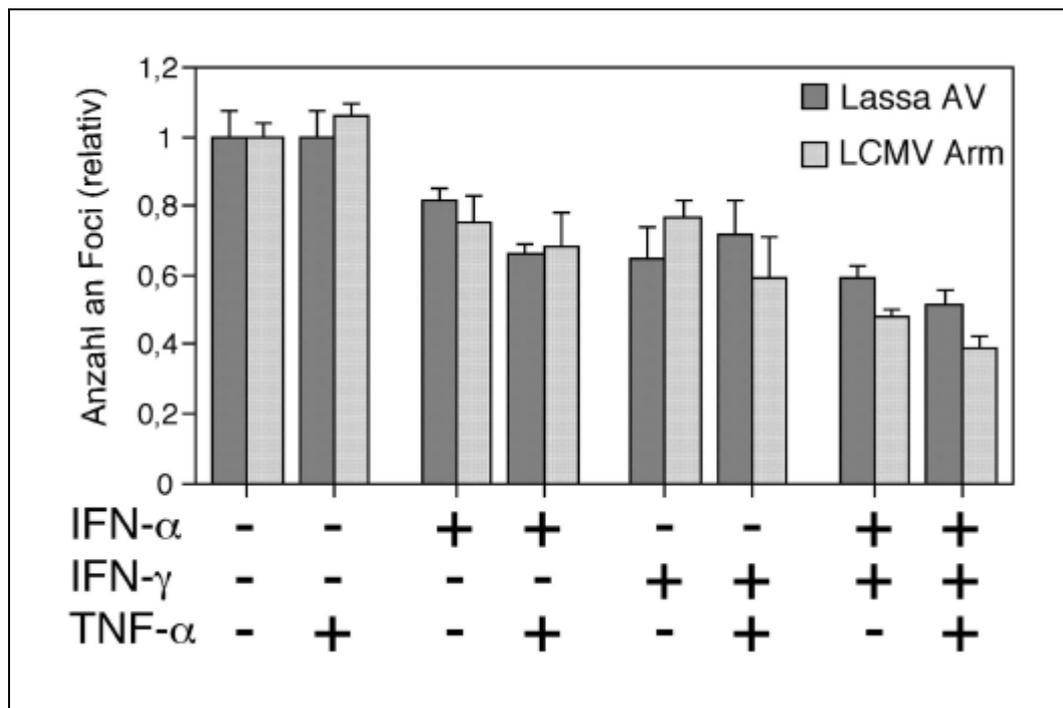


Abbildung 30: Einfluß von Cytokinen im Immunfocus-Assay auf Vero-Zellen.

Quantitative Darstellung der Daten aus Abbildung 29. Vero-Zellen wurden mit Cytokinen 24 h präinkubiert (1000 U / ml) und anschließend mit Lassa-Virus AV bzw. LCMV Armstrong infiziert. Die Meßergebnisse beruhen auf Mittelwerten aus Dreifachansätzen.

Zusätzlich zu den Versuchen mit Vero-Zellen wurden äquivalente Versuche mit HuH7-Zellen durchgeführt. Ein Ausschnitt des entsprechenden Cytokin-Immunfocus-Assays ist in Abbildung 31, die quantitative Auswertung in Abbildung 32 wiedergegeben.

Die Experimente mit dem HuH7-Immunfocus-Assay bestätigten die zuvor beschriebene antivirale Aktivität der Cytokine gegenüber Lassa-Virus und LCMV in Vero-Zellen. Im Vergleich zu Vero-Zellen konnte das Virus auf den HuH7-Zellen generell etwas stärker gehemmt werden. Im Gegensatz zu allen bisherigen Experimenten zeigte TNF- α alleine und in Kombination einen deutlichen Effekt (Abbildung 32).

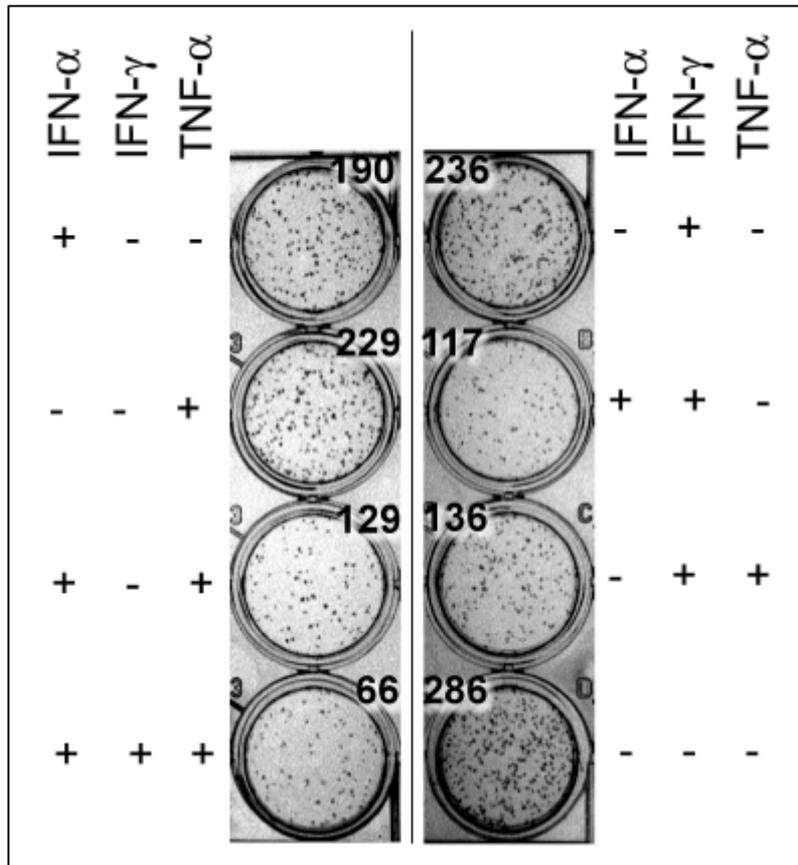


Abbildung 31: Cytokin-Immunfocus-Assay mit Lassa-Virus Stamm AV auf HuH7-Zellen.

HuH7-Zellen wurden mit Cytokinen 48 h präinkubiert (1000 U / ml) und anschließend mit Lassa-Virus AV infiziert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Immunfocus-Assays. Die Ziffer gibt die durchschnittliche Focus-Anzahl aus einem Dreifachansatz an.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß Cytokine im Immunfocus-Assay ebenfalls eine Reduktion von Lassa-Virus AV und LCMV Armstrong auf HuH7- und Vero-Zellen bewirken konnten. Die Reduktionen waren in ihrem Wirkungsmuster vergleichbar mit den zuvor dargestellten Cytokin-Versuchen (Abbildung 25). Nur die Höhe der Hemmungen fiel im Vergleich zu den Kultivierungsexperimenten geringer aus.

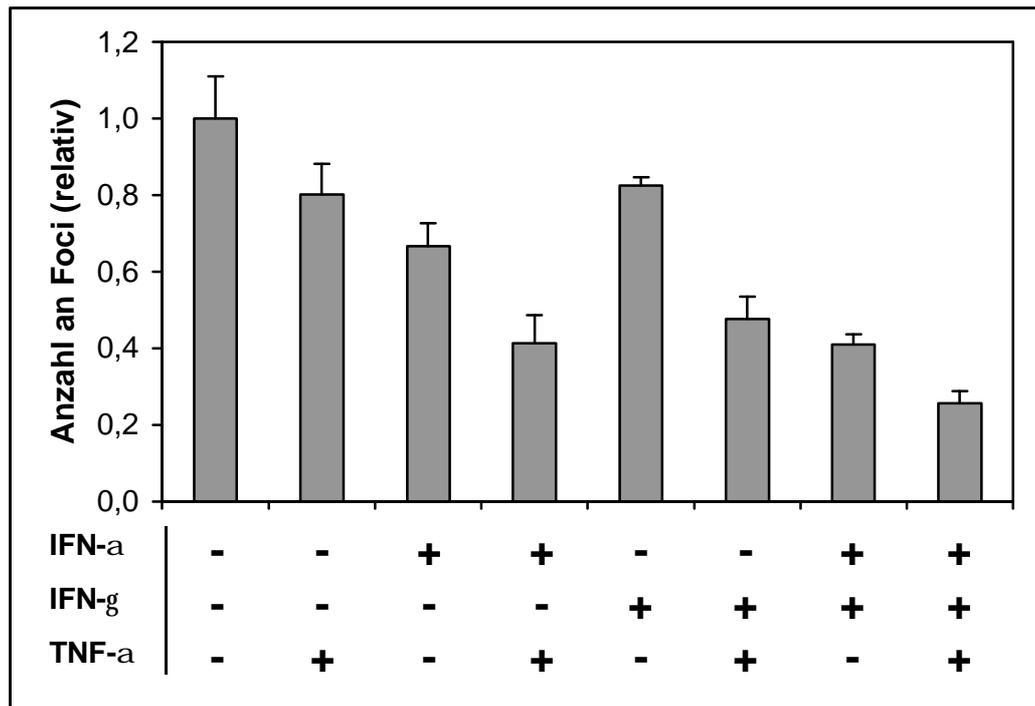


Abbildung 32: Einfluß von Cytokinen im Immunfocus-Assay auf HuH7-Zellen.

HuH7-Zellen wurden mit entsprechenden Cytokinen 48 h präinkubiert (1000 U / ml), Infektion mit Lassa-Virus AV. Mittelwerte aus Dreifachansatz.

5.7 Einfluß der PML- und Sp100-Überexpression auf die Replikation von Lassa-Virus und LCMV

Mit den vorhergehenden Versuchen wurde eine antivirale Aktivität der Cytokine auf die Replikation von Lassa-Virus und LCMV gezeigt. Dieser Effekt wird vermutlich durch antiviral wirkende Proteine vermittelt, die durch Cytokine induziert werden. Zu Interferon-induzierten, potentiell antiviral wirkenden Proteinen gehören das PML- und Sp100-Protein. Daher sollte untersucht werden, ob PML oder Sp100-Protein an der antiviralen Aktivität der Cytokine gegenüber Arenaviren beteiligt sind. Die Beteiligung des PML- und Sp100-Proteins wurde mit Hilfe von induzierbar überexprimierenden Zelllinien untersucht. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen sind stabil transfiziert und können induziert PML- und Sp100-Protein überexprimieren. Vorexperimente hatten gezeigt, daß diese Zellen gut mit Lassa-Virus und LCMV infizierbar sind. Die Etablierung dieser Zelllinien erfolgte durch STERNSDORF *et al.* (1995). Das gesamte PML- bzw. Sp100-Gen wurde in einem Tet-off Vektor in die Zellen transfiziert (CLONTECH, PT3001-1). Dies bedeutet, daß PML bzw. Sp100 in den Zellen überexprimiert werden, wenn kein Tetracyclin im Zellkulturmedium vorhanden ist. Umgekehrt ist die Transkription durch das Vorhandensein von Tetracyclin blockiert.

Die Funktionalität der Protein-Überexpression von HtTA-PML⁺⁺ - und HtTA-Sp100⁺⁺ - Zellen wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz gezeigt. Zu diesem Zweck wurden HtTA-PML⁺⁺ - und HtTA-Sp100⁺⁺ -Zellen mit Tetracyclin (d.h. PML- und Sp100-Protein wird nicht überexprimiert) und ohne Tetracyclin (d.h. Überexpression der Proteine) inkubiert. In Abbildung 33 sind Fluoreszenzaufnahmen von HtTA-PML⁺⁺ -Zellen nach PML-Überexpression (PML⁺) und im normalen Zustand (PML⁻) dargestellt. Die in HtTA-PML⁺⁺ -Zellen erkennbaren fluoreszierenden Pünktchen sind das endogen von der Zelle exprimierte PML. Ein deutlicher Unterschied bestand nach Überexpression des Proteins (PML⁺). Die intranukleären PML-Dots waren größer und in höherer Anzahl zu erkennen. Analog war die Situation nach Überexpression von Sp100.

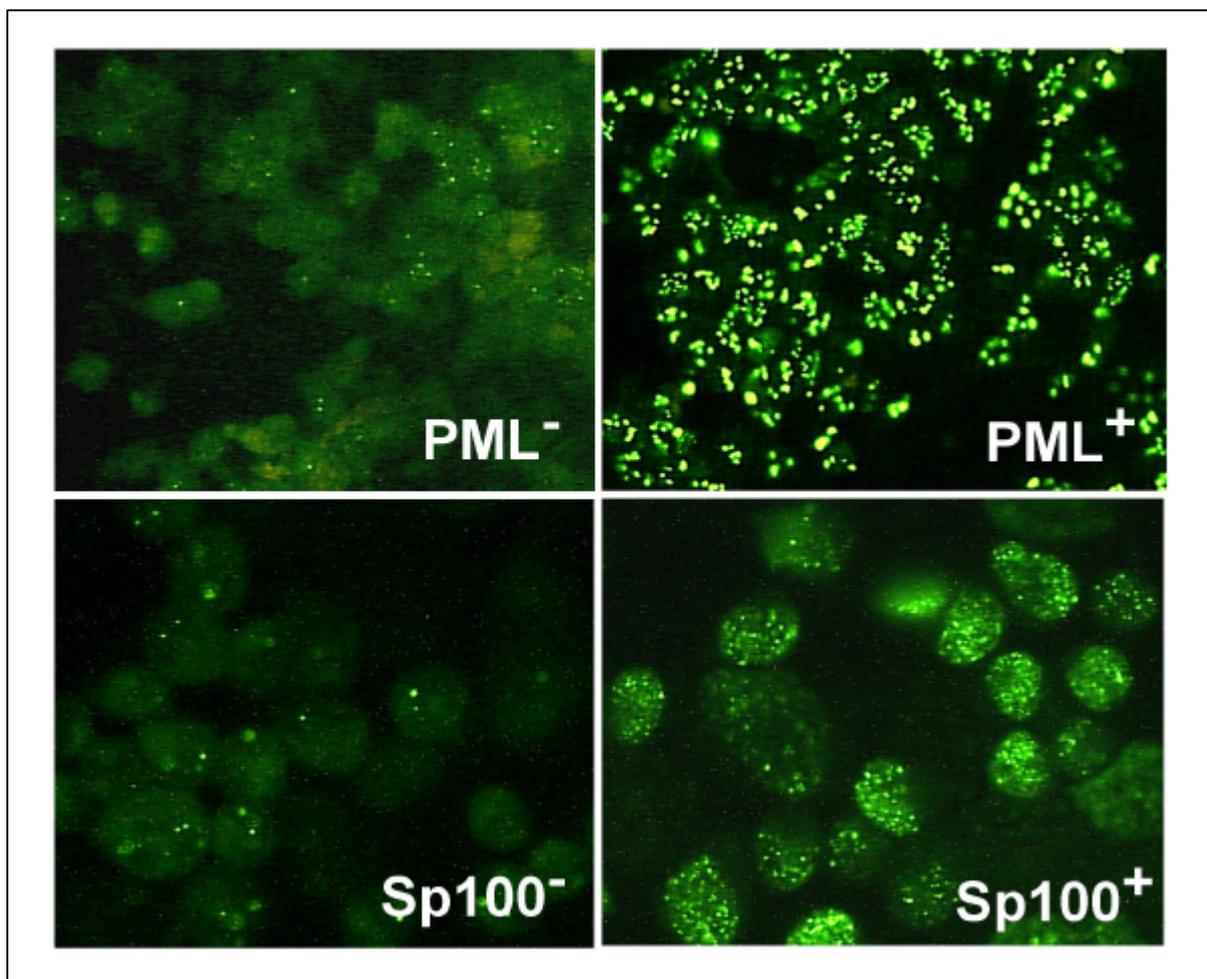


Abbildung 33: Induzierte Überexpression von HtTA-PML⁺⁺ - und HtTA-Sp100⁺⁺ - Zellen.

Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen von induzierten und nicht-induzierten HtTA-PML⁺⁺ - und HtTA-Sp100⁺⁺ -Zellen. Detektion mit primären PML- und Sp100-spezifischen Antikörpern sowie FITC-markierten sekundären Antikörpern. Die Zellen wurden mit Tetracyclin (PML⁻ / Sp100⁻) und ohne Tetracyclin (PML⁺ / Sp100⁺) inkubiert.

Die Daten zeigen, daß sich in den Zellen PML- sowie Sp100-Proteine mit Hilfe des Tet-off-Systems induziert überexpressieren lassen. Die Überexpression kann mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz verläßlich kontrolliert werden.

5.7.1 Der Einfluß von PML- und Sp100-Überexpression auf die Replikation von VSV

Es wurde in der Literatur beschrieben, daß VSV suszeptibel gegenüber einer PML-Überexpression ist (BONILLA *et al.*, 2002; CHELBI-ALIX *et al.*, 1998). Daher wurde initial die Wirkung von PML auf VSV in unserem Expressionssystem getestet. Der VSV-Titer wurde mit Hilfe des Plaque-Assays quantifiziert. Ein Ausschnitt dieses Assays ist in Abbildung 34 dargestellt.

Die PML-Überexpression verursachte keine Reduktion des VSV-Titers (Abbildung 34A). In den Kulturüberständen der Zellen, in denen PML-Protein überexpressiert wurde, konnte ein Virustiter von $3,1 \times 10^6$ PFU / ml gemessen werden. Dieser war mit dem in den Überständen der Zellen ohne PML-Expression nahezu identisch (3×10^6 PFU / ml) (Abbildung 34B). Im Gegensatz zu den Literaturdaten bewirkte die PML-Überexpression in unseren Zelllinien allerdings keine Reduktion des VSV-Titers.

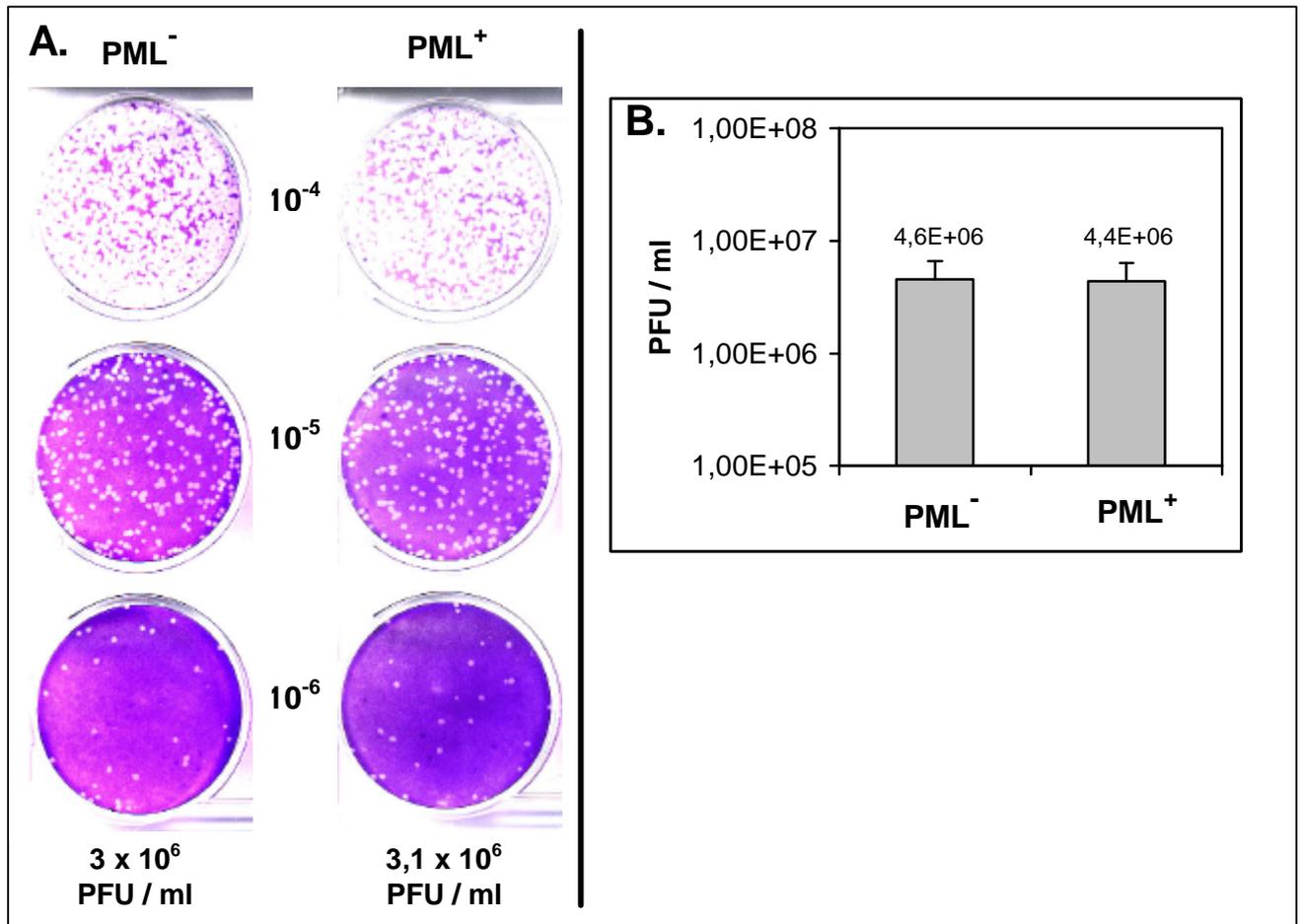


Abbildung 34: Einfluß der PML-Überexpression auf die VSV-Replikation.

A. Beispiel für einen VSV Plaque-Assay auf Vero-Zellen. Es sind Zellkulturüberstände in Verdünnung von 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} von HtTA-PML⁺⁺-Zellen ohne (PML⁻) und mit PML-Überexpression (PML⁺) dargestellt. Der ermittelte Virustiter in der 10^{-5} - und 10^{-6} -Verdünnung ist in PFU pro ml angegeben.

B. Grafische Darstellung der Plaque-Assay Vermessung aus A., Mittelwerte aus Doppelbestimmung.

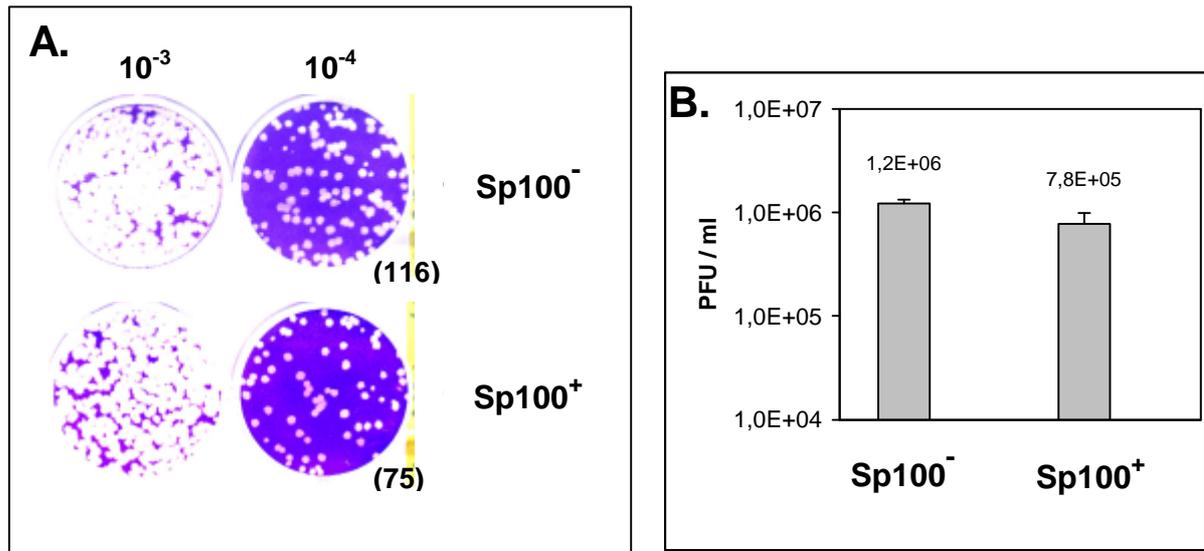


Abbildung 35: Einfluß der Sp100-Überexpression auf die VSV-Replikation.

- A.** Ausschnitt aus einem VSV Plaque-Assays. Zellkulturüberstände in der Verdünnung 10^{-3} und 10^{-4} von VSV-Kulturen, die in Sp100-überexprimierenden Zellen (Sp100⁺) und Kontrollzellen (Sp100⁻) replizierten. Die Ziffern (rechts) geben die Plaque-Anzahl pro Well an. Die Färbung erfolgte mit Kristallviolett.
- B.** Graphische Darstellung der Titervermessung aus A. Der durchschnittliche VSV-Titer von einem Dreifachansatz ist in PFU pro ml angegeben.

Entsprechend der zuvor dargestellten Versuche wurden Sp100-überexprimierende Zellen mit VSV infiziert und der resultierende Virustiter per Plaque-Assay quantifiziert (Abbildung 35A). Bei der Quantifizierung des VSV-Titers im Plaque-Assay konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen mit induzierter Sp100-Expression (Sp100⁺) und Kontrollzellen (Sp100⁻) detektiert werden (Abbildung 35B). Die Sp100-Überexpression hatte vergleichbar zu PML keinen negativen Einfluß auf die Virusreplikation von VSV-Stamm Indiana.

5.7.2 Einfluß der PML-Überexpression auf die Replikation von Arenaviren

Der Einfluß der PML-Überexpression sollte auch auf die LCMV-Replikation untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HtTA-PML⁺⁺-Zellen mit LCMV Armstrong mit einer MOI von 0,1; 0,01 bzw. 0,001 infiziert (Abbildung 36). Mit den unterschiedlichen MOIs wurde ein breites Spektrum in der Replikationskinetik abgedeckt.

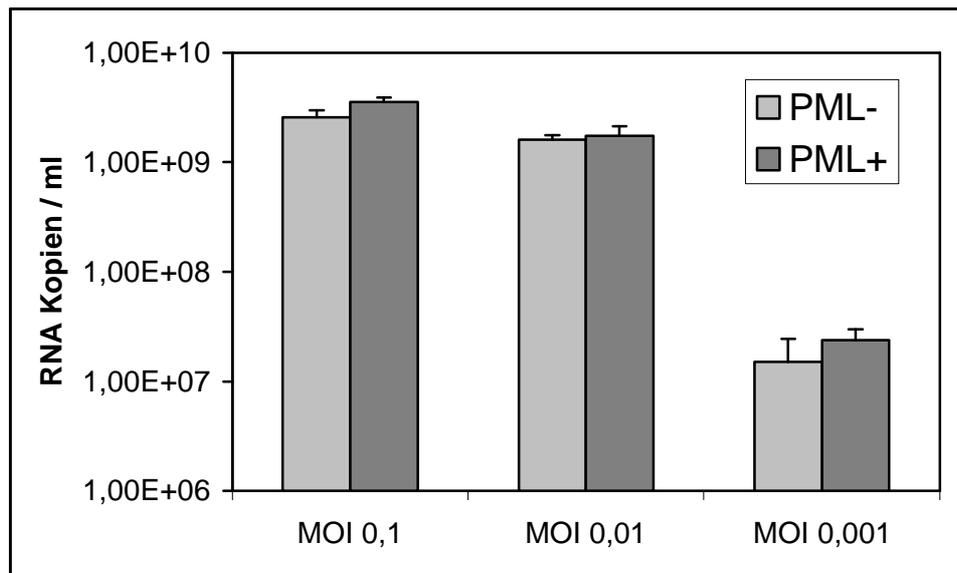


Abbildung 36: Einfluß der PML-Überexpression auf die Replikation von LCMV Armstrong.

Analyse der viralen S-RNA (LCMV Armstrong) im Zellkulturüberstand (48 h p.i.) von PML überexprimierenden HtTA-Zellen (PML⁺) und Kontrollzellen (PML⁻). Infektion der Zellen mit MOI 0,1; 0,01 bzw. 0,001.

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde die RNA-Konzentration in den Überständen der Kulturen bestimmt. Sie lag bei Infektionen mit einer MOI von 0,001 deutlich unter der der Infektionen mit MOI 0,1 und 0,01. Eine Hemmung der LCMV-Replikation war bei keiner der drei Infektionsdosen zu erkennen.

Außerdem wurden HtTA-PML⁺⁺ - Zellen direkt im Immunfocus-Assay mit LCMV Armstrong infiziert. Damit sollten mögliche Einflüsse des PML-Proteins während der initialen Infektionsphase untersucht werden. Vor der Infektion wurde die Überexpression des PMLs induziert (PML⁺). Nicht induzierte Zellen (PML⁻) dienten als Kontrolle. PML⁺ - und PML⁻ -Zellen wurden jeweils mit einem Aliquot einer Virusverdünnung infiziert und die Zellen anschließend mit Methylcellulose überschichtet. Infizierte Foci wurden 4 Tage später immunologisch nachgewiesen. In Abbildung 37 ist ein Ausschnitt des Immunfocus-Assays gezeigt und die Ergebnisse graphisch dargestellt.

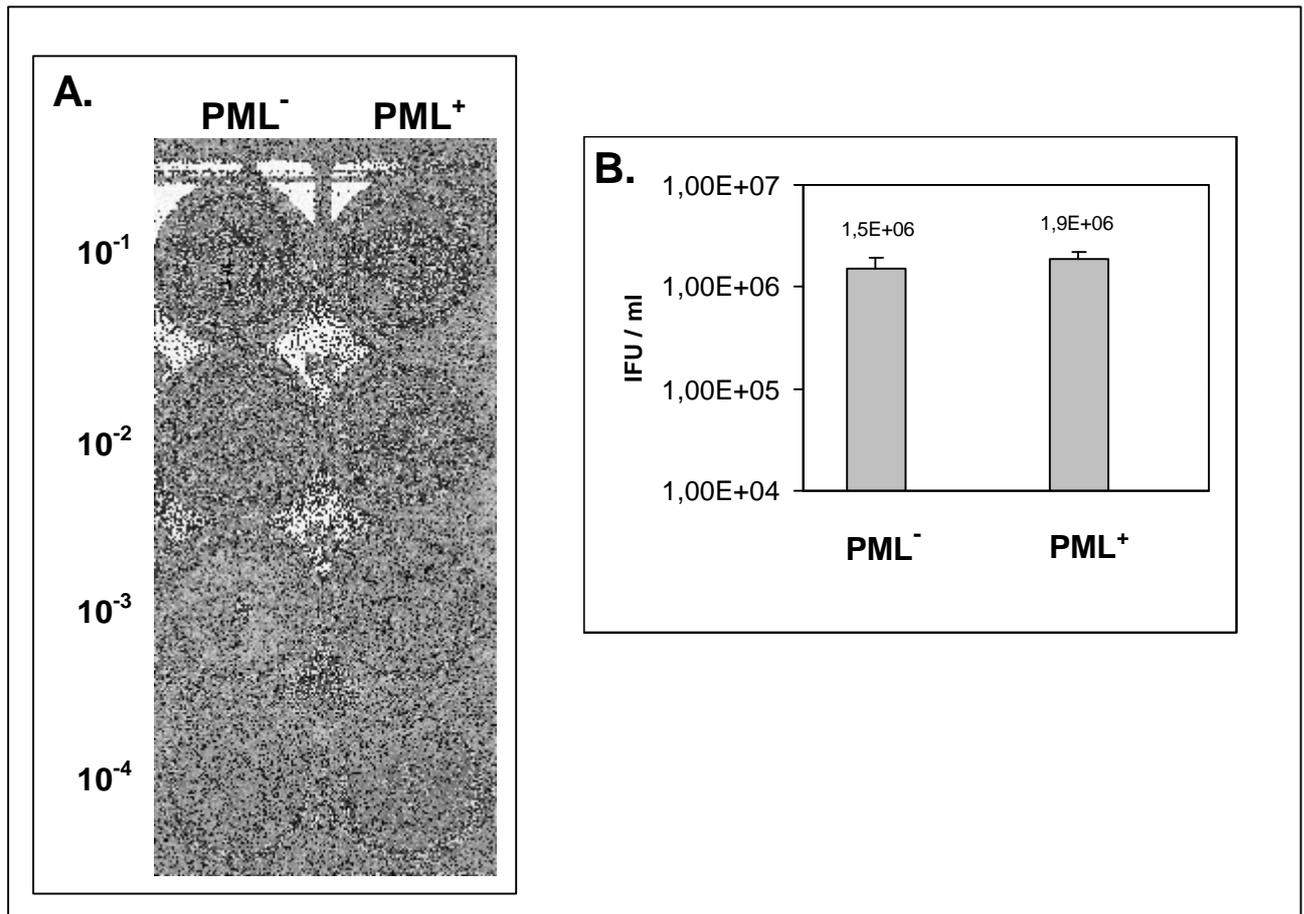


Abbildung 37: LCMV Armstrong Immunofocus-Assay auf HtTA-PML⁺⁺-Zellen.

A. Immunofocus-Assay auf HtTA-PML⁺⁺-Zellen. Die Virusverdünnungen sind links angegeben. PML⁻ = Kontrollzellen (HtTA), PML⁺ = PML-überexprimierende HtTA-Zellen.

B. Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Verdünnungsstufe 10⁻³ in A (Mittelwert von n = 3). Angabe des Virustiters in IFU / ml.

Im Immunofocus-Assay ergaben sich keine Unterschiede in der Anzahl und in der Morphologie der Foci zwischen PML-überexprimierenden und PML nicht-überexprimierenden HtTA-Zellen. Die Überexpression des PML hatte keinen antiviralen Einfluß auf die LCMV Armstrong Infektion.

Eine mögliche Interaktion von Arenaviren mit dem PML-Protein sollte auch mit Hilfe der indirekten Doppelimmunfluoreszenz untersucht werden. Hierzu wurden HtTA-PML⁺⁺-Zellen auf Objektträgern kultiviert und mit Lassa-Virus AV infiziert. In der indirekten Doppelimmunfluoreszenz wurde einerseits PML mit FITC-markierten und andererseits Lassa-Virus NP mit Rhodamin-markierten sekundären Antikörper nachgewiesen (Abbildung 38).

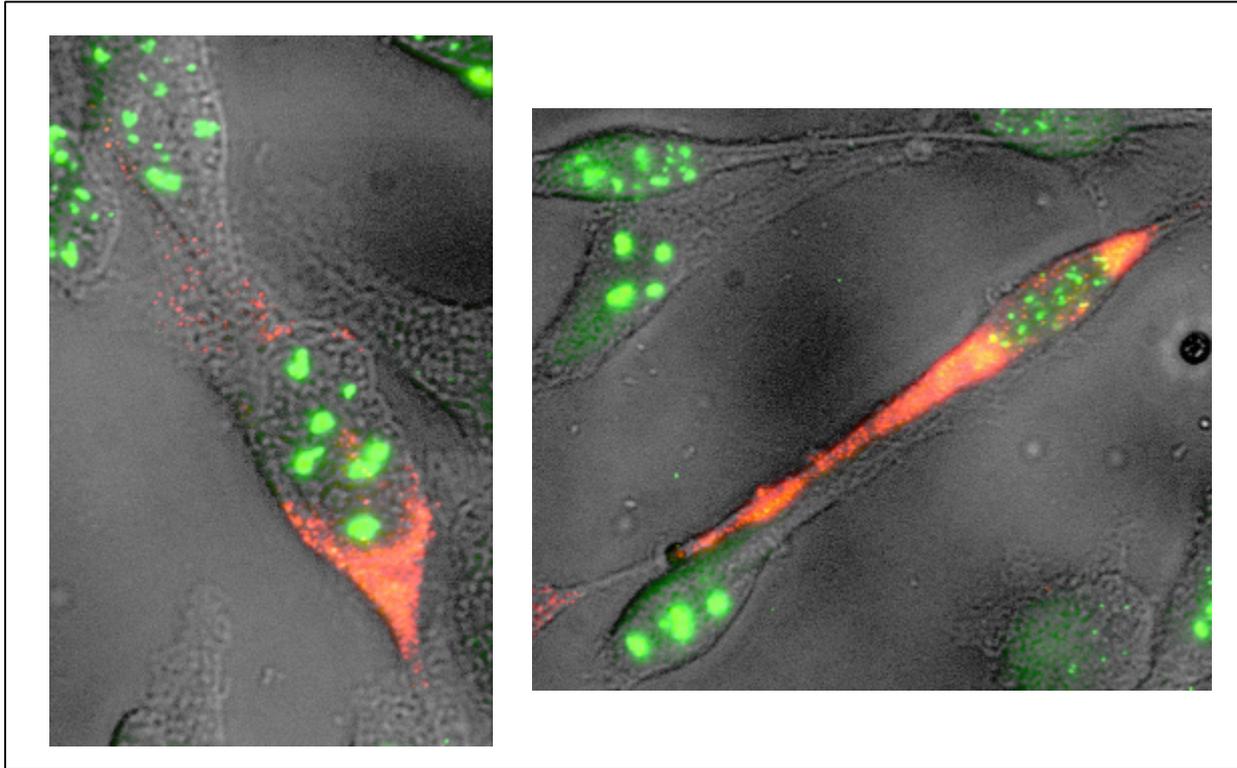


Abbildung 38: Doppelimmunfluoreszenzaufnahmen von Lassa-Virus AV infizierten HtTA-PML⁺⁺-Zellen.

In HtTA-PML⁺⁺-Zellen wurde die PML-Überexpression mit FITC markierten AK nachgewiesen. Die Infektion der Zellen erfolgte mit Lassa-Virus AV, ein Nachweis von Lassa-Virus NP wurde mit Rhodamin markierten AK durchgeführt.

Zellen, bei denen PML-Protein nicht überexprimiert wurde, zeigten eine geringe Grundfluoreszenz. Hierbei handelte es sich um das endogen von der Zelle exprimierte PML (nicht gezeigt). Die Lassa-Virusinfektion von HtTA-Zellen ohne PML-Überexpression verursachte keine stärkere Expression des natürlichen zellulären PMLs. Nach Überexpression des Proteins aggregierte es in großen *dots* im Zellkern (Abbildung 38). Nach Infektion mit Lassa-Virus war das NP ausschließlich im Zytoplasma nachzuweisen. Eine eindeutige räumliche Trennung zwischen Virus-NP und PML konnte beobachtet werden. Anzahl und Morphologie der PML-*dots* wurden nicht verändert. Die Daten zeigen auf Einzelzellebene, daß die Überexpression von PML eine Replikation von Lassa nicht verhindert.

5.7.3 Einfluß der Sp100-Überexpression auf die Replikation von Arenaviren

Vergleichbar zu PML wurde der Einfluß der Sp100-Überexpression auf die Replikation von Lassa-Virus AV und NL sowie von LCMV Armstrong untersucht.

Sp100^{+/-}-Zellen (HtTA) wurden mit einer MOI von 0,1 infiziert und Zellkulturüberstände in einer Zeitreihe von 24 h bis 96 h p.i. entnommen. In Abbildung 39 ist die mit Hilfe der RT-PCR ermittelte RNA-Kopienzahl pro ml Zellkulturüberstand dargestellt. Bei Lassa-Virus AV und NL

waren vergleichbare Steigerungen der S-RNA-Konzentration zwischen der 24. und 96. Stunde p.i. um rund 3,1 Log₁₀ (Sp100⁻) bzw. 3,3 Log₁₀ (Sp100⁺) zu beobachten (Abbildung 39A,B).

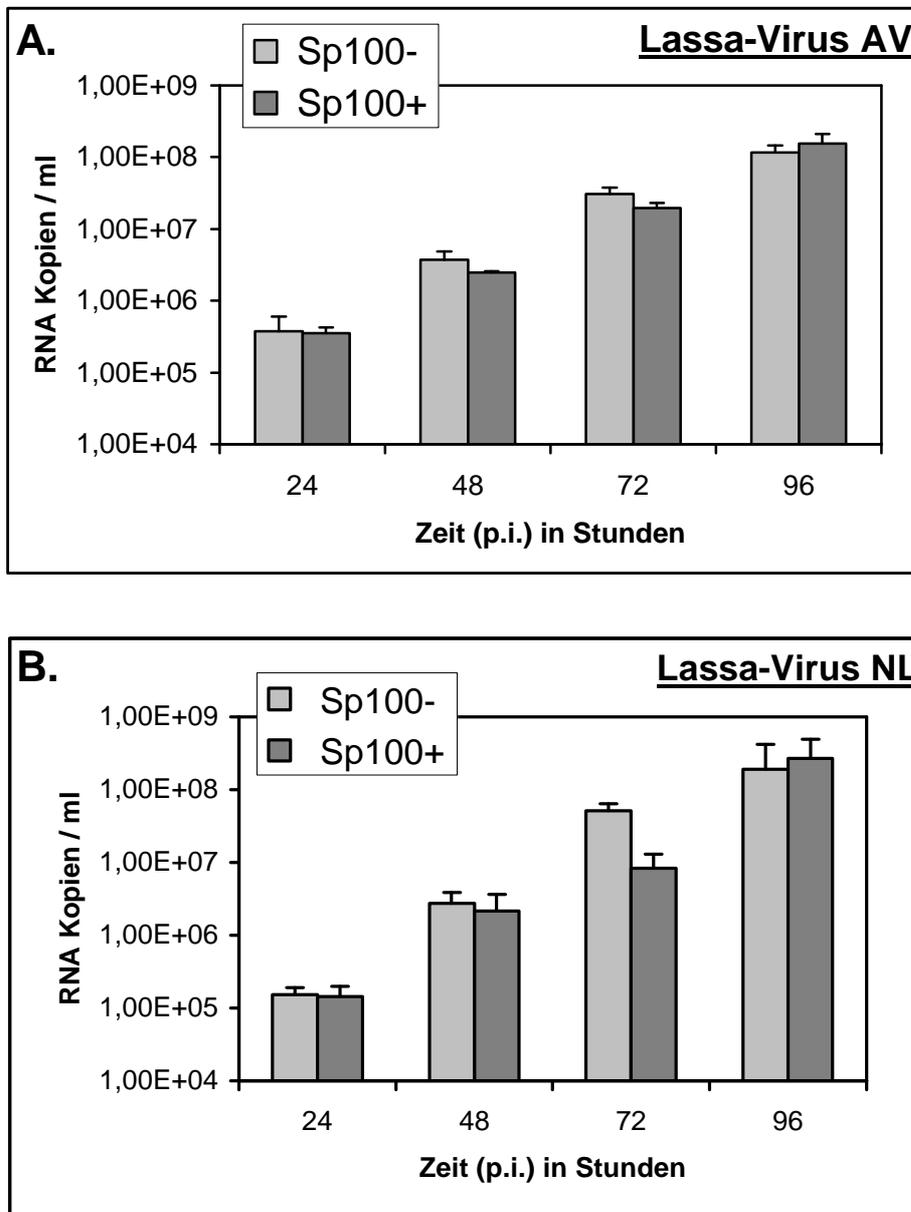


Abbildung 39: Einfluß der Sp100-Überexpression auf Lassa-Virus AV und NL.

Quantifizierung der Lassa-Virus S-RNA aus Zellkulturüberständen von Sp100^{+/-}-Zellen (HtTA). Mittelwerte aus Dreifachansatz.

Auch die Replikationskinetiken von Lassa-Virus AV und NL waren über den gesamten Inkubationszeitraum in Zellen mit und ohne Sp100-Überexpression nahezu identisch (Abbildung 39A,B). Die Sp100-Überexpression hatte also keinen feststellbaren Einfluß auf den Titer von Lassa-Virus AV und NL.

Als nächstes wurde untersucht, ob Sp100 eventuell einen Einfluß auf die LCMV-Replikation hat und ob ein Effekt von der Infektionsdosis abhängt.

Replikationskinetiken von LCMV Armstrong in infizierten Sp100^{+/+}-Zellen (HtTA; MOI 0,1; 0,01 bzw. 0,001) sind in Abbildung 40 dargestellt. Es wurden jeweils Zeitpunkte 0, 24, 48 und 72 Stunden p.i. analysiert. Deutlich erkennbar war bei allen MOIs die Detektion des viralen Inokulums zum Zeitpunkt null, also direkt nach der Infektion. Oberhalb dieser Nullwerte liegende RNA-Konzentrationen resultierten von der Virusreplikation.

Bei allen Infektionsdosen wurde das Maximum des Virustiters nach 48 Stunden erreicht. Unabhängig von der MOI waren zwischen Sp100-überexprimierenden HtTA-Zellen und Kontrollzellen keine nennenswerten Unterschiede in der Replikationskinetik zu erkennen.

Zusammenfassend lassen die Daten mit den HtTA-PML^{+/+}- und HtTA-Sp100^{+/+}-Zellen den Schluß zu, daß die Überexpression beider Proteine in den verwendeten Zellen keinen antiviralen Effekt gegen Lassa-Virus und LCMV haben.

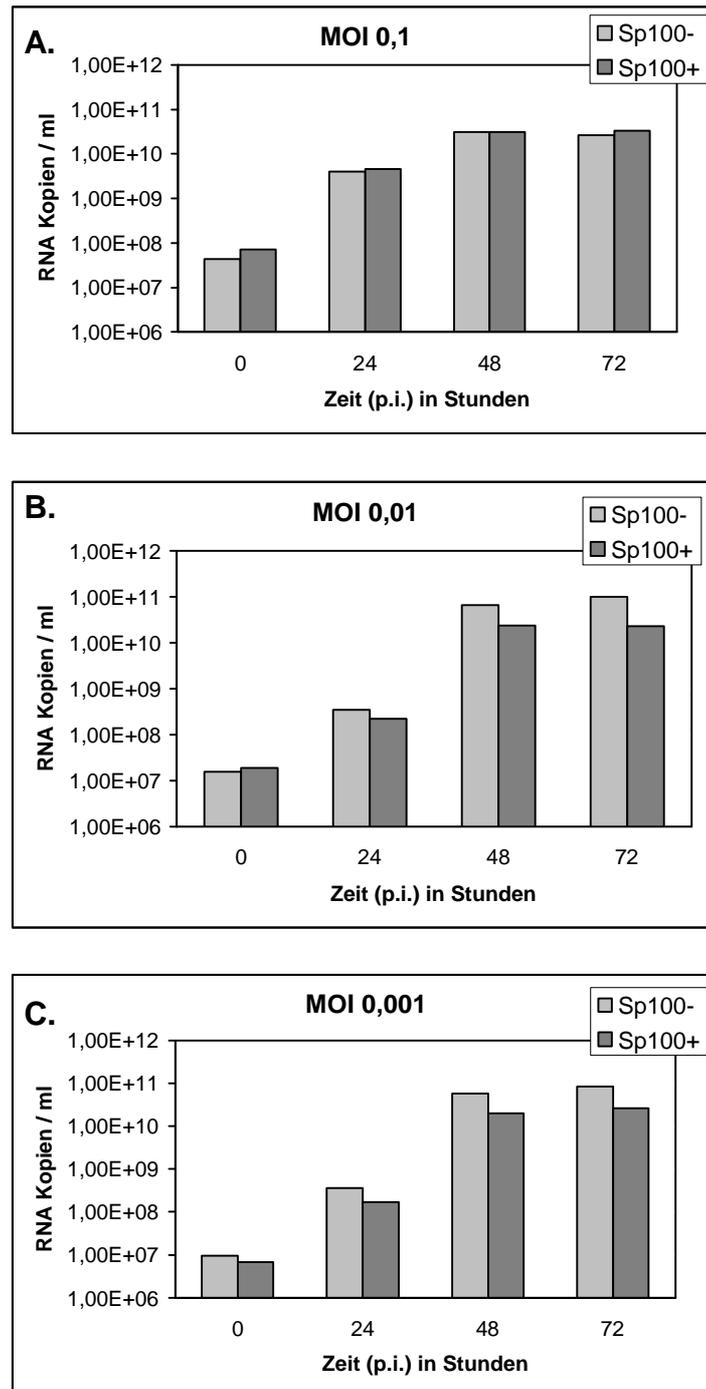


Abbildung 40: Einfluß der Sp100-Überexpression auf die Replikation von LCMV.

LCMV Armstrong Infektion von Sp100^{+/-} -Zellen (HtTA) mit einer MOI von (A.) 0,1; (B.) 0,01 bzw. (C.) 0,001. RNA-Quantifizierung per RT-PCR der Zeitpunkte 0, 24, 48 und 72 h p.i., Zeitreihe aus Einzelansätzen.

6. Diskussion

6.1 Isolierung und charakterisierung neuer LCMV- und Lassa-Virusstämme

LCMV-CH Primärisolation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der erste Callitrichid-Hepatitis-Ausbruch außerhalb der USA beschrieben. Der Tod von vier Callitrichiden in einem deutschen Zoo (Dortmund) wurde durch eng verwandte LCMV-Stämme verursacht. Die Infektion war durch charakteristische histopatologische Befunde gekennzeichnet. Zwei neue LCMV-Stämme wurden in der Zellkultur isoliert und deren komplette S-RNA Sequenz bestimmt. Diese Stämme unterscheiden sich eindeutig von allen bisher bekannten LCMV-Stämmen, auch von dem einzigen bisher bekannten CH-assoziierten Stamm. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von LCMV als Krankheitserreger und zeigen, daß die CH von verschiedenen LCMV-Stämmen verursacht werden kann.

Obwohl - oder gerade weil - LCMV seit mehr als 60 Jahren bekannt ist, wird sein pathogenes Potential oftmals unterschätzt. Dies wird durch mehrere Veröffentlichungen gestützt, die zeigen, daß im Uterus übertragene LCMV-Infektionen beim Menschen häufiger sind, als bisher angenommen (BARTON *et al.*, 1995; WRIGHT *et al.*, 1997; BARTON und METS, 1999; ENDERS *et al.*, 1999; BARTON und HYNDMAN, 2000; METS *et al.*, 2000). Vermutlich bleiben viele Infektionen aufgrund fehlender virologischer Untersuchungen unerkannt.

Die CH der Affen ähnelt sehr dem Lassa-Fieber des Menschen (MONTALI *et al.*, 1995). Auch beim Menschen konnten in seltenen Fällen atypische LCMV-Infektionen beobachtet werden (SMADEL *et al.*, 1942). Aus diesem Grund sollten bei Patienten mit schwerer fieberhafter Erkrankung oder mit einer Hepatitis, deren Ursprung nicht geklärt ist, LCMV-Infektionen als Diagnose in Betracht gezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere Aspekte des CH-Ausbruchs beschrieben werden:

1. der zeitliche Verlauf des Ausbruchs, charakterisiert durch mehrere Übertragungen innerhalb von 10 Monaten;
2. das räumliche Vorkommen der Infektionen aufgrund des genau definierten Ortes der Übertragung;
3. die Isolierung der verursachenden LCMV-Stämme und
4. der Nachweis des LCMV-Stammes im natürlichen Wirt.

Nur wenige derartige Informationen sind über Ausbrüche hämorrhagischer Fieber beim Menschen, die vom Lassa-, Junin- oder Guanarito-Virus verursacht werden, bekannt. Die Daten

aus dem CH-Ausbruch ermöglichen einige Rückschlüsse auf die Infektionen beim Menschen. Ein etwas überraschendes Ergebnis ist die große Homologie zwischen den am Ausbruch beteiligten LCMV-Stämmen, inklusive dem aus der Maus. Dies verdeutlicht, daß eine regionale Mauspopulation mit einem relativ stabilen Viruspool von nahezu identischen LCMV-Stämmen infiziert ist und nicht durch genetisch differente Stämme. Diese Situation läßt sich auf das Lassa-Virus und seinem Wirt - *Mastomys natalensis* - übertragen. Innerhalb West-Afrikas ist Lassa-Virus außerordentlich variabel. Die Isolation eines identischen Lassa-Virusstammes (Sequenzvergleich von 500 bp) aus zwei *Mastomys*, die in der gleichen Gegend von Sierra Leone gefangen wurden (BOWEN *et al.*, 2000) läßt aber vermuten, daß ebenfalls bei Lassa-Viren regional sehr ähnliche oder identische Stämme zirkulieren. Ein weiterer Hinweis für die räumliche und zeitliche genetische Stabilität der Arenaviren kommt von phylogenetischen Untersuchungen an Lassa- und Junin-Viren. Diese Viren zeigen ein geographisches, jedoch keine zeitliches Muster in der Phylogenese (BOWEN *et al.*, 2000; GARCIA *et al.*, 2000), d.h. verschiedene Virusstämme sind geographisch verteilt und diese Verteilung ändert sich im zeitlichen Verlauf wenig. Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit dargestellten und bereits veröffentlichten Daten, daß stark homologe Arenavirus-Stämme an einem Ort zirkulieren und dort über einen langen Zeitraum hinweg übertragen werden können.

Es ist denkbar, daß nur wenige LCMV-Stämme eine CH verursachen können. Eindeutige Unterschiede in der Pathogenität konnten zwischen LCMV-Stämmen in Meerschweinchen (DUTKO und OLDSTONE, 1983) und in *Cynomolgus*-Afften (PETER *et al.*, 1987) sowie zwischen verschiedenen Lassa-Virusstämmen in Meerschweinchen (JAHRLING *et al.*, 1985) gezeigt werden. Bisher sind allerdings keine Marker bekannt, woran man Stämme unterschiedlicher Virulenz unterscheiden könnte. In einer phylogenetischen Studie mit Junin-Virus konnte ebenfalls keine Gruppierung von Stämmen, die mit hämorrhagischem Fieber assoziiert sind, beobachtet werden. Auch charakteristische Austauschungen im GPC konnten nicht identifiziert werden (GARCIA *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnten im Vergleich zu bekannten LCMV-Stämmen nur wenige CH-spezifische Aminosäureaustausche identifiziert werden. Auch besitzen die CH-assoziierten Stämme keinen spezifischen phylogenetischen Ursprung innerhalb des LCMV-Taxons. Andererseits muß bedacht werden, daß nur ein Teil des Genoms untersucht wurde, und daß die Virulenz der bisher bekannten LCMV-Stämme in Callitrichiden unbekannt ist. Dennoch weisen die Daten darauf hin, daß die Virulenz eines Stammes durch eine Vielzahl an Mutationen verursacht wird, unabhängig von seinem phylogenetischen Hintergrund.

LCMV-Isolate haben gewöhnlicherweise Leucin an Position 260 des GPC; die zwei CH-assoziierten Stämme und der Stamm aus der gefangenen Maus weisen an dieser Position hingegen ein Isoleucin auf. Die biologische Äquivalenz von Leucin und Isoleucin konnte in einem Mausmodell gezeigt werden (SEVILLA *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu Gehirn-adaptierten

Stämmen mit Phenylalanin an der Position 260, weisen Isolate mit Leucin oder Isoleucin eine hohe Rezeptorbindungs-Affinität auf, haben einen Tropismus für dendritische Zellen und verursachen eine Immunsuppression des Wirtes, so daß eine persistierende Infektion des Wirtes möglich ist (SEVILLA *et al.*, 2000). Der Leucin zu Isoleucin Austausch hatte offensichtlich keinen Einfluß auf die persistierend infizierte Maus, möglicherweise hat der Austausch aber einen Effekt nach einer Übertragung des Virus auf eine andere Spezies.

Zusammen mit den beiden in dieser Arbeit beschriebenen CH-assoziierten Stämmen sind jetzt vier vollständige S-RNA Sequenzen von LCMV bekannt. Diese ermöglichen Rückschlüsse auf die genetische Diversität in codierenden und nichtcodierenden Bereichen der LCMV S-RNA. Außerdem ist ein Vergleich mit Lassa-Virus möglich. Wie für das Lassa-Virus gezeigt wurde (BOWEN *et al.*, 2000; GÜNTHER *et al.*, 2000), liegt die *stem-loop* Struktur auch bei der LCMV-RNA innerhalb der *intergenic region* komplett konserviert vor. Dies weist darauf hin, daß diese Strukturen wichtige viruspezifische Funktionen besitzen. Unterschiede in diesen Sequenzabschnitten könnten daher neben phylogenetischen Distanzmessungen als Kriterium gelten, um Virus-Spezies innerhalb des Genus Arenavirus zu diskriminieren. Wie auch bei den Lassa-Viren (BOWEN *et al.*, 2000; GÜNTHER *et al.*, 2000) liegen die am stärksten variablen Sequenzbereiche innerhalb der 5' und 3' nicht-codierenden Regionen. Die Diversität im GPC ist bei LCMV etwas geringer als beim Lassa-Virus (Nukleotidsequenz: 16,1 *versus* 21,0%; Aminosäure Sequenz: 6,4 *versus* 6,6%), während LCMV im NP eine eindeutig geringere Diversität als Lassa-Virus besitzt (Nukleotidsequenz: 15,1 *versus* 23,3; Aminosäure Sequenz: 4,3 *versus* 10,2%) [Ref. für Lassa-Virus Daten (BOWEN *et al.*, 2000)]. Zusammenfassend wird deutlich, daß die Lokalisation von variablen und konservierten Bereichen in der S-RNA bei Lassa-Virus und LCMV identisch ist, obwohl die Variabilität innerhalb der Lassa-Virusstämme höher ist. Im Gegensatz zum Lassa-Virus, welches sich evolutionär von Ost nach West ausgebreitet hat (BOWEN *et al.*, 2000), gibt es in den phylogenetischen Analysen bei LCMV kein eindeutiges geographisches Muster innerhalb des LCMV-Taxons. Die ursprünglichen LCMV-Stämme scheinen eng verwandt gewesen zu sein, so daß Verwandtschaften innerhalb des LCMV-Taxons durch das Phylogeneseprogramm nicht eindeutig aufgelöst werden konnten. Mit zusätzlichen Sequenzinformationen wäre dies eventuell möglich.

Lassa-Virus Primärisolation

In dem Zeitraum, in dem diese Arbeit angefertigt wurde, konnten am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin drei Lassa-Virus-Infektionen diagnostiziert werden (Fall AV Januar 2000 (GÜNTHER *et al.*, 2000), Fall CSF März 2000 (GÜNTHER *et al.*, 2001) und Fall NL Juli 2000 (SCHMITZ *et al.*, 2001). Anhand entsprechender Patientenproben wurden Virusisolationen durchgeführt, die als Ausgangsmaterial für die weiteren Versuche dienten. Das besondere an diesen Isolaten ist ihre geringe Zahl von Zellkulturpassagen (Isolate direkt aus

Primärmaterialien) sowie die dazugehörigen, detaillierten Informationen über das Krankheitsbild beim Menschen. Erstmals gelang die Isolation eines Lassa-Virusstammes eindeutig aus Liquor. Während der Abnahme von Liquor bei Lassa-Fieber Patienten besteht üblicherweise die Gefahr der Kontamination mit Blut und somit eine Virusübertragung vom Blut in den Liquor. In diesem bisher einmaligen Fall konnte das Lassa-Virus ausschließlich im Liquor, nicht aber im Serum nachgewiesen werden. Somit handelt es sich bei dem Lassa-Virusstamm CSF um ein eindeutig Hirn-adaptiertes Isolat. Phylogenetische Charakterisierungen zeigen eine enge Verwandtschaft mit einem beschriebenen Isolat aus Jos / Nigeria, was mit dem Ursprung des CSF-Isolates übereinstimmt (GÜNTHER *et al.*, 2001).

Bei der Primärisolation der drei Lassa-Virusstämme konnte ein unterschiedliches Replikationsverhalten beobachtet werden. Bei dem mit einer Hämorrhagie assoziierten Stamm AV wurde innerhalb von vier Tagen ein hoher Virustiter erreicht. Im Gegensatz dazu replizierte der Stamm CSF aus dem Liquor nur sehr langsam. Erst nach einer dreimal längeren Zellkultur-Passagierung wurden vergleichbare Virustiter erreicht. Eventuell war der Stamm an ZNS-Zellen adaptiert und vermehrte sich aus diesem Grund nicht gut in Vero-Zellen (Nierenzellen). Auch war der Titer im Liquor geringer, als im Serum von Patient AV und NL (GÜNTHER *et al.*, 2001; SCHMITZ *et al.*, 2001).

Auch bei weiterer Passage replizierte der Virusstamm CSF langsamer als die anderen Stämme. Dies führte auch dazu, daß dieser Stamm im Immunfocus-Assay kleinere und schwächer angefärbte Foci bildete. Eine schwächere Färbung weist auf eine verhältnismäßig niedrige NP-Konzentration hin. Allerdings konnten in der indirekten Immunfluoreszenz mit dem gleichen Antikörper keine Intensitätsunterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden.

Das Isolat vom Patienten NL wies im Serum, welches kurz vor dem Tod entnommen wurde, einen Titer von rund 10^6 RNA-Molekülen pro ml auf (SCHMITZ *et al.*, 2001). Die Primärinfektion aller Zellen mit diesem Serum dauerte im Vergleich zum Stamm AV doppelt so lange, bevor ein vergleichbarer Virustiter erreicht wurde. Die initiale Kultivierung des Stammes NL auf Vero-Zellen verursachte schließlich einen cytopathischen Effekt, der bei keinem der anderen Lassa-Virusstämme beobachtet werden konnte. Die CPE auslösende Eigenschaft des NL Stammes war bereits in der 2. Passage nicht mehr zu beobachten, was für eine schnelle Adaptation des Virus an die Zelllinie spricht. Ein nur über wenige Zellkulturpassagen anhaltender cytopathischer Effekt wurde bereits in der Erstbeschreibung des Lassa-Virus veröffentlicht (FRAME *et al.*, 1970) und diente zur Quantifizierung und Charakterisierung des noch unbekanntes Virus.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen vom Lassa-Virusstamm AV zeigten die Virusfreisetzung durch Abschnürungen (*Budding*) von der Zellmembran in den extrazellulären Raum. Diese Freisetzung erreichte kein zellschädigendes Ausmaß, da es sich bei Lassa-Virus AV, wie erwähnt, um einen nicht-cytopathischen Stamm handelt. Intrazellulär waren keine Viruspartikel

zu erkennen (SCHMETZ, persönliche Mitteilung). Auffällig waren amorphe, elektronendichte Bereiche, bei denen es sich vermutlich um Synthese- bzw. Akkumulationsorte des Nukleoproteins handelte. Vermutlich binden NP-spezifische Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz an diese Bereiche und führen zu dem Lassa-Virus- bzw. LCMV-spezifischen punktförmigen Fluoreszenzmuster.

Quantifizierungsverfahren / Viruskinetiken

Weil wie bei den Lassa-Virusstämmen und auch bei LCMV kein CPE beobachtet werden konnte - nur der Stamm WE verursachte einen geringen CPE im Plaque-Assay - mußte eine Quantifizierungsmethode etabliert werden, die den infektiösen Titer nicht-cytopathogener Viren bestimmen kann. Mit Hilfe eines für LCMV beschriebenen Immunfocus-Assays (BATTEGAY *et al.*, 1991; BATTEGAY 1993) konnte nach Modifikation eine Titerbestimmung auch für alle drei Lassa-Virusstämmen vorgenommen werden. Dabei war es wichtig, daß die Durchführung auch unter den erschwerten Bedingungen eines Labors der Sicherheitsstufe 4 möglich war. Im Immunfocus-Assay waren Unterschiede zwischen den gut replizierenden Stämmen (AV, NL, Arm und WE) und den langsamer replizierenden Stämmen (CSF und CH-5692) sichtbar. Eine schnellere Virusreplikation ermöglichte im Assay eine schnelle Zell-zu-Zell Infektion und somit eine weite Foci-Ausbreitung. Die Foci der gut replizierenden Stämme sind darüberhinaus stärker angefärbt, da durch einen größeren Anteil an viralem NP mehr Antikörper binden können und dadurch eine gesteigerte enzymatische Detektion möglich ist. Neben der Quantifizierungsmöglichkeit nicht-cytopathogener Viren hat der Immunfocus-Assay aufgrund der Verwendung virusspezifischer Antikörper eine viel höhere Spezifität bei der Detektion, als der Plaque-Assay (BATTEGAY *et al.*, 1991; BATTEGAY 1993). Gerade im Hinblick auf diagnostische Titerbestimmungen in Primärmaterialien ist die Spezifität des Assays sehr wichtig.

Die quantitative Grenze zum Nachweis infektiöser Partikel im 24-Well Plattenformat des Immunfocus-Assays liegt bei rund 20 bis 50 IFU pro ml (2 bis 5 Foci / Well). Aufgrund der statistischen Verteilung kann der genaue Virustiter in diesem Bereich mit einer geringen Zahl von Foci nicht zuverlässig quantifiziert werden. Zwischen 20 und 300 Foci sollten pro Well zu erkennen sein. Als quantitative Nachweisgrenze des IFA im 24-Well Plattenformat sollten in der 1:10 Verdünnung als niedrigste Verdünnungsstufe mindestens 20 Foci zählbar sein. Dies entspricht einem Titer von 2×10^3 IFU pro ml. Mit weniger Foci würde unserer Erfahrung nach ein zu niedriger Virustiter ermittelt. Sind mehr als 300 Foci pro Well zu erkennen, so ist deren zuverlässiges Auszählen nicht mehr möglich.

Ein großer Nachteil des Immunfocus- aber auch des Plaque-Assays ist die erhebliche Dauer des Versuches. Erst nach rund 5 Tagen kann eine Auswertung stattfinden. Dabei können pro

Person und Woche unter Beachtung der Arbeitssituation eines Hochsicherheitslabores maximal 72 Proben quantifiziert werden. Aus diesem Grund wurde hier eine schnellere Quantifizierungsmethode, die LCMV und Lassa-Virus LightCycler RT-PCR, etabliert. Mit Hilfe der RT-PCR ist der Probanddurchsatz rund dreimal höher und eine Ergebnisauswertung ist innerhalb weniger Stunden möglich. Die üblicherweise in der *real-time*-Detektion eingesetzten fluoreszenzmarkierten Sonden sind für spezifische Lassa-Virus- bzw. LCMV-PCRs aufgrund hoher Variabilität ungeeignet. Deshalb wurde mit Lassa-Virus- (DEMBY *et al.*, 1994) und LCMV-spezifischen Primern (ASPER *et al.*, 2001) eine *one-step* RT-PCR auf Basis von SybrGreen etabliert. *Real-time* RT-PCRs sind schneller als normale RT-PCRs, da keine separate Detektion mit der Agarosegelelektrophorese notwendig ist (DROSTEN *et al.*, 2002). Darüberhinaus kann in der *real-time*-Detektion eine Virusstamm-spezifische Diskriminierung und eine Quantifizierung des Ausgangsmaterials erfolgen. Es konnte gezeigt werden, daß die LCMV- und Lassa-Virusstämme in der Schmelzkurvenanalyse im LightCycler einen stammspezifischen und überwiegend gut zu differenzierenden Schmelzpunkt besitzen. Dadurch ist die Aufklärung einer versehentlichen Kontamination möglich, was gerade im Hinblick auf den diagnostischen Einsatz der PCRs hilfreich ist.

Es besteht eine Virusspezies- und Stamm-spezifische als auch Zelltyp-spezifische Korrelation zwischen der in der RT-PCR quantifizierten RNA-Konzentration und den im Immunfocus-Assay ermittelten infektiösen Einheiten. Es konnte auch gezeigt werden, daß *post Infectionem* im zeitlichen Verlauf eine Tendenz zur RNA-Konzentrationszunahme pro infektiöser Einheit besteht. Eine mögliche Erklärung wäre, daß in der stationären Phase der Infektion weniger neue virale Partikel freigesetzt werden, gleichzeitig aber viele Partikel ihre Infektiosität verlieren. Die RNA der nicht mehr infektiösen Viruspartikel wird vermutlich geschützt in RNP-Partikeln vorliegen und kann nachgewiesen werden, d.h. die Inaktivierung der RNA dauert länger als die Abnahme der Infektiosität. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Verhältnisänderung zwischen RNA-Konzentration und infektiösen Partikeln wäre eine Erhöhung der Anzahl an RNA-Genomen pro Partikel in der späten Infektionsphase. Es konnte früher gezeigt werden, daß pro Viruspartikel mehr als ein S-RNA-Genom vorliegt (MEYER *et al.*, 2002). Möglicherweise ist die RNA-Synthese in der späten Infektionsphase höher als die Synthese viraler Proteine. Pro Virion würde so eine zunehmende Anzahl an RNA-Molekülen verpackt. Des Weiteren könnte das Auftreten sogenannter *defective interfering particles* (DIP) das Verhältnis aus RNA-Molekülen pro infektiöser Einheit verändern. DIPs haben einen Replikationsdefekt und interferieren spezifisch mit der Replikation infektiöser Viren. Sie können für eine persistierende Infektion, für den zyklischen Titerverlauf einer Infektion oder für den Abbruch einer produktiven Infektion verantwortlich sein. DIPs entstehen z.B. vermehrt während der Virus-Passagierung bei hoher MOI (BANGHAM und KIRKWOOD, 1990; KIRKWOOD und BANGHAM, 1994). Die Morphologie und Zusammensetzung der DIPs von Arenaviren ist weitestgehend unbekannt. Die RNA dieser

nicht-infektiösen Partikel würde vermutlich ebenfalls in der RT-PCR quantifiziert und zu einem hohen RNA-Titer, nicht aber zu einem hohen Infektionstiter führen.

Ein unterschiedliches Replikationsverhalten der Virusstämme, wie bei der Primärisolation, konnte auch bei den Untersuchungen zur Replikationskinetik beobachtet werden. Speziell der Lassa-Virusstamm CSF replizierte auf verschiedenen Zelllinien im Vergleich zu den Primärisolaten AV und NL langsamer.

Für die produktive Lassa-Virusinfektion bedurfte es nur eines geringen Infektionstiters. Die Infektion jeder 10.000sten Zelle ($\text{MOI } 10^{-4}$) war für eine produktive Infektion ausreichend. Übertragen auf das Virus-Wirt-Verhältnis in der Natur würde dies bedeuten, daß bereits sehr geringe Infektionsdosen zu einer erfolgreichen Infektion führen. Allerdings muß man davon ausgehen, daß der tatsächliche infektiöse Virustiter mindestens um den Faktor 10 höher liegt als der im Immunfocus-Assay quantifizierte Titer (PETERS *et al.*, 1996). Dies könnte erklären, warum Arenaviren auch über Aerosole von infizierten Nagetieren übertragen werden können.

Inaktivierungsstudien an Arenaviren

Die durchgeführten Inaktivierungsstudien verdeutlichten die große Stabilität der Arenaviren. Fünfmal hintereinander durchgeführtes Einfrieren und Auftauen der virushaltigen Zellkulturüberstände bewirkte keine Reduktion des infektiösen Virustiters. Auch die LCMV-CH Stämme waren in den schlecht gelagerten Autopsiematerialien der Affen so stabil, daß eine Isolierung noch möglich war. Wird das Virus durch den natürlichen Wirt in der Umwelt verbreitet, so muß man davon ausgehen, daß es dort über einen längeren Zeitraum infektiös bleibt.

In Aerosolen besitzt Lassa-Virusstamm Josiah bei 24 bis 32°C eine biologische Halbwertszeit von rund 10 bis 55 min. (STEPHENSON *et al.*, 1984). Diese Zeit wäre für eine Aerosolübertragung des Virus über beträchtliche Distanzen ausreichend. Würde ein Virustiter von 10^6 PFU/ml ausgeschieden, wäre der Titer nach 6 Stunden immer noch rund $1,5 \times 10^4$ PFU/ml. Weil die mittlere Infektionsdosis ID₅₀ von Lassa-Virusstamm Josiah auf Meerschweinchen bei rund 15 PFU liegt (STEPHENSON *et al.*, 1984), könnte in Meerschweinchen bereits ein Volumen von 1 µl ($1,5 \times 10^4$ PFU/ml) eine Infektion verursachen. Beim Menschen wird die Infektionsdosis wohl vergleichbar mit Affen sein, die durch inhalierte 465 PFU Lassa-Virus infiziert werden konnten (STEPHENSON *et al.*, 1984). Im Hinblick auf Nagetiere als Wirte der Arenaviren ist die Stabilität in der Umwelt für den Menschen von Nachteil. Nagetiere und Menschen teilen sich zu unterschiedlichen Zeiten den gleichen Lebensraum. Im Gegensatz zum Menschen sind Nagetiere meistens nachts aktiv. Stabile Viruspartikel, die nachts ausgebracht werden, wären am nächsten Tag noch infektiös, wenn der Mensch mit ihnen in Berührung kommt.

Gegenüber hohen Temperaturen ist das Lassa-Virus relativ sensitiv. Bereits nach einer 20 minütigen Inkubation bei 60°C waren keine infektiösen Partikel mehr nachzuweisen. Aus diesem Grund werden 60°C über 60 min. als sichere Lassa-Virus Inaktivierungsbedingungen empfohlen. Gleiche Bedingungen wurden auch von MITCHELL und MCCORMICK (1984) vorgeschlagen. Die thermische Inaktivierung stellt eine Alternative zur Inaktivierung durch Gamma-Bestrahlung dar. Ein Nachteil der thermischen Behandlung ist jedoch die Verfälschung wichtiger klinischer Parameter im Serum. Eine Untersuchung von Proben hinsichtlich der enzymatischen Aktivität von Proteinen im Serum (wie GOT oder GPT) bzw. Gerinnungsfaktoren wäre nicht mehr möglich (MITCHELL und MCCORMICK, 1984). Für die im Rahmen dieser Arbeit notwendigen Inaktivierungen stellt die thermische Behandlung die schnellste und am einfachsten durchzuführende Methode dar, ohne daß der RNA-Titer reduziert wird. Unter einfachsten Labor- und Klinikbedingungen, z.B. in Lassa-Endemiegebieten, ist die thermische Behandlung eine sichere Möglichkeit, infektiöses Material und Instrumente oder infektiöse Seren für serologische Untersuchungen zu inaktivieren.

6.2 Einfluß von Cytokinen

Ein antiviraler Einfluß von Cytokinen konnte bei verschiedenen Viren gezeigt werden (ISAACS und LINDENMANN, 1957; MESTAN *et al.*, 1988; MOSKOPHIDIS *et al.*, 1994; NAGANO und KOJIMA, 1958; NOVELLA *et al.*, 1996). Allerdings gibt es hinsichtlich eines antiviralen Einflusses bisher keine Daten zu Lassa-Viren. Demzufolge gibt es auch keinen Vergleich zwischen wenig pathogenen LCMV-Stämmen und hoch-pathogenen Lassa-Virusstämmen. Im Rahmen der Arbeit wurde daher an jeweils drei LCMV- und Lassa-Virusstämmen die antivirale Aktivität von Cytokinen untersucht. Dabei standen zwei unterschiedliche Zelllinien zur Verfügung, die für beide Viren permissiv waren.

Zu Beginn wurde der antiproliferative Einfluß der Cytokine auf die verwendeten Zelllinien untersucht. Auf HuH7-Zellen hatten die Cytokine keinen wachstumshemmenden Einfluß und einen geringen Effekt auf die schneller replizierenden Vero-Zellen. Ausschließlich die Zellzahl, nicht aber die Zellmorphologie wurde durch die Cytokine beeinflusst. Die Reduktion der Zellzahl lag bei höchstens 50%, was geringer ist als der \log_{10} -Effekt auf die Virusreplikation durch die Cytokine.

Cytokininduzierter antiviraler Effekt auf VSV

Vor der Infektion mit LCMV- und Lassa-Virus wurde untersucht, ob die verwendeten Cytokine generell antivirale Mechanismen in HuH7- und Vero-Zellen auslösen können. Als Modellvirus wurde das bekanntermaßen cytokin-suszeptible VSV eingesetzt (MESTAN *et al.*, 1988; NOVELLA *et al.*, 1996).

In HuH7- und Vero-Zellen hemmen sowohl IFN- α als auch IFN- γ die Produktion infektiöser VSV-Partikel, d.h. auf beiden Zelllinien konnte die antivirale Aktivität der Interferone nachgewiesen werden. In HuH7- und in Vero-Zellen hatte IFN- α im Vergleich zu IFN- γ einen wesentlich größeren hemmenden Einfluß. TNF- α besaß hingegen keine bzw. nur eine unwesentliche antivirale Aktivität, was auf die verwendeten Zellen zurückgeführt werden kann. In HEp-2-Zellen besaß TNF- α dagegen eine antivirale Aktivität gegenüber VSV (MESTAN *et al.*, 1988).

Die antivirale Aktivität auf VSV von IFN- α ist in HuH7-Zellen größer als in Vero-Zellen (rund $1,5 \log_{10}$). Dafür ist die Wirkung von IFN- γ auf beiden Zelllinien nahezu identisch. Ein möglicher Grund für eine geringere IFN- α Aktivität in Vero-Zellen liegt vermutlich an dem humanen Ursprung der Cytokine. Die Vero-Zelle ist eine Affenzelllinie, deren Interferon-Rezeptoren vermutlich ähnlich, jedoch nicht identisch mit humanen Rezeptoren sind. In HuH7-Zellen, einer humanen Zelllinie, werden die eingesetzten Interferone aufgrund des gleichen Ursprungsorganismus eine maximale antivirale Reaktion bewirken können.

Die charakteristische Eigenschaft von VSV einen CPE zu bilden, wurde mit einer Interferonkonzentration von 1000 U/ml völlig unterdrückt. Die beim Menschen sehr mild bzw. apathogen verlaufende Infektion könnte mit der hohen Suszeptibilität von VSV gegenüber geringen Interferon-Konzentrationen zusammenhängen. Auf KB-Zellen reichten Interferon-Konzentrationen in normalem Humanserum (20 U/ml) aus, um einen CPE zu verhindern (GHYKA und SAVI, 1987).

Im Gegensatz zu den Interferonen wirkte TNF- α nicht antiviral. Die Funktionalität der Reaktionswege wurde deshalb mit Hilfe eines über TNF- α indirekt induzierbaren Plasmids experimentell bestätigt. In HuH7-Zellen war eine deutliche Induktion des *Pathways* nachweisbar, in Vero-Zellen dagegen zeigte das verwendete Plasmid einen sehr hohen Luciferase-Expressionshintergrund. Eine deutliche Abgrenzung zwischen TNF- α induzierten und nicht-induzierten Zellen war nur eingeschränkt möglich (Faktor ca. 1,5). Ein hoher Expressionshintergrund der Luciferase war allerdings auch bei einem Kontrollvektor ohne NF κ B Promotor zu beobachten. Für eindeutigere Ergebnisse bezüglich einer TNF- α Induktion, müßte ein experimentelles System mit einer geringeren Hintergrundexpression verwendet werden. Zur Funktionalitätskontrolle der zellulären Reaktionswege ist das dargestellte System jedoch

ausreichend. TNF- α ist wegen der nachweislich induzierbaren Reaktionswege in HuH7- und Vero-Zellen eine fehlende antivirale Aktivität gegenüber VSV zuzuschreiben.

Einfluß von Cytokinen auf den Titer von Lassa- und LCM-Virusstämmen

Weil die größten antiviralen Effekte der Cytokine bei einer Konzentration von 1000 U / ml beobachtet werden konnten, wurde diese Konzentration für Untersuchungen an Lassa-Virus und LCMV eingesetzt. Zusätzlich wurde der Einfluß der Cytokine in Kombination untersucht. Wie bei VSV hatten Cytokine auch auf Lassa- und LCM-Virusstämmen eine antivirale Wirkung. Zwischen den drei Lassa-Virusstämmen bestanden geringe Unterschiede in der Suszeptibilität. Das Liquorisolat CSF und der Stamm NL waren etwas weniger sensitiv als der Stamm AV. Im Gegensatz dazu war das CSF-Isolat vollständig aus dem Serum des Patienten eliminiert worden und verursachte eine milde Symptomatik (GÜNTHER *et al.*, 2001), während der Interferon-suszeptible AV-Stamm massiv in der Patientin replizierte und tödliche hämorrhagische Manifestationen verursachte. Das heißt, innerhalb von Lassa-Virus scheint es eher einen umgekehrten Zusammenhang zwischen der klinischen Manifestation und der Interferon-Empfindlichkeit des Stammes zu geben (eine hohe Virulenz korreliert mit einer geringer Zytokinresistenz).

Auch der LCMV-Stamm CH-5692, der bei den Callitrichiden eine letale Erkrankung auslöste (ASPER *et al.*, 2001), wird durch Cytokine scheinbar am stärksten (relativ zu anderen LCMV-Stämmen) beeinflusst. Auffallend ist die außergewöhnlich starke Hemmung von LCMV WE durch die Kombination von IFN- α und IFN- γ . Meerschweinchen können mit diesem Stamm bereits in niedrigen Dosen tödlich infiziert werden (DJAVANI *et al.*, 1998).

Allgemein konnten auf unseren Zelllinien bei gleicher Interferonkonzentration (1000 U / ml) vergleichbare, bereits beschriebene antivirale Effekte auf LCMV Armstrong und WE beobachtet werden (MOSKOPHIDIS *et al.*, 1994). Eine weitere Steigerung der Interferonkonzentration war durch die cytopathogene Wirkung auf unseren Zelllinien nicht möglich. Ein eventuell stärkerer antiviraler Effekt aufgrund einer höheren Interferonkonzentration konnte somit nicht untersucht werden. Im Gegensatz zu den verwendeten LCMV-Stämmen hatten Interferone bei LCMV Docile und Traub nur einen sehr geringen antiviralen Einfluß (MOSKOPHIDIS *et al.*, 1994). Aufgrund fehlender Sequenzen war die Aufklärung dieser stammspezifischen Unterschiede bisher nicht möglich.

Insgesamt waren in dieser Arbeit keine eindeutigen Unterschiede in der Interferon-Empfindlichkeit zwischen den hoch-pathogenen Lassa- und den geringer pathogenen LCM-Virusstämmen zu erkennen. Die unterschiedliche Pathogenität der beiden Viren kann vermutlich nicht auf Unterschiede in der Suszeptibilität gegenüber der cytokinininduzierten Abwehr einer Zelle zurückgeführt werden.

Die Interferon-Empfindlichkeit fällt im Vergleich zu VSV insbesondere bei IFN- α niedrig aus. Es wäre deshalb z.B. eine Arenavirus-bedingte antagonistische Wirkung gegenüber Cytokinen denkbar. Verschiedene RNA-Viren besitzen Interferon antagonistische Aktivitäten (BEATTIE *et al.*, 1995; GUNNERY *et al.*, 1990; YOUNG *et al.*, 2001). Es konnten verschiedene Mechanismen gezeigt werden, wie Viren Cytokine antagonisieren: durch Hemmung der Interferonsynthese (z.B. Influenza- und Masern-Virus), durch Hemmung der Interferon-Signalkaskade (z.B. Ebola- und Influenza-Virus) oder durch Hemmung der Funktion Interferon-induzierter Proteine (z.B. Polio- und Influenza-Virus) (SEN, 2001).

Möglicherweise antagonisieren Arenaviren die Signalkaskade des Interferon-*Pathways*. Dies würde erklären, warum bei beiden Lassa-Fieber Patienten AV und NL hohe Interferon-Titer gefunden wurden, die aber offensichtlich zu keiner Reduktion des Virustiters führten (SCHMITZ *et al.*, 2002). Allerdings erklärt diese Hypothese nicht, warum LCMV, welches ebenfalls nur gering sensitiv ist, beim Menschen nicht zu einer systemischen Erkrankung führt. Möglicherweise ist die Situation beim Callitrichid-Affen oder im Meerschweinchen anders, wo bestimmte LCMV-Stämme eine systemische Infektion auslösen können. Auf Mauszellen scheinen einige LCMV-Stämme geringer auf Interferone anzusprechen und diese Eigenschaft korreliert mit der Pathogenese in der Maus (MOSKOPHIDIS *et al.*, 1994). Das heißt, eventuell ist der genetische Hintergrund der Wirtszelle von entscheidender Bedeutung für die Interferon-Empfindlichkeit und somit für den Ausgang einer Infektion. In der Tat wurden bestimmte Spezies-spezifische Interferon-Antagonisten gefunden (BAIGENT *et al.*, 2002).

Der antivirale Einfluß der Cytokine wurde nicht nur anhand des Zellkulturüberstandes auf Arenaviren, sondern auch intrazellulär mit Hilfe des Western-Blots untersucht. Exemplarisch wurde anhand der Lassa-Virus NP-Konzentration gezeigt, daß auch intrazellulär ein negativer Einfluß auf die Virusreplikation besteht. Wie bereits mit der RT-PCR bzw. mit dem Immunfocus-Assay gezeigt werden konnte, hat IFN- α im Vergleich zu IFN- γ einen größeren antiviralen Einfluß.

Eine cytokinvermittelte Hemmung der Virusreplikation wäre auf RNA und / oder Proteinebene denkbar. Bei VSV scheint die Proteinsynthese stärker als die RNA-Synthese gehemmt zu sein (BELKOWSKI UND SEN, 1987; KOMATSU *et al.*, 1999). Inwieweit ähnliche Effekte bei Arenaviren eine Rolle spielen, konnte nicht geklärt werden. Zumindest konnte gezeigt werden, daß sich das Verhältnis aus RNA-Konzentration und infektiöser Einheit durch die Cytokinwirkung nicht ändert. Bei stark reduzierter Proteinsynthese wäre vermutlich mit einer Zunahme der RNA-Moleküle pro Partikel zu rechnen. Andererseits zeigt dieses Ergebnis auch, daß Interferon nicht zu einer Akkumulation defekter Partikel führt.

Ob Cytokine in der frühen oder mehr in der späten Phase der Virusreplikation wirken, sollte mit Hilfe eines modifizierten Immunfocus-Assays untersucht werden. Zu infizierende Zellen im Immunfocus-Assay wurden mit Cytokinen inkubiert, um einen antiviralen Status der Zelle zu induzieren. Dann wurden die Zellen infiziert und die ungehinderte Diffusion freigesetzter Virionen mit Hilfe eines Overlaymediums verhindert. Dadurch können ausschließlich neu synthetisierte Viren zu einer Foci-Vergrößerung führen, nicht aber zu einer Zunahme der Zahl von Foci. Offenbar besteht die hemmende Wirkung der Cytokine in der ersten Phase der Infektion, also während des *Entry* oder der frühen Replikation. In dem modifizierten Immunfocus-Assay würde die Foci Anzahl dann geringer ausfallen, weil eine geringere Anzahl an Zellen initial infiziert wurde. In Zellen, die nicht völlig resistent waren, werden im weiteren Verlauf des Experimentes Viren freigesetzt. Diese treffen nun auf benachbarte und suszeptible Zellen, da keine Interferon-Induktion mehr stattfindet (die Interferoninduktion erfolgte ausschließlich durch eine Vorinkubation). An diesen Stellen werden Foci im Immunfocus-Assay nachweisbar.

Bei unseren Experimenten war die Zahl der Foci durch Interferon-Vorinkubation im Immunfocus-Assay deutlich reduziert. Dies bedeutet, daß eine große Zahl von Zellen vollständig vor einer Infektion geschützt war.

6.3 Wirkung der Cytokin-induzierten Proteine PML und Sp100 auf die Lassa-Virus und LCMV-Replikation

Die antivirale Aktivität von Interferonen wird durch Interferon-induzierte Proteine vermittelt (REGAD UND CHELBI-ALIX, 2001). Zu den Interferon-induzierten Proteinen zählen unter anderem PML und Sp100. Eine Interaktion des Arenavirus Z-Proteins mit PML und eine dadurch bedingte Relokalisation des PMLs in das Zytoplasma infizierter Zellen ist beschrieben (BORDEN *et al.*, 1998). Des weiteren wurde vermutet, daß die Interaktion von PML- und Z-Protein zusammen mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4E (KENTISIS *et al.*, 2001) die zelluläre Translation hemmt. Die Bedeutung dieser Interaktion für die Virusreplikation sind nicht bekannt. Mit Hilfe von HtTA-Zelllinien, die induziert PML- und Sp100-Protein überexprimieren (STERNSDORF *et al.*, 1995), konnte selektiv die antivirale Aktivität dieser Proteine untersucht werden. Diese Zelllinien unterscheiden sich von *knock-out* Zellen, die es für PML gibt (BONILLA *et al.*, 2002), darin, daß das endogen exprimierte zelluläre PML- bzw. Sp100-Protein auch in den nicht-induzierten Zellen vorhanden ist. Auch überexprimieren die beiden Zelllinien nur eine bestimmte Splice-Variante des jeweiligen Proteins [HtTA-PML⁺⁺-Zelllinie: Splicevariante *PML-L* (DE THE *et al.*, 1991); HtTA-Sp100⁺⁺-Zelllinie: Splicevariante *SpAlt-C* (STERNSDORF *et al.*, 1997b)]. In *knock-out* Zelllinien dagegen wird die Expression aller entsprechenden Proteine und

Splice-Varianten komplett verhindert. Kontrollzellen exprimieren das Protein in normaler, endogener Konzentration (REGAD *et al.*, 2001).

Eine mögliche antivirale Aktivität des PML-Proteins wurde zuerst mit VSV untersucht. Die induzierte bzw. nicht-induzierte Überexpression der transfizierten Zellen konnte vor und nach jedem Experiment mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz gezeigt werden. Die Proteinexpression hatte dabei keinen sichtbaren Einfluß auf die Zellproliferation. Die Infektion der PML-überexprimierenden HtTA-Zellen bewirkte allerdings keine Änderung des Virustiters und die Zellen waren auch nicht vor dem cytopathischen Effekt von VSV geschützt.

Dieser Befund steht im Gegensatz zu früheren Berichten, wonach sowohl VSV als auch Influenza-Virus durch die Überexpression von PML gehemmt werden (CHELBI-ALIX *et al.*, 1998). Bei diesen Experimenten wurde sogar wie in unseren Zellen die gleiche PML-Splicevariante (PML-L) überexprimiert. Allerdings war der zelluläre Hintergrund anders (Osteosarkomzelle *versus* HeLa-Zelle). Dies könnte ein Grund für das unterschiedliche Ansprechen sein und würde auf eine Bedeutung zusätzlicher zellulärer Faktoren bei der PML-Wirkung hinweisen.

Auch auf Lassa-Virus und LCMV hatte die PML-L Überexpression keinen Einfluß. Dies kontrastiert mit der erhöhten Replikation von LCMV auf PML *knock-out* Zellen und in PML *knock-out* Mäusen (BONILLA *et al.*, 2002; DJAVANI *et al.*, 2001). Allerdings war der Effekt verglichen mit anderen antiviral wirkenden Proteinen wie Mx auf Influenza C-Virus sehr gering (MARSCHALL *et al.*, 2000).

Für die fehlende antivirale Aktivität der eingesetzten Zelllinie gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits könnten andere Splice-Varianten außer PML-L an der Vermittlung antiviraler Effekte von PML beteiligt sein. So konnte bei dem ebenfalls cytokin-induzierten MxA-Protein (HALLER und KOCHS, 2002) gezeigt werden, daß das Carboxy-Terminale Ende, welches bei PML-Splicevarianten unterschiedlich ist, für eine antivirale Aktivität notwendig ist (KOCHS *et al.*, 2002). Andererseits wäre es denkbar, daß die basale, endogene Expression von PML in unseren Überexpressionszellen bereits ausreichend ist, um einen antiviralen Effekt auszulösen. Eine weitere Expression wäre folglich ohne Wirkung.

Als weiteres cytokininduziertes Protein wurde Sp100 untersucht. Wie auch auf den PML-Zellen, konnte ein antiviraler Effekt des Sp100-Proteins weder auf VSV, noch auf Lassa-Virus sowie LCMV beobachtet werden. Dies bestätigt Versuche, bei denen VSV, Influenza-A-Virus und EMCV durch Sp100 nicht gehemmt werden konnten (CHELBI-ALIX *et al.*, 1998). Wie beim PML-Protein treten bei Sp100 unterschiedliche Splice-Varianten auf (DEVOR, 2001), die eventuell durch eine unterschiedliche antivirale Aktivität gekennzeichnet sind.

6.4 Ausblick

Der Nachweis von LCMV-Erkrankungen bei Mensch und Tier (Callitrichid-Hepatitis) in Deutschland unterstreicht, daß es sich bei LCMV um eine relevante Zoonose handelt, die oftmals unterschätzt wird. Analysen der LCMV-Prävalenz in wildlebenden Nagetierpopulationen könnten einen wichtigen Hinweis auf die Übertragung von LCMV auf den Menschen liefern.

Der geringe antivirale Einfluß der Interferone auf die Replikation von verschiedenen Lassa-Virus und LCMV-Stämmen weist auf eine mögliche Arenavirus-spezifische Wirkung gegen die antivirale Aktivität von Cytokinen hin. Dies sollte in Zukunft getestet werden. Als möglicherweise daran beteiligtes Protein könnte das noch nicht vollständig in seiner Funktion aufgeklärte Z-Protein untersucht werden. Außerdem könnten weiterführende Untersuchungen zeigen, ob sich unterschiedliche Virusstämme oder Virusspezies in der Induktion von endogenen Cytokinen unterscheiden.

7. Zusammenfassung

Lassa-Virus und Lymphocytäres Choriomeningitis Virus (LCMV) sind eng verwandte Alt-Welt-Arenaviren, deren natürliche Wirte Nagetiere sind. Lassa-Viren sind in Westafrika endemisch und verursachen beim Menschen ein hämorrhagisches Fieber mit hoher Letalität. Infektionen mit LCMV verlaufen dagegen meist asymptomatisch. Die hohe Pathogenität von Lassa-Viren könnte auf eine Resistenz gegenüber der Wirkung humaner Cytokine zurückzuführen sein. Um diese Hypothese zu testen, sollten neue Virusstämme aus erkrankten Patienten oder Tieren isoliert werden und ihre Cytokinempfindlichkeit vergleichend in Zellkultur gemessen werden.

Ein neuer LCMV-Stamm (LCMV-CH) wurde aus Callitrichid-Affen isoliert. Die Affen starben im Dortmunder Zoo an Callitrichid-Hepatitis, einer über Mäuse übertragenen LCMV-Infektion. Drei neue Lassa-Virusstämme wurden aus Patienten isoliert, die das Virus nach Europa importierten. Zwei der Isolate stammen aus Serum (AV und NL) und eines aus Liquor (CSF).

Zur Quantifizierung infektiöser Partikel und viraler RNA wurde eine real-time RT-PCR sowie ein Immunfocus-Assay auf der Basis spezifischer Antikörper etabliert. Beide Methoden waren weitgehend äquivalent, wobei sich während der Replikation in Zellkultur eine Zunahme der RNA-Menge pro infektiöser Einheit zeigte.

Der antivirale Effekt von humanen Cytokinen (IFN- α , IFN- γ und TNF- α) auf die Virusreplikation wurde in einer humanen Zelllinie (HuH7) und einer Affenzelllinie (Vero) untersucht. Die Funktionalität des Testsystems wurde am Beispiel von VSV nachgewiesen, welches um bis zu 6 log₁₀ Stufen durch IFN- α gehemmt wurde. Sowohl Lassa-Virus als auch LCMV wurden im 1-2 log₁₀ Bereich durch IFN- α und IFN- γ oder deren Kombination gehemmt; TNF- α zeigte keine Wirkung. Es gab keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen den getesteten Lassa-Virus- (AV, NL und CSF) und LCMV- (CH, WE, Arm) Stämmen. Das Verhältnis von RNA-Menge zu infektiöser Einheit wurde nicht beeinflusst. Die Reduktion der Virusfreisetzung korrelierte mit einer intrazellulären Reduktion der Nukleoproteinmenge. Eine Interferon-Vorbehandlung führte ebenfalls zur Reduktion infizierter Foci im Immunfocus-Assay.

Mit HtTA-Zelllinien, in denen spezifische Splicevarianten der Interferon-induzierten Proteine PML und Sp100 reguliert überexprimiert werden können, wurde getestet, ob die Interferonwirkung auf Expression dieser Proteine zurückzuführen ist. Die Überexpression beider Protein zeigte keinen Effekt auf die Lassa-Virus und LCMV-Replikation.

Zusammengefaßt zeigen die Daten, daß sowohl Lassa-Virus als auch LCMV empfindlich gegenüber der intrazellulären Wirkung von Interferonen ist, allerdings deutlich geringer als VSV. Die unterschiedliche Pathogenität der Arenaviren korreliert nicht mit der Empfindlichkeit gegenüber Zytokinen. Die getesteten Splicevarianten von PML und Sp100 scheinen keine Rolle bei der IFN-induzierten Hemmung von Lassa-Virus und LCMV zu spielen.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- ACKERMANN, R., SILLE, W., BLUMENTHAL, W., HELM, E.B., KELLER, K. AND BALDUS, O. (1972): Syrian hamsters as vectors of lymphocytic choriomeningitis. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **97**, 1725-1731.
- AHMED, R., HAHN, C.S., SOMASUNDARAM, T., VILLARETE, L., MATLOUBIAN, M. UND STRAUSS, J.H. (1991): Molecular basis of organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *J. Virol.* **65**, 4242-4247.
- AHN, M.J.; NASON-BURCHENAL, K., MOASSER, M.M. AND DMITROVSKY (1995): Growth suppression of acute promyelocytic leukemia cells having increased expression of the non-rearranged alleles: RAR α or PML. *Oncogene* **10**, 2307-2314.
- ANONYMUS (2003a): http://members.tripod.com/uakari/callimico_goeldii.html
- ANONYMUS (2003b): http://members.tripod.com/uakari/cebuella_pygmaea.html
- ARMSTRONG C. (1941): Studies on choriomeningitis and poliomyelitis. *Harvey Lect.* **36**, 39-65
- ASCOLI, C.A. AND MAUL, G.G. (1991): Identification of a novel nuclear domain. *J. Cell Biol.* **112**, 785-795.
- ASPER, M., HOFMANN, P., OSMANN, C., FUNK, J., METZGER, C. BRUNS, M., KAUP, F.J., SCHMITZ, H. UND GÜNTHER, S. (2001): First Outbreak of Callitrichid Hepatitis in Germany: Genetic Characterisation of the Causative Lymphocytic Choriomeningitis Virus Strains. *Virology* **284**, 203-213.
- BANGHAM, C.R.M UND KIRKWOOD, T.B.L. (1990): Defective Interfering Particles: Effects in Modulating Virus Growth and Persistence. *Virology* **179**, 821-826.
- BAIGENT, S.J., ZHANG, G., FRAY, M.D., FLICK-SMITH, H., GOODBOURN, S., MCCAULEY, J.W. (2002): Inhibition of beta interferon transcription by noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus is through an interferon regulatory factor 3-dependent mechanism. *J. Virol.* **76**, 8979-8988.
- BARTON, L.L. UND HYNDMAN, N.J. (2000): Lymphocytic choriomeningitis virus: Reemerging central nervous system pathogen. *Pediatrics* **105**, URL: <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/105/3/e35>
- BARTON, L.L. UND METS, M.B. (1999): Lymphocytic choriomeningitis virus: Pediatric pathogen and fetal teratogen. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**, 540-541.
- BARTON, L.L., PETERS, C.J. UND KSIAZEK, T.G. (1995): Lymphocytic choriomeningitis virus: An unrecognized teratogenic pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* **1**, 152-153.
- BATTEGAY, M. (1993): Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus within an immunological focus assay in 24 well plates. *ALTEX.* **10**, 6-14.

- BATTEGAY, M., COOPER, S., ALTHAGE, A., BÄNZIGER, J., HENGARTNER, H. UND ZINKERNAGEL, R.M. (1991): Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J. of Virol. Meth.* **33**, 191-198.
- BEATTIE, E.K., DENZLER, J., TARTAGLIA, M.E., PERKUS, E., PAOLETTI, E. AND JACOBS, B.L. (1995): Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. *J. Virol.* **69**, 499-505.
- BELKOWSKI, L.S. AND SEN, G.C. (1987): Inhibition of vesicular stomatitis viral mRNA synthesis by interferons. *J. Virol.* **61**, 653-660.
- BLECHSCHMIDT, M., GERLICH, W. AND THOMSEN, R. (1977): Radioimmunoassay for LCM virus antigens and anti-LCM virus antibodies and its application in an epidemic survey of people exposed to Syrian hamsters. *Med. Microbiol. Immunol.* **163**, 67-76.
- BONILLA, W.V., PINSCHOWER, D.D., KLENERMAN, P., ROUSSON, V., GABOLI, M., PANDOLFI, P.P., ZINKERNAGEL, R.M., SALVATO, M.S. AND HENGARTNER, H. (2002): Effects of Promyelocytic Leukemia Protein on Virus-Host Balance. *J. Virol.* **76**, 3810-3818.
- BOOM, R., SOL C.J., SALIMANS, M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M., VAN DER NOORDA J. (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* **28**, 495-503.
- BORDEN K.L., CAMPBELL DWYER, E.J. AND SALVATO M.S. (1997): The promyelocytic leukemia protein PML has a pro-apoptotic activity mediated through its RING domain. *FEBS Letters* **418**, 30-34
- BORDEN, K.L., CAMPBELL DWYER, E.J., CARLILE, G.W., DJAVANI, M. AND SALVATO, M.S. (1998a): Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J. Virol.* **72**, 3819-3826.
- BORDEN K.L., CAMPBELL DWYER, E.J. AND SALVATO M.S. (1998): An Arenavirus RING (Zink-Binding) Protein Binds the Oncoprotein Promyelocyte Leukemia Protein (PML) and Relocates PML Nuclear Bodies to the Cytoplasm. *J. Virol.* **72**, 758-766.
- BOWEN, M.D., PETERS, C.J. UND NICHOL, S.T. (1997): Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: Patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Mol. Phylogenet. Evol.* **8**, 301-316.
- BOWEN, M.D., ROLLIN, P.E., KSIAZEK, T.G., HUSTAD, H.L., BAUSCH, D.G., DEMBY, A.H., BAJANI, M.D., PETERS, C.J. UND NICHOL, S.T. (2000): Genetic diversity among Lassa virus strains. *J. Virol.* **74**, 6992-7004.
- BOWEN, M.D., ROLLIN, P.E., KSIAZEK, T.G., HUSTAD, H.L., BAUSCH, D.G., DEMBY, A.H., BAJANI, M.D., PETERS, C.J. UND NICHOL, S.T. (2000): GENETIC DIVERSITY AMONG LASSA VIRUS STRAINS. *J. VIROL.* **74**, 6992-7004.

- BRIGGAR, R.J., WOODALL, J.P., WALTER, P.D. AND HAUGHIE, G.E. (1975): Lymphocytic choriomeningitis outbreak associated with pet hamsters: fifty-seven cases from New York state. *JAMA* **232**, 494-500.
- BUCHMEIER, M.J. (2002): Arenaviruses: Protein Structure and Function. Aus: Arenaviruses I - The Epidemiology, Molecular and Cell Biology of Arenaviruses. Oldstone, M.B.A. (Editor), *Springer Verlag* Berlin, Germany
- BURNS, W.J. UND BUCHMEIER, M.J. (1993): Glycoproteins of the arenaviruses. In "The Arenaviridae" (M. S. Salvato, Ed.), *Plenum Press*, New York, 17-35.
- CAO, W., HENRY, M.D., BORROW, P., YAMADA, H., ELDER, J.H., RAVKOV, E.V., NICHOL, S.T., COMPANS R.W., CAMPBELL, K.P AND OLDSTONE M.B.A. (1998): Identification of α -Dystroglycan as a Receptor for Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Lassa Fever Virus. *Science* **282**, 1999-2000.
- CARVALHO, T., SEELER, J.S., OHMAN, K., JORDAN, P., PETERSSON, U., AKUSJARVI, G., CARMO-FONSECA, M. AND DEJEAN, A. (1995): Targetting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J. Cell. Biol.* **131**, 45-56.
- Chelbi-Alix, M.K., Quignon, F., Pelicano, L., Koken, M.H.M. und de Thé, H. (1998): Resistance to Virus Infection Conferred by the Interferon-Induced Promyelocytic Leukemia Protein. *J. of Virolog* **72**, 1043-1051.
- Childs, J.E., Glass, G.E., Ksiazek, T.G., Rossi, C.A., Oro, J.G., Leduc, J.W. (1991): Human-rodent contact and infection with lymphocytic choriomeningitis and Seoul viruses in an inner-city population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**, 117-121.
- Clegg, J.C.S. (2002): Molecular Phylogeny of the Arenaviruses. Aus: Arenaviruses I - The Epidemiology, Molecular and Cell Biology of Arenaviruses. Oldstone, M.B.A. (Editor), *Springer Verlag* Berlin, Germany
- CLONTECH LABORATORIES, Protocol PT3244-5, Version PR94995 (1999)
- CLONTECH LABORATORIES, Protocol PT3001-1, Version PR85369, INC., <http://www.clontech.com>
- CIUREA, A., KLENERMAN, P., HUNZIKER, L., HORVATH, E., SENN, B.M., OCHSENBEIN, A.F., HENGARTNER, H. UND ZINKERNAGEL, R.M. (2000): Viral persistence *in vivo* through selection of neutralizing antibody-escape variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2749-2754.
- CUMMINS, D., MCCORMICK, J.B., BENNETT, D., SAMBA, J.A., FARRAR, B. AND MACHIN S.J. (1990): Acute sensorineural deafness in Lassa fever. *JAMA* **264**, 2093-2096.
- DEIBEL, R., WOODALL, J.P., DECHER, W.J. AND SCHRYVER, G.D. (1975): Lymphocytic choriomeningitis virus in man: serologic evidence of association with pet hamsters. *JAMA* **232**, 501-504.
- DEMBY, A.H., CHAMBERLAIN, J., BRWON, D.W.G. UND CLEGG, C.S. (1994): Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2898-2903.

- Deutsches Patentamt München; DROSTEN, C.: Echtzeitdetektion von DNA-Amplifikationsprodukten, Nr. 101 50 121.8
- DEVOR, E.J. (2001): Molecular archeology of an Sp100 splice variant revisited: dating the retrotranscription and *Alu* insertion events. *Genome Biology* **9**, 0040.1-0040.6.
- DJAVANI, M., LUKASHEVICH, I.S. AND SALVATO, M.S. (1998): Sequence comparison of the large genomic RNA segments of two strains of lymphocytic choriomeningitis virus differing in pathogenetic potential for guinea pigs. *Virus Genes* **17**, 151-155.
- DJAVANI, M., RODAS, J., LUKASHEVICH, I.S., HOREJSH, D., PANDOLFI, P.P., BORDEN, K.L.B. AND SALVATO, M.S. (2001): Role of Promyelocytic Leukemia Protein PML in the Interferon Sensitivity of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *J. Virol.* **75**, 6204-6208.
- DOUCAS, V., ISHOV, M.A., ROMO, A., JUGUILON, M.D., WEITZMAN, M.D., EVANS, R.M. AND MAUL, G.G. (1996): Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Gene Develop.* **10**, 196-207.
- DROSTEN, C., GÖTTIG, S., SCHILLING, S., ASPER, M., PANNING, M., SCHMITZ, H. UND GÜNTHER, S. (2002): Rapid Detection and Quantification of RNA of Ebola and Marburg Viruses, Lassa Virus, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Rift Valley Fever, Dengue Virus, and Yellow Fever Virus by Real-Time Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiology* **40**, 2323-2330.
- DUTKO, F.J. UND OLDSTONE, M.B. (1983): Genomic and biological variation among commonly used lymphocytic choriomeningitis virus strains. *J. Gen. Virol.* **64**, 1689-1698.
- DYCK, J.A., MAUL, G.G., MILLER, W.J., CHEN, J.D., KAKIZUKA, A. AND EVANS, R.M. (1994): A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* **76**, 333-343.
- ENDERS, G., VARHO-GÖBEL, M. LÖHLER, J., TERLETSKAIA-LADWIG, E. UND EGGERS, M. (1999): Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: An underdiagnosed disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **18**, 652-655.
- FELSENSTEIN, J. (1995): PHYLIP (Phylogeny Interference Package) Version 3.57c. [Online] Department of Genetics, University of Washington, Washington D.C. Internetadresse: URL: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html> [Stand: 28. Januar 2000]
- Frame, J.D., Baldwin Jr., J.M., Gocke, D. J. und Troup, J.M. (1970): Lassa Fever, a new virus disease of man from West Africa. *Am. J. of Trop. Medicine and Hygiene* **19**, 670-696.
- Garcia, J.B., Morzunov, S.P., Levis, S., Rowe, J., Calderon, G., Enria, D., Sabattini, M., Buchmeier, M.J., Bowen, M.D. und Jeor, S.C.S. (2000): Genetic diversity of the Junin virus in Argentina: Geographic and temporal patterns. *Virology* **272**, 127-136.
- GHYKA, G. UND SAVI, I. (1987): Interferon level in human normal sera. *Med. Interne.* **25**, 43-46.
- GREGG, M.B. (1975): Recent outbreaks of lymphocytic choriomeningitis in the United States of America. *Bull. WHO* **52**, 549-554.

- GÜNTHER, S., EMMERICH, P., LAUE, T., KÜHLE, O., ASPER, M., JUNG, A., GREWING, T., TER MEULEN, J., SCHMITZ, H. (2000): Imported Lassa Fever in Germany: Molecular Characterisation of a New Lassa Virus Strain. *Emerging Infec. Dis.* **6**, 466-476.
- GÜNTHER, S., WEISNER, B., ROTH, A., GREWING, T., ASPER, M., DROSTEN, C., EMMERICH, P., PETERSEN, J., WILCZEK, M. UND SCHMITZ, H. (2001): Lassa Fever Encephalopathy: Lassa Virus in Cerebrospinal Fluid but Not in Serum. *J. Infect. Diseases.* **184**, 345-349.
- GUNNERY, S.A., RICE, A.P., ROBERTSON, H.D. AND MATHEWS, M.B. (1990): Tat-responsive region RNA of human immunodeficiency virus 1 can prevent activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8687-8691.
- HAAS, W.H., BREUER, T., PFAFF, G., SCHMITZ, H., KÖHLER, P., ASPER, M., EMMERICH, P., DROSTEN, C., GÖLNITZ, U., FLEISCHER, K. UND GÜNTHER, S. (2003): Imported Lassa Fever in Germany - Surveillance and Management of Contact Persons. *Clin. Infect. Diseases.* **36**, 1254-1258.
- HALLER, O. AND KOCHS, G. (2002): Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic.* **3**, 710-717.
- HOLMES, G.P., MCCORMICK, J.B., TROCK, S.C., CHASE, R.A., LEWIS, S.M. AND MASON, C.A. (1990): Lassa fever in the United States. Investigation of a case and new guidelines for management. *N. Engl. J. Med.* **323**, 1120-1123.
- HUFERT, F.T., LUDKE, W. UND SCHMITZ, H. (1989): Epitope mapping of the Lassa virus nucleoprotein using monoclonal anti-nucleocapsid antibodies. *Arch. Virol.* **106**, 201-212.
- ISAACS, A. und LINDENMANN, J (1957): Virus interference. I. The Interferon. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **147**, 258-267.
- JAHRLING, P.B., FRAME, J.D., SMITH, S.B. UND MONSON, M.H. (1985): Endemic Lassa fever in Liberia. III. Characterization of Lassa virus isolates. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**, 374-379.
- JENSEN, K., SHIELS, C. UND FREEMONT, P.S. (2001): PML protein isoforms and the RBCC / TRIM motif. *Oncogene.* **49**, 7223-7233.
- KENTSIS, A., CAMPBELL DWYER, E., PEREZ, J.M., SHARMA, M., CHEN, A., PAN, Z.Q. AND BORDEN, K.L.B. (2001): The Ring Domains of Promyelocytic Leukemia Protein PML and the Arenaviral Protein Z Repress Translation by Directly Inhibiting Translation Initiation Factor eIF4E. *JMB* **312**, 609-623.
- KIRKWOOD, T.B.L. AND BANGHAM, C.R.M (1994): Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: A model of defective interfering particles. *Proc. Natl. Sci. USA.* **91**, 8685-8689.
- KNOBLOCH, J., MCCORMICK, J.K., WEBB, P.A., DIETRICH, M., SCHUMACHER, H.H. AND DENNIS., E. (1980): Clinical observations in 42 patients with Lassa fever. *Tropenmed. Parasitol.* **31**, 389-398.

- KOCHS, G., JANZEN, C., HOHENBERG, H. AND HALLER, O. (2002): Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 3153-3158.
- KOMATSU, T., SRIVASTAVA, N., REVZIN, M., IRELAND, D.D.C., CHESLER, D. AND REISS, C.S. (1999): Mechanisms of Cytokine-Mediated Inhibition of Viral Replication. *Virology* **259**, 334-341.
- LE, X.F., YANG, P. AND CHANG, K.S. (1996): Analysis of the growth and transformation suppressor domains of promyelocytic leukemia gene, PML. *J. Biol. Chem.* **271**, 130-135.
- LENZ, O., TER MEULEN, J., FELDMANN, H., KLENK, H.D. UND GARTEN, W. (2000): Identification of a novel consensus sequence at the cleavage site of the Lassa virus glycoprotein. *J. Virol.* **74**, 11418-11421.
- LINDL, T. UND BAUER, J. (1994): Zell- und Gewebekultur, 3. Aufl., *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart.
- MARSCHALL M, ZACH A, HECHTFISCHER A, FOERST G, MEIER-EWERT H, HALLER O. (2000): Inhibition of influenza C viruses by human MxA protein. *Virus Res.* **67**, 179-188
- MCCORMICK J.B. (1987): Epidemiology and control of Lassa fever. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **134**, 69-78.
- MCCORMICK J.B. UND FISCHER-HOCH, S.P. (2002): Lassa Fever. Aus: Arenaviruses I - The Epidemiology, Molecular and Cell Biology of Arenaviruses. Oldstone, M.B.A. (Editor), *Springer Verlag* Berlin, Germany
- MESTAN, J., BROCKHAUS, M., KIRCHNER, H. AND JACOBSEN (1988): Antiviral Activity of Tumor Necrosis Factor. Synergism with Interferons and Induction of Oligo-2',5'-adenylate Synthetase. *J. gen. Virol.* **69**, 3113-3120.
- METS, M.B. (1999): Childhood blindness and visual loss: an assessment at two institutions including a "new" cause. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **97**, 653-696.
- METS, M.B., BORTON, L.L., KHAN, A.S. UND KSIAZEK, T.G. (2000): Lymphocytic choriomeningitis virus: An underdiagnosed cause of congenital chorioretinitis. *Am J. Ophthalmol.* **130**, 209-215.
- MEYER, B.J., DE LA TORRE, J.C. UND SOUTHERN, P.J. (2002): Arenaviruses: Genomic RNAs, Transcription, and Replication. Aus: Arenaviruses I - The Epidemiology, Molecular and Cell Biology of Arenaviruses. Oldstone, M.B.A. (Editor), *Springer Verlag* Berlin, Germany.
- MITCHELL, S.W. AND MCCORMICK, J.B. (1984): Physicochemical inactivation of Lassa, Ebola, and Marburg viruses and effect on clinical laboratory analyses. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 486-489.

- MONTALI, R.J., CONNOLLY, B.M., ARMSTRONG, D.L., SCANGA, C.A. AND HOLMES K.V. (1995): Pathology and immunohistochemistry of callitrichid hepatitis, an emerging disease of captive New World primates caused by lymphocytic choriomeningitis virus. *Am. J. Pathol.* **147**, 1441-1449.
- MONTALI, R.J., RAMSAY, E.C., STEPHENSEN, C.B., WORLEY, M., DAVIS, J.A. AND HOLMES, K.V. (1989): A new transmissible viral hepatitis of marmosets and tamarins. *J. Infect. Dis.* **160**, 759-765.
- MONTALI, R.J., SCANGA, C.A., PERNIKOFF, D., WESSNER, D.R., WARD, R. AND HOLMES, K.V. (1993): A common-source outbreak of callitrichid hepatitis in captive tamarins and marmosets. *J. Infect. Dis.* **167**, 946-950.
- MOSKOPHIDIS, D., BATTEGAY, M., BRUENDLER, M.A. LAINE, E., GRESSER, I., ZINKERNAGEL, R.M. (1994): Resistance of Lymphocytic Choriomeningitis Virus to Alpha/Beta Interferon and to Gamma Interferon. *J. Virol.*, **68**, 1951-1955.
- MU, Z.M., CHIN, K.V., LIU, J.H., LOZANO, G. AND CHANG, K.S. (1994): PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. *Mol. Cel. Biol.* **14**, 6858-6867.
- NAGANO, Y. und KOJIMA, Y. (1958): Inhibition de l'infection vaccinale par le virus homologue. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* **152**, 1627-1630.
- NOVELLA, I.S., CILNIS, M., ELENA, S.F., KOHN, J., MOYA, A., DOMINGO, E. AND HOLLAND, J (1996): Large-Population Passages of Vesicular Stomatitis Virus in Interferon-Treated Cells Select Variants of Only Limited Resistance. *J. Virol.* **70**, 6414-6417.
- PEARCE, B.D., VALADI, N.M., PO, C.L. AND MILLER, A.H. (2000): Viral infection of developing GABAergic neurons in a model of hippocampal disinhibition. *Neuro Report* **11**, 2433-2438.
- PETERS, C.J., BUCHMEIER, M., ROLLIN, P.E. UND KSIAZEK, T.G. (1996): Arenaviruses. Aus Fields Virology (Third Edition). Fields, B.N., Knipe, D.M. Howley P.M. *et al.* (Herausgeber). *Lippincott - Raven Publishers*, Philadelphia (1996).
- PETERS, C.J., JAHRLING, P.B., LUCI, C.T., KENYON, R.H., MCKEE, K.T. AND BARRERA ORO, J.G. (1987): Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. In "Arenavirus: Biology and Immunotherapy" (M.B.A. Oldstone, Ed.), *Current Topics Microbiol. Immunol.* **134**, 5-68, Springer-Verlag, Berlin.
- RAMSAY, E.C., MONTALI, R.J., WORLEY, M., STEPHENSEN, C.B. AND HOLMES, K.V. (1989): Callitrichid Hepatitis: Epizootiology of a fatal hepatitis in zoo tamarins and marmosets. *J. Zoo Wildl. Med.* **20**, 178-183.
- REGAD, T. AND CHELBI-ALIX, M.K. (2001): Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene.* **20**, 7274-7286.

- REGAD, T., SAIB, A., LALLEMAND-BREITENBACH, V., PANDOLFI, P.P., DE THÉ, H. UND CHELBI-ALIX, M.K. (2001): PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO* **20**, 3495-3505.
- ROBBINS, C.B. AND VAN DER STRAETEN, E. (1989): Comments on the systematics of *Mastomys Thomas 1915* with the description of a new West African species. *Senckenb. Biol.* **69**, 1-14.
- ROMANOWSKI, V., MATSUURA, Y. AND BISHOP, D.H. (1985): Complete sequence of the S-RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichinde arenavirus. *Virus Res.* **3**, 101-114.
- Salazar-Bravo, J.; Ruedas, L.A. und Yates, T.L. (2002): Mammalian Reservoirs of Arenaviruses. Aus: Arenaviruses I - The Epidemiology, Molecular and Cell Biology of Arenaviruses. Oldstone, M.B.A. (Editor), *Springer Verlag* Berlin, Germany.
- SALVATO, M.S., DJAVANI, M., XIA, L., SCHMIDT, D., BORDEN, K.L.B. AND LUKASHEVICH (1999): Role of arenavirus genes in replication. *Factors in the Emergence and Control of Rodent-borne Viral Diseases (Hantaviral and Arenal Diseases)* Saluzzo, J.F. and Dodet, B. (Editoren) 233-240.
- SALVATO, M.S., SHIMOMAYE, E. AND OLDSTONE, M.B. (1989): The primary structure of lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase. *Virology* **169**, 377-384.
- SALVATO, M.S., SHIMOMAYE, E., SOUTHERN, P. AND OLDSTONE, M.B. (1988): Virus-lymphocyte interactions. IV. Molecular characterization of LCMV-Armstrong (CTL+) small genomic segment and that of its variant, Clone 13 (CTL-). *Virology* **164**, 517-522.
- SAMUEL, C.E. (2001): Antiviral Actions of Interferons. *Clinical Microbiol. Reviews* **14**, 778-809.
- SCHMITZ, H., KÖHLER, B., LAUE, T., DROSTEN, C., VELDKAMP, P.J., GÜNTHER, S., EMMERICH, E., GEISEN, H.P., FLEISCHER, K., BEERSMA, M.F.C. UND HOERAUF, A. (2001): Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever. *Microbes and Infection* **4**, 43-50.
- SEILER, P., SENN, B.M., BRUNDLER, M.A., ZINKERNAGEL, R.M., HENGARTNER, H. UND KALINKE, U. (1999): *In vivo* selection of neutralization-resistant virus variants but no evidence of B cell tolerance in lymphocytic choriomeningitis virus carrier mice expressing a transgenic virusneutralizing antibody. *J. Immunol.* **162**, 4536-4541.
- SEN, G.C. (2001): Viruses and Interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 255-281.
- SEVILLA, N., KUNZ, S., HOLZ, A., LEWICKI, H., HOMANN, D., YAMADA, H., CAMPBELL, K.P., DE LA TORRE, J.C. UND OLDSTONE, M.B. (2000): Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1249-1260.
- SHEINBERGAS, M.M. (1976): Hydrocephalus due to prenatal infection with the lymphocytic choriomeningitis virus. *Infection* **4**, 185-191.

- Smadel, J.E., Green, R.H., Paltauf, R.M. und Gonzalez, T.A. (1942): Lymphocytic choriomeningitis: Two human fatalities following an unusual febrile illness. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* **49**, 683-686.
- SMELT, S.C., BORROW, P., KUNZ, S., CAO, W., TISHON, A., LEWICKI, H., CAMPBELL, P., OLDSTONE M.B.A. (2001): Differences in Affinity of Binding of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Strains to the Cellular Receptor α -Dystroglycan Correlate with the Viral Tropism and Disease Kinetics. *J. of Virology* **75**, 448-57.
- STEPHENSON, C.B., BLOUNT, S.R., LANFORD, R.E., HOLMES K.V., MONTALI R.J., FLEENOR, M.E. AND SHAW, J.F. (1992): Prevalence of serum antibodies against lymphocytic choriomeningitis virus in selected populations from two U.S. cities. *J. Med. Virol.* **38**, 27-31.
- STEPHENSON, C.B., JACOB, J.R., MONTALI, R.J., HOLMES, K.V., MUCHMORE, E., COMPANS, R.W., ARMS, E.D., BUCHMEIER, M.J. AND LANFORD, R.E. (1991): Isolation of an arenavirus from a marmoset with callitrichid hepatitis and its serologic association with disease. *J. Virol.* **65**, 3995-4000.
- STEPHENSON, C.B., PARK, J.Y. AND BLOUNT, S.R. (1995): cDNA sequence analysis confirms that the etiologic agent of callitrichid hepatitis is lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **69**, 1349-1352.
- STEPHENSON, E.H., LARSON, E.W. AND DOMINIK, J.W. (1984): Effect of environmental factors on aerosol-induced Lassa virus infection. *J. Med. Virol.* **14**, 295-303.
- STERNSDORF, T., GULDNER, H.H., SZOSTECKI, C., GRÖTZINGER, T. UND WILL, H. (1995): Two Nuclear Dot-Associated Proteins, PML and Sp100, are Often Co-Autoimmunogenic in Patients with Primary Biliary Cirrhosis. *Scand. J. Immunol.* **42**, 257-268.
- STERNSDORF, T., GRÖTZINGER, T., JENSEN, K. UND WILL, H. (1997a): Nuclear Dots: Actors on Many Stages. *Immunobiology* **198**, 307-331.
- STERNSDORF, T., JENSEN, K. UND WILL, H. (1997b): Evidence for Covalent Modification of the Nuclear Dot-associated Proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *The J. of Cell Biol.* **139**, 1621-1634.
- THE DE, H., LAVAU, C., MARCHIO, A., CHOMIENNE, C., DEGOS, L. AND DEJEAN, A. (1991): The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**, 675-684.
- TER MEULEN J., LUKASHEVICH I., SIDIBE K., INAPOGUI A., MARX M., DORLEMANN A., YANSANE M.L., KOULEMOU K., CHANG-CLAUDE J. AND SCHMITZ H. (1996): Hunting of peridomestic rodents and consumption of their meat as possible risk factors for rodent-to-human transmission of Lassa virus in the Republic of Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**, 661-666.

- THOMPSON, J.D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN, F. AND HIGGINS, D.G. (1997): The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4876-4882.
- WAGNER, R.R. AND ROSE, J.K. (1996): Rhabdoviridae: The Viruses and Their Replication. Aus: *Fields Virology*, Third Edition. ED. FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. *et al.*, Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.
- WEBER, E.L. AND BUCHMEIER, M.J. (1988): Fine mapping of a peptide sequence containing an antigenic site conserved among arenaviruses. *Virology* **164**, 30-38.
- WRIGHT, K.E., SALVATO, M.S. UND BUCHMEIER, M.J. (1989): Neutralizing epitopes of lymphocytic choriomeningitis virus are conformational and require both glycosylation and disulfide bonds for expression. *Virology* **171**, 417-426.
- WRIGHT, R., JOHNSON, D., NEUMANN, M., KSIAZEK, T.G., ROLLIN, P., KEECH, R.V., BONTHIUS, D.J., HITCHON, P., GROSE, C.F., BELL, W.E. UND BALE, J.F. (1997): Congenital lymphocytic choriomeningitis virus syndrom: A disease that mimics congenital toxoplasmosis or cytomegalovirus infection. *Pediatrics* **100**, URL: <http://www.pediatrics.org/cgi/content/full/100/1/e9>
- YOUNG, D.F., CHATZIANDREOU, N., HE, B., GOODBOURN, S., LAMB, R.A. AND RANDALL, R.E. (2001). Single Amino Acid Substitution in the V Protein of Simian Virus 5 Differentiates Its Ability To Block Interferon Signaling in Human and Murine Cells. *J Virol.*, **75**, 3363-3370.

9. Danksagung

Zu allererst möchte ich *Dr. Stephan Günther* danken, daß ich in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit durchführen durfte. Das große Vertrauen, die schier endlos scheinenden Ideen und die genialen wissenschaftlichen Diskussionen haben mich vom ersten Tag an fasziniert und begeistert! Außerdem möchte ich *Prof. Dr. Herbert Schmitz* danken, in dessen virologische Abteilung ich am Bernhard-Nocht-Institut gearbeitet habe. Seine stete und unkomplizierte Diskussions- und Hilfsbereitschaft haben mich bis heute beeindruckt. Frau *Antje Rhode*, unserer leitenden und damals einzigen TA möchte ich für die große Hilfe bei den Versuchen danken. Ohne sie wären die nicht enden wollenden Versuchsreihen lange nicht so schnell und so angenehm durchzuführen gewesen! *Dr. Christian Drosten*, was wären meine molekularbiologischen Untersuchungen ohne seine genialen Ideen? Als absolutes Highlight will ich hier sein SGS-Molekül hervorheben, ohne das ich die vielen PCR`s lange nicht so gut hinbekommen hätte. Außerdem möchte ich den TA`s *Martina Westerkofsky* und *Beate Becker-Ziaja* für die tolle, schnelle und vor allen Dingen unkomplizierte Hilfe im Labor, besonders bei den Zellkulturarbeiten danken. Mein ganz besonderer Lob geht an *Thomas R. Dittmann* für seine geniale und vor allen Dingen schnelle Hilfe bei computer- und softwaretechnischen Problemen beim Zusammenschreiben dieser Arbeit...aber auch bei jeder Vortragsvorbereitung. Zu fast jeder Tageszeit hatte er ein offenes Ohr und einen Lösungsvorschlag für meine Probleme. *Christina Röser* möchte ich für die fruchtbare Kooperation in der letzten Phase meiner Arbeit danken. Zusammen haben wir die bisher wichtigste Arbeit unseres Lebens beenden können. *Meike Hass* möchte ich ganz besonders für die Anleitungen rund um die Proteinchemie danken. Ich durfte ihr einwandfrei funktionierenden Protokolle auf meine Versuche übertragen. Frau *Prof. Angelika Vallbracht* von der Universität Bremen möchte ich für die Bereitschaft danken, meine Arbeit zu begleiten und zu begutachten. Durch Ihre freundliche Kooperationsbereitschaft war es mir möglich, als Student der Universität Bremen meine Arbeit extern am BNI durchzuführen. Der *technischen-* und der *Wirtschaftsabteilung* des Bernhard-Nocht-Instituts möchte ich für die absolut unbürokratische und schnelle Hilfe danken. Ganz speziell möchte ich dabei *Frau Neuburg* und *Herrn Voß* hervorheben. Unermüdlich haben Sie meinen manchmal etwas speziellen Wünschen mit ganz großer Sorgfalt und Schnelligkeit Rechnung getragen. Alle Mitarbeiter aus beiden Abteilungen haben mir meine Arbeit ein wesentliches Stück einfacher gemacht. Für die Zusammenarbeit im Rahmen der LCMV-Callitrichid-Hepatitis möchte ich Frau *Dr. Petra Hofmann* (Deutsches Primatenzentrum, Göttingen), Frau *Dr. Christine Osmann* (Zoo Dortmund) und Herrn *Dr. Christoph Metzger* (Labor Prof. Enders und Partner, Stuttgart) danken. Herrn *Dr. Michael Bruns* aus dem Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg möchte ich für die Einführung in die Arbeiten mit dem LCMV danken. Von ihm konnte ich einen unschätzbaren Wert an hochwertigen Virusstocks und Antikörpern übernehmen. Herrn *Dr. Hermann Meier* von der Bundeswehrakademie in München möchte ich für die schnelle Vermittlung von VSV bedanken.

Diese Arbeit wurde finanziell vom Bundesamt für Wehrtechnik und Beschaffung, Projekt E/B31E/M0171/M5916 unterstützt.

Ganz zum Schluß möchte ich meiner lieben Familie danken, ganz speziell meiner Mutter, die mir ein großes Vorbild ist und die mich während meines gesamten Studium begleitet und für mich gebetet hat. Ohne sie hätte ich nicht den Punkt erreicht, an dem ich jetzt stehe! Vielen, vielen Dank!!!

10. Anhang

10.1 Publikationsliste

GÜNTHER, S., EMMERICH, P., LAUE, T., KÜHLE, O., ASPER, M., JUNG, A., GREWING, T., TER MEULEN, J., SCHMITZ, H. (2000): Imported Lassa Fever in Germany: Molecular Characterisation of a New Lassa Virus Strain. *Emerging Infec. Dis.* **6**, 466-476.

ASPER, M., HOFMANN, P., OSMANN, C., FUNK, J., METZGER, C. BRUNS, M., KAUP, F.J., SCHMITZ, H. UND GÜNTHER, S. (2001): First Outbreak of Callitrichid Hepatitis in Germany: Genetic Characterisation of the Causative Lymphocytic Choriomeningitis Virus Strains. *Virology* **284**, 203-213.

GÜNTHER, S., WEISNER, B., ROTH, A., GREWING, T., ASPER, M., DROSTEN, C., EMMERICH, P., PETERSEN, J., WILCZEK, M. UND SCHMITZ, H. (2001): Lassa Fever Encephalopathy: Lassa Virus in Cerebrospinal Fluid but Not in Serum. *J. Infect. Diseases.* **184**, 345-349.

DROSTEN, C., GÖTTIG, S., SCHILLING, S., ASPER, M., PANNING, M., SCHMITZ, H. UND GÜNTHER, S. (2002): Rapid Detection and Quantification of RNA of Ebola and Marburg Viruses, Lassa Virus, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Rift Valley Fever, Dengue Virus, and Yellow Fever Virus by Real-Time Reverse Transcription-PCR. *J Clin. Microbiology* **40**, 2323-2330.

HAAS, W.H., BREUER, T., PFAFF, G., SCHMITZ, H., KÖHLER, P., ASPER, M., EMMERICH, P., DROSTEN, C., GÖLNITZ, U., FLEISCHER, K. UND GÜNTHER, S. (2003): Imported Lassa Fever in Germany - Surveillance and Management of Contact Persons. *Clin. Infect. Diseases.* **36**, 1254-1258.

VIETH, S., TORDA, A.E., ASPER, M., SCHMITZ, H. UND GÜNTHER, S.: Sequence analysis of L-RNA of Lassa Virus. *Manuskript eingereicht.*

ASPER, M., RHODE, A., DROSTEN, C., SCHMITZ, H. UND GÜNTHER, S.: Effects of Cytokines on Lassa Virus and LCMV Replication. *In der Vorbereitung.*

ASPER, M., RÖSER, C., HOSMANE, R.S., BOROWSKI, P., SCHMITZ, H. UND GÜNTHER, S.: Ring-expanded Nucleosides as a novel class of Lassa Virus antiviral agents. *In der Vorbereitung.*

10.2 Lebenslauf

Name:	Marcel Asper	
Geburtsdatum & Geburtsort:	31.03.1973 in Heidelberg	
Schulbildung:	1980 - 1983	Besuch der Wilhelm-Busch Grundschule in Gifhorn
	1983 - 1984	Besuch der Freien-Evang.- Bekenntnis Grundschule und Orientierungsstufe in Bremen
	1984 - 1993	Besuch des Gymnasiums der Freien-Evang.-Bekenntnisschule in Bremen
Zivildienst:	1993 - 1994	Ableistung des Zivildienstes beim Deutschen Roten Kreuz
Ausbildung:	Okt. 1993	Prüfung zum Rettungshelfer in Bellin / Schleswig-Holstein
	Sep. 1996	Abschlußprüfung zum Rettungsanwärter in Münster / Westfalen-Lippe
Studium:	1994 - 1999	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Bremen
	Nov. 1996	Diplomvorprüfung
	Nov. 1999	Abschluß des Studiums mit Diplom
	1999 - 2003	Aufbaustudium zur Erlangung des Doktorgrades an der Universität Bremen
Beschäftigung:	seit Nov. 1999	Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. med. H. Schmitz in der Abteilung Virologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

10.3 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
3. und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bremen, 13. Juni 2003

Marcel Asper