
Die Rolle des Signalpeptids für die Reifung des Lassavirus Glykoproteins

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Robert Eichler
aus Frankfurt

Marburg/Lahn 2003

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Dezember 2001 bis Dezember 2003 im Institut für Virologie, Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk, Fachbereich Medizin, der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Garten durchgeführt.

Angenommen vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel
Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Garten

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Eichler R., Lenz O., Strecker T., Eickmann M., Klenk H.-D. und Garten W. (2003). Lassa virus glycoprotein signal peptide displays a novel topology with an extended ER-luminal region. *JBC*, eingereicht

Eichler R., Lenz O., Strecker T., Eickmann M., Klenk H.-D. und Garten W. (2003). Identification of Lassa virus glycoprotein GP-C signal peptide as a *trans*-acting maturation factor. *EMBO Rep* 4: 1084-88

Eichler R., Lenz O., Strecker T. und Garten W. (2003). Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length. *FEBS Lett* 538: 203-6

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium des Graduiertenkollegs 541 "Proteinfunktion auf atomarer Ebene", Marburg, sowie der FAZIT-Stiftung, Frankfurt, gefördert.

Weitere Publikationen:

Eichler R., Strecker T., Kolesnikova L., ter Meulen J., Weissenhorn W., Becker S., Klenk H.-D., Garten W. und Lenz O. (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein sufficient for the release of virus-like particles. *Virus Res*, im Druck

Strecker T., **Eichler R.**, ter Meulen J., Weissenhorn W., Klenk H.-D., Garten W. und Lenz O. (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein sufficient for the release of virus-like particles. *J Virol* 77:10700-5

Simon J., **Eichler R.**, Pisa R., Biel S. und Gross, R. (2002). Modification of heme c binding motifs in the small subunit (NrfH) of the *Wolinella succinogenes* cytochrome c nitrite reductase complex. *FEBS Lett* 522: 83-7

Pisa R., Stein T., **Eichler R.**, Gross R. und Simon J. (2002). The nrfI gene is essential for the attachment of the active site haem group of *Wolinella succinogenes* cytochrome c nitrite reductase. *Mol Microbiol* 43: 763-70

Simon J., Pisa R., Stein T., **Eichler R.**, Klimmek O. und Gross R. (2001) The tetraheme cytochrome c NrfH is required to anchor the cytochrome c nitrite reductase (NrfA) in the membrane of *Wolinella succinogenes*. *Eur J Biochem* 268: 5776-82

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Zusammenfassung	2
3. Einleitung	3
3.1. Das Lassavirus	3
3.1.1. Taxonomie	3
3.1.2. Epidemiologie	4
3.1.3. Klinik, Therapie, Impfung und Prophylaxe	5
3.2. Biologie der Lassaviren	7
3.2.1. Virusstruktur und Replikation	7
3.2.2. Das Glykoprotein der Arenaviren	11
3.2.3. Infektionszyklus	13
3.3. Signalpeptide und deren Bedeutung	14
3.3.1. Struktur von Signalpeptiden	14
3.3.2. Prozessierung von Signalpeptiden	15
3.3.3. Signalpeptide und zusätzliche Funktionen	15
4. Zielsetzung	17
5. Material	18
5.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	18
5.2. Enzyme	18
5.3. Antiseren	18
5.4. Kits	19
5.5. Vektoren	19
5.6. Oligonukleotide	19
5.7. Oligopeptide	23
5.8. Zelllinien	23
5.9. Bakterien	23
5.10. Viren	24
5.11. Medien und Puffer	24
5.11.1 Puffer	24

5.11.2. Medien für Bakterienkultur	25
5.11.3. Puffer und Medien für Zellkultur	26
6. Methoden	27
6.1. Virologische Methoden	27
6.1.1. Virusinfektion- und reinigung	27
6.2. Molekularbiologische Methoden	27
6.2.1. Polymerasekettenreaktion	27
6.2.2. Rekombinante Mutagenese	28
6.2.3. Hybridisierungs- und Auffüllungsreaktion	29
6.2.4. Bestimmung von DNA-Konzentrationen über UV-Adsorption	29
6.2.5. Verdau doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	30
6.2.6. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	30
6.2.7. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
6.2.8. Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	31
6.2.9. Auffüllung überhängender DNA-Enden mit Nukleotiden durch Klenow-Enzym	31
6.2.10. Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase	32
6.2.11. Herstellung und Transformation kompetenter <i>E.coli</i>	32
6.2.12. DNA-Präparation	32
6.2.13. Enzymatische Sequenzierung von DNA	33
6.2.14. Reinigung von DNA-Fragmenten	34
6.2.15. <i>In vitro</i> -Transkription/Translation	34
6.3. Zellkultur	35
6.3.1. Transfektion von Zellen mit Lipofektamin 2000	35
6.4. Herstellung polyklonaler Immunsereen aus Kaninchen	36
6.5. Methoden zum Nachweis von Proteinexpression und –funktion	36
6.5.1. Immunoblot	36
6.5.2. Lyse von Zellen für Immunoblot	36
6.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
6.5.4. Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
6.5.5. Elektroblothing	38
6.5.6. Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	39
6.5.7. Metabolische Markierung mit ³⁵ S-Methionin und –Cystein	39
6.5.8. Zelllyse für Immunpräzipitation	40

6.5.9. Immunpräzipitation	40
6.5.10. Oberflächenbiotinylierung	41
6.5.11. Endoglykosidasebehandlung	41
6.5.12. Aufreinigung und N-terminale Sequenzierung von Lassavirus GP1	42
6.5.13. Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz	42
7. Ergebnisse	44
7.1. Identifikation des Signalpeptids von Lassavirus Glykoprotein präGP-C	44
7.1.1. Bestimmung des N-Terminus von Lassavirus GP1	44
7.1.2. Charakterisierung der Signalpeptidspaltstelle	47
7.2. Halbwertszeit des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C	50
7.3. Topologie des Signalpeptids von Lassa präGP-C in der ER-Membran	51
7.3.1. Deletion hydrophober Domänen des Signalpeptids von Lassa präGP-C	51
7.3.2. Selektive Permeabilisierung zur Bestimmung der Topologie des Signalpeptids von Lassa präGP-C	53
7.3.3. Einführung von potentiellen N-Glykosylierungstellen	55
7.3.4. Dimerisierung des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C	56
7.4. Rolle des Signalpeptids für die Reifung des Lassavirus Glykoproteins	58
7.4.1. Einfluss der Signalpeptidspaltung auf die Reifung des Glykoproteins	58
7.4.2. Austausch des Lassavirus präGP-C Signalpeptids durch andere Signalpeptide	59
7.4.3. Koexpression von solitärem Signalpeptid mit chimärem Lassavirus präGP-C	61
7.4.4. Assoziation des Lassavirus Glykoproteins mit Calnexin	63
7.5. Interaktion von Lassavirus GP-C und Signalpeptid	64
7.5.1. Kopräzipitation von Lassavirus GP-C und Signalpeptid	64
7.5.2. Kolokalisation von Lassavirus GP-C und Signalpeptid	65
7.6. Sequenzerfordernisse des Signalpeptids für GP-C-Spaltung	67
7.6.1. N- und C-terminale Mutation des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C	67
7.6.2. Mutationsanalyse des Bereichs zwischen den hydrophoben Regionen des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C	68

7.7. Inkorporation des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C in Virionen	69
7.8. Mutation von Cysteinresten des Lassavirus Glykoprotein Signalpeptids	71
8. Diskussion	73
8.1. Identifikation des Lassavirus präGP-C Signalpeptids	73
8.2. Topologie des Signalpeptids	74
8.3. Bedeutung des Signalpeptids für die Reifung des Glykoproteins	79
8.3.1. Mögliche weitere Funktionen des Signalpeptids	80
8.4. Interaktion zwischen Signalpeptid und Glykoprotein	81
8.5. Modell des Lebenszyklus des Signalpeptids von Lassavirus Glykoprotein präGP-C	83
9. Literaturverzeichnis	85
10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	92
11. Anhang	93
Danksagung	94
Erklärung	95
Lebenslauf	96

1. Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäurerest
BSL	biologische Sicherheitsstufe
CD8	Plasmamembranprotein zytotoxischer T-Zellen
CoIP	Koimmunpräzipitation
C-terminal/-Terminus	carboxyterminal/-Terminus
Endo H	Endoglykosidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GP1	aminoterminal Glykoproteinuntereinheit
GP2	carboxyterminale Glykoproteinuntereinheit
HA	Hämagglutinin
HIV	humanes Immundefizienzvirus
LCMV	Lymphozytäre Choriomeningitis Virus
L	Polymerase des Lassavirus
GP-C	nicht-aktiviertes Glykoproteinvorläufermolekül des Lassavirus
mAb	monoklonaler Mausantikörper
NP	Nukleoprotein des Lassavirus
N-terminal/-Terminus	aminoterminal/-Terminus
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
präGP-C	Glykoproteinvorläufer mit N-terminal gebundenem Signalpeptid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rb	Kaninchen
RIPA	Radioimmunpräzipitationsversuch
S-NHS	Sulfosuccinimidobiotin
SP	Signalpeptid
SPase	Signal-Peptidase
SPPase	Signalpeptid-Peptidase
SRD-12B	Sterolregulations-defizienter Zellklon aus Ovarien chinesischer Hamster
WT	Wildtyp
Z	Matrixprotein des Lassavirus

Aminosäuren wurden mit dem Ein-Buchstaben-Code abgekürzt.

2. Zusammenfassung

Das Oberflächenglykoprotein des Lassavirus ist ein Typ 1-Membranprotein. Es wird als Vorläufer präGP-C synthetisiert und posttranslational mit N-Glykanen modifiziert. Nach der proteolytischen Abspaltung des Signalpeptids wird GP-C in seine beiden Untereinheiten GP1 und GP2 durch die Wirtszellprotease SKI-1/S1P prozessiert. Das Glykoproteins weist nach Analyse mit einem Computerprogramm ein SP von außergewöhnlicher Länge auf. Thema dieser Arbeit war die Charakterisierung dieses SP.

1. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die exakte Länge des Signalpeptids von 58 Aminosäureresten durch N-terminale Sequenzierung der GP1-Untereinheit und Mutationsanalysen der potentiellen Signalpeptidspaltstelle ermittelt.

2. Topologische Untersuchungen ergaben, dass das Signalpeptid des Lassavirus Glykoproteins eine außergewöhnliche Struktur mit zwei hydrophoben Regionen besitzt. Daraus ergeben sich mehrere Möglichkeiten für die Topologie des Signalpeptids in der ER-Membran. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nur die N-terminale der beiden hydrophoben Domänen die ER-Membran durchspannt und damit ein außergewöhnlich langer Abschnitt, der auch die zweite hydrophobe Region umschließt, im ER-Lumen vorliegt.

3. Das Signalpeptid wurde auf zusätzliche Funktionen neben der Translokationsfunktion untersucht. Hierfür wurde das native Signalpeptid durch andere Signalpeptide ausgetauscht. Dieser Austausch verhindert die Reifespaltung des Glykoproteins GP-C in seine beiden Untereinheiten GP1 und GP2. Die Spaltung wird durch Koexpression des solitären ursprünglichen Signalpeptids wiederhergestellt. Mithilfe von Mutationsanalysen wurde der Bereich des Signalpeptids, der für die proteolytische Aktivierung des Glykoproteins essentiell ist, auf den ER-luminalen Anteil des Signalpeptids eingeschränkt. Weiterhin wurde gezeigt, dass besonders der Bereich zwischen beiden hydrophoben Regionen für die Reifung des Glykoproteins notwendig ist. Über Kopräzitationsstudien wurde eine direkte Interaktion zwischen Signalpeptid und Glykoprotein bestätigt. Diese wird über eine Wechselwirkung des Signalpeptids mit der GP2-Untereinheit des Glykoproteins vermittelt.

4. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Signalpeptid ein fester Bestandteil des Virions ist. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Inkorporation des Signalpeptids von der Inkorporation des Glykoproteins abhängig ist und das Signalpeptid selbst keine Transportkompetenz besitzt.

5. Die Signalpeptide der Glykoproteine der Arenaviren sind homolog, eine Austauschbarkeit der Signalpeptide zwischen den Glykoproteinen der Arenaviren wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Die vorgestellten Daten sind daher auf die Signalpeptide der Glykoproteine aller Arenaviren übertragbar.

3. Einleitung

3.1. Das Lassavirus

3.1.1. Taxonomie

Das Lassavirus gehört zur Familie der *Arenaviridae*. Arenaviren sind umhüllte Viren mit einem segmentierten, einzelsträngigen RNA-Genom in negativer Orientierung. Namensgebend für diese Virenfamilie sind die körnigen, bzw. „sandigen“ (lat.: arenosus=sandig) Strukturen, die man in elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt. Die Familie der *Arenaviridae* besteht aus einem Genus und umfasst derzeit 18 Spezies. Aufgrund serologischer Daten, geographischer Verbreitung und phylogenetischer Analysen werden zwei Gruppen innerhalb des Genus definiert. In Europa und Afrika verbreitete Mitglieder bilden die Gruppe der Altwelt-Arenaviren, amerikanische Vertreter bilden den Komplex der Neuwelt-Arenaviren (Abb. 1).

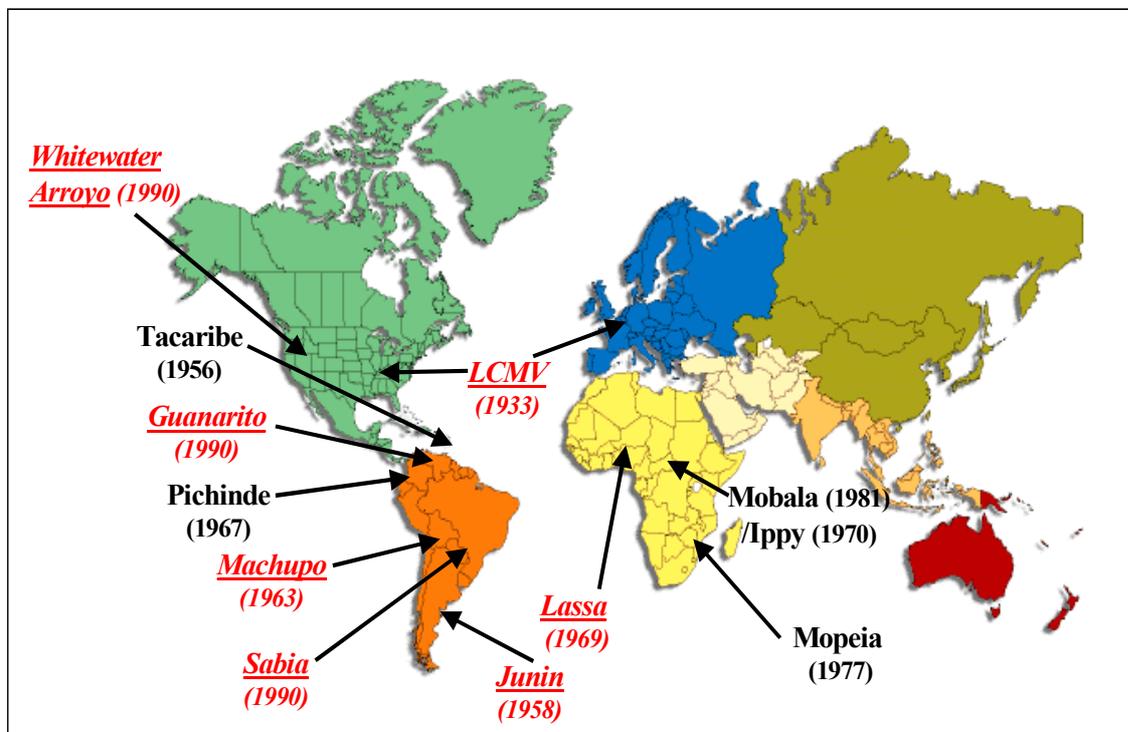


Abb. 1: Verbreitung der Arenaviren. Humanpathogene Viren sind rot und unterstrichen dargestellt. Das Jahr der Isolierung des ersten Vertreters des jeweiligen Virus ist in Klammern angegeben.

3.1.2. Epidemiologie

Das Lassavirus wurde erstmals 1969 nach einer Epidemie mit schwerem hämorrhagischen Fieber im Norden Nigerias beschrieben. Auf Grund der Pathogenität des Virus und des Fehlens einer Therapie und Vakzine erfolgte die Einstufung dieses Erregers in die höchste biologische Sicherheitsstufe (L4 oder BSL4). Das durch Lassaviren verursachte Lassafieber ist endemisch in Westafrika mit jährlich etwa 100000-500000 Infektionen. Etwa 30% der Infektionen verlaufen klinisch apparent mit einer Mortalitätsrate von 10-15% (McCormick et al., 1987). Die Prävalenz von Antikörpern reicht bis 35% in stark betroffenen Regionen Nigerias, Sierra Leones, Guineas und Liberias. Lassavirus-Infektionen verursachen bei ca. 17% seropositiver Personen transiente oder bleibende Hörschäden. Somit spielt das Virus eine wesentliche Rolle als kausales Agens von Schwerhörigkeit in den Verbreitungsgebieten. Etwa 1-2% der Bevölkerung in den betroffenen Gebieten leidet unter Hörverlust (Cummins et al., 1990).

Das natürliche Reservoir des Lassavirus, Nager chronisch infizierter *Mastomys*-Spezies, sind in ganz Westafrika südlich der Sahara heimisch (Abb. 2). Infizierte Tiere erkranken nicht, bleiben jedoch ihr gesamtes Leben virämisch und scheiden das Virus in beträchtlichen Mengen über Urin aus. Der Mechanismus, der zur Ausbildung der persistierenden Infektion führt, ist nicht geklärt.



Abb. 2: Natürlicher Wirt der Lassaviren. Nager der Gattung *Mastomys* sind der natürliche Überträger des Lassavirus. *Mastomys* ist in ganz Afrika verbreitet.

Die Übertragung des Virus auf den Menschen erfolgt über direkten oder indirekten Kontakt. Direkte Übertragung erfolgt in der Regel durch Fang, Zubereitung und Verzehr der Tiere. Eine weitere Infektionsquelle sind mit virushaltigen Nagerexkrementen kontaminierte Lebensmittel (McCormick et al., 1987). Politische Unruhen und Bürgerkriege mit einhergehenden Flüchtlings- und Wanderungsbewegungen führten in der Vergangenheit in endemischen Ländern immer wieder zu Lebenssituationen, die die Exposition der Bevölkerung mit dem Virus begünstigten. Eine adäquate Isolierung und Behandlung infizierter Patienten ist durch die desolate medizinische Versorgung oftmals nicht gewährleistet. Mitarbeiter internationaler Hilfsorganisationen sowie in Endemiegebieten stationierte Friedenstruppen sind selbst dem Risiko einer Infektion ausgesetzt (ter Meulen et al., 2001). Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist insbesondere bei engem Kontakt während der virämischen Phase möglich. Da das Virus während der Rekonvaleszenz bis zu zwei Monate in Urin und Sperma infizierter Personen nachweisbar ist, besteht ein längerfristiges Infektionsrisiko für Lebens- und Sexualpartner betroffener Personen.

Die jahreszeitliche Verteilung von Lassavirus-Infektionen korreliert mit der saisonalen Aktivität des natürlichen Wirtes. So nehmen Infektionen in den Monaten der Ernte durch vermehrten Kontakt mit *Mastomys* zu (McCormick et al., 1987, Monath et al., 1974., Stephenson et al., 1984). Zudem scheint trockenes Wetter die Beständigkeit Lassavirus-haltiger Aerosole zu begünstigen (Stephenson et al., 1984), was ebenfalls Einfluss auf die saisonale Verteilung von Lassavirus-Infektionen haben könnte. Erhöhte Zahlen an Infektionen außerhalb der natürlichen Saison entstehen vor allem durch die Notwendigkeit des Verzehrs von „bush meat“ sowie durch Epidemien aufgrund der Übertragung von Mensch zu Mensch. Während einer Epidemie 1996/97 in Sierra Leone kam es so zu 823 Fällen von Lassafieber mit 153 Toten (Mortalitätsrate: 18,6%).

3.1.3 Klinik, Therapie, Impfung und Prophylaxe

Lassafieber hat eine Inkubationszeit von 5-21 Tagen. Die Erkrankung beginnt in der Regel mit Grippe-ähnlichen Symptomen, Fieber und Unwohlsein. Im weiteren Verlauf steigt das Fieber oft über 39°C mit parallel auftretenden Muskelschmerzen. Typisch sind ebenfalls gastrointestinale Beschwerden. Retrosternale Schmerzen sind ein weiterer Hinweis auf eine Lassavirus-Infektion. Bei etwa einem Drittel aller Patienten kommt es zu Hämorrhagien, erhöhter vaskulärer Permeabilität, Ödemen und Pleuraerguss, was auf einen kritischen Krankheitsverlauf hindeutet. In afrikanischen Krankenhäusern wurde bei hospitalisierten Lassafieber-Patienten eine Mortalität von 15-20% beschrieben. Die Mortalität der nach Europa und in die USA importierten Fälle scheint nicht niedriger zu liegen.

Lassavirus-Infektionen verursachen eine hohe Mortalität bei Schwangeren, besonders im dritten Trimenon der Schwangerschaft. Bis zu 30% der Schwangeren verstirbt während dieser Phase, im Gegensatz zu ca. 13% bei Nicht-Schwangeren. Bis zu 80% der erkrankten Schwangeren verlieren *in utero* oder während der Geburt ihr Kind (Price et al., 1988). In fötalem Gewebe und Plazenta wurden hohe Konzentrationen an Virus nachgewiesen (Walker et al., 1982).

Während der Rekonvaleszenzphase kommt es uni- oder bilateral bei etwa 30% der Patienten zu transienten oder permanenten Hörschäden (Cummins et al., 1990). Die Ursache dieser Hörverluste ist ungeklärt, immunpathologische Prozesse werden in diesem Zusammenhang diskutiert.

Die Therapie ist hauptsächlich supportiv. Der Transport des Patienten sollte vermieden werden, jegliche Injektionen unterlassen sowie der Flüssigkeitshaushalt des Patienten kontrolliert werden. Als Therapeutikum steht das Guanosin-Analogon Ribavirin zu Verfügung. Der Wirkmechanismus ist nicht eindeutig geklärt, doch scheint Ribavirin ein starkes Mutagen zu sein und entsprechend dem Modell der Fehlerkatastrophe (Abb. 3) die Überlebensfähigkeit der Viruspopulation entscheidend schwächen zu können (Crotty et al., 2002). Demnach ist der Großteil einer RNA-Viruspopulation überlebensfähig. Jedoch führt nach diesem Modell bereits eine geringfügige Erhöhung der Mutationsfrequenz die mutagenisierte Viruspopulation (rechts) in die Fehlerkatastrophe, da die Anzahl an Mutationen pro viralem Genom ausreicht, um den Großteil der Viruspopulation letal zu mutagenisieren.

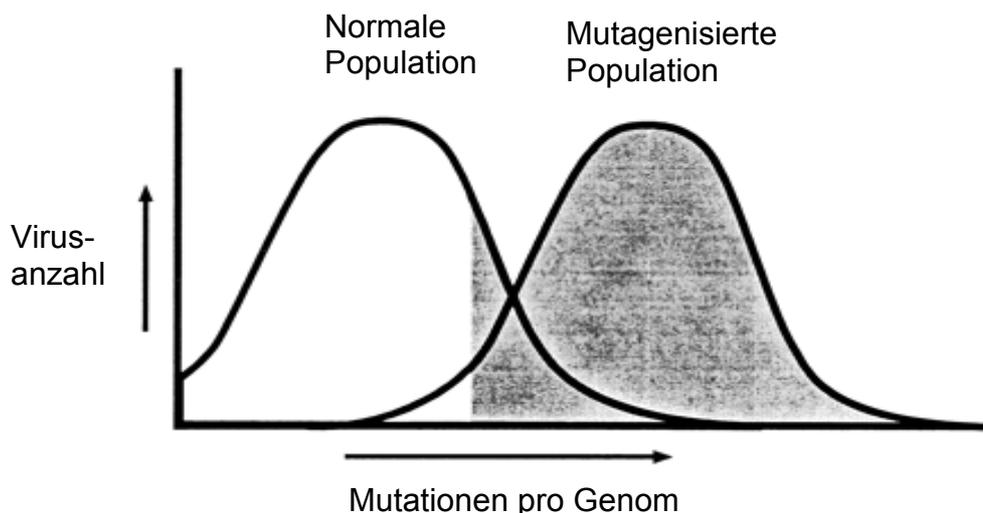


Abb. 3: Modell der Fehlerkatastrophe. Modifiziert nach Crotty et al. (2002). Weiß: überlebensfähiges Virus; grau: nicht vermehrungsfähiges Virus.

Eine Behandlung mit Ribavirin ist allerdings nur dann erfolgversprechend, wenn sie kurz nach Infektion begonnen wird. Somit ist die rechtzeitige Diagnose einer Lassavirus-Infektion unerlässlich. Dies ist jedoch in endemischen Gebieten oftmals nicht gewährleistet (Buchmeier et al., 2001). Ob Ribavirin bei exponierten Personen auch als Prophylaxe angewendet werden sollte, ist umstritten.

Ein Impfstoff steht momentan nicht zur Verfügung. Ein auf Vacciniavirus basierender Impfstoff, mit dem das Lassavirus Glykoprotein und Nukleoprotein appliziert werden, zeigte in nicht-humanen Primaten teilweise vielversprechende Erfolge (Fisher-Hoch et al., 2000). Allerdings sind bislang weder die Kreuzprotektivität zwischen verschiedenen Virusisolaten noch die Immunpathologie der Lassavirus-Infektion ausreichend geklärt, um eine krankheitsinduzierende Wirkung der Vakzinierung ausschließen zu können (ter Meulen et al., 1999). Erfolge mit dem attenuierten Lebendimpfstoff „Candide 1“ bei der Bekämpfung des argentinischen hämorrhagischen Fiebers, das durch das verwandte Junivirus verursacht wird, lassen die Entwicklung einer Lassavirus-Vakzine möglich erscheinen.

3.2. Biologie der Lassaviren

3.2.1. Virusstruktur und Replikation

Lassaviren sind pleomorphe lipidumhüllte Partikel mit einem Durchmesser von 60-200 nm. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen körnige Strukturen innerhalb der Partikel, wobei es sich wahrscheinlich um Ribosomen handelt, die bei der Virusmorphogenese von der Wirtszelle aufgenommen und mitgeführt werden (Abb. 4). Die Bedeutung dieses Phänomens ist unklar, doch scheint die Anwesenheit von Ribosomen im Viruspartikel keinen Einfluss auf die Virusinfektiosität zu haben. In die Lipidhülle sind Multimere der viralen Glykoproteine GP1 und GP2 eingelagert. Das Nukleokapsid besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Segmenten, mit denen die RNA-abhängige RNA-Polymerase L, das Matrixprotein Z sowie das Nukleoprotein NP assoziiert sind. Das größere der beiden RNA-Segmente, das L-Segment, ist ca. 7,2 kb, das kleinere S-Segment etwa 3,5 kb groß. Sowohl innerhalb eines Segmentes als auch zwischen L- und S-Segment sind etwa 20 Nukleotide an jedem Ende weitgehend komplementär, sodass sich quasizirkuläre, pfannenstielähnliche Strukturen ausbilden können.

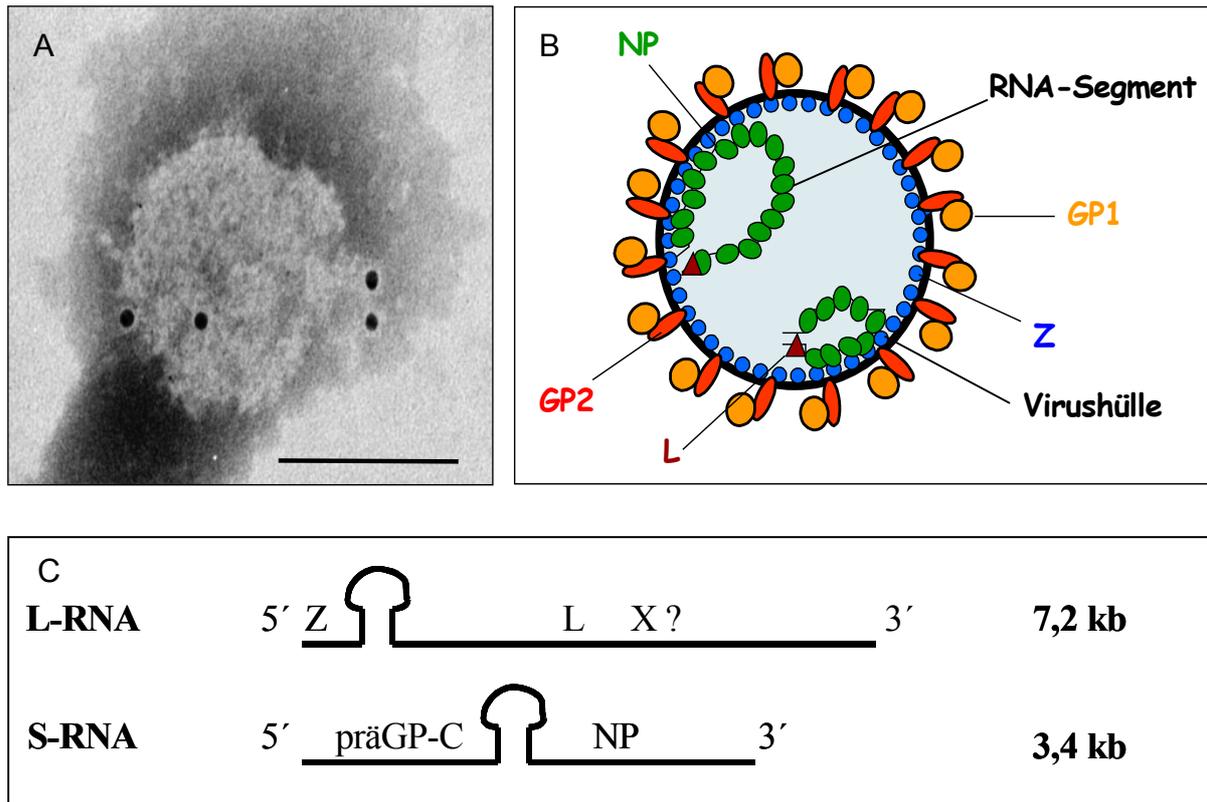


Abb. 4: Struktur und Genom des Lassavirus. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Lassaviren (Eichler et al., im Druck). Die GP2-Untereinheit wurde immungefärbt (schwarze Punkte). Balken: 100 nm. B) Schematische Darstellung eines Lassaviruspartikels. Lassaviren sind umhüllte Viren, die ein RNA-Genom in „ambisense“-Orientierung besitzen. Das periphere Glykoprotein GP1 ist nicht-kovalent mit dem membranverankerten GP2 verbunden. Das Virion besitzt ein bisegmentiertes ssRNA-Genom, das zusammen mit dem Nukleoprotein NP und der viralen Polymerase L den Ribonukleoprotein-Komplex bildet. Das Matrixprotein Z ist membranassoziiert und könnte, wie hier schematisch angedeutet, mit dem Ribonukleoproteinkomplex aus RNA und Nukleoprotein interagieren. C) Das große RNA-Segment (L-RNA) mit einer Größe von 7,2 kb kodiert in positiver Orientierung für das Z-Protein und eventuell für ein weiteres Protein (X). Das L-Protein wird in negativer Orientierung kodiert. Das kleine Segment (S-RNA) kodiert für den Glykoproteinvorläufer GP-C in positiver und das Nukleoprotein NP in negativer Orientierung.

Diese Enden sind zwischen verschiedenen Arenaviren konserviert. Beide Segmente kodieren für je zwei Proteine in „ambisense“-Orientierung, d.h. das am 5'-Ende liegende Gen ist in positiver Orientierung wie eine mRNA kodiert, das am 3'-Ende gelegene Gen in der konventionellen negativen Orientierung. Bei der Transkription wird demnach eine zur viralen RNA komplementäre mRNA generiert, welche die Translation des entsprechenden Proteins einleitet (Abb. 5).

Die Leserahmen der Gene werden von einer nicht-translatierten, etwa 200 Nukleotide langen intergenischen Region getrennt, die vermutlich als Terminationssignal dient. Diese GC-reiche Region scheint eine stabile haarnadelähnliche Struktur auszubilden.

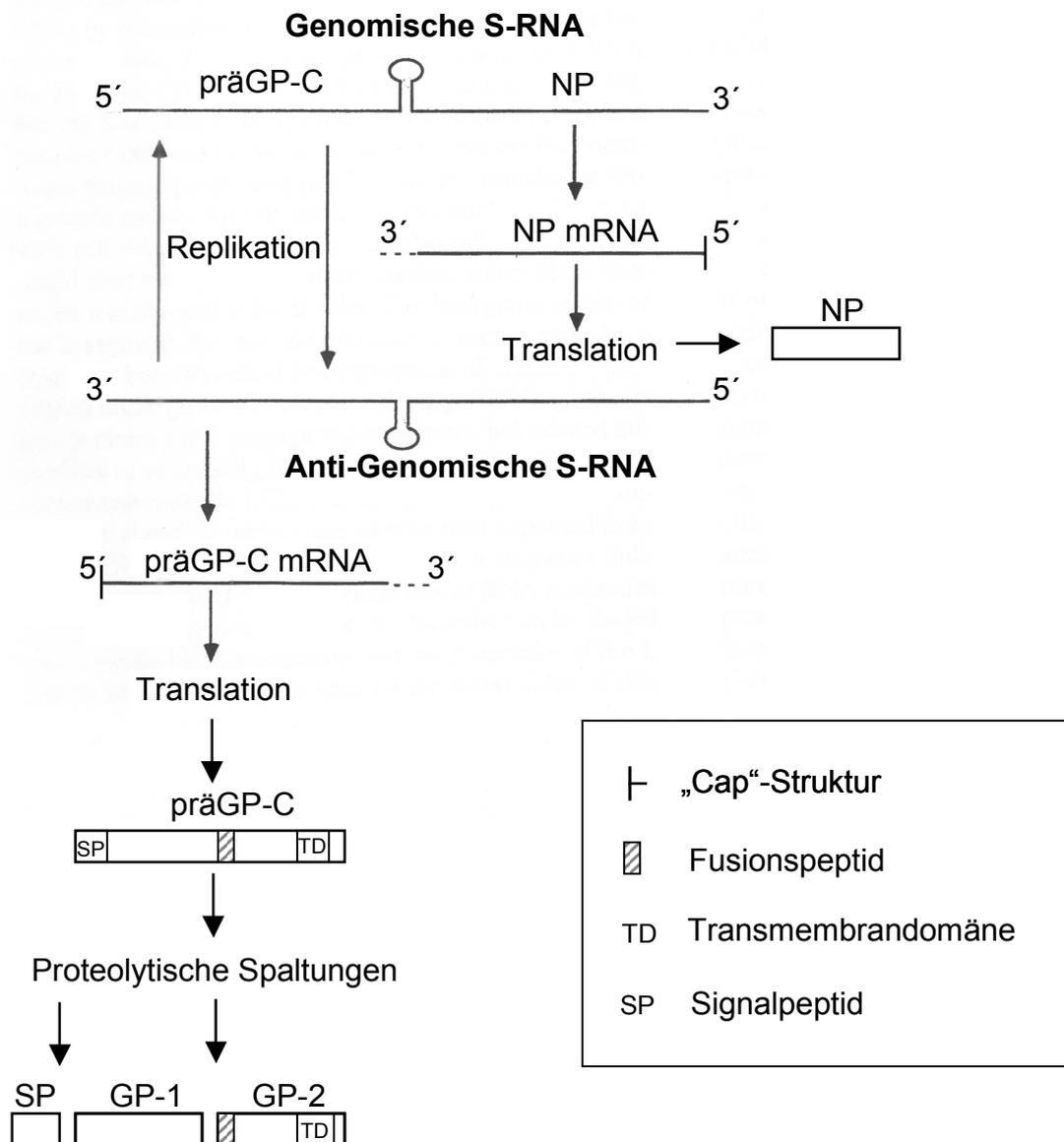


Abb. 5: Schematische Darstellung der Transkription, Translation und Genomreplikation des S-Segmentes des Lassavirus. Nach Infektion der Zelle wird durch die virale Polymerase L der 3'-Bereich des S-Segmentes in die mRNA für das Nukleoprotein NP transkribiert und anschließend translatiert. Die genomische S-RNA wird repliziert, wobei eine anti-genomische RNA als Matrize dient. Von der anti-genomischen RNA wird außerdem die mRNA für den Glykoproteinvorläufer GP-C transkribiert. Nach der Translation von präGP-C werden durch proteolytische Spaltung das SP, das periphere Glykoprotein GP1 und das membranständige GP2 generiert (siehe Anhang). Das hier dargestellte Schema für das S-RNA-Segment gilt im Prinzip genauso für das größere L-RNA-Segment. Durch die Transkription wird eine zur viralen RNA komplementäre mRNA generiert, die zur Translation des Proteins verwendet wird. Die in positiver Orientierung vorliegende RNA wird wahrscheinlich als komplementäre anti-genomische RNA transkribiert, von der im Anschluss die mRNA transkribiert wird.

Der offene Leserahmen am 5'-Ende des S-Segments kodiert für den Glykoproteinvorläufer GP-C, das 3'-Ende für das Nukleoprotein NP. Das L-Segment kodiert in seinem 5'-Ende für das Matrixprotein Z und am 3'-Ende für die virale Polymerase L. Innerhalb des offenen Leserahmens für die virale Polymerase befindet sich bei LCMV und Lassavirus in entgegengesetzter Orientierung zu L ein weiterer offener Leserahmen, der für ein etwa 95 Aminosäurereste langes Protein X kodieren könnte. Ob dieser Leserahmen tatsächlich genutzt wird, ist ungeklärt (Salvato et al., 1989; Djavani et al., 1997).

Das L-Segment kodiert für das Z-Protein und die virale Polymerase L. Das Z-Protein oder p11 enthält ein RING-Finger Motiv, also eine potentiell Zink-bindende Struktur. Für das Z-Protein von LCMV wurde diese Aktivität belegt (Salvato und Shimomaye, 1989). Es wird spekuliert, dass das RING-Motiv Zink-abhängig eine Bindung an weitere Proteine vermittelt. So bindet Z an das Promyelotische Leukämie Protein (PML), das nukleäre Aggregate mit weiteren Proteinen bildet, und relokalisiert PML in das Zytoplasma (Borden et al., 1998). PML wiederum soll eine Bedeutung für die Interferon-Sensitivität bei LCMV haben (Djavani et al., 2001). Desweiteren wurde ein negativer regulatorischer Effekt von Z auf Transkription und Replikation des LCMV-Genoms beschrieben (Cornu und de la Torre, 2001).

Neueste Daten zeigen, dass das Z-Protein die treibende Kraft bei der Virusknospung ist. Z enthält zwei Tetrapeptidmotive, PTAP und PPPY, die für die Knospung von virus-ähnlichen Partikeln notwendig sind (Strecker et al., 2003; Perez et al., 2003). Diese sogenannten „late domains“ wurden bereits für eine Vielzahl von Matrixproteinen anderer RNA-Viren beschrieben. Die Bezeichnung leitet sich von der Bedeutung dieser Tetrapeptidmotive „spät“ im viralen Infektionszyklus ab. Für HIV-1 wurde gezeigt, dass eine Mutation der „late domain“ zu einem schwerwiegenden Defekt in der Virusfreisetzung führt. Entsprechende Mutanten zeigen lange Ketten von Partikeln als Folge eines unterbrochenen Abschnürungsprozesses (Freed et al., 2002). Eine Mutation dieser entsprechenden Tetrapeptid-Motive beim Lassavirus Z-Protein führt zu einem drastischen Abfall der Partikelfreisetzung. Desweiteren wurde gezeigt, dass Z membranassoziiert ist, eine Interaktion mit dem Nukleoprotein aufweist sowie eine strukturelle Komponente des Virions ist (Strecker et al., 2003; Eichler et al., im Druck). Alle diese Eigenschaften verdeutlichen, dass Z das Matrixprotein der Arenaviren ist.

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase L besitzt eine Größe von ca. 250 kDa und ist vermutlich mit dem Ribonukleinsäure-Protein-Komplex (RNP) assoziiert, da aufgereinigte RNPs Polymeraseaktivität aufweisen. L weist funktionelle Domänen auf, die typisch für Polymerasen negativ-strängiger RNA-Viren sind. Da die virale mRNA im Gegensatz zum viralen Genom und anti-Genom am 5'-Ende eine sogenannte Cap-Struktur, gefolgt von 4-5 nicht-viruskodierten Nukleotiden aufweist, wird angenommen, dass L eine Domäne besitzt,

die Cap-Strukturen von zellulären mRNAs abschneidet und an die virale mRNA anhängen kann („Cap-snatching“).

Das NP ist das häufigste Strukturprotein der Arenaviruspartikel mit etwa 1500 Molekülen pro Virion (Buchmeier et al., 2001). Es hat eine Größe von 570 Aminosäureresten mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 60 kDa. Für Pichindevirus, ein Neuwelt-Arenavirus, wurde gezeigt, dass 70% aller markierten Virusproteine NP sind (Buchmeier et al., 2001). 2 h nach Infektion ist NP-mRNA detektierbar, nach 12 h NP-Protein. Damit sind NP-mRNA als auch NP die frühesten generierten viralen Produkte bei einer Arenavirus-Infektion. Wahrscheinlich spielt die Menge an intrazellulärem NP eine wichtige Rolle bei der Regulation von Transkription und Translation. Für LCMV wurde in einem rekombinanten System gezeigt, dass NP zusammen mit L notwendig und ausreichend für die Replikation und Transkription LCM-viraler RNA-Analoga ist (Lee et al., 2000). Das NP ist vollständig im Zytoplasma lokalisiert. Desweiteren wurde mit Hilfe von Quervernetzungsreagenzien bei LCMV eine Assoziation des NP mit dem zytoplasmatischen Anteil von GP2 gezeigt (Burns und Buchmeier, 1991).

3.2.2. Das Glykoprotein der Arenaviren

Der 5'-Terminus des S-Segments der Arenaviren kodiert für den Glykoproteinvorläufer präGP-C. Dieser wird in Signalpeptid und GP-C gespalten (Abb. 6). GP-C wird posttranslational in das N-terminale, periphere GP1 und das membranständige GP2 durch die Subtilase SKI-1/S1P proteolytisch prozessiert (Lenz et al., 2001). PräGP-C ist ein Typ 1-Membranprotein mit, je nach Virus, 8-16 potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Lassavirus präGP-C (Stamm Josiah) ist 491 Reste lang und enthält 11 potentielle N-Glykosylierungsstellen. Welche davon genutzt werden ist ungeklärt. GP-C besitzt bei errechnetem Molekulargewicht von 55 kDa im glykosylierten Zustand ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 76 kDa.

Die C-terminale Untereinheit von GP-C, GP2, besitzt einen hydrophoben Bereich zwischen Position 427 und 450, der die GP2-Untereinheit in der Membran verankert. C-terminal schließt sich ein 41 Reste langer basischer zytoplasmatischer Bereich an. Es wird vermutet, dass dieser Bereich mit dem NP, respektive RNP, des Virus interagiert und so eine Rolle bei der Virusfreisetzung an der Zellmembran spielt. Am N-Terminus von GP2 befindet sich eine hydrophobe Domäne, die vermutlich als Fusionspeptid fungiert (Glushakova et al., 1990). Mit artifiziellen Membranen wurde eine Fusionsaktivität eines Peptids aus diesem Bereich gezeigt (Glushakova et al., 1992). Strukturanalysen zeigen, dass GP2 hoch-konservierte Wiederholungen von Leucin- oder Isoleucinresten, sogenannte „Heptad-Repeats“, besitzt,

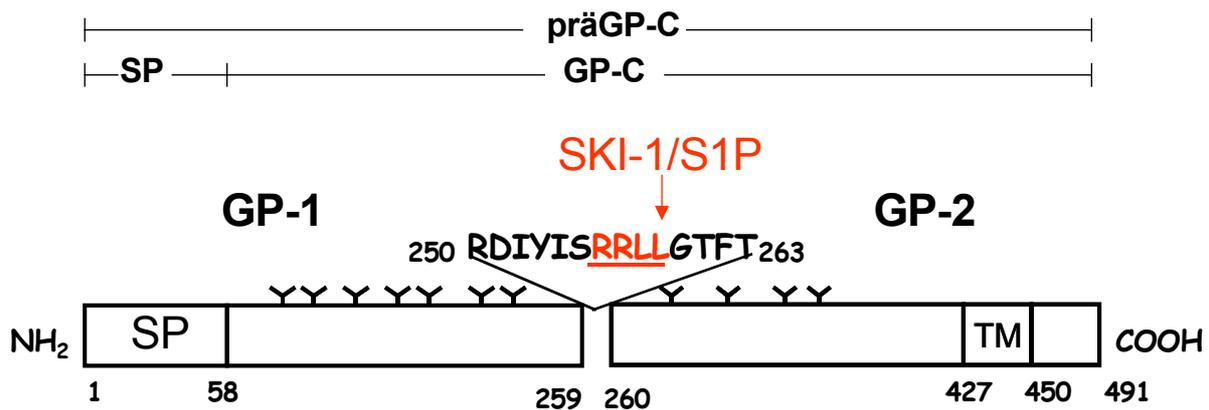


Abb. 6: Schema des Lassa-virus Glykoproteinvorläufers präGP-C. Darstellung des Lassa-virus-Glykoproteinvorläufers präGP-C und dessen Spaltprodukte GP1 und GP2. Der umgebende Bereich der Spaltstelle von GP-C durch SKI-1/S1P ist im Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren vergrößert dargestellt, das Erkennungsmotiv für SKI-1/S1P ist mit einem Balken unterlegt. SP: Signalpeptid; TM: Transmembrandomäne; Y: potentielle N-Glykosylierungsstellen.

was die Ausbildung eines dreifach umwundenen alpha-helikalen Stranges („coiled-coil“) begünstigt. Wie für etliche virale Glykoproteine beschrieben, könnte diese Struktur ebenfalls bei Arenaviren für die Fusion relevant sein (Gallaher et al., 2001). Für LCMV ist beschrieben, dass GP1 und GP2 im Virus als Homotetramer vorliegen. Für die GP1-Struktur sollen Disulfid-Brücken verantwortlich sein, die Bindung an den Membrananker GP2 erfolgt jedoch vermutlich über ionische Wechselwirkungen (Burns und Buchmeier, 1991). Innerhalb von LCMV GP1 befindet sich die rezeptorbindende Domäne. Die Rezeptorbindung konnte bei LCMV *in vitro* durch neutralisierende Antikörper blockiert werden. Der Mechanismus neutralisierender Immunsereen beruht daher vermutlich unter anderem auf einer Inhibition der Interaktion zwischen GP1 und dem zellulären Rezeptor des Lassa-virus (Borrow und Oldstone, 1992). Der zelluläre Rezeptor von Lassa-virus und LCMV ist alpha-Dystroglykan, ein peripheres Membranprotein, das nicht-kovalent an das membranverankerte beta-Dystroglykan gebunden ist (Cao et al., 1998). Dieser Komplex ist in den meisten Geweben und Organen vorhanden und vermittelt die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix (Durbeej et al., 1998). Die Bindungsfähigkeit des LCMV GP1 scheint, neben Wirtsfaktoren wie z.B. Alter des Tieres, von Bedeutung für die Etablierung persistierender Infektionen zu sein. Weiterhin wird spekuliert, dass besonders für Viren mit niedriger Affinität für alpha-Dystroglykan, speziell Neuwelt-Arenaviren wie Olivero Virus, weiteren Rezeptoren eine wichtige Rolle für die Virusaufnahme zukommt (Smelt et al., 2001; Spiropoulou et al., 2002).

Für das LCMV Glykoprotein wurde gezeigt, dass die Spaltung in GP1 und GP2 etwa 75-90 min nach der Translation erfolgt. Diese sogenannte Reifungs- oder Aktivierungsspaltung erfolgt im späten Golgi-Apparat oder Trans-Golgi-Netzwerk, nachdem das Protein komplex

glykosyliert wurde (Wright et al., 1990). Wird die Glykosylierung unterbunden, wird LCMV GP-C nicht mehr korrekt transportiert, die Reifespaltung erfolgt nicht und es werden keine infektiösen Viren freigesetzt. Untersuchungen des Neuwelt-Arenavirus Junin zeigten ebenfalls, dass die Glykosylierung notwendig für den Transport und die Reifung infektiöser Viren ist, die Modifikation mit komplexen Zuckern scheint jedoch nicht erforderlich (Padula und de Martinez-Segovia, 1984; Silber et al., 1993). Im Gegensatz zu LCMV wird Lassavirus GP-C schon früh im sekretorischen Transportweg gespalten (Lenz et al., 2001). Durch systematische Analyse der potentiellen Glykoprotein-Spaltstelle wurde gezeigt, dass die Spaltung des Lassavirus Glykoproteins GP-C an einem neuartigen Konsensusmotiv (RRLL) hinter einem nicht-basischen Rest erfolgt (Abb. 6, Lenz et al., 2000). Diese Aktivierungs- oder Reifespaltung erfolgt im späten ER oder frühen Golgi-Apparat durch die Subtilase SKI-1/S1P (Lenz et al., 2001), ein Enzym, das eine wichtige Rolle im Cholesterinmetabolismus spielt. Erfolgt die Reifespaltung des Glykoproteins in seine beiden Untereinheiten GP1 und GP2 nicht, werden keine infektiösen Virionen produziert, da nur proteolytisch prozessiertes Glykoprotein in Viruspartikel integriert wird. Kürzlich wurde SKI-1/S1P ebenfalls als prozessierende Protease des LCMV GP-C sowie des Glykoproteins des Krim-Kongo Hämorrhagischen Fieber Virus, einem Bunyavirus, identifiziert (Beyer et al., 2003; Vincent et al., 2003). Da nicht alle potentiellen Spaltstellen der Glykoproteine der Arenaviren dem Konsensusmotiv der Protease SKI-1/S1P entsprechen, werden zukünftige Studien zeigen müssen, ob alle Glykoproteine der Arenaviren durch dieses Enzym aktiviert werden.

3.2.3. Infektionszyklus

Reife Viruspartikel besitzen auf ihrer Oberfläche Multimere des peripheren GP1, die über ionische Wechselwirkungen mit dem membranverankerten GP2 verbunden sind. GP1 bindet an den zellulären Rezeptor alpha-Dystroglykan. Die Aufnahme der Viruspartikel erfolgt vermutlich durch endozytotische Vesikel, die nicht Clathrin-umhüllt sind (Borrow und Oldstone, 1994). Durch Ansäuerung dieser Vesikel dissoziiert GP1, das Fusionspeptid in GP2 wird nach Konformationsänderung exponiert und vermittelt vermutlich die Fusion von Virushülle und Endosomenmembran. Die RNP-Komplexe gelangen durch die Fusionspore ins Zytoplasma, wo Transkription und Translation eingeleitet werden. Die mRNAs werden an membrangebundenen Ribosomen translatiert und präGP-C kotranslational in das Lumen des ER transloziert. Das Signalpeptid wird abgespalten, GP-C posttranslational in GP1 und GP2 durch die Wirtszellprotease SKI-1/S1P gespalten, somit in seine aktive Form überführt und an die Zelloberfläche transportiert. Hier erfolgt der Zusammenbau viraler Partikel und die Freisetzung von infektiösem Virus.

3.3. Signalpeptide und deren Bedeutung

3.3.1. Struktur von Signalpeptiden

Die Funktion zellulärer Proteine hängt besonders von ihrer korrekten subzellulären Lokalisation ab. Etwa die Hälfte aller Proteine einer eukaryotischen Zelle überqueren nach ihrer Synthese im Zytoplasma eine Membran (Schatz und Dobberstein, 1996; Johnson und von Waes, 2001). Proteine nutzen Signalsequenzen, um mit der zellulären Translokationsmaschinerie zu interagieren. Diesen Signalsequenzen kommt eine entscheidende Rolle bei der Translokation und Membraninsertion von Proteinen zu. Abhängig von dem Kompartiment, in das das entsprechende Protein dirigiert werden soll, unterscheidet sich auch dessen Signalsequenz. Nukleäre Lokalisationssignale tragen beispielsweise ein internes basisches Motiv, peroxisomale Proteine besitzen C-terminal das Motiv SKL (Schatz und Dobberstein, 1996). Sekretorische Proteine nutzen N-terminale Signalsequenzen oder -peptide (SP), um mit dem Translokator der ER-Membran zu interagieren (Blobel und Dobberstein, 1975). Die Länge sekretorischer SP variiert in der Regel zwischen 15 und 25 Aminosäureresten. Diese SP besitzen eine dreigeteilte Struktur (Abb. 7): Einen N-terminalen, in der Regel basischen Abschnitt mit stark variierender Länge (n-Region), eine zentrale hydrophobe Domäne (h-Region) mit einer Länge von 6-15 Aminosäureresten, die absolut notwendig für die Membraninsertion des Peptids ist, sowie einen kurzen C-terminalen polaren Bereich, der mit kleinen ungeladenen Resten in Position -1 und -3 die Signalpeptidspaltstelle bestimmt (c-Region) (von Heijne, 1985). Resultierend aus der universellen Struktur von SP können diese zwischen verschiedenen Proteinen oder sogar Organismen ohne Verlust der Translokationsfunktion ausgetauscht werden (Izard und Kendall, 1994).

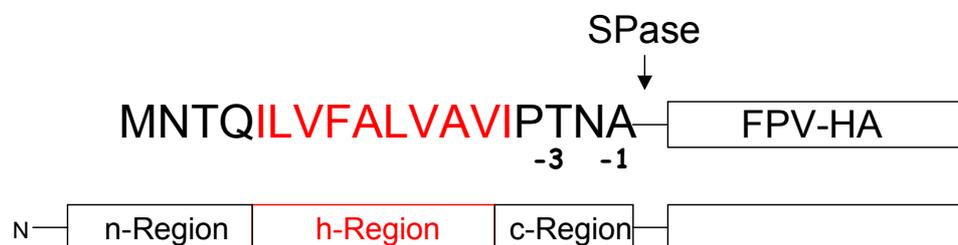


Abb. 7: Struktur von Signalpeptiden. Signalpeptide besitzen eine dreigeteilte Struktur: eine N-terminale hydrophile Region, eine hydrophobe Domäne (rot) und eine polare c-Region. Als Beispiel ist das Signalpeptid des Hämagglutinin des Geflügelpestvirus (FPV) gezeigt. Die Spaltstelle durch Signal-Peptidase (SPase) ist durch einen Pfeil angegeben.

3.3.2. Prozessierung von Signalpeptiden

N-terminale Signalsequenzen sekretorischer Proteine werden kotranslational von ihrem Protein abgespalten. Das membranassoziierte prozessierende Enzym, Signal-Peptidase (SPase), gehört zur Familie der Serinproteasen und ist ein fester Bestandteil des Translokons der ER-Membran. Die Aktivität der SPase ist essentiell für die Überlebensfähigkeit der Zelle. Die Struktur des bakteriellen Proteins ist gelöst (Paetzel et al., 1999). Die eukaryotische Signal-Peptidase unterscheidet sich von der bakteriellen durch das Vorhandensein zusätzlicher Untereinheiten, die Substratspezifität scheint jedoch sehr ähnlich zu sein. Das Sequenzmotiv für die Spaltung durch SPase besteht aus einer hydrophoben Region 2-9 Aminosäurereste N-terminal der Spaltstelle sowie kleinen, ungeladenen Resten in Position -1 und -3.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine weitere Protease an der Prozessierung von Signalpeptiden beteiligt sein kann. Das Enzym Signalpeptid-Peptidase (SPPase), eine Präsenilin-ähnliche Aspartatprotease, spaltet intramembranär Signalpeptide innerhalb der h-Region. Das N-terminale Fragment des SP wird in das Zytosol freigesetzt, wo es abgebaut wird, oder in besonderen Fällen zusätzliche Funktionen annimmt (Braud et al., 1998). Für eine Prozessierung durch SPPase sind polare und helixbrechende Reste in der Mitte der h-Region essentiell. Aminosäurereste mit langen oder sperrigen Seitenketten in der Mitte der h-Region, sowie basische Reste, die die h-Region flankieren, inhibieren eine Spaltung durch SPPase (Lemberg und Martoglio, 2002).

3.3.3. Signalpeptide und zusätzliche Funktionen

Bis vor wenigen Jahren dominierte die Ansicht, dass Signalpeptide lediglich ihr Protein in das ER translozieren und danach entbehrlich sind und rapide durch Oligopeptidasen abgebaut werden. In den letzten Jahren häufen sich jedoch Hinweise, dass Signalpeptide vielfältige zusätzliche Funktionen ausüben können, die weit über ihre ursprüngliche Translokationsfunktion hinausgehen.

So wurde gezeigt, dass das SP des MHC Klasse I-HLA-Proteins intramembranär gespalten und ein SP-Fragment an der Zelloberfläche nahezu jeder nukleären menschlichen Zelle präsentiert wird und so die Biosynthese von MHC Klasse I-Molekülen dem Immunsystem mitteilt (Braud et al., 1998). Damit unterscheidet das Immunsystem effektiv zwischen körpereigenen und fremden Zellen.

Für das Signalpeptid des HIV-Hüllproteins gp120 wurde gezeigt, dass ein N-terminales Fragment in das Zytosol freigesetzt wird. Dieses interagiert effizient mit Calmodulin

(Martoglio et al., 1997). Das gleiche SP soll in seiner vollen Länge eine Retention des Glykoproteins im ER bewirken (Li et al., 2000). Die biologische Funktion beider Aktivitäten ist jedoch bislang ungeklärt.

Weiterhin wurde ein immundominantes T-Zell-Epitop im SP des LCMV Glykoproteins gefunden, das von MHC Klasse I-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert wird (Buchmeier und Zinkernagel., 1992; Hombach et al., 1995; Hudrisier et al., 1997).

Schließlich wurde für das SP des Foamyvirus Glykoproteins eine essentielle Rolle bei der Viruspartikelreifung diskutiert (Lindemann et al., 2001). Dieses knapp 150 Aminosäurereste lange SP ist für die Spezifität der Interaktion zwischen dem Glykoprotein und Viruskapsid verantwortlich und außerdem ein Bestandteil des reifen Virions.

4. Zielsetzung

Signalpeptide besitzen eine essentielle Funktion im Lebenszyklus sekretorischer Proteine. Durch Interaktion mit der Translokationsmaschinerie ermöglichen sie die Insertion ihrer Proteine in das ER. Dort werden Signalpeptide kotranslational durch das Enzym Signalpeptidase abgespalten und in der Regel zügig abgebaut. Einige Signalpeptide sind von außergewöhnlicher Länge und weisen zusätzliche Funktionen neben Ihrer Translokationsfunktion auf. Das Signalpeptid des Lassavirus Glykoproteins präGP-C besitzt eine mit einem Computerprogramm vorhergesagte Länge von 58 Aminosäureresten, verglichen mit etwa 15-25 Resten bei gewöhnlichen Signalpeptiden. Da Lassaviren eine höchst effiziente Ausnutzung ihrer Kodierungskapazität mit nur vier Genen besitzen, war daher anzunehmen, dass das Signalpeptid des Lassavirus Glykoproteins nicht ausschließlich eine Translokationsfunktion besitzt.

1. In dieser Arbeit sollte das Signalpeptid des Lassavirus Glykoproteins präGP-C zunächst identifiziert werden. Zur Identifikation des Signalpeptids sollte der N-Terminus von der GP1-Untereinheit bestimmt sowie die potentielle Signalpeptid-Spaltstelle mutiert werden.

2. Das Signalpeptid sollte auf strukturelle Besonderheiten hin untersucht werden. Hierzu sollten topologische Untersuchungen zur Orientierung des Signalpeptids in der ER-Membran durchgeführt werden.

3. Das Signalpeptid sollte durch funktionelle Untersuchungen auf eine mögliche zusätzliche Funktion neben der Translokationsfunktion überprüft werden. Um eine zusätzliche Funktion des Signalpeptids nachweisen zu können, sollten Hybridglykoproteine mit ausgetauschtem Signalpeptiden generiert und deren Verhalten in geeigneten Expressionssystemen untersucht werden. Zusätzlich sollte eine mögliche Interaktion mit viralen oder zellulären Proteinen studiert werden.

4. Ein möglicher Transport des Signalpeptids an die Zelloberfläche und in virale Partikel sollte untersucht werden.

Auf der Basis dieser Ergebnisse sollte die Bedeutung des Signalpeptids des Lassavirus Glykoproteins für den viralen Infektionszyklus geklärt werden.

5. Material

5.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Nicht näher bezeichnete Standardchemikalien wurden von den Firmen Biorad (München), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Sigma (Deisenhofen) und Riedel-de-Haen (Seelze) bezogen.

Acrylamid - Roth, Karlsruhe
BSA (Rinderserumalbumin) - Sigma, Deisenhofen
Digitonin - Sigma, Deisenhofen
DNA-Längenstandard III, VI und IX - Roche, Mannheim
FCS (Fötale Kälberserum) – PAA, Österreich
Gewebekulturflaschen – Greiner, Nürtingen
Jodacetamid - Sigma, Deisenhofen
KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) – Gibco BRL, Eggenstein
Lipofektamin 2000 - Invitrogen, Karlsruhe
Mowiol - Calbiochem, Bad Soden
N-Ethylmaleimid – Sigma, Deisenhofen
OptiMEM - Gibco BRL, Eggenstein
Optiprep – Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd – Serva, Heidelberg
Protein A-Sepharose - Sigma, Deisenhofen
Rainbowmarker - Amersham Biosciences, Freiburg
Röntgenfilme: BIOMAX MR – Kodak, USA
Sulfosuccimidobiotin (Sulfo-NHS-Biotin) - Calbiochem, Bad Soden
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin) – Bayer, Leverkusen
Trasylol - Bayer, Leverkusen
Tween 20 – Serva, Heidelberg
Zellschaber - Costar, USA

5.2. Enzyme

Alkalische Phosphatase - Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen - New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Streptavidin-Peroxidase - Amersham Biosciences, Freiburg
T4 DNA-Ligase - MBI, St. Leon-Rot
Taq DNA-Polymerase - Qiagen, Hilden
Trypsin/EDTA - Gibco BRL, Eggenstein
Endo H – New England Biolabs, Schwalbach
PNGase F – New England Biolabs, Schwalbach

5.3. Antiseren

Anti-Kaninchen IgG (Schwein)/HRP - Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Maus IgG (Schaf)/HRP - Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Kaninchen IgG (Ziege)/Rhodamin – Jackson Immunoresearch, USA
Anti-Kaninchen IgG (Ziege)/FITC – DAKO, Dänemark
Anti-Maus IgG (Ziege)/FITC - DAKO, Dänemark
Anti-Maus IgG (Ziege)/Rhodamin - Dianova, Hamburg

Anti-FLAG (Kaninchen) – Sigma, Deisenhofen
 Anti-FLAG M2 (Kaninchen) - Sigma, Deisenhofen
 Anti-Calnexin (Kaninchen) – Stressgen Bioreagents, USA
 Anti-HA (Kaninchen) – Babco, USA

5.4. Kits

DNA Sequencing Kit - Perkin Elmer
 ECL Detection Kit - Amersham, Braunschweig
 HiSpeed Plasmid Maxi Kit - Qiagen, Hilden
 QIAprep Spin Miniprep Kit - Qiagen, Hilden
 QIAquick Gel Extraction Kit - Qiagen, Hilden
 QIAquick PCR Purification Kit - Qiagen, Hilden
 SuperSignal, West Dura Extended Duration Substrate- Pierce, USA

5.5. Vektoren

pTM1 eukaryonter Expressionsvektor, erhalten von Dr. Sutter, GSF, München (Moss, 1990)
pCAGGS eukaryonter Expressionsvektor, erhalten von Dr. Miyazaki, Japan (Niwa et al., 1991)

5.6. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) und der Firma Qiagen Operon (Köln) synthetisiert.

Die Sequenzen der Primer sind in 5'→3'-Richtung aufgeführt.

Primer zur Mutation der Signalpeptidspaltstelle des Lassavirus prägp-c-Gens

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
G54R(a)	GTGCAAGACCTACGACACAACAGGAG
G54R(b)	CTCCTGTTGTGTCGTAGGTGTTGCACAACC
S56R(a)	GACTGGTTGTGCAACGCCTACCACACAAC
S56R(b)	GTTGTGTGGTAGGCGTTGCACAACCAGTC
T58R(a)	GACTGGTCCTGCAAGACCTACCACACAAC
T58R(b)	TCTTGCAGGACCAGTCTTTATAAAG
S60R(a)	CCCTTTATAAAGTCTGGTTGTGCAAG
S60R(b)	GGTCTTGACAACCAGACTTTATAAAGGG

Primer zum Austausch des Signalpeptids des Lassavirus prägp-c-Gens

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
CD8-SP/GP-C	GTAGAATTCATGGCCTTACCAGTGACCGCC
CD8-SP/GP-C(a)	CTTTATAAAGACTGGTCCTGGCGGCGTGGAGCAGCAAG

CD8-SP/GP-C(b)	CACGCCGCCAGGACCAGTCTTTATAAAGGGGTTTATG
HA-SP/GP-C(a)	ATACCCGGGATGAACACTCAAATCCTGGTTTTTC
HA-SP/GP-C(b)	TTTATAAAGACTGGTAATTTTGTCTGCATTTGTGGG
HA-SP/GP-C(c)	AATGCAGACAAAATTACCAGTCTTTATAAAGGGG
LCMV-SP/GP-C(a)	GTACCCGGGATGGGTGTCAGATTGTGACAATG
LCMV-SP/GP-C(b)	CTTTATAAAGACTGGTGCCACAGGACCTACCAGCC
LCMV-SP/GP-C(c)	GGTCCTGTGGCACCAGTCTTTATAAAGGGG

Primer zur Deletion des Lassavirus prägp-c-Gens

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
Δ2-17	GTACCCGGGATGGTGATGAACATTGTTCTCATTG
Δ2-30	GTACCCGGGATGGCAGTGCTGAAAGGTCTG
Δ2-41	GTACCCGGGATGGGCCTTGTTGGTTTGGTCAC
Δ2-58	GTACCCGGGATGACCAGTCTTTATAAAGGGG
Δ18-32(a)	GTACAGACCTTTCTTCTTATTACATGAGGCAC
Δ18-32(b)	GTAATAGAAGAGAAAGGTCTGTACAATTTTG
Δ43-52(a)	GCAAGACCTACCACAGCCACACGTTGCAAATTG
Δ43-52(b)	GGCTGTGGTAGGTCTTGACAACC
Δ62-491 (BglII)	CAAAGATCTCTAAAGACTGGTTGTGCAAGACC
Δ62-491 (XhoI)	CAACTCGAGCTAAAGACTGGTTGTGCAAGACC

Primer zur Einführung antigener Epitope in das Lassavirus prägp-c-Gen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
SP-FLAG-N	GACCCGGGATGGACTACAAGGATGACGACGATAAGG GACAAATAGTGACATTCTTC
SP-FLAG-M(a)	GTCGTACAGACCTTTCAGCACTGCTAGTAC
SP-FLAG-M(b)	CTGAAAGGTCTGTACGACTACAAGGATGACGACGAT
SP-FLAG-C(a)	CGTCGTCATCCTTGTAGTCCAACAGGAGGAAAGTGACC
SP-FLAG-C(b)	GATGACGACGATAAGTCTTGACAACCAGTCTTTATAAAG
SP-FLAG-C(c)	GACAGATCTCTAAAGACTGGTTGTGCAAGACTTATCGTC
SP-HA-N	GCAGAATTCATGTATCCCTACGATGTACCGGACTATGCA GGACAAATAGTGACATTCTTCCAGGAAG
SP-HA-M(a)	GACGTCGTACGGATACAGACCTTTCAGCACTGCTAGTAC
SP-HA-M(b)	GTACGACGTCCCGGACTACGCGAATTTTGCAACGTGTG GCCTTG
SP-HA-C	TGGTTGTGCAAGATGCATAGTCCGGTACATCGTAGGG ATACAACAGGAGGAAAGTGACCAAACC

Primer zur Einführung von N-Glykosylierungsstellen in das Lassavirus prägp-c-Gen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
FLAGN-terGlyk	GCACCCGGGATGAATGCCACCGACTACAAGGATGACG ACG
SP-GlycQ9(a)	CTGTCGCGTTGAAGAATGTCACTATTTGTCCC
SP-GlycQ9(b)	CAACGCGACAGAAGTGCCTCATGTAATAGAAG
SP-Glyc-N(a)	CTGTCGCGTTGAAGAATGTCACTATTTGTCCC
SP-Glyc-N(b)	CAACGCGACAGAAGTGCCTCATGTAATAGAAG
SP-Glyc-M(a)	TCTAATAACACATCTTCAGACTACAAGGATGACGACGAT
SP-Glyc-M(b)	AGATGTGTTATTAGATGACGCGTAGTCCGGGACGTCC TAC
SP-Glyc-M3(a)	GTTATTATTGTTCTGGTAATTTGAAGATGTGTTATTAGATG ACGC
SP-Glyc-M3(b)	TACCAGAACAATAATAACCAGAATTTTGCAACGTGTG GCCTTGTTG

Primer zur Amplifikation des Lassavirus prägp-c-Gens

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
WT/präGP-C (a)	AAACCCGGGATGGGACAAATAGTGACATTC
WT/präGP-C (b)	CAAAGATCTCTATCTCTTCCATTTACAGG

Primer zur Mutation von Cysteinresten des Lassavirus prägp-c-Gens

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
SP G2C	GATGAATTCATGGACTACAAGGATGACGACGATA AGTGTCAAATAGTGACATTCTTCCAGGAAG
SP C57S	CAACTCGAGCTAAAGACTGGTTGTGGAAGACC
SP C57S/C53S	CAACTCGAGCTAAAGACTGGTTGTGGAAGACCTACC AGACAACAGGAG
C41S(a)	CCAACAAGGCCAGACGTTGCAAATTG
C41S(b)	CAATTTTGCAACGTCTGGCCTTGTTGG
C53S(a)	GCAAGACCTACCAGACAACAGGAGGAAAGTGACC
C53S(b)	GGTAGGTCTTGACAACCAGTCTTTATAAAG
C53S/C57S(a)	GGAAGACCTACCAGACAACAGGAGGAAAGTGACC
C53S/C57S(b)	GGTAGGTCTTCCACAACCAGTCTTTATAAAG
C57S(a)	GGAAGACCTACCACACAACAGGAGGAAAGTGACC
C57Sh(b) siehe C53S/C57S(b)	
C279S(a)	GGGGGATATTCTCTGACCAGGTGGATGCTAATT
C279S(b)	CCACCTGGTCAGAGAATATCCCCCTGGTGTGTC

C292S(a)	TGTGTTCCCGAAGGATTTTAGTTCAGC
C292S(b)	GCTGAACTAAAATCCTTCGGGAACACA
C301S(a)	GTGGCAAATCTAATGAGAAGCATGATGAGGAA
C301S(b)	ATGCTTCTCATTAGATTTTGCCACAGCTGTGTTCCC
C310S(a)	CCTCAGCATGTCAGAAAATTCCTCATC
C310S(b)	GATGAGGAATTTTCTGACATGCTGAGG
C364S(a)	CTTGCTGTAATTAGAGTATGGAATTCC
C364S(b)	GGAATTCCATACTCTAATTACAGCAAG
C385S(a)	CTGCCAAATCTTGGCTTGTATCAAATGGT
C385S(b)	TGATACAAGCCAAGATTTGGGCAGTGATGTTCTCCC

Primer zur Mutation der C-Region des Signalpeptids des Lassavirus prägp-c-Gens

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
A35-40(a)	GCTGCAGCGGCTGCAGCGTGTGGCCTTGTGGTTTG GTCAC
A35-40(b)	CGCTGCAGCCGCTGCAGCACCTTTCAGCACTGCTAGT ACAG
35-40inv(a)	ACAGCATTTAATTACCTCTGTGGCCTTGTGGTTTG GTCAC
35-40inv(b)	GAGGTAATTAATGCTGTACCTTTCAGCACTGCTAGTA CAG
A33-37(a)	TGCCGCTGCGGCAGCCAGCACTGCTAGTACAGACAG
A33-37(b)	GCTGCCGCAGCGGCATTTGCAACGTGTGGCCTTGTTG
A38-42(a)	TGCCGCTGCGGCAGCATTGTACAGACCTTTCAGCAC
A38-42(b)	GCTGCCGCAGCGGCACTTGTGGTTTGGTCACTTTC
A43-48(a)	TGCCGCTGCAGCGGCAGCGCCACACGTTGCAAAT GTAC
A43-48(b)	GCTGCCGCTGCAGCGGCATTCCTCCTGTTGTGTGGTAGG

Primer zur Sequenzierung des Lassavirus prägp-c-Gens

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
pTM 1 (1321-1245)	GGCCTCGGTGCACATGCTTTACATG
pTM 1 (1556-1530) R	GTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCC
pCAGGS	CCTTCTTCTTTTTCTACAG
pCAGGS R	CCTTTATTAGCCAGAAGTCAG
LaJsgpc (51-75)	GGTGATGAACATTGTTCTCATTGC
LaJsgpc (180-158)R	CTGGTTGTGCAAGACCTACCAC
LaJsgpc (448-468)	GTATGAGGCAATGAGCTGCG
LaJsgpc (635-660)	GTATTATGACTAGTTATCAATATCTG

LaJsgpc (780-748)R	GCCTAGCAATCTTCTACTAATATAAATATCTC TAG
LaJsgpc (951-930)R	CAAACAGCCTCAGCATGTAC
LaJsgpc (1068-1090)	CGGGACATCATGGGAATTCCATAC

5.7. Oligopeptide

Die Oligopeptide wurden mit einem ABI 432A Peptid-Syntheseapparat (Applied Biosystems) von Dr. M. Krause (Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg) hergestellt.

NP	<i>H₂N-LMRKERRDDNDLKRLRDLNQAVC-COOH</i>
GP1	<i>H₂N-CQFSRPSPIGYLGLLSQRTRDIYIS-COOH</i>
SP	<i>H₂N-GQIVTFFQEVPHVIEEVC-COOH</i>
GP2-N	<i>H₂N-LGTFTWTLSDSEGKDTPGGYC-COOH</i>
GP2-C	<i>H₂N-CGLYKQPGVPVKWKR-COOH</i>
Z	<i>H₂N-CGAADSIRPPPYSP-COOH</i>

Alle Peptide wurden homolog zur Sequenz von Lassavirus, Stamm Josiah, ausgewählt. Der Zusatz N oder C bezieht sich auf die Position des Peptids innerhalb des Proteins am N- oder C-Terminus.

5.8. Zelllinien

Vero-76-Zellen - Epithelzelllinie aus der Niere der afrikanischen Grünen Meerkatze (*Ceropithecus aethiops*) ATCC CRL-1587

Vero-E6-Zellen (C1008) - Epithelzelllinie aus der Niere der afrikanischen Grünen Meerkatze (*Ceropithecus aethiops*) ATCC CRL-1586

SRD-12B-Zellen – SKI-1/S1P-defizienter CHO-K1-Zellklon. Ursprünglich erhalten von Dr. Goldstein (Rawson et al., 1998)

5.9. Bakterien

Escherichia coli, Stamm XL1-Blue – [K12, recA 1, lac, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, (F'proAB, lacIq, lacZ, dM15, Tn10)],
Fa. Stratagene, Heidelberg

5.10. Viren

Lassavirus, Stamm Josiah - Lassavirus aus Sierra Leone (GenBank P08669). Erhalten von Dr. J. ter Meulen. Kloniertes Lassavirus präGP-C wurde von Dr. O. Lenz erhalten.

5.11. Medien und Puffer

5.11.1. Puffer

Anodenpuffer I	1 M Tris	300 ml
	Ethanol	200 ml
		ad 1 l dH ₂ O
Anodenpuffer II	1 M Tris	25 ml
	Ethanol	200 ml
		ad 1 l dH ₂ O
Kathodenpuffer	1 M Tris	25 ml
	Aminocaprinsäure	5,25 g
	Ethanol	200 ml
		ad 1 l dH ₂ O
Laufpuffer (10x)	SDS	10 g
	Tris	30 g
	Glyzin	144 g
		ad 1 l dH ₂ O
Anodenpuffer (Tricin-SDS-PAGE) (5x)	Tris	121 g
		ad 1 l dH ₂ O
Kathodenpuffer (Tricin-SDS-PAGE) (5x)	Tris	60,5 g
	Tricin	89,5 g
	SDS	5 g
		ad 1 l dH ₂ O

RIPA-Puffer (pH 7,5)	10 % Triton X-100	10 ml
	10 % DOC	10 ml
	10 % SDS	1 ml
	1 M Tris (pH 7,5)	2 ml
	3 M NaCl	3 ml
	0,5 M EDTA	2 ml
	TrasyloI	5 ml
	Jodacetamid	185 g
	ad 1 l dH ₂ O	

frisch zusetzen: 1 mM PMSF

CoIP-Puffer	1 M Tris	10 ml
	5 M NaCl	10 ml
	0,5 M EDTA	5 ml
	1 % NP40	5 g
	0,4 % Deoxycholate	2 g
	25 mM Jodacetamid	2,3 g
	TrasyloI	5 ml
	ad 500 ml dH ₂ O	
	frisch zusetzen: 1 mM PMSF	

Gelpuffer	Tris	181,7 g
	SDS	1,5 g
	ad 1 l dH ₂ O	

SDS-Probenpuffer (4x)	0,5 M Tris pH 6,8	4 ml
	SDS	0,4 g
	Glyzerin	4 ml
	2 % Bromphenolblau	0,1 ml
	dH ₂ O	1,2 ml
	β-Mercaptoethanol	0,4 ml

TAE-Puffer (50x)	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
	ad 1 l dH ₂ O	

5.11.2. Medien für Bakterienkultur

LB-Medium	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	ad 1 l dH ₂ O	

LB-Agarplatten LB-Medium mit 1,5 % Bactoagar; Antibiotika
(100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Tetracyclin) werden nach
dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C zugesetzt.

TSS-Puffer 85 % LB-Medium 85 ml
10 % Polyethylenglykol 10 g
5 % Dimethylsulfoxid 5 ml
50 mM MgCl₂ 1,02 g
ad 100 ml dH₂O

5.11.3. Puffer und Medien für Zellkultur

PBS⁺⁺ NaCl 8,0 g
(Phosphat-gepufferte KCl 0,2 g
Lösung) Na₂HPO₄ 1,15 g
MgCl₂ 0,1 g
KH₂PO₄ 0,2 g
CaCl₂ 0,13 g
ad 1 l dH₂O

PBS^{def} wie PBS⁺⁺ ohne MgCl₂ und CaCl₂

Dulbeccos Medium Dulbeccos MEM Modifikation; nach einem hauseigenen Rezept
von Gibco, BRL in zweifach konzentrierter (2x) Form
hergestellt.

Dulbeccos Medium Dulbeccos MEM Modifikation; ohne Cystein und Methionin,
-Cystein/-Methionin Sigma, Deisenhofen

6. Methoden

6.1. Virologische Methoden

6.1.1. Virusinfektion- und reinigung

Lassaviren wurden von Dr. O. Lenz unter BSL 4-Bedingungen in Vero- oder SRD-12B-Zellen angezüchtet. Zur Herstellung von Virussuspensionen wurden konfluente Zellen zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit einer Virusverdünnung (0,1 bis 1 plaque forming units (pfu) pro Zelle) für 2 h bei 37°C inokuliert. Nach Abnahme des Inokulums wurden die Zellen einmal gewaschen und mit Dulbeccos Medium mit 2 % FCS für 2 bis 4 Tage bei 33°C kultiviert. Die Virusernte erfolgte, sobald 80 bis 90 % der Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten. Dazu wurde zum einen der virushaltige Zellkulturüberstand durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit und aliquotiert. Zum anderen wurde der Zellrasen in 10 ml serumfreies Optimum abgekratzt und zellassoziertes Virus durch zweimaliges Frieren und Tauen freigesetzt. Die Virussuspension wurde nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C aufbewahrt. Zur Reinigung von Virus wurde der Zellkulturüberstand infizierter Vero- oder SRD-12B-Zellen durch niedertourige Zentrifugation von Zelltrümmern befreit. Anschließend wurde die Virussuspension mit einer 20 %igen Saccharoselösung unterschichtet und 2 h bei 20000 UpM, 4°C zentrifugiert. Das konzentrierte und partiell gereinigte Viruspellet wurde anschließend in 4,5 ml PBS resuspendiert.

6.2. Molekularbiologische Methoden

6.2.1. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der selektiven Amplifikation von DNA-Sequenzen. Dabei werden an einer Matrizen-Doppelstrang-DNA durch zwei Oligonukleotide (Hin- und Rück-Primer), die zu jeweils einem der beiden Stränge komplementär sind, neue DNA-Stränge für das jeweils am Gegenstrang hybridisierende Oligonukleotid enzymatisch synthetisiert. Durch etwa 30 malige Wiederholung eines Zyklus, bestehend aus einem Denaturierungs-, einem Hybridisierungs- und einem Syntheseschritt, kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des zwischen den Oligonukleotiden gelegenen DNA-Abschnittes. Entscheidend für die PCR ist die Hitzestabilität der verwendeten DNA-

Polymerase. Sie wurde ursprünglich aus dem hyperthermophilen Archaeon *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) isoliert.

Für diese Arbeit wurde das PCR Core Kit (Qiagen) sowie ein programmierbarer Heizblock (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) verwendet.

Reaktionsansatz:

PCR-Puffer (10x)	5 µl
DNA-Matrize	200 ng
Hin-Primer	100 pmol
Rück-Primer	100 pmol
dNTP-Mischung	4 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1 µl
dH ₂ O	ad 100 µl

Zyklusparameter:

Denaturierung vor dem ersten Zyklus	95°C		5 min
		30x	
Denaturierung	95°C		1 min
Primeranlagerung	50°C		1 min
DNA-Synthese	72°C		1 min/kb
DNA-Synthese nach dem letzten Zyklus	72°C		7 min
			4°C

Nach Ablauf der Reaktion wurden die PCR-Fragmente gereinigt mit dem QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, nach den Angaben des Herstellers gereinigt und durch Agarose-Gelelektrophorese auf Größe und Reinheit überprüft.

6.2.2. Rekombinante Mutagenese

Die rekombinante Mutagenese dient der Einführung von ein- oder mehrfachen Nukleotidaustauschen sowie von größeren Deletionen und Insertionen in Plasmid-DNA (Higuchi et al, 1988). Mit dieser Methode werden zwei PCR-DNA-Fragmente konstruiert, die in überhängenden Bereichen, die jeweils die gewünschte Mutation enthalten, komplementär sind. Nach Hybridisierung beider Fragmente mit anschließender Auffüllreaktion erhält man ein fusioniertes PCR-DNA-Fragment, das mittels anschließender PCR amplifiziert wird. Dieses Fragment wird durch Restriktionsendonukleasen geschnitten und in das entsprechende Plasmid ligiert. Pro PCR-Ansatz wurden 50 bis 250 ng Plasmid-DNA und jeweils 125 ng Hin- und Rück-Primer verwendet.

6.2.3. Hybridisierungs- und Auffüllreaktion

Um die zwei PCR-DNA-Fragmente aus der ersten PCR zu fusionieren, wurden sie nach Denaturierung mit den jeweiligen überlappenden Enden einer Hybridisierungs- und Auffüllreaktion unterworfen.

Dazu wurden ca. 10 ng der gereinigten PCR-DNA-Fragmente mit den passenden überlappenden Enden zu einem PCR-Reaktionsansatz ohne Primer gegeben.

Zyklusparameter der Hybridisierungs- und Auffüllreaktion:

Zyklusparameter:

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

Nach der Hybridisierungs- und Auffüllreaktion wird der Reaktionsansatz in ein neues Reaktionsgefäß, in das je 0,1 nmol (Endkonzentration 1 µM) der beiden äußeren Primer vorgegeben wurden, transferiert. Es folgte eine Standard-PCR mit 30 Zyklen. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden gereinigt, im Agarosegel überprüft und einem Restriktionsverdau unterzogen, um nach Extraktion aus einem Agarosegel für die Klonierung eingesetzt zu werden.

6.2.4. Bestimmung von DNA und Oligonukleotidkonzentrationen über UV-Absorption

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

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

6.2.5. Verdau doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA wird durch Behandlung mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau) in Fragmente definierter Größe und mit definierten 5'- und 3'-Enden zerlegt. Für jedes Enzym werden vom Hersteller geeignete Restriktionspuffer unterschiedlicher Salzkonzentrationen und pH-Werte empfohlen.

Reaktionsansatz:

dsDNA (0,2-0,5 µg)	1 µl
Inkubationspuffer (10x)	1 µl
Restriktionsendonuklease (ca. 5 U)	1 µl
dH ₂ O	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde für präparative Zwecke 4 h bei 37°C inkubiert und anschließend gereinigt oder zur quantitativen Analyse 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

6.2.6. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

DNA-Fragmente werden über Elektrophorese in Agarosegelen ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. DNA-Fragmente werden im Gel nach Anfärbung mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und bei Bedarf aus dem Gel ausgeschnitten. Die Agarose wurde mit TAE-Puffer (1x) aufgekocht und nach Abkühlung wurde Ethidiumbromid-Lösung in einer Konzentration von 0,5 µg/10 ml Gel hinzugegeben. Das Gel wurde als Horizontalgel mit eingehängtem Kamm gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE-Puffer (1x). Die aufzutrennenden Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer, Endkonzentration 1x, versetzt. Die Elektrophoresespannung betrug 5 V/cm, bezogen auf den Abstand der Elektroden. Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter UV-Licht analysiert. Ein DNA-Größenstandard ermöglichte die Größenbestimmung und eine grobe Mengenabschätzung einzelner DNA-Fragmente.

6.2.7. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung in einem präparativen TAE-Agarosegel wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel unter langwelligem UV-Licht (360 nm) ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe des QIAquick Gel

Extraction Kits nach Angaben des Herstellers (Qiagen) isoliert. Der Reinheitsgrad der DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

6.2.8. Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

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

Reaktionsansatz:

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

Der Ansatz wurde 3 h bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend inaktiviert (65°C; 15 min).

6.2.9. Auffüllung überhängender DNA-Enden mit Nukleotiden durch Klenow-Enzym

Mit Klenow-Enzym und freien Nukleotiden (dNTPs) können überhängende DNA-Enden aufgefüllt und somit zu stumpfen Enden modifiziert werden.

Reaktionsansatz:

Restriktionsverdaute DNA	50 µl
dNTPs (je 1 µl pro Nukleotid)	4 µl
Klenow-Enzym (3 U/µl)	1 µl
Klenow-Puffer (10x)	7 µl
dH ₂ O	ad 70 µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem PCR-Reinigungskit gereinigt.

6.2.10. Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase

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

Reaktionsansatz:

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

Die Ligationsreaktion wurde für 8-16 h bei 16°C inkubiert. Als Ligationskontrolle diente linearisierter Vektor ohne Insert-DNA. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde für die Transformation kompetenter Bakterien benutzt.

6.2.11. Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*

Bestimmte Bakterienstämme (z.B. *E. coli* XL1-Blue) werden durch Inkubation mit geeigneten Chemikalien (z.B. Calciumchlorid oder Dimethylsulfoxid) zur Aufnahme von DNA befähigt (Chung et al., 1989). Diese kompetenten Bakterien nehmen während Inkubation auf Eis DNA auf. Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 30 ml LB-Medium mit 600 µl einer Übernackkultur (ÜNK) von *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von ungefähr 0,5 bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf Eis gekühlt, für 10 min bei 4000 UpM, 4°C zentrifugiert und schließlich in 3 ml eiskaltem Transformations- und Lagerungs (TSS)-Puffer resuspendiert. 50 µl kompetente Bakterien wurden mit DNA versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz 1,5 min auf 42°C erwärmt (Temperaturschock) und anschließend 0,5 ml LB-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden auf LB/Antibiotika-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die gewachsenen resistenten Kolonien wurden in Flüssigkultur vermehrt und die Plasmid-DNA nach Standardmethoden isoliert und analysiert.

6.2.12. DNA-Präparation

Zur Isolierung zirkulärer, extrachromosomaler Plasmid-DNA wurden Bakterien einer alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) unterzogen, die chromosomale DNA mit den Zellresten präzipitiert und die episomale DNA über Silikamembranen oder Anionen-

Austausch-Chromatographie isoliert. Für diese Arbeit wurden das QIAprep Spin Miniprep Kit sowie das QIAfilter Plasmid Maxi Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde photometrisch ermittelt.

6.2.13. Enzymatische Sequenzierung von DNA

Die Methode basiert auf der enzymatischen Synthese von DNA und Kettenabbruch durch Dideoxynukleotide *in vitro* (Sanger et al., 1977). Hier wurde das ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) verwendet. Ausgangspunkt für die enzymatische Synthese von DNA entlang eines als Matrize dienenden DNA-Einzelstranges ist ein Oligonukleotid (Primer), das zu einem bestimmten Teil der Matrize komplementär ist und mit diesem hybridisiert. Die AmpliTaq DNA-Polymerase FS katalysiert in Gegenwart aller vier Deoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und der vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs die Polymerisation der zur Matrize komplementären Sequenz. Während der Synthesereaktion, die in mehreren Zyklen abläuft, kommt es durch Einbau der ddNTPs zu statistisch verteilten Abbrüchen der Kettenpolymerisation, da die ddNTPs nicht die notwendige 3'-OH-Gruppe für die 5'-3'-Phosphodiesterbindung besitzen. Da die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, kann in diesem System die Sequenzierungsreaktion in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden.

Nach der Sequenzierungsreaktion werden die DNA-Fragmente durch Ethanolfällung von nicht-eingebauten ddNTPs gereinigt und dann in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fluoreszenz wird mit Hilfe eines Lasers detektiert und die DNA-Sequenz über eine spezielle Software ausgewertet.

Reaktionsansatz:

Prämix:	4 µl
-A-,C-,G-,T-Dye Terminator	
-dITP, dATP, dCTP,dTTP	
-Tris (pH 9,0), MgCl ₂	
-hitzestabile Pyrophosphate	
-AmpliTaq DNA-Polymerase FS	
dsDNA	0,5 µg
Primer	100 pmol
dH ₂ O	ad 20 µl

Zyklusparameter:

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

6.2.14. Reinigung von DNA-Fragmenten

Ethanol-Fällung:

Der Sequenzieransatz wurde mit 2 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,6-5,2 und 50 µl Ethanol (abs.) versetzt, 10 min bei RT inkubiert und die DNA pelletiert (13000 UpM; 30 min). Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet, mit Probenpuffer versetzt und auf das Sequenziergel aufgetragen.

6.2.15. *In vitro*-Transkription/Translation

Mit Hilfe des Coupled-*In-Vitro*-Translation Kits (Promega) besteht die Möglichkeit, ein Gen in einem Expressionsvektor mit T7-Promotor zu transkribieren und translatieren. Hierbei wird das Protein nach Transkription durch Kaninchen-Retikulozytenlysate translatiert, wobei es durch Zugabe von radioaktivem ³⁵S-Methionin markiert wird.

Reaktionsansatz:

DNA (0,7 µg)	1 µl
Nuklease-freies Wasser	3 µl
³⁵ S-Methionin 10 µCi/µl	1 µl
TNT T7-Quick Master Mix:	20 µl
-Kaninchen Retikulozytenlysate	
-TNT-Retikulozyten Puffer	
-T7 RNA-Polymerase	
-Aminosäuren (ohne Methionin)	
-RNasin (RNA-Inhibitor)	

Der Translationsansatz wurde 90 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert, mit Probenpuffer versetzt, das Protein über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie ausgewertet.

6.3. Zellkultur

Zur Expression von Fremdprotein mittels Expressionsvektoren sowie zur Virusanzucht wurden Vero, Vero E6- und SRD-12B-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 250 ml-Plastikflaschen (Greiner) gezüchtet und in Brutschränken mit 5% CO₂ begast und bei 37°C inkubiert. Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank ausgeführt, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden. Als Kulturmedium wurde für Vero- und Vero E6-Zellen 1xDulbeccos MEM (DMEM) mit 10 % FCS verwendet, SRD-12B-Zellen wurden in DMEM/nutrients mixture F12 Ham mit 5 % FCS passagiert. Zu dem Medium für SRD-12B-Zellen wurde zusätzlich Cholesterin (13 mM), Mevalonat (1 mM) und Oleat (20 µM) beigemischt. Der konfluente Zellrasen einer 250 ml-Kulturflasche wurde mit PBS^{def} gewaschen und anschließend die Zellen mit 3 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Die vereinzelt Zellen wurden in 20 ml Medium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt (1/10 bis 1/40). Die Zellen wachsen nach dem Umsetzen innerhalb von 3-7 Tagen zu einem konfluenten Zellrasen zusammen, woraufhin sie wieder vereinzelt und in neuen Gefäßen ausgesät wurden.

6.3.1. Transfektion von Zellen mit Lipofektamin 2000

Lipofektamin (Gibco) ist eine Liposomen-Mischung aus kationischen Phospholipiden. Die Lipofektamin 2000-Methode zeichnet sich durch eine hohe Transfektionseffizienz aus.

Transfektionsansatz für eine 6cm-Schale:

A: 10 µg DNA	B: 12 µl Lipofektamin 2000
500 µl OptiMEM	500 µl OptiMEM

Die Lösungen A und B wurden jeweils 2 min einzeln bei RT inkubiert, bevor A und B vereinigt, kurz gemischt und für 20 min bei RT inkubiert wurden. Das Transfektionsmedium wurde zusammen mit 3 ml Medium auf die Zellen gegeben. Nach 6-8 h wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 16-32 h die Expression der Proteine analysiert.

6.4. Herstellung polyklonaler Immunsereen aus Kaninchen

Zur Gewinnung von Antisereen, welche einen genau definierten Bereich des Signalpeptids des Glykoproteins GP-C des Lassavirus (Stamm Josiah) erkennt, wurden homologe Oligopeptide mit einem terminalen Cysteinrest hergestellt. Da ein Oligopeptid meist zu klein ist, um eine ausreichende Immunantwort in Kaninchen zu induzieren, wurden die Cysteinreste der Peptide kovalent mittels eines N-(α -Maleimid)-Succinimids an ein Trägerprotein, das sogenannte „Keyhole Limpet Hemocyanin“ (KLH), gekoppelt. Hierzu wurden 1-2 mg Peptid in 10 mM NaH₂PO₄ gelöst und mit 2 mg in H₂O gelöstem KLH mit N-(α -Maleimid)-Succinimid (molares Verhältnis: 1:1) unter inerten Bedingungen (d.h. unter Argon) gemischt (pH7) für 2-3 h bei RT inkubiert. Das gekoppelte Peptid wurde für jeweils zwei Immunisierungen eingesetzt.

Erstimmunisierung: Die gekoppelten Peptide wurden durch zwei über eine Kanüle verbundene Spritzen 1:1 mit komplettem Freund's Adjuvans gemischt und den Kaninchen subkutan injiziert. Freund's Adjuvans ist eine Suspension von inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* in Paraffinöl.

Nachimmunisierung (Boost): Zur Nachimmunisierung wurden die Kaninchen alle 2-4 Wochen mit demselben gekoppelten Peptid wie bei der Erstimmunisierung, das mit unkomplettem Freund's Adjuvans (ohne *Mycobacterium*) 1:1 suspendiert wurde, immunisiert. Nach jeder Immunisierung wurden den Kaninchen 5 ml Blut entnommen und der Immunstatus mittels Peptid-ELISA bestimmt. Es wurde so lange nachimmunisiert, bis die gewünschte Immunantwort gegeben war.

Serumgewinnung: Frisches Blut wurde zum Defibrinieren 1 h bei 37°C inkubiert und daraufhin ü. N. bei 4°C aufbewahrt, um eine Kontraktion des Blutpfropfes zu erreichen. Der Blutpfropfen wurde anschließend bei 4.000 UpM und 4°C abzentrifugiert, das klare Serum vorsichtig abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

6.5. Methoden zum Nachweis von Proteinexpression und -funktion

6.5.1. Immunoblot

6.5.2. Lyse von Zellen für Immunoblot

Transfizierte Zellen wurden mit PBS⁺⁺ gewaschen und in 1 ml PBS^{def} geschabt. Anschließend wurden die bei 2000 UpM für 5 min bei 4°C pelletierten Zellen in 80-100 μ l SDS-Probenpuffer mit oder ohne Mercaptoethanol lysiert. Nach einer Ultraschallbehandlung

bei 40 Watt für 3 x 30 Sekunden (Sonifier 450; Branson) wurden die Proben für 5 min bei 97°C aufgeköcht und unlösliche Aggregate für weitere 5 min bei 13000 UpM abzentrifugiert.

6.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen hauptsächlich auf Grund ihrer Masse in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch trennen (Laemmli et al., 1970). Das Proteingemisch wird zunächst unter Zusatz von SDS (engl.: sodium dodecyl sulfate) gelöst, einem Detergenz, das die Hydrathülle und damit fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört und sich über hydrophobe Wechselwirkungen an das Protein anlagert. Im Gel können die Proteine durch Färbung mit dem Farbstoff Coomassie-Blue oder bei radioaktiv markierten Proteinen durch Auflegen eines Röntgenfilms nachgewiesen werden. Weiterhin können die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen werden, wo sie sich durch entsprechende immunchemische Nachweisverfahren detektieren lassen.

Material:

10%ige Trenngellösung für zwei Gele:		3,75%ige Sammelgellösung für zwei Gele:	
dH ₂ O	3,0 ml	dH ₂ O	3,4 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,0 ml	0,5 M Tris (pH 6,8)	0,6 ml
30 % Acrylamid/ Bisacrylamid-Lsg. (37,5:1)	3,0 ml	30 % Acrylamid /Bisacrylamid -Lsg. (37,5:1)	0,6 ml
10 % SDS	90 µl	10 % SDS	50 µl
TEMED	14 µl	TEMED	10 µl
10 % APS	40 µl	10 % APS	40 µl

Die Elektrophorese wurde in Keutz-Miniprotein Gelkammern durchgeführt. Das Gel wurde in die Apparatur eingebaut und die Pufferkammern mit Laufpuffer (1x) gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen in die Taschen des Sammelgels 5 min aufgeköcht und anschließend kurz abzentrifugiert. Elektrophoresebedingungen: 60 min, 150 V.

6.5.4. Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine mit einer Masse unter 20 kDa werden in einer SDS-PAGE nach Lämmli nur teilweise oder gar nicht von einem Überschuss an SDS während der Gelelektrophorese getrennt. Daraus resultierend laufen diese kleineren Proteine bei höheren Acrylamidkonzentrationen nicht als fokussierte Banden. Die Nutzung von Tricin als Folgeion erlaubt eine Auflösung kleiner Proteine bei geringeren Acrylamidkonzentrationen als in

Glyzin-SDS-PAGE-Systemen. Dadurch lassen sich im niedermolekularen Bereich von 2-20 kDa Proteine trotz vergleichsweise niedriger Acrylamidkonzentration fokussiert darstellen (Schägger und Jagow, 1987).

Material:

16,5 % Trennlösung für zwei Gele:		4 % Sammellösung für zwei Gele:	
ddH ₂ O	2,3 ml	ddH ₂ O	4,2 ml
Gelpuffer	3,3 ml	Gelpuffer	1,6 ml
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lsg. (32:1)	3,3 ml	Acrylamid-/Bisacrylamid-Lsg (32:1)	0,5 ml
Glyzerin	1,0 ml		
TEMED	7 µl	TEMED	7 µl
10 % APS	50 µl	10 % APS	50 µl

Elektrophoresebedingungen: 20 min, 40V, dann 90 min, 100 V.

6.5.5. Elektroblothing

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

Aufbau:

Anode

6 Filterpapiere - getränkt mit Anodenpuffer I

3 Filterpapiere - getränkt mit Anodenpuffer II

PVDF-Membran - getränkt mit Anodenpuffer II

Gel

9 Filterpapiere - getränkt mit Kathodenpuffer

Kathode

Die Filterpapiere und die PVDF-Membran (Porengröße: 0,45 µm) wurden auf eine Größe von 9x6 cm zugeschnitten, mit den entsprechenden Puffern getränkt und anschließend luftblasenfrei aufeinandergelegt.

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

6.5.6. Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die auf der PVDF-Membran gebundenen Proteine wurden indirekt durch Antikörper gegen das Protein nachgewiesen. Bei biotinylierten Proteinen erfolgt der Nachweis durch einen Streptavidin-Peroxidase-Komplex, wobei Streptavidin mit hoher Avidität an Biotin bindet und die Peroxidase eine Entwicklung mittels eines Chemilumineszenznachweises (ECL) ermöglicht.

Die PVDF-Membran wurde nach dem Blot für 30 min bei RT mit 3% BSA in PBS^{def}/0,1% Tween abgesättigt und anschließend dreimal kurz mit PBS^{def}/0,1% Tween gewaschen. Danach wurde die Membran 1 h mit Antikörper (Verdünnung: 1:2000) in PBS^{def}/0,1% Tween bei RT inkubiert. Nach dreimaligem kurzen Spülen mit PBS^{def}/0,1% Tween wurde dreimal für 10 min mit PBS^{def}/0,1% Tween gewaschen. Der 2. Antikörper (spezifisch für den Fc-Teil des 1. Antikörpers, an Peroxidase gekoppelt; Verdünnung: 1:5000) wurde ebenfalls für 1 h bei RT in einer PBS^{def}/0,1% Tween Lösung inkubiert. Auch hiernach wurde die Membran gewaschen, bevor mit ECL entwickelt wurde. Für den Nachweis biotinylierter Proben wurde die abgesättigte Membran für 45 min mit Streptavidin, gekoppelt an Peroxidase, inkubiert (Verdünnung: 1:5000).

Gebundene Peroxidase wurde über Chemilumineszenz nachgewiesen. Hierzu wurde das Entwicklungskit Super Signal und Super Signal Ultra der Firma Pierce verwendet. Dabei wird der Peroxidase als Substrat ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol) angeboten, das von der Peroxidase oxidiert wird und dessen Elektronen in einen angeregten Zustand überführt. Die resultierende Lichtemission wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (BIOMAX MR, Kodak) detektiert.

Ein Größenstandard, der neben den Proben auf das Gel aufgetragen wurde (Rainbow Marker, Amersham), ermöglichte die Abschätzung der Molekulargewichte der einzelnen Proteine.

6.5.7 Metabolische Markierung mit ³⁵S-Methionin und -Cystein

Mit ³⁵S-Methionin und -Cystein können Proteine während ihrer Synthese in eukaryontischen Zellen radioaktiv markiert und durch anschließende Autoradiographie nachgewiesen werden. Die Zellen wurden in Greiner Schalen (Durchmesser: 6 cm) zweimal mit DMEM (1x) ohne Methionin und Cystein, DMEM/-M-C (1x), gewaschen und anschließend mit 2 ml DMEM/-M-C (1x) für eine Stunde bei 37°C ausgehungert. Nach dem Aushungern wurden die Zellen mit 2 ml DMEM/-M-C (1x) und 10 µl (100 µCi) Pro-Mix (L-³⁵S-Methionin und L-³⁵S-Cystein „*in vitro* cell labeling mix“; Amersham) für 1 h bei 37°C inkubiert, um die in dieser Zeit

translatierten Proteine radioaktiv zu markieren („Pulse“). Bei „Pulse-Chase“-Experimenten wurde das Markierungsmedium entfernt und die Zellen mit 3 ml 1x DMEM für variable Zeiten im Brutschrank inkubiert („Chase“), bevor die Zellen lysiert wurden. Während dieser Inkubationszeit können die radioaktiv markierten Proteine posttranslationale Veränderungen durchlaufen.

6.5.8. Zellyse für Immunpräzipitation

Für die Zellyse wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen auf Eis mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen. Danach wurden die Zellen pro Schale (Durchmesser: 6 cm) mit 1ml RIPA- oder CoIP-Puffer für 10 min lysiert. Das Zellysate wurde abgekratzt und in einem Reaktionsgefäß mit Ultraschall behandelt. Durch 60 min Zentrifugation bei 4°C und 13000 UpM wurden unlösliche Bestandteile pelletiert. Die gewünschten Proteine wurden dann über Nacht aus dem Überstand mit Hilfe einer Immunpräzipitation gefällt.

6.5.9. Immunpräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht darauf, dass aus einem Proteingemisch Proteine durch spezifische Antikörper gefällt werden können. An den Fc-Teil der Antikörper bindet das bakterielle Protein A, das seinerseits an ein Trägermaterial (Sepharose) kovalent gebunden ist. Der Komplex aus Protein, Antikörper und Protein A-Sepharose lässt sich durch Zentrifugation von zellulären Bestandteilen trennen.

Das Zellysate (s. 5.5.8) wurde mit spezifischem Antikörper und 30µl Protein A-Sepharose über Nacht bei 4°C auf einem Rotator (Keutz, Reiskirchen) inkubiert. Der Protein/Sepharose-Komplex wurde bei 5000 UpM pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde dieser Waschschritt dreimal wiederholt. Das Pellet wurde dann mit 100 mM Tris (pH7,5) gewaschen, mit 20 µl Probenpuffer (4x, mit oder ohne Mercaptoethanol) für 5 min bei 97°C aufgeköcht und schließlich über SDS-PAGE aufgetrennt.

Proben von Lassavirus-infizierten Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert. Anschließend wurde aus Sicherheitsgründen SDS (ad 1%) hinzugegeben und die Proben für 10 min aufgeköcht, um eine vollständige Inaktivierung des Virus zu gewährleisten. Vor der Immunpräzipitation wurde zur Komplexierung von SDS 8 µl 10% NP40 gegeben, bevor wie oben beschrieben weiter verfahren wurde.

Nach der Gelelektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel für 30 min in einem Essigsäure/Ethanol/H₂O (1/1/3)-Bad fixiert und danach in einem Geltrockner unter Vakuum auf Whatman-Filterpapier getrocknet. Das getrocknete Gel wurde entweder auf einer Phosphorimagerplatte (Bas-MP, Fuji Film) am Biolumager (Bas 200, Ray Test) oder auf einem Röntgenfilm (BIOMAX MR, Kodak) exponiert und analysiert.

6.5.10. Oberflächenbiotinylierung

Mit Sulfo-N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS)-Biotin können Proteine, die sich auf der Oberfläche von Zellen befinden, selektiv markiert werden (Lisanti et al., 1988). Dabei reagieren primäre Amine der Lysinreste von Proteinen in einer nukleophilen Reaktion mit dem NHS-Ester unter Abspaltung von N-Hydroxysulfosuccinimid. Biotin wiederum bindet nicht kovalent, aber mit hoher Affinität Streptavidin und kann somit leicht detektiert oder gefällt werden.

Nach der Markierung werden die Zellen lysiert und das gesuchte Protein entweder mit einem antigenspezifischen Antikörper immunpräzipitiert und mit Streptavidin-Peroxidase im Western-Blot nachgewiesen oder biotinylierte Proteine werden mit Streptavidin-Sepharose gefällt und dann im Immunoblot detektiert. Die Fällung mit Streptavidin-Sepharose wurde mit 100 µl Streptavidin-Sepharose durchgeführt.

Um jeglichen zellulären Transport zu unterbinden, müssen alle Schritte der Biotinylierung auf Eis stattfinden. Nachdem das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen wurden, wurde jede Schale (Durchmesser: 6 cm) zweimal je 15 min mit 2 ml einer Biotin-Lösung (1 mg Sulfo-NHS-Biotin frisch in 1 ml PBS⁺⁺ gelöst) bei 0°C behandelt. Danach wurde überschüssiges Biotin durch Waschen mit einer Glyzin-Lösung (0,1 M in PBS⁺⁺) gebunden. Die darauf folgende Lyse der Zellen und die Präzipitation der Proteine wurde mit spezifischen Antikörpern oder mit Streptavidin-Sepharose wie unter 6.5.9. beschrieben durchgeführt.

6.5.11. Endoglykosidasebehandlung

Radioaktives oder biotinyliertes präzipitiertes Protein wurde mehrfach mit 500 µl RIPA-Puffer gewaschen. Das Präzipitat wurde danach mit 20 µl Denaturierungspuffer (0,5% SDS, 1% Mercaptoethanol) 15 min auf 95°C erhitzt und 5 min bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder mit 2 µl G5-Puffer (0,5 M Natriumcitrat; pH 5,5; 10x) und 2 µl

EndoH für EndoH-Verdau oder mit 2 µl G7-Puffer (0,5 M Natriumphosphat; pH 7,5; 10x), 2 µl NP40 (10x) und 2 µl PNGaseF für PNGaseF-Verdau versetzt und 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zu jeder Probe wurde 7 µl SDS-Probenpuffer (4x, mit Mercaptoethanol) gegeben und die Proben im SDS-Gel aufgetrennt.

6.5.12. Aufreinigung und N-terminale Sequenzierung von Lassavirus GP1

Virus wurde wie unter 6.1.1. beschrieben vermehrt und gereinigt. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, auf einen Optiprep-Stufen-Gradienten gegeben (8,4% bis 20% Iodixanol in 1,2% Schritten mit je 1 ml) und bei 41000 UpM und 4°C für 1,5 h in einem SW41-Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Die Fraktionen (1 ml) wurden von oben abgenommen und auf den Gehalt an viralem Protein in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot untersucht. Die zwei Fraktionen des Optiprep-Gradienten mit der größten Menge an GP1 wurden vereinigt, über eine NAP 5-Säule (Sephadex G25, Pharmacia) entsalzt, eingeengt und mit PNGase F deglykosyliert. Die Probe wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und in drei Spuren in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine des Gels wurden auf eine PVDF-Membran transferiert, die Membran in Längsbahnen entsprechend der Spuren zerschnitten und eine Spur mit Coomassie-Blau gefärbt, während die beiden anderen Spuren mit Antiserum gegen GP1 und GP2 gefärbt wurden. Die Coomassie-Blau gefärbte Bande, die dem GP1 entsprach, wurde ausgeschnitten, an der Luft getrocknet und die N-terminale Sequenz mit Hilfe des automatisierten Edman-Abbaus kommerziell ermittelt (WITA).

6.5.13. Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz

Zelluläre und virale Antigene auf Zelloberflächen oder in permeabilisierten Zellen können durch die Immunfluoreszenz-Technik mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht werden.

Fixierung der Zellen mit Aceton/Methanol: Durch die Behandlung der Zellen mit Aceton/Methanol findet neben der Fixierung gleichzeitig eine vollständige Permeabilisierung der Zellen statt. Auf einem Deckgläschen gewachsene Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS⁺⁺ gewaschen, anschließend für 5 min mit 250 µl Aceton/Methanol (1:1) pro Deckglas bei -20°C fixiert und erneut dreimal mit kaltem PBS⁺⁺ gewaschen. Nach der Fixierung folgte die Inkubation mit einem spezifischen ersten Antikörper.

Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd: Bei Behandlung der Zellen mit Formaldehyd bleibt die zelluläre Plasmamembran intakt. Die Zellen wurden auf Eis dreimal mit kaltem PBS⁺⁺ gewaschen, anschließend mit 250 µl 2-4% Paraformaldehyd in PBS⁺⁺ pro Deckglas 20 min bei RT fixiert und danach erneut dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen.

Selektive Permeabilisierung der Zellmembran mit Digitonin: Niedrige Konzentrationen an Digitonin permeabilisieren selektiv die Zytoplasmamembran durch die höhere Konzentration an Cholesterol verglichen mit anderen Membranen (Lange und Steck, 1985). Interne Membranen wie die ER-Membran bleiben daher durch die Behandlung intakt.

Die Zellen wurden nach Fixierung mit 4% Paraformaldehyd dreimal mit kaltem PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend für 3 min mit Digitonin (Endkonzentration: 4 mg/ml) in Permeabilisierungspuffer inkubiert. Danach wurde dreimal mit kaltem PBS⁺⁺ gewaschen und mit den gewünschten Antikörpern inkubiert.

Inkubation mit spezifischen Antikörpern: Die Inkubation mit Antiserum fand in einer "feuchten Kammer" statt. Hierzu wurde der Boden einer Petrischale mit Wasser gesättigtem Filterpapier ausgelegt. Auf das Filterpapier wurde eine Plastikfolie ausgelegt. Darauf wurden pro Deckglas 20 µl der verdünnten Antikörperlösung (1:100-1:400 in 0,1 % BSA in PBS^{def}) pipettiert und die Deckgläser luftblasenfrei aufgelegt. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurden die Deckgläschen in 24er-Platten transferiert (Zellseite nach oben) und dreimal mit PBS^{def} gewaschen.

Inkubation mit Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern: FITC- oder Rhodamin-gekoppelte Zweitantikörper wurden 1:200 mit 0,1% BSA in PBS^{def} verdünnt und die zuvor mit Erstantikörpern behandelten Zellen damit 1 h im Dunkeln inkubiert. Die weiteren Schritte entsprechen denen der Inkubation mit den Erstantikörpern.

Eindeckeln der Deckgläser: Die Zellen wurden durch Schwenken der Deckgläschen in dH₂O von störenden Salzen befreit und dann mit 10 µl Mowiol auf Objektträgern luftblasenfrei eingedeckelt.

Auswertung: Die Präparate wurden im Auflichtmikroskop (Axiophot, Zeiss) betrachtet und mit Hilfe einer digitalen Kamera dokumentiert. Kolokalisationsstudien wurden mit einem Konfokalmikroskop (TCS SP2, Leica) durchgeführt.

7. Ergebnisse

7.1. Identifikation des Signalpeptids von Lassavirus Glykoprotein präGP-C

In der vorliegenden Arbeit sollte das Signalpeptid des Lassavirus Glykoproteins in Bezug auf zusätzliche Funktionen neben seiner Translokationsfunktion innerhalb des Infektionszyklus der Lassaviren untersucht werden. Da die Länge des Signalpeptids zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt war, musste das Signalpeptid zunächst identifiziert werden.

7.1.1. Bestimmung des N-Terminus von Lassavirus GP1

Eine Analyse mit dem SignalP-Programm (Nielsen et al., 1997) sagt vorher, dass mögliche Spaltstellen im Signalpeptid (SP) des Lassavirus Glykoproteinvorläufers präGP-C zwischen Position 37 und 38 und Position 58 und 59 für die Signal-Peptidase (SPase) bestehen. Um die exakte SP-Spaltstelle zu bestimmen, wurde zunächst der N-Terminus von GP1, das aus Virionen isoliert wurde, über Edman-Abbau bestimmt. Da das SP im ER proteolytisch abgespalten wird, besitzt GP1 nach seinem Transport über den sekretorischen Weg in das Viruspartikel kein N-terminales SP. Die N-terminale Sequenz von viralem GP1 gibt somit Aufschluss über die SP-Spaltstelle und damit auch über die Länge des SP. Zur Bestimmung der N-terminalen Sequenz von viralem GP1 wurden Verozellen mit Lassavirus (Stamm Josiah) infiziert. 5 Tage nach Infektion wurde der Zellkulturüberstand von sechs Flaschen mit einem Zellrasen von je 175 cm² durch 20%ige Saccharosekissen zentrifugiert und das Viruspellet anschließend über einen Optiprep-Stufengradienten (Fraktionen 1-8) aufgetrennt. Virales Protein der Fraktionen wurde im Western Blot analysiert (Abb. 8). Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an viralem Protein (Fraktion 5-7) wurden vereinigt, deglykosyliert, um eine fokussierte Bande für die nachfolgende Färbung mit Coomassie-Blau zu erhalten, und schließlich über SDS-PAGE aufgetrennt.

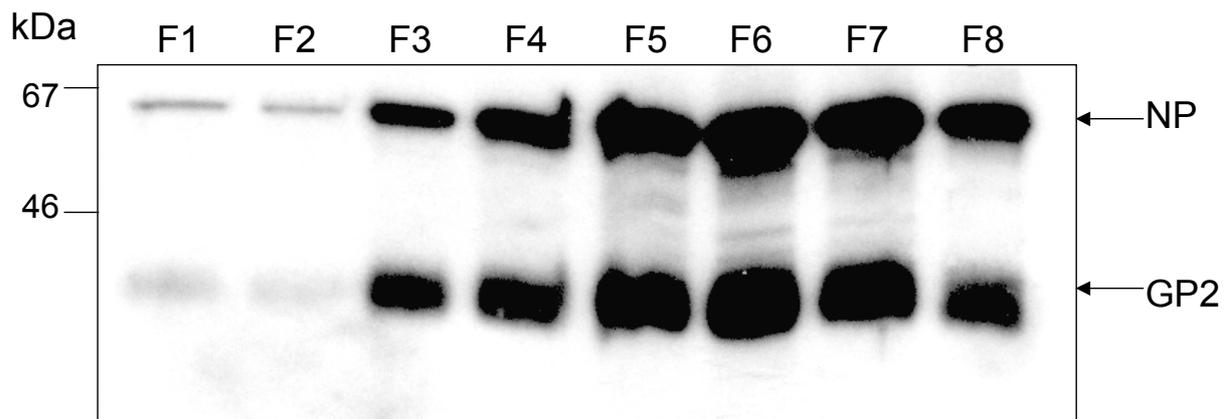


Abb. 8: Reinigung von viralem GP1 über einen Iodixanol-Gradienten. Lassavirus-haltiger Kulturüberstand wurde durch ein Saccharosekissen (20%) ultrazentrifugiert und das Virus über einen Iodixanolgradienten (Optiprep: 8,4-20%, F1-8) gereinigt. Proben der Fraktionen wurden anschließend über SDS-PAGE (10%) aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und NP und GP2 mit den Antiseren Rb- α -NP und Rb- α -GP2 detektiert.

Nach anschließendem Transfer auf PVDF-Membran wurden die Proteine mit Coomassie-Blau angefärbt. Zwei weitere Spuren der gleichen Proben wurden mit entsprechenden Antiseren gegen GP1 bzw. GP2 immungefärbt (Abb. 9). Sowohl in der Coomassie-Blau-Färbung als auch im Immunoblot wurden GP1 und GP2 mit apparenten Molekulargewichten von 27 bzw. 24 kDa detektiert. Das über SDS-PAGE ermittelte Molekulargewicht entspricht in beiden Fällen dem errechneten Wert aus der Proteinsequenz.

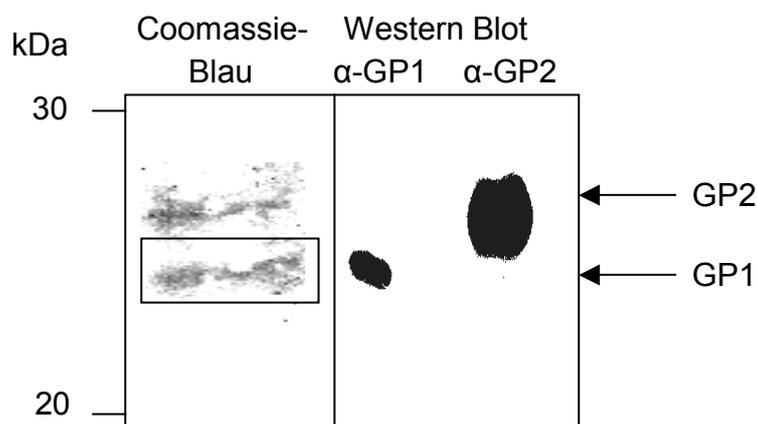


Abb. 9: Nachweis von gereinigtem GP1 aus virushaltigem Kulturüberstand. Über einen Iodixanolgradienten (8,4-20%) gereinigtes Virus wurde deglykosyliert, über SDS-PAGE (14% Acrylamid) aufgetrennt und auf PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran mit Coomassie-Blau angefärbt. Zwei weitere Spuren der Proben wurden mit den Antiseren Rb- α -GP1 und Rb- α -GP2 im Western Blot analysiert. Die dem GP1 entsprechende mit Coomassie-Blau gefärbte Bande wurde ausgeschnitten und N-terminal ansequenziert.

Die Coomassie-Blau-gefärbte Bande von viralem GP1 wurde aus der Membran ausgeschnitten und über Edman-Abbau sieben N-terminale Aminosäuren in der Reihenfolge TSLYKGV bestimmt. Diese Sequenz entspricht exakt der Aminosäuresequenz von Lassavirus präGP-C von Position 59 bis 65 (Abb. 10). Diesen Daten nach besitzt das SP eine Länge von 58 Aminosäureresten.

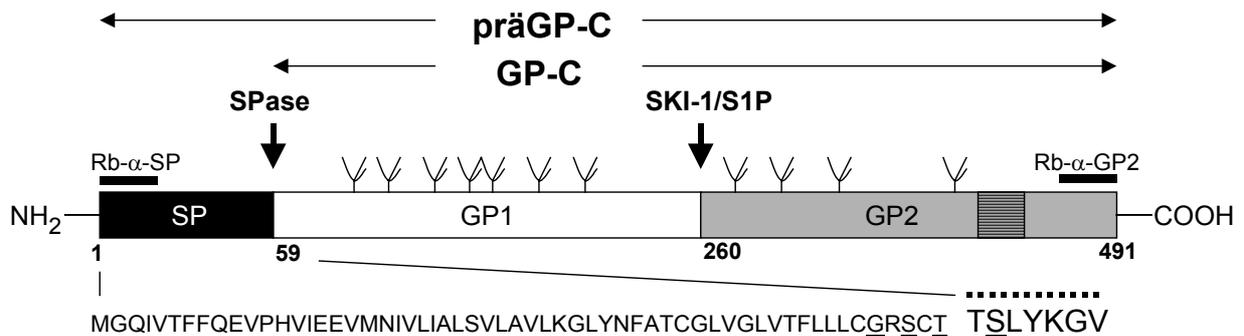


Abb. 10: Schematische Darstellung des Lassavirus Glykoproteins präGP-C. Das primäre Translationsprodukt präGP-C (aa 1-491), das Signalpeptid (SP) (aa 1-58), das Vorläufer-Glykoprotein GP-C (aa 59-491) und die Untereinheiten GP1 (aa 59-259) und GP2 (260-491), das C-terminal membranverankert ist (Streifen, aa 427-450) sind gezeigt. Die Antiserumbindungsstellen, Rb- α -SP (aa 2-18) and Rb- α -GP2 (aa 477-491), die Signal-Peptidase (SPase)-Spaltstelle zwischen den Threoninresten 58 und 59 (Pfeil), die SKI-1/S1P-Spaltstelle C-terminal von Leucin 259 (Pfeil), sowie potentielle N-Glykosylierungsstellen (Baum-ähnliche Symbole, siehe Anhang) sind angegeben. Die gesamte Signalpeptidsequenz und C-terminal folgende Aminosäurereste, die zu GP1 gehören, sind im Ein-Buchstaben-Code aufgeführt. Einzeln unterstrichene Aminosäuren wurden in Signalpeptidmutanten jeweils durch Arginin ausgetauscht. Aminosäuren überlagert mit einer gepunkteten Linie wurden über Edman-Abbau von GP1 bestimmt.

Eine zusätzliche Möglichkeit zur Bestimmung einer Spaltstelle innerhalb eines Proteins bietet das monoklonale FLAG-Antikörper-Set M1/M2 der Firma Sigma. Der Antikörper FLAG-M1 erkennt das FLAG-Epitop nur dann, wenn es frei am N-Terminus eines Proteins zugänglich ist, FLAG-M2 dagegen erkennt das FLAG-Epitop unabhängig von seiner Position im Protein. Es wurden daher zwei Mutanten konstruiert, die nach Position 58 eine FLAG-Tag-Insertion trugen (T58-FLAG und T58R-FLAG). Die Mutante T58R-FLAG wies zusätzlich die Punktmutation T58R auf, um eine potentielle Signalpeptidspaltung zu unterbinden. Es ist bekannt, dass für eine SP-Spaltung durch SPase an Position -1 und -3 nur kleine, ungeladene Reste, jedoch keine geladenen Reste vorkommen dürfen (von Heijne, 1985). Abb. 11 zeigt, dass der Antikörper FLAG-M1 nur die Mutante T58-FLAG, nicht aber die Mutante T58R-FLAG, detektiert. Deren Expression wurde durch den Antikörper FLAG-M2 nachgewiesen, der, wie erwartet, beide Glykoproteine detektiert. Der durch die fehlende Abspaltung des Signalpeptids bei der Mutante T58R-FLAG entstehende Laufunterschied zur Mutante T58-FLAG ist bei der Auflösung dieses Gelsystems nicht erkennbar. Dieser Versuch bestätigt, dass nach Position 58 eine Spaltung erfolgt.

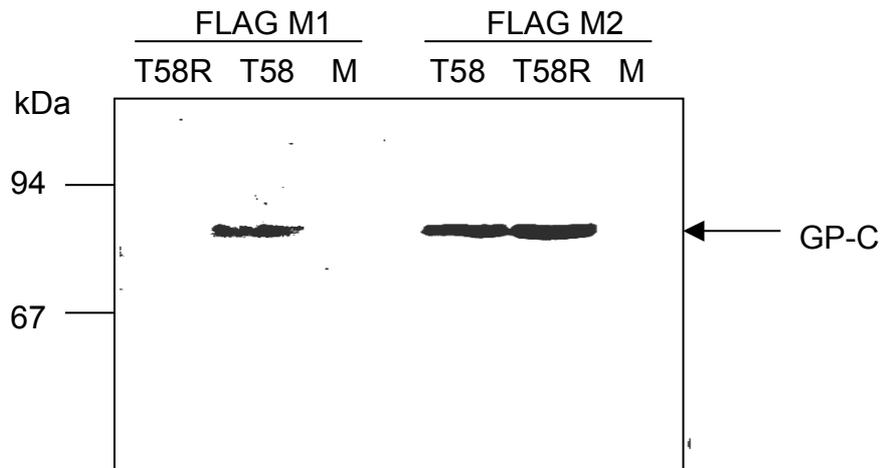


Abb. 11: Einführung des FLAG-Epitops C-terminal der potentiellen Signalpeptid-Spaltstelle. Verozellen wurden mit den Mutanten T58-FLAG und T58R-FLAG von rekombinantem Lassavirus präGP-C Lipofektamin-transfiziert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Der Nachweis erfolgte durch Immunfärbung mit den Antiseren FLAG-M1 und FLAG-M2. M: Mock (Scheininfektion mit Vektor ohne Insertion).

7.1.2. Charakterisierung der Signalpeptid-Spaltstelle

Die unter 7.1.1 aufgeführten Resultate sprechen für eine Länge des Signalpeptids bis Position 58 von Lassavirus präGP-C. Jedoch schließen die beiden aufgeführten Methoden nicht aus, dass N-terminal von Position 58 eine oder mehrere zusätzliche Spaltungen erfolgen. Um diese auszuschließen, wurde die potentielle SP-Spaltstelle mutiert. Wie bereits erwähnt, sind für eine SP-Spaltung kleine, ungeladene Reste in Position -1 und -3 der Spaltstelle essentiell. Um die SP-Spaltung zu unterbinden, wurde jeweils an Position -1 und -3 ein großer, geladener Rest, Arginin, eingeführt (Mutanten T58R und S56R). Mit einem Antiserum, das gegen den N-Terminus des Signalpeptids gerichtet ist, konnte das Signalpeptid nach Expression von Wildtyp-GP-C, solitär exprimiertem SP, sowie Lassavirus-infizierten Zellen immunpräzipitiert werden (Abb. 12, Spuren 1, 6 und 7), nicht jedoch bei den Mutanten T58R und S56R (Spuren 3 und 4).

Mutationen von weiteren kleinen, ungeladenen Aminosäureresten in diesem Bereich (Mutanten G54R und S60R) haben keine Auswirkung auf die SP-Spaltung (Spuren 2 und 5). Entsprechende Laufunterschiede zwischen präGP-C und GP-C wurden nach hochauflösender Gelelektrophorese im Western Blot mit einem Antikörper gegen GP-C detektiert. Die Mutanten T58R und S56R zeigen ein signifikant langsames Laufverhalten als Anzeichen dafür, dass das SP nicht abgespalten wurde. Bei der Mutante S56R tritt

zusätzlich eine schneller laufende Bande, die dem Wildtyp-GP-C entspricht, auf, was auf eine Restaktivität bei der SP-Spaltung hindeutet (Spur 3).

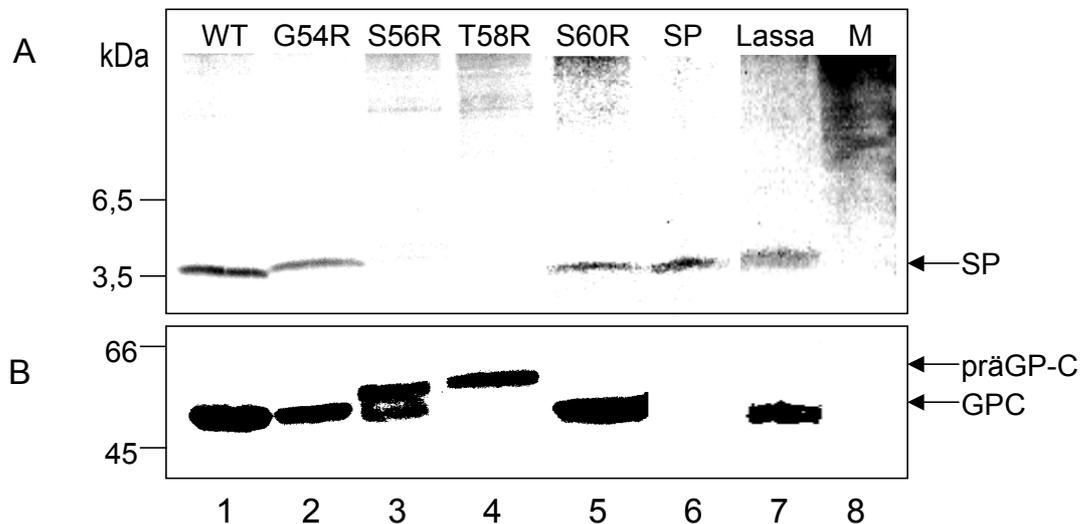


Abb. 12: Identifizierung der Signalpeptid-Spaltstelle von Lassa virus Glykoprotein präGP-C. Verozellen wurden mit dem Vektor pCAGGS mit folgenden Insertionen von präGP-C transfiziert: Wildtyp (WT), Substitutionsmutanten (G54R, S56R, T58R und S60R), rekombinantes Signalpeptid (SP) oder als Kontrolle mit Vektor ohne Insertion (M: Mock). Zusätzlich wurden Verozellen mit Lassa virus infiziert (Lassa). Die synthetisierten Proteine wurden entweder (A) mit ^{35}S -Methionin/Cystein radioaktiv markiert, mit dem Antiserum Rb- α -SP immunpräzipitiert, über Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert oder (B) nach PNGaseF-Verdau über SDS-PAGE in 12% Acrylamidgelen aufgetrennt und im Western Blot mit dem Immuneserum Rb- α -GP2 detektiert.

Diese Restaktivität ist jedoch zu gering, um das SP in der Immunpräzipitation zu detektieren. Keines der aufgeführten Konstrukte zeigte weder im Western Blot noch in der Immunpräzipitation ein zusätzliches Spaltprodukt. Dieses Ergebnis belegt, dass exklusiv hinter Position 58 gespalten wird und keine weiteren Spaltprodukte generiert werden.

Um dies zusätzlich zu bestätigen, wurden die Reste 1-58 von präGP-C in vitro-translatiert und mit Signalpeptid aus infizierten Zellen verglichen. Unter hochauflösenden Bedingungen zeigen die in vitro-translatierten Aminosäurereste 1-58 die gleiche elektrophoretische Mobilität wie aus Lassa virus-infizierten Zellen präzipitiertes SP (Abb. 13).



Abb. 13: Gelelektrophoretische Mobilität des Lassavirus Glykoprotein Signalpeptids. Die Aminosäurereste 1-58 von Lassavirus präGP-C wurden *in-vitro*-translatiert (Promega-Kit), mit ^{35}S -Methionin/Cystein radioaktiv markiert und mit dem Antiserum Rb- α -SP präzipitiert. Die Probe wurde über Tricin-SDS-PAGE (18%) aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Als Kontrolle wurde aus Lassavirus-infizierten Zellen präzipitiertes Signalpeptid mitaufgetrennt. Mock: Vektor ohne Insertion.

Der derzeitige Stand der Forschung besagt, dass SP von sekretorischen Proteinen kotranslational von ihren Proteinen freigesetzt werden. Es sind jedoch einzelne Fälle untersucht, in denen das SP posttranslational von seinem Protein proteolytisch abgespalten wird (Li et al., 2000). Die Resultate aus Abb. 12 B zeigten bereits, dass im Western Blot keine Form des WT-Glykoproteins mit N-terminal kovalent gebundenem SP detektiert wurde. Dieses Experiment veranschaulicht jedoch nur die Situation nach etwa 20 Stunden transients Expression. Um eine posttranslationale Abspaltung des SP kurz nach Translation auszuschließen, wurden daher metabolische Markierungen des Glykoproteins mit sehr kurzen Markierungszeiten durchgeführt. Aber auch nach sehr kurzen Zeiten wurde keine Form des Glykoproteins mit SP detektiert (Abb. 14, Spur 2). Eine Mutante mit mutierter SP-Spaltstelle zeigt die zu erwartende gelelektrophoretische Mobilität einer solchen Form (Spuren 1 und 3). Dieses Ergebnis zeigt, dass das SP kotranslational oder zumindest sehr kurz nach Translation abgespalten wird.

Die unter 7.1.1. und 7.1.2. aufgeführten Resultate zeigen, dass das SP die Reste 1-58 von präGP-C umfasst und exklusiv hinter Position 58 kotranslational gespalten wird. Die Aminosäurereste T58 und S56 bestimmen die Spaltstelle für die Signal-Peptidase.

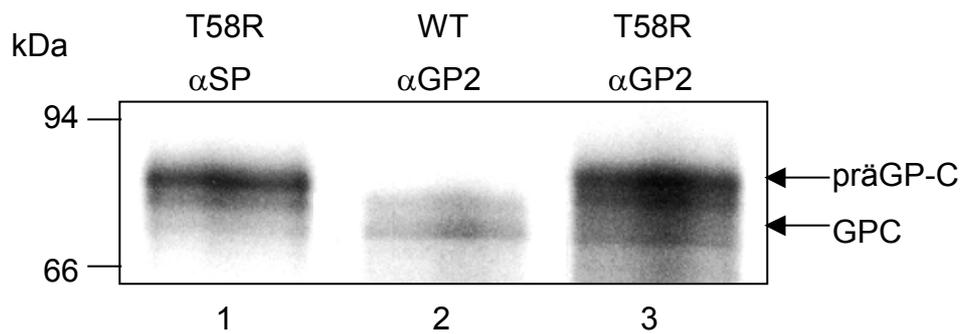


Abb. 14: Kotranslationale Abspaltung des Lassavirus präGP-C Signalpeptids. Verozellen wurden mit dem Vektor pCAGGS mit der Mutante T58R (Spur 1 und 3) und WT präGP-C (Spur 2) transfiziert. Die exprimierten Proteine wurden mit ^{35}S -Methionin/Cystein für 5 min radioaktiv markiert, mit dem Antiserum Rb- α -SP oder Rb- α -GP2 immunpräzipitiert, über SDS-PAGE (12%) aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert.

7.2. Halbwertszeit des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C

Signalpeptide, die kotranslational abgespalten werden, sind nach ihrer Prozessierung entbehrlich und werden rapide abgebaut. Es sind jedoch Ausnahmen bekannt, in denen SP oder zumindest SP-Fragmente eine längere Halbwertszeit besitzen und somit über mehrere Stunden detektierbar sind. Diese SP oder SP-Fragmente besitzen ausnahmslos zusätzliche Funktionen, die über die ursprüngliche Sortierungsfunktion hinausgehen. In einem ersten Experiment sollte daher ermittelt werden, ob das Lassavirus präGP-C SP eine verlängerte Halbwertszeit besitzt. Zu diesem Zweck wurden metabolische radioaktive Markierungen mit verlängerten Chase-Zeiten durchgeführt.

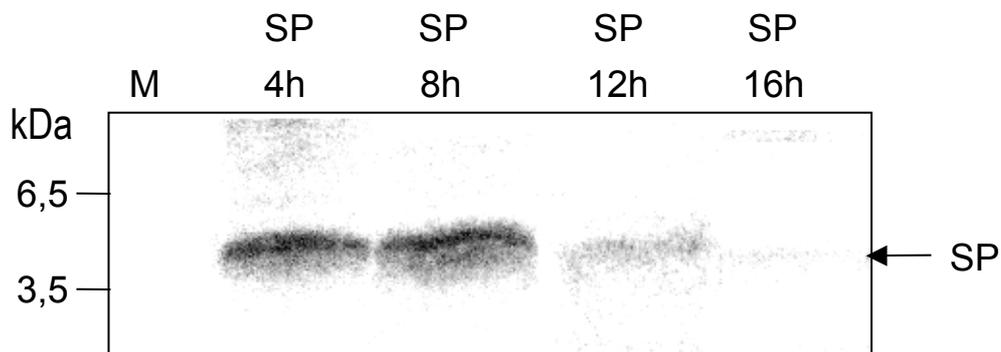


Abb. 15: Halbwertszeit des Lassavirus präGP-C Signalpeptids. Verozellen wurden mit dem Vektor pCAGGS mit rekombinantem SP (SP) transfiziert. Exprimiertes Protein wurde mit ^{35}S -Methionin/Cystein für 30 min radioaktiv markiert, und einem anschließenden Chase mit den angegebenen Zeiten unterzogen. Proben wurden mit dem Antiserum Rb- α -SP immunpräzipitiert, über Tricin-SDS-PAGE (16,5%) aufgetrennt und das SP durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Aus Abb. 15 ist ersichtlich, dass das SP nach solitärer Expression bis zu 12 h in voller Länge nachweisbar, also stabil, ist. Dieses Ergebnis deutete bereits darauf hin, dass das SP besondere strukturelle Eigenschaften besitzt, die im folgenden untersucht wurden.

7.3. Topologie des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C in der ER-Membran

7.3.1. Deletion hydrophober Domänen des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C

Eine Sequenzanalyse des SP bezüglich der Hydrophobizität nach Kyte und Doolittle (1982) sagt voraus, dass das SP zwei hydrophobe Domänen besitzt, die in Abb. 16 mit h1 und h2 gekennzeichnet sind. Die hydrophobe Domäne h1 liegt im Bereich von Aminosäureposition 18-32, die hydrophobe Region h2 im Bereich von Position 43-52. Verbunden sind beide hydrophoben Regionen durch ein hydrophiles Segment (Position 33-42). SP mit zwei hydrophoben Domänen sind außergewöhnlich selten, bislang sind nur zwei weitere SP mit derartigen Sequenzeigenschaften bekannt (von Heijne et al., 1989; Kurys et al., 2000).

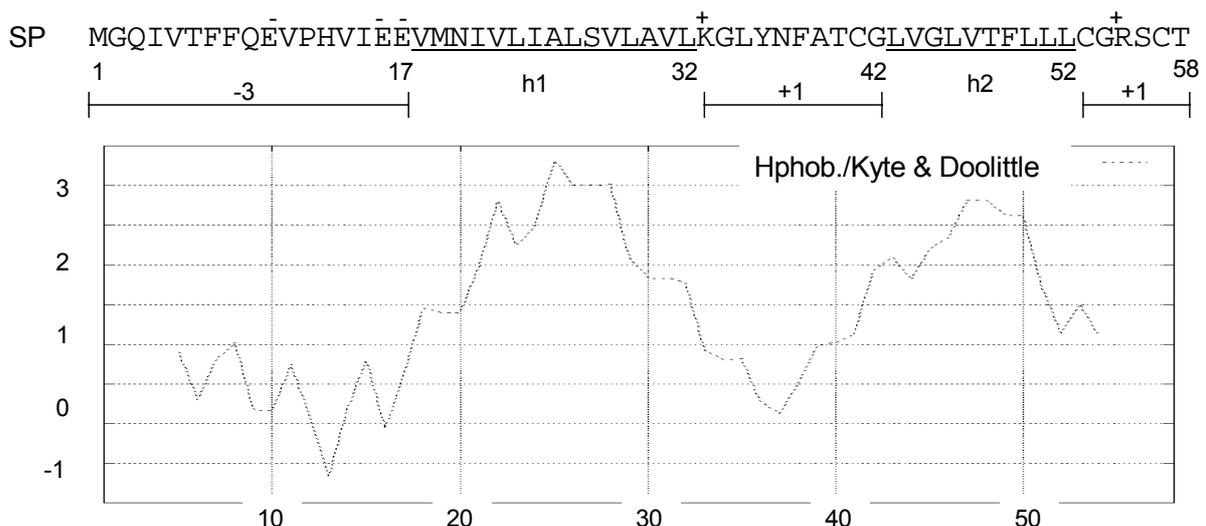


Abb. 16: Hydrophobizitätsindex des Lassavirus präGP-C Signalpeptids. Hydrophobizitätsindex nach Kyte und Doolittle (1982). y-Achse: Hydrophobizitätsindex; x-Achse: Aminosäureposition. Die Signalsequenz ist oben angegeben. Die hydrophoben Regionen h1 und h2 sind unterstrichen. Die Gesamtladungen der einzelnen angrenzenden Regionen sind angegeben, einzelne Ladungen sind mit + und - gekennzeichnet.

Um zu bestimmen, welche der beiden hydrophoben Domänen die Fähigkeit besitzt, das Glykoprotein in das ER-Lumen zu translozieren, wurden beide zunächst einzeln und schließlich zusammen deletiert (Abb. 17). Nach Expression dieser Konstrukte in Verozellen wurden diese Mutanten im Western Blot mit WT-Lassavirus Glykoprotein verglichen.

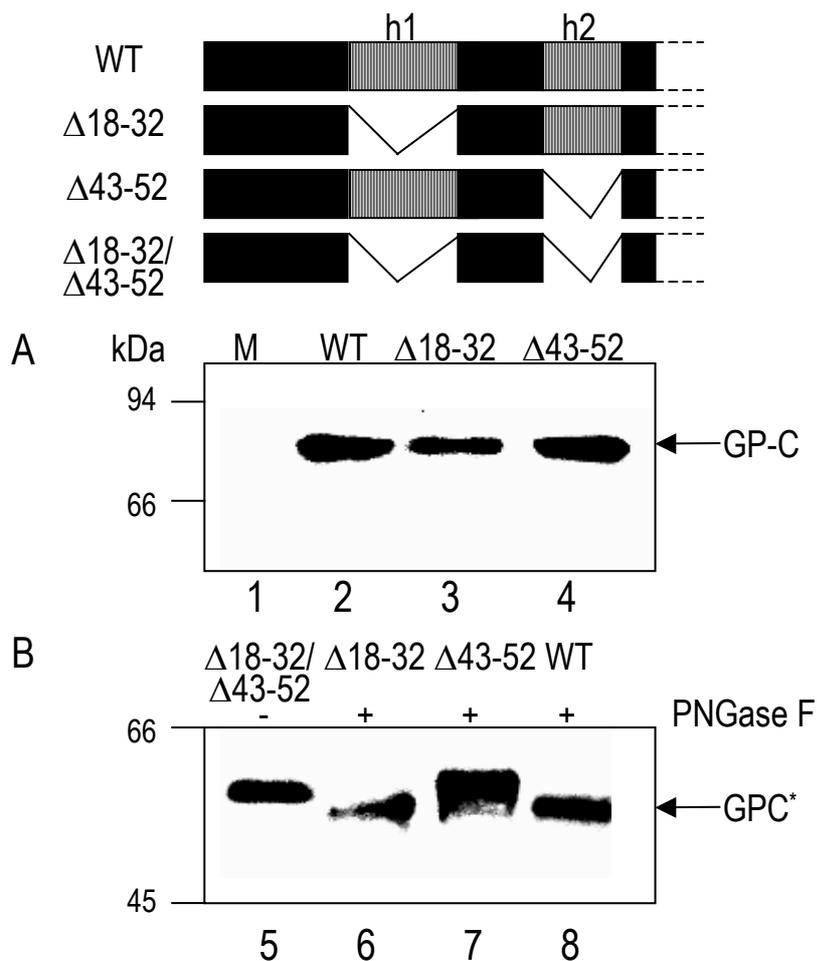


Abb. 17: Deletion von hydrophoben Domänen innerhalb des Lassavirus präGP-C Signalpeptids. Verozellen wurden mit den Mutanten $\Delta 18-32$, $\Delta 43-52$ und $\Delta 18-32/43-52$ von rekombinantem Lassavirus Glykoprotein präGP-C und dem leeren Vektor pCAGGS als Mock-Transfektion (M) transfiziert. Die Proben wurden, wenn angegeben, mit PNGase F behandelt (B), durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und GP-C immunchemisch mit dem Antiserum Rb- α -GP2-N nachgewiesen. Die deglykosylierte Form von GP-C ist mit einem Sternchen markiert.

Die Daten zeigen, dass die Deletion von jeweils einer hydrophoben Domäne weiterhin zur Modifikation von GP-C mit N-Glykanen führt, was durch Deglykosylierung mit PNGaseF bestätigt wurde (Abb. 17, Spuren 2-4). Dieses Ergebnis bedeutet, dass beide hydrophoben Domänen einzeln eine ER-Translokation des Glykoproteins ermöglichen. Erst die gemeinsame Deletion beider hydrophober Domänen, Mutante $\Delta 18-32, 43-52$, resultiert nach Expression in der unglykosylierten Form von GP-C (Spur 5). Die Abwesenheit von N-Glykanen belegt, dass diese Mutante ohne jegliche hydrophobe Region innerhalb des SP nicht mehr in das ER transloziert wird.

Aus diesem Ergebnis resultieren drei mögliche Konformationen, wie beide hydrophoben Domänen mit der ER-Membran interagieren könnten (Abb. 18): (A) ein Modell, bei dem N- und C-Terminus des SP im Lumen des ER zum liegen kämen und beide hydrophoben

Domänen als Membrananker fungieren würden, (B) ein Modell mit einem langen N-terminalen zytoplasmatischen Anteil, der die erste hydrophobe Domäne umfasst und bei dem die hydrophobe Domäne h2 als Membrananker genutzt würde und (C) ein Modell mit einem kurzen N-terminalen zytoplasmatischen Abschnitt bei dem die hydrophobe Domäne h1 als Membrananker fungieren würde und ein außergewöhnlich langer Abschnitt inklusive der zweiten hydrophoben Region h2 ER-luminal wäre. Die h2-Region könnte frei oder membranassoziiert vorliegen.

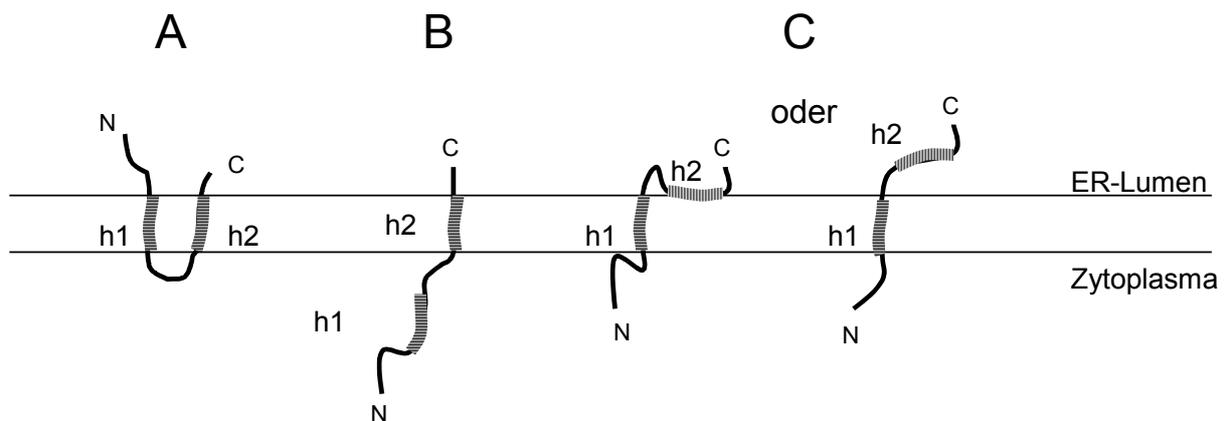


Abb. 18 : Mögliche Topologien des Lassavirus präGP-C Signalpeptids. Mögliche Topologien des Signalpeptids in der ER-Membran sind aufgeführt. N- und C-Terminus des Signalpeptids sind angegeben. Die hydrophoben Domänen h1 und h2 sind als gestrichelte Linien gekennzeichnet.

7.3.2. Selektive Permeabilisierung zur Bestimmung der Topologie des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C

In einem ersten Ansatz zur Bestimmung der Topologie des SP in der ER-Membran wurde ein immunzytochemischer Nachweis gewählt, der bereits zuvor erfolgreich für die Bestimmung der Topologie des Hepatitis C Glykoproteins in der ER-Membran verwendet wurde (Coquerel et al., 2002). Die selektive Permeabilisierung der Zytoplasmamembran mit Digitonin lässt interne Membranen wie die ER-Membran intakt. Eine Immunfärbung nach Expression und Behandlung mit Digitonin erlaubt daher die Unterscheidung zwischen Epitopen, die auf der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran liegen und solchen, die ER-luminal orientiert sind. Um dies zu untersuchen, wurden entweder der HA-Tag (YPYDVPDYA) oder der FLAG-Tag (DYKDDDDK) als antigenes Epitop in verschiedene Domänen des SP inseriert: an den N-Terminus (SP-HA-N und SP-FLAG-N), zwischen beide hydrophoben Domänen (SP-HA-M und SP-FLAG-M) sowie an den C-Terminus des SP (SP-HA-C und SP-FLAG-C) (Abb. 19).

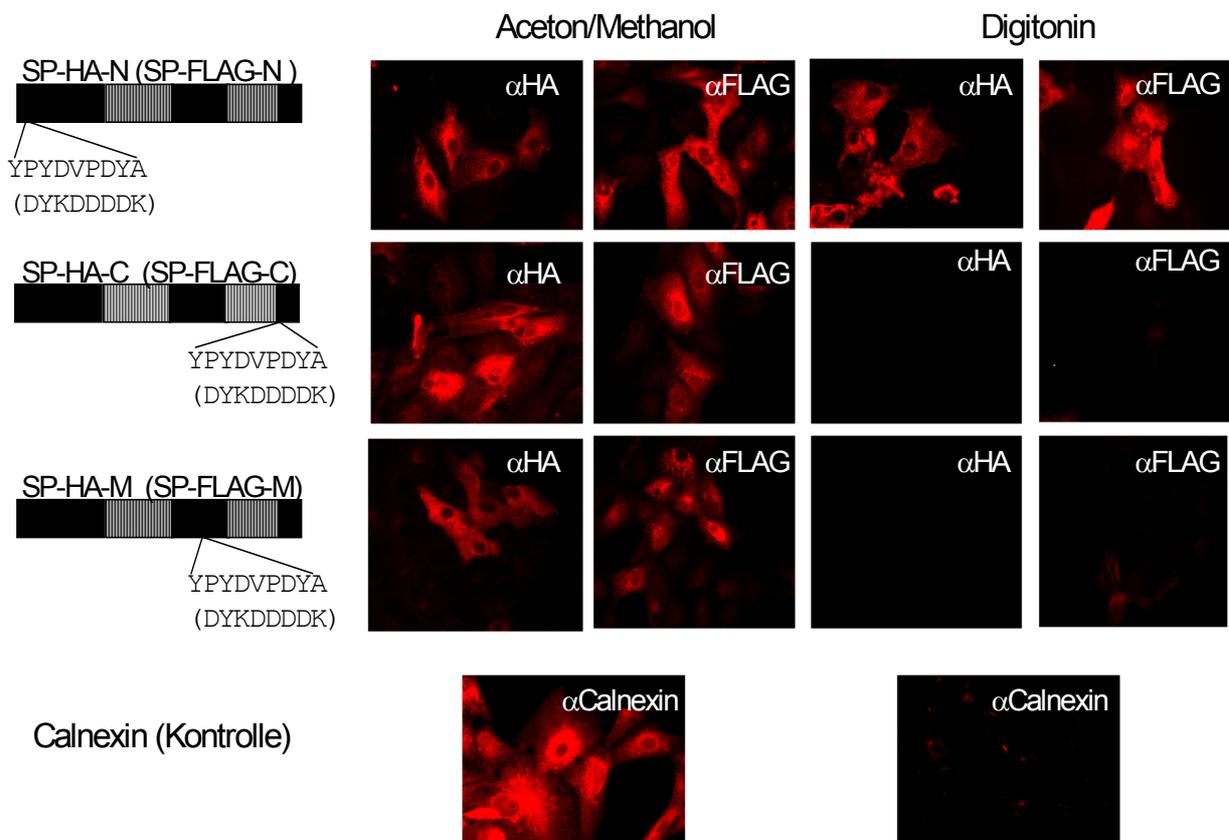


Abb. 19: Bestimmung der Topologie des Lassavirus präGP-C Signalpeptids durch selektive Permeabilisierung mit Digitonin. Auf Deckgläschen gewachsene Verozellen wurden mit pCAGGS Vektor mit den Signalpeptidmutanten SP-HA-N, SP-HA-M, SP-HA-C oder den entsprechenden FLAG-Mutanten transfiziert. 20 h nach Transfektion wurden die Zellen entweder mit Aceton/Methanol zur Permeabilisierung aller zellulären Membranen oder mit Digitonin zur selektiven Permeabilisierung der Zytoplasmamembran inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit polyklonalen Antisera gegen das HA-Epitop (α -HA), das FLAG-Epitop (α -FLAG) oder gegen die Ektodomäne von Calnexin (α -Calnexin) inkubiert. Immunreaktionen wurden mittels Rhodaminfärbung sichtbar gemacht.

Alle Konstrukte zeigen ein klares Fluoreszenzsignal nach Expression mit anschließender Permeabilisierung aller zellulären Membranen mit Aceton/Methanol. Nach selektiver Permeabilisierung mit Digitonin sind jedoch nur SP-HA-N und SP-FLAG-N detektierbar, was belegt, dass diese Epitope als einzige zytoplasmatisch orientiert sind. Alle anderen Mutanten, SP-HA-M, SP-FLAG-M, SP-HA-C und SP-FLAG-C, zeigen kein Fluoreszenzsignal, was bedeutet, dass das entsprechende Epitop für den jeweiligen Antikörper nicht zugänglich ist. Die Epitope sind demnach ER-luminal orientiert. Damit ist nur der Bereich bis zur ersten hydrophoben Domäne des SP zytoplasmatisch ausgerichtet. Als Kontrolle wurde Antiserum gegen die ER-luminale Ektodomäne von intrazellulärem Calnexin verwendet. Das Epitop zeigt, wie erwartet, nur in komplett permeabilisierten Zellen ein Fluoreszenzsignal.

7.3.3. Einführung von potentiellen N-Glykosylierungsstellen

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Topologie eines Proteins in der ER-Membran bietet die Einführung von potentiellen N-Glykosylierungsstellen (N-X-S/T) in definierte Proteinabschnitte. Kommt es durch die Einführung der Glykosylierungsstelle zur Anheftung von N-Glykanen, macht sich dies in einer Verminderung der elektrophoretischen Mobilität bemerkbar, die durch Behandlung mit Endoglykosidasen aufgehoben werden kann. Wie in den unter 7.3.2. beschriebenen Ergebnissen gezeigt, ist der Bereich zwischen den hydrophoben Abschnitten h1 und h2 bereits ER-luminal. Die Insertion einer N-Glykosylierungsstelle zwischen beide Domänen sollte also zur Anheftung eines N-Glykans führen. Da die Anheftung von N-Glykanen durch das Enzym Oligosaccharyl-Transferase jedoch nur in hydrophiler Umgebung mit ausreichendem Abstand zur ER-Membran stattfinden kann, wurden zwei N-Glykosylierungsstellen in einem hydrophilen Abschnitt, flankiert von einem HA- und einem FLAG-Tag als Abstandhalter, inseriert (SP-Glyk-M). Als Negativkontrollen wurden zwei Mutanten generiert, bei denen je eine N-Glykosylierungsstelle nahe dem N-Terminus des SP inseriert ist (SP-Glyk-N und -N2) (Abb. 20).

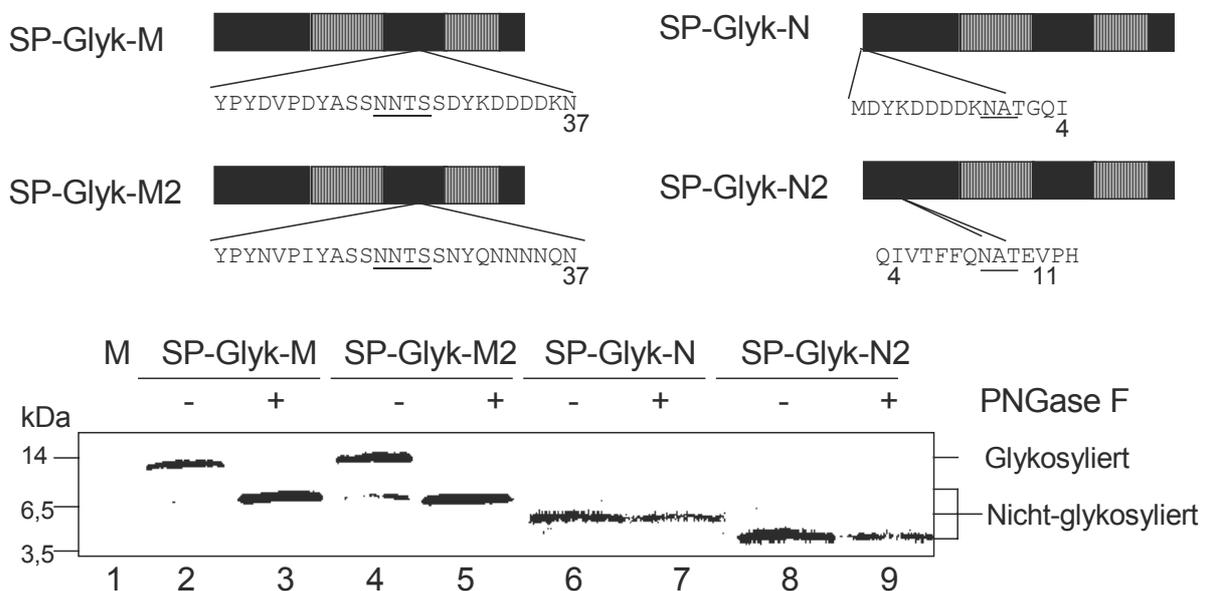


Abb. 20: Bestimmung der Topologie des Signalpeptids durch Insertion von N-Glykosylierungsstellen. Die Mutanten SP-Glyk-N, SP-Glyk-N2, SP-Glyk-M und SP-Glyk-M2, mit eingefügten N-Glykosylierungsstellen (unterstrichen) wurden in Verozellen mit dem pCAGGS Vektor exprimiert. Die Proteine wurden mit ^{35}S -Methionin/-Cystein für 30 min metabolisch markiert und anschließend 4h durch nicht-radioaktive Aminosäuren verdrängt. Mutiertes Signalpeptid wurde mit dem Antiserum Rb- α -SP präzipitiert. Wenn angegeben, wurde ein Aliquot der Proben mit PNGase F über Nacht behandelt. Unbehandeltes und PNGase F-behandeltes präzipitiertes Protein wurde durch Tricin-SDS-PAGE (16.5% Acrylamid) aufgetrennt, gefolgt von Autoradiographie.

Da die Insertionen nicht die hydrophoben Regionen oder deren flankierende Bereiche betreffen, sollte die Topologie der SP-Mutanten der des nativen SP entsprechen. Die Mutante SP-Glyk-M zeigt ein deutlich verlangsamtes elektrophoretisches Laufverhalten, welches durch Behandlung mit der Glykosidase PNGaseF wieder aufgehoben wird (Abb. 20, Spur 2 und 3). Dies ist der Beweis dafür, dass eine N-Glykosylierung erfolgte und damit die Region zwischen beiden hydrophoben Regionen bereits ER-luminal lokalisiert ist. Um auszuschließen, dass die durch die Insertionen eingeführten Ladungen eine artifizielle Änderung der Topologie bewirken und die Mutante SP-Glyk-M deshalb N-glykosyliert wird, wurde ein Konstrukt generiert, in dem durch die Mutationen hervorgerufene Ladungsveränderungen neutralisiert wurden, sodass das Ladungsverhältnis des Wildtyp-SP wiederhergestellt war. Da auch diese Mutante (SP-Glyk-M2, Spur 4 und 5) glykosyliert wird, ist eine Umkehr der Topologie durch eingeführte Ladungen auszuschließen. Die Kontrollmutanten, SP-Glyk-N und SP-Glyk-N2 (Spur 6-9), zeigen keine Veränderung der gelelektrophoretischen Mobilität nach Behandlung mit PNGase F, was bestätigt, dass die eingeführte N-terminale Glykosylierungsstelle zytoplasmatisch orientiert ist und daher nicht für die Anheftung von N-Glykanen zur Verfügung steht. Die Differenzen im Laufverhalten zwischen den Mutanten liegen an der variablen Länge der Insertionen.

7.3.4. Dimerisierung des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Topologie eines Proteins besteht in der Untersuchung eines Cysteinrestes auf seine Fähigkeit hin, Disulfidbrücken zu bilden. Bildet ein Cysteinrest eine Disulfidbrücke aus, ist dieser Cysteinrest ER-luminal orientiert, da das Disulfidbrücken-knüpfernde Enzym Proteindisulfid-Isomerase ER-ständig vorliegt. Das SP des Lassavirus Glykoproteins besitzt drei Cysteinreste (C41/C53/C57). Von diesen liegt der Rest C41 zwischen beiden hydrophoben Regionen und ist somit geeignet, zu überprüfen, ob diese Region ER-luminal ist.

Um dies zu untersuchen, wurde eine Mutante konstruiert, bei der die beiden übrigen Cysteinreste des SP an Position 53 und 57 zu Serin mutiert waren (Mutante C53S/C57S), also keine Disulfidbrücken durch diese beiden Reste gebildet werden konnten. Das entsprechende Konstrukt wurde in Verozellen exprimiert und im Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Verglichen wurde diese Mutante mit einem Konstrukt, bei dem alle Cysteinreste des SP zu Serin mutiert waren (Mutante C41S/C53S/C57S). Aus Abb. 21 ist ersichtlich, dass die Mutante C53S/C57S entsprechend dem Wildtyp-SP kovalent verbundene Dimere unter nicht-reduzierenden Bedingungen bildet (Spuren 2 und 3). Die Mutante C41S/C53S/C57S zeigt keine Dimerbildung (Spur 4). Als

weitere Kontrolle wurde eine Mutante generiert, bei der nach Austausch aller Cysteinreste ein Cysteinrest am N-Terminus des SP eingeführt wurde (Mutante C41S/C53S/C57S/G2C). Auch diese Mutante zeigt keine Dimerbildung (Spur 5), als Indiz dafür, dass der N-Terminus des SP zytoplasmatisch orientiert ist. Um eine artifizielle Disulfidbrückenbildung durch Oxidation freier Sulfhydrylgruppen zu verhindern, wurde N-Ethylmaleimid in einer Endkonzentration von 20 mM zu Beginn der Zelllyse zugegeben. Dieses Ergebnis zeigt, dass über den Cysteinrest C41 disulfid-abhängig Dimere gebildet werden und somit dieser Bereich des Signalpeptids ER-luminal lokalisiert ist.

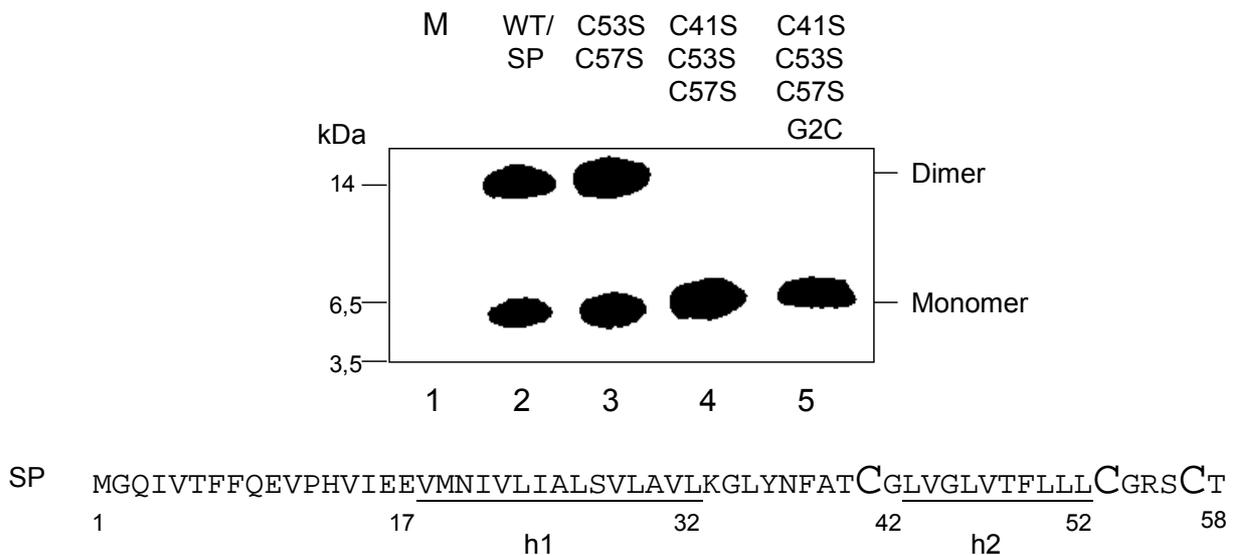


Abb. 21: Bestimmung der Topologie des Lassavirus präGP-C Signalpeptids durch Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens. Wildtyp-Signalpeptid sowie die Mutanten C53S/C57S, C41S/C53S/C57S und C41S/C53S/C57S/G2C wurden in Verozellen exprimiert und im Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Signalpeptidsequenz ist im Ein-Buchstaben-Code dargestellt, Cysteinreste innerhalb der Sequenz sind hervorgehoben. Die hydrophoben Regionen h1 und h2 sind unterstrichen.

Die Topologie des Lassavirus Glykoprotein Signalpeptids konnte durch drei unabhängige experimentelle Ansätze, der Ermittlung der Orientierung eingeführter antigenen Epitope in das SP (7.3.2.), der Einführung potentieller N-Glykosylierungsstellen (7.3.3.) sowie der Untersuchung des disulfid-abhängigen Dimerisierungsverhaltens des SP (7.3.4.) ermittelt werden. Damit wurde gezeigt, dass das Lassavirus präGP-C SP eine neuartige Topologie für SP besitzt. Diese besteht aus einem N-terminalen zytoplasmatischen Abschnitt von 17 Aminosäureresten, gefolgt von dem Transmembrananker h1, der die Aminosäurereste 18-32 umfasst, und einer außergewöhnlichen verlängerten ER-luminalen c-Region von Position 33-58, die die zweite hydrophobe Region h2 einschließt.

7.4. Rolle des Signalpeptids für die Reifung des Lassavirus Glykoproteins

7.4.1. Einfluss der Signalpeptidspaltung auf die Reifung des Glykoproteins

Die ungewöhnliche Topologie des SP deutete auf eine mögliche zusätzliche Funktion neben der Translokationsfunktion, die es im folgenden zu ermitteln galt. Zunächst sollte der Einfluss der SP-Spaltung auf die Reifespaltung des Glykoproteins in seine Untereinheiten GP1 und GP2 durch die Wirtszellprotease SKI-1/S1P untersucht werden. Interessanterweise wurden die Mutanten T58R und S56R, die keine SP-Spaltung mehr aufweisen, nicht mehr in GP1 und GP2 gespalten (Abb. 22, Spuren 3 und 4). Mutationen umgebender Aminosäurereste der SP-Spaltstelle hatten keinen Einfluss auf die posttranslationale Reifespaltung (Spuren 2 und 5). Die Signalpeptidfreisetzung ist demnach Voraussetzung für die anschließende Reifespaltung des Glykoproteins in seine aktive Form.

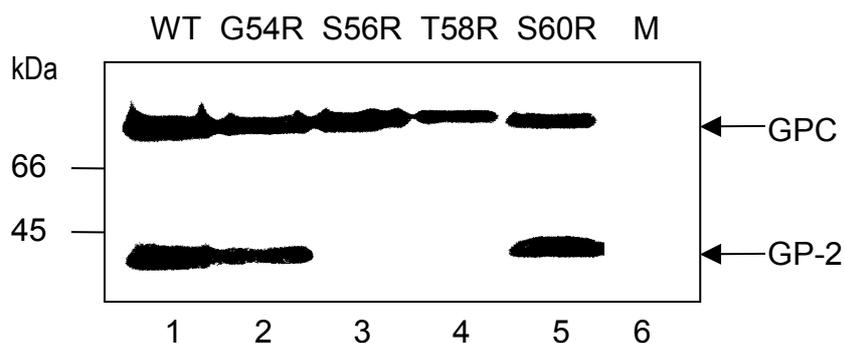


Abb. 22: Proteolytische Prozessierung durch die Subtilase SKI-1/S1P in Lassavirus Glykoprotein Mutanten mit mutierter Signalpeptid-Spaltstelle. Verozellen wurden mit WT-Lassavirus Glykoprotein, sowie den Mutanten G54R, S56R, T58R und S60R Lipofektamin-transfiziert. Glykoprotein wurde durch 10% Acrylamidgele über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Ungespaltenes GP-C und seine gespaltene Form GP2 ist durch Immunfärbung mit dem Antiserum Rb- α -GP2 detektiert.

Da SP ebenfalls als Membrananker fungieren können, bestand in diesem Fall die Möglichkeit, dass das nicht-abspaltbare SP der Mutanten S56R und T58R das Glykoprotein in der ER-Membran zurückhält, das Glykoprotein somit nicht den Ort der Reifespaltung erreicht und deshalb nicht durch SKI-1/S1P in seine Untereinheiten GP1 und GP2 prozessiert wird. Frühere Resultate deuteten jedoch darauf hin, dass die Reifespaltung des Glykoproteins bereits früh im sekretorischen Transportweg erfolgt, eventuell schon im ER (Lenz et al., 2001). Es konnte daher nicht ausgeschlossen werden, dass das freigesetzte SP selbst eine essentielle Rolle bei der posttranslationalen Reifung von GP-C spielt.

7.4.2. Austausch des Lassavirus präGP-C Signalpeptids durch andere Signalpeptide

Um zu untersuchen, ob das SP selbst als solitäre Einheit notwendig für die proteolytische Aktivierung des Glykoproteins ist, wurden mittels rekombinanter PCR andere SP vor das Lassavirus GP-C fusioniert. In dieser Arbeit wurden das Hämagglutinin SP des Influenza Geflügelpestvirus, sowie das SP des zellulären Plasmamembranproteins CD8 verwendet (Mutanten HA-SP/GP-C und CD8-SP/GP-C). Influenzavirus Hämagglutinin und CD8 wurden in früheren Studien häufig als Reportermoleküle in chimären Proteinen genutzt (Jackson et al., 1993; Meyer und Radsak., 2000; Schäfer et al., 1995).

Nach Expression beider Mutanten in Verozellen wurden die chimären Glykoproteine im Western Blot untersucht. Unabhängig von der Herkunft des ausgetauschten Signalpeptids wurden die Lassavirus präGP-C-Hybride in das ER transloziert, wobei das Laufverhalten der Mutanten dem WT-GP-C entspricht (Abb. 23 A, Spuren 3-5). Damit ist gezeigt, dass die heterologen SP korrekt abgespalten werden, da eine inkorrekte Prozessierung in einem verlangsamten elektrophoretischen Laufverhalten resultieren würde. Interessanterweise wurden die Mutanten HA-SP/GP-C und CD8-SP/GP-C jedoch, im Gegensatz zum WT, nicht in die Untereinheiten GP1 und GP2 gespalten (Abb. 23 B, Spuren 2-4). Das Signalpeptid von LCMV präGP-C umfasst wahrscheinlich ebenfalls 58 Reste (Burns und Buchmeier, 1993). Da es hohe Sequenzähnlichkeit zu Lassavirus GP-C SP aufweist, wurde die Austauschbarkeit dieser SP getestet. (Mutante LCMV-SP/GP-C). Diese Mutante wurde nach Expression in Verozellen wie Wildtyp-GP-C prozessiert und ist daher nicht von diesem unterscheidbar (Abb. 23 B, Spur 5).

Die ER-Translokation von Lassavirus präGP-C funktioniert also auch dann, wenn andere SP das von Lassavirus GP-C ersetzen. GP-C wird allerdings nur dann proteolytisch in GP1 und GP2 gespalten, wenn das ursprüngliche oder ein eng verwandtes SP, wie das LCMV präGP-C SP, als Signalpeptid für das Glykoprotein fungieren.

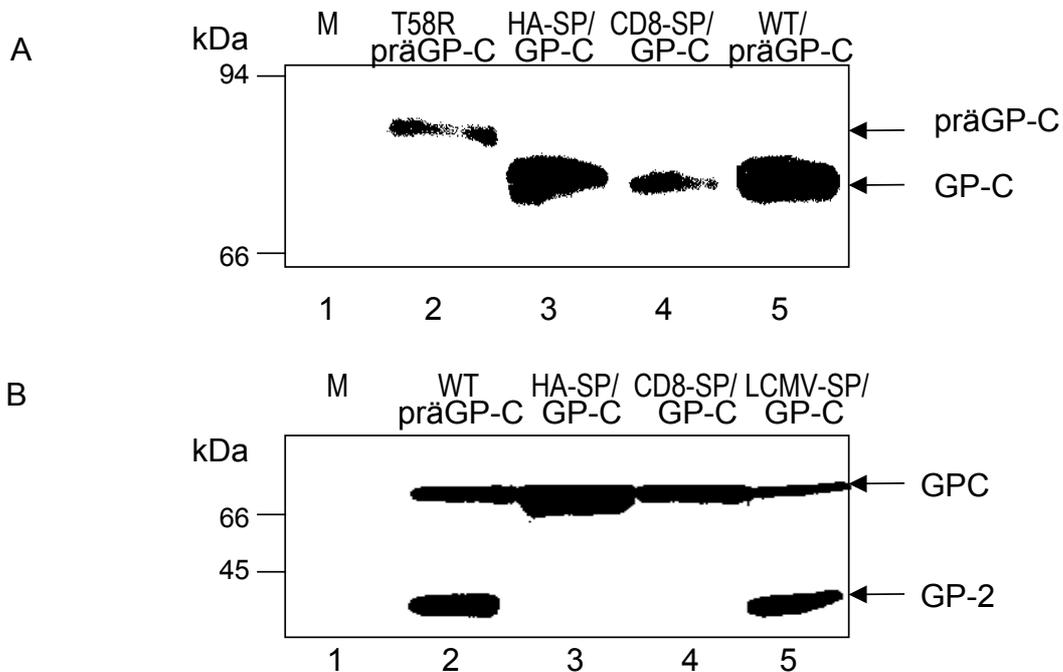
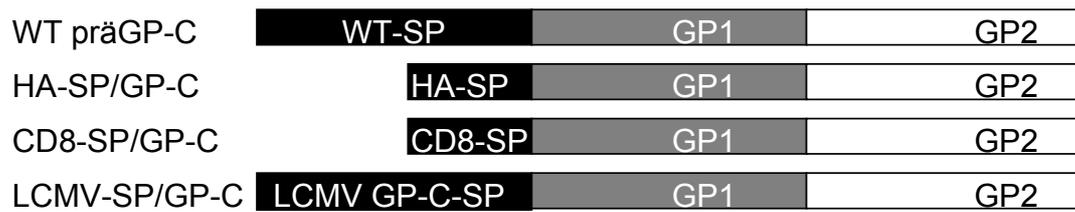


Abb. 23: Substitution des Lassavirus Glykoprotein präGP-C Signalpeptids. Verozellen wurden mit pCAGGS-Vektor (M) und pCAGGS-Wildtyp präGPC und präGP-C Hybriden (Mutanten HA-SP/GP-C, CD8-SP/GP-C und LCMV-SP/GP-C) transfiziert. Die solitär exprimierten Glykoproteine wurden durch SDS-PAGE in 12% (A) oder 10% (B) Acrylamidgelen aufgetrennt, auf PVDF-Membran übertragen und mit dem Kaninchenserum Rb- α -GP2-N detektiert.

7.4.3 Koexpression von solitärem Signalpeptid mit chimärem Lassavirus präGP-C

Die experimentellen Hinweise, dass Glykoproteinmutanten mit defekter SP-Spaltstelle (Abb. 22) sowie Mutanten mit ausgetauschten SP, aber intakten SP-Spaltstellen (Abb. 23), nicht mehr in GP1 und GP2 durch SKI-1/S1P prozessiert werden, lassen darauf schließen, dass das abgespaltene solitäre SP essentiell für die Aktivierungsspaltung von GP-C ist. Um dies zu belegen, wurden die chimären präGP-C-Mutanten HA-SP/GP-C und CD8-SP/GP-C, die nicht zur Reifespaltung in GP1 und GP2 fähig sind, mit solitärem Lassavirus präGP-C SP koexprimiert und die Reifespaltung der Glykoproteine im Western Blot analysiert (Abb. 24). In beiden Fällen wurde die Reifespaltung in GP1 und GP2 durch Koexpression des solitären nativen SP rekonstituiert (Spuren 3-6). Eine Deletionsmutante, bei der das gesamte SP deletiert war, Mutante $\Delta 2-58$ (Spur 1), wurde nicht in GP1 und GP2 gespalten. Diese Mutante belegt die Notwendigkeit eines kovalent gebundenen SP für die ER-Translokation und die nachfolgende Reifespaltung in GP1 und GP2.

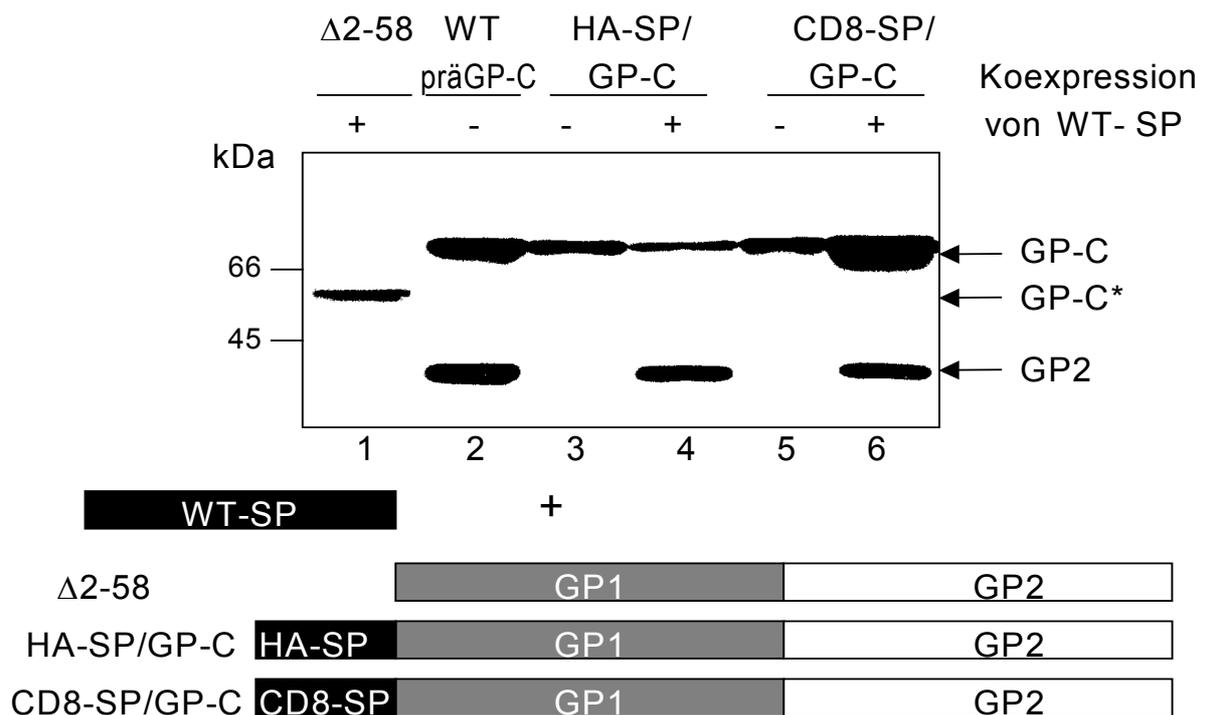


Abb. 24: Rekonstitution der Lassavirus Glykoproteinspaltung in GP1 und GP2. Lassavirus Glykoprotein präGP-C, Mutante HA-SP/GP-C, Mutante CD8-SP/GP-C und, als Kontrolle, Mutante $\Delta 2-58$ wurden mit oder ohne Lassavirus präGP-C Signalpeptid exprimiert. Protein von solubilisierten Zellen wurde durch SDS-PAGE in 10% Acrylamidgelen aufgetrennt und über Western Blot mit dem Antiserum Rb- α -GP2-N detektiert. Nicht-glykosyliertes GP-C ist mit einem Sternchen markiert.

Um auszuschließen, dass die Sequenz N-terminal der SP-Spaltstelle notwendig zur Aktivierung des Glykoproteins ist, wurden zwei N-terminale Deletionsmutanten (Mutanten $\Delta 2-30$ und $\Delta 2-41$) generiert. Auch bei diesen Mutanten wird das Signalpeptid abgespalten (nicht gezeigt), die Reifespaltung erfolgt jedoch nicht. Beide Mutanten werden ebenfalls durch Koexpression mit solitärem Lassavirus GP-C SP zur Reifespaltung von GP-C in GP1 und GP2 befähigt (Abb. 25 A, Spuren 3-6).

In Abb. 22 wurde bereits gezeigt, dass die Freisetzung des SP von präGP-C ein erster essentieller Schritt zur Reifung des Glykoproteins ist. Im folgenden Experiment sollte geklärt werden, ob bei mutiertem präGP-C, von dem das SP nicht abgespalten werden kann, die Reifespaltung durch Koexpression des nativen SP wiederhergestellt werden kann. Aus Abb. 25 B ist ersichtlich, dass bei Mutanten, die nicht zur SP-Spaltung fähig sind (Mutanten S56R und T58R), durch Koexpression mit Lassavirus präGP-C SP die Reifespaltung nicht rekonstituiert wird (Spuren 2-6). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Freisetzung des SP durch SPase eine notwendige Voraussetzung für die Spaltung des Glykoproteins durch SKI-1/S1P zur Generierung der Untereinheiten GP1 und GP2 ist.

Diese Experimente demonstrieren, dass das Lassavirus Glykoprotein SP nach Abspaltung von präGP-C als eigenständige funktionelle Einheit notwendig für die proteolytische Aktivierung von GP-C in GP1 und GP2 ist.

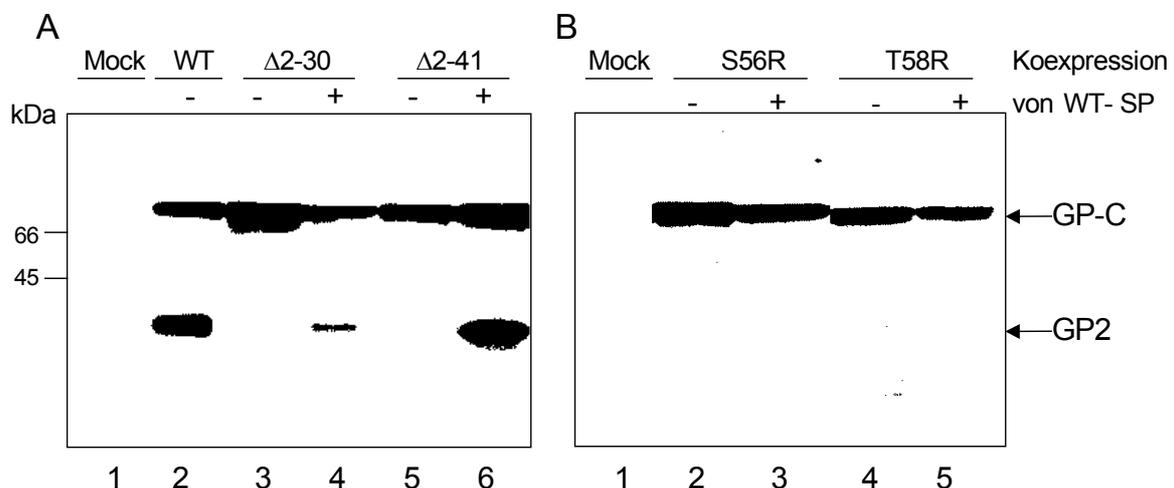


Abb. 25: Rekonstitution der Lassavirus Glykoproteinspaltung bei Lassavirus Glykoprotein Signalpeptidmutanten. (A) Lassavirus Glykoprotein präGP-C, Mutante $\Delta 2-30$ und Mutante $\Delta 2-41$ wurden mit oder ohne solitärem Lassavirus präGP-C Signalpeptid exprimiert. Exprimiertes Protein wurde durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und über Western Blot mit dem Antiserum Rb- α -GP2-N detektiert. (B) Lassavirus Glykoprotein-Mutanten S56R und T58R wurden mit oder ohne Lassavirus präGP-C Signalpeptid exprimiert. Glykoprotein von solubilisierten Zellen wurde durch SDS-PAGE in 10% Acrylamidgelen aufgetrennt und über Western Blot mit dem Antiserum Rb- α -GP2-N detektiert.

7.4.4. Assoziation des Lassavirus Glykoproteins mit Calnexin

Signalpeptide, die nach Abspaltung weiter an dem Reifungsprozess von Proteinen beteiligt sind, waren bislang nicht bekannt. Eine Möglichkeit, wie das SP in dem Prozess der Reifung des Glykoproteins fungiert, wäre eine chaperonähnliche Aktivität, die das Glykoprotein in einer bestimmten Konformation hält. In einem weiteren Ansatz wurde daher überprüft, ob das SP spezifisch in den Faltungsprozess von GP-C involviert ist. Zu diesem Zweck wurden Pulse/Chase-Versuche und anschließende Kopräzipitationen mit Antiserum gegen das ER-Chaperon Calnexin durchgeführt. Calnexin interagiert als molekulares Chaperon ER-luminal in einer frühen Phase der Proteinfaltung mit glykosylierten Proteinen. Die Halbwertszeit der Interaktion eines Glykoproteins mit Calnexin gibt daher einen Aufschluss darüber, inwieweit ein Protein nicht korrekt gefaltet ist und im sekretorischen Transportweg zurückgehalten wird. Um dies zu untersuchen, wurde eine Mutante mit ausgetauschtem SP im Vergleich zu Wildtyp-präGP-C exprimiert und metabolisch markiert.

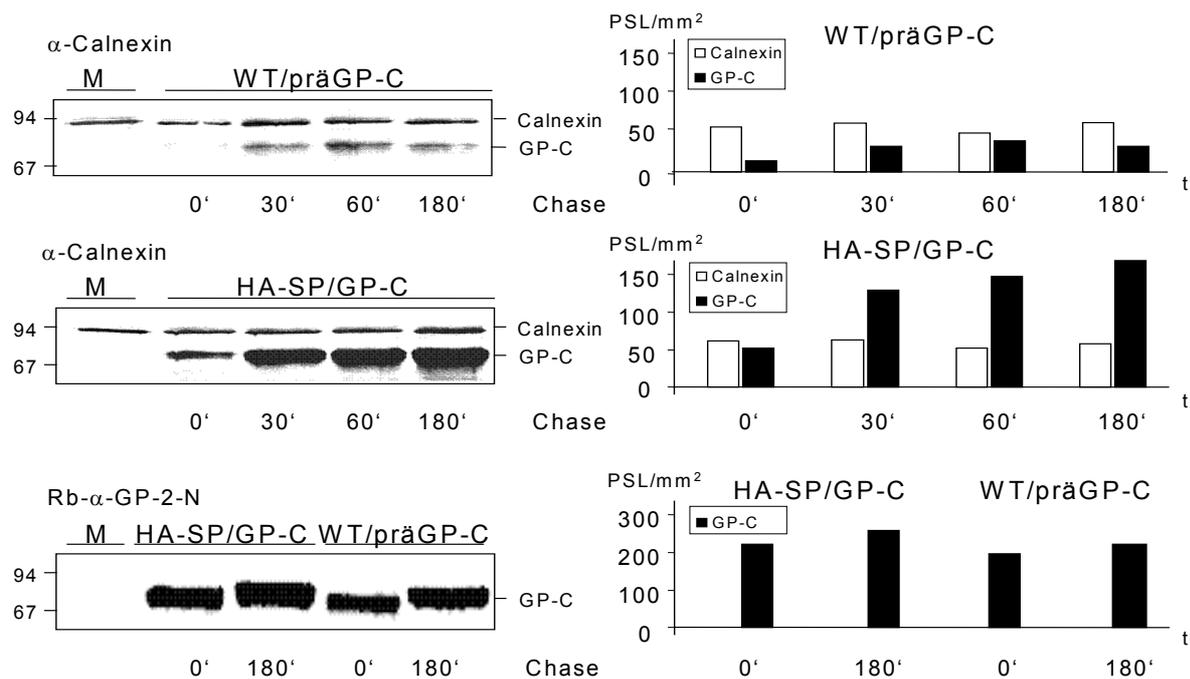


Abb. 26: Glykoprotein-Assoziation mit Calnexin. Verozellen wurden mit Lassavirus präGP-C und der Mutante HA-SP/GP-C transfiziert oder, als Kontrolle, mit Vektor ohne Insertion transfiziert (M). 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit ³⁵S-Methionin/-Cystein für 30 min metabolisch markiert und anschließend über die angegebenen Zeitintervalle mit nicht-radioaktiven Aminosäuren inkubiert. Protein wurde mit Anti-Calnexin-Antiserum (obere und mittlere Reihe, linke Spalte) oder Rb-α-GP2-N Antiserum (untere Reihe, linke Spalte) präzipitiert, durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und über anschließende Autoradiographie mittels Tina-Software (Raytest) quantifiziert (rechte Spalte). PSL/mm²: Signalintensität.

Die Ergebnisse aus Abb. 26 zeigen, dass der Austausch des nativen SP bei der Mutante HA-SP/GP-C im Gegensatz zum Wildtyp-Glykoprotein (oben) zu einer zeitabhängigen Akkumulation von GP-C mit Calnexin führt (Mitte). Das Expressionsniveau von WT/präGP-C und HA-SP/GP-C ist hierbei vergleichbar, was durch parallele Präzipitation mit GP-C-spezifischem Antiserum bestätigt wurde (unten). Das Calnexin-Signal ist in diesem Fall zu schwach, um detektiert zu werden.

Eine Interaktion zwischen Calnexin und den gespaltenen Untereinheiten GP1 und GP2 wurde nicht detektiert, auch dies kann auf ein zu schwaches Signal zurückzuführen sein. Die aufgeführten Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Lassavirus Glykoprotein SP für eine korrekte Faltung des Glykoproteins notwendig ist.

7.5. Interaktion von Lassavirus GP-C und Signalpeptid

7.5.1. Kopräzipitation von Lassavirus GP-C und Signalpeptid

Die bisher genannten Resultate legen eine direkte Interaktion zwischen GP-C und seinem freigesetzten SP nahe. Um dies zu untersuchen, wurden Kopräzipitationsexperimente durchgeführt. Nach vektorieller Expression von Wildtyp-präGP-C in Verozellen wird GP-C durch SP-spezifisches Antiserum kopräzipitiert. Umgekehrt kopräzipitiert das Antiserum, das gegen die GP2-Untereinheit gerichtet ist, das SP (Abb. 27 A, B).

Im folgenden sollte geklärt werden, wie lange die Interaktion zwischen SP und Glykoprotein andauert. Zu diesem Zweck wurde nach Expression von Wildtyp-präGP-C die Dauer der Chase-Periode um entsprechende Zeitintervalle verlängert (Abb. 27 C). Aus diesem Experiment wird ersichtlich, dass die Interaktion zwischen SP und Glykoprotein mindestens bis zu einer Dauer von 8 h stabil ist, unabhängig davon, welches der beiden Antiseren für die Präzipitation verwendet wurde.

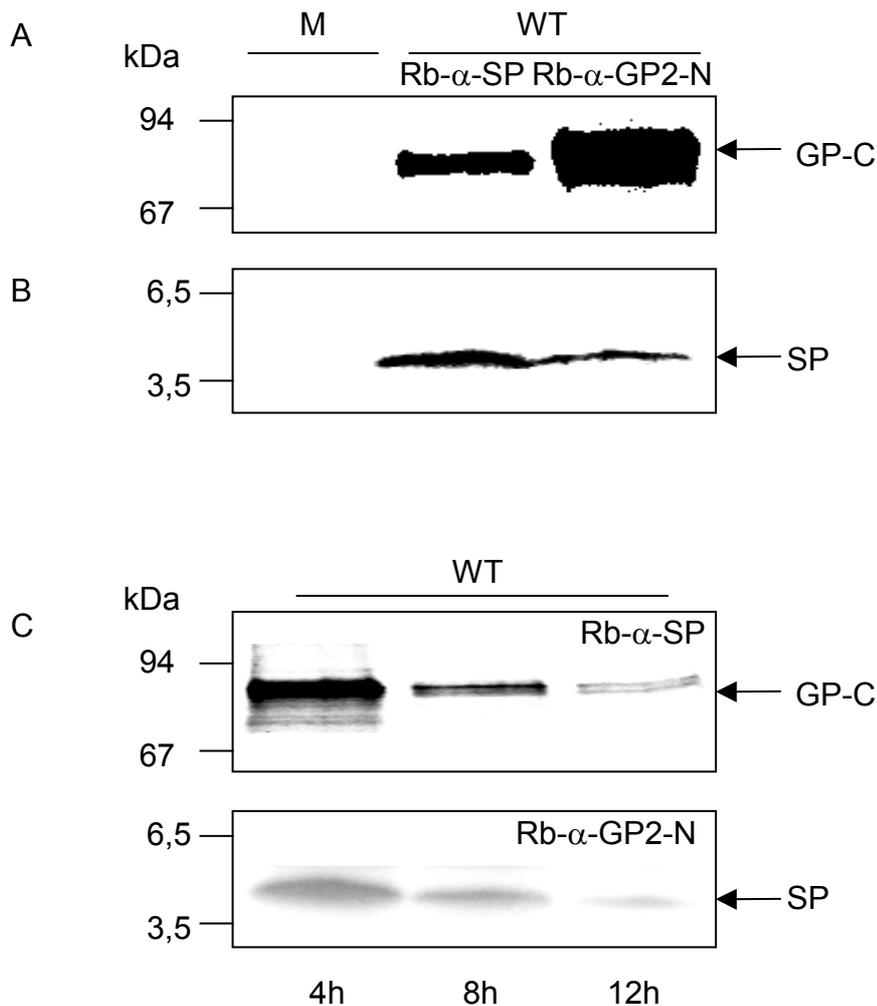


Abb. 27: Interaktion von Lassavirus GP-C und Signalpeptid. Verozellen wurden mit präGP-C oder mit leerem Vektor (M) transfiziert. Exprimiertes Protein wurde mit ^{35}S -Methionin/-Cystein metabolisch markiert und entweder mit dem Antiserum Rb- α -SP (A und B, Spur 2 und C, obere Reihe) oder Rb- α -GP2-N (A und B, Spur 3 und C, untere Reihe) präzipitiert. Immunopräzipitiertes SP und GP-C wurde durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) (A und C, obere Reihe) oder Tricin-SDS-PAGE (16,5% Acrylamid) (B und C, untere Reihe) aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

7.5.2. Kolokalisation von Lassavirus GP-C und Signalpeptid

Die im vorhergehenden Experiment beschriebene direkte Interaktion zwischen SP und Glykoprotein bedingt eine Kolokalisation beider Proteine im gleichen zellulären Kompartiment. Um dies zu bestätigen, wurde in einem weiteren Ansatz ein Signalpeptid mit N-terminalem FLAG-Tag konstruiert (Mutante SP-FLAG-N), da der Antikörper gegen den N-Terminus des SP nur in Immunpräzipitations-, jedoch nicht in Immunfluoreszenzstudien eingesetzt werden konnte. Dieses modifizierte SP verhält sich wie WT-SP, wie Expressions- als auch Kopräzipitationsstudien bestätigen. SP-FLAG-N wurde mit chimärem präGP-C (HA-SP/GP-C) koexprimiert. Zellen, die mit beiden Konstrukten transfiziert wurden, zeigen bei

konfokalen Aufnahmen eine klare Überlagerung der Immunfluoreszenzen als direktes Indiz für eine Kolokalisation (Abb. 28, oben, dicker Pfeil). Signalpeptid und Glykoprotein, von verschiedenen Plasmiden exprimiert, kolokalisieren demnach im gleichen zellulären Kompartiment. Zellen, die nur mit einem Konstrukt transfiziert wurden, zeigen keine Überlagerung der Immunfluoreszenz, was belegt, dass keine Kreuzreaktion zwischen den Antikörpern auftritt (dünner Pfeil). Als Kontrolle wurde das solitäre SP mit einem anderen viralen Glykoprotein, dem Geflügelpestvirus Hämagglutinin (HA) exprimiert (unten). Wie erwartet, zeigt sich keine Überlagerung der Fluoreszenzen beider Konstrukte, die Kolokalisation von SP und GP-C ist demnach spezifisch.

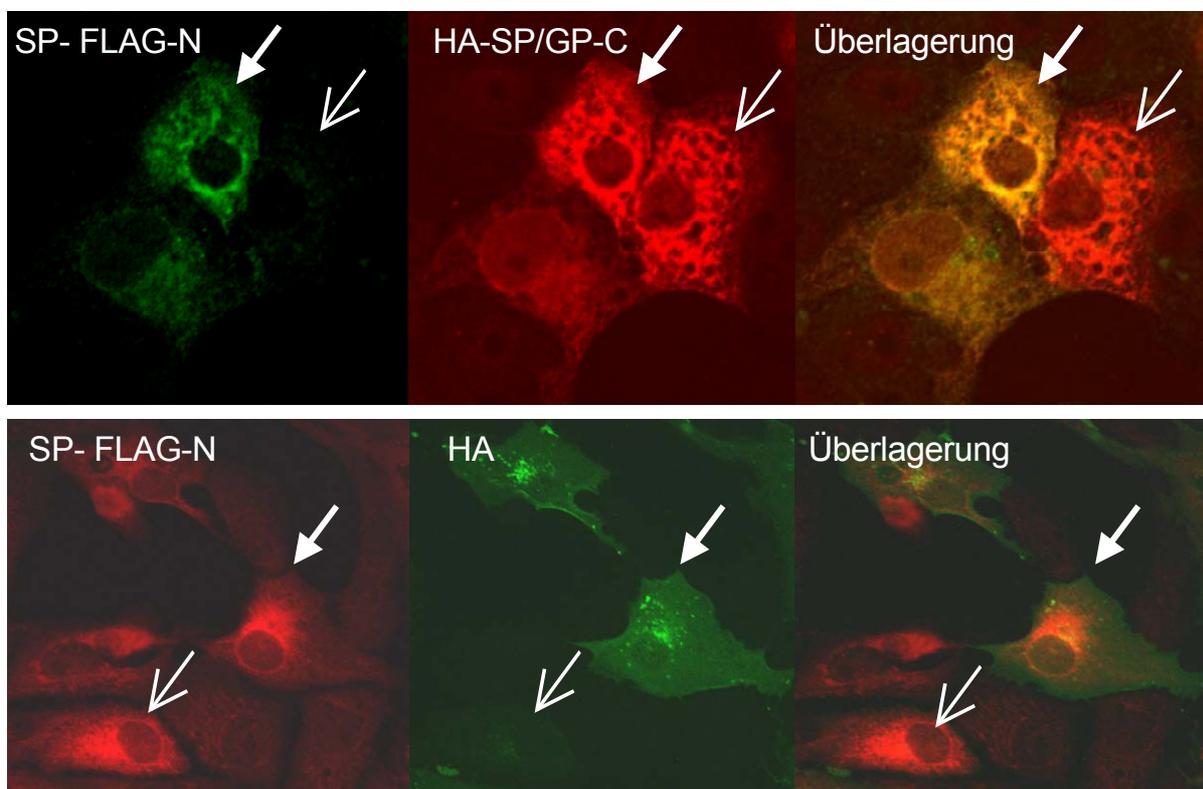


Abb. 28: Kolokalisation von Lassavirus GP-C und Signalpeptid. Verozellen, die auf Deckgläschen gewachsen waren, wurden mit pCAGGS-Vektor, der die Insertionen HA-SP/GP-C bzw. HA oder SP-FLAG-N enthielt, kotransfiziert. Nach Permeabilisierung mit Aceton/Methanol wurde mit den Antikörpern Rb- α -GP2-N, und mAb- α -FLAG M2 bzw. mAb- α -FLAG und Rb- α -FLAG inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit entsprechenden Rhodamin- oder FITC-gekoppeltem Immunglobulin. Die Koexpression von koexprimiertem Signalpeptid und Lassavirus GP-C ist durch einen ausgefüllten Pfeil gezeigt, Einzelexpression durch einen leeren Pfeil.

7.6. Sequenzerfordernisse des Signalpeptids für GP-C-Spaltung

7.6.1. N- und C-terminale Mutation des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C

Die Interaktion des SP mit dem Glykoprotein sowie seine Topologie in der ER-Membran deuten darauf hin, dass der verlängerte C-terminale ER-luminale Bereich des SP für die Interaktion mit GP-C verantwortlich ist. Nach dieser Annahme wäre die Anwesenheit des zytoplasmatischen Anteils des Signalpeptids bis zur hydrophoben Domäne h1 für die Prozessierung von GP-C in GP1 und GP2 nicht notwendig. Um diese Annahme zu stützen, wurde eine präGP-C-Deletionsmutante, Mutante $\Delta 2-17$, verkürzt vom N-Terminus des SP bis zur Transmembrandomäne h1, generiert und in Verozellen exprimiert. Eine Western Blot-Analyse dieses Konstrukts zeigt, dass die Deletion des N-Terminus bis zum Transmembransegment h1 keinen Einfluss auf die GP-C-Prozessierung hat (Abb. 29). Diese Mutante ist, hinsichtlich dieser Eigenschaft, nicht von Wildtyp-GP-C zu unterscheiden.

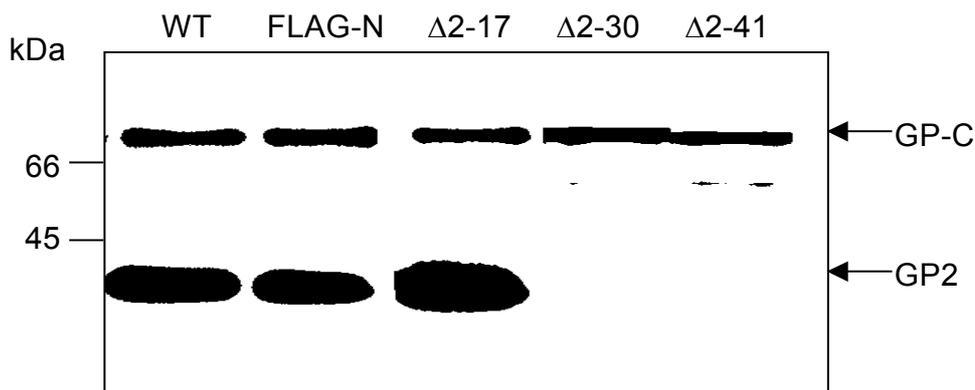


Abb. 29: Deletion des N-Terminus von Lassavirus Glykoprotein präGP-C. Verozellen wurden mit Wildtyp-präGP-C und präGP-C-Mutanten mit einem N-terminalen FLAG-Epitop (Mutante FLAG) sowie den Deletionen der Aminosäuren 2-17, 2-30 und 2-41 (Mutanten $\Delta 2-17$, $\Delta 2-30$ und $\Delta 2-41$) transfiziert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und nicht-gespaltene GP-C sowie die Untereinheit GP2 mit dem Antiserum Rb- α -GP2-N nachgewiesen.

Weitergehende Deletionen von 30 oder 41 Resten bis zur zweiten hydrophoben Region verhindern die Reifespaltung von GP-C, erlauben aber weiterhin die ER-Translokation. In einer weiteren Mutationsanalyse wurden die C-terminalen polaren Reste des SP vor der Spaltstelle C53, G54 und R55 in Punktmutanten untersucht, um die Wichtigkeit der polaren Region N-terminal der SP-Spaltstelle für die Glykoproteinreifung zu klären. Alle diese Mutanten besitzen hinsichtlich der Reifespaltung Wildtypcharakter (nicht gezeigt). Die aufgeführten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen GP-C und SP im ER-Lumen stattfindet. Der N-Terminus des SP sowie der polare Bereich am C-Terminus vor der SP-Spaltstelle sind nicht für die Reifung des Glykoproteins notwendig.

7.6.2. Mutationsanalyse des Bereichs zwischen den hydrophoben Regionen des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C

Die unter 7.6.1. aufgeführte Mutationsanalyse ermöglichte eine Eingrenzung der für die Glykoproteinaktivierung notwendigen Region des SP. In dem nun folgenden Experiment sollte der Bereich des SP zwischen beiden hydrophoben Regionen sowie die zweite hydrophobe Domäne h2 selbst untersucht werden. Hierzu wurden die Aminosäuren im Bereich zwischen beiden hydrophoben Regionen des SP durch Alaninreste ersetzt (Mutanten A33-37 und A38-42). Die zweite hydrophobe Domäne wurde im Bereich von Aminosäureposition 43-48 zu Alanin mutiert. Die Untersuchungen an diesen Mutanten zeigen, dass die Reifespaltung des Glykoproteins in GP1 und GP2 bei den Mutanten A33-37 und A38-42 stark reduziert ist (Spuren 2 und 3). In einer weiteren Mutante wurde die Sequenz zwischen Position 35 und 40 invertiert. Diese Mutante wurde ebenfalls nicht in GP1 und GP2 gespalten (nicht gezeigt). Die Mutante A43-48 (Spur 4) dagegen verhält sich bezüglich der Reifespaltung annähernd wie der Wildtyp. Diesen Ergebnissen nach ist der Bereich zwischen beiden hydrophoben Domänen essentiell für die Reifung des Glykoproteins.

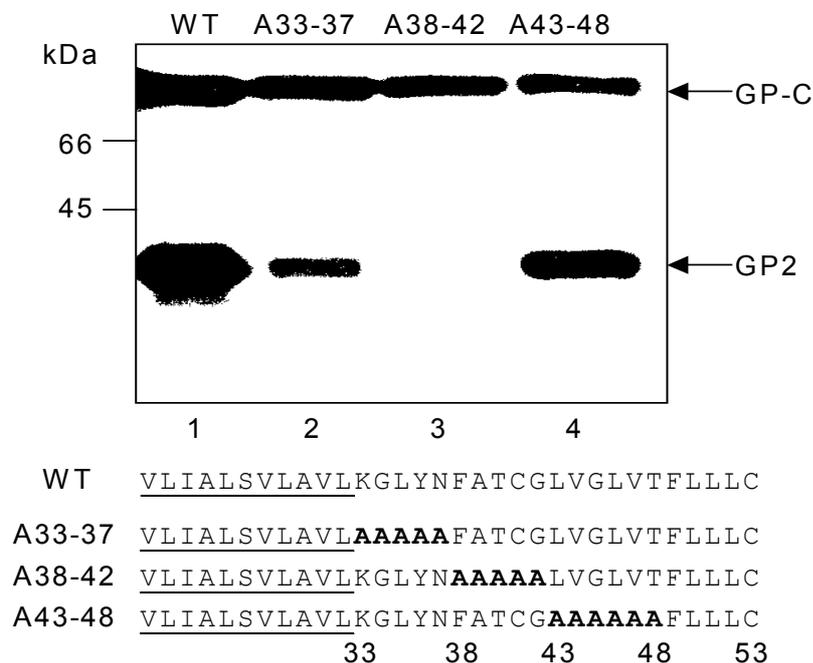


Abb. 30: Mutagenese der c-Region des Signalpeptids von Lassavirus Glykoprotein präGP-C. Verozellen wurden mit Wildtyp präGP-C und präGP-C-Konstrukten mit Mutationen im Bereich von Aminosäureposition 33-48 (Mutanten A33-37, A38-42 und A43-48) transfiziert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Nicht-gespaltenes GP-C und die Untereinheit GP2 wurden mit dem Antiserum Rb- α -GP2-N detektiert. Die membranständige Region des SP ist unterstrichen dargestellt.

7.7. Inkorporation des Signalpeptids von Lassavirus präGP-C in Virionen

Die Funktion des SP als Reifungsfaktor für das Glykoprotein und die damit verbundene Stabilität des SP warf die Frage auf, ob das SP auch in Virionen inkorporiert wird und somit fester Bestandteil des Viruspartikels ist. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Verozellen mit Lassavirus infiziert und radioaktiv markiert. Das radioaktiv markierte Virus im Kulturüberstand wurde anschließend gereinigt, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Autoradiographie analysiert.

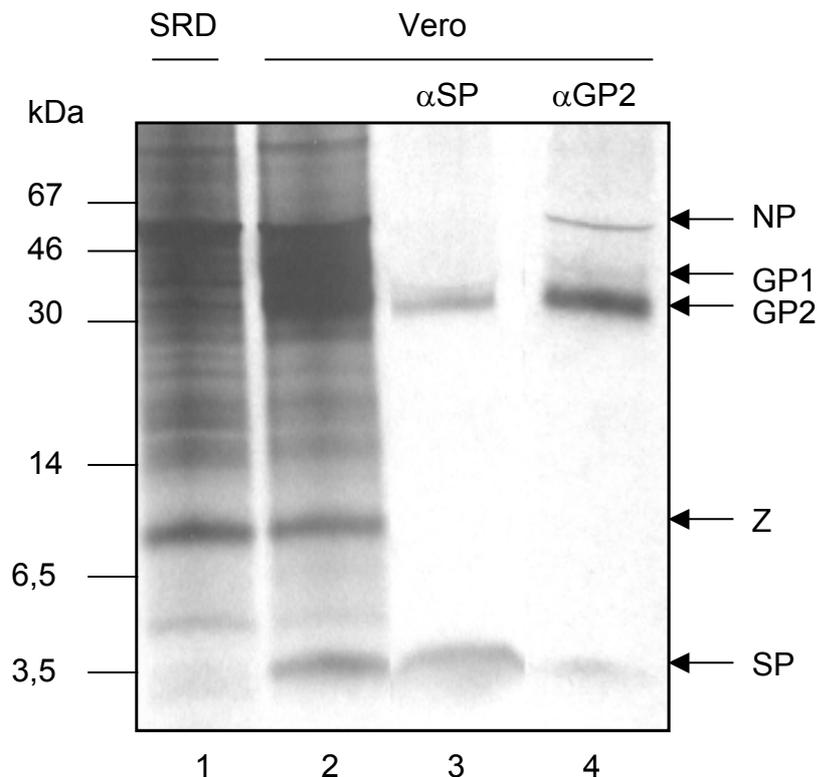


Abb. 31: Virion-Assoziation des Lassavirus Glykoprotein Signalpeptids. Verozellen wurden mit Lassavirus infiziert. Einen Tag nach Infektion wurden die Zellen mit ^{35}S -Methionin/-Cystein für 24 h metabolisch markiert. Radioaktiv markiertes Virus wurde anschließend durch ein Saccharosekissen (20%) gereinigt und unbehandelt oder nach Präzipitation mit Rb- α -SP, Rb- α -GP2 oder Rb- α -GP1 über Tricin-SDS-PAGE (16,5% Acrylamid) aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert.

Die Viruspräparation aus Abb. 31 enthält die viralen Proteine NP, GP1, GP2 und Z. Das Signal der viralen Polymerase L ist zu schwach, um bei der Reinheit dieser Probe eindeutig identifiziert zu werden. Zusätzlich zu den genannten Proteinen wurde in diesen Viruspräparationen aus Verozellen ein zusätzliches Signal mit der gelelektrophoretischen Mobilität des SP detektiert (Spur 2). Interessanterweise fehlt dieses Signal in Viruspräparationen aus SRD-12B-Zellen (Spur 1). Diese Zelllinie ist SKI-1/S1P-defizient, daher wird in diesen Zellen das Glykoprotein nicht in GP1 und GP2 gespalten. Da nur gespaltenes Glykoprotein in Viruspartikel inkorporiert wird, enthalten Viruspartikel aus SRD-

12B-Zellen kein Glykoprotein (Lenz et al., 2001). Eine Immunpräzipitation der Viruspräparation aus Verozellen mit gegen das SP gerichtetem Antiserum bestätigt, dass es sich bei diesem Signal um das Lassavirus Glykoprotein SP handelt (Spur 3). Zusätzlich wird bei dieser Präzipitation ein weiteres Protein kopräzipitiert, dass vom Laufverhalten GP2 entspricht. Umgekehrt wird bei einer Immunpräzipitation mit gegen GP2 gerichtetem Antiserum das SP kopräzipitiert (Spur 4). Außerdem werden geringe Mengen von Proteinen in Höhe des GP1 und NP kopräzipitiert. Diese Versuche zeigen, dass das SP in Virionen inkorporiert wird und mit der GP2-Untereinheit interagiert.

Die Entstehung des GP2-SP-Komplexes ist aller Wahrscheinlichkeit nach nicht an das Virion gebunden. Unter dieser Voraussetzung sollte eine Interaktion zwischen SP und GP2 zellulären Ursprungs und somit auch in Verozellen zu detektieren sein. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde ein Lassavirus Glykoprotein, dass N-terminal mit einem FLAG-Tag versehen ist, konstruiert. Somit konnte das SP mit FLAG-Antiserum und die GP2-Untereinheit mit GP2-Antiserum präzipitiert werden. Nach Expression in Verozellen wurde zunächst das SP mit FLAG-Antiserum präzipitiert und anschließend kopräzipitiertes GP2 im Western Blot mit GP2-Antiserum nachgewiesen (Abb. 32). Unter Nutzung des GP1-Antiserums wurde nur GP-C detektiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Interaktion zwischen SP und der GP2-Untereinheit bereits in Zellen stattfindet und nicht strikt an das Virion gebunden ist.

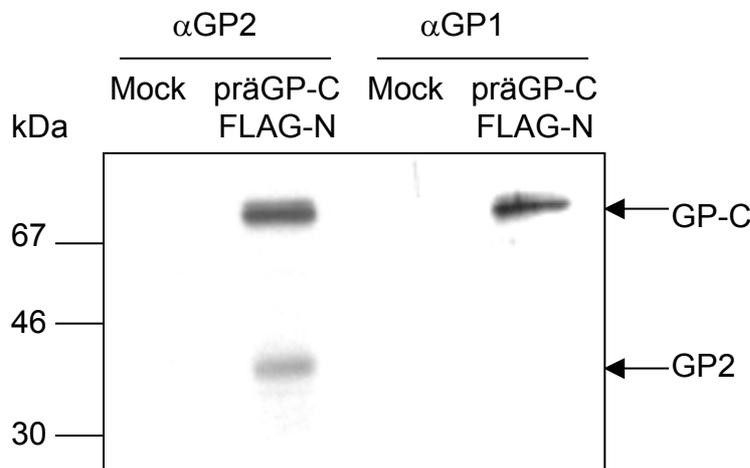


Abb. 32: Zelluläre Interaktion zwischen SP und GP2. Verozellen wurden mit präGP-C/FLAG-N Lipofektamin-transfiziert oder mit Vektor ohne Insertion transfiziert (Mock). 20 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und mit Rb- α -FLAG präzipitiert. Präzipitiertes Protein wurde anschließend über SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und im Western Blot mit dem Antiserum Rb- α -GP2 bzw. Rb- α -GP1 analysiert.

7.8. Mutation von Cysteinresten des Lassavirus Glykoprotein Signalpeptids

Die Resultate aus 7.7. zeigen eine Interaktion des SP mit GP-C und speziell der GP2-Untereinheit. Die nachfolgenden Experimente sollten Hinweise auf die Natur dieser Interaktion geben. Der C-terminale verlängerte Abschnitt des SP enthält drei Cysteinreste, sodass zunächst eine mögliche Interaktion über Disulfidbrücken untersucht wurde. Mittels rekombinanter Mutagenese wurden jeweils die Cysteinreste C41, C53 und C57 zu Serin ausgetauscht. Die entsprechenden Proteine wurden wieder N-terminal mit dem FLAG-Epitop versehen. Die Expression dieser Konstrukte in Verozellen mit anschließender Detektion der GP2-Untereinheit im Western Blot zeigt, dass nur bei der Mutante C53S GP2 detektierbar ist, wohingegen bei den Mutanten C41S und C57S keine Aktivierungsspaltung von GP-C in GP1 und GP2 stattfindet (Abb. 33). Demnach sind die Cysteinreste C41 und C57 des SP zumindest von struktureller Bedeutung für die Reifung des Glykoproteins.

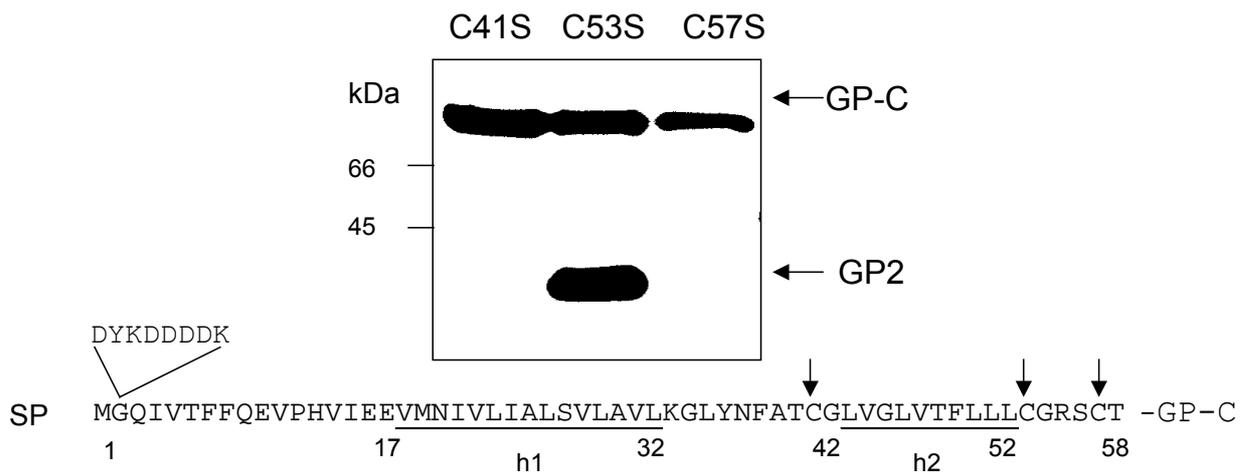


Abb. 33: Mutation von Cysteinresten des Lassavirus Glykoprotein Signalpeptids. Verozellen wurden mit den Mutanten C41S-FLAG-N, C53S-FLAG-N und C57S-FLAG-N von rekombinantem präGP-C transfiziert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Ungespaltene GP-C und seine gespaltene Form GP2 ist durch immunchemischen Nachweis mit dem Antiserum Rb- α -GP2 detektiert. Die Signalsequenz ist angegeben, ebenso das FLAG-Epitop (DYKDDDDK) und die jeweils mutierten Cysteinreste des Signalpeptids (Pfeile). Die hydrophoben Regionen h1 und h2 sind unterstrichen.

Um die Auswirkung dieser Mutationen auf die Interaktion von SP und GP-C zu untersuchen, wurden die Mutanten C41S, C53S und C57S in Verozellen exprimiert und zunächst mit FLAG-Antiserum bzw. GP2-Antiserum präzipitiert. Anschließend wurde im Western Blot GP-C mit GP2-Antiserum bzw. SP mit FLAG-Antiserum detektiert.

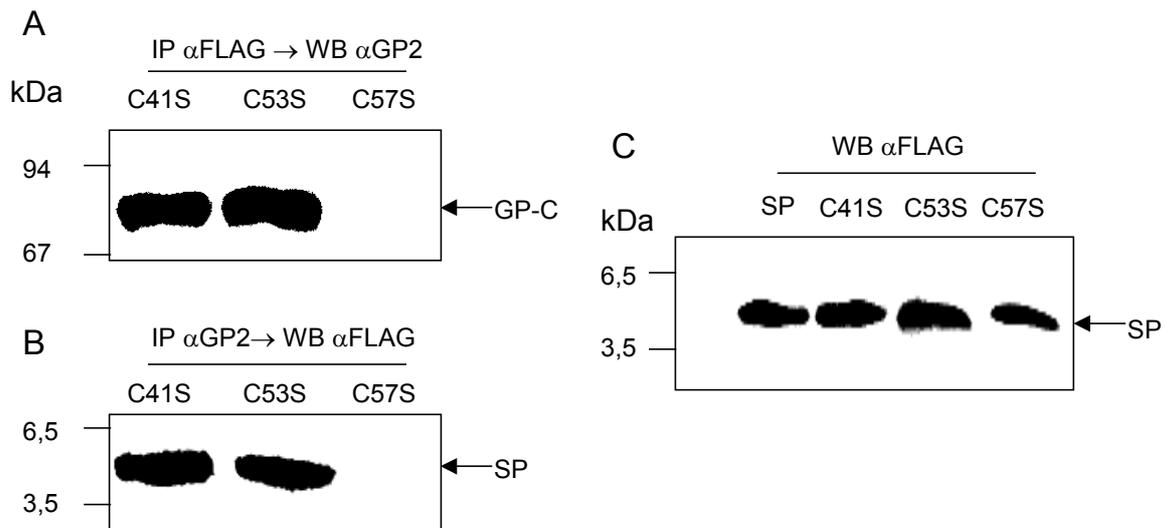


Abb. 34: Cysteinvermittelte Interaktion zwischen Lassavirus Glykoprotein und SP. Verozellen wurden mit den Mutanten C41S-FLAG-N, C53S-FLAG-N und C57S-FLAG-N von rekombinatem präGP-C Lipofektamin-transfiziert. 20 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und entweder mit Rb- α -FLAG (A) bzw. Rb- α -GP2 (B) präzipitiert oder nach Tricin-SDS-PAGE (16,5%) im Western Blot mit dem Antiserum Rb- α -FLAG (C) analysiert. Mit Rb- α -FLAG präzipitierte Proben wurden durch 10% Acrylamidgele über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem Antiserum Rb- α -GP2 detektiert. Mit Rb- α -GP2 präzipitierte Proben wurden über Tricin-SDS-PAGE (16,5%) aufgetrennt und im Western Blot mit dem Antiserum Rb- α -FLAG detektiert.

Aus Abb. 34 ist ersichtlich, dass die Mutationen C41S und C53S keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen SP und GP-C haben (A und B). Die Mutante C57S zeigt jedoch in beiden Fällen keine Interaktion von SP mit GP-C. Das Signalpeptid wird bei allen drei Mutanten korrekt von präGP-C abgespalten (Abb. 34, C). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass der Aminosäurerest C57 für die Interaktion zwischen SP und GP-C wichtig ist. Diese Interaktion ist für die anschließende Reifespaltung des Glykoproteins in seine beiden Untereinheiten GP1 und GP2 notwendig.

8. Diskussion

8.1. Identifikation des Lassavirus präGP-C Signalpeptids

Signalpeptide (SP) besitzen eine dreigliedrige Struktur, bestehend aus einem N-terminalen Abschnitt stark variierender Länge, einem hydrophoben Bereich, der notwendig für Membraninsertion und Zielsteuerung des Proteins ist, und einem C-terminalen polaren Bereich, der die Signalpeptid-Spaltstelle einschließt. Dieser C-terminale, polare Bereich enthält in Position -1 und -3 kleine, ungeladene Reste, wodurch die SP-Spaltstelle bestimmt wird. Große, geladene Reste in diesen Positionen verhindern eine SP-Spaltung durch die Signal-Peptidase (SPase).

Zu Beginn dieser Studie war die Spaltstelle des SP des Lassavirus präGP-C durch SPase nicht bekannt. Vorhersageprogramme wie SignalP (Nielsen et al., 1997) sowie Untersuchungen am LCMV Glykoprotein (Burns und Buchmeier, 1993) wiesen auf eine mögliche Spaltung um Position 58 hin, es wurde jedoch auch eine mögliche Spaltung nach Position 37 vorhergesagt. Mehrere potentielle SP-Spaltstellen sowie das Vorhandensein zweier hydrophober Regionen ließen eine eindeutige Zuordnung der SP-Spaltstelle auf theoretischem Wege nicht zu. Die SP-Spaltstelle wurde daher experimentell einerseits durch Ansequenzierung der GP1-Untereinheit nach Isolierung aus Virionen und andererseits durch gezielte Mutagenese der potentiellen Spaltstelle ermittelt (Kapitel 7.1.). Das Ergebnis der N-terminalen Ansequenzierung brachte einen ersten Hinweis auf die ungewöhnliche Länge des SP von 58 Aminosäureresten. Diese Methode schließt jedoch nicht in letzter Konsequenz aus, dass die SP-Spaltung N-terminal von Position 58, z. B. nach Position 37, erfolgt und anschließend durch eine Aminopeptidase mehrere N-ständige Aminosäurereste von GP1 abgedaut werden. Im Falle eines N-terminalen Abbaus durch eine Aminopeptidase wären hier jedoch unterschiedliche Aminosäuren zu erwarten. Diese Möglichkeit kann demnach ausgeschlossen werden, da die Signale der Sequenzierung eindeutig waren. Eine nachfolgende Mutation der für die SP-Spaltung notwendigen entsprechenden Aminosäurereste in Position -1 und -3 lieferte endgültigen Aufschluss. Die Einführung einer Ladung an diesen Positionen verhinderte die SP-Spaltung, während Ladungen im Umkreis dieser Positionen ohne Effekt blieben. Die Mutation des Aminosäurerestes an Position -3 verhinderte die SP-Spaltung jedoch nicht vollständig. Eine mögliche Erklärung für diese Restaktivität lässt sich aus der Kristallstruktur der bakteriellen SPase ableiten. Die Struktur zeigt, dass die hydrophobe Nische für die -3-Position etwas breiter als für die -1-Position ist und somit auch größere Reste in dieser Position erlaubt. Position -2 und -4 dagegen liegen außerhalb des aktiven Zentrums und erlauben daher eine hohe Variabilität in diesen Positionen (Paetzel et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Spaltung des SP exklusiv hinter Position 58 erfolgt. Neben der Spaltung durch SPase treten keine weiteren Spaltprodukte des SP auf. Die ungewöhnliche Länge des SP sowie das Vorhandensein zweier hydrophober Domänen könnte zu der Annahme verleiten, dass das SP eventuell nicht durch SPase, sondern eine andere Protease gespalten wird. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch folgende Hinweise: (i) das Lassavirus Glykoprotein ist ein sekretorisches Protein. Alle bislang bekannten sekretorischen Proteine besitzen N-terminal eine Signalsequenz, die, falls sie abgespalten wird, durch SPase abgespalten wird. (ii) Die Spaltung erfolgt kotranslational. Es ist kein weiteres dem ER-Translokation assoziiertes Enzym bekannt, das diese Spaltung übernehmen könnte. (iii) Das Motiv, an dem die Spaltung erfolgt, entspricht exakt dem Erkennungsmotiv für SPase. Die Reste an Position -1 und -3 der Spaltstelle sind klein und ungeladen. Ein Austausch an einer der beiden Positionen durch einen geladenen Rest inhibiert die SP-Spaltung. Desweiteren befindet sich eine hydrophobe Domäne im Abstand von 6 Aminosäureresten zur SP-Spaltstelle. Wird diese deletiert, erfolgt ebenfalls keine SP-Spaltung. Auch dies steht in Einklang mit bisherigen Untersuchungen, nach denen SP-Spaltungen 2-9 Reste hinter einer hydrophoben Region erfolgen (Izard und Kendall, 1994). Untersuchungen zum Signalpeptid des LCMV Glykoproteins sind publiziert, die, im Gegensatz zu den hier vorliegenden Daten für Lassavirus präGP-C, eine posttranslationale Abspaltung des Signalpeptids von präGP-C diskutieren (Froeschke et al., 2003). In jener Arbeit konnte jedoch GP-C, die Form des Glykoproteins, bei der das SP bereits freigesetzt ist, nicht detektiert werden. Dies wurde als mögliche Instabilität von GP-C oder unpassende Auflösung des verwendeten Gelelektrophoresesystems diskutiert. Weiterhin wurde präGP-C nur in der Immunpräzipitation, aber nicht im Western Blot, mit Antiserum gegen das SP detektiert. Allerdings muss präGP-C gerade im Western Blot bei einem nicht-abgespaltenen Signalpeptid, wie von den Autoren gefordert, mit gegen das SP gerichtetem Antiserum zu detektieren sein. Aufgrund der hohen Homologie der Signalpeptide von Lassavirus und LCMV präGP-C könnte daher die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Interaktion von GP-C mit dem SP in jener Arbeit als nicht-abgespaltenes SP von präGP-C fehlinterpretiert worden sein.

8.2. Topologie des Signalpeptids

Der Mechanismus, der die Topologie einer membranspannenden Domäne in der ER-Membran bestimmt, ist größtenteils unbekannt. Signalpeptide nehmen in der Regel eine Konformation ein, bei der der N-Terminus zytoplasmatisch ausgerichtet und der C-Terminus ER-luminal ist (Mothes et al., 1994). Einzelne Untersuchungen zeigen jedoch, dass der N-

Terminus eines Signalpeptids unter besonderen Umständen in das ER-Lumen transloziert wird (von Heijne et al., 1989). Eine Analyse zahlreicher Transmembrandomänen wies darauf hin, dass Aminosäurereste, die den N-terminalen Signalanker flankieren, bestimmend für dessen Topologie sind (von Heijne, 1989; Hartmann et al., 1989; Parks und Lamb, 1991). Es wurde nachfolgend vorgeschlagen, dass die Netto-Ladungen der flankierenden Segmente der hydrophoben Region deren Orientierung diktieren, mit einer zytoplasmatischen Ausrichtung des positiveren Segments (von Heijne, 1994). Diese sogenannte „positive-inside-rule“ wird in der Topologie des Großteils membranintegrierter bakterieller Proteine bestätigt, was zumindest zum Teil durch das der bakteriellen Membran anliegenden negativen elektrischen Potentials erklärbar ist (Cao et al., 1995). Diese Regel ist jedoch nicht auf die Topologie eukaryotischer Proteine, die kotranslational in die ER-Membran inseriert werden, übertragbar (Spiess, 1995; Sato et al., 1998; Goder und Spiess, 2003). Auf Grund von statistischen Analysen schlugen Hartmann und Mitarbeiter (1989) die sogenannte „charge-difference“-Hypothese vor. Diese besagt, dass die jeweils 15 flankierenden Aminosäurereste eines Transmembransegments die Orientierung des N-Terminus zur Membran bestimmen. Aber auch diese Hypothese wurde zunehmend durch experimentelle Hinweise in Frage gestellt (Andrews et al., 1992).

Der derzeitige Stand der Forschung besagt, dass keine einzelne Eigenschaft einer naszierenden Polypeptidkette die Orientierung einer hydrophoben Domäne bestimmt. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die Summe einer Vielzahl von Eigenschaften der hydrophoben Sequenz und deren flankierender Bereiche, wie Hydrophobizität, Ladung und Konformation die Orientierung des Polypeptids am Translokon diktieren (Denzer et al., 1995; Wahlberg und Spiess, 1997; Goder und Spiess, 2003).

Die in dieser Arbeit aufgeführten Daten zeigen, dass das Signalpeptid von Lassavirus präGP-C zwei unabhängige hydrophobe Domänen besitzt, h1 und h2 (Kapitel 7.3.). Beide hydrophoben Domänen sind unabhängig voneinander in der Lage, das Glykoprotein in das ER zu translozieren. Topologische Studien haben jedoch gezeigt, dass im nativen Signalpeptid nur die erste der beiden hydrophoben Domänen, h1, zur Membranverankerung genutzt wird. Das resultierende Topologiemodell besteht aus einem 17 Aminosäurereste langen N-terminalen zytoplasmatischen Anteil, der Transmembranregion h1, sowie einem verlängerten C-terminalen ER-luminalen Bereich (Abb. 35). Dieser verlängerte C-terminale Bereich kann nochmals in drei Domänen unterteilt werden: die zweite hydrophobe Domäne h2, flankiert von der h1-h2-verbindenden Region sowie der kurzen polaren c-Region, die das Erkennungsmotiv für die SPase einschließt. Die hydrophobe Region h2 könnte frei im ER-Lumen vorliegen oder membranassoziiert sein. Eine Unterscheidung zwischen beiden möglichen Konformationen ist mit den gängigen molekularbiologischen Methoden nicht

möglich. Obwohl die hydrophobe Domäne h2 membranassoziiert vorliegen könnte, ist das Rückfalten dieser Region durch die ER-Membran dadurch ausgeschlossen, dass der C-Terminus des SP die SP-Spaltstelle enthält und somit ER-luminal ist. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, dass C-terminal mit antigenen Epitopen versehene SP in Zellen mit nicht-permeabilisierten ER-Membranen immunchemisch nicht zugänglich sind.

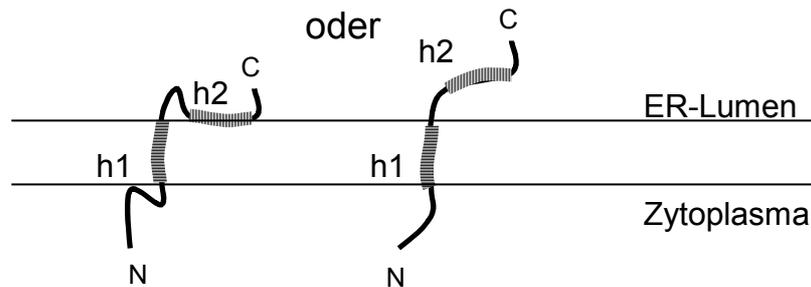


Abb. 35 : Topologie des Lassavirus präGP-C Signalpeptids. Die Topologie des Lassavirus Glykoprotein Signalpeptids in der ER-Membran ist aufgeführt. N- und C-Terminus des Signalpeptids sind angegeben. Die hydrophoben Domänen h1 und h2 sind als gestrichelte Linien gezeigt.

Eine Membranassoziation der h2-Region erscheint plausibel, da kürzliche Untersuchungen mit Proteaseschutz-Experimenten am SP des LCMV Glykoproteins gezeigt haben, dass das SP resistent gegenüber Proteaseeinwirkung ist und somit eine sehr kompakte Struktur besitzen muss (Froeschke et al., 2003). Da die h2-Region notwendig für eine korrekte SP-Spaltung ist, wäre eine Membranassoziation dieser Domäne denkbar, da auch das spaltende Enzym SPase membranassoziiert ist (Paetzel et al., 1998). Die in jener Arbeit angedeuteten möglichen Modelle für die Topologie des SP in der ER-Membran wurden jedoch durch die in der vorliegenden Dissertation gezeigten experimentellen Hinweise widerlegt.

Die Topologie des SP wurde mit drei voneinander unabhängigen Methoden untersucht, die gemeinsam auf das in Abb. 35 dargelegte Topologiemodell hindeuten. Dennoch kann nie mit letzter Konsequenz das Entstehen von artifizierlicher Insertion bei der Mutagenese des SP oder die Möglichkeit verschiedener Populationen des SP mit unterschiedlichen Konformationen ausgeschlossen werden. Die in dieser Arbeit aufgeführten Experimente wurden jedoch mit zahlreichen Kontrollen versehen, um das Auftreten von Artefakten auszuschließen.

Die Einführung antigenen Epitope wie des FLAG-Epitops verändert die Ladung des SP, sodass theoretisch eine Änderung der Konformation des SP die Folge sein könnte. Diese Möglichkeit wurde durch folgende Kontrollen ausgeschlossen: (i) Neben dem FLAG-Epitop wurden weitere Epitope mit unterschiedlichen Ladungsverteilungen, wie das HA-Epitop oder das His-Epitop, in das SP eingeführt. Diese Konstrukte zeigten allesamt die gleiche Topologie. (ii) Die Ladungsverteilung im nativen SP zeigt, dass der N-Terminus des SP negativ (-3) und der Bereich zwischen beiden hydrophoben Regionen positiv (+1) geladen

ist. Die Einführung des FLAG (-2)- oder HA (-2)-Epitops zwischen beide hydrophoben Regionen verändert zwar die Ladung in diesem Bereich von +1 zu -1, damit ist die Gesamtladung in diesem Bereich jedoch immer noch positiver als im N-terminalen Segment (-3). (iii) Die am N-Terminus des SP eingeführten Epitope befinden sich in einem Abstand von knapp 20 Aminosäureresten zur h-Region. Bisherige Untersuchungen ergaben, dass Ladungen in derartigem Abstand zur hydrophoben Region keinen Einfluss auf die Topologie eines Proteins haben (Hartmann et al., 1989). (iv) Die in dieser Arbeit aufgeführten Daten haben gezeigt, dass der N-Terminus des SP bis zur ersten hydrophoben Domäne deletiert werden kann und dies keinen Einfluss auf die Reifungsspaltung des Glykoproteins hat. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass ein Glykoprotein, das am N-Terminus des SP ein FLAG-Epitop trägt, wie wildtypisches Glykoprotein prozessiert wird. Beide Ergebnisse wären mit einer Umkehr in der Topologie des SP durch die Deletion des N-Terminus oder Einführung des Epitops unvereinbar.

Die Auswirkung der Einführung von Ladungen in den Bereich zwischen beiden hydrophoben Regionen wurde mit Hilfe der Mutanten mit inserierten N-Glykosylierungsstellen untersucht. Über die antigenen Epitope eingeführte Ladungen wurden in nachfolgenden Mutanten neutralisiert, sodass schließlich das Ladungsverhältnis wieder exakt der Wildtypsituation entsprach. Trotz dieser Ladungsänderungen wurden alle Mutanten mit eingeführten N-Glykosylierungsstellen zwischen beiden hydrophoben Regionen N-glykosyliert. Im Gegensatz dazu wurde kein Konstrukt mit N-terminal eingeführter N-Glykosylierungsstelle, gleichgültig ob mit oder ohne zusätzlichem Epitop und unabhängig von der Gesamtladung, N-glykosyliert. Die Wahrscheinlichkeit, dass Ladungen in den mutierten Bereichen für die Topologie des SP eine Rolle spielen, ist daher praktisch ausgeschlossen.

Zusätzlich wurde das Potential zur Bildung von Disulfidbrücken bei dem Cysteinrest C41 zwischen beiden hydrophoben Regionen bestätigt. Bei den entsprechenden Mutanten blieb die Ladung des Wildtyp-SP unverändert. Die Mutation von Cysteinresten kann zwar zu einer Konformationsänderung des Proteinabschnitts, nicht aber zu einer Umkehr der Topologie führen.

Die vorgeschlagene Topologie für das SP erscheint auch bei theoretischer Betrachtungsweise sinnvoll, da SP in einem Signalerkennungspartikel (SRP)-abhängigen Prozess zum ER-Translokation dirigiert werden. Das SRP bindet dabei an die h-Region der aus dem Ribosom naszierenden Polypeptidkette. Die Translation wird während der SRP-Bindung arretiert und das SRP bindet an seinen Rezeptor am ER-Translokation. Die h-Region wird in die Membran inseriert und die Elongation der naszierenden Polypeptidkette wird in das ER-Lumen fortgesetzt. Da die h1-Region des SP, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ausreichend für die ER-Translokation des Glykoproteins ist, erscheint es höchst

unwahrscheinlich, dass das SRP zunächst an die h1-Region bindet und dann wieder dissoziiert, um mit der h2-Region zu interagieren.

Die Aminosäuresequenz von Lassavirus präGP-C SP, von der 17 zytoplasmatisch und 26 Reste ER-luminal orientiert sind, ist hochkonserviert unter den Glykoproteinen der Arenaviren, LCMV präGP-C eingeschlossen (Tab. 1). Bislang wurde das LCMV präGP-C SP als klassisches Signalpeptid mit verlängerter N-Region betrachtet (Martoglio und Dobberstein, 1998). Da die SP von Lassavirus und LCMV präGP-C homolog und, wie in dieser Arbeit gezeigt, funktionell austauschbar sind, ist anzunehmen, dass das LCMV präGP-C SP dieselbe Topologie wie das Lassavirus präGP-C SP mit einem verlängerten ER-luminalen Bereich aufweist.

Tab. 1 Signalpeptide der Arenaviren

Lassa	MGQIVTFFQEVPHVIEEVMNIVLIALSVLVILKGLYNFATCGLVGLVTFLLLCGRSCTTS	60
Mopeia	MGQIVTFFQEVPHILEEVMNIVLMTLSILAILKGIYNVMTCGIIGLITFLLFCGRSCS-S	59
LCMV	MGQIVTMFEALPHIIDEVINIVLIVLIIITSIKAVYNFATCGILALVSFLFLAGRSCG--	58
Whitewater	MGQLISFFGEIPSIIEHEALNIALIAVSIISILKGVINIWGSGLLQFIVFLLLAGRSCSYK	60
Sabia	MGQLFSFFEEVPNIIEHEAINIALIAVSLIAALKGMINLWKSGLFQLIFFLTLAGRSCSFR	60
Tacaribe	MGQFISFMQEIPFLQAEALNIALVAVSLICIVKGLVNLVYRCGLFQLMVFLVLAGRSCSEE	60
Junin	MGQFISFMQEIPFLQAEALNIALVAVSLIAIIKGIVNLYKSGLFQFFVFLVLAGRSCTEE	60
Pichinde	MGQVVTLIQSIPEVLQAEVFNVALIIVSTLCIIKGFVNLVYRCGLFQLITFLILAGRSCDGM	60
	***. : * . . . * : : : * . . * . . * ** *	

Legende: *, vollständige Konservierung; :, hohe Konservierung; ., niedrige Konservierung

Die Topologie des Lassavirus präGP-C Signalpeptids ist einzigartig im Vergleich zu Glykoproteinen anderer Virusfamilien. Verlängerte SP sind ebenfalls für Glykoproteine anderer Viren beschrieben, wie z.B. Foamyvirus (Lindemann et al., 2001), HIV-1 (Li et al., 2000), Sindbisvirus und Hepatitis C-Virus (Coquerel et al., 2002), sowie von nicht-viralen Proteinen, wie z.B. Prolaktin (Lemberg und Martoglio, 2002).

Für das verlängerte Foamyvirus Glykoprotein SP wurde eine Länge von 148 Aminosäureresten vorgeschlagen. Die N-terminalen 66 Aminosäurereste formen eine hydrophile zytoplasmatische Domäne, 24 hydrophobe Reste durchspannen die Membran und 58 Reste sind ER-luminal orientiert mit mehreren potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Im Unterschied dazu hat das Lassavirus präGP-C SP zwei hydrophobe Domänen, von denen allerdings nur die erste membraninsetiert ist. Dieses Charakteristikum unterscheidet das Lassavirus präGP-C SP deutlich von dem des Foamyvirus Glykoproteins, das bei der Partikelbildung eine Rolle spielen soll (Lindemann et al., 2001).

Das Sindbisvirus 6K Protein verbindet die Proteine E1 und E2 im Vorläuferprotein und kann ebenfalls als Signalpeptid angesehen werden. Es durchspannt die ER-Membran zweifach, wobei N- und C-Terminus ER-luminal orientiert sind (Sanz et al., 2003). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Topologie des Lassavirus präGP-C Signalpeptids neuartig ist und sich deutlich von der bisher bekannten Topologie von Signalpeptiden zellulärer und viraler Proteine unterscheidet, die aus einem N-terminalen zytoplasmatischen Bereich, einer hydrophoben Region und einer kurzen polaren C-Region besteht.

8.3. Bedeutung des Signalpeptids für die Reifung des Glykoproteins

Es wurde bereits vermutet, dass Signalpeptide, bedingt durch ihre Diversität, exzellente evolutionäre Substrate sind. Sequenzelemente, die die Sortierungsfunktion nicht beeinträchtigen, aber für zusätzliche Funktionen nützlich sind, können neu entstehen und über lange Zeiträume selektiert werden (Hegde, 2002). Das Lassavirus Glykoprotein Signalpeptid könnte hierfür ein Beispiel sein. Die hohe Konservierung unter den Glykoproteinen der Arenaviren, was ungewöhnlich für virale Signalpeptide ist, ist ein starker Indikator für eine zusätzliche Funktion neben der Translokation des Proteins in das ER.

Die Beobachtung, dass chimäre Lassavirus Glykoprotein Vorläufer mit ausgetauschten SP nicht proteolytisch durch SKI-1/S1P gespalten werden, hat gezeigt, dass das SP des Lassavirus präGP-C tatsächlich eine zusätzliche Funktion besitzt (Kapitel 7.4.). Diese zweite Funktion, die zu gespaltenem GP1/GP2 führt, wird durch Koexpression von solitärem Lassavirus präGP-C SP wiederhergestellt und nur dann ausgeübt, wenn das SP korrekt von Lassavirus präGP-C abgespalten wird. Nicht-abgespaltenes SP kann nicht die Reifespaltung von GP-C durch SKI-1/S1P unterstützen. Dies kann nicht durch Koexpression von solitärem SP des Lassavirus präGP-C ausgeglichen werden, was auf ein sterisches Problem hindeutet.

Der Mechanismus, wie das SP an der Spaltung von GP-C beteiligt ist, ist nicht bekannt. N-terminale Deletionsmutanten sowie die ungewöhnliche Topologie des SP deuten jedoch stark auf eine ER-luminale Interaktion zwischen SP und GP-C hin. Dies erscheint plausibel, da Mutanten mit verändertem N-Terminus Wildtyp-Charakter besitzen (Mutanten SP-FLAG-N und $\Delta 2-17$), Mutanten mit veränderter c-Region dagegen nicht funktionell sind, was die Reifespaltung des Glykoproteins betrifft. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass die c-Region des Signalpeptids GP-C in das zelluläre Kompartiment, in dem die Spaltung durch SKI-1/S1P erfolgt, relokalisiert. Es wurde gezeigt, dass Lassavirus GP-C, wie die übrigen bekannten zellulären Substrate von SKI-1/S1P, früh im sekretorischen Transportweg vor Erreichen des medialen Golgi gespalten wird (Lenz et al., 2001; Chen et al., 2002; Ye et al.,

2000; deBose-Boyd et al., 1999; Espenshade et al., 1999; Mowla et al., 1999). Das Lassavirus präGP-C SP könnte daher eine Relokalisierungs- oder Retentionsfunktion für die Reifespaltung von GP-C erfüllen. Diese Möglichkeit erscheint jedoch unwahrscheinlich, da kein Unterschied in der zellulären Lokalisation von Wildtyp präGP-C und chimärem präGP-C gefunden wurde, was nahelegt, dass das SP nicht für den Transport von GP-C verantwortlich ist und damit gegen eine Funktion des SP als Relokalisationsfaktor spricht. Im Gegenteil, das SP wird bei Lassavirus-infizierten Verozellen in Viruspartikel inkorporiert, in Lassavirus-infizierten SRD-12B-Zellen jedoch nicht. SRD-12B-Zellen sind SKI-1/S1P-defizient, d.h. in diesen Zellen erfolgt keine Aktivierung des Glykoproteins. Es wird jedoch nur aktiviertes Glykoprotein, d.h. nur die gespaltenen Untereinheiten GP1 und GP2, in Viruspartikel inkorporiert. Da in SRD-12B-Zellen im Gegensatz zu Verozellen kein Transport des SP in Viruspartikel erfolgt, ist es daher wahrscheinlich, dass das SP durch das Glykoprotein dirigiert wird und nicht umgekehrt. Eine weitere These ist folgende: das SP fixiert das Glykoprotein in einem bestimmten Abstand zur ER-Membran und fungiert sozusagen als Abstandhalter und ermöglicht so die Reifespaltung durch SKI-1/S1P. Mutationsstudien des ER-luminalen Anteils des SP haben jedoch gezeigt, dass nicht nur die Länge des SP wichtig ist, sondern ebenfalls die Aminosäuresequenz zwischen beiden hydrophoben Regionen entscheidend für die Spaltung von GP-C ist. Aus diesem Grund erscheint die Möglichkeit, dass die ER-luminalen 26 Reste des SP als Chaperon für GP-C fungieren und dieses in einer für das spaltende Enzym SKI-1/S1P zugänglichen Konformation halten, in diesem Zusammenhang am wahrscheinlichsten. Die lange Halbwertszeit des SP in der Zelle, die Kolokalisation des SP mit GP-C sowie die Akkumulation von GP-C mit dem ER-Chaperon Calnexin in Mutanten mit ausgetauschtem SP unterstützen diese Annahme.

Neben der ER-Translokation hat das SP des Lassavirus Glykoproteins eine weitere Funktion. Es fungiert wahrscheinlich als Chaperon, ist somit essentiell für die posttranslationale Spaltung des Glykoproteins und folglich für die Entstehung infektiöser Viruspartikel.

8.3.1. Mögliche weitere Funktionen des Signalpeptids

Es ist theoretisch möglich, dass das SP noch weitere Funktionen neben der bereits besprochenen Bedeutung für die proteolytische Aktivierung des Glykoproteins erfüllt. Speziell der N-terminale, zytoplasmatische Bereich des SP könnte weitere Interaktionspartner besitzen, darunter eventuell auch virale, etwa das Matrixprotein Z oder das Nukleoprotein NP des Lassavirus. Kopräzipitationsstudien haben jedoch keine weiteren

Interaktionspartner für das SP identifiziert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Interaktionen stattfinden, diese allerdings so schwach sind, dass sie unterhalb der Detektionsgrenze liegen.

Das SP enthält N-terminal eine Myristylierungsstelle, also eine weitere Möglichkeit zur Membranassoziation. N-terminale Deletionsmutanten haben gezeigt, dass eine Deletion dieser Myristylierungsstelle keinen Einfluss auf die Reifung des Glykoproteins hat. Ob diese Myristylierungsstelle überhaupt genutzt wird, erscheint äußerst fraglich, da das Motiv für N-Myristylierung stark degeneriert ist und daher rein statistisch sehr häufig vorkommt.

Bislang sind vornehmlich N-terminale Signalpeptidfragmente bekannt, die über zusätzliche Funktionen verfügen (Martoglio et al., 1997; Braud et al., 1998). Diese werden nach ihrer Abspaltung vom SP ins Zytoplasma entlassen, wo sie weitere Aufgaben erfüllen können. Die diesem Prozess vorausgehende Spaltung erfolgt intramembranär durch eine Signalpeptid-Peptidase (SPPase). Ein ähnlicher Ablauf wäre für den Lebenszyklus des SP von Lassavirus präGP-C unwahrscheinlich, da dieses in voller Länge stabil ist. N-terminale Spaltfragmente wurden nicht detektiert. Dies erscheint auch vor dem Hintergrund plausibel, dass Spaltungen durch SPPase durch basische Reste, die den hydrophoben Membrananker flankieren, inhibiert werden (Lemberg und Martoglio, 2002). Das SP des Glykoproteins der Arenaviren besitzt einen vollständig konservierten Lysinrest an Position 33 der Aminosäuresequenz, also direkt flankierend zur hydrophoben Region h1, die das SP in der Membran inseriert. Damit kann eine Prozessierung des SP durch die SPPase ausgeschlossen werden.

8.4. Interaktion zwischen Signalpeptid und Glykoprotein

Funktionelle Untersuchungen haben ergeben, dass das Signalpeptid notwendig für die proteolytische Prozessierung des Glykoproteins in seine beiden Untereinheiten, GP1 und GP2, durch die Wirtszellprotease SKI-1/S1P ist. Untersuchungen der Zusammensetzung viraler Partikel haben gezeigt, dass das SP ein fester Bestandteil des Virions ist. Weitere Beobachtungen ergaben, dass das SP nur in viralen Partikeln vorhanden ist, wenn eine Virusinfektion in Zellen erfolgte, in denen SKI-1/S1P aktiv ist. Virus aus infizierten SRD-12B-Zellen enthält kein SP. SRD-12B-Zellen fehlt die Protease SKI-1/S1P, die für die proteolytische Aktivierung des Glykoproteins notwendig ist. Virale Partikel, die aus diesen Zellen freigesetzt werden, besitzen kein Glykoprotein, da nur korrekt prozessierte Glykoproteinuntereinheiten in Virionen eingebaut werden (Lenz et al., 2001; Kunz et al., 2003). Das Fehlen von SP in Virus aus SRD-12B-Zellen ist ein starkes Indiz dafür, dass das

SP nur zusammen mit dem Glykoprotein in Viruspartikel inkorporiert wird. Voraussetzung hierfür ist eine stabile Interaktion zwischen SP und Glykoprotein. Interaktionsstudien haben eine direkte Interaktion des Signalpeptids mit seinem Glykoprotein gezeigt, die darüber hinaus eine hohe Stabilität besitzt. Die Natur der molekularen Interaktion zwischen SP und Glykoprotein wurde durch Mutationsanalysen untersucht. Diese zeigten, dass der zytosolische Anteil des SP bis zur membranverankerten Region für die Interaktion zwischen SP und GP-C entbehrlich ist. Weitere Mutationsanalysen deuten darauf hin, dass die Interaktion zwischen SP und Glykoprotein über eine kovalente Verknüpfung durch eine Disulfidbrücke vermittelt wird. Als interagierender Cysteinrest wurde der Cysteinrest C57 des SP bestimmt (Kapitel 7.8.). Das SP wird dann passiv in das Virion transportiert und ist letztendlich ein fester Bestandteil des Viruspartikels. Inwiefern zusätzlich eine sequenzspezifische Interaktion zwischen dem SP und GP2 dazu beiträgt, ist nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das SP Dimere unter nicht-reduzierenden Bedingungen bildet. Ob diese Dimerisierung notwendig für die Reifung des Glykoproteins ist, ist nicht eindeutig geklärt. Zwar verhindert eine Mutation der Cysteinreste 41 und 57 des SP die Reifungsspaltung des Glykoproteins in GP1 und GP2, jedoch könnte auch eine Missfaltung des SP durch die eingeführte Mutation den beobachteten Effekt erzielen. Daten, die zu dem Glykoprotein von LCMV publiziert sind, besagen, dass GP1 und GP2 in Virionen Homotetramere bilden (Burns und Buchmeier, 1991). In diesem Zusammenhang erscheint die Dimerisierung des SP sinnvoll, jedoch ist vollkommen ungeklärt, ob der Glykoproteinvorläufer GP-C, mit dem das SP neben der GP2-Untereinheit interagiert, ebenfalls Multimere bildet.

Bislang steht noch keine befriedigende antivirale Behandlungsmöglichkeit gegen das Lassafieber zur Verfügung. Das erhältliche Guanosinanalogon Ribavirin ist nur wirksam, wenn das Therapeutikum kurz nach Infektion appliziert wird. Da die Interaktion zwischen SP und GP-C hochspezifisch zu sein scheint, könnte die Inhibition dieser Interaktion von therapeutischer Relevanz sein. Inhibitorische Peptide, die diese Interaktion unterbinden, würden die Reifespaltung von GP-C und somit die Produktion von infektiösem Virus unterbinden.

Ein zusätzlicher therapeutischer Ansatz würde sich in einer Reduktion der SPase-Aktivität bieten. Wird das SP nicht von präGP-C abgespalten, findet ebenfalls keine proteolytische Aktivierung des Glykoproteins statt. Somit entstehen auch bei diesem Ansatz keine infektiösen Partikel. Inhibitoren, die spezifisch SPase inhibieren, sind bereits kommerziell erhältlich. SPase ist jedoch ein essentielles Enzym für die Zelle. In entsprechenden Studien müssten daher Bedingungen herausgefunden werden, die einen maximalen inhibitorischen Effekt auf die Virusproduktion bei minimalem toxischen Effekt gewährleisten. Dies erscheint

selbst bei kurzfristigen schwerwiegenden potentiellen Nebenwirkungen sinnvoll, da akutes Lassafieber oftmals einen fulminanten Verlauf nimmt und daher die Ausbreitung des Virus im Organismus verhindert werden muss.

8.5. Modell des Lebenszyklus des Signalpeptids von Lassavirus Glykoprotein präGP-C

Die den Ergebnissen dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten sind abschließend in einem Modell zum Lebenszyklus des Lassavirus präGP-C Signalpeptids zusammengefasst.

Das Lassavirus Glykoprotein Signalpeptid wird mit einer Länge von 58 Aminosäureresten während der Biosynthese in das ER transloziert und kotranslational von dem Enzym Signalpeptidase von präGP-C abgespalten. Die Spaltung erfolgt exklusiv nach Position 58, die Aminosäurereste Serin 56 und Threonin 58 bestimmen die Signalpeptid-Spaltstelle. Es treten keine weiteren Spaltprodukte auf.

Das Signalpeptid besitzt eine Topologie in der ER-Membran, in der die erste hydrophobe Region in die Membran inseriert ist, während eine außergewöhnlich lange C-terminale Region, einschließlich der zweiten hydrophoben Region, ER-luminal orientiert ist. Dieser ER-luminale Anteil ist für die Interaktion zwischen Glykoprotein und Signalpeptid verantwortlich (Abb. 36). Die Interaktion wird über den Cysteinrest C57 des Signalpeptids mit der GP2-Untereinheit vermittelt. Vermutlich finden weitere hydrophile Interaktionen zwischen dem Signalpeptid und GP2 in dem Bereich zwischen den beiden hydrophoben Regionen des Signalpeptids statt. Beide Interaktionen sind für die Reifung des Glykoproteins, der Aktivierungsspaltung des Glykoproteins in seine beiden Untereinheiten GP1 und GP2 durch die Wirtszellprotease SKI-1/S1P, notwendig. Diese Funktion des Signalpeptids kann nicht durch andere Signalpeptide erfüllt werden, mit Ausnahme homologer Signalpeptide wie das des Lymphozytäre Choriomeningitis Virus.

Die Interaktion zwischen Signalpeptid und Glykoprotein ist stabil. Das Signalpeptid wird daher entlang des exozytotischen Transportweges mit dem Glykoprotein an die Zelloberfläche transportiert. Das Signalpeptid selbst besitzt diese Transportkompetenz nicht. An der Zelloberfläche wird das Signalpeptid über die Interaktion mit der GP2-Untereinheit in Viruspartikel inkorporiert und ist somit ein fester Bestandteil des Virions (Abb. 36).

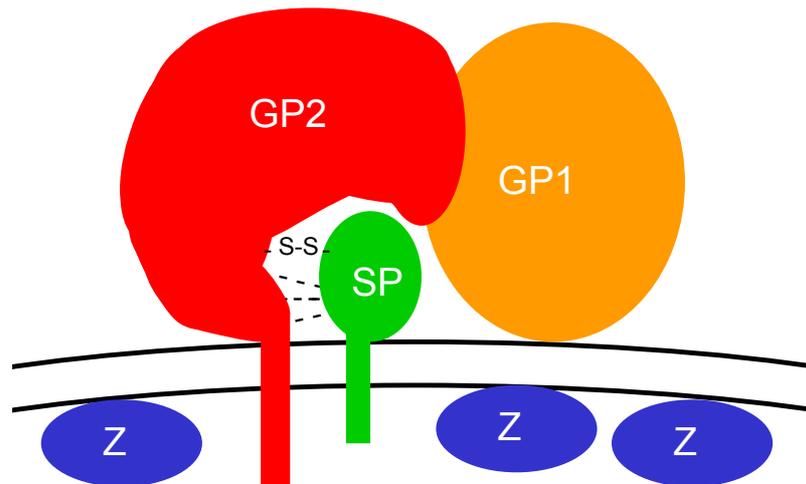


Abb. 36 : Modell der Lassa virushülle. Die über ionische Wechselwirkungen interagierenden Glykoproteinuntereinheiten GP1- (orange) und GP2-Untereinheit (rot) sowie das Signalpeptid (grün) sind in monomerer Form schematisch dargestellt. Die Disulfidbrücke zwischen SP und GP2 ist angegeben. Weitere Interaktionen zwischen SP und GP2 sind durch dünne gestrichelte Linien angedeutet. Das membranassoziierte Z-Protein ist im Viruslumen blau dargestellt.

9. Literaturverzeichnis

- Andrews, D. W., Young, J. C., Mirels, L. F. & Czarnota, G. J.** (1992) The role of the N region in signal sequence and signal-anchor function, *J Biol Chem.* 267, 7761-9.
- Beyer, W. R., Pöpplau, D., Garten, W., von Laer, D. & Lenz, O.** (2003) Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P, *J Virol.* 77, 2866-72.
- Birnboim, H. C. & Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-23.
- Blobel, G. & Dobberstein, B.** (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma, *J Cell Biol.* 67, 835-51.
- Borden, K. L., Campbelldwyer, E. J., Carlile, G. W., Djavani, M. & Salvato, M. S.** (1998) Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins, *J Virol.* 72, 3819-26.
- Borrow, P. & Oldstone, M. B.** (1992) Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus, *J Virol.* 66, 7270-81.
- Borrow, P. & Oldstone, M. B.** (1994) Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells, *Virology.* 198, 1-9.
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L. & McMichael, A. J.** (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C, *Nature.* 391, 795-9.
- Buchmeier, M. J., Bowen M. D. & Peters, C. J.** (2001) Arenaviridae: The Viruses and Their Replication. In Knipe, D. M. and Howley, P. M. (eds.), *Fields Virology.* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2, 1635-1668.
- Buchmeier, M. J. & Zinkernagel, R. M.** (1992) Immunodominant T cell epitope from signal sequence, *Science.* 257, 1142.
- Burns, J. W. & Buchmeier, M. J.** (1991) Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus, *Virology.* 183, 620-9.
- Burns, J. W. & Buchmeier, M. J.** (1993) in: The Arenaviridae (Salvato, M.S., Ed.), S. 17-33, Plenum Press, New York
- Cao, G., Kuhn, A. & Dalbey, R.E.** (1995) The translocation of negatively charged residues across the membrane is driven by the electrochemical potential: evidence for an electrophoresis-like membrane transfer mechanism, *EMBO J.* 14, 866-75.
- Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P. & Oldstone, M.B.** (1998) Identification of alpha-

- dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus, *Science*. 282, 2079-81.
- Chen, X., Shen, J. & Prywes, R.** (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi, *J Biol Chem*. 277, 13045-52.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H.** (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86, 2172-5.
- Cocquerel, L., Op de Beeck, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F. & Dubuisson, J.** (2002) Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins, *EMBO J*. 21, 2893-902.
- Cornu, T. I. & de la Torre, J. C.** (2001) RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome, *J Virol*. 75, 9415-26.
- Crotty, S., Cameron, C. & Andino, R.** (2002) Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?, *J Mol Med*. 80, 86-95.
- Cummins, D.** (1990) Lassa fever, *Br J Hosp Med*. 43, 186-8, 190, 192.
- deBose-Boyd, R. A., Brown, M. S., Li, W. P., Nohturfft, A., Goldstein, J. L. & Espenshade, P. J.** (1999) Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi, *Cell*. 99, 703-12.
- Denzer, A. J., Nabholz, C. E. & Spiess, M.** (1995) Transmembrane orientation of signal-anchor proteins is affected by the folding state but not the size of the N-terminal domain, *EMBO J*. 14, 6311-7.
- Djavani, M., Lukashevich, I. S., Sanchez, A., Nichol, S. T. & Salvato, M. S.** (1997) Completion of the Lassa fever virus sequence and identification of a RING finger open reading frame at the L RNA 5' End, *Virology*. 235, 414-8.
- Djavani, M., Rodas, J., Lukashevich, I. S., Horejsh, D., Pandolfi, P. P., Borden, K. L. & Salvato, M. S.** (2001) Role of the promyelocytic leukemia protein PML in the interferon sensitivity of lymphocytic choriomeningitis virus, *J Virol*. 75, 6204-8.
- Durbeej, M., Henry, M. D., Ferletta, M., Campbell, K. P. & Ekblom, P.** (1998) Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues, *J Histochem Cytochem*. 46, 449-57.
- Eichler R., Strecker, T., Kolesnikova, L., ter Meulen, J., Weissenhorn, W., Becker, S., Klenk, H.-D., Garten, W. & Lenz, O.** (2003) Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: Electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein NP, *Virus Res.*, im Druck.

- Espenshade, P. J., Cheng, D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S.** (1999) Autocatalytic processing of site-1 protease removes propeptide and permits cleavage of sterol regulatory element-binding proteins, *J Biol Chem.* 274, 22795-804.
- Fisher-Hoch, S. P., Hutwagner, L., Brown, B. & McCormick, J. B.** (2000) Effective vaccine for lassa fever, *J Virol.* 74, 6777-83.
- Freed, E. O.** (2002) Viral late domains, *J Virol.* 76, 4679-87.
- Froeschke, M., Basler, M., Groettrup, M. & Dobberstein, B.** (2003) Long-lived signal peptide of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein pGP-C, *J Biol Chem.* 278, 41914-20.
- Gallaher, W. R., DiSimone, C. & Buchmeier, M. J.** (2001) The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor, *BMC Microbiol.* 1, 1.
- Glushakova, S. E., Lukashevich, I. S. & Baratova, L. A.** (1990) Prediction of arenavirus fusion peptides on the basis of computer analysis of envelope protein sequences, *FEBS Lett.* 269, 145-7.
- Glushakova, S. E., Omelyanenko, V. G., Lukashevitch, I. S., Bogdanov, A. A., Jr., Moshnikova, A. B., Kozytch, A. T. & Torchilin, V. P.** (1992) The fusion of artificial lipid membranes induced by the synthetic arenavirus 'fusion peptide', *Biochim Biophys Acta.* 1110, 202-8.
- Goder, V. & Spiess, M.** (2003) Molecular mechanism of signal sequence orientation in the endoplasmic reticulum, *EMBO J.* 22, 3645-53.
- Hartmann, E., Rapoport, T. A. & Lodish, H. F.** (1989) Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 5786-90.
- Hegde, R. S.** (2002) Targeting and beyond: new roles for old signal sequences, *Mol Cell.* 10, 697-8.
- Higuchi, R., Krummel, B. & Saiki, R. K.** (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions, *Nucleic Acids Res.* 16, 7351-67.
- Hombach, J., Pircher, H., Tonegawa, S. & Zinkernagel, R. M.** (1995) Strictly transporter of antigen presentation (TAP)-dependent presentation of an immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitope in the signal sequence of a virus protein, *J Exp Med.* 182, 1615-9.
- Hudrisier, D., Oldstone, M. B. & Gairin, J. E.** (1997) The signal sequence of lymphocytic choriomeningitis virus contains an immunodominant cytotoxic T cell epitope that is restricted by both H-2D(b) and H-2K(b) molecules, *Virology.* 234, 62-73.
- Izard, J. W. & Kendall, D. A.** (1994) Signal peptides: exquisitely designed transport promoters, *Mol Microbiol.* 13, 765-73.

- Jackson, M. R., Nilsson, T. & Peterson, P. A.** (1993) Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum, *J Cell Biol.* 121, 317-33.
- Johnson, A. E. & van Waes, M. A.** (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15, 799-842.
- Kunz, S., Edelmann, K.H., de la Torre, J.C., Gorney, R. & Oldstone, M.B.** (2003) Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions, *Virology.* 314, 168-78
- Kurys, G., Tagaya, Y., Bamford, R., Hanover, J. A. & Waldmann, T. A.** (2000) The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15, *J Biol Chem.* 275, 30653-9.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods.* 10, 203-9.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F.** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J Mol Biol.* 157, 105-32.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227, 680-5.
- Lange, Y & Steck, T. L.** (1985) Cholesterol-rich intracellular membranes: a precursor to the plasma membrane, *J Biol Chem.* 260, 15592-7
- Lee, K. J., Novella, I. S., Teng, M. N., Oldstone, M. B. & de-La-Torre, J. C.** (2000) NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs, *J Virol.* 74, 3470-7.
- Lemberg, M. K. & Martoglio, B.** (2002) Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis, *Mol Cell.* 10, 735-44.
- Lenz, O., ter Meulen, J., Feldmann, H., Klenk, H. D. & Garten, W.** (2000) Identification of a novel consensus sequence at the cleavage site of the Lassa virus glycoprotein, *J Virol.* 74, 11418-21.
- Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H. D., Seidah, N. G. & Garten, W.** (2001) The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 12701-5.
- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y. & Kang, C. Y.** (2000) The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding, *Virology.* 272, 417-28.
- Lindemann, D., Pietschmann, T., Picard-Maureau, M., Berg, A., Heinkelein, M., Thurow, J., Knaus, P., Zentgraf, H. & Rethwilm, A.** (2001) A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity, *J Virol.* 75, 5762-71.
- Lisanti, M. P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A. R. & Rodriguez-Boulan, E.** (1988)

- Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 9557-61.
- Martoglio, B. & Dobberstein, B.** (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides, *Trends Cell Biol.* 8, 410-5.
- Martoglio, B., Graf, R. & Dobberstein, B.** (1997) Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin, *EMBO J.* 16, 6636-45.
- McCormick, J. B., King, I. J., Webb, P. A., Johnson, K. M., O'Sullivan, R., Smith, E. S., Trippel, S. & Tong, T. C.** (1987) A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever, *J Infect Dis.* 155, 445-55.
- Meyer, G. A. & Radsak, K. D.** (2000) Identification of a novel signal sequence that targets transmembrane proteins to the nuclear envelope inner membrane, *J Biol Chem.* 275, 3857-66.
- Monath, T. P., Maher, M., Casals, J., Kissling, R. E. & Cacciapuoti, A.** (1974) Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972. II. Clinical observations and virological studies on selected hospital cases, *Am J Trop Med Hyg.* 23, 1140-9.
- Moss, B.** (1990) Recombinant DNA virus vectors for vaccination, *Semin Immunol.* 2, 317-27.
- Mothes, W., Prehn, S. & Rapoport, T. A.** (1994) Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane, *EMBO J.* 13, 3973-82.
- Mowla, S. J., Pareek, S., Farhadi, H. F., Petrecca, K., Fawcett, J. P., Seidah, N. G., Morris, S. J., Sossin, W. S. & Murphy, R. A.** (1999) Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons, *J Neurosci.* 19, 2069-80.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G.** (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Int J Neural Syst.* 8, 581-99.
- Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J.** (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, *Gene.* 108, 193-9.
- Padula, P. J. & de Martinez-Segovia, Z. M.** (1984) Replication of Junin virus in the presence of tunicamycin, *Intervirology.* 22, 227-31.
- Paetzel, M., Dalbey, R. E. & Strynadka, N. C.** (1998) Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor, *Nature.* 396, 186-90.
- Parks, G. D. & Lamb, R. A.** (1991) Topology of eukaryotic type II membrane proteins: importance of N-terminal positively charged residues flanking the hydrophobic domain, *Cell.* 64, 777-87.
- Perez, M., Craven, R. C. & de la Torre, J. C.** (2003) The small RING finger protein Z drives

- arenavirus budding: implications for antiviral strategies, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 12978-83.
- Price, M. E., Fisher-Hoch, S. P., Craven, R. B. & McCormick, J. B.** (1988) A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy, *BMJ.* 297, 584-7.
- Rawson, R. B., Cheng, D., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.** (1998) Isolation of cholesterol-requiring mutant Chinese hamster ovary cells with defects in cleavage of sterol regulatory element-binding proteins at site 1, *J Biol Chem.* 273, 28261-9.
- Salvato, M., Shimomaye, E. & Oldstone, M. B.** (1989) The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase, *Virology.* 169, 377-84.
- Salvato, M. S. & Shimomaye, E. M.** (1989) The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein, *Virology.* 173, 1-10.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 5463-7.
- Sanz, M. A., Madan, V., Carrasco, L. & Nieva, J. L.** (2003) Interfacial domains in Sindbis virus 6K protein. Detection and functional characterization, *J Biol Chem.* 278, 2051-7.
- Sato, M., Hresko, R. & Mueckler, M.** (1998) Testing the charge difference hypothesis for the assembly of a eucaryotic multispinning membrane protein, *J Biol Chem.* 273, 25203-8.
- Schäfer, W., Stroh, A., Berghöfer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M. L., Kern, H. F., Klenk, H. D. & Garten, W.** (1995) Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin, *EMBO J.* 14, 2424-35.
- Schägger, H. & von Jagow, G.** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal Biochem.* 166, 368-79.
- Schatz, G. & Dobberstein, B.** (1996) Common principles of protein translocation across membranes, *Science.* 271, 1519-26.
- Silber, A. M., Candurra, N. A. & Damonte, E. B.** (1993) The effects of oligosaccharide trimming inhibitors on glycoprotein expression and infectivity of Junin virus, *FEMS Microbiol Lett.* 109, 39-43.
- Smelt, S. C., Borrow, P., Kunz, S., Cao, W., Tishon, A., Lewicki, H., Campbell, K. P. & Oldstone, M. B.** (2001) Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor alpha-dystroglycan correlate with viral tropism and disease kinetics, *J Virol.* 75, 448-57.

- Spiess, M.** (1995) Heads or tails--what determines the orientation of proteins in the membrane, *FEBS Lett.* 369, 76-9.
- Spiropoulou, C. F., Kunz, S., Rollin, P. E., Campbell, K. P. & Oldstone, M. B.** (2002) New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor, *J Virol.* 76, 5140-6.
- Stephenson, E. H., Larson, E. W. & Dominik, J. W.** (1984) Effect of environmental factors on aerosol-induced Lassa virus infection, *J Med Virol.* 14, 295-303.
- Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Dieter-Klenk, H., Garten, W. & Lenz, O.** (2003) Lassa virus Z protein is a matrix protein sufficient for the release of virus-like particles, *J Virol.* 77, 10700-5.
- ter Meulen, J.** (1999) Lassa fever: implications of T-cell immunity for vaccine development, *J Biotechnol.* 73, 207-12.
- ter Meulen, J., Lenz, O., Koivogui, L., Magassouba, N., Kaushik, S. K., Lewis, R. & Aldis, W.** (2001) Short communication: Lassa fever in Sierra Leone: UN peacekeepers are at risk, *Trop Med Int Health.* 6, 83-4.
- Vincent, M. J., Sanchez, A. J., Erickson, B. R., Basak, A., Chretien, M., Seidah, N. G. & Nichol, S. T.** (2003) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1, *J Virol.* 77, 8640-9.
- von Heijne, G.** (1985) Signal sequences. The limits of variation, *J Mol Biol.* 184, 99-105.
- von Heijne, G.** (1989) Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues, *Nature.* 341, 456-8.
- von Heijne, G.** (1994) Signals for protein targeting into and across membranes, *Subcell Biochem.* 22, 1-19.
- Wahlberg, J. M. & Spiess, M.** (1997) Multiple determinants direct the orientation of signal-anchor proteins: the topogenic role of the hydrophobic signal domain, *J Cell Biol.* 137, 555-62.
- Walker, D. H., McCormick, J. B., Johnson, K. M., Webb, P. A., Komba-Kono, G., Elliott, L. H. & Gardner, J. J.** (1982) Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man, *Am J Pathol.* 107, 349-56.
- Wright, K. E., Spiro, R. C., Burns, J. W. & Buchmeier, M. J.** (1990) Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus, *Virology.* 177, 175-83.
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S. & Goldstein, J. L.** (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs, *Mol Cell.* 6, 1355-64.

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1:** Verbreitung der Arenaviren.
Abb. 2: Natürlicher Wirt der Lassaviren.
Abb. 3: Modell der Fehlerkatastrophe.
Abb. 4: Struktur und Genom des Lassavirus.
Abb. 5: Schematische Darstellung der Transkription, Translation und Genomreplikation des S-Segmentes des Lassavirus.
Abb. 6: Schema des Lassavirus Glykoproteinvorläufers präGP-C.
Abb. 7: Struktur von Signalpeptiden.
Abb. 8: Reinigung von viralem GP1 über einen Iodixanol-Gradienten.
Abb. 9: Nachweis von gereinigtem GP1 aus virushaltigen Kulturüberstand.
Abb. 10: Schematische Darstellung des Lassavirus Glykoproteins präGP-C.
Abb. 11: Einführung des FLAG-Epitops C-terminal der potentiellen Signalpeptid-Spaltstelle.
Abb. 12: Identifizierung der Signalpeptid-Spaltstelle von Lassavirus Glykoprotein präGP-C.
Abb. 13: Gelelektrophoretische Mobilität des Lassavirus Glykoprotein Signalpeptids.
Abb. 14: Kotranslationale Abspaltung des Lassavirus präGP-C Signalpeptids.
Abb. 15: Halbwertszeit des Lassavirus präGP-C Signalpeptids.
Abb. 16: Hydrophobizitätsindex des Lassavirus präGP-C Signalpeptids.
Abb. 17: Deletion von hydrophoben Domänen innerhalb des Lassavirus präGP-C Signalpeptids.
Abb. 18: Mögliche Topologien des Lassavirus präGP-C Signalpeptids.
Abb. 19: Bestimmung der Topologie des Lassa präGP-C Signalpeptids durch selektive Permeabilisierung mit Digitonin.
Abb. 20: Bestimmung der Topologie des Signalpeptids durch Insertion von N-Glykosylierungsstellen.
Abb. 21: Bestimmung der Topologie des Lassavirus präGP-C Signalpeptids durch Untersuchung des Dimerisierungsverhaltens.
Abb. 22: Proteolytische Prozessierung durch die Subtilase SKI-1/S1P in Lassavirus Glykoprotein Mutanten mit mutierter Signalpeptid-Spaltstelle.
Abb. 23: Substitution des Lassavirus Glykoprotein präGP-C Signalpeptids.
Abb. 24: Rekonstitution der Lassavirus Glykoproteinspaltung in GP1 und GP2.
Abb. 25: Rekonstitution der Lassavirus Glykoproteinspaltung bei Lassavirus Glykoprotein Signalpeptidmutanten.
Abb. 26: Glykoprotein-Assoziation mit Calnexin.
Abb. 27: Interaktion von Lassavirus GP-C und Signalpeptid.
Abb. 28: Kolokalisation von Lassavirus GP-C und Signalpeptid.
Abb. 29: Deletion des N-Terminus von Lassavirus Glykoprotein präGP-C.
Abb. 30: Mutagenese der c-Region des Signalpeptids von Lassavirus Glykoprotein präGP-C.
Abb. 31: Virion-Assoziation des Lassavirus Glykoprotein Signalpeptids.
Abb. 32: Zelluläre Interaktion zwischen SP und GP2.
Abb. 33: Mutation von Cysteinresten des Lassavirus Glykoprotein Signalpeptids.
Abb. 34: Cysteinvermittelte Interaktion zwischen Lassavirus Glykoprotein und SP.
Abb. 35 : Topologie des Lassavirus präGP-C Signalpeptids.
Abb. 36 : Modell der Lassavirushülle.
- Tab. 1:** Signalpeptide der Arenaviren

11. Anhang

Aminosäuresequenz von Lassavirus Glykoprotein präGP-C (Stamm Josiah), Genbank-Zugriffsnummer unter www.pubmed.de/data/nlm.link.html: J04324. Die Spaltstellen durch Signalpeptidase (SPase) und SKI-1/S1P sind durch Pfeile markiert. Transmembranregionen sind unterstrichen, potentielle N-Glykosylierungsstellen kursiv vergrößert dargestellt.



Nukleotidsequenz (1-1476) von Lassavirus Glykoprotein präGP-C (Stamm Josiah), Genbank-Zugriffsnummer unter www.pubmed.de/data/nlm.link.html: J04324.

ATGGGACAAATAGTGACATTCCTCCAGGAAGTGCCTCATGTAATAGAAGAGGTGATGAACATTGTTCTCATTGCACCTGTCTGTACTAGCAGTG
CTGAAAGGTCTGTACAATTTTGCAACGTGTGGCCTTGTGGTTTGGTCACTTTCCTCCTGTGTGTGGTAGGCTTGCACAACCAAGTCTTTAT
AAAGGGGTTTATGAGCTTCAGACTCTGGAACATAACATGGAGACACTCAATATGACCATGCCTCTCTCCTGCACAAAGAACAACAGTCATCAT
TATATAATGGTGGGCAATGAGACAGGACTAGAACTGACCTTGACCAACACGAGCATTATTAATCACAAATTTGCAATCTGTCTGTATGCCAC
AAAAAGAACCTCTATGACCACGCTCTTATGAGCATAATCTCAACTTTCACCTGTCCATCCCCAACTTCAATCAGTATGAGGCAATGAGCTGC
GATTTTAAATGGGGAAAGATTAGTGTGCAGTACAACCTGAGTCACAGCTATGCTGGGGATGCAGCCAACCATTTGTGGTACTGTTGCAAATGGT
GTGTTACAGACTTTTATGAGGATGGCTTGGGGTGGGAGCTACATTGCTCTTGACTCAGGCCGTGGCAACTGGGACTGATTATGACTAGTTAT
CAATATCTGATAATCCAAAATACAACCTGGGAAGATCACTGCCAATCTCGAGACCATCTCCCATCGGTTATCTCGGGCTCCTCTCACAAGG
ACTAGAGATATTTATATTAGTAGAAGATTGCTAGGCACATTACATGGACACTGTCTAGATTCTGAAGGTAAGACACACCAGGGGATATTGT
CTGACCAGGTGGATGCTAATTGAGGCTGAACTAAAAATGCTTCGGGAACACAGCTGTGGCAAAATGTAATGAGAAGCATGATGAGGAATTTTGT
GACATGCTGAGGCTGTTTACTTCAACAAACAAGCCATTCAAAGGTTGAAAGCTGAAGCACAAATGAGCATTTCAGTTGATCAACAAAGCAGTA
AATGCTTTGATAAATGACCAACTTATAATGAAGAACCATCTACGGGACATCATGGGAATTCATACTGTAATACAGCAAGTATTGGTACCTC
AACCACACAACACTACTGGGAGAACATCACTGCCCAAATGTTGGCTTGTATCAAATGGTTCATACTTGAACGAGACCCACTTTTCTGATGATATT
GAACAACAAGCTGACAATATGATCACTGAGATGTTACAGAAGGAGTATATGGAGAGGCAGGGGAAGACACCATTGGGTCTAGTTGACCTCTTT
GTGTTCACTACAGTTTCTATCTATTAGCATCTTCCTTACCTAGTCAAAATACCAACTCATAGGCATATGTAGGCAAGTCGTGCCAAA
CCTCACAGATTGAATCATATGGGCATTTGTTCTGTGGACTCTACAACAGCCTGGTGTGCCTGTGAAATGGAAGAGATGA

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Garten danke ich für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas und die wissenschaftliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel möchte ich für die Betreuung und Vertretung der vorliegenden Arbeit am Fachbereich Biologie danken.

Besonderer Dank geht an Dr. Oliver Lenz für die fachliche Unterstützung während der gesamten Dauer der Promotion.

Danken möchte ich auch Thomas Strecker und Dr. Markus Eickmann für ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Dr. Stefan Baumeister danke ich für die Hilfe bei den Konfokalaufnahmen.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Garten möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Oliver Lenz, Thomas Strecker und Markus Moll danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere der Labore E101, K110 und E206, für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung meiner Arbeit.

Der FAZIT-Stiftung, Frankfurt sowie dem Graduiertenkolleg „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“, Marburg danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Meiner Familie danke ich für ihre stetige Unterstützung während der gesamten Zeit.

Erklärung

Ich versichere,
dass ich die dem Fachbereich Biologie eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Die Rolle des Signalpeptids für die Reifung des Lassavirus Glykoproteins“

selbst durchgeführt und mich bei der Abfassung der Arbeit keiner anderen als
in der Dissertation aufgeführten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner weiteren
Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 11.12.2003

Robert Eichler

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Robert Eichler
Geburtsdatum	01.02.1976
Geburtsort	Frankfurt
Wohnort	Wettergasse 28, 35037 Marburg
Familienstand	ledig

Schulbildung

1982-1986	Erich-Kästner-Grundschule in Frankfurt
1986-1995	Ziehen-Gymnasium in Frankfurt
06/1995	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1995-1996	Behindertentransport beim DRK, Frankfurt
-----------	--

Hochschulbildung

10/1996-10/1998	Grundstudium der Biologie am Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
10/1998	Vordiplom
10/1998-10/2000	Hauptstudium der Biologie am Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
10/2000	Diplomprüfungen (Hauptfach: Mikrobiologie; Nebenfächer: Genetik, Biochemie)
10/2000-8/2001	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt unter Leitung von Prof. Dr. A. Kröger; Thema: „Charakterisierung von <i>Wolinella succinogenes</i> Nitrit-Reduktase-Mutanten“
08/2001	Diplom im Fach Biologie

Berufliche Tätigkeit

Seit 12/2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg
12/2001	Beginn der Promotion am Institut für Virologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W. Garten unter Leitung von Prof. Dr. W. Buckel; Thema „Die Rolle des Signalpeptids für die Reifung des Lassavirus Glykoproteins“

Förderung

01/2002-03/2002	Stipendiat des Graduiertenkollegs "Proteinfunktion auf atomarer Ebene", Marburg
03/2002-12/2003	Assoziierter des Graduiertenkollegs "Proteinfunktion auf atomarer Ebene", Marburg
03/2002-12/2003	Stipendiat der FAZIT-Stiftung, Frankfurt