

Aus dem Charité Centrum 5
für diagnostische und präventive Labormedizin
Institut für Virologie
Direktor: Professor Dr. Detlev H. Krüger

HABILITATIONSSCHRIFT

Hantaviren und das intrinsische antivirale Interferon System

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das
Fach VIROLOGIE

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

von

Dr. rer. nat. Andreas Rang

geboren am 28. Januar 1963 in Bonn

Eingereicht: August 2011
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grütters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies, Würzburg
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Liebert, Leipzig

Inhaltsverzeichnis:

LISTE DER ABKÜRZUNGEN.....	3
1. EINLEITUNG	4
1.1. GENOMORGANISATION UND REPLIKATIONSZYKLUS	5
1.2. PATHOGENESE	7
1.3. INTRINSISCHES INTERFERON-SYSTEM & ANTIVIRALER STATUS	7
1.4. INTERAKTION ZWISCHEN HANTAVIREN UND DEM ANGEBORENEN IMMUNSYSTEM	10
2. EIGENE ARBEITEN	11
2.1 ENTWICKLUNG EINER KLONIERUNGSMETHODE FÜR NICHT-ZYTOLYTISCHE VIREN	12
2.2. DIE QUANTIFIZIERUNG NEUTRALISIERENDER ANTIKÖRPER MITTELS VIRUSNEUTRALISATIONSTEST KANN DURCH DEFЕКTE VIRUSPARTIKEL BEEINTRÄCHTIGT WERDEN	14
2.3. HEMMUNG VON HANTAAN VIRUS DURCH TYP I UND TYP II INTERFERON IST UNABHÄNGIG VON MxA	15
2.4. HANTAAN VIRUS AKTIVIERT ANGEBORENE IMMUNREAKTIONEN ÜBER TLR3	16
2.5. KLONIERUNG UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG EINER IN VITRO HERGESTELLTEN REASSORTANTEN ZWISCHEN EINEM PATHOGENEN EINEM NICHT PATHOGENEN HANTAVIRUS.	17
2.6. INFektion VON IN VIVO DIFFERENZIIERTEN HUMANEN MASTZELLEN MIT HANTAVIREN	19
3. DISKUSSION	20
3.1. HISTORIE ZELLKULTUR-ADAPTIERTER HANTAVIREN	20
3.2. HEMMUNG VON HANTAVIREN IN ZELLKULTUR DURCH ZUGABE VON REKOMBINANTEM INTERFERON	21
3.3. INTRINSISCHE IMMUNREAKTIONEN AUF DIE INFektion MIT HANTAVIREN	23
3.4. INFektion VON MASTZELLEN: POINT OF NO RETURN?	25
4. ZUSAMMENFASSUNG	27
5. LITERATUR AUS DEM FREIEN TEXT	30
DANKSAGUNG.....	36
ERKLÄRUNG.....	37

Liste der Abkürzungen

AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
ANDV	Andes Virus
CARDIF	<i>CARD adaptor inducing IFN-β</i>
CCHFV	Krim-Kongo Fieber Virus (<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i>)
DOBV	Dobrava-Belgrade Virus
GBP	<i>guanylate binding protein</i>
Gn/Gc	Glykoproteine
HCPS	Hantavirus Kardiopulmonales Syndrom
HTNV	Hantaan Virus
HFRS	Hemorrhagisches Fieber mit Renalem Syndrom
IFN	Interferon
IPS1	<i>interferon-beta promoter stimulator 1</i>
ISG	Interferon induzierbare Gene
IRF	<i>interferon response factor</i>
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>
JAK	Janus Kinase
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
Mx	<i>Myxovirus resistance protei</i>
NF κ B	<i>nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells</i>
NP	Nukleokapsidprotein
NSs	nicht-Strukturprotein des viralen S-Segments
OAS	Oligoadenylat Synthetase
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
RdRP	RNA-abhängige RNA Polymerase
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
PKR	Interferon induzierbare Proteinkinase R
PRR	<i>pathogen recognition receptor</i>
SNV	Sin Nombre Virus
STAT	<i>signal transduction and activator of transcription</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
TBK1	<i>TRAF family member-associated NF-kappa-B activator (TANK) binding kinase 1</i>
THAIV	Thailand Virus
TLR	Toll ähnlicher Rezeptor (<i>toll like receptor</i>)
TOPV	Topografov Virus
TRAF3	<i>Tumor necrosis factor receptor associated factor 3</i>
VISA	<i>virus-induced signaling adaptor</i>

1. Einleitung

Hantaviren sind wichtige zoonotische Krankheitserreger, die innerhalb der Familie der Bunyaviridae als eine separate Art (Hantavirus) zusammengefasst werden. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Familie, die durch Arthropoden übertragen werden, findet man Hantaviren in infizierten Nagetieren und Insektivoren. Mit diesen kleinen Säugetieren haben sich Hantaviren über eine lang währende Koevolution entwickelt (Abb. 1). Diese enge Koexistenz bildet höchstwahrscheinlich die Basis für die Symptom-freie Virusvermehrung in dem natürlichen Wirt, im Gegensatz zum Verlauf der Infektion im Fehlwirt Mensch (Schönrich *et al.*, 2008).

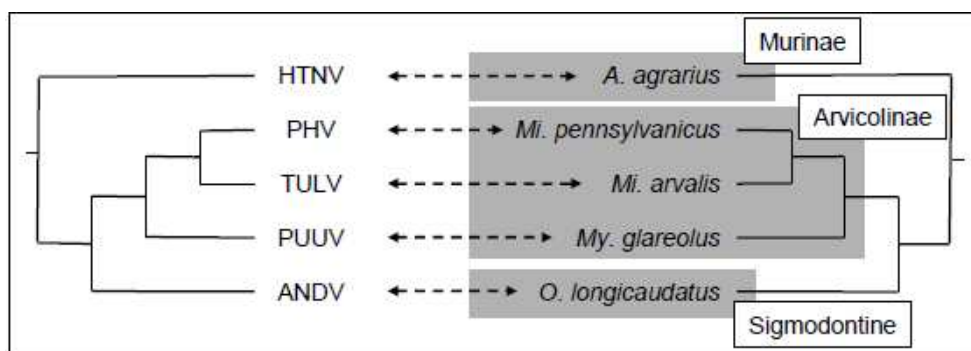


Abb. 1 Phylogenetische Korrelation ausgewählter Hantavirusarten und ihrer natürlichen Reservoirwirte. Virus-Wirt-Spezifität ist durch gestrichelte Pfeile angedeutet. *Apodemus agrarius*, Brandmaus; *Microtus pennsylvanicus*, Wiesenwühlmaus; *Microtus arvalis*, Feldmaus; *Myodes glareolus*, Rötelmaus; *Oligoryzomys longicaudatus*; Zwergreisratte. Dargestellt sind auch die Unterfamilien der Nagetier-Arten. Die Abbildung wurde modifiziert nach Ramsden *et al.* 2009.

Das Virus wird von infizierten Tieren mit dem Urin und Kot ausgeschieden und kann aerosolisiert auf den Menschen u. a. über die Atemwege übertragen werden. Eine Mensch zu Mensch Übertragung ist selten und bisher ausschließlich für Andesvirus (ANDV) dokumentiert. Somit können Hantavirus-infizierte Patienten i. d. R. ohne aufwendige Quarantänebedingungen behandelt werden.

Abhängig von der Virusart können unterschiedlich schwerwiegende Krankheitsverläufe ausgelöst werden. Die in Amerika verbreiteten Neue Welt Hantaviren, einschließlich ANDV und Sin Nombre Virus (SNV), können das Hantavirus Kardiopulmonale Syndrom (HCPS) hervorrufen und führen in ca. 40% der Fälle zum Tode. Die Infektion mit den Alte Welt Hantaviren, wie Hantaan (HTNV) und Dobrava-Belgrade Virus (DOBV), können zu Hemorrhagischem Fieber mit Renalem Syndrom (HFRS) mit Letalitätsraten von bis zu 15% führen. In Zentraleuropa und in Fennoskandinavien findet man vornehmlich das Puumala Virus (PUUV), das eine milde HFRS-Form, die Nephropathia Epidemica, mit einem Letalitätsindex unter 0,2% auslösen kann.

Die Gefährdung durch PUUV in Deutschland hat in den letzten Jahren aus nicht geklärten Gründen stark zugenommen. Innerhalb der ersten 10 Jahre seit Einführung der Meldepflicht Hantavirus-bedingter Erkrankungen wurden dem Robert Koch Institut insgesamt 4.884 PUUV-Fälle gemeldet; davon allein 1.874 bestätigte Fälle im Jahr 2010 (siehe Abb. 2).

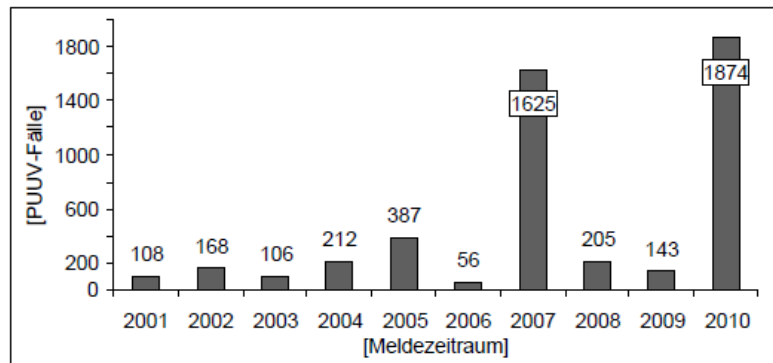


Abb. 2 In Deutschland gemeldete PUUV-Fälle in den Jahren 2001-2010. Quelle: SurvStat <http://www3.rki.de/SurvStat>, <14.4.2011>.

1.1. Genomorganisation und Replikationszyklus

Wie alle Mitglieder der Bunyaviridae Familie, bestehen Hantaviren aus einem umhüllten Virion mit drei einzelsträngigen RNA Segmenten. Die Genomsegmente der Hantaviren haben eine negative Polarität und kodieren jeweils für eine RNA-abhängige RNA Polymerase (RdRP), zwei Glykoproteine (Gn, Gc) und ein Nukleokapsidprotein (NP). Weiterhin findet man in Arvicolinae- und Sigmodontinae-assoziierten Hantavirus-Arten ein sogenanntes NSs-Gen, dessen Funktion nicht eindeutig geklärt ist (Abb.2).

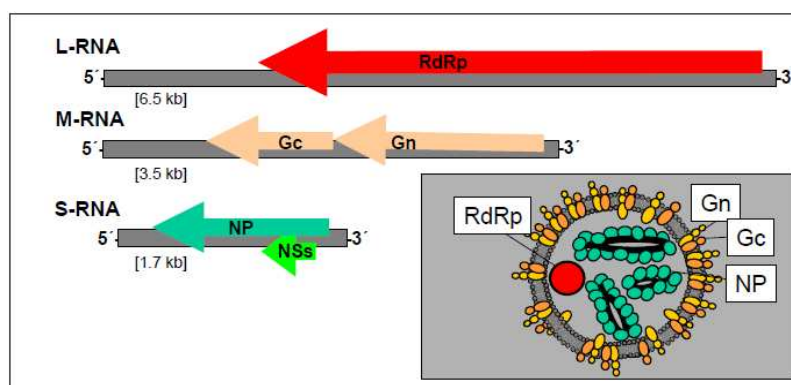


Abb. 2 Darstellung der drei genomischen RNA-Segmente mit den offenen Leserahmen und ein Schema des Virions. RdRp: RNA-abhängige RNA Polymerase, Gc/Gn: Glykoproteine; NP: Nukleokapsidprotein; NSs: nicht-Struktur Protein.

Die RdRp, das NP und die genomische RNA bilden einen Ribonukleoproteinkomplex, der nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangt. Dort

erfolgt die Replikation der RNA über einen sogenannten *prime and realign* Mechanismus, aufgrund dessen dreifach phosphorylierte 5'-Enden von der viralen RNA entfernt werden (Garcin et al. 1995). Über einen sogenannten *cap-snatching* Mechanismus werden an die 5'-Enden der viralen Transkripte gekappte heterologe RNA-Fragmente mit einer Länge von 10-15 Nucleotiden verknüpft. Diese von mRNAs der Wirtszelle stammenden 5'-Enden sind für die Translation der viralen Transkripte notwendig, zumal die RNA der Hantavirus nicht über interne Ribosomen Bindungsstellen verfügt. Vermittelt über die Glycoproteine Gn and Gc kommt es zur Sortimentierung der neu gebildeten Ribonukleoproteinkomplexe, bestehend aus RdRp, NP und jeweils einem der drei Genom-Segmente. Anschließend kommt es zur Freisetzung reifer Virionen, ohne offensichtliche zytopathische Effekte für die Wirtszelle (Abb. 3; Elliott et al. 1991; Schönrich et al. 2008).

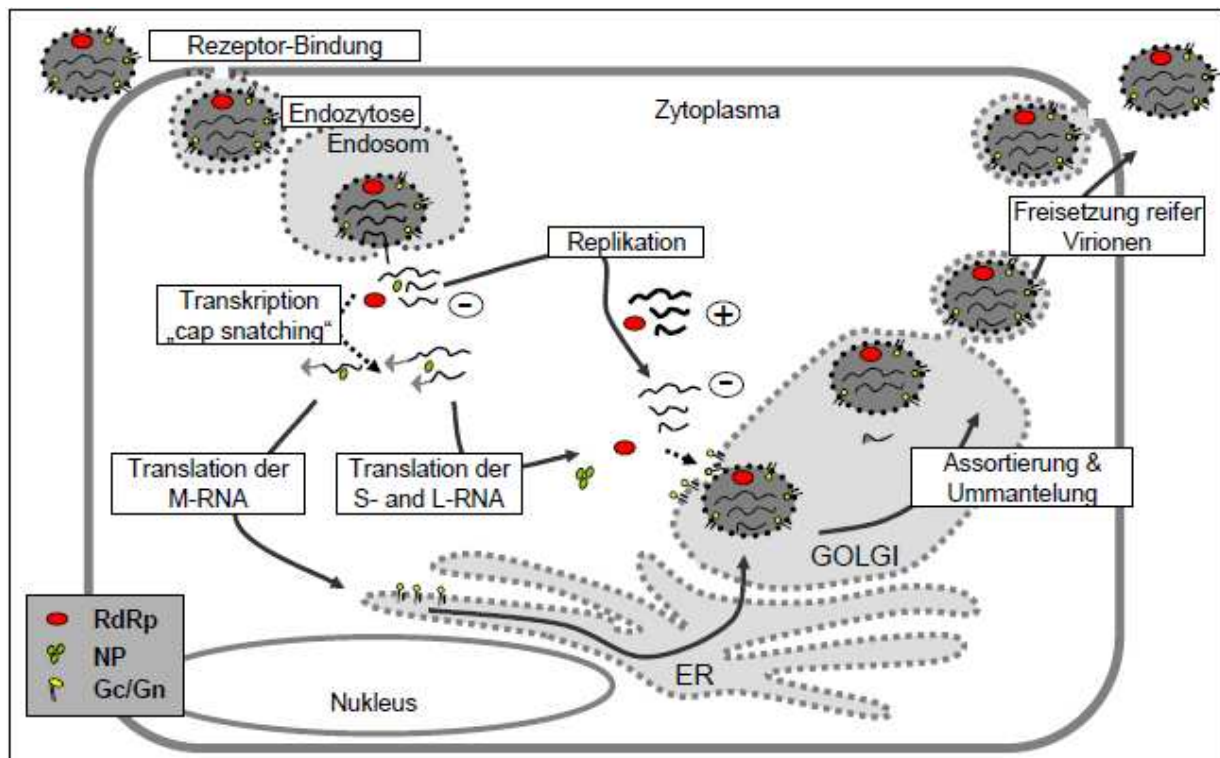


Abb. 3 Replikationszyklus von Hantaviren im Zytoplasma der Wirtszelle. Nach Rezeptor-vermittelter Endozytose erfolgt die primäre Replikation (Synthese plus-strängiger RNA). An die viralen Transkripte werden 5'-Enden zellulärer mRNAs mit einem Cap übertragen (*cap-snatching*), um eine Translation viraler Proteine zu ermöglichen. Die *de novo* Produktion viraler Proteine ist notwendig für die Assortierung und Verpackung der minus-strängigen Genomsegmente. Anschließend erfolgt die Virusfreisetzung ohne zytopathische Schädigung der Wirtszelle. Minus und plus soll die Orientierung der replizierten RNA andeuten.

1.2. Pathogenese

Das durch Neue Welt Hantaviren verursachte HCPS zeichnet sich durch progressive pulmonale Ödeme, Myokarddepression und respiratorische Insuffizienzen aus. Charakteristisch für das durch Alte Welt Viren verursachte HFRS sind retroperitoneale Ödeme assoziiert mit teilweise schwerwiegenden Nierenfunktionsstörungen. Beide Syndrome, sowohl HCPS als auch HFRS, sind verbunden mit erhöhter vaskulären Permeabilität und Thrombozytopenie. Die Ursachen für die Hantavirus-spezifischen Symptome und unterschiedlich schwerwiegenden Krankheitsverläufe sind unbekannt.

Das Virus *per se* scheint für die Wirtszelle nicht zytotatisch zu sein. Allerdings könnten pathogene Hantaviren über die Interaktion mit β 3-Integrinen die Funktion der Endothelzellen modulieren und auf diese Weise an der erhöhten Permeabilität der Gefäße beteiligt sein. Unterstützt wird dieses Model durch den Befund, dass ausschließlich pathogene nicht jedoch nicht pathogene Hantaviren über β 3-Integrine als Rezeptor in die Wirtszelle aufgenommen werden (Gavrilovskaya et al. 1998; Mackow et al. 2001).

Im Serum Hantavirus-infizierter Patienten findet man große Mengen inflammatorischer Zytokine und Chemokine, die ebenfalls die pathologisch erhöhte Gefäßpermeabilität und Thrombozytopenie verursachen könnten. (Linderholm et al. 1996; Sundstrom et al. 2001). In welchem Maße die skizzierten Modelle die Pathogenese entscheidend bedingen, kann mangels geeigneter Testsysteme nicht eindeutig beantwortet werden.

1.3. Intrinsisches Interferon-System & antiviraler Status

Voraussetzung der oben skizzierten Pathogenitätsmodelle ist eine systemische Virusinfektion, der notwendigerweise eine primäre Infektion unmittelbar nach der Virusaufnahme, meist über die Atemwege, vorausgeht. Um eine Virusinfektion schon im Keim zu verhindern, verfügen Vertebraten mit dem Interferon (IFN) -System über ein sehr effizientes intrinsisches Verteidigungssystem. Das IFN-System wurde 1957 erstmalig von Isaak und Lindenmann beschrieben (Isaacs 1957). Der Name Interferon (IFN) leitet sich von dessen interferierenden antiviralen Wirkung ab. Die Endung des Namens wurde bewusst im Anklang an die Terminologie in der Nuklearforschung bzw. Kernphysik gewählt (Lindenmann 2007), deren friedliche Nutzung in dieser Zeit größtenteils euphorisch begrüßt wurde (1957: erstes Kernkraftwerk in München, erster kommerzieller Atomreaktor in Pennsylvania, USA und Stapellauf des ersten Atomeisbrechers „Lenin“ in Murmansk, UdSSR).

Aufgrund von Protein-Sequenzhomologien und unterschiedlich genutzten Rezeptoren

unterscheidet man drei IFN-Typen. Typ I (IFN α/β) und Typ III IFN (IFN λ 1, IFN λ 2/3 alias IL29, 28a/b) können nahezu von allen Zellen gebildet werden. Die Expression von Typ I und Typ III IFN kann durch Virusinfektionen, besonders effizient durch RNA Viren ausgelöst werden. Molekularer Auslöser ist die Erkennung sogenannter Pathogen assoziierter molekularer Muster (*pathogen associated molecular patterns*; PAMPs) durch zelluläre Pathogenerkennungsrezeptoren (*pathogen recognition receptors*; PRRs). TLR3 (*toll like receptor-3*) und das RIG-I (*retinoic acid inducible gene I*) gehören zu den am besten untersuchten PRRs. TLR3 erkennt doppelsträngige (ds) RNA und RIG-I wird besonders stark von dsRNA mit dreifach phosphorylierten 5'-Enden aktiviert (Alexopoulou et al. 2001; Hornung et al. 2006). Im Gegensatz zu dem im Zytosol lokalisierten RIG-I, ragen die repetitiven Leucinreichen Erkennungsdomänen bzw. die Sensoren der membranständigen TLRs in das Lumen zellulärer Vesikel, einschließlich dem Endosom, und in den extrazellulären Raum der Zellen (Janeway & Medzhitov 2002; Hornung et al. 2002). Somit wird die spezifische Rekrutierung und Aktivierung der PRRs nicht allein durch die jeweiligen Liganden beeinflusst, sondern auch über die subzelluläre Lokalisation und Zelltyp-spezifische Expression der einzelnen PRR bestimmt.

Die Aktivierungskaskade am Beispiel von RIG-I und TLR3 führt über die Rekrutierung des Kinase/E3-Ligase Komplexes aus TBK1 (*TANK binding kinase 1*) und TRAF3 (*TNF-receptor associated factor 3*) über das MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein* alias IPS1 [interferon-beta promoter stimulator 1] oder VISA [*virus-induced signaling adaptor*] oder CARDIF [*CARD adaptor inducing IFN- β*]) und das mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziierte AIM2/STING (*absent in melanoma 2; stimulator of interferon genes*) zur Phosphorylierung von IRF3 (*IFN response factor*). IRF3 bindet zusammen mit NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) und anderen Transkriptionsfaktoren die Promotoren der Typ I und Typ III IFN-Gene (Seth et al. 2005; Ishikawa et al. 2008; Hornung et al. 2009; Onoguchi et al. 2007; Osterlund et al. 2007).

Das gebildete IFN wird sezerniert und stimuliert über die Rezeptorbindung und den dadurch ausgelösten JAK/STAT-Signalweg (*Janus kinase/signal transduction and activator of transcription*) die Neusynthese einer großen Gruppe unterschiedlicher IFN-stimulierbarer Gene (ISGs). Die durch IFN ausgelöste ISG-Expression versetzt die Zelle in einen sogenannten antiviralen Status, in dem sie sehr effektiv vor einer Virusinfektion geschützt ist. RNA-Transkriptomanalysen ergaben, dass 5% aller Gene durch IFN moduliert werden können. Dieser extrem hohe Wirkungsgrad von IFN unterstreicht die Bedeutung und Effizienz der ausgelösten Schutzreaktionen.

Im Gegensatz zu den zentralen Akteuren des intrinsischen IFN-Systems (Typ I/Typ II IFN),

wird das Typ II IFN ($\text{IFN}\gamma$) vorwiegend von spezialisierten Zellen des angeborenen (NK-Zellen, Mastzellen) und des adaptiven Immunsystems (T-Lymphozyten) gebildet. Aufgrund des Bildungsorts und der immunmodulatorischen Wirkung wird Typ II IFN auch als Immun-IFN bezeichnet. $\text{IFN}\gamma$ wirkt nicht nur auf Zellen des Immunsystems sondern wie Typ I IFN auf nahezu alle Zelltypen. Interessanterweise führt auch $\text{IFN}\gamma$ über die Induktion von ISGs zur Ausprägung eines antiviralen Status. Diese Gemeinsamkeit kommt dadurch zustande, dass alle IFNe teilweise gemeinsame Signaltransduktionswege auslösen. Typ I und Typ III IFN führt zur Aktivierung eines trimeren Transkriptionsfaktors, bestehend aus STAT1, STAT2 und IRF9, der sogenannte ISRE-Regionen (*IFN stimulated response elements*) im Promoterbereich induzierbarer Gene bindet. $\text{IFN}\gamma$ wirkt ebenfalls über STAT1 führt jedoch nach der Rezeptorbindung zur Homodimierisierung von STAT1, das an sogenannte GAS-Elemente (*gamma IFN activation site*) bindet. Neben den partiellen Überschneidungen der Signalkaskaden, enthalten viele Promotoren sowohl ISRE als auch GAS, sodass durch Type I und Typ II IFNe teilweise die gleichen Gene induziert werden.

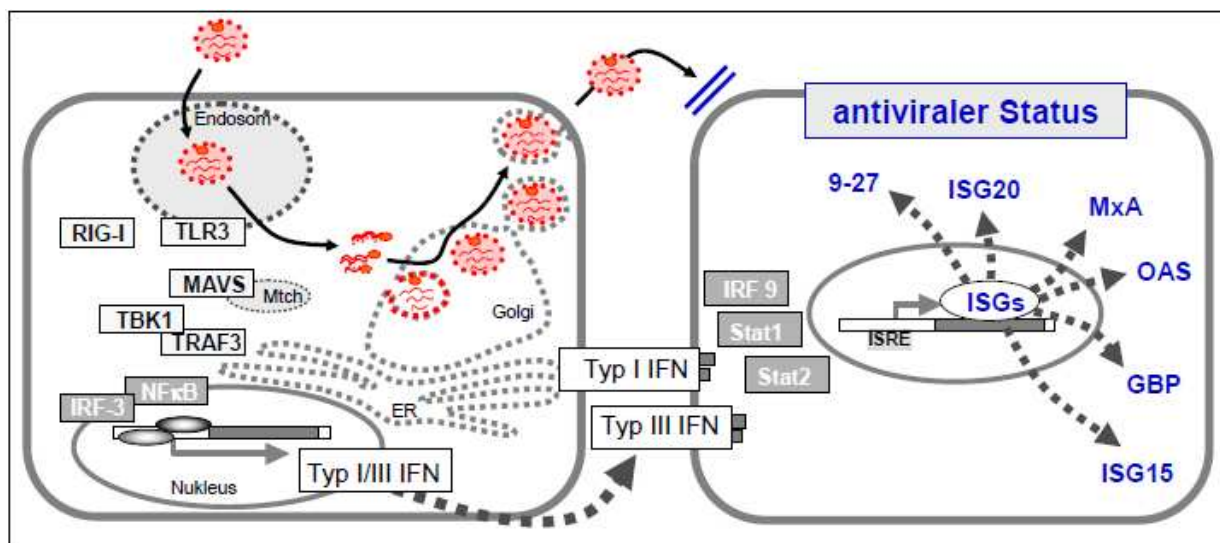


Abb. 4 Aktivierung des intrinsischen IFN-Systems durch RNA Viren und Aufbau eines antiviralen Status über die Stimulation IFN-induzierbarer Gene (ISGs). Die Virusinfektion wird erkannt durch Pathogenerkennungszellrezeptoren (u. a. TLR3, RIG-I) und führt über zelluläre Adapter und Kinasen (u.a. MAVS, TRAF3, TBK1) zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (IRF3, NFκB) und Expression von Typ I und Typ III IFN. Die Bindung IFN Typ-spezifischer Rezeptoren bewirkt die Expression von ISGs, die zur Konstituierung des antiviralen Status führen. Die Geschwindigkeit von Virusreplikation auf der einen und IFN-Induktion auf der anderen Seite ist von wesentlicher Bedeutung für den Verlauf einer Infektion. ER: endoplasmatisches Retikulum; GBP: *guanylate binding protein* ISRE: *IFN stimulated response element*; Mx: *Myxovirus resistance protein*; Mtch: Mitochondrium; OAS: Oligoadenylat Synthetase.

Die in Abbildung 4 schematisch gezeigte Wechselwirkung zwischen Virus und intrinsischem IFN-System soll auch verdeutlichen, dass die Geschwindigkeit der Virusreplikation auf der einen Seite und die IFN-Induktion auf der anderen von wesentlicher Bedeutung ist, ob

sich eine primäre und darauf aufbauend eine systemische Infektion entwickeln kann.

1.4. Interaktion zwischen Hantaviren und dem angeborenen Immunsystem

Viren haben vielfältigste Ausweichmechanismen entwickelt, um sich trotz dieser effizienten antiviralen Verteidigungslinie in der Wirtszelle zu vermehren und das eigene Überleben zu sichern (Randall et al. 2008; Haller et al. 2006; Versteeg et al. 2010). Für Hantaviren scheinen solche Ausweichmechanismen besonders wichtig zu sein, da sie sich relativ langsam vermehren, im Vergleich zu anderen RNA Viren. Die Erkennung der viralen RNA im Zytoplasma der Wirtszelle über RIG-I wird vermieden, da die Hantavirus RNA wie bereits erwähnt kein dreifach phosphoryliertes 5'-Ende trägt. Die Abspaltung terminaler Nukleotide vom 5'-Ende über den *prime and realign* Mechanismus allein ist offenbar nicht ausreichend, um eine Aktivierung des IFN-Systems vollständig zu verhindern, da die Infektion mit den nicht-pathogenen Hantaviren Prospect Hill (PHV), Tula (TULV) und Topografov (TOPV) zu einer frühen und starken IFN-Antwort führt. (Kraus et al. 2004; Khaiboullina et al. 2004; Alff et al. 2006; Spiropoulou et al. 2007; Handke et al. 2009a; Guhl et al. 2010, eigene nicht veröffentlichte Daten). Auch die Infektion pathogener Hantaviren, einschließlich HTNV und PUUV, aktiviert das IFN-System; allerdings wird diese Reaktion deutlich verzögert ausgelöst im Vergleich zur Reaktion auf die nicht pathogenen Hantaviren. Die verzögerte und verminderte Aktivierung des IFN-Systems scheint ein generelles Charakteristikum pathogener Hantaviren zu sein. Für die Etablierung der primären Infektion, die Ausbreitung des Virus im Wirt und auch die Entstehung pathologischer Symptome könnte die verzögerte IFN-Reaktion eine wichtige Grundvoraussetzung darstellen.

Über welche Mechanismen Hantaviren die Aktivierung des IFN-Systems blockieren oder verzögern, ist nur ansatzweise bekannt. Bisherige Studien deuten darauf hin, dass, abgesehen von der RdRp, alle Hantavirus-Proteine antagonistische Effekte ausüben können. Die bisher publizierten Befunde dieser antagonistischen Effekte der Hantaviren auf das IFN-System sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Die in Tabelle 1 skizzierten Arbeiten sind ausnahmslos *in vitro* Studien, in welchen Hantavirus-Subfragmente mittels transienter Transfektion von Expressionsplasmiden in die Zellen eingebracht wurden. Ob die viralen Produkte auch im Kontext des gesamten Virusgenoms die gleichen Effekte bewirken, kann nicht eindeutig beantwortet werden, zumal Reverse Genetik Systeme für Hantaviren nicht etabliert sind.

Zusammengefasst deuten diese Daten daraufhin, dass Hantaviren unterschiedliche und redundante Ausweichmechanismen entwickelt haben, um das intrinsische IFN-System zu umgehen. Diese antagonistischen Mechanismen scheinen von herausragender Bedeutung zu

sein, um eine erfolgreiche primäre Infektion und eine Ausbreitung des Virus im Wirt zu ermöglichen.

Virus	Protein	Effekt	Referenz
ANDV PHV	Gn/Gc	Retention von STAT1 im Zytoplasma	Spiropoulou et al. 2007
NYV	zytoplasmatischer Teil von Gn	Block der TBK1 initiierten ISG-Induktion	Alff et al. 2006
PUUV	NSs	Reduktion der poly-IC induzierten IFN β -Reportergenaktivität	Jääskeläinen et al. 2007
NYV	zytoplasmatischer Teil von Gn	Destabilisierung des TBK1/TRAF3 Komplexes	Alff et al. 2008
HTNV	NP	Interaktion mit Importin- α , Blockade des NF κ B Kerntransports	Taylor et al. 2009
ANDV	NP plus Gn/Gc	Reduktion der Sendai Virus induzierten Aktivität im IFN β -Reportergenassay	Levine et al. 2010
SNV	Gn/Gc		
TULV	zytoplasmatischer Teil von Gn	Reduktion der Aktivität im IFN β -Reportergenassay	Matthys et al. 2011

Tabelle 1: Übersicht publizierter Studien die Hinweise auf die Interaktion zwischen Hantaviren und intrinsischem IFN-System geben. Aufgelistet sind das verwendete Virus, das virale Protein, der gemessene Parameter der Untersuchung und die Referenz. NYV: New York Virus; Poly-IC: Poly-Inosin/Poly-Cytidylsäure ist ein synthetisches Analogon doppelsträngiger RNA.

2. Eigene Arbeiten

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen die Interaktionsmechanismen zwischen Hantaviren und dem angeborenen Immunsystem. Ausgangspunkt war die Beobachtung, dass pathogene im Vergleich zu nicht pathogenen Hantaviren das angeborene IFN-System differentiell aktivieren. Dieser Befund korreliert mit der verstärkten Vermehrung pathogener im Vergleich zu den nicht pathogenen Hantaviren in den verwendeten Testsystemen (Geimonen et al. 2002; Kraus et al. 2004; Khaiboullina et al. 2004; Alff et al. 2006; Spiropoulou et al. 2007).

Zu dem skizzierten Thema sind in der Habilitationsschrift sechs Publikation aus den Jahren 2006 bis 2010 zusammengefasst. Im ersten Teil dargestellt ist die Etablierung der Testsysteme, mit dessen Hilfe die differentielle Wechselwirkung zuverlässig und reproduzierbar charakterisiert werden sollten (Kapitel 2.1, 2.2 und 2.3). Im zweiten Teil der Arbeit sind die Erkenntnisse dargestellt, die mit Hilfe dieser Testsystem über die Virus-Wirt-Interaktion gewonnen wurden (Kapitel 2.4, 2.5 und 2.6).

2.1 Entwicklung einer Klonierungsmethode für nicht-zytolytische Viren

Virusisolate für Untersuchungen in Forschung und Diagnostik unterliegen einer Dynamik u. a. in Abhängigkeit von den verwendeten Zellkulturbedingungen, der Art der Wirtszellen, den Virustypen und der Zahl der Viruspassagen. Aufgrund spontaner Mutationen kommt es zur Entstehung von Virusvarianten, die als Quasispezies bezeichnet werden. Auf diese Weise entstehen außerdem defekte Varianten, die *per se* nicht infektiös sind, sich jedoch auf Kosten intakter Viren in derselben Zelle vermehren und als defekte Partikel ausgeschleust werden können. Das Verhältnis zwischen infektiösen und defekten Partikeln in einem Virusstock kann sich stark unterscheiden und diese Varianz kann großen Einfluss auf die Resultate bestimmter Untersuchungen haben.

In der ersten Arbeit wurde eine Methode entwickelt mit dessen Hilfe infektiöse Hantaviren von nicht infektiösen getrennt werden können. Zur Validierung der Methode wurde aus einem Gemisch unterschiedlicher Hantaviren eine Variante erfolgreich isoliert, die sich durch eine NSs-inaktivierende Punktmutation vom Wildtyp unterscheidet.

Die etablierte Methode ist eine wichtige Voraussetzung für die Isolierung einzelner Viruskclone aus einem Gemisch unterschiedlicher Varianten und für die Herstellung homogener Stocks mit vergleichbar hohen Virustitern. Interessanterweise zeigten alle Stocks, die mit Fokus-aufgereinigten Viren hergestellt wurden, deutlich höhere Titer im Vergleich zu den ursprünglichen parentalen Stocks (siehe Tabelle 2). Hier soll auch darauf hingewiesen werden, dass mit einem Stock mit ca. 5.000 Viren pro ml aussagekräftige funktionelle Infektionsversuche praktisch kaum möglich sind.

Anfangs-Titer	Virus	Titer nach Fokus-Aufreinigung
$1,8 \times 10^4$	HTNV	$2,5 \times 10^6$
$2,0 \times 10^3$	DOBV	$8,0 \times 10^5$
$4,7 \times 10^3$	PUUV	$2,5 \times 10^6$
$8,0 \times 10^4$	THAIV	$5,0 \times 10^6$
$4,0 \times 10^4$	TULV	$4,0 \times 10^6$
$6,8 \times 10^3$	PHV	$4,0 \times 10^6$
$7,0 \times 10^3$	TOPV	$1,0 \times 10^6$

Tabelle 2: Fokus-Aufreinigung zur Anreicherung infektiöser Partikel bewirkt einen deutlichen Anstieg der Virusproduktion. Dargestellt ist die Menge infektiöser Viren pro ml die innerhalb von 7 Tagen nach der Infektion von Vero Zellen mit parentalen Viren oder mit Fokus aufgereinigten Viren gebildet wurden (Kapitel 2.1). THAIV: Thailand Virus.

Auf Grundlage dieser Technik konnte die Reproduzierbarkeit vieler Versuche und die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Hantaviren in funktionellen Studien erheblich verbessert werden.

Diese Methode wurde auch verwendet, um erstmals in Zellkultur eine Reassortante zwischen einem pathogenen und einem nicht pathogenen Hantavirus herzustellen und für die funktionelle Analyse zu isolieren (siehe Kapitel 2.6).

Journal of Virological Methods 2006; 135:26-31

A novel method for cloning of non-cytolytic viruses.

Rang A, Heider H, Ulrich R, Krüger DH.

Institute of Virology, Helmut-Ruska-Haus, University Hospital Charité, Campus Charité Mitte, D-10098 Berlin, Germany

Hantaviruses are rodent-borne pathogens with a segmented single-stranded RNA genome of negative polarity. Spontaneous occurrence of variants with genetic heterogeneity have been observed both in vivo and in vitro. The objective of this study was to establish a method for the cloning of genetically homogenous hantaviruses which can be used for subsequent functional studies. Infected VeroE6 cells were incubated with an agarose/medium overlay to prevent uncontrolled distribution of de novo synthesized virus. Thereafter, the overlay was removed and stored for isolation of the diffused virus. The cell layer was fixed and viral antigen-containing foci were detected by immunochemistry. The relative location of the foci on the culture dish was used to trap individual virus clones in the corresponding overlay. The clones were picked and used for re-infection. According to this novel protocol three different hantaviruses, i.e. Hantaan, Puumala, and Tula virus, were purified. In the course of purification the titers of the resulting virus stocks were increased by 10-1000-fold. In addition, this method was used to purify a minor Puumala virus variant from a parental stock containing a mixture of two variants. Taken together, the method presented is well suited to isolate genetically homogenous hantaviruses and might also be applicable for other non-cytolytic viruses.

2.2. Die Quantifizierung neutralisierender Antikörper mittels Virusneutralisationstest kann durch defekte Viruspartikel beeinträchtigt werden

Die im vorigen Abschnitt beschriebene Studie bildet eine wichtige Grundlage für die Klonierung und Isolierung von nicht zytolytischen RNA Viren. Wie im vorigen Abschnitt eingeführt, können Virus Stock Präparationen, vornehmlich von RNA Viren, unterschiedliche Mengen infektiöser und defekter Viruspartikel enthalten. In der folgenden Studie wurde die Bedeutung und Auswirkung dieser Varianz für die Quantifizierung Virus-neutralisierender Antikörper untersucht.

Die Oberflächen infektiöser und nicht infektiöser Partikel sind identisch und haben die gleiche Immunoreaktivität. Die Studie verdeutlicht, dass die Quantifizierung neutralisierender Antikörper mittels Virusneutralisationstests durch das variierende Verhältnis zwischen defekten und infektiösen Partikeln dramatisch beeinträchtigt werden kann. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung homogener Virusstocks für einen zuverlässigen funktionellen Vergleich unterschiedlicher Referenzviren.

Intervirology 2009; 52:335-339

Defective particles can lead to underestimated antibody titers in virus neutralization tests.

Handke W, Krüger DH, Rang A.

Institute of Virology, University Hospital Charité, Berlin, Germany.

OBJECTIVE: Stocks of RNA viruses often contain divergent mixtures of infectious and defective particles (DPs). Since the surface of both particles share the same immunoreactivity, differing ratios of these particles in stocks used for virus neutralization tests might alter the results. Here the impact of such off-target effects were measured.

METHODS: To determine the relative content of DPs in 3 stocks with high, medium and low titers of infectious virions, the amounts of nucleocapsid protein and viral RNA were quantified by Western blot and quantitative RT-PCR. Thereafter, stocks with different amount of DPs were used to determine the titer of neutralizing antibodies in serum from a convalescent Puumala virus-infected patient by a focus reduction neutralization test.

RESULTS: The relative amount of DPs was at least 5-fold higher in the stock with the lowest titer compared to the stock with the highest. Stocks with lower levels of DPs led to higher

antibody titers compared to the analysis performed with stocks containing higher levels of DPs.

CONCLUSION: These results imply that DPs in virus stocks should be considered when performing virus neutralization tests to quantify neutralizing antibodies.

2.3. Hemmung von Hantaan Virus durch Typ I und Typ II Interferon ist unabhängig von MxA

Das humanen MxA Protein interferiert mit der Infektion vieler unterschiedlicher RNA und DNA Viren (Haller 2011). Welche Rolle das endogene MxA Protein im komplexen Netzwerk der durch IFN ausgelösten Schutzmechanismen spielt ist nicht klar. Um diese Frage zu beantworten, wurde der Effekt von Typ I IFN α und Typ II IFN γ auf HTNV untersucht. Interessanterweise wurde HTNV mit vergleichbarer Effizienz durch beide IFN-Typen gehemmt, obwohl MxA durch Typ II IFN γ nicht induziert wird. Untersuchungen in MxA-defizienten Zellen und nach spezifischem *knock down* von MxA mittels siRNA zeigten ferner, dass MxA für den durch IFN ausgelösten antiviralen Status keine entscheidende Rolle spielt. Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass weniger ein einzelnes Gen, sondern eher die konzertierte Aktion vieler Gene für die antivirale Wirkung und die effiziente IFN-vermittelte Hemmung verantwortlich sind.

Virus Research 2007; 127:100-105

MxA-independent inhibition of Hantaan virus replication induced by type I and type II interferon in vitro.

Oeschlegel R, Krüger DH, Rang A.

Institute of Virology, Helmut-Ruska-Haus, University Hospital Charité, Charité Campus Mitte, D-10098 Berlin, Germany.

Interferons (IFN) induce an antiviral state against Hantaan virus (HTNV) but the mechanisms responsible for inhibition are unclear. The IFN-inducible MxA is discussed to be important for control of infections with hantaviruses. To characterize the role of endogenous MxA, the inhibition of HTNV induced by type I and type II IFNs was compared in Vero and A549 cells. IFN α and IFN γ reduced production of infectious virions, viral RNA, and nucleocapsid protein with the same efficiency, although expression of MxA protein was detectable only in IFN α -treated A549 cells. Furthermore, knock down of MxA expression did not impair

IFN α -induced inhibition. Thus, inhibition of HTNV induced by type I and type II IFNs did not depend on expression of endogenous MxA. Taken together, these data suggest that MxA endogenously expressed in response to type I or type II IFNs does not play a pivotal role for the antiviral state against HTNV and that there is more than one mechanism by which cellular defences block hantavirus replication.

2.4. Hantaan Virus aktiviert angeborene Immunreaktionen über TLR3

Reverse Genetik Systeme für Hantaviren sind nicht und experimentelle Tiersysteme nur für einzelne Spezies beschrieben. Somit ist die Untersuchung der Virus-Wirt-Interaktion auf Zellkultursysteme angewiesen. Die vorherigen Studien (Kapitel 2.1, 2.2, 2.3) beschreiben die genaue Etablierung und detaillierte Charakterisierung von Zellkultursystemen auf deren Grundlage weiterführende Erkenntnisse gewonnen wurden, die in diesem und den zwei folgenden Kapiteln (2.5, 2.6) dargestellt sind. Die erste der drei Studien zeigt, dass sowohl das pathogene HTNV als auch das nicht pathogene PHV das IFN-System über die E3-Ligase TRAF3 stimulieren. Ferner konnte erstmalig mit TLR3 ein PPR identifiziert werden, der direkt durch HTNV aktiviert wird. Für die durch das nicht pathogene PHV ausgelöste frühzeitige Aktivierung des IFN-Systems war TLR3 jedoch nicht notwendig. Die Daten zeigen, dass die Rekrutierung von TLR3 sowohl antivirale als auch inflammatorische Immunreaktionen auslöst. Im Kontext dieser Studie stellt sich die Frage, ob und wenn ja in welchem Masse die inflammatorischen Immunreaktionen an der Pathogenese beteiligt sein könnten, die durch das HTNV ausgelöst wird.

Journal of Immunology 2009; 182:2849-2858

Hantaan virus triggers TLR3-dependent innate immune responses.

Handke W, Oelschlegel R, Franke R, Krüger DH, Rang A.

Institute of Virology, Helmut-Ruska-Haus, University Hospital Charité, Charité Campus Mitte, Berlin, Germany.

Immediately after viral infection, innate responses including expression of IFN- α / β and IFN-stimulated genes (ISGs) are elicited ubiquitously by recruitment of specific pathogen recognition receptors. The velocity to induce IFN- α / β and ISGs in response to an infection is often decisive for virulence. Interestingly, in primary endothelial cells ISGs are induced later by hantaviruses pathogenic to humans than those considered to be nonpathogenic

or of low virulence. Here we demonstrate that pathogenic Hantaan (HTNV) and putatively nonpathogenic Prospect Hill hantavirus (PHV) differentially activate innate responses in the established cell lines A549 and HuH7. STAT1 α phosphorylation was detectable 3 h after PHV inoculation but not within the first 2 days after HTNV inoculation. The velocity to induce the ISGs MxA and ISG15 correlated inversely with amounts of virus produced. Moreover, expression of the inflammatory chemokine CCL5 was also induced differentially. Both hantaviruses induced innate responses via TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3), and TLR3 was required for HTNV-induced expression of MxA, but not for the MxA induction triggered by PHV. Infection of RIG-I-deficient HuH7.5 cells revealed that RIG-I (retinoic acid receptor I) was not necessary for induction of innate responses by PHV.

Taken together, these data suggest that HTNV and PHV elicit different signaling cascades that converge via TRAF3. Early induction of antiviral responses might contribute to efficient elimination of PHV. Subsequent to clearance of the infection, innate responses most likely cease; vice versa, retarded induction of antiviral responses could lead to increased HTNV replication and dissemination, which might cause a prolonged inflammatory response and might contribute to the in vivo virulence.

2.5. Klonierung und funktionelle Charakterisierung einer in vitro hergestellten Reassortanten zwischen einem pathogenen einem nicht pathogenen Hantavirus.

Mit Hilfe der in Kapitel 2.1 dargestellten Klonierungsmethode ist es erstmals gelungen eine Reassortante zwischen einem pathogenen und einem nicht pathogenen Hantavirus herzustellen. Die Ergebnisse dieser Studie erlauben zuverlässige Rückschlüsse auf die viralen Determinanten, die für die differentielle Aktivierung des IFN-Systems entscheidend sind. Die erzielten Befunde erlauben weiterhin einen Einblick in grundlegende Kontrollmechanismen der viralen Replikation bzw. der Sortimentierung viraler RNA-Segmente.

Die funktionelle Analyse dieser Reassortante im Vergleich zu den parentalen Viren ergab, dass die differentielle Immunantwort durch die Gensegmente bestimmt wird, die für die RdRp und das NP kodieren. Die Untersuchung der Reassortante ergab außerdem, dass die Virusaufnahme über bestimmte Integrin-Rezeptoren für die spezifische IFN-Antwort in den verwendeten Testsystemen keine Rolle spielt.

Journal of General Virology 2010; 91:2351-2359

Generation and characterization of genetic reassortants between Puumala and Prospect Hill hantavirus in vitro.

Handke W, Oelschlegel R, Franke R, Wiedemann L, Krüger DH, Rang A.

Institute of Virology, Helmut-Ruska-Haus, University Hospital Charité, D-10098 Berlin, Germany.

Hantaviruses belong to the family Bunyaviridae characterized by tri-segmented RNA genomes. Depending on the hantavirus species, infection can lead to hantavirus cardiopulmonary or haemorrhagic fever with renal syndrome. In vitro studies suggest that pathogenic hantaviruses evade induction of innate antiviral responses, and this ability might determine the virulence in humans. Since reverse genetic systems are not available, in vitro reassortment is currently the only way to culture defined hantavirus variants. Here, we demonstrate for the first time the generation of a reassortant between a pathogenic Old World and a non-pathogenic New World hantavirus in vitro. The reassortant contained the glycoprotein coding M-segment derived from the pathogenic Puumala virus (PUUV) and the other genomic segments coding for the nucleocapsid protein and RNA-dependent RNA-polymerase from Prospect Hill virus (PHV), which is taken as non-pathogenic in humans. Exchange of the M-segment was confirmed by sequencing and virus neutralization test with PUUV-specific sera. Functional analysis of the reassortant and parental viruses revealed characteristic growth kinetics and innate immune responses as determined by expression analyses for lambda interferon and MxA, and by interferon-stimulated response element reporter gene studies. Consistent with previous studies with other pathogenic hantaviruses, PUUV elicited reduced innate responses if compared with PHV. In all these functional assays the reassortant revealed PHV-like phenotypes. Thus, neither the PUUV M-segment nor entry via specific M-segment directed pathways modulated the virus type-specific innate responses. Moreover, the data imply that this approach might be an option for production of attenuated viruses that could be used as vaccines against pathogenic hantaviruses.

2.6. Infektion von *in vivo* differenzierten humanen Mastzellen mit Hantaviren

Die erhöhte vaskuläre Permeabilität ist ein wesentliches Symptom der durch Hantaviren ausgelösten Erkrankungen. Besonders schwerwiegende Verläufe gehen einher mit irreversiblen Schock. Mastzellen sind wichtige Regulatoren vaskulärer Permeabilität und können bekanntermaßen schwerwiegende Schockzustände auslösen. Die vor diesem Hintergrund durchgeführten Studien ergaben, dass *in vivo* differenzierte humane Mastzellen mit Hantaviren infiziert und aktiviert werden können. Es stellt sich die Frage, ob durch die Hantavirusinfektion von Mastzellen der Verlauf der Erkrankung dramatisch verschlechtert wird, und ob eine Behandlung mit Mastzellstabilisatoren schwerwiegende Verläufe lindern oder sogar verhindern könnten.

Journal of General Virology 2010; 91:1256-1261.

Infection of *in vivo* differentiated human mast cells with hantaviruses.

Guhl S, Franke R, Schielke A, Johne R, Krüger DH, Babina M, Rang A.

Department of Dermatology and Allergy, University Hospital Charité, D-10098 Berlin, Germany.

Increased vascular permeability is a key feature of the pathological symptoms caused by hantaviruses. Here, we analysed the interaction between hantaviruses and mast cells, which regulate vascular homeostasis. In highly purified human skin mast cells increasing amounts of Hantaan (HTNV) and, to a lower extent, Prospect Hill (PHV) virions were produced. Replication was confirmed by the production of viral plus-strand RNA as determined by a virus strand-specific RT-PCR. PHV but not HTNV elicited early expression of beta interferon, MxA, ISG15 and CCL5 consistent to studies with other cell types. The data demonstrate that mature mast cells are permissive to infection with hantaviruses. This interaction might contribute to the development of vascular leakage syndrome.

3. Diskussion

Über welche Mechanismen Hantaviren in infizierten Patienten die teilweise lebensbedrohlichen Erkrankungen hervorrufen, ist unbekannt. Auch aus diesem Grund sind die Interventionsmöglichkeiten, die über eine symptomatische Behandlung hinausgehen, begrenzt. In der frühen Phase nach der Infektion kann die Behandlung von HFRS-Patienten mit Ribavirin den Verlauf positiv beeinflussen. Dieses Nukleosid-Analogon scheint jedoch gegen Alte Welt Hantaviren in HCPS-Patienten unwirksam zu sein. Gründe für die unterschiedliche Wirksamkeit sind nicht bekannt (Jonsson et al. 2008; Rusnak et al. 2009; Huggins et al. 1991; Chapman et al. 1999; Mertz et al. 2004; Marcus et al. 2005). Zusätzlich zu diesem therapeutisch wichtigen Unterschied zwischen Alte und Neue Welt Hantaviren ist von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen ein weiterer grundlegender Unterschied zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Hantaviren beschrieben worden. Von nicht pathogenen Hantaviren wird das intrinsische IFN-System *in vitro* unmittelbar nach der Infektion, jedoch erst deutlich verzögert nach der Infektion mit pathogenen Hantaviren ausgelöst. Dieses erweiterte Zeitfenster könnte für die erfolgreiche Infektion und Ausbreitung im Menschen notwendig und auch für die Virulenz der Hantaviren entscheidend sein. Die Aufklärung dieser und anderer grundlegender Fragen zur Virusvermehrung, Virus-Wirt-Interaktion und Pathogenese sind dringend erforderlich, um intervenierend den Krankheitsverlauf zu beeinflussen und alternative Impfstrategien zu entwickeln.

3.1. Historie Zellkultur-adaptierter Hantaviren

Die Untersuchung der Hantavirus Vermehrung, Wirtsspezifität und Pathogenese sind schwierig, da geeignete Tiersysteme nur begrenzt und Reverse Genetik Systeme für Hantaviren nicht zur Verfügung stehen. Viele Richtungsweisende Erkenntnisse basieren auf Untersuchungen *in vitro* mit an Zellkultur adaptierte Hantavirus-Isolate. In welcher Form diese Isolate vergleichbar sind mit den Viren, die *in vivo* in natürlichen Reservoirwirten und im Menschen zirkulieren, ist ungewiss. Die Historie des verwendeten Virus kann von beachtlicher Relevanz zu sein. Zumindest in einer Studie konnte gezeigt werden, dass ein Zellkultur-adaptiertes Isolat nicht mehr in der Lage war, den natürlichen Reservoirwirt *Myodes glareolus* zu infizieren, im Gegensatz zu dem *in vivo* passagierten Virus. Obwohl in nicht kodierenden Regionen Sequenzunterschiede zwischen den beiden Isolaten identifiziert wurden, ist nicht geklärt, welche Charakteristika für die veränderte *in vivo* Infektivität entscheidend war (Lundkvist et al. 1997).

Die Historie eines Virusstocks drückt sich auch in dem wechselhaften Verhältnis zwischen defekten und infektiösen Viruspartikeln aus, welches in Abhängig von der

Infektionsdosis, den Kulturbedingungen und der Art der Wirtszelle stark schwanken kann. Diese Varianz kann sich sehr effizient auf die Virusproduktion auswirken. Einerseits ist gezeigt worden, dass defekte RNA-haltige Viruspartikel das intrinsische IFN-System besonders stark stimulieren (Yount et al. 2006, Marcus et al. 1989). Zum Anderen wurde dargestellt, u. a. in der vorliegenden Arbeit auch für Hantaviren, dass defekte Partikel auf Kosten der infektiösen produziert werden (Kapitel 2.2). Um die Varianz zwischen den unterschiedlichen Virusstocks zu minimieren, wurde in Anlehnung an die klassische Plaque-Reinigung zytolytischer Viren eine neue Fokus-Aufreinigungsmethode zur Klonierung nicht zytolytischer Viren entwickelt (Kapitel 2.1).

Mit Hilfe dieser Methode kann zuverlässig die genetische Homogenität der Virusstocks und dadurch auch eine hohe Vergleichbarkeit unterschiedlicher Hantavirus-Arten gewährleistet werden. In Folge dieser Homogenität konnte auch die Reproduzierbarkeit der funktionellen Studien deutlich erhöht werden. Die Relevanz dieser Fokus-Aufreinigungsmethode wird nicht nur durch den Anstieg der Virustiter deutlich (siehe Kapitel 2.1, Tabelle 2), sondern konnte auch für Virus-Neutralisationsteste gezeigt werden. In Abhängigkeit von der Menge an defekten Partikeln in den verwendeten Virusstocks führte die Quantifizierung neutralisierender Antikörper zu teilweise irreführende Ergebnisse (Kapitel 2.2).

Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit einer genauen Kontrolle der Virusstocks, die für funktionelle Studien *in vivo* und *in vitro* verwendet werden. Aufgrund dieser Erwägungen wurden alle Studien mit Stocks durchgeführt, die nach einer Fokus-Aufreinigung der entsprechenden Hantaviren hergestellt wurden. Um klonale Effekte auszuschließen bzw. zu kontrollieren, wurden Wiederholungsexperimente i. d. R. mit Virusstocks durchgeführt, die mit unterschiedlichen Virusklonen hergestellt wurden.

3.2. Hemmung von Hantaviren in Zellkultur durch Zugabe von rekombinantem Interferon

Um die Wirkung und Bedeutung des intrinsischen IFN Systems besser einschätzen zu können, wurde die Hemmung von HTNV durch rekombinantes Typ I IFN α und Typ II IFN γ bestimmt. In diesen Studien wurde deutlich, dass sowohl durch IFN α als auch durch IFN γ die Virusproduktion sehr effizient blockiert werden kann. Die Wirkung dieser IFNe gegen HTNV schien vergleichbar, obwohl durch IFN α und IFN γ teilweise unterschiedliche Gene induziert werden (Kapitel 2.3).

IFN wirkt autokrin und parakrin auf komplexe regulatorische Netzwerke, die nicht allein das angeborene und adaptive Immunsystem, sondern auch grundlegende zelluläre Prozesse kontrollieren. Beeinträchtigt wird u. a. die Zellteilungsrate als auch die zelluläre Translation u. a.

über die Phosphorylierung des eukariotischen Initiationsfaktors der Translation eIF2A durch die IFN-induzierbare Proteinkinase R (PKR). Somit induziert IFN nicht nur ISGs mit direkter antiviraler Wirkung, sondern reduziert den gesamten Zellstoffwechsel auf ein lebenserhaltendes Minimum. In diesem nahezu selbst-zerstörerischen Zustand ist die Zelle vor einer Virusinfektion auch geschützt, da wichtige Wirtzellfunktionen nicht stattfinden, die für die Etablierung der Virusinfektion erforderlich sind. Nach diesen Szenarien ergeben sich zwei intrinsische Verteidigungsebenen. Auf einer Ebene durch die Induktion von ISGs, die direkt mit viralen Produkten interagieren und auf einer weiteren grundlegenden Ebene durch die weitgehende Abschaltung aller Prozesse, die für vitale Funktionen der Zelle zumindest übergangsweise nicht notwendig sind.

Im Gegensatz zu diesem komplexen vielschichtigen Wirkungsmodell konnte gezeigt werden, dass allein die Überexpression des IFN-induzierbaren MxA Proteins eine HTNV-Infektion vollständig verhindern konnte (Frese et al. 1998). Neben HTNV können viele unterschiedliche RNA- und DNA-Viren durch das humane MxA Protein gehemmt werden, einschließlich Afrikanisches Schweinefieber Virus, Coxsackie B Virus, Hepatitis B Virus, Humanes Parainfluenza Virus Typ 3, Infektiöses Lachsanämie Virus, Infektiöses Pancreasnekrose Virus, Influenza A/B/C Virus, Krim-Kongo Fieber Virus, LaCrosse Virus, Masern Virus, Rift Valley Fieber Virus, Semliki Forest Virus, Thogoto Virus und Vesicular Stomatitis Virus, Virus der Infektiösen Bursitis und Thogoto (Haller und Kochs 2011). Welche Eigenschaften des MxA Proteins für das breite Wirkungsspektrum verantwortlich sind, ist nicht genau charakterisiert. Für Krim-Kongo Fieber und Thogoto Virus konnte eine direkte Interaktion von MxA mit den viralen Nukleokapsidproteinen nachgewiesen werden (Kochs et al. 1999; Andersson et al. 2004). Durch diese Bindung wird höchst wahrscheinlich das für die Virusproduktion essentielle Strukturprotein entzogen und inaktiviert. Ob MxA mit allen oben genannten Viren in ähnlicher Weise interagiert oder über andere Wirkmechanismen die Virusvermehrung hemmt, ist unklar.

Im Zuge intrinsischer antiviraler Immunreaktionen wird MxA nicht allein, sondern ausschließlich zusammen mit anderen ISGs induziert. Welche Rolle MxA für die Hemmung von HTNV im Kontext dieser anderen ISGs spielt, ist wenig bekannt. In unseren Studien zur antiviralen Wirkung von Typ I IFN α und Typ II IFN γ wurde HTNV mit vergleichbarer Effizienz durch beide IFN-Typen gehemmt, obwohl MxA durch Typ II IFN γ nicht induziert wird. In MxA-defizienten Zellen und MxA-*knock down* Experimenten war die durch IFN ausgelöste Hemmung nicht beeinträchtigt (Kapitel 2.3). Somit scheint das endogene MxA Protein für die IFN-vermittelte Hemmung von HTNV nicht entscheidend zu sein, wie zuvor auch schon für die Hemmung von Hepatitis B Virus gezeigt (Rang et al. 2002).

Diese Daten darauf hin, dass zusätzlich zu MxA, durch IFN weitere bisher nicht charakterisierte antivirale Mechanismen ausgelöst werden. Im Anbetracht des hoch-komplexen IFN-Netzwerks wird zunehmend deutlich, dass die hoch-effiziente antivirale Wirkung nicht allein durch einzelne ISGs, sondern in einem vielschichtigen Konzert vieler Gene und grundlegender zellulärer Prozesse vermittelt wird (Borden et al. 2007).

3.3. Intrinsische Immunreaktionen auf die Infektion mit Hantaviren

Im Rahmen der oben beschriebenen IFN-Studie bewirkte die HTNV Infektion von Lungenepithelzellen interessanterweise eine endogene MxA Expression auch ohne Zugabe von rekombinantem IFN (Kapitel 2.3, Abbildung 1,C). In weiteren Untersuchungen konnte mit Hilfe dieses experimentellen Zellsystems erstmals direkt gezeigt werden, dass Hantaviren über TLR3 und TRAF3 antivirale und inflammatorische Immunreaktionen auslösen. Der direkte funktionelle Vergleich zwischen pathogenen und nicht pathogenen Hantaviren ergab ferner, dass weder die Rekrutierung von TLR3 noch von RIG-I für die frühe Aktivierung des IFN-Systems durch das nicht pathogene PHV entscheidend zu sein scheint (Kapitel 2.4). Konsistent zu den oben beschriebenen Befunden wurde auch von Habjan und Kollegen gezeigt, dass RIG-I an der Erkennung von HTNV nicht beteiligt zu sein scheint, da von dem Virusgenom die dreifach-phosphorylierten 5'-Enden im Zuge der Replikation entfernt werden (Habjan et al. 2008).

Unser Daten zeigen erstmalig das Hantaviren durch TLR3 erkannt werden können, wobei die protektive Rolle von TLR3 in Kontext der Erkennung viraler Infektion fraglich ist. TLR3 erkennt doppelsträngige RNA über eine Ektodomäne, die auf der Zelloberfläche oder im endosomalen Lumen lokalisiert ist. Diese zelluläre Lokalisation haben alle TLRs gemein, die mit Nukleinsäuren als PAMP interagieren, einschließlich TLR7 und TLR9. Aufgrund der Virushülle und den gegenwärtig bekannten Aufnahmewegen von Virionen kann man davon ausgehen, dass genomische Virus-RNA oder -DNA vorwiegend im Zytoplasma für PRRs zugänglich sind. Fraglich ist deshalb, wie TLR3, TLR7 oder TLR9 als protektive Sensoren einer viralen Infektion fungieren können (Takeuchi et al. 2007). Hier muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass in der Wirtszelle zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten ein reger Materialaustausch über unterschiedliche Transportmechanismen besteht. TLR7 spezifische Liganden beispielsweise können aus dem Zytoplasma der Wirtszelle mittels Autophagie in endosomale Kompartimente überführt werden (Lee et al. 2007). Auf ähnliche Weise könnte auch doppelsträngige HTNV RNA katabolisiert und mit TLR3 in Verbindung gebracht werden. Dieser Mechanismus scheint jedoch ungeeignet zu sein eine erfolgreiche Infektion zu verhindern, da die ausgelösten antiviralen Effekte zumindest in unseren Studien erst 2 Tage nach der HTNV Infektion nachweisbar waren (Kapitel 2.4 und 2.5).

Die Infektion mit HTNV führt über die Rekrutierung von TLR3 zur Expression inflammatorischer Gene, einschließlich Rantes/CCL5. Da die verzögerte Immunreaktion die erfolgreiche primäre Infektion nicht mehr verhindern kann, könnte die Infektion über TLR3 nachhaltige Entzündungsreaktionen und so immunpathologische Prozesse auslösen. Folglich könnte die Rekrutierung von TLR3 durch Hantaviren eine Fehlaktivierung bewirken mit schädlichen Auswirkungen. Anhaltspunkte für dieses Szenarium ergaben sich aus Infektionsstudien mit Influenza Virus, West Nil Virus, Phlebovirus oder Encephalomyelitis Virus. In TLR3-defizienten Mäusen waren die ausgelösten Symptome wesentlich milder und die Mortalitätsraten deutlich geringer im Vergleich zu den Befunden in den TLR3-kompetenten Tieren (Gowen et al. 2006; Hardarson et al. 2007).

Welche zellulären Sensoren nicht pathogene Hantaviren (PHV, TULV, TOPV) erkennen und die frühzeitige Immunantwort auslösen, ist eine wichtige bisher unbeantwortete Frage. Unklar ist auch welche viralen Produkte von der Wirtszelle als PAMP erkannt werden und für die beobachteten Unterschiede zwischen den pathogenen und nicht pathogenen Hantaviren entscheidend sind. Um diese Frage zu untersuchen, wurden *in vitro* Reassortanten mit definierten Hantaviren hergestellt (McElroy et al. 2004; Kirsanovs et al. 2010). Mit Hilfe der oben skizzierten Fokus-Aufreinigungsmethode ist es erstmalig gelungen Reassortanten zwischen einem pathogenen und einen nicht-pathogenen Hantavirus herzustellen und zu isolieren (Kapitel 2.5).

Wie die Sortimentierung der drei unterschiedlichen Genomsegmente in der Wirtszelle reguliert wird, ist unklar. Bisherige Studien deuten darauf hin, dass eine Reassortimentierung nach Doppelinfektion einer Zelle mit zwei Hantaviren einer Art relativ häufig erfolgen kann (Henderson et al. 1995; Rodriguez et al. 1998; Klempa et al. 2003; Rizvanov et al. 2004; Zou et al. 2008; Razzauti et al. 2009; Kirsanovs et al. 2010). Zwischen unterschiedlichen Virusarten scheint die Reassortierung restriktiver kontrolliert zu sein. Dennoch kann diese Beschränkung zumindest für Reassortanten mit einem heterologen M-Segment durchbrochen werden (McElroy et al. 2004, Handke et al. 2010). Ob andere Genom-Kombinationen nicht oder deutlich schlechter vermehrungsfähig sind oder in der Ursprungszelle gar nicht erst gebildet werden, ist unklar. Ungeachtet dieser Einschränkungen ist die Reassortierung *in vitro* gegenwärtig der einzige Weg zu definierten Virus-Varianten, da Reverse Genetik Systeme für Hantaviren nicht etabliert sind.

Der funktionelle Vergleich der Reassortanten mit den parentalen Viren ergab, dass ausschließlich die S- und L-Segmente und die durch diese Genomsegmente kodierten

Virusprodukte entscheidend für die differentielle IFN-Reaktion sind. Die Rekrutierung spezifischer Integrinrezeptoren durch die Glykoproteine von PUUV und PHV zeigt in dem verwendeten Testsystem keinen offensichtlichen Einfluss auf die beobachteten Immunreaktionen (Kapitel 2.5). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wird der N-terminalen cytoplasmatischen Domäne des New York Virus (NYV) Gn eine wichtige Rolle an der Blockade des intrinsischen IFN-Systems beigemessen (Alff et al. 2006; Alff et al. 2008). Kürzlich wurden ähnliche antagonistische Effekte auch für das Gn des nicht pathogene TULV beschrieben (Matthys et al. 2011) Zumindest die letztgenannten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer früheren Arbeit (Kraus et al. 2006). Gegenwärtig ist nicht bekannt, ob experimentelle Details oder auch die benutzten Virusisolate diese Unterschiede erklären könnten.

Insgesamt findet man abhängig von den verwendeten Hantavirus-Arten vielfältige Mechanismen, die mit der Aktivierung des IFN-Systems interferieren (siehe Tabelle 1). Hier muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass abgesehen von den Arbeiten mit Reassortanten (McElroy et al. 2008; Kirsanovs et al. 2010; Handke et al. 2010) die funktionelle Untersuchungen im subviralen Kontext durchgeführt wurden. Ob die beobachteten Effekte auch im gesamtgenomischen Kontext der jeweiligen Hantaviren wirksam werden, ist nicht klar.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass Hantaviren viele redundante Mechanismen entwickelt haben, um der effizienten antiviralen Wirkung intrinsischer Immunreaktionen zu entgehen. Diese Redundanz mag auch mit der Entwicklung in unterschiedlichen Reservoirwirten begründet sein. Im Zuge der lang währenden Koevolution können sich Spezies-spezifisch unterschiedliche Ausweichmechanismen ausgeprägt haben, die im Fehlwirt Mensch mit entscheidend sind, sowohl für die Virulenz als auch für die Art der jeweiligen Pathogenitätsmechanismen.

3.4. Infektion von Mastzellen: point of no return?

Über welche Mechanismen pathogene Hantaviren im Menschen Krankheitssymptome auslösen, ist unbekannt. Sowohl die direkte Interaktion mit Endothelzellen, als auch indirekte Effekte über die verstärkte Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und Mediatoren könnten die erhöhte vaskuläre Permeabilität auslösen. Schock-artige Symptome bei fast allen letal verlaufenden HCPS- und HFRS-Fällen deuten darauf hin, dass Mastzellen an der Pathogenese beteiligt sein könnten (Borges et al. 2008; Campen et al. 2006). Unterstützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass Mastzellen mit Hantaviren infiziert und aktiviert werden können (Kapitel 2.6). Die Infektion von Mastzellen könnte einen kritischen Punkt markieren, der einmal überschritten einen nicht reversiblen Schock-Zustand auslöst und zu Organversagen und unabwendbar zum Tod des Patienten führt.

Hinweise auf eine Aktivierung von Mastzellen aufgrund erhöhter Histaminwerte im Serum Hantavirus-infizierter Patienten unterstützen dieses Modell. Aufgrund der sehr geringen Halbwertszeit können erhöhte Histaminmengen im Serum leicht übersehen werden. Dies könnte der Grund sein, warum bisher nur in zwei Studien erhöhte Mengen an Histamin in Hantavirus-infizierten Patienten dokumentiert wurden (Sidelnikov et al. 1990; Sidelnikov et al. 1996). Um die Rolle von Mastzellen an der Pathogenese fundierter beurteilen zu können, sind weitere detaillierte Untersuchungen notwendig. Für diese Fragestellung würde sich besonders das experimentelle Model im Syrischen Hamster für ANDV anbieten. In diesem System könnte man testen, in welchem Maße Mastzellen mit ANDV infiziert sind, und ob diese Infektion mit den beobachteten Befunden in den entsprechenden Organen in Einklang gebracht werden können. Falls sich Mastzellen als Zielzellen der Hantavirusinfektion bestätigen sollten, könnte man untersuchen, ob Mastzellstabilisatoren oder andere Mastzell-regulierende Medikamente die Symptomatik in diesem Testsystem beeinflussen können.

4. Zusammenfassung

Infolge einer Infektion mit Hantaviren sterben bis zu 15% der mit hämorrhagischem Fieber mit renalem Syndrom und bis zu 40% der mit Hantaviralen Cardiopulmonalen Syndrom erkrankten Patienten. Die Pathogenitätsmechanismen die zu diesen Syndromen führen und Virulenzfaktoren der Hantaviren sind nur ansatzweise charakterisiert. Die erfolgreiche primäre Infektion nach der Virusaufnahme ist eine wesentliche Voraussetzung für die Pathogenese. In dieser Phase der Infektion vermehren sich pathogene Hantaviren *in vitro* deutlich effizienter als nicht pathogene. Im Rahmen der Studie wurden virale und zelluläre Faktoren identifiziert und charakterisiert, die für die Etablierung der primären Infektion und folglich auch für die Virulenz der Viren *in vivo* eine wichtige Rolle spielen.

In einem ersten Schritt der Studie wurde eine Fokusaufreinigungsmethode für nicht zytolytische Viren entwickelt. Diese Methode erlaubt die Klonierung von Hantaviren und auf diese Weise auch die Entfernung von defekten interferierenden Viruspartikeln. Defekte Partikel können die Effizienz der Virusvermehrung und auch angeborene Immunreaktionen modulieren. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die Verwendung von Referenzviren mit unterschiedlichen Anteilen defekter Viruspartikel einen starken Einfluss auf die Quantifizierung Virus-neutralisierender Antikörper hat. Dieser Befund unterstreicht zusätzlich die Bedeutung der etablierten Fokusaufreinigungsmethode. Diese Methode bildet eine wichtige und solide Grundlage für den funktionellen Vergleich pathogener und nicht-pathogener Referenzviren.

Um die Interaktion zwischen Hantaviren und dem angeborenen Immunsystem zu charakterisieren, wurde die Wirkung von Interferon-alpha ($IFN\alpha$) und Interferon-gamma ($IFN\gamma$) auf das hochpathogene HTNV bestimmt. Obwohl diese IFN-Typen teilweise unterschiedliche Gene induzieren, wurde HTNV durch beide IFNs mit der gleichen Effizienz gehemmt. Die Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass die Hemmung von HTNV durch Gene vermittelt wird, die sowohl durch $IFN\alpha$ als auch $IFN\gamma$ moduliert werden.

Frühere Studien hatten gezeigt, dass MxA *per se* ausreichend ist, um eine HTNV-Infektion *in vitro* zu verhindern. Im Gegensatz zu diesen Befunden, ergaben unsere Untersuchungen keine Hinweise auf einen Beitrag von MxA an der Hemmung von HTNV in $IFN\alpha$ -behandelten Zellen. Die Effizienz der Hemmung von HTNV war unverändert, ungeachtet ob MxA gebildet wurde oder nicht. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass redundante Mechanismen existieren, die für die antivirale Wirkung und die effiziente IFN-vermittelte Hemmung entscheidend sind. Diese Ergebnisse bestätigen die oben skizzierte Hypothese, dass

die entscheidenden antiviralen Effektoren gegen HTNV sowohl durch IFN α als auch durch IFN γ induziert werden sollten.

Testsysteme für die Untersuchung der Mechanismen, die zu HFRS oder HCPS führen, sind nur ansatzweise entwickelt. Um Hinweise auf diese Mechanismen zu erhalten, wurde die Wechselwirkung zwischen Wirt und Virus - auf der einen Seite mit dem pathogenen HTNV und auf der anderen Seite mit dem nicht pathogenen PHV verglichen. Im Rahmen dieser Vergleichsstudie konnte festgestellt werden, dass pathogene und nicht pathogene Hantaviren angeborene Immunreaktionen über die Ubiquitin-Ligase TRAF3 auslösen. Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, dass hoch-pathogene Hantaviren angeborene Immunreaktionen über TLR3 auslösen können. Auf Grundlage der differentiellen Virus-Wirt-Interaktion wurde folgendes Modell aufgestellt: Die durch nicht pathogene Hantaviren frühzeitig ausgelösten angeborenen antiviralen Immunreaktionen blockieren die Infektion vollständig. Pathogene Hantaviren hingegen lösen die antivirale Immunreaktion zu spät aus, sodass die Entwicklung einer primären und systemischen Infektion ermöglicht wird. In Folge der anhaltenden Virusproduktion, kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die Effektorzellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems rekrutiert und aktiviert. Diese durch die Infektion ausgelöste systemische Immunreaktion könnte für die Pathogenese entscheidend sein.

Reverse Genetik System sind bisher für Hantaviren nicht etabliert. Die Herstellung und Isolierung von Reassortanten nach einer Ko-Infektion mit mehreren Viren ist gegenwärtig der einzige Weg, mit dessen Hilfe definierte Hantavirusvarianten hergestellt werden können. Um Virulenzfaktoren eindeutig zu identifizieren, wurden Reassortanten zwischen einem pathogenen und einem nicht pathogenen Hantavirus hergestellt. Die funktionelle Analyse dieser Reassortanten im Vergleich zu den parental Viren zeigte, dass die S-RNA, die für das Nukleokapsidprotein und die L-RNA, die für die RNA-abhängige RNA Polymerase kodieren, entscheidend sind für die Virusspezies-spezifische Virus-Wirt-Interaktion. Abgesehen von den immunogenen Eigenschaften der Glykoproteine des pathogenen PUUV, zeigte die hergestellte Reassortante denselben Phänotyp, wie das nicht pathogene parentale PHV. Um zu testen, ob diese Reassortante als Lebend-Impfstoff zum Schutz vor einer PUUV Infektion geeignet sein könnte sind weitere Studien erforderlich. Über diesen Aspekt hinaus, erlauben die erzielten Ergebnisse eine fokussierte Charakterisierung der molekularen Wirkmechanismen, die für die differenzielle Aktivierung antiviraler Immunreaktionen verantwortlich sind.

Hantaviren vermehren sich primär in Endothelzellen können aber auch in alveolar Makrophagen und Dendritischen Zellen replizieren. Wie die Viren sich nach der primären Infektion im Wirt ausbreiten ist gegenwärtig nicht bekannt. Über die Migration infizierter dendritischer Zellen könnte das Virus in die Lymphknoten gelangen und von dort die

systemische Infektion auslösen. Während der systemischen Infektion kommt es teilweise zu irreversiblen Schockzuständen, die i. d. R. tödlich verlaufen. Erstmalig konnten wir zeigen, dass *in situ* gereifte humane Mastzellen mit Hantaviren infiziert und durch die Infektion aktiviert werden können. Diese Ergebnisse begründen die Hypothese, dass auch Mastzellen im Zuge der systemischen Infektion infiziert werden und durch die Sezernierung von Entzündungsmediatoren an der Ausprägung der Symptomatik beteiligt sein könnten. Die therapeutische Stabilisierung von Mastzellen in dieser kritischen Phase der Infektion könnte geeignet sein, die Ausprägung irreversibler Schockzustände und letale Krankheitsverläufe zu verhindern.

In dieser Arbeit sind Studien zusammengefasst, auf deren Grundlage konkrete Hypothesen zur Virulenz und Pathogenese der Hantaviren im Menschen aufgestellt werden konnten. Eine Fortführung der Untersuchungen, angelehnt an diese Hypothesen, kann zur Entwicklung neuer Hantavirus-Impfstoffe und zur Verbesserung der Behandlungsoptionen für infizierte Patienten führen.

5. Literatur aus dem freien Text

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732.

Alff, P. J., Gavrilovskaya, I. N., Gorbunova, E., Endriss, K., Chong, Y., Geimonen, E., Sen, N., Reich, N. C. & Mackow, E. R. (2006). The pathogenic NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail inhibits RIG-I- and TBK-1-directed interferon responses. *J. Virol.* 80:9676.

Alff, P. J., Sen, N., Gorbunova, E., Gavrilovskaya, I. N. & Mackow, E. R. (2008). The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation. *J. Virol.* 82:9115.

Andersson, I., Bladh, L., Mousavi-Jazi, M., Magnusson, K.E., Lundkvist, A., Haller, O., Mirazimi, A., (2004). Human MxA protein inhibits the replication of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J. Virol.* 78:4323.

Andersson, I., Lundkvist, A., Haller, O., Mirazimi, A., (2006). Type I interferon inhibits Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human target cells. *J. Med. Virol.* 78:216.

Borden EC., Sen GC., Uze G., Silverman RH., Ransohoff RM., Foster GR., Stark GR (2007) Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature reviews* 6:975.

Borges AA, Figueiredo LT. (2008) Mechanisms of shock in hantavirus pulmonary syndrome. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21:293.

Campen MJ, Milazzo ML, Fulhorst CF, Obot Akata CJ, Koster F. (2006) *Virology*. Characterization of shock in a hamster model of hantavirus infection. 356:45.

Cho, H. W. & Howard, C. R. (1999). Antibody responses in humans to an inactivated hantavirus vaccine (Hantavax). *Vaccine* 17:2569.

Cho, H. W., Howard, C. R. & Lee, H. W. (2002). Review of an inactivated vaccine against hantaviruses. *Intervirology* 45:328.

Chu, Y. K., Jennings, G., Schmaljohn, A., Elgh, F., Hjelle, B., Lee, H. W., Jenison, S., Ksiazek, T., Peters, C. J., Rollin, P. & et al. (1995). Cross-neutralization of hantaviruses with immune sera from experimentally infected animals and from hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome patients. *J. Infect. Dis.* 172:1581.

Chapman LE, Mertz GJ, Peters CJ, Jolson HM, Khan AS, Ksiazek TG, Koster FT, Baum KF, Rollin PE, Pavia AT, Holman RC, Christenson JC, Rubin PJ, Behrman RE, Bell LJ, Simpson GL, Sadek RF. (1999) Intravenous Ribavirin for hantavirus pulmonary syndrome: safety and tolerance during 1 year of open-label experience. *Antiviral Therapy* 4:211.

Diaz, M. O., Ziemin, S., Le Beau, M. M., Pitha, P., Smith, S. D., Chilcote, R. R. & Rowley, J. D. (1988). Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5259.

Elliott, R. M., Schmaljohn, C. S. & Collett, M. S. (1991). Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 169:91.

Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Manilof, f. J., Desselberger, U. & Ball, L. A., (Eds.) (2005). Bunyaviridae, in: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the Committee on the Taxonomy of Viruses.*

Frese M, Kochs G, Feldmann H, Hertkorn C, Haller O. (1996) Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J. Virol.* 70:915.

Gavrilovskaya, I. N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M. H. & Mackow, E. R. (1998). beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7074.

Geimonen, E., Neff, S., Raymond, T., Kocer, S. S., Gavrilovskaya, I. N. & Mackow, E. R. (2002). Pathogenic and nonpathogenic hantaviruses differentially regulate endothelial cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13837.

Gowen, B. B., J. D. Hoopes, M. H. Wong, K. H. Jung, K. C. Isakson, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, and R. W. Sidwell. (2006) TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to Phlebovirus infection. *J. Immunol.* 177:6301.

Guhl S., Franke R., Schielke A., Johne R., Krüger D.H., Babina M., Rang A. (2010) Infection of in vivo differentiated human mast cells with hantaviruses. *J. Gen. Virol.* 91:1256.

Habjan M, Andersson I, Klingström J, Schümann M, Martin A, Zimmermann P, Wagner V, Pichlmair A, Schneider U, Mühlberger E, Mirazimi A, Weber F. (2008) Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One.* 3:e2032.

Haller O, Kochs G, Weber F. (2006) The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344:119.

Haller O, Kochs G. (2011) Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res.* 31:79.

Handke, W., Oelschlegel, R., Franke, R., Kruger, D. H. & Rang, A. (2009b). Hantaan virus triggers TLR3-dependent innate immune responses. *J. Immunol.* 182:2849.

Handke W., Krüger DH., Rang A. (2009b) Defective particles can lead to underestimated antibody titers in virus neutralization tests. *Intervirolgy* 52:335.

Handke W., Oelschlegel R., Franke R., Krüger DH., Rang A. (2010) Generation and characterization of genetic reassortants between Puumala and Prospect Hill hantavirus in vitro. *J. Gen. Virol.* 91:2351.

Hardarson, H. S., J. S. Baker, Z. Yang, E. Purevjav, C. H. Huang, L. Alexopoulou, N. Li, R. A. Flavell, N. E. Bowles, and J. G. Vallejo. (2007) Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury. *Am. J. Physiol.* 292:251.

Heider, H., Ziaja, B., Priemer, C., Lundkvist, A., Neyts, J., Krüger, D. H. & Ulrich, R. (2001). A chemiluminescence detection method of hantaviral antigens in neutralisation assays and inhibitor studies. *J. Virol. Meth.* 96:17.

Henderson, W. W., Monroe, M. C., St Jeor, S. C., Thayer, W. P., Rowe, J. E., Peters, C. J. & Nichol, S. T. (1995). Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology* 214:602.

Hooper, J. W., Larsen, T., Custer, D. M. & Schmaljohn, C. S. (2001). A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 289:6.

Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S., Hartmann G. (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 168:4531.

Hornung V., Ellegast J., Kim S., Brzózka K., Jung A., Kato H., Poeck H., Akira S., Conzelmann KK., Schlee M., Endres S., Hartmann G. (2006) 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science* 314:994.

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E,

Fitzgerald KA. (2009) AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**:514.

Huggins JW, Hsiang CM, Cosgriff TM, Guang MY, Smith JI, Wu ZO, LeDuc JW, Zheng ZM, Meegan JM, Wang QN, et al. (1991) Prospective, Double-Blind, Concurrent, Placebo-Controlled Clinical Trial of Intravenous Ribavirin Therapy of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *J. Inf. Dis.* **164**:1119.

Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. 1. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **147**:258.

Ishikawa H, Barber G.N. (2008) STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling, *Nature* **455**:674.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition. *Ann. Rev. Immunol.* **20**:197.

Jääskeläinen K., Kaukinen P., Minskaya ES., Plyusnina A., Vapalahti O., Elliott RM., Weber F., Vaheri A., Plyusnin A. (2007) Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional and the products inhibit activation of the interferon-beta promoter. *J. Med. Virol.* **79**:1527.

Jonsson CB, Hooper J, Mertz G. (2008) Treatment of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Research* **78**:162.

Khaiboullina, SF., Rizvanov AA., Otteson E., Miyazato A., Maciejewski J., Jeor SS. (2004) Regulation of cellular gene expression in endothelial cells by Sin Nombre and Prospect Hill viruses. *Viral. Immunol.* **17**: 234.

Kirsanovs S, Klempa B, Franke R, Lee MH, Schönrich G, Rang A, Kruger DH. (2010) Genetic reassortment between high-virulent and low-virulent Dobrava-Belgrade virus strains. *Virus Genes* **41**:319.

Klempa, B., Schmidt, H. A., Ulrich, R., Kaluz, S., Labuda, M., Meisel, H., Hjelle, B. & Krüger, D. H. (2003). Genetic interaction between distinct Dobrava hantavirus subtypes in *Apodemus agrarius* and *A. flavicollis* in nature. *J. Virol.* **77**:804.

Klingstrom, J., Stoltz, M., Hardestam, J., Ahlm, C. & Lundkvist, A. (2008). Passive immunization protects cynomolgus macaques against Puumala hantavirus challenge. *Antivir. Ther.* **13**:125.

Kochs G, Haller O. (1999) Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:2082.

Kraus, A. A., Raftery, M. J., Giese, T., Ulrich, R., Zawatzky, R., Hippenstiel, S., Suttorp, N., Krüger, D. H. & Schönrich, G. (2004). Differential antiviral response of endothelial cells after infection with pathogenic and nonpathogenic hantaviruses. *J. Virol.* **78**:6143.

Krüger, D. H., Ulrich, R. & Lundkvist, A. A. (2001). Hantavirus infections and their prevention. *Microbes Infect.* **3**:1129.

Lee, H. K., J. M. Lund, B. Ramanathan, N. Mizushima, and A. Iwasaki. (2007) Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* **315**:1398.

Lee, P. W., Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C. & Yanagihara, R. (1985). Serotypic classification of hantaviruses by indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralization tests. *J. Clin. Microbiol.* **22**:940.

Levine JR, Prescott J, Brown KS, Best SM, Ebihara H, Feldmann H. (2010) Antagonism of type I interferon responses by new world hantaviruses. *J. Virol.* **84**:11790.

Lindenmann (2007) *Nature* **449**:13.

Li, D., Schmaljohn, A. L., Anderson, K. & Schmaljohn, C. S. (1995). Complete nucleotide sequences of the M and S segments of two hantavirus isolates from California: evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 206:973.

Lundkvist, A., Fatouros, A. & Niklasson, B. (1991). Antigenic variation of European haemorrhagic fever with renal syndrome virus strains characterized using bank vole monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 72:2097.

Lundkvist A, Cheng Y, Sjölander KB, Niklasson B, Vaheeri A, Plyusnin A. (1997) Cell culture adaptation of Puumala hantavirus changes the infectivity for its natural reservoir, *Clethrionomys glareolus*, and leads to accumulation of mutants with altered genomic RNA S segment. *J. Virol.* 71:9515.

Mackow, E. R. & Gavrillovskaya, I. N. (2001). Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 256:91.

Matthys V, Gorbunova EE, Gavrillovskaya IN, Pepini T, Mackow ER. (2011) The C-terminal 42 residues of the tula virus gn protein regulate interferon induction. *J. Virol.* 85:4752.

McElroy, A. K., Smith, J. M., Hooper, J. W. & Schmaljohn, C. S. (2004). Andes virus M genome segment is not sufficient to confer the virulence associated with Andes virus in Syrian hamsters. *Virology* 326:130.

Marcus KA, Johann-Liang R, Powers JH. (2005) Ribavirin Trials and Hantavirus – What We Should Not Conclude. *Clinical Infectious Diseases* 40:1550

Marcus PI, Gaccione C. (1989) Interferon induction by viruses. XIX. Vesicular stomatitis virus--New Jersey: high multiplicity passages generate interferon-inducing, defective-interfering particles. *Virology* 171:630.

Mertz GJ, Miedzinski L, Goade D, Pavia AT, Hjelle B, Hansbarger CO, Levy H, Koster FT, Baum K, Lindemulder A, Wang W, Riser L, Fernandez H, Whitley RJ; Collaborative Antiviral Study Group. (2004) Placebo-Controlled, Double-Blind Trial of Intravenous Ribavirin for Treatment of Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome in North America. *Clinical Infectious Diseases* 39:1307.

Oelschlegel R, Krüger DH, Rang A. (2007) Characterization of type I and type II interferon-induced inhibition of Hantaan virus replication in vitro. *Virus Res.* 127:100.

Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H, et al. (2007) Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J. Biol. Chem.* 282:7576.

Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, Kutenko SV, Julkunen I. (2007) IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J. Immunol.* 179:3434.

Randall R.E., Goodbourn S. (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 89:1.

Rang, A., Heider, H., Ulrich, R. & Krüger, D. H. (2006). A novel method for cloning of non-cytolytic viruses. *J. Virol. Meth.* 135:26.

Razzauti, M., Plyusnina, A., Sironen, T., Henttonen, H. & Plyusnin, A. (2009). Analysis of Puumala hantavirus in a bank vole population in northern Finland: evidence for co-circulation of two genetic lineages and frequent reassortment between strains. *J. Gen. Virol.* 90:1923.

Rizvanov, A. A., Khaiboullina, S. F. & St Jeor, S. (2004). Development of reassortant viruses between pathogenic hantavirus strains. *Virology* 327:225.

Rodriguez, L. L., Owens, J. H., Peters, C. J. & Nichol, S. T. (1998). Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 242:99.

Rang A, Bruns M, Heise T, Will H. (2002) Antiviral activity of interferon-alpha against hepatitis B virus can be studied in non-hepatic cells and is independent of MxA. *J. Biol. Chem.* 277:7645.

Rang A, Heider H, Ulrich R, Krüger DH. (2006) A novel method for cloning of non-cytolytic viruses. *J. Virol. Meth.* 135:26.

Rusnak JM, Byrne WR, Chung KN, Gibbs PH, Kim TT, Boudreau EF, Cosgriff T, Pittman P, Kim KY, Erlichman MS, Rezvani DF, Huggins JW. (2009) Experience with intravenous ribavirin in the treatment of hemorrhagic fever with renal syndrome in Korea. *Antiviral Research* 81:68.

Schmaljohn, C. (2009). Vaccines for hantaviruses. *Vaccine* 27:61.

Schmaljohn, C. & Hjelle, B. (1997). Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg. Infect. Dis.* 3:95.

Schönrich, G., Rang, A., Lutteke, N., Raftery, M. J., Charbonnel, N. & Ulrich, R. G. (2008). Hantavirus-induced immunity in rodent reservoirs and humans. *Immunol. Rev.* 225:163.

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

Sidelnikov I. N. & Sivoraksha, G. A. (1990). The participation of histamine and serotonin in the genesis of acute kidney failure in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Urol. Nefrol.* 4:46.

Sidelnikov I. N. & Sivoraksha, G. A. (1996). The histamine and serotonin content in the kidneys of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Urol. Nefrol. (Mosk)*, 4:19.

Sohn, Y. M., Rho, H. O., Park, M. S., Kim, J. S. & Summers, P. L. (2001). Primary humoral immune responses to formalin inactivated hemorrhagic fever with renal syndrome vaccine (Hantavax): consideration of active immunization in South Korea. *Yonsei Med. J.* 42:278.

Spiropoulou, C. F., Albarino, C. G., Ksiazek, T. G. & Rollin, P. E. (2007). Andes and Prospect Hill hantaviruses differ in early induction of interferon although both can downregulate interferon signaling. *J. Virol.* 81:2769.

Sundstrom, J. B., McMullan L. K., Spiropoulou C. F., Hooper W. C., Ansari A. A., Peters C. J., Rollin P. E.. (2001) Hantavirus infection induces the expression of RANTES and IP-10 without causing increased permeability in human lung microvascular endothelial cells. *J. Virol.* 75:6070.

Takeuchi, O., and S. Akira. (2007) Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Rev.* 220:214.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evolution* 24:1596.

Tanaka, N., Kawakami, T. & Taniguchi, T. (1993). Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol. Cell. Biol.* 13:4531.

Taylor SL, Frias-Staheli N, Garcia-Sastre A, Schmaljohn CS. Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin alpha proteins and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced activation of nuclear factor kappa B. *J. Virol.* 2009; 83:1271-9.

Taylor SL, Krempel RL, Schmaljohn CS. Inhibition of TNF-alpha-induced activation of NF-kappaB by hantavirus nucleocapsid proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1171 Suppl. 1:E86-93.

Ulrich, R., Hjelle, B., Pitra, C. & Krüger, D. H. (2002). Emerging viruses: the case 'hantavirus'. *Intervirology* 45:318.

Versteeg GA., Garcia-Sastre A. (2010) Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr. Opin. Microbiol.* 13:508.

Yanagihara, R., Daum, C. A., Lee, P. W., Baek, L. J., Amyx, H. L., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. (1987). Serological survey of Prospect Hill virus infection in indigenous wild rodents in the USA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:42.

Yount JS, Kraus TA, Horvath CM, Moran TM, López CB. (2006) A novel role for viral-defective interfering particles in enhancing dendritic cell maturation. *J. Immunol.* 177:4503.

Zou, Y., Hu, J., Wang, Z. X., Wang, D. M., Yu, C., Zhou, J. Z., Fu, Z. F. & Zhang, Y. Z. (2008). Genetic characterization of hantaviruses isolated from Guizhou, China: evidence for spillover and reassortment in nature. *J. Med. Virol.* 80:1033.

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Detlev H. Krüger für seine konstante und freundliche Unterstützung und stetige konstruktive Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich auch den wissenschaftlichen, technischen und administrativen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für die offen-kollegiale und angenehm-produktive Atmosphäre.

Ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, mit deren Hilfe viele theoretische Ideen auf den Boden einer soliden Datenlage gehoben oder *ad acta* gelegt werden konnten. Besonders erwähnen möchte ich hier Wiebke Handke und Renate Franke, die substanziell und entscheidend die hier dargestellten Arbeiten ermöglicht haben.

Viele wichtige Impulse, Anregungen und nicht zuletzt detaillierte Hilfestellungen gehen zurück auf Alma Adam, Paul Ruben Marali und Lutz Hamann.

Herzlich & inniglich danke ich Astrid, Fabian, Helena, Viktor, meiner Familie und meinen Freunden!

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

9. August 2011

Datum

.....

Unterschrift