Aus dem Institut für Virologie
Medizinisches Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie
Direktor: Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk

Charakterisierung und Funktionsanalyse der Bindungsdomäne für den Kofaktor VP35 der RNA-Polymerase L des Ebola-Virus

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Martina Trunschke, geb. Lobe
aus Rudolstadt/ Thüringen

Marburg/ Lahn, 2007

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2003 bis Juni 2007 am Institut für Virologie des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Infektionsbiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Elke Mühlberger durchgeführt.

Angenommen vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am: 21.12.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. Klaus Lingelbach
Referent: Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl
Koreferent: Frau PD Dr. Elke Mühlberger

Prüfer: Herr Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch
Prüfer: Herr Prof. Dr. Erhard Bremer

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2008

Für meine Mutter,
ohne die nichts möglich gewesen wäre,
und für meinen Mann,
der immer an mich geglaubt hat.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 2

1.1 Filoviren als Pathogen 2
1.1.1 Taxonomie und Epidemiologie der Filoviren 2
1.1.2 Klinik, Pathogenese und Diagnose 5
1.1.3 Prävention und Therapie 6

1.2 Molekularbiologie der Filoviren 6
1.2.1 Morphologie des Virions 6
1.2.2 Genomstruktur 7
1.2.3 Funktionen der viralen Proteine 8
1.2.3.1 Nukleokapsidproteine (NP, VP35, VP30, L) 8
1.2.3.2 Matrixproteine (VP40, VP24) 12
1.2.3.3 Membranprotein (GP) 12
1.2.4 Replikation und Transkription 14
1.2.5 Artifizielles Replikations- und Transkriptionssystem 17
1.2.6 Interaktionen filoviraler Nukleokapsidproteine 17

1.3 Problemstellung dieser Arbeit 19

2 MATERIAL 21

2.1 Geräte 21
2.2 Verbrauchsmaterialien 22
2.3 Chemikalien 22
2.4 Kits und Reagenzien 24
2.5 Puffer und Lösungen 24
2.6 Radioaktiv markierte Substanzen 26
2.7 Enzyme 26
2.8 Antikörper 27
2.9 Größenmarker 27
2.10 Zellkultur und Viren 28
2.10.1 Prokaryotische Zellen 28
2.10.2 Eukaryotische Zellen 28
2.10.3 Viren 29
2.11 Nukleinsäuren 29
2.11.1 Nukleotide 29
2.11.2 Primer 29
2.11.3 Vektoren und Plasmide 30

3 METHODEN 32

3.1 Molekularbiologische Methoden 32
3.1.1 Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 32
3.1.2 *In vitro*-Mutagenese 33
3.1.3 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden 35
3.1.4 Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide (Primer-Annealing) 35
3.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren 36
3.1.5.1 Analytisches DNA-Agarosegel 36
3.1.5.2 Präparatives DNA-Agarosegel 36

3.1.5.3 Polyacrylamid-Gel 37
3.1.6 Reinigung von Nukleinsäuren 37
3.1.6.1 Aufreinigung von DNA über Silica-Säulchen....37
3.1.6.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen 37
3.1.6.3 Phenol/ Chloroform – Extraktion von Nukleinsäuren....38
3.1.6.4 Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol/ Natriumacetat 38
3.1.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen 38
3.1.8 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA....39
3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten in vektorielle DNA....39
3.1.10 Transformation Z-kompetenter *E. coli* 40
3.1.11 Plasmid-DNA Minipräparation (Miniprep) 40
3.1.12 Plasmid-DNA Maxipräparation (Maxiprep) 40
3.1.13 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA (OD-Messung)....40
3.1.14 Sequenzanalyse mit dem Kapillarsequenzer MegaBASE^{TM} 500....41

3.2 Zellbiologische Methoden 42
3.2.1 Kultivierung von Zellen....42
3.2.2 Vaccinia-Virus T7-Expressionssystem 42
3.2.3 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mit FuGENE® 6 42
3.2.4 Isolation exprimierter Proteine durch Zelllyse....43

3.3 Biochemische und immunologische Methoden 43
3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (IFA)....43
3.3.2 *In vitro* Translation 44
3.3.3 Immunpräzipitation....44
3.3.4 Elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung von Proteinen....45
3.3.4.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)....45
3.3.4.2 Coomassie-Färbung....46
3.3.4.3 Elektrotransfer von Proteinen – Western-Blot-Analyse 46
3.3.4.4 BioImager-Analyse 47
3.3.5 Das EBOV-spezifische Replikations- und Transkriptionssystem 47
3.3.5.1 Radioaktiver Aktivitätsnachweis (CAT-Assay) 47
3.3.5.2 Nicht-radioaktiver Aktivitätsnachweis (*Fast*-CAT-Assay) 48
3.3.5.3 Quantifizierung der Firefly-Luziferase (Luz-Assay) 49

4 ERGEBNISSE 52

4.1 Analyse zum Aufbau des Replikationskomplexes des EBOVz....52
4.1.1 Optimierung der Immunfluoreszenz-Analyse....52
4.1.2 Nachweis des EBOVzL über ein Flag-Epitop 52
4.1.3 Interaktionen der viralen Polymerase L mit den Nukleokapsidproteinen NP und VP35....53
4.1.4 Zusammenfassung Kapitel 4.1....54

4.2 Charakterisierung der VP35-Bindungsdomäne auf dem EBOVzL....55
4.2.1 Klonierung N-terminal Flag-markierter L-Deletionsmutanten....55
4.2.2 Ko-Lokalisation von NP, VP35 und den L-Deletionsmutanten (IFA) 57
4.2.3 Interaktionen des VP35 mit L-Deletionsmutanten (Ko-IP) 62
4.2.4 Zusammenfassung Kapitel 4.2....66

4.3 Untersuchungen zur Homo-Oligomerisierung des EBOVzL....67
4.3.1 Klonierung eines HA-Epitops an den N-Terminus des L-Proteins 67
4.3.2 Einfluss der N-terminalen Markierung auf die Polymerase-Aktivität....68
4.3.3 Die Instabilität des EBOVz-L-Proteins bei Einzel-Expression....69
4.3.4 Die Stabilisierung des L-Proteins 70

4.3.5 Die Homo-Oligomerisierung des EBOVzL 71
4.3.6 Zusammenfassung Kapitel 4.3 72

4.4 Die Hemmung des aktiven Polymerasekomplexes 73
4.4.1 Optimierung des Dual-Luziferase Reportergen-Assays 73
4.4.2 Klonierung von L-Peptidfragmenten 75
4.4.3 Analyse der L-Fragmente auf ihre inhibitorische Wirkung 76
4.4.4 Zusammenfassung Kapitel 4.4 79

5 DISKUSSION 81

5.1 Der Aufbau des Replikationskomplexes des EBOVz 81
5.2 Die VP35-Bindungsdomäne des EBOVzL 82
5.3 Die Homo-Oligomerisierung des EBOVzL 85
5.4 Die Hemmung des aktiven Polymerase-Komplexes 86

6 ZUSAMMENFASSUNG 91

7 LITERATURVERZEICHNIS 93

8 ABBILDUNGS-/ TABELLEN- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 101

9 ANHANG 106
Veröffentlichungen, Vorträge, Posterpräsentationen
Verzeichnis der akademischen Lehrer
Curriculum Vitae
Danksagung
Ehrenwörtliche Erklärung

1

EINLEITUNG

1 EINLEITUNG

1.1 Filoviren als Pathogen

1.1.1 Taxonomie und Epidemiologie der Filoviren

Das Ebola-Virus (EBOV) bildet gemeinsam mit dem Marburg-Virus (MARV) die Familie der *Filoviridae*. Diese hochpathogenen Erreger rufen sowohl beim Menschen als auch in Primaten schwere fieberhafte, hämorrhagische Erkrankungen hervor, die mit hohen Letalitätsraten einhergehen. Aufgrund ähnlicher serologischer, biochemischer und molekularer Eigenschaften sowie der fadenförmigen Gestalt wurden EBOV und MARV in einer eigenständigen Virusfamilie zusammengefasst (Kiley, et al., 1982). Unterschiede in Pathogenität, Antigenität und Genomstruktur der EBOV-Isolate führten zur weiteren Unterteilung in die Spezies Zaire ($EBOV_Z$), Sudan ($EBOV_S$), Ivory Coast ($EBOV_{IC}$) und Reston ($EBOV_R$) (Buchmeier, et al., 1983, Cox, et al., 1983, Feldmann and Klenk, 1996)

Die *Filoviridae* werden aufgrund ihrer Genomstruktur (1.2.2) zusammen mit den *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* und *Bornaviridae* in die Ordnung der Mononegavirales eingruppiert (ICTV, 1991). Sequenzanalysen der RNA-Genome haben gezeigt, dass die *Filoviridae* den *Paramyxoviridae* phylogenetisch am nächsten stehen (Mühlberger, et al., 1992, Sanchez, et al., 1992).

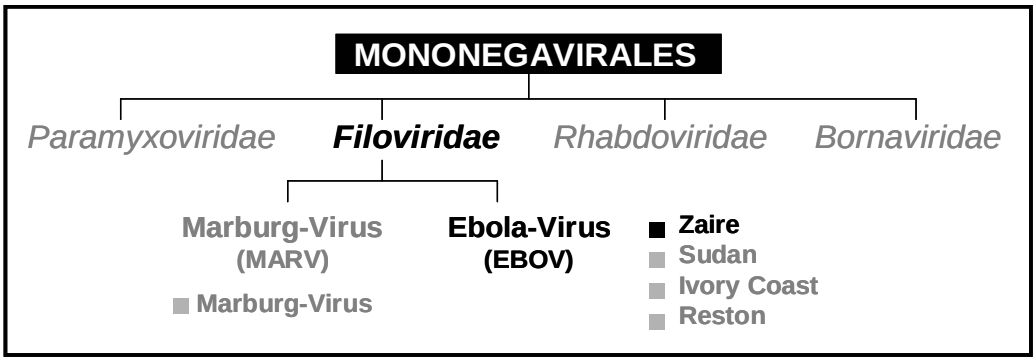


Abb. 1. Taxonomie der Filoviren

Ausbrüche von Filoviren wurden erstmals 1967 dokumentiert als Laborangestellte in Marburg, Frankfurt am Main und Belgrad an schwerem hämorrhagischem Fieber erkrankten, nachdem sie mit infizierten Organen der aus Uganda importierten grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) in Kontakt gekommen waren (Siegert, et al., 1967). Insgesamt wurden 32 Krankheitsfälle registriert. Sieben der 26 primärinfizierten Personen verstarben, während die aufgetretenen Sekundärinfektionen durch einen deutlich milderen Krankheitsverlauf gekennzeichnet waren (Martini, et al., 1968, Slenczka, 1999). Das bis dahin unbekannte Virus wurde nach der Stadt Marburg benannt, in der es erstmals isoliert und morphologisch charakterisiert wurde (Siegert, et al., 1968). Tabelle 1 zeigt alle nach 1967 bekannten Filovirusinfektionen. Nach 1967 wurden Ausbrüche von MARV hervorgerufenem hämorrhagischem Fieber (*Marburg hemorrhagic fever*, MHF) zunächst nur sporadisch in Zimbabwe, Kenia (1980, 1987) und Südafrika beobachtet (Gear, et al., 1975, Johnson, et al., 1996, Smith, et al., 1982). Erst Ende 1998 wurde wiederholt von MARV-Infektionen aus Durba in der Demokratischen Republik Kongo (DRK, ehemals Zaire) berichtet (Bertherat, et al., 1999, WHO, 1999). Die in der Bevölkerung als Durba disease

bekannte Erkrankung schien schon längere Zeit in dieser Region endemisch zu sein, wobei die dokumentierten Fälle auf den Aufenthalt der infizierten Personen in einer nahe gelegenen Goldmine zurückzuführen waren. Der bisher dramatischste Ausbruch des MARV ereignete sich von November 2004 bis Juli 2005 in Uige der Republik Angola, wobei von 374 infizierten Menschen 329 verstarben (WHO, 2005).

Virus	Spezies	Jahr	Ort	humane Krankheitsfälle (Todesfälle)	Letalität	Isolat
Marburg		1967	Deutschland / Jugoslawien	32 (7)	22%	Rataycak / Popp
		1975	Zimbabwe	3 (1)		Ozolin
		1980	Kenia	2 (1)		Musoke
		1987	Kenia	1 (1)		Ravn
		1998-2000	Republik Kongo	154 (128)	83%	?
		2004-2005	Republik Angola	374 (329)	88%	Angola
		2007	Uganda	1 (1)		?
Ebola	***Sudan***	1976	Sudan	*284 (151)*	53%	Boniface
	Zaire	1976	Zaire	*318 (280)*	*88%*	Mayinga
	Zaire	1977	Zaire	1 (1)		Bonduni
	Sudan	1979	Sudan	34 (22)	65%	Maleo
	Reston	1989	USA	4 (0)		Philippines
	Reston	1989-1990	Philippinen	0		Philippines
	Reston	1992	Italien	0		Siena
	Zaire	1994	Gabun	52 (31)	60%	Gabon
	Ivory Coast	1994	Elfenbeinküste	1 (0)		Cote d'Ivoire
	Zaire	1995	Zaire	*315 (243)*	77%	Kikwit
	Zaire	1996	Gabun	37 (21)	57%	Gabon
	Zaire	1996-1997	Gabun	60 (45)	75%	Gabon
	Zaire	1996	Südafrika	2 (1)		?
	Reston	1996	USA	0		Pennsylvania
	Sudan	2000-2001	Uganda	*425 (224)*	53%	?
	Zaire	2001-2002	Gabun/Kongo	122 (96)	79%	?
	Zaire	2002-2003	Republik Kongo	143 (128)	89%	?
	Zaire	2003	Republik Kongo	35 (29)	83%	?
	Sudan	2004	Süd-Sudan	17 (7)	41%	?
	Zaire	2005	Republik Kongo	12 (9)	75%	?
	Zaire	2007	Republik Kongo	25 (?)	***ongoing***	***ongoing***

Tab. 1. Ausbrüche von Filovirusinfektionen.
In Anlehnung an CDC, 1996; Feldmann et al., 1996a; WHO 1978a, 1978b, 1992, 1996, 1997, 1999, 2000, 2001, 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 2005a, 2005b, 2007.

Das durch das EBOV hervorgerufene hämorrhagische Fieber (*Ebola hemorrhagic fever*, EHF) trat weitaus häufiger auf (Tab. 1). Der Erreger wurde 1976 anlässlich zweier annähernd zeitgleicher, aber voneinander unabhängiger Ausbrüche in Zaire und im Sudan erstmals beschrieben. Die Benennung des Virus erfolgte nach einem Fluss in der Republik Kongo (früher Zaire), der in der Nähe der Endemiegebiete verläuft (Johnson, et al., 1977). Über 600 Menschen wurden infiziert und die Letalitätsraten lagen in Zaire bei 88% und in Sudan bei 50%. In den Folgejahren kam es immer wieder zu Ausbrüchen mit hohen Letalitätsraten und verheerenden Ausmaßen in den Jahren 1995 (Spezies Zaire) und 2000/2001 (Spezies Sudan).
Im Jahre 1989 kam es in Reston/Virginia (USA) in einer Quarantänestation zu mehreren Todesfällen von Cynomolgus-Affen der Gattung *Macaca fascicularis*. Die von den Philippinen

importierten Tiere hatten sich vermutlich dort mit dem für Affen hochpathogenen EBOV-Erreger infiziert, der aufgrund genetischer und serologischer Unterschiede zu den bekannten Spezies als EBOV-Reston klassifiziert wurde (Jahrling, et al., 1990). Die durch diese Spezies beim Menschen verursachten Infektionen verliefen trotz hervorgerufener Antikörper-Bildung bislang alle symptomlos (Miranda, et al., 1999).
Nachdem 1994 an der Elfenbeinküste (Ivory Coast) eine Wissenschaftlerin bei der Sektion eines toten Schimpansen an einem schweren hämorrhagischen Fieber erkrankte, wurde schließlich die EBOV-Spezies Ivory Coast isoliert (Formenty, et al., 1999).

Das natürliche Reservoir der Filoviren liegt trotz ausgedehnter Untersuchungen noch immer im Dunkeln. Zwar ist das EHF ein bedeutendes Problem für die Population von Gorillas und Schimpansen in Zentralafrika (Vogel, 2004), doch aufgrund der außerordentlich hohen Pathogenität der Viren können Affen lediglich als Zwischenwirte agieren. Fledermäuse hingegen scheiden das Virus nach Infektion mit dem Kot aus und sind somit eine potentielle Überträgerquelle (Swanepoel, et al., 1996).

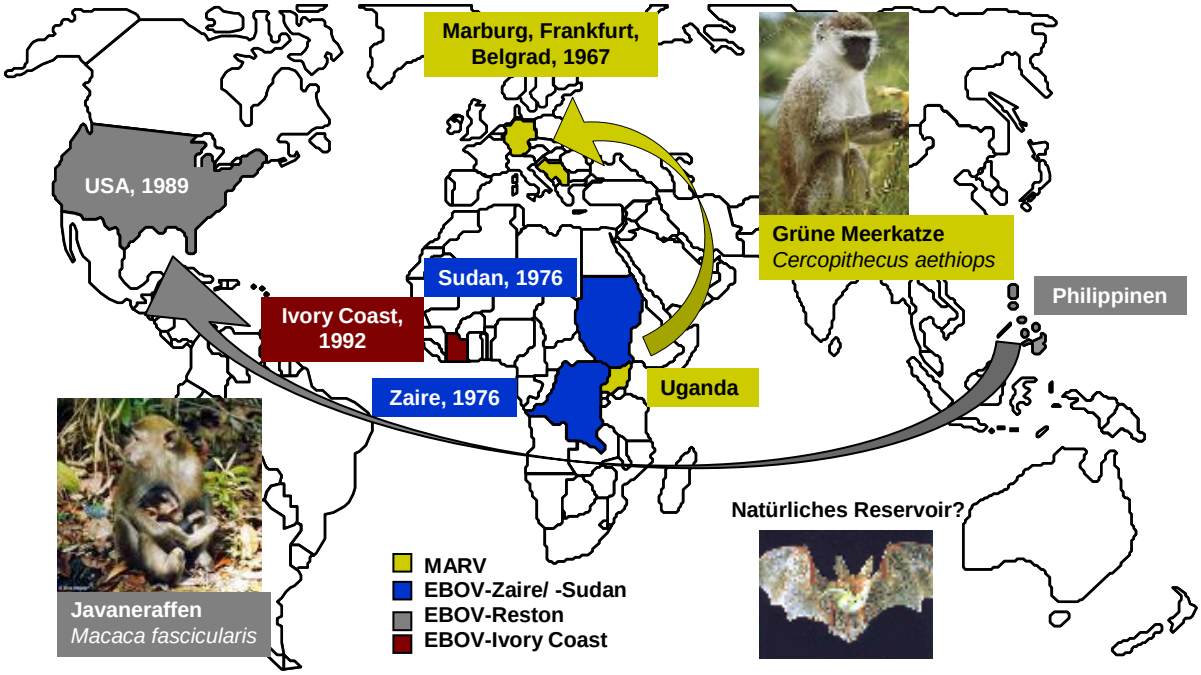


Abb. 2: Herkunft und Erstisolierung des MARV und der EBOV-Spezies

Seroepidemiologische Studien belegten das endemische Vorkommen von Filoviren im zentralafrikanischen Raum, dem sog. Ebola-Gürtel (Sudan, DRK, Kenia und Uganda). Hierbei wurden etwa 10 Prozent der untersuchten Personen in Abwesenheit einer klinischen Symptomatik seropositiv getestet (Becker, et al., 1992, Hughes, et al., 1986, Slenczka, et al., 1968). Ergänzende Untersuchungen wurden im Jahre 1996 während des EBOV-Ausbruchs in Gabun durchgeführt, wobei das Vorkommen asymptomatisch verlaufender Filovirusinfektionen bestätigt wurde (Baize, et al., 1999, Leroy, et al., 2000). Auch in den USA, Deutschland und auf den Philippinen gelang der Nachweis Filovirus-spezifischer Antikörper bei Personen, die nie Symptome einer solchen Erkrankung hatten. Daher ist nicht auszuschließen, dass Filoviren geringerer Pathogenität weltweit kursieren, sollte es sich nicht um serologische Kreuzreaktionen mit anderen Vertretern der Mononegavirales handeln (Becker, et al., 1992).

Die Übertragung von Filoviren erfolgt hauptsächlich über Körperflüssigkeiten (Blut, Speichel, Sperma) infizierter Personen oder Affen (Dowell, et al., 1999), aber auch Tröpfchen- und Aerosolinfektionen, obwohl unwahrscheinlich, können nicht ausgeschlossen werden (Leffel and Reed, 2004, Roels, et al., 1999).

1.1.2 Klinik, Pathogenese und Diagnose

Filoviren rufen in Menschen und nicht-humanen Primaten ein schweres hämorrhagisches Fieber hervor. Beim Menschen beginnt die Erkrankung abrupt nach einer Inkubationszeit von vier bis sieben Tagen mit einem grippe-ähnlichen Erscheinungsbild: Fieber, Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schüttelfrost, Muskel- und Gliederschmerzen. Diesen Anzeichen folgen sehr rasch gastrointestinale Beschwerden mit Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen. Kurz darauf verschlechtert sich der Zustand des Patienten rapide und neben hohem Fieber, Verwirrtheitszuständen bis hin zur Bewusstlosigkeit und starker Dehydrierung treten Petechien und konjunktivale Einblutungen auf. Der Tod tritt bei fatalem Verlauf der Infektionskrankheit etwa ein bis zwei Wochen nach Krankheitsbeginn ein und ist durch schwere Hämorrhagien, Verbrauchskoagulopathie, hypovolämischen Schock sowie Multiorganversagen gekennzeichnet (Bwaka, et al., 1999, Mahanty and Bray, 2004, Peters and Khan, 1999).
Die Zellen des monozytären Phagozytensystems (MPS) sind primäres Ziel für die Filovirus-Replikation (Ryabchikova, et al., 1996, Ryabchikova, et al., 1996). Die weitere Ausbreitung erfolgt über das Blutgefäß- und das Lymphsystem, wobei infizierte Monozyten und Makrophagen als Vehikel fungieren (Feldmann, et al., 1996, Ströher, et al., 2001). Pathohistologisch finden sich vor allem ausgeprägte Nekrosen in Leber, Milz und Lymphknoten (Peters, 1996). Die im Spätstadium der Erkrankung auftretenden schweren Hämorrhagien sowie das Schocksyndrom resultieren aus einer massiven vaskulären Instabilität des Endothels. Die Erhöhung der Endothelpermeabilität ist möglicherweise auf die infektionsbedingte Zerstörung der Endothelzellen bzw. die veränderte Zytokinfreisetzung zurückzuführen (Feldmann, et al., 1996, Schnittler, et al., 1993). Die Ausschüttung des Tumornekrosefaktors α (TNFα) durch infizierte Makrophagen wird als mögliche Ursache für die Schocksymptomatik diskutiert (Villinger, et al., 1999). Die immunsupprimierende Wirkung des VP35 und dessen Fähigkeit die Interferon-I- (IFN-I) Antwort der infizierten Zellen zu inhibieren, wurde bisher nur in Zellkultur nachgewiesen (Basler, et al., 2003), weshalb noch ungeklärt ist, ob und inwieweit VP35 den rasanten und fatalen Verlauf einer Filovirusinfektion beeinflusst.
Aufgrund der uncharakteristischen Symptomatik viraler hämorrhagischer Fieber (VHF) ist eine Differenzialdiagnose anhand der klinischen Symptome nicht möglich. Daher erfolgt die endgültige Identifizierung durch den Nachweis des Erregers (Virusisolierung aus dem Serum mit anschließender Anzucht in Nierenzelllinien) bzw. seiner Bestandteile oder durch den Nachweis spezifischer Antikörper. Die RT-PCR ermöglicht den Nachweis der viralen Nukleinsäure in der akuten Phase (Sanchez, et al., 1999, Weidmann, et al., 2004). Alternativ kann der Nachweis elektronenmikroskopisch oder mit ELISA- und Immunfluoreszenztests erbracht werden.

1.1.3 Prävention und Therapie

Bisher ist weder ein Impfstoff zur Prävention noch eine spezifische antivirale Therapie verfügbar. Allerdings kann eine Ausbreitung durch geeignete Eindämmungs- und Quarantäneprozeduren verhindert oder zumindest stark eingeschränkt werden. Die Behandlung erfolgt symptombezogen, wobei eine intensivmedizinische Therapie des hämorrhagischen Schocks und der Verbrauchskoagulopathie im Vordergrund stehen.
Die Suche nach Impfstoffen und Therapeutika wird nicht nur durch die hohen Sicherheitsstandards erschwert, sondern auch durch die Diskrepanz der Wirksamkeit in unterschiedlichen Tiermodellen. Derzeit stellen Meerschweinchen und nicht-menschliche Primaten die am besten geeigneten Tiermodelle dar, da sie der Erkrankung beim Menschen in ihrem Infektionsverlauf sowie der Pathogenese stark ähneln. Zur Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes wurden bereits verschiedene Methoden eingesetzt, darunter klassische Verfahren wie attenuierte Viren, rekombinante Viren sowie virale Untereinheiten z.B. Replikons oder virusähnliche Partikel (VLP) (Jones, et al., 2005, Sullivan, et al., 2003, Vanderzanden, et al., 1998, Warfield, et al., 2005). Die erste EBOV-Vakzine, die einen vollständigen Schutz für nicht-menschliche Primaten bot, basierte auf humanen Adenovirus 5 Vektoren, die für das ebolavirale Glycoprotein (GP) bzw. das Nukleoprotein (NP) kodierten (Sullivan, et al., 2003). Der Schutz vor einer MARV-Infektion gelang bei Grünen Meerkatzen *(Cercopithecus aethiops)* durch Gabe eines Alphavirus-Replikons (Hevey, et al., 1998). Allerdings bieten weder Adenovirus-Vektoren noch Alphavirus-Replikons einen Schutz gegen beide, EBOV und MARV. Die Vakzinierung gegen EBOV und MARV gelang schließlich im Cynomolgus-Affen-Model *(Macaca fascicularis)* durch attenuierte, rekombinante vesikuläre Stomatitis-Viren (rVSV), die das GP von EBOV bzw. MARV exprimieren (Jones, et al., 2005). Die ideale Filovirus-Vakzine, die vor allen vier EBOV-Spezies und MARV schützt, ist jedoch noch nicht gefunden.
Aufgrund der hohen Mortalität und der fehlenden Behandlungs- und Vakzinierungsmöglichkeiten wurden Filoviren als Erreger der biologischen Sicherheitsstufe S4 (laboratory biosafety level 4, BSL4) eingestuft.

1.2 Molekularbiologie der Filoviren

1.2.1 Morphologie des Virions

Im Elektronenmikroskop können Marburg- und Ebolaviren anhand ihrer durchschnittlichen Partikellänge sowie der strukturellen Unterschiede in den viralen Einschlüssen voneinander differenziert werden, wobei die einzelnen EBOV-Spezies nicht zu unterscheiden sind (Geisbert and Jahrling, 1995). Die zumeist fadenförmige Erscheinung hat den Filoviren ihren Namen gegeben (*filum*, lat.: Faden) (Kiley, et al., 1982). Die Gestalt ist pleomorph, die Virionen präsentieren sich langgestreckt, verzweigt, zirkulär oder „6“-förmig, bei einer variierenden Länge von durchschnittlich 665 nm (MARV) bzw. 805 nm (EBOV) (Slenczka, 1999) und einem konstanten Durchmesser von etwa 80 nm (Abb. 3).
Im Inneren des Virions befindet sich das Nukleokapsid, das sich strukturell in einen zentral gelegenen axialen Kanal von 19-25 nm Durchmesser (Feldmann and Klenk, 1996) und eine helikale Schicht von 45-50 nm gliedert. Das helikale Nukleokapsid besteht aus der viralen RNA, die von NP, dem Nukleoprotein, dicht enkapsidiert ist, sowie den viralen Proteinen VP35 und VP30 und der viralen Polymerase L (Elliott, et al., 1985). Die dichte Verpackung

verleiht der Nukleinsäure Resistenz gegenüber Nukleaseverdau. Die vier Nukleokapsidproteine sind an der Replikation und Transkription des viralen Genoms beteiligt (Boehmann, et al., 2005, Mühlberger, et al., 1998, Mühlberger, et al., 1999). Umgeben ist das Nukleokapsid von einer Hüllmembran, die das Virus beim Knospungsvorgang von der Wirtszelle erhält. Das einzige viruskodierte Oberflächenprotein GP ist als Homotrimer in die Lipidmembran inseriert und erscheint als globuläre Struktur (Volchkov, et al., 1998). Zwischen Hüllmembran und Nukleokapsid liegen die beiden Matrixproteine VP40 und VP24 (Dessen, et al., 2000, Han, et al., 2003).

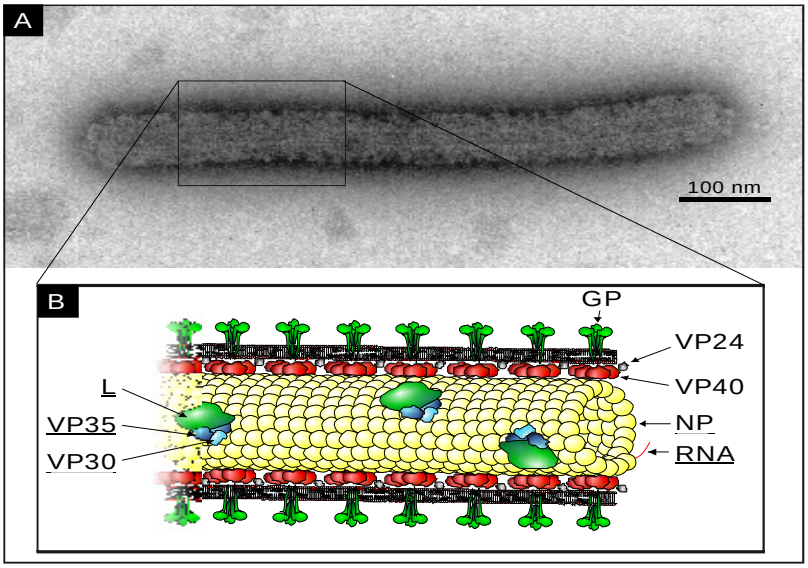


Abb. 3. Morphologie eines Filoviruspartikels. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBOV-Virions (aufgenommen von Frau Dr. Larissa Kolesnikova) in 50.000-facher Vergrößerung. Die innere Elektronendichte stellt das Nukleokapsid dar, die äußere die Hüllmembran mit ein- bzw. angelagerten Proteinen. (B) Schematische Interpretation der Virusstruktur. Die einzelnen Komponenten sind weder stöchiometrisch noch im richtigen Größenverhältnis dargestellt.

1.2.2 Genomstruktur

Wie alle Vertreter der Ordnung Mononegavirales besitzen Filoviren ein einzelsträngiges, nicht-segmentiertes RNA-Genom in negativer Orientierung; die virale RNA ist somit nicht infektiös (Kiley, et al., 1982). Die Genomlänge beträgt etwa 19 kb ($EBOV_Z$: 18.959 nts, MARV: 19.111 nts), womit die Filoviren das längste Genom innerhalb der Ordnung besitzen. Am 3'- und 5'-Ende befinden sich kurze, nicht-transkribierte Regionen, die als *leader* bzw. *trailer* bezeichnet werden (Kiley, et al., 1986). In diesen Bereichen sind cis-aktive Signale für den Replikationsstart, die Transkriptionsinitiation und die Verpackung der replizierten RNA enthalten (Mühlberger, et al., 1998, Mühlberger, et al., 1999). Für beide Sequenzbereiche sind stabile Sekundärstrukturen vorhergesagt (Sanchez, et al., 1989, Volchkov, et al., 1999). Das Genom weist sieben offene Leserahmen (ORFs) in linearer Anordnung auf: 3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5', die von ungewöhnlich langen (57 bis 684 nts) nicht-translatierten Regionen (NTRs) mit bisher noch unbekannter Funktion flankiert sind. Die Filoviren kodieren für sieben Strukturproteine, wobei EBOV ein zusätzliches lösliches GP (sGP) synthetisiert. sGP wird nicht in die Viruspartikel integriert, jedoch von infizierten Zellen sekretiert.

Die einzelnen Gene sind durch hoch konservierte Transkriptionsstart- (TSS) und -stoppsignale (TStpS) begrenzt (Mühlberger, et al., 1996). Die meisten Gene sind durch kurze intergenische Regionen (IR) getrennt, die aus 4-7 nicht-konservierten Nukleotiden bestehen. Längere IRs finden sich nur zwischen GP und VP30 (MARV) und zwischen VP30 und VP24 (EBOV-Spezies). Zudem finden sich Genüberlappungen, die bei den einzelnen Filoviren

unterschiedlich lokalisiert sind (Abb. 4); die Überlappungen beschränken sich dabei auf fünf hoch konservierte Nukleotide „UAAUU“ der TSS (Feldmann, et al., 1992, Sanchez, et al., 1993).
Die Ausbildung von Sekundärstrukturen im Bereich der TSS auf mRNA-Ebene wurde 1996 durch Computeranalysen vorhergesagt (Feldmann, et al., 1992, Sanchez, et al., 1993) und mit leichten Modifikationen 2002 für das TSS des NP-Gens von EBOV experimentell bestätigt (Weik, et al., 2002). Ob derartige Strukturen auch auf der umhüllten vRNA zu finden sind, ist noch ungeklärt.

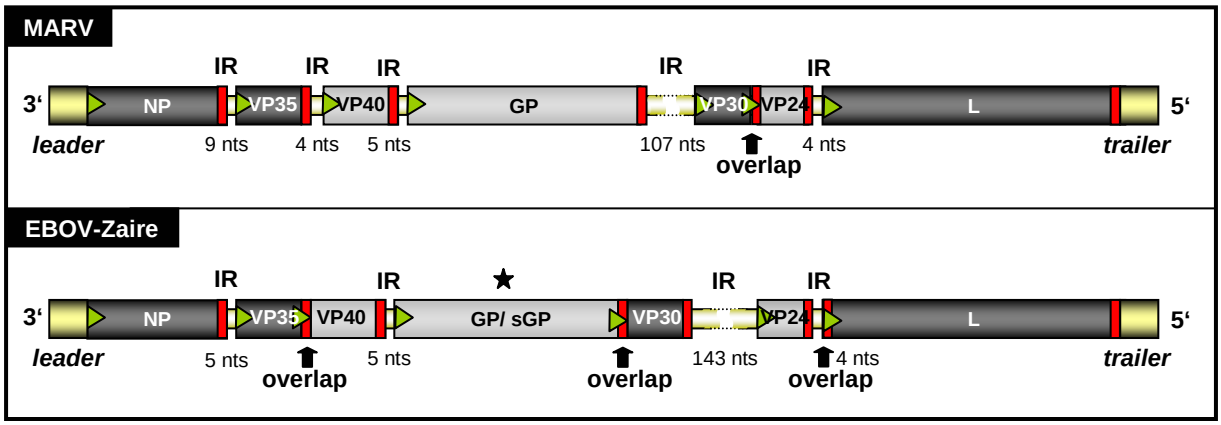


Abb. 4. Genomorganisation von MARV und EBOV. Beide Genome bestehen aus etwa 19 kb einzelsträngiger RNA in negativer Orientierung. Flankiert werden die Gene (grau) von nicht-kodierenden Sequenzen (gelb). Die Längen der in ihrer Sequenz variablen intergenischen Regionen (IR) sind unterhalb der Graphik angegeben. Genüberlappungen sind durch Pfeile markiert. Am 3’-Ende befindet sich die sog. *leader*-, am 5’-Ende die *trailer*-Sequenz. Gene, die für die Nukleokapsidproteine (NP, VP35, VP30, L) kodieren, sind dunkelgrau dargestellt. Die Transkriptionsstart-Signale (TSS) sind als grüne Dreiecke, die Transkriptionsstopp-Signale (TstpS) als rote Balken angezeigt. Beachte die zwei getrennten TstpS des EBOV VP24. Eine weitere Besonderheit ist das Gen des Oberflächenproteins GP des EBOV, das primär als lösliches sGP sezerniert wird, und nur nach transkriptionellem Editing als membraninseriertes strukturelles GP vorliegt. Die „mRNA editing site“ innerhalb des GP-Gens ist durch einen Stern angezeigt.

1.2.3 Funktionen der viralen Proteine

1.2.3.1 Nukleokapsidproteine (NP, VP35, VP30, L)

Die vier Nukleokapsidproteine NP, VP35, VP30 und L bilden als strukturelle Komponenten zusammen mit der viralen RNA den Ribonukleoprotein- (RNP) Komplex. Darüber hinaus katalysieren sie Replikation und Transkription des viralen Genoms (1.2.4).

Das **Nukleoprotein NP** stellt die Hauptkomponente des Nukleokapsidkomplexes (NC) dar; es umhüllt die RNA vollständig. Es gliedert sich in einen hydrophoben N-Terminus, der die Interaktion mit der RNA ermöglicht und einen hydrophilen, sauren C-Terminus, der für die Wechselwirkung mit anderen NC-Proteinen verantwortlich ist (Weik, et al., 2002). NP wird phosphoryliert (Becker, et al., 1994), O-glycosyliert sowie sialyliert (Huang, et al., 2002). Die Phosphorylierung ist möglicherweise die Voraussetzung für die Interaktion mit der viralen RNA und wäre somit essentiell für die Bildung des NCs. Dies würde auch erklären, weshalb die nicht-phosphorylierte Form des NP in Virionen nicht vorkommt. Der Prozess des Filovirus-Zusammenbaus hingegen wird durch die O-Glycosylierung und Sialylierung des NP

reguliert. Die Modifikationen erlauben die Interaktion des NP mit den gleichzeitig exprimierten Virion-assoziierten Proteinen VP35 und VP24 (Huang, et al., 2002). Das „self assembly“ erfolgt über eine im N-terminalen Bereich gelegene Bindungsdomäne, die die ersten 450 Aminosäuren (AS) umfasst. Für die Formierung nukleokapsid-ähnlicher Strukturen werden weitere 150 benachbarte AS und die Proteine VP35 und VP24 benötigt (Watanabe, et al., 2006). Darüber hinaus ist das NP am Knospungsprozess beteiligt. Zusammen mit GP und VP24 verstärkt es die Freisetzung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs, 1.2.3.2). Dabei interagiert NP über die C-terminalen 50 AS mit VP40 (Licata, et al., 2004).

VP35 ist das Analogon zu dem Phosphoprotein P der *Paramyxo*- und *Rhabdoviridae*, obwohl es im Gegensatz zu diesen nur sehr schwach phosphoryliert ist. Es fungiert als Kofaktor der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Mühlberger, et al., 1999) und ferner als Typ I Interferon (IFN I) Antagonist in Virus-infizierten Zellen. Die Inhibition der IFN I-Antwort basiert auf der Blockade der Doppelstrang (ds)-RNA- und Virus-vermittelten Induktion des IFN-β Promotors (Basler, et al., 2000) durch Hemmung der Aktivierung des IFN-regulierenden Faktors 3 (IRF-3). Dabei wird die Phosphorylierung des IRF-3 verhindert, sodass weder die Dimerisierung noch die nukleäre Translokation stattfinden können. IRF-3 ist ein zellulärer Transkriptionsfaktor mit zentraler Bedeutung in der Initiierung der IFN-Antwort (Basler, et al., 2003).

Das **VP30** wurde lange Zeit als Phosphoprotein-Analogon anderer Mononegavirales angesehen, da es stark phosphoryliert und mit dem RNP-Komplex assoziiert ist (Elliott, et al., 1985). Dies wurde jedoch widerlegt, als für MARV gezeigt werden konnte, dass minigenomische RNA ohne VP30 repliziert und transkribiert werden kann (Mühlberger, et al., 1998). Ein viertes Nukleokapsidprotein (M2-Protein) besitzen innerhalb der Ordnung der Mononegavirales nur noch die Pneumovirinae (Garcia, et al., 1993, Huang, et al., 1985). Für das M2-Protein des Respiratorischen Synzytialvirus (RSV), einem Pneumovirus, konnten Collins et al. (1996) zeigen, dass es sich dabei um einen Antiterminationsfaktor der Transkription handelt. Die Funktion des MARV VP30 blieb hingegen weiterhin unbekannt. Anders im Falle des EBOV, wo Transkription nicht ohne VP30 erfolgt (Mühlberger, et al., 1999). Die Funktion des VP30 als Transkriptionsaktivator ist abhängig von der Bildung einer RNA-Sekundärstruktur („stem-loop“) am TSS des ersten Gens. Wird diese zerstört, erfolgt die Transkription VP30-unabhängig. Die VP30-abhängige Transkriptionsinitiation am ersten Gen ist erforderlich für die Transkription aller weiteren Gene, die der Anwesenheit von VP30 nicht bedürfen. Bemerkenswert ist, dass die „stem-loop“ Struktur autonom und unabhängig von ihrer Lokalisation auf dem RNA-Genom agieren kann (Weik, et al., 2002). Die Phosphorylierung (6 Serine, 1 Threonin) des VP30 beeinflusst die Transkriptionsaktivierung negativ; die Bindung an NP wird positiv reguliert (Serine 40, 42) (Modrof, et al., 2001, Modrof, et al., 2002). Die VP30-Proteine von MARV und EBOV zeigen beide ein Zink-Bindungsmotiv, welches bei MARV nicht näher charakterisiert ist. Bei EBOV ist es wichtig für die Aktivierung der viralen Transkription; die Bindung des VP30 zu NC-ähnlichen Strukturen wird nicht beeinflusst (Modrof, et al., 2003). Darüber hinaus ist die Transkriptionsaktivierung von der Homo-Oligomerisierung des VP30 abhängig. Die Domäne für das Self-Assembly umfasst die AS 94-112 und enthält ein Cluster von 4-Leucin-Resten (Hartlieb et al., 2003). Kristallographische Untersuchungen zeigten, dass die Faltung des VP30 in eine dimere, helikale Anordnung über eine C-terminale Domäne (CTD) erfolgt und der Oligomerisierung

vorausgeht. VP30-Dimere bilden über die N-terminale Oligomerisierungsdomäne (NTD) Hexamere, die in Virionen eingebaut werden. Bei der Replikation beschränkt sich die Rolle des EBOV VP30 auf die Stabilisierung naszierender mRNA (Hartlieb, et al., 2007).

Das **L**-Protein (L=large) ist die katalytische Untereinheit der virus-eigenen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp), die mit VP35 als Kofaktor den aktiven Polymerasekomplex bildet. Diese multifunktionelle Polymerase vermittelt über ihre Assoziation mit dem RNP-Komplex die Transkription in virus-spezifische mRNA-Spezies und die Replikation der gesamten genomischen RNA. Neben (i) Transkription und Replikation katalysiert die Polymerase auch (ii) das mRNA Capping, (iii) die Methylierung der 5' Cap-Struktur sowie (iv) die Polyadenylierung.
Die Aufklärung der Funktionen des L-Proteins sowie des Transkriptions-/ Replikations-Mechanismus basierte zunächst auf vergleichenden Sequenzanalysen mit bereits besser analysierten NNS RNA-Viren. Die Vergleiche der L-Gene haben gezeigt, dass die *Filoviridae* eine größere phylogenetische Verwandtschaft zu den *Paramyxoviridae* haben als zu den *Rhabdoviridae*. Innerhalb der *Filoviridae* weist die Sequenz des L-Proteins des EBOVz eine Homologie von 73% zur Spezies Sudan, aber nur 44% zu MARV auf. Die Isolate innerhalb des MARV (Musoke; Popp) hingegen zeigen eine Übereinstimmung zu 96%. Dies bestätigt die Daten der Sequenzvergleiche anderer filoviraler Gene und die Einteilung der *Filoviridae* in zwei Genera, MARV und EBOV, mit der Unterteilung des EBOV in vier Spezies (Feldmann and Kiley, 1999, Sanchez, et al., 1996, Volchkov, et al., 1997).
Das L-Gen des EBOV besitzt eine Länge von 6782 nts (Position auf dem Genom: 11500-18281) und mehrere Methionin-Codons innerhalb der ersten 500 nts, die als potenzielle Translationsinitiatoren wirken können. Das am weitesten *upstream* gelegene $ATG_{85\text{-}87}$, das an Position 18216-18218 unterbrochen wird, initiiert den offenen Leserahmen (ORF) von 6639 nts. Das Transkriptionsstart-Signal 5'-GGAGGAAGATTAA liegt am 5'-Ende der mRNA und enthält einen nicht-genomischen Guanosinrest (unterstrichen), der vermutlich die CAP-Struktur der mRNA des L repräsentiert (Volchkov, et al., 1999). Zunächst existierte nur ein indirekter Nachweis für das Capping, wobei die Hemmung der EBOV-Replikation in Anwesenheit eines Inhibitors der S-Adenosylhomocystein-Hydrolase demonstriert wurde (Huggins, et al., 1999). Später gelang durch die Präzipitation der VP40 mRNA mit einem Anti-Cap Antikörper (AK) der direkte Nachweis für das Capping EBOV-spezifischer mRNAs. Dadurch konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass die in die Bildung der Sekundärstrukturen involvierten Transkriptionsstart-Signale nicht in eine Cap-unabhängige Translation involviert sind, wie es den sog. internen Ribosomeneintrittsstellen (IRES) zugeschrieben wird (Weik, et al., 2002). Die Sequenz 5'-ATTAAGAAAAA(A) liegt innerhalb des viralen Genoms in siebenfacher Wiederholung vor und repräsentiert das Transkriptionsstopp-Signal am 3'-Ende der viralen mRNA. Einzig das Transkriptionsstopp-Signal des L-Proteins 5'-ATTA***TA***AAAAA weist in diesem hoch konservierten Bereich eine Abweichung (fett, kursiv) auf (Tab. 2).

Gen	Transkriptions – Start (mRNA 5' → 3')	Transkriptions-Stopp (mRNA 5' → 3')
NP	GA***G***GAAGATTAA	ATTAAGAAAAA**A**
VP35	GATGAAGATTAA	ATTAAGAAAAA
VP40	GATGAAGATTAA	ATTAAGAAAAA**A**
GP	GATGAAGATTAA	ATTAAGAAAAA
VP30	GATGAAGATTAA	ATTAAGAAAAA
VP24	GATGAAGATTAA	1) ATTAAGAAAAA 2) ATTAAGAAAAA**A**
L	GA***G***GAAGATTAA	ATTA***TA***AAAAA

Tab. 2. Transkriptionssignale des EBOV. Die Sequenzen (mRNA) der Transkriptionsstart- und -stopp-(Polyadenylierung) Signale des EBOV sind hoch konserviert und enthalten alle die Sequenz 5'-ATTAA (unterstrichen). Abweichungen innerhalb des konservierten Bereiches sind fett, kursiv dargestellt. Zusätzliche Adenosinreste (NP, VP40, V24) sind fett markiert.

Die Transkriptionsstart- und -stopp- (Polyadenylierung) Signale des EBOV sind hoch konserviert und enthalten alle, mit Ausnahme des Transkriptionsstopp-Signals des L-Proteins, die Sequenz 5'-ATTAA (mRNA). Sie stellen ein gemeinsames Merkmal der NNS RNA-Viren dar. Die mRNA des L-Proteins besitzt einen 5'-untranslatierten Bereich von 80 nts und einen 3'-untranslatierten Bereich von 63 nts.

Das 2212 AS umfassende L-Protein des EBOV hat ein MG von 253 kDa (kalkuliert) bzw. 220 kDa (SDS-PAGE-Analyse) (Volchkov, et al., 1999), was in Übereinstimmung mit dem MARV (267 kDa) (Mühlberger, et al., 1992) und anderen RdRp's der *Paramyxoviridae und Rhabdoviridae* (242-256 kDa) ist (Elliott, et al., 1985, Kiley, et al., 1988). Darüber hinaus wurden für das L-Protein verschiedene Merkmale identifiziert die den L-Proteinen der NNS RNA-Viren eigen sind: (i) hoher (Iso-) Leucin-Gehalt (Dayhoff, et al., 1978)), (ii) große positive Nettoladung bei neutralem pH-Wert mit (iii) Clustern basischer AS wie sie in verschiedenen RNA-Bindeproteinen gefunden werden (Lazinski, et al., 1989).

Für die verschiedenen enzymatischen Funktionen des L-Proteins sind konservierte lineare Domänen von Bedeutung (Poch, et al., 1990). Die Verteilung der homologen Regionen auf dem filoviralen L-Protein hat drei Bereiche mit größeren Abweichungen offenbart: den N-Terminus (ersten 350AS), den C-Terminus (letzten 210AS) und AS 1649-1800 (Abb. 5).

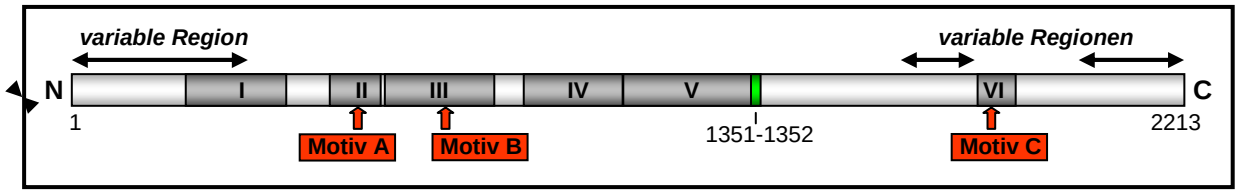


Abb. 5. Schematische Darstellung der Struktur des L-Proteins des EBOV. Dargestellt sind drei variable Regionen: die ersten 350 AS des N-Terminus, die letzten 210 AS des C-Terminus und AS 1649-1800 (Doppelpfeile). Die sechs konservierten Bereiche (Block I-VI) sind als dunkelgraue Boxen gekennzeichnet und die drei Polymerase-Motive (Motiv A-C) mittels roter Blockpfeile markiert. Die Position der paarigen Cysteinreste (grüner Balken) ist unterhalb des 2213 AS umfassenden L-Proteins (hellgrau) angezeigt.

Darüber hinaus finden sich sechs konservierte Bereiche (Block I-VI) sowie drei Polymerase-Motive (A-C), die zunächst für die NNS Viren (Poch, et al., 1990) beschrieben wurden. Es folgte der Nachweis für das L-Protein des MARV (Mühlberger, et al., 1992) und des EBOV (Volchkov, et al., 1999). Die Polymerase-Motive enthalten: (i) ein RNA-Bindemotiv (Motiv A, AS 553-571), (ii) eine mögliche RNA-Erkennungsstelle und/ oder eine Domäne zur Bildung einer Phosphodiester-Bindung (Motiv B, AS 738-744), sowie (iii) eine ATP-Bindedomäne (Motiv C, AS 1815-1841). Weiterhin wurden zwei hoch konservierte paarige Cysteinreste an Position 1351-1352 aller L-Proteine gefunden, die möglicherweise die Sekundärstruktur des

L-Proteins stabilisieren und damit für die Konformation des Proteins wichtig sind (Blumberg, et al., 1988, Mühlberger, et al., 1992).

1.2.3.2 Matrixproteine (VP40, VP24)

Die beiden Matrixproteine VP40 und VP24 sind im Raum zwischen Nukleokapsid und Hüllmembran lokalisiert. Beide Proteine sind mit der Lipidmembran assoziiert; VP24 assoziiert zusätzlich mit dem RNP-Komplex (Elliott, et al., 1985).

VP40 stellt das Analogon zu den M-Proteinen anderer NNS-RNA Viren dar. Das VP40 ist beteiligt an der Ausbildung und Knospung von virus-ähnlichen Partikeln (VLPs). Es besteht aus zwei Domänen mit gleicher Faltung (β-Sandwich Strukturen), die vermutlich durch Gen-Dublikationen generiert werden. Die C-terminale Domäne (CTD) vermittelt mit ihren hydrophoben Bereichen die Bindung an die Lipidmembran, vorzugsweise an negativ geladene Phospholipide (Ruigrok, et al., 2000). Nach Trypsin-Spaltung an Lysin 212 dissoziiert die CTD ab, die N-terminale Domäne (NTD) hingegen bleibt Membran-assoziiert. Durch die Interaktion der NTD mit dem C-Terminus des viralen, transmembranären GP wird VP40 zu Hexameren vernetzt (Garoff, et al., 1998). Die Bildung solcher Membran-gebundener Partikel ist abhängig von der Interaktion mit zellulären WW-Domänen tragenden Proteinen. Hierfür besitzt VP40 ein konserviertes N-terminales PPXY-Motiv (Jasenosky, et al., 2001). In vitro finden sich zwei verschiedene Oligomere, ringförmige Hexamere und RNA bindende Oktamere in Poren-ähnlicher Struktur. Die Oktamerisierung des VP40 ist abhängig von der sequenz-spezifischen Bindung von bis zu acht kurzen single-strand (ss) RNAs (Trinukleotide: 5’ U-G-A-3’) im Poreninneren, die zur Stabilisierung der Ringstruktur führen (Gomis-Ruth, et al., 2003). VP40-Oktamere sind essentiell für die virale Replikation, spielen bei der VP40-Knospung als lipid-gebundene VLPs jedoch keine Rolle (Hoenen, et al., 2005).

VP24 ist ein einzigartiges Merkmal der Ordnung Mononegavirales; als zweites Matrixprotein ist es in geringerer Menge in reifen Virionen vorhanden. Es ist beteiligt an (i) der Bildung des viralen NC-Komplexes, (ii) der Ausbildung und Knospung von VLPs, (iii) der Wirtszelldeterminierung und (iv) der Hemmung des IFN-induzierten Signalweges. Für die Bildung des NC-Komplexes sind, neben VP24, die viralen Proteine VP35 und NP notwendig und ausreichend (Huang, et al., 2002). Die Rekrutierung des VP24 in die NC-Strukturen erfolgt über die Interaktion mit NP. Der Transport zur Lipidmembran kann entweder als Ko-transport in diesen NC-Komplexen oder NC-unabhängig erfolgen. Durch die spezifische Inkorporation des VP24 in VP40-induzierte VLPs wird der Knospungsvorgang fortgesetzt (Bamberg, et al., 2005). Für die Funktion viraler Matrixproteine im Knospungsprozess ist neben der Fähigkeit zur Membranbindung die Oligomerisierung wichtig. VP24 oligomerisiert mit präferentieller Bildung von Tetrameren (Han, et al., 2003). Als Pathogenitätsfaktor beeinflusst es die Wirtsadaptation und verhindert die IFN-induzierte Ausbildung des antiviralen-Status (Volchkov, et al., 2000).

1.2.3.3 Membranprotein (GP)

Das **Glykoprotein GP** ist das einzige Oberflächenprotein des Virus, und inseriert als Homotrimer in der Membran. Es handelt sich um ein N- und O-glycosyliertes Typ-I-Trans-membranprotein mit hydrophobem Signalpeptid am N-Terminus und Transmembrananker im

C-terminalen Bereich (Feldmann, et al., 1991, Will, et al., 1993). Eine Besonderheit stellt das EBOV GP (130 kDa) dar, dessen primäres Genprodukt (50-70 kDa) eine verkürzte, lösliche Form des GP (*soluble*, sGP) ist. Es wird in großen Mengen produziert (bis zu 80 % der Transkripte) und stellt das uneditierte mRNA-Produkt dar. Das „transkriptionelle editing", das die beiden Leserahmen ORF1 und ORF2 des GP verbindet, wird durch die EBOV-Polymerase oder durch andere DNA-abhängige RNA-Polymerasen katalysiert (Volchkov, et al., 1995). Dabei wird mittig in eine Abfolge von sieben kodierten Adenosinen ein zusätzliches, nicht kodiertes Adenosin eingefügt (Sanchez, et al., 1996). Durch Glycosylierung wird das precursor GP (preGP) im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi modifiziert. Das reife GP wird durch die Subtilisin-ähnliche Protease Furin in die durch Disulfidbrückenbindung verknüpften Untereinheiten GP1 (140 kDa) und GP2 (26 kDa) gespalten ($preGP_{ER}$ → $preGP_{Golgi}$ → GP → GP1/ 2). Die Verankerung des GP1/2-Komplexes in der Membran erfolgt über die in GP2 gelegene Transmembrandomäne. Nach Abspaltung des N-terminalen Signalpeptides oligomerisiert das Protein, wobei das „GP-spike-assembly" unabhängig von anderen Proteinen erfolgt (Feldmann, et al., 1991, Volchkov, et al., 1998, Will, et al., 1993). Für die Oligomerisierung ist ein in GP2 gelegenes coiled-coil Motiv verantwortlich (Watanabe, et al., 2000). Das GP ist für den Viruseintritt in die Wirtszelle verantwortlich. Die Bindung an einen noch umstrittenen Rezeptor erfolgt über die ersten 150 N-terminalen Aminosäuren des GP1. Die zusätzliche Interaktion mit Adhäsionsmolekülen wie den Typ-C-Lektinen DC-SIGN/R oder dem Asialoglycoprotein-Rezeptor ASGP-R steigert die Infektion (Marzi, et al., 2004). Das GP2 hingegen vermittelt über seine fusionsaktive Konformation (typisch für Klasse-I-Membranfusionsproteine) die Fusion von Virus und Zellmembran (Manicassamy, et al., 2005). Der Prozeß ist pH-abhängig und wird durch endosomale Cathepsine (CatB und CatL) katalysiert, die ein 19 kDa Intermediat des GP generieren, das die Fusion einleitet (Schornberg, et al., 2006). Darüber hinaus weist das GP eine immunsupprimierende Wirkung auf. Über die Mucin-Domäne im GP2 werden Oberflächenproteine mit essentieller Bedeutung für Zell-Zell-Adhäsion und Immunantwort herab reguliert. Die verminderte Expression des mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Effektors ERK2, der Proliferation, Zellzyklus und Survival steuert, führt zur Zellzerstörung. Die verminderte Präsenz von MHC-I-Molekülen hingegen modifiziert die Erkennung durch Immunzellen, EBOV gelingt die Immunflucht (Sullivan, et al., 2005). Die Aktivierung von Endothelzellen und die durch GP1/2 induzierte Verminderung der Barriere-Funktion führen schließlich zu den typischen pathologischen Symptomen während der Virusinfektion (Wahl-Jensen, et al., 2005). Für die Pathogenese der EBOV-Infektion von Bedeutung ist auch die effiziente Blockierung virus-neutralisierender Antikörper durch lösliches GP1. Die Freisetzung von GP1 erfolgt über ein *Ectodomain Shedding* mit proteolytischer Spaltung an AS-Position 637. Bei der beteiligten Sheddase handelt es sich um das *tumor-necrosis factor α converting enzym* (TACE), einem Mitglied der ADAM Familie Zn-abhängiger Metalloproteasen (Dolnik, et al., 2004). Das primäre Transkriptionsprodukt des GP ist noch weitgehend unerforscht. Die posttranslationelle Spaltung an einem multibasischen AS Motiv (AS 321-324) durch Furin oder Furin-ähnliche Endonukleasen führt zur Sekretion des sGP und des Delta-Peptids (Volchkov, 1999).

1.2.4 Replikation und Transkription

Im Zytoplasma der infizierten Zelle finden zwei RNA-synthetisierende Ereignisse statt: Transkription zur Umschrift des Genoms in mRNAs und Replikation zur Vervielfältigung des gesamten Genoms (Abb. 6). Beide Prozesse werden durch eine viruskodierte RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) katalysiert, die das negativ-strängige RNA-Genom als Matrize verwendet. Diese Strategie findet sich bei allen nicht-segmentierten Negativstrang- (NNS) RNA-Viren, wobei für die Filoviren einige einzigartige Merkmale beschrieben wurden (Whelan, et al., 2004).

Nach Infektion der Zelle wird das enkapsidierte negativ-strängige RNA-Genom vom Transkriptionskomplex (Transkriptase) zunächst in sieben monocistronische mRNAs überschrieben, die polyadenyliert sind und eine *Cap*-Struktur aufweisen (Weik, et al., 2002). Der Prozess wird durch den Eintritt der RdRp an einer einzigen Polymerase-Bindungsstelle am 3'-Ende des Genoms initiiert. Einmal gebunden, verbleibt die RdRp an der RNA-Matrize und transkribiert in linearer Abfolge die einzelnen Gene, wobei sie mit der Polyadenylierung am TStpS jedes Gens endet und nach Reinitiation am TSS des nachfolgenden Gens weiterliest. Dieser Mechanismus wird auch als „single-initiation stopp-start model" bezeichnet (Emerson, 1982). Auf diese Weise wird das gesamte Genom abgetastet, wobei intergenische Regionen ohne RNA-Synthese übersprungen werden (Abb. 4). Eine Ablösung der RdRp von der RNA-Matrize unterbricht die Transkription. Dadurch entsteht ein Transkriptionsgradient an synthetisierter mRNA, der von 3' nach 5' abnimmt: NP>VP35>VP40>sGP/GP>VP30>VP24>L (Mühlberger, et al., 1996). Die TSSs und TStpSs, die jedes Gen flankieren, sind hoch konserviert. Das TSS besteht aus 12 Nukleotiden (nts) und variiert nur leicht zwischen MARV (3'-CUUCUU$^{A}/_{G}$UAAUU-5') und EBOV (3'-CU$^{C}/_{A}$CUUCUAAUU-5'). Das TStpS hingegen zeigt die Sequenz 3'-UAAUUC gefolgt von 5 bis 6 Uridin-Resten, die als Matrize für die Synthese des Poly-A-Schwanzes dienen. Die Polyadenylierung der mRNA's erfolgt durch einen sog. *stuttering*-Mechanismus (Whelan, et al., 2004) Ein einzigartiges Merkmal der filoviralen TSSs ist die Bildung stabiler RNA Sekundärstrukturen, deren Funktion noch geklärt werden muss (Mühlberger, et al., 1996, Sanchez, et al., 1993). Üblicherweise werden für die Transkription von NNS RNA-Genomen drei Proteine benötigt: NP, P und L (Conzelmann, 2004). Bei den Filoviren handelt es sich dabei um die homologen Proteine NP, VP35 und L. Die Transkription des EBOV hingegen ist VP30-abhängig und wird über eine RNA-Haarnadelstruktur im Bereich des TSS des NP-Gens reguliert (Weik, et al., 2002). Für die Reinitiation an internen TSS ist VP30 jedoch nicht erforderlich. Eine weitere Besonderheit der ebolaviralen Transkription ist das zu 20% stattfindende Editieren der GP-spezifischen mRNA (Sanchez, et al., 1996)**.**

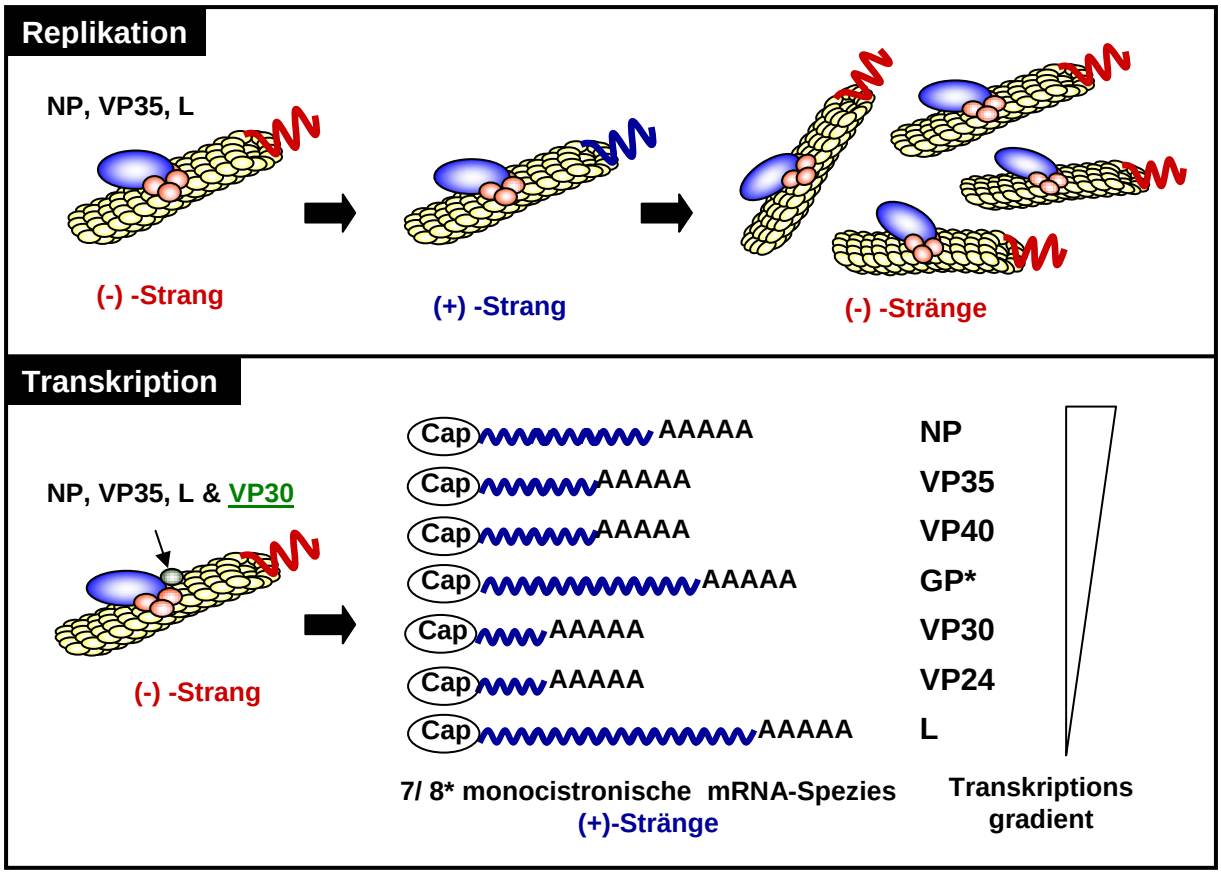


Abb. 6. Replikation und Transkription des EBOVz-Genoms. Die Replikation des negativ-strängigen RNA-Genoms (rot) erfolgt durch die Nukleokapsid- (NC) Proteine NP (gelb), VP35 (orange) und L (blau). Die Vervielfältigung des gesamten Genoms erfolgt über ein komplementäres Antigenom, das als positiv-strängiges Replikationsintermediat (blau) vorliegt (Abb. 6, oben). Für die Transkription des negativ-strängigen RNA-Genoms (rot) wird zusätzlich das NC-Protein VP30 (grün) benötigt. Es werden sieben monocistronische mRNAs gebildet, die alle polyadenyliert (AAAAAn) sind und eine CAP-Struktur aufweisen. Das GP besitzt zwei ORFs (1.2.3.3), sodass acht mRNA-Spezies auftreten können (Stern)

Die Umschaltung von Transkription zu Replikation ist mechanistisch bisher ungeklärt. Ein sehr einfaches Modell stellte zunächst verfügbares NP als Regulator der Umschaltung heraus (Kolakofsky, 1982). Bei dem Rabiesvirus konnte später gezeigt werden, dass das Matrixprotein (M-Protein) die Balance zwischen Transkription und Replikation reguliert. Das M-Protein agiert dabei als „replication stimulatory factor“ indem es die Transkription hemmt und die Replikation stimuliert (Finke, et al., 2003). Inzwischen gibt es Hinweise, dass es sich um einen weitaus komplexeren Mechanismus handelt. Für das VSV wurde z.B. eine unterschiedliche Zusammensetzung des Transkriptions- und Replikationskomplexes nachgewiesen. Dabei handelt es sich bei der Transkriptase um einen Multi-Proteinkomplex aus: (i) den viruskodierten Proteinen L und P, (ii) den zellulären Proteinen translation elongation factor-1α (EF-1α) und heat-shock protein-60 (HSP-60) sowie (iii) der zellulären mRNA cap Guanylyltransferase (GT). Die Replikase hingegen besteht lediglich aus den viralen Proteinen L, P und N (Qanungo, et al., 2004). Es ist nicht auszuschließen, dass auch bei Filoviren Transkriptase und Replikase in ihrer Proteinzusammensetzung variieren. Einen Ansatzpunkt in diese Richtung liefert das VP30 des EBOV, das zwar als

Transkriptionsaktivator essentiell ist, für die Replikation jedoch nicht benötigt wird (Mühlberger, et al., 1999).

Im Gegensatz zur Transkriptase startet die Replikase nicht am TSS des 1.Gens, sondern am 3'-Ende des Genoms und ignoriert die Start- und Stoppsignale der Transkription. Auf diese Weise werden über ein positiv-strängiges Replikationsintermediat, das sog. komplementäre Antigenom, Kopien des gesamten Genoms angefertigt (Abb. 6). Die Promotoren für die Replikation liegen im 3'-Bereich des Genoms bzw. des Antigenoms. Basen-Komplementaritäten im 3'- und 5'-Terminus des Filovirus-Genoms führen zur Ausbildung von Sekundärstrukturen: (i) *Panhandle*-Struktur (13-23 Nukleotide (nt's) des 3'- und 5'-Terminus), (ii) interne *hairpin*-Struktur (weitere 34-40 nt's im *leader*- und *trailer*-Bereich), (iii) *stem-loop* Struktur in der *leader*-Region (Crary, et al., 2003). Die Promotoren der NNS RNA Viren werden aufgrund ihrer Struktur in zwei Gruppen unterteilt: (1) einteilige Promotoren mit vollständiger Lokalisation im *leader*-Bereich, z.B. *Rhabdoviridae, Pneumoviridae* und (2) zweiteilige Promotoren mit Lokalisation des ersten Promotorelements (PE1) im *leader*-Bereich und des zweiten (PE2) in der nicht-translatierten Region des ersten Gens, des NP-Gens, z.B. *Paramyxoviridae*. Der Replikationspromotor des EBOV ist ebenfalls zweigeteilt (Abb. 7). PE1 umfasst die *leader*-Region (Nukleotide 1-55) und PE2 enthält die Nukleotide 81-128 innerhalb der nicht-translatierten Region des NP-Gens. PE1 und PE2 sind durch eine *spacer*-Region getrennt, die das TSS des NP-Gens enthält, sowie eine Region, die in die Bildung einer Sekundärstruktur und die Transkriptionsinitiation involviert ist. Die Struktur des PE2 ist innerhalb der NNS RNA Viren einzigartig und enthält einen Sequenzbereich von acht aufeinander folgenden UN_5 Hexameren, wobei N jedes beliebige Nukleotid repräsentiert. Daraus abzuleiten ist die Toleranz gegenüber Insertionen und Deletionen von sechs Nukleotiden oder Vielfachen von sechs innerhalb der *spacer*-Region. Der Replikationspromotor folgt demnach der sog. *„rule of six"*, wohingegen die gesamte Länge des Genoms einer solchen Regel nicht unterworfen ist (Weik, et al., 2005).

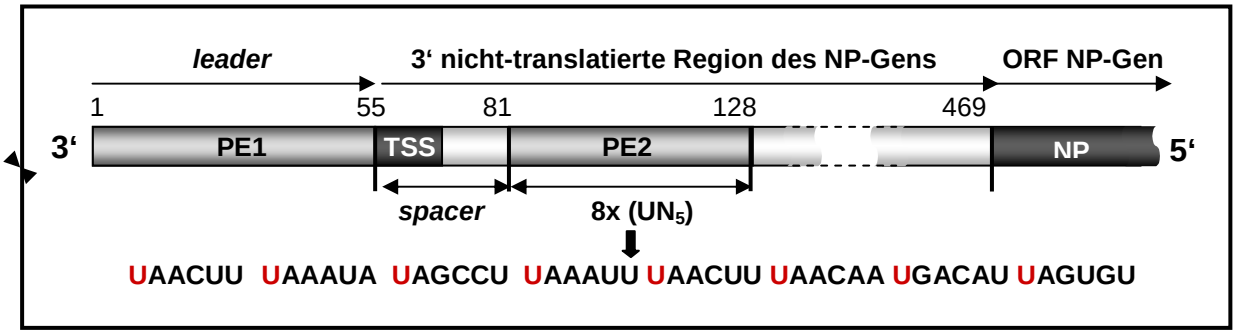


Abb. 7. Struktur des EBOVz Replikations-Promotors. Der zweigeteilte Promotor befindet sich am 3'-Ende des Genoms. Die beiden Promotorelemente, PE1 und PE2, sind durch einen *spacer* separiert, der das Transkriptionsstartsignal (TSS) des NP-Gens beinhaltet. PE1 umfasst die *leader*-Region, PE2 ist in der nicht-translatierten Region des NP-Gens lokalisiert und besteht aus acht hintereinander gelegenen UN_5 Hexameren. Die Sequenz dieser Region ist unterhalb des Schemas angezeigt, wobei die konservierten, hexamerischen ‚U'-Reste dunkelrot dargestellt sind. Der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) des NP-Gens beginnt an Position 469.

1.2.5 Artifizielles Replikations- und Transkriptionssystem (MARV-/ EBOV-spezifisches Minigenomsystem)

Zur Untersuchung der Replikations- und Transkriptionsereignisse außerhalb eines BSL-4 Labors steht sowohl für MARV (Mühlberger, et al., 1998) als auch für EBOV (Mühlberger, et al., 1999) ein rekonstituiertes System zur Verfügung. Dabei werden eukaryotische Zellen mit Plasmiden, die für die Nukleokapsidproteine und ein Minigenom kodieren, transfiziert. Diese Zellen exprimieren die T7-RNA-Polymerase entweder konstitutiv (BSR-T7/5- oder HuH-T7-Zellen) oder transient durch Infektion mit MVA-T7 oder Transfektion eines entsprechenden Plasmids (pCAGGS-T7). Das Minigenom besteht aus der *leader*-Sequenz und der 3'-NTR des NP-Gens sowie der 5'-NTR des L-Gens und dem *trailer*. Die viralen Gene wurden durch das Gen der Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) ersetzt. (Abb. 8, unten). Die T7-RNA-Polymerase transkribiert die Plasmide in mRNAs der Nukleokapsidproteine und in die minigenomische RNA, die dann durch die viralen Proteine verpackt, repliziert und transkribiert wird (Abb. 8, oben). Replikation kann durch replizierte RNA nachgewiesen werden, Transkription durch CAT-mRNA oder CAT-Aktivität.

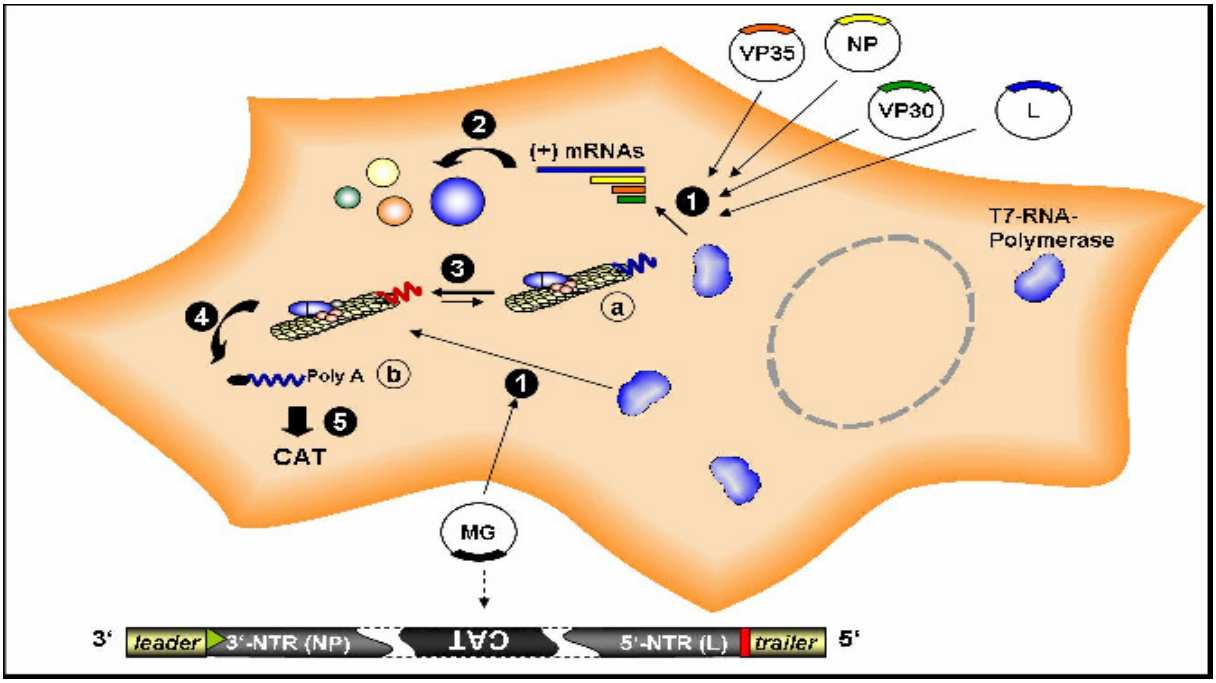


Abb. 8. Artifizielles Replikations- und Transkriptionssystem. Säugerzellen mit stabiler oder transienter Expression der T7-RNA-Polymerase werden mit Plasmiden, die für das Minigenom (MG) und die Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und L kodieren, transfiziert. Da sie unter Kontrolle eines T7-RNA-Polymerase-Promotors stehen, werden die entsprechenden RNAs transkribiert (1). Die viralen mRNAs werden translatiert (2), und die Nukleokapsidproteine replizieren (3) und transkribieren (4) das MG. Transkription kann entweder über die mRNA (b) oder über das Translationsprodukt (CAT, 5) nachgewiesen werden. Die enkapsidierte und daher Nuklease-resistente replizierte RNA (a) kann nach Mikrokokken-Nuklease-Verdau über Northern Blot detektiert werden.

1.2.6 Interaktionen filoviraler Nukleokapsidproteine

Die Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und L sind als strukturelle Komponenten für die Bildung des Nukleokapsids verantwortlich (Abb. 9). Ferner sind sie in verschiedene Proteinkomplexe involviert, über deren Funktionen bisher noch wenig bekannt ist. Als

funktionelle Komponenten sind sie an der viralen Replikation (NP, VP35, L) und der Transkription (NP, VP30, VP35, L) beteiligt (Mühlberger, et al., 1999). Die Regulation der beiden Prozesse erfolgt möglicherweise über die Ausbildung unterschiedlicher Proteinkomplexe. In der Virusmorphogenese spielt die Homo-Oligomerisierung des NP eine zentrale Rolle. Die Selbstaggregation des NP führt zur Ausbildung Nukleokapsid-ähnlicher Strukturen (Kolesnikova, et al., 2000). Darüber hinaus kann es sowohl mit VP35 als auch mit VP30 interagieren, die ebenfalls oligomerisieren können. Die Fähigkeit des L des EBOV mit anderen Nukleokapsidproteinen zu interagieren, ist noch völlig unklar. Für das L des MARV konnte hingegen bereits gezeigt werden, dass es mit VP35 interagiert. Des Weiteren wurden trimere Komplexe aus NP, VP35 und L für MARV identifiziert, wobei das VP35 als Brücke zwischen NP und L agiert. Eine direkte Interaktion zwischen NP und L des MARV ist nicht beschrieben (Becker, et al., 1998). Es ist davon auszugehen, dass das EBOV L in denselben Komplexen vorliegt.

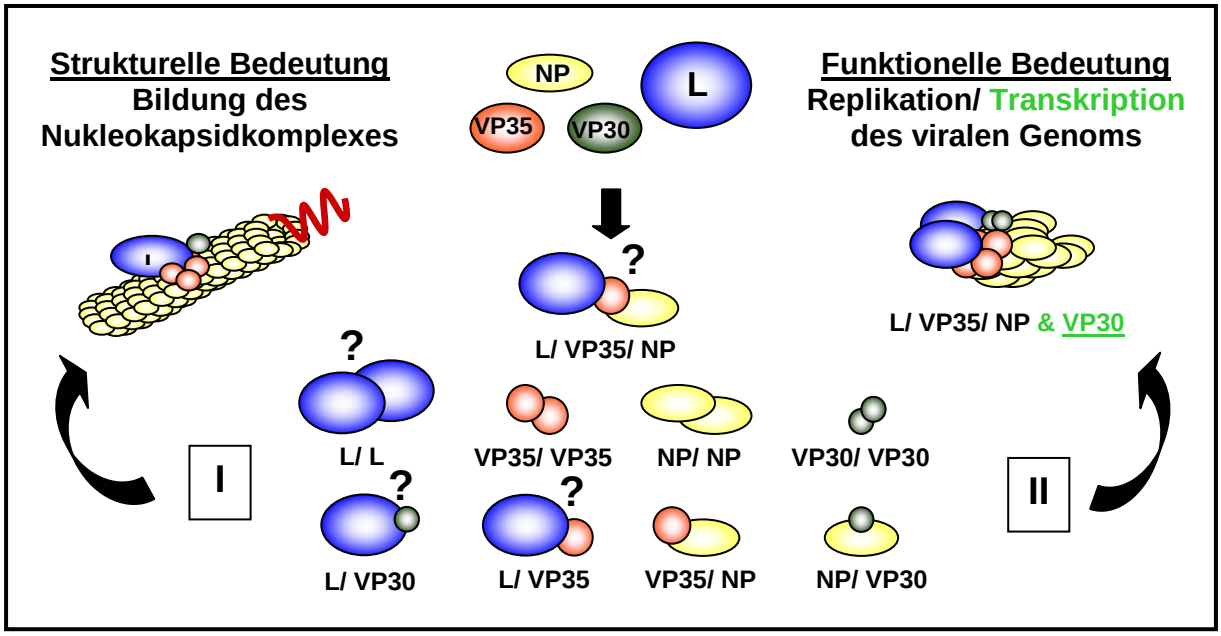


Abb. 9. Interaktionen der Nukleokapsidproteine des EBOV. Die Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und L sind in verschiedene Proteinkomplexe involviert. Einerseits sind sie so als strukturelle Komponenten an der Bildung des Nukleokapsids beteiligt, andererseits spielen sie als funktionelle Komponenten eine wichtige Rolle in der viralen Replikation (NP, VP35, L) und Transkription (NP, VP35, L und VP30). Die vermutliche Homo-Oligomerisierung des L-Proteins sowie die Fähigkeit mit anderen Nukleokapsidproteinen zu interagieren, ist durch ein Fragezeichen markiert.

1.3 Problemstellung dieser Arbeit

Die Nukleokapsidproteine des EBOV haben eine duale Funktion im viralen Replikationszyklus: als strukturelle Komponenten sind sie in die Virusmorphogenese involviert, als funktionelle Komponenten katalysieren sie Replikation und Transkription des viralen RNA-Genoms (Mühlberger, et al., 1999). Es wird angenommen, dass die Zusammensetzung der gebildeten Proteinkomplexe maßgeblich für die Funktion der involvierten Proteine verantwortlich ist. Daher kann die Identifizierung der Interaktionspartner zur Aufklärung der Funktionsweise eines Proteins beitragen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) des EBOV, die das Schlüsselenzym der viralen Replikation und Transkription darstellt.

1. Zunächst sollte geklärt werden, ob die katalytische Untereinheit L mit dem Polymerase-Kofaktor VP35 interagiert, um einen funktionellen Polymerasekomplex zu bilden. Bei nachgewiesener Komplexbildung sollte mit Hilfe von L-Deletionsmutanten die Lokalisation der Bindungsdomäne für das VP35 auf dem L-Protein erfolgen. Für diese Untersuchungen waren Ko-Immunpräzipitations-Studien und Immunfluoreszenz Analysen angedacht.

2. Für verschiedene Negativstrang-RNA Viren ist bekannt, dass das L-Protein Homo-Oligomere bildet, die für die Polymeraseaktivität essentiell sind (Cevik, et al., 2003, Sanchez and de la Torre, 2005, Smallwood and Moyer, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, ob das L-Protein des EBOV ebenfalls zur Homo-Oligomerisierung in der Lage ist. Ferner sollte im Falle einer Oligomerisierung des L-Proteins die Lokalisation der Multimerisierungsdomäne bestimmt werden.

3. Nach Kartierung der Interaktionsdomänen für das VP35 und die L-L-Oligomerisierung sollte untersucht werden, ob die Polymeraseaktivität durch kompetitive Hemmung der VP35-L-Interaktion inhibiert werden kann. Es war geplant, diese Tests mit Hilfe des rekonstituierten EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionsassays durchzuführen. Diese Versuche sollten dazu beitragen, neue Angriffspunkte für antivirale Substanzen identifizieren zu können, die die Transkription und Replikation der hoch pathogenen EBOV inhibieren.

Wir erwarten durch diese Untersuchungen ein besseres Verständnis über den Aufbau und die Funktion des Polymerasekomplexes des EBOV zu erhalten. Dies könnte langfristig dazu beitragen, antivirale Therapien gegen Ebolaviren zu entwickeln.

2

MATERIAL

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Gerätename	Hersteller
ABI PRISM™ 377 DNA Sequenzer	Perkin-Elmer Cetus, Norwalk (USA)
Beckman-Coulter Avanti J-25	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Bio-Imager Analyzer BAS-1000	Fuji, Kanagawa (Japan)
Bio-Image Screen: Imaging plate 2040S; MP	Fuji, Kanagawa (Japan)
Brutschrank B 5061 EK/CO_2	Hereaus Instruments,Hanau
Certomat® S, Tischschüttelmaschine	B.Braun Biotech international, Melsungen
Consort E425 Stromquelle	von Keutz, Reiskirchen
DNA Thermal Cycler TC1	Perkin-Elmer Cetus, Norwalk (USA)
Entwicklermaschine Optimax 2010	Protec Medizintechnik GmbH & Co KG, Oberstenfelde
Eppendorf Reference® Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Fastblot Whatman	Biometra, Göttingen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Jena
Freezing Container, Nalgene® Mr Frosty, Cryo 1℃	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gasbrenner Schütt Flamy S	Schütt GmbH, Göttingen
Geiger-Müller-Zähler	Berthold, Wildbad
Gel Doc™ 2000	BIO RAD, München
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Horizontalschüttler HS 250 Basis	IKA Labortechnik, Staufen
Keutz®-Minigelkammer	von Keutz, Reiskirchen
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Laminar-Flow-Box Herasafe, steril	Heraeus-Christ, Hanau
Inverses Lichtmikoskop WILOVERT Standard	Hund,Wetzlar
Luminometer LUMIstar	Bmg Lab. Technol., Offenburg
Magnetrührer MR 2002	Heidolph, Heidelberg
MegaBace ™ 1000-Sequenzierer	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Mikrowellengerät	Bosch
Minifuge RF Centrifuge	Hereaus Instruments, Hanau
Mini-PROTEAN® 3 Cell, Gel System	Biorad, Richmond (USA)
Odyssey infrared imager	LI-COR GmbH, Bad Homburg
ph-Meter C6832	Schott Laborgeräte
Photometer GeneQuant pro	Biochrom, Cambridge (UK)
Pipettboy comfort	Integra Bioscience, Fernwald
Präzisionsküvette aus Quarzglas	Hellma, Mühlheim
Sicherheitswerkbank	Hereaus Instruments, Hanau
Sonifier 450	G. Heinemann, Schwäbich Gmünd
Spot Kamera	Diagnostic Instruments, Michigan (USA)
Steri-Cult 200 Inkubator (Brutschrank)	Forma Scientific
Taumler Typ 54131	Heidolph; Heidelberg
Tischzentrifuge	Kobe, Marburg
UV-Schirm 302 nm	Bachofer, Reutlingen
UV-Spektrophotometer GeneQuant	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Überkopfrotierer	Heidolph, Schwabach
Vakuum-Geltrockner	von Keutz, Reiskirchen
Vakuum-Zentrifuge (Speed-vac)	von Keutz, Reiskirchen
Vakupack Tischschweißgerät	Krups, Essen
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach

2.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	**Hersteller**
Cryoröhrchen, Corning® 2.0 Cryogenic Vial	Corning, New York (USA)
Deckgläser	Menzel GmbH, Braunschweig
Gewebekulturröhrchen (Polystyrolröhrchen)	Greiner, Nürtingen
Glaswaren (verschiedene)	Schott, Mainz & Hirschmann, Eberstadt
Handschuhe, Safe Skin	Kimerly Clark, Roswell (USA)
Kapillarspitzen	Biozym-Diagnostik, Hess. Oldendorf
Kieselgelplatte/ DC Kieselgel 60	Merck KGaA, Darmstadt
Mikro-Schraubröhrchen (1,5 ml, PP)	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulose Transfermembran (0,45 µm)	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig
Papiertücher	Kimberly Clark, Roswell (USA)
Parafilm	Pechney, Chicago (USA)
PCR-Tubes (0,2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg
Plastikpipetten (serologisch 1, 2, 5, 10, 25 ml)	Greiner; Nürtingen/ Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrenröhrchen (RedCap, 14 ml)	Greiner, Nürtingen
PVDF-Membran (Immobilon™-FL/ -P)	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße (1,5 ml/ 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme, Biomax™ MR	Kodak, Rochester (USA)
Röntgenfilme, Hyperfilm™	Amersham Biosciences, Freiburg
Whatmann-Papier 3MM	Schleicher&Schuell, Dassel
Ultrazentrifugen Röhrchen 14 ml, non-pyrogenic	Greiner, Nürtingen
Zellkulturflaschen, 175 cm^2/ 75 cm^2/ 25 cm^2	Costar, Cambridge (USA)
Zellkulturplatten, 6-well,12-well, 96-well	Greiner, Nürtingen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Chemikalien

Bezeichnung	**Hersteller**
Aceton	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Acetyl-CoA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Acrylamid (AA)	BRL, Neu-Isenburg
Acrylamid-Lösung (29:1)	Biorad, Richmond (USA)
Agarose, ultrarein	BRL, Neu-Isenburg
Agarose, NA	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
6-Amino-n-Capronsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumchlorid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Ammoniumhydrogenkarbonat	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Richmond (USA)
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit (USA)
Blocking Buffer Odyssey	LI-COR GmbH, Bad Homburg
Borsäure	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau (BPB)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Chloroform	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Coomassie® Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
DABCO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DAPI (4´, 6-Diamidino-2-phenylindol**)**	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deconex	Bohrer Chemie, Zuchwil (Schweiz)
Dextranblau	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Dinatriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Dinatriummethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Essigsäure (HOAc)	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethanol (EtOH)	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Ethylacetat (Essigsäureethylester)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Fluoprep	bioMérieux, Nürtingen
FluorSave™ Reagent	Calbiochem, Darmstadt
Formamid	BRL, Neu-Isenburg
L-**G**lutamin 200MM (100×)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glycerin (Glycerol)	BRL, Neu-Isenburg
Glycin	Riedel-de-Haën, Seelze
Glykogen (20 mg/ml)	Roche, Mannheim
Harnstoff (ultrarein)	BRL, Neu-Isenburg
Hefeextrakt	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Immersions-Öl	Leica, Wetzlar
Isopropanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Jodacetamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchloridhexahydrat ($MgCl_2 \times 6H_2O$)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfatheptahydrat ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol (MeOH)	Riedel-de-Haën, Seelze
Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	J.T. Baker B.V., Deventer (Holland)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
N(onidet)P40	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml	Gibco BRL, Karlsruhe

Pepton	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Phenol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
rotiphorese® Gel 30 (Acrylamidlösung)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Stickstoff (99,996 %)	Messer-Griesheim, Siegen
Sucrose	Serva, Heidelberg
Tetracyclin	Serva, Heidelberg
N, N, N´, N´, - Tetramethylethylethylendiamin (TEMED)	Biorad, Richmond (USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg

2.4 Kits und Reagenzien

Produkt	**Hersteller**
AmpliScribe™ T7 Transcription Kit	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
BD In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit	BD Biosciences, Palo Alto (USA)
Complete ™ (Proteasen-Inhibitoren-Cocktail)	Roche, Mannheim
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega GmbH, Mannheim
Dry Ease® Mini-Gel Drying System	Invitrogen, Carlsbad (USA)
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequenzing Kit	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I & II	Peqlab, Erlangen
FAST-CAT® Chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kit (F-2900)	Molecular Probes
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Lipofectamine™	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000/ LTX Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectin™ Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Luciferase Assay System	Promega, Madison (USA)
Metafectene™ Reagent	Biontex Laboratories, Martinsried
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Cambrex Bio Science, Rockland (USA)
MycoKill™	PAA Laboratories, Pasching, (Österreich)
QIAGEN® Plasmid Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substr.	Pierce, Rockford (USA)
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity	Pierce, Rockford (USA)
TNT® T7 Quick Coupled Transcr/ Transl. System	Promega, Madison (USA)
T7 Sequenzing™ Kit	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Z-Competent *E.coli* Transformation Kit™ and Buffer Set	Zymo Research, Orange (USA)

2.5 Puffer und Lösungen

Im Allgemeinen wurden (Fein-) Chemikalien von JT Baker, Merck, Serva oder Sigma-Aldrich benutzt. Sofern nicht anders angegeben, sind Puffer und Lösungen mit Millipore-Wasser (dH_2O) angesetzt worden.

Arbeiten mit DNA	
10x TBE (pH 8,0)	892 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA (pH 8,0) (A)
50x TAE (pH 8,0)	2 mM Tris-Cl, 951 mM Eisessig, 50 mM EDTA (pH 8,0) (A)

SDS-PAGE und Western Blot	
10x TBS	0,25 M Tris, 1,37 M NaCl; pH mit HCl auf 7,5 einstellen
10 % SDS	10% (w/v) SDS unter HCl-Zugabe lösen, pH auf 7,0-7,5 einstellen
5x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 0,5% (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	12,5% (v/v) 1M Tris/ HCl (pH 6,8), 1% (v/v) 10% SDS
Trenngelpuffer	25% (v/v) 1,5M Tris/ HCl (pH 8,8), 1% (v/v) 10 % SDS
2x SDS-Probenpuffer	20% (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) β-Mercapthoethanol, 30% (v/v) 20%-ige SDS-Lösung, 125 mM Tris-Base, 2,5% (v/v) gesättigte Bromphenolblau-Lösung in dH_2O
4x SDS-Probenpuffer	20% (v/v) Glycerin, 20% (v/v) β-Mercapthoethanol, 30% (v/v) 40%-ige SDS-Lösung, 750 mM Tris-Base, 2,5% (v/v) gesättigte Bromphenolblau-Lösung in dH_2O
6x Laemmli-Probenpuffer	0,35 M Tris-HCl (pH 6,8), 30% (v/v) Glycerin, 10% (w/v) SDS, 9,3% DTT, etwas Bromphenolblau
Coomassie-Färbelösung	0,25% (w/v) coomassie blue, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) HOAc
Entfärbelösung	50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) HOAc
Anodenpuffer I	300 mM Tris-Base, 20% (v/v) Ethanol (vergällt)
Anodenpuffer II	25 mM Tris-Base, 20% (v/v) Ethanol (vergällt)
Kathodenpuffer	40 mM ε-Amino-Capronsäure, 25 mM Tris, 20% (v/v) Ethanol (vergällt)
Waschpuffer – WB	0,1% Tween20 in PBS_{def}
Blockingpuffer – WB	10% Milchpulver in PBS_{def}
AK-Puffer – WB	1% Milchpulver, 0,1% Tween20 in PBS_{def}
Strippingpuffer	100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-Cl (pH 6,8)
Fixierer/ Entfärber	30% Ethanol (vergällt), 10% Essigsäure, 60% dH_2O

Immunfluoreszenz	
Blockingreagenz	2% (w/v) BSA, 0,2% (v/v) Tween20, 3% (v/v) Glycerin, 0,05 (w/v) NaN_3 aus 1 l mit PBS_{def} (S)
Glycin-Waschlösung	0,1 M Glycin (in dH_2O)
Methanol/Aceton	50% Methanol, 50% Aceton
4 % Paraformaldehyd (PFA)	4% (w/v) Paraformaldehyd bei 60℃ unter Rühren in D MEM lösen
PBS++ (pH 7,5)	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na_2HPO_4, 0,13 g $CaCl_2$ auf 1 l (A)
PBS_{def} (pH 7,5)	Phosphatpuffer deficient → wie PBS++, jedoch ohne $CaCl_2$ (A)

Ko-Immunpräzipitation	
Tris/KCl – Puffer	10 mM Tris (pH 8,0), 150 mM KCl, 0,5% NP-40, 3% BSA
Tris/KCl - Waschpuffer	wie Tris/KCl – Puffer, jedoch ohne BSA
Ko-IP Zelllysepuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 25x Complete™ (Proteasen-Inhibitoren-Cocktail) kurz vor der Verwendung hinzusetzen

Kulturmedien für Bakterien und Antibiotikalösungen	
LB-Medium (Luria Bertani)	1,0% (w/v) Bacto-Pepton (Trypton), 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1,0% (w/v) NaCl (A)
LB-Agar, 2YT Agar	1,5% (w/v) Bacto-Agar zum Medium geben (A)

2YT Medium	1,6% (w/v) Bacto-Pepton (Trypton), 1,0% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl [(A)]
SOB--Medium	2,0% (w/v) Bacto-Pepton (Trypton), 0,5% (w/v) Hefeextract, 0,058% (w/v) NACl, 0,019% (w/v) KCl, 1,0% (v/v) 1M $MgCl_2$, 1,0% (v/v) 1M $MgSO_4$
Ampicillin stock	Pulver (Ratiopharm) in sterilem dH_2O aufnehmen (0,1 g/ml) [(S)]; Aliquots bei -20 °C lagern
Tetracyclin stock	(0,1 g/ml) [(S)]; Aliquots bei -20 °C lagern

Medien für die Zellkultur	
DMEM komplett	DMEM (-L-Glutamin), 2-10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Pen/Strep, 1% (v/v) L-Glutamin
Glasgow MEM/ BHK-21 komplett	MEM (+L-Glutamin, -TPB), 10% (v/v) NCS, 1% (v/v) 100x MEM Acids, 10% (v/v) TPB, 1% (v/v) Pen/Strep

Sonstige Puffer/ Lösungen	
1 M Tris (pH 6,8/ 7,4)	121,14 g Tris-Base → ad 800 ml dH_2O; pH einstellen, ad 1 l dH_2O

[(S)] steril filtrieren/ [(A)] autoklavieren

2.6 Radioaktiv markierte Substanzen

Substanz	Hersteller
D-*threo*-[dichloroacetyl-1-^{14}C]-Chloramphenicol * (25 µCi/ ml)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg → früher Amersham Bioscience
L-[^{35}S]-Methionine (10mCi/ ml) bzw. Redivue™ Pro-mix L-[^{35}S] in vitro cell labeling mix	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg → früher Amersham Bioscience
Rainbow [^{14}C] Methylated protein marker, high molecular weight (14.300 – 220.000 Da) [1 µCi]	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg → früher Amersham Bioscience

* Das Chloramphenicol wurde in 250 mM Tris-Cl, pH 7,5 gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.7 Enzyme

Enzyme	Hersteller
Polymerasen (jeweils mit entsprechendem 10x Puffer)	
SAWADY *Pwo*-DNA-Polymerase [1 U/ µl]	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pfu TURBO® DNA-Polymerase [2,5 U/ µl]	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	
*Bcl*I, *Dpn*I, *Hind*III, NcoI, *Not*I, *Sac*I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Andere Enzyme	
Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal Phosphatase (CIP) [10 U/µl]	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Polynukleotidkinase (PNK)	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase [4 U/µl]	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
TrypLE™ Express Trypsin (with phenol red)	Invitrogen, Karlsruhe

2.8 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Erst-Antikörper – nicht kommerziell	
Anti-EBOVz-Serum 36/ 6 aus Ziege	Institut für Virologie, Marburg
Anti-EBOVz-NP (B6G5) monoklonaler Maus AK	Institut für Virologie, Marburg
Erst-Antikörper gegen Epitop-Markierungen	
Anti-FLAG® M2 monoclonal mouse antibody	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-FLAG® M2 Agarose affinity gel, from mouse	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rabbit Polyclonal Anti-DYKDDDDK Tag	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
Mouse IgG1 Monoclonal Anti-DYKDDDDK Tag	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
Anti-HA clone HA-7 monoclonal mouse antibody	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rabbit Anti-HA, affinity isolated	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mouse Monoclonal Anti-HA-Agarose Clone HA-7	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mouse Monoclonal Antibody HA.11	Covance, Berkeley (Californien)
Rabbit Polyclonal Anti-HA Epitope Tag	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
Erst-Antikörper	
Anti-beta-Aktin, mouse monoclonal antibody, loading control [1 mg/ ml]	Abcam, Cambridge (UK)
Erst-Antikörper – POD gekoppelt	
Anti-biotin, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technologies, Danvers MA (USA)
Zweit-Antikörper; Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt	
Rhodamine Red™-X-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) [1,5 mg/ml]	Dianova, Hamburg
Rhodamine Red™-X-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) [1,4 mg/ml]	Dianova, Hamburg
Alexa Fluor® 594 donkey anti-goat IgG (H+L)	Invitrogen, Karlsruhe
Fluor FITC AP F(ab')2 donkey anti-mouse IgG (H+L) [1,5 mg/ml]	Dianova, Hamburg
Cy™ 2-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L) [1,4 mg/ml]	Dianova, Hamburg
Alexa Fluor® 680 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) [2 mg/ml]	Molecular Probes
IRDye™ 800 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Rockland, Gilbertsville PA (USA)
Zweit-Antikörper; POD-gekoppelt	
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) [0,8 mg/ml]	Dianova, Hamburg
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) [0,8 mg/ml]	Dianova, Hamburg

2.9 Größenmarker

Größenmarker	Hersteller
DNA-Größenmarker	
GeneRuler™ 100 bp DNA-Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
GeneRuler™ Express DNA-Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Protein-Größenmarker

Biotinylated Protein Ladder	Cell Signaling Technologies, Danvers MA (USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

→ radioaktive Marker unter 2.6

2.10 Zellkultur und Viren

2.10.1 Prokaryotische Zellen

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden unterschiedliche Bakterienstämme (Tab. 3) eingesetzt. Die Herstllung unmethylierter Plasmid-DNA erfolgte ausschließlich in dem *E.coli* Stamm SCS-110, der *dam* (DNA-Adenin-Methylase)- und *dcm* (DNA-Cytosin-Methylase)-negativ ist.

Tab. 3. Genotypen der verwendeten *E. coli* Bakterien

***E.coli* Stamm**	**Genotyp**	**Vertreiber**
XL1-Blue	*E.coli B recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^{q}ZΔM15* Tn*10 (Tet^r)].*	Stratagene, Heidelberg
DH10 B	*E.coli* B F$^-$ *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- RPSl NUPg λ- tonA*	Invitrogen, Karlsruhe
SCS110	*rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB LacI^{q}ZΔM15]*	Stratagene, Heidelberg

2.10.2 Eukaryotische Zellen

HuH-T7, eine von Huh7-Zellen abgeleitete humane Hepatoma-Zelllinie, wurde von V. Gauss-Müller, Medizinische Molekularbiologie der Universität von Lübeck bereitgestellt (Beneduce, et al., 2002). Babyhamster Nierenzellen (BSR T7/5, abgeleitet von einer BHK-21 Zelllinie) wurden von K. Conzelmann (Max von Pettenkofer Institut, München) zur Verfügung gestellt (Buchholz, et al., 1999). Beide Zelllinien exprimieren stabil die T7-RNA-Polymerase. Während für die konstitutive Expression der T7-RNA-Polymerase HeLa-Zellen (Tab. 4) mit dem Vacciniavirus MVA-T7 (Sutter, et al., 1995) infiziert wurden, wurden 293-, HeLa- und Vero-Zellen zusätzlich mit einem pCAGGS-T7 Plasmid transfiziert.

Tab. 4. Zelllinien ohne stabile Expression der T7-RNA-Polymerase

Bezeichnung	**Zelltyp**	**Herkunft**
293-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen	PD Dr. F. Weber, Freiburg
HeLa-Zellen	Humane Cervixkarzinom-Zellen	ECACC[1]
Huh7-Zellen	Humane Leberkarzinom-Zellen	Prof. Dr. Bartenschlager, Heidelberg
Vero-Zellen	Affen-Nierenzellen (Grüne Meerkatze)	Urspr. isoliert aus Cercopithecus aethiops

[1]European collection of cell cultures

2.10.3 Viren

MVA-T7 (Sutter, et al., 1995) wurde unter Bedingungen der biologischen Sicherheitsstufe 2 gehandhabt. Die Infektion von HeLa-Zellen mit dem Vacciniavirus führte zur konstitutiven Expression der T7-RNA-Polymerase. Untersuchungen an den Ebola-Virus Spezies Zaire und Reston wurden im Labor der biologischen Sicherheitsstufe 4 in Marburg durchgeführt.

Tab. 5. Viren

Bezeichnung	Spezies/ Stamm	Herkunft
MVA-T7	Recombinantes Vaccinia-Virus	Sutter et al., 1995
Ebola-Virus	Zaire, Mayinga	CDC, Atlanta (USA)
Ebola-Virus	Reston, Reston	CDC, Atlanta (USA)

2.11 Nukleinsäuren

2.11.1 Nukleotide

Nukleotide	Vertreiber
dNTP Set (10mM each dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Eurogentec, Seraing (Belgien)
rATP, 2'Adenosin 5'Triphosphat 10 mM	Roche, Mannheim

2.11.2 Primer

#	Name		Sequenz 5'→ 3'
Oligonukleotide zur Klonierung L-spezifischer Deletionsmutanten			
1449	Flag_EBOVzL	fwd	cac gat aat acc atg ggc ggc cgc agg atg
1435	EBOVzL100	rev	gac gag ctc *tta* taa gaa ctg ttg gca ccg cgg ctc
1436	EBOVzL133	rev	gac gag ctc *tta* ttg aaa gtg ttc atc aac aca gtc
1437	EBOVzL177	rev	gac gag ctc *tta* atc atg aac aaa cca tgt tga tct
1438	EBOVzL333	rev	gac gag ctc *tta* ttc ttc tag ggt gtg att tac agc
1699	EBOVzL340	rev	gac gag ctc *tta* tag tgc acg cat ttc tgt aat ttc
1700	EBOVzL360	rev	gac gag ctc *tta* cat ctc cag cct tat caa tgt tct
1901	EBOVzL370	rev	gac gag ctc *tta* gga aaa tag ctc aca aag ttg ttg
1701	EBOVzL380	rev	gac gag ctc *tta* tag cac agg atg ccc cca gtg ttt
1688	EBOVzL400	rev	gac gag ctc *tta* gcg taa tgc ttt tag cac cgt agc
1583	EBOVzL450	rev	gac gag ctc *tta* tag tag ttc ttt aat cat tgg caa
1584	EBOVzL600	rev	gac gag ctc *tta* cca tga tgc ttg atg caa taa gct
1589	EBOVzL1200	rev	gga atc cca tac att ***t****ga* tca agg aca ***t****aa* gat aag ata gg
1590	EBOVzL1200	fwd	cc tat ctt atc *tt****a*** tgt cct tga *tc****a*** aat gta tgg gat tcc
1845	Flag_EBOVzLΔ200	fwd	gac agc ggc cgc agg **atg gac tac aag gac gac gat gac aag** caa gga atc ccc cat gct gct atg
2046	Flag_EBOVzLΔ220	fwd	gac acc atg gga **atg gac tac aag gac gac gat gac aag** gaa gcg gtt caa ggg cat aca cac
2047	Flag_EBOVzLΔ240	fwd	gac acc atg gga **atg gac tac aag gac gac gat gac aag** tgc aaa gat tta att aca tgt cga
2048	Flag_EBOVzLΔ260	fwd	gac acc atg gga **atg gac tac aag gac gac gat gac aag** gag gat cca gtt tgt tct gat ta

2049	Flag_EBOVzLΔ280	fwd	gac acc atg gga **atg gac tac aag gac gac gat gac aag** gga gat tac tta ctc tcc ata tta
1971	Flag_EBOVzLΔ300	fwd	gac agc ggc cgc agg **atg gac tac aag gac gac gat gac aag** ttg tgc ttg gcc aaa att caa tta
2056	Flag_EBOVzLΔ380	fwd	gac acc atg gga **atg gac tac aag gac gac gat gac aag** cta cat agt gaa aca gca atc caa
2057	EBOVzL510	rev	gac gag ctc *tta* ttt gtg agg tgg att ata tcc tag
2058	Flag_EBOVzLΔ699	fwd	gac acc atg gga **atg gac tac aag gac gac gat gac aag** gga ggg att gaa gga ctg caa caa
2059	EBOVzL828	rev	gac gag ctc *tta* ccc ttg aag atc atc aaa aat tgc
2060	Flag_EBOVzLΔ1901	fwd	gac acc atg gga **atg gac tac aag gac gac gat gac aag** act tgg ttt aaa gac caa aga gca
2061	EBOVzL2030	rev	gac gag ctc *tta* gct tcg ttg aat ttg cag ttg caa
2062	Flag_CATΔ36	fwd	gac acc atg gga **atg gac tac aag gac gac gat gac aag** acc gtt cag ctg gat att acg gcc
2063	CAT165	rev	gac gag ctc *tta* gtt gtc cat att ggc cac gtt taa

Oligonukleotide zur Epitop-Markierung

1733	HA-NotI	fwd	ggc cgc ATG TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT TAT GCA gc
1734	HA-NotI	rev	ggc cgc TGC ATA ATC TGG AAC ATC ATA TGG ATA CAT gc

Sequenzierprimer

124	pTM1	fwd	att gta tgg gat ctg atc tgg
175	pTM1	rev	gcc aac tca gct tcc ttt cgg

Die Primer #125 und #174 wurden von Dr. M. Krause am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg synthetisiert. Alle anderen Primer wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim) synthetisiert.

Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen SacI (GAG CT▼C), NotI (GC▼GGCCGC), NcoI (C▼CA TGG) und BclI (T▼GA TCA) wurden unterstrichen, die *Stopp-Stellen* in Kursivschrift dargestellt, die Sequenzen des **Flag-Epitops** (atg gac tac aag gac gac gat gac aag) mit Fettdruck und die des HA-EPITOPs (ATG TAT CCA TAT GAT GTT CCA GAT TAT GCA) in Großbuchstaben angezeigt, sowie die ***Punkt-Mutationen*** in fett gedruckter Kursivschrift kenntlich gemacht.

2.11.3 Vektoren und Plasmide

Die verwendeten Plasmide des Minigenomsystems $EBOV_Z$ sind in der Publikation Mühlberger et al., 1999 beschrieben. Das N-terminal Flag-markierte L-Gen der Ebola-Virus Spezies Zaire war, einkloniert in einen pTM1-Vektor, im Labor vorhanden. Die Klonierung wurde von M. Weik durchgeführt.

Vektoren	**Herkunft**
3E-5E_Luc	S. Beck, Marburg/ Diplomarbeit
pCAGGS	Prof. Dr. Y. Kawaoka, University of Tokyo (Japan)
pcDNA3.1 (-)	Invitrogen, Karlsruhe
pGL3-Control	Promega, Madison (USA)
pRL-SV40	Promega, Madison (USA)
pTM1	Dr. B. Moss, NIH Bathesda (USA)

3

METHODEN

3 METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR geht auf Arbeiten von Kary B. Mullis in den Jahren 1983-85 zurück und ermöglicht die Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen in vitro. Dabei wird die gewünschte DNA-Sequenz in komplementäre Einzelstränge zerlegt, die enzymatisch kopiert werden und in sich wiederholenden Reaktionszyklen erneut als Matrize für eine DNA-Synthese eingesetzt werden, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz kommt. Als Ausgangsmaterial für die PCR kann neben DNA auch RNA eingesetzt werden, die zuvor in einer Reverse-Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben werden muss und anschließend nach demselben Prinzip wie die DNA vervielfältigt werden kann.

Um die gewünschte DNA-Sequenz per PCR zu amplifizieren, wurden zwei verschiedene Primer verwendet, die an jeweils einen DNA-Strang binden und die Zielsequenz einrahmen. Der Vorwärts- sowie der entsprechende Rückwärts-Primer (meist 15-25 Nukleotide) definieren das 5'- und das 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Entsprechend der Klonierungsstrategie können die Primer flankierende Restriktionsschnittstellen enthalten, um das PCR-Produkt nach enzymatischem Verdau (3.1.7) in einen geeigneten Vektor ligieren (3.1.9) zu können.
Ein Reaktionszyklus besteht aus drei verschiedenen Temperaturstufen. Am Anfang steht die (1) *Denaturierung* der DNA, wobei die doppelsträngige DNA-Matrize durch Erhitzen in ihre Einzelstränge zerlegt wird. Dem folgt die komplementäre Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA-Matrize. Dabei wird der Reaktionsansatz auf eine durch die Basensequenz der Primer festgelegte Temperatur abgekühlt, um ein spezifisches (2) *„Annealing"* zu erreichen. Abschließend kommt es zur (3) *Extension* der hybridisierten Primer, die vom 3'-Ende des jeweiligen Primers ausgeht und zur Synthese des Doppelstranges führt. Hierzu wird die Temperatur auf das Aktivitätsoptimum der eingesetzten, hitzestabilen DNA Polymerase erhöht. Der Reaktionszyklus wird mehrfach wiederholt, um die amplifizierte Zielsequenz exponentiell im Reaktionsgemisch anzureichern.

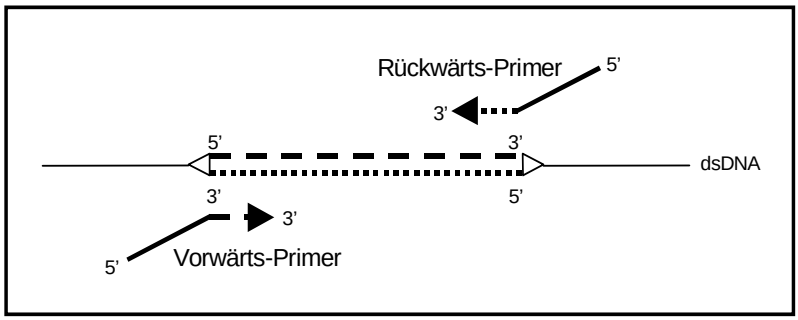


Abb. 10. Prinzip einer PCR. Der vergrößerte DNA-Abschnitt soll mittels PCR amplifiziert werden. Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA und Hybridisierung der Primer an die Zielsequenz erfolgt die Synthese des gewünschten DNA-Fragments in 5'-3'-Richtung.

Die Reaktion wurde mit der ***Pwo***-Polymerase der Firma Peqlab (Erlangen) durchgeführt. Ein 100 µl Reaktionsansatz enthielt gewöhnlich:

Menge	Reagenz
5-50 ng	DNA-Matrize
3 µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
3 µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
2 µl	10 mM dNTP-Mix (Stratagene)
10 µl	10x ***Pwo***-Puffer komplett (+ $MgSO_4$; Peqlab)
ad 97,5 µl	dH_2O
2,5 µl	***Pwo-***DNA-Polymerase (1 U/µl; Peqlab)

Um am Beginn der Reaktion eine Verlängerung von evtl. unspezifisch an die DNA angelagerten Primern zu verhindern, wurde die PCR mit einem sog. „Hot start" eingeleitet. Hierfür wurde der Reaktionsansatz zunächst ohne Polymerase auf 99 °C erhitzt. Die Zugabe der Polymerase erfolgte während der nachfolgenden Abkühlung des Gemisches auf 90 °C. Nach Ablauf der Zyklen schloss sich eine Polymerisationsphase bei 72 °C an, um verkürzte Fragmente zu vervollständigen.

Das Grundgerüst des PCR-Profils bestand aus folgenden Schritten:

Prozess		Temp.	Zeit
Denaturierung/ Hot start		99 °C	3 min
Abkühlung/ ***Pwo***-Zugabe		90 °C	2 min
Denaturierung	x30-35	94 °C	45 s
"Annealing"		*(variabel)*	1 min
Synthese		72 °C	*(2 min pro kb)*
Fertigstellung der Polymerisation		72 °C	10 min
Lagerung		8 °C	∞

Die erhaltenen Produkte wurden entweder direkt auf einem Agarosegel analysiert (3.1.5) oder aufgereinigt (3.1.6) und mit Restriktionsenzymen verdaut (3.1.7).

3.1.2 *In vitro*-Mutagenese

Diese Methode stellt eine Abwandlung der eben beschriebenen PCR dar und kann eingesetzt werden, um spezifisch wenige Nukleotide zu deletieren, zu inserieren oder zu substituieren. Es handelt sich dabei um eine Modifikation des kommerziell erhältlichen QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, Heidelberg): Zwei komplementäre Primer, die beide die gewünschte(n) Mutation(en) enthalten, werden mit der Matrizen-DNA in einer PCR-Reaktion inkubiert. Nach Denaturierung der Matrize hybridisieren die Primer an den jeweiligen Matrizen-Strang, so dass anschließend beide Stränge mit den entsprechenden Mutationen synthetisiert werden. Die eingesetzte Pfu_{Turbo}® DNA Polymerase liest hierbei in entgegengesetzter Richtung aus dem Gen hinaus und amplifiziert in 16 Zyklen das gewünschte DNA-Fragment inklusive der Vektor-Sequenz. Die modifizierten DNA-Stränge stehen in jeder weiteren Runde als Matrize zur Verfügung und können so exponentiell amplifiziert werden. Für den sich anschließenden *Dpn*I-Verdau ist es von Bedeutung, dass die eingesetzte bakteriell exprimierte Matrizen-DNA aus Bakterien stammt, die Plasmid-DNA methylieren. Dadurch kann die ursprüngliche DNA von der

Restriktionsendonuklease *Dpn*I fragmentiert werden, während die *in vitro* synthetisierten, nicht methylierten Doppelstränge vor dem Restriktionsverdau geschützt sind; hemimethylierte Doppelstränge werden ebenfalls verdaut. Nach dem Restriktionsverdau wurden 3-5 µl der Probe auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen (3.1.5) und bei erfolgreicher PCR in Bakterien amplifiziert (3.1.10/ 3.1.11).

Für die in vitro-Mutagenese wurde die *Pfu*$_{Turbo}$® DNA Polymerase eingesetzt, da sie mit einer geringen Fehlerrate auch längere DNA-Fragmente synthetisieren kann. In einer 50 µl Reaktion wurden folgende Komponenten eingesetzt:

Menge	Reagenz
250 ng	DNA-Matrize, methyliert
125 ng	Primer 1
125 ng	Primer 2
2 µl	10 mM dNTP-Mix (Stratagene)
5 µl	10x Cloned ***Pfu***-Reaktionspuffer
ad 49 µl	dH_2O
1 µl	***Pfu***$_{Turbo}$® DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Das Grundgerüst des PCR-Profils bestand aus folgenden Schritten:

Prozess		Temp.	Zeit
Denaturierung/ Hot start		99 ℃	3 min
Abkühlung/ ***Pfu***-Zugabe		90 ℃	2 min
Denaturierung	x16	94 ℃	1 min
“Annealing”		55 ℃	1 min
Synthese		72 ℃	2 min
Fertigstellung der Polymerisation		72 ℃	10 min
Lagerung		8 ℃	∞

Zur PCR-Reaktion wurde 1 µl (10 U) *Dpn*I (New England Biolabs) gegeben und die Proben dann für 1-16 h bei 37 ℃ inkubiert.

Bei schwierigen Reaktionen war oftmals ein stark geändertes Profil, das auf Angaben des Pfu-Herstellers (Stratagene) basiert, erfolgreich (z.B. Einfügen von Fremdsequenz durch Primer-Überhang):

Prozess		Temp.	Zeit
Denaturierung/ Hot start		99 ℃	3 min
Abkühlung/ ***Pfu***-Zugabe		90 ℃	2 min
Denaturierung	x10	92 ℃	1 min
“Annealing”		40 ℃	1 min
Synthese		68 ℃	*(2 min pro kb)*
Denaturierung	x20	92 ℃	1 min
“Annealing”		*(variabel)*	1 min
Synthese		72 ℃	*(1 min pro kb)*+ 10 s
Fertigstellung der Polymerisation		72 ℃	10 min
Lagerung		8 ℃	∞

Variante der *in vitro*-Mutagenese-PCR

Plasmide, in die durch überhängende Oligonukleotide Sequenzen eingefügt wurden, mussten zusätzlich phosphoryliert (3.1.3) und durch Ligation zirkularisiert (3.1.9) werden, bevor sie zur Transformation von *E.coli* (3.1.10) benutzt werden konnten.

3.1.3 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Um hybridisierte Primer (Primer-Annealing, 3.1.4) in einen dephosphorylierten Vektor ligieren zu können, müssen die komplementären Oligonukleotide an ihren 5'-Enden mit Phosphatgruppen versehen werden. Die Phosphorylierung ist eine Kinasereaktion in Anwesenheit von rATP. Ein 10 µl Reaktionsansatz enthält folgende Komponenten:

Menge	Reagenz
10-15 µl	Primer (100 pmol/ µl)
2-5 µl	rATP (10 mM)
2 µl	10x PNK-Puffer (Roche)
1-2 µl	PNK, Polynukleotidkinase (Roche)
ad 20 µl	dH_2O

Die von der Firma Sigma-Aldrich in lyophilisiertem Zustand gelieferten Oligonukleotide wurden zunächst durch Lösen in der entsprechenden Menge dH_2O auf 100 pmol/µl eingestellt und anschließend dem Ansatz zugefügt. Der Ansatz wurde dann für 2 h bei 37 ℃ inkubiert. Nach Aufreinigung mittels einer Phenol-Chloroform Extraktion (3.1.6.3) erfolgte die Ankonzentrierung durch Fällung (3.1.6.4).

3.1.4 Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide (Primer-Annealing)

Zur Herstellung von Epitop-markierten Proteinen wurde die Methode des sog. Primer-Annealings verwendet. Hierbei wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide zu kurzen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten hybridisiert. Diese wurden anschließend über ihre flankierenden Restriktionsschnittstellen in einen zuvor entsprechend verdauten Vektor ligiert (3.1.9). Dazu war es notwendig, dass die Primer in ihrer 5'-phosphorylierten Form vorlagen (3.1.3). Für die Reaktion, die in einem Thermocycler stattfand, wurde der Annealing-Puffer aus dem T7 Sequenzing™ Kit (Amersham) verwendet. Ein Reaktionsansatz enthielt:

Menge	Reagenz
5 µl	Primer 1, phosphoryliert*****
5 µl	Primer 2, phosphoryliert*****
7 µl	7x Annealing-Puffer
ad 49 µl	dH_2O

***** 2 µl des jeweiligen Primers (100 pmol/µl) wurden 5'-phosphoryliert (3.1.3). Danach erfolgte eine Phenol-Chloroform Extraktion (3.1.6.3) mit anschließender Ethanol-Fällung (3.1.6.4). Das Pellet wurde jeweils in 5 µl dH_2O gelöst. Anschließend wurde das gesamte Volumen von 5 µl zur Hybridisierung der Primer eingesetzt.

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 1-5 Minuten bei 95 ℃ inkubiert. Die Oligonukleotidanlagerung fand für 20-30 Minuten bei einer Temperatur von 37 ℃ statt. Nach einer anschließenden 15-minütigen Inkubation bei 25℃ (Raumtemperatur) wurden die hybridisierten doppelsträngigen DNA-Fragmente mittels Ethanol-/Natriumacetat-Fällung aufgereinigt und ankonzentriert (3.1.6.4).

3.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können aufgrund negativ geladener Phosphatgruppen entsprechend ihrer Molekülgröße elektrophoretisch aufgetrennt werden. Unter Verwendung des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid werden die Nukleinsäurefragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder nach enzymatischen Reaktionen verwendet man analytische DNA-Agarosegele, wogegen präparative DNA-Agarosegele zur Reinigung von Nukleinsäuren benutzt werden. Sie unterscheiden sich im Reinheitsgrad der Agarose, dem Laufpuffer und dem einzusetzenden Probenvolumen. Gemische sehr kurzer DNA-Fragmente, wie sie z.B. nach Primer-hybridisierungen vorkommen, können in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

3.1.5.1 Analytisches DNA-Agarosegel

Agarosegel: 1% (w/v) UltraPURE Agarose in 1x TBE-Puffer (pH 8,0)
Laufpuffer: 1x TBE-Puffer (pH 8,0)

Die Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente bestimmt die Prozentualität des Gels: 1% (w/v) für Fragmente von 2 kb bis 23 kb, 1,5% (w/v) für 0,5-2 kb und 2% (w/v) für 50-500 bp. Die entsprechende Menge an Agarose (UltraPURE Agarose, Invitrogen) wurde in 30 ml 1x TBE-Puffer (pH 8,0) pro Gel angesetzt. Der jeweils eingesetzte Längenstandard sowie die einzelnen Proben wurden mit 6x Loading Dye bzw. 6x Orange Loading Dye (Fermentas) versetzt. Der Auftragspuffer erhöht die Dichte der DNA-Probe und ermöglicht die Beladung der Geltaschen. Der enthaltene Farbstoff Bromphenolblau liefert einen Anhaltspunkt für die Wanderung der DNA. Nach ca. 10-minütigem Einlaufen bei 30 mA wurde die Stromstärke auf 50 mA erhöht und die Proben separiert, bis eine ausreichende Auftrennung erreicht war. Doppelstängige DNA wurde durch Interkalation von Ethidiumbromid (4-10 µl einer 10 mg/ml Stammlösung auf ca. 50 ml 1x TBE) markiert und unter UV-Licht bei 302 nm visualisiert. Die entstandenen Bandenmuster wurden durch Belichtung eines Polaroid-Films dokumentiert (QuantityOne 4.4.0, Bio-Rad).

3.1.5.2 Präparatives DNA-Agarosegel

Agarosegel: 1,5% (w/v) Agarose NA in 1x TAE-Puffer (pH 8,0)
Laufpuffer: 1x TAE-Puffer (pH 8,0)

Die Aufbau- und Elektrophoresebedingungen entsprachen denen analytischer DNA-Agarosegele (3.1.5.1). Im Gegensatz zu den analytischen Gelen wurde die Agarose durch Erhitzen in 30 ml 1x TAE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Nach Anfärbung der DNA-Fragmente in Ethidiumbromidlösung wurden die gewünschten DNA-Banden auf dem UV-Schirm ausgeschnitten. Anschließend erfolgte unter Anwendung des QIAquick™ Gel Extraction Kits die Isolierung der DNA aus der Gelmatrix (3.1.6.2).

3.1.5.3 Polyacrylamid-Gel

Gelmatrix: 15 % (w/v) Polyacrylamid in 1x TBE-Puffer (pH 8,0)
Laufpuffer: 1x TBE-Puffer (pH 8,0)

Um den Erfolg der Primerhybridisierung zu überprüfen, wurde ein Polyacrylamid-Gel (alternativ ein analytisches Agarosegel) eingesetzt. Hierzu wurden je 1 µl der ungepaarten komplementären Primer (100 pmol/µl) und 1 µl der hybridisierten Primer aus dem 49 µl umfassenden Hybridisierungs-Ansatz (3.1.4) eingesetzt. Die Primer-Volumina wurden mit 3 µl 6x Probenpuffer versetzt und mit dH_2O auf ein Gesamtvolumen von 18 µl eingestellt. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 100 bp DNA-Ladder eingesetzt. Die begrenzenden Spuren wurden ebenfalls mit Probenpuffer beladen, um ein Schräglaufen des Gels zu vermeiden. Nach Einlaufen bei einer Spannung von 100 V und max. Stromstärke erfolgte die Separierung der Proben bei 200 V. Der Anfärbung in wässriger Ethidiumbromidlösung (20-30 min) folgte eine zehn-minütige Waschung des Gels in dH_2O und letztlich die Visualisierung der Banden.

3.1.6 Reinigung von Nukleinsäuren

Saubere Nukleinsäurepräparationen sind Voraussetzung für jedes molekularbiologische Experiment. Demzufolge müssen sämtliche Kontaminationen wie Proteine, Salze, Detergenzien oder Rückstände vorangegangener Präparationen (Phenol, Chloroform, Ethanol, EDTA) restlos entfernt werden, da sich diese andernfalls störend auf Nachfolgereaktionen auswirken können.

3.1.6.1 Aufreinigung von DNA über Silica-Säulchen

Eine schnelle Methode zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten (3.1.1) und geschnittener DNA (3.1.7) stellte das „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen zur Verfügung: Die von Primern und Nukleotiden verunreinigten PCR-Produkte sowie die von störenden Salzen und Fragmenten des 5’- und 3’-Endes verunreinigten Produkte eines Restriktionsverdaus wurden nach Angaben des Kit-Herstellers aufgearbeitet. Dabei adsorbierte die DNA an die Matrix des Silica-Säulchens und wurde schließlich durch die Waschung mit einem PE-Puffer von den Verunreinigungen befreit. Nach Trocknung der Säule durch Zentrifugation wurde die gereinigte DNA in 30-50 µl dH_2O eluiert.

3.1.6.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Um einzelne DNA-Fragmente von anderen zu isolieren, wurde die DNA zunächst über ein präparatives Agarosegel (3.1.5.2) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte bei 365 nm. Mit einem sauberen Skalpell wurde die gewünschte Bande möglichst exakt ausgeschnitten und in einem 2 ml-Reaktionsgefäß abgewogen. Kleine Fragmente (50-100 bp) wurden mittels einer Glasmatrix (QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen) extrahiert, größere Fragmente (>100 bp) über Silica-Säulchen (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben; eluiert wurde in 40 µl dH_2O.

3.1.6.3 Phenol/ Chloroform – Extraktion von Nukleinsäuren

Proteine und sonstige Verunreinigungen können durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln effektiv aus Lösungen von Nukleinsäure-Fragmenten entfernt werden. Diese Methode eignet sich insbesondere zur Aufreinigung sehr kurzer DNA-Fragmente, die nicht über eine Säulenmatrix (3.1.6.1) isoliert werden können.
Die DNA-haltige Lösung wurde mit dH_2O auf ein gut handhabbares Volumen (z.B. 300 µl) aufgefüllt. Anschließend wurde der wässrigen Nukleinsäure-Lösung ein gleiches Volumen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) zugefügt. Die Verwendung eines Chloroform/ Isoamylalkohol-Gemisches statt reinen Chloroforms soll ein Schäumen verhindern. Nach sorgfältigem Mischen wurden organische und wässrige Phase durch Zentrifugation (2 min bei 14.000 rpm; Kühlzentrifuge 5417R, Eppendorf) getrennt, und die obere, wässrige Phase mit gleichem Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) erneut extrahiert. Die Nukleinsäure konnte danach durch Ethanolfällung (3.1.6.4) ankonzentriert werden.

3.1.6.4 Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol/ Natriumacetat

Diese quantitative Methode zur Ankonzentrierung von Nukleinsäuren besteht in der Fällung mit Alkohol (Ethanol (EtOH) oder Isopropanol) und hohen Konzentrationen an Salz, wie z.B. Natriumacetat (NaOAc) oder Natriumchlorid (NaCl). Die wässrige Lösung von DNA oder RNA wurde mit 1/10 Vol. 3M NaOAc pH 5,0-6,0 und 2,5 Vol. 100% EtOH versetzt und gemischt. Bei kleinen DNA-Fragmenten (<50bp und Primern), sehr geringen DNA-Mengen und bei RNA wurde zusätzlich 1,0 µl Glykogen (20 µg/µl) als Präzipitationshilfe zugegeben. Gefällt wurde über Nacht bei -20°C oder 15 min bis 4h lang auf einer Isopropanol/ Trockeneismischung. Die DNA bildet während dieser Zeit in Gegenwart des NaOAc's und des 100%-igen EtOH's einen unlöslichen Niederschlag, der durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4°C und 14.000 rpm (Kühlzentrifu ge 5417R, Eppendorf) pelletiert wurde. Zur Entfernung der mitgefällten Salze wurde das Pellet mit 500-1000 µl 70% EtOH gewaschen. Nach 10-minütiger Zentrifugation wie zuvor wurde der Überstand komplett mit einer ausgezogenen Spitze entfernt, das Pellet 5 min bei RT an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen Puffer aufgenommen oder in einer adäquaten Menge dH_2O gelöst.

3.1.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme wurden benutzt, um DNA an spezifischen Sequenzen zu schneiden. Zwei Ziele wurden damit verfolgt:

Analytischer Verdau. Das Vorhandensein einer Erkennungssequenz wurde z.B. nach einer *in vitro*-Mutagenese (3.1.2) oder Ligation (3.1.9) überprüft. Aus den resultierenden Fragmenten konnten Rückschlüsse auf den Erfolg des Versuchs gezogen werden. Darüber hinaus konnten so entstandene Klonierungsprodukte identifiziert werden. Dazu wurden 100-250 ng der zu analysierenden DNA in einem 10 µl Ansatz mit 5-10 U Enzym unter definierten Pufferbedingungen bei der empfohlenen Temperatur für 2-18 h inkubiert. Der Ansatz des Restriktionsverdaus wurde in Abhängigkeit des verwendeten Puffers mit BSA (100 µg/ml) komplettiert. Die entstandenen Fragmente wurden anschließend mit Hilfe eines analytischen DNA-Agarosegels (3.1.5.1) ausgewertet.

Präparativer Verdau. Größere Mengen DNA wurden verdaut, um z.B. PCR-Fragmente (3.1.1) oder Vektoren für die Ligation vorzubereiten. In einem 50 µl Ansatz wurden 3-10 µg vektorielle DNA bzw. 40 µl PCR-Ansatz mit 5 µl 10x Reaktionspuffer und 10-40 U Enzym unter den empfohlenen Bedingungen mind. 2 h inkubiert.

Erfolgte der Verdau über zwei unterschiedliche Schnittstellen, wurden die zwei Restriktionsenzyme gleichzeitig eingesetzt, insofern die Temperatur- und Reaktions-Bedingungen der Enzyme kompatibel waren. Der „*Doppelverdau“* wurde in dem am besten geeigneten Puffer durchgeführt. Die Komplettierung mit BSA (100 µg/ml) wurde vorgenommen, sobald sie für eines der beiden Enzyme essentiell war.
Andernfalls erfolgte der Verdau in zwei Schritten, wobei nach dem ersten Verdau die DNA entweder über ein präparatives Agarosegel (3.1.5.2) oder über Silica-Säulchen (3.1.6.1) aufgereinigt und in einem zweiten Verdau mit dem anderen Enzym geschnitten wurde.

3.1.8 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Um eine Religation oder Oligomerisierung geschnittener Vektoren zu verhindern, wurden die 5’-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmide durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, CIP; Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP) von der Firma Fermentas entfernt.
Hierzu wurden der verdauten Vektor DNA (40 µl) 5 µl 10x Reaktionspuffer, 4 µl nuklease-freies dH_2O sowie 1 µl CIP (1 U/µl) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37℃. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Hitze-Inaktivierung der CIP (15 min, 85℃) gestoppt. Da die alkalische Phosphatase in den meisten 10x Reaktionspuffern der Restriktionsenzyme von Fermentas aktiv ist, wurde sie dem Ansatz des präparativen Restriktionsverdaus (3.1.7) nach der 2-stündigen Inkubation einfach hinzugesetzt, insofern die Inkubationstemperatur bei 37℃ lag. Anschließend wurde die DNA mit dem QI Aquick^{TM} PCR Purification Kit (3.1.6.1) aufgereinigt.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten in vektorielle DNA

Mit Hilfe der T4 DNA Ligase, die die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen freien 5’-Phosphatgruppen eines DNA-Stranges mit den freien 3’-OH-Gruppen eines anderen Stranges katalysiert, wurden linearisierte DNA-Moleküle zusammengefügt. Dabei wurden hybridisierte Primer oder ein geschnittenes PCR-Fragment in einen kompatiblen Vektor ligiert. In einem 15 µl Ansatz wurden 1,5 µl 10x Ligationspuffer und 1,5 µl 10 mM ATP vorgelegt. Das einzufügende Fragment wurde im Verhältnis zum dephosphorylierten Vektor (3.1.8) 3:1 bis 7:1 eingesetzt, das fehlende Volumen (abzüglich 0,5 µl T4 DNA Ligase (New England Biolabs), die als letztes zugegeben wurde) mit dH_2O aufgefüllt. Als Religationskontrolle diente ein Ansatz ohne Insertions-Fragment. Als Positivkontrolle für die Ligation wurde ein mit nur einem Enzym verdautes, nicht-dephosphoryliertes Plasmid eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1h bei RT oder über Nacht bei 16℃. Der Ligationsansatz wurde anschließend zur Transformation von kompetenten *E. coli* Bakterien (3.1.10) benutzt.

3.1.10 Transformation Z-kompetenter *E. coli*

Die zur Vermehrung der rekombinanten Plasmide herangezogenen Bakterienzellen wurden zunächst für die Aufnahme der fremden Plasmid-DNA kompetent gemacht. Dies geschah unter Verwendung des Z-Competent *E.coli* Transformation Kit™ and Buffer Set der Firma Zymotec (Orange, USA). Die Handhabung erfolgte entsprechend dem beiliegenden Protokoll. Die kompetenten Bakterienzellen wurden in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.
Von der zu amplifizierenden DNA wurden ja nach Herkunft unterschiedliche Mengen eingesetzt: Maxi/ Mini: 10-100 ng, Ligation/ *in vitro*-Mutagenese: 3-7,5 µl. Die DNA wurde zu 50-100 µl Z-kompetenter Bakterien gegeben, vorsichtig durch Anschnipsen gemischt und 30-60 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Transformationsansätze auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37℃ inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien zur Analyse gepickt.

3.1.11 Plasmid-DNA Minipräparation (Miniprep)

Einzelkolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von Agarplatten gepickt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt; sollte noch am selben Tag die Miniprep durchgeführt werden, wurden nur 3 ml Medium angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37℃ geschüttelt, bis sie eine ausreichende Dichte hatten (meist über Nacht). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem E.Z.N.A® Plasmid Miniprep Kit I der Firma Peqlab (Erlangen) nach Herstellerangaben aus 1,8 ml der Bakterienkulturen. Nach Durchführung aller optionalen Waschschritte wurde die DNA in 40 µl dH_2O eluiert. Zur Überprüfung, ob das gewünschte Plasmid amplifiziert wurde und die Insertion in richtiger Orientierung vorlag, wurden 2-5 µl des gewonnenen Eluats mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut (3.1.7) und auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt (3.1.5.1).

3.1.12 Plasmid-DNA Maxipräparation (Maxiprep)

Für größere Plasmidmengen (>100 µg) wurden drei Kits der Firma Qiagen benutzt: QIAGEN® Plasmid Maxi Kit, QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit und das Qiagen HiSpeed® Plasmid Maxi Kit. 100-250 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 100-250 µl der entsprechenden Miniprep-Kultur angeimpft und 16-20 h bei 37℃ im Horizontalschüttler HS 250 Basis bei 200-220 rpm inkubiert (Übernacht-Kultur). Die Plasmid-DNA wurde anschließend nach Herstellerangaben isoliert und gefällt. Das Pellet wurde zunächst in 200-300 µl dH_2O aufgenommen (beim HiSpeed Kit in 500 µl dH_2O eluiert), die Konzentration spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt und gegebenenfalls auf 1,0 oder 0,5 µg/µl eingestellt.

3.1.13 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA (OD-Messung)

Die Konzentration wässriger Nukleinsäure-Lösungen wurde durch UV-Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Optische Dichte der Lösung bei 260 nm (OD_{260}) ist direkt proportional zu ihrem Nukleinsäuregehalt. Um die Extinktion im linearen Bereich (0,01 bis 0,8) zu erhalten, wurden die Proben in dH_2O verdünnt. Für die Verwendung einer 10 mm Hellma-Quarzküvette wurden die Proben 1: 100, für die 5 mm Hellma-Präzisionsküvette 1:

10 eingesetzt. Die Nukleinsäurekonzentration berechnet sich aus dem Produkt der OD_{600}, der Verdünnung und dem entsprechenden Nukleinsäure-Faktor (Faktor ds DNA = 50 µg/µl; Faktor ssDNA/ RNA = 40 µg/µl; Faktor ssOligonukleotide = 20 µg/µl). Die Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung definiert sich durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm. Reine Lösungen besitzen einen OD_{260}/ OD_{280}-Wert von 1,8. Durch Kontaminationen mit Proteinen ergeben sich wesentlich kleinere Werte, Verunreinigungen durch Phenol oder RNA resultieren in einem deutlich höheren Quotienten.

3.1.14 Sequenzanalyse mit dem Kapillarsequenzer MegaBASE™ 500

Das Prinzip dieser Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger und Coulson (Sanger and Coulson, 1975). Bei der hier verwendeten Modifikation der Methode wird die zu sequenzierende DNA mittels PCR synthetisiert. Ein Reaktionsansatz enthält:

Menge	Reagenz
1 µl	DNA (100-150 ng/µl)
1 µl	Primer (7,5 pmol)
4 µl	Ter-Mix
ad 20 µl	dH_2O

Programm		Temp.	Zeit
Denaturierung		95 °C	3 min
Denaturierung	x35	95 °C	1 min
"Annealing"		50 °C	15 sec
Synthese		60 °C	2 min
Ende der Synthese		4 °C	∞

Neben den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) werden unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) eingesetzt, die nach Einbau den Abbruch der Elongation verursachen. Der „Sequenzing reagent mix" (Amersham Biosciences) enthält neben einem Gemisch aus markierten Nukleotiden (DYEnamic™ ET dye terminators) eine sequenzspezifische Polymerase, die Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase. Die Proben wurden im Anschluss an die PCR mit Hilfe von Sephadex® G-50 Superfine in 96-well Multiscreen-Platten über mehrere Zentrifugations- und Waschschritte aufgereinigt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Kapillarsequenziergerät MegaBACE™ 500, das fluoreszenzmarkierte DNA automatisch analysiert und mittels einer speziellen Software auswertet.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Inkubatoren in einer feuchten 5%-igen CO_2-Atmosphäre bei 37℃. BSR-T7/5-Zellen wurden in komplettiertem Glasgow MEM-Medium (2.5) mit 1 mg/ml Geneticin gehalten. Für alle anderen Zelllinien wurde komplettiertes DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (2.5) als Wachstumsmedium verwendet. HuH-T7-Zellen wurden zusätzlich mit 0,5 mg/ml Geneticin behandelt. Die Subkultivierung erfolgte unter einer Lamina Flow im Abstand von 3-4 Tagen. Zum Passagieren wurde der konfluente Zellrasen 2x mit PBS_{def} gewaschen und die Zellen in 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Durch Zugabe von 8 ml DMEM + 10% FCS wurde die Trypsin-Reaktion gestoppt und die abgelösten Zellen durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Entsprechend der benötigten Dichte wurden die Zellen in 20 ml bzw. 40 ml Medium (75 cm^2-bzw. 162 cm^2-Flaschen) kultiviert oder in 6-well-Zellkulturplatten (54 cm^2) umgesetzt. Die zur Passage von Zellen verwendeten Medien und Substanzen wurden zuvor im Wasserbad erwärmt.

3.2.2 Vaccinia-Virus T7-Expressionssystem

Mit Hilfe dieses Systems wurden EBOVz-Proteine in Zellen synthetisiert, die keine konstitutiv exprimierte T7-RNA-Polymerase besitzen. Die Zellen wurden mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus Ankara T7 (MVA-T7) infiziert, welches die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Phagen T7 exprimiert. Anschließend erfolgte die Transfektion der zu exprimierenden Gene, die unter Kontrolle eines T7-RNA-Polymerase-Promotors stehen. Die transfizierten Gene wurden durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert. Die entstandenen mRNA-Spezies mittels der zellulären Translationsmaschinerie translatiert.

Infektion mit dem Vaccinia-Virus MVA-T7. Die zu infizierenden Zellen wurden bis zu einer Dichte von 50-70% in 6-well-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit DMEM +Pen/Strep, +L-Glutamin gewaschen und mit 10-100 µl Virussuspension (abh. vom verwendeten Stock) infiziert. Die Infektion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 500 µl Medium (ohne FCS) pro well für 1h bei 37℃ und unter 5% CO_2-Atmosphäre auf einem Kippschüttler. Das Infektionsmedium wurde danach entfernt, und die Zellen gegebenenfalls transfiziert (3.2.3). Die Inkubation erfolgte dann bei 33 ℃.

3.2.3 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mit FuGENE® 6

Zellen für die Transfektion mit FuGENE® 6 Transfection Reagent (Roche) wurden in 6-well-Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von 50-70% ausgesät. Vor der eigentlichen Transfektion wurden die Zellen 2x mit DMEM +L-Glutamin (im Folgenden Medium genannt) gewaschen, mit 1 ml Medium versetzt und im Brutschrank inkubiert. Während der Inkubation wurde die zu transfizierende DNA in Schraubröhrchen in 200 µl Medium und das FuGENE® 6 in Polystyrolröhrchen in 800 µl Medium verdünnt. Dabei wurden pro Mikrogramm DNA 3 µl FuGENE® 6 eingesetzt. Das Transfektionsreagenz wurde zu der verdünnten DNA gegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert, damit die spontane Bildung der Lipid-DNA-Komplexe stattfinden konnte. Nach der Inkubation wurde das Transfektionsgemisch auf die Zellen pipettiert. Nach 4-8 Stunden im Brutschrank wurde das Medium gegen DMEM komplett (2.5) mit 2% FCS

ausgetauscht (z.B. BHK-T7-Zellen), und die Platten wurden anschließend weiter inkubiert oder die Transfektion erfolgte über Nacht bei 37℃ unter 5% CO_2-Begasung.

3.2.4 Isolation exprimierter Proteine durch Zelllyse

Die Expressionsrate synthetisierter Proteine wurde im Western-Blot bestimmt. Dazu wurden die transfizierten Zellen zunächst 2x mit kaltem PBS_{def} gewaschen, in 0,5 ml kaltem PBS_{def} abgeschabt und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation (Kühlzentrifuge 5417R, 4℃) bei 8.00 0 rpm, für 8 min. Das Pellet wurde in 100 µl 1x Passive-Lysis Puffer (Komponente aus dem Dual-Luziferase-Kit von Promega) resuspendiert ,15 min bei RT inkubiert und im Anschluss für 15-30 s gevortext. Nach einer Zentrifugation (Kühlzentrifuge 5417R, 4℃) bei 10.0 00 rpm, für 2 min wurde das Zelllysat in 6x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die exprimierten Proteine über SDS-PAGE (3.3.4.1) aufgetrennt und im Western-Blot (3.3.4.3) detektiert.

3.3 Biochemische und immunologische Methoden

3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse (IFA)

Mittels Immunfluoreszenz-Analyse können virale Proteine intrazellulär lokalisiert werden. Durch die hier angewandte auch als Sandwich-Technik bezeichnete Methode wird das Signal verstärkt. Dabei werden die durch einen spezifischen Erst-Antikörper gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem fluoreszenz-markierten Zweit-Antikörper detektiert. Immunfluoreszenzen wurden mit auf Deckgläschen kultivierten Zellen durchgeführt. Die Deckgläschen wurden 3x 5 min in PBS_{def} gewaschen und anschließend für 5 min bei -20℃ mit Aceton/Methanol (1:1) permeabilisiert. Das Lösungsmittelgemisch wurde durch 3-maliges Waschen in PBS_{def} entfernt. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurde zunächst 10 min mit 0,1 M Glycin (in H_2O) inkubiert und nach 3 Waschschritten mit PBS_{def} für 10 min mit IFA-Blockinglösung abgesättigt. Der jeweilige Erst-Antikörper wurde in Blockinglösung verdünnt. Pro Deckgläschen wurden 25 µl auf Parafilm pipettiert und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Die Inkubation erfolgte 1 h in einer verschlossenen, feuchten Box. Nicht gebundene Antikörper wurden in 3 Waschschritten mit PBS_{def} entfernt. Der entsprechende Zweit-Antikörper wurde ebenfalls in Blockinglösung verdünnt und wie der Erst-Antikörper inkubiert. Erneut wurde 3x mit PBS_{def} gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde der Farbstoff DAPI (10 mg/ml) 1:100 in Blockinglösung vorverdünnt und wiederum 1:100 verdünnt direkt zum Zweit-Antikörper gegeben. Nach 4-maligem Waschen in PBS_{def} wurden die Deckgläschen kurz in dH_2O geschwenkt und vorsichtig durch senkrechtes Auftupfen auf ein Papiertuch getrocknet. Als Fixiermedium wurde ein Tropfen Fluoprep (versetzt mit 2,5% DABCO) oder 10 µl FluorSave™ Reagent auf einen Objektträger gegeben, und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Zur Aushärtung wurden die Deckgläschen über Nacht im Kühlschrank gelagert. Die Fluoreszenz wurde an dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan von Zeiss mit unterschiedlichen Filtern und Objektiven durchgeführt. Bilder wurden mit einer Spot Kamera aufgenommen und mit der Software Spot bearbeitet.

3.3.2 *In vitro* Translation

Mit dem TNT® T7 Quick Coupled Transcription/ Translation Kit (Promega) und unter Verwendung von Plasmid-DNA können [^{35}S]-Methionin-markierte Proteine im zellfreien System synthetisiert werden. Sofern dem zu exprimierenden Gen ein T7-RNA-Polymerase-Promotor vorgeschaltet ist, können das im TNT® T7 Quick Master Mix enthaltene Kaninchen-Retikulozytenlysat und die T7-RNA-Polymerase sowohl Transkription als auch Translation vermitteln.

Ein Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

Menge	Reagenz
20 µl	TNT® T7 Quick Master Mix
1 µl	L-[^{35}S]-Methionin (10 mCi/ml)
0,1-1µg	Plasmid-DNA I
0,1-1µg	Plasmid-DNA II
ad 25 µl	nukleasefreies dH_2O

Um Interaktionsstudien viraler Proteine durchzuführen, wurden die jeweils austitrierten Mengen an Plasmid-DNA zweier möglicher Bindungspartner in einem Ansatz ko-translatiert. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert und anschließend für 90 min bei 30℃ inkubiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (3.3.4.1) aufgetrennt und mit dem Bio-Imager (3.3.4.4) analysiert.

3.3.3 Immunpräzipitation

Mit dieser Methode können Proteine durch die Kopplung von Antigen-Antikörper-Komplexen an Protein-A-Sepharose gefällt werden. Die Ko-Immunpräzipitation ermöglicht darüber hinaus die Ermittlung von Protein-Interaktionen.

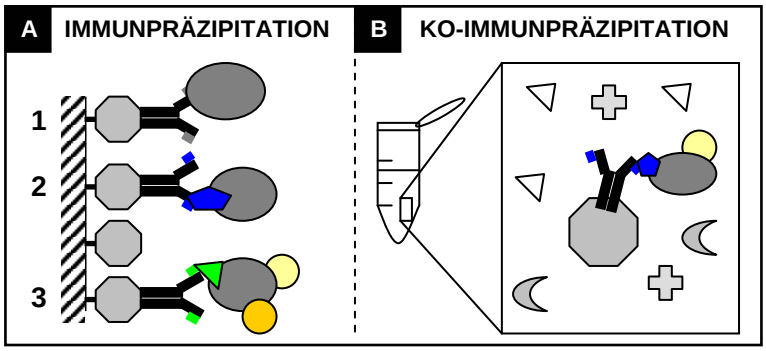


Abb. 11. Schematische Darstellung der Immunpräzipitation. (A) Prinzip der Detektion: (1) Direkte AK-Detektion, (2) AK-Detektion über eine Epitop-Markierung des Proteins, (3) Ko-Immunpräzipitation von Interaktionspartnern (orange, gelb). **(B)** Ko-Immunpräzipitation in Lösung.

Erläuterung der Symbole: Festkörper z.B. Säulen (quergestreiftes Rechteck), Sepharose (graues Achteck), AK (schwarz), variable Region des AK (graues, blaues bzw. grünes Rechteck), Epitop-Markierung (blaues Fünfeck; grünes Dreieck), Protein z.B. L-Protein (dunkelgraues Oval), Interaktionspartner z.B. VP35 (oranger; gelber Kreis).

Äquilibrierung von Protein-A-Sepharose. 250 mg Protein-A-Sepharose wurden in 4 ml Tris/KCl-Waschpuffer (ohne BSA) aufgenommen, gut gemischt und für 1h bei RT inkubiert. Die gequollene Sepharose wurde anschließend 1 min bei 5000 rpm (Megafuge 1.0R) pelletiert und 3x mit je 1 ml Tris/KCl-Waschpuffer (ohne BSA) gewaschen. Nach dem letzten

Waschschritt wurde die Protein-A-Sepharose in 1 Volumenteil (VT) Tris/KCl-Waschpuffer (ohne BSA) aufgenommen und bei 4℃ gelagert.

Prä-Adsorption. 5 µl *in vitro* Translat (3.3.2) wurden zunächst in 500 µl Tris/KCl-Puffer aufgenommen und für 20 min bei 4℃ und 13.000 rpm (Minifuge, Hereaus) zentrifugiert. Um den Hintergrund an unspezifischen Proteinen möglichst gering zu halten, wurden die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt und mit 20 µl Protein-A-Sepharose versetzt. Die Prä-Inkubation erfolgte bei 4℃ für 1 h auf dem Überkopfrotierer (ÜKR). Nach einer zwei-minütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm (Minifuge, Hereaus) wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Bei Einsatz von Agarose-gekoppelten Antikörpern entfiel der Schritt der Prä-Adsorption.

Spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Überstände wurden bei 4℃ für 1 Stunde mit dem spezifischen Antikörper auf dem ÜKR inkubiert. Die Inkubationszeit der Agarose-gekoppelten Antikörper betrug 3 Stunden. In dieser Zeit erfolgten die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion sowie die Präzipitation.

Verdünnungsverhältnisse der verwendeten Antikörper

Antikörper	**Verdünnung**
Anti-Flag® M2 monoklonaler Maus-AK	1:500
Anti-HA.7 monoklonaler Maus-AK	1:5000

Präzipitation. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Kopplung an Protein-A-Sepharose gefällt. Dafür wurden den Ansätzen je 20 µl Protein-A-Sepharose zugesetzt. Anschließend wurden die Ansätze erneut bei 4℃ auf dem ÜKR für 1h oder über Nacht inkubiert. Die an die Protein-A-Sepharose gebundenen Immunkomplexe wurden für 2 min bei 3000 rpm (Minifuge, Hereaus) abzentrifugiert. Die Sedimente wurden 2-3x mit je 600 µl Tris/KCl-Puffer gewaschen, wobei für den letzten Waschschritt ein Tris/KCl-Waschpuffer (ohne BSA) verwendet wurde. Die verbleibenden Protein-A-Sepharose-Pellets wurden mit 20 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95℃ aufgekocht. Die Analyse der Immunpräzipitate erfolgte mittels SDS-PAGE (3.3.4.1) und dem Bio-Imager (3.3.4.4).

3.3.4 Elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung von Proteinen

3.3.4.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinproben erfolgte auf denaturierenden Polyacrylamidgelen entsprechend der Größe. Dabei überdeckt SDS (Natriumdodecylsulfat) die Eigenladung der Proteine, so dass negativ geladene SDS-Protein-Komplexe entstehen, die proportional zum Molekulargewicht sind. Die aufzutrennenden Proteingemische wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95℃ denaturiert. Durch das Mitführen von Größenmarkern (2.9) wurden die Molekulargewichte der Proteine ermittelt. Das Gelsystem bestand aus einem 5%-igen Sammelgel und einem 10-15%-igen Trenngel (Sambrook et al., 1989; A8.43). Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 30-60 mA pro Gel, bis die Farbstofffront herausgelaufen war. Zur Darstellung der gelelektrophoretisch aufgetrennten nicht-radioaktiven Proteine wurden die Gele in einer Coomassie-Lösung gefärbt (3.3.4.2) oder auf eine Immobilon^{TM}-FL Membran elektrotransferiert (3.3.4.3). SDS-Gele mit radioaktiv-markierten Proteinen wurden für 10-20 min in Fixierer/ Entfärber-Lösung geschwenkt, kurz in dH_2O gespült, für 30-50 min auf

Whatmann-Papier mit Hilfe eines Vakuum-Geltrockners getrocknet und mit dem Bio-Imager analysiert (3.3.4.4).

3.3.4.2 Coomassie-Färbung

Mit einer Nachweisgrenze von 1 µg BSA ist die Coomassie-Färbung die unempfindlichste der angewandten Methoden. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden für 15-30 min in Coomassie-Färbelösung und anschließend solange in Entfärbelösung geschwenkt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Die gefärbten Gele wurden in das DryEasy System (Invitrogen) eingespannt und über Nacht bei RT getrocknet. Eine Alternative ist das PageBlue^{TM} Protein Staining Solution Kit (Fermentas), dessen Färbe-Lösung auf toxische Substanzen wie Methanol und Eisessig verzichtet.

3.3.4.3 Elektrotransfer von Proteinen – Western-Blot-Analyse

Zum selektiven Nachweis von Proteinen (Nachweisgrenze: 1 pg) wurden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Immobilon^{TM}-FL Membran transferiert, an die sie irreversibel gebunden werden. Anschließend wurden die gewünschten Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert und über Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

Western-Blot. Die PVDF-Membran wurde zunächst kurz in Methanol aktiviert und dann in Anodenpuffer II äquilibriert. Pro Gel wurden je drei Whatman-Papiere (6x9 cm) in Kathoden-, Anoden I- oder Anodenpuffer II eingeweicht und die Blotapparatur wie in Abb. 12 gezeigt aufgebaut. Pro Membran wurden 43 mA eingestellt (0,8 mA/cm^2 Membran) und die Proteine für eine Dauer von 1,5 Stunden transferiert.

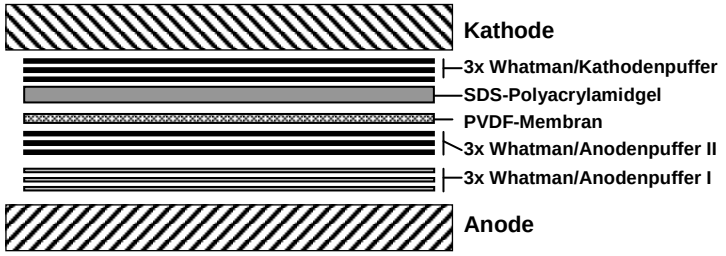


Abb. 12. Schematischer Aufbau der Western-Blot-Apparatur. Die Whatman-Papiere wurden mit dem angegebenen Puffer getränkt; Blasen wurden mit einer Pipette „ausgerollt".

Spezifische Proteindetektion mit Chemilumineszenz. Nach dem Transfer wurden die Markerbanden nachgezogen und die Membran für 1h (RT) mit 10% Milchpulver in PBS_{def} abgesättigt. Der Erst-Antikörper wurde in 1% Milchpulver in PBS_{def} + 0,1% Tween20 verdünnt, und der Blot 1h bei RT oder ü.N. bei 4℃ unter Schwenken inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für 10 min mit PBS_{def} + 0,1% Tween20 entfernt. Der Peroxydase-gekoppelte Zweit-Antikörper wurde ebenfalls in 1% Milchpulver in PBS_{def} + 0,1% Tween20 verdünnt und die Membran 1h bei RT unter Schwenken inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS_{def} + 0,1% Tween20 entfernt, gefolgt von zwei Waschschritten mit PBS_{def}. Als Substrat für die Peroxydase wurde das Super Signal Kit benutzt. Je 500 ml der beiden Lösungen wurden gemischt und auf den Blot getropft. Nach 5-minütiger Inkubation in einer Folientasche wurde überschüssiges Substrat herausgedrückt und ein Film aufgelegt.

3.3.4.4 BioImager-Analyse

Radioaktiv-markierte Proteine wurden nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE (3.3.4.1) mit dem Bio-Imager Analyzer BAS-1000 sichtbar gemacht. Die markierten Proteinbanden wurden durch Exposition einer Bio-Imagingplatte nachgewiesen. Die radioaktive Strahlung der markierten Proteine versetzt Elektronen in der Bio-Imagingplatte in einen angeregten Zustand. Durch das Abtasten mit einem Helium-Neon-Laser (632,6 nm; 17 mW) werden die Elektronen erneut angeregt, fallen dann in ihren ursprünglichen Energiezustand zurück und emittieren dabei Licht. Die Daten wurden für den Computer digitalisiert und über das Computerprogramm TINA2.09g (Raytest, Freiburg) analysiert. Die Expositionszeiten variierten zwischen einigen Stunden bis zu zwei Tagen.

3.3.5 Das EBOV-spezifische Replikations- und Transkriptionssystem

Mit dem artifiziellen EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem (Mühlberger, et al., 1999) werden Reporterproteine über ihre enzymatische Aktivität nachgewiesen. Das verwendete 3E-5E-Plasmid kodiert für ein unter dem T7-RNA-Polymerase-Promotor stehendes EBOV-spezifisches RNA-Minigenom. Nach Transfektion von 3E-5E in Zelllinien mit stabiler Expression der T7-RNA-Polymerase wird das Minigenom transkribiert. Das 3'- und das 5'-Ende werden durch die terminalen Bereiche des EBOV-Genoms gebildet, und enthalten alle notwendigen Signale für die virale Transkription und Replikation. Die Regionen flankieren das entsprechende Reportergen, welches in negativer Orientierung vorliegt (Abb. 8).

Transkription und Replikation des Minigenoms. Nach gleichzeitiger Transfektion der für die EBOV-Nukleokapsid-Proteine NP, VP35, VP30 und L kodierenden Plasmide mit der Minigenom-DNA, ebenfalls unter Kontrolle der T7-RNA-Polymerase, kommt es zu deren Synthese. Die viralen Proteine ihrerseits katalysieren die Transkription und Replikation des Minigenoms, wodurch ein Transkript des Reportergens entsteht.

Translation des Reportergens. Die zelluläre Proteinbiosynthese-Maschinerie translatiert das Transkript des Reportergens und vollendet damit die Synthese des Reporterproteins. Der Nachweis der Enzymaktivität ist in diesem System ein Maß für die EBOV-spezifische Replikation und Transkription.

3.3.5.1 Radioaktiver Aktivitätsnachweis (CAT-Assay)

Der biochemische Nachweis des Reporterproteins Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) erfolgte über dessen enzymatische Aktivität. Die CAT katalysiert die Übertragung von Acetyl-Gruppen des Donors Acetyl-Coenzym A auf den Akzeptor Chloramphenicol (CAMP). Dabei entstehen die Produkte 1'-Acetyl-CAMP, 3'-Acetyl-CAMP und 1'-3'-Diacetyl-CAMP, die in ihrem Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie (DC) unterschieden werden können. Durch den Einsatz von [^{14}C]-markiertem CAMP war es möglich, die entstandenen Produkte nach der DC mit dem BioImager zu detektieren.

Subkonfluente (50-70%) HuH-T7 bzw. BSR-T7/5 Zellen wurden mit 1 µg 3E-5E-Minigenom, 0,5 µg pT/NP$_{EBO}$-Plasmid, 0,5 µg pT/VP35$_{EBO}$-Plasmid, 0,1 µg pT/VP30$_{EBO}$-Plasmid und 1 µg pT/L$_{EBO}$-Plasmid transfiziert (Mühlberger, et al., 1999) (3.2.3). Im Kontrollansatz wurde das L-Plasmid nicht transfiziert, so dass kein enzymatisch aktives CAT-Protein synthetisiert werden konnte. Die zu untersuchenden Zellen wurden 24 h nach Transfektion zwei Mal mit kaltem PBS$_{def}$ gewaschen und mit 150 µl 1x Reporter Lysis Puffer

15 min bei RT lysiert. Das Zelllysat wurde mit einem Zellschaber auf Eis abgekratzt und nach 15-sekündigem Mischen 2 min lang bei 10.000 rpm (Kühlzentrifuge 5417R), 4℃ pelletiert. Vom Überstand wurde in der Regel 1 µl in die CAT-Reaktion eingesetzt. Das Lysat wurde mit 1 µl Acetyl-Coenzym A (70 mg/ml) und 2 µl ^{14}C-markiertem Chloramphenicol (25 µCi/µl) in einem Gesamtvolumen von 150 µl 250 mM Tris-HCl (pH 7,5) mind. 3,5 h (meist über Nacht) bei 37℃ inkubiert. Das Chloramphenicol wurde mit 5 Volumen (750 µl) Ethylacetat durch 30-sekündiges Mischen extrahiert und die Phasen durch 2-minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm (Minifuge RF) getrennt. Von der oberen, organischen Phase wurden 725 µl in ein neues Reaktionsgefäß mit gelöchertem Deckel überführt und in der SpeedVac unter Vakuum und Hitze für 15 min evaporiert. Das eingedampfte Pellet wurde in 10 µl Ethylacetat aufgenommen und auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Die dünnschicht-chromatographische Auftrennung der unterschiedlich acetylierten Formen des Chloramphenicols erfolgte in einem Laufmittel aus 95% (v/v) Chloroform und 5% (v/v) Methanol. Zur Detektion der Radioaktivität wurde eine BioImager-Platte etwa eine 1h lang aufgelegt. Die Platte wurde in einem BioImager-Analyzer-BAS-1000 ausgelesen; das Programm TINA2.09g (RayTest, Freiburg) diente der Auswertung der erhaltenen Daten.

3.3.5.2 Nicht-radioaktiver Aktivitätsnachweis (*Fast*-CAT-Assay)

Der *Fast*CAT® von Molecular Probes ist ein auf Fluoreszenz basierender CAT-Assay. Bei gleicher Sensitivität entfällt der Umgang mit Radioaktivität; die Visualisierung der CAT-Aktivität erfolgt unter UV-Licht. Unter Verwendung des *Desoxy*-Chloramphenicol Substrates entsteht nur ein fluoreszierendes Produkt. Damit ist die Acetylierungsrate direkt proportional zur Enzymaktivität und somit quantitativ auswertbar (Abb. 13)

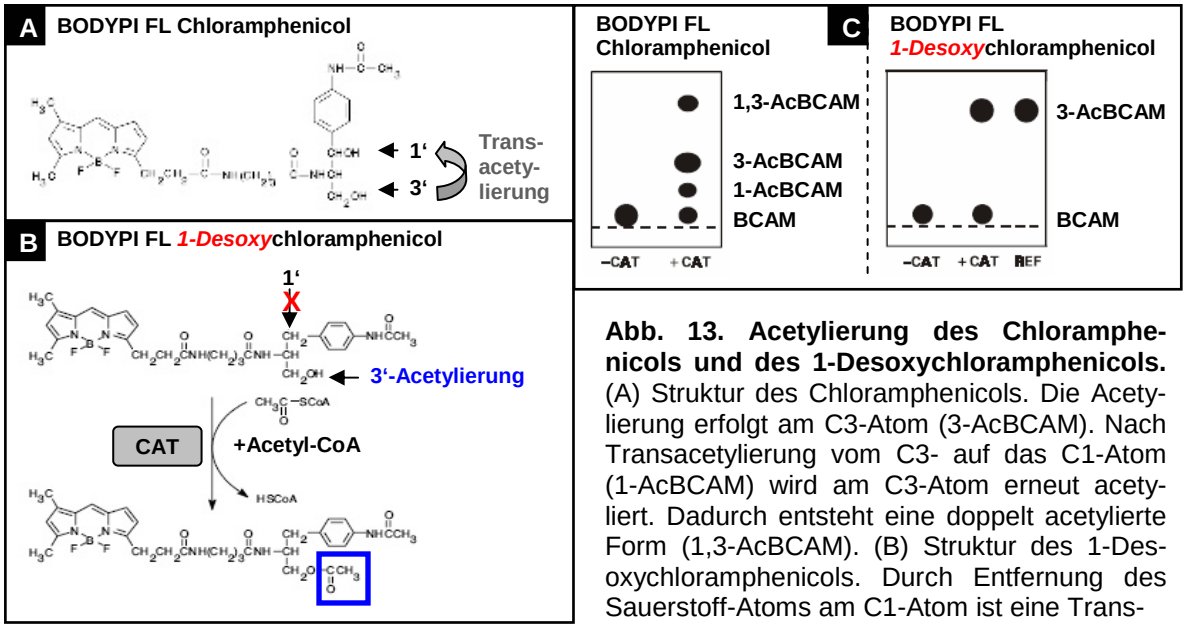


Abb. 13. Acetylierung des Chloramphenicols und des 1-Desoxychloramphenicols. (A) Struktur des Chloramphenicols. Die Acetylierung erfolgt am C3-Atom (3-AcBCAM). Nach Transacetylierung vom C3- auf das C1-Atom (1-AcBCAM) wird am C3-Atom erneut acetyliert. Dadurch entsteht eine doppelt acetylierte Form (1,3-AcBCAM). (B) Struktur des 1-Desoxychloramphenicols. Durch Entfernung des Sauerstoff-Atoms am C1-Atom ist eine Transacetylierung nicht mehr möglich. Es erfolgt nur die Acetylierung am C3-Atom (3-AcBCAM). (C) Auftrennung der acetylierten Formen des Chloramphenicols (links) und des 1-Desoxychloramphenicols (rechts).

Die Gewinnung der Zelllysate erfolgte wie unter (3.3.5.1) beschrieben. Vom Überstand der Zelllysate wurden in der Regel 4 µl in die CAT-Reaktion eingesetzt. Das Lysat wurde mit 5 µl Komponente A (BODIPY *Desoxy*Chloramphenicol Substrat) in einem Gesamtvolumen von 79 µl 250 mM Tris-HCl (pH 7,5) für 5 min bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Acetyl-Coenzym A (70 mg/ml) wurde die Inkubation für mind. 2 h fortgesetzt. Durch Zugabe von 1 ml kaltem (-20°C) Ethylacetat wurde die Reaktion abgestoppt und das Chloramphenicol durch 20-sekündiges Mischen extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte durch 3-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4°C. Von der oberen, organischen Phase wurden 900 µl in ein neues Reaktionsgefäß mit gelöchertem Deckel überführt und in der SpeedVac unter Vakuum und Hitze für 20 min getrocknet. Das eingedampfte Pellet wurde in 10 µl Ethylacetat aufgenommen und auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle wurden 5 µl der Komponente B aus dem Kit aufgetragen. Die dünnschicht-chromatographische Auftrennung der unterschiedlich acetylierten Formen des Chloramphenicols erfolgte in einem Laufmittel aus 87% (v/v) Chloroform und 13% (v/v) Methanol. Die Fluoreszenz wurde mit dem GelDoc-Gerät unter UV-Licht detektiert; das Programm QuantityOne-4.0.0 (Basic) diente der Auswertung.

3.3.5.3 Quantifizierung der Firefly-Luziferase (Luz-Assay)

Das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (DLR™ Assay) von Promega erlaubt die simultane Expression und quantitative Messung von zwei individuellen Reporter-Enzymen innerhalb eines Systems. Dabei spiegelt der „Experimentelle Reporter“ die spezifischen Versuchsbedingungen wieder, während der ko-transfizierte „Kontroll-Reporter“ als interne Kontrolle die Grundaktivität aufzeigt. Die Normalisierung der Aktivität des „Experimentellen Reporters“ mit der internen Kontrolle führt zur Minimierung experimenteller Schwankungen, hervorgerufen durch die unterschiedliche Vitalität der Zellen oder der Transfektionseffizienz.

Als Reporterenzyme wurden die *Firefly*-Luziferase (*F*-Luz; aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis*) und die *Renilla*-Luziferase (*R*-Luz; aus der gemeinen Seefeder *Renilla reniformis*) verwendet. Die Diskriminierung der Biolumineszenz-Reaktionen erfolgt auf Grund der unterschiedlichen Enzym-Substrate. Die *F*-Luz katalysiert die ATP-, Mg^{2+}- und O_2-abhängige Decarboxylierung von Luziferin, während die *R*-Luz eine oxidative Decarboxylierung des Coelenterazins katalysiert. Beide Lumineszenz-Reaktionen erfolgen unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm (Abb. 14).

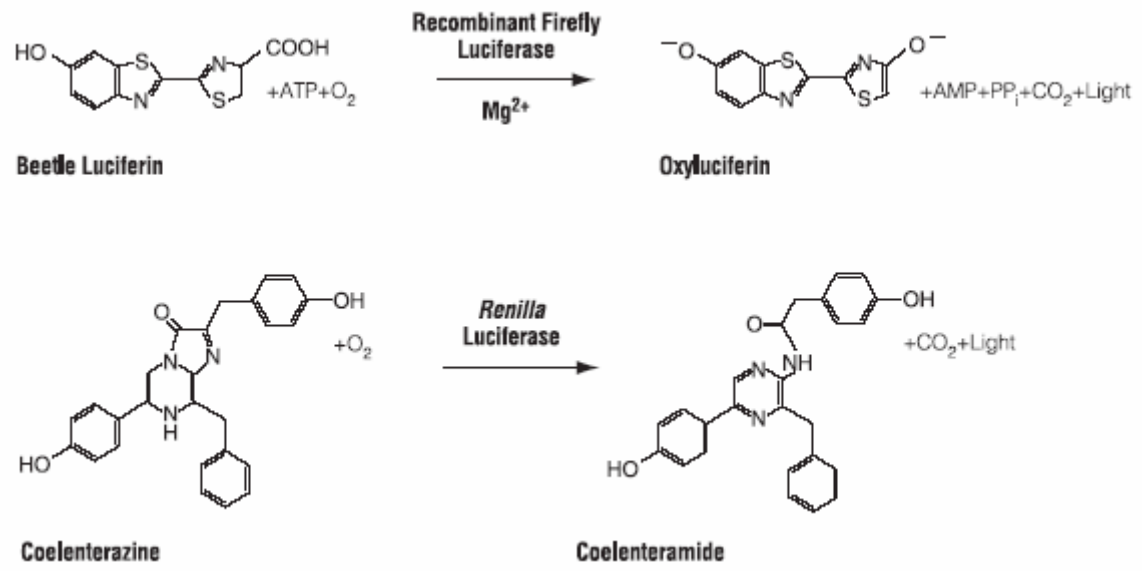


Abb. 14. Biolumineszenz-Reaktionen katalysiert durch die *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase

Das Reportergen für die *F*-Luz wurde aus dem pGL3-Vektor in das 3E-5E-Plasmid (Andy Vektor, T7- Promotor) kloniert (Beck, 2005) und fungierte als „Experimenteller Reporter". Der pRL-SV40 Vektor enthält die DNA-Sequenz für die *R*-Luz unter Kontrolle eines SV40 (Simian Virus 40)-Promotors und diente als „Kontroll-Reporter".

Subkonfluente (50-70%) HuH-T7 bzw. BSR-T7/5 Zellen wurden mit 1 µg 3E-5E_*F*-Luz, 0,3 µg pRL-SV40, 0,5 µg pT/NP_{EBO}-Plasmid, 0,5 µg pT/$VP35_{EBO}$-Plasmid, 0,1 µg pT/$VP30_{EBO}$-Plasmid und 1 µg pT/L_{EBO}-Plasmid transfiziert (3.2.3). Im Kontrollansatz wurde das pT/L_{EBO}-Plasmid nicht transfiziert, sodass kein enzymatisch aktives Luziferase-Protein synthetisiert werden konnte. Die zu untersuchenden Zellen wurden 24h nach Transfektion zwei Mal mit kaltem PBS_{def} gewaschen, in 0,5 ml kaltem PBS_{def} mit einem Zellschaber abgekratzt und nach Überführung in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße für 8 min bei 8.000 rpm (Kühlzentrifuge 5417R), 4℃ pelletiert. Durch Z ugabe von 100 µl 1x Passive-Lysis-Puffer (Kit-Komponente) wurde das Pellet resuspendiert und die Zellen 15 min bei RT lysiert. Nach 15-sekündigem Mischen wurden 10 µl des Lysates in den DLR™ Assay eingesetzt. Die Messung der Lumineszenz der *F*-Luz erfolgte nach Zugabe von 50 µl des Luciferase Assay Reagent II (Kit-Komponente) und einer Messdauer von 10 sec. Nach Quantifizierung der *Firefly*-Lumineszenz wurde durch Zugabe des Stop & Glo® Reagent (Kit-Komponente) die Reaktion abgestoppt und gleichzeitig die Messung der *R*-Luz gestartet. Die Quantifizierung der *Renilla*-Lumineszenz dauerte 1 sec pro Ansatz. Die Lumineszenz-Messungen erfolgten mit dem Luminometer LUMIstar von BMG und wurden anschließend mit Excel (MicrosoftOffice) ausgewertet.

4
ERGEBNISSE

4 ERGEBNISSE

4.1 Analyse zum Aufbau des Replikationskomplexes des EBOVz

Der Replikationskomplex des EBOVz wird von den Nukleokapsid- (NC-) Proteinen NP, VP35 und L gebildet (Mühlberger, et al., 1999). Auf welche Art die einzelnen viralen Komponenten miteinander interagieren, war bisher noch unbekannt, obwohl es Hinweise aus den Interaktionsstudien der MARV-Proteine gab. Hier gelang u.a. der Nachweis von Komplexen zwischen NP-VP35 sowie VP35-L (Becker, et al., 1998). An dieser Stelle setzten die Untersuchungen zur Aufklärung der Interaktionen des EBOVzL an.

4.1.1 Optimierung der Immunfluoreszenz-Analyse

Um die Interaktionsfähigkeit des L-Proteins des EBOVz (EBOVzL) mit den NC-Proteinen NP und VP35 zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Insbesondere bei der Ko-Expression der potentiellen Interaktionspartner stellten sich die kritischen Punkte im Versuchsverlauf heraus: Transfektionseffizienz und Art des verwendeten Agens zur Permeabilisierung der transfizierten Zellen. Die Transfektionseffizienz wurde im Wesentlichen vom verwendeten Zelltyp, dem Transfektionsreagenz und der Menge an transfizierter Plasmid-DNA beeinflusst. Im ungünstigsten Fall waren die Zellen zu weniger als 10 Prozent transfiziert, exprimierten bei Ko-Transfektion nur eines der Proteine und zeigten lediglich eine schwache Expression des entsprechenden Proteins. Für die Detektion der im Zytoplasma lokalisierten Proteine mussten die Zellen ausreichend permeabilisiert werden. Zu den verwendeten Permeabilisierungsmethoden zählten die Aceton/Methanol- und die Triton-X100 Behandlung. Die Permeabilisierung war insofern problematisch, da sie häufig zur völligen Fragmentierung der Zellen mitsamt ihrem Zellkern führten. Unter den getesteten Zelllinien befanden sich BSR-T7/5 und HuH-T7 Zellen, die durch ihre Fähigkeit zur konstitutiven Expression der erforderlichen T7-RNA-Polymerase bereits einen Vorteil hatten. Bei den verwendeten HeLa- und Vero-Zellen wurde die transiente Expression der T7-RNA-Polymerase durch Infektion mit MVA-T7 oder Transfektion mit dem Plasmid pCAGGS-T7 bewirkt. Die verschiedenen Transfektionsreagenzien u.a. Lipofectin, Lipofectamin2000, Dac30, Metafectene sowie FuGENE® 6 wurden in Kombination mit den unterschiedlichen Zelllinien getestet. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren und auf Erfahrungswerte zurückgegriffen. Optimale Versuchsbedingungen wurden unter Verwendung FuGENE® 6-transfizierter BSR-T7/5 Zellen mit anschließender Aceton/Methanol-Behandlung erzielt, wobei die maximale Inkubationszeit mit Aceton/Methanol bei 5 min bei -20℃ lag. Darüber hinaus konnte durch die zusätzliche Transfektion von pCAGGS-T7 die Expressionsrate deutlich erhöht werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 Nachweis des EBOVzL über ein Flag-Epitop

Zur direkten Detektion des L-Proteins des EBOV steht bislang kein spezifischer Antikörper zur Verfügung. Dies ist auf die geringe Menge des Proteins im Virion und dessen schwache Immunogenität zurückzuführen. Der immunologische Nachweis ist dennoch möglich. Hierzu wurde ein Fusionsprotein erzeugt, indem über eine kurze *Linker*-Sequenz ein Flag-Epitop an das 5'-Ende des L-Gens kloniert wurde. Der *Linker* enthält die Sequenz der NotI-Schnittstelle, über die die Einklonierung des Epitops in den pTM1 Vektor erfolgte. Das pTM1-

Plasmid (5357 bp) enthielt bereits das zuvor über die Schnittstellen NotI und SacI einklonierte L-Gen (Abb. 15).

Bei dem Flag-Epitop handelt es sich um ein hydrophiles Oktapeptid mit der AS-Sequenz N'-DYKDDDDK-C'. Das L-Protein besitzt ein N-terminales Flag von neun AS Länge, da ein *Start-Codon* bei der Einklonierung vorgeschaltet wurde. Die kodierende Region des Peptids besitzt daher folgende Basenfolge:

5'- *atg* gac tac aag gac gac gat gac aag -3'

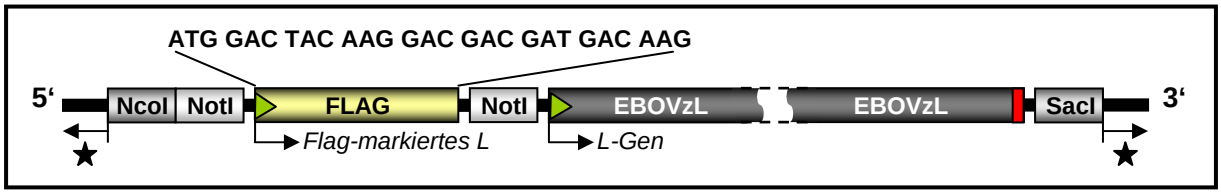


Abb. 15. Sequenz des N-terminalen Flag-Epitops des EBOVzL im pTM1-Vektor. Dargestellt ist ein Ausschnitt der *Multiple Cloning Site* (MCS) des pTM1-Vektors (Stern). Die Schnittstellen für die Klonierung des L-Gens (dunkel-graue Box) sind NotI (gc'ggccgc) und SacI (gagct'c). Das Flag-Epitop (gelb-graue Box) wurde über die NotI-Schnittstelle einkloniert. Die Sequenz des Flag-Epitops ist oberhalb der Graphik angezeigt. Es besitzt ebenso wie das L-Gen ein Startcodon (grünes Dreieck). Das L-Gen enthält darüber hinaus das Stopp-Codon (roter Balken).

4.1.3 Interaktionen der viralen Polymerase L mit den Nukleokapsidproteinen NP und VP35

Unter den optimierten Versuchsbedingungen der Immunfluoreszenz-Analyse (3.3.1) konnten reproduzierbare Daten hinsichtlich der Interaktion des EBOVzL mit NP und VP35 erzielt werden. Zur Expression der Nukleokapsidproteine wurden BSR-T7/5-Zellen mit pTM1-Plasmiden von L (1,0 µg), NP (0,25 µg) und/ oder VP35 (0,25 µg) transfiziert. Die verwendete Zelllinie zeichnet sich durch die konstitutive Expression der T7-RNA-Polymerase aus. Dennoch wurde das Plasmid pCAGGS-T7 (1,0 µg) zusätzlich transfiziert, um ein möglichst hohes Expressionslevel zu erreichen. Durch den Einsatz entsprechender Mengen des Leervektors pTM1 wurden die transfizierten Plasmidmengen in den unterschiedlichen Ansätzen angeglichen. Die exprimierten Proteine wurden mittels eines Anti-EBOVz-Serums aus Ziege und eines Alexa Fluor® 594 Anti-Ziege IgG (H+L) Antikörpers aus Esel von Invitrogen sichtbar gemacht. Das L-Protein konnte mangels eines geeigneten Antikörpers nicht direkt detektiert werden, so dass es am N-Terminus mit einem Flag-Epitop markiert wurde (4.1.2). Der Nachweis des Flag-markierten L-Proteins erfolgte mittels des monoklonalen Maus-Antikörpers Anti-Flag® M2 von Sigma und dem Fluor FITC AP F(ab')2 Esel Anti-Maus IgG (H+L) Antikörper von Dianova. Die Untersuchungen zum intrazellularen Verteilungsmuster der rekombinant exprimierten Proteine zeigten einen deutlichen Unterschied zwischen dem NP-Protein und den Proteinuntereinheiten des RdRp-Komplexes, VP35 und L. Während letztere ein relativ homogenes Verteilungsmuster aufwiesen, zeigte sich NP in großen Aggregaten, wie man sie als sog. Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) in infizierten Zellen findet (Abb. 16a) Durch diese spezifische Verteilung des NP konnten in den durchgeführten Ko-Expressionsstudien Wechselwirkungen des NP mit den anderen Proteinen durch deren verändertes Verteilungsmuster erkennbar gemacht werden. Auf diese Weise gelang zunächst der Nachweis, dass L nicht in der Lage ist eine direkte Interaktion mit NP einzugehen (Abb. 16b, unten), aber über VP35 in die NP-Aggregate dirigiert wird, was zur Re-Lokalisation von VP35 und L in die typischen durch NP gebildeten Einschlusskörperchen führt (Abb. 16b, oben). Demzufolge wird ein trimerer Komplex aus NP-

VP35-L gebildet, dem die Interaktion zwischen NP und VP35 sowie jene zwischen VP35 und L zugrunde liegt.

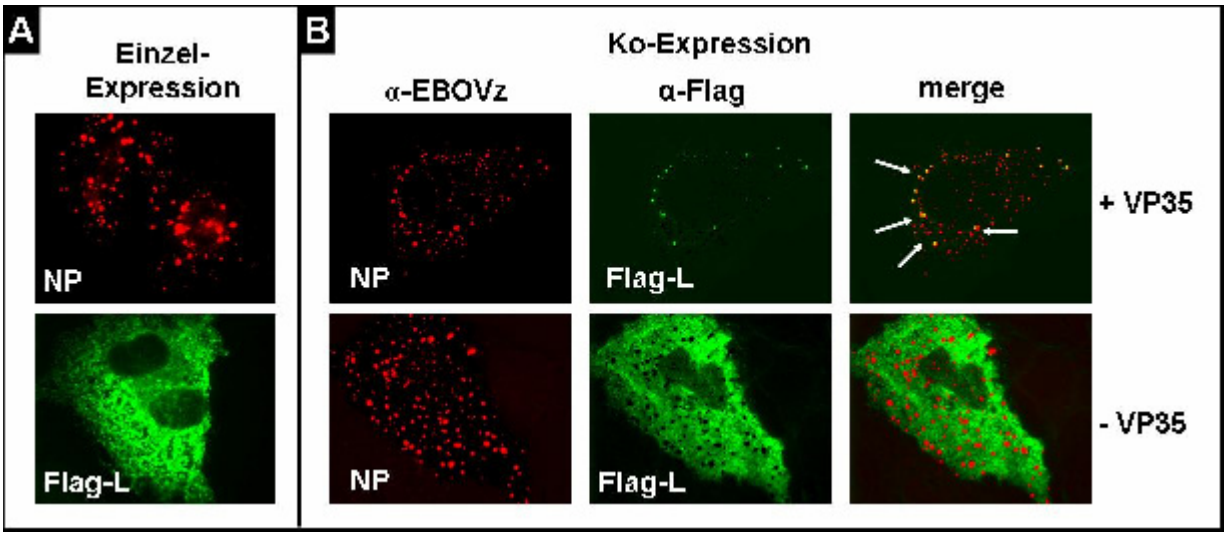


Abb. 16. Interaktion des EBOVzL mit den Nukleokapsidproteinen NP und VP35. Proteinexpression in mittels FuGENE® 6 transfizierten BSR-T7/5-Zellen. Detektion des NP mit dem Ziege-Anti-EBOVz-Serum (1:100) und einem Alexa Fluor® 594 Esel Anti-Ziege AK (1:500); Flag-L Nachweis durch den Anti-Flag® M2-AK (1:200) und dem Fluor FITC donkey anti-mouse AK (1:100). (A) Einzelexpression der Nukleokapsidproteine NP und Flag-L. (B) Ko-Expression von NP und Flag-L in An- bzw. Abwesenheit von VP35.

4.1.4 Zusammenfassung Kapitel 4.1

Die Replikation des EBOV ist von den Nukleokapsidproteinen NP, VP35 und L abhängig. Dabei liegt die katalytische Funktion der Replikase bei der viralen Polymerase L. Um die Interaktionsfähigkeit des L-Proteins mit NP und VP35 zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Die aufgetretenen Schwierigkeiten, die oft eine Auswertung der Daten unmöglich machten, wurden durch eine Reihe von Vorläufertests ausgeräumt. Entscheidend war dabei die Wahl einer Zelllinie mit konstitutiver Expression der T7-RNA-Polymerase. Auf diese Weise konnte auf eine Infektion der Zellen mit MVA-T7 verzichtet werden. Die Transfektion eines Plasmids, das für die T7-RNA-Polymerase kodiert, führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expressionsrate. Die eingesetzte Plasmidmenge war insbesondere für das L-Protein kritisch, da eine überhöhte Expression im ungünstigsten Fall bereits bei der Einzelexpression des Proteins eine starke Aggregation zur Folge hatte. Diese Aggregate traten zwar hauptsächlich in Zellkernnähe auf, waren den Einschlusskörperchen des NP aber sehr ähnlich, so dass bei Ko-Expression aller drei Proteine (NP, VP35 und L) zwischen L-Aggregaten und in NP-Einschlusskörperchen relokalisiertem L nicht mehr unterschieden werden konnte.

Die Untersuchungen zur Interaktionsfähigkeit der viralen Polymerase L mit NP und VP35 führten schließlich zur Bestätigung der Annahme, dass die EBOVz-Proteine auf die selbe Art miteinander interagieren, wie es bereits für die MARV-Proteine NP, VP35 und L gezeigt wurde. Das L-Protein als katalytische Untereinheit des Komplexes interagiert lediglich mit seinem Kofaktor VP35. Eine Interaktion zwischen L und NP existiert hingegen nicht. Daher ist VP35 im trimeren Replikationskomplex für die Ko-Lokalisation von NP und L verantwortlich.

4.2 Charakterisierung der VP35-Bindungsdomäne auf dem EBOVzL

Zunächst sollte die Bindungsdomäne für das VP35 auf dem L-Protein identifiziert werden. Dafür wurden Interaktionsstudien mit VP35 und verschiedenen L-Deletionsmutanten durchgeführt.

4.2.1 Klonierung N-terminal Flag-markierter L-Deletionsmutanten

Für das MARV wurde bereits gezeigt, dass die Interaktion der Polymerase L mit VP35 über die ersten 530 N-terminalen Aminosäuren (AS) des L-Proteins stattfindet. Die Region zwischen AS 309 und 530 wurde als essentielle Bindungsdomäne charakterisiert (Becker, et al., 1998). Daher wurde für das L-Protein des EBOV ebenfalls eine N-terminal gelegene Bindungsdomäne für das VP35 vermutet. Ausgehend von dieser Annahme wurden zunächst C-terminal trunkierte L-Proteine hergestellt. Dabei umfasste die größte L-Deletionsmutante die ersten 1200 N-terminalen AS des L-Proteins, wohingegen die kleinste nur noch die ersten 100 N-terminalen AS repräsentierte (Abb. 17A). Zur genaueren Kartierung der Bindungsdomäne für das VP35 wurden zusätzlich Mutanten des L-Proteins mit deletiertem N-Terminus hergestellt. Als Ausgangskonstrukt diente die bereits klonierte L-Deletionsmutante, die noch über die ersten 600 N-terminalen AS verfügte (Abb. 17B). Die klonierten L-Deletionsmutanten wurden alle durch ein N-terminales Flag-Epitop markiert, um sie später detektieren zu können.

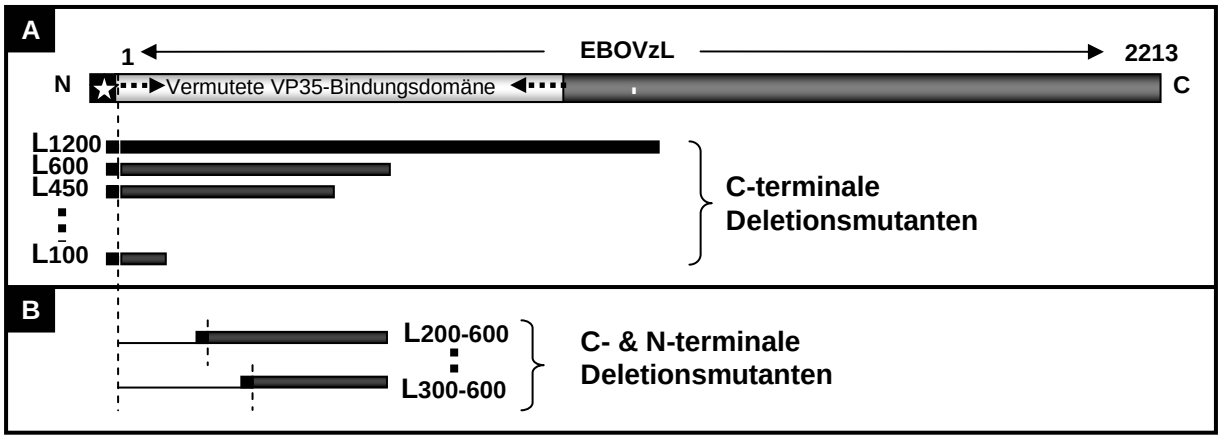


Abb. 17. Klonierte L-Deletionsmutanten des EBOVz. Das EBOVzL besteht aus 2213 AS. Dargestellt ist die vermutete VP35-Bindungsdomäne im N-terminalen Bereich des L-Proteins (hellgraue Box) sowie das N-terminale Flag-Epitop (schwarze Box mit weißem Stern). (A) C-terminale L-Deletionsmutanten: Die drei größten Fragmente (L1200, L600 und L450) sowie das kleinste Fragment (L100) wurden in entsprechendem Größenverhältnis zum vollständigen L-Protein dargestellt (schwarze Balken). Die senkrechte, dicke gestrichelte Linie steht stellvertretend für die nicht dargestellten L-Fragmente. (B) C- und N-terminale L-Deletionsmutanten: die Darstellung entspricht der unter A beschriebenen.

Für die Bezeichnung der hergestellten L-Deletionsmutanten wurde ein einheitliches Format verwendet: pT_EBOVzL(Anz. N-terminaler Nukleotide). Dabei steht pT für den verwendeten Vektor pTM1.

Klonierung mittels PCR: Die Klonierung erfolgte mit Ausnahme der pT_EBOVzL1200 Mutante nach einem einheitlichen Prinzip: Für die Amplifikation des gewünschten N-terminalen Bereiches wurde jeweils ein entsprechendes Primerpaar verwendet (Tab. 6).

Für die Klonierungen der C-terminalen L-Deletionsmutanten wurde der Vorwärtsprimer #1449 verwendet, der die Restriktionsschnittstelle *Nco*I und das Startcodon des Flag-Epitops enthält. Der Rückwärtsprimer besteht jeweils aus den letzten Nukleotiden der kodierenden Sequenzen des L, die amplifiziert werden sollten, sowie einem Stoppkodon und der Restriktionsschnittstelle *Sac*I.

Für die Klonierungen der C- und N-terminalen L-Deletionsmutanten wurden Vorwärtsprimer verwendet, die die Restriktionsschnittstelle *Not*I, die vollständige Sequenz des Flag-Epitops und direkt im Anschluss die Sequenz für die ersten acht AS des L-Proteins ab der jeweils gewünschten Startposition enthielten. Als Rückwärtsprimer diente der Primer #1584, der für die Klonierung des pT_EBOVzL600 als Rückwärtsprimer eingesetzt wurde.

CC-Nr.	Name	Primerpaar
C-terminale L-Deletionsmutanten		
ML-11/ 04	pT_Flag_EBOVzL1200	#1590 - #1589
ML-10/ 04	pT_Flag_EBOVzL600	#1449 - #1584
ML-09/ 04	pT_Flag_EBOVzL450	#1449 - #1583
ML-12/ 04	pT_Flag_EBOVzL400	#1449 - #1688
ML-15/ 05	pT_Flag_EBOVzL380	#1449 - #1701
ML-19/ 05	pT_Flag_EBOVzL370	#1449 - #1901
ML-14/ 05	pT_Flag_EBOVzL360	#1449 - #1700
ML-13/ 04	pT_Flag_EBOVzL340	#1449 - #1699
ML-08/ 03	pT_Flag_EBOVzL333	#1449 - #1438
ML-07/ 03	pT_Flag_EBOVzL177	#1449 - #1437
ML-06/ 03	pT_Flag_EBOVzL133	#1449 - #1436
ML-05/ 03	pT_Flag_EBOVzL100	#1449 - #1435
C-und N-terminale L-Deletionsmutanten		
ML-20/ 05	pT_Flag_EBOVzL200-600	#1845 - #1584
ML-25/ 06	pT_Flag_EBOVzL220-600	#2046 - #1584
ML-26/ 06	pT_Flag_EBOVzL240-600	#2047 - #1584
ML-27/ 06	pT_Flag_EBOVzL260-600	#2048 - #1584
ML-28/ 06	pT_Flag_EBOVzL280-600	#2049 - #1584
ML-21/ 05	pT_Flag_EBOVzL300-600	#1971 - #1584

Tab. 6. L-Deletionsmutanten des EBOVz. Die Clone-Chart-Nummer (CC-Nr.) setzt sich zusammen aus den Initialen des Erzeugers sowie der Klon-Nr. und dem Jahr der Herstellung. Die Bezeichnung der Klone beinhaltet den Vektor (pTM1), das Epitop (Flag) den Spenderorganismus (EBOVz) sowie den N-terminalen Bereich des L-Proteins. Die Primer sind mit internen Nummern bezeichnet.

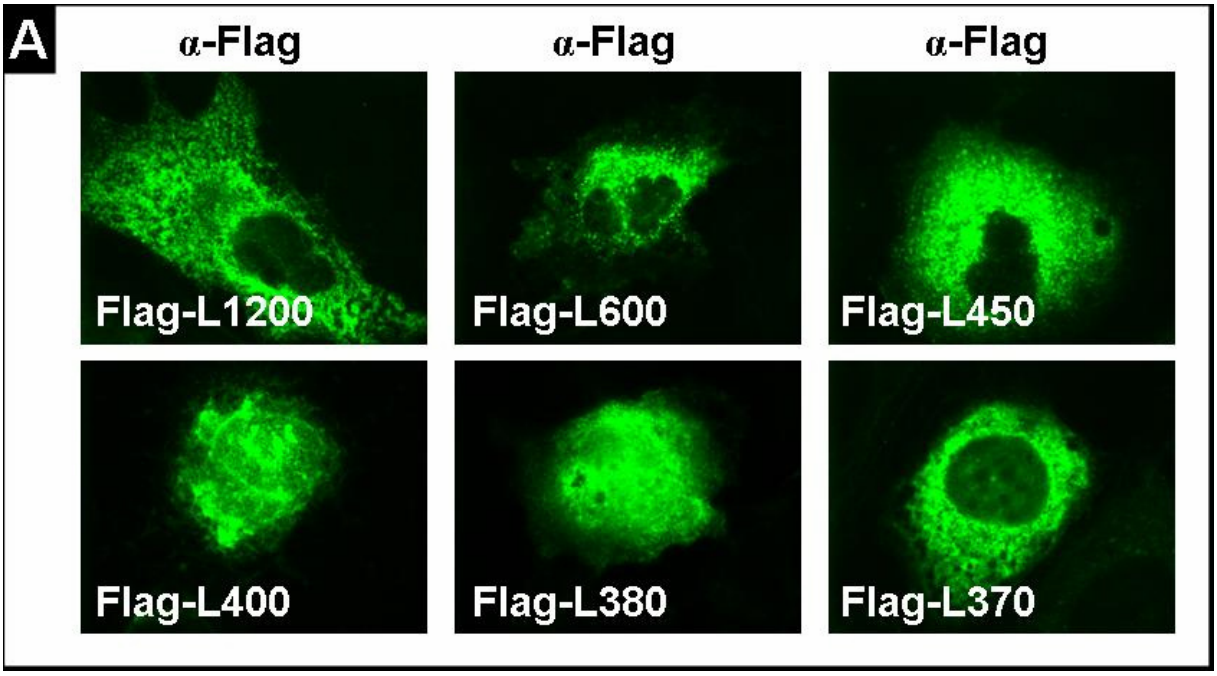
Die über ein Agarosegel gereinigten PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in den Vektor pTM1 ligiert (3.1.9). Von einer Auswahl an Klonen wurden Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab hergestellt (3.1.11) und nach einem analytischen Verdau (3.1.7) durch eine analytische Gelelektrophorese (3.1.5.1) auf den korrekten Einbau der PCR-Fragmente getestet. Plasmid-DNA mit den gewünschten Insertionen wurden in großem Maßstab produziert (3.1.12). Abschließend wurde die klonierte DNA auf Mutationen getestet. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Vorwärtprimer #125 und dem Rückwärtprimer #174, die beide im pTM1-Plasmid nahe der *Multiple Cloning Site* (MCS) binden und in den Bereich der Insertion hineinlesen (3.1.14).

Klonierung mittels in vitro-Mutagenese: Die ortsgerichtete Mutagenese wurde ausschließlich zur Herstellung der größten L-Deletionsmutante pT_EBOVzL1200 angewandt. Dies war erforderlich, da die Amplifikation eines derart großen Sequenzabschnittes mittels herkömmlicher PCR generell eine zu hohe Anfälligkeit für Mutationen hat. Die verwendeten

komplementären Primer wurden so gewählt, dass sie die Sequenz des L-Gens von AS 1190 bis AS 1202 + 2 Guanosine umfassen und zwei Punktmutationen enthalten. Die Mutationen führten im Bereich der AS 1195 zur Erzeugung einer künstlichen BclI Schnittstelle, die in einem späteren Kontrollverdau verwendet wurde, um das neue Fragment auf den Erfolg der *in vitro*-Mutagenese zu überprüfen. Die AS an Position 1199 wurde durch die Substitution zu einem Stopp-Codon mutiert und führte damit zur Herstellung eines trunkierten L-Proteins an definierter Stelle. Die Identifikation positiver Klone erfolgte mittels Restriktionsverdau (3.1.7) und Sequenzierung (Primer F#21.1, F#22.1, #125).

4.2.2 Ko-Lokalisation von NP, VP35 und den L-Deletionsmutanten (IFA)

Die Immunfluoreszenz-Analysen von NP, VP35 und den L-Deletionsmutanten wurden durchgeführt wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben. Zunächst wurde überprüft, ob die hergestellten L-Deletionsmutanten nach Expression in den BSR-T7/5-Zellen ein dem vollständigen L-Protein vergleichbares homogenes Verteilungsmuster aufwiesen. Dies war sowohl bei den einzeln exprimierten C-terminalen L-Deletionsmutanten (Abb. 18) als auch den C- und N-terminalen L-Deletionsmutanten (Abb. 21) der Fall. Auffällig war jedoch die insbesondere in Kernnähe aufgetretene Neigung zur Aggregatbildung der kleinen Fragmente (Flag_EBOVzL100/ 133/ 177/ 333 und Flag_EBOVzL300-600/ 280-600). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass mit zunehmender Verkürzung des L-Proteins der Expressionslevel anstieg. Daher musste die transfizierte DNA-Menge der Größe des eingesetzten Fragments angeglichen werden.



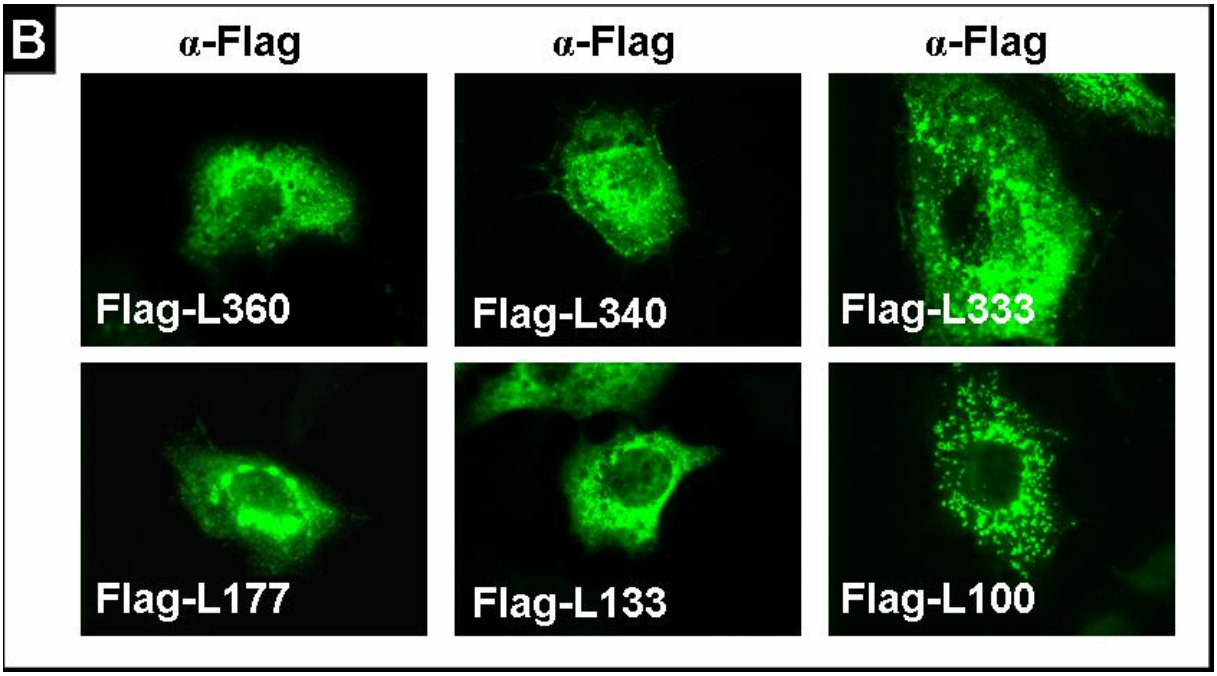


Abb. 18. Einzel-Expression der Flag_EBOVzL-Fragmente (IFA). Immunfluoreszenz-Analyse von transfizierten BSR-T7/5 Zellen und Detektion der L-Fragmente mit dem monoklonalen Maus-Antikörper Anti-Flag® M2 (1:200) und dem Fluor FITC AP F(ab')2 Anti-Maus IgG (H+L) Ziege Antikörper (1:100). (A) L-Fragmente mit intakter VP35-Bindungsdomäne und (B) L-Fragmente mit inkompletter VP35-Bindungsdomäne wie nachfolgend dargestellt.

Im Anschluss erfolgten die Ko-Expressionsstudien mit den L-Deletionsmutanten, wie sie bereits für das vollständige L-Protein in Kapitel 4.1.3 beschrieben wurden. Die EBOVzL-Fragmente wurden jeweils in An- und Abwesenheit des VP35 mit dem NP ko-exprimiert. Das exprimierte NP-Protein bildete dabei unabhängig von der Ko-Expression der anderen beiden Nukleokapsidproteine zytoplasmatische Einschlusskörperchen. In Abwesenheit von VP35 zeigten sämtliche L-Deletionsmutanten ein homogenes Verteilungsmuster, wie man es auch nach solitärer Expression der Proteine finden konnte (Abb. 18). Dies zeigt, dass das L-Protein nicht direkt mit NP interagiert. Eine Re-Lokalisation der L-Deletionsmutanten in die NP-Einschlusskörperchen erfolgte nach Ko-Expression des VP35. Dies gelang jedoch nur, wenn die L-Deletionsmutanten trotz ihres trunkierten Bereiches noch über eine vollständig erhaltene VP35-Bindungsdomäne verfügten. Daher kann die Ko-Lokalisation einer L-Deletionsmutante mit den Einschlusskörperchen des NP auf eine intakte VP35-Bindungsdomäne zurückgeführt werden.
Die Immunfluoreszenz-Analysen ergaben, dass Flag_EBOVzL370 die kleinste C-terminale L-Deletionsmutante ist, die mit den Einschlusskörperchen des NP ko-lokalisierte (Abb. 19). Bereits die Deletion von weiteren 10 AS am C-Terminus (Fragment Flag_EBOVzL360) verhinderte die Ko-Lokalisation. Damit wurde gezeigt, dass die Interaktion mit VP35 über den N-Terminus des L-Proteins erfolgt. Die Bindungsdomäne für das VP35 ist innerhalb der 370 N-terminalen AS des L lokalisiert, wobei die Region zwischen AS 360 und 370 essentiell für die Bindung ist.

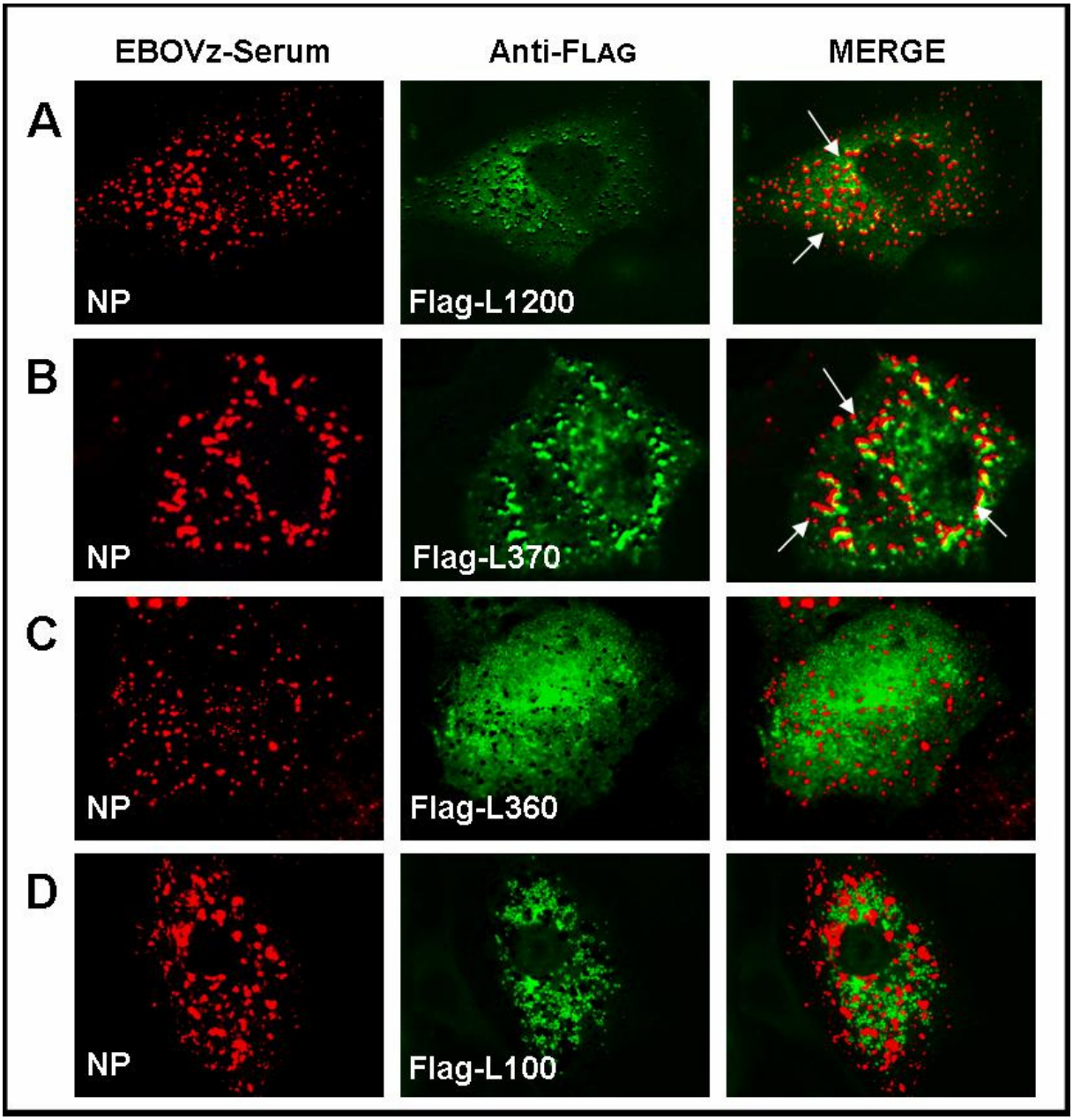


Abb. 19. Ko-Expression der Flag_EBOVzL-Fragmente mit NP und VP35. Immunfluoreszenz-Analyse von mit FuGENE® 6 transfizierten BSR-T7/5 Zellen. Detektion des NP mit einem Ziege-Anti-EBOVz-Serum (1:100) und einem Alexa Fluor® 594 Esel Anti-Ziege AK (1:500); Flag-L Nachweis durch den Anti-Flag® M2-AK (1:200) und dem Fluor FITC donkey anti-mouse AK (1:100). (A-D) Ko-Expression von NP und Flag-L-Deletionsmutanten in Anwesenheit von VP35. (A und B) Ko-Lokalisation der L-Deletionsmutanten als Folge der erhalten gebliebenen Interaktionsfähigkeit mit VP35. (C und D) NP in den typischen intrazellulären Einschlusskörperchen; Flag_L-Deletionsmutanten mit homogener Verteilung. Diesen Deletionsmutanten fehlt die intakte VP35-Bindungsdomäne.

Durch die Testung der L-Fragmente mit deletiertem C-und N-terminalen Bereich stellte sich heraus, dass die ersten 200 AS des N-Terminus des L-Proteins für die Komplexbildung mit VP35 nicht benötigt werden (Abb. 20A und B). Hingegen führte die Deletion von weiteren 100 AS (dies entspricht dem Fragment Flag_EBOVzL300-600) dazu, dass die Ko-Lokalisation des L-Fragments in die Einschlusskörperchen des NPs unterblieb (Abb. 20C und D). Die Interaktion zwischen dem L-Fragment und VP35 fand demnach nicht statt, was darauf hinweist, dass die Mutante keine intakte VP35-Bindungsdomäne besitzt.

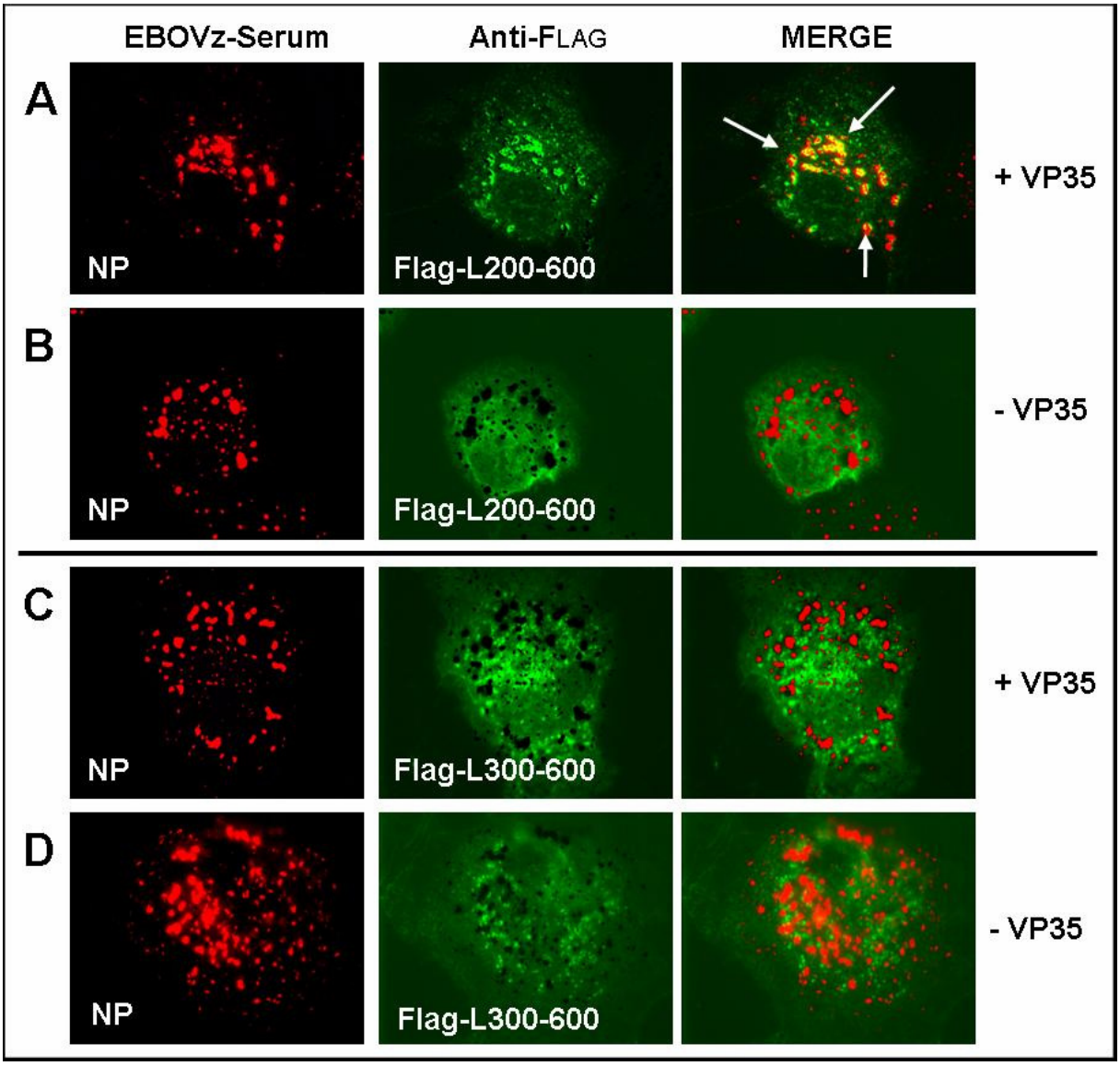


Abb. 20. Ko-Expression der C- und N-terminalen L-Deletionsmutanten mit NP und VP35. Immunfluoreszenz-Analyse von transfizierten BSR-T7/5 Zellen. Die zur Detektion des NP und des Flag-Epitops verwendeten Antikörper sind dem Text zu Abb. 19 zu entnehmen. (A, B) Ko-Expression der Deletionsmutante Flag_EBOVzL200-600 mit NP bzw. NP und VP35. (A) Ko-Lokalisation als Folge der erhalten gebliebenen Interaktionsfähigkeit mit VP35. (C, D) Ko-Expression der Deletionsmutante Flag_EBOVzL300-600 mit NP bzw. NP und VP35. (C) Das Fehlen einer intakten VP35-Bindungsdomäne auf dem L-Protein verhindert die Ko-Lokalisation in den typischen Einschlusskörperchen des NP.

Anschließend wurden mit L-Fragmenten, die zusätzliche Deletionen im N-terminalen Bereich aufwiesen, weitere Untersuchungen durchgeführt. Die längste dieser Mutanten umfasst AS 220 bis 600, die kürzeste AS 280 bis 600 (Abb. 21A-F). Es war trotz vielfacher Versuche nicht gelungen die Deletionsmutante Flag_EBOVzL220-600 zu exprimieren (Abb. 21C), weshalb diese Mutante nicht auf ihre Ko-Lokalisationsfähigkeit getestet werden konnte. In nachfolgend durchgeführten *in vitro* Translationsstudien (Abb. 24A) konnte gezeigt werden, dass diese L-Deletionsmutante an erwarteter Position keine Bande aufwies. Daher ist anzunehmen, dass in diesem Fall entweder ein internes TSS bevorzugt wurde oder die Mutante auf Grund hoher Instabilität abgebaut wurde. Die IF-Analysen aller weiteren L-Deletionsmutanten (Flag_EBOVzL240-600/ 260-600/ 280-600) führten zu dem Ergebnis, dass hier nur eine partielle Ko-Lokalisation vorlag. Das typische Bild einer partiellen Ko-

Lokalisation wird in Abb. 21G am Beispiel der Flag_EBOVzL240-600 L-Deletionsmutante dargestellt.

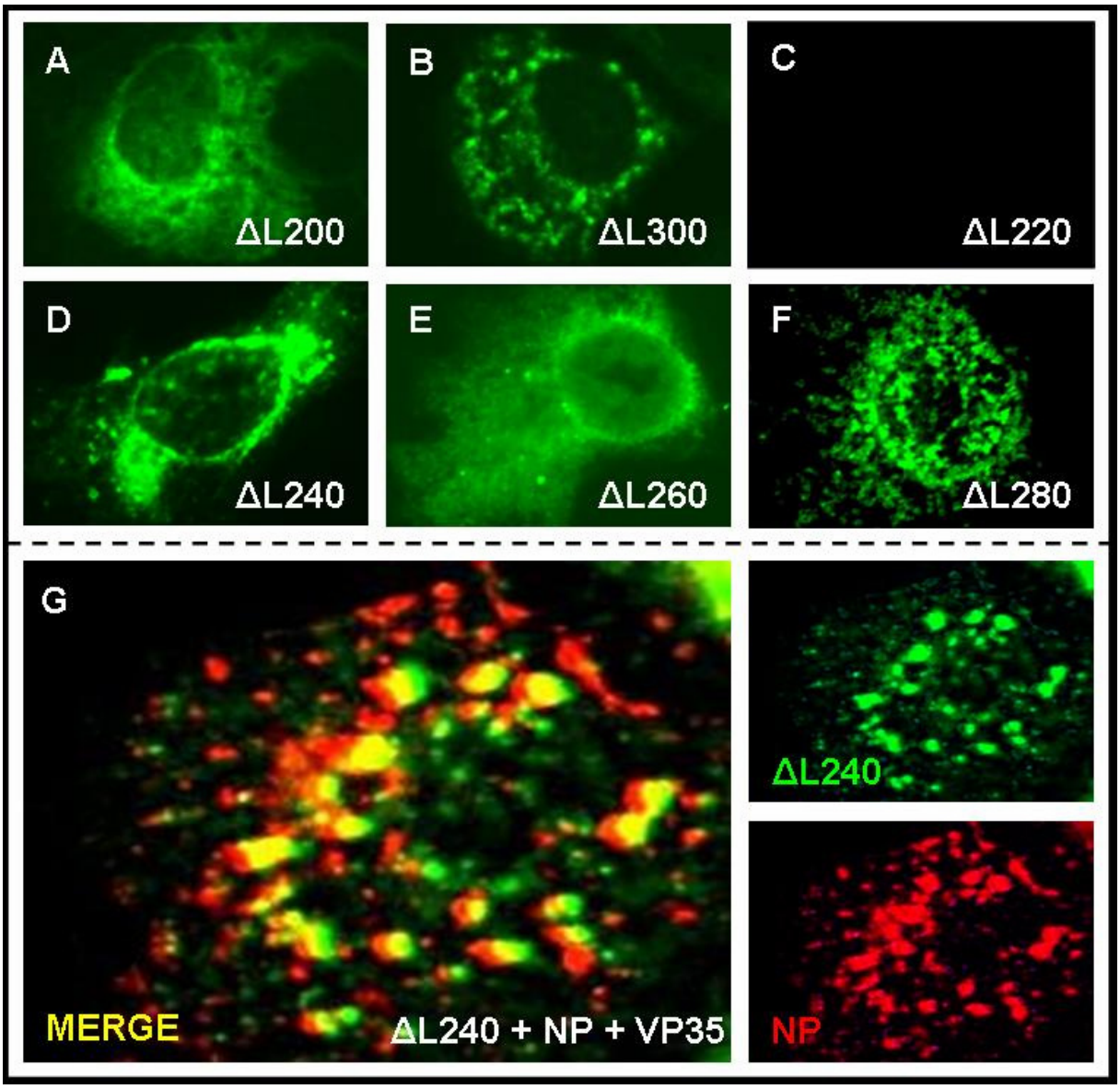


Abb. 21. Einzel-Expression der C- und N-terminalen L-Deletionsmutanten und partielle Ko-Lokalisation von Flag_EBOVzL240-600. Immunfluoreszenz-Analyse von transfizierten BSR-T7/5 Zellen. Die zur Detektion des NP und des Flag-Epitops verwendeten Antikörper sind dem Text zu Abb. 19 zu entnehmen. (A-F) Einzelexpression der C- und N-terminalen L-Deletionsmutanten in folgender Reihenfolge: Flag_EBOVzL200-600/ 300-600/ 220-600/ 240-600/ 260-600/ 280-600. (G) Ko-Expression von Flag_EBOVzL240-600 mit NP und VP35. NP in den typischen intrazellulären Einschlusskörperchen; Ko-Lokalisation der L-Deletionsmutante als Folge der intakten VP35-Bindungsdomäne.

Möglicherweise ist in diesem Bereich (AS 240-280) die Interaktion des L-Proteins mit dem VP35 zwar noch möglich, jedoch instabil. Um die Interaktion zwischen VP35 und dem L-Protein näher zu beleuchten, wurden zusätzlich Ko-Immunpräzipitationsstudien durchgeführt (4.2.3).

4.2.3 Interaktionen des VP35 mit L-Deletionsmutanten (Ko-IP)

Die Ko-Immunpräzipitations-Assays ermöglichten einen direkten Nachweis der Interaktion des L-Proteins und der L-Deletionsmutanten mit dem VP35. Unter Verwendung des TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System wurde eine C-terminal HA-markierte Form des VP35 und das Flag-markierte L-Protein bzw. die L-Deletionsmutanten entweder einzeln oder gemeinsam *in vitro* translatiert und methabolisch mit [^{35}S]-Methionin markiert (3.3.2). Nach einer Präinkubation mit Protein-A-Sepharose erfolgte die Detektion des L-Proteins mit dem monoklonalen Maus-Anti-Flag® M2-AK (1:500) und die Erkennung des VP35 über den monoklonalen Maus-Anti-HA.7-AK (1:5000). Präzipitiert wurde über die Kopplung der AK an Protein-A-Sepharose (3.3.3). Die Ko-Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE (3.3.4.1) aufgetrennt, das Gel getrocknet und mit dem Bio-Imager und dem Computerprogramm TINA 2.09g ausgewertet (3.3.4.4).

Zunächst wurde das vollständige L-Protein hinsichtlich der Interaktionsfähigkeit mit VP35 in diesem Assay getestet (Abb. 22). Dazu wurden die beiden Proteine jeweils einzeln exprimiert (Spur 1 und 2) und ko-translatiert (Spur 3). Anschließend erfolgte die Präzipitation mit dem Anti-HA.7- bzw. dem Anti-Flag M2-AK. Eine unspezifische Detektion des $VP35_{HA}$ durch Kreuzreaktion mit dem Anti-Flag M2-AK (Spur 4) bzw. des Flag_EBOVzL mit dem Anti-HA.7-AK (Spur 7) konnte ausgeschlossen werden. Beide einzeln exprimierten Proteine wurden mit den verwendeten Antikörpern immunpräzipitiert (Spur 5 und 6). Unter spezifischer Fällung des Flag_EBOVzL mit dem Anti-Flag M2 AK wurde $VP35_{HA}$ ko-sedimentiert, was die Interaktion beider Proteine zeigt (Spur 8). Der Nachweis über die spezifische Fällung des $VP35_{HA}$ mit dem Anti-HA.7-AK verlief jedoch negativ. Flag_EBOVzL konnte als Ko-Immunpräzipitat nicht nachgewiesen werden (Spur 9). Möglicherweise liegt die Menge des ko-immunpräzipitierten L-Proteins unterhalb der Nachweisgrenze, denn auch das präzipitierte VP35-Protein liegt in diesem Ansatz in nur geringer Menge vor.

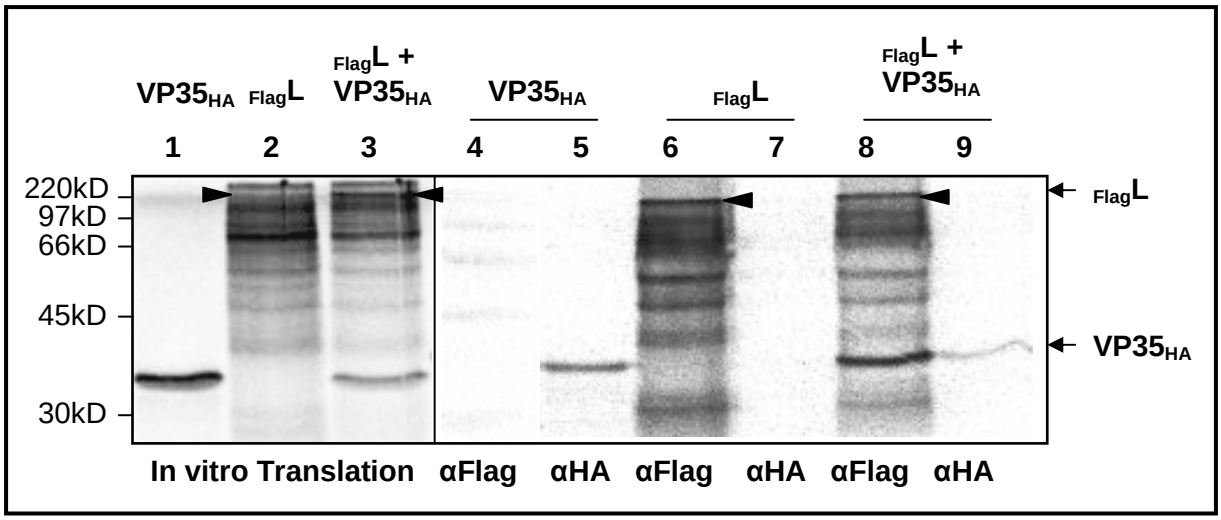
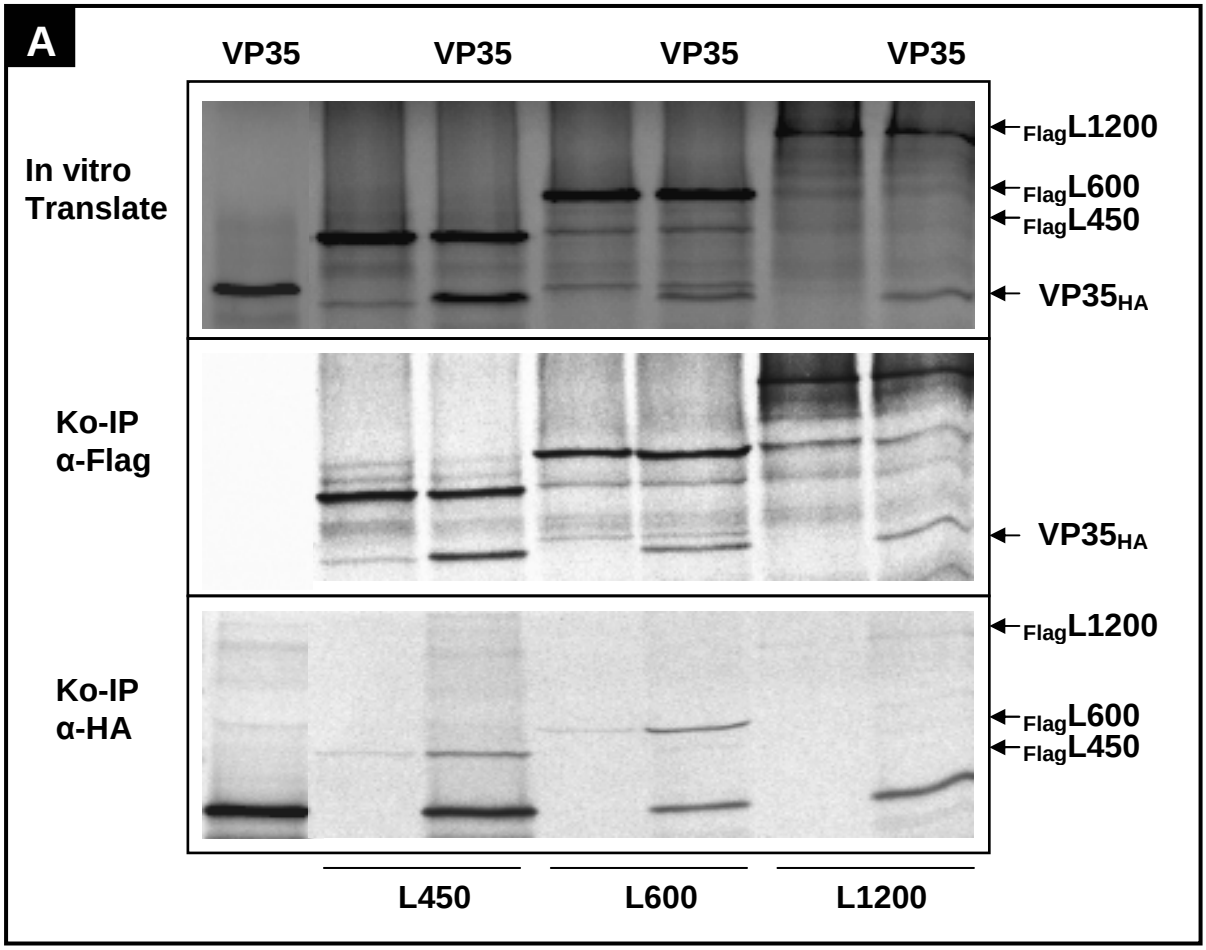


Abb. 22. Interaktion des Flag_EBOVzL mit $VP35_{HA}$. Flag_EBOVzL und $VP35_{HA}$ wurden mittels des TNT® T7 Quick Coupled Retikulozytenlysat-Systems ko-exprimiert und metabolisch mit [^{35}S]-Methionin markiert. Nach der *in vitro* Translation folgte eine Ko-Immunpräzipitation mit einem Anti-Flag M2-AK oder einem Anti-HA.7-AK. 10 µl des Translations-Reaktions-Gemischs und der Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE separiert und mittels BioImager-Analyse visualisiert. Um Kreuzreaktionen der AK auszuschließen, wurden Flag_EBOVzL und $VP35_{HA}$ einzeln exprimiert und mit den angezeigten AK präzipitiert. Durch die Nutzung zusätzlicher, interner Translationsinitiations-Stellen des L-Proteins wurden neben dem Volle-Länge-Produkt (schwarzer Pfeilkopf) auch kleinere Fragmente synthetisiert. Die jeweils exprimierten Proteine sind oberhalb, die verwendeten AK unterhalb der Autoradiographie aufgeführt. Links sind die Positionen des mitgeführten Größenmarkers, rechts die Positionen der detektierten Proteine angezeigt.

Nachfolgend wurden sämtliche Flag-markierten L-Deletionsmutanten gemeinsam mit dem HA-markierten VP35 als potentiellen Interaktionspartner *in vitro* translatiert. Die Ko-Immunpräzipitations-Analysen der C-terminalen L-Deletionsmutanten sind in Abb. 23 dargestellt, die Ergebnisse für die C- und N-terminal deletierten L-Fragmente sind der Abb. 24 zu entnehmen. Alle L-Fragmente wurden mit den verwendeten AK auf eventuell bestehende Kreuzreaktionen getestet. Für den Anti-Flag® M2-AK ergaben sich keine Unspezifitäten, der Anti-HA.7-AK hingegen zeigte zumeist eine schwache Detektion der singulär exprimierten $_{Flag}$L-Fragmente (Abb 23A, unten). Dies trat vor allem bei starker Expression der Proteine auf. Darüber hinaus lag insbesondere die Menge an größeren, ko-immunpräzipitierten $_{Flag}$L-Fragmenten häufig unterhalb der Nachweisgrenze. Demzufolge konzentrierten sich die Untersuchungen primär auf den Nachweis mit dem Anti-Flag® M2-AK.

Die mittels Ko-Immunpräzipitation gewonnenen Daten sind mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzstudien bezüglich der Interaktionsfähigkeit des L-Proteins mit dem VP35 identisch. Das $VP35_{HA}$ ko-sedimentiert nicht nur bei Präzipitation der Deletionsmutanten $_{Flag}$L1200, $_{Flag}$L600 und $_{Flag}$L450 (Abb. 23A) mit dem Anti-Flag® M2-AK, sondern auch mit den Fragmenten $_{Flag}$L400 und $_{Flag}$L380 (Abb. 23B). Bei Ko-Expression der Fragmente $_{Flag}$L360 und $_{Flag}$L340 (Abb. 23B) sowie aller kleineren Fragmente (Daten nicht gezeigt) mit $VP35_{HA}$, konnte das $VP35_{HA}$ nicht ko-immunpräzipitiert werden. Daher sind diese Fragmente nicht mehr in der Lage mit $VP35_{HA}$ zu interagieren. Von besonderem Interesse ist Fragment $_{Flag}$L370, da es möglicherweise den Grenzbereich der VP35-Bindungsdomäne kennzeichnet (Abb. 23C). Die Ko-Lokalisation des $_{Flag}$L370 in den Einschlusskörperchen des NP in der Immunfluoreszenz spricht für eine intakte VP35-Bindungsdomäne (Abb. 19B). Dennoch erbrachte die Ko-Immunpräzipitations-Analyse keinen eindeutigen Nachweis für eine

Interaktion zwischen dieser L-Deletionsmutante und dem VP35. Der Test wurde unter Verwendung des Anti-Flag® M2-AK und zusätzlich des Anti-HA-AK, die beide bereits an Agarose-gekoppelt vorlagen, wiederholt (Abb. 23C). Wiederum diente das $_{Flag}$L360 als Negativkontrolle und das $_{Flag}$L380 als Positivkontrolle. Mit der M2-Agarose konnte lediglich bei Ko-Expression mit dem $_{Flag}$L380 das VP35 präzipitiert werden (Spur 7, Mitte). Allerdings befindet sich auf Höhe der VP35-Bande eine Abbaubande des $_{Flag}$L380 (Spur 6, Mitte). Die Komplexbildung mit VP35 führt wahrscheinlich zur Stabilisierung des L-Proteins, weshalb das als Doppelbande sichtbare Abbauprodukt des $_{Flag}$L380 bei Ko-Expression mit VP35 nicht detektierbar war. Der Interaktionsnachweis mit dem Agarose-gekoppelten Anti-HA-AK fiel deutlicher aus (Spur 7, unten). Im Gegensatz dazu konnte für das $_{Flag}$L360 weder mit der M2-Agarose (Spur 3, Mitte) noch mit der HA-Agarose (Spur 3, unten) die Interaktion mit dem VP35 gezeigt werden. Die Kontrollen waren somit verwendbar. Für das zu untersuchende $_{Flag}$L370 fiel der Nachweis mit der M2-Agarose (Spur 5, Mitte) eindeutig negativ aus, wohingegen bei Einsatz der HA-Agarose (Spur 5, unten) geringe Mengen des $_{Flag}$L370 präzipitiert werden konnten. In Verbindung mit dem positiven Interaktionsnachweis aus der Immunfluoreszenz-Analyse sprechen diese Daten dafür, dass es sich hierbei um eine abgeschwächte Bindung von VP35 an das $_{Flag}$L370 handelt.



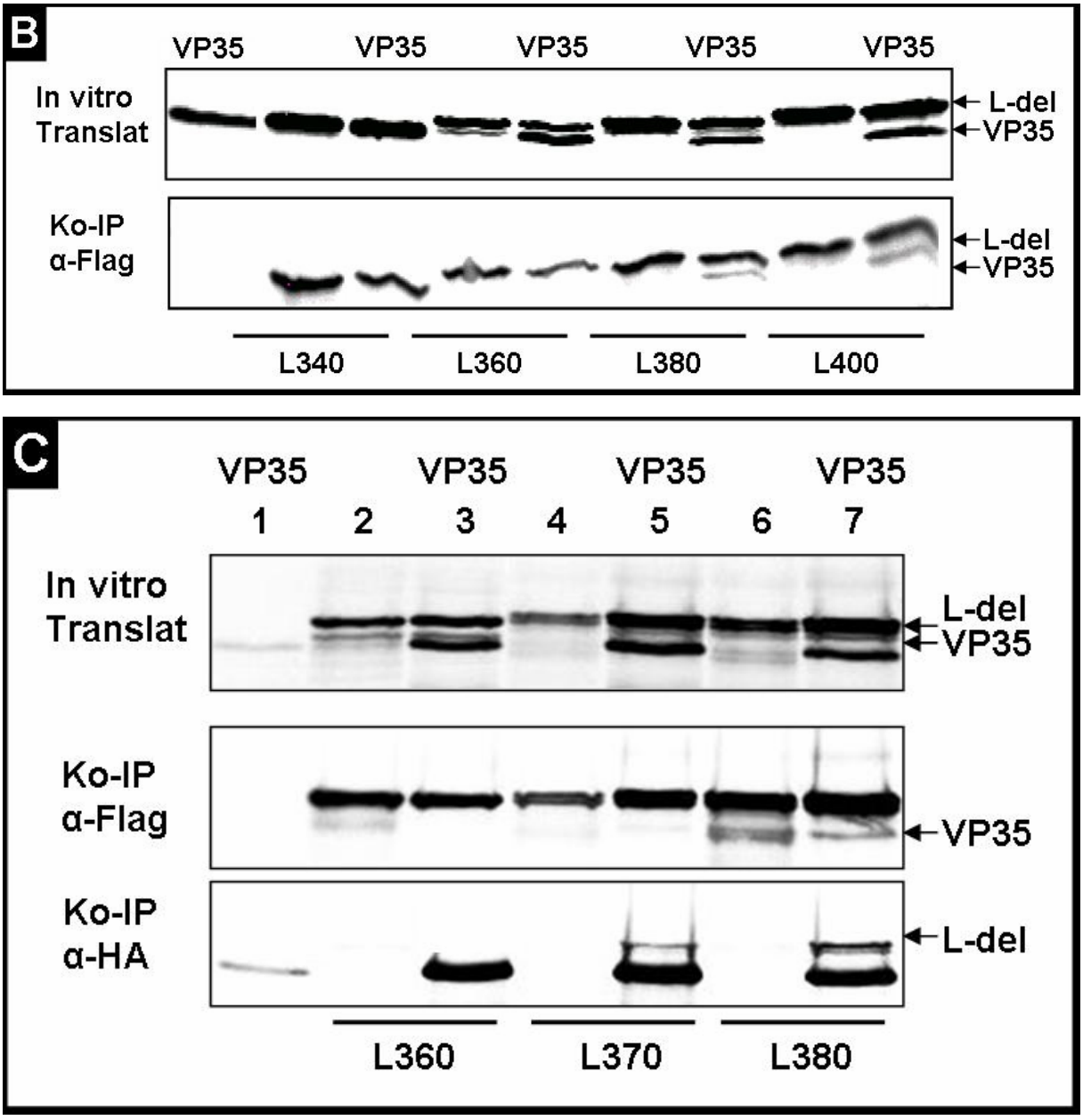


Abb. 23. Interaktion der C-terminalen $_{Flag}$L-Deletionsmutanten mit VP35$_{HA}$. $_{Flag}$L-Deletionsmutanten und VP35$_{HA}$ wurden mittels des TNT® T7 Quick Coupled Retikulozytenlysat-Systems ko-exprimiert und metabolisch mit [^{35}S]-Methionin markiert. Nach der *in vitro* Translation folgte eine Ko-Immunpräzipitation mit einem Anti-Flag M2-AK oder einem Anti-HA-AK. 10 µl des Translations-Reaktions-Gemischs und der Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE separiert und mittels Bio-Imager-Analyse visualisiert. Das exprimierte VP35$_{HA}$ ist oberhalb, die jeweilige $_{Flag}$L-Deletionsmutante unterhalb der Graphik angezeigt. Die verwendeten AKs sind links neben der Graphik vermerkt, die Positionen der detektierten Proteine rechts neben der Autoradiographie aufgeführt.

Die Einzel- und Ko-Expression der C- und N-terminal deletierten L-Mutanten gelang mit Ausnahme des Fragments Flag_EBOVzL220-600 (Abb. 24A). Die erwartete Position dieser L-Deletionsmutante wurde mit schwarzen Balken gekennzeichnet (Spur 4 und 5 von links). Weder durch die Ko-Immunpräzipitation mit dem Agarose-gekoppelten Anti-Flag® M2-AK noch mit dem Agarose-gekoppelten Anti-HA-AK konnten die jeweils ko-exprimierten Proteine präzipitiert werden (Abb. 24B). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass keine der C- und N-terminal deletierten Mutante in der Lage ist mit VP35 zu interagieren. Jedoch hatten die Immunfluoreszenz-Analysen für die L-Deletionsmutante Flag_EBOVzL200-600 eine

Interaktion mit dem VP35 bestätigt (4.2.2). Für das Fragment Flag_EBOVzL280-600 wurde zumindest eine partielle Ko-Lokalisation und damit eine schwache bzw. instabile Interaktion mit dem VP35 detektiert. Daher ist anzunehmen, dass eine N-terminale Deletion des L-Proteins von mehr als 200 AS zu einer abgeschwächten Interaktion zwischen L und VP35 führt. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz-Analyse war es mit dem Ko-Immunpräzipitations-Assay nicht möglich diese schwachen Wechselwirkungen zwischen den ko-exprimierten Proteinen zu detektieren.

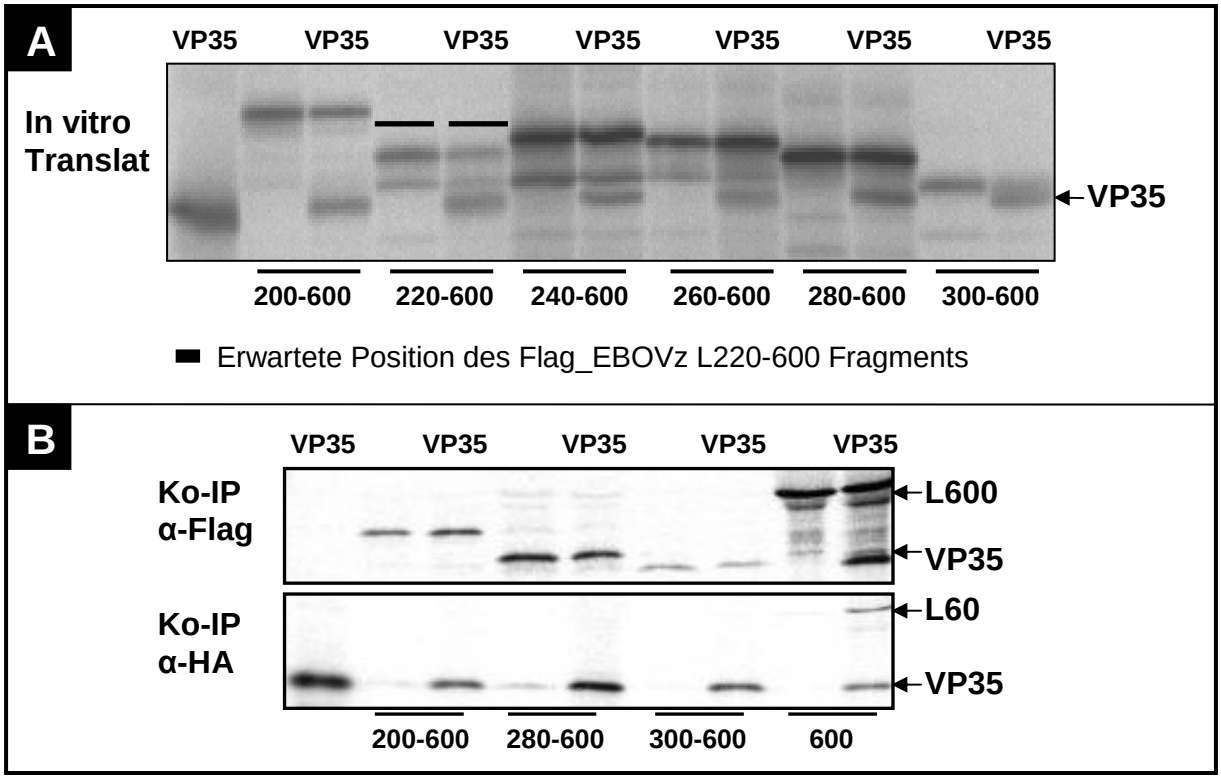


Abb. 24. Interaktion der C- und N-terminal deletierten $_{Flag}$L-Fragmente mit VP35$_{HA}$. $_{Flag}$L-Deletionsmutanten und VP35$_{HA}$ wurden mittels des TNT® T7 Quick Coupled Retikulozytenlysat-Systems ko-exprimiert und metabolisch mit [^{35}S]-Methionin markiert (A). Nach der *in vitro* Translation folgte eine Ko-Immunpräzipitation mit einem Anti-Flag M2-AK oder einem Anti-HA-AK (B). 10 µl des Translations-Reaktions-Gemischs und der Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE separiert und mittels Bio-Imager-Analyse visualisiert. Das exprimierte VP35$_{HA}$ ist oberhalb, die jeweilige $_{Flag}$L-Deletionsmutante unterhalb der Graphik angezeigt. Die verwendeten AKs sind links neben der Graphik vermerkt, die Positionen der detektierten Proteine rechts neben der Autoradiographie aufgeführt.

4.2.4 Zusammenfassung Kapitel 4.2

Die beiden Nukleokapsidproteine L und VP35 interagieren miteinander und bilden den aktiven RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplex. Um die Bindungsdomäne für das VP35 auf dem L-Protein zu identifizieren, wurden Immunfluoreszenz-Analysen und ergänzend Ko-Immunpräzipitations-Assays durchgeführt. Die Interaktionsstudien wurden mit einer Reihe N-terminal Flag-markierter L-Deletionsmutanten durchgeführt, die entsprechend des jeweils aktuellen Kenntnisstandes kloniert wurden. Dadurch erfolgte eine stufenweise Eingrenzung der Interaktionsdomäne.

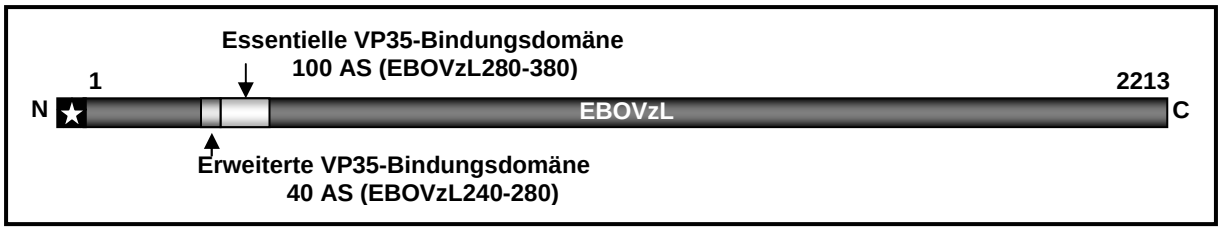


Abb. 25. Struktur der VP35-Bindungsdomäne auf dem EBOVzL. Dargestellt ist die Position der Bindungsdomäne für VP35 auf dem 2213 AS umfassenden L-Protein. Am N-Terminus befindet sich das Flag-Epitop (schwarzer Kasten mit weißem Stern). Die essentielle VP35-Bindungsdomäne besteht aus 100 AS und umfasst die AS 280-380, die erweiterte VP35-Bindungsdomäne erstreckt sich mit 40 AS über die AS 240-280 auf dem N-Terminus des L-Proteins.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindungsdomäne für das VP35 im N-terminalen Bereich des L-Proteins lokalisiert ist und die AS 280-380 umfasst (Abb. 25). Dieser Bereich kennzeichnet die essentielle VP35-Bindungsdomäne, da L-Fragmente mit einer Ausdehnung über diese Region hinweg sowohl in der Immunfluoreszenz-Analyse als auch im Ko-Immunpräzipitations-Assay eine eindeutige Interaktion mit VP35 zeigten. Durch die zusätzliche Interaktion des VP35 mit einem erweiterten Bereich der charakterisierten VP35-Bindungsdomäne erfolgte die Stabilisierung des Polymerase-Komplexes. Die erweiterte VP35-Bindungsdomäne umfasst 40 AS und erstreckt sich von AS 240-280 auf dem N-Terminus des L-Proteins (Abb. 25). Die Kartierung dieses Bereiches gelang durch L-Fragmente, die in Immunfluoreszenz-Analysen eine partielle Ko-Lokalisation mit NP-Einschlusskörperchen zeigten.

4.3 Untersuchungen zur Homo-Oligomerisierung des EBOVzL

Die Fähigkeit filoviraler Proteine durch Selbstaggregation Multimere zu bilden, scheint die Voraussetzung für deren Funktionalität zu sein. Nachgewiesen wurde dies u. a. bereits für das VP35 des MARV (Möller, et al., 2005). Eine Multimerisierungsdomäne für das L-Protein ist bisher nicht bekannt. Allerdings konnte bereits für verschiedene Negativstrang-RNA-Viren gezeigt werden, dass das L-Protein Homo-Oligomere bildet, die für die Polymeraseaktivität essentiell sind (Cevik, et al., 2003, Sanchez and de la Torre, 2005, Smallwood and Moyer, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob das L-Protein des EBOV zur Homo-Oligomerisierung fähig ist. Ferner sollte im Falle einer L-L-Interaktion die Multimerisierungsdomäne lokalisiert werden. Durch diese Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die Bildung des aktiven Polymerasekomplexes von der Homo-Oligomerisierung des L-Proteins abhängig ist.

4.3.1 Klonierung eines HA-Epitops an den N-Terminus des L-Proteins

Für die Untersuchungen zur L-L-Oligomerisierung war es nötig mit zwei unterschiedlich Epitop-markierten L-Proteinen zu arbeiten, da kein AK für die direkte Detektion des L-Proteins zur Verfügung stand. Das bisher verwendete N-terminale Flag-Epitop sollte daher durch ein HA-Epitop ausgetauscht werden. Das HA-Epitop stammt von dem humanen Influenza-Hämagglutinin und ist ein aus neun AS bestehendes Peptid. Da ein Start-Codon bei der Einklonierung vorgeschaltet wurde, besteht die N-terminale HA-Markierung des L-Proteins aus zehn AS und wird durch folgende Sequenz kodiert:

5’- *atg* tat cca tat gat gtt cca gat tat gca -3’

Der Austausch des N-terminalen Flag-Epitops gegen ein HA-Epitop wurde nur an dem Konstrukt des vollständigen L-Gens pT_Flag_EBOVzL und den L-Genfragmenten pT_Flag-EBOVzL1200/ 600 vorgenommen. Die Deletion des Flag-Epitops und die Insertion des HA-Epitops erfolgten über die Restriktionsschnittstelle *Not*I (Abb. 15).

Klonierung mittels Primer-Annealing: Die Herstellung Epitop-markierter Proteine erfolgte über die Methode des sog. Primer-Annealing (3.1.4). Hierzu wurden die beiden zueinander komplementären Oligonukleotide #1733 und #1734 verwendet (Tab. 7). Beide Primer enthalten die Sequenz des HA-Epitops mit einem vorgeschalteten Start-Codon und sind von der Sequenz der *Not*I-Schnittstelle umrahmt.

CC-Nr.	Name	Ausgangskonstrukt	Schnittstelle	Primerpaar
ML-16/ 05	pT_HA_EBOVzL	pT_Flag_EBOVzL	NotI	#1733 - #1734
ML-23/ 05	pT_HA_EBOVzL1200	pT_Flag_EBOVzL1200	NotI	#1733 - #1734
ML-22/ 05	pT_HA_EBOVzL600	pT_Flag_EBOVzL600	NotI	#1733 - #1734

Tab. 7. N-terminal HA-markierte L-Proteine des EBOVz. Die Clone-Chart-Nummer (CC-Nr.) setzt sich zusammen aus den Initialen des Erzeugers sowie der Klon-Nr. und dem Jahr der Herstellung. Die Bezeichnung der Klone beinhaltet den Vektor (pTM1), das Epitop (Flag) den Spenderorganismus (EBOVz) sowie den N-terminalen Bereich des L-Proteins. Die Primer sind mit internen Nummern bezeichnet.

Nach der Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide (3.1.4) wurden diese mittels Ethanol-Fällung aufgereinigt und ankonzentriert (3.1.6.4). Die hybridisierten Primer mussten nicht geschnitten werden, da sticky ends bereits vorhanden waren. Das jeweilige Ausgangskonstrukt (Tab. 7) wurde mit dem Restriktionsenzym *Not*I geschnitten (3.1.7), um das Flag-Epitop zu entfernen und das HA-Epitop in den Zielvektor zu klonieren (3.1.9). Die klonierte DNA wurde mit dem Vorwärtsprimer #125 sequenziert und so auf Mutationen und/ oder ein mehrfach inseriertes HA-Epitop getestet (3.1.14). Klone mit korrektem Einbau des HA-Epitops wurden in großem Maßstab produziert (3.1.12).

4.3.2 Einfluss der N-terminalen Markierung auf die Polymerase-Aktivität

Um auszuschließen, dass die N-terminale Markierung des L-Proteins zu dessen Inaktivierung führt (z.B. durch Fehlfaltungen und damit verbundenen Konformationsänderungen des Proteins), wurden die markierten L-Proteine zunächst auf ihre enzymatische Aktivität hin getestet. Die Untersuchung erfolgte mittels des artifiziellen EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystems, wobei das Reporterprotein CAT über dessen enzymatische Aktivität nachgewiesen wurde. Der Versuch wurde in subkonfluenten (50-70%) BSR-T7/5 Zellen, wie unter 3.3.5.1 beschrieben, durchgeführt. Im Kontrollansatz (Negativkontrolle; -EBOVzL) wurde das L-Plasmid nicht transfiziert, so dass kein enzymatisch aktives CAT-Protein synthetisiert werden konnte. Die Testansätze (+HA-EBOVzL; +Flag-EBOVzL; +Flag-EBOVzL1200) wurden anstatt mit dem für das EBOVzL kodierenden Plasmid mit dem Plasmid der jeweiligen Epitop-markierten Variante des L-Proteins bzw. dem für die C-terminal verkürzten Deletionsmutanten kodierenden Plasmid transfiziert. Nach erfolgtem CAT-Assay wurden acetyliertes und nicht acetyliertes radioaktives Chloramphenicol in einem BioImager-Analyzer-BAS-1000 ausgelesen (Abb. 26A). Nach der quantitativen Auswertung der Daten mit dem Programm TINA2.09g wurden die erhaltenen Werte graphisch dargestellt (Abb. 26B).

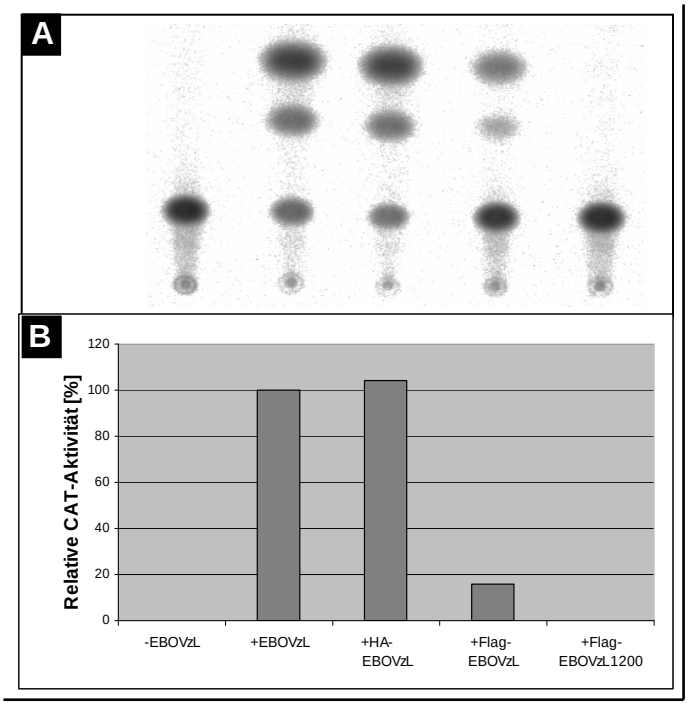


Abb. 26. Einfluss einer N-terminalen Epitop-Markierung auf die Aktivität der Polymerase L des EBOVz. (A) Dünnschichtchromatographie von radioaktivem Chloramphenicol. BHK-T7/5 Zellen wurden mittels FuGENE® 6 mit Plasmiden, die für die Polymerase L in unmarkierter und Epitop-markierter Form kodieren (je 1 µg) transfiziert. Zusätzlich wurden jeweils die Plasmide, die für NP, VP35 und VP30 kodieren, sowie das Minigenom 3E-5E transfiziert. Der Versuch wurde wie unter 3.3.5.1 beschrieben durchgeführt. Spur 1: Kontrollansatz ohne EBOVzL; Spur 2: Kontrollansatz mit EBOVzL; Spur 3-5: Testansätze mit HA-EBOVzL, Flag-EBOVzL und Flag-EBOVzL1200. (B) Graphische Darstellung der CAT-Aktivität. Der gemessene Chloramphenicol-Umsatz der Positivkontrolle (Spur 2) wurde gleich 100% gesetzt.

Die in Abb. 26 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass durch eine N-terminale Markierung des L-Proteins mit dem HA-Epitop keine Veränderung in der Replikations- und Transkriptions-Aktivität der Polymerase L auftritt. Während bei dem N-terminal Flag-markierten L-Protein noch eine enzymatische Aktivität von 16% zu detektieren war, führte die zusätzliche Deletion des C-Terminus zur vollständigen Inaktivierung der Polymerase. Damit wurde zum einen die funktionelle Bedeutung des C-terminalen Bereichs des L-Proteins für die enzymatische Aktivität belegt, zum anderen wurde der Einfluss einer Epitop-Markierung veranschaulicht. Während das HA-Epitop keinerlei Einfluss auf die Polymeraseaktivität zeigte, konnte für das Flag-Epitop eine erhebliche Verminderung der enzymatischen Aktivität des L-Proteins ermittelt werden.

4.3.3 Die Instabilität des EBOVz-L-Proteins bei Einzel-Expression

Für die RNA-Polymerase des Sendai-Virus wurde bereits gezeigt, dass die Stabilität des L-Proteins von der Ko-Expression des viralen P-Proteins, einem Analogon des EBOVzVP35, abhängig ist. Dabei unterstützt das P-Protein möglicherweise die Faltung des L und verhindert so den Abbau der gebildeten L Oligomere (Horikami, et al., 1992, Horikami, et al., 1997). Es war davon auszugehen, dass sich diese Beobachtungen auf das L-Protein des EBOVz übertragen lassen. Deshalb sollte im Vorfeld der Untersuchungen zur L-L-Interaktion die mögliche Instabilität des L-Proteins des EBOVz geklärt werden. Durch die Degradation des L-L-Komplexes könnte die Detektion erschwert oder der Nachweis im ungünstigsten Fall experimentell nicht möglich sein.

Um die Stabilität des L-Proteins des EBOVz zu überprüfen, wurden das HA-markierte vollständige L und parallel die Deletionsmutante HA_EBOVzL600 jeweils einzeln exprimiert. Dazu wurden subkonfluente (50-70%) BSR-T7/5 Zellen mit FuGENE® 6 transfiziert. Es wurden je 3 µg pT_HA_EBOVzL bzw. pT_HA_EBOVzL600 eingesetzt. Um den Expressionslevel der T7-RNA-Polymerase in den Zellen zu erhöhen, wurde zusätzlich pro Ansatz 1 µg des Plasmids pCAGGS-T7 transfiziert, welches für die T7-RNA-Polymerase

kodiert. Die Gewinnung der Zelllysate (3.2.4) erfolgte 24h, 36h und 48h nach Transfektion. Die gewonnenen Zelllysate wurden auf einem 8%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.3.4.1). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die spezifische Proteindetektion (3.3.4.3). Der Nachweis wurde unter Verwendung des monoklonalen Maus-AK HA.11 als Erst-AK und eines Peroxidase (POD)-gekoppelten Anti-Maus-AK aus Ziege als Zweit-AK geführt. Der eingesetzte biotinylierte Protein-Marker (1 µl) wurde durch den Horseradish-Peroxidase (HRP, Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelten Anti-Biotin AK (1:20.000) visualisiert. Für die Detektion wurde das SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat nach Herstellerangaben verwendet. Die erhaltenen Daten (Abb. 27) haben die vermutete Instabilität des EBOVzL bestätigt.

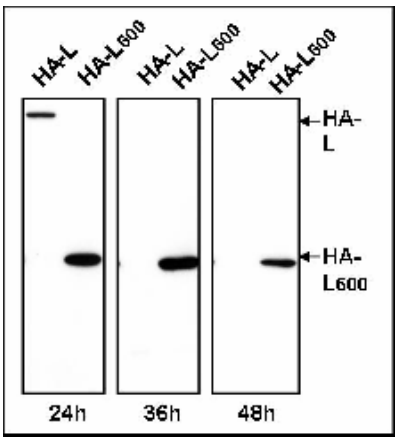


Abb. 27. Instabilität des L-Proteins des EBOVz. Subkonfluente (50-70%) BSR-T7/5 Zellen wurden mittels FuGENE® 6 transfiziert. Die Plasmide pT_HA_EBOVzL (3 µg) und pT_HA_EBOVzL600 (3 µg) wurden jeweils mit dem Plasmid pCAGGS-T7 (1 µg) ko-transfiziert. Die Gewinnung der Zelllysate erfolgte 24h, 36h und 48h nach Transfektion. Die Zelllysate wurden über ein 8%-iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Maus-AK HA.11 (1:10.000) und eines POD-gekoppelten Anti-Maus-AK aus Ziege (1:40.000).

Nach 24h war die Detektion beider L-Proteine möglich, obwohl bereits zu diesem Zeitpunkt die wesentlich schwächere Expression des vollständigen L-Proteins erkennbar war. Zu späteren Zeitpunkten (36h, 48h) konnte das L-Protein nicht mehr detektiert werden. Die L-Deletionsmutante war aufgrund der erheblich höheren Expressionsrate auch 48h nach Transfektion noch in detektierbarer Menge vorhanden, präsentierte sich jedoch als abgeschwächte Bande. Dies ist möglicherweise auf eine Degradation des einzeln exprimierten L-Proteins zurückzuführen. Die Nachweisbarkeit des Proteins ist somit vom Expressionslevel und dem Zeitintervall zwischen Transfektion und Zellernte abhängig, wobei der Expressionlevel für ein verkürztes L-Protein beträchtlich erhöht ist.

4.3.4 Die Stabilisierung des L-Proteins

Um zu untersuchen, ob das L-Protein von anderen EBOV-spezifischen Nukleokapsidproteinen stabilisiert wird, wurden Ko-Expressionsversuche durchgeführt. Als Kontrolle wurde dabei ein nicht virales Protein, die *Firefly*-Luziferase, mit dem L-Protein ko-translatiert. Die einzelnen Nukleokapsidproteine (0,5 µg pT/NP_{EBO}; 0,7 µg pT/$VP35_{EBO}$; 0,5 µg pT/$VP30_{EBO}$), die L-Deletionsmutante (1,5 µg pT_HA_EBOVzL600) sowie die *Firefly*-Luziferase (0,7 µg 3E-5E_F-Luz) wurden mittels des TNT® T7 Quick Coupled Transcription/ Translation Kits (3.3.5.3) mit dem L-Protein (0,6 µg pT_Flag_EBOVzL) ko-translatiert. Die verwendeten Plasmidmengen wurden so austitriert, dass die Expressionsrate der jeweils ko-exprimierten Proteine annähernd gleich war. Die radioaktiven Proben wurden mittels SDS-PAGE (3.3.4.1) aufgetrennt und mit dem BioImager (3.3.4.4) analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 28 dargestellt.

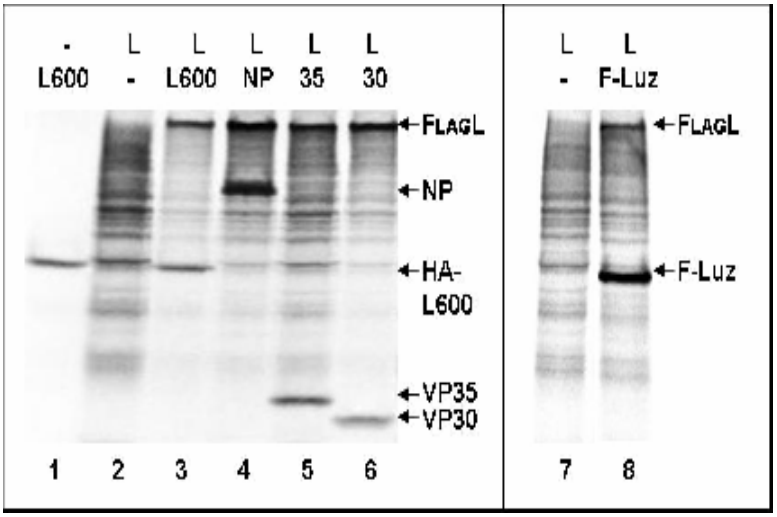


Abb. 28. Stabilisierung des L-Proteins des EBOVz. Die $_{HA}$L-Deletionsmutante (L600; Spur 1) und das Volle-Länge $_{Flag}$L (L; Spur 2, 7) wurden jeweils einzeln und ko-exprimiert (Spur 3) sowie das Volle-Länge $_{Flag}$L mit den Nukleokapsidproteinen NP, VP35 und VP30 (Spur 4-6) oder der *Firefly*-Luziferase (*F*-Luz; Spur 8) mittels des TNT® T7 Quick Coupled Retikulozytenlysat-Systems ko-exprimiert und metabolisch mit [^{35}S]-Methionin markiert. 10 µl des Translations-Reaktions-Gemischs wurden über SDS-PAGE (10% Gele) separiert und mittels Bio-Imager-Analyse visualisiert. Die exprimierten Proteine sind oberhalb, die jeweiligen Spuren unterhalb der Graphik angegeben. Die Positionen der detektierten Proteine sind rechts neben der Autoradiographie aufgeführt.

In Spur 1 ist die einzeln exprimierte L-Deletionsmutante dargestellt, die als distinkte Bande detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte das einzeln exprimierte vollständige L-Protein keine distinkte Bande auf erwarteter Höhe bei 220 kDa (Spur 2, 7). Die detektierten niedermolekularen Banden könnten Abbaubanden des L-Proteins sein oder auf die Nutzung interner Translationsstarts des L-Proteins hinweisen. Für die Ko-Expression des L-Proteins mit einer L-Deletionsmutante (Spur 3) oder mit anderen Nukleokapsidproteinen (Spur 4-6) wurde stets das gleiche Resultat erzielt. Das L-Protein konnte nach Ko-Expression mit anderen Proteinen als distinkte Bande bei 220 kDa detektiert werden. Überraschenderweise führte jedoch auch die Ko-Expression des L-Proteins mit einem nicht viralen Protein zur Stabilisierung der Proteinbande bei 220 kDa (Spur 8). Diese Ergebnisse sprechen für eine generelle Stabilisierung des L-Proteins durch Ko-Expression mit einem beliebigen Protein. Da der Einfluss der Nukleokapsidproteine NP, VP35 und VP30 sowie der *Firefly*-Luziferase auf die L-L-Interaktion nicht bekannt ist und eine Stabilisierung bereits durch Ko-Expression mit einer L-Deletionsmutante erreicht werden konnte, wurde bei den Interaktionsstudien zur Aufklärung der Homo-Oligomerisierung des L-Proteins auf die Ko-Expression weiterer Proteine verzichtet (4.3.5).

4.3.5 Die Homo-Oligomerisierung des EBOVzL

Studien zur Homo-Oligomerisierung des L-Proteins des Sendai-Virus (SeV) haben bereits gezeigt, dass die L-L-Interaktion durch den N-Terminus des Proteins vermittelt wird (Smallwood, et al., 2002). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Multimerisierungsdomäne für das L-Protein des EBOVz ebenfalls im N-terminalen Bereich des Proteins vermutet. Die Untersuchungen zur L-L-Interaktion wurden unabhängig von VP35 durchgeführt. Zunächst wurde das Flag-markierte vollständige L-Protein mit dem N-terminalen L-Fragment HA_EBOVzL600 ko-exprimiert und immunpräzipitiert. Dazu wurden 0,5-2 µg des Plasmids pT_Flag_EBOVzL mit 0,8-3 µg des Plasmids pT_HA_EBOVzL600 ko-transfiziert. Allerdings gelang die Ko-Immunpräzipitation des vollständigen L-Proteins mit dem Anti-HA.7-AK trotz gut austitrierter Plasmidmengen nicht, was möglicherweise auf die geringe Expressionsrate des L-Proteins zurückzuführen ist (Ergebnisse nicht dargestellt).

Weiterführende Studien wurden ausschließlich mit C-terminalen L-Deletionsmutanten durchgeführt, wobei die HA-markierte Deletionsmutante L600 jeweils mit einer N-terminal Flag-markierten L-Deletionsmutante ko-translatiert wurde. Die Ko-Immunpräzipitation wurde mit einem Agarose-gekoppelten Anti-Flag-M2-AK (10 µl/ Ansatz) durchgeführt. Die eingesetzten Plasmid-Mengen betrugen 0,9-1,5 µg pT_HA_EBOVzL600, 0,02-0,3 µg pT_Flag_EBOVzL450, 0,04-0,3 µg pT_Flag_EBOVzL380, 0,04-0,4 µg pT_Flag_EBOVzL370 und 0,04-0,3 µg pT_Flag_EBOVzL340. Die Einzelexpression der L-Deletionsmutante HA_EBOVzL600 (Abb. 29, Spur 1,8) diente als Negativkontrolle. Die Ergebnisse sind in Abb. 29 dargestellt.

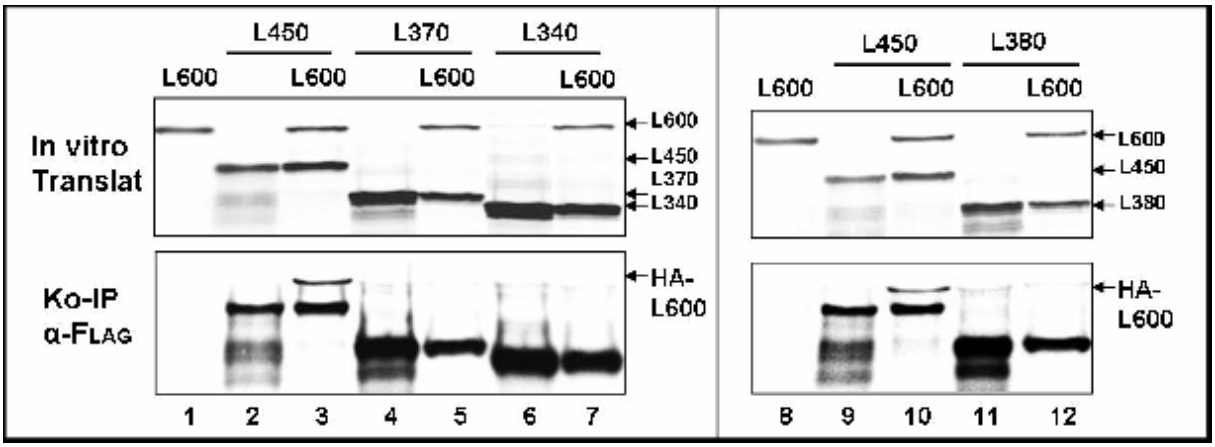


Abb. 29. Homo-Oligomerisierung des L-Proteins des EBOVz. Die Deletionsmutanten wurden mittels des TNT® T7 Quick Coupled Retikulozytenlysat-Systems jeweils einzeln (Spur 1,2,4,6,8,9,11) und ko-exprimiert (Spur 3,5,7,10,12) und metabolisch mit [^{35}S]-Methionin markiert. Nach der *in vitro* Translation folgte eine Ko-IP mit einem Anti-Flag M2-AK. 10 µl des Translations-Reaktions-Gemischs und der Immunkomplexe wurden über SDS-PAGE separiert und mittels BioImager-Analyse visualisiert. Die exprimierten Proteine wurden oberhalb, die jeweiligen Spuren unterhalb der Graphik angezeigt. Die Positionen der detektierten Proteine wurden rechts neben der Autoradiographie aufgeführt. Die beiden oberen Bilder stellen die *in vitro* Translate dar, die unteren zeigen die mit dem Anti-Flag M2-AK (ko-) immunpräzipitierten Proteine.

Die L-Deletionsmutanten Flag_EBOVzL450/ 380/ 370/ 340 wurden bei Einzel-Expression stärker translatiert und auf Grund ihrer Instabilität stärker degradiert, worauf die zusätzlichen Banden hinweisen. Die L-L-Interaktion konnte nur zwischen den beiden ko-exprimierten Fragmenten HA_EBOVzL600 und Flag_EBOVzL450 nachgewiesen werden (Abb. 29, Spur 3, 10). Fragmente mit weniger als 450 N-terminalen AS waren nicht mehr in der Lage mit HA_EBOVzL600 zu interagieren (Abb. 29, Spur 5,7,12). Damit konnte gezeigt werden, dass die L-L-Interaktion über den N-Terminus des Proteins erfolgt. Die Homo-Oligomerisierungsdomäne umfasst die ersten 450 N-terminalen AS.

4.3.6 Zusammenfassung Kapitel 4.3

Um das L-Protein des EBOVz auf dessen Fähigkeit zur Selbst-Aggregation zu überprüfen, wurden Ko-Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Dabei mussten zunächst einige experimentelle Schwierigkeiten bewältigt werden. Die N-terminale Epitop-Markierung der verwendeten L-Deletionsmutanten ermöglichte die Detektion trotz fehlender AK gegen das L-Protein. Aufgrund der geringen Expressionsrate des vollständigen L-Proteins konnte dieses in Interaktionsstudien nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden besser nachweisbare N-terminale L-Deletionsmutanten für die Interaktionsstudien verwendet. Durch

die Optimierung der Versuchsbedingungen gelang schließlich der Nachweis der L-L-Interaktion. Es konnte gezeigt werden, dass die Homo-Oligomerisierungsdomäne im N-terminalen Bereich des L-Proteins lokalisiert ist und die ersten 450 AS umfasst. Die charakterisierte Multimerisierungsdomäne zeigte eine Überlappung mit der bereits identifizierten VP35-Bindungsdomäne (4.2), ist mit dieser aber nach bisherigen Untersuchungen nicht identisch. Für die L-L-Interaktion ist die simultane Synthese des viralen Polymerase-Kofaktors VP35 nicht erforderlich. Es kann anhand der hier vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ko-exprimiertes VP35 einen negativen Effekt auf die Homo-Oligomerisierung des L ausüben kann.

4.4 Die Hemmung des aktiven Polymerasekomplexes

Die Bildung des aktiven Polymerasekomplexes ist von der Interaktion der enzymatisch aktiven RNA-abhängigen RNA-Polymerase L und dem Kofaktor VP35 abhängig. Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass es neben der Interaktionsdomäne für das VP35 (4.2) auch eine Homo-Oligomerisierungsdomäne im N-terminalen Bereich des L-Proteins gibt (4.3). Daher scheint der N-Terminus des L-Proteins für die Bildung des aktiven Polymerasekomplexes von essentieller Bedeutung zu sein. Im Folgenden sollte nun geklärt werden, ob die Polymeraseaktivität durch kompetitive Hemmung der VP35-L-Interaktion und/oder der Homo-Oligomerisierung inhibiert werden kann. Zur Durchführung dieser Untersuchungen wurde das rekonstituierte EBOV-spezifische Replikations- und Transkriptionssystem verwendet.

4.4.1 Optimierung des Dual-Luziferase Reportergen-Assays

Um die Hemmung des aktiven Polymerasekomplexes durch L-Fragmente zu untersuchen, wurden Dual-Luziferase Reportergen-Assays (3.3.5) durchgeführt. Dabei wurden subkonfluente (50-70%) BSR-T7/5 Zellen mit 1 µg 3E-5E_*F*-Luz, 0,3 µg pRL-SV40, 0,5 µg pT/NP_{EBO}-Plasmid, 0,5 µg pT/$VP35_{EBO}$-Plasmid, 0,1 µg pT/$VP30_{EBO}$-Plasmid und 1 µg pT/L_{EBO}-Plasmid mittels FuGENE® 6 transfiziert. Dieser „komplette Ansatz“ diente als Positivkontrolle. Im Ansatz der Negativkontrolle wurde das L-Plasmid nicht transfiziert. Dem „kompletten Ansatz“ wurden variierende Mengen der Plasmide für die potentiellen Inhibitoren zugesetzt. Dabei handelte es sich um L-Deletionsmutanten, die sich in ihrer Fähigkeit zur Selbstaggregation und der Interaktion mit VP35 unterschieden.

Um zunächst den Einfluss der N-terminalen Epitope und der Expressionsrate der L-Fragmente auf eine mögliche inhibitorische Wirkung zu untersuchen, wurden in einem Dual-Luziferase Reportergen-Assay die N-terminal Flag-markierte und die HA-markierte Version der L-Deletionsmutante EBOVzL600 als potentielle Inhibitoren austitriert (0,1-1 µg) und auf ihren inhibitorischen Effekt getestet. Die Mutanten umfassen die ersten 600 AS des L-Proteins. Es wurden BSR-T7/5 Zellen mit den Plasmiden, die für die Nukleokapsidproteine NP, VP35, VP30 und L, das Minigenom 3E-5E_*F*-Luz sowie die *Renilla*-Luziferase kodieren (wie oben für den „kompletten Ansatz“ beschrieben), transfiziert und 10-20 µl des gewonnenen Zelllysates in den Dual-Luziferase Reportergen-Assay eingesetzt, um die relative Luziferase Aktivität in Prozent zu bestimmen (Abb. 30). Je 8 µl des Zelllysates wurden mit 2x SDS-Probenpuffer versehen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Zwei identisch beladene Gele wurden im Anschluss entweder einer Coomassie-Färbung unterzogen (alternativ wurde das PAGE-Blue™ Protein Staining Solution Kit von Fermentas getestet)

oder auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion des geblotteten HA_EBOVzL600-Fragments erfolgte mit dem monoklonalen Maus Anti-HA.11-AK, der Nachweis des Flag_EBOVzL600-Fragments mit dem monoklonalen Maus Anti-Flag M2-AK und im Anschluss jeweils mit einem POD-gekoppelten Anti-Maus-AK aus Ziege. Die Proteingelfärbung erbrachte keine Ergebnisse, die Daten des Western Blots sind in Abb. 30B dargestellt.

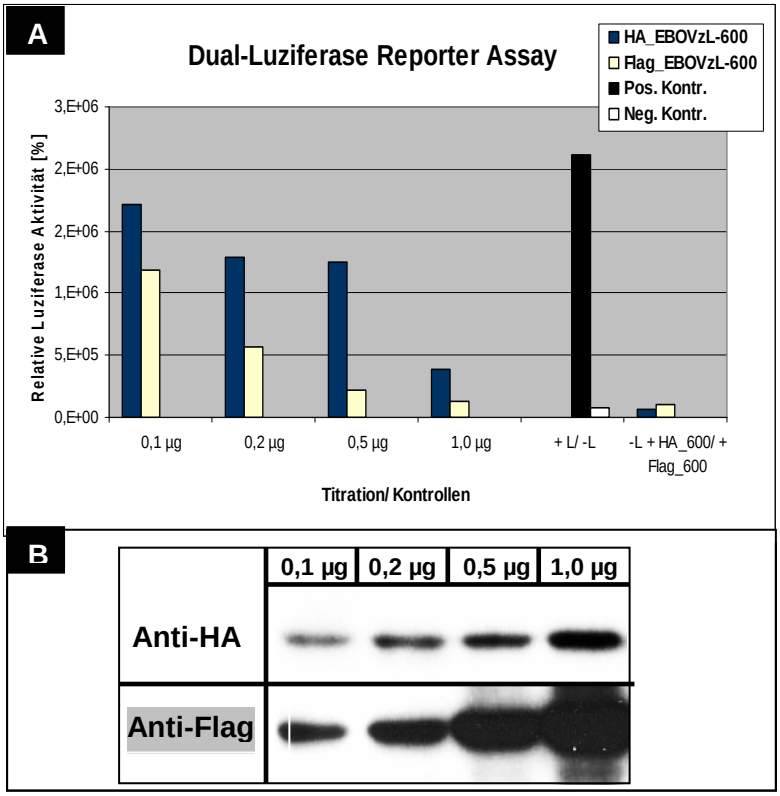


Abb. 30. Plasmidtitration der inhibitorisch wirksamen L-Deletionsmutanten pT_HA-/ Flag-EBOVzL600 im Dual-Luziferase Reporter-Assay. (A) Schematische Darstellung der relativen Luziferase Aktivität in Prozent. Subkonfluente (50-70 %) BSR-T7/5 Zellen wurden mit 1 µg 3E-5E_*F*-Luz, 0,3 µg pRL-SV40, 0,5 µg pT/NP_{EBO}-Plasmid, 0,5 µg pT/$VP35_{EBO}$-Plasmid, 0,1 µg pT/$VP30_{EBO}$-Plasmid und 1 µg pT/L_{EBO}-Plasmid mittels FuGENE® 6 transfiziert. Das Plasmid pT_HA-/ Flag-EBOVzL600, welches für das HA- bzw. Flag-markierte Protein EBOVzL600 kodiert, wurde jeweils in den Mengen 0,1 µg, 0,2 µg, 0,5 µg und 1,0 µg zusätzlich zu dem intakten Volle-Länge pT/L_{EBO}-Plasmid transfiziert. Zur Kontrolle wurden die beiden Plasmide pT_HA-/ Flag-EBOVzL600 (je 1 µg) auch in Abwesenheit des enzymatisch aktiven vollständigen L-Proteins getestet (rechts im Bild). **(B)** Bestimmung der Expressionsrate der titrierten L-Deletionsmutanten mittels Western Blot. BSR-T7/5 Zellen wurden mittels FuGENE® 6 (wie unter A beschrieben) transfiziert. Das mit 2x SDS-Probenpuffer versetzte Zelllysat wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte mit dem monoklonalen Maus Anti-HA.11-AK (1:10.000) bzw. mit dem monoklonalen Maus Anti-Flag M2-AK (1:10.000) und einem POD-gekoppelten Anti-Maus-AK aus Ziege (1:40.000).

Durch die Messung der relativen Luziferase-Aktivität in Prozent (Abb. 30A) konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt der eingesetzten L-Deletionsmutanten mit zunehmender Menge an exprimiertem Protein anstieg. Der stärkste Hemmeffekt wurde bei einem Einsatz von 1 µg Plasmid-DNA der jeweiligen L-Deletionsmutante beobachtet. Wie in Abb. 30B gezeigt, wurden in diesen Ansätzen die L-Deletionsmutanten am effizientesten exprimiert. Darüber hinaus konnte durch die N-terminal Flag-markierte Mutante eine deutlich stärkere Hemmung erreicht werden als durch die HA-markierte Mutante. Möglicherweise ist dies auf eine verstärkte Expression durch das Flag-Epitop zurückzuführen, was eine gesteigerte Menge an Translationsprodukt zur Folge hätte. Es ist aber auch denkbar, dass die Affinität des Anti-Flag M2-AK im Vergleich zum Anti-HA.11-AK höher ist, so dass der im Western Blot ermittelte scheinbare Mengenunterschied an HA- und Flag-markierten Translationsprodukten tatsächlich gar nicht vorhanden ist. Abschließend kann jedoch festgestellt werden, dass die L-Deletionsmutante EBOVzL600, die sowohl eine intakte VP35-

Bindungsdomäne als auch eine vollständige Homo-Oligomerisierungsdomäne besitzt, zur Inhibition fähig ist. Dabei zeigte der Einsatz einer N-terminal Flag-markierten Mutante einen größeren inhibitorischen Effekt. Die Transfektion von 0,5 µg Plasmid-DNA der Flag-markierten L-Deletionsmutante ergab bereits einen ausreichend starken Hemmeffekt. Um die Menge an transfiziertem Plasmid möglichst niedrig zu halten und trotzdem einen eindeutigen inhibitorischen Effekt zu erzielen, wurde für alle folgenden Experimenten mit 0,5 µg der jeweils Flag-markierten L-Deletionsmutanten gearbeitet.

4.4.2 Klonierung von L-Peptidfragmenten

Es sollte geklärt werden, ob die Polymeraseaktivität tatsächlich über kompetitive Hemmung der VP35-L-Interaktion inhibiert werden kann. Für diese Untersuchung sollte ein kurzes L-Peptidfragment generiert werden, das die VP35-Bindungsdomäne repräsentiert. Um dieses zu erzeugen, wurde die Deletionsmutante Flag_EBOVzL240-370 kloniert (Abb. 31). Das dafür nötige Primerpaar (#2047/ #1901) war bereits vorhanden. Um zu überprüfen, ob eine spezifische Blockade der VP35-Bindungsregion zur Inaktivierung der Polymerase führt, wurden weitere L-Peptidfragmente von gleicher Größe (je 130 AS), jedoch unterschiedlicher L-Sequenz kloniert (Abb. 31). Diese L-Fragmente umfassen Bereiche benachbart von der VP35-Bindungsdomäne (Flag_EBOVzL380-510) oder weiter entfernt von der VP35-Bindungsdomäne im N-Terminus (Flag_EBOVzL699-828) bzw. C-Terminus (Flag_EBOVzL1901-2030) des L-Proteins. Das Peptidfragment Flag_CAT36-165 repräsentiert die AS 36 bis 165 des CAT-Gens und wurde als Negativkontrolle verwendet.

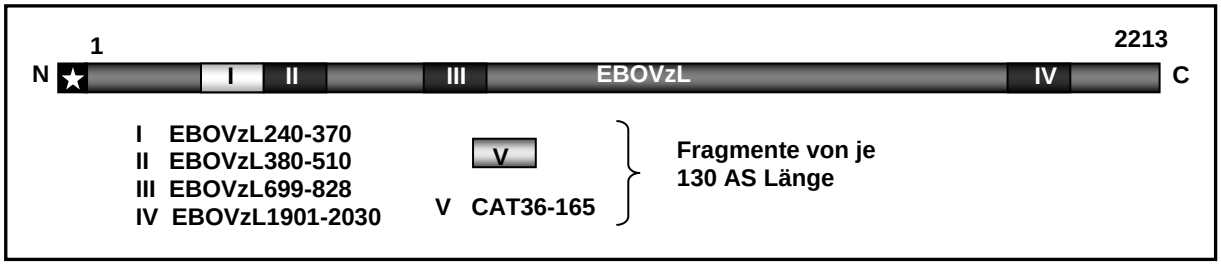


Abb. 31. Klonierte L-Peptidfragmente des EBOVz. Das EBOVzL besteht aus 2213 AS und enthält ein N-terminales Flag-Epitop (schwarze Box mit weißem Stern). Dargestellt wurden die klonierten L-Peptidfragmente, die jeweils 130 AS umfassen und N-Terminal Flag-markiert sind. Das L-Peptidfragment Flag_EBOVzL240-370 repräsentiert die bereits charakterisierte VP35-Bindungsdomäne. Alle weiteren L-Peptidfragmente liegen außerhalb der VP35-Bindungsdomäne. Das Flag_CAT36-165-Fragments repräsentiert einen Bereich des CAT-Proteins und wurde als Negativkontrolle genutzt.

Klonierung mittels PCR: Für die Klonierung der Peptidfragmente wurde der gewünschte Sequenz-Bereich mittels spezifischer Primer amplifiziert (Tab. 8).

Für die Klonierungen der L-Peptidfragmente wurde jeweils ein Vorwärtsprimer verwendet, der die Restriktionsschnittstelle *Nco*I, ein Startcodon, die vollständige Sequenz des Flag-Epitops und direkt im Anschluss die Sequenz für die ersten acht AS des L-Proteins ab der jeweils gewünschten Startposition enthielt. Der Rückwärtsprimer umfasste jeweils die letzten Nukleotide der kodierenden Sequenzen des L, die amplifiziert werden sollten, sowie ein Stoppkodon und die Restriktionsschnittstelle *Sac*I.

Für die Klonierungen des CAT-Peptidfragmentes wurden der Vorwärts- und der Rückwärtsprimer in gleicher Weise aufgebaut. Die spezifisch zu amplifizierende Sequenz des Peptids stammte in diesem Fall jedoch vom CAT-Gen.

CC-Nr.	Name	Primerpaar
L-Peptidfragmente		
ML-29/ 06	pT_Flag_EBOVzL240-370	#2047 - #1901
ML-30/ 06	pT_Flag_EBOVzL380-510	#2056 - #2057
ML-31/ 06	pT_Flag_EBOVzL699-828	#2058 - #2059
ML-32/ 06	pT_Flag_EBOVzL1901-2030	#2060 - #2061
CAT-Peptidfragment		
ML-33/ 06	pT_Flag_CAT36-165	#2062 - #2063

Tab. 8. Peptidfragmente des EBOVz. Die Peptidfragmente wurden in den Vektor pTM1 kloniert, enthielten ein N-terminales Flag-Epitop und umfassten je 130 AS. Die Primer folgen einer internen Nummerierung, CC: clone chart.

Die Klonierung der Peptidfragmente mittels PCR erfolgte nach demselben Prinzip wie es bereits für die Herstellung der N-terminal Flag-markierten L-Deletionsmutanten in Kapitel 4.2.1 beschrieben wurde.

4.4.3 Analyse der L-Fragmente auf ihre inhibitorische Wirkung

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die klonierten L-Fragmente über kompetitive Hemmung der VP35-L-Interaktion und/ oder der Homo-Oligomerisierung die Polymerase inaktivieren können. Die Untersuchungen wurden mit dem Dual-Luziferase Reportergen-Assay durchgeführt. Der Test wurde mit jedem Fragment mehrfach wiederholt. Im Anschluss wurde in jedem Experiment die Negativkontrolle (ohne pT/L_{EBO}) gleich Null gesetzt und die gemessenen Werte für die relative Luziferase-Aktivität als prozentualer Anteil der Positivkontrolle (mit pT/L_{EBO}; ohne L-Fragment) angegeben. Aus den Werten der verschiedenen Testläufe wurden schließlich der Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung berechnet. Die Daten sind in Abb. 32 graphisch dargestellt.

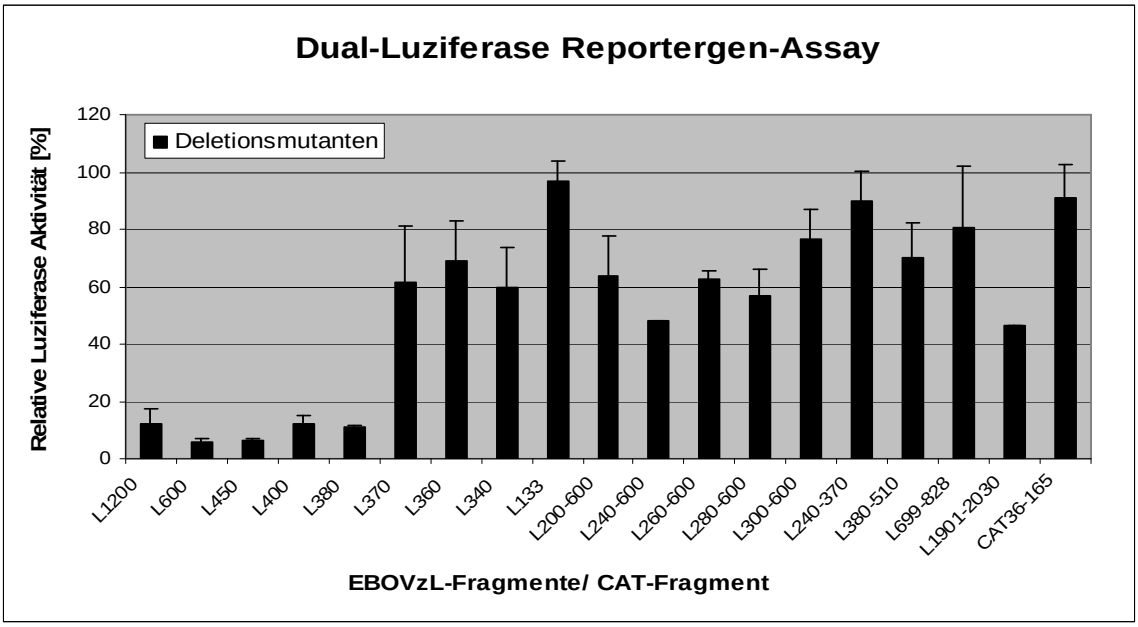


Abb. 32. Test aller klonierten L-Fragmente auf die Fähigkeit über kompetitive Hemmung der VP35-L oder L-L-Interaktion die Polymerase zu inhibieren. BSR-T7/5 Zellen wurden mit Plasmiden, die für die Nukleokapsidproteine NP (0,5 µg), VP35 (0,5 µg), VP30 (0,1 µg) und L (1,0 µg) sowie ein L-Fragment (0,5 µg) des EBOVz kodieren mittels FuGENE® 6 transfiziert. Zusätzlich wurde das Minigenom-Plasmid 3E-5E_*F*-Luz transfiziert (1,0 µg), das für ein EBOV-spezifisches Minigenom kodiert. Dieses enthält die 3'- und 5'-Enden des EBOV-Genoms. Dazwischen liegt das *Firefly*-Luziferase-Reportergen. Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte über das ko-transfizierte Plasmid pRL-SV40, das für die *Renilla*-Luziferase (0,3 µg) kodiert. Die Zellen wurden 24h nach Transfektion lysiert. Die relative Luziferase-Aktivität wurde gemessen und graphisch dargestellt. Die relative Luziferase-Aktivität der Negativkontrolle (ohne pT/L_{EBO}) wurde gleich Null gesetzt und die gemessenen Werte als prozentualer Anteil der Positivkontrolle (mit pT/L_{EBO}; ohne L-Fragment) angegeben.

Die Auswertungen haben ergeben, dass die Bildung eines aktiven Polymerasekomplexes durch die Ko-Transfektion von L-Fragmenten verhindert werden kann. Dabei kommt es wahrscheinlich durch kompetitive Hemmung der VP35-L-Interaktion bzw. der L-L-Interaktion zur Inhibition der Polymeraseaktivität. Aus der graphischen Darstellung (Abb. 32) ist ersichtlich, dass ausschließlich die N-terminalen L-Deletionsmutanten mit mehr als 370 AS diesen inhibitorischen Effekt aufweisen. Eine Gemeinsamkeit dieser Fragmente ist die intakte VP35-Bindungsdomäne. Dies lässt darauf schließen, dass das Vorhandensein einer vollständigen VP35-Bindungsdomäne für die Inhibition essentiell ist. Interessanterweise war die L-Deletionsmutante Flag_EBOVzL370 nicht in der Lage, die Polymeraseaktivität zu hemmen, was darauf schließen lässt, dass die Bindungsaffinität dieser Mutante zu gering ist, um VP35 aus dem L-VP35-Komplex zu verdrängen. Auch in der Ko-Immunpräzipitations-Analyse erbrachte diese Mutante kein eindeutig positives Ergebnis (Abb. 23D), was auf eine deutlich schwächere Interaktion zwischen Flag_EBOVzL370 und VP35 hindeutet. Die Vermutung, dass dieses Fragment in dem verwendeten Assay nicht exprimiert wurde, bestätigte sich nicht. Das Fragment konnte in ausreichend großer Menge im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 33).

Abb. 33. Proteinnachweis der L-Deletionsmutanten Flag_EBOVzL370 und Flag_EBOVzL380. Die aus dem Dual-Luziferase Reportergen-Assay gewonnenen Zelllysate wurden in 6x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, die Proteine über SDS-PAGE (15 %) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Detektion der L-Deletionsmutanten erfolgte mit dem monoklonalen Maus Anti-Flag M2-AK (1:3000). Der Nachweis des Aktins mit dem Maus Anti-Aktin AK (1:5000). Als Zweit-AK wurde der Alexa Fluor 680 gekoppelte Anti-Maus-AK aus Ziege von Molecular Probes verwendet. Die Auswertung des Western Blots wurde mit einem Odyssey-Gerät durchgeführt.

Darüber hinaus konnte das erzielte Resultat im *Fast*-CAT-Assay bestätigt werden. Dazu wurden im Rahmen des EBOV-spezifischen Transkriptions- und Replikationssystems BSR-T7/5 Zellen mittels FuGENE® 6 mit den Plasmiden für die EBOV-Nukleokapsidproteine NP, VP35, VP30, L und die jeweilige L-Deletionsmutante transfiziert. Zusätzlich wurde über Transfektion das Minigenom 3E-5E in die Zellen eingebracht, welches das Gen für die CAT trägt. Der CAT-Assay wurde durchgeführt wie unter 3.3.5 beschrieben. Aus den Ergebnissen (Abb. 34) ist ersichtlich, dass nur Fragmente mit mehr als 370 N-terminalen AS (Spur 3-6) zur Inhibition der Polymeraseaktivität fähig sind. Hingegen ist in Gegenwart von L-Deletionsmutanten mit 370 oder weniger N-terminalen AS (Spur 7,8) die Polymerase in ihrer Replikations- und Transkriptionsaktivität nicht gestört.

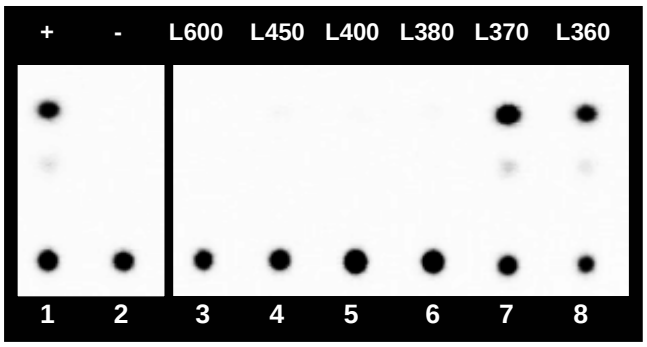


Abb. 34. Test der L-Deletionsmutanten auf die Fähigkeit zur Hemmung der Polymeraseaktivität. BSR-T7/5 Zellen wurden mit Plasmiden, die für die Nukleokapsidproteine NP (0,5 µg), VP35 (0,5 µg), VP30 (0,1 µg) und L (1,0 µg) sowie ein L-Fragment (0,5 µg) des EBOVz kodieren mittels FuGENE® 6 transfiziert. Zusätzlich wurde ein Plasmid ko-transfiziert, das für das EBOV-spezifische Minigenom 3E-5E (1,0 µg) kodiert. Dieses trägt das CAT-Reportergen. Die Zellen wurden 24h nach Tranfektion lysiert und die CAT-Aktivität wurde gemessen. Spur 1: Positivkontrolle mit L, Spur 2: Negativkontrolle ohne L, Spuren 3-8: L-Deletionsmutanten Flag_EBOVzL600/ 450/ 400/ 380/ 370/ 360.

Überraschend waren die Ergebnisse für diejenigen Mutanten, die den gesamten Bereich der ermittelten VP35-Bindungsdomäne umfassten (AS 240-380). So zeigte weder Mutante Flag_EBOVzL200-600 noch Mutante Flag_EBOVzL240-600 eine inhibitorische Wirkung, was darauf schließen lässt, das für eine kompetitive Bindung des VP35-Proteins der gesamte N-Terminus des L-Proteins bis AS 380 vorhanden sein muss. Das für diese Untersuchungen klonierte L-Peptidfragment Flag_EBOVzL240-370 war ebenfalls nicht in der Lage, die Polymeraseaktivität zu inhibieren, was mit den Ergebnissen für Mutante Flag_EBOVzL370 übereinstimmt. Unklar blieb, inwieweit die Blockade der Homo-Oligomerisierungsdomäne einen Einfluss auf die Inhibition des aktiven Polymerasekomplexes hat. Das inhibierende Fragment Flag_EBOVzL380 umfasst zwar die intakte VP35-Bindungsdomäne, spiegelt jedoch nicht die vollständige Homo-Oligomerisierungsdomäne wieder.

4.4.4 Zusammenfassung Kapitel 4.4

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Inaktivierung der Polymerase L durch kompetitive Hemmung der VP35-L-Interaktion und/ oder der L-L-Interaktion mittels L-Deletionsmutanten möglich ist. Dabei hat sich gezeigt, dass nur L-Deletionsmutanten mit intakter VP35-Bindungsdomäne zur Inhibierung der Polymeraseaktivität fähig sind. Die kürzeste Mutante mit inhibitorischer Wirkung war Flag_EBOVzL380. Mutanten mit eingeschränkter VP35-Bindungsfähigkeit wie Flag_EBOVzL370 konnten die Polymeraseaktivität nicht hemmen. Auch L-Deletionsmutanten mit fehlendem N-Terminus, die jedoch die gesamte identifizierte VP35-Bindungsdomäne umfassten, waren zur Inhibition der Polymeraseaktivität nicht in der Lage. Unklar blieb, inwieweit die Blockade der Homo-Oligomerisierungsdomäne einen Einfluss auf die Bildung des aktiven Polymerasekomplexes hat.

5
DISKUSSION

5 DISKUSSION

In den vergangenen Jahren ist es mit Hilfe eines artifiziellen Replikations- und Transkriptionssystems gelungen, Einsichten in den Mechanismus der Transkription und Replikation des hoch pathogenen EBOV zu gewinnen (Mühlberger, et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Nukleokapsidproteine NP, VP35 und L sowohl für die Replikation als auch für die Transkription der viralen RNA essentiell sind (Mühlberger, et al., 1999). Das vierte Nukleokapsidprotein VP30 ist dabei nur für den Prozess der Transkription notwendig. D. h. die Nukleokapsidproteine sind nicht nur als strukturelle Komponenten am Aufbau des Nukleokapsidkomplexes beteiligt, sondern besitzen auch funktionelle Aufgaben. Die einzelnen Proteine sind dabei in Proteinkomplexe involviert, über die möglicherweise die Funktion des jeweiligen Proteins determiniert wird. Der genaue Regulationsmechanismus von Replikation und Transkription über die verschiedenen Proteinkomplexe ist bislang jedoch nicht bekannt.
Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion des L-Proteins des EBOVz mit anderen Nukleokapsidproteinen aufzuklären. Darüber hinaus sollte die Lokalisation der involvierten Bindungsdomänen sowie ihr Potenzial als antivirales Target bestimmt werden.

5.1 Der Aufbau des Replikationskomplexes des EBOVz

Die Replikation ist neben der Transkription einer der beiden RNA-synthetisierenden Prozesse, die für die Vermehrung des EBOVz im Zytoplasma einer infizierten Zelle essentiell sind. Durch die miteinander wechselwirkenden NC-Proteine NP, VP35 und L wird der hierfür notwendige Replikationskomplex gebildet (Mühlberger, et al., 1999). Bisher war jedoch unklar, auf welche Art die viralen Komponenten miteinander interagieren. Daher wurde die Interaktionsfähigkeit des EBOVzL mit den NC-Proteinen NP und VP35 mittels Immunfluoreszenz-Analysen untersucht (4.1.3). Dabei konnte die Bildung eines trimeren Komplexes aus NP-VP35-L nachgewiesen werden, dem die Interaktion zwischen NP und VP35 sowie jene zwischen VP35 und L zugrunde liegt. Das L-Protein als katalytische Untereinheit des Komplexes interagiert dabei mit seinem Kofaktor VP35, wodurch der aktive RNA-abhängige RNA-Polymerase-Komplex gebildet wird. Die Ko-Lokalisation von NP und L wird hingegen durch die Vernetzung über VP35 bewerkstelligt, da eine direkte Interaktion zwischen NP und L nicht existiert.
Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die NC-Proteine des EBOVz und des MARV auf die gleiche Weise miteinander interagieren, um den Replikationskomplex zu bilden. Dabei bleibt allerdings unklar wie die Stöchiometrie der komplexierten Untereinheiten L und VP35 des EBOVz aussieht und inwieweit diese einen Einfluss auf die Funktionalität der einzelnen Komponenten hat.
Erste Ansätze zur Aufklärung der Stöchiometrie des Replikationskomplexes gibt es hingegen für das VP35 des MARV und das P-Protein des SeV. So wurde für das VP35 des MARV eine Homo-Oligomerisierungsdomäne nachgewiesen, die für die Bildung des aktiven RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplexes essentiell ist. In seiner monomeren Form hingegen interagiert das VP35 des MARV nicht mit der Polymerase L (Möller, et al., 2005). Ferner wurde für den Polymerase-Komplex des SeV gezeigt, dass P, das homologe Protein zu VP35, als Tetramer mit L in Kontakt tritt (Cevik, et al., 2003). Darüber hinaus ist für das L-Protein verschiedener NNS-Viren eine Homo-Oligomerisierungsdomäne nachgewiesen worden (Cevik, et al., 2004, Smallwood and Moyer, 2004). Daher wird für den aktiven

Polymerasekomplex des SeV eine minimale Komposition von L_2P_4 bzw. L_2P_8 angenommen (Cevik, et al., 2003).
Ob eine mögliche Homo-Oligomerisierung des VP35 sowie des L-Proteins für die Bildung des aktiven Polymerase-Komplexes des EBOVz essentiell ist und welche Funktion und Stöchiometrie den einzelnen Komponenten innerhalb des Komplexes zukommt, ist bisher nicht geklärt.

5.2 Die VP35-Bindungsdomäne des EBOVzL

Bei simultaner Expression der beiden NC-Proteine VP35 und L kommt es zur Bildung von Komplexen, die wie die Komplexe aus P- und L-Proteinen der *Rhabdo*- und *Paramyxoviridae* als RNA-abhängige RNA-Polymerasen fungieren (Chenik, et al., 1998, Horikami, et al., 1992, Mühlberger, et al., 1998, Mühlberger, et al., 1992, Parks, 1994).
Im Bereich der NNS-Viren wird die Interaktion mit dem VP35 bzw. dem P-Protein über eine Bindungsdomäne im N-terminalen Bereich des L-Proteins ermöglicht. Für das Rabies-Virus (RV), einem Vertreter der *Rhabdoviridae*, konnte allerdings gezeigt werden, dass die P-Bindungsstelle innerhalb der letzten 566 AS des C-Terminus lokalisiert ist (Abb.35) (Chenik, et al., 1998).

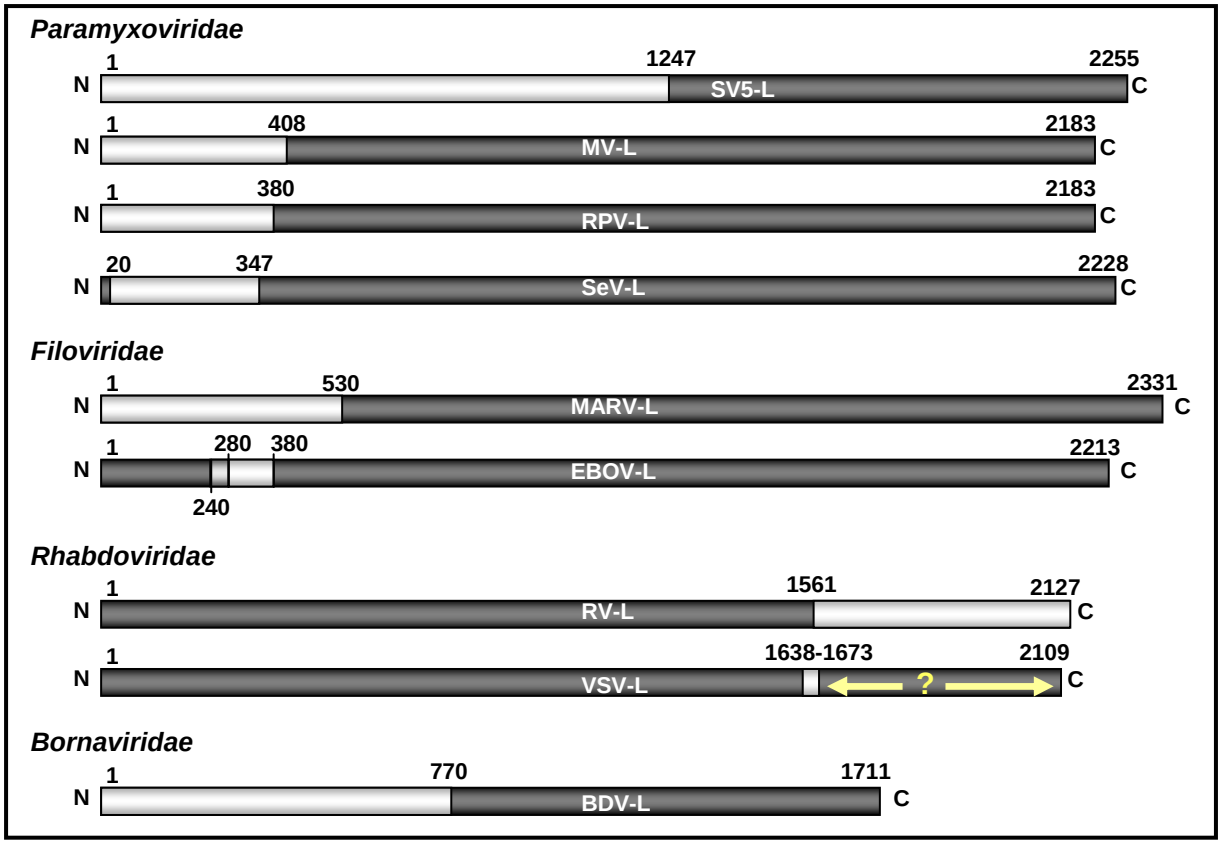


Abb. 35. Schematische Darstellung der P-/ VP35-Bindungsdomäne auf dem L-Protein der NNS-Viren. Dargestellt sind die L-Proteine (dunkelgraue Boxen) von Simian Virus 5 (SV5), Masernvirus (MV), Rinderpest-Virus (RPV), Sendai-Virus (SeV), Marburg-Virus (MARV), Ebola-Virus, Spezies Zaire (EBOVz), Rabies-Virus (RV), vesikuläres Stomatitis-Virus (VSV), Virus der Bornaschen Krankheit (BDV) sowie die bisher identifizierten VP35- bzw. P-Bindungsdomänen (hellgraue Boxen). Die Zahlen oberhalb der L-Proteine kennzeichnen die Größe des Proteins sowie die Grenzen der Bindungsdomänen. Beim VSV ist der C-Terminus als vermuteter Bereich der P-Bindungsdomäne zusätzlich markiert (Fragezeichen, Pfeile).

Auch für das weniger gut charakterisierte vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV), ebenfalls ein Vertreter der *Rhabdoviridae*, konnte die Bedeutung des C-terminalen Bereichs des L-Proteins für die L-P Komplexbildung gezeigt werden, wobei eine Deletion der AS 1638 bis 1673 zum Ausbleiben der Interaktion zwischen L und P führte (Canter and Perrault, 1996). Dadurch stellt das L-Protein der *Rhabdoviridae* in Bezug auf die Lokalisation der P-Bindungsdomäne eine Ausnahme dar. Zudem wird hierdurch erneut die engere genetische Verwandtschaft der *Filoviridae* mit den *Paramyxoviridae* untermauert.
Bei den Vertretern der *Paramyxo-*, *Filo-* und *Bornaviridae* konnte die im N-Terminus gelegene VP35- bzw. P-Bindungsdomäne auf dem L-Protein bislang unterschiedlich stark eingegrenzt werden. Die vermutlich gröbste Eingrenzung findet sich beim Simian Virus 5 (SV5), bei dem die gesamte N-terminale Hälfte des L-Proteins (AS 1 bis 1247) für die Bindung des P-Proteins verantwortlich ist (Parks, 1994). Es ist anzunehmen, dass sich innerhalb dieses Bereiches eine P-Bindungsdomäne von wesentlich geringerem Ausmaß befindet. Für drei weitere Vertreter der *Paramyxoviridae* liegt hingegen eine genauere Charakterisierung der P-Bindungsdomäne auf dem L-Protein vor. Beim Masernvirus (MV) ist die Bindungsdomäne für das P-Protein innerhalb der ersten 408 N-terminalen AS (Horikami, et al., 1994) und beim Rinderpest-Virus (RPV) innerhalb der ersten 380 N-terminalen AS (Chattopadhyay and Shaila, 2004) lokalisiert. Beim SeV gelang zusätzlich eine Eingrenzung vom N-terminalen Bereich her, so dass die P-Bindungsdomäne für den AS-Bereich 20 bis 347 beschrieben werden konnte (Holmes and Moyer, 2002).
Die Untersuchungen innerhalb der Familie der *Filoviridae* beschränkten sich bisher auf das Marburg Virus (MARV). Hier erstreckt sich die Interaktionsdomäne für das VP35 über die ersten 530 N-terminalen AS des L-Proteins, wobei die Region zwischen AS 309 und 530 als essentielle Bindungsdomäne charakterisiert wurde (Becker, et al., 1998).
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bindungsdomäne für das VP35 des EBOVz ebenfalls im N-terminalen Bereich des L-Proteins lokalisiert ist. Der mittels Immunfluoreszenz-Analysen und ergänzend durchgeführten Ko-Immunpräzipitations-Assays identifizierte Bindungsbereich umfasst die AS 280 bis 380, wobei die Region zwischen AS 360 und 380 essentiell für die Bindung ist. Besonders auffällig war das Verhalten der Deletionsmutante $_{Flag}$L370, die möglicherweise im Grenzbereich der Bindungsdomäne liegt. Obwohl der Interaktionsnachweis zwischen VP35 und $_{Flag}$L370 in der Immunfluoreszenz-Analyse eindeutig positiv ausfiel, konnte mittels Ko-Immunpräzipitations-Assays die Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist insofern ungewöhnlich, da sich ansonsten sämtliche gewonnenen Daten aus Immunfluoreszenz-Studien und Ko-Immunpräzipitations-Assays entsprechen. Daher wird vermutet, dass es sich bei der Interaktion von VP35 und $_{Flag}$L370 um eine abgeschwächte Bindung handelt. Somit stellt das Fragment $_{Flag}$L380 die kleinste L-Deletionsmutante dar, die sowohl in der Immunfluoreszenz-Analyse als auch im Ko-Immunpräzipitations-Assay positiv getestet wurde und damit eine starke Bindung mit dem VP35 eingeht. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die für das RPV identifizierte P-Bindungsdomäne, die sich über die ersten 380 N-terminalen AS des RPV L-Proteins erstreckt (Chattopadhyay and Shaila, 2004). Eine Aussage über den Bereich um die ersten 370 N-terminalen AS konnte in dieser Studie nicht getroffen werden, da die nächst kleinere getestete L-Deletionsmutante lediglich über die ersten 336 N-terminalen AS verfügte. Um dennoch eine Vorstellung über den Aufbau der Bindungsdomänen zu erhalten, wurde ein AS-Sequenzvergleich zwischen den N-terminalen Bereichen (AS 1-380) der L-Proteine des EBOVz und des RPV durchgeführt. Ein konservierter AS-Bereich, der Rückschlüsse auf die Struktur der Interaktionsdomäne erlaubt,

konnte hierbei nicht identifiziert werden. Auffällig war hingegen der mit rund 11 Mol% hohe Anteil an Leucinresten und das im Bereich der N-terminalen AS 357-359 (EBOVz) bzw. AS 360-362 (RPV) gelegene Muster mit der AS-Sequenz RLE (Abb.36).

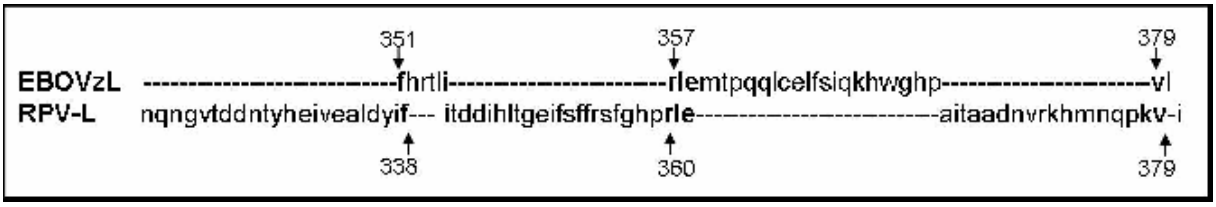


Abb. 36. Ausschnitt aus dem AS-Sequenzvergleich zwischen den N-terminalen Bereichen der L Proteine des EBOVz und des RPV. Dargestellt ist das möglicherweise konservierte AS-Muster RLE (fett), das im Bereich der jeweils identifizierten VP35-/ P-Bindungsdomäne auf dem L-Protein des EBOVz bzw. des RPV liegt. Die Pfeile/ Nummern ober- und unterhalb der Graphik geben die jeweilige Position der AS auf dem L-Protein an.

Ausgehend von dieser Beobachtung wurden weitere Vergleiche mit den N-terminalen Bereichen der L-Proteine verschiedener NNS-Viren durchgeführt. Dabei wurden die AS-Sequenzen im Bereich der AS 340 bis 380 des jeweiligen L-Proteins miteinander verglichen Abb. 37). Es zeigte sich, dass neben dem EBOVz und dem RPV auch das MV ein RLE-Sequenzmotiv im P-Bindungsbereich besitzt. Ob diesem AS-Muster eine funktionelle Bedeutung bei der Protein-Protein Wechselwirkung zukommt, ist bisher nicht bekannt. Besonders unter der Berücksichtigung der Tatsache, dass für das MARV lediglich ein RL(T) und für das SeV ein (S)LE Muster gefunden werden konnte, erscheint eine essentielle Bedeutung des RLE-Motivs für die Protein-Protein-Wechselwirkung des L-Proteins mit dem VP35- bzw. P-Protein fraglich.

Abb. 37. AS-Sequenzabschnitt (AS 340-380) der L-Proteine verschiedener NNS-Viren mit auffälligem Sequenzmuster. Dargestellt sind die AS-Sequenzabschnitte (AS 340-380) der L-Proteine des Ebola-Virus, Spezies Zaire (EBOVz), Marburg-Virus (MARV), Rinderpest-Virus (RPV), Sendai-Virus (SeV) und Masernvirus (MV). Diese AS-Bereiche liegen jeweils innerhalb der identifizierten VP35-/ P-Bindungsdomänen auf dem L-Protein. Das auffällige Sequenzmuster wurde jeweils fett markiert. Die AS-Positionen auf dem L-Protein sind jeweils oberhalb der Sequenz angegeben. Das in allen AS-Motiven vorkommende Leucin ist zusätzlich unterstrichen.

Im N-terminalen Grenzbereich der identifizierten VP35-Bindungsdomäne liegt eine Region, die möglicherweise für die Stabilisierung des gebildeten Polymerase-Komplexes verantwortlich ist. Dieser erweiterte VP35-Bindungsbereich umfasst 40 AS und erstreckt sich von AS 240 bis 280 auf dem L-Protein des EBOVz. Es konnte gezeigt werden, dass L-Fragmente mit einer Deletion von 240 bis 280 AS des N-terminalen Bereichs nur noch zur partiellen Ko-Lokalisation in der Immunfluoreszenz-Analyse fähig sind. Daher wird

angenommen, dass eine Deletion von mehr als 200 N-terminalen AS des L-Proteins zu einer abgeschwächten Interaktion mit dem VP35 führt. Darüber hinaus wurde der Nachweis erbracht, dass die beiden L-Deletionsmutanten $_{Flag}$L200-600 und $_{Flag}$L240-600 den aktiven Polymerase-Komplex nicht hemmen können, obwohl sie die vollständige Bindungsdomäne für VP35 umfassen. Dies spricht dafür, dass der gesamte N-Terminus vorhanden sein muss, um eine hohe Bindungsaffinität zu gewährleisten.
Für die charakterisierte VP35-Bindungsdomäne auf dem L-Protein des EBOVz konnte keines der typischen Protein-Protein-Bindemotive gefunden werden. Dies schließt auch das Leucin-Zipper-Motiv mit ein, dass aufgrund des hohen Leucingehaltes von rund 11 Mol% anfänglich in Betracht gezogen wurde. Eine *coiled coil* Struktur, wie sie beispielsweise für das VP35 des MARV beschrieben wurde (Möller, et al., 2005), existiert daher für das L-Protein nicht.
Ausgehend von den bisherigen Untersuchungen kann festgestellt werden, dass die Bindungsdomäne des VP35 bzw. des P-Proteins mit Ausnahme der *Rhabdoviridae* im N-terminalen Bereich des L-Proteins lokalisiert ist und in ihrer Ausdehnung jeweils variiert. Hinweise auf zwei oder mehr getrennt gelegene AS-Abschnitte, die durch Protein-Faltung erst zu einer intakten Interaktionsdomäne zusammengeführt werden müssten, gibt es nicht. Die nähere Charakterisierung der P-Bindungsstelle auf dem SeV L-Protein hatte bereits gezeigt, dass die ersten 20 AS für eine P-L-Komplexbildung nicht essentiell sind (Holmes and Moyer, 2002). Im Falle des EBOVz konnten sogar die ersten 200 N-terminalen AS der VP35-Bindungsdomäne auf dem L-Protein deletiert werden, ohne die Interaktionsdomäne zu zerstören. Allerdings ist bei fehlendem N-Terminus des L-Proteins des EBOVz die Inhibition der Polymerase über kompetitive Hemmung der VP35-Bindungsdomäne nicht möglich. Hingegen wurde für das RPV gezeigt, dass ein vollständiger N-Terminus des L-Proteins für die Interaktion mit dem P-Protein essentiell ist (Chattopadhyay and Shaila, 2004). Durch die identifizierte erweiterte VP35-Bindungsdomäne auf dem L-Protein des EBOVz konnte jedoch gezeigt werden, dass der N-Terminus durchaus auch eine stabilisierende Wirkung auf den Polymerase-Komplex ausüben kann.
Daher kann der N-terminale Bereich des L-Proteins für die Interaktion mit VP35 bzw. dem P-Protein innerhalb der Vertreter der Negativstrang-RNA-Viren verschiedene Bedeutungen haben (i) nicht essentiell für die Bindung, (ii) Stabilisierung des gebildeten Polymerase-Komplexes (iii) Bestandteil der Bindungsdomäne.

5.3 Die Homo-Oligomerisierung des EBOVzL

Das L-Protein ist Bestandteil des RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplexes und enthält alle für die RNA-Synthese notwendigen katalytischen Funktionen. Die Charakterisierung des L-Proteins des SeV hat gezeigt, dass Mutationen innerhalb verschiedener Bereiche der sechs konservierten Domänen des L-Proteins zur Ausprägung inaktiver Phänotypen führen. Dies deutet darauf hin, dass mehrere Domänen an den verschiedenen Schritten der viralen RNA-Synthese beteiligt sind (Chandrika, et al., 1995, Cortese, et al., 2000, Feller, et al., 2000, Horikami and Moyer, 1995, Smallwood, et al., 1999). Durch Ko-Expression zweier inaktiver L-Mutanten mit Mutationen in verschiedenen Domänen konnte der Nachweis für die intragenische Komplementation des L-Proteins erbracht werden. Hierbei wurde die virale RNA-Synthese wieder hergestellt, was auf die Oligomerisierung des L-Proteins zurückzuführen ist (Cevik, et al., 2003, Smallwood, et al., 2002). Die Oligomerisierung des L-Proteins wurde auch für das humane Parainfluenza Virus 3 (hPIV3) (Smallwood and Moyer, 2004) und das Masernvirus (Cevik, et al., 2004) gezeigt

und die Bindungsdomäne dem jeweiligen N-terminalen Bereich des L-Proteins zugeordnet. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Oligomerisierung des L-Proteins ein gemeinsames Merkmal der Paramyxoviren und möglicherweise sämtlicher Mononegavirales ist.
Der Nachweis für die Homo-Oligomerisierung des L-Proteins des EBOVz wurde durch Ko-Immunpräzipitations-Assays mit Epitop-markierten vollständigen und verkürzten L-Proteinen erbracht. Die simultane Synthese des viralen Polymerase-Kofaktors VP35 war dabei nicht erforderlich. Es konnte gezeigt werden, dass die L-L-Interaktion durch die ersten 450 N-terminalen AS vermittelt wird. Die Wechselwirkung der beiden Deletionsmutanten $_{Flag}$L450 und $_{HA}$L600, denen der C-terminale Bereich des L-Proteins fehlt, weist darauf hin, dass es sich um einen ungeteilten Bindungsbereich handelt. Ob der identifizierte Interaktionsbereich eine AS-Region enthält, die ausschließlich für die Stabilisierung des L-L-Komplexes verantwortlich ist und nach Deletion zu einer abgeschwächten Bindung führt, kann nicht ausgeschlossen werden. Ein für die Multimerisierung des L-Proteins notwendiges Bindemotiv wurde bisher nicht beschrieben.
Obwohl das L-Protein einer Anzahl von negativsträngigen RNA Viren Oligomere bildet, ist die Funktion und die Stöchiometrie der Oligomerisierung des L-Proteins im VP35-L- bwz. P-L-Komplex bisher nicht bekannt. Denkbar wäre jedoch, dass die Oligomerisierung des L-Proteins für die Bindung an das oligomere VP35- bzw. P-Protein erforderlich ist. Auch könnte die Oligomerisierung ein wichtiger Schritt für die Ausprägung der verschiedenen enzymatischen Aktivitäten des L-Proteins für die virale RNA-Synthese sein.
Um jedoch die Struktur und die vielfältigen Funktionen des L-Proteins im Polymerase-Komplex während der RNA-Synthese zu verstehen, müssten zunächst noch ausgedehnte strukturelle Untersuchungen durchgeführt werden. Röntgenstrukturanalysen der L-Proteine von unsegmentierten Negativstrang-RNA-Viren liegen bislang nicht vor.

5.4 Die Hemmung des aktiven Polymerase-Komplexes

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Polymerase L über ihren N-terminalen Bereich sowohl zur VP35-L-Komplexbildung als auch zur Selbstaggregation befähigt ist. Die nachgewiesene L-L-Interaktion ereignet sich unabhängig von der Ko-Expression des VP35, doch ist nicht auszuschließen, dass VP35 zur Stabilisierung der L-Oligomere beitragen könnte. Dies würde bedeuten, dass sich die Bildung des aktiven Polymerase-Komplexes in Form eines zwei-stufigen Prozesses vollzieht: (i) Initiation der Komplexbildung durch die Multimerisierung des L-Proteins mit nachfolgender (ii) Stabilisierung und Aktivierung des Komplexes durch Bindung von VP35-Oligomeren.
Da der N-Terminus des L-Proteins für die Ausbildung eines aktiven Polymerase-Komplexes von essentieller Bedeutung ist, stellt er auch ein potentielles Target für Inhibitoren dar. Im Zusammenhang mit den bisher gewonnenen Daten ergab sich somit die Frage, ob durch die Ko-Expression von L-Deletionsmutanten die Polymeraseaktivität über kompetitive Hemmung der VP35-L-Interaktion und/ oder der Homo-Oligomerisierung des L-Proteins inhibiert werden kann.
Die erzielten Ergebnisse haben gezeigt, dass eine Hemmung des Polymerase-Komplexes durch ko-exprimierte L-Deletionsmutanten möglich ist. Dabei spielt insbesondere der inhibitorische Effekt der L-Deletionsmutanten mit intakter VP35-Bindungsdomäne eine Rolle. Dies umfasst die Fragmente mit mindestens 380 N-terminalen AS. Für die L-Deletionsmutante $_{Flag}$L370, die in der Immunfluoreszenzanalyse, jedoch nicht im Ko-Immunpräzipitations-Assay an VP35 gebunden hat, konnte keine Hemmung der

Polymeraseaktivität nachgewiesen werden. Die L-Deletionsmutante $_{Flag}$L370 ist in ihrer VP35-Bindung im Vgl. zu $_{Flag}$L380 eingeschränkt und könnte daher durch das Wildtyp-L-Protein aus dem Komplex verdrängt werden. Die Inhibition der Polymeraseaktivität durch kompetitive Hemmung ist somit nicht möglich (Abb. 38A). L-Fragmente mit weniger als 370 N-terminalen AS besitzen weder eine intakte VP35-Interaktionsdomäne noch eine Homo-Oligomerisierungsdomäne und sind daher wohl nicht in der Lage den aktiven Polymerasekomplex zu inhibieren (Abb. 38A). Für den beobachteten inhibitorischen Effekt der L-Fragmente mit mehr als 370 N-terminalen AS lassen sich zwei mögliche Wirkmechanismen postulieren: Für die L-Deletionsmutanten $_{Flag}$L380 und $_{Flag}$L400 könnte die Inhibition auf einer verhinderten Komplexbildung zwischen Wildtyp-L-Oligomeren und VP35-Trimeren (Reid, et al., 2005) beruhen. Dabei bindet die L-Deletionsmutante an VP35 und blockiert damit die Bildung eines aktiven VP35-L-Komplexes durch kompetitive Hemmung (Abb. 38B). Die Ko-Expression von L-Fragmenten mit 450 oder mehr N-terminalen AS könnte zusätzlich zur Bildung eines inaktiven VP35-L-Komplexes führen. Dabei käme es neben der kompetitiven Hemmung der VP35-Bindung durch die Fähigkeit dieser Mutanten zur L-L-Interaktion auch zur Ausbildung gemischter enzymatisch inaktiver L-Homo-Oligomere (Abb. 38C).

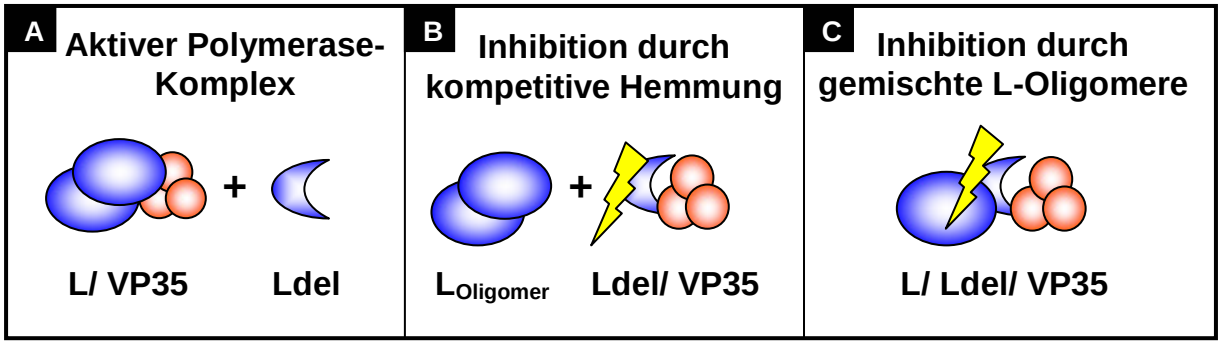


Abb. 38. Hypothetisches Schema zur Hemmung des aktiven Polymerase-Komplexes durch ko-exprimierte L-Deletionsmutanten des EBOVz. (A) Schematische Darstellung des aktiven Polymerase-Komplexes nach Ko-Expression einer L-Deletionsmutante ohne inhibitorischen Effekt. Das L-Fragment besitzt weder eine intakte VP35-Interaktionsdomäne noch die Fähigkeit zur Homo-Oligomerisierung. Polymerase L (blau), Kofaktor VP35 (rot), L-Deletionsmutante (blau, sichelförmig) (B) Graphische Darstellung der Inhibition (gelber Blitz) durch eine L-Deletionsmutante, die durch kompetitive Hemmung die Komplexbildung zwischen einem intakten Wildtyp-L-Oligomer und einem VP35-Trimer (Reid, et al., 2005) verhindert. Das L-Fragment besitzt lediglich eine intakte VP35-Interaktionsdomäne. (C) Graphische Darstellung der Inhibition durch eine L-Deletionsmutante, die aufgrund ihrer intakten Multimerisierungsdomäne ein gemischtes Homo-Oligomer und damit einen inaktiven Polymerase-Komplex bildet.

Interessanterweise zeigten L-Deletionsmutanten mit fehlendem N-Terminus, die jedoch die vollständige Bindungsdomäne für VP35 enthielten (z.B. Fragment $_{Flag}$L200-600), keine inhibierende Aktivität. Dies könnte darauf hinweisen, dass der N-Terminus des L-Proteins für eine hohe Bindungsaffinität erforderlich ist und so die VP35-Interaktion und/oder die L-Homo-Oligomerisierung stabilisiert. Demnach sind L-Deletionsmutanten mit fehlendem N-Terminus nicht in der Lage das Wildtyp-L aus dem Komplex zu verdrängen und so zur Inhibition der Polymeraseaktivität beizutragen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Polymerase L durch ko-exprimierte C-terminale L-Deletionsmutanten gehemmt werden kann. Dabei wird die Inhibition des aktiven

Polymerasekomplexes entweder durch (i) die kompetitive Hemmung des Kofaktors VP35 oder (ii) die Bildung von inaktiven gemischten L-Oligomeren bewirkt. Die identifizierten Bindungsdomänen im N-terminalen Bereich des L-Proteins stellen somit potenzielle Zielsequenzen für die Entwicklung EBOV-spezifischer antiviraler Therapien dar. Denkbar wäre die Herstellung eines kurzen Peptids (z.B. 20-25mer), das vom identifizierten Bindungsbereich abgeleitet ist und die Interaktion empfindlich stört. Ein solches Vorgehen wurde bereits für den Transkriptionsfaktor VP30 des EBOVz beschrieben (Hartlieb, et al., 2003). Hier gelang die Hemmung der VP30-Oligomerisierung durch ein 25mer Peptid (AS 91-113), das die identifizierte VP30-Oligomerisierungsdomäne (AS 94-112) umspannt. Wurden EBOV-infizierte Zellen mit dem synthetischen Peptid transfiziert, kam es zum Erliegen der viralen Transkription. Die Replikation blieb hingegen von der Hemmung der VP30-Oligomerisierung unbeeinflusst. Hier zeigt sich der Vorteil in der Inhibition der RNA-abhängigen RNA-Polymerase L, deren Hemmung zum kompletten Verlust aller RNA synthetisierenden Prozesse führt. Zudem gibt es in Säugerzellen kein Analogon zu dieser Polymerase.

Weitere Möglichkeiten der antiviralen Therapie liegen in der Anwendung von *antisense*-Methoden. „RNA *interference*“ (RNAi) repräsentiert eine starke und natürlich vorkommende Strategie zur Inhibition der Gen-Expression. Diese Methode wurde bereits zur Hemmung der Replikation in einer Anzahl von humanpathogenen Viren verwendet (Colbere-Garapin, et al., 2005, Tan and Yin, 2004). Auch die Proteinexpression und Virusfreisetzung des MARV konnte bereits durch RNAi inhibiert werden. Dabei kamen *small interfering* RNAs (siRNAs), die komplementär zu den MARV-Transkripten von NP, VP35 und VP30 sind, zum Einsatz (Fowler, et al., 2005). Die Hemmung der Polymerase L des EBOV konnte durch einen Pool von vier verschiedenen siRNAs gegen das L-Gen gezeigt werden, wobei die Inkorporation der siRNA in spezielle Liposomen zu sog. *stabile nucleic acid-lipid particles* (SNALPs) führten, die sich durch eine gesteigerte Effizienz auszeichneten. Hierbei gelang ein kompletter Schutz infizierter Meerschweinchen gegen Virämie und Tod (Geisbert, et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit durch ein *antisense*-Präparat die Virus-Vermehrung spezifisch zu inhibieren, liegt im Einsatz von Peptid-konjugierten synthetischen DNA-Analoga (P-PMOs). Zielsequenz dieser Peptidkonjugate ist der Translationsstart eines viralen Proteins auf dem (+)-Strang. Für das EBOV konnte eine gezielte Herunterregulierung des VP35 gezeigt werden, die zur Hemmung der ebolaviralen Vermehrung führte (Enterlein, et al., 2006). Der Einsatz von P-PMOs, die gegen den Translationsstart des L-Proteins des EBOVz gerichtet waren, führte in Zellkultur und in infizierten Mäusen nur zu einer unzureichenden Hemmung der ebolaviralen Replikation, obwohl eine effiziente Inhibition der Translation in *in-vitro*-Versuchen nachgewiesen werden konnte (Enterlein, et al., 2006, Warfield, et al., 2006). Ein Kombinationspräparat von P-PMOs gerichtet gegen die mRNAs von VP35, VP24 und L führte allerdings bei infizierten Affen in 75% der Fälle zu einem Schutz vor einer tödlichen EBOV-Infektion (Warfield, et al., 2006).

Für die spezifische Hemmung der Polymerase L des EBOV hat sich erst kürzlich ein ganz neuer Ansatz offenbart. Beschrieben wurde der hemmende Effekt eines *Zink-Finger antiviralen Proteins* (ZAP) auf die filovirale Replikation, wobei das Ziel des ZAPs die mRNA der Polymerase L darstellt. Bisher konnten zwar weder die spezifische Zielsequenz noch der genaue Mechanismus identifiziert werden, doch scheint eine minimale Sequenzlänge für die Interaktion mit ZAP nötig. Es wird vermutet, dass ZAP entweder inhibitorisch in die Synthese der L-genspezifischen mRNA eingreift oder aber die mRNA destabilisiert, was zu einer

Reduktion des L-mRNA-Levels und damit zu einer Hemmung der Virusvermehrung führt (Muller, et al., 2007).
Abschließend lässt sich feststellen, dass bisher noch keine wirksame antivirale Therapie gegen das EBOV existiert. Es gibt aber vielversprechende Ansätze für die Entwicklung antiviraler Präparate, die sich auch auf den Angriff des L-Proteins des EBOV beziehen. Darunter befinden sich Strategien wie die in dieser Arbeit beschriebene (i) Inhibition der Bildung des aktiven Polymerasekomplexes, (ii) die Inhibition der Gen-Expression durch *antisense*-Präparate (siRNA, P-PMOs) und die (iii) Destabilisierung L-genspezifischer mRNA.

6

ZUSAMMENFASSUNG

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ebolavirus Zaire (EBOVz) zählt zu den tödlichsten humanpathogenen Erregern, gegen die es weder ein Therapeutikum noch einen Impfstoff gibt. Replikation und Transkription des 19 kb umfassenden negativsträngigen RNA-Genoms basieren auf der Bildung eines aktiven RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplexes, der sich aus einer katalytischen Untereinheit, der Polymerase L, und deren Kofaktor VP35 zusammensetzt. Dieser Komplex interagiert mit dem von Nukleoproteinen (NP) dicht umhüllten RNA-Genom, um so Replikation und Transkription zu katalysieren. Das L-Protein ist in diesem Prozess das Schlüsselenzym.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von der Interaktion der Untereinheiten L und VP35 abhängige Bildung des Polymerase-Komplexes untersucht. Dabei wurden mit Hilfe verschiedener L-Deletionsmutanten die Bindungsdomänen identifiziert, die das L-Protein zur Ausbildung der verschiedenen Komplexe benötigt. Darüber hinaus wurden diese L-Fragmente auf ihre Fähigkeit getestet, die Replikation und Transkription des EBOVz durch Blockade der VP35-L-Interaktion und/ oder der Homo-Oligomerisierung des L zu inhibieren.

Ko-Expressionsstudien haben gezeigt, dass das L-Protein keine direkte Wechselwirkung mit dem NP eingeht. Das L-Protein interagiert jedoch mit VP35 und wird über dessen Bindung an NP zu der von NP umhüllten viralen RNA dirigiert. Mittels Immunfluoreszenz-Analysen und Ko-Immunpräzipitations-Assays konnte die VP35-Bindungsdomäne im N-terminalen Bereich des L-Proteins zwischen AS 280 bis 380 lokalisiert werden. Dieser Komplex wurde durch eine weitere Domäne des L-Proteins (AS 240-280) stabilisiert.

Das L-Protein ist auch in der Lage Homo-Oligomere zu bilden. Die Homo-Oligomerisierung wird über die ersten 450 N-terminalen AS des L-Proteins vermittelt und konnte auch in Abwesenheit von VP35 nachgewiesen werden.

Ferner wurden unter Verwendung eines Minigenom-Assays die inhibitorischen Effekte der L-Deletionsmutanten auf die Replikation und Transkription des EBOVz untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass N-terminale L-Fragmente, die mindestens 380 AS umfassen und die intakte VP35-Bindungsdomäne enthalten, zur effizienten Hemmung der Replikation und Transkription des EBOVz-Minigenoms fähig waren. Dies weist darauf hin, dass die Polymeraseaktivität durch eine kompetitive Hemmung der VP35-L-Komplexbildung inhibiert werden kann.

Abschließend kann festgestellt werden, dass der N-terminale Bereich des L-Proteins sowohl die VP35-Bindungsdomäne als auch die Homo-Oligomerisierungsdomäne enthält und damit eine wichtige Funktion in der Bildung des aktiven Polymerase-Komplexes einnimmt. Aus diesem Grund ist diese Domäne ein viel versprechender potentieller Angriffspunkt für die Entwicklung antiviraler Komponenten.

7

LITERATURVERZEICHNIS

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Baize, S., E. M. Leroy, M. C. Georges-Courbot, M. Capron, J. Lansoud-Soukate, P. Debre, S. P. Fisher-Hoch, J. B. McCormick, and A. J. Georges.** 1999. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients [see comments]. Nat Med **5:**423-6.
2. **Bamberg, S., L. Kolesnikova, P. Möller, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2005. VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles. J Virol **79:**13421-33.
3. **Basler, C. F., A. Mikulasova, L. Martinez-Sobrido, J. Paragas, E. Mühlberger, M. Bray, H. D. Klenk, P. Palese, and A. Garcia-Sastre.** 2003. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. J Virol **77:**7945-56.
4. **Basler, C. F., X. Wang, E. Mühlberger, V. Volchkov, J. Paragas, H. D. Klenk, A. Garcia-Sastre, and P. Palese.** 2000. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. Proc Natl Acad Sci U S A **97:**12289-94.
5. **Beck, S.** 2005. Etablierung einer quantitativen TaqMan-PCR für Ebola-Viren. Diplomarbeit. Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg.
6. **Becker, S., H. Feldmann, C. Will, and W. Slenczka.** 1992. Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide? Med Microbiol Immunol **181:**43-55.
7. **Becker, S., S. Huppertz, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1994. The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated. J Gen Virol **75:**809-18.
8. **Becker, S., C. Rinne, U. Hofsäss, H.-D. Klenk, and E. Mühlberger.** 1998. Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. Virology **249:**406-17.
9. **Beneduce, F., Y. Kusov, M. Klinger, V. Gauss-Muller, and G. Morace.** 2002. Chimeric hepatitis A virus particles presenting a foreign epitope (HIV gp41) at their surface. Antiviral Res **55:**369-77.
10. **Bertherat, E., A. Renaut, R. Nabias, G. Dubreuil, and M. C. Georges-Courbot.** 1999. Leptospirosis and Ebola virus infection in five gold-panning villages in northeastern Gabon. Am J Trop Med Hyg **60:**610-5.
11. **Blumberg, B. M., J. C. Crowley, J. I. Silverman, J. Menonna, S. D. Cook, and P. C. Dowling.** 1988. Measles virus L protein evidences elements of ancestral RNA polymerase. Virology **164:**487-97.
12. **Boehmann, Y., S. Enterlein, A. Randolf, and E. Mühlberger.** 2005. A reconstituted replication and transcription system for Ebola virus Reston and comparison with Ebola virus Zaire. Virology **332:**406-17.
13. **Buchholz, U. J., S. Finke, and K. K. Conzelmann.** 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. J Virol **73:**251-9.
14. **Buchmeier, M. J., R. U. DeFries, J. B. McCormick, and M. P. Kiley.** 1983. Comparative analysis of the structural polypeptides of Ebola viruses from Sudan and Zaire. J Infect Dis **147:**276-81.
15. **Bwaka, M. A., M. J. Bonnet, P. Calain, R. Colebunders, A. De Roo, Y. Guimard, K. R. Katwiki, K. Kibadi, M. A. Kipasa, K. J. Kuvula, B. B. Mapanda, M. Massamba, K. D. Mupapa, J. J. Muyembe-Tamfum, E. Ndaberey, C. J. Peters, P. E. Rollin, and E. Van den Enden.** 1999. Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. J Infect Dis **179 Suppl 1:**S1-7.
16. **Canter, D. M., and J. Perrault.** 1996. Stabilization of vesicular stomatitis virus L polymerase protein by P protein binding: a small deletion in the C-terminal domain of L abrogates binding. Virology **219:**376-86.
17. **Cevik, B., D. E. Holmes, E. Vrotsos, J. A. Feller, S. Smallwood, and S. A. Moyer.** 2004. The phosphoprotein (P) and L binding sites reside in the N-terminus of the L subunit of the measles virus RNA polymerase. Virology **327:**297-306.
18. **Cevik, B., S. Smallwood, and S. A. Moyer.** 2003. The L-L oligomerization domain resides at the very N-terminus of the sendai virus L RNA polymerase protein. Virology **313:**525-36.
19. **Chandrika, R., S. M. Horikami, S. Smallwood, and S. A. Moyer.** 1995. Mutations in conserved domain I of the Sendai virus L polymerase protein uncouple transcription and replication. Virology **213:**352-63.

20. **Chattopadhyay, A., and M. S. Shaila.** 2004. Rinderpest virus RNA polymerase subunits: mapping of mutual interacting domains on the large protein L and phosphoprotein p. Virus Genes **28:**169-78.
21. **Chenik, M., M. Schnell, K. K. Conzelmann, and D. Blondel.** 1998. Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein. J Virol **72:**1925-30.
22. **Colbere-Garapin, F., B. Blondel, A. Saulnier, I. Pelletier, and K. Labadie.** 2005. Silencing viruses by RNA interference. Microbes Infect **7:**767-75.
23. **Conzelmann, K. K.** 2004. Reverse genetics of mononegavirales. Curr Top Microbiol Immunol **283:**1-41.
24. **Cortese, C. K., J. A. Feller, and S. A. Moyer.** 2000. Mutations in domain V of the Sendai virus L polymerase protein uncouple transcription and replication and differentially affect replication in vitro and in vivo. Virology **277:**387-96.
25. **Cox, N. J., J. B. McCormick, K. M. Johnson, and M. P. Kiley.** 1983. Evidence for two subtypes of Ebola virus based on oligonucleotide mapping of RNA. J Infect Dis **147:**272-5.
26. **Crary, S. M., J. S. Towner, J. E. Honig, T. R. Shoemaker, and S. T. Nichol.** 2003. Analysis of the role of predicted RNA secondary structures in Ebola virus replication. Virology **306:**210-8.
27. **Dayhoff, M. O., L. T. Hunt, and S. Hurst-Calderone.** 1978. Compositions of proteins. Atlas of Protein Sequence and Structure **5:**363-373.
28. **Dessen, A., V. Volchkov, O. Dolnik, H. D. Klenk, and W. Weissenhorn.** 2000. Crystal structure of the matrix protein VP40 from ebola virus [In Process Citation]. Embo J **19:**4228-36.
29. **Dolnik, O., V. Volchkova, W. Garten, C. Carbonnelle, S. Becker, J. Kahnt, U. Stroher, H. D. Klenk, and V. Volchkov.** 2004. Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus. Embo J **23:**2175-84.
30. **Dowell, S. F., R. Mukunu, T. G. Ksiazek, A. S. Khan, P. E. Rollin, and C. J. Peters.** 1999. Transmission of Ebola hemorrhagic fever: a study of risk factors in family members, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. Commission de Lutte contre les Epidemies a Kikwit. J Infect Dis **179 Suppl 1:**S87-91.
31. **Elliott, L. H., M. P. Kiley, and J. B. McCormick.** 1985. Descriptive analysis of Ebola virus proteins. Virology **147:**169-76.
32. **Emerson, S. U.** 1982. Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the vesicular stomatitis virus genome. Cell **31:**635-42.
33. **Enterlein, S., K. L. Warfield, D. L. Swenson, D. A. Stein, J. L. Smith, C. S. Gamble, A. D. Kroeker, P. L. Iversen, S. Bavari, and E. Mühlberger.** 2006. VP35 knockdown inhibits Ebola virus amplification and protects against lethal infection in mice. Antimicrob Agents Chemother **50:**984-93.
34. **Feldmann, H., and M. P. Kiley.** 1999. Classification, structure, and replication of filoviruses. Curr Top Microbiol Immunol **235:**1-21.
35. **Feldmann, H., and H. D. Klenk.** 1996. Marburg and Ebola viruses. Adv Virus Res **47:**1-52.
36. **Feldmann, H., E. Mühlberger, A. Randolf, C. Will, M. P. Kiley, A. Sanchez, and H. D. Klenk.** 1992. Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. Virus Res **24:**1-19.
37. **Feldmann, H., W. Slenczka, and H. D. Klenk.** 1996. Emerging and reemerging of filoviruses. Arch Virol Suppl **11:**77-100.
38. **Feldmann, H., C. Will, M. Schikore, W. Slenczka, and H. D. Klenk.** 1991. Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. Virology **182:**353-6.
39. **Feller, J. A., S. Smallwood, S. M. Horikami, and S. A. Moyer.** 2000. Mutations in conserved domains IV and VI of the large (L) subunit of the sendai virus RNA polymerase give a spectrum of defective RNA synthesis phenotypes. Virology **269:**426-39.
40. **Finke, S., R. Mueller-Waldeck, and K. K. Conzelmann.** 2003. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. J Gen Virol **84:**1613-21.
41. **Formenty, P., C. Hatz, B. Le Guenno, A. Stoll, P. Rogenmoser, and A. Widmer.** 1999. Human infection due to Ebola virus, subtype Cote d'Ivoire: clinical and biologic presentation. J Infect Dis **179 Suppl 1:**S48-53.
42. **Fowler, T., S. Bamberg, P. Möller, H. D. Klenk, T. F. Meyer, S. Becker, and T. Rudel.** 2005. Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNA interference. J Gen Virol **86:**1181-8.
43. **Garcia, J., B. Garcia-Barreno, A. Vivo, and J. A. Melero.** 1993. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. Virology **195:**243-7.

44. **Garoff, H., R. Hewson, and D. J. Opstelten.** 1998. Virus maturation by budding. Microbiol Mol Biol Rev **62:**1171-90.
45. **Gear, J. S., G. A. Cassel, A. J. Gear, B. Trappler, L. Clausen, A. M. Meyers, M. C. Kew, T. H. Bothwell, R. Sher, G. B. Miller, J. Schneider, H. J. Koornhof, E. D. Gomperts, M. Isaacson, and J. H. Gear.** 1975. Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. Br Med J **4:**489-93.
46. **Geisbert, T. W., L. E. Hensley, E. Kagan, E. Z. Yu, J. B. Geisbert, K. Daddario-DiCaprio, E. A. Fritz, P. B. Jahrling, K. McClintock, J. R. Phelps, A. C. Lee, A. Judge, L. B. Jeffs, and I. MacLachlan.** 2006. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference. J Infect Dis **193:**1650-7.
47. **Geisbert, T. W., and P. B. Jahrling.** 1995. Differentiation of filoviruses by electron microscopy. Virus Res **39:**129-50.
48. **Gomis-Ruth, F. X., A. Dessen, J. Timmins, A. Bracher, L. Kolesnikowa, S. Becker, H. D. Klenk, and W. Weissenhorn.** 2003. The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties. Structure **11:**423-33.
49. **Han, Z., H. Boshra, J. O. Sunyer, S. H. Zwiers, J. Paragas, and R. N. Harty.** 2003. Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding. J Virol **77:**1793-800.
50. **Hartlieb, B., J. Modrof, E. Mühlberger, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2003. Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide. J Biol Chem **278:**41830-6.
51. **Hartlieb, B., T. Muziol, W. Weissenhorn, and S. Becker.** 2007. Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. Proc Natl Acad Sci U S A **104:**624-9.
52. **Hevey, M., D. Negley, P. Pushko, J. Smith, and A. Schmaljohn.** 1998. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. Virology **251:**28-37.
53. **Hoenen, T., V. Volchkov, L. Kolesnikova, E. Mittler, J. Timmins, M. Ottmann, O. Reynard, S. Becker, and W. Weissenhorn.** 2005. VP40 octamers are essential for Ebola virus replication. J Virol **79:**1898-905.
54. **Holmes, D. E., and S. A. Moyer.** 2002. The phosphoprotein (P) binding site resides in the N terminus of the L polymerase subunit of sendai virus. J Virol **76:**3078-83.
55. **Horikami, S. M., J. Curran, D. Kolakofsky, and S. A. Moyer.** 1992. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. J Virol **66:**4901-8.
56. **Horikami, S. M., R. E. Hector, S. Smallwood, and S. A. Moyer.** 1997. The Sendai virus C protein binds the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. Virology **235:**261-70.
57. **Horikami, S. M., and S. A. Moyer.** 1995. Alternative amino acids at a single site in the Sendai virus L protein produce multiple defects in RNA synthesis in vitro. Virology **211:**577-82.
58. **Horikami, S. M., S. Smallwood, B. Bankamp, and S. A. Moyer.** 1994. An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. Virology **205:**540-5.
59. **Huang, Y., L. Xu, Y. Sun, and G. J. Nabel.** 2002. The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. Mol Cell **10:**307-16.
60. **Huang, Y. T., P. L. Collins, and G. W. Wertz.** 1985. Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. Virus Res **2:**157-73.
61. **Huggins, J., Z. X. Zhang, and M. Bray.** 1999. Antiviral drug therapy of filovirus infections: S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors inhibit Ebola virus in vitro and in a lethal mouse model. J Infect Dis **179 Suppl 1:**S240-7.
62. **Hughes, J. H., D. R. Mann, and V. V. Hamparian.** 1986. Viral isolation versus immune staining of infected cell cultures for the laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. J Clin Microbiol **24:**487-9.
63. **ICTV.** 1991. The order Mononegavirales. Arch Virol **117:**137-40.
64. **Jahrling, P. B., T. W. Geisbert, D. W. Dalgard, E. D. Johnson, T. G. Ksiazek, W. C. Hall, and C. J. Peters.** 1990. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. Lancet **335:**502-5.
65. **Jasenosky, L. D., G. Neumann, I. Lukashevich, and Y. Kawaoka.** 2001. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. J Virol **75:**5205-14.

66. **Johnson, E. D., B. K. Johnson, D. Silverstein, P. Tukei, T. W. Geisbert, A. N. Sanchez, and P. B. Jahrling.** 1996. Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya. Arch Virol Suppl **11:**101-14.
67. **Johnson, K. M., J. V. Lange, P. A. Webb, and F. A. Murphy.** 1977. Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. Lancet **1:**569-71.
68. **Jones, S. M., H. Feldmann, U. Stroher, J. B. Geisbert, L. Fernando, A. Grolla, H. D. Klenk, N. J. Sullivan, V. E. Volchkov, E. A. Fritz, K. M. Daddario, L. E. Hensley, P. B. Jahrling, and T. W. Geisbert.** 2005. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. Nat Med **11:**786-90.
69. **Kiley, M. P., E. T. Bowen, G. A. Eddy, M. Isaacson, K. M. Johnson, J. B. McCormick, F. A. Murphy, S. R. Pattyn, D. Peters, O. W. Prozesky, R. L. Regnery, D. I. Simpson, W. Slenczka, P. Sureau, G. van der Groen, P. A. Webb, and H. Wulff.** 1982. Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? Intervirology **18:**24-32.
70. **Kiley, M. P., N. J. Cox, L. H. Elliott, A. Sanchez, R. DeFries, M. J. Buchmeier, D. D. Richman, and J. B. McCormick.** 1988. Physicochemical properties of Marburg virus: evidence for three distinct virus strains and their relationship to Ebola virus. J Gen Virol **69:**1957-67.
71. **Kiley, M. P., J. Wilusz, J. B. McCormick, and J. D. Keene.** 1986. Conservation of the 3' terminal nucleotide sequences of Ebola and Marburg virus. Virology **149:**251-4.
72. **Kolakofsky, D.** 1982. Isolation of vesicular stomatitis virus defective interfering genomes with different amounts of 5'-terminal complementarity. J Virol **41:**566-74.
73. **Kolesnikova, L., E. Mühlberger, E. Ryabchikova, and S. Becker.** 2000. Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. J Virol **74:**3899-904.
74. **Lazinski, D., E. Grzadzielska, and A. Das.** 1989. Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. Cell **59:**207-18.
75. **Leffel, E. K., and D. S. Reed.** 2004. Marburg and Ebola viruses as aerosol threats. Biosecur Bioterror **2:**186-91.
76. **Leroy, E. M., S. Baize, V. E. Volchkov, S. P. Fisher-Hoch, M. C. Georges-Courbot, J. Lansoud-Soukate, M. Capron, P. Debre, J. B. McCormick, and A. J. Georges.** 2000. Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response [see comments]. Lancet **355:**2210-5.
77. **Licata, J. M., R. F. Johnson, Z. Han, and R. N. Harty.** 2004. Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. J Virol **78:**7344-51.
78. **Mahanty, S., and M. Bray.** 2004. Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. Lancet Infect Dis **4:**487-98.
79. **Manicassamy, B., J. Wang, H. Jiang, and L. Rong.** 2005. Comprehensive analysis of ebola virus GP1 in viral entry. J Virol **79:**4793-805.
80. **Martini, G. A., H. G. Knauff, H. A. Schmidt, G. Mayer, and G. Baltzer.** 1968. A hitherto unknown infectious disease contracted from monkeys. "Marburg- virus" disease. Ger Med Mon **13:**457-70.
81. **Marzi, A., T. Gramberg, G. Simmons, P. Moller, A. J. Rennekamp, M. Krumbiegel, M. Geier, J. Eisemann, N. Turza, B. Saunier, A. Steinkasserer, S. Becker, P. Bates, H. Hofmann, and S. Pohlmann.** 2004. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Virol **78:**12090-5.
82. **Miranda, M. E., T. G. Ksiazek, T. J. Retuya, A. S. Khan, A. Sanchez, C. F. Fulhorst, P. E. Rollin, A. B. Calaor, D. L. Manalo, M. C. Roces, M. M. Dayrit, and C. J. Peters.** 1999. Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. J Infect Dis **179 Suppl 1:**S115-9.
83. **Modrof, J., S. Becker, and E. Mühlberger.** 2003. Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein. J Virol **77:**3334-8.
84. **Modrof, J., C. Moritz, L. Kolesnikova, T. Konakova, B. Hartlieb, A. Randolf, E. Muhlberger, and S. Becker.** 2001. Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. Virology **287:**171-82.
85. **Modrof, J., E. Mühlberger, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2002. Phosphorylation of VP30 Impairs Ebola Virus Transcription. J Biol Chem **277:**33099-104.
86. **Möller, P., N. Pariente, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2005. Homo-oligomerization of Marburgvirus VP35 is essential for its function in replication and transcription. J Virol **79:**14876-86.

87. **Mühlberger, E., B. Lötfering, H.-D. Klenk, and S. Becker.** 1998. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. J Virol **72:**8756-64.
88. **Mühlberger, E., A. Sanchez, A. Randolf, C. Will, M. P. Kiley, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1992. The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses. Virology **187:**534-47.
89. **Mühlberger, E., S. Trommer, C. Funke, V. Volchkov, H.-D. Klenk, and S. Becker.** 1996. Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. Virology **223:**376-80.
90. **Mühlberger, E., M. Weik, V. E. Volchkov, H.-D. Klenk, and S. Becker.** 1999. Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. J Virol **73:**2333-42.
91. **Muller, S., P. Moller, M. J. Bick, S. Wurr, S. Becker, S. Gunther, and B. M. Kummerer.** 2007. Inhibition of filovirus replication by the zinc finger antiviral protein. J Virol **81:**2391-400.
92. **Parks, G. D.** 1994. Mapping of a region of the paramyxovirus L protein required for the formation of a stable complex with the viral phosphoprotein P. J Virol **68:**4862-72.
93. **Peters, C. J.** 1996. Emerging infections--Ebola and other filoviruses. West J Med **164:**36-8.
94. **Peters, C. J., and A. S. Khan.** 1999. Filovirus diseases. Curr Top Microbiol Immunol **235:**85-95.
95. **Poch, O., B. M. Blumberg, L. Bougueleret, and N. Tordo.** 1990. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. J Gen Virol **71:**1153-62.
96. **Qanungo, K. R., D. Shaji, M. Mathur, and A. K. Banerjee.** 2004. Two RNA polymerase complexes from vesicular stomatitis virus-infected cells that carry out transcription and replication of genome RNA. Proc Natl Acad Sci U S A **101:**5952-7.
97. **Reid, S. P., W. B. Cardenas, and C. F. Basler.** 2005. Homo-oligomerization facilitates the interferon-antagonist activity of the ebolavirus VP35 protein. Virology **341:**179-89.
98. **Roels, T. H., A. S. Bloom, J. Buffington, G. L. Muhungu, W. R. Mac Kenzie, A. S. Khan, R. Ndambi, D. L. Noah, H. R. Rolka, C. J. Peters, and T. G. Ksiazek.** 1999. Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: risk factors for patients without a reported exposure. J Infect Dis **179 Suppl 1:**S92-7.
99. **Ruigrok, R. W., G. Schoehn, A. Dessen, E. Forest, V. Volchkov, O. Dolnik, H. D. Klenk, and W. Weissenhorn.** 2000. Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. J Mol Biol **300:**103-12.
100. **Ryabchikova, E., L. Kolesnikova, M. Smolina, V. Tkachev, L. Pereboeva, S. Baranova, A. Grazhdantseva, and Y. Rassadkin.** 1996. Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. Arch Virol **141:**909-21.
101. **Ryabchikova, E., L. Strelets, L. Kolesnikova, O. Pyankov, and A. Sergeev.** 1996. Respiratory Marburg virus infection in guinea pigs. Arch Virol **141:**2177-90.
102. **Sanchez, A., M. P. Kiley, B. P. Holloway, and D. D. Auperin.** 1993. Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. Virus Res **29:**215-40.
103. **Sanchez, A., M. P. Kiley, B. P. Holloway, J. B. McCormick, and D. D. Auperin.** 1989. The nucleoprotein gene of Ebola virus: cloning, sequencing, and in vitro expression. Virology **170:**81-91.
104. **Sanchez, A., M. P. Kiley, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1992. Sequence analysis of the Marburg virus nucleoprotein gene: comparison to Ebola virus and other non-segmented negative-strand RNA viruses. J Gen Virol **73:**347-57.
105. **Sanchez, A., T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, M. E. Miranda, S. G. Trappier, A. S. Khan, C. J. Peters, and S. T. Nichol.** 1999. Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. J Infect Dis **179 Suppl 1:**S164-9.
106. **Sanchez, A., S. G. Trappier, B. W. Mahy, C. J. Peters, and S. T. Nichol.** 1996. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. Proc Natl Acad Sci U S A **93:**3602-7.
107. **Sanchez, A. B., and J. C. de la Torre.** 2005. Genetic and biochemical evidence for an oligomeric structure of the functional L polymerase of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. J Virol **79:**7262-8.
108. **Sanger, F., and A. R. Coulson.** 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol **94:**441-8.
109. **Schnittler, H. J., F. Mahner, D. Drenckhahn, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1993. Replication of Marburg virus in human endothelial cells. A possible mechanism for the development of viral hemorrhagic disease. J Clin Invest **91:**1301-9.

110. **Schornberg, K., S. Matsuyama, K. Kabsch, S. Delos, A. Bouton, and J. White.** 2006. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. J Virol **80:**4174-8.
111. **Siegert, R., H. L. Shu, and W. Slenczka.** 1968. [Isolation and identification of the "Marburg virus"]. Dtsch Med Wochenschr **93:**604-12.
112. **Siegert, R., H.-L. Shu, W. Slenczka, D. Peters, and G. Müller.** 1967. Zur Aetiologie einer unbekannten, von Affen ausgegangenen menschlichen Infektioskrankheit. Dtsch Med Wschr **51:**2341-3.
113. **Slenczka, W., H. L. Shu, G. Piepenberg, and R. Siegert.** 1968. Detection of the antigen of the "Marburg Virus" in the organs of infected guinea-pigs by immunofluorescence. Ger Med Mon **13:**524-9.
114. **Slenczka, W. G.** 1999. The Marburg virus outbreak of 1967 and subsequent episodes. Curr Top Microbiol Immunol **235:**49-75.
115. **Smallwood, S., B. Cevik, and S. A. Moyer.** 2002. Intragenic complementation and oligomerization of the L subunit of the sendai virus RNA polymerase. Virology **304:**235-45.
116. **Smallwood, S., C. D. Easson, J. A. Feller, S. M. Horikami, and S. A. Moyer.** 1999. Mutations in conserved domain II of the large (L) subunit of the Sendai virus RNA polymerase abolish RNA synthesis. Virology **262:**375-83.
117. **Smallwood, S., and S. A. Moyer.** 2004. The L polymerase protein of parainfluenza virus 3 forms an oligomer and can interact with the heterologous Sendai virus L, P and C proteins. Virology **318:**439-50.
118. **Smith, D. H., B. K. Johnson, M. Isaacson, R. Swanapoel, K. M. Johnson, M. Killey, A. Bagshawe, T. Siongok, and W. K. Keruga.** 1982. Marburg-virus disease in Kenya. Lancet **1:**816-20.
119. **Ströher, U., E. West, H. Bugany, H. D. Klenk, H. J. Schnittler, and H. Feldmann.** 2001. Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. J Virol **75:**11025-33.
120. **Sullivan, N., Z. Y. Yang, and G. J. Nabel.** 2003. Ebola virus pathogenesis: implications for vaccines and therapies. J Virol **77:**9733-7.
121. **Sullivan, N. J., M. Peterson, Z. Y. Yang, W. P. Kong, H. Duckers, E. Nabel, and G. J. Nabel.** 2005. Ebola virus glycoprotein toxicity is mediated by a dynamin-dependent protein-trafficking pathway. J Virol **79:**547-53.
122. **Sutter, G., M. Ohlmann, and V. Erfle.** 1995. Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. FEBS Lett **371:**9-12.
123. **Swanepoel, R., P. A. Leman, F. J. Burt, N. A. Zachariades, L. E. Braack, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, S. R. Zaki, and C. J. Peters.** 1996. Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. Emerg Infect Dis **2:**321-5.
124. **Tan, F. L., and J. Q. Yin.** 2004. RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection. Cell Res **14:**460-6.
125. **Vanderzanden, L., M. Bray, D. Fuller, T. Roberts, D. Custer, K. Spik, P. Jahrling, J. Huggins, A. Schmaljohn, and C. Schmaljohn.** 1998. DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. Virology **246:**134-44.
126. **Villinger, F., P. E. Rollin, S. S. Brar, N. F. Chikkala, J. Winter, J. B. Sundstrom, S. R. Zaki, R. Swanepoel, A. A. Ansari, and C. J. Peters.** 1999. Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. J Infect Dis **179 Suppl 1:**S188-91.
127. **Vogel, G.** 2004. Epidemiology. Ebola outbreaks may have had independent sources. Science **303:**298-9.
128. **Volchkov, V., V. Volchkova, C. Eckel, H. D. Klenk, M. Bouloy, B. LeGuenno, and H. Feldmann.** 1997. Emergence of subtype Zaire Ebola virus in Gabon. Virology **232:**139-44.
129. **Volchkov, V. E.** 1999. Processing of the Ebola virus glycoprotein. Curr Top Microbiol Immunol **235:**35-47.
130. **Volchkov, V. E., S. Becker, V. A. Volchkova, V. A. Ternovoj, A. N. Kotov, S. V. Netesov, and H. D. Klenk.** 1995. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. Virology **214:**421-30.
131. **Volchkov, V. E., A. A. Chepurnov, V. A. Volchkova, V. A. Ternovoj, and H. D. Klenk.** 2000. Molecular Characterization of Guinea Pig-Adapted Variants of Ebola Virus. Virology **277:**147-155.
132. **Volchkov, V. E., H. Feldmann, V. A. Volchkova, and H. D. Klenk.** 1998. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. Proc Natl Acad Sci U S A **95:**5762-7.
133. **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, A. A. Chepurnov, V. M. Blinov, O. Dolnik, S. V. Netesov, and H. Feldmann.** 1999. Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. J Gen Virol **80:**355-62.

134. **Wahl-Jensen, V., S. K. Kurz, P. R. Hazelton, H. J. Schnittler, U. Stroher, D. R. Burton, and H. Feldmann.** 2005. Role of Ebola virus secreted glycoproteins and virus-like particles in activation of human macrophages. J Virol **79:**2413-9.
135. **Warfield, K. L., R. G. Panchal, M. J. Aman, and S. Bavari.** 2006. Antisense treatments for biothreat agents. Curr Opin Mol Ther **8:**93-103.
136. **Warfield, K. L., D. L. Swenson, G. Demmin, and S. Bavari.** 2005. Filovirus-like particles as vaccines and discovery tools. Expert Rev Vaccines **4:**429-40.
137. **Watanabe, S., T. Noda, and Y. Kawaoka.** 2006. Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus. J Virol **80:**3743-51.
138. **Watanabe, S., A. Takada, T. Watanabe, H. Ito, H. Kida, and Y. Kawaoka.** 2000. Functional importance of the coiled-coil of the ebola virus glycoprotein. J Virol **74:**10194-201.
139. **Weidmann, M., E. Muhlberger, and F. T. Hufert.** 2004. Rapid detection protocol for filoviruses. J Clin Virol **30:**94-9.
140. **Weik, M., S. Enterlein, K. Schlenz, and E. Mühlberger.** 2005. The Ebola virus genomic replication promoter is bipartite and follows the rule of six. J Virol **79:**10660-71.
141. **Weik, M., J. Modrof, H. D. Klenk, S. Becker, and E. Mühlberger.** 2002. Ebola Virus VP30-Mediated Transcription Is Regulated by RNA Secondary Structure Formation. J Virol **76:**8532-9.
142. **Whelan, S. P., J. N. Barr, and G. W. Wertz.** 2004. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. Curr Top Microbiol Immunol **283:**61-119.
143. **WHO.** 1999. Marburg fever in the Democratic republic of the Congo. WER **74:**145.
144. **WHO.** 2005. Marburg haemorrhagic fever, Angola--update. Wkly Epidemiol Rec **80:**141-2.
145. **Will, C., E. Muhlberger, D. Linder, W. Slenczka, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1993. Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein. J Virol **67:**1203-10.

8

ABBILDUNGS-/ TABELLEN- und ABKÜRZUNGS-VERZEICHNIS

8 ABBILDUNGS-/ TABELLEN- und ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abbildungen:

Abb. 1	Taxonomie der Filoviren	2
Abb. 2	Herkunft und Erstisolierung des MARV und der EBOV-Spezies	4
Abb. 3	Morphologie eines Filoviruspartikels	7
Abb. 4	Genomorganisation von MARV und EBOV	8
Abb. 5	Schematische Darstellung der Struktur des L-Proteins des EBOV	11
Abb. 6	Replikation und Transkription des EBOVz-Genoms	15
Abb. 7	Struktur des EBOVz Replikations-Promotors	16
Abb. 8	Artifizielles Replikations- und Transkriptionssystem	17
Abb. 9	Interaktionen der Nukleokapsidproteine des EBOV	18
Abb. 10	Prinzip einer PCR	32
Abb. 11	Schematische Darstellung der Immunpräzipitation	44
Abb. 12	Schematischer Aufbau der Western-Blot-Apparatur	46
Abb. 13	Acetylierung des Chloramphenicols und des 1-Desoxychloramphenicols	48
Abb. 14	Biolumineszenz-Reaktionen katalysiert durch die *Firefly*- und *Renilla*-Luziferase	50
Abb. 15	Sequenz des N-terminalen Flag-Epitops des EBOVzL im pTM1-Vektor	53
Abb. 16	Interaktion des EBOVzL mit den Nukleokapsidproteinen NP und VP35	54
Abb. 17	Klonierte L-Deletionsmutanten des EBOVz	56
Abb. 18	Einzel-Expression der Flag_EBOVzL-Fragmente (IFA)	59
Abb. 19	Ko-Expression der Flag_EBOVzL-Fragmente mit NP und VP35	60
Abb. 20	Ko-Expression der C- und N-terminalen L-Deletionsmutanten mit NP und VP35	61
Abb. 21	Einzel-Expression der C- und N-terminalen L-Deletionsmutanten und partielle Ko-Lokalisation von Flag_EBOVzL240-600	62
Abb. 22	Interaktion des Flag_EBOVzL mit $VP35_{HA}$	64
Abb. 23	Interaktion der C-terminalen $_{Flag}$L-Deletionsmutanten mit $VP35_{HA}$	66
Abb. 24	Interaktion der C- und N-terminal deletierten $_{Flag}$L-Fragmente mit $VP35_{HA}$	67
Abb. 25	Struktur der VP35-Bindungsdomäne auf dem EBOVzL	68
Abb. 26	Einfluss einer N-terminalen Epitop-Markierung auf die Aktivität der Polymerase L des EBOVz	70
Abb. 27	Instabilität des L-Proteins des EBOVz	72
Abb. 28	Stabilisierung des L-Proteins des EBOVz	73
Abb. 29	Homo-Oligomerisierung des L-Proteins des EBOVz	74
Abb. 30	Plasmidtitration der inhibitorisch wirksamen L-Deletionsmutanten pT_HA-/ Flag-EBOVzL600 im Dual-Luziferase Reporter-Assay	77
Abb. 31	Klonierte L-Peptidfragmente des EBOVz	78
Abb. 32	Test aller klonierten L-Fragmente auf die Fähigkeit über kompetitive Hemmung der VP35-L oder L-L-Interaktion die Polymerase zu inhibieren	79
Abb. 33	Proteinnachweis der L-Deletionsmutanten Flag_EBOVzL370 und Flag_EBOVzL380	80
Abb. 34	Test der L-Deletionsmutanten auf die Fähigkeit zur Hemmung der Polymeraseaktivität	81
Abb. 35	Schematische Darstellung der P-/ VP35-Bindungsdomäne auf dem L-Protein der NNS-Viren	84
Abb. 36	Ausschnitt aus dem AS-Sequenzvergleich zwischen den N-terminalen Bereichen der L Proteine des EBOVz und des RPV	86
Abb. 37	AS-Sequenzabschnitt (AS 340-380) der L-Proteine verschiedener NNS-Viren mit auffälligem Sequenzmuster	86
Abb. 38	Hypothetisches Schema zur Hemmung des aktiven Polymerase-Komplexes durch ko-exprimierte L-Deletionsmutanten des EBOVz	89

Tabellen:

Tab. 1	Ausbrüche von Filovirusinfektionen	3
Tab. 2	Transkriptionssignale des EBOV	10
Tab. 3	Genotypen der verwendeten *E. coli* Bakterien	28
Tab. 4	Zelllinien ohne stabile Expression der T7-RNA-Polymerase	28
Tab. 5	Viren	29
Tab. 6	L-Deletionsmutanten des EBOVz	57
Tab. 7	N-terminal HA-markierte L-Proteine des EBOVz	69
Tab. 8	Peptidfragmente des EBOVz	79

Abkürzungen:

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen.

2YT-Medium	Yeast-Tryptone Medium
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDV	*Borna Disease Virus*, Virus der Bornaschen Krankheit
bp	*basepair(s)*, Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
BSL4	*biosafety level 4*
CAMP	Chloramphenicol
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CatB/ L	Cathepsin B/ L
CDC	*Centers for Disease Control*
cDNA	komplementäre DNA
CIAP	*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*
CIP	*Calf Intestinal Phosphatase*
CoA	Coenzym A
C-Terminus	Carboxyterminus
CTD	carboxyterminale Domäne
***d**am*	DNA-Adenin-Methylase
DAPI	4, 6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
dcm	DNA-Cytosin-Methylase
def	deficient
dH_2O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*Deoxyribonucleic Acid,* Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRK	Demokratische Republik Kongo
ds	*double stranded*, Doppelstrang
E$BOV_{Z/ S/ IC/ R}$	Ebola-Virus (Spezies Zaire; Sudan; Ivory Coast; Reston)
EDTA	Dinatriummethylendiamintetraacetat
EF-1α	*translation elongation factor-1α*
EHF	*Ebola hemorrhagic fever*
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	*Fetal Calf Serum*
F-Luz	*Firefly*-Luziferase
GP	Glykoprotein
GT	Guanylyltranferase
hPIV3	humanes Parainfluenza-Virus 3

HRP	*horseradish peroxidase,* Meerrettich-Peroxidase
HSP	*heat-shock protein*, Hitzeschock-Protein
IFA	Immunfluoreszenz-Analyse
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IR	intergenische Region
IRES	*internal ribosomal entry site*; interne ribosomale Eintrittsstelle
IRF-3	IFN-regulierender Faktor 3
kb	*kilobases*, 1000 Basen
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
LB	Luria Bertani
L-Protein	*Large*-Protein (Polymerase)
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MARV	Marburg-Virus
MCS	*Multiple Cloning Site*
MG	Molekulargewicht (bzw. Minigenom)
MHC	*Major Histocompatibility Complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex
MHF	*Marburg hemorrhagic fever*
MPS	Monocytäres Phagozytensystem
mRNA	*messenger*-RNA, ‚Boten'-RNA
MV	Masernvirus
MVA-T7	*modified vaccinia virus strain Ankara* (attenuiertes, rekombinantes Vaccinia-Virus, das für die RNA Polymerase des Bakteriophagen T7 kodiert)
NC	Nukleokapsidkomplex
NNS-Virus	nicht-segmentiertes Negativ-Strang Virus
NP	Nukleoprotein
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus
NTD	aminoterminale Domäne
NTR	nicht-translatierte Regionen
OD	*Optical Density*, optische Dichte
ORF	*Open Reading Frame*, offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	*Phosphate Buffered Saline*, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	*Polymerase Chain Reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Promotorelement
Pen/ Strep	Penicillin/ Steptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	*potentia hydrogenii* (lat. Stärke des Wasserstoffs)
PMO	Phosphorodiamidat-Morpholinooligomer
PNK	Polynukleotidkinase
POD	Peroxidase
P-PMO	Peptid-konjugiertes Phosphorodiamidat-Morpholinooligomer
P-Protein	Phosphoprotein
preGP	Precursor GP
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rATP	ribo-Adenosintriphosphate
RdRp	*RNA-dependent RNA-polymerase*, RNA-abhängige RNA-Polymerase
R-Luz	*Renilla*-Luziferase
RNA	*Ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
RNP-Komplex	Ribonukleoprotein-Komplex
RPV	Rinderpest-Virus
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT	Reverse Transkriptase/ Transkription oder Raumtemperatur
RV	Rabies-Virus
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat
SeV	Sendai-Virus
sGP	*soluble Glycoprotein*, lösliches Glykoprotein
siRNA	*small interfering* RNA
SNALPs	*stabile nucleic acid-lipid particles*

ss	*single stranded*, Einzelstrang
SV 5/ 40	Simian-Virus 5 bzw. 40
Tab.	Tabelle
TACE	*Tumor-necrosis factor α converting enzym*
TAE-Puffer	Tris-Acetate-EDTA Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borate-EDTA Puffer
TEMED	N, N, N´, N´, - Tetramethylethylendiamin
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	Transkriptionsstart-Signal
TStpS	Transkriptionsstopp-Signal
UV	Ultraviolett
ÜKR	Überkopfrotierer
VHF	*Viral hemorrhagic fever*
VLP	*Virus like particle,* virus-ähnliche Partikel
VP	virales Protein
vRNA	virale-RNA
VSV	vesikuläres Stomatitis-Virus
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation
ZAP	Zink-Finger antivirales Protein

9
ANHANG

9 ANHANG

Veröffentlichungen, Vorträge, Posterpräsentationen

Veröffentlichungen

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit soll folgende Publikation erstellt werden.

Inhibition of the Ebola virus polymerase activity by blocking the binding domain for the polymerase cofactor VP35.
Trunschke, M., E. Mühlberger.
(in Vorbereitung)

Vorträge

The L polymerase of Ebola virus: Key enzyme for replication and transcription
Lobe, M., E. Mühlberger
- Interne Seminarreihe des SFB 535, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere Gießen, Mai 2007

The L polymerase of Ebola virus: Key enzyme for replication and transcription
Lobe, M., E. Mühlberger
- Virologisch-Parasitologisches Seminar, Institut für Virologie Marburg, Mai 2007

Poster-Präsentationen

Inhibition of the Ebola virus polymerase activity by blocking the binding domain for the polymerase cofactor VP35.
Lobe, M., E. Mühlberger.
- Third European Congress of Virology, Nürnberg, Germany, Sep 2007

The Ebola virus L polymerase: L-L oligomerisation and interaction of the L polymerase with VP35.
Lobe, M., E. Mühlberger.
- 13th International Conference on Negative Strand Viruses, Salamanca, Spain, Jun 2006

The Ebola virus L polymerase: L-L oligomerisation and interaction of the L polymerase with VP35.
Lobe, M., E. Mühlberger.
- Annual Meeting of the German Society of Virology, München, Germany, Mrz 2006

Interaction studies on the Ebola virus L polymerase: mapping of the binding domain for VP35.
Lobe, M., E. Mühlberger.
- Annual Meeting of the German Society of Virology, Hannover, Germany, Mrz 2005

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Friedrich-Schiller Universität in Jena waren folgende Damen und Herren:

Agricola, Appenroth, Bolz, Bosch, Braune, Bruchaus, Claussen, Dahse, Diekert, Dunken, Eckert, Fichtner, Fiedler, Fischer, Fritzsche, Gräfe, Greulich, Gustav, Haas, Halbhuber, Halle, Hamburger, Hellwage, Hellwig, Hertel, Herwig, Hörhold, Jäger, Jetschke, Jüngel, Knoph, Kochs, Koenig, Kothe, Lemke, Liebert, Linß, Lupp, Malke, Müller, Neubauer, Nüske, Oelmüller, Ramm, Reißmann, Riemay, Saluz, Schmidt, Schumacher, Stelzner, Stockmann, Straube, Voelksch, Voigt, von Knorre, Wesch, Wiederanders, Witte, Wöstemeyer, Zipfel

Mein akademischer Lehrer am Universitätsklinikum in Frankfurt am Main war der folgende Herr:

Peter Kraiczy

Meine akademischen Lehrer an der Lund Universität in Schweden waren folgende Damen und Herren:

Åsa Ljung, Naoko Yanagisawa, Fredrik Ivars

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name:	Martina Trunschke, geb. Lobe
Adresse:	An der Kaiserburg 13, 40629 Düsseldorf
Geburtsdatum/-ort:	22.07.1978 in Rudolstadt, Deutschland
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

Promotion

11/2003 – 06/2007	Promotion am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk Dissertationsthema: „Charakterisierung und Funktionsanalyse der Bindungsdomäne für den Kofaktor VP35 der RNA-Polymerase L des Ebola-Virus“

Hochschulausbildung

09/2003	Studienabschluss als Diplom-Biologin; Gesamtnote „gut“
11/2002 – 08/2003	Diplomarbeit in der Abt. Infektionsbiologie des Leibnitz-Instituts für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut in Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Zipfel Diplomarbeitsthema: „Untersuchungen zur Komplement-Resistenz von *Borrelia burgdorferi* “
01/2003 – 02/2003	Forschungsaufenthalt am Institut für Medizinische Mikrobiologie der J.-W. Goethe Universität in Frankfurt am Main im Rahmen der Diplomarbeit; Leitung der Forschung durch Herrn Dr. Peter Kraiczy
08/2001 – 07/2002	Stipendiat des Sokrates/ ERASMUS Programms Studienaufenthalt an der Lund Universität in Schweden
09/1997 – 07/2001	Studium der Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Med. Mikrobiologie, Pharmakologie, Human-Anatomie
05/2000 – 06/2001	Forschungstätigkeit am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller Universität in Jena Forschungsprojekt: „Isolierung von D-Rhamnose aus bakteriellen Lipopolysaccharid von *Pseudomonas syringae pv. Phaseolicola*“

Schulausbildung

09/1991 – 06/1997	Friedrich-Fröbel Gymnasium Bad Blankenburg; Abschluss: Abitur
09/1985 – 08/1991	Polytechnische Oberschule Geschwister Scholl

Danksagung

Diese Arbeit ist Teil des SFB 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ und wurde im Rahmen des Teilprojektes B9 „Untersuchungen zur Replikation von Filoviren“ unter der Leitung von Frau PD Dr. Elke Mühlberger durchgeführt.
Ich möchte all jenen meinen Dank aussprechen, die diese Arbeit möglich gemacht haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn **Prof. Dr. H.-D. Klenk** für die freundliche Aufnahme am Institut für Virologie an der Philipps-Universität in Marburg.

Herrn **PD Dr. Detlev Buttgereit** danke ich für seine Bereitschaft die persönliche Betreuung meiner Doktorarbeit am Fachbereich Biologie zu übernehmen und für die hilfreichen Anregungen. Frau **Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl** gebührt mein Dank für die kurzfristige Übernahme der Funktion als Erstgutachter und offizieller Betreuer meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau **PD Dr. Elke Mühlberger** für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit. Ich danke ihr für ihre nette und offene Art, mit der sie mich in ihrer Arbeitsgruppe willkommen geheißen hat, für das Vertrauen, das sie von Anfang an in mich gesetzt hat, für ihre wertvollen Anregungen und Ideen, für ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, für ihre überaus großzügige Geduld, für das unermüdliche Korrekturlesen und ihre Unterstützung, um diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Danken möchte ich auch den (ehemaligen) Kollegen/ Kolleginnen meiner Arbeitsgruppe: **Stefanie Beck**, **Kristina Brauburger**, **Dominik Conrad**, **Dr. Sven Enterlein**, **Melanie Grosch**, **Verena Krähling**, **Judith Küsters**, **Kristina Schmidt** und **Dr. Michael Schümann** sowie allen Praktikanten/ Praktikantinnen, die gemeinsam zu einem angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben. Ihre Bereitschaft mich in sämtlichen Problemsituationen mit Ratschlägen zu unterstützen, haben einen wesentlichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau **Dr. Peggy Möller** ein herzliches Dankeschön aussprechen, die mir bei fachlichen Fragen immer gern zur Seite stand.

Allen Mitarbeitern/ Mitarbeiterinnen des Institutes für Virologie danke ich dafür, dass ich auf ihre Erfahrungen zurückgreifen konnte, wann immer dies erforderlich war.

Bei meiner Mutter **Simone Lobe** und meinem Bruder **Martin Lobe** möchte ich mich für die vielseitige Unterstützung, den familiären Rückhalt, die vielen Aufmunterungen und Bestärkungen und das geduldige Anhören meiner Projekt-Schilderungen bedanken.

Meinem Mann, **Heiko Trunschke**, danke ich für sein Verständnis für mich und meine Arbeit, seine Unterstützung in schwierigen Phasen meiner Promotion, für seine Geduld und Liebe und vor allem dafür, dass er mich immer wieder ermutigt hat nicht aufzugeben.

VIELEN DANK!!!

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere gem. § 5 der Promotionsordnung
der naturwissenschaftlichen Fachbereiche der Philipps-Universität Marburg,
dass ich die dem Fachbereich Biologie
zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit
mit dem Titel

Charakterisierung und Funktionsanalyse der Bindungsdomäne für den Kofaktor VP35 der RNA-Polymerase L des Ebola-Virus

am Institut für Virologie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg,
selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe durchgeführt und mich dabei sowie bei der Abfassung der Arbeit keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ein Gesuch um Zulassung zur Promotion wurde von mir noch an keinen anderen in- oder ausländischen Biologischen Fachbereich gerichtet.

Die vorliegende Dissertation in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form wurde noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Düsseldorf, den …….

_____
Martina Trunschke, geb. Lobe