

Aus dem Institut für Virologie
Klinikum der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk

**Untersuchung *cis*-aktiver Elemente
im Genom des Ebola-Virus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Michael Weik
aus Viernheim

Marburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 22.04.02

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rudolf Arnold

Referent: Prof. Dr. H.-D. Klenk

Coreferent: Priv.-Doz. Dr. H. Stöppler

Für meine Frau Martina

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 DAS EBOLA-VIRUS	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Klinischer Verlauf der Erkrankung	1
1.2 DIE MOLEKULARBIOLOGIE DES EBOV	2
1.2.1 Morphologie des Virion	2
1.2.2 Genomstruktur	3
1.2.3 Replikation und Transkription	5
1.3 DAS EBOV-SPEZIFISCHE TRANSKRIPTIONS- / REPLIKATIONS- SYSTEM	6
1.4 PROBLEMSTELLUNG DIESER ARBEIT	9
2. MATERIAL	11
2.1 CHEMIKALIEN	11
2.2 GERÄTE	12
2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	13
2.4 KITS	14
2.5 PLASMIDE, NUKLEINSÄUREN, OLIGONUKLEOTIDE UND NUKLEOTIDE	15
2.5.1 Plasmide	15
2.5.2 Nukleinsäuren	15
2.5.3 Oligonukleotide	15
2.5.4 Sonstige Nukleotide	17
2.5.5 Radioaktiv markierte Nukleotide	18
2.6 ENZYME	18
2.6.1 Restriktionsendonukleasen	18
2.6.2 Sonstige Enzyme	18
2.7 VIREN	18
2.8 ZELLEN	19

2.8.1	Prokaryonte Zellen.....	19
2.8.2	Eukaryonte Zellen.....	19
2.9	NÄHRMEDIEN	19
2.9.1	Nährmedien für Bakterien.....	19
2.9.2	Nährmedien für Säugerzelllinien.....	19
2.10	LÖSUNGEN	20
2.11	PUFFER	21
3.	METHODEN	24
3.1	ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON DNA	24
3.1.1	Vorbereitung lyophilisierter Oligonukleotide für den Gebrauch.....	24
3.1.2	Aufreinigung (radioaktiv) markierter Oligonukleotide.....	24
3.1.3	Chloroform/Phenol Extraktion.....	24
3.1.4	Reinigung von DNA-Fragmenten >100bp.....	24
3.1.5	Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten über präparative Agarosegele.....	25
3.1.6	Fällung von Nukleinsäuren durch Ethanol und Natriumacetat.....	25
3.2	ANALYSE VON DNA	26
3.2.1	Quantifizierung von DNA.....	26
3.2.2	Analyse von DNA-Restriktionsmustern auf analytischen Agarosegelen.....	26
3.2.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch denaturierende Polyacrylamidgele.....	26
3.2.3	Radioaktive Sequenzierung nach Sanger.....	26
3.2.4	Nichtradioaktive Sequenzierung mit ABI Prism™.....	27
3.3	VERVIELFÄLTIGUNG VON DNA	27
3.3.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase- Ketten-Reaktion (PCR).....	27
3.3.2	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	28
	a.) Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (MINIPREP).....	28

	b.) Plasmidpräparation im großen Maßstab (MAXIPREP).....	29
3.4	MARKIERUNG, KLONIERUNG UND MUTAGENESE VON DNA	29
3.4.1	Hybridisierung von Oligonukleotidpaaren.....	29
3.4.2	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit ³² P.....	29
3.4.3	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen.....	30
	a.) Analytischer Verdau.....	30
	b.) Präparativer Verdau.....	30
3.4.4	Abspaltung 5'-ständiger Phosphate durch Phosphatase- Behandlung der DNA.....	31
3.4.5	Ligation einer Insert-DNA in einen linearisierten Vektor.....	31
3.4.6	Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA.....	31
3.4.7	Mutagenese größerer Plasmid-Abschnitte mittels hybridisierter Oligonukleotide.....	32
3.5	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN MIT PLASMID-DNA	33
3.5.1	Hitzeschocktransformation TSS-kompetenter Bakterien.....	33
3.5.2	Transformation Z-kompetenter Bakterien.....	33
3.6	TRANSFEKTION VON EUKARYONTEN ZELLEN MIT PLASMID-DNA	34
3.6.1	Transfektion mit Lipofektin®-Reagenz (HeLa-Zellen).....	34
3.6.2	Transfektion mit Fugene© (BHK-T7 Zellen).....	35
3.7	RUN-OFF-TRANSKRIPTION EINER RNA VON EINER LINEARISIERTEN PLASMID-VORLAGE	35
3.8	ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON RNA	36
3.8.1	Isolierung und Reinigung zellulärer Gesamt-RNA mit Trizol®-Reagent.....	37
3.8.2	Isolierung und Reinigung replizierter RNA.....	37
3.8.3	Isolierung und Reinigung transkribierter mRNA mit Oligo(dT)-Zellulose.....	38
3.8.3	Isolierung spezifischer RNAs mit einem biotinylierten Primer an einer Streptavidin-Matrix.....	39
3.9	ANALYSE VON RNA	40
3.9.1	Quantifizierung von RNA.....	40

3.9.2	Auftrennung von RNA-Fragmenten auf einem Formaldehyd-Agarosegel.....	40
3.9.3	Northern-Blot-Analyse von RNA.....	41
3.9.4	Prähybridisierung und Hybridisierung membranfixierter RNAs.....	41
3.9.5	Nachweis von RNA mittels DIG-markierter RNA-Sonden.....	42
3.9.6	Primer-Extension-Assay zur Detektion modifizierter Nukleotide in RNA.....	42
3.9.7	RNase-Protection Assay.....	43
3.10	MODIFIKATION VON RNA.....	44
3.10.1	Transkription und Reinigung einer DIG-markierten RNA-Sonde.....	44
3.10.2	Transkription und Reinigung einer [α - 32 P]-UTP-markierten RNA-Sonde.....	45
3.10.3	Chemische Modifikation von RNA mit DMS.....	46
3.10.4	Chemische Modifikation von RNA mit CMCT.....	46
3.11	TRANSFEKTION VON RNA IN HELA-ZELLEN.....	47
3.12	ZELLKULTUR-TECHNIKEN.....	47
3.12.1	Kultivierung von HeLa-Zellen.....	47
3.12.2	Kultivierung von BHK-T7-Zellen.....	48
3.12.3	Infektion von HeLa-Zellen mit MVA-T7 Virus.....	48
3.13	NACHWEIS VON CHLORAMPHENICOL-ACETYLTRANSFERASE (CAT) (-AKTIVITÄT).....	49
3.13.1	Aktivitätsnachweis der CAT mittels [14 C]-markiertem Chloramphenicol.....	49
3.13.2	Nachweis der CAT durch Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	49
4.	ERGEBNISSE.....	50
4.1	DAS MINIGENOM IN (+)-STRANG-ORIENTIERUNG.....	51
4.1.1	Klonierung eines Minigenoms in (+)-Strang-Orientierung.....	51
4.1.2	Ein zusätzliches Nukleotid am 3'-Ende des Trailers in (+)-Strang-Orientierung hemmt die Replikation.....	52

4.2	UNTERSUCHUNGEN DES TRANSKRIPTIONSSTARTSIGNALS DES ERSTEN GENS	54
4.2.1	Analyse <i>in vitro</i> transkribierter RNA in (+)-Strang-Orientierung mittels chemischer Modifikation	54
4.2.2	Chemische Modifikation <i>in vitro</i> transkribierter Minigenom-RNA in (-)-Strang-Orientierung	57
4.2.3	Analyse der RNA-Sekundärstrukturbildung in der Transkriptionsstart-Region in einer NP-mRNA ähnlichen RNA	59
	a) Klonierung des Konstrukts mRNA-DI	60
	b) Chemische Modifikation <i>in vitro</i> transkribierter mRNA-DI-RNA	61
4.2.4	Auswirkungen von Mutationen in der Transkriptionsstart-Region auf die Effizienz der Transkription	63
4.2.5	Herstellung einer Mutante mit zerstörter Sekundärstruktur ohne Veränderungen am konservierten Transkriptionsstart	65
4.2.6	Chemische Modifikation <i>in vitro</i> transkribierter (+)Leadmut-NheI RNA	66
4.2.7	Funktionsanalyse der Mutante (-)Leadmut-NheI in An- und Abwesenheit von VP30	68
4.2.8	mRNA-Nachweis der Mutante (-)Leadmut-NheI in An- und Abwesenheit von VP30	69
4.3	UNTERSUCHUNGEN AM TRANSKRIPTIONSSTART IM BICISTRONISCHEN MINIGENOM	71
4.3.1	Klonierung der Mutante NheI-TK-BICI	71
4.3.2	mRNA-Nachweis der Mutante NheI-TK-BICI in An- und Abwesenheit von VP30	72
4.3.3	Klonierung des Minigenoms NheI-TK-BICI/ NPss@IRNP-VP35	73
4.3.4	Untersuchung der Sekundärstruktur am Transkriptionsstart des zweiten Gens der Mutanten NheI-TK-BICI/ NPss@IRNP-VP35 und NheI-TK-BICI/XhoI.1_2	74
	a.) Klonierung der Mutanten sIR_ NPss und sIR_ XhoI.1_2	75

	b.) Chemische Modifikation <i>in vitro</i> transkribierter RNAs	
	der Mutanten (-)sIR_NPss und (-)sIR_XhoI.1_2.....	76
4.3.5	mRNA-Nachweis der Mutante NheI-TK-BICI/ NPss@IRNP-VP35 in An- und Abwesenheit von VP30.....	78
4.4	UNTERSUCHUNGEN ZUM REPLIKATIONSPROMOTOR DES EBOV	81
4.4.1	Untersuchungen der Leader-Region des des EBOV-Genoms.....	81
4.4.1.1	Nachweis gepaarter RNA-Bereiche in der Leader-Region mittels chemischer Modifikation.....	81
4.4.1.2	Die gepaarten RNA-Bereiche des Leaders entstehen nicht durch Interaktion mit dem Trailer.....	83
4.4.1.3	Klonierung der Minigenommutanten (-)DI/x53-55, (-)DI/x50-52 und (-)DI/x44-46.....	85
4.4.1.4	Nachweis replizierter RNA der Mutanten (-)DI/x53-55, (-)DI/x50-52 und (-)DI/x44-46.....	86
4.4.2	Untersuchung des Bereichs von Nukleotid 55 bis 472.....	87
4.4.2.1	Klonierung der Deletionsmutanten Δ 52 bis Δ 351.....	88
4.4.2.2	Analyse der Deletionsmutanten Δ 52 bis Δ 351 im quantifizierten CAT-Assay.....	89
4.4.2.3	Nachweis replizierter RNA der Deletionsmutanten Δ 92 bis Δ 300.....	90
4.4.3	Der genomische Promotor des EBOV. Ein zwei- oder ein einteiliger Promotor ?.....	91
4.4.3.1	Klonierung der Mutante Δ 250/x55-90.....	92
4.4.3.2	Nachweis replizierter RNA der Mutante Δ 250/x55-90.....	93
4.4.3.3	Klonierung der Mutante Δ 250/SpeI+4.....	94
4.4.3.4	Nachweis replizierter RNA der Mutante Δ 250/SpeI+4.....	95
4.4.3.5	Klonierung der Mutanten Δ 250/x90-110.....	96
4.4.3.6	Nachweis replizierter RNA der Mutante Δ 250/x90-110.....	97
4.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DES EBOV-VP30	98
4.5.1	Nachweis polyadenylierter mRNA.....	98
4.5.2	RNA-Analyse mittels RNase-Protection Assay.....	100

4.5.3	Die Transkription des EBOV ist in Anwesenheit von Actionmycin D nicht mehr VP30-abhängig.....	102
5.	DISKUSSION.....	104
5.1	DIE SEKUNDÄRSTRUKTUR AM TRANSKRIPTIONSSTART DES ERSTEN UND ZWEITEN GENS.....	105
5.2	DIE ROLLE DES VP30 IN DER TRANSKRIPTION DES EBOV.....	108
5.3	EIN HYPOTHETISCHES MODELL DER TRANSKRIPTIONS- REGULATION DES EBOV.....	109
5.4	DER GENOMISCHE PROMOTOR DES EBOV.....	112
5.5	EIN HYPOTHETISCHES MODELL DES GENOMISCHEN PROMOTORS DES EBOV.....	114
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	117
7.	LITERAZURVERZEICHNIS.....	119
8.	ABBILDUNGS-, TABELLEN- UND DIAGRAMMVERZEICHNIS.....	124
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	126
10.	ANHANG.....	128

PRÄSENTATION DER ARBEIT AUF KONGRESSEN UND TAGUNGEN

VERÖFFENTLICHUNGEN

VERÖFFENTLICHUNGEN IN VORBEREITUNGEN

CURRICULUM VITAE

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

DANKSAGUNG

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

1. EINLEITUNG

1.1 DAS EBOLA-VIRUS

1.1.1 Taxonomie

Ebola-Virus (EBOV) und Marburg-Virus (MBGV) sind die einzigen derzeit bekannten Vertreter der Familie *Filoviridae*. Aufgrund ihrer molekularbiologischen Charakteristika werden sie zusammen mit den Virusfamilien Paramyxoviridae, Rhabdoviridae und Bornaviridae zur Ordnung der Mononegavirales zusammengefaßt (ICTV, 1991):

<u>ORDNUNG</u>	<u>FAMILIE</u>	<u>GENUS</u>	<u>SPEZIES</u>
Mononegavirales	Paramyxoviridae		
	Rhabdoviridae		
	Bornaviridae		
	Filoviridae	Marburg Virus (MBGV)	
		Ebola Virus (EBOV)	Zaire Sudan Ivory Coast Reston

1.1.2 Klinischer Verlauf der Erkrankung

Obwohl EBOV primär durch Kontakt mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten infizierter Patienten (Dowell *et al.*, 1999) oder Affen übertragen wird, kann eine Übertragung durch Aerosole nicht völlig ausgeschlossen werden (Roels *et al.*, 1999). Mit Ausnahme von EBOV-Reston, dessen Infektion beim Menschen symptomlos zu verlaufen scheint (CDC, 1990a, CDC, 1990b, Miranda *et al.*, 1999), verursacht EBOV beim Menschen und nicht-humanen Primaten ein schweres hämorrhagisches Fieber. Nach einer Inkubationszeit von 4 bis 10 Tagen manifestiert sich die Erkrankung durch plötzlich auftretende, grippeähnliche Symptome wie z.B. Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schluckbeschwerden, Gelenk- und Muskelschmerzen (Bwaka *et al.*, 1999, Ndambi *et al.*, 1999). Schon bald nach Ausbruch der Erkrankung kommt es zu gastrointestinalen Beschwerden sowie hohem Fieber, und der Allgemeinzustand des Patienten verschlechtert sich rapide. Nach beginnenden punktförmigen Einblutungen der Schleimhäute kann es zu

schweren hämorrhagischen Komplikationen kommen. In einigen Fällen können auch neurologische Symptome wie Koma, Krämpfe und Delirium beobachtet werden. Die terminale Phase der Erkrankung ist gekennzeichnet durch massive Blutungen und ein nahezu generalisiertes Organversagen. Bei einem fatalen Verlauf versterben die Patienten meist an den Folgen der schweren Hämorrhagien und einem hypovolämischen Schock. Während der Infektion ist eine Immunsuppression der Patienten zu beobachten, die wohl aus einem Zusammenspiel von Zerstörung lymphatischer Organe, Disregulation der Chemokinausschüttung und Blockierung der Interferonantwort (Basler *et al.*, 2000, Harcourt *et al.*, 1998) resultiert.

Da derzeit weder eine spezifische Therapie noch eine wirksame Vakzine zur Immunisierung des Menschen bereitstehen, werden Filoviren als Krankheitserreger der Sicherheitsstufe 4 eingestuft und können daher nur unter Einhaltung extremer Sicherheitsmaßnahmen untersucht werden.

1.2 DIE MOLEKULARBIOLOGIE DES EBOV

1.2.1 Morphologie des Virion

Bei den Virionen des EBOV (Abbildung 1) handelt es sich um polymorphe, meist jedoch filamentöse, membranumhüllte Partikel. Während die Länge der Viren stark schwanken kann (bis zu 14000nm), im Mittel jedoch bei 970nm liegt, wird ein einheitlicher Durchmesser von ca. 80 nm beobachtet. Die Hüllmembran, in welche das virale Glykoprotein (GP) eingelagert ist (Volchkov *et al.*, 1998), umgibt ein zentral gelegenes, helikales Nukleokapsid (NC). Das NC hat einen Durchmesser von ca. 50nm und besteht aus dem viralen RNA-Genom, dem Nukleoprotein (NP), den viralen Proteinen 35 und 30 (VP35, VP30) und der großen Polymeraseuntereinheit (L). Wegen ihrer Beteiligung am NC werden diese vier Proteine als Nukleokapsidproteine (NC-Proteine) bezeichnet. Bei dem VP35 handelt es sich, trotz fehlender Phosphorylierung, um das Analogon des P-Proteins anderer Mononegavirales (Mühlberger *et al.*, 1999). L und das VP35 zusammen bilden die RNA abhängige RNA-Polymerase des EBOV (Mühlberger *et al.*, 1999), welche die Transkription und Replikation des viralen Genoms katalysiert und wie bei allen Mononegavirales ein obligater Bestandteil des Virions ist. Das NP verpackt (enkapsidiert) das virale Genom auf seiner gesamten

Länge und verleiht ihm dadurch eine Resistenz gegen Nuklease. Neben den bereits erwähnten fünf Strukturproteinen sind an der Morphogenese des Virions noch zwei weitere Proteine beteiligt. Die viralen Proteine 24 und 40 (VP24, VP40) (Dessen *et al.*, 2000) sind zwischen Membran und NC lokalisiert. Während dem VP40 die Rolle des Hauptmatrixproteins zugeschrieben wird, scheint es sich beim VP24 um ein zusätzliches matrixassoziiertes Protein zu handeln.

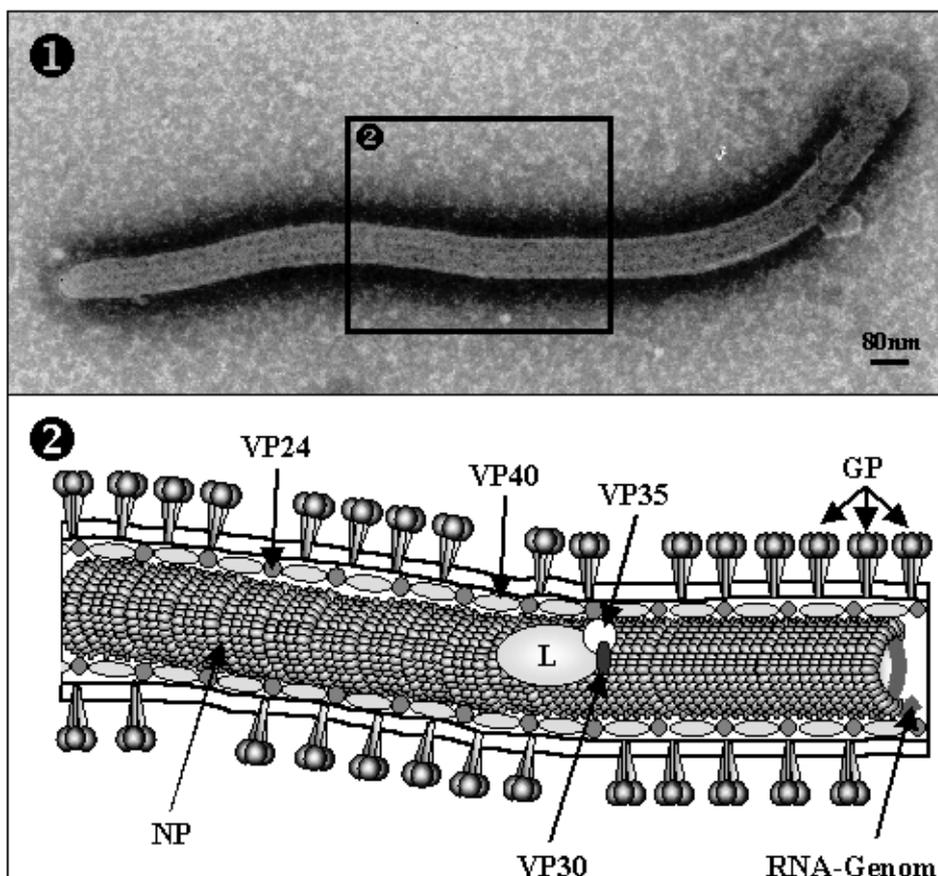


Abbildung 1: Morphologie des EBOV. ❶ Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBOV-Virion in 50000 facher Vergrößerung (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Larissa Kolesnikova). Das eingezeichnete Rechteck markiert den in ❷ schematisch dargestellten Bereich. ❷ Schematischer Aufbau eines EBOV-Virion.

1.2.2 Genomstruktur

Das Genom des EBOV ist wie bei allen Mononegavirales ein einzelnes, einzelsträngiges RNA Molekül von negativer Orientierung. Die Länge des Genoms beträgt ca. 19kb bei einem Molekulargewicht ca. $6,3 \times 10^3$ kDa. Aufgrund der negativen Orientierung ist das Genom nicht infektiös [Kiley et al., 1988].

Die sieben Strukturproteine des EBOV werden in sieben offenen Leserahmen hintereinander auf dem Genom kodiert. Die Anordnung der offenen Leseramen ist in Abbildung 2 dargestellt. Sie sind teilweise durch kurze Sequenzblöcke, sogenannte intergenische Regionen (IR), voneinander getrennt oder überlappen

mit ihren, zum Teil sehr langen, nicht translatierten Regionen (NTRs). Die Anzahl der überlappenden Bereiche ist typenspezifisch. Die Gene des EBOV werden von konservierten Transkriptionsstart- (TKS) und Transkriptionsstoppsignalen (TKSt) flankiert, denen mit großer Wahrscheinlichkeit eine regulatorische Funktion während der Transkription zukommt.

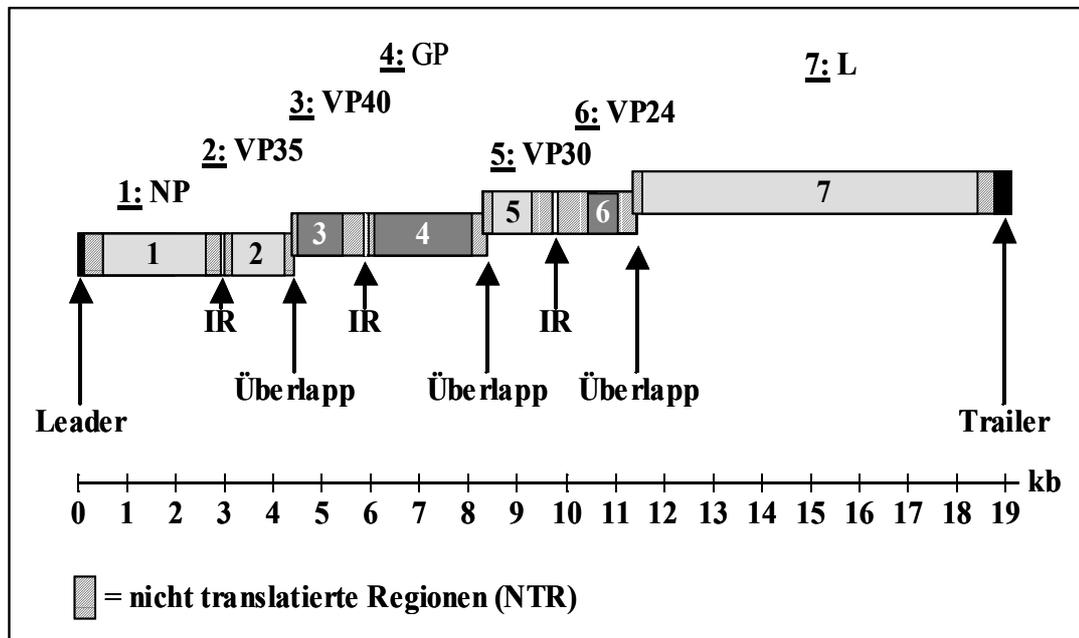


Abbildung 2: Genomorganisation des EBOV-Zaire [frei nach (Peters *et al.*, 1996)]. Hell- und dunkelgrau eingefärbte Flächen kennzeichnen die offenen Leserahmen der viralen Proteine. Die Gene für NC-Proteine sind hellgrau gefärbt. IR = intergenische Regionen. Leader und Trailer sind schwarz dargestellt, nicht-translatierte Bereiche (NTR) sind durch schraffierte Flächen dargestellt.

Computergestützte Analysen sagen eine Beteiligung der TKS-Regionen an der Bildung stabiler Sekundärstrukturen voraus (Mühlberger *et al.*, 1996). Ob sich diese in Abbildung 3 dargestellten Sekundärstrukturen wirklich ausbilden und welche Relevanz sie für die Transkription haben, ist bisher noch ungeklärt. Die Transkription der viralen mRNAs endet an den jeweiligen TKSt an einer Serie von fünf oder sechs Uridinen. Es wird angenommen, daß die virale Polymerase durch wiederholtes Transkribieren dieses Bereichs eine Polyadenylierung der mRNAs durchführt, wie es für andere Viren beschrieben ist (Zheng *et al.*, 1999).

Sowohl in den Regionen der TKS als auch in den TKSt ist das Pentamer 3'-UAAUU-5' enthalten. An den Genüberlappungen teilen sich TKSt des ersten Gens und TKS des folgenden Gens dieses Pentamer. An dem extremen 3'- und dem 5'-Ende des Genoms befinden sich Sequenzbereiche die nicht transkribiert und als Leader, bzw. Trailer bezeichnet werden. Sequenzvergleiche, der Leader-

Region von EBOV und MBGV enthüllten große konservierte Bereiche in dieser Region (Kiley *et al.*, 1986). In Leader und Trailer sind der genomische (3'-Region) und der antigenomische (5' Region) Promotor enthalten.

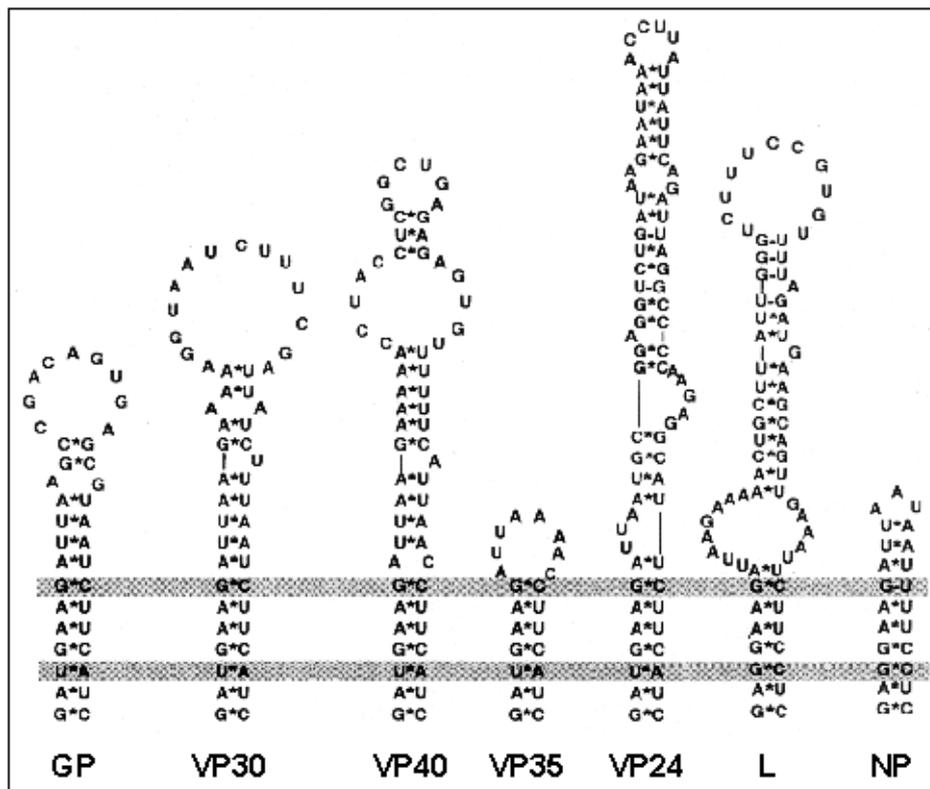


Abbildung 3: Computervorhersage der Sekundärstrukturen in den Bereichen der TKS. [Entnommen aus: (Mühlberger *et al.*, 1996)]

1.2.3 Replikation und Transkription

Über den Vermehrungszyklus des EBOV ist bislang nur wenig bekannt, doch beruhen die Replikationsmechanismen der RNA-Viren mit einzelsträngigem unsegmentiertem Genom negativer Polarität auf einem einheitlichen Prinzip (Kingsbury, 1990, Wagner, 1990):

Nach dem Eindringen des Virus in die Zelle dient das enkapsidierte Genom als Vorlage für Transkription und Replikation, „nackte“ RNA wird von dem Transkriptions-/Replikationskomplex nicht erkannt. Bei beiden Prozessen lagert sich der Polymerasekomplex wahrscheinlich an einer Bindungsstelle in der Leader-Region des Genoms an. Bei der Transkription viraler mRNAs wird nach der Bindung an die RNA vermutlich zunächst ein kurzes Stück Leader-RNA synthetisiert, anschließend sucht der Transkriptionskomplex die enkapsidierte RNA nach den TK-Startstellen der viralen Gene ab. Dabei transkribiert der Transkriptionskomplex die sieben Gene des EBOV nacheinander. Jeweils am

TKS eines Gens beginnt der Komplex mit der Synthese der viralen mRNA und beendet diese durch Polyadenylierung der jeweiligen mRNA an den TKSt. Im Anschluß daran überspringt der Komplex die IR ohne RNA-Synthese, um am nächsten TKS die Synthese wieder aufzunehmen. Da mit zunehmender Synthesedauer die Wahrscheinlichkeit zunimmt, daß die Polymerase von der Matrize „abfällt“, hat dieser Prozess einen mRNA-Gradienten NP>VP35>VP40>sGP/GP> VP30>VP24>L zur Folge (Galinski, 1991, Iverson & Rose, 1982). Der Mechanismus, nach welchem das Umschalten von Transkription zu Replikation erfolgt, ist noch nicht untersucht. Bei der Replikation jedoch wird der Polymerasekomplex „blind“ gegenüber den TKSt und synthetisiert ein enkapsidiertes, vollständiges Genom in positiver Orientierung, das Antigenom. Dieses Antigenom dient dann wiederum als Vorlage für die Synthese neuer Genome in (-)-Strang-Orientierung.

Während die Mehrheit der Mononegavirales nur drei NC-Proteine besitzt, findet man bei den Filoviridae ein viertes NC-Protein, das VP30. Es konnte gezeigt werden, daß VP30 eine zentrale Rolle in der Transkription der mRNAs bei EBOV spielt. Im Gegensatz zu MBGV war bei EBOV Transkriptionsaktivität nur in Gegenwart von VP30 nachweisbar (Mühlberger *et al.*, 1999).

1.3 DAS EBOV-SPEZIFISCHE TRANSKRIPTIONS- / REPLIKATIONSSYSTEM

Um die Replikation und Transkription des EBOV unter reduzierten Sicherheitsmaßnahmen untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit ein EBOV-spezifisches Replikations- und Transkriptionssystem verwendet (Mühlberger *et al.*, 1999, Weik, 1999). Ein vergleichbares, auf reverser Genetik basierendes Replikationssystem, hat bei zahlreichen anderen Negativstrang-RNA-Viren Anwendung gefunden (Conzelmann, 1996) und ist auch für MBGV etabliert (Mühlberger *et al.*, 1998). Da diesem System eine zentrale Bedeutung in den Untersuchungen dieser Arbeit zukommt, ist hier kurz die Funktionsweise erläutert (siehe Abbildung 4).

Dieser Replikationsassay beruht auf dem Vaccinia-Virus-T7-Expressionssystem (Fuerst *et al.*, 1986). Werden Zellen mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus (MVA-T7), welches das Gen für die RNA-Polymerase des Phagen T7 trägt,

infiziert, so wird die T7-RNA-Polymerase in großer Menge vom zellulären Proteinsyntheseapparat synthetisiert. Werden diese Zellen anschließend mit Plasmiden transfiziert, welche die gewünschten Gene unter der Kontrolle eines T7-RNA-Polymerase-Promotors enthalten, werden diese Gene über eine T7-RNA-Polymerase-abhängige Transkription besonders effizient abgelesen. Mit Hilfe dieses Expressionssystems werden die Nukleokapsidproteine des EBOV gemeinsam in einer Zelle exprimiert. Als Substrat für Replikation und Transkription wird den NC-Proteinen ein EBOV-spezifisches Minigenom (siehe Abbildung 5) zur Verfügung gestellt.

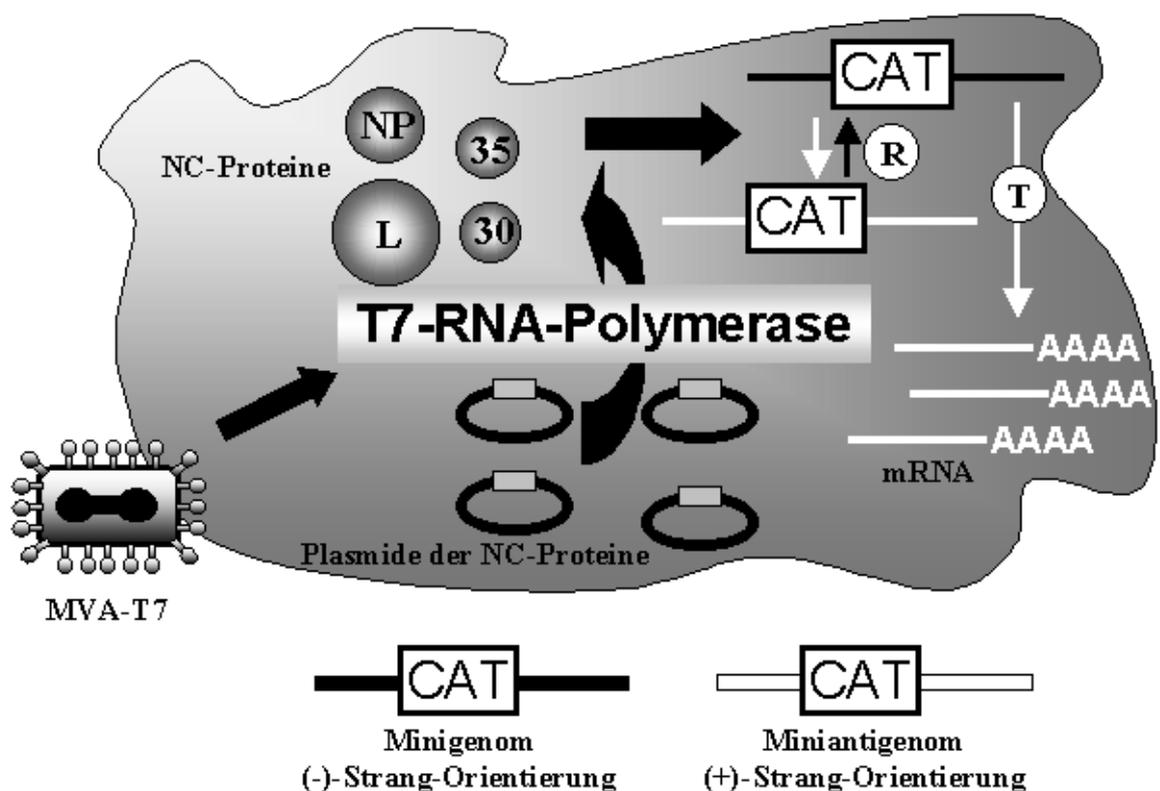


Abbildung 4: Schematische Übersicht über die Funktionsweise des EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystems. (R) bezeichnet den Vorgang der Replikation, (T) kennzeichnet die Transkription.

Das Minigenom enthält Leader und NTR des ersten Gens, sowie NTR des letzten Gens und den Trailer. Der gesamte, für virale Strukturproteine kodierende Bereich ist durch das Gen für die Chloramphenicol-acetyl-transferase (CAT) als Reporter gen ersetzt. Das Minigenom enthält also alle nötigen Signale für die Replikation und Transkription (genomischer Promotor im Leader und TKS in der NTR des ersten Gens, sowie antigenomischer Promotor im Trailer und TKSt in der NTR des letzten Gens).

Die Transkription der minigenomischen RNA wurde entweder durch Nachweis der Reportergenaktivität gezeigt oder transkribierte mRNAs wurden direkt mit Hilfe einer oligo(dT)-Zellulose-Reinigung isoliert und anschließend einer Northern-Blot-Hybridisierung unterzogen. Der Nachweis replizierter RNA erfolgte über einen S7-Nuklease-Verdau. Replizierte RNA wird während der Synthese von den NC-Proteinen verpackt und ist damit vor einem Nuklease-Verdau geschützt. „Nackte“ RNA (z.B. mRNA) jedoch kann vollständig abgebaut werden. Mit Hilfe der Northern-Blot-Hybridisierung wird die enkapsidierte und damit geschützte RNA anschließend detektiert. Auf diese Weise können sowohl genomische als auch antigenomische RNA nachgewiesen werden.

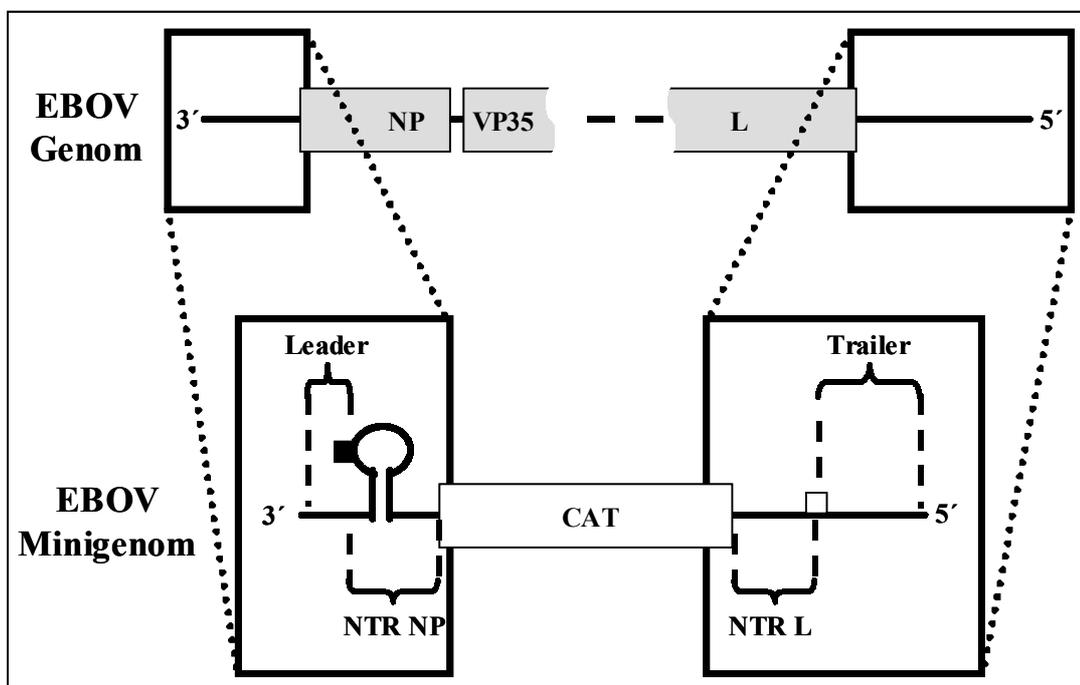


Abbildung 5: Aufbau des EBOV-Minigenoms 3E-5E im Vergleich zum Genom. Das gefüllte Quadrat (■) symbolisiert den TKS des NP-Gens, das leere Quadrat (□) stellt den TKSt des L-Gens dar.

1.4 PROBLEMSTELLUNG DIESER ARBEIT

Obwohl Replikation und Transkription bei einigen Vertretern der Mononegavirales schon gut untersucht sind, ist über die Regulation und den Ablauf dieser Prozesse bei EBOV bisher wenig bekannt. Nachdem ein auf reverser Genetik basierendes Replikations- und Transkriptionssystem für EBOV etabliert wurde, konnte in ersten Experimenten gezeigt werden, daß drei der vier NC-Proteine zur Vermittlung der Replikation ausreichen, daß für die Transkription des Minigenoms jedoch auch das 4. NC-Protein, VP30, benötigt wird (Mühlberger *et al.*, 1999). Ob VP30 in der Transkription des EBOV möglicherweise die Rolle eines Antiterminationsfaktors übernimmt, wie es für das M2-1 Protein des respiratorischen Synzytialvirus (RSV) beschrieben ist (Collins *et al.*, 1996), war bisher ungeklärt. Ebenfalls ungeklärt war die Funktion von stabilen Sekundärstrukturen, deren Bildung an den TKS der EBOV-Gene vorhergesagt wird (Mühlberger *et al.*, 1996). Bilden sich diese Strukturen wirklich aus? Wenn ja, haben sie eine Relevanz für die Transkription der Gene oder die Stabilität der mRNAs oder ist doch nur die Nukleotidsequenz der TKS für die Transkription der darauffolgenden Gene verantwortlich? Auch die Sequenz der replikations-vermittelnden Signale und ihre Lage im Genom des EBOV waren zu Beginn dieser Arbeit unbekannt und sollten näher untersucht werden. Aus diesen Überlegungen heraus entwickelten sich drei zentrale Aufgabenstellungen für diese Arbeit:

(1) Analyse der Transkription

- a) Nachweis von Sekundärstrukturen an den TKS in verschiedenen RNA-Spezies
- b) Klonierung verschiedener Mutanten der TKS-Region
- c) Analyse der TKS-Mutanten mit der Fragestellung, ob Sekundärstruktur oder Nukleotidsequenz der TKS die Transkriptionseffizienz beeinflussen

(2) Funktionsanalyse des VP30 während der Transkription des EBOV

- a) Untersuchung der VP30-Funktion durch Analyse der Transkribierten RNA-Spezies im RNase-Protection-Assay
- b) Differenzierung zwischen der Funktion als Elongations- oder Initiationsfaktor über Analyse der Transkribierten RNA-Spezies

(3) Analyse des genomischen Promotors

- a) Grobe Lokalisation des replikationsvermittelnden Sequenzbereichs über Deletionsmutanten
- b) Feinkartierung und Charakterisierung des Promotors

2. MATERIAL

2.1 CHEMIKALIEN

Aceton	Merck	Darmstadt
Acrylamid-Lösung (29:1)	Biorad	Richmond/USA
Actinomycin D-Mannitol	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Agarose (ultrarein)	BRL	Neu-Isenburg
Agarose NA	Pharmacia	
	LKB GmbH	Freiburg
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad	Richmond/USA
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva	Heidelberg
B acto-Agar	Difco Lab.	Detroit/USA
Borsäure	Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
C alciumchloriddihydrat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)		
carbodiimid meto- <i>p</i> -toluensulfonat (CMCT)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
D ekonex	Bohrer Chemie	Zuchwil/Schweiz
Dekontaminationspaste	Isotechnik	Neukirchen
Desoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Diethylpyrocarbon (DEPC)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Dimethylsulfat (DMS)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Merck	Darmstadt
Dinatriummethylen-diamintetraacetat (EDTA)	Roth KG	Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Biorad	Richmond/USA
E ssigsäure	Riedel-de Haën	Seelze
Ethanol (EtOH)	Riedel-de Haën	Seelze
Ethidiumbromid	Roche	Mannheim
F icoll Typ 400	Pharmacia	
	LKB GmbH	Freiburg
Formaldehydlösung min 37%	Merck	Darmstadt
Formamid, redestilliert	BRL	Neu-Isenburg
Fugene©	Roche	Mannheim
G eneticin 50mg/ml	GibcoBRL	Eggstein
Glycerin	BRL	Neu-Isenburg
Glycin	Roth KG	Karlsruhe
Glykogen (20 µg/µl)	Roche	Mannheim
H arnstoff (HST; ultrarein)	BRL	Neu-Isenburg
Hefeextrakt	Merck	Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-		
Sulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
I soamylalkohol	Merck	Darmstadt
Isopropanol	Merck	Darmstadt

K aliumtetraborat ($K_2B_4O_7$)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Kaliumchlorid	Roth KG	Karlsruhe
L ipofektin®-Reagenz	Gibco BRL	Karlsruhe
M agermilchpulver	Töpfer	Dietmannsried
Magnesiumchloridhexahydrat	Merck	Darmstadt
Maleinsäure	Merck	Darmstadt
β -Mercaptoethanol (MercOH)	Serva	Heidelberg
Methanol	Merck	Darmstadt
MiniComplete (Protease-Inhibitor Cocktail)	Roche	Mannheim
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
N atriumacetat	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Roth KG	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck	Darmstadt
P epton	Merck	Darmstadt
Phenol	Roth KG	Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche	Mannheim
Polyethylenglycol 8000 (PEG8000)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon PVP360	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
R inderserumalbumin (BSA)	Serva	Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA), RNasefrei	Ambion	Austin/USA
S alzsäure (HCl)	Merck	Darmstadt
Streptavidin, immobilisiert	Roche	Mannheim
N,N,N',N' -Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Biorad	Richmond/USA
Trichlormethan (Chloroform)	Merck	Darmstadt
Trinatriumcitratdihydrat	Roth KG	Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	USB	Cleveland/USA
Triton X-100	Serva	Heidelberg
Trizol®-Reagent	Gibco BRL	Karlsruhe
Tween 20	Serva	Heidelberg
X ylencyanol FF (XC)	Serva	Heidelberg

2.2 GERÄTE

ABI Prism™ -System 377A DNA Sequencer	Perkin Elmer Cetus	Norwalk/USA
B iofuge 13	Heraeus Sepatech GmbH	Osterode
Bio-Imager Analyzer BAS-1000	Fuji	Kanagawa/Japan
Bio-Image Screen: Imaging plate 2040S; MP	Fuji	Kanagawa/Japan
D N A Thermal Cycler TC1	Perkin Elmer Cetus	Norwalk/USA

Eppendorf-Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg
Eppendorf-Tischzentrifuge 5145	Eppendorf	Hamburg
Horizontalschüttler HS 250-Basis	IKA Labor- technik	Staufen
J2-21 Zentrifuge	Beckmann	Palo Alto/USA
Keutz®-Minigelkammer	von Keutz	Reiskirchen
Liquid Scintillation System LS1801	Beckmann	Palo Alto/USA
Metallblockthermostat TCS	Lab Tech	
Mikrowellengerät	Barkey	Bielefeld
Minifuge RF	Bosch	München
Minifuge T	Heraeus Sepatech GmbH	Osterode
pH-Meter C6832	Heraeus Sepatech GmbH	Osterode
Polaroid MP4 Land Camera	Schott Geräte GmbH	Mainz
Primus Termocycler	Polaroid	Cambridge / USA
QIAvac Manifold 6S	MWG-Biotech AG	Ebersberg
Sonifier 450	Qiagen	Düsseldorf
Thermomixer 5436	G. Heinemann	Schwäb.Gmünd
UV-Schirm 302 nm	Eppendorf	Hamburg
Vakuum-Blotter TransDNA Express™	Bachofer	Reutlingen
Vakuum-Geltrockner	Qbiogene	Heidelberg
Vortex	von Keutz	Reiskirchen
	Heidolph Instruments	Schwabach

2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Blottingpapier GB 002 (Whatman 3MM)	Schleicher & Schüll	Dassel
Einmalentwickler Agfa Rodinal	Agfa-Gevaert	Leverkusen
6x Loading Dye	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Mini Quick Spin™ DNA Collumns	Roche	Mannheim
MiniComplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche	Mannheim
Nylon membrane, positivly charged	Roche	Mannheim
Parafilm	American National Can.	Greenwich/USA
Polaroidfilm 667 Professionel	Polaroid	Cambridge/USA

Polysterol-Röhrchen (10ml) REDCAP	Grainer	Nürtingen
Röntgenfilm BioMax™ MS	Kodak/USA	
Röntgenfilm X-OMAT™ AR	Kodak/USA	
Sterilfiltrationsgerät		
-1l, Nylon-Membran, PorenØ = 0,2µm	Nalge Company Rochester/USA	
-0,5l, Nylon-Membran, PorenØ = 0,2µm	Nalge Company Rochester/USA	
-100ml, Nylon-Membran, PorenØ = 0,2µm	Nalge Company Rochester/USA	
Zellkulturflaschen	Costar	Cambridge/USA
Zellkulturschälchen	Greiner	Nürtingen
6er-Zellkulturplatten	Greiner	Nürtingen

2.4 KITS

Roche, Mannheim:

- 10x DIG Labelling Mix
- CAT ELISA
- CDP-Star
- Pwo DNA-Polymerase

Qiagen, Düsseldorf:

- Qiafilter Plasmid MAXI Kit
- Qiaprep 8 Plasmid Miniprep Kit (10)
- Qiaquick Gel Extraction Kit
- Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit (50)
- Qiaquick PCR Purification Kit
- RNeasy Mini Kit

Sonstige:

- | | | |
|---|------------------------------|--------------|
| - ABI-Prism™ Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit | Perkin Elmer
Cetus | Norwalk/USA |
| - ABI-Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit | Perkin Elmer
Cetus | Norwalk/USA |
| - AmpliScribe™ T7 Transcription Kit | Biozym
Diagnostik
GmbH | Oldendorf |
| - HybSpeed™ RPA Kit | Ambion | Austin/USA |
| - Protein Assay Farbstoffkonzentrat | Biorad | Richmond/USA |
| - Pfu _{TURBO} Polymerase | Stratagene | Heidelberg |
| - Quickchange Mutagenese PCR | Stratagene | Heidelberg |
| - Riboscribe™ T7 Transcription Kit | Biozym
Diagnostik
GmbH | Oldendorf |
| - SuperScriptII™ Reverse Transkriptase | Gibco BRL | Karlsruhe |
| - T7-Sequencing™ Kit | Pharmacia LKB GmbH | Freiburg |
| - Z-Competent E. coli Transformation Kit | LabKit | Freiburg |

2.5 PLASMIDE, NUKLEINSÄUREN, OLIGONUKLEOTIDE UND NUKLEOTIDE

2.5.1 Plasmide

- pBluescript KS+/SK- Vektor	Stratagene	Heidelberg
- pGem/EboLeader(-)260nt	im Labor vorhanden	Marburg
- pT/L _{EBO}	(Mühlberger <i>et al.</i> , 1999)	Marburg
- pT/NP _{EBO}	(Mühlberger <i>et al.</i> , 1999)	Marburg
- pT/VP30 _{EBO}	(Mühlberger <i>et al.</i> , 1999)	Marburg
- pT/VP35 _{EBO}	(Mühlberger <i>et al.</i> , 1999)	Marburg
- Minigenom 3E-5E	(Mühlberger <i>et al.</i> , 1999)	Marburg
- Minigenom BICI 436	im Labor vorhanden	Marburg

2.5.2 Nukleinsäuren

- Century RNA-Marker Template	Ambion, Inc.	Austin/ Texas
- DNA-Größenmarker III, λ-DNA EcoRI/HindIII	Roche	Mannheim
- GeneRuler™ 50bp DNA-Ladder	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
- GeneRuler™ 100bp DNA-Ladder Plus	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
- GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
- RNA des EBOV-Stamm Mayinga, Subtyp Zaire	im Labor vorhanden	

2.5.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide bis zur internen Nummer #436 (Ausnahmen #406, #426 und #427) wurden von Dr. M. Krause im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) in Marburg synthetisiert. Diese Oligonukleotidlösungen müssen vor Gebrauch mit Stickstoff begast und gereinigt werden. Alle anderen Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG-Biotech GmbH / Ebersberg als Lyophilisat bestellt. Alle Oligonukleotide sind in 5'→3' Richtung dargestellt. Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme (oder Teile davon), welche durch die Oligonukleotide in ein PCR-Fragment eingebracht werden, eine wichtige Rolle für die Klonierungsstrategie spielen, oder durch Hybridisierung eines Oligonukleotidpaares entstehen, sind fett und unterstrichen hervorgehoben. Um welche Erkennungsstelle es sich dabei handelt, ist dem Abschnitt 2.6.1 zu entnehmen.

Int.-Nr.	Bezeichnung	Sequenz
#211	CAT-368 PvuII	5' -GTAATATC CAGCTG AACGGTCTGG-3'
#287	EBO 5'-NotI	5' -GAC GCGGCCG CATAGTATCCTGATACTTGCAAGGTTGG-3'

#310	MvnI-EBOCAT-Start	5' -GAT <u>CGCG</u> GACACACAAAAGAAGAAGATTT-3'
#311	EBOCAT-PmlI-Ende	5' -GAT <u>CACGTG</u> GACACACAAAAAGAAGATAGAT-3'
#355	ebo-83/biotin	5' -CAATTTAAATTCCGATATAAAATTTCA-3'
#364	Ebv-Leader Δ51-480	5' -AATCTTC <u>CATATG</u> GTTATTTCGCACACAAAGATCCTAAAA ...TT-3'
#365	Ebv-Leader Δ107-480	5' -ACAGTAA <u>CATATG</u> CAATTTAAATTCCGATATAAAATTTCAAT GA-3'
#366	Ebv-Leader Δ350-480	5' -AAAACCA <u>CATATG</u> ATTCTCAATCTTGCTTGTGACTGTGA AC-3'
#374	Ebv-Leader Δ70-4801	5' -AATGAGA <u>CATATG</u> TTATTAATCTTCTCATAGTTATTCGCAC CAC-3'
#375	Ebv-Leader Δ80-481	5' -TATAAAT <u>CATATG</u> GAGAGGAAATTATTAATCTTCTCATAG TT-3'
#376	EBOV-Leader→T7-Promotor	5' -GGT <u>CGGACCG</u> CGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCGTG GACACACAAAAAGAAGAA-3'
#384	Ebv-Leader Δ90-481	5' -TAAATTC <u>CATATG</u> AAATTTCAATGAGAGGAAAATTATTAAT CTT-3'
#385	Ebv-Leader Δ100-481	5' -AATTTACATATGATTCCGATATAAATTTCAATGAGAGGAAA AT-3'
#406	#377 ohneG	5' -GGTCGGACCGCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCTGG ACACACAAAAAGAAGAA-3'
#426	-DI/Leadm2a	5' -CCGATATAAATTTCAATGAGGCTAGCTTAATTAATCTTCTC CATAGTTATTCGC-3'
#427	-DI/Leadm2b	5' -GCGAATAACTATGAGGAAGATTAATTAAGCTAGCCTCATTG AAATTTATATCGG-3'
#428	Ebv-Leader Δ104-482	5' -AACCAAT <u>CATATG</u> TAAATTTCCGATATAAATTTCAATGAGAG GAA-3'
#429	Ebv-Leader Δ150-482	5' -TCTATCT <u>CATATG</u> TGTGGCTCTGAACAAACCAGGTGTGATT AC-3'
#430	Ebv-Leader Δ200-482	5' -TCAACTG <u>CATATG</u> CTGATGCCCTTGCTCCCTTCGGAGACCT AGG-3'
#431	Ebv-Leader Δ250-482	5' -CTGAGGT <u>CATATG</u> TGTATGTGATAAGACCTAGGTGTTGACA AGG-3'
#432	Ebv-Leader Δ300-482	5' -TCCTTTA <u>CATATG</u> ATGTTTCTATTAAGGTTGTTGGATCACC ...CTG-3'
#473	SpeI-LmutF	5' -GAGAGGAAAATTATTAAT <u>ACTAGT</u> TATAGTTATTCGCACAC AAAAGATCC-3'
#474	SpeI-LmutR	5' - <u>GG</u> ATCTTTTGTGTGCGAATAACTAT <u>ACTAGT</u> GATTAATAAT TTT <u>CCTCTC</u> -3'
#475	xL55-90anealF	5' - <u>GG</u> TGGACCTTTTT <u>CGATCC</u> GCAA-3'
#476	xL55-90anealR	5' -CTAGTTTGC <u>GGATCC</u> GAAAAAGGTCCACCGC-3'
#481	SacII-Lmut aF	5' -CAATTTAAATTCCGATATA <u>CC</u> TTTCAATGAGAGG-3'
#482	SacII-Lmut aR	5' -CCTCTCATTGAA <u>GG</u> TATATCGGAATTTAAATTG-3'
#483	SacII-Lmut bF	5' -CAATTTAAATTCCGATATA <u>CCGCT</u> CAATGAGAGG-3'

#484	SacII-Lmut bR	5' - CCTCTCATTG <u>GCGG</u> TATATCGGAATTTAAATTG-3'
#485	SacII-Lmut cF	5' - CAATTTAAATTCCGATATA <u>CCGCGG</u> AATGAGAGG-3'
#486	SacII-Lmut cR	5' - CCTCTCATT <u>CCGCGG</u> TATATCGGAATTTAAATTG-3'
#501	Ld98 F	5' - TTTCAAT <u>CATATG</u> TCCGATATAAAATTTCAATGAGAGGAAAA TTA-3'
#502	Ld96 F	5' - TCAATTT <u>CATATG</u> CGATATAAAATTTCAATGAGAGGAAAAATT ATT-3'
#503	Ld94 F	5' - AATTTAA <u>CATATG</u> ATATAAAATTTCAATGAGAGGAAAAATTAT TAA-3'
#504	Ld92 F	5' - TTTAAAT <u>CATATG</u> ATAAAATTTCAATGAGAGGAAAAATTATTA AT-3'
#578	BICI-XhoI.1#F	5' - GCTTCGAGTG <u>CTCGAG</u> AATTCAATTG-3'
#579	BICI-XhoI.1#R	5' - CAATTGAATT <u>CTCGAG</u> CACTCGAAGC-3'
#580	BICI-XhoI.2#F	5' - CTTAATTATAAAACG <u>CTCGAG</u> TAAATGTTGGGCAGG-3'
#581	BICI-XhoI.2#R	5' - CCTGCCCAACATTTA <u>CTCGAG</u> CGTTTTATAATTAAG-3'
#586	XhoI-NPTKan#F	5' - <u>TCGAG</u> AATTCAATTGACGTAAGGAGAGGAAAAATTATTAATC TTCTCATTAGTTTTTTCTTAATTATAAAACGC-3'
#587	XhoI- NPTKan#R	5' - <u>TCGAG</u> CGTTTTATAATTAAGAAAAAACTAATGAGGAAGATT AATAATTTTCTCTCCTTACGTCAATTGAATTC-3'
#671	EBO-Leader/9- 32	5' - CAAAAAGAAAGAAGATTTTTTAGG-3'
#705	T7-NPTK-Start	5' - GAT <u>CCCCGG</u> TTAATACGACTCACTATAGGAGGAAGATTAAT AATTTTCTCTCATTGAAATTTATATCGG-3'
#748	IRNP/35 CM	5' - CATTATGCTTTTATAACTTACC-3'
#868	xI90-110F	5' - <u>CCAGGT</u> GTGATTACAGTAACAATCGACCAGATCTAATAACG TGT <u>CCGC</u> -3'
#925	EBOxL55-53F	5' - TAATCTTCCTCCGTGTTATTTCGCAC-3'
#926	EBOxL55-53R	5' - GTGCGAATAACACGGAGGAAGATTA-3'
#927	EBOxL52-50F	5' - TCTTCTCATATACATTTCGCACACA-3'
#928	EBOxL52-50R	5' - TGTGTGCGAATGTATATGAGGAAGA-3'
#931	EBOxL46-44F	5' - TCATAGTTATTTATACACAAAAGAT-3'
#932	EBOxL46-44R	5' - ACTTTTTGTGTATAAATAACTATGA-3'

2.5.4 Sonstige Nukleotide

- dATP, 2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat Pharmacia
LKB GmbH Freiburg
- dCTP, 2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat Pharmacia
LKB GmbH Freiburg
- dGTP, 2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat Pharmacia
LKB GmbH Freiburg
- dTTP, 2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat Pharmacia
LKB GmbH Freiburg
- rATP, Adenosin 5'-Triphosphat Roche Mannheim

dATP, dCTP, dGTP und dTTP liegen als Natriumsalze vor, rATP als Lithiumsalz. Die Nukleotide werden jeweils mit dH₂O auf die jeweilige Gebrauchskonzentration verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.5.5 Radioaktiv markierte Nukleotide

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$, 3000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, 6000 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg

2.6 ENZYME**2.6.1 Restriktionsendonukleasen**

Die Restriktionsendonukleasen und die 10-fach konzentrierten Reaktionspuffer der Restriktionsendonukleasen (1, 2, 3, 4, Sall-Puffer) wurden von der Firma New England Biolabs, Schwalbach bezogen.

BamHI	5'-G A -GATCC-3'
BseRI	5'-GAGGAG(N) ₁₀ A -3'
ClaI	5'-AT A -CGAT-3'
NdeI	5'-CA A -TATG-3'
NheI	5'-G A -CTAGC-3'
PmlI	5'-CAC A -GTG-3'
RsrII	5'-CG A -G ^A /TCCG-3'
SacII	5'-CCGC A -GG-3'
Sall	5'-G A -TCGAC-3'
SexAI	5'-A A -CC ^A /TGGT-3'
SpeI	5'-A A -CTAGT-3'

2.6.2 Sonstige Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP), EC 3.1.3.1	Roche	Mannheim
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	Roche	Mannheim
T4-DNA-Ligase, EC 6.5.1.1	Stratagene	Heidelberg
Polynukleotid-Kinase	Roche	Mannheim
Nuklease S7	Roche	Mannheim
Ribonuklease Inhibitor (RNasin) (20 ^U /μl)	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot

2.7 VIREN

Rekombinantes Vacciniavirus MVA-T7	(Sutter <i>et al.</i> , 1995)
------------------------------------	-------------------------------

2.8 ZELLEN**2.8.1 Prokaryonte Zellen**E. coli Stamm XL1Blue

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac
 [F' proAB lac F'ZAM15 Tn10(ter^r)] Stratagene Heidelberg

E. coli Stamm SCS110

Genotyp: rpsL (Str^r) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA
 tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB
 lacI^qZAM15] Stratagene Heidelberg

2.8.2 Eukaryonte Zellen

Säugerzelllinie HeLa (humane epitheliale Zervixkarzinomzellen)

ATCC Klon CCL-2

Säugerzelllinie BHK-T7

(Buchholz *et al.*, 1999)

2.9 NÄHRMEDIEN**2.9.1 Nährmedien für Bakterien**

LB-Medium: 10g Pepton
 5g Hefeextrakt
 10g NaCl
 ad 1l dH₂O
 → autoklavieren

TSS-Puffer: 85ml LB-Medium
 10% PEG 8000
 5ml DMSO
 50mM MgCl₂
 ad 100ml dH₂O
 → steril filtrieren und bei 4°C lagern

2YT-Medium: 16g Pepton
 10g Hefeextrakt
 5g NaCl
 ad 1l dH₂O
 → autoklavieren

2YT-Agar: 3,75g Bacto-Agar
 ad 500ml 2YT-Medium
 → autoklavieren

2.9.2 Nährmedien für Säugerzelllinien

DMEM	GibcoBRL	Eggstein
Glasgow Medium	GibcoBRL	Eggstein
L-Glutamin	GibcoBRL	Eggstein
Penicillin	GibcoBRL	Eggstein

<u>20x SSC:</u>	292,2g	NaCl
	88,2g	Trinatriumcitratdihydrat
	in ca. 800ml	dH ₂ O lösen und den pH mit HCl auf 7,0 justieren
	<u>ad 1 l</u>	<u>dH₂O</u>
		→autoklavieren
<u>50x Denhardts Lösung:</u>	2,5g	Ficoll (Typ 400)
	2,5g	Polyvinylpyrrolidon
	2,5g	BSA
	<u>ad 250ml</u>	<u>dH₂O</u>
		→ steril filtrieren, aliquotiert bei -20°C lagern
<u>50x TAE, pH=8,0:</u>	242g	Tris
	57,1g	Eisessig
	100ml	0,5 M EDTA-Lösung, pH=8,0
	<u>ad 1 l</u>	<u>dH₂O</u>
		→ autoklavieren
<u>Alkalischer Transfer-Puffer:</u>	60ml	5M NaCl-Lösung
	0,8ml	1M NaOH-Lösung
	<u>ad 100ml</u>	<u>dH₂O</u>
<u>Binding Buffer (BB) mRNA:</u>	500µl	1M Tris, pH=7,5
	100µl	0,5 M EDTA-Lösung, pH=8,0
	500µl	10% SDS-Lösung
	5ml	5M NaCl-Lösung
	<u>ad 50ml</u>	<u>dH₂O</u>
<u>Chemilumineszenz-Puffer 1:</u>	11,67g	Maleinsäure
	8,77g	NaCl
	in ca. 800ml	dH ₂ O lösen, mit NaOH auf pH=7,5 justieren
	<u>ad 1 l</u>	<u>dH₂O</u>
		→ autoklavieren
<u>Chemilumineszenz-Puffer 3:</u>	12,11g	Tris
	5,84g	NaCl
	10,17g	MgCl ₂
	in ca. 800ml	dH ₂ O lösen, mit HCl auf pH=9,5 justieren
	<u>ad 1 l</u>	<u>dH₂O</u>
		→ steril filtrieren
<u>CMCT-Puffer:</u>	50mM	Kaliumtetraboratlösung, pH=8,0
	10mM	MgCl ₂
	100mM	NH ₄ Cl

<u>Collins-Hybridisierungslösung:</u> (Grosfeld <i>et al.</i> , 1995)	30ml 10ml 1ml 54ml	20x SSC 50x Denhardts Lösung 10% SDS dH ₂ O
<u>Elution Buffer (EB) mRNA:</u>	500µl 100µl 500µl ad 50ml	1M Tris, pH=7,5 0,5 M EDTA-Lösung, pH=8,0 10% SDS-Lösung dH ₂ O
<u>Extraktionspuffer:</u>	0,3M 0,5% 5mM 25mM	Natriumacetat, pH=6,5 SDS EDTA, pH=8,0 Kaliumtetraboratlösung, pH=7,0
<u>FA- Auftragspuffer (pro Probe):</u>	2µl 1µl 1,75µl 5µl	dH ₂ O 5x FA-Laufpuffer 37% Formaldehydlösung Formamid
<u>S7-MCN-Puffer:</u>	9ml 100mg 100µl 100µl 30µl 500µl 200µl	dH ₂ O Triton X-100 1M NaCl-Lösung 1M Tris, pH=7,5 0,5M MgCl ₂ -Lösung 10% DOC-Lösung 0,5M CaCl ₂ -Lösung
Beim Ansetzen: kurz vor Gebrauch:	+1Tablette +1mM	MiniComplete oder PMSF
<u>SDS / SSC-Waschpuffer:</u>	2,5ml 5ml ad 500ml	20x SSC 10% SDS dH ₂ O
<u>Streptavidin-binding buffer (Strep.-BB):</u>		50mM Tris, pH=7,5 1mM EDTA 200mM NaCl
<u>Streptavidin-elution buffer (Strep.-EB):</u>		50mM Tris, pH=7,5 1mM EDTA
<u>PBS def. (Phosphate Buffered Saline deficient):</u>		8g NaCl 0,2g KCl 1,15g Na ₂ HPO ₄ 0,2g KH ₂ HPO ₄ ad 1l dH ₂ O → autoklavieren
<u>PBS:</u>		Wie PBS def., jedoch +0,13g CaCl ₂

3. METHODEN

Sofern nicht anders beschrieben wurde für alle Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur (RT) eine Eppendorf-Tischzentrifuge 5145 verwendet. Zentrifugationen bei 4°C wurden in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge 5417R ausgeführt.

3.1 ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON DNA

3.1.1 Vorbereitung lyophilisierter Oligonukleotide für den Gebrauch

Oligonukleotide der Firma MWG wurden in lyophilisiertem Zustand geliefert. Vor dem Gebrauch mußten die Oligonukleotide in dH₂O resuspendiert werden. Das Volumen wurde dabei so gewählt, daß das Oligonukleotid eine Teilchendichte von 100^{pmol}/µl aufwies.

3.1.2 Aufreinigung (radioaktiv) markierter Oligonukleotide

Im Anschluß an die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden wurde der Reaktionsansatz mit dH₂O auf 100µl aufgefüllt und 20min lang bei einer Geschwindigkeit von 2500 Upm über eine Sephadex G-50 Säule zentrifugiert. Das Eluat wurde anschließend einer Chloroform/Phenol Extraktion unterzogen.

3.1.3 Chloroform/Phenol Extraktion

Die DNA-haltige Lösung wurde mit dH₂O auf 400µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) 15s lang mit einem Vortex ausgeschüttelt. Durch einminütige Zentrifugation bei einer Geschwindigkeit von 14000 UpM wurden die beiden Phasen getrennt und die obere, wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA-haltige Phase mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) nochmals extrahiert und nach wiederholter Zentrifugation in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

3.1.4 Reinigung von DNA-Fragmenten >100bp

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten >100bp in Lösung kam das PCR-Purification Kit der Firma Qiagen zum Einsatz. Dabei wurde die DNA-haltige Lösung mit dem 5fachen Volumen des Puffers PB versetzt und anschließend an die Silica-Matrix einer Säule gekoppelt. Nach

Waschschritten mit EtOH-komplementiertem Puffer PE wurde die gereinigte DNA in 50µl oder 30µl dH₂O von der Säule eluiert.

3.1.5 Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten über präparative

Agarosegele

Sollte aus einem Gemisch verschiedener DNA-Fragmente, wie es z.B. nach einem Restriktionsverdau von Vektor-DNA vorliegt, eine bestimmte DNA-Spezies isoliert und gereinigt werden, so wurde das DNA-Gemisch zunächst mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die Gelmatrix bestand hierbei aus Agarose NA in 1x TAE-Puffer. Der Gellauf wurde dabei bis zum Einlaufen der Proben in das Gel mit einer Stromstärke von 30mA durchgeführt, später wurde diese dann auf 50mA erhöht. Nach dem Lauf wurden die DNA-Banden durch 15minütige Inkubation in einer Ethidiumbromid/ dH₂O-Lösung angefärbt und im UV-Licht bei 302nm oder 365nm sichtbar gemacht. Die gewünschte DNA-Bande wurde dann mitsamt der Gelmatrix mittels eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde im Anschluß unter Verwendung des Qiaquick Gel Extraction Kit nach dem Herstellerprotokoll aus der Gelmatrix befreit und für die weitere Verwendung in 30µl oder 50µl dH₂O eluiert.

3.1.6 Fällung von Nukleinsäuren durch Ethanol und Natriumacetat

Nicht immer sind die Nukleinsäure-Konzentrationen in wäßrigen DNA-Lösungen, wie man sie z.B. wie in 3.1.3 oder 3.1.5 beschrieben erhält, zweckmäßig für Folgeexperimente. Um die Konzentration einer Lösung auf einen gewünschten Wert justieren zu können, wurde die Nukleinsäure-Lösung zunächst mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat, pH=5,2 und 2,5 Volumina 100% EtOH versetzt und 15min lang in einem EtOH/Trockeneis-Bad gefällt. Das Präzipitat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei einer Temperatur von 4°C mit maximaler Rotationsgeschwindigkeit am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Das Pellet wurde dann nochmals mit 900µl 70% EtOH gewaschen und erneut 10min zentrifugiert. Nach der vollständigen Entfernung des Überstandes mittels einer ausgezogenen Pipettenspitze wurde das Pellet 10min lang bei RT getrocknet und anschließend in einem adäquaten Volumen Puffer oder dH₂O gelöst.

3.2 ANALYSE VON DNA

3.2.1 Quantifizierung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration von wäßrigen DNA-, bzw. Oligonukleotidlösungen wurde deren Absorptionsvermögen photometrisch bei 260nm bestimmt. Eine Absorption von 1 entsprach dabei einer Konzentration von 50µg/ml für doppelsträngige (ds) DNA, bzw. 20µg/ml für einzelsträngige (ss) Oligonukleotide.

3.2.2 Analyse von DNA-Restriktionsmustern auf analytischen Agarosegelen

DNA, welche einem Restriktionsverdau unterzogen wurde, wurde auf einem 1%-1,5% Agarose/TBE-Gel analysiert. Dabei wurden die DNA-Fragmente bei einer Stromstärke von 50mA ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Für den Auftrag auf das Gel wurden die DNA-Proben mit $\frac{1}{6}$ Vol. 6x-Auftragspuffer gemischt. Nach der Auftrennung wurden die Gele 15 min lang in einer Ethidiumbromid / dH₂O-Lösung geschwenkt, und anschließend wurde Bandenmuster unter UV-Licht bei 302nm oder 365nm begutachtet.

3.2.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch denaturierende

Polyacrylamidgele

Gemische verschieden langer DNA-Fragmente, wie sie z.B. als Produkte bei Sequenzierungen oder Primerextensionen entstehen, wurden über denaturierende Polyacrylamidgele aufgetrennt. Die Gelmatrix bestand in diesen Fällen aus 5% Polyacrylamid, 7M Harnstoff in 1x TBE-Puffer (Sequenzierung) oder 8% Polyacrylamid, 3,9M Harnstoff in 1x TBE-Puffer (Primerextensionen). Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 0,3mm gegossen und bei einer Spannung von 1,4kV für 2h (Primerextensionen) oder 8h (Sequenzierung) gefahren. Die Analyse erfolgte anschließend durch Exposition eines Röntgenfilms oder einer Bio-Imager-Platte (Radioaktive Sequenzierung / Primerextensionen) oder automatisiert auf einem ABI Prism™-System 377A DNA Sequencer (Sequenzierung).

3.2.3 Radioaktive Sequenzierung nach Sanger

Für die radioaktive Sequenzierung wurde das T7-Sequencing™ Kit eingesetzt. 2-5µg der DNA-Vorlage wurden dabei nach Herstellerangaben denaturiert, mit den

vorgegebenen Mengen an Reagenzien für die Synthese kurzer Nukleotidstränge und 0,3pmol sequenzspezifischen, ^{32}P -markierten Primer versetzt. Die von der T7-DNA-Polymerase neu synthetisierten und ^{32}P -markierten DNA-Fragmente wurden dann wie unter 3.2.2 beschrieben aufgetrennt und die Sequenzinformation aus dem Autoradiogramm abgelesen.

3.2.4 Nichtradioaktive Sequenzierung mit ABI Prism™

Für die nichtradioaktive Sequenzierung von DNA wurde das ABI Prism™ Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Perkin Elmer verwendet. Das Prinzip dieser Technik beruht auf einer polyzyklischen Synthesereaktion (cycle sequencing). Dabei polymerisiert eine Mutante der Taq DNA Polymerase (AmpliTaq DNA Polymerase, FS), beginnend an einem sequenzspezifischen Primer, einen DNA-Strang an der Matrizen-DNA entlang, bis es zum Einbau fluoreszenzmarkierter 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs, bzw. N-Dye Terminators) kommt. Da diesen ddNTPs die notwendige 3' OH-Gruppe für eine 5'-3' Phosphodiesterbindung und damit die DNA-Kettenverlängerung fehlt, kommt es zu statistisch verteilten Abbrüchen und damit zur Entstehung fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente. Diese Fragmente können nach Reinigung und Ethanol-fällung (3.1.6) auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden (3.2.2). Während der Elektrophorese erfaßt ein Argon-Ion-Laser (40 mW) kontinuierlich die Fluoreszenzsignale der passierenden Fragmente. Nach computergestützter Auswertung der gemessenen Daten kann die Basenabfolge der sequenzierten DNA als Elektroferrogramm analysiert werden.

Reaktionsansatz:

0,25µg Matrizen-DNA
 9nmol sequenzspezifischer Primer
 2µl Big-Dye Terminator Ready Reaction Mix
 ad 10µl dH₂O

Thermocycler-Programm:

30s 96°C
 15s 50°C
 4min 60°C
 ↻ 25 Zyklen

3.3 VERVIELFÄLTIGUNG VON DNA

3.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR wurde bereits früher ausführlich beschrieben (Weik, 1999). In dieser Arbeit wurden für die PCR die Pwo-DNA-Polymerase und die Pfu_{TURBO}

Polymerase verwendet. Die zur PCR verwendeten Primerpaare sind im Ergebnisteil an den entsprechenden Stellen genannt, und ihre Sequenzen können im Abschnitt 2.5.3 dieser Arbeit nachgelesen werden. Die PCR-Reaktionen wurden in einem DNA Thermal Cycler TC1 mit Deckelheizung nach folgendem Schema durchgeführt:

5µl 10x Reaktionspuffer	<u>Thermocycler-Programm</u>
+ 5-50ng dsDNA-Vorlage	30s 95°C
+ 125ng Oligonukleotid-Primer 1	1min 55°C
+ 125ng Oligonukleotid-Primer 2	6min 68°C
+ 1µl dNTP-Mix (jedes 25mM)	↳20-30 Zyklen
ad 49µl dH ₂ O	

Der Reaktionsansatz wurde 5min lang bei einer Temperatur von 95°C erhitzt und dann 1µl Pfu_{TURBO} Polymerase zugeben. Anschließend wurde das Thermocycler-Programm gestartet. Zur Überprüfung des PCR-Erfolgs wurde $\frac{1}{10}$ des Reaktionsvolumens auf einem analytischen Gel begutachtet.

3.3.2 Plasmidpräparation aus Bakterien

DNA kann in Form von Plasmiden in Bakterien eingebracht und von diesen vermehrt werden. Um die Plasmide zurückzugewinnen, müssen die Bakterien lysiert und die DNA aus dem Lysat aufgereinigt werden. Je nach Maßstab und Reinheit der DNA-Präparation werden dabei zwei Methoden unterschieden:

a.) Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (MINIPREP)

Für eine Miniprep wurden 5ml 2YT-Medium mit einem adäquaten Antibiotikum zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien versetzt und mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Das beimpfte Medium wurde anschließend über Nacht bei einer Temperatur von 37°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Am Morgen des nächsten Tages wurden die Bakterien unter Zuhilfenahme des Qiaprep 8 Plasmid Miniprep Kit (10) oder des Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit (50) lysiert und die Plasmide an die Matrix der im Kit enthaltenen Säulen gekoppelt. Nach verschiedenen Waschungen wurde die gereinigte Plasmid-DNA in 100µl dH₂O von der Säulenmatrix eluiert.

b.) Plasmidpräparation im großen Maßstab (MAXIPREP)

Um Plasmide in größerer Menge und hoher Reinheit verfügbar zu haben, z.B. für anschließende Klonierungen oder Transfektion in HeLa-Zellen, wurden Maxipreps durchgeführt. Dazu wurden 100ml 2YT-Medium mit einem adäquaten Selektionsantibiotikum versetzt und mit 40µl einer Bakterien-Übernachtskultur angeimpft. Das angeimpfte Medium wurde anschließend 12-16h bei einer Temperatur von 37°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Durch Verwendung des Qiafilter Plasmid MAXI Kit wurde die Plasmid-DNA aus der 100ml Übernachtskultur präpariert, gereinigt, gefällt und pelletiert. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde anschließend in 200µl dH₂O resuspendiert, quantifiziert (3.2.1) und für den weiteren Gebrauch auf eine DNA-Konzentration von 1µg/µl eingestellt.

3.4 MARKIERUNG, KLONIERUNG UND MUTAGENESE VON DNA

3.4.1 Hybridisierung von Oligonukleotidpaaren

Je 300pmol zueinander komplementärer Oligonukleotide wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß mit 7µl Annealingpuffer (aus dem T7-Sequencing™ Kit) versetzt und der Reaktionsansatz mit dH₂O auf 49µl aufgefüllt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch folgendem Thermocycler-Programm unterworfen:

5min 95°C

30min 37°C

15min 25°C

Anschließend wurde die hybridisierte DNA mittels einer Chloroform/Phenol-Extraktion (3.1.3) aufgereinigt und durch eine Fällung (3.1.6) ankonzentriert. Die DNA wurde dann in einem Volumen von 50µl dH₂O resuspendiert.

3.4.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit ³²P

Um Primer z.B. für die radioaktive Sequenzierung (3.2.3) zu markieren, wurde eine Kinasierungsreaktion in Gegenwart von [γ -³²P]-ATP durchgeführt. Dabei wurde ein radioaktiver Phosphatrest von der γ -Position eines Donor-ATP auf das 5'-Ende eines Oligonukleotids übertragen:

0,8µl Primer (10 pmol/µl)

+ 1µl 10x T4 Polynukleotidkinasepuffer

+ 1µl T4 Polynukleotidkinase
+ 5,2µl [γ -³²P]-ATP, 6000 Ci/mmol
ad 10µl dH₂O

Der Reaktionsansatz wurde 1h lang bei einer Temperatur von 37°C inkubiert und anschließend die Kinase 5min bei einer Temperatur von 65°C inaktiviert. Der Ansatz wurde dann mit dH₂O auf 100µl aufgefüllt, die nicht eingebauten Nukleotide durch einen Reinigungsschritt entfernt (3.1.2), die markierten Primer gefällt (3.1.6) und das getrocknete DNA-Pellet in 50µl dH₂O gelöst.

3.4.3 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

a.) Analytischer Verdau

Ca. 200ng dsDNA wurden mit 3U Enzym und 1µl 10x Reaktionspuffer versetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit dH₂O auf 10µl aufgefüllt und, falls nicht anders vorgeschrieben, 2h bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Die verschiedenen Reaktionspuffer wurden zusammen mit den jeweiligen Enzymen beim Hersteller erworben und nach deren Angaben eingesetzt. Das Ergebnis des Restriktionsverdaus wurde im Anschluß auf einem analytischen TBE/Agarosegel (3.2.2) begutachtet.

b.) Präparativer Verdau

5µg Vektor-DNA, bzw. 50µl aufgereinigtes PCR-Fragment wurden mit 20-40U Enzym und 5µl 10x Restriktionspuffer versetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit dH₂O auf 50µl aufgefüllt und 2-16h bei der vorgeschriebenen Temperatur (in der Regel 37°C) inkubiert. Bei einem Verdau mit zwei Restriktionsenzymen wurde die DNA nacheinander zuerst mit EnzymA und nach einem Aufreinigungsschritt (3.1.4) mit EnzymB verdaut. Sofern die Enzyme gleiche oder ähnliche Pufferbedingungen benötigten, konnte auch ein Doppelverdau mit beiden Enzymen in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Das gewünschte DNA-Fragment wurde im Anschluß an den Verdau über ein präparatives TAE/Agarosegel (3.1.5) aufgetrennt, isoliert und gereinigt.

3.4.4 Abspaltung 5'-ständiger Phosphate durch Phosphatase-Behandlung der DNA

Um die Religationen linearisierter Vektor-DNA mit kompatiblen Enden zu unterbinden, wurden diese linearisierten Vektoren mit Phosphatase aus Kalbsintestinum (CIP) behandelt, und so die 5'-Enden zu dephosphorylieren. Da die CIP mit den meisten Puffern der Restriktionsendonukleasen kompatibel ist, konnten je 2U CIP pro 1µg linearisierter Vektor-DNA direkt zu dem Restriktionsverdau zugegeben und mit diesem 2h bei einer Temperatur von 37°C inkubiert werden.

3.4.5 Ligation einer Insert-DNA in einen linearisierten Vektor

Um freie, kompatible DNA-Enden einer Insert-DNA (z.B. eines PCR-Fragments) und einer Vektor-DNA miteinander zu verbinden wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

1,5µl rATP, 10mM
 1,5µl 10x Ligasepuffer
 xµl Insert-DNA
 yµl Vektor-DNA
 3U T4-DNA-Ligase
 ad 15µl dH₂O

Das verwendete Volumen an Vektor- (y) und Insert-DNA (x) waren variable Größen des Versuchsansatzes. Ihr Verhältnis zueinander wurde je nach Versuch zur Optimierung der Ligationsausbeute variiert. Der Ansatz wurde 1h bei RT inkubiert.

3.4.6 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Um kleinere Mutationen in Plasmid-DNA einzuführen (Punktmutationen, Insertion / Deletion von Nukleotiden oder Nukleotidtripletts) wurde das Quickchange Mutagenese PCR Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei dieser Methode wurden 2 zueinander komplementäre Primer zusammen mit dem zu mutierenden Plasmid als Vorlage in einer PCR-Reaktion verwendet. Die Primer entsprachen der Sequenz der Plasmid-DNA am Mutageneseort, trugen jedoch schon die einzuführende Mutation. Nach dem ersten PCR-Zyklus entstanden so Plasmidhybride aus jeweils einem parentalen DNA-Strang und einem am Primer neusynthetisierten Tochterstrang (dieser trug die erwünschte

Mutation). Nach dem zweiten PCR-Zyklus entstanden dann die ersten vollständig neusynthetisierten Plasmide mit der gewünschten Mutation. Die Anzahl dieser Produkte stieg mit jedem weiteren PCR-Zyklus exponentiell an. Nach der PCR-Reaktion wurde die parentale DNA (welche keine Mutation trägt) durch einen Verdau mit DpnI aus dem Reaktionsansatz entfernt. DpnI verdaut nur methylierte DNA. Da die in der PCR entstandene DNA nicht methyliert war, war sie gegen die DpnI-Behandlung unempfindlich. Die mutierten Plasmide wurden dann in *E. coli* transformiert, auf Agarplatten mit einem geeigneten Antibiotikum selektioniert und konnten anschließend aus einer Miniprep zur Analyse rückgewonnen werden.

3.4.7 Mutagenese größerer Plasmid-Abschnitte mittels hybridisierter

Oligonukleotide

Um einen größeren DNA-Abschnitt zu mutieren, zu deletieren oder zu inserieren wurden hybridisierte und 5'-phosphorylierte Oligonukleotidpaare (3.4.1) verwendet. Zunächst wurden stromauf- und stromabwärts des Mutageneseortes über ortsgerichtete Mutagenese (3.4.6) singuläre Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen erzeugt. Die verwendeten Primerpaare waren im größten Teil ihrer Sequenz komplementär zueinander und trugen die gewünschten Mutationen. Bei Hybridisierung der Primer paarten die komplementären Bereiche. An den Enden jedoch entstanden Überhänge, welche kompatibel zu den erzeugten Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen im Zielplasmid waren. Durch einen präparativen Restriktionsverdau des Zielplasmids mit diesen Enzymen (3.4.3), anschließender Phosphatase-Behandlung (3.4.4) und Ligation der hybridisierten Primer mit dem vorbereiteten Zielplasmid (3.4.5) wurden so die gewünschten Mutationen über die hybridisierten Oligonukleotide en bloc eingebracht. Eine unabdingbare Voraussetzung für diese Methode ist die 5'-Phosphorylierung der Oligonukleotide. Falls die Primer nicht schon vom Hersteller phosphoryliert geliefert wurden, konnte dies durch eine Kinasierungsreaktion (3.4.2) in Anwesenheit von (nicht radioaktivem) ATP bewerkstelligt werden.

3.5 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN MIT PLASMID-DNA

3.5.1 Hitzeschocktransformation TSS-kompetenter Bakterien

Für Transformationen wurden, soweit nicht anders angegeben, XL1-Blue Bakterien verwendet. Zunächst wurden die Bakterien in 40ml 2YT-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert (optische Dichte von ca. 0,8). Anschließend wurde die Kultur 20min lang auf Eis inkubiert und anschließend 10 min lang bei einer Geschwindigkeit von 2700 UpM in einer Biofuge A pelletiert. Die Bakterien wurde dann in 4ml TSS-Puffer resuspendiert und waren nach weiteren 10min auf Eis bereit für die Transformation. Je 200 μ l transformationskompetente Bakterien wurden mit 15 μ l Ligationsansatz, 5-10 μ l DpnI-verdaulichem Mutagenese-PCR Ansatz oder 10-100ng gereinigter Plasmid-DNA gemischt und 1h lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch eine 90s andauernde Hitzeschock-Behandlung bei einer Temperatur von 42°C zur Aufnahme der Plasmide veranlaßt. Nach einer einstündigen Kultivierung bei einer Temperatur von 37°C, welche zur Ausbildung einer plasmidkodierten Antibiotikaresistenz diente, wurden 200 μ l des Ansatzes auf einer 2YT-Agarplatte mit geeignetem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Von den gewachsenen Kolonien konnten dann, zur weiteren Analyse der Plasmide, Minipreps angefertigt werden.

3.5.2 Transformation Z-kompetenter Bakterien

Eine weitere Methode Plasmid-DNA in Bakterien zu transformieren, wurde mit dem Z-Competent E. coli Transformation Kit durchgeführt. Dabei wurde zunächst 50ml SOB-Medium in einem 500ml Erlenmeyerkolben mit 0,5ml einer frischen Übernachtskultur XL1-Blue inokuliert und auf dem Horizontalschüttler bei einer Temperatur von 20 -25°C solange kultiviert, bis die optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=600\text{nm}$ 0,4-0,6 betrug. Anschließend wurde die Bakterienkultur 10min lang auf Eis gestellt und dann bei einer Temperatur von 0-4°C und einer Geschwindigkeit von 2500g 6min lang in einer Minifuge T pelletiert. Das Pellet wurde im Anschluß in 5ml eiskaltem 1x Wash Buffer resuspendiert und wie zuvor beschrieben repelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 5ml eiskaltem 1x Competent Buffer aufgenommen, in Volumina zu je 100 μ l, bzw. 200 μ l aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Zur Transformation der Bakterien wurde ein Aliquot mit 15 μ l

Ligationsansatz, 5-10µl DpnI-verdaulichem Mutagenese-PCR Ansatz oder 10-100ng gereinigter Plasmid-DNA gemischt und für die Dauer von 15-60min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das gesammte Aliquot auf einer 2YT-Agarplatte mit geeigneten Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Auch hier konnten die gewachsenen Kolonien zur weiteren Beurteilung in je 5ml 2YT-Medium überimpft und nach Vermehrung der Bakterien die Plasmid-DNA in einer Miniprep isoliert werden.

3.6 TRANSFEKTION VON EUKARIONTEN ZELLEN MIT PLASMID-DNA

3.6.1 Transfektion mit Lipofektin®-Reagenz (HeLa-Zellen)

HeLa Zellen wurde in 6er-Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von ca. 60% kultiviert [und mit MVA-T7 Virus infiziert (3.12.3)]. Pro zu transfizierendem Zellkulturschälchen wurde in einem Polystyrol-Röhrchen (REDCAP) 1ml DMEM ohne FCS mit 5µl Lipofektin®-Reagenz gemischt und einer 30- bis 40minütigen Inkubation bei RT unterzogen. Während der Inkubationszeit wurden Ansätze mit der zu transfizierenden DNA vorbereitet. Dazu wurden pro Zellkulturschälchen je 1ml DMEM ohne FCS mit xµg Plasmid-DNA in einem Polystyrol-Röhrchen (REDCAP) gemischt. Nach Ablauf der 30minütigen Inkubationsperiode wurden pro zu transfizierendem Zellkulturschälchen je 1ml des vorbereiteten Lipofektin®-Ansatzes mit 1ml der vorbereiteten DNA-Lösung gemischt und für weitere 15-20min bei RT belassen. Anschließend wurde je ein 2ml Transfektionsansatz auf ein Zellkulturschälchen mit den 1x mit DMEM gewaschenen (und mit MVA-T7 infizierten) Zellen gegeben. Sofern nichts gegenteiliges angegeben ist, wurden für das EBOV-spezifische Replikations- und Transkriptionssystem pro Zellkulturvertiefung 0,5µg pTM1/NP_{EBO}, 0,5µg pTM1/VP35_{EBO}, 0,1µg pTM1/VP30_{EBO}, 1µg pTM1/L_{EBO} und 2µg Plasmid-DNA des Minigenoms transfiziert. Es folgte eine 12-16stündige Inkubation bei einer Temperatur von 33°C und einer CO₂-Atmosphäre von 5%. Dann wurde das Transfektionsmedium gegen 1x DMEM mit 2-5% FCS ausgewechselt und die Inkubation der Zellen bei einer Temperatur von 33°C und einem CO₂-Gehalt von 5% für weitere 12-16h fortgesetzt.

3.6.2 Transfektion mit Fugene© (BHK-T7 Zellen)

BHK-T7 Zellen wurden in 6er-Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von ca. 50%-70% kultiviert. Zunächst wurden die Zellen 1x mit DMEM ohne Zusatz von Penicillin/Streptomycin (P/S) und ohne FCS gewaschen. Nach Entfernung des Waschmediums wurde in jedes Zellkulturschälchen 1ml DMEM ohne Antibiotikazusatz (Penicillin/Streptomycin) und ohne FCS gegeben und die Zellen für eine Zeitperiode von 1h bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurden pro zu transfizierendem Zellkulturschälchen folgende Ansätze in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckel vorbereitet:

<u>Fugene©-Ansatz</u>	<u>DNA-Ansatz</u>
200µl DMEM ohne P/S, ohne FCS	800µl DMEM ohne P/S, ohne FCS
+ 12µl Fugene©-Reagenz	+ xµg DNA (maximal 4µg)
mischen durch „Anschnippsen“ des Reaktionsgefäßes	gut durchmischen
5minütige Inkubation bei RT	

↪ Überführen des DNA- in den Fugene©-Ansatz ↪
durch achtmaliges Pipettieren mit einer 1000µl Pipette mischen
20minütige Inkubation bei RT

Nach Ablauf der Inkubationsperiode wurde jeweils der gesamte Transfektionsansatz (1ml) auf je eines der zuvor vorbereiteten Zellkulturschälchen mit 1ml DMEM ohne P/S und ohne FCS gegeben. Es folgte eine 12-16stündige Inkubation bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Atmosphäre von 5%. Danach wurde das Transfektionsmedium gegen 1x DMEM mit P/S und mit 2% FCS ausgetauscht und die Inkubation der Zellen bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% für weitere 12-16 Stunden fortgesetzt.

3.7 RUN-OFF-TRANSKRIPTION EINER RNA VON EINER LINEARISIERTEN PLASMID-VORLAGE

Um die Voraussetzungen für die hier beschriebene Run-off-Transkription einer RNA zu erfüllen, mußte ein Plasmid zwei Charakteristika besitzen: es mußte (1) einen T7-RNA-Polymerase Promotor vor der zu transkribierenden Region und (2) eine singuläre Restriktionsschnittstelle hinter dieser Region aufweisen. Alle in

dieser Arbeit beschriebenen Minigenome und Minigenommutanten besitzen, sofern nicht anders erwähnt, einen T7-RNA-Polymerase Promotor vor und eine singulären Sall-Stelle hinter der zu transkribierenden Region.

Für die Run-off-Transkription wurde die Plasmid-Vorlage zunächst über die Schnittstelle (Sall) linearisiert (3.4.3b), mit dem PCR-Purification Kit aufgereinigt und in 60µl RNase-freies dH₂O eluiert. Nach diesen Vorbereitungen wurde eine Transkriptionsreaktion in einem sterilen Eppendorf Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel nach folgenden Parametern mit dem AmpliScribe™ T7

Transcription Kit angesetzt:

- 8,5µl linearisiertes Plasmid (ca. 0,7µg DNA)
- + 2µl 10x T7-Reaktionspuffer
- +1,5µl ATP
- +1,5µl CTP
- +1,5µl GTP
- +1,5µl UTP
- +2µl DTT
- +0,5µl RNase-Inhibitor (20^U/µl)
- + 1µl AmpliScribe T7-Enzym-Mix

Der Ansatz wurde 2h lang bei einer Temperatur von 37°C inkubiert und dann mit 1µl RNase-freier DNaseI (1^U/µl) gemischt. Nach weiteren 15min Inkubationszeit wurde die transkribierte RNA mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach dem „RNA-Cleanup“-Protokoll gereinigt und in 60µl RNase-freies dH₂O eluiert. Falls nötig wurde die RNA-Konzentration bestimmt (3.9.1) und auf die gewünschte Konzentration justiert.

3.8 ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON RNA

Eukarionte Zellen, welche zur Produktion von T7-RNA-Polymerase befähigt sind (BHK-T7 Zellen, HeLa Zellen nach Infektion mit MVA-T7) und mit Plasmiden der Nukleokapsid-Gene des EBOV und einem EBOV-spezifischen Minigenom (oder einer Minigenommutante) transfiziert wurden, replizieren das Minigenom in Form negativsträngiger Minigenom-RNA und positivsträngiger Miniantigenom-RNA. Gleichzeitig werden TKS- und TKSt-stellen auf der Minigenom-RNA zur Synthese positivsträngiger, polyadenylierter mRNAs mit einer Cap-Struktur am 5'-Ende genutzt (Mühlberger *et al.*, 1999). Um replizierte Minigenom-/

Miniantigenom-RNA und transkribierte mRNA voneinander zu trennen, bedient man sich verschiedener Isolierungsmethoden. Replizierte RNA ist durch die Enkapsidierung mit dem Nukleokapsid-Protein resistent gegen Nukleasebehandlung und kann durch einen Verdau mit S7- Mikrococcen-Nuklease von anderen RNAs getrennt werden. Transkribierte mRNA des EBOV Polyadenyliert deswegen mittels einer Behandlung mit Oligo(dT)-Zellulose aus einem RNA-Gemisch isoliert werden.

3.8.1 Isolierung und Reinigung zellulärer Gesamt-RNA mit Trizol®-Reagent

Zur Isolierung der gesamten zellulären RNA wurde das Trizol®-Reagent verwendet. Dazu wurden in 6er Zellkulturplatte gewachsene Zellen zunächst auf einer Kühlplatte 2x mit 0-4°C kaltem PBS_{def} gewaschen. Pro Zellkulturschälchen wurden die Zellen dann in 0,5ml PBS_{def} abgeschabt, gleiche Ansätze zusammengeführt und bei einer Temperatur von 4°C und bei einer Geschwindigkeit von 8000 Upm in einer Kühlzenrifuge 8min lang pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands, wurde das Zellpellet in 1ml Trizol®-Reagent resuspendiert und danach 8x über eine violette Kanüle (Ø= 0,55x25 mm) geschert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform / Isoamylalkohol (25:1) wurde das Gemisch 15s lang manuell gemischt und anschließend 15min lang auf Eis inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei einer Beschleunigung von 11583 UpM und einer Temperatur von 4°C wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 500µl 100%igem, RNase-freiem Isopropanol und 1µl Glykogen (20µg/µl) bei einer Temperatur von -20°C mindestens 1h lang, in der Regel jedoch über Nacht, gefällt (3.1.6).

3.8.2 Isolierung und Reinigung replizierter RNA

24-32h nach Transfektion der Zellen mit den für die EBOV-Nukleokapsidproteingene und das EBOV-spezifischen Minigenom (oder einer Mutante) kodierenden Plasmide (3.6.1 , 3.6.2) wurden die Zellen geerntet und die replizierte RNA isoliert. Zunächst wurden die Zellen auf einer Kühlplatte 2x mit 0-4°C kaltem PBS_{def} gewaschen. Anschließend wurden die Zellen pro Vertiefung in 500µl 0-4°C kaltes PBS_{def} abgeschabt und gleiche Ansätze vereinigt. Durch eine 8min Zenrifugation bei einer Temperatur von 4°C und einer Geschwindigkeit

von 8000 UpM wurden die geernteten Zellen pelletiert, der Überstand mit einer 1000µl Pipette entfernt und das Pellet in 200µl S7-MCN-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei einer Temperatur von 0-4°C mit 60 Ultraschallpulse beschallt (Geräteeinstellung: Dyty Cycle = 99%) und danach 8x über eine violette Kanüle (Ø= 0,55x25 mm) geschert. Nach Zugabe von 3U S7-Mikrococccen-Nuklease wurden die Reaktionsansätze für 30-40min bei einer Temperatur von 30°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde jeder Ansatz mit 700µl RLT-Puffer + MercOH (aus den RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen) und 500µl 100%igem, RNase-freiem EtOH gemischt. Die so behandelte RNA wurde dann mit dem RNeasy Mini Kit nach dem „Animal Cell“-Protokoll des Herstellers aufgereinigt und in 200µl RNase freies dH₂O eluiert. Die gereinigte RNA wurde dann durch Zugabe von 500µl 100%igem, RNase-freiem EtOH, 20µl 3M Natriumacetat, pH=6,5 oder 7,0 und 1µl Glykogen (20µg/µl) bei einer Temperatur von -20°C mindestens 12h lang gefällt (3.1.6).

3.8.3 Isolierung und Reinigung transkribierter mRNA mit Oligo(dT)-

Zellulose

Vorbereitung der Oligo(dT)-Zellulose:

100mg Oligo(dT)-Zellulose wurden in einem Falcon-Röhrchen mit 5ml Binding Buffer (BB) (2.11) gemischt und 1h lang auf Eis inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde die gequollene Oligo(dT)-Zellulose bei einer Temperatur von 4°C und einer Geschwindigkeit von 2000 UpM 10min lang pelletiert und nach Entfernen des Überstandes in ca. 2ml BB resuspendiert.

24-32h nach der Transfektion wurden die Zellen 2x mit 0-4°C kaltem PBS_{def} auf einer Kühlplatte gewaschen, jeweils in 500µl 0-4°C kaltes PBS_{def} abgeschabt und gleiche Ansätze vereinigt. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei einer Temperatur von 4°C und einer Geschwindigkeit von 8000 UpM 8min lang pelletiert und nach Entfernen des Überstandes in 350µl RLT-Puffer + MercOH aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann 8x über eine violette Kanüle (Ø= 0,55x25 mm) geschert und mit 350µl 70% EtOH gemischt. Nach dem „Animal-Cell“ Protokoll des RNeasy Kit wurde dann aus diesem Zellysat die gesamte RNA aufgereinigt. Im letzten Schritt der Aufreinigung wurde die RNA mit 200µl RNase freiem dH₂O von der Säule in ein Eppendorf-

Reaktionsgefäß mit „Safelock“-Deckel eluiert. Nachdem der RNA-Lösung 200µl 2x Elution Buffer (2xEB) zugegeben worden war, wurde der Reaktionsansatz 5min lang in einem Wasserbad gekocht, dann 3min lang auf Eis inkubiert und anschließend mit $\frac{1}{10}$ Vol. (= 44µl) 5M NaCl-Lösung gemischt. Jedem Ansatz wurden dann je 100µl vorgequollene Oligo(dT)-Zellulose zugegeben. Vor jeder Zugabe wurde die Zellulose erneut mit dem Vortex gemischt. Die zellulosehaltigen Ansätze wurden 5min lang bei Stufe 3 auf einem Vortex geschüttelt und die zellulosegebundene mRNA anschließend durch eine 3s dauernde Zentrifugation bei einer Geschwindigkeit von 3000 UpM pelletiert. Es folgten 3 Waschungen des Pellets mit je 800µl BB (je 15s lang vortexen, 1-2min lang bei einer Geschwindigkeit von 14000 UpM zentrifugieren und den Überstand verwerfen). Nach den Waschungen wurde die mRNA von der Oligo(dT)-Zellulose in 4 Durchgängen mit je 100µl 70°C warmem 1xEB eluiert. Dazu wurde jedem Pellet der angewärmte 1xEB zugegeben, 8x mit einer 100µl Pipette gemischt, 2min lang bei einer Geschwindigkeit von 14000 UpM zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Die vereinigten Überstände der 4 Elutionen wurden im Anschluß nochmals einer 2min langen Zentrifugation bei einer Geschwindigkeit von 14000 UpM unterworfen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um Zellulosereste aus der Lösung zu entfernen. Die gereinigte mRNA wurde dann durch Zugabe von 1ml 100%igem, RNase-freiem EtOH, 40µl 3M Natriumacetat, pH=6,5 oder 7,0 und 1µl Glykogen (20µg/µl) bei einer Temperatur von -20°C mindestens 12h lang gefällt (3.1.6).

3.8.3 Isolierung spezifischer RNAs mit einem biotinylierten Primer an einer Streptavidin-Matrix

Kopplung des biotinylierten Primers an eine Streptavidin-Matrix:

300µl immobilisiertes Streptavidin wurde 30s lang mit einer Geschwindigkeit von 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1ml Strep.-BB aufgenommen, mit 10µl RNase-freier BSA-Lösung (50mg/ml) und 2µl tRNA-Lösung (146 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gemischt und 5min lang bei RT mit einem Vortex auf Stufe 3 geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz 30s lang mit einer Geschwindigkeit von 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 2x mit je 1ml Strep.-EB bei RT gewaschen (5min lang auf Stufe 3

mit einem Vortex mischen / 30s lang mit einer Geschwindigkeit von 14000 Upm zentrifugieren) und dann 2x mit je 1ml Strep.-BB equilibriert (15s lang mischen / 30s lang mit einer Geschwindigkeit von 14000 Upm pelletieren. Nach dem letzten Schritt wurde das Pellet in 1ml Strep.-BB aufgenommen und mit 23nmol des biotinylierten Primers versetzt. Dieser Ansatz wurde 1h lang bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Streptavidin/Primer-Komplex durch eine zweiminütige Zentrifugation mit Maximalgeschwindigkeit gefällt, der Überstand verworfen und das Pellet 2x mit BB (mRNA) gewaschen. Nach Repelletierung des gewaschenen Streptavidin/Primer-Komplexes wurde das Pellet in 320µl BB (mRNA) aufgenommen und bis zum Gebrauch bei einer Temperatur von 4°C gelagert.

Die eigentliche RNA-Reinigung verläuft genau wie es unter 3.8.3 für mRNA beschrieben ist. An Stelle von 100µl vorgequollene Oligo(dT)-Zellulose wurden jedoch jedem Ansatz 100µl streptavidingekoppelter, biotinylierter Primer zugegeben.

3.9 ANALYSE VON RNA

3.9.1 Quantifizierung von RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung, wurde das Absorptionsvermögen bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ UV-photometrisch gemessen. Eine Absorption von 1 entsprach dabei einer Konzentration von 40µg/ml für ssRNA.

3.9.2 Auftrennung von RNA-Fragmenten auf einem Formaldehyd-Agarose-gel

Um RNA-Fragmente verschiedener Größe aufzutrennen und für den Northern-Blot vorzubereiten, wurden denaturierende Formaldehyd-Agarosegele verwendet.

Vorbereitung des Formaldehyd-Agarosegels:

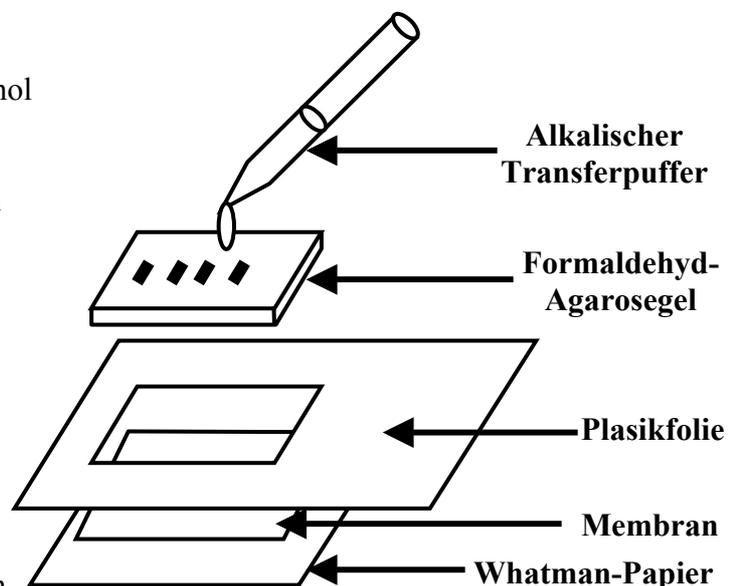
0,45g RNase-freie Agarose wurden in 23,3ml RNase-freiem dH₂O durch Kochen gelöst und mit 6ml 5x FA-Laufpuffer und 1ml 37%iger Formaldehydlösung gemischt. Anschließend wurde die Gellösung mit einer 20ml Pipette in einen 5x10cm großen Gelschlitten verbracht und erkaltete dort.

Die zu trennenden RNA-Lösungen wurden zunächst durch eine Fällung mit EtOH, Natriumacetat (3.1.6) und 1µl Glykogen (20µg/µl) präzipitiert, 1x mit 70% EtOH gewaschen und die Pellets 5min lang bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Pellets in je 10µl frischem FA-Auftragspuffer resuspendiert, 15min lang bei einer Temperatur von 65°C denaturiert und nach weiteren 5min Inkubation auf Eis mit je 2µl Farbpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben auf das vorbereitete Formaldehyd-Agarosegel geladen. Als Laufpuffer wurde 1x FA-Laufpuffer verwendet. Bis die Proben in die Gelmatrix eingelaufen waren, wurde an das Gel eine Spannung von 50V angelegt, dann wurde die Spannung auf 90V erhöht und blieb solange angelegt, bis die Bromphenolblau-Bande ca. 1cm vor dem Gelende angekommen war.

3.9.3 Northern-Blot-Analyse von RNA

Im Anschluß an ihre Auftrennung wurden die RNA-Fragmente in dem Formaldehyd-Agarosegel durch alkalischen Transferpuffer mit dem Vakuum-Blotter TransDNA Express™ auf eine positiv geladene Nylon-Membran übertragen. Die Blotapparatur wurde wie nebenstehend beschrieben aufgebaut.

Vor dem Blotvorgang mußte die Membran kurz mit Metanol benetzt und im Anschluß ca. 10min lang in alkalischem Transferpuffer geschwenkt werden. Der Blotvorgang wurde 90min lang bei einem Saugdruck von 50mbar durchgeführt. Nach dem Transfer der RNAs auf die Membran wurde diese 10min



lang in 200mM Phosphatpuffer neutralisiert, kurz zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet und 3min lang auf einem UV-Schirm fixiert.

3.9.4 Prähybridisierung und Hybridisierung membranfixierter RNAs

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurden die neutralisierten Membranen zunächst einer Prähybridisierung unterworfen, um unspezifische Bindungsstellen

abzusättigen. Dazu wurden die Membranen in Hybridisierungsröhrchen mit 19ml Collins-Hybridisierungslösung und 1ml Lachsspermien-DNA (10min lang bei 95°C inkubiert und anschließend 5min lang auf Eis gekühlt) verbracht und mindestens 5h lang in einem Hybridisierungssofen bei einer Temperatur von 65°C gerollt. Anschließend wurden 17ml der Collins/DNA-Lösung entnommen und 3-10µl der spezifische Sonde (3min lang bei einer Temperatur von 95°C denaturiert und 3min lang auf Eis gekühlt) in den verbleibenden 3ml Collins/DNA-Lösung verdünnt. Die Hybridisierung wurde dann für eine Inkubationszeit von mindestens 12h bei einer Temperatur von 65°C fortgesetzt.

3.9.5 Nachweis von RNA mittels DIG-markierter RNA-Sonden

Zum Nachweis der RNA wurden die Membranen nach der Hybridisierung zunächst 5min lang bei RT in SDS / SSC-Waschpuffer geschwenkt. Anschließend wurden die Membranen in neue Hybridisierungsröhrchen, gefüllt mit SDS / SSC-Waschpuffer, verbracht und mindestens 2h lang bei einer Temperatur von 65°C im Hybridisierungssofen gerollt. Nach weiteren 5min Schwenken bei RT in Chemilumineszenz-Puffer 1, wurden die Membranen 60min auf einem Horizontalschüttler bei RT in 60ml Chemilumineszenz-Puffer 1 und 15ml 10% Blockingreagent inkubiert. Nach dieser Zeit wurde ein α -DIG-Antikörper in 40ml dieser Lösung 1:20000 oder 1:40000 verdünnt und die Blots weitere 30min lang bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten 3 je 5min lange Waschschrte mit Chemilumineszenz-Puffer 1 + 0,3% Tween20 und eine 5min lange Äquilibrierung der Blots in Chemilumineszenz-Puffer 3. Danach wurde auf jeden Blot 1ml vorbereitete CDP-Star-Lösung (995µl Chemilumineszenz-Puffer 3 + 5µl CDP-Star) gegeben und 5min lang bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Blots kurz zwischen 2 Blättern Whatman-Papier getrocknet, in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm exponiert. Die Position der DIG-markierten RNA/Sonden-Hybride auf dem Blot konnte nach Entwicklung anhand der durch Chemilumineszenz verursachten Schwärzung des Films bestimmt werden.

3.9.6 Primer-Extension-Assay zur Detektion modifizierter Nukleotide in RNA

Bei dem Primer-Extension-Assay wurden die zu untersuchende RNA und ein komplementäres Oligonukleotid miteinander hybridisiert und der Primer dann an

der RNA-Vorlage verlängert. Für die hier beschriebenen Versuche wurde das SuperScriptII RNaseH⁻ Reverse Transkriptase Kit verwendet. Standardmäßig wurden 0,5µg RNA mit 1µl eines 5'-[³²P] markierten Oligonukleotids (ca. 2x10⁵ IpM) und 1µl SuperScriptII-Puffer gemischt und mit dH₂O auf 8µl aufgefüllt. Die jeweils verwendeten Primer sind an entsprechender Stelle im Ergebnis-Teil der Arbeit benannt und können im Materialteil (2.5.3) nachgeschlagen werden. Der Reaktionsansatz wurde 10min lang bei einer Temperatur von 70°C denaturiert und 3min lang auf Eis wieder abgekühlt. Nach der Inkubation auf Eis wurden jedem Ansatz 2µl Enzym-Master-Mix zugegeben, gemischt und die Reaktion weitere 50min lang bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

<u>Enzym-Master-Mix:</u>	P x 0,4µl dNTP-Mix (jedes Nukleotid 25mM)
	+ P x 1µl DTT (0,1M)
	+ P x 0,2µl RNase-Inhibitor
	+ P x 0,4µl SuperScriptII

“P” ist die Anzahl der zu untersuchenden RNA-Proben

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Assay verwendet, um chemisch modifizierte RNA-Transkripte verschiedener EBOV-Minigenome zu analysieren. Die Verlängerung des Primers schritt dabei jeweils nur bis zu einem modifizierten Nukleotid in der RNA fort und brach dann ab. Nach der 50minütigen Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 10µl Stopp-Puffer FA (aus dem T7-Sequencing™ Kit) terminiert, 5min lang bei einer Temperatur von 95°C denaturiert und je Probe 5µl auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (8% Polyacrylamid, 3,9M Harnstoff in 1x TBE-Puffer) aufgetragen. Die Proben wurden 2h lang bei einer Spannung von 1,4kV über das Gel aufgetrennt. Parallel zu den Proben des Primer-Extension-Assay wurde auf das Gel eine radioaktive Sequenzierung des Vorlage-Minigenoms [Vorlage der *in vitro* RNA-Transkription (3.7)] mit dem gleichen Primer aufgetragen. Durch Vergleich der Abbruchbanden von Primer-Extension-Assay und radioaktiver Sequenzierung im Autoradiogramm, konnte so auf die Positionen chemischer Modifikationen in der untersuchten RNA rückgeschlossen werden.

3.9.7 RNase-Protection Assay

Für die RNase-Protection Assays wurde das HybSpeed™ RPA Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zelluläre gesamt-RNA (3.8.1) wurde dabei mit

einer spezifischen, [α - 32 P]-UTP-markierten RNA-Sonde inkubiert. Nicht mit der Sonde hybridisierte RNAs wurden anschließend durch einen RNase A/T1-Verdau aus den Reaktionsansätzen entfernt und unverdaute RNA-Fragmente auf einer Gelmatrix mit 8% Polyacrylamid, 5M Harnstoff in 1x TBE-Puffer analysiert. Die Reaktionen wurden in PCR-Gefäßen angesetzt und die Inkubationsperioden wegen der z.T. schnellen Temperaturwechsel in einem DNA Thermal Cycler durchgeführt. Die jeweils verwendeten Sonden sind im Ergebnisteil an der entsprechenden Stelle benannt.

3.10 MODIFIKATION VON RNA

3.10.1 Transkription und Reinigung einer DIG-markierten RNA-Sonde

Zur Markierung von RNA-Sonden mit DIG kam das 10x DIG Labelling Mix der Firma Roche zum Einsatz. In dieser Arbeit wurde nur das Konstrukt BS/-CAT als Vorlage für DIG-markierte Sonden verwendet. Dabei handelte es sich um den Blueskript-Vektor, in welchen das CAT-Gen in negativer Orientierung (bezogen auf den T7-RNA-Polymerase-Promotor) einkloniert war. Bei der hier beschriebenen Transkription entstand eine DIG-markierte RNA welche komplementär zur CAT-mRNA war. Die Markierungsreaktion wurde wie folgt angesetzt:

- 13 μ l linearisiertes Konstrukt BS/-CAT
- + 2 μ l DIG Labelling Mix
- + 2 μ l 10x Transkriptionspuffer
- + 1 μ l RNase-Inhibitor
- + 2 μ l T7-RNA-Polymerase

Nach einer Inkubation des Ansatzes von 2-3h bei einer Temperatur von 37°C, wurde der Reaktion 1 μ l RNase-freie DNase zugesetzt und der Versuchsansatz für weitere 30min bei einer Temperatur von 37°C belassen. Anschließend wurde die transkribierte und markierte RNA nach dem „RNA-Cleanup“-Protokoll des RNeasy Mini Kit gereinigt, in 100 μ l RNase-freies dH₂O eluiert, mit 3 μ l RNase-Inhibitor versetzt und bis zum Gebrauch bei einer Temperatur von -20°C gelagert.

3.10.2 Transkription und Reinigung einer [α -³²P]-UTP-markierten RNA-

Sonde

Die Transkription einer [α -³²P]-UTP-markierten RNA-Sonde wurde mit dem Riboscribe™ T7 Transcription Kit durchgeführt. 10 μ l linearisiertes Vorlageplasmid wurden in ein Reaktionsgefäß verbracht und 10min lang in der Speedvac eingedampft. Zu der getrockneten RNA wurden folgende Komponenten zugegeben:

- + 4 μ l 5x Reaktionspuffer
- + 1 μ l ATP
- + 1 μ l CTP
- + 1 μ l GTP
- + 3 μ l UTP (100 μ M)
- + 2 μ l DTT
- + 0,5 μ l RNase-Inhibitor
- + 2 μ l T7-RNA-Polymerase-Mix
- + 5 μ l [α -³²P]-UTP, 3000 Ci/mmol

Der Ansatz wurde zur Abschirmung der radioaktiven Strahlung in eine Plexiglas-Box verbracht und 3h lang bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank des Isotopenlabors inkubiert. Anschließend wurde eine Reinigung der Sonde mit dem RNeasy Mini Kit nach dem „RNA-Cleanup“-Protokoll durchgeführt und die Sonde in 30 μ l RNase-freiem dH₂O eluiert. Die gereinigte Sondenlösung wurde mit 30 μ l Gel-Loading-BufferII (aus dem HybSpeed™ RPA Kit) versetzt und auf ein denaturierendes 5% Polyacrylamid- / 7% Harnstoffgel aufgetragen. Nach einem einstündigen Gellauf bei einer angelegten Spannung von 250V wurde das Gel in Folie verpackt und ein Röntgenfilm exponiert. Auf dem entwickelten Film wurde die Position der gewünschten [α -³²P]-UTP-markierten RNA-Sonde bestimmt und die entsprechende Bande aus den Röntgenfilm ausgeschnitten. Mit Hilfe des Films als Maske wurde dann die [α -³²P]-UTP-markierte RNA-Sonde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 200 μ l Elution-Buffer (aus dem HybSpeed™ RPA Kit) überschichtet und 2-3h lang bei RT inkubiert. Die Aktivität in 1 μ l Überstand wurde am Szintillation-Counter bestimmt. Für die RNase-Protection-Assays wurden je Probe 4-5x10⁴ IpM eingesetzt.

3.10.3 Chemische Modifikation von RNA mit DMS

DMS modifiziert spezifisch folgende ungepaarte Basen durch Transfer einer Methylgruppe auf das jeweils bezeichnete Stickstoffatom (Reihenfolge der Präferenz nach absteigend): G-N7, A-N1 und C-N3. Aufgrund seiner stark mutagenen und giftigen Eigenschaften wurden alle Arbeiten mit DMS unter einem Abzug und mit entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt. Für die Modifikation *in vitro* transkribierter RNA (3.7) mit DMS wurde der folgende Versuchsansatz gewählt:

1 μg *in vitro*-transkribierte Minigenom-RNA
+ 19 μl 10x HMK-Puffer
+ 2 μl RNase-Inhibitor
ad. 190 μl dH₂O

Der Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt (+DMS und -DMS) um eine negativ-Kontrolle zu erhalten. Die Reaktionsansätze wurden zunächst 10min lang auf Eis inkubiert und weitere 10min lang auf eine Temperatur von 30°C erwärmt. Anschließend wurden dem +DMS-Ansatz 0,8 μl DMS zugesetzt und gemischt, während in den -DMS-Ansatz nur 0,8 μl dH₂O gegeben wurden. Nach einer 5min dauernden Inkubation bei einer Temperatur von 30°C, wurde beiden Ansätzen je 10 μl t-RNA-Lösung (1^{Hg}/ μl) zugesetzt und die chemische Modifikation durch Zugabe von je 200 μl 2xDMS-Stopp-Puffer unterbrochen. Nach einer Inkubationszeit von 5min bei RT schlossen sich eine Chloroform/Phenol Extraktion (3.1.3) und eine Fällung von modifizierter RNA durch Ethanol und Natriumacetat (3.1.6) an. Das RNA-Pellet wurde nach der Fällung in 10 μl RNase-freiem dH₂O resuspendiert und mit 0,2 μl RNase-Inhibitor versetzt. Die Position der modifizierten und damit ungepaarten Basen wurde im Anschluß im Primer-Extension-Assay bestimmt. Da eine Methylierung an Position N7 eines ungepaarten G keine Termination der reversen Transkription herbeiführt und folglich auch an derartig modifizierten Nukleotiden keine Abbruchfragmente entstehen können, wurde DMS als A/C-spezifisches Modifikationsagens behandelt.

3.10.3 Chemische Modifikation von RNA mit CMCT

Ähnlich wie DMS besitzt auch CMCT die Eigenschaft ungepaarte Basen spezifisch an Stickstoffatomen zu modifizieren. Bei CMCT handelt es sich dabei um (Reihenfolge der Präferenz nach absteigend): U-N7 und G-N2.

Modifikationen mit CMCT an *in vitro*-transkribierter RNA (3.7) wurden in folgenden Reaktionsansätzen durchgeführt:

12,5µl *in vitro*-transkribierte Minigenom-RNA (4^{µg}/µl)
+ 12,5µl CMCT stock

Auch hier wurde der Versuch im Doppelansatz durchgeführt (+CMCT und – CMCT) um eine negativ-Kontrolle zu erhalten. Zur negativ-Kontrolle wurden an Stelle von CMCT stock-Lösung 12,5µl CMCT-Puffer gegeben. Beide Ansätze wurden 10min lang bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2,5Vol. 100% EtOH gestoppt und die RNA für eine Zeitdauer von 10min auf einem EtOH / Trockeneis-Bad gefällt. Danach wurde die RNA durch eine 10min dauernde Zentrifugation bei einer Geschwindigkeit von 15000 UpM gefällt, der Überstand verworfen und das Pellet in 200µl Extraktionspuffer resuspendiert. Die resuspendierte RNA wurde dann einer Chloroform/Phenol Extraktion (3.1.3) unterzogen und durch eine Fällung mit Ethanol und Natriumacetat (3.1.6) erneut pelletiert. Das RNA-Pellet wurde im Anschluß an die Fällung in 400µl RNase-freiem dH₂O resuspendiert und mit 4µl RNase-Inhibitor versetzt. Im Primer-Extension-Assay wurde CMCT als U/G-spezifisches Modifikationsagens angesehen.

3.11 TRANSFEKTION VON RNA IN HELa-ZELLEN

Die Methode der Transfektion von RNA in HeLa-Zellen wurde bereits ausführlich beschrieben (Weik, 1999).

3.12 ZELLKULTUR-TECHNIKEN

Die gesamte Zellkultur wurde durch Frau Angelika Lander betreut.

3.12.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die verwendeten HeLa-Zellen wurde in 1xDMEM kultiviert, welchem 10% FCS, L-Glutamin (2mM) und die Antibiotika Penicillin (50U/ml) und Streptomycin (50µg/ml) zugegeben worden waren. Das Inkubationsmilieu des Brutschranks wurde auf eine Temperatur von 37°C und einen CO₂-Anteil von 5% justiert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich subkultiviert. Hierzu wurde das Medium aus den 75cm² Zellkulturflaschen konfluent gewachsener Zellen durch Dekantieren entfernt und die Zellen zweimal mit 37°C warmem PBS_{def.} gewaschen. Durch

Zugabe von 5ml Trypsin-EDTA-Lösung wurde das Ablösen der Zellen vom Untergrund forciert und nach einer 1-3min dauernden Inkubation bei einer Temperatur von 37°C mikroskopisch kontrolliert. Nach Zugabe von 5ml 1xDMEM / 10%FCS wurde die Zellsuspension mit einer Pipette gut durchmischt und die Wirkung der Trypsin-EDTA-Lösung neutralisiert. Für die weitere Kultivierung wurde $\frac{1}{10}$ Vol. der Zellsuspension in eine neue 75cm² Zellkulturflasche mit 20ml 1xDMEM / 10%FCS überführt und erneut im Brutschrank bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Infektion mit MVA-T7-Viren und / oder Transfektionen wurde die Zellsuspension, abhängig vom erwünschten Dichtegrad am nächsten Tag, in 1xDMEM / 10%FCS verdünnt und in 6er-Zellkulturplatten ausplattiert. Nach einer Kultivierungszeit von 7-12h (je nach verwendeter Verdünnung und angestrebter Dichte) waren die Zellen dann bereit für die Folgeexperimente.

3.12.2 Kultivierung von BHK-T7-Zellen

Das Kultivierungsprinzip der BHK-T7-Zellen gleicht in Technik und Inkubationsmilieu dem der HeLa-Zellen. Da jedoch die BHK-T7-Zellen zur Beibehaltung der T7-RNA-Polymerase-Expression einem ständigen Selektionsdruck unterworfen sein müssen, wurde zur Kultivierung dieser Zellen das Glasgow-Medium der Firma GibcoBRL verwendet und mit L-Glutamin, den Antibiotika Penicillin und Streptomycin, nicht essentiellen Aminosäuren, Tryptose Phos. Broth., 10% newborn calf serum und 1^{mg}/ml Geneticin angereichert. Auch hier wurden die Zellen nach dem gleichen Schema wie unter 3.12.1 zweimal wöchentlich bei Erreichen der Konfluenz subkultiviert.

3.12.3 Infektion von HeLa-Zellen mit MVA-T7 Virus

Um HeLa-Zellen zur Produktion von T7-RNA-Polymerase zu befähigen, wurden diese mit dem rekombinanten Vacciniavirus MVA-T7 infiziert. Dazu wurden die bis zu einer Dichte von ca. 40-70% kultivierten Zellen zunächst einmal mit 1xDMEM (+ Penicillin / Streptomycin + L-Glutamin, aber ohne FCS) gewaschen und anschließend pro Well mit 100µl MVA-T7-Virus Stammlösung in 400µl 1xDMEM (+ Penicillin / Streptomycin + L-Glutamin, aber ohne FCS) überschichtet. Während einer einstündigen Adsorptionsphase wurden die Zellen mit dem Virusmedium bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Anteil von

5% im Brutschrank auf einem Kippschüttler inkubiert. Nach Ablauf der Adsorptionszeit wurde das Virusmedium von den Zellen entfernt und diese mit Plasmid-DNA transfiziert (3.6.1).

3.13 NACHWEIS VON CHLORAMPHENICOL-ACETYLTRANSFERASE (CAT) (-AKTIVITÄT)

3.13.1 Aktivitätsnachweis der CAT mittels [¹⁴C]-markiertem Chloramphenicol

Das Funktionsprinzip, die nötigen Puffer und die Durchführung des Aktivitätsnachweis der CAT mittels [¹⁴C]-markiertem Chloramphenicol wurde schon früher ausführlich dargestellt (Weik, 1999). Welche Mengen an Zellysat für den jeweiligen Versuch eingesetzt wurden, ist im Ergebnisteil dieser Arbeit an den entsprechenden Stellen angegeben.

3.13.2 Nachweis der CAT durch Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zum direkten Nachweis des translatierten Reporterproteins CAT wurde der CAT-ELISA-Kit verwendet. Die Zellen wurden zunächst nach Protokoll des Herstellers lysiert und der Gehalt an Gesamtprotein bestimmt. Dazu wurden 50µl Zellysat mit 1ml fünffach verdünntem Proteinbestimmungsreagenz (Protein Assay Farbstoffkonzentrat / Biorad) gemischt und das Absorptionsvermögen der Lösung bei einer Wellenlänge von $\lambda=595\text{nm}$ bestimmt. Anhand der gemessenen Absorptionen wurden anschließend normierte Mengen an Zellysat für den CAT-ELISA verwendet. Funktionsprinzip und Durchführung des CAT-ELISA sind im Herstellerprotokoll nachzulesen.

4. ERGEBNISSE

Während Replikation und Transkription des EBOV entstehen verschiedene RNA-Spezies (siehe Abbildung 6) unterschiedlicher Orientierung und Länge. Die Replikation des RNA-Genoms in (-)-Strang-Orientierung (②) in das komplementäre Antigenom in (+)-Strang-Orientierung (①) wird durch einen genomischen Promotor am 3'-Ende des Genoms vermittelt. Die Replikation des Antigenoms in (+)-Strang-Orientierung (①) zurück in das Genom in (-)-Strang-Orientierung (②) wird durch den sogenannten antigenomischen Promotor am 3'-Ende des viralen Antigenoms vermittelt. Von den TKS der genomischen RNA aus wird die Transkription der viralen mRNAs reguliert. Die mRNAs in (+)-Strang-Orientierung (③) sind polyadenyliert und beginnen an ihrem 5'-Ende mit der komplementären Sequenz des jeweiligen TKS.

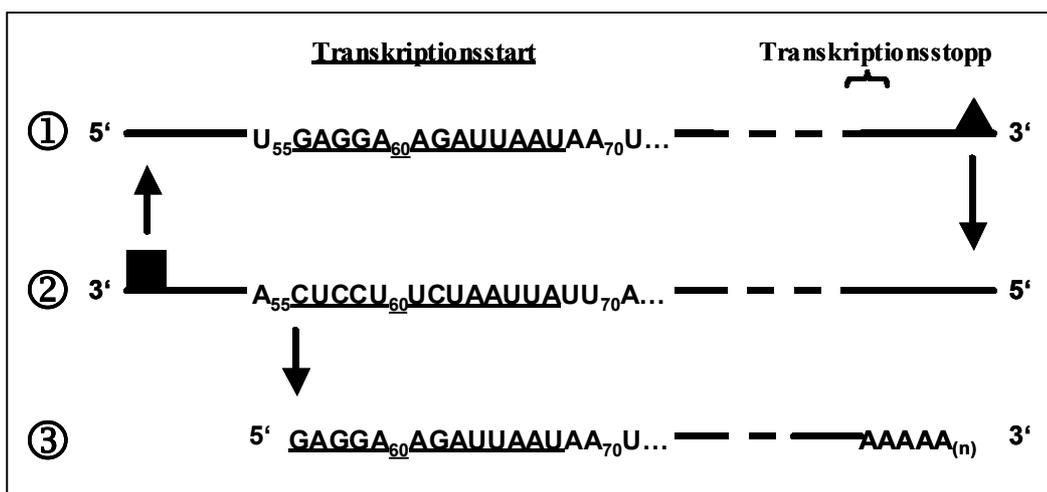


Abbildung 6: Schema der verschiedenen RNA-Spezies und ihrer Unterschiede. ① Zeigt die antigenomische-RNA in (+)-Strang-Orientierung. ② Stellt die genomische RNA in (-)-Strang-Orientierung dar und in ③ ist transkribierte mRNA in (+)-Strang-Orientierung gezeigt. Das schwarze Quadrat symbolisiert den genomischen Promotor. Das schwarze Dreieck stellt den antigenomischen Promotor dar.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich zum einen mit der näheren Charakterisierung des genomischen Promotors über verschiedene Deletions- und Austauschmutanten. Zum anderen wurde der TKS des ersten Gens näher untersucht. Computergestützte Analysen der verschiedenen RNA-Spezies sagten die Beteiligung der TKS an der Bildung stabiler Sekundärstrukturen voraus. Die Morphologie dieser Sekundärstrukturen und ihre Relevanz für die Transkription im Zusammenhang mit dem Nukleokapsidprotein VP30 wurden ebenfalls näher betrachtet.

4.1 DAS MINIGENOM IN (+)-STRANG-ORIENTIERUNG

Ein Großteil der in dieser Arbeit präsentierten Daten basieren auf Versuchen mit dem unter 1.3 beschriebenen Replikations- / Transkriptionssystem für EBOV. Das Minigenom stellt dabei ein stark verkürztes Analogon des Genoms des EBOV dar. Während Replikation und Transkription des Minigenoms entstehen daraus alle in Abbildung 6 beschriebenen RNA-Spezies [minigenomische RNA (②), miniantigenomische RNA (①) und mRNA des Reportergens (③)]. Zu Beginn dieser Arbeit lag nur das negativsträngige Minigenom 3E-5E vor. Um die geplanten Analysen sowohl an negativ- als auch an positivsträngiger RNA durchführen zu können, mußte zunächst ein Minigenom in (+)-Strang-Orientierung kloniert werden.

4.1.1 Klonierung eines Minigenoms in (+)-Strang-Orientierung

Die in diesem Abschnitt beschriebene Klonierungsstrategie ist in Abbildung 7 dargestellt. ① Das in (-)-Strang-Orientierung vorliegende Minigenom 3E-5E (Mühlberger *et al.*, 1999) wurde mit den Enzymen RsrII und ClaI (3.4.3.b) verdaut. Die herausgeschnittene Kassetten aus T7-Promotor, Trailer des EBOV, CAT, Leader des EBOV und dem Hepatitis-Delta-Virus (HDV)-Ribozym bis zur RsrII-Schnittstelle wurde anschließend über ein präparatives Gel aufgereinigt (3.1.5). ② 2µl von 50µl des gelgereinigten Fragments wurden für eine PCR-Reaktion (3.3.1) mit den Primern #310 und #311 eingesetzt. Primer #311 erzeugte am Übergang T7-Promotor/EBO-Trailer eine PmlI-Schnittstelle, während Primer #310 am Übergang EBO-Trailer/HDV-Ribozym eine MvnI-Schnittstelle einführte. Das entstandene PCR-Fragment wurde mit den Enzymen PmlI und MvnI verdaut (3.4.3.b), gelgereinigt (3.1.5), und 2µl von 50µl wurden für eine PCR ③ mit den Primern #376 und #377 eingesetzt (3.3.1). Primer #376 bindet an die Nukleotide 1-26 des Leaders des EBOV und enthält die gesamte Sequenz des T7-RNA-Polymerase-Promotors gefolgt von einer ClaI-Schnittstelle. Primer #377 bindet an ein Cytosin in der Vektorsequenz vor dem Trailer des EBOV, die Nukleotide 1-21 des Trailers des EBOV und beinhaltet 38 Nukleotide der HDV-Ribozym-Sequenz einschließlich der RsrII-Schnittstelle. Durch die PCR mit diesem Primerpaar wurde der T7-RNA-Polymerase-Promotor direkt vor den Leader des EBOV kloniert und die Teilsequenz des HDV-Ribozyms an den Trailer gehängt. Das entstandene PCR-Fragment wurde mit RsrII und ClaI

verdaut (3.4.3.b), gelgereinigt (3.1.5) und in das RsrII/ClaI verdaute und CIP-behandelte (3.4.4) Minigenom 3E-5E einligiert (3.4.5). Das entstandene Minigenom (+)DI_G enthielt die Leader/CAT/Trailer-Kassette in (+)-Strang-Orientierung und ein zusätzliches Nukleotid am 3'-Ende des Trailers.

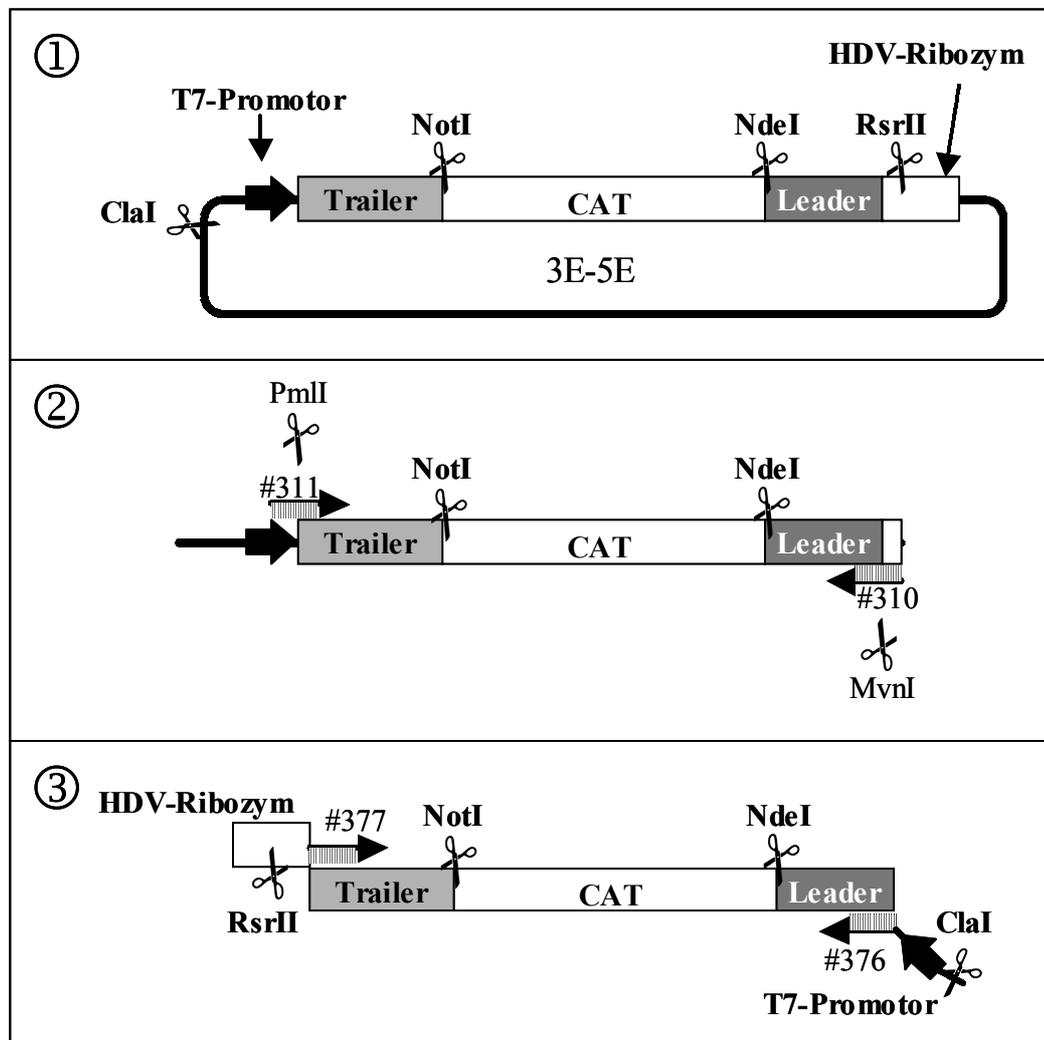


Abbildung 7: Strategie zur Klonierung eines EBOV-Minigenoms in (+)-Strang-Orientierung, ausgehend von dem Konstrukt 3E-5E

4.1.2 Ein zusätzliches Nukleotid am 3'-Ende des Trailers in (+)-Strang-Orientierung hemmt die Replikation

Durch die Klonierungsstrategie (4.1.2) wurde ein zusätzliches Nukleotid (C) aus der Vektorsequenz an das 3'-Ende des Trailers in (+)-Strang-Orientierung kloniert. Überprüfung dieses Minigenoms im Replikations- /Transkriptionssystem ergaben, daß dieses Konstrukt nicht zur Replikation fähig war. Um das zusätzliche Nukleotid am 3'-Ende des Trailers in (+)-Strang-Orientierung zu entfernen, wurde eine PCR mit den Primern #287 und #406 an dem Plasmid (+)DI_G durchgeführt (3.3.1). Das PCR-Fragment wurde gelgereinigt (3.1.5) und

über die Schnittstellen NotI und RsrII mit dem entsprechenden NotI/RsrII-Fragment aus dem (+)DI_{+G}-Plasmid ausgetauscht (3.4.3.b-4.4.5). Transkribierte RNA (3.7) des Minigenoms (+)DI_{+G} und des neuen Konstrukts, (+)DI wurden in HeLa-Zellen transfiziert (3.11), welche zuvor mit MVA-T7 infiziert (3.12.3) und mit pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO} und pTM1/L_{EBO} transfiziert (3.6.1) worden waren. Für die RNA-Transfektion wurde von beiden RNAs je 1µl einer 1:10-Verdünnung eingesetzt. Nach Aufschluß der Zellen wurde die CAT-Aktivität von je 1,5µl Zellysat im CAT-Assay nachgewiesen (3.13.1). Abbildung 8 zeigt das Ergebnis des Versuchs.

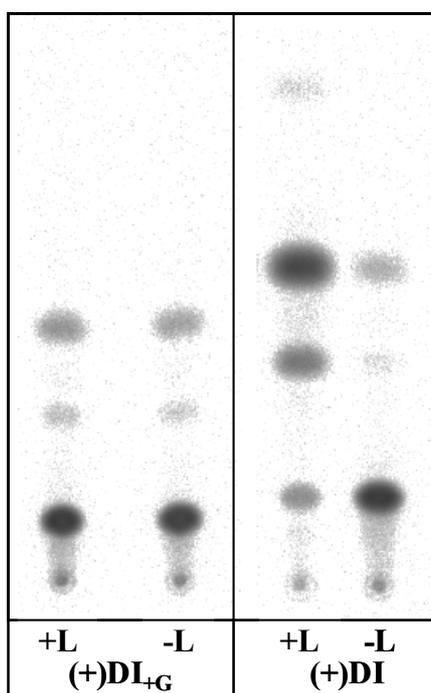


Abbildung 8:

Vergleich der CAT-Aktivität in Zellysaten des Konstrukts (+)DI_{+G} (links) und (+)DI (rechts). Für den Assay wurden je 1,5µl Zellysat eingesetzt. +L indiziert die Anwesenheit des Plasmids pTM1/L_{EBO} in den transfizierten Zellen, während -L dessen Abwesenheit anzeigt (Negativkontrolle).

Obwohl mit der Expression des CAT-Gens eigentlich Aussagen über die Transkriptionsaktivität der Minigenome getroffen werden, lassen sich auch Rückschlüsse auf das Replikationsverhalten der Konstrukte ziehen. Bei den Ansätzen (+)DI_{+G} war sowohl in An- (+L) als auch in Abwesenheit (-L) des Plasmids pTM1/L_{EBO} in den transfizierten Zellen nach Lyse nur eine basale CAT-Aktivität zu beobachten. Diese Hintergrund-CAT-Aktivität läßt sich auf die transfizierte RNA in (+)-Strang-Orientierung zurückführen, welche von der Zelle unspezifisch transkribiert werden kann. Dies führt zu einer geringen Hintergrundexpression des Reportergens, unabhängig von der Anwesenheit des L-Proteins (siehe Abbildung 7). Im Gegensatz zu dieser unspezifischen Hintergrundaktivität wirken im Ansatz (+)DI +L die spezifische Replikation der Minigenom-RNA und deren Transkription zusammen und führen zu einer

deutlich erhöhten CAT-Aktivität in diesem Zellysat. Ein zusätzliches Nukleotid (C) am 3'-Ende des Trailers in (+)-Strang-Orientierung hemmt also die Replikation.

4.2 UNTERSUCHUNGEN DES TRANSKRIPTIONSSTARTSIGNALS DES ERSTEN GENS

Nachdem replikationskompetente Minigenome in (-)- und (+)-Strang-Orientierung vorlagen, wurde mit der Untersuchung des TKS des ersten Gens und der dort vermuteten Sekundärstruktur begonnen. Über chemische Modifikation mit einzelstrang-spezifischen Reagenzien (3.10.3, 3.10.4) wurde dabei zunächst überprüft, ob sich in *in vitro* transkribierten RNAs in dieser Region Sekundärstrukturen ausbilden können und wie die Morphologie dieser Strukturen beschaffen ist.

4.2.1 Analyse *in vitro* transkribierter RNA in (+)-Strang-Orientierung mittels chemischer Modifikation

Zunächst wurde die Bildung der RNA-Sekundärstruktur in Miniantigenom-RNA in (+)-Strang-Orientierung überprüft. Zu diesem Zweck wurde das Konstrukt (+)DI mit Sall linearisiert (3.4.3.b), gereinigt (3.1.4) und in einer Run-off-Transkription (3.7) eingesetzt. Die *in vitro* transkribierte RNA in (+)-Strang-Orientierung wurde dann in zwei getrennten Ansätzen einer chemischen Modifikation mit DMS (3.10.2) und CMCT (3.10.3) unterworfen. Da beide Chemikalien nur ungepaarte Nukleotide modifizieren, bleiben gepaarte Bereiche (wie sie z.B. in Sekundärstrukturen vorkommen) vor einer Modifikation geschützt. Die modifizierten RNAs wurden als Vorlagen für einen Primer-Extension-Assay (3.9.6) verwendet. Parallel zu dem Primer-Extension-Assay wurde eine radioaktive Sequenzierung (3.2.3) durchgeführt. Die radioaktiv markierten Fragmente des Primer-Extension-Assays und der radioaktiven Sequenzierung wurden zusammen auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (3.9.6) aufgetrennt. Durch Auswertung des Bandenmusters im Autoradiogramm konnte auf die Position gepaarter und ungepaarter Nukleotide rückgeschlossen und so eine mögliche Sekundärstruktur ermittelt werden. Abbildung 9 zeigt exemplarisch ein solches Autoradiogramm. Bei dem Vergleich der Bandenmuster von radioaktiver Sequenzierung und Primer-Extension-Assay ist darauf zu achten, daß die cDNA-Produkte, welche an der modifizierten RNA synthetisiert wurden,

gegenüber der radioaktiven DNA-Sequenzierung normalerweise um 1 Nukleotid versetzt sind. Dies ist damit zu erklären, daß das letzte von der reversen Transkriptase inkorporierte Nukleotid komplementär zu dem Nukleotid vor der Modifizierungsstelle in der RNA-Vorlage ist.

In drei unabhängigen Modifikationsassays wurden an RNA in (+)-Strang-Orientierung für die TKS-Region des ersten Gens folgende Ergebnisse beobachtet:

5' - . . . ACUAU₅₅ GAGGA₆₀ AGAUUAAUAA₇₀ UUUUCCUCUC₈₀ AUUGA₈₅ AA . . . - 3'

5' - . . . ACUAU₅₅ GAGGA₆₀ AGAUUAAUAA₇₀ UUUUCCUCUC₈₀ AUUGA₈₅ AA . . . - 3'

5' - . . . ACUAU₅₅ GAGGA₆₀ AGAUUAAUAA₇₀ UUUUCCUCUC₈₀ AUUGA₈₅ AA . . . - 3'

Die grau unterlegten Nukleotide waren durch die Chemikalien DMS und CMCT markiert worden. Bei dem unterstrichenen Nukleotid war eine eindeutige Aussage nicht möglich, weil auch in der Negativkontrolle eine leichte Bande zu beobachten war. Mit Hilfe dieser Daten konnte die in Abbildung 10 dargestellte Sekundärstruktur abgeleitet werden. Der Vergleich zu der vom Computer vorhergesagten Sekundärstruktur zeigt, daß die experimentell bestimmte Sekundärstruktur eine deutlich größere „Loop“-Region besitzt als die vom Computer berechnete.

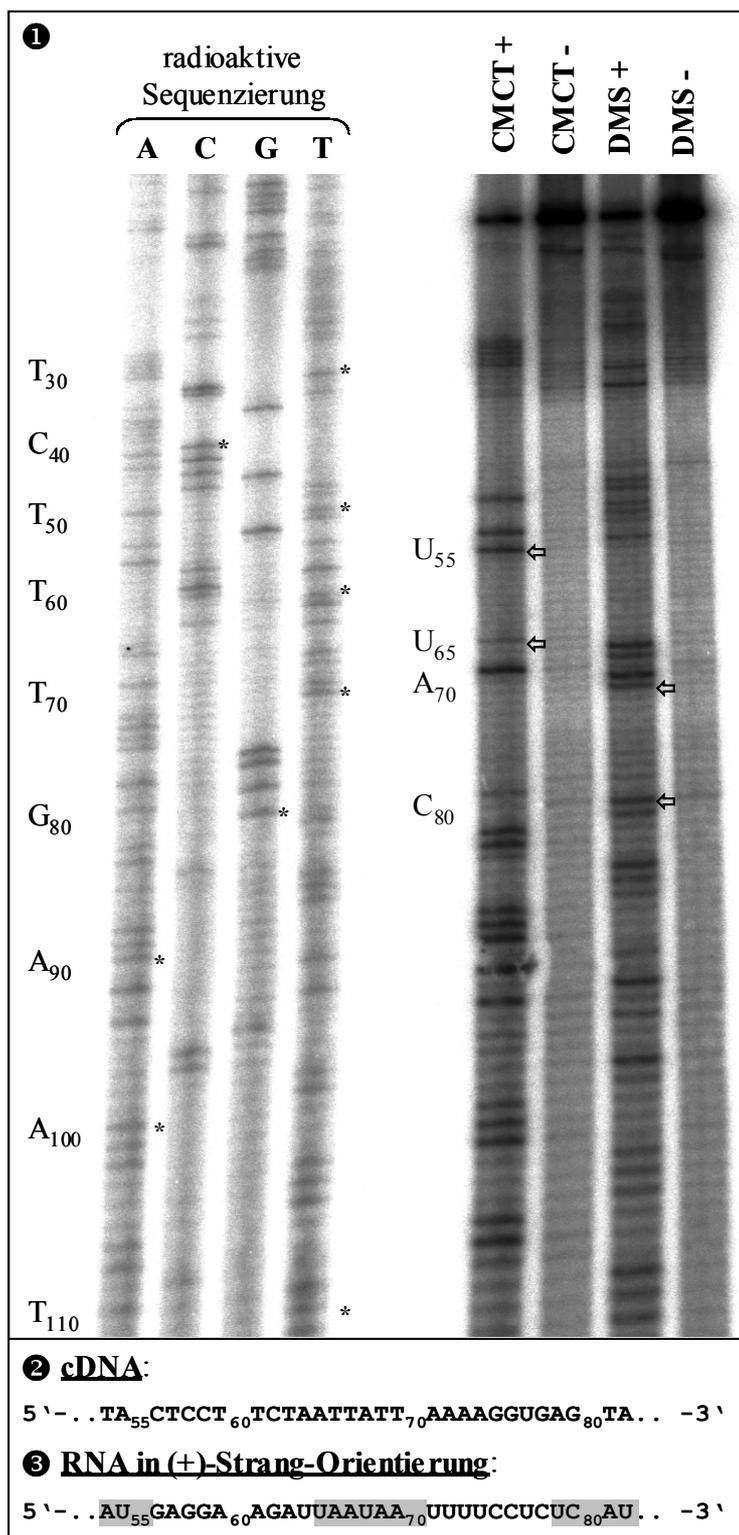


Abbildung 9:

Autoradiogramm einer chemischen Modifizierung an *in vitro* transkribierter DI RNA in (+)-Strang-Orientierung. **1** Die radioaktive Sequenzierung (links) und die cDNA-Synthese an modifizierter RNA im Primer-Extension-Assay (rechts) wurden mit den 5'-[³²P]-markierten Primer #429 durchgeführt. Die Ansätze DMS+ und CMCT+ enthielten die jeweilige Chemikalie, während sie in den Ansätzen DMS- und CMCT- fehlte (Negativkontrolle), um unspezifische Abbrüche der cDNA-Synthese zu detektieren. Die Sterne (*) zeigen jeweils die seitlich indizierte Nucleotide an. Die Beschriftung der Sequenzierung bezieht sich auf die entstandene cDNA, ist also komplementär zur Sequenz der RNA in (+)-Strang-Orientierung (siehe auch **2**). Die Beschriftung der modifizierten Nucleotide im Primer-Extension-Assay bezieht sich auf die (+)RNA. Die Numerierung der Nucleotide bezieht sich auf die EBOV-spezifische Sequenz des Leaders in (+)-Strang-Orientierung. **3** stellt die modifizierten Nucleotide am TKS (grau hinterlegt) zusammenfassend dar.

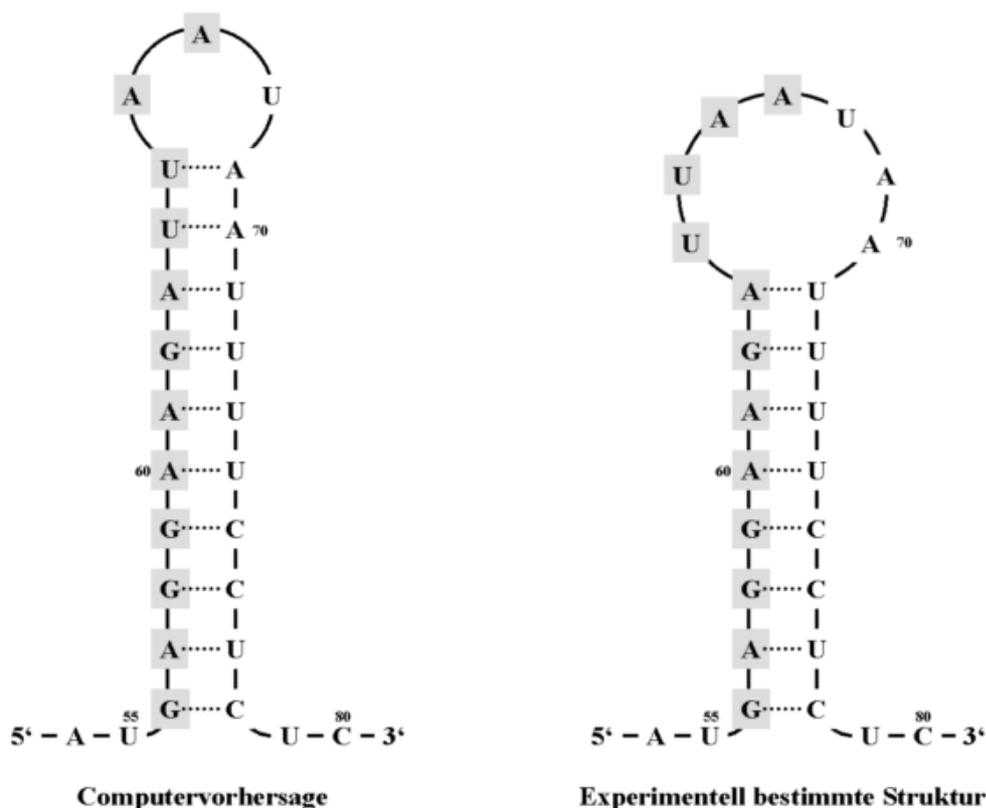
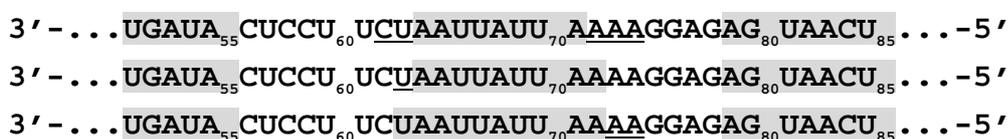


Abbildung 10: Darstellung der vom Computer vorhergesagten und der experimentell ermittelten Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens in RNA in (+)-Strang-Orientierung. Die Numerierung der Nukleotide bezieht sich auf die EBOV-spezifische Sequenz des Leaders in (+)-Strang-Orientierung. Nukleotide, welche zur Sequenz des TKS des ersten Gens gehören, sind grau unterlegt.

4.2.2 Chemische Modifikation in vitro transkribierter Minigenom-RNA in

(-)-Strang-Orientierung

Nachdem gezeigt werden konnte, daß sich eine stabile Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens in antigenomischer RNA in (+)-Strang-Orientierung bilden kann, wurde dies auch an Minigenom-RNA in (-)-Strang-Orientierung untersucht. Plasmid-DNA des Minigenoms 3E-5E wurde mit Sall linearisiert (3.4.3.b) und *in vitro* transkribiert (3.7). Die RNA in (-)-Strang-Orientierung wurde mit DMS und CMCT modifiziert (3.10.3, 3.10.4) und anschließend für den Primer-Extension-Assay (3.9.6) verwendet. In Abbildung 11 ist das Autoradiogramm des Gels nach zwölfstündiger Exposition dargestellt. Drei unabhängig voneinander durchgeführte chemische Modifikationsassays an Minigenom-RNA in (-)-Strang-Orientierung ergaben für die TKS-Region des ersten Gens folgende Ergebnisse:



Die grau unterlegten Nukleotide waren durch DMS und CMCT modifiziert worden. Bei unterstrichenen Nukleotiden war eine eindeutige Aussage nicht möglich, da auch in der Negativkontrolle eine leichte Bande zu beobachten war. Insgesamt scheint die Sekundärstruktur in minigenomischer RNA in (-)-Strang-Orientierung labiler als in miniantigenomischer RNA in (+)-Strang-Orientierung. Der „Loop“-Bereich der Sekundärstruktur ist deutlich zu Lasten der Stamm-Region erweitert. Abbildung 12 zeigt eine mögliche Sekundärstruktur der Region auf Basis der hier gezeigten Daten.

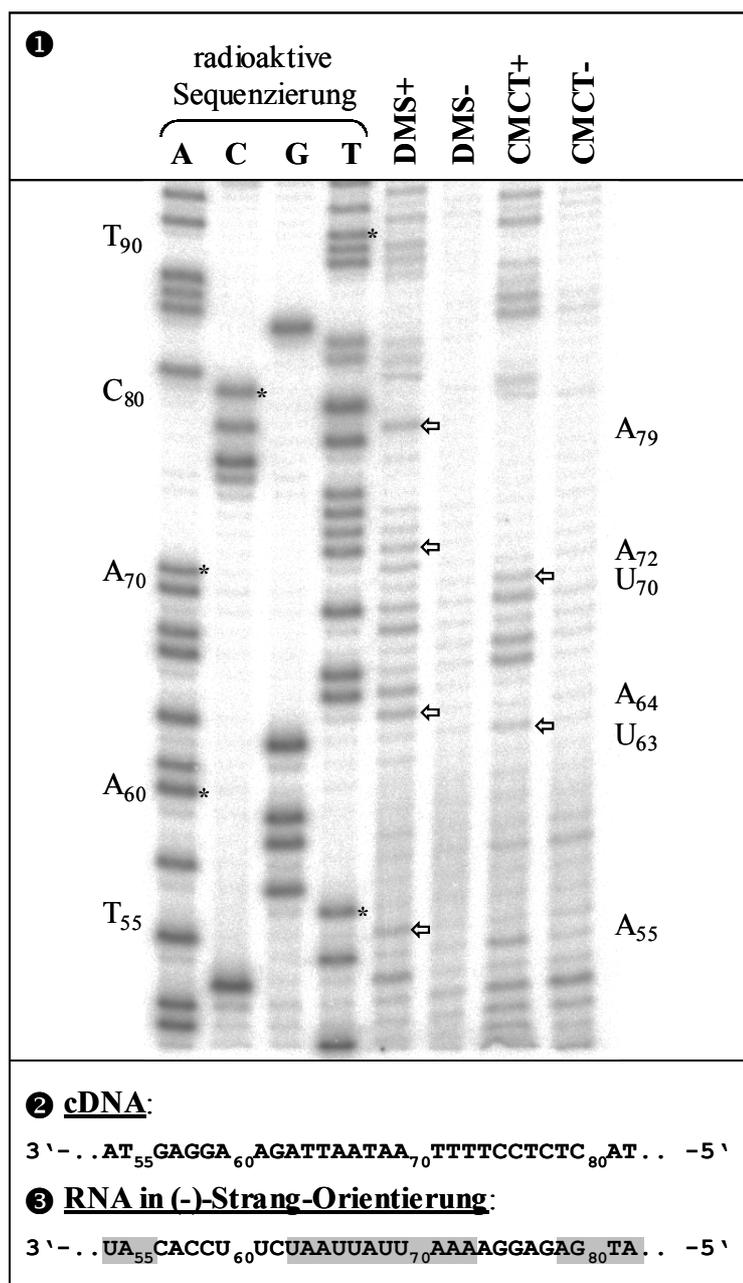


Abbildung 11: Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an *in vitro* transkribierter Mini-genom-RNA in (-)-Strang-Orientierung. Für die cDNA-Synthese im Primer-Extension-Assay (rechts) und die radioaktive Sequenzierung an denaturierter 3E-5E-Plasmid-DNA (links) wurde der 5'-[³²P]-markierte Primer #671 verwendet. Die Negativkontrollen sind jeweils mit – gekennzeichnet (DMS- und CMCT-). Die Sterne (*) markieren die zu den links aufgeführten Nukleotiden

zugehörigen Abbruchbanden der radioaktiven Sequenzierung. Die Pfeile (\Leftrightarrow) zeigen die zu den rechts bezeichneten Nucleotiden zugehörigen Banden des Primer-Extension-Assays an. Die Beschriftung der Sequenzierung bezieht sich auf die entstandene cDNA, ist also komplementär zur Sequenz der RNA in (-)-Strang-Orientierung (siehe auch 2). Die Beschriftung der modifizierten Nucleotide im Primer-Extension-Assay bezieht sich auf die (-)RNA. Die jeweiligen Zahlen an den Nucleotiden beziehen sich auf die 3'-Leader-Region der negativ-strängigen RNA. 3 Stellt die modifizierten Nucleotide am TKS (grau hinterlegt) zusammenfassend dar. Abbruchbanden in den Negativkontrollen resultierten wahrscheinlich aus cDNA-Synthese an kurzen RNA-Fragmenten, welche durch geringe RNase-Kontaminationen entstanden.

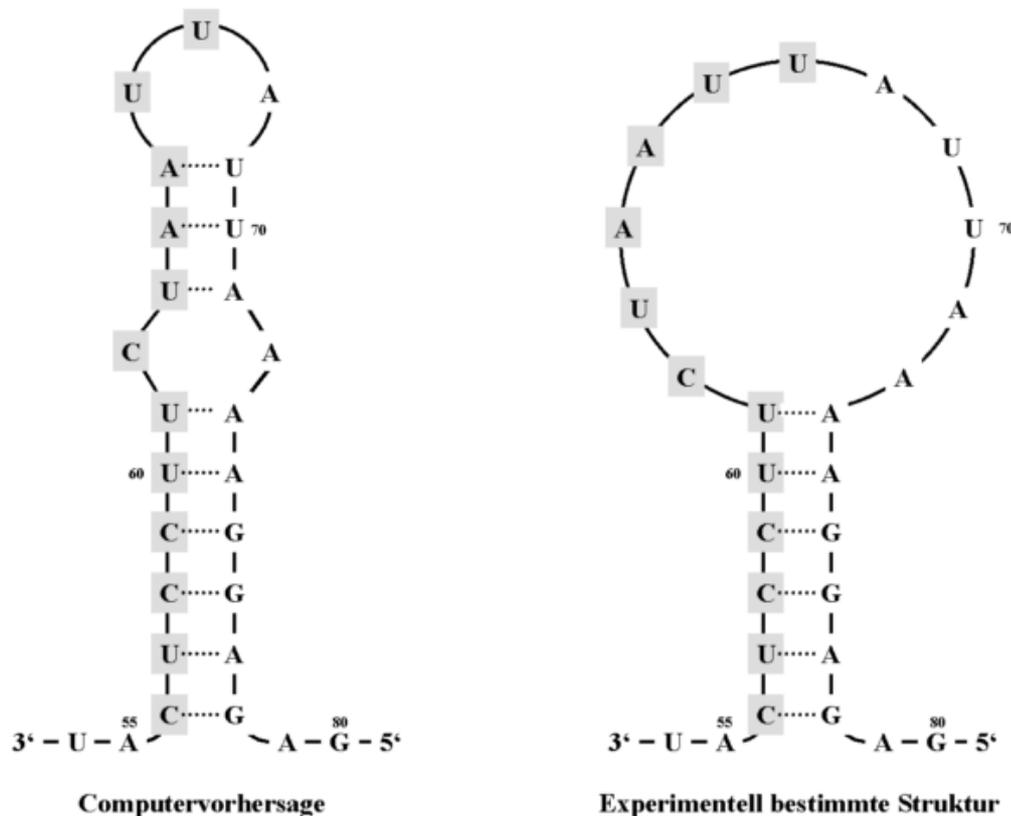


Abbildung 12: Darstellung der experimentell ermittelten Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens in RNA negativer Polarität. Die kleinen Zahlen an den Nucleotiden beziehen sich auf die 3'-Leader-Region der negativsträngigen RNA. Nucleotide, welche zur Sequenz des TKS des ersten Gens gehören, sind grau unterlegt.

4.2.3 Analyse der RNA-Sekundärstrukturbildung in der Transkriptionsstart-Region in einer NP-mRNA ähnlichen RNA

Nachdem die vorangegangenen Versuche gezeigt hatten, daß sich eine stabile RNA-Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens besonders gut in RNA in (+)-Strang-Orientierung ausbildet, sollten Folgeexperimente nun zeigen, ob sich diese auch in der mRNA ausbilden würde. Der mRNA fehlen im Vergleich zum ebenfalls positivsträngigen Miniantigenom die Nucleotide 1-55 der EBOV-spezifischen Leader-Sequenz in (+)-Strang-Orientierung, da die Transkription der mRNA erst an der TKS der genomischen RNA beginnt (Nucleotid 56). Um genug

RNA für die chemische Modifikation zur Verfügung zu haben, wurde ein Minigenom kloniert, von welchem durch Run-off-Transkription eine mRNA-ähnliche RNA mit folgenden Charakteristika transkribiert werden konnte:

- 1.) positivsträngig
- 2.) 5'-Ende beginnt am TKS

4.2.3.a) Klonierung des Konstrukts mRNA-DI

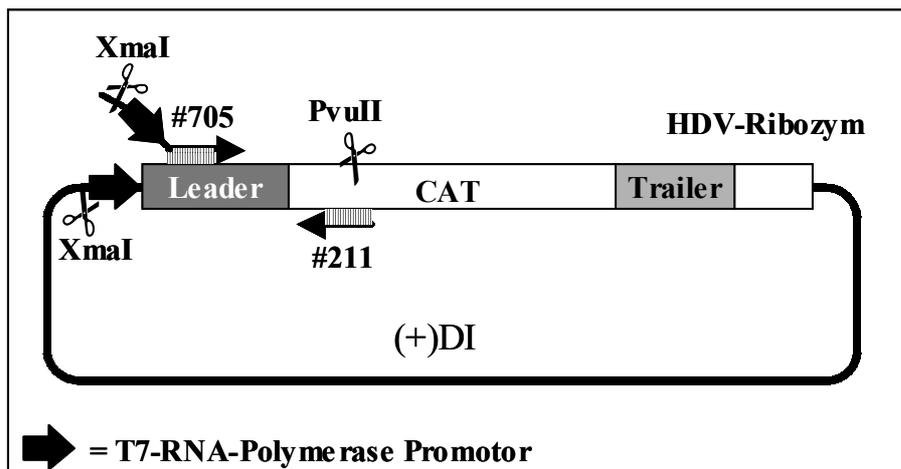


Abbildung 13: Klonierungsstrategie des Minigenoms mRNA-DI

Die Primer #211 und #705 wurden zusammen mit dem Plasmid (+)DI in einer PCR-Reaktion (3.3.1) eingesetzt. Während der Primer #211 im Bereich der PvuII-Schnittstelle im CAT-Gen bindet, bindet der Primer #705 an die Nukleotide 56-97 der Leader-Sequenz des EBOV. Zwischen den EBOV-spezifischen Nukleotiden und einer XmaI-Schnittstelle am 5'-Ende enthält der Primer #705 die gesamte Sequenz des T7-RNA-Polymerase-Promotors. Aus dieser PCR ging ein 576bp großes DNA-Fragment hervor, welches die EBOV-spezifische Sequenz ab dem TKS direkt hinter dem T7-RNA-Polymerase-Promotor enthielt. Nach Verdau mit XmaI / PvuII (3.4.3.b) und anschließender Gelreinigung (3.1.5) wurde das Fragment in das XmaI / PvuII-verdaute (3.4.3.b) und CIP-behandelte (3.4.4) (+)DI-Minigenom einligiert (3.4.5) und auf diese Weise das Konstrukt „mRNA-DI“ erhalten. Bei Transkription des entstandenen Konstrukts wurde eine RNA in (+)-Strang-Orientierung synthetisiert, deren 5'-Ende aus der TKS-Region des ersten Gens bestand.

4.2.3.b) Chemische Modifikation *in vitro* transkribierter mRNA-DI-RNA

Nachdem nun eine mRNA-ähnliche RNA *in vitro* transkribiert werden konnte und damit in ausreichender Menge zur Verfügung stand, wurde die Sekundärstrukturbildung am TKS in dieser RNA untersucht. 5µg mRNA-DI Plasmid-DNA wurden mit Sall linearisiert (3.4.3.b) und als Vorlage für eine Run-off-Transkription (3.7) verwendet. Die daraus resultierende mRNA-ähnliche RNA wurde dann einer Sekundärstrukturanalyse mittels chemischer Modifikation unterzogen (3.10.3, 3.10.4). Auf der folgenden Seite ist in Abbildung 14 das Autoradiogramm des Gels nach dem Versuch dargestellt.

Der Versuch zeigte, daß sich die erwartete Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens in einer mRNA-ähnlichen RNA ausbilden kann, obgleich diese direkt am 5'-Ende dieser RNA lokalisiert ist. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich in einer RNA, deren 5'-Ende der mRNA des NP-Gens ähnelt, die in Abbildung 10 dargestellte Sekundärstruktur ausbilden kann.

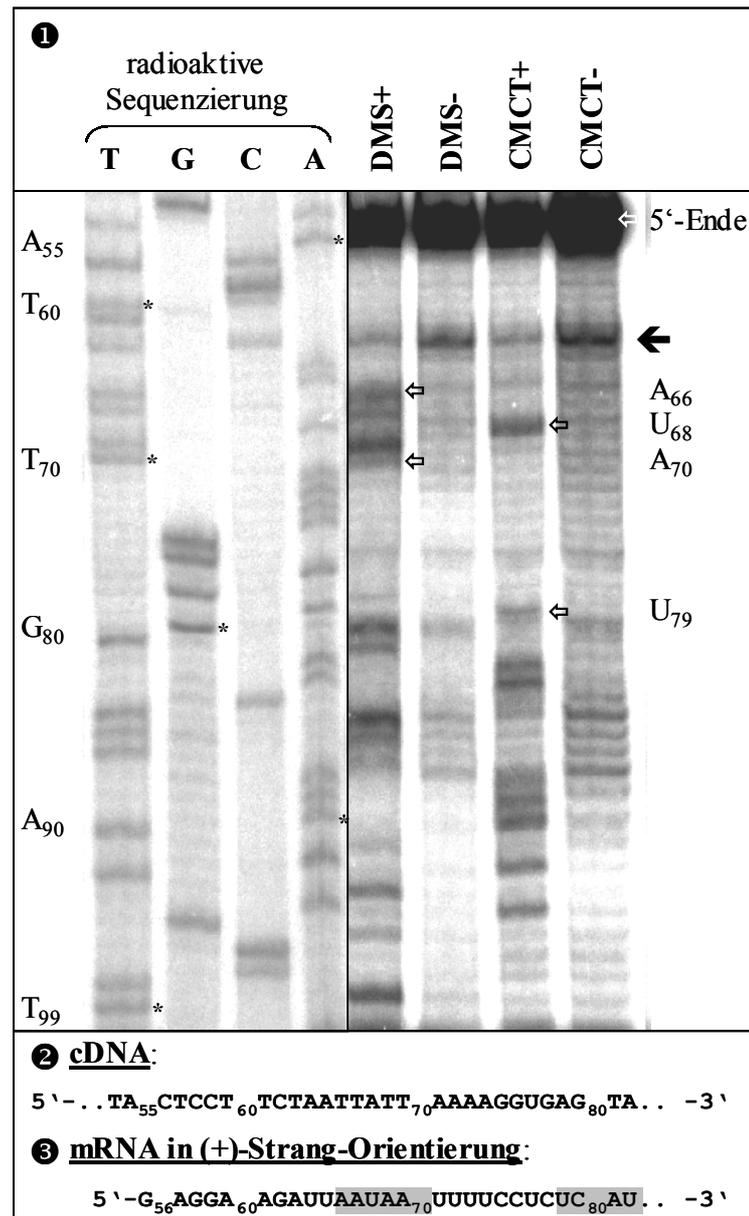


Abbildung 14:

Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an *in vitro* transkribierter RNA des mRNA-DI. Für die cDNA-Synthese im Primer-Extension-Assay (rechts) und die radioaktive Sequenzierung (links) wurde der 5'-[³²P]-markierte Primer #429 verwendet. Die Negativkontrollen sind jeweils mit – gekennzeichnet (DMS- und CMCT-). Die Sterne (*) markieren die zu den links aufgeführten Nucleotiden zugehörigen Banden der radioaktiven Sequenzierung. Die Beschriftung der Sequenzierung bezieht sich auf die entstandene cDNA, ist also komplementär zur Sequenz der verwendeten RNA (siehe auch 2). Die Pfeile (⇐) zeigen die zu den rechts bezeichneten Nucleotiden zugehörigen Banden des Primer-Extension-Assay an. Die Beschriftung der modifizierten Nucleotide im Primer-Extension-Assay bezieht sich auf die (+)mRNA. Die Numerierung der Nucleotide bezieht sich auf die EBOV-spezifische Sequenz des Leaders in (+)-Strang-Orientierung. Abbruchbanden in den Negativkontrollen (z.B.: ←) resultierten wahrscheinlich aus cDNA-Synthese an kurzen RNA-Fragmenten, welche durch RNase-Kontaminationen entstanden. 3 stellt die modifizierten Nucleotide (grau hinterlegt) zusammenfassend dar.

4.2.4 Auswirkungen von Mutationen in der Transkriptionsstart-Region auf die Effizienz der Transkription

Nachdem gezeigt worden war, daß sich eine RNA-Sekundärstruktur in der TKS-Region des ersten Gens ausbilden kann, sollten Folgeexperimente die Relevanz dieser Sekundärstruktur für die Transkriptionseffizienz des darauf folgenden Gens klären. Dazu wurde zunächst eine Punktmutation in der Stammregion der Sekundärstruktur an Position 76 eingebracht. Sinn dieser Mutation war es, die Sekundärstruktur zu ändern ohne sie völlig zu zerstören oder die Nukleotidsequenz des TKS (Nukleotide 56-67) zu mutieren. Um diese Mutante zu klonieren, wurde eine Quickchange Mutagenese PCR durchgeführt (3.4.6), bei welcher das Plasmid 3E-5E als Vorlage diente. Es war geplant die Mutation über das Primerpaar #414 / #415 an Position 76 einzuführen. Aufgrund eines Synthesefehlers bei der Primerherstellung wurden zusätzlich zur gewünschten Mutation an Position 76 noch weitere Mutationen, u.a. auch an Position 64 in die Nukleotidsequenz des TKS, eingebracht. Folgende Mutanten wurden bei dieser Mutagenese-PCR erhalten (der TKS des NP-Gens ist unterstrichen, Mutationen der Originalsequenz sind grau und fett hervorgehoben):

3E-5E: 3' - .UGAUA₅₅CUCCUUCUAAUUAUU₇₀AAAAGGAGAG₈₀UAACU₈₅UUAAA₉₀TAUAG. -5'
 Leadmut #2: 3' - .UGAUA₅₅CUCCUUCUUAUUAUU₇₀AAAAGUAGAG₈₀UAACU₈₅UUAAA₉₀TAUAG. -5'
 Leadmut #3: 3' - .UGAUA₅₅CUCCUUCUAAUUAUU₇₀AAAAGUUAG₈₀UAACU₈₅UUAAA₉₀TAUAG. -5'
 Leadmut #4: 3' - .UGAUA₅₅CUCCUUCUAAUUAUU₇₀AUUAGUAGAG₈₀UAACU₈₅UUAAA₉₀TAUAG. -5'
 Leadmut #5: 3' - .UGAUA₅₅CUCCUUCUAAUUAUU₇₀AAAUGUAGAG₈₀UAACU₈₅UUAAA₉₀TAAAG. -5'

Je 5µg Plasmid-DNA der Mutanten Leadmut #2, #3, #4 und #5 wurden mit Sall linearisiert (3.4.3.b) und als Vorlagen für Run-off-Transkriptionen (3.7) verwendet. Die daraus resultierenden RNAs wurden in MVA-T7-infizierte (3.12.3) HeLa-Zellen transfiziert (3.11), welche mit pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO} und pTM1/VP30_{EBO} transfiziert worden waren (3.6.1). Die (+)L-Ansätze enthielten zusätzlich noch 1µg pTM1/L_{EBO} pro Vertiefung. 2 Tage nach der RNA-Transfektion wurden die Zellen lysiert und die CAT-Aktivität im Lysat mittels CAT-Assay (3.13.1) nachgewiesen. Abbildung 15 zeigt ein Autoradiogramm des Dünnschicht-Chromatogramms (DC) nach Exposition einer Bio-Imager-Platte.

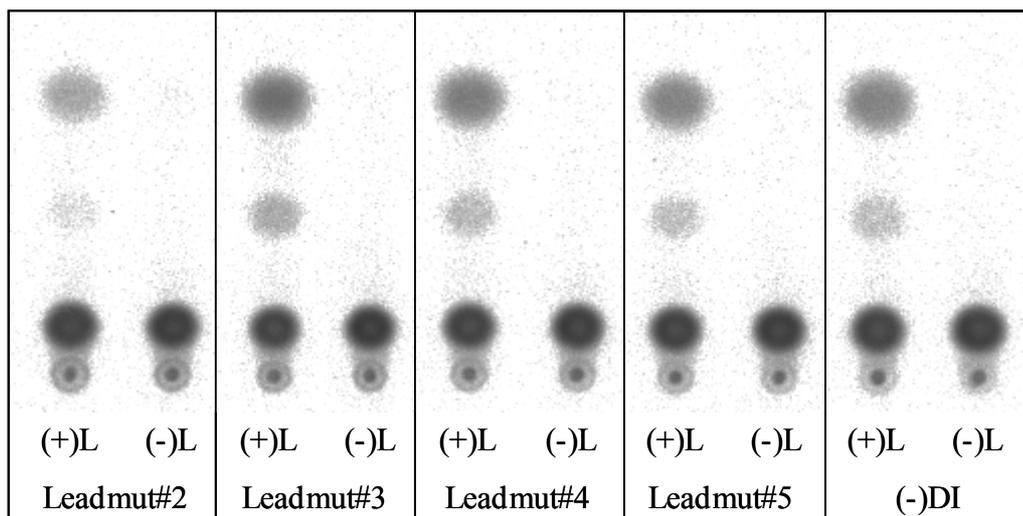


Abbildung 15: CAT-Assay der Mutanten Leadmut#2, #3, #4 und #5 im Vergleich zum Minigenom 3E-5E. Für jeden Ansatz wurden 1,5µl einer 1:10 Verdünnung des Zellysats eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Zellysats betrug 150µl. (-)L bezeichnet die jeweiligen Negativkontrollen, welche kein L-Protein enthielten. Nach dem DC-Lauf wurde eine Bio-Imager-Platte 30min lang exponiert und anschließend ausgewertet.

Ein Vergleich der umgesetzten Menge an [¹⁴C]-Chloramphenicol lieferte folgendes Diagramm (der Umsatz des Minigenoms 3E-5E ist auf 100% gesetzt):

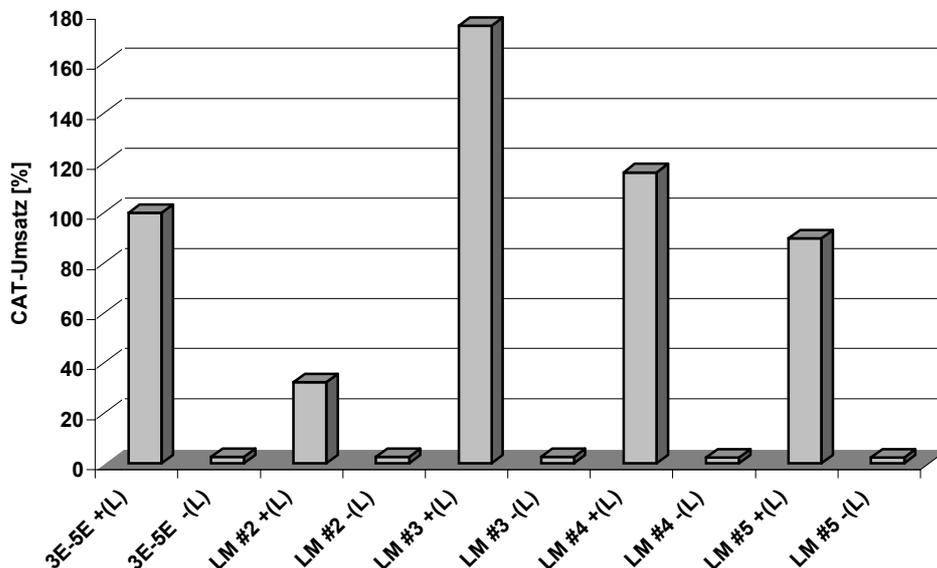


Diagramm 1: Quantifizierung des CAT-Assays der Mutanten Leadmut (LM) #2, #3, #4 und #5 im Vergleich zum Minigenom 3E-5E. Der Anteil an umgesetztem [¹⁴C]-Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09^e bestimmt und als prozentualer Umsatz ($[\text{Produkt}:(\text{Produkt}+\text{Edukt})]*100$) berechnet. Der daraus resultierende Wert für das Minigenom 3E-5E wurde auf 100% gesetzt und das Verhältnis der anderen Werte dazu gebildet.

Es konnte gezeigt werden, daß die Mutanten Leadmut #3, #4, #5, keine schlechtere Transkriptionseffizienz aufwiesen als das Minigenom 3E-5E. In einigen Fällen (Leadmut #3) war sogar eine deutlich erhöhte CAT-Aktivität im Zellysat nachweisbar. Die Mutante Leadmut #2, welche auch eine Mutation im Bereich der Nukleotidsequenz des TKS trägt, zeigte im Vergleich zum Minigenom 3E-5E eine deutlich geringere CAT-Aktivität. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß Punktmutationen in der Sekundärstruktur keine negative Auswirkung auf die Transkriptionseffizienz haben, solange sie nicht die Nukleotidsequenz des konservierten TKS betreffen. Punktmutationen in der konservierten Sequenz des TKS hingegen führen zu einem drastischen Rückgang der Transkriptionseffizienz.

4.2.5 Herstellung einer Mutante mit zerstörter Sekundärstruktur ohne Veränderungen am konservierten Transkriptionsstart

Um die Funktion der Sekundärstruktur am TKS des NP-Gens weiter zu untersuchen, wurde eine Mutante erzeugt, in der die Bildung der Sekundärstruktur verhindert werden sollte. Durch eine Quickchange Mutagenese PCR (3.4.6) mit dem Primerpaar #426 / #427 wurden in die Minigenome 3E-5E und (+)DI Mutationen an den Positionen 69, 71-73 und 75-77 (jeweils bezogen auf die EBOV-spezifische Leadersequenz in (-) oder (+)-Strang-Orientierung) eingebracht. Diese Mutationen veränderten nicht die Nukleotidsequenz des TKS, sollten jedoch die Bildung der Sekundärstruktur verhindern. Durch die eingeführten Mutationen wurde eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym NheI erzeugt. Die Mutanten wurden daher als (-)Leadmut-NheI und (+)Leadmut-NheI bezeichnet. Der Vergleich zwischen der Sequenz des Minigenoms 3E-5E und den Mutanten zeigt, welche Nukleotide geändert wurden (der konservierte TKS ist unterstrichen, Mutationen sind grau und fett hervorgehoben):

```

3E-5E          3' - . . UGAUA55CUCCU60UCUAAUU70AAAAGGAGAG80UAACU85 . . -5'
(-)Leadmut-NheI 3' - . . UGAUA55CUCCU60UCUAAUU70UGCAUCGGAG80UAACU85 . . -5'
(+)Leadmut-NheI 5' - . . ACUAU55GAGGA60AGAUAAU70ACGUAGCCUC80AUUGA85 . . -3'
    
```

4.2.6 Chemische Modifikation *in vitro* transkribierter (+)Leadmut-NheI RNA

Um zu überprüfen, ob die eingeführten Mutationen in dem Minigenom (+)Leadmut-NheI die Bildung der stabilen Sekundärstruktur verhindern würden, wurden RNA-Transkripte des Minigenoms (+)Leadmut-NheI in der chemischen Modifikation auf die Bildung der Sekundärstruktur hin untersucht.

5 µg Plasmid-DNA der Mutante (+)Leadmut-NheI wurden mit dem Enzym SalI linearisiert (3.4.3.b) und in der Run-off-Transkription (3.7) eingesetzt. Die positivsträngige (+)Leadmut-NheI-RNA wurde der chemischen Modifikation mit DMS und CMCT unterworfen (3.10.3, 3.10.4) und anschließend im Primer-Extension-Assay analysiert (3.9.6). Parallel zur radioaktiven Sequenzierung (3.2.3) am denaturierten (+)Leadmut-NheI-Plasmid und dem Primer-Extension-Assay wurde auf das gleiche Gel eine radioaktive Sequenzierung und ein Primer-Extension-Assay chemisch modifizierter (+)DI Minigenom-RNA als Vergleich aufgetragen. Abbildung 16 (auf der nächsten Seite) zeigt das Autoradiogramm des getrockneten Gels nach einer Expositionszeit von 14h.

Die Auswertung des Bandenmusters der Minigenom-RNA (+)DI zeigte unmodifizierte RNA-Bereiche zwischen den Nukleotid 56-65 und 71-78. Diese Bereiche waren vor einer Modifikation geschützt, lagen also gepaart vor (zum Vergleich siehe Abbildungen 9 und 10). Im korrespondierenden Bereich der (+)Leadmut-NheI-RNA dagegen liegen mehrere der Nukleotide in modifizierter Form vor. Das bedeutet, daß eine stabile Sekundärstruktur in diesem Bereich nicht ausgebildet werden konnte.

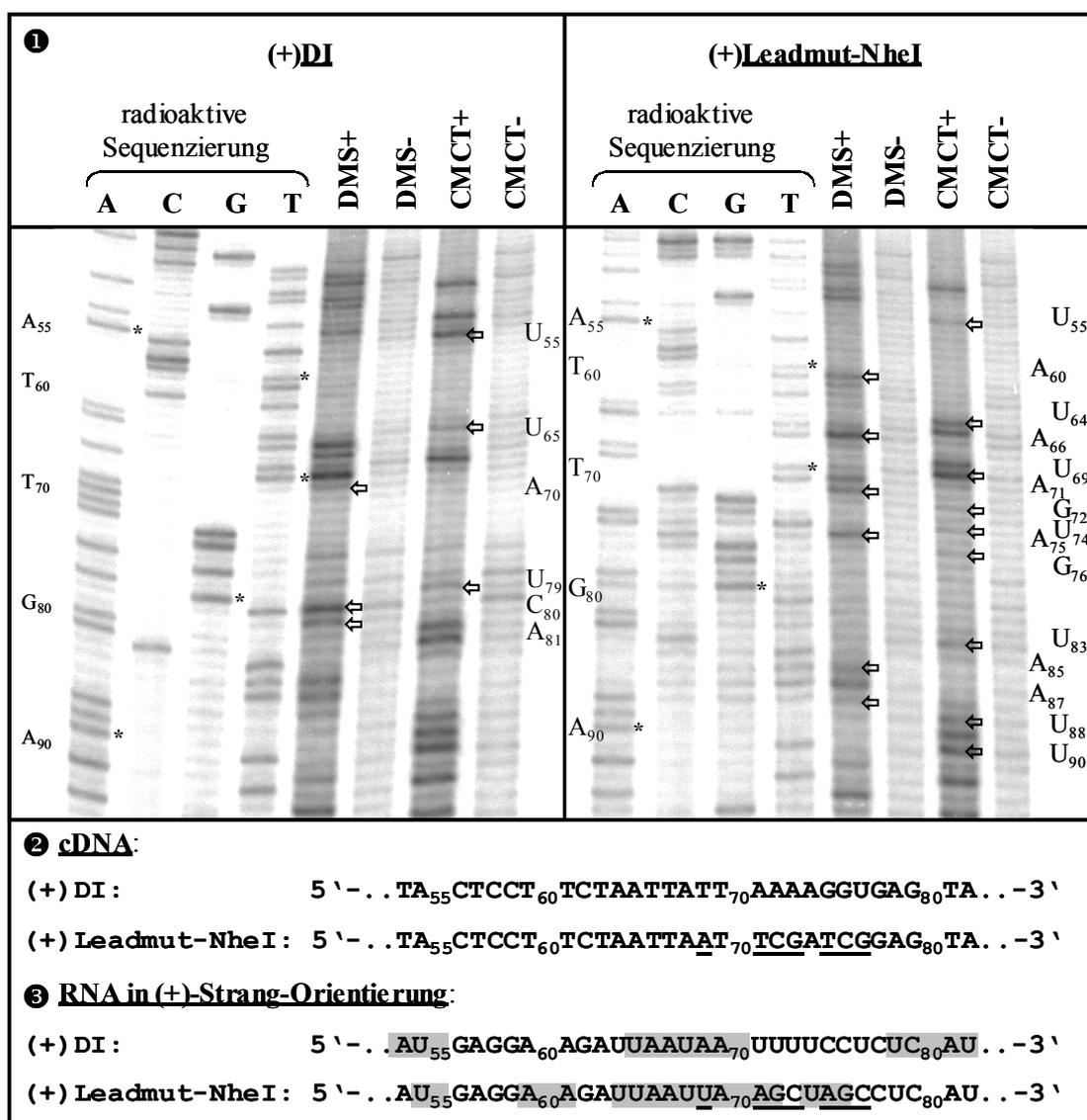


Abbildung 16: Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an *in vitro* transkribierter (+)Leadmut-NheI-RNA (① rechte Hälfte) im Vergleich zur chemischen Modifizierung an *in vitro* transkribierter (+)DI-RNA (① linke Hälfte). Für die radioaktive Sequenzierung (jeweils links) an den denaturierten Plasmiden und die cDNA-Synthese an der modifizierten RNA im Primer-Extension-Assay (jeweils rechts) wurde der 5'-[³²P]-markierte Primer #429 verwendet. Die Sterne (*) markieren die links indizierten Abbruchbanden der jeweiligen Sequenzierung. Die Beschriftung der Sequenzierung bezieht sich auf die entstandene cDNA, ist also komplementär zur Sequenz der verwendeten RNA (siehe auch ②). Die Pfeile (⇐) markieren die jeweils benannten Banden des Primer-Extension-Assays an modifizierter RNA. Die Beschriftung der modifizierten Nukleotide im Primer-Extension-Assay bezieht sich auf die (+)RNA. Die Numerierung der Nukleotide bezieht sich auf die EBOV-spezifische Sequenz des Leaders in (+)-Strang-Orientierung. Abbruchbanden in den Negativkontrollen (-DMS,-CMCT) rührten von cDNA-Synthese an kurzen RNA-Fragmenten her, welche durch geringfügige Verunreinigungen mit RNasen entstanden. In ② ist die Sequenz des (+)DI und (+)Leadmut-NheI am TKS dargestellt. Mutationen in der Mutante (+)Leadmut-NheI sind unterstrichen. ③ stellt die modifizierten Nukleotide (grau hinterlegt) in der TKS-Region des (+)DI und der (+)Leadmut-NheI-Mutante vergleichend dar.

4.2.7 Funktionsanalyse der Mutante (-)Leadmut-NheI in An- und Abwesenheit von VP30

Nachdem in 4.2.6 gezeigt werden konnte, daß die eingeführten Mutationen ausreichend waren, um die Bildung der stabilen Sekundärstruktur am TKS zu unterbinden, wurde untersucht, welche Auswirkungen die Zerstörung der Sekundärstruktur auf das Transkriptionsverhalten des mutierten Minigenoms haben.

Zu diesem Zweck wurden je 5µg Plasmid-DNA der Konstrukte 3E-5E und (-)Leadmut-NheI mit Sall linearisiert (3.4.3.b) und in der Run-off Transkription eingesetzt (3.7). Die *in vitro* transkribierten RNAs wurden nach photometrischer Kontrolle (3.9.1) auf eine Konzentration von 0,5^{µg}/µl eingestellt. Zwei 6er-Zellkulturplatten HeLa-Zellen mit einer Dichte von 60% wurden mit MVA-T7 infiziert (3.12.3) und mit pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO} und pTM1/L_{EBO} transfiziert (3.6.1). Folgende Plasmidkombinationen wurden hierbei eingesetzt:

NP/VP35/VP30/L	↳ (+)VP30/(+)L
NP/VP35/L	↳ (-)VP30/(+)L
NP/VP35/VP30	↳ (+)VP30/(-)L
NP/VP35	↳ (-)VP30/(-)L

3 Stunden nach der DNA-Transfektion wurden die Zellen mit je 4µg der vorbereiteten RNAs transfiziert (3.11) und anschließend bei einer Temperatur von 33°C inkubiert. 28h nach Transfektion wurden die Zellen in 150µl Lysispuffer lysiert, und die CAT-Aktivität im Zellysat wurde mittels [¹⁴C]-markiertem Chloramphenicol nachgewiesen (3.13.1). Abbildung 17 zeigt das Autoradiogramm des DC nach dreißigminütiger Exposition einer Bio-Imager-Platte.

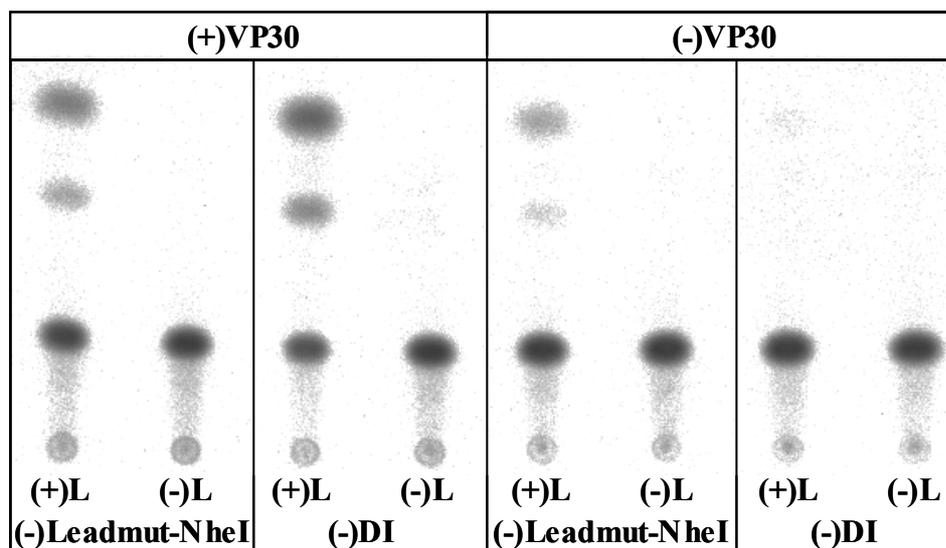


Abbildung 17: CAT-Assay der Mutante (+)Leadmut-NheI im Vergleich zum Minigenom 3E-5E in An- [(+)VP30] und Abwesenheit [(-)VP30] von VP30. Pro Ansatz wurde 1µl 1:10 verdünntes Zellysat eingesetzt. Den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen [(-)L] war nicht das Plasmid pTM1/L_{EBO} zugegeben worden.

Wie in Abbildung 17 zu ersehen ist, war bei Mutante (-)Leadmut-NheI im Unterschied zum Minigenom 3E-5E bei Abwesenheit von VP30 CAT-Expression nachweisbar. Das bedeutet, daß die Mutante (-)Leadmut-NheI in ihrer mRNA-Transkription nicht mehr auf die Anwesenheit des VP30 angewiesen ist.

4.2.8 mRNA-Nachweis der Mutante (-)Leadmut-NheI in An- und Abwesenheit von VP30

Um den beobachteten Effekt der VP30-unabhängigen Transkription der Mutante (-)Leadmut-NheI näher zu charakterisieren, wurde die mRNA direkt nachgewiesen. Zwei 6er-Zellkulturplatten mit HeLa-Zellen (Dichte der Zellen ca. 60%) wurden mit dem rekombinanten Vacciniavirus MVA-T7 infiziert (3.12.3) und nach dem gleichen Schema wie in 4.2.7 beschrieben mit den Plasmiden, welche für die EBOV-NC-Proteine kodieren, transfiziert. Zusätzlich zu diesen Plasmiden wurden hier jedem Transfektionsansatz 2µg der jeweiligen 3E-5E-, bzw. (-)Leadmut-NheI-Plasmid-DNA zugegeben. Für die Isolierung der mRNA wurden pro Ansatz je 2 Vertiefungen transfiziert. 30h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die mRNA isoliert (3.8.3). Die isolierten mRNAs wurden dann auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (3.9.2) und im Northern-Blot (3.9.3) auf eine positiv geladene Nylon-Membran übertragen. Nach UV-Fixierung und einer sechsständigen Prähybridisierung (3.9.4) der Membran wurden die geblotteten mRNAs mit der DIG-markierten (3.10.1) RNA-Sonde BS/-CAT (RNA des CAT-Gens in (-)-Strang-Orientierung) 12h lang hybridisiert

(3.9.4). Im Anschluß daran wurden die DIG-markierte RNA mit CDP-Star nachgewiesen (3.9.5). Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs.

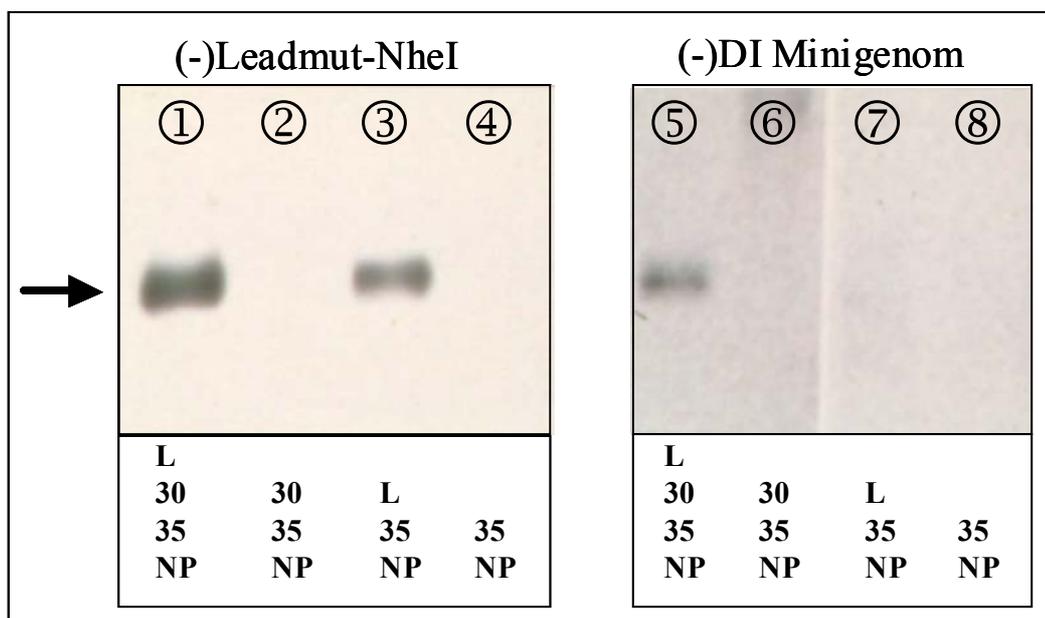


Abbildung 18: Northern-Blot-Analyse der mRNA von Mutante (-)Leadmut-NheI im Vergleich zum Minigenom 3E-5E in An- und Abwesenheit von VP30. Der Pfeil weist auf die Höhe der erwarteten RNA-Bande hin. In den Spuren 3, 4, 7 und 8 wurde das Plasmid pTM1/VP30_{EBO} nicht mittransfiziert. In den Negativkontrollen (Spuren 2, 4, 6 und 8) fehlte das Plasmid pTM1/L_{EBO}.

Die Ergebnisse der mRNA-Analyse bestätigten die vorangegangenen Resultate des CAT-Assays. Während in Anwesenheit von VP30 sowohl bei dem Minigenom 3E-5E als auch bei der Mutante (-)Leadmut-NheI deutliche mRNA-Banden nachweisbar war (Spur 1 und Spur 5 in Abbildung 18), war in Abwesenheit von VP30 nur noch bei der Mutante (-)Leadmut-NheI mRNA nachweisbar (Spur 3). Bei dem Minigenom 3E-5E war in Abwesenheit von VP30 keine Bande zu erkennen (Spur 7). Der Versuch bestätigte also die Ergebnisse aus 4.2.7: die Mutante (-)Leadmut-NheI ist auch in Abwesenheit von VP30 zur effizienten Transkription von mRNAs fähig.

4.3 UNTERSUCHUNGEN AM TRANSKRIPTIONSSTART IM BICISTRONISCHEN

MINIGENOM

Jedes der 7 Gene des EBOV ist von hochkonservierten TKS- und TKSt-Regionen flankiert. Laut Computervorhersage ist jede der TKS-Regionen an der Bildung einer stabilen RNA-Sekundärstruktur beteiligt. Um zu untersuchen, ob die Zerstörung der Sekundärstruktur des TKS des ersten Gens Auswirkungen auf die Transkription weiterer Gene hat, wurden Experimente mit einem bicistronischen Minigenom (BICI 436) durchgeführt. Der Aufbau des Minigenoms BICI 436 ist schematisch in Abbildung 19 wiedergegeben.

In dieses Minigenom, wurde zunächst die unter 4.2.5 beschriebene Mutation der Sekundärstruktur am TKS des NP-Gens eingeführt.

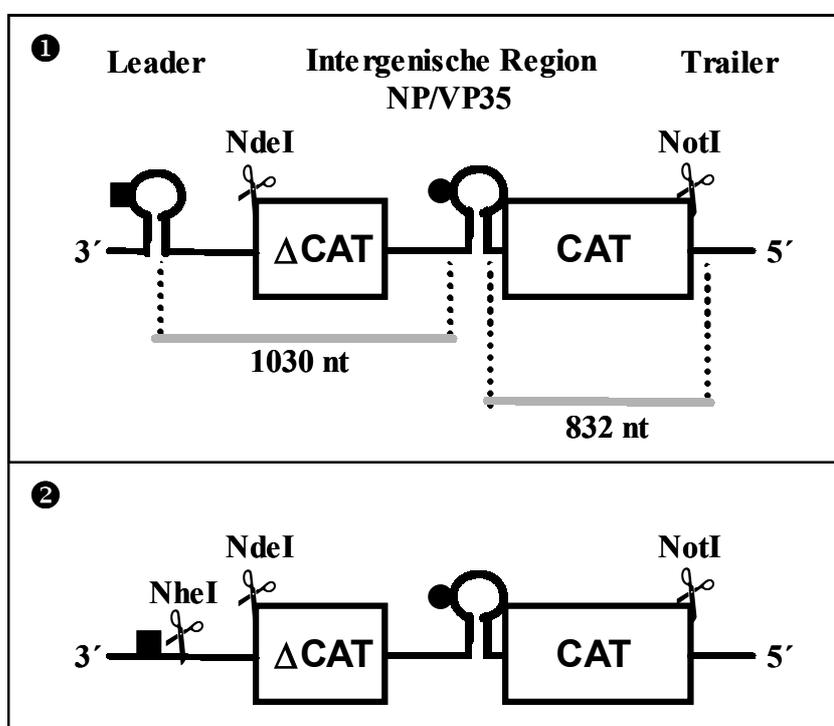


Abbildung 19: Aufbau des bicistronischen Minigenoms BICI 436 (❶) und der Mutante NheI-TK-BICI (❷) in (-)-Strang-Orientierung. Dem Leader folgt eine verkürzte Form des CAT-Gens (Δ CAT). Das Δ CAT wird von dem vollständigen CAT-Gen durch die intergenische Region zwischen dem NP- und dem VP35-Gen getrennt. Dem CAT-Gen schließt sich der Trailer des EBOV an. Das Quadrat (■) symbolisiert den TKS des NP-Gens, während der Kreis (●) den TKS des VP35-Gens darstellt. Die grauen Linien symbolisieren die jeweiligen mRNA-Transkripte. Die Zahlen geben die Länge der Transkripte an.

4.3.1 Klonierung der Mutante NheI-TK-BICI

Je 5 μ g Plasmid-DNA des Minigenoms BICI 436 wurden einem präparativen Verdau mit den Restriktionsenzymen NdeI und NotI unterzogen (3.4.3.b). Durch den Verdau wurde die [Δ CAT_IR NP/VP35_CAT]-Kassette aus dem BICI 436

ausgeschnitten (siehe Abbildung 19) und anschließend gelgereinigt (3.1.5). Das aufgereinigte Fragment wurde über die NotI und NdeI-Schnittstellen (siehe Abbildung 7) in das Minigenom (-)Leadmut-NheI einligiert (3.4.3-3.4.5) und so dessen CAT-Gen gegen die [Δ CAT_IR NP/VP35_CAT]-Kassette aus dem Plasmid BICI 436 ausgetauscht. Das entstandene Konstrukt wurde als NheI-TK-BICI bezeichnet und war nicht mehr dazu in der Lage, die Sekundärstruktur am ersten TKS auszubilden (siehe Abbildung 19).

4.3.2 mRNA-Nachweis der Mutante NheI-TK-BICI in An- und Abwesenheit von VP30

Das in 4.3.1 beschriebene Minigenom wurde nach der erfolgreichen Klonierung im EBOV-spezifischen Replikations-/Transkriptionssystem auf sein Transkriptionsverhalten hin untersucht. Hierzu wurden zwei 6er-Zellkulturplatten mit HeLa-Zellen (Zelldichte ca. 70%) mit dem MVA-T7 Virus infiziert (3.12.3) und anschließend mittels Lipofektin®-Transfektion mit den EBOV-NC-Protein-Plasmiden und der Mutante NheI-TK-BICI transfiziert (3.6.1). Den Transfektionsansätzen „-VP30“ wurde das Plasmid pTM1/VP30_{EBO} nicht zugegeben, während in den Negativkontrollen (-L) das Plasmid pTM1/L_{EBO} fehlte. Für die Isolierung der mRNA wurden pro Ansatz je 2 Vertiefungen infiziert und transfiziert. 30 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die mRNA isoliert (3.8.3). Die mRNAs wurden auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (3.9.2), auf eine positiv geladene Nylon-Membran geblottet (3.9.3) und nach UV-Fixierung 6h lang prähybridisiert (3.9.4). Anschließend wurde der Blot einer zwölfstündigen Hybridisierung (3.9.4) mit der DIG-markierten (3.10.1) RNA-Sonde BS/-CAT unterzogen. Abbildung 20 zeigt ein Bild des Blots nach Detektion der DIG-markierten RNA mit CDP-Star (3.9.5).

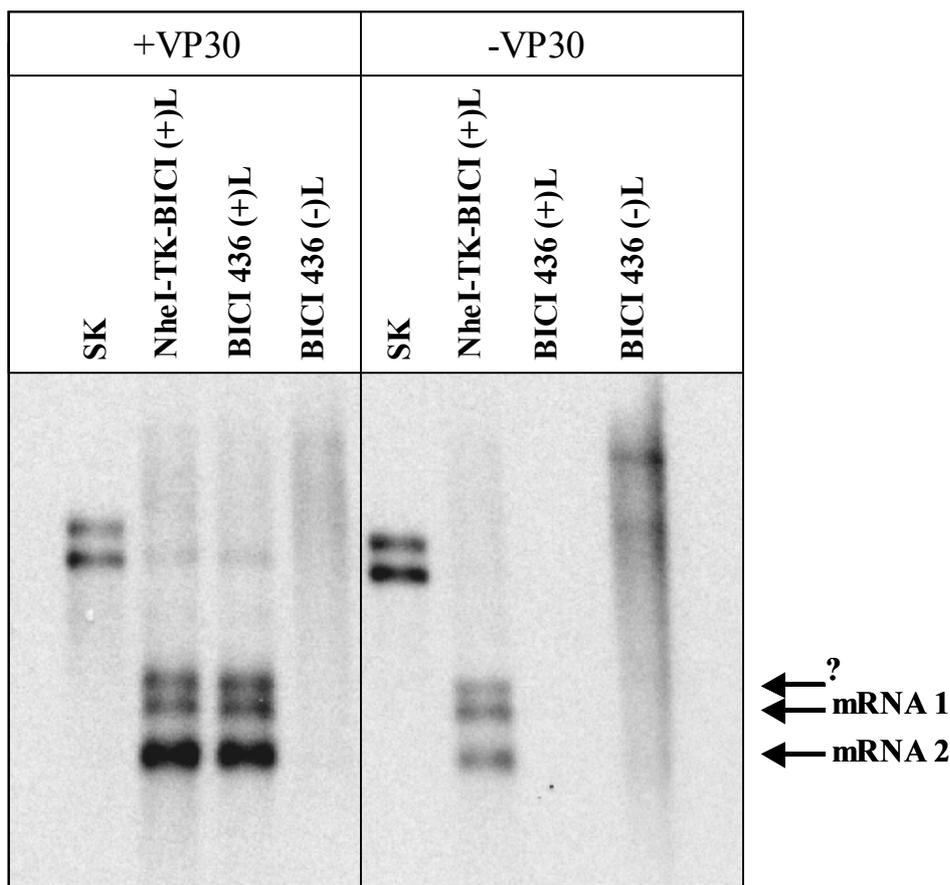


Abbildung 20: Northern-Blot-Analyse der mRNA von Mutante NheI-TK-BICI im Vergleich zum Minigenom BICI 436 in An- und Abwesenheit von VP30. Als Kontrolle der Sondenerkennung wurde auf das Gel parallel 1µl *in vitro* transkribierte RNA des Plasmids (+)DI in einer Verdünnung von 1:10⁴ aufgetragen (SK). Die Pfeile mit den Beschriftungen mRNA1, bzw. mRNA2 verweisen auf die Position der korrespondierenden mRNA-Banden. Das Fragezeichen (?) markiert eine Bande unklarer Herkunft, es handelt sich jedoch nicht um eine „read-through“-RNA aus mRNA1 und mRNA2.

In Anwesenheit von VP30 wurden sowohl von dem Minigenom BICI 436 als auch von der Mutante NheI-TK-BICI beide mRNAs transkribiert. In Abwesenheit von VP30 waren in den Zellysaten des Minigenoms BICI 436 keine der beiden mRNAs mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu war die Mutante NheI-TK-BICI auch in Abwesenheit von VP30 in der Lage beide mRNAs zu transkribieren. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß der Transkriptionskomplex VP30-unabhängig am mutierten TKS des ersten Gens die Transkription initiieren konnte. Nach dieser Initiation war für die anschließende Transkription des zweiten Gens kein VP30 mehr nötig, obwohl die Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gens intakt war.

4.3.3 Klonierung des Minigenoms NheI-TK-BICI/NPss@IRNP-VP35

Da die vorhergesagte Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gens keinen hemmenden Einfluß auf die Transkription der mRNA in Abwesenheit von VP30

ausübte, lag die Vermutung nahe, daß ausschließlich die Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens für die Abhängigkeit der viralen Transkription von VP30 verantwortlich ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ausgehend von der Mutante NheI-TK-BICI ein bicistronisches Minigenom kloniert, bei welchem die Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gens gegen die Sekundärstruktur des NP-TKS ausgetauscht wurde (siehe auch Abbildung 24, unterer Teil). Zunächst wurde mit dem Minigenom NheI-TK-BICI eine Quickchange Mutagenese PCR durchgeführt (3.4.6). Mit dem Primerpaar #578 / #579 wurde eine XhoI-Schnittstelle 5' (in (-)-Strang-Orientierung) der TKS-Stelle des VP35-Gens erzeugt. Die erzeugte Mutante, NheI-TK-BICI/XhoI.1 wurde für eine zweite Quickchange Mutagenese PCR (3.4.6) mit dem Primerpaar #580 / #581 eingesetzt. Dieses Primerpaar erzeugte eine XhoI-Schnittstelle 3' (in (-)-Strang-Orientierung) der TKS-Stelle des VP35-Gens. Aus der so entstandenen Mutante NheI-TK-BICI/XhoI.1_2 wurde durch Verdau mit XhoI (3.4.3.b) die TKS-Stelle des VP35-Gens herausgeschnitten und durch das hybridisierte Primerpaar #586 / #587 ersetzt (3.4.7). Durch dieses DNA-Fragment wurden zwischen den XhoI-Stellen folgende Mutationen (grau hinterlegt) in die Mutante NheI-TK-BICI/NPss@IRNP-VP35 eingebracht:

Transkriptionsstopp_NP TKS-VP35

NheI-TK-BICI:

3' - . . UAUUAAUUCUUUUUUUGAUUACUACUUCUAAUUUUGGAAGUAGG . . -5'

NheI-TK-BICI/NPss@IRNP-VP35:

3' - . . UAUUAAUUCUUUUUUUGAUUACUCCUUCUAAUUAUUAAAAGGAGG . . -5'

Die mutierte Region entspricht der TKS-Region des NP-Gens.

4.3.4 Untersuchung der Sekundärstruktur am Transkriptionsstart des zweiten Gens der Mutanten NheI-TK-BICI/ NPss@IRNP-VP35 und NheI-TK-BICI/XhoI.1 2

Um zu überprüfen, ob sich die erwünschte NP-Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gens bilden würde, wurden *in vitro* transkribierte RNAs der Mutanten NheI-TK-BICI/ NPss@IRNP-VP35 und NheI-TK-BICI/XhoI.1_2 der chemischen Modifikation mit DMS und CMCT unterzogen (3.10.3, 3.10.4). Die Länge der transkribierten RNA und die Lage der Sekundärstruktur in der Mitte dieser RNA stellen ein erhebliches Problem dar. Starke Abbaubanden in den Negativkontrollen der DMS- und CMCT-Ansätzen machten eine Auswertung der

Versuche unmöglich. Um die Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gens dennoch darstellen zu können, mußten Mutanten kloniert werden, in denen die Sekundärstrukturen in kürzeren RNA-Transkripten modifiziert werden konnten.

4.3.4.a.) Klonierung der Mutanten sIR_NPss und sIR_XhoI.1_2

Um die Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gens an kurzen RNA-Transkripten untersuchen zu können, wurden die Mutanten NheI-TK-BICI/NPss@IRNP-VP35 und NheI-TK-BICI/XhoI.1_2 einem präparativen Verdau mit dem Enzym HindIII unterzogen (3.4.3.b) (siehe Abbildung 21).

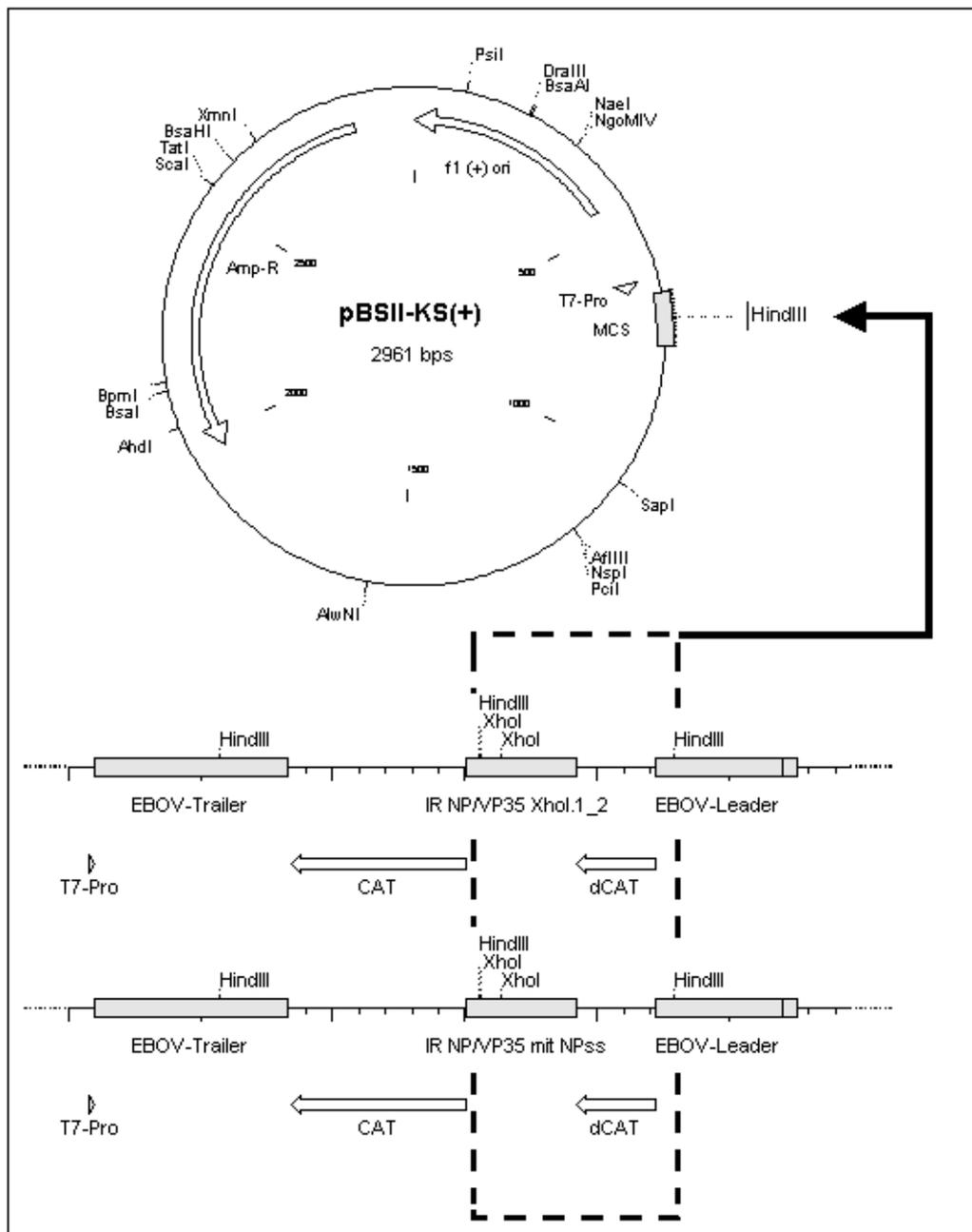


Abbildung 21: Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Mutanten sIR_NPss und sIR_XhoI.1_2

Das ausgeschnittene Fragment (umrahmter Bereich in Abbildung 21), wurde gelgereinigt (3.1.5) und mit dem HindIII-verdauten und CIP-behandelten Vektor pBlueskriptII KS(+)ligiert (3.4.3.b-3.4.5). Die dabei entstandenen Klone wurden (-)sIR_NPss (mit dem Fragment aus der Mutante NheI-TK- BICI/ NPss@IRNP-VP35) und (-)sIR_XhoI.1_2 (mit dem Fragment aus der Mutante NheI-TK-BICI/XhoI.1_2) benannt.

4.3.4.b.) Chemische Modifikation *in vitro* transkribierter RNAs der Mutanten

(-)sIR_NPss und (-)sIR_XhoI.1_2

Nachdem die verkürzten Mutanten kloniert worden waren, war es nun möglich die Sekundärstrukturen an der TKS-Region der beiden Konstrukte NheI-TK-BICI/NPss@IRNP-VP35 und NheI-TK-BICI/XhoI.1_2 vergleichend zu untersuchen. Dazu wurden je 5µg der Plasmid-DNA (-)sIR_NPss und (-)sIR_XhoI.1_2 mit dem Enzym AccI linearisiert (3.4.3.b) und nach Aufreinigung als Matrize für die Run-off-Transkription (3.7) verwendet. Die transkribierten RNAs wurden der chemischen Modifikation mit DMS und CMCT unterworfen (3.10.3, 3.10.4) und im Primer-Extension-Assay analysiert (3.9.6). Ein Autoradiogramm des Gels nach 29stündiger Exposition einer Bio-Imager-Platte ist in Abbildung 22 dargestellt.

Mit Hilfe der Daten aus den chemischen Modifikationen konnten die in Abbildung 23 gezeigten Sekundärstrukturen für die TKS beider Mutanten (Abbildung 23) abgeleitet werden. Die experimentell ermittelte Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gens (Mutante (-)sIR_XhoI.1_2) entsprach der vom Computer vorhergesagten Sekundärstruktur für den TKS des VP35-Gens (siehe Abbildung 3 zum Vergleich). Im Vergleich zueinander unterschieden sich die experimentell ermittelten Sekundärstrukturen am TKS des zweiten Gens in den Mutanten (-)sIR_NPss und (-)sIR_XhoI.1_2 deutlich. Die Sekundärstruktur, an deren Bildung die TKS-Region des zweiten Gens beteidigt ist, besteht in der Mutante (-)sIR_XhoI.1_2 aus einer 20 Nukleotide umfassenden Stammregion und einer „Loop“-Region aus 8 Nukleotiden. In der Mutante (-)sIR_NPss bildete sich wie erwartet die Sekundärstruktur aus, die auch am TKS des ersten Gens in negativsträngiger RNA zu finden war (zum Vergleich siehe Abbildung 12). In den folgenden Abschnitten wird diese Sekundärstruktur als „NP-Sekundärstruktur“ benannt.

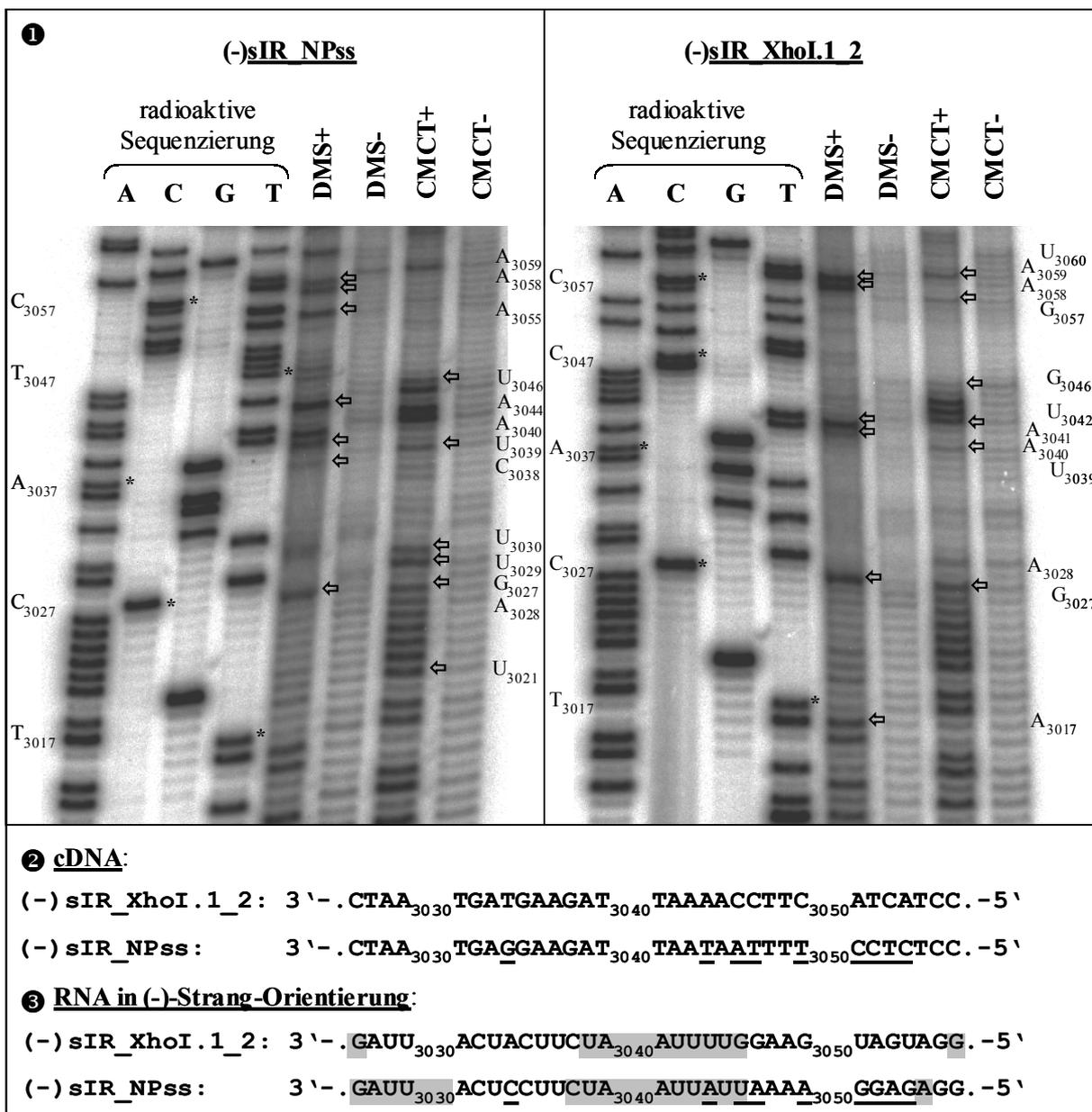


Abbildung 22: Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an *in vitro* transkribierter (-)sIR_XhoI.1_2-RNA (① rechte Hälfte) im Vergleich zur chemischen Modifizierung an *in vitro* transkribierter (-)sIR_NPss-RNA (① linke Hälfte). Für die radioaktive Sequenzierung (jeweils links) an den denaturierten Plasmiden und die Primer-Extension-Assays an der modifizierten RNA (jeweils rechts) wurde der 5'-[³²P]-markierte Primer #748 verwendet. Die Sterne (*) markieren die links indizierten Abbruchbanden der jeweiligen Sequenzierung. Die Benennung der Nucleotide in der Sequenzierung bezieht sich auf die entstandene cDNA, ist also komplementär zur Sequenz der verwendeten RNA (siehe auch ②). Die Pfeile (⇐) markieren die jeweils modifizierten Nucleotide in der RNA nach Detektion im Primer-Extension-Assay. Die Beschriftung der modifizierten Nucleotide bezieht sich auf die (-)RNA. Die Zahlen an den Nucleotiden beziehen sich auf die Sequenz des EBOV-Genoms. Abbruchbanden in den Negativkontrollen (-DMS, -CMCT) rührten von cDNA-Synthese an kurzen RNA-Fragmenten her, welche durch Kontaminationen mit RNasen entstanden. In ② ist die Sequenzierung der Mutanten (-)sIR_XhoI.1_2 und (-)sIR_NPss im Bereich der TKS des zweiten Gens dargestellt. Mutationen in dem Konstrukt (-)sIR_NPss im Vergleich zu (-)sIR_XhoI.1_2 sind unterstrichen. ③ stellt die modifizierten Nucleotide (grau hinterlegt) in der zweiten TKS-Region beider Mutanten zusammenfassend dar.

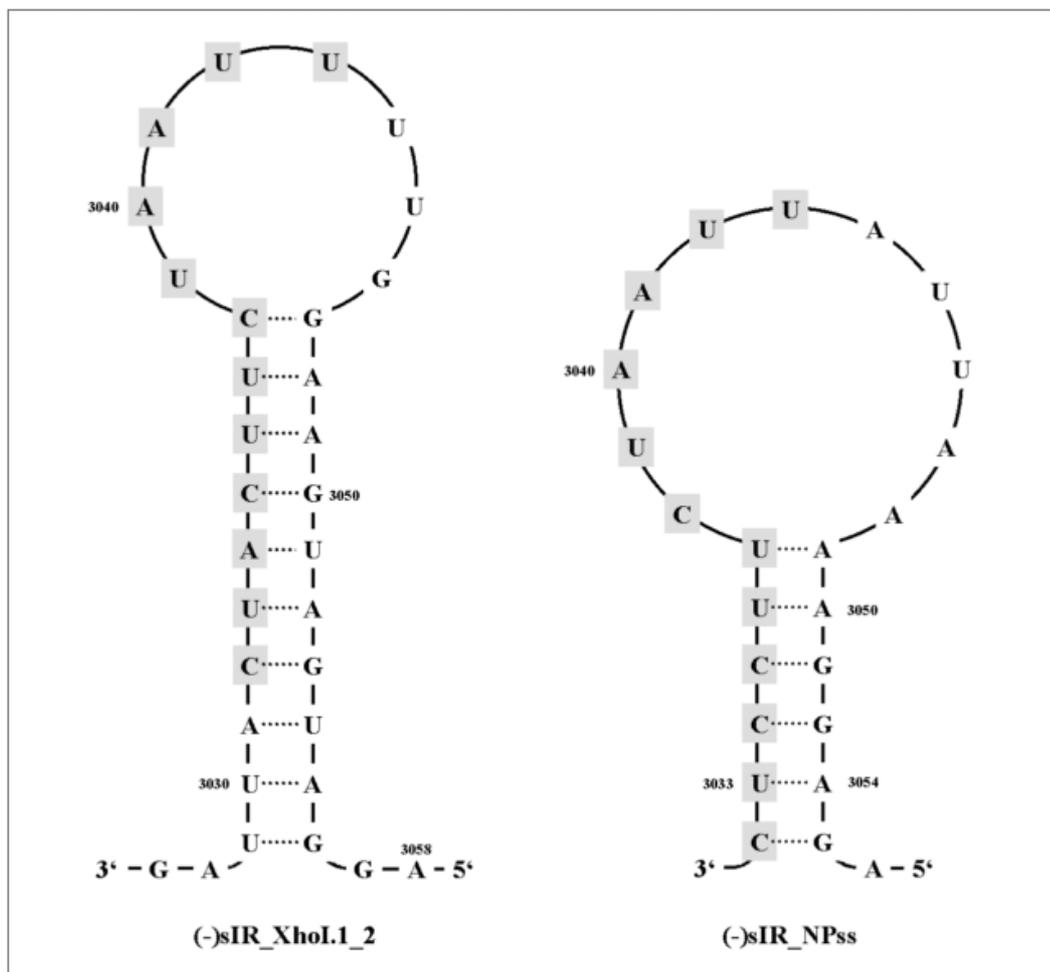


Abbildung 23: Darstellung der experimentell ermittelten Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gens in den Mutanten (-)sIR_XhoI.1_2 (links) und (-)sIR_NPss (rechts). Die Nummerierung der Nucleotide bezieht sich auf die Sequenz des EBOV-Genoms. Nucleotide, welche zur Sequenz des TKS des zweiten Gens gehören, sind grau unterlegt.

4.3.5 mRNA-Nachweis der Mutante NheI-TK-BICI/ NPss@IRNP-VP35 in

An- und Abwesenheit von VP30

Nachdem durch die chemische Modifikation bestätigt worden war, daß sich in der Mutante NheI-TK-BICI/ NPss@IRNP-VP35 die NP-Sekundärstruktur im Bereich der TKS-Region des zweiten Gens ausbilden konnte, wurde das Transkriptionsverhalten dieser Mutante in An- und Abwesenheit von VP30 überprüft. HeLa-Zellen mit einer Dichte von 60% wurden mit rekombinantem MVA-T7-Virus infiziert (3.12.3) und mit den Plasmiden pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO} und pTM1/L_{EBO} transfiziert (3.6.1). Zusätzlich wurde den Transfektionsansätzen je 2µg Plasmid-DNA eines bicistronischen Minigenoms zugegeben. Folgende Plasmidkombinationen wurden eingesetzt: NP/VP35/VP30/L+BICI436, NP/VP35/L+BICI436, NP/VP35/VP30/L+NheI-TK-

BICI, NP/VP35/L+NheI-TK-BICI, NP/VP35/VP30/L+NheI-TK-BICI/NPss@IR und NP/VP35/L+NheI-TK-BICI/NPss@IR.

Pro Ansatz wurden 2 Vertiefungen einer 6er Zellkulturplatte infiziert und transfiziert. 28h nach der Transfektion wurde die mRNA der Zellen isoliert (3.8.3) und einer Northern-Blot Analyse unterzogen (3.9.3). Dabei wurden die Blots 7h lang prähybridisiert (3.9.4) und anschließend während einer zwölfstündigen Inkubationszeit mit 7µl DIG-markierter (3.10.1) RNA-Sonde BS/-CAT hybridisiert (3.9.4). Abbildung 24 zeigt ein Bild des Blots nach Detektion der DIG-markierten RNA mit CDP-Star (3.9.5).

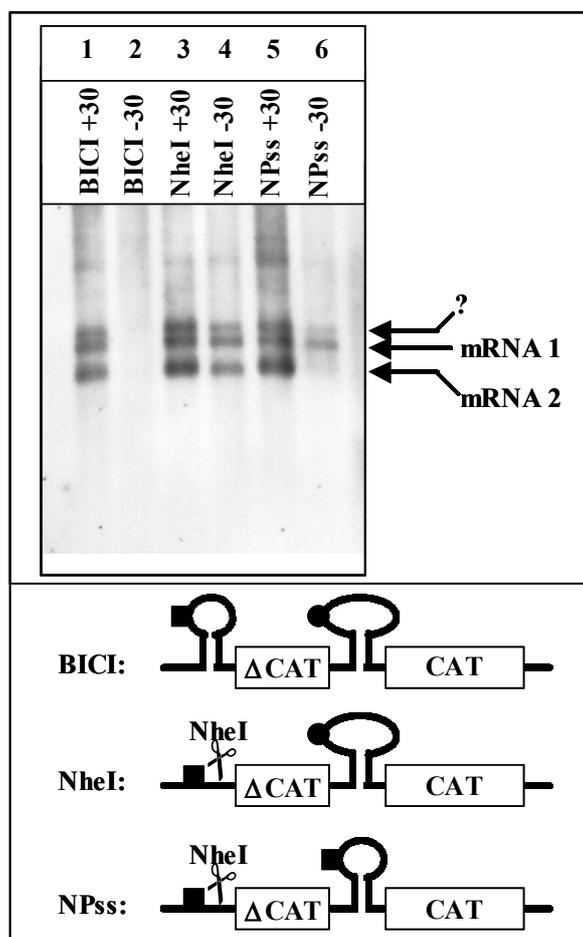


Abbildung 24: Northern-Blot-Analyse von mRNA der Konstrukte BICI 436 (BICI), NheI-TK-BICI (NheI) und NheI-TK-BICI/ NPss@IRNP-VP35 (NPss). (+30): Anwesenheit von VP30. (-30): Abwesenheit von VP30. Die Pfeile mit den Beschriftungen mRNA1, bzw. mRNA2 verweisen auf die Position der korrespondierenden mRNA-Banden. Das Fragezeichen (?) markiert eine Bande unklarer Herkunft. Das schwarze Quadrat im unteren Teil der Abbildung symbolisiert den TKS des NP-Gens. Der schwarze Kreis zeigt den TKS des VP35-Gens an.

Bei den Ansätzen mit dem Minigenom BICI 436 (Abbildung 24, Spuren 1 und 2) war ein mRNA-Nachweis nur möglich, wenn die Zellen das VP30-Protein des EBOV exprimierten. Bei der Mutante NheI-TK-BICI (Abbildung 24, Spuren 3 und 4) bestätigten sich die Ergebnisse vorheriger Versuche (4.3.2). Sowohl in Anals auch in Abwesenheit von VP30 konnten die mRNAs beider Gene nachgewiesen werden. Bei der Mutante NheI-TK-BICI/ NPss@IRNP-VP35 (Abbildung 24, Spuren 5 und 6) waren in Anwesenheit von VP30 beide mRNAs

nachweisbar. Wurde VP30 nicht exprimiert, konnte nur die mRNA des ersten Gens mit der zerstörten Sekundärstruktur am TKS nachgewiesen werden. Durch die Klonierung der NP-Sekundärstruktur vor das zweiten Gen wurde dieses Gen in seiner Transkription abhängig von VP30.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß ausschließlich die NP-Sekundärstruktur für die VP30-Abhängigkeit der Transkription verantwortlich ist. Die Lage dieser Sekundärstruktur scheint dabei nicht von Bedeutung zu sein.

4.4 UNTERSUCHUNGEN ZUM REPLIKATIONSPROMOTOR DES EBOV

Vor dem Translationsstart des ersten Gens liegt im Genom des EBOV ein 472 Nukleotide langer Bereich aus Leader und NTR des NP-Gens. Innerhalb dieser ungewöhnlich langen nicht kodierenden Region ist der genomische Promotor des EBOV lokalisiert. Untersuchungen an anderen Mononegavirales hatten ergeben, daß bei diesen Viren die Leader-Region essentiell für die Funktion des Replikationspromotors sind. In dem folgenden Abschnitt dieser Arbeit wurde die Leader-/NP-NTR-Region des EBOV-Genoms mit der Fragestellung untersucht, welche der 472 Nukleotide eine essentielle Rolle in der Genomreplikation spielen.

4.4.1 Untersuchungen der Leader-Region des des EBOV-Genoms

Die TKS-Regionen sind nicht die einzigen Orte im Genom des EBOV, die laut Computervorhersage an der Bildung stabiler RNA-Sekundärstrukturen beteiligt sind. Ein Bereich, für den ebenfalls eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Sekundärstrukturen angegeben wurde, war das extreme 3'-Ende des EBOV-Genoms. Da es sich hierbei auch um eine Region handelt, die unter den EBOV-Subtypen hoch konserviert ist und in der wichtige Promotorsequenzen vermutet werden, wurde zunächst untersucht, ob sich in diesem RNA-Abschnitt Sekundärstrukturen ausbilden können.

4.4.1.1 Nachweis gepaarter RNA-Bereiche in der Leader-Region mittels chemischer Modifikation

In vitro transkribierte RNA des Minigenoms (+)DI wurde, wie unter (4.2.1) beschrieben, mit DMS und CMCT chemisch modifiziert (3.10.3, 3.10.4) und im Primer-Extension-Assay (3.9.6) parallel zu einer radioaktiven Sequenzierung (3.2.3) analysiert. Der verwendete Primer bindet nahe am 5'-Ende und ermöglicht so eine Analyse dieser Region. Abbildung 25 zeigt das Autoradiogramm des Gels, nachdem 14h lang eine Bio-Imager-Platte exponiert worden war.

Es wurde ein größerer modifizierter Bereich (Nukleotid 16-34) beobachtet, der von zwei unmodifizierten Bereichen flankiert wurde. Im Bereich der Nukleotide 1-15 wurden zwei schwache aber spezifische Modifikationsbanden beobachtet (A_4 , A_{14}). Der zweite geschützte Bereich (Nukleotid 35-46) wurde nicht durch Modifikationen unterbrochen.

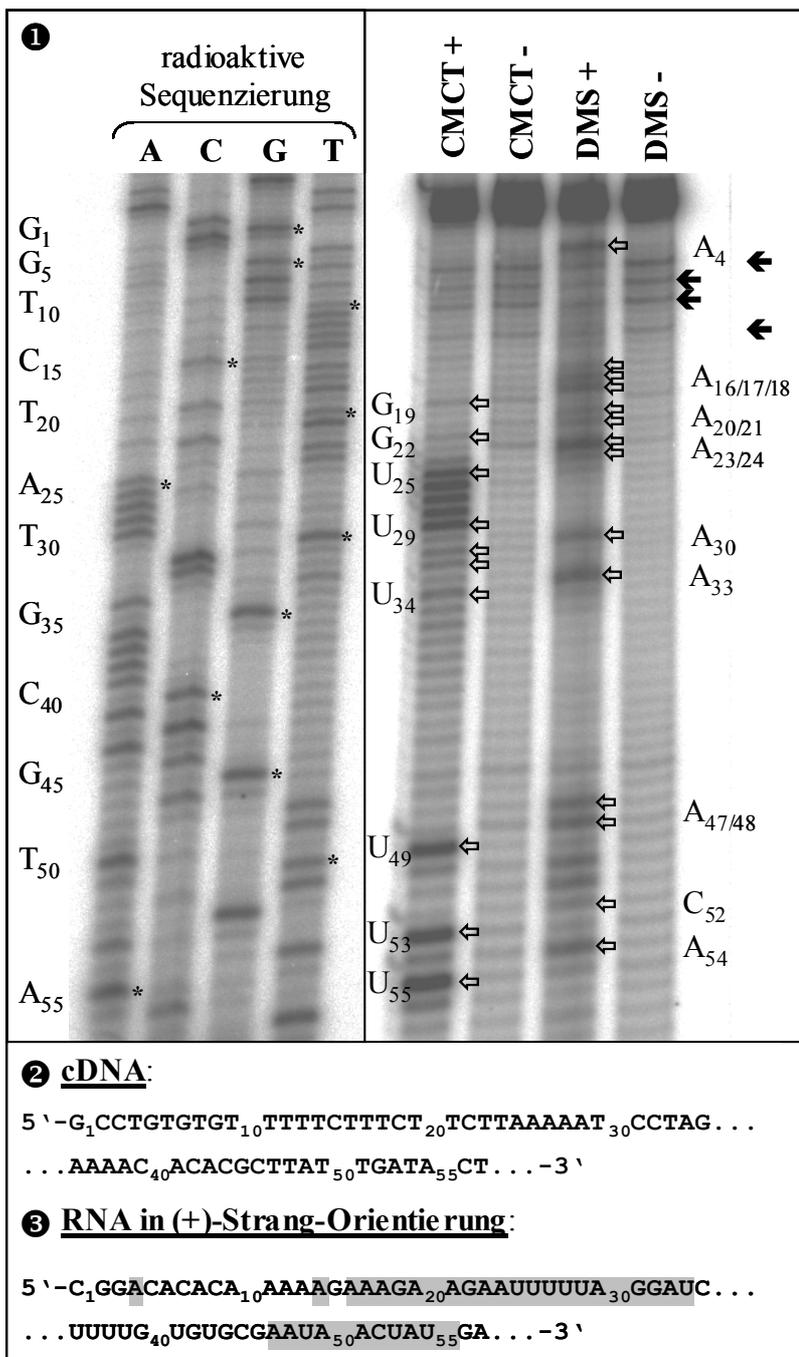


Abbildung 25: Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an *in vitro* transkribierter (+)DI-RNA (1 rechte Hälfte) im Vergleich zur radioaktiven Sequenzierung (1 linke Hälfte) an denaturierter Plasmid-DNA. Für die Sequenzierung und den Primer-Extension-Assay an der modifizierten RNA wurde der 5'-[³²P]-markierte Primer #384 verwendet. Die Sterne (*) markieren die links indizierten Abbruchbanden der Sequenzierung. Die Benennung der Nukleotide in der Sequenzierung bezieht sich auf die entstandene cDNA, ist also komplementär zur Sequenz der verwendeten RNA (siehe auch 2). Die Pfeile (⇐) markieren die jeweils modifizierten Nukleotide in der RNA nach Detektion im Primer-Extension-Assay. Die Beschriftung der modifizierten Nukleotide bezieht sich auf die (+)RNA. Die Zahlen an den Nukleotiden beziehen sich auf die Leader-Sequenz des EBOV in (+)-Strang-Orientierung. Abbruchbanden (⚡) in den Negativkontrollen (-DMS, -CMCT) rühren von cDNA-Synthese an kurzen RNA-Fragmenten her, welche durch Kontaminationen mit RNasen entstanden. In 2 ist die Sequenzierung des Plasmids (+)DI gezeigt. 3 stellt die modifizierten Nukleotide (grau hinterlegt) am 5'-Ende der RNA zusammenfassend dar.

4.4.1.2 Die gepaarten RNA-Bereiche des Leaders entstehen nicht durch

Interaktion mit dem Trailer

Für die beobachtete Sekundärstrukturbildung in der Leader-Region kommen 2 Erklärungsmöglichkeiten in Frage:

- a. Es handelt sich um eine interne Sekundärstruktur des Leaders
- b. Es handelt sich um eine Sekundärstrukturbildung zwischen Leader- und komplementärer Trailer-Region („panhandle“-Struktur)

Um herauszufinden, wie sich die beobachtete Sekundärstruktur bildet, wurde eine RNA erzeugt, die die Leader-, nicht jedoch die Trailer-Region umfaßte. Hierzu wurde Plasmid-DNA des Minigenoms (+)DI mit NdeI linearisiert (3.4.3.b) und in der Run-off-Transkription eingesetzt (3.7). Durch den Verdau mit NdeI wurde die Plasmid-DNA am Übergang vom Leader des EBOV zum CAT-Gen geschnitten (siehe Abbildung 6). Bei der anschließenden RNA-Transkription entstand so eine positivsträngige Minigenom-RNA, der das CAT-Gen und der gesamte Trailer-Bereich fehlte. Diese Leader-RNA wurde einer Modifikation mit den Chemikalien DMS und CMCT unterworfen (3.10.3, 3.10.4), die modifizierte RNA im Primer-Extension-Assay (3.9.6) analysiert und gemeinsam mit einer radioaktiven Sequenzierung (3.2.3) an (+)DI-Plasmid-DNA und dem Primer-Extension-Assay aus 4.4.1.1 auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Abbildung 26 zeigt das Autoradiogramm des Gels.

Der Versuch zeigte, daß die gleichen Nukleotide in der positivsträngigen Leader-RNA und in der (+)DI-Minigenom-RNA durch CMCT und DMS modifiziert wurden, d.h. ungepaart vorlagen. Die gepaarten (geschützten) Bereiche in diesem RNA-Abschnitt rührten also nicht von einer Interaktion mit dem Trailer in (+)-Strang-Orientierung her, sondern waren Produkt einer internen Interaktion von Leader-Nukleotiden. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse konnte für die Leader-Region in (+)-Strang-Orientierung die in Abbildung 27 gezeigte Sekundärstruktur erstellt werden.

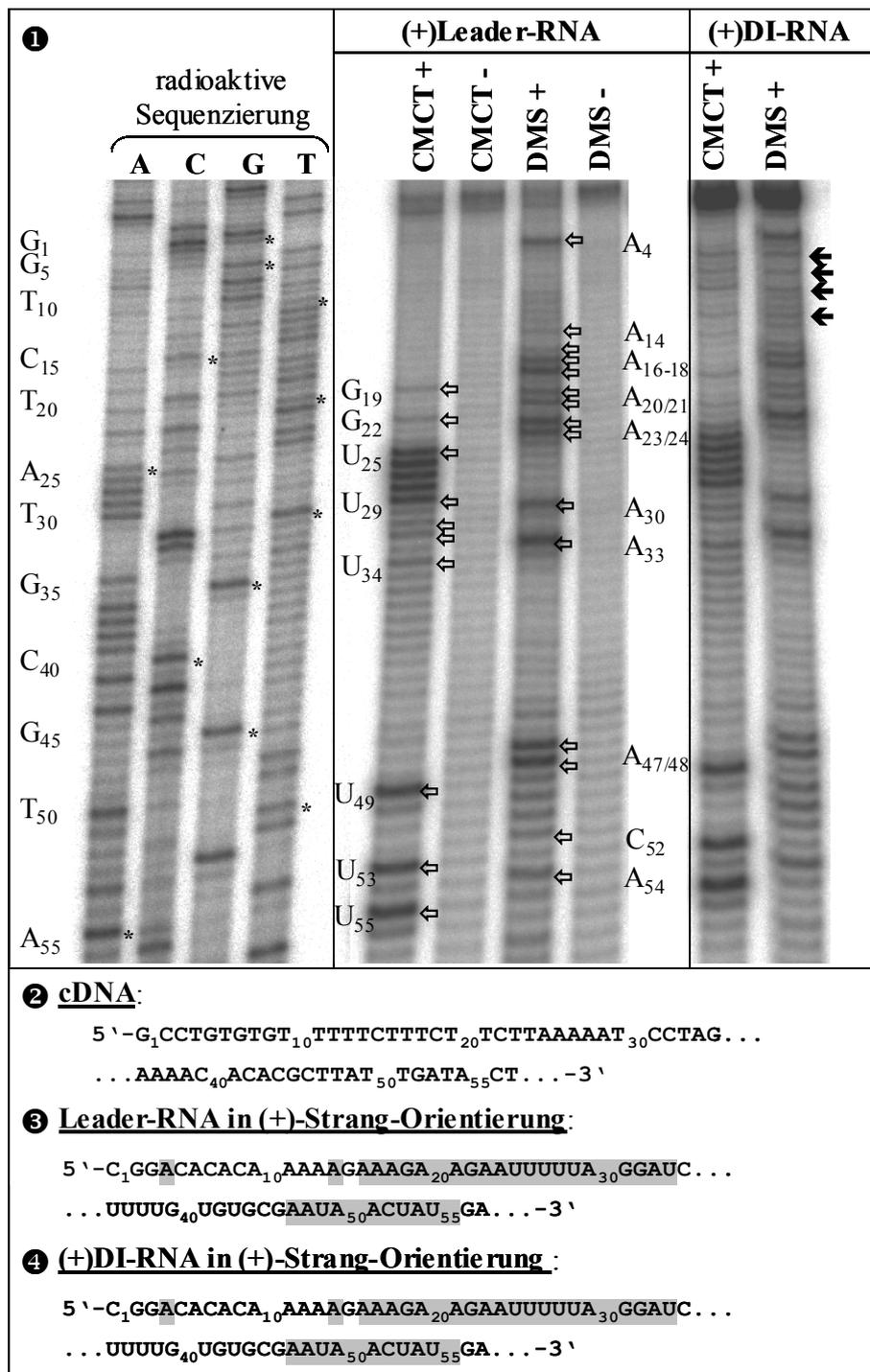


Abbildung 26: Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an *in vitro* transkribierter (+)DI-RNA im Vergleich zu *in vitro* transkribierter Leader-RNA in (+)-Strang-Orientierung (① rechte Seite). Zur Orientierung ist die radioaktive Sequenzierung (① linke Seite) an denaturierter (+)DI-Plasmid-DNA aufgetragen. Für die Sequenzierung und den Primer-Extension-Assay an der modifizierten RNA wurde der 5'-[³²P]-markierte Primer #384 verwendet. Die Sterne (*) markieren die links indizierten Abbruchbanden der Sequenzierung und beziehen sich auf die entstandene cDNA, sind also komplementär zur Sequenz der verwendeten RNA (siehe auch ②). Die Pfeile (↔) markieren die jeweils modifizierten Nukleotide in der RNA nach Detektion im Primer-Extension-Assay. Die Beschriftung der modifizierten Nukleotide bezieht sich auf die (+)RNA. Die Zahlen an den Nukleotiden beziehen sich auf die EBOV-spezifische Leader-Sequenz in (+)-Strang-Orientierung. Unspezifische Abbruchbanden (↔) in den Ansätzen (+)DI-RNA/DMS+ und (+)DI-RNA/CMCT+ wurden bereits vorher beobachtet (siehe Abbildung 19) und rührten von cDNA-Synthese an kurzen RNA-Fragmenten her. In ② ist die Sequenzierung des Plasmids (+)DI im Bereich der ersten Leader-Nukleotide gezeigt. ③ und ④ stellen die modifizierten Nukleotide (grau hinterlegt) in (+)DI-RNA und Leader-RNA in (+)-Strang-Orientierung vergleichend dar.

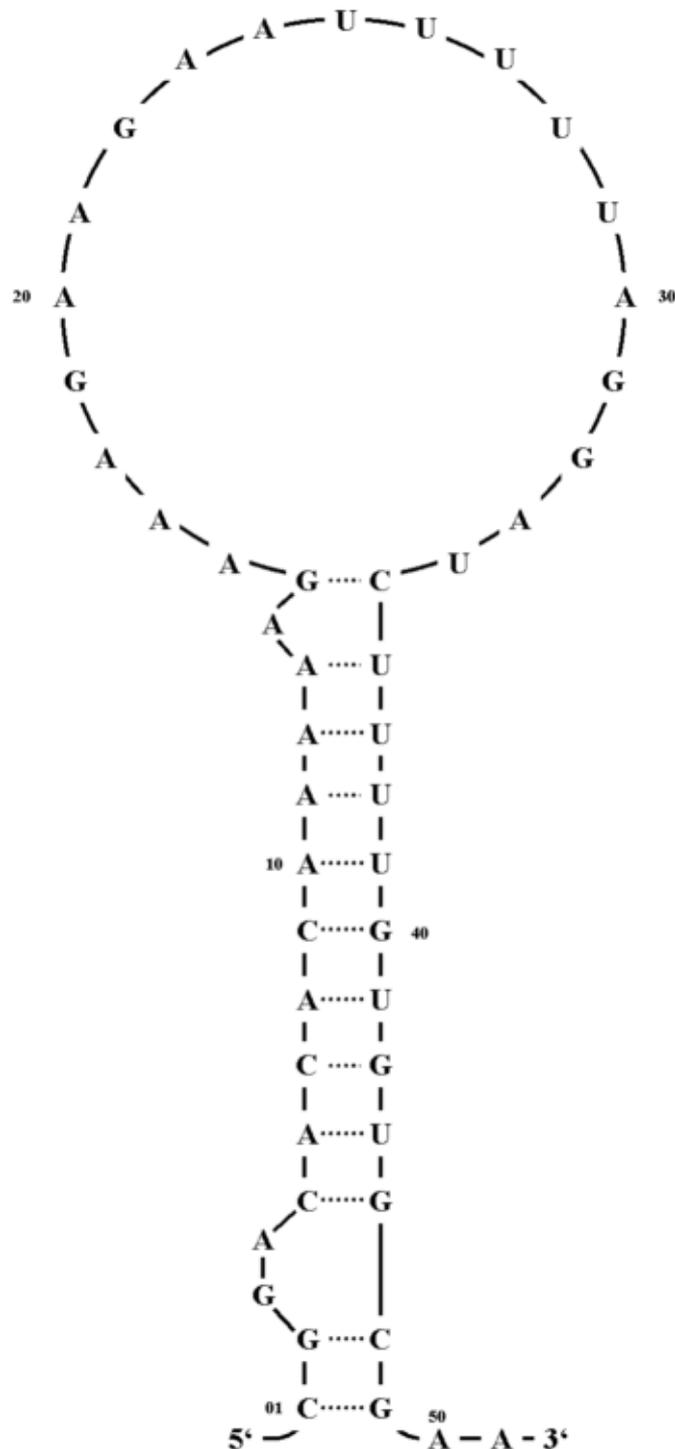


Abbildung 27: Darstellung der experimentell ermittelten Sekundärstruktur in der Leader-Region des EBOV in (+)-Strang-Orientierung. Die Numerierung der Nucleotide bezieht sich auf die EBOV-spezifische Leader-Sequenz in (+)-Strang-Orientierung.

4.4.1.3 Klonierung der Minigenommutanten (-)DI/x53-55, (-)DI/x50-52 und (-)DI/x44-46

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß sich am Beginn des EBOV-Genoms zwei Sekundärstrukturen befinden. In Analogie zu anderen Mononegavirales wurde vermutet, daß dem Bereich der ersten Sekundärstruktur (Nucleotide 1-49) eine

essentielle Rolle als Teil des Replikationspromotors zukommt. Die zweite Sekundärstruktur bildet sich unter Beteiligung des NP-TKS an den Nukleotiden 56-78 aus und ist, wie gezeigt wurde (4.2.1 – 4.3.5), in die Regulation der viralen Transkription involviert. Um zu überprüfen, ob die sechs Nukleotide zwischen den beiden Sekundärstrukturen (50-55) eine Relevanz für die Replikation des Minigenoms besitzen, wurden folgende Mutanten erstellt:

(-)DI/x53-55 → Nukleotide 53, 54 und 55 ausgetauscht

(-)DI/x50-52 → Nukleotide 50, 51 und 52 ausgetauscht

Als Kontrolle für die essentielle Rolle der Nukleotide 1-49 bei der Replikation wurde eine zusätzliche Mutante kloniert, welche einen Austausch von 3 Nukleotiden innerhalb der Sequenz 1-49 besaß:

(-)DI/x44-46 → Nukleotide 44, 45 und 46 ausgetauscht

Zur Erzeugung dieser Mutanten wurde eine Quickchange Mutagenese PCR (3.4.6) mit dem Minigenom 3E-5E als Vorlage durchgeführt. Für die Mutante (-)DI/x53-55 wurde das Primerpaar #925 / #926 verwendet, für die Mutante (-)DI/x50-52 das Primerpaar #927 / #928, und zur Erzeugung der Mutante (-)DI/x44-46 kam das Primerpaar #931 / #932 zum Einsatz.

4.4.1.4 Nachweis replizierter RNA der Mutanten (-)DI/x53-55, (-)DI/x50-52 und (-)DI/x44-46

Um zu überprüfen, ob die Mutationen der Minigenome (-)DI/x53-55, (-)DI/x50-52 und (-)DI/x44-46 einen Einfluß auf deren Replikationsfähigkeit haben, wurden die Mutanten im Replikations-/Transkriptionssystem eingesetzt und mit dem Minigenom 3E-5E verglichen. Zwei 6er-Zellkulturplatten HeLa-Zellen (Zelldichte: 60%), wurden mit rekombinantem Vaccinia-Virus MVA-T7 infiziert (3.12.3) und pro Vertiefung mit den Plasmiden pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO}, pTM1/L_{EBO} und der jeweiligen Minigenom-Plasmid-DNA transfiziert (3.6.1). Dem Transfektionsansatz der Negativkontrolle 3E-5E –L wurde das Plasmid pTM1/L_{EBO} nicht zugegeben. Pro Ansatz wurden zwei Zellkulturschälchen infiziert und transfiziert. Nach 30h wurden die Zellen lysiert, und die replizierte RNA wurde isoliert (3.8.2). Anschließend wurden die isolierten RNAs einer Northern-Blot-Hybridisierung unterzogen (3.9.3). Nach einer Prähybridisierungsdauer von 7h wurden die Blots 12,5h lang mit 6µl der DIG-

markierten (3.10.1) RNA-Sonde BS/-CAT hybridisiert (3.9.4). Abbildung 28 zeigt ein Bild des Blots nach Detektion der DIG-markierten RNAs (3.9.5).

Es konnte gezeigt werden, daß keine der Minigenom-Mutanten zur Replikation fähig war. Es konnte nur eine spezifische Bande replizierter RNA in dem Ansatz des Minigenoms 3E-5E +L nachgewiesen werden (Spur 1 in Abbildung 28). Bereits ein Austausch der Nukleotide 53-55 führte zum völligen Erliegen der Replikation.

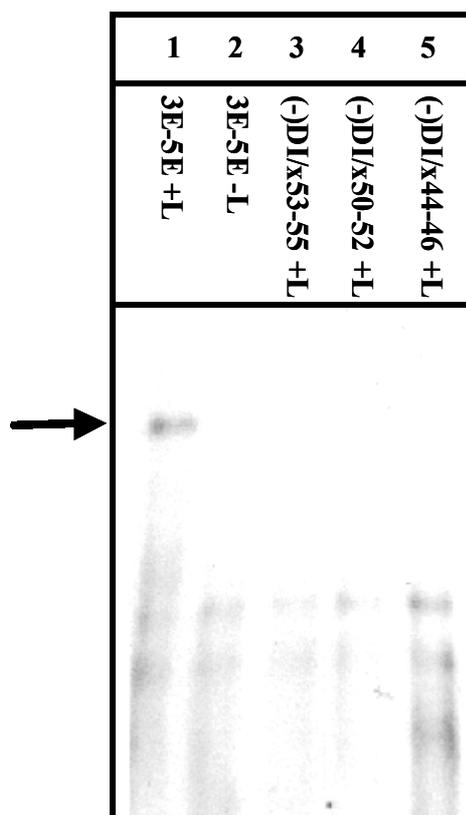


Abbildung 28: Northern-Blot-Analyse replizierter RNA der Mutanten (-)DI/x53-55, (-)DI/x50-52 und (-)DI/x44-46 im Vergleich zu Minigenom 3E-5E. Der Pfeil verweist auf die Position der replizierten RNA-Banden.

4.4.2 Untersuchung des Bereichs von Nukleotid 55 bis 472

Wie die vorangegangenen Untersuchungen (4.4.1.1 bis 4.4.1.4) gezeigt hatten, enthalten die Nukleotide 1-55 des EBOV-Genoms essentielle Sequenzen für die Replikation. Um abzuklären, ob dieser essentielle Bereich noch über das Nukleotid 55 hinausreicht, wurden zunächst Mutanten des Minigenoms 3E-5E angefertigt, in denen der Sequenzbereich zwischen dem CAT-Gen und dem Nukleotid 55 sukzessive durch immer größer werdende Deletionen verkürzt wurde. Die Deletionsmutanten wurden dann auf ihre Replikationsfähigkeit hin überprüft. Ziel dieser Vorgehensweise war es, den replikationsvermittelnden Sequenzbereich näher einzugrenzen und anschließend über verschiedene Substitutionsmutanten den genomischen Promotor des EBOV näher zu charakterisieren.

4.4.2.1 Klonierung der Deletionsmutanten Δ52 bis Δ351

Um Bereiche zwischen dem CAT-Gen und dem 3'-Ende des Minigenoms zu deletieren, wurden PCR-Fragmente mit verschiedenen Primerpaaren an der Pasmid-DNA des Minigenoms 3E-5E generiert (3.3.1). Der Primer #284 wurde bei allen PCR-Ansätzen verwendet. Er bindet an 38 Nukleotide der HDV-Ribozym-Sequenz und die ersten 22 Nukleotide der Sequenz des EBOV-Leaders. Dadurch umfaßt er eine RsrII-Schnittstelle die in dem Bereich des HDV-Ribozym lokalisiert ist (siehe Abbildung 29). Der zweite Primer, welcher bei jeder Deletionsmutante variierte, enthielt an seinem 5'-Ende eine NdeI-Schnittstelle. Nach einem präparativen Verdau (3.4.3.b) konnte das jeweilige PCR-Fragment über die RsrII- und NdeI-Schnittstelle gegen das RsrII- /NdeI-Fragment des Minigenoms 3E-5E ausgetauscht werden. Der Bereich zwischen Primerbindungsstelle und CAT-Gen wurde durch dieses Vorgehen deletiert. Tabelle 1 gibt Aufschluß über die erzeugten Deletionsmutanten, die deletierten und nicht-deletierten Bereiche und die verwendeten Primerpaare.

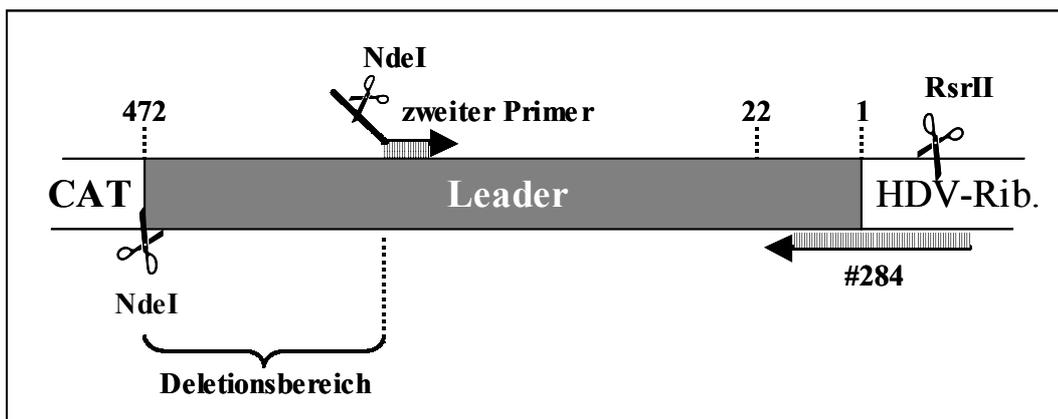


Abbildung 29: Klonierungsstrategie der Deletionsmutanten Δ52 bis Δ351.

Minigenom	Primerpaar	Deletierter Bereich	Nicht-deletierter Bereich
3E-5E	---	---	1 - 472
Δ351	#284 / #366	352 - 472	1 - 351
Δ300	#284 / #432	301 - 472	1 - 300
Δ250	#284 / #431	247 - 472	1 - 246
Δ200	#284 / #430	201 - 472	1 - 200
Δ150	#284 / #429	151 - 472	1 - 150
Δ108	#284 / #365	109 - 472	1 - 108
Δ103	#284 / #428	104 - 472	1 - 103
Δ100	#284 / #385	101 - 472	1 - 100
Δ98	#284 / #501	99 - 472	1 - 98
Δ96	#284 / #502	97 - 472	1 - 96
Δ94	#284 / #503	95 - 472	1 - 94
Δ92	#284 / #504	93 - 472	1 - 92
Δ90	#284 / #384	91 - 472	1 - 90
Δ80	#284 / #375	81 - 472	1 - 80
Δ70	#284 / #374	71 - 472	1 - 70
Δ52	#284 / #364	53 - 472	1 - 52

Tabelle 1: Auflistung aller klonierten Deletionsmutanten.

4.4.2.2 Analyse der Deletionsmutanten Δ52 bis Δ351 im quantifizierten CAT-Assay

Die in 4.4.2.1 beschriebenen Deletionsmutanten wurden zunächst über einen CAT-ELISA auf ihre Replikationsfähigkeit hin überprüft. Der CAT-ELISA stellt primär zwar eine Nachweismethode für die Transkription und Translation des Reportergens CAT dar, gibt jedoch zusätzlich auch einen Hinweis, ob ein Minigenom zu Replikation fähig ist oder nicht (siehe 4.1.2). BHK-T7 Zellen (Zelldichte: 60%) in 6er Zellkulturplatten wurden durch Fugene-Transfektion mit den Plasmiden pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO}, pTM1/L_{EBO} und 1μg des jeweiligen Minigenom-Plasmids transfiziert (3.6.2). Dem Transfektionsansatz der Negativkontrolle 3E-5E –L wurde das Plasmid pTM1/L_{EBO} nicht zugesetzt. Nach Lyse der Zellen wurde der Proteingehalt der Zellysate normalisiert und die Konzentration an CAT mittels CAT-ELISA (3.13.2) bestimmt (siehe Diagramm 2).

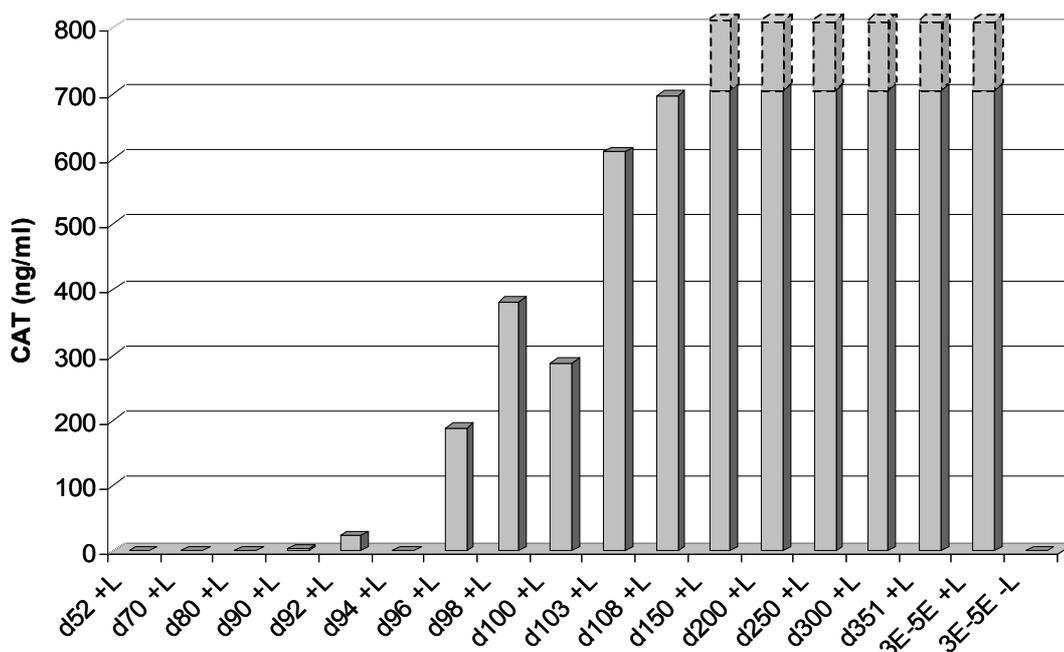


Diagramm 2: Quantifizierung des CAT-ELISA der Deletionsmutanten Δ52 bis Δ351 im Vergleich zum Minigenom 3E-5E. Die Konzentrationen an CAT in Lysaten der Deletionsmutanten Δ150 – Δ351 und des Minigenoms 3E-5E lagen oberhalb des Meßbereichs und sind daher nicht angegeben.

Der Versuch zeigte, daß die nachweisbare CAT-Konzentration von einem Wert oberhalb des Meßbereichs ($OD > 2 \cong 704 \text{ ng CAT/ml}$) in den Zellysaten der Ansätze 3E-5E +L bis Δ150 +L auf $696,7 \text{ ng/ml}$ im Lysat des Ansatzes Δ108 +L abfiel. In den Lysaten der Ansätze Δ108 +L bis Δ90 +L nahm die Konzentration an CAT stetig ab und erreichte im Lysat des Ansatzes Δ80 +L einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze.

4.4.2.3 Nachweis replizierter RNA der Deletionsmutanten Δ92 bis Δ300

Der Nachweis der CAT-Konzentration im Zellysat gibt nur einen Hinweis auf die Replikationsfähigkeit der Minigenome, da er von weiteren Faktoren, wie z.B. Transkriptions- und Translationseffizienz, beeinflusst wird. Um die Ergebnisse des unter 4.4.2.2 beschriebenen Versuchs zu überprüfen, wurde die replizierte RNA der Minigenome Δ92, Δ94, Δ96, Δ98, Δ100, Δ103, Δ108, Δ150, Δ200 und Δ300 direkt nachgewiesen und mit der replizierten RNA des Minigenoms 3E-5E verglichen. Dazu wurden vier 6er Zellkulturplatten HeLa-Zellen (Zelldichte: 70%) mit MVA-T7-Virus infiziert (3.12.3) und durch Lipofektin-Transfektion mit den Plasmiden pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO}, pTM1/L_{EBO} und der jeweiligen Minigenom-DNA transfiziert (3.6.1). Dem Transfektionsansatz der Negativkontrolle 3E-5E -L wurde kein pTM1/L_{EBO}-Plasmid zugegeben. Für jeden

Ansatz wurden zwei Zellkulturschälchen infiziert und transfiziert. 30 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die replizierte RNA wurde isoliert (3.8.3) und einer Northern-Blot-Analyse (3.9.3) unterzogen. Die Prähybridisierungszeit betrug 6,5h, gefolgt von einer elfstündigen Hybridisierung (3.9.4) mit 5µl DIG-markierter-RNA-Sonde (3.10.1) BS/-CAT. Abbildung 30 zeigt ein Bild des Blots nach Detektion der DIG-markierten RNA (3.9.5) und zwölfstündiger Exposition eines Röntgenfilms.

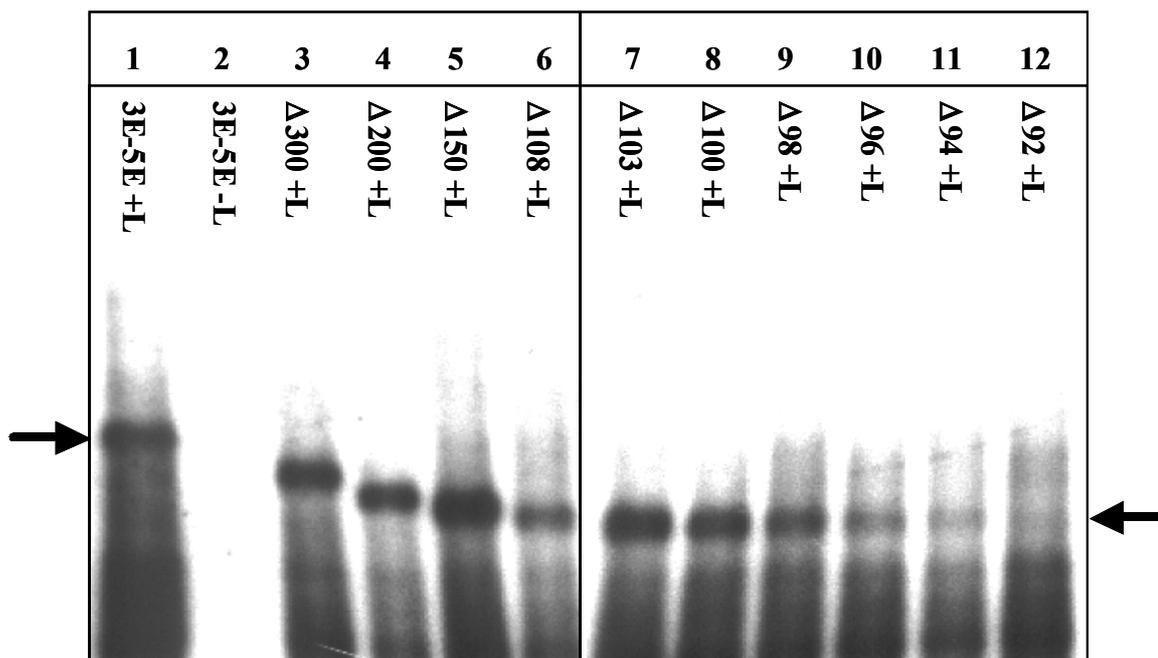


Abbildung 30: Northern-Blot-Analyse replizierter RNA der Deletionsmutanten Δ92 bis Δ300 im Vergleich zu Minigenom 3E-5E. Die Pfeile verweisen auf den Bereich der replizierten RNA-Banden. Dem Transfektionsansatz der Negativkontrolle 3E-5E -L wurde das Plasmid pTM1/L_{EBO} nicht zugegeben.

Auch im direkten Nachweis replizierter RNA zeigte sich im Bereich der Deletionsmutanten Δ150 bis Δ94 ein starkes Absinken der Replikationseffizienz. In den Ansätzen der Mutante Δ92 war keine replizierte RNA mehr nachweisbar. Aufgrund der guten Replikationseffizienz der Deletionsmutanten Δ108 und Δ103 wurde vermutet, daß das Ende der replikations-vermittelnden Sequenz im Bereich der Nukleotide 90-110 des EBOV-Genoms lokalisiert ist.

4.4.3 Der genomische Promotor des EBOV. Ein zwei- oder ein einteiliger Promotor ?

In den Abschnitten 4.4.1.3, 4.4.1.4 und 4.4.2.1 – 4.4.2.3 konnte gezeigt werden, daß der genomische Promotor des EBOV innerhalb der Nukleotide 1 bis 150 des

EBOV-Genoms lokalisiert ist. Die beobachteten Versuchsergebnisse konnten auf zweierlei Weise interpretiert werden:

- 1.) Bei dem Promotor des EBOV könnte es sich um einen einteiligen Promotor handeln, wie er z.B. für das RSV beschrieben ist (Fearnls *et al.*, 2000). In diesem Fall wäre die gesamte Sequenz im Bereich der Nukleotide 1-150 des Genoms des EBOV für die Funktion des Promotors essentiell.
- 2.) Bei dem Promotor des EBOV handelt es sich um einen zweiteiligen Promotor wie ihn z.B. das Sendai Virus besitzt (Tapparel *et al.*, 1998). Zwei separate Promotorelemente würden in diesem Fall durch einen nicht essentiellen Sequenzbereich getrennt.

Um zu untersuchen, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, wurde zunächst eine Mutante erzeugt, bei welcher der Sequenzbereich zwischen Nukleotid 55 bis 90 durch eine Fremdsequenz gleicher Länge ersetzt wurde.

4.4.3.1 Klonierung der Mutante $\Delta 250/x55-90$

Die Versuche zu der Sequenzsubstitution zwischen den Nukleotiden 55 und 90 des Genoms des EBOV wurden an der verkürzten Minigenommutante $\Delta 250$ durchgeführt. Über eine Quickchange Mutagenese PCR (3.4.6) mit dem Primerpaar #473 / #474 wurden die Nukleotide 56-61 der Leadersequenz mutiert und so eine SpeI-Schnittstelle in der Sequenz des Minigenoms $\Delta 250$ erzeugt (siehe Abbildung 31). Die entstandene Mutante $\Delta 250/\text{SpeI}$ diente als Vorlage für eine Quickchange Mutagenese PCR (3.4.6) in welcher durch das Primerpaar #481 / #482 die Nukleotide an Position 89 und 88 der EBOV-spezifischen Sequenz mutiert wurden (siehe Abbildung 31). Die daraus resultierende Mutante $\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacIIa}$ wurde erneut einer Mutagenese PCR (3.4.6) unterzogen. Mit Hilfe des Primerpaares #483 / #484 wurden die Nukleotide 87 und 86 mutiert und so die Mutante $\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacIIb}$ erzeugt (siehe Abbildung 31). In einer letzten Quickchange Mutagenese PCR (3.4.6) mit dem Primerpaar #485 / #486 wurden die Nukleotide 85 und 84 der EBOV-spezifischen Sequenz mutiert und so eine vollständige SacII-Erkennungsstelle im Bereich der Nukleotide 84-89 geschaffen (siehe Abbildung 31). In der entstandenen Mutante $\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacII}$ konnte der

Sequenzbereich zwischen den Nukleotiden 55 und 90 über die SpeI- und SacII-Schnittstelle gegen eine beliebige Sequenz ausgetauscht werden. Diese Sequenz resultierte aus der Hybridisierung des Primer #475 mit dem Primer #476 (3.4.7). Die Mutante, welche aus der Ligation (3.4.5) des SpeI- und SacII-verdauten (3.4.3.b) Minigenoms $\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacII}$ mit den hybridisierten Primern #475 und #476 hervorging, wurde als $\Delta 250/\text{x}55\text{-}90$ bezeichnet.

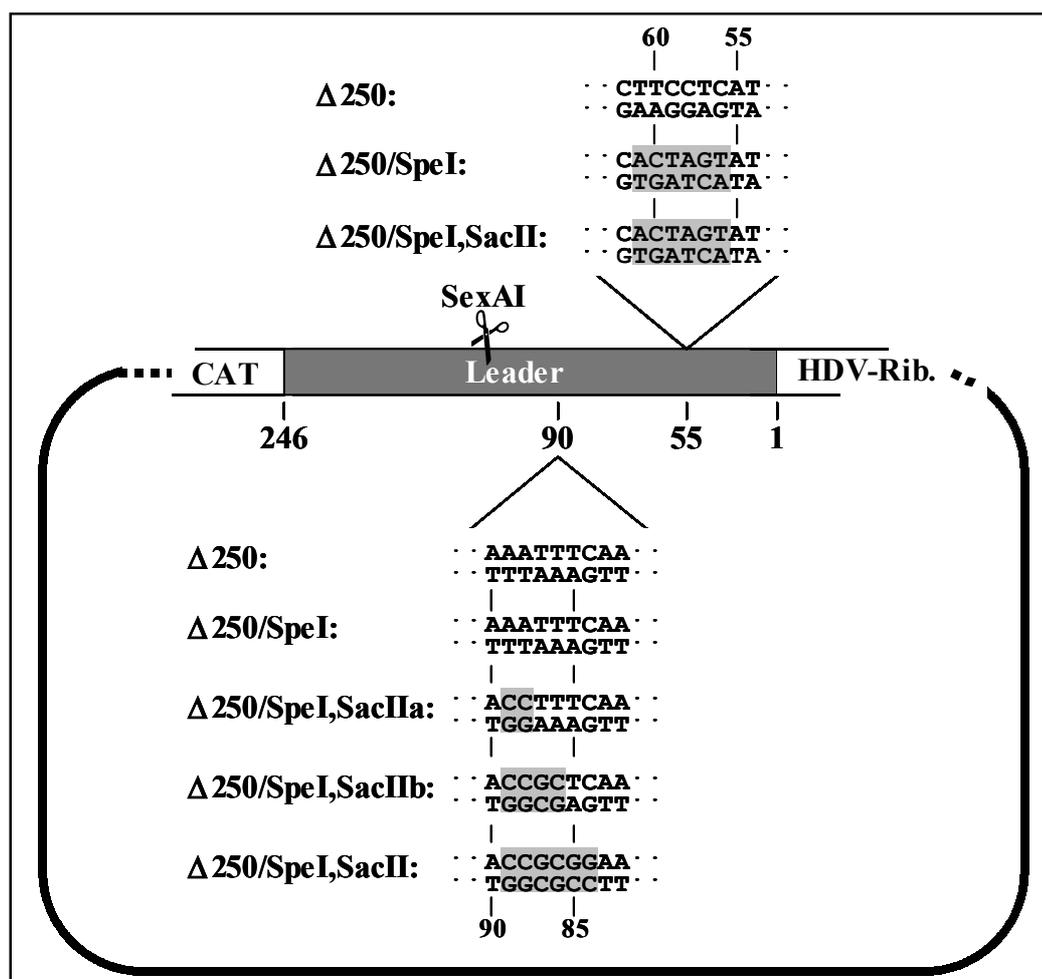


Abbildung 31: Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Mutante $\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacII}$. Mutationen im Vergleich zur Sequenz des Minigenoms $\Delta 250$ sind grau hinterlegt.

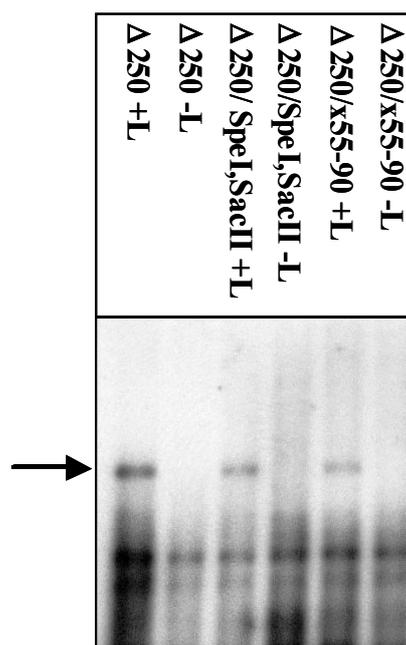
4.4.3.2 Nachweis replizierter RNA der Mutante $\Delta 250/\text{x}55\text{-}90$

Nachdem in der Minigenommutante $\Delta 250/\text{x}55\text{-}90$ die EBOV-spezifischen Nukleotide 55-90 gegen eine Fremdsequenz gleicher Länge substituiert worden waren, wurde die Replikationsfähigkeit dieser Mutante im Replikations- und Transkriptionssystem untersucht. Zwei 6er Zellkulturplatten HeLa-Zellen (Zelldichte: 70%) wurden mit MVA-T7-Virus infiziert (3.12.3) und durch Lipofektin-Transfektion mit den Plasmiden $\text{pTM1}/\text{NP}_{\text{EBO}}$, $\text{pTM1}/\text{VP35}_{\text{EBO}}$,

pTM1/VP30_{EBO}, pTM1/L_{EBO} und der jeweiligen Minigenom-DNA transfiziert (3.6.1). 30h nach Transfektion wurde die EBOV-spezifische, replizierte RNA aus den Zellen isoliert (3.8.2) und einer Northern-Blot-Hybridisierung (3.9.3) unterzogen. Die Prähybridisierungszeit betrug 6h, die Hybridisierung (4.9.4) wurde für 11h mit 5µl DIG-markierter (3.10.1) RNA-Sonde BS/-CAT durchgeführt. Abbildung 32 zeigt ein Bild des Blots nach Detektion der DIG-markierten RNAs (3.9.5).

Abbildung 32:

Northern-Blot-Analyse replizierter RNA der Mutante $\Delta 250/x55-90$ im Vergleich zur replizierten RNA der Minigenome $\Delta 250$ und $\Delta 250/SpeI,SacII$. Der Pfeil verweist auf den Bereich der replizierten RNA-Banden. Dem Transfektionsansatz der Negativkontrollen ($\Delta 250 -L$, $\Delta 250/SpeI,SacII -L$ und $\Delta 250/x55-90 -L$) wurde das Plasmid pTM1/L_{EBO} nicht zugegeben.



Es konnte sowohl bei der Mutante $\Delta 250/x55-90$, als auch bei ihrer Vorstufe $\Delta 250/SpeI,SacII$ und dem Minigenom $\Delta 250$ EBOV-spezifische replizierte Minigenom-RNA nachgewiesen werden. Die Substitution der Sequenz zwischen Nukleotid 55 und 90 hatte keinen hemmenden Einfluß auf die Replikationseffizienz der Mutante $\Delta 250/x55-90$.

4.4.3.3 Klonierung der Mutante $\Delta 250/SpeI+4$

Auf Grundlage der Versuchsergebnisse aus 4.4.3.2 wurde postuliert, daß es sich bei dem genomischen Promotor des EBOV um einen zweiteiligen Promotor handelt. Basierend auf dieser Annahme sollte ein Folgeexperiment Aufschluß darüber geben, ob der Abstand der zwei Promotorelemente zueinander einen Einfluß auf die Replikationseffizienz hat. Um dies zu untersuchen, wurde ausgehend von dem Minigenom $\Delta 250/SpeI$ (4.4.3.1) ein Minigenom kloniert, dessen Sequenz zwischen den Nukleotiden 55 und 90 um 4 zusätzliche

Nukleotide verlängert wurde. Dazu wurde die Mutante $\Delta 250/\text{SpeI}$ zunächst einem präparativen Verdau (3.4.3.b) mit dem Enzym SpeI unterzogen. Die Schnittstellen des linearisierten Plasmids wurden anschließend durch Klenow-Polymerisation aufgefüllt (Weik, 1999). Abschließend wurde das Plasmid durch Zugabe von T4-DNA-Ligase religiert (3.4.5). Die Mutante $\Delta 250/\text{SpeI}+4$ wies im Sequenzvergleich zum Minigenom $\Delta 250/\text{SpeI}$ folgende Änderungen auf (die SpeI-Erkennungsstelle ist unterstrichen, die eingefügten 4 Nukleotide sind grau hinterlegt):

$\Delta 250/\text{SpeI}$: . . . T₅₀ TGATA₅₅ TGATC₆₀ ACTAA₇₀ . . .

$\Delta 250/\text{SpeI}+4$: . . . T₅₀ TGATA₅₅ TGATC₆₀ GATCA₇₀ CTAA₇₄ . . .

4.4.3.4 Nachweis replizierter RNA der Mutante $\Delta 250/\text{SpeI}+4$

Um die Auswirkungen der Insertion von vier Nukleotiden zwischen den beiden Promotorelemente zu untersuchen, wurde die replizierte RNA der Mutante $\Delta 250/\text{SpeI}+4$ mit der replizierten RNA der Minigenome $\Delta 250/\text{SpeI}$, SacII und $\Delta 250/\text{x55-90}$ verglichen. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit einer Dichte von ca. 60% mit dem rekombinanten Vacciniavirus MVA-T7 infiziert (3.12.3) und durch Lipofektin-Transfektion mit den Plasmiden pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO}, pTM1/L_{EBO} und der jeweiligen Minigenom-DNA transfiziert (3.6.1). Die Zellen wurden 30h nach Transfektion lysiert, die replizierte RNA wurde isoliert (3.8.2) und in der Northern-Blot-Hybridisierung (3.9.3) analysiert. Abbildung 33 zeigt den Northern Blot nach 7,5 stündiger Prähybridisierung, 12,5h langer Hybridisierung (3.9.4) mit 6 μ l DIG-markierter (3.10.1) RNA-Sonde BS/-CAT und anschließender Detektion der DIG-markierten RNAs (3.9.5).

In den Zellysaten der Ansätze $\Delta 250/\text{SpeI}$, SacII +L und $\Delta 250/\text{x55-90}$ +L konnte eindeutig EBOV-spezifische, replizierte Minigenom-RNA nachgewiesen werden, während in dem Lysat des Ansatzes $\Delta 250/\text{SpeI}+4$ +L keine replizierte RNA nachgewiesen werden konnte. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß eine Insertion von 4 Nukleotiden nicht von dem EBOV-Replikationskomplex toleriert wird. Daraus folgt, daß die Promotorelemente in einem definierten Abstand zueinander liegen müssen.

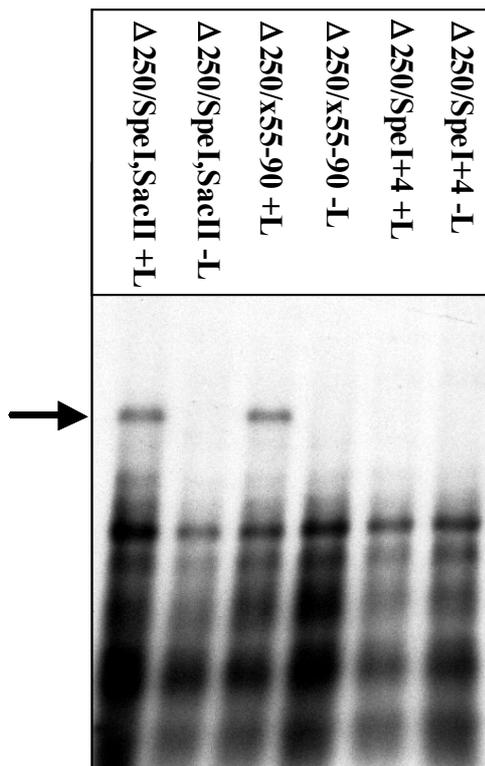


Abbildung 33: Northern-Blot-Analyse replizierter RNA der Mutante $\Delta 250/\text{SpeI}+4$ im Vergleich zu den Minigenommutanten $\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacII}$ und $\Delta 250/\text{x}55-90$. Der Pfeil verweist auf den Bereich der replizierten RNA-Banden. Den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen ($\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacII} -\text{L}$, $\Delta 250/\text{x}55-90 -\text{L}$ und $\Delta 250/\text{SpeI}+4 -\text{L}$) wurde das Plasmid pTM1/L_{EBO} nicht zugegeben.

4.4.3.5 Klonierung der Mutanten $\Delta 250/\text{x}90-110$

Nachdem in 4.4.3.2 und 4.4.3.4 gezeigt werden konnte, daß der Abstand der zwei Promotorelemente zueinander und nicht die Sequenz der dazwischen liegenden Region entscheidend für die Aktivität des genomischen Promotors des EBOV ist, sollte nun in einem Folgeversuch das zweite Promotorelement zerstört werden. Ausgehend von den Ergebnissen in 4.4.2.2 und 4.4.2.3 wurde das zweite Promotorelement im Bereich der Nukleotide 90-110 des EBOV-Genoms vermutet. Auf der Grundlage des Minigenoms $\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacII}$ wurde eine Mutante kloniert, in welcher die EBOV-spezifische Sequenz zwischen den Nukleotiden 90-110 gegen Fremdsequenz ausgetauscht wurde. Dazu wurde das Minigenom $\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacII}$ einem präparativen Verdau mit den Enzymen SacII und SexAI unterzogen (3.4.3.b). Durch diesen Verdau wurde ein 48 Nukleotide langes Fragment aus dem Leader-Bereich des Minigenoms ausgeschnitten (siehe Abbildung 31). Durch Ligation (3.4.5) des SacII/SexAI-verdauten Minigenoms $\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacII}$ mit einem Fragment, welches aus der Hybridisierung des Primers #868 mit dem Primer #869 entstand (3.4.7), wurde das Minigenom $\Delta 250/\text{x}90-110$ kloniert. Die Mutante $\Delta 250/\text{x}90-110$ besitzt die SpeI- und die SacII-Schnittstelle des Minigenoms $\Delta 250/\text{SpeI},\text{SacII}$, der Bereich zwischen den Nukleotiden 90-110 ist jedoch durch eine nicht-EBOV-spezifische Sequenz ersetzt.

4.4.3.6 Nachweis replizierter RNA der Mutante $\Delta 250/x90-110$

Nach Klonierung der Mutante $\Delta 250/x90-110$ wurde deren Replikationsfähigkeit im EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem überprüft. Zweier Zellkulturplatten HeLa-Zellen (Zelldichte: 50%) wurden mit MVA-T7-Virus infiziert (3.12.3) und mit den Plasmiden pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO}, pTM1/L_{EBO} und der jeweiligen Minigenom-DNA transfiziert (3.6.1). 30h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, die EBOV-spezifischen, replizierten RNAs isoliert (3.8.2) und durch Northern-Blot-Hybridisierung (3.9.3) analysiert. Nach 7h langer Prähybridisierung und zwölfstündiger Hybridisierung (3.9.4) mit 6 μ l DIG-markierter (3.10.1) RNA-Sonde BS/-CAT wurden die DIG-markierten RNAs detektiert (3.9.5). Abbildung 34 zeigt ein Bild des Blots.

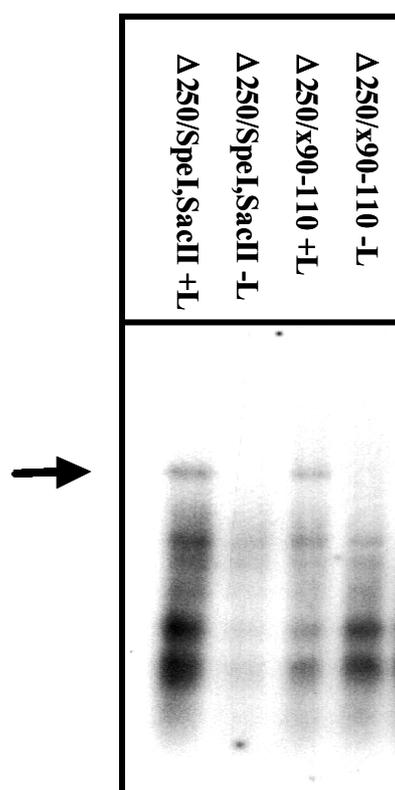


Abbildung 34:

Northern-Blot-Analyse replizierter RNA der Mutante $\Delta 250/x90-110$ im Vergleich zu replizierter RNA des Minigenoms $\Delta 250/SpeI,SacII$. Der Pfeil verweist auf den Bereich der replizierten RNA-Banden. Den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen ($\Delta 250/SpeI,SacII$ -L und $\Delta 250/x90-110$ -L) wurde das Plasmid pTM1/L_{EBO} nicht zugegeben.

Sowohl in dem Zellysat der Positivkontrolle ($\Delta 250/SpeI,SacII$ +L) als auch in dem Zellysat des Ansatzes $\Delta 250/x90-110$ +L konnte spezifisch replizierte RNA nachgewiesen werden. Aus den Versuchsergebnissen wurde geschlossen, daß der Sequenzbereich 90-110 des EBOV-Genoms nicht den Hauptanteil des zweiten Promotorelements enthält, sondern daß dieser zwischen den Nukleotiden 110 und 150 lokalisiert sein muß.

4.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DES EBOV-VP30

Bereits zu Beginn dieser Arbeit war die zentrale Bedeutung, welche dem VP30 während der Transkription des EBOV zukommt, bekannt (Mühlberger *et al.*, 1999). Eine ähnlich zentrale Rolle in der viralen Transkription wurde für das M2-1 Protein des RSV beschrieben (Collins *et al.*, 1996), welches dort als Elongationsfaktor der viralen Transkription wirkt. Um die Funktion des VP30 in der Transkription des EBOV zu klären, wurde EBOV-spezifische RNA, welche in An- und Abwesenheit von VP30 transkribiert worden war, aus Zellen isoliert und mittels Northern-Blot-Hybridisierung und RNase Protection Assay (RPA) analysiert.

4.5.1 Nachweis polyadenylierter mRNA

Um zu klären, ob VP30 ähnlich wie das M2-1 des RSV ein Transkriptionselongationsfaktor ist oder sich an der Transkriptionsinitiation beteiligt wurde folgender Versuch durchgeführt. HeLa-Zellen (Zelldichte: 80%) wurden mit MVA-T7-Virus infiziert (3.12.3) und mit den Plasmiden pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO}, pTM1/L_{EBO} und Plasmid-DNA des Minigenoms Δ 250 transfiziert (3.6.1). Nach 30h wurden die Zellen lysiert, und die Gesamt-RNA wurde mit Trizol®-Reagent isoliert (3.8.1). Nach der Fällung der RNA (3.1.6) wurde diese in je 400 μ l RNase-freiem dH₂O resuspendiert und zu je gleichen Teilen auf 2 Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt:

RNA aus Lysat...	Reaktionsgefäß 1 „O“-Ansätze	Reaktionsgefäß 2 „B“-Ansätze
Δ 250 +L +VP30	200 μ l	200 μ l
Δ 250 -L +VP30	200 μ l	200 μ l
Δ 250 +L -VP30	200 μ l	200 μ l

Die „O“-Ansätze wurden einer mRNA-Isolierung mittels Oligo(dT)-Zellulose unterzogen (3.8.2). Durch diesen Versuchsansatz wurde aus den „O“-Ansätzen nur polyadenylierte, also vollständig synthetisierte mRNA isoliert. Aus den „B“-Ansätzen wurde die mRNA mit Hilfe des Streptavidin-gekoppelten Primers #355 isoliert (3.8.3). Dieser Primer bindet an die Nukleotide 83-108 des EBOV-Antigenoms in (+)-Strang-Orientierung, was den Nukleotiden 28-53 der EBOV-NP-mRNA entspricht. Mit Hilfe dieses Primers wurden nicht nur EBOV-

spezifische polyadenylierte mRNAs aus der Gesamt-RNA isoliert, sondern auch kürzere, frühzeitig abgebrochene Fragmente der mRNA-Transkription. Die isolierten EBOV-spezifischen mRNAs wurden anschließend in der Northern-Blot-Hybridisierung analysiert (3.9.3-3.9.5) und die Signale der „O“-Ansätze mit denen der „B“-Ansätze verglichen. Falls VP30 als Transkriptionselongationsfaktor wirken würde, wären in den „O“-Ansätzen bei Anwesenheit von VP30 vollständig synthetisierte mRNAs nachweisbar, während in Abwesenheit von VP30 keine oder nur sehr schwache Signale detektiert werden könnten. In diesem Fall wäre das Ergebnis der „B“-Ansätzen in Anwesenheit von VP30 nicht von dem der „O“-Ansätzen unterscheidbar, in Abwesenheit von VP30 jedoch würde sich in den „B“-Ansätzen ein „Schmier“ an mRNA-Abbruchfragmente verschiedener Größen nachweisen lassen. Abbildung 35 zeigt den Vergleich der Ansätze.

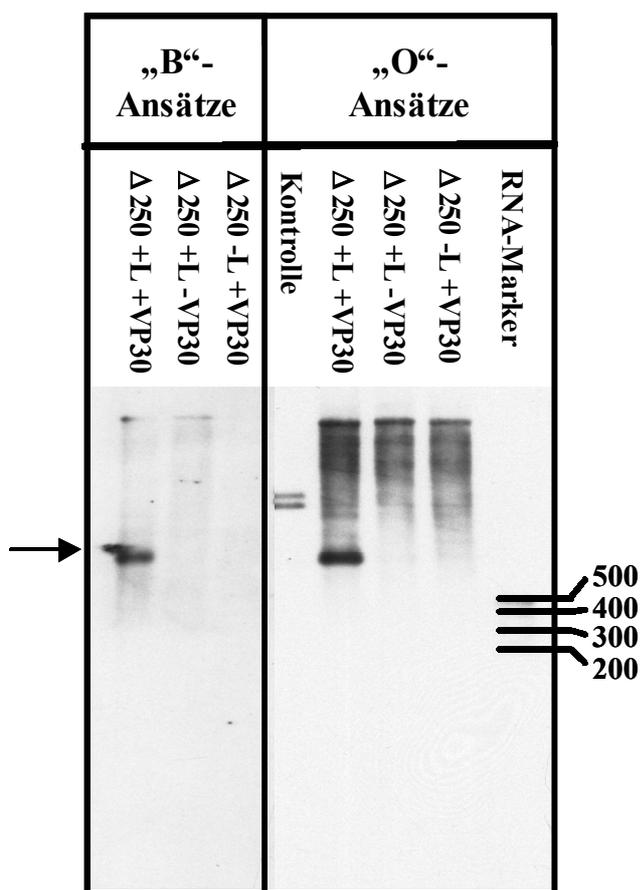


Abbildung 35:

Northern-Blot-Analyse transkribierter mRNAs, welche in An- und Abwesenheit von VP30 transkribiert wurden. Die „B“-Ansätze wurden mit dem Streptavidin-gekoppelten Primer #355 aus der jeweiligen Gesamt-RNA gereinigt, die „O“-Ansätze wurden mit Hilfe von Oligo(dT)-Zellulose isoliert. Den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen (-L) wurde das Plasmid pTM1/L_{EBO} nicht zugegeben, während den Transfektionsansätzen Δ250 +L –VP30 das Plasmid pTM1/VP30_{EBO} nicht zugesetzt wurde. Die korrespondierenden Fragmentgrößen des RNA-Markers sind auf der rechten Seite verzeichnet. Der Pfeil auf der linken Seite der Abbildung markiert die Größe der vollständig synthetisierten Minigenom-mRNA

Während in Anwesenheit von VP30 sowohl in den „O“-, als auch den „B“-Ansätzen vollständig synthetisierte mRNAs nachgewiesen wurden, waren in Abwesenheit von VP30 in den „B“-Ansätzen keine frühzeitig abgebrochenen Fragmente der mRNA-Transkription nachweisbar. Das VP30 des EBOV ist also kein Transkriptionselongationsfaktor sondern wirkt bei der Initiation der viralen Transkription mit.

4.5.2 RNA-Analyse mittels RNase-Protection Assay

Nachdem in 4.5.1 gezeigt wurde, daß in Abwesenheit von VP30 keine polyadenylierte mRNA synthetisiert wird, wurde in einem Folgeexperiment mittels RNase-Protection-Assay (RPA) untersucht ob kurze Abbruchfragmente der Transkription entstehen. HeLa-Zellen in 6er Zellkulturplatten (Zelldichte: 60%) wurden mit MVA-T7-Viren infiziert (3.12.3) und mit den Plasmiden pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO}, pTM1/L_{EBO} und Plasmid-DNA des Minigenoms Δ351 transfiziert (3.6.1). Folgende Plasmidkombinationen wurden eingesetzt: NP/VP35/VP30/L+Δ351, NP/VP35/L+Δ351 und NP/VP35/VP30+Δ351. Nach 30h wurde die Gesamt-RNA der Zellen mit Trizol®-Reagent isoliert (3.8.1) und einem RPA mit dem HybSpeed™ RPA-Kit unterzogen (3.9.7). Die verwendete Sonde wurde von dem HindIII-linearisierten (3.4.3.b) Konstrukt „pGem/EboLeader(-)260nt“ *in vitro* transkribiert und dabei mit [α -³²P]-UTP markiert (3.10.2). Die transkribierte RNA ist 518 Nukleotide lang, enthält die Nukleotide 1-272 des EBOV-Genoms in (-)-Strang-Orientierung und bindet somit an den komplementären Bereich des Antigenoms und der mRNA in (+)-Strang-Orientierung (siehe Abbildung 36).

Falls VP30 in der Transkription des EBOV als Elongationsfaktor wirkte, würden im RPA in den Ansätzen mit VP30 vollständig synthetisierte mRNAs durch die Sonde geschützt (Länge des geschützten Bereichs: 217 Nukleotide; siehe Abbildung 36). In den Ansätzen ohne VP30 hingegen sollte ein starker Hintergrund an vorzeitig abgebrochenen mRNA-Fragmenten unterschiedlichster Länge nachweisbar sein (Länge der geschützten Fragmente: ≤ 217 Nukleotide). Falls VP30 einen Transkriptionsinitiationsfaktor darstellte, so würden im RPA in den Ansätzen mit VP30 ebenfalls vollständig synthetisierte mRNAs durch die Sonde geschützt, wohingegen in den Ansätzen ohne VP30 keine geschützte Bande nachweisbar sein sollte, da die Transkription nicht oder sehr ineffizient initiiert

würde. Abbildung 37 zeigt ein Autoradiogramm des getrockneten Polyacrylamidgels nach dem RPA.

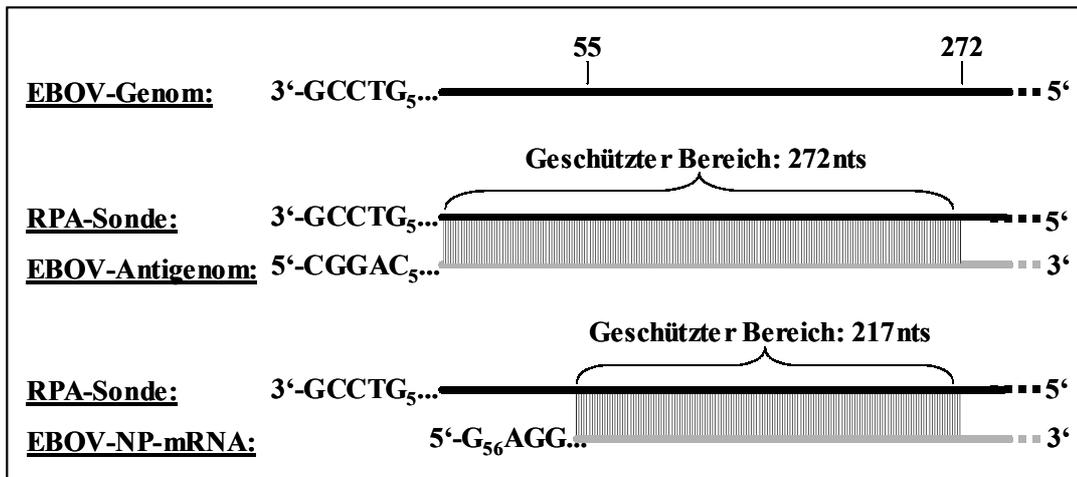


Abbildung 36: Darstellung der Bindungsbereiche der RPA-Sonde „pGem/EboLeader(-)260nt“ an antigenomischer RNA und NP-mRNA in (+)-Strang-Orientierung. RNA in (+)-Strang-Orientierung ist grau gekennzeichnet. Der jeweilige Bindungsbereich der Sonde wird durch vertikale Linien zwischen der Sonde und dem komplementären Bereich symbolisiert.

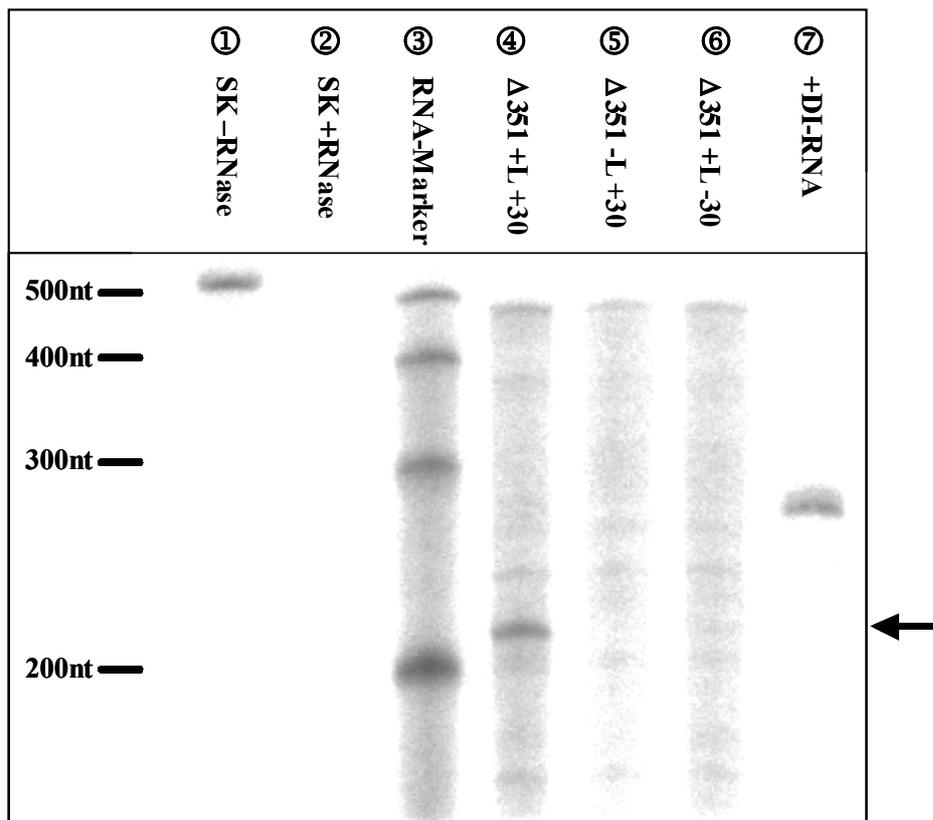


Abbildung 37: Autoradiogramm des RPA von RNAs, welche in An- und Abwesenheit von VP30 transkribiert wurden. Spur 1: Sondenkontrollen (SK) mit RNase. Spur 2: Sondenkontrollen ohne RNase. Spur 3: RNA-Größenstandard „Century RNA-Marker“. Spuren 4-6: Ansätze des RPA mit den aus Zellen isolierten RNAs. Spur 7: Kontrolle der Sondenerkennung mit *in vitro* transkribierter (+)DI-RNA in (+)-Strang-Orientierung. Dem Transfektionsansatz der Negativkontrolle (5) war das Plasmid pTM1/L_{EBO} nicht zugegeben worden. Der Pfeil weist auf die Fragmentgröße von 217 Nukleotiden hin.

Mit Hilfe des Versuchs konnte gezeigt werden, daß in Anwesenheit von VP30 vollständig synthetisierte mRNAs transkribiert werden, welche im RPA durch die Sonde geschützt sind [Abbildung 37, Spur (4)]. Abbruchbanden, die kleiner als der geschützte Bereich waren (217nts) wurden in Abwesenheit des VP30 nicht nachgewiesen [Abbildung 37, Spur (6)]. Die Versuchsergebnisse deuten darauf hin, daß VP30 an der Initiation der EBOV-Transkription beteiligt ist und nicht wie M2-1 als Transkriptionselongationsfaktor wirkt und stützen damit die Ergebnisse aus 4.5.1.

4.5.3 Die Transkription des EBOV ist in Anwesenheit von Actinomycin D

nicht mehr VP30-abhängig

Bei dem Versuch, den Hintergrund an nicht-EBOV-spezifischen RNA-Transkripten zu reduzieren, wurde eine unerwartete Beobachtung gemacht. HeLa-Zellen mit einer Zelldichte von 70% wurden mit MVA-T7-Virus infiziert (3.12.3) und mit den Plasmiden pTM1/NP_{EBO}, pTM1/VP35_{EBO}, pTM1/VP30_{EBO}, pTM1/L_{EBO} und Plasmid-DNA des Minigenoms Δ 351 transfiziert (3.6.1). In Ansätzen welche kein VP30 exprimieren sollten (-VP30), wurde den Transfektionsansätzen das Plasmid pTM1/VP30_{EBO} nicht zugegeben, während in den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen (-L) das Plasmid pTM1/L_{EBO} fehlte. 14 Stunden nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium gewechselt und gegen Actinomycin D-haltiges Medium ersetzt. Durch die durch Zugabe von 10µg Actinomycin D pro ml Medium wurde die DNA-abhängige RNA-Transkription der Zelle und des MVA-T7-Virus blockiert, jedoch nicht die RNA-abhängige RNA-Transkription der EBOV-Polymerase. 12h nach dem Wechsel des Mediums wurden die Zellen lysiert, die transkribierten mRNAs wurden mit Hilfe von Oligo(dT)-Zellulose isoliert (3.8.3) und in der Northern-Blot-Hybridisierung (3.9.3) analysiert. Abbildung 38 zeigt ein Bild des Blots nach sechsstündiger Prähybridisierung, 12h langer Hybridisierung (3.9.4) mit 6µl DIG-markierter (3.10.1) RNA-Sonde BS/-CAT und anschließender Detektion der DIG-markierten RNAs (3.9.5).

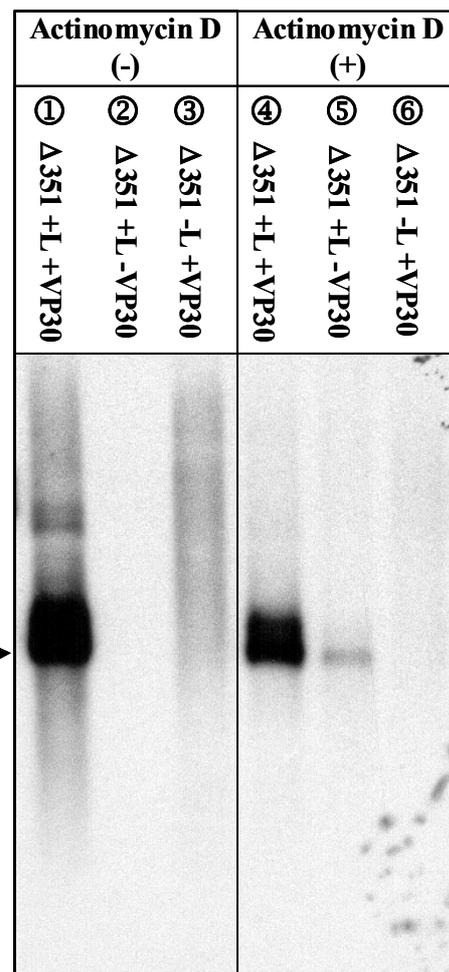


Abbildung 38: Northern-Blot-Analyse transkribierter mRNAs, welche in An- und Abwesenheit von VP30 und Actinomycin D transkribiert wurden. Den Ansätzen rechts (Spuren 4-6) wurden beim Wechsel des Transfektionsmediums Actinomycin D zugegeben [Actinomycin D (+)], während das Medium der Ansätze links (Spuren 1-3) kein Actinomycin D enthielt [Actinomycin D (-)]. Der Pfeil markiert die Position der erwarteten mRNA-Bande.

Es konnte gezeigt werden, daß in Abwesenheit von Actinomycin D und VP30 (Spur 2) keine minigenomische mRNA transkribiert wurde. Transkripte konnten in Abwesenheit von Actinomycin D (Spuren 1-3) nur nachgewiesen werden, wenn VP30 exprimiert worden war (Spur 1). Bei Anwesenheit von Actinomycin D (Spuren 4-6) konnte eine allgemeine Reduzierung der Transkriptionseffizienz beobachtet werden (Vergleich: Spur 1 und 4). Obwohl jedoch die Effizienz der Transkription in Anwesenheit von Actinomycin D reduziert war, ließ sich bei diesen Ansätzen auch in Abwesenheit von VP30 eine deutliche mRNA-Bande detektieren (Spur 5). Diese Ergebnisse lassen den Rückschluß zu, daß zelluläre Faktoren, oder Proteine des MVA-T7-Virus, eine VP30-unabhängige Transkription inhibieren.

5. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die für Mononegavirales ungewöhnlich lange Leader- / NP-NTR-Region (siehe Tabelle 2) des EBOV-Zaire untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß der genomische Promotor des EBOV in diesem Bereich lokalisiert ist, und es war möglich, ihn über Deletions- und Substitutionsmutanten näher einzugrenzen und zu charakterisieren. In diesem Bereich ist ebenfalls der TKS des NP-Gens lokalisiert, welcher laut Computervorhersage an der Bildung stabiler RNA-Sekundärstrukturen beteiligt ist (Mühlberger *et al.*, 1996). Über chemische Modifikation wurde die Morphologie der Sekundärstruktur untersucht und über Northern-Blot-Analysen verschiedener RNA-Spezies ein funktioneller Zusammenhang zur VP30-abhängigen Transkription hergestellt. Über verschiedene Mutanten konnte in bicistronischen Minigenomen nachgewiesen werden, daß die Sekundärstruktur am ersten TKS des EBOV-Genoms die Abhängigkeit von VP30 bedingt und die Transkription des zweiten Gens nicht auf VP30 angewiesen ist. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen der Transkription konnte auch die Funktion des VP30 näher charakterisiert werden. Es zeigte sich, daß dieses Protein nicht als Transkriptionselongationsfaktor wirkt, sondern an der Initiation der viralen Transkription beteiligt ist.

Virus	Länge der Leader- / NTR-Region des 1. Gens
EBOV-Zaire (Isolat Mayinga)	470 Nukleotide
Mumps-Virus	146 Nukleotide
Sendai-Virus	120 Nukleotide
Masern-Virus (Stamm Edmonston)	109 Nukleotide
Humanes Respiratorisches Synzytialvirus	99 Nukleotide
Vesikuläres Stomatitis- Virus (Serotyp Indiana)	64 Nukleotide

Tabelle 2: Vergleich der Längen der Leader- / NTR-Region des 1. Gens verschiedener Mononegavirales

5.1 DIE SEKUNDÄRSTRUKTUR AM TRANSKRIPTIONSSTART DES ERSTEN UND ZWEITEN GENS

Mittels chemischer Modifikation wurde die Morphologie der RNA-Sekundärstruktur der Nukleotide 56-78 des EBOV-Genoms sowohl in (-)-Strang-Orientierung als auch in (+)-Strang-Orientierung ermittelt. Es zeigte sich im Vergleich zu den Computervorhersagen (siehe Abbildungen 10 und 12), daß die „Loop“-Region der Sekundärstruktur nicht durch 3, sondern 7 [(+)-Strang-Orientierung] bzw. 11 [(-)-Strang-Orientierung] Nukleotide gebildet wurde. Die „Stamm“-Region der Sekundärstruktur wurde von 16 [(+)-Strang-Orientierung], bzw. 12 [(-)-Strang-Orientierung] Nukleotiden gebildet. In beiden Fällen waren die Nukleotide 56-61 und 73-78 an der Bildung der „Stamm“-Region beteiligt. Der Vergleich der Sekundärstrukturen zeigte, daß die experimentell bestimmte Sekundärstruktur in (-)-Strang-Orientierung mit $\Delta G = -4,4 \text{ kcal/mol}$ aus energetischer Sicht ungünstiger ist als die Sekundärstruktur in (+)-Strang-Orientierung mit $\Delta G = -7,4 \text{ kcal/mol}$ [berechnet mit dem Programm mfold Version 3.1 (Mathews *et al.*, 1999, Zuker *et al.*, 1999)]. Auch die Daten der chemischen Modifikation unterstützen die Annahme, daß die Sekundärstruktur in (-)-Strang-Orientierung etwas labiler ist und vor allem am Übergang des „Loop“-Bereichs zur „Stamm“-Region einer größeren Dynamik unterliegt. So waren z.B. die Nukleotide U₆₃ und A₇₂ in der negativsträngigen RNA nicht in allen Fällen eindeutig als modifiziert zu erkennen, was auf eine veränderliche Konformation dieser Region hindeuten könnte (siehe Kapitel 4.2.2).

RNA-Sekundärstrukturen spielen bei verschiedenen Prozessen in Zellen und Viren wichtige Rollen. So vermitteln RNA-Sekundärstrukturen z.B. die Initiation der Translation unabhängig von einer 5'-Cap-Struktur (Friebe *et al.*, 2001, Jang *et al.*, 1990), können die Initiation der Transkription regulieren (Beerens *et al.*, 2001) und bedingen durch ihre An- oder Abwesenheit die Stabilität von mRNAs und damit deren Halbwertszeit (Diwa *et al.*, 2000, Wellington *et al.*, 1993). Auch in der spezifischen Interaktion viraler Proteine mit RNA-Molekülen und damit verbundenen Transport- oder Regulationsschritten nehmen Sekundärstrukturen eine zentrale Stellung ein (Cullen, 1991). Nachdem die Bildung einer stabilen RNA-Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens sowohl in (+)-Strang- (4.2.1) als auch in (-)-Strang-Orientierung (4.2.2) experimentell belegt werden konnte,

wurde die funktionelle Bedeutung dieser Sekundärstruktur untersucht. An allen TKS des Genoms des EBOV ist die Bildung stabiler Sekundärstrukturen laut Computervorhersage möglich. Da diese Sekundärstrukturen auch bei Abweichungen des jeweiligen TKS-Signals von der konservierten Sequenz durch kompensatorische Mutationen aufrecht erhalten werden und in positivsträngiger RNA energetisch stabiler sind (siehe 5.1), wurde vermutet, daß es sich hierbei um wichtige Strukturen handelt, die an der Regulation der Translation (Mühlberger *et al.*, 1996) und/oder Transkription beteiligt sein könnten.

Durch Einbringen von Punktmutationen in die TKS-Region des ersten Gens wurde die Morphologie der Sekundärstruktur geändert, ohne die Nukleotidsequenz des konservierten TKS zu mutieren (4.2.4). Die Analyse der solchermaßen mutierten Minigenome ergab, daß Mutationen der Sekundärstruktur keinen negativen Effekt auf die Transkriptionseffizienz haben. Im Gegensatz dazu zeigte eine Minigenom-Mutante, welche eine Mutation im konservierten TKS besaß, eine deutlich reduzierte Transkriptionseffizienz. Diese Daten wurden als Hinweis darauf gewertet, daß es sich bei der Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens nicht um einen transkriptionsverstärkenden Faktor handelt wie es für andere Viren beschrieben ist (Wang & Zhang, 2000).

Da über chemische Modifikation gezeigt werden konnte, daß sich die RNA-Sekundärstruktur auch in einer NP-mRNA ähnlichen RNA ausbildet (4.2.3), war eine weitere mögliche Funktion dieser Struktur die Vermittlung der Translationsinitiation wie es z.B. für Vertreter der Picornaviridae gezeigt werden konnte (Jang *et al.*, 1990). Die Zerstörung der Sekundärstruktur durch multiple Mutationen (Leadmut-NheI-Mutante) hatte jedoch keinen negativen Einfluß auf die Synthese des Enzyms CAT (4.2.5-4.2.7). Auf Basis dieser Versuchsergebnisse wurde postuliert, daß die Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens nicht die Funktion einer internen Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) übernimmt. Neuere Untersuchungen haben zudem gezeigt, daß die mRNAs des EBOV eine 5'-Cap-Struktur besitzen (Modrof, J., persönliche Mitteilung) und daher nicht auf eine IRES angewiesen sind.

Erst Versuche mit der Minigenom-Mutante Leadmut-NheI in Abwesenheit von VP30 gaben einen Hinweis auf die Funktion der Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens. Im Gegensatz zum Minigenom 3E-5E, welches zur Transkription auf

das VP30 angewiesen ist (Mühlberger *et al.*, 1999), zeigte die Mutante Leadmut-NheI auch in Abwesenheit von VP30 CAT-Aktivität (4.2.7), und spezifische mRNA-Transkripte konnten nachgewiesen werden (4.2.8). Die Sekundärstruktur am TKS des NP-Gens hat also eine negativ-regulatorische Wirkung auf die Transkription, welche durch die Anwesenheit von VP30 kompensiert wird.

Nachdem gezeigt worden war, daß die Sekundärstruktur am TKS des NP-Gens die Transkription der mRNA in Abwesenheit von VP30 hemmt, wurden Versuche mit bicistronischen Minigenomen durchgeführt, welche zusätzlich zum TKS des NP-Gens auch den TKS des VP35-Gens beinhalteten (siehe Abbildung 19). In chemischen Modifikationsanalysen konnte gezeigt werden, daß sich auch am TKS des VP35-Gens eine stabile Sekundärstruktur ausbilden kann (Abbildung 22 / rechte Hälfte und Abbildung 23 / linke Hälfte). Der Vergleich zu der computervorhergesagten Sekundärstruktur (siehe Abbildung 3) zeigte eine exakte Übereinstimmung mit der experimentell bestimmten Sekundärstruktur. Mit einer freien Energie von $\Delta G = -11,3^{\text{kcal}}/\text{mol}$ ist diese Sekundärstruktur energetisch deutlich günstiger als die Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens.

Um die Funktion der Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gen zu klären, wurde ein bicistronisches Minigenom kloniert, bei welchem die Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens zerstört war (4.2.5). Sowohl in An- als auch in Abwesenheit von VP30 konnten bei der bicistronischen Minigenom-Mutante NheI-TK-BICI beide mRNAs nachgewiesen werden, während bei dem Ausgangskonstrukt BICI436 Transkripte nur in Anwesenheit von VP30 dedektierbar waren (4.3.2). Die Versuchsergebnisse belegen, daß die Transkription, sofern sie am ersten Gen erfolgreich initiiert hat, für die Transkription der folgenden Gene nicht mehr auf VP30 angewiesen ist, auch wenn sich an deren TKS-Regionen Sekundärstrukturen ausbilden. Der Transkriptionskomplex bindet also am ersten Gen und transkribiert dann die folgenden Gene in Richtung des Trailers (NP>VP35>... etc.) ohne sich neu an den TKS der jeweiligen Gene zu etablieren. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen bei anderen Mononegavirales überein (Glazier *et al.*, 1977, Piwnica-Worms & Keene, 1983).

Nachdem anhand der Mutante NheI-TK-BICI gezeigt worden war, daß die Transkription des zweiten Gens VP30-unabhängig verläuft, wurde die Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gens gegen die Sekundärstruktur des NP-TKS ausgetauscht (4.3.3 & 4.3.4). In Abwesenheit von VP30 wurde nur das erste Gen des Minigenoms transkribiert, während die mRNA des zweiten Gens, das unter Kontrolle der NP-Sekundärstruktur lag, nicht nachgewiesen werden konnte. In Anwesenheit von VP30 wurden dagegen beide Gene transkribiert. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die NP-Sekundärstruktur ein autonomes *cis*-aktives Element darstellt, dessen Wirkung unabhängig von seiner Position in einem bicistronischen Minigenom ist. Bei intakter NP-Sekundärstruktur ist VP30 für die Transkription des folgenden Gens essentiell.

Wie eingangs erwähnt, gibt es Sekundärstrukturen, welche mRNAs destabilisieren können. Da sich die NP-Sekundärstruktur auch in einer NP-mRNA ähnlichen RNA ausbilden kann (4.2.3), könnte es sich hier um ein solches Element handeln. Das Fehlen von mRNA-Transkripten in Abwesenheit von VP30 wäre dann auf eine extrem kurze Halbwertszeit dieser mRNAs zurückzuführen. Durch Koexpression von VP30 könnte die destabilisierende Wirkung dieses RNA-Elements möglicherweise durch Bindung kompensiert werden. Da für die Sekundärstruktur am TKS des VP35-Gens jedoch keine derartige Wirkung beobachtet wurde, (4.3.2) erscheint es unwahrscheinlich, daß nur die Expression des ersten Gens über einen solchen Mechanismus reguliert wird.

5.2 DIE ROLLE DES VP30 IN DER TRANSKRIPTION DES EBOV

Im Gegensatz zu den meisten Mononegavirales besitzt das EBOV 4 statt 3 NC-Proteine (Elliott *et al.*, 1985): NP, VP35, L und VP30. Während NP, VP35 und L ausreichen; um ein Minigenom zu replizieren, ist für eine effiziente Transkription auch das 4. NC-Protein, VP30, nötig (Mühlberger *et al.*, 1999). Eine ähnlich zentrale Rolle in der viralen Transkription wurde für ein Protein des RSV, einem Vertreter der Familie Paramyxoviridae (Genus Pneumovirus), beschrieben. Auch bei diesem Virus ist zusätzlich zu den NC-Proteinen N, P und L die Anwesenheit eines 4. Proteins, des M2-1, zur effizienten Transkription vollständig synthetisierter mRNAs notwendig (Collins *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß M2-1 bei der Transkription der RSV-mRNAs als Elongationsfaktor wirkt, in dessen Abwesenheit die mRNA-Synthese vorzeitig abgebrochen wird

und nur wenige polyadenylierte Transkripte entstehen. Da im EBOV-System in Abwesenheit des VP30 ebenfalls nur sehr geringe Transkriptionseffizienz nachgewiesen werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß es sich bei dem VP30 ebenfalls um einen Transkriptionselongationsfaktor handeln könnte. Die Analyse der Transkriptionsprodukte zeigte jedoch, daß keine unvollständig synthetisierten mRNAs in Abwesenheit von VP30 nachweisbar waren. Während in Anwesenheit von VP30 vollständige, polyadenylierte mRNAs synthetisiert wurden, konnten in Abwesenheit von VP30 keine mRNA-Spezies nachgewiesen werden (4.5.1 und 4.5.2). Dies weist darauf hin, daß bereits die Initiation der Transkription gehemmt wurde und VP30 als Transkriptionsinitiationsfaktor fungieren würde.

Bei Versuchsansätzen, denen Actinomycin D zur Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Synthese zugegeben worden war, konnten spezifische Minigenom-mRNA-Transkripte auch in Abwesenheit von VP30 nachgewiesen werden (4.5.3). Dieser Effekt könnte mit einer geringeren Menge an zellulären Nukleasen in Verbindung gebracht werden, da die Synthese zellulärer Proteine durch die Actinomycin D-vermittelte Blockierung der DNA-abhängigen RNA-Synthese behindert wurde. Wenn man jedoch in Betracht zieht, daß die Transkriptionseffizienz in Anwesenheit von Actinomycin D deutlich reduziert war, erscheint eine solche Erklärung unwahrscheinlich. Trotz der verminderten Transkription konnte auch in Abwesenheit von VP30 unter dem Einfluß von Actinomycin D eine EBOV-spezifische mRNA-Bande nachgewiesen werden. Da die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen durch Actinomycin D gehemmt werden, könnte der beobachtete Effekt darauf hindeuten, daß zelluläre Proteine, oder Proteine des MVA-T7-Virus, inhibitorisch auf eine VP30-unabhängige Transkription wirken. In Abwesenheit von Actinomycin D würden diese inhibitorischen Proteine synthetisiert und VP30 käme nach diesem Modell die Rolle zu den hemmenden Einfluß dieser Proteine zu neutralisieren.

5.3 EIN HYPOTHETISCHES MODELL DER TRANSKRIPTIONSREGULATION DES EBOV

Das folgende Modell vereint alle präsentierten Ergebnisse über die TKS-Regionen, die Funktion des VP30 und den Effekt von Actinomycin D.

In Abwesenheit von VP30 wird die Initiation der Transkription des EBOV vermutlich durch die Interaktion eines zellulären Proteins oder eines Proteins des MVA-T7-Virus mit der Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens behindert (Abbildung 39 ①). In diesem Fall läßt sich die mRNA-Transkription nur schwach oder gar nicht nachweisen. Wird VP30 in der Zelle koexprimiert (Abbildung 39 ②a), verdrängt es den hemmenden Faktor von der Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens. Ob VP30 dabei an das Protein bindet oder mit der RNA-Sekundärstruktur interagiert, ist nicht bekannt. Für das M2-1 Protein des RSV konnte eine RNA-Bindung gezeigt werden (Cuesta *et al.*, 2000), und es gibt auch erste Hinweise auf eine RNA-Interaktion des VP30 (Modrof, J., persönliche Mitteilung). Durch die Verdrängung des hemmenden Proteins und möglicherweise durch einen initiationserleichternden Einfluß des VP30 kann der Transkriptionskomplex effizient an die RNA binden, die Transkription wird initiiert und die Transkription des ersten Gens wird begonnen (Abbildung 39 ②b). Nachdem der Transkriptionskomplex die Transkription am TKSt des NP-Gens beendet hat, bleibt er an dem RNA-Genom gebunden und „überliest“ die intergenische Region zwischen dem NP- und VP35-Gen. Am Transkriptionsstart des VP35-Gens beginnt der Komplex erneut mit der mRNA-Synthese, ohne daß VP30 für diesen Vorgang notwendig ist (Abbildung 39 ②c). Das Minigenom Leadmut-NheI, bei dem die Ausbildung der NP-Sekundärstruktur durch Mutationen unterbunden ist, könnte nach diesem Modell VP30-unabhängig transkribieren, da die Interaktion der transkriptionshemmenden Proteine mit der minigenomischen RNA verhindert wird. Auch der Effekt der VP30-unabhängigen Transkription in Anwesenheit von Actinomycin D läßt sich mit diesem Modell erklären. Bei Zugabe von Actinomycin D wird die DNA-abhängige Transkription der Zelle und der MVA-T7-Viren unterdrückt. Die Konzentration an transkriptionshemmenden Proteinen wäre in diesem Fall reduziert und die Transkription des EBOV könnte VP30-unabhängig initiieren. Die Tatsache, daß diese VP30-unabhängige Transkription nicht sehr effizient ist (siehe Abbildung 38 zum Vergleich), könnte ein Hinweis darauf sein, daß VP30 zusätzliche Funktionen besitzt, welche dem Transkriptionskomplex die Transkriptionsinitiation erleichtern. Eine Möglichkeit wäre, daß das VP30 über eine RNA-Helikase-Aktivität verfügt, wie sie für mehrere Virusproteine beschrieben ist (Kadare & Haenni, 1997). Durch die Auflösung der Sekundärstruktur an der TKS-

Region des NP-Gens könnte VP30 so dem Transkriptionskomplex den Zugang zum konservierten TKS erleichtern.

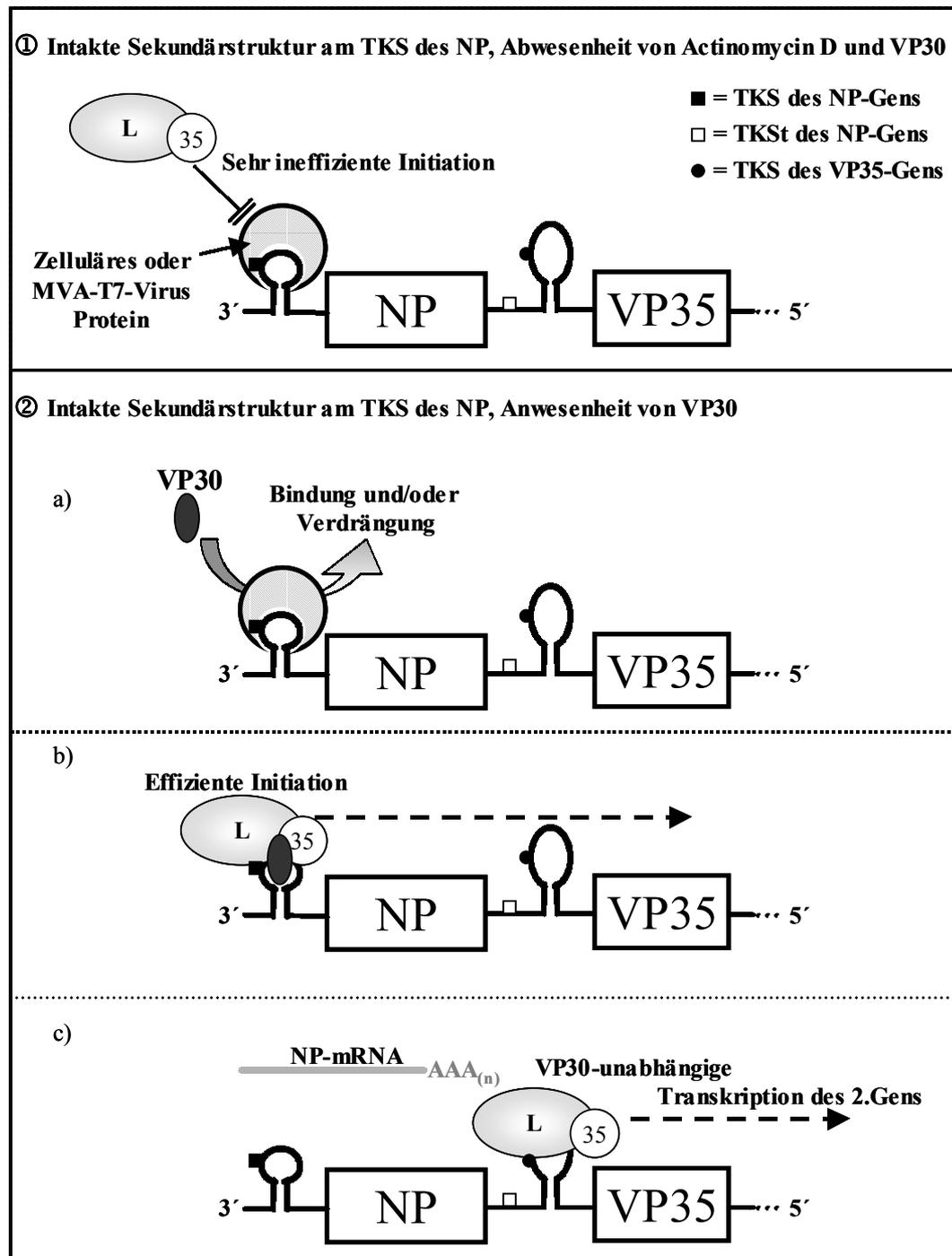


Abbildung 39: Hypothetisches Modell zur Regulation der Transkription bei EBOV

Das hier präsentierte Modell stellt eine grobe Vereinfachung der natürlichen Situation in der infizierten Zelle dar. Das Genom des EBOV liegt in der Zelle immer als Ribonukleoproteinkomplex, d.h. vollständig enkapsidiert vom NP (Elliott *et al.*, 1985), vor. Ob und wie sich RNA-Sekundärstrukturen bei einer

Enkapsidierung des Genoms mit NP ausbilden können, ist bisher unbekannt. Es ist jedoch zu bedenken, daß die Umhüllung mit NP zumindest zeitweise beim Zugriff des Transkriptions-/Replikationskomplexes auf das Genom geöffnet werden muß. Möglicherweise reicht dieser Zeitraum zur Bildung der Sekundärstrukturen aus.

5.4 DER GENOMISCHE PROMOTOR DES EBOV

Die 3'- und 5'-nichtkodierenden Regionen der Filoviren enthalten alle notwendigen Signale für die Replikation und Transkription des viralen Genoms (Mühlberger *et al.*, 1998, Mühlberger *et al.*, 1999). Da die Leader- und die NTR-Sequenz des NP-Gens ungewöhnlich lang sind, war eine Zielsetzung dieser Arbeit, diejenigen Nukleotide in diesem Bereich näher zu charakterisieren, die für die Replikation des Genoms essentiell sind. Unter den Mononegavirales sind 2 Typen von Promotoren beschrieben:

- (1) Ein einteiliger Promotor, der aus einer kurzen Sequenz am 3'-Ende des Genoms besteht. Ein solcher Promotortyp ist z.B. für das RSV und das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) beschrieben (Fearnly *et al.*, 2000, Li & Pattnaik, 1999).
- (2) Ein Promotor, der aus zwei getrennten Elementen besteht. Ein Element liegt direkt am 3'-Ende des Genoms, und ist vom zweiten Element durch eine unspezifische Sequenzfolge definierter Länge getrennt. Diesen Promotortyp findet man z.B. beim Sendai-Virus, dem humanen Parainfluenza-Virus Typ3 und beim Simian-Virus 5 (SV5) (Hoffman & Banerjee, 2000, Murphy & Parks, 1999, Tapparel *et al.*, 1998).

Da bei beiden Promotortypen dem 3'-Ende des Genoms eine essentielle Rolle bei der Replikation zukommt, wurde zunächst die Leader-Region des EBOV untersucht. Über chemische Modifikation wurde nachgewiesen, daß sich innerhalb der Nukleotide 1-49 gepaarte RNA-Bereiche befinden (4.4.1.1). Obwohl gezeigt werden konnte, daß komplementäre 3'- und 5'-Enden und damit potentielle Interaktionen von Leader und Trailer einen Einfluß auf die Replikation von VSV-Minigenomen haben (Wertz *et al.*, 1994), rührten die geschützten RNA-Bereiche von einer internen Sekundärstruktur des Leaders her. Eine Interaktion von Leader und Trailer konnte in den hier gezeigten Versuchen nicht nachgewiesen werden (4.4.1.2). Substitutionen von jeweils drei aufeinander-

folgenden Nukleotiden im Bereich der Leader-Sequenz 50-55 zeigten, daß der essentielle Sequenzbereich für die Replikation des Minigenoms mindestens bis zum TKS des ersten Gens an Position 56 reicht (4.4.1.4).

Um zu klären, ob der genomische Promotor über den TKS des ersten Gens hinausreicht, wurde der Bereich zwischen Nukleotid 55 und dem CAT-Gen des Minigenoms sukzessive von 5'- in 3'-Richtung verkürzt, und die entstandenen Deletionsmutanten wurden auf ihre Replikationsfähigkeit hin überprüft. Es zeigte sich, daß es zu einem deutlichen Abfall der Replikationseffizienz kam, sobald die Deletionen den Bereich der ersten 150 Nukleotide unterschritten. Im Bereich der Deletionsmutanten 108-94 kam es zu einem drastischen Absinken der Replikationseffizienz. Bei einer Deletion der Leader-/NTR-NP-Nukleotide 93-472 war keine Replikation mehr nachweisbar (4.4.2.1-4.4.2.2). Da ein Bereich von 150 Nukleotiden für einen einteiligen Promotor ungewöhnlich lang wäre (Fearnis *et al.*, 2000, Li & Pattnaik, 1999), wurde überprüft, ob die Sequenz zwischen Nukleotid 55 und 90 eine essentielle Funktion für die Replikation besitzt. Es konnte gezeigt werden, daß die Minigenom-Mutante $\Delta 250/x55-90$, in der die Nukleotide 55-90 gegen eine beliebige Sequenz gleicher Länge substituiert wurden, zur Replikation fähig war. Das bedeutet, daß die Nukleotide 55-90 keine essentielle Funktion bei der Replikation haben. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Versuchen an den genomischen und antigenomischen Promotoren anderer Mononegavirales (Hoffman & Banerjee, 2000, Murphy *et al.*, 1998). Untersuchungen an den Promotoren des Sendai-Virus und dem antigenomischen Promotor des SV5 haben gezeigt, daß der Abstand der beiden Promotorelemente zueinander eine kritische Rolle für die Vermittlung der viralen Replikation spielt (Murphy *et al.*, 1998, Tapparel *et al.*, 1998). Versuche mit einem EBOV-spezifischen Minigenom, bei welchem die Region zwischen den Nukleotiden 55-90 um 4 Nukleotide verlängert worden war ($\Delta 250/SpeI+4$), zeigten ähnliche Resultate: das Minigenom $\Delta 250/SpeI+4$ war nicht mehr zur Replikation befähigt (4.4.3.3-4.4.3.4). Aus diesen Ergebnissen wurde rückgeschlossen, daß der genomische Promotor des EBOV aus zwei Sequenzelementen besteht, deren Abstand zueinander kritisch für die Funktion des Promotors ist.

Da die Replikationseffizienz im Bereich der Nukleotide 108-94 stark zurückging, wurde hier das zweite Promotorelement vermutet. Über eine Substitution der Nukleotide 90-110 wurde ein Minigenom kloniert ($\Delta 250/x90-110$), in welchem

dieser Bereich gegen eine beliebige Sequenz substituiert ist (4.4.3.5). Der Replikationsnachweis zeigte jedoch, daß das Minigenom $\Delta 250/x90-110$ fast ebenso gut repliziert wurde wie das Ausgangskonstrukt (4.4.3.6). Aus diesen Versuchsergebnissen wurde geschlossen, daß der Hauptanteil des zweiten Promotorelements zwischen den Nukleotiden 110-150 lokalisiert sein muß, während zwischen den Nukleotiden 92-110 nur noch ein kleinerer Anteil dieses Promotorelements liegt.

5.5 EIN HYPOTHETISCHES MODELL DES GENOMISCHEN PROMOTORS DES EBOV

Der Promotor des EBOV setzt sich aus zwei Teilen zusammen. Ein hypothetisches Modell des genomischen Promotors ist in Abbildung 40 dargestellt. Das erste Element (Abbildung 40: PE1) ist im Bereich der Leader-Nukleotide 1-55 lokalisiert, während das zweite Element (Abbildung 40: PE2) zwischen den Nukleotiden 92-150 lokalisiert ist. Der Hauptanteil des PE2 befindet sich dabei im Bereich der Nukleotide 110-150 und ein kleinerer, substituierbarer Teil zwischen den Nukleotiden 92-110. Wird das Element PE2 sukzessive deletiert, so vermitteln die Nukleotide 92-110 noch eine basale Replikation (Abbildung 40: PE2, schraffierter Bereich) bis die Deletionen das Nukleotid 93 unterschreiten. Wird der Sequenzbereich zwischen den Nukleotiden 90 bis 110 substituiert, hat der Austausch dieser Sequenz keinen dramatischen Effekt auf die Replikationseffizienz, da der Hauptteil des PE2 (Abbildung 40: PE2, schwarze Fläche) weiterhin eine effiziente Replikation vermittelt.

Während die Sequenz der Region zwischen PE1 und PE2 keine signifikante Rolle für die Replikationseffizienz spielt, ist ihre Länge und damit der exakte Abstand der beiden Elemente zueinander von elementarer Bedeutung für die Funktion des Promotors. Für Sendai-Virus, einen Vertreter der Paramyxoviridae, welcher strikt der sogenannten „Rule of six“ folgt (Calain & Roux, 1993), konnte gezeigt werden, daß durch den Abstand der Promotorelemente zueinander das erste Element in der dreidimensionalen Struktur des Nukleokapsids auf der gleichen Seite der Helix zu liegen kommt wie das Promotorelement 2 (Tapparel *et al.*, 1998). Es wird vermutet, daß die beiden Elemente Teile einer gemeinsamen Erkennungsstelle des viralen Polymerase-Komplexes sind. Obwohl EBOV nicht

der „Rule of six“ folgt, könnte eine solche oder ähnliche Regel für den Abstand der Promotorelemente zueinander eine wichtige Rolle spielen.

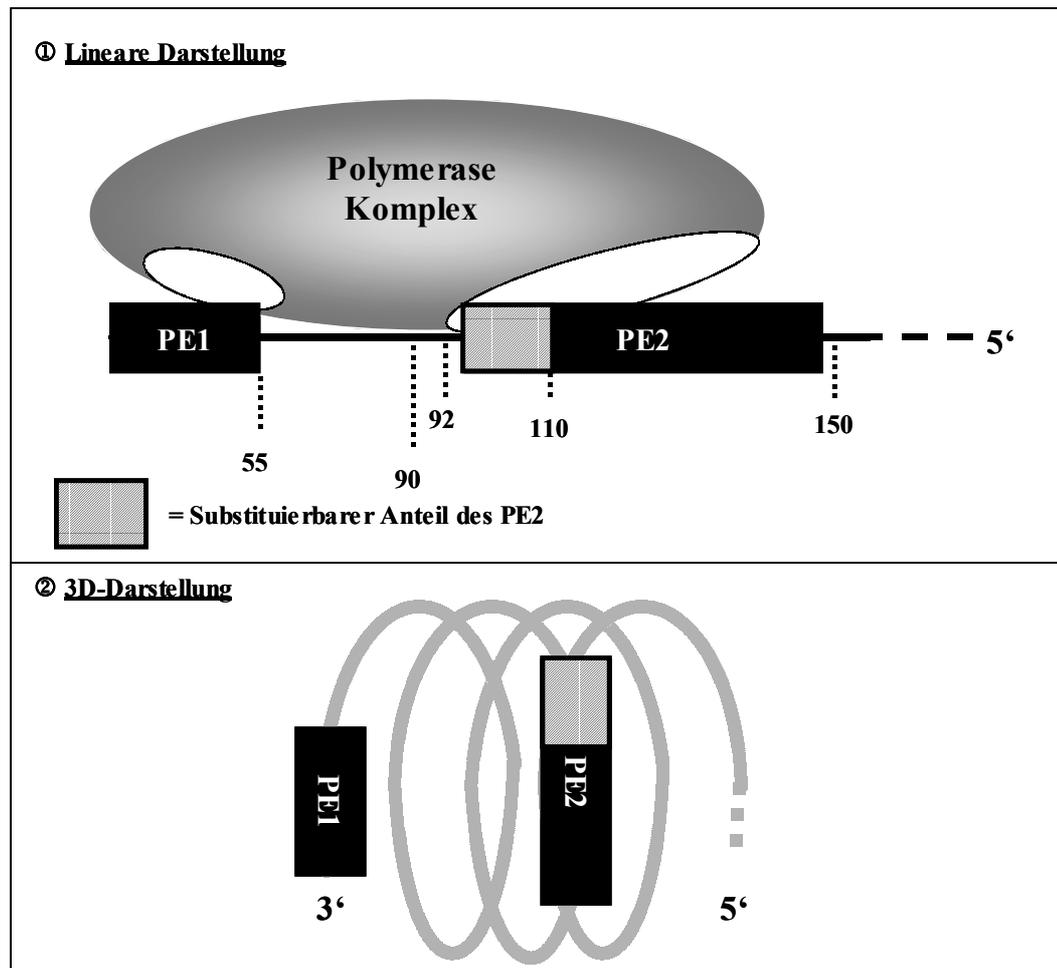


Abbildung 40: Hypothetisches Modell zum Aufbau des genomischen Promotors des EBOV

Ebenfalls für Sendai-Virus konnte gezeigt werden, daß die „N-Phase“ (die Enkapsidierung von je 6 Nukleotiden von einem Molekül N-Protein), in welcher die Promotorelemente der Polymerase präsentiert werden, von entscheidender Bedeutung für die Replikation ist (Vulliemoz & Roux, 2001). 3 G-Reste des zweiten Promotorelements, welche in einem Abstand von 6 Nukleotiden zueinander positioniert sind und eine Schlüsselrolle in der Promotorfunktion des zweiten Elements einnehmen, waren in replikationsfähigen Minigenomen immer an Position „1“ einer N-Enkapsidierungseinheit lokalisiert. Wurde der Leaderbereich des Minigenoms um eine nicht durch 6 teilbare Anzahl an Nukleotiden verlängert und damit die „N-Phase“ der Promotorelemente zueinander geändert, war keine Replikation mehr nachweisbar. Die hier präsentierten Ergebnisse stützen die Vermutung, daß auch für EBOV die „NP-Phase“ eine wichtige Rolle spielen könnte. So könnten z.B. die

Versuchsergebnisse mit dem replikationsdefizienten Minigenom $\Delta 250/\text{SpeI}+4$ (4.4.3.3) oder der Befund, daß ein zusätzliches Nukleotid am 3'-Ende des Trailers in (+)-Strang-Orientierung (4.1.2) die Replikation hemmt, so gedeutet werden, daß bei diesen Minigenomen die „NP-Phase“ verschoben wurde.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Genom des Ebola-Virus (EBOV) ist mit einer Länge von ca. 19kb eines der größten innerhalb der Ordnung Mononegavirales. An den Genomenden sind ungewöhnlich lange nicht-translatierte Regionen lokalisiert, welche essentielle regulatorische Signale für die Replikation und Transkription beinhalten (Mühlberger *et al.*, 1999). Während für die Replikation nur drei Nukleokapsidproteine nötig sind, wird für die Transkription auch das vierte Nukleokapsidprotein, VP30, benötigt. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Transkriptions- und Replikationsrelevanten Regulationssignalen und der Funktion des VP30 bei der Transkription.

Untersuchung EBOV-spezifischer mRNAs mittels RNase Protection- und Northern Blot-Analysen ergab, daß das VP30 des EBOV als Transkriptions-initiationsfaktor fungiert. Die VP30 vermittelte Transkriptionsinitiation ist dabei abhängig von der Struktur des Transkriptionsstarts des ersten Gens (TKS1).

Mittels chemischer Modifikation konnte die Bildung computervorhergesagter Sekundärstrukturen am TKS1 und dem TKS des zweiten Gens (TKS2) gezeigt und ihre Struktur bestimmt werden. Bei mutierten monocistronischen Minigenomen, welche unter Beibehaltung der hoch konservierten Nukleotidsequenz des TKS1 keine Sekundärstruktur mehr ausbilden, konnte die Transkription auch ohne VP30 initiieren. Weitergehende Analysen an bicistronischen Minigenomen ergaben, daß die Transkriptionsinitiation des zweiten Gens trotz intakter Sekundärstruktur des TKS2 VP30-unabhängig verlief. Wurde diese jedoch durch die Sekundärstruktur des TKS1 ausgetauscht, so war nun auch die Transkription des zweiten Gens VP30-abhängig. Das heißt, daß die VP30-abhängige Transkription an die Sekundärstruktur des intakten TKS1 gekoppelt ist unabhängig von deren Position im bicistronischen Minigenom.

Über Deletions- und Substitutionsmutanten konnte der genomische Promotor des EBOV näher eingegrenzt und charakterisiert. Es wurde gezeigt, daß sich der genomische Promotor aus zwei Promotorelementen konstituiert, die in einem definierten Abstand zueinander liegen müssen. Das erste Element erstreckt sich über die Nukleotide 1-55 und ist in der Lage, eine stabile RNA-Sekundärstruktur auszubilden. Das zweite Element ist zwischen den Nukleotiden 92-150 lokalisiert. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten deuten auf einen unter den

Mononegavirales neuartigen Regulationsmechanismus der Transkription hin. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß das EBOV einen zweiteiligen genomischen Promotor besitzt wie er auch für das Sendai-Virus beschrieben ist.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Basler, C. F., Wang, X., Mühlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H. D., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (2000). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12289-94.
- Beerens, N., Groot, F. & Berkhout, B. (2001). Initiation of HIV-1 reverse transcription is regulated by a primer activation signal. *J Biol Chem* **276**, 31247-56.
- Buchholz, U. J., Finke, S. & Conzelmann, K. K. (1999). Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* **73**, 251-9.
- Bwaka, M. A., Bonnet, M. J., Calain, P., Colebunders, R., De Roo, A., Guimard, Y., Katwiki, K. R., Kibadi, K., Kipasa, M. A., Kuvula, K. J., Mapanda, B. B., Massamba, M., Mupapa, K. D., Muyembe-Tamfum, J. J., Ndaberey, E., Peters, C. J., Rollin, P. E. & Van den Enden, E. (1999). Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**, S1-7.
- Calain, P. & Roux, L. (1993). The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* **67**, 4822-30.
- CDC (1990a). Update: filovirus infection in animal handlers. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **39**, 221.
- CDC (1990b). Update: filovirus infections among persons with occupational exposure to nonhuman primates. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **39**, 266-7; 273.
- Collins, P. L., Hill, M. G., Cristina, J. & Grosfeld, H. (1996). Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 81-5.
- Conzelmann, K. K. (1996). Genetic manipulation of non-segmented negative-strand RNA viruses. *J Gen Virol* **77**, 381-9.
- Cuesta, I., Geng, X., Asenjo, A. & Villanueva, N. (2000). Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J Virol* **74**, 9858-67.

- Cullen, B. R. (1991). Regulation of HIV-1 gene expression. *Faseb J* **5**, 2361-8.
- Dessen, A., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H. D. & Weissenhorn, W. (2000). Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *Embo J* **19**, 4228-36.
- Diwa, A., Bricker, A. L., Jain, C. & Belasco, J. G. (2000). An evolutionarily conserved RNA stem-loop functions as a sensor that directs feedback regulation of RNase E gene expression. *Genes Dev* **14**, 1249-60.
- Dowell, S. F., Mukunu, R., Ksiazek, T. G., Khan, A. S., Rollin, P. E. & Peters, C. J. (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.
- Elliott, L. H., Kiley, M. P. & McCormick, J. B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* **147**, 169-76.
- Fearn, R., Collins, P. L. & Peeples, M. E. (2000). Functional analysis of the genomic and antigenomic promoters of human respiratory syncytial virus. *J Virol* **74**, 6006-14.
- Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N. & Bartenschlager, R. (2001). Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* **75**, 12047-57.
- Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. & Moss, B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8122-6.
- Galinski, M. S. (1991). Paramyxoviridae: transcription and replication. *Adv Virus Res* **39**, 129-62.
- Glazier, K., Raghov, R. & Kingsbury, D. W. (1977). Regulation of Sendai virus transcription: evidence for a single promoter in vivo. *J Virol* **21**, 863-71.
- Grosfeld, H., Hill, M. G. & Collins, P. L. (1995). RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J Virol* **69**, 5677-86.
- Harcourt, B. H., Sanchez, A. & Offermann, M. K. (1998). Ebola virus inhibits induction of genes by double-stranded RNA in endothelial cells. *Virology* **252**, 179-88.

- Hoffman, M. A. & Banerjee, A. K. (2000). Precise mapping of the replication and transcription promoters of human parainfluenza virus type 3. *Virology* **269**, 201-11.
- ICTV (1991). The order Mononegavirales. *Arch Virol* **117**, 137-40.
- Iverson, L. E. & Rose, J. K. (1982). Sequential synthesis of 5'-proximal vesicular stomatitis virus mRNA sequences. *J Virol* **44**, 356-65.
- Jang, S. K., Pestova, T. V., Hellen, C. U., Witherell, G. W. & Wimmer, E. (1990). Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme* **44**, 292-309.
- Kadare, G. & Haenni, A. L. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *J Virol* **71**, 2583-90.
- Kiley, M. P., Wilusz, J., McCormick, J. B. & Keene, J. D. (1986). Conservation of the 3' terminal nucleotide sequences of Ebola and Marburg virus. *Virology* **149**, 251-4.
- Kingsbury, D. W. (1990). Paramyxoviridae and their replication. In *Fields Virology*, 2 edn, pp. 945-962. Edited by B. N. Fields, and D.M. Knipe. New York: New York.
- Li, T. & Pattnaik, A. K. (1999). Overlapping signals for transcription and replication at the 3' terminus of the vesicular stomatitis virus genome. *J Virol* **73**, 444-52.
- Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D. H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* **288**, 911-40.
- Miranda, M. E., Ksiazek, T. G., Retuya, T. J., Khan, A. S., Sanchez, A., Fulhorst, C. F., Rollin, P. E., Calaor, A. B., Manalo, D. L., Roces, M. C., Dayrit, M. M. & Peters, C. J. (1999). Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**, S115-9.
- Mühlberger, E., Lotfering, B., Klenk, H. D. & Becker, S. (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.
- Mühlberger, E., Trommer, S., Funke, C., Volchkov, V., Klenk, H. D. & Becker, S. (1996). Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Virology* **223**, 376-80.

- Mühlberger, E., Weik, M., Volchkov, V. E., Klenk, H. D. & Becker, S. (1999). Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J Virol* **73**, 2333-42.
- Murphy, S. K., Ito, Y. & Parks, G. D. (1998). A functional antigenomic promoter for the paramyxovirus simian virus 5 requires proper spacing between an essential internal segment and the 3' terminus. *J Virol* **72**, 10-9.
- Murphy, S. K. & Parks, G. D. (1999). RNA replication for the paramyxovirus simian virus 5 requires an internal repeated (CGNNNN) sequence motif. *J Virol* **73**, 805-9.
- Ndambi, R., Akamituna, P., Bonnet, M. J., Tukadila, A. M., Muyembe-Tamfum, J. J. & Colebunders, R. (1999). Epidemiologic and clinical aspects of the Ebola virus epidemic in Mosango, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**, S8-10.
- Peters, C. J., Sanchez, A., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G. & Murphy, F. A. (1996). Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. In *Fields Virology*, 3 edn, pp. 1161-1176. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. New York/Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Piwnica-Worms, H. & Keene, J. D. (1983). Sequential synthesis of small capped RNA transcripts in vitro by vesicular stomatitis virus. *Virology* **125**, 206-18.
- Roels, T. H., Bloom, A. S., Buffington, J., Muhungu, G. L., Mac Kenzie, W. R., Khan, A. S., Ndambi, R., Noah, D. L., Rolka, H. R., Peters, C. J. & Ksiazek, T. G. (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.
- Sutter, G., Ohlmann, M. & Erfle, V. (1995). Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett* **371**, 9-12.
- Tapparel, C., Maurice, D. & Roux, L. (1998). The activity of Sendai virus genomic and antigenomic promoters requires a second element past the leader template regions: a motif (GNNNNN)₃ is essential for replication. *J Virol* **72**, 3117-28.

- Volchkov, V. E., Feldmann, H., Volchkova, V. A. & Klenk, H. D. (1998). Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5762-7.
- Vulliemoz, D. & Roux, L. (2001). "Rule of six": how does the Sendai virus RNA polymerase keep count? *J Virol* **75**, 4506-18.
- Wagner, R. R. (1990). Rhabdoviridae and their replication. In *Fields Virology*, 2 edn, pp. 867-881. Edited by B. N. Fields, and D.M. Knipe. New York: Raven Press.
- Wang, Y. & Zhang, X. (2000). The leader RNA of coronavirus mouse hepatitis virus contains an enhancer-like element for subgenomic mRNA transcription. *J Virol* **74**, 10571-80.
- Weik, M. (1999). Klonierung und Expression eines funktionellen L-Proteins des Ebola-Virus und Etablierung eines Replikationssystems. In *Institut für Virologie*. Marburg: Philipps-Universität.
- Wellington, C. L., Greenberg, M. E. & Belasco, J. G. (1993). The destabilizing elements in the coding region of c-fos mRNA are recognized as RNA. *Mol Cell Biol* **13**, 5034-42.
- Wertz, G. W., Whelan, S., LeGrone, A. & Ball, L. A. (1994). Extent of terminal complementarity modulates the balance between transcription and replication of vesicular stomatitis virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8587-91.
- Zheng, H., Lee, H. A., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. (1999). Influenza A virus RNA polymerase has the ability to stutter at the polyadenylation site of a viral RNA template during RNA replication. *J Virol* **73**, 5240-3.
- Zuker, M., Mathews, D. H. & Turner, D. H. (1999). Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, pp. 11-43. Edited by J. Barciszewski & B. F. C. Clark. Kluwer: Academic Publishers.

8. ABBILDUNGS-, TABELLEN- UND DIAGRAMMVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Abbildung 1:	Morphologie des EBOV.....	3
Abbildung 2:	Genomorganisation des EBOV-Zaire.....	4
Abbildung 3:	Computervorhersage der Sekundärstrukturen in den Bereichen der TKS.....	5
Abbildung 4:	Schematische Übersicht über die Funktionsweise des EBOV spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem.....	7
Abbildung 5:	Aufbau des EBOV-Minigenoms 3E-5E im Vergleich zum Genom.....	8

4. ERGEBNISSE

Abbildung 6:	Schema der verschiedenen RNA-Spezies und ihrer Unterschiede.....	50
Abbildung 7:	Strategie zur Klonierung eines EBOV-Minigenoms in (+)-Strang- Orientierung, ausgehend von dem Konstrukt 3E-5E.....	52
Abbildung 8:	Vergleich der CAT-Aktivität in Zellysaten des Konstrukts (+)DI _G und (+)DI.....	53
Abbildung 9:	Autoradiogramm einer chemischen Modifizierung an <i>in vitro</i> transkribierter DI RNA in (+)-Strang-Orientierung.....	56
Abbildung 10:	Darstellung der vom Computer vorhergesagten und der experimentell ermittelten Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens in RNA in (+)-Strang-Orientierung.....	57
Abbildung 11:	Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an <i>in vitro</i> transkribierter Minigenom-RNA in (-)-Strang-Orientierung.....	58
Abbildung 12:	Darstellung der experimentell ermittelten Sekundärstruktur am TKS des ersten Gens in RNA negativer Polarität.....	59
Abbildung 13:	Klonierungsstrategie des Minigenoms mRNA-DI.....	60
Abbildung 14:	Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an <i>in vitro</i> transkribierter RNA des mRNA-DI.....	62
Abbildung 15:	CAT-Assay der Mutanten Leadmut#2, #3, #4 und #5 im Vergleich zum Minigenom 3E-5E.....	64
Abbildung 16:	Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an <i>in vitro</i> transkribierter (+)Leadmut-NheI-RNA im Vergleich zur chemischen Modifizierung an <i>in vitro</i> transkribierter (+)DI-RNA.....	67
Abbildung 17:	CAT-Assay der Mutante (+)Leadmut-NheI im Vergleich zum Mini- genom 3E-5E in An- und Abwesenheit von VP30.....	69
Abbildung 18:	Northern-Blot-Analyse der mRNA von Mutante (-)Leadmut-NheI im Vergleich zum Minigenom 3E-5E in An- und Abwesenheit von VP30.....	70
Abbildung 19:	Aufbau des bicistronischen Minigenoms BICI 436 und der Mutante NheI-TK-BICI in (-)-Strang-Orientierung.....	71
Abbildung 20:	Northern-Blot-Analyse der mRNA von Mutante NheI-TK-BICI im Ver- gleich zum Minigenom BICI 436 in An- und Abwesenheit von VP30.....	73
Abbildung 21:	Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Mutanten sIR_NPss und sIR_XhoI.1_2.....	75
Abbildung 22:	Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an <i>in vitro</i> transkribierter (-)sIR_XhoI.1_2-RNA im Vergleich zur chemischen Modifizierung an <i>in vitro</i> transkribierter (-)sIR_NPss-RNA.....	77
Abbildung 23:	Darstellung der experimentell ermittelten Sekundärstruktur am TKS des zweiten Gens in den Mutanten (-)sIR_XhoI.1_2 und (-)sIR_NPss.....	78
Abbildung 24:	Northern-Blot-Analyse von mRNA der Konstrukte BICI 436, NheI-TK-BICI und NheI-TK-BICI/ NPss@IRNP-VP35.....	79
Abbildung 25:	Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an <i>in vitro</i> transkribierter (+)DI-RNA im Vergleich zur radioaktiven Sequenzierung an denaturierter Plasmid-DNA.....	82

<u>Abbildung 26:</u>	Autoradiogramm der chemischen Modifizierung an <i>in vitro</i> transkribierter (+)DI-RNA im Vergleich zu <i>in vitro</i> transkribierter Leader-RNA in (+)-Strang-Orientierung.....	84
<u>Abbildung 27:</u>	Darstellung der experimentell ermittelten Sekundärstruktur in der Leader-Region des EBOV in (+)-Strang-Orientierung.....	85
<u>Abbildung 28:</u>	Northern-Blot-Analyse replizierter RNA der Mutanten (-)DI/x53-55, (-)DI/x50-52 und (-)DI/x44-46 im Vergleich zu Minigenom 3E-5E.....	87
<u>Abbildung 29:</u>	Klonierungsstrategie der Deletionsmutanten $\Delta 52$ bis $\Delta 351$	88
<u>Abbildung 30:</u>	Northern-Blot-Analyse replizierter RNA der Deletionsmutanten $\Delta 92$ bis $\Delta 300$ im Vergleich zu Minigenom 3E-5E.....	91
<u>Abbildung 31:</u>	Klonierungsstrategie zur Erzeugung der Mutante $\Delta 250$ /SpeI;SacII.....	93
<u>Abbildung 32:</u>	Northern-Blot-Analyse replizierter RNA der Mutante $\Delta 250$ /x55-90 im Vergleich zur replizierten RNA der Minigenome $\Delta 250$ und $\Delta 250$ /SpeI,SacII.....	94
<u>Abbildung 33:</u>	Northern-Blot-Analyse replizierter RNA der Mutante $\Delta 250$ /SpeI+4 im Vergleich zu den Minigenommutanten $\Delta 250$ /SpeI,SacII und $\Delta 250$ /x55-90.....	96
<u>Abbildung 34:</u>	Northern-Blot-Analyse replizierter RNA der Mutante $\Delta 250$ /x90-110 im Vergleich zu replizierter RNA des Minigenoms $\Delta 250$ /SpeI,SacII.....	97
<u>Abbildung 35:</u>	Northern-Blot-Analyse transkribierter mRNAs, welche in An- und Abwesenheit von VP30 transkribiert wurden.....	99
<u>Abbildung 36:</u>	Darstellung der Bindungsbereiche der RPA-Sonde „pGem/Ebo Leader(-)260nt“ an antigenomischer RNA und NP-mRNA in (+)-Strang-Orientierung.....	101
<u>Abbildung 37:</u>	Autoradiogramm des RPA von RNAs, welche in An- und Abwesenheit von VP30 transkribiert wurden.....	101
<u>Abbildung 38:</u>	Northern-Blot-Analyse transkribierter mRNAs, welche in An- und Abwesenheit von VP30 und Actinomycin D transkribiert wurden.....	103
<u>Diagramm 1:</u>	Quantifizierung des CAT-Assays der Mutanten Leadmut (LM) #2, #3, #4 und #5 im Vergleich zum Minigenom 3E-5E.....	64
<u>Diagramm 2:</u>	Quantifizierung des CAT-ELISA der Deletionsmutanten $\Delta 52$ bis $\Delta 351$ im Vergleich zum Minigenom 3E-5E.....	90
<u>Tabelle 1:</u>	Auflistung aller klonierten Deletionsmutanten.....	89
 5. DISKUSSION		
<u>Abbildung 39:</u>	Modell zur Regulation der Transkription bei EBOV.....	111
<u>Abbildung 40:</u>	Modell zum Aufbau des genomischen Promotors des EBOV.....	115
<u>Tabelle 2:</u>	Vergleich der Längen der Leader- / NTR-Region des 1. Gens verschiedener Mononegavirales.....	104

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
BHK	baby hamster kidney
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CAMP	Chloramphenicol
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
def.	deficient
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig(e)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBOV	Ebola-Virus
G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GP	Glykoprotein
h	Stunde(n)
HDV	Hepatitis-Delta-Virus
IRES	interne Ribosomen-Eintrittsstelle
l	Liter
L	„large“ Protein
M	Mol
m	Meter
MBGV	Marburg-Virus
min	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NC	Nukleokapsid
NP	Nukleoprotein
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure

RPA	RNase-Protection-Assay
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkription
ss	single strand = Einzelstrang
SV5	Simian-Virus 5
T	Thymin
TKS	Transkriptionsstart
TKSt	Transkriptionsstopp
U	units
UpM	Umdrehungen pro Minute
VP	Virusprotein
VSV	vesikuläres Stomatitis-Virus

Bedeutung von Vorsilben am Beispiel der SI-Einheit Gramm (g):

Symbol	Vorsilbe	Faktor
kg	kilo...	10^3 g
mg	milli...	10^{-3} g
μ g	mikro...	10^{-6} g
ng	nano...	10^{-9} g
pg	piko...	10^{-12} g


```

121      130      150      170
GCGAGCCTTCTGATGAGCGTGGTCAATGTCTTAATTATCATTAAACACGAAGATTATTATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
181      190      210      230
TAGTCTGCTATATTGTAAGAAGGTATTTCTGATTTTACAGTCCTGCCTTTTCTTTAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
240      250      270      290
TTTATCATTCTGTATGAAATAGTAGCTTACTAGACAAAAATGTTAAGGTTATTACACCTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
301      310      330      350
ATCTCTTATTTTACACAAAGATTAAGGCTATCACCGTTTTTAAAACGACAAATTAAAGTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
361      370      390      410
ATGATAATTATAAAAACTTAATCTTAAAGATCAATTTTGTTTTAAAGAAGTTGTGTATC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
421      430      450      470
AACCAAAACACTATTCCATCTGACAGGATATTGATACAACATTATTATATCAATAACAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
481      490      510      530
ATGAGCCCAGACCTTCGTTAAAGCTTAATTATAAAGAGTGCAGAGTTTATTATGTTGCGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
541      550      570      590
TAAATTCATTGCGGCAGTAATATGTCACACATGCTGCATTGTGAATTTTTTGATTATCAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
601      610      630      650
GCAGGGAGAGAGGCTAAATATAGTATATAATATAGGGACTCCTTTCGTTATTTAAATAGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
661      670      690      710
TGTTTATTGAGATTAGATCAATATGATGTATGAGAGCAATTTATGAGTTTTTTATAATCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
721      730      750      770
GTATGTTAATAACCAACCTTTGCAAGTATCAGGATACTATGCGGCCGCAAATTACGCCCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
781      790      810      830
GCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
841      850      870      890
ATCACAGACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTGCGCTTGCCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
901      910      930      950
ATAATATTTGCCCATGGTGAAGCGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
960      970      990
TATTATAACGGGTACCACTTTGGCCCCGCTTCTTCAACAGGTATAACCGGTGCAAAAT

```

TKSt L-Gen
NotI

```

          970              990              1010
ATCAAAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTTCTCAATAAA
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
TAGTTTTGACCACTTTGAGTGGGTCCCTAACCGACTCTGCTTTTTGTATAAGAGTTATTT

          1030              1050              1070
CCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTG
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
GGGAAATCCCTTTATCCGGTCCAAAAGTGGCATTGTGCGGTGTAGAACGCTTATATACAC

          1090              1110              1130
TAGAAACTGCCGAAATCGTCGTGGTATTCCTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTG
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
ATCTTTGACGCCTTTAGCAGCACCATAAGTGAGGTCTCGCTACTTTTGCAAAGTCAAAC

          1150              1170              1190
CTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
GAGTACCTTTTGCCACATTGTTCCCACTTGTGATAGGGTATAGTGGTCGAGTGGCAGAAA

          1210              1230              1250
CATTGCCATACGGAATTCGGGATGAGCATTATCAGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGC
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
GTAACGGTATGCCTTAAGGCCTACTCGTAAGTAGTCCGCCCGTTCTTACACTTATTTCCG

          1270              1290              1310
CGGATAAAACTTGTGCTTATTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTG
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
GCCTATTTTGAACACGAATAAAAAGAAATGCCAGAAATTTTCCGGCATTATAGGTCGAC

          1330              1350              1370
AACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTCTTTACG
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TTGCCAGACCAATATCCATGTAACCTGTTGACTGACTTTACGGAGTTTTACAAGAAATGC

          1390              1410              1430 NdeI
ATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATATGAGACAT
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
TACGGTAACCTATATAGTTGCCACCATATAGGTCATAAAAAAGAGGTAATACTCTGTA
CAT-Start-ATG

          1450              1470              1490
ACTCGGAATTTGTGATTCCGAGCAATTTGTCTTTAACTATTTCCAATGTTTTACCCCA
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
TGAGCCTTAAAAACTAAGGCTCGTTAAACAGAAAATTGATAAAGGTTACAAAATGGGGT

          1510              1530              1550
AGCTTTAGGGTTGTTGAATCTTCAATCCCCTAAGTGTTCAGTTCAAACCAAGGTTAAT
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
TCGAAATCCCAACAACCTTAGAAGTTAGGGGATTCACAAGTTCAGTTTTGGTTCCAATTA

          1570              1590              1610
TCTCAATCTTGCTTGTTGACTGTGAACATAAGCTGTCCTTTAAACAATAATGTTCTATT
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
AGAGTTAGAACGAACAACTGACACTTGATTACGACAGGAAATGTTATTACAAAGATAA

          1630              1650              1670
AAGGTTGTTGGATCACCCGTCAGAGTCTGAGGTGGAACCTTGTGATGTGATAAGACCTAGG
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
TTCCAACAACCTAGTGGGACGTCTCAGACTCCACCTTGAACACTACACTATTCTGGATCC

          1690              1710              1730
TGTTGACAAGGGATTTTCAACTGAGCACACTGATGCCCTTGCTCCCTTCGGAGACCTAGG
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
ACAACCTGTTCCCTAAAAGTTGACTCGTGTGACTACGGGAACGAGGGAAGCCTCTGGATCC

```

```

1741      1750      1770      SexAI      1790
      TTGTTCTCTATCTTTGTGATGTGGCTCTGAAACAAACCAGGTGTGATTACAGTAAACAATT
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1800      AACAAAGAGATAGAAACACTACACCGAGACTTTGTTTGGTCCACACTAATGTCATGTGTTAA

1801      1810      1830      1850
      TCAATTTAAATCCGATATAAAATTTCAATGAGAGGAAAATTATTAATCTTCCTCATAGTT
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1860      AGTTAAATTTAAGGCTATATTTAAAGTTACTCTCCTTTTAAATAATTAGAAGGAGTATCAA
                                     TKS-NP-Gen

1861      1870      1890      1910
      ATTCGCACACAAAAGATCCTAAAAATTCTTCTTTCTTTTTGTGTGTCGGGGTCCGCATG
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1920      TAAGCGTGTGTTTTCTAGGATTTTTAAGAAGAAAAGAAAACACACAGGCCCCAGCCGTAC

1921      1930      RsrII      1950      HDV-Ribozym      1970
      GCATCTCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGTCGTCCACTCGGA
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1980      CGTAGAGGTGGAGGAGCGCCAGGCTGGACCCGTAGGCTTCTCCTGCAGCAGGTGAGCCT

1981      1990      2010      2030
      TGGCTAAGGGAGAGCTCAAAAAAAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTG
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2040      ACCGATTCCTCTCGAGTTTTTTTTCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTTCCTTCGAC

2041      2050      2070      2090
      AGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGG
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2100      TCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTATTGATCGTATTGGGGAAACCCCGGAGATTTGCC

2101      2110      2130      2150
      TCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGATCGAGATCCTCTAGAGTCG
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2160      AGAACTCCCAAAAACGACTTTCCTCCTTGATATAGGCCCTAGCTCTAGGAGATCTCAGC

2161      2170      2190      2210
      ACCTGCAGGCATGCAAGCTTGTATTCTATAGTGTACCTAAATCGTATGTGTATGATACA
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2220      TGGACGTCCGTACGTTTCAACATAAGATATCACAGTGGATTTAGCATAACATACTATGT

2221      2230      2250      2270
      TAAGGTTATGTATTAATTGTAGCCGCTTCTAACGACAATATGTACAAGCCTAATTGTGT
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2280      ATTCCAATACATAATTAACATCGGCGCAAGATTGCTGTTATACATGTTCCGGATTAACACA

2281      2290      2310      2330
      AGCATCTGGCTTACTGAAGCAGACCCTATCATCTCTCTCGTAAACTGCCGTCAGAGTCGG
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2340      TCGTAGACCGAATGACTTCGTCTGGGATAGTAGAGAGAGCATTTGACGGCAGTCTCAGCC

2341      2350      2370      2390
      TTTGGTTGGACGAACCTTCTGAGTTTCTGGTAACGCCGTTCCGCACCCCGGAAATGGTCA
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2400      AAACCAACCTGCTTGAAGACTCAAAGACCAATTGCGGCAAGGCGTGGGGCCTTTACCAGT

2401      2410      2430      2450
      GCGAACCAATCAGCAGGGTCATCGCTAGCCAGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGCCGG
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2460      CGCTTGGTTAGTCGTCCCAGTAGCGATCGGTCTAGGAGATGCGGCCTGCGTAGCACCCGGC

2461      2470      2490      2510
      GCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGG
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
2520      CGTAGTGGCCGCGGTGTCCACGCCAACGACCCGGATATAGCGGCTGTAGTGGCTACCCC

```

```

                2530                2550                2570
2521 AAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
                2590                2610                2630
2581 GCCCGTGGCCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCACCATTCTTGGCGGGCGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2640
CGGGGCACCGGCCCCCTGACAACCCGCGGTAGAGGAACGTGGTAAGGAACGCCGCCCA

                2650                2670                2690
2641 GCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2700
CGAGTTGCCGGAGTTGGATGATGACCCGACGAAGATTACGTCCTCAGCGTATTCCTCT

                2710                2730                2750
2701 GCGTCGATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2760
CGCAGCTATACCACGTGAGAGTCATGTTAGACGAGACTACGGCGTATCAATTCGGTCGGG

                2770                2790                2810
2761 CGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
GCTGTGGGCGGTTGTGGGCGACTGCGCGGGACTGCCCGAACAGACGAGGGCCGTAGGCGA

                2830                2850                2870
2821 TACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTCCACCGTCATCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
ATGTCTGTTTCGACACTGGCAGAGGCCCTCGACGTACACAGTCTCCAAAAGTGGCAGTAGT

                2890                2910                2930
2881 CCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
GGCTTTGCGCGCTCTGCTTTCCCGGAGCACTATGCGGATAAAAAATATCCAATTACAGTAC

                2950                2970                2990
2941 ATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCCTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
TATTATTACCAAAGAATCTGCAGTCCACCGTGAAAAGCCCCTTTACACGCGCCTTGGGGA

                3010                3030                3050
3001 ATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
TAAACAAATAAAAAGATTTTATGTAAGTTTATACATAGGCGAGTACTCTGTTATTGGGACT

                3070                3090                3110
3061 TAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTCGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
ATTTACGAAGTTATTATAACTTTTCTTCTCATACTCATAAGTTGTAAAGGCACAGCGG

                3130                3150                3170
3121 CTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGCCTCACCAGAAACGCTGGTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
GAATAAGGGAAAAAACGCCGTAAAACGGAAGGACAAAAACGAGTGGGTCTTTGCGACCAC

                3190                3210                3230
3181 AAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACGGATCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
TTTCATTTTCTACGACTTCTAGTCAACCCACGTGCTCACCCAATGTAGCTTGACCTAGAG

                3250                3270                3290
3241 AACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
TTGTCGCCATTCTAGGAACCTCAAAAGCGGGCTTCTTGCAAAAGGTTACTACTCGTGA
```

```

          3310          3330          3350
3301  TTTAAAGTTC TGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAATTTCAAGACGATACACCGCGCCATAATAGGGCATAACTGCGGCCCGTTCTCGTTGAG
          3370          3390          3410
3361  GGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3420  CCAGCGGCGTATGTGATAAGAGTCTTACTGAACCAACTCATGAGTGGTCAGTGTCTTTTC

          3430          3450          3470
3421  CATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3480  GTAGAATGCCTACCGTACTGTCATTCTCTTAATACGTACGACGGTATTGGTACTCACTA

          3490          3510          3530
3481  AACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3540  TTGTGACGCCGGTTGAATGAAGACTGTTGCTAGCCTCCTGGCTTCTCGATTGGCGAAAA

          3550          3570          3590
3541  TTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3600  AACGTGTTGTACCCCTAGTACATTGAGCGGAACTAGCAACCCCTTGGCCTCGACTTACTT

          3610          3630          3650
3601  GCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3660  CGGTATGGTTTGCTGCTCGCACTGTGGTGTACGGACATCGTTACCGTTGTTGCAACGCG

          3670          3690          3710
3661  AAATAATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3720  TTTGATAATTGACCGCTTGATGAATGAGATCGAAGGGCCGTTGTTAATTATCTGACCTAC

          3730          3750          3770
3721  GAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3780  CTCCGCTATTTCAACGTCTTGGTGAAGACGCGAGCCGGAAGCCGACCGACCAAATAA

          3790          3810          3830
3781  GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCGAGCACTGGGGCCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3840  CGACTATTTAGACCTCGGCCACTCGCACCCAGAGCGCCATAGTAACGTGCGTACCCCGGT

          3850          3870          3890
3841  GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3900  CTACCATTCCGGAGGGCATAGCATCAATAGATGTGCTGCCCCCTCAGTCCGTTGATACCTA

          3910          3930          3950
3901  GAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
3960  CTTGCTTTATCTGTCTAGCGACTCTATCCACGGAGTGACTAATTCGTAACCATTTGACAGT

          3970          3990          4010
3961  GACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAAC TTCATTTTTAATTTAAAAGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
4020  CTGGTTCAAATGAGTATATATGAAATCTAACTAAATTTTGAAGTAAAAATTAATTTTCC

          4030          4050          4070
4021  ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
4080  TAGATCCACTTCTAGGAAAACTATTAGAGTACTGGTTTTAGGGAATTGCACTCAAAGC

```

```

      4090              4110              4130
4081 TTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGGTGACTCGCAGTCTGGGGCATCTTTTCTAGTTTCTTAGAAGAACTCTAGGAAAAAA 4140

      4150              4170              4190
4141 CTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACGCGCATTAGACGACGAACGTTTGTTTTTTTGGTGGCGATGGTCGCCACCAAAACAA 4200

      4210              4230              4250
4201 CCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCCTAGTTCTCGATGGTTGAGAAAAAGGCTTCCATTGACCGAAGTCGTCTCGGCTCTAT 4260

      4270              4290              4310
4261 CCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTTTATGACAGGAAGATCACATCGGCATCAATCCGGTGGTGAAGTTCTTGAGACATCGT 4320

      4330              4350              4370
4321 CCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCGGATGTATGGAGCGAGACGATTAGGACAATGGTCACCGACGACGGTCACCGCTATTC 4380

      4390              4410              4430
4381 TCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGCACAGAATGGCCCAACCTGAGTTCTGCTATCAATGGCCTATTCGCGTCGCCAGCCCC 4440

      4450              4470              4490
4441 TGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTTGCCCCCAAGCACGTGTGTCGGGTGCAACCTCGCTTGCTGGATGTGGCTTGACTCT 4500

      4510              4530              4550
4501 TACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGGATGTCGCACTCGATACTCTTTCGCGGTGCGAAGGGCTTCCCTCTTTCGCGCTGTCC 4560

      4570              4590              4610
4561 TATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATAGGCCATTGCGCGTCCCAGCCTTGTCTCTCGCGTGCTCCCTCGAAGGTCCCCCTTTG 4620

      4630              4650              4670
4621 GCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGACCATAGAAATATCAGGACAGCCCAAAGCGGTGGAGACTGAACTCGCAGCTAAAAAC 4680

      4690              4710              4730
4681 TGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTACGAGCAGTCCCCCGCCTCGGATACCTTTTTGCGGTGCTTGCGCCGAAAAATGCC 4740

      4750              4770              4790
4741 TTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAGGACCGGAAAACGACCGGAAAACGAGTGTACAAGAAAGGACGCAATAGGGGACTAAGA 4800

      4810              4830              4850
4801 GTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCGAACGACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCTATTGGCATAATGGCGGAAACTACTCGACTATGGCGAGCGGCGTTCGGCTTGCTGG 4860

      4870              4890              4910
4861 GAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCGGTCGCTCAGTCACTCGCTCCTTCGCTTCTCGCGGTTATGCGTTTGCGGAGAG 4920

```

4930 4950
4921 CCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGGGGGAT
-----+-----+-----+----- 4955
GGGCGCGCAACCGGCTAAGTAATTACGTCCCCTA

PRÄSENTATION DER ARBEIT AUF KONGRESSSEN UND TAGUNGEN

- 1.) **Weik, M., S. Becker, und E. Mühlberger.** Die Rolle von RNA-Sekundärstrukturen bei der Transkriptionsinitiation des Ebola-Virus. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), 14.-17.03.2001 in Dresden. Poster
- 2.) **Weik, M.** Transcription initiation of Ebola virus. Klausurtagung des SFB286 „Intrazellulärer Transport und Reifung von Proteinen“, 19.-23.02.2001 in Hirschegg, Österreich. Vortrag
- 3.) **Weik, M., S. Becker, und E. Mühlberger.** Das VP30-Protein des Ebola-Virus ist ein Transkriptionsaktivator. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), 26.-29.04.2000 in Wien. Vortrag
- 4.) **Mühlberger, E., M. Weik, V. E. Volchkov, H. D. Klenk, and S. Becker.** Comparison of the replication and transcription strategies of filoviruses by using artificial replication systems. 11th International Congress of Virology (ICV), 9.-13.08.1999 in Sydney, Australien. Vortrag
- 5.) **Becker, S., M. Weik, V. E. Volchkov, H. D. Klenk, and E. Mühlberger.** Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg and Ebola virus. 18th Annual Meeting of the American Society for Virology (ASV), 10.-14.07.1999 in Amherst, Massachusetts. Vortrag
- 6.) **Weik, M., S. Becker, und E. Mühlberger.** Ebola virus VP30 acts as a transcription activation factor. 11th International Conference on Negative Strand Viruses (NSV), 24.-29.06.2000 in Québec City, Kanada. Poster
- 7.) **Weik, M., S. Becker, H. D. Klenk, und E. Mühlberger.** Etablierung eines Ebola-Virus spezifischen Replikationssystems und Untersuchung zur Funktion der Nucleocapsid-Proteine. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), 9.-12.03.1999 in Bremen. Poster

VERÖFFENTLICHUNGEN

- 1.) **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, E. Mühlberger, L. V. Kolesnikova, M. Weik, O. Dolnik, and H. D. Klenk.** 2001. Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science*. **291**:1965-9
- 2.) **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
- 3.) **Weik, M.** 1999. Investigation of cis-acting signals in the Ebola virus genome by using a reverse genetic system. *B.I.F. FUTURA*. **14**:135-136

VERÖFFENTLICHUNGEN IN VORBEREITUNGEN

- 1.) **Weik, M., J. Modrof, S. Becker, and E. Mühlberger.** The Ebola virus nucleocapsidprotein VP30 is a transcription initiation factor. [In Preparation]

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Michael Weik
Adresse: Wilhelm-Busch-Str. 9
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum/-ort: 13.07.1974, Viernheim

Promotion

11/1998 – 11/2001 Stipendiat des Boehringer Ingelheim Fonds
09/1998 Beginn der Promotion am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. H.-D. Klenk.
Dissertationsthema: „Untersuchung *cis*-aktiver Elemente im Genom des Ebola-Virus.“

Hochschulausbildung

31.08.1998 StudienAbschluß als Diplom-Humanbiologe,
Gesamtnote: „sehr gut“
09/1997 – 08/1998 Diplomarbeit am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg mit dem Thema:
„Klonierung und Expression eines funktionellen L-Proteins des Ebola-Virus und Etablierung eines Replikationssystems.“
10/1995 – 09/1997 Hauptstudium des Studienganges Humanbiologie mit dem Hauptfach Virologie und den Nebenfächern Molekularbiologie und Immunologie
12.10.1995 Abschluß der Diplom-Vorprüfung,
Gesamtnote: „gut“
10/1993 – 10/1995 Grundstudium des Studienganges Humanbiologie

Schulbildung

15.06.1993 Abschluß der Schulausbildung mit Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife,
Gesamtnote: „1,0“
08/1984 – 06/1993 Besuch des Bischöflich-Städtischen Albertus-Magnus-Gymnasiums Viernheim.
1980 – 1984 Nibelungen Grundschule in Viernheim

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aurich, Beato, Becker, Brandis-Heep, Buckel, Elbel, Elsässer, Felddmann, Feuser, Fruhstorfer, Garten, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Herrler, Kern, Klenk, Knöller, Koolmann, Löffler, Lührmann, Müller, Niessing, Perst, Risau, Röhm, Schäfer, Seitz, J., Seitz, K.-A., Slenczka, Steininger, Steinmetz, Thauer, von Löw, Voigt, Waßmuth

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und des Arbeitsplatzes, sowie die fortwährende Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Frau Dr. Elke Mühlberger danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotion, Ihre unzähligen Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung meines Projekts und Ihre Offenheit für meine Ideen. Mein besonderer Dank gilt Ihr auch für die nicht einfache Erstkorrektur der vorliegenden Arbeit.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Stephan Becker möchte ich mich für seine beständige Unterstützung während der letzten 5 Jahre bedanken. Seine Anregungen und Hilfestellungen waren für mich stets ein Ansporn.

Mein herzlicher Dank richtet sich auch an die Mitglieder (und ehemaligen Mitglieder) meiner Arbeitsgruppe für deren Hilfe, das tolle Arbeitsklima und die gute Zeit: Beate Lötfering, Ulrike Hofsäß, Christian Sängler, Angelika Lander (danke für Deine Geduld mit meinen Zellwünschen und die vielen Gespräche), Larissa Kolesnikova (thank you for the permission to use „your“ Computer and for the very nice EM-pictures; **СПАСИБО**), Jens Modrof (danke für die interessanten Diskussionen und Deine „krassen“ Ideen), Peggy Möller und Andrea Di Carlo (danke für Eure Tips und Anregungen zu meinen Seminaren, Vorbereitungen von Weihnachtsfeiern, etc.), Sandra Bamberg (danke, daß Du mir Deinen Laptop öfter mal ausgeliehen hast), Yannik Boehmann (danke für die Gespräche (nicht nur über die Arbeit), merci beaucoup !), „meine“ Praktikantinnen Katrin Schlenz und Melanie Grosch (danke für Eure Mitarbeit an meinem Projekt und das geduldige Ertragen meiner Ordnungsliebe), Constanze Möritz, Sven Miller und Bettina Hartlieb.

Mein besonderer Dank richtet sich an den Boehringer Ingelheim Fonds für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit und die exzellente persönliche Betreuung.

Dr. Rüttger Ebdndt danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz im Dienst eines gut funktionierenden Netzwerkes, seine Hilfe bei aussichtslosen Hardware-Konflikten und schweren Ausnahmefehlern und für die Beantwortung auch noch so trivialer Fragen zu Computern und Shiatsu.

Dr. Markus Eickmann danke ich für sein offenes Ohr bei Fragen und Problemen, unabhängig ob diese fachlicher Natur sind oder Computer, Weihnachtsfeiern, etc. betreffen. Danke für alles !

Ich danke Dr. Sven Erik Behrend und Haiying Yu für alle Tipps und Hinweise betreffend der Methode der chemischen Modifikation.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie möchte ich ganz herzlich dafür danken, daß Sie es mir ermöglicht haben diese Arbeit in einem angenehmen Arbeitsklima durchzuführen, Fragen zu stellen und mir bei der Lösung von Problemen immer behilflich waren.

Meinen Eltern Monika und Manfred Weik bin ich zutiefst dankbar, daß Sie mir durch Ihre Unterstützung dieses Studium ermöglicht haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Bei meinen Großeltern Erika und Bernhard Weik, meiner Schwester Marion Weik, Rudolf und Hedwig Knapp, meinen Schwiegereltern Gabriele und Peter Huxol und allen meinen Verwandten möchte ich mich für den familiären Rückhalt und das geduldige Anhören meiner Projekt-Erläuterungen bedanken.

Ich möchte an dieser Stelle auch Sophie Knapp und Alexander Babylon danken und gedenken. Mit Ihrem Interesse an meiner Arbeit und mit Ihrem Eifer in Ihrem Leben gaben Sie mir stets Ansporn „weiter zu machen“ und waren mir Vorbild. Gerne hätten Sie den Abschluß dieser Arbeit erlebt, Ihre Zeit auf Erden war jedoch zu kurz bemessen. Ruht in Frieden.

Meiner Frau, Martina Weik, ist diese Arbeit gewidmet. Ich danke Dir, Martina, für das unermüdliche Korrekturlesen dieser Arbeit, für Dein Lachen, für Deine Liebe und für jeden Tag, den ich mit Dir erleben darf. Durch Dein Verständnis für mich und meine Arbeit und Deine Unterstützung in schwierigen Phasen meiner Promotion hast Du maßgeblich zum erfolgreichen Abschluß dieses Projekts beigetragen. Durch Dich sind auch dunkle Tage in meinem Leben nicht mehr ganz so finster. Vielen Dank !!!

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich,
daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg
zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit
mit dem Titel

„Untersuchung *cis*-aktiver Elemente im Genom des Ebola-Virus“

am Institut für Virologie, Klinikum der Philipps-Universität Marburg,
mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk ohne sonstige Hilfe selbst
durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der
Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch
um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere
Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 11. Dezember 2001

Michael Weik