

Philipps



Universität
Marburg

Die Rolle der Gengrenzen in der Transkriptionsregulation von *Zaire Ebolavirus*

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

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Kristina Brauburger
aus Friedberg
Marburg/Lahn, 2009

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 06.07.2009 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Elke Mühlberger

Tag der mündlichen Prüfung am 31.07.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Epidemiologie	3
2.2	Krankheitsverlauf und Pathogenese	4
2.3	Taxonomie	4
2.4	Virusstruktur	5
2.4.1	Morphologie des Ebolavirus	5
2.4.2	Genomstruktur und cis-aktive Elemente	7
2.4.3	Die Gengrenzen	9
2.5	Der Vermehrungszyklus von Ebolaviren	10
2.5.1	Virale Transkription	11
2.5.2	Virale Replikation	15
2.5.3	Regulation zwischen Transkription und Replikation	16
2.6	Ebolavirus-spezifisches Replikations- und Transkriptionssystem	17
2.7	Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
3	Material und Methoden	22
3.1	Geräte	22
3.2	Verbrauchsmaterialien	22
3.3	Kits	23
3.4	Puffer	23
3.5	Plasmide, Nukleinsäuren und Nukleotide	25
3.5.1	Vektoren und rekombinante Plasmide	25
3.5.1.1	Vektoren und erhaltene Plasmide	25
3.5.1.2	Hergestellte Plasmide	26
3.5.2	Primer	28
3.6	Enzyme und Antikörper	30
3.6.1	Restriktionsendonukleasen	30
3.6.2	Sonstige Enzyme	30
3.6.3	Antikörper und Detektions-Agentien	30
3.7	Nährmedien	30

3.7.1	Nährmedien für Bakterienzellen	30
3.7.2	Nährmedien für Säugerzellen	31
3.8	Zellen und Viren	32
3.8.1	Prokaryotische Zellen	32
3.8.2	Eukaryotische Zellen	32
3.8.3	Viren	32
3.9	Klonierung bicistronischer Zaire Ebolavirus-spezifischer Minigenome	32
3.10	Isolierung, Aufreinigung und Analyse von Nukleinsäuren	34
3.10.1	Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab (MINIPREP)	34
3.10.2	Plasmidpräparationen im großen Maßstab (MAXIPREP)	34
3.10.3	QIAquick™ PCR Purification Kit	34
3.10.4	QIAquick Gel Extraction Kit	35
3.10.5	Reinigung und Isolierung von mRNA über Oligo-dT-Zellulose	35
3.11	Analyse von Nukleinsäuren	36
3.11.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	36
3.11.2	Analytische Agarosegelelektrophorese von RNA	37
3.11.3	Northern Blot-Assay von mRNA	37
3.11.3.1	RNA-Formaldehyd-Agarosegele	37
3.11.3.2	Northern Blot	38
3.11.3.3	Prähybridisierung und Hybridisierung membranfixierter RNA	39
3.11.3.4	Nachweis gebundener Digoxigenin-markierter RNA-Sonden	39
3.11.4	Ligation von DNA-Fragmenten	40
3.11.5	In-vitro-Transkription und Reinigung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden	41
3.11.6	In-vitro-Transkription und Reinigung einer RNA-Sondenkontrolle	42
3.12	Synthese und Modifikation von Nukleinsäuren	43
3.12.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	43
3.12.1.1	Deletions-PCR	43
3.12.1.2	Amplifikation von Sondenmatrizen zum Nachweis virusspezifischer mRNAs	44
3.12.2	Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA (Quickchange-Mutagenese)	45
3.12.3	5'- Phosphorylierung von PCR-Fragmenten	46
3.13	Konzentrations- und Sequenzbestimmung von Nukleinsäuren	46
3.14	Arbeiten mit Bakterien	47
3.14.1	Herstellung Z-kompetenter Bakterien	47
3.14.2	Transformation Z-kompetenter Bakterien	47
3.15	Zellbiologische Methoden	47
3.15.1	Kultivierung von Säugerzellen	47
3.15.2	Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA	48

3.15.2.1	Transfektion mit FuGENE/LT-1	48
3.16	Arbeiten mit Viren	50
3.16.1	Infektion und Ernte von Zellen für mRNA-Isolierung im BSL-4 Labor	50
3.17	Biochemische Methoden	50
3.17.1	Normalisierung der Transfektionseffizienzen mittels Luziferaseassay	50
3.17.2	Nachweis der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivität	51
3.18	Statistische Methoden	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Transkriptionsregulation an den Wildtyp-Gengrenzen	55
4.1.1	Transkriptionsregulation an den Gengrenzen in der Virusinfektion	56
4.1.2	Transkriptionsregulation an den Gengrenzen in bicistronischen Minigenomen	57
4.1.2.1	Transkription von bicistronischen Minigenomen bei viraler Überinfektion	58
4.1.2.2	Transkription von bicistronischen Minigenomen im rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystem	60
4.2	Untersuchung einer Gengrenze mit einer kurzen intergenischen Region	62
4.2.1	Einfluss der Sequenz der intergenischen Region	62
4.2.2	Einfluss der Länge der intergenischen Region	65
4.2.3	Zusammenfassung Kapitel 4.2	68
4.3	Untersuchung einer Gengrenze mit einer langen intergenischen Region	70
4.3.1	Schwächt die intergenische Region die Transkriptionsinitiation des nachfolgenden Gens?	70
4.3.2	Verkürzung der intergenischen Region	71
4.3.2.1	Einfluss der IR-Länge auf die Reinitiation in der Virusinfektion	74
4.3.2.2	Einfluss der Sequenz der intergenischen Region auf die Inhibition der Reinitiation	75
4.3.3	Zusammenfassung Kapitel 4.3.....	76
4.4	Transkriptionsregulation bei überlappenden Transkriptionssignalen	78
4.4.1	Wechselseitige Beeinflussung der Transkriptionssignale	78
4.4.2	Trennung der überlappenden Transkriptionssignale	79
4.4.3	Zusammenfassung Kapitel 4.4	81
5	Diskussion	82
5.1	Die intergenische Region	82
5.1.1	Die intergenische Region ist für die Transkription in Zaire Ebolavirus nicht essentiell ..	82
5.1.2	Einfluss der Sequenz der intergenischen Region auf die Reinitiation	86
5.1.3	Einfluss der Länge der intergenischen Region auf die Reinitiation	88
5.2	Sekundärstruktur der intergenischen Region und Reinitiation	91

5.3	NP-Phase und Reinitiation	94
5.4	Termination und Transkriptionsregulation über Readthrough-mRNA	96
5.5	Hinweise zu den Vorgängen an der Gengrenze - Stoppen, Scannen und Neustarten	98
5.6	Die Rolle der Transkriptionsregulation über intergenische Regionen im viralen Infektionszyklus	101
6	Literaturverzeichnis	104
7	Danksagung	115
8	Anhang	117
8.1	Abbildungsverzeichnis	117
8.2	Abkürzungsverzeichnis	115
8.3	Sequenzen der Verkürzungsmutanten der intergenischen Region zwischen VP30 und VP24 Gen	120
8.4	Lebenslauf	121
8.5	Eidesstattliche Erklärung	124

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die sieben Gene des *Zaire Ebolavirus* (ZEBOV) werden im RNA-Genom durch hoch konservierte Transkriptionsstartsignale und –stoppsignale flankiert. An den Gengrenzen treffen das Stoppsignal des vorangehenden und das Startsignal des nachfolgenden Gens in unterschiedlicher Weise aufeinander. Entweder überlappen die beiden Signale, oder sie sind über nicht transkribierte intergenische Regionen (IRs) variabler Länge und Sequenz getrennt. Nicht segmentierte negativ-strängige RNA-Viren besitzen nur einen am 3'-Ende des Genoms gelegenen Transkriptionspromotor. Einzig die *cis*-aktiven Signale an den Gengrenzen steuern somit über Interaktion mit dem viralen Polymerasekomplex alle bei der Transkription ablaufenden Prozesse, wie die Termination und Reinitiation der Transkription sowie das Capping und Polyadenylieren der mRNA.

Eine Möglichkeit, die Syntheserate viraler mRNA und damit die Produktion viraler Proteine zu regulieren, ist, die Bildung polycistronischer (Readthrough-) mRNAs durch das Überlesen von Transkriptionsstoppsignalen zu induzieren. Diesen wird eine Rolle bei der spezifischen Reduktion einzelner Genprodukte zugeschrieben, da sie schlecht translatiert werden. Solche Transkripte waren bislang für ZEBOV nicht beschrieben, konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch in mit Virus infizierten Zellen nachgewiesen werden. Dabei war interessant, dass sie unabhängig von der Struktur der Gengrenzen, also sowohl bei solchen mit überlappenden als auch mit durch IR getrennten Transkriptionssignalen, gebildet wurden.

Um nun der Frage weiter nachzugehen, inwieweit die Transkriptionsaktivität über die unterschiedlich strukturierten Gengrenzen reguliert wird, wurden bicistronische Minigenome eingesetzt. In diesen sind zwei Reportergene durch ZEBOV-spezifische Gengrenzen voneinander separiert.

Zunächst wurde die Transkriptionsaktivität von Minigenomen mit unterschiedlichen Wildtyp-Gengrenzen (IR 5nt, IR 144nt und eine Überlappung) untersucht. Dies erfolgte sowohl in mit ZEBOV infizierten Zellen als auch in einem rekonstruierten ZEBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem. Interessanterweise deuteten die Ergebnisse übereinstimmend auf eine durch die IRs beeinflusste Regulation der Transkription hin, da die Reinitiationsfrequenz bei einer Gengrenze mit einer langen IR am niedrigsten war.

Viele Negativstrang-RNA-Viren nutzen die intergenischen Regionen, um die Erkennung der angrenzenden Transkriptionssignale zu regulieren. Da die Transkriptionssignale bei ZEBOV sehr hoch konserviert sind, die IRs jedoch variabel, legte das einen Einfluss auf die Erkennung der angrenzenden Signale nahe. Erstaunlicherweise führte jedoch die Deletion, Substitution oder Verlängerung der beiden untersuchten IRs nicht zu einem Verlust der Genex-

pression. Daraus folgt, dass die IRs in ZEBOV für die Expression angrenzender Gene nicht essentiell sind.

Die Analyse der transkribierten mRNA sowie die Quantifizierung der gebildeten Proteinmenge bestätigten allerdings, dass die IRs die Reinitiationsfrequenz am nachfolgenden Gen regulieren. Die Sequenz der IR konnte dabei als maßgeblicher Faktor ausgeschlossen werden. Vielmehr spielte die IR-Länge eine bedeutende Rolle. Entgegen den Erwartungen ließ sich hierbei keine direkte Korrelation zwischen IR-Länge und Reinitiationsfrequenz feststellen, wie sie für andere Viren beschrieben wird. Vielmehr konnte für beide untersuchten Gengrenzen bei IRs von 10-30 Nukleotiden Länge eine starke Reduktion des Neustartens beobachtet werden, während eine Inhibition der Reinitiation bei IR-Längen von 5 oder >40 Nukleotiden nicht auftrat. Die Hemmung der viralen Polymerase über IRs bestimmter Länge konnte auch in der Virusinfektion bestätigt werden. Eine derartige Regulation ist bislang bei anderen Viren nicht bekannt. Dies könnte auf eine für ZEBOV einmalige Erkennung der Startsignale hindeuten, die von der spezifischen Verpackungseinheit des Genoms abhängig ist.

An zwei Gengrenzen im ZEBOV-Genom überlappen die Transkriptionssignale aufeinander folgender Gene, wobei sie sich ein hoch konserviertes Pentamer teilen. Diese Gengrenzstruktur ist für Filoviren einzigartig. Aufgrund der Überlappung trifft die virale Polymerase bei der Transkription zuerst auf das Startsignal des stromabwärts liegenden Gens, bevor sie zu dem Stoppsignal des stromaufwärts liegenden Gens gelangt. Eine Mutation des Transkriptionsstartsignals beeinflusste die Erkennung des überlappenden Transkriptionsstoppsignals nicht. Hingegen war ein funktionelles Stoppsignal essentiell für die Reinitiation am überlappenden Startsignal. Stoppen und Neustarten sind somit in ZEBOV funktionell miteinander verknüpft, was den generellen Ablauf der Transkription nach einem für alle nicht segmentierten negativ-strängigen RNA Viren beschriebenen Modell bestätigen konnte.

Eine Insertionsmutagenese an dieser Gengrenze verschob das überlappende Startsignal stromaufwärts. Die Untersuchung der gebildeten mRNA zeigte, dass die filovirale Polymerase in der Lage war, überlappende Transkriptionssignale effizient zu erkennen, die in umgedrehter Reihenfolge durch bis zu 21 Nukleotide getrennt vorlagen.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass auch die Filoviren bei Stoppen und Neustarten der Transkription einem generell für alle negativ-strängigen nicht segmentierten RNA-Viren vorgeschlagenen Modell zu folgen scheinen. Dennoch weisen die Ergebnisse auf für Filoviren einzigartige, komplexe Regulationsmechanismen hin, die eine spezifische Kontrolle der viralen Polymerase über die an den Gengrenzen gelegenen *cis*-aktiven Signale nahe legen.

2 EINLEITUNG

2.1 Epidemiologie

Die Ebolaviren (EBOV) bilden zusammen mit den Marburgviren (MARV) die Familie der *Filoviridae*. Abhängig von der jeweiligen Spezies verursachen Filoviren bei Affen und Menschen ein virales hämorrhagisches Fieber mit Mortalitätsraten von bis zu 90%.

Filoviren wurden erstmals 1967 beschrieben, als sich Laborarbeiter in Marburg, Belgrad und Frankfurt bei der Sektion infizierter grüner Meerkatzen aus Uganda mit den später nach der Stadt der Erstcharakterisierung benannten MARV infizierten (Martini, 1971; Slenczka, 1999). Die Filoviren sind, mit Ausnahme der Spezies *Reston Ebolavirus* (REBOV), endemisch in Afrika. Dort kam es 1976 zum ersten Auftreten von Ebolaviren (Baron et al., 1983; Bowen et al., 1977; Johnson et al., 1977) in zwei zeitgleichen Ausbrüchen von unterschiedlichen EBOV-Spezies, dem *Zaire Ebolavirus* (ZEBOV) und dem *Sudan Ebolavirus* (SEBOV) (Buchmeier et al., 1983; Cox et al., 1983; McCormick et al., 1983). Bislang traten noch drei weitere Spezies des Genus EBOV in Erscheinung, die sich unter anderem durch die mit den Ausbrüchen assoziierten Mortalitätsraten voneinander unterscheiden (Abbildung 1) (Le Guenno et al., 1995; Formenty et al., 1999; Towner et al., 2008).

Von bislang 450 Fällen von Marburgvirus-Infektionen beim Menschen verliefen 368 tödlich; im Fall von Ebolaviren waren dies 1539 von 2181 Infektionen (Kuhn, 2008, www.cdc.gov; www.who.org). Zudem stellen Filovirusinfektionen eine wachsende Gefahr für die afrikanische Menschenaffenpopulation dar (Bermejo et al., 2006; Leroy et al., 2004).

Mit einem wahrscheinlichen Ursprung im asiatischen Raum (Philippinen), nehmen REBOV in der Familie der *Filoviridae* eine Sonderstellung ein (Geisbert et al., 1992, Jahrling et al., 1996a, Rollin et al., 1999, CDC, 1996; CDC, 1990a, CDC, 1990b). Bei Personen, die mit dieser Spezies in Kontakt gekommen waren, konnten bislang keine Krankheitssymptome beobachtet werden, weshalb die Viren als apathogen für den Menschen, allerdings hoch für nichtmenschliche Primaten gelten. Während für alle übrigen Filoviren bislang nur Infektionen bei Primaten (Familien: *Hominidae* (Menschenaffen) und *Cercopithecidae* (Meerkatzenverwandte)) und afrikanischen Antilopen („Duiker“, Genus *Cephalophus*) beobachtet wurden, kam es Ende 2008 erstmals zu einem Ausbruch von REBOV in mehreren philippinischen Schweinefarmen. Menschen, bei denen ein Kontakt zu den Viren über Antikörpernachweis festgestellt werden konnte, erkrankten jedoch nicht. (WHO, 1990; Normile, 2009).

Da gegen filovirales hämorrhagisches Fieber bislang weder eine Impfung noch eine spezifische Therapie für die Anwendung am Menschen zugelassen ist, werden Marburg- und Ebolaviren aufgrund der hohen Mortalitätsrate der biologischen Sicherheitsstufe 4 zugeordnet.

2.2 Krankheitsverlauf und Pathogenese

Die Infektion wird hauptsächlich durch direkten Kontakt mit Körperflüssigkeiten infizierter Patienten oder Tiere übertragen. Die Viren dringen durch kleinere Haut- oder Schleimhautläsionen in den Körper ein und infizieren am Eintrittsort ihre primären Zielzellen Makrophagen, Monocyten und dendritische Zellen (Ryabchikova et al., 1996a; Ryabchikova et al., 1996b; Zaki und Peters, 1997; Geisbert et al., 2003). Mit diesen gelangen die Erreger unter starker Vermehrung zu den lokalen Lymphknoten, von wo sie sich systemisch ausbreiten. Infizierte Monozyten und Makrophagen schütten unkontrolliert Botenstoffe aus, die die Durchlässigkeit des Endothels erhöhen, weitere Zielzellen anlocken und zu einer gestörten, intravaskulären Blutgerinnung führen (Jahrling et al., 1996b, Peters, 1996, Schnittler und Feldmann, 1999; Rippey et al., 1984; Zaki und Goldsmith, 1999). Symptomatisch manifestiert sich die beginnende Erkrankung nach einer Inkubationszeit von 2-21 Tagen durch das abrupte Auftreten unspezifischer, grippeähnlicher Beschwerden. In der akuten Phase entwickeln sich Hämorrhagien in Gastrointestinaltrakt, Lunge und Mundschleimhaut, die durch die erhöhte Durchlässigkeit der Endothelzellbarriere verursacht werden (Bwaka et al., 1999; Martini, 1971; Pattyn, 1978; Gear et al., 1975; Slenczka, 1999; WHO, 1978a, WHO, 1978b). Die Virusvermehrung ist äußerst effizient. So sind bei fatal verlaufenden Infektionen bereits zwei Tage nach Einsetzen der Symptome $>10^8$ Virusgenomkopien/ml Blut nachweisbar (Towner et al., 2004).

Bei tödlich verlaufende Infektionen ist die adaptive Immunantwort unterdrückt (Baize et al., 1999), bzw. äußerst ineffizient (Bradfute et al., 2008), wobei u. a. die massive Apoptose von nicht infizierten Lymphozyten eine Rolle spielen könnte (Baize et al., 1999; Baize et al., 2000). Zudem kodiert das Virus für mehrere Proteine, die in den infizierten Zellen der angeborenen Immunantwort entgegenwirken (Basler et al., 2000; Basler et al., 2003; Cardenas et al., 2006; Prins et al., 2009; Reid et al., 2006). Die Patienten versterben sechs bis sechzehn Tage nach Ausbruch der Symptome bedingt durch die teilweise schweren Blutungen, einen Volumenmangelschock und Multiorganversagen.

2.3 Taxonomie

Die Familie der *Filoviridae*, bestehend aus den Genera *Marburg*- und *Ebolavirus*, wird aufgrund des nicht segmentierten, einzelsträngigen RNA-Genoms in negativer Polarität zusammen mit den *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* und *Bornaviridae* der Ordnung der *Mononegavirales* zugeordnet (Abbildung 1).

Während die unterschiedlichen Marburgvirus-Isolate ein so geringes Maß an Variabilität zeigen, dass hier keine Aufspaltung vorgenommen wird, besitzen die fünf dem Genus *Ebolavirus* zugeordneten Spezies untereinander eine Sequenzhomologie von nur 60-70%. Sie unterscheiden sich in der Pathogenität, dem geographischen Auftreten, der Antigenität, den viralen Strukturproteinen sowie im Aufbau der Gengrenzen (GGs) und Promotorelemente, zeigen jedoch teilweise serologische Kreuzreaktivität (Feldmann et al., 1993).

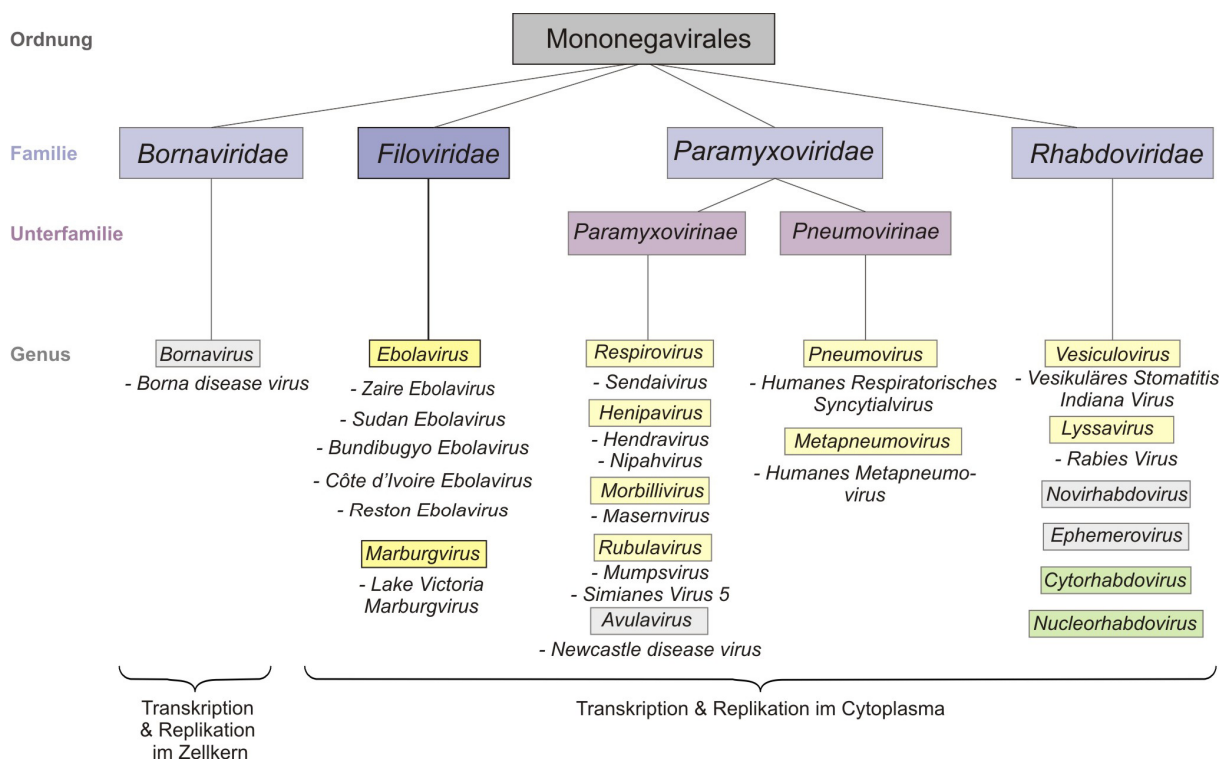


Abbildung 1 : Taxonomie der Filoviren innerhalb der Ordnung Mononegavirales

Verändert nach: Feldmann et al., 2005; Quelle: www.ictvonline.org, Virustaxonomieliste 2008. Bundibugyo Ebolavirus zugefügt nach: Towner et al., 2008. Die Virusgenera sind bezogen auf die jeweilige Wirtsspezies farblich hinterlegt: gelb: Genus enthält humanpathogene Viren; grau: Erreger befallen Vertebraten, keine humanpathogenen Vertreter; grün: Pflanzenpathogene. Aufgeführt sind, mit Ausnahme aller Spezies der Filoviren, nur die jeweils bekanntesten Vertreter der einzelnen Virusfamilien. Die einzelnen Filoviruspezies sind nach abnehmenden Letalitätsraten geordnet: Zaire Ebolavirus (80-90%), Sudan Ebolavirus (50-55%), Bundibugyo Ebolavirus (36%), Côte d'Ivoire Ebolavirus (noch nicht bestimmbar Letalitätsrate, da bisher nur 1 nicht tödlicher Fall), Reston Ebolavirus (0%).

2.4 Virusstruktur

2.4.1 Morphologie des Ebolavirus

Die filamentösen Virionen von Ebolavirus variieren stark in der Länge (974-1086nm für ZEBOV), haben jedoch einen konstanten Durchmesser von 80nm (Geisbert und Jahrling, 1995). Das helikale Nukleokapsid im Innern der Viruspartikel besteht aus dem RNA-Genom, das eng von dem Nukleoprotein (NP) enkapsidiert wird (Abbildung 2). Assoziiert mit dem Nukleokapsid sind die katalytische Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase L

(für „large“, 253kD) sowie die viralen Proteine VP35 und VP30 mit einer Masse von 35 und 30 kD. Diese vier Proteine bilden zusammen mit dem RNA-Genom den Ribonukleoprotein-komplex (RNP), der funktionell und strukturell im Virion eine Einheit bildet. In Analogie zu den übrigen nicht segmentierten negativ strängigen RNA-Viren (NNS RNA-Viren) stellt der RNP bei Filoviren den funktionellen Polymerasekomplex dar, der für die Transkription und Replikation der Virusgenome verantwortlich ist (siehe 2.5.1) (Mühlberger et al., 1999). Im Viruspartikel wird er umhüllt von einer Lipiddoppelschicht, die von der Wirtszellmembran stammt und in die das einzige virale Oberflächenmolekül Glykoprotein (GP) in Form von trimeren, 5-10 nm langen Spikes eingelagert ist. GP ist für die Rezeptorbindung, die Fusion der Virusmembran mit der der Wirtszelle und somit für den Zelleintritt verantwortlich (Sanchez et al., 1998, Feldmann et al., 2001 Manicassamy et al., 2005). Zwischen Virushülle und Nukleokapsid befinden sich die viralen Matrixproteine VP24 und VP40. Während das VP40 das Analog zu anderen Matrixproteinen der NNS RNA-Viren darstellt, ist das VP24 einzigartig für Filoviren und vermutlich eine essentielle Pathogenitätsdeterminante (Ebihara et al., 2006; Volchkov et al., 2000). Es hemmt das zelluläre Interferonsystem (Reid et al., 2006), spielt eine Rolle für die Ausbildung funktioneller Nukleokapside (Hoenen et al., 2006) und ist vermutlich an der Regulation des viralen Infektionszyklus bei der Umschaltung von RNA-Synthese zum Viruszusammenbau beteiligt (Watanabe et al., 2007).

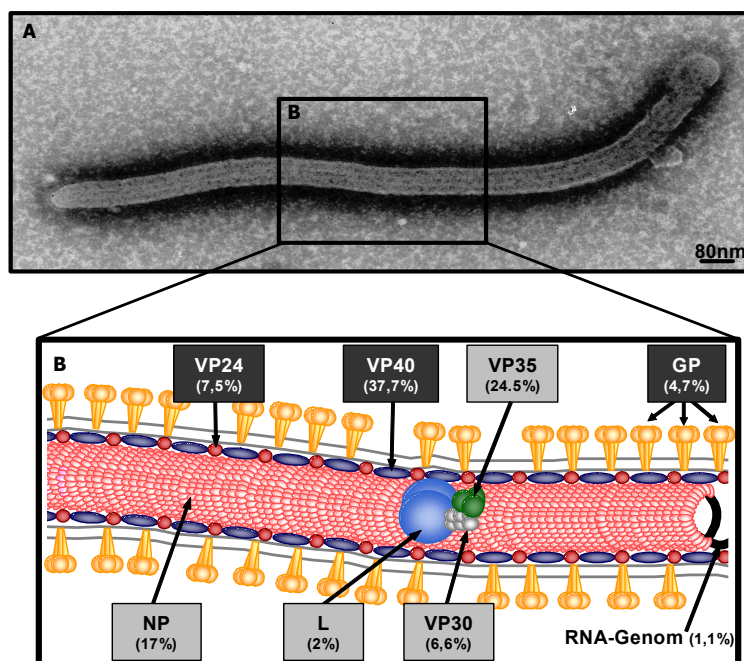


Abbildung 2: Struktur eines EBOV-Virions (verändert nach: Weik, 2001)

A) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBOV-Virions (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Larissa Kolesnikova). Das eingezeichnete Rechteck markiert den in (B) schematisch dargestellten Bereich. **B)** Schematischer Aufbau eines EBOV-Virions. Die Proteine des RNP sind hellgrau, die Matrix- und Oberflächenproteine dunkelgrau hinterlegt. Die ermittelten relativen Häufigkeiten der Proteine im Ebolavirion, sowie der Anteil der RNA an der molekularen Masse des viralen Partikels sind wie in Elliott et al. (1985) postuliert angegeben (in Klammern).

VP40 ist die treibende Kraft für den Transport des viralen Nukleokapsids zur Zelloberfläche, dessen Einbau in reife Virionen sowie für die Virusknospung von der Plasmamembran (Harty et al., 2000; Jasenosky et al., 2001; Martin-Serrano et al., 2001). Bei Ebolaviren findet

sich ein achtetes Protein, das lösliche sGP, das kein Bestandteil der Virionen ist, sondern von der infizierten Zelle sekretiert wird. Seine Bedeutung für den Infektionszyklus ist noch nicht abschließend geklärt (Kindzelskii et al., 2000; Sanchez et al., 1999; Sui und Marasco, 2002; Wahl-Jensen et al., 2005).

2.4.2 Genomstruktur und cis-aktive Elemente

Das 19 Kilobasen lange Genom der Filoviren hat ein Molekulargewicht von $4,2 \times 10^3$ kD und besteht aus einer einzelsträngigen RNA in negativer Orientierung (Regnery et al., 1980; Kiley et al., 1982; Elliott et al., 1985). Die genomische RNA ist aufgrund der negativen Polarität per se nicht infektiös und kann nur der im Virion vorhandenen Polymerase, nicht aber zellulären Enzymen, als Matrize dienen. Wie die Sequenzen der bislang entschlüsselten 27 Filovirusgenome zeigen, sind die Viren genetisch sehr stabil (Kuhn, 2008).

Durch Beobachtungen an defekten ZEBOV-Genomen konnten die ersten 155 und letzten 176 Nukleotide des viralen Genoms als hinreichend für eine Vermehrung identifiziert werden (Calain et al., 1999). Die darin enthaltenen nicht translatierten Leader- und Trailersequenzen sind wichtige Bestandteile des viralen und antiviralen Promotors (Abbildung 3) (Weik et al., 2005; Enterlein, 2005). Ebenso befinden sich an den 3' und 5' Enden des Genoms die Enkapsidierungssignale für die während des ganzen viralen Infektionszyklus aufrecht erhaltene Verpackung mit dem Nukleoprotein (Mühlberger et al., 1999; Watanabe et al., 2004). Obwohl die Enkapsidierung des Erbmaterials entscheidende Vorteile für das Virus birgt (Schutz vor Nukleasen und Immunsystem, Unabhängigkeit von Helikasen), wird die Erkennung der Promotorstrukturen im Kontext der NP-Verpackung erschwert und es ist bisher nicht eindeutig geklärt, wie diese stattfindet. Auch die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die im Infektionszyklus anderer RNA-Viren essentiell sind, ist aufgrund der Endkapsidierung schwer vorstellbar. Da für die RNA-Synthese das Genom zumindest teilweise von den Nukleoproteinen freigelegt werden muss, könnte sich die RNA zu dieser Zeit falten. Potentiellen Sekundärstrukturen im viralen Genom konnte bislang – mit Ausnahme der jedoch vermutlich in der mRNA gebildeten Sekundärstruktur am Start des ersten Gens (siehe 2.5.1) – keine Bedeutung nachgewiesen werden (Weik et al., 2005; Crary et al., 2003).

Innerhalb der Genome der NNS RNA-Viren sind die einzelnen Gene gemäß ihrer Funktion in einer konservierten Reihenfolge arrangiert. Diese lautet in 3' → 5' Richtung: 3' Leader – Nukleoproteingene - Membranproteingene - Oberflächenproteingene - RNA-abhängige RNA-Polymerasegene - 5' Trailer. Diese Anordnung spiegelt sich, mit Ausnahme der zwei einzigartigen Gene für VP30 und VP24, auch im Genom der Filoviren wider (Abbildung 3) und geht zurück auf eine für alle *Mononegavirales* ähnliche Replikations- und Transkriptionsstrategie (2.5.1).

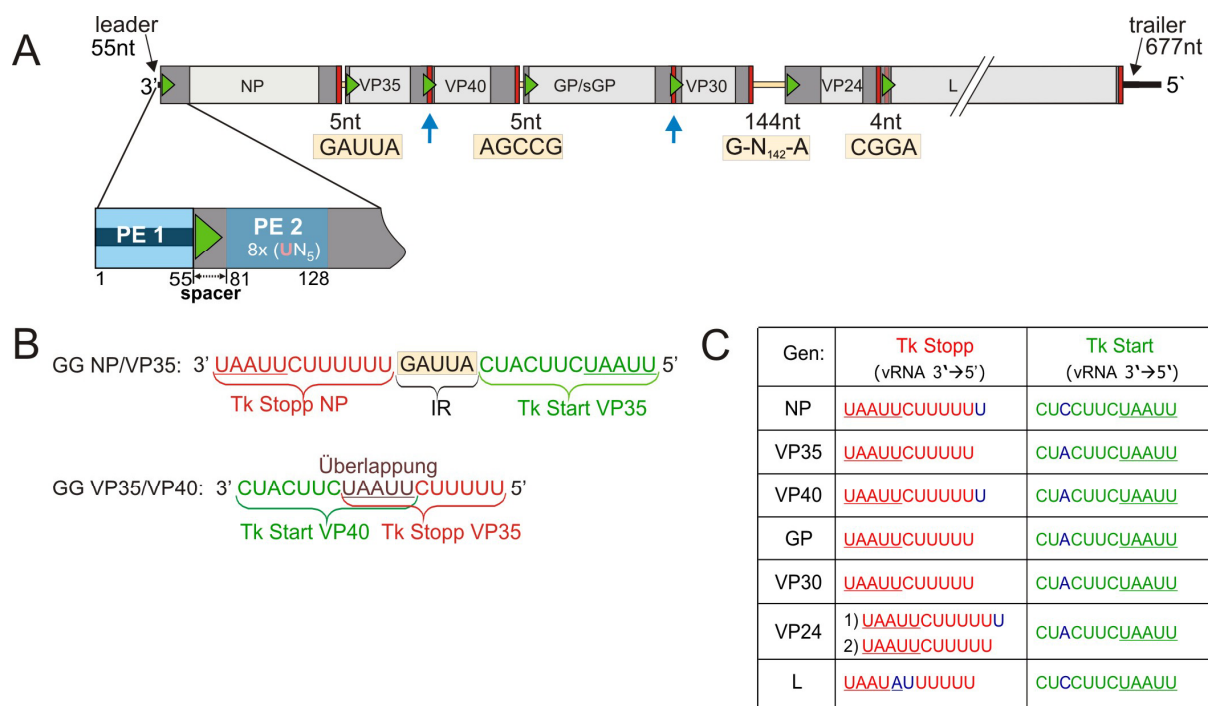


Abbildung 3 : Struktur von Genom, Promotor und Gengrenzen in Zaire Ebolavirus

A) Genomaufbau des ZEBOV (Stamm Mayinga, NC_002549). Die offenen Leserahmen der einzelnen Gene sind in hellgrau, die 3' und 5' nicht translatierten Regionen in dunkelgrau maßstabsgetreu abgebildet. Transkriptionsstartsignale (Tk Start) sind als grüne Pfeile, Transkriptionsstoppsignale (Tk Stopp) als rote Balken dargestellt. Das zweite Transkriptionsstoppsignal des VP24 Gens, das in der Virusinfektion jedoch nicht genutzt wird (Boehmann, 2002), ist transparent eingefärbt. Blaue Pfeile kennzeichnen die Lage von überlappenden Genen. Die Länge und Sequenz der intergenischen Regionen (IRs) ist aufgeführt. Vergrößert dargestellt ist der Aufbau des genomischen Promotors mit den beiden Promotorelementen (PE). **B**) Unterschiedliche Struktur der Gengrenzen (GGs) zwischen erstem und zweitem und zweitem und drittem Gen. **C**) Transkriptionsstart- und -stoppsignale. Die Tabelle zeigt die Sequenz der konservierten Transkriptionssignale in Orientierung der viralen RNA (vRNA). Das sowohl im Tk Stopp als auch im Tk Start enthaltene hoch konservierte Pentamer ist unterstrichen, blau hervorgehoben sind die nicht konservierten Nukleotide.

Charakteristisch für Filoviren sind die außerordentlich langen nicht translatierten Regionen (NTR) an den 3' und 5' Enden der einzelnen Gene. Sie erreichen in ZEBOV Längen von 63 bis 435 Nukleotiden (Stamm Mayinga, NC_002549). Vergleichbar lange nicht kodierende Sequenzen sind innerhalb der *Mononegavirales* bislang nur für Nipah-, Hendra- und Morbilliviren bekannt (Wang et al., 2001; Rima und Duprex, 2009). Diese A/U-reichen Abschnitte sind bei Filoviren in Länge und Sequenz zwischen den einzelnen Spezies hoch variabel (Abbildung 4) (Sanchez et al., 1993). Ihre Bedeutung für den viralen Infektionszyklus ist bislang noch völlig unklar.

2.4.3 Die Gengrenzen

Am Beginn und Ende jedes der sieben filoviralen Gene befinden sich hoch konservierte Transkriptionsstart- und Transkriptionsstoppsignale, die auch das 5' und das 3'-Ende der monocistronischen mRNAs determinieren (Abbildung 3) (Feldmann et al., 1992; Mühlberger et al., 1996; Sanchez et al., 1993). Fast alle Transkriptionssignale beinhalten ein konserviertes Pentamermotiv der Sequenz 3' UAAUU 5' (in genomischer Polarität). Dieses Motiv wiederholt sich im Genom des Zaire Ebolavirus (Stamm Mayinga) 49 mal, doch nur in Kombination mit den angrenzenden sechs bzw. sieben Nukleotiden wird es von der viralen Polymerase als Transkriptionssignal erkannt. Die Konsensussequenz der EBOV-spezifischen Transkriptionsstartsignale lautet (in Genomorientierung) 3' CU^C/_ACUUCUAAUU 5'; die von MARV unterscheidet sich nur geringfügig: 3' CUUCUU^A/_GUAAUU 5'. Die noch stärker konservierten Transkriptionsstoppsignale beginnen mit dem konservierten Pentamer, gefolgt von einem Cytosin und einer Abfolge von 5-6 Uridinen, die als Matrize für die Polyadenylierung dienen (siehe 2.5.1) (Mühlberger et al., 1996; Sanchez et al., 1989; Sanchez et al., 1993; Feldmann et al., 1992).

An den GGs treffen das Transkriptionsstoppsignal des vorangehenden und das Transkriptionsstartsignal des folgenden Gens aufeinander. Dabei werden die beiden Signale entweder durch so genannte IRs variabler Länge und Sequenz voneinander getrennt, oder sie überlappen in für Filoviren einzigartiger Weise. Bei den überlappenden GGs teilen sich ein Transkriptionsstart- und ein Transkriptionsstoppsignal das hoch konservierte Pentamermotiv. Dadurch wird die Reihenfolge der beiden überlappenden Transkriptionssignale vertauscht (Abbildung 3).

Die Struktur der einzelnen GGs ist innerhalb der verschiedenen Filoviruspezies variabel (Abbildung 4). Während beispielsweise in REBOV an der Grenze der Gene für das Glykoprotein und VP30 eine IR von fünf Nukleotiden das Transkriptions-stoppsignal vom anschließenden Startsignal trennt, überlappen die beiden Signale an der gleichen GGs in den Spezies ZEBOV und SEBOV. Auch die Sequenz der intergenischen Regionen ist zwischen den Spezies nicht konserviert. Alle filoviralen Genome besitzen allerdings sowohl GGs mit kurzen (4nt-9nt), als auch jeweils eine GG mit einer langen intergenischen Region (97nt-144nt). Die Lage der langen intergenischen Region ist innerhalb der Filovirus-Genera konserviert - sie befindet sich in Ebolaviren zwischen dem fünften und sechsten, in Marburgviren zwischen dem vierten und fünften Gen (Abbildung 4).

Innerhalb der NNS RNA-Viren gibt es markante Unterschiede bezüglich der Struktur der GGs und intergenischen Regionen.

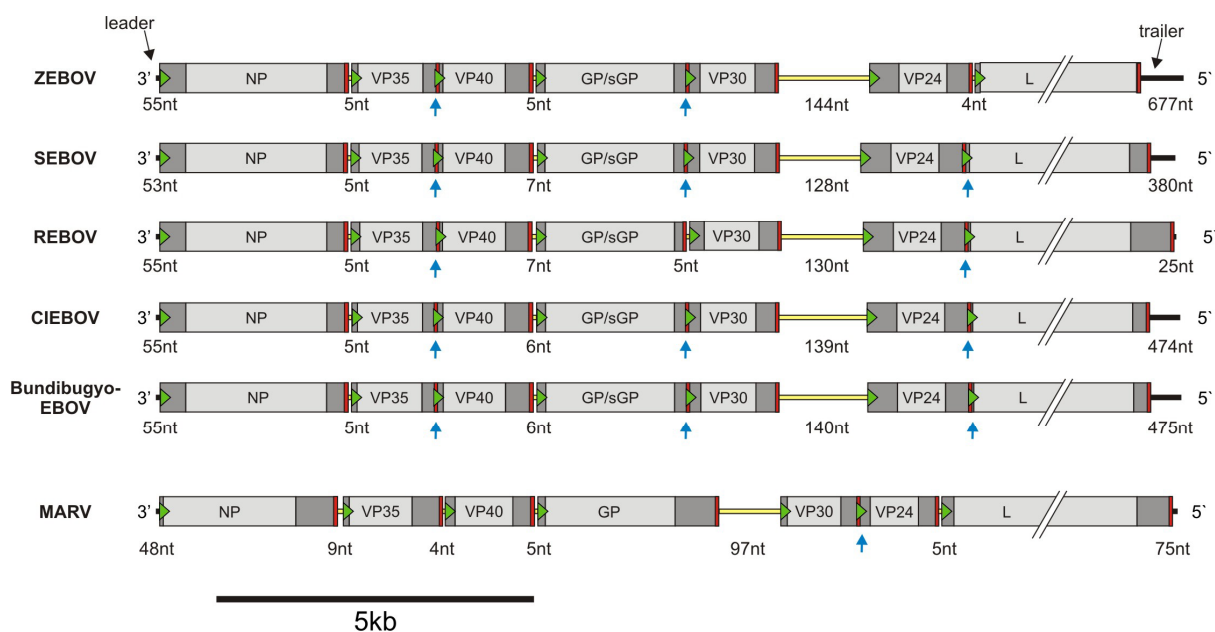


Abbildung 4 : Schematische Darstellung der Genome verschiedener Filoviren

Gezeigt sind die Längen von Leader und Trailer sowie die der intergenischen Regionen. Die offenen Leserahmen der einzelnen Gene sind in hellgrau, die 3' und 5' NTRs in dunkelgrau maßstabsgetreu abgebildet. Transkriptionsstartsignale sind als grüne Pfeile, Transkriptionsstoppsignale als rote Balken dargestellt. Die Länge der intergenischen Regionen (hier um Faktor 10 vergrößert dargestellt) ist aufgeführt; blaue Pfeile kennzeichnen die Lage von überlappenden Genen. ZEBOV: *Zaire Ebolavirus*; SEBOV: *Sudan Ebolavirus*; REBOV: *Reston Ebolavirus*; CIEBOV: *Côte d'Ivoire Ebolavirus*; MARV Marburgvirus; Basierend auf den Sequenzen: ZEBOV: NC_002549, SEBOV: NC_006432, REBOV: NC_004161, CIEBOV: FJ217162, Bundibugyo-EBOV: FJ217161, MARV: Musoke: NC_001608.

So enthalten manche Viren in Länge und Sequenz hoch konservierte IRs, wie beispielsweise Vesiculo- und Respiroviren (Länge: 3nt, präferentieller Konsensus: 3' GAA 5' (Genomorientierung)); andere zeigen eine Variation ähnlich der bei Filoviren beobachteten (Whelan et al., 2004).

Das Humane Respiratorische Syncytialvirus (HRSV), ein Pneumovirus, besitzt IRs, die in der Länge von 1-56nt variieren sowie eine Überlappung über 46nt (Collins et al., 1986). Interessanterweise lässt sich hier keine Familien- oder Subfamilien-spezifische Regel ähnlich zum Beispiel der „Rule of six“ der *Paramyxovirinae* (2.5.2) finden. So hat beispielsweise das Rabiesvirus, das zu den *Rhabdoviridae* zählt, hoch variable, das VSV aus der gleichen Familie aber streng konservierte IRs. Die hohe Variabilität könnte auf speziesspezifische Regulationsmechanismen der viralen Transkription hindeuten.

2.5 Der Vermehrungszyklus von Ebolaviren

Nach dem Andocken an die Wirtszelle werden die Viren über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und fusionieren mit der Endosomenmembran, was eine Freisetzung des

Ribonukleoproteinkomplexes (RNP) in das Cytoplasma zur Folge hat. Die schätzungsweise 50 L-Proteine eines Ebolavirions, die mit den übrigen RNPProteinen an dem verpackten Genom assoziiert sind, beginnen nach Zelleintritt mit der Synthese viraler RNA (Elliott et al., 1985). Der Replikationszyklus von Zaire Ebolavirus dauert in VeroE6 Zellen 12 Stunden (Mühlberger, 2004).

Die bisher meisten Studien zu Transkription und Replikation von NNS RNA-Viren wurden an den Prototypviren Sendaivirus (*Paramyxovirinae*) und VSV (*Rhabdoviridae*) durchgeführt. Die Erkenntnisse zu Regulationsmechanismen in Ebolaviren sind aufgrund der schweren Zugänglichkeit als BSL4-klassifizierte Erreger bisher noch sehr lückenhaft. Darum wird im Folgenden häufig auf Wissen verwiesen, das auf Versuchen mit den leichter zu untersuchenden Prototypen basiert. Aufgrund bereits erwähnter Gemeinsamkeiten in Genomaufbau und Proteinzusammensetzung der NNS RNA-Viren kann auch von einer ähnlichen Transkriptions- und Replikationsstrategie ausgegangen werden.

Dennoch konnten seit der Entwicklung rekombinanter Systeme zu Untersuchung der Molekularbiologie von Filoviren (2.6) bereits einige Unterschiede zu den Modellviren aufgedeckt werden.

2.5.1 Virale Transkription

Virale mRNA ist in mit ZEBOV infizierten Zellen bereits 7 h *post infectionem* nachweisbar, erreicht ein Maximum nach 18h und nimmt danach wieder ab (Sanchez und Kiley, 1987). Die Transkription wird bei Ebolavirus über die Proteine NP, L, VP35 und VP30 im Cytoplasma der infizierten Zelle unter Verwendung zellulärer NTPs bewerkstelligt. NP von MARV enkapsidiert bei solitärer Expression unspezifisch zelluläre RNA (Kolesnikova et al., 2000). Bei der spezifischen Enkapsidierung viraler RNA könnte in Analogie zu anderen NNS RNA-Viren das VP35 als Chaperon wirken. Die Ausbildung von nukleokapsidähnlichen Strukturen wird bei Ebolaviren vermutlich über die Proteine VP35 und VP24 vermittelt (Huang et al., 2002; Noda et al., 2005; Watanabe et al., 2006; Hoenen et al., 2006). Da VP35 sowohl mit NP als auch mit L interagiert, kann es als Brückenprotein die katalytische Untereinheit der Polymerase L zum verpackten Genom transportieren (Becker et al., 1998; Boehmann et al., 2005; Groseth et al., 2009). Trotz fehlender oder nur schwacher Phosphorylierung (Elliott et al., 1985; Becker et al., 1998) ist VP35 das filovirale Analog des Phosphoproteins anderer NNS RNA-Viren und wirkt in trimerer Form als Polymerasekofaktor (Mühlberger et al., 1999; Möller et al., 2005). Darüber hinaus spielt das multifunktionelle VP35 von ZEBOV eine Rolle im Zusammenbau von Nachkommenviren (Johnson et al., 2006) sowie als Inhibitor der angeborenen Immunantwort (Basler et al., 2000, Basler et al., 2003; Cardenas et al., 2006;

Prins et al., 2009). Das L-Protein ist, ebenfalls in Analogie zu anderen NNS RNA-Viren, die katalytische Untereinheit der viralen Polymerase (Abbildung 2) (Kiley et al., 1980). Für mehrere Mitglieder der Mononegavirales konnte gezeigt werden, dass es verantwortlich ist für (i) das Capping der viralen mRNA, (ii) die Methylierung der CAP-Struktur, (iii) die Synthese des Poly-Adenosin-Schwanzes und für (iv) Replikation und (v) Transkription der viralen RNA (Poch et al., 1990). Das L-Protein von Ebolaviren bildet Homooligomere und interagiert mit dem Transkriptionsaktivator VP30 (Lobe, 2007; Groseth et al., 2009). Letzterer ist einzigartig für Filoviren, da innerhalb der *Mononegavirales* nur Pneumoviren ein viertes Protein im RNP besitzen, das sich jedoch funktionell von VP30 unterscheidet (Biacchesi et al., 2003; Cowton et al., 2006). Das VP30 von ZEBOV ist ein ssRNA-bindendes Protein (John et al., 2007) und wird als Hexamer für die Initiation der viralen Transkription benötigt (Weik et al., 2002; Hartlieb et al., 2003, Hartlieb et al., 2007). Reguliert wurde die VP30-abhängige Transkriptionsinitiation von einer vom Transkriptionsstartsignal des NP-Gens gebildeten Sekundärstruktur. Ist diese Struktur zerstört, wird VP30 für die Transkriptionsinitiation nicht mehr benötigt (Weik et al., 2002). Eine mögliche Rolle bei der Reinitiation der Transkription an intern gelegenen Transkriptionsstartsignalen, die ebenfalls Sekundärstrukturen ausbilden können, konnte mit bicistronischen Minigenomen (siehe 2.6) nicht beobachtet werden (Weik et al., 2005), wird aber für ein rekombinantes GFP-Virus voller Länge postuliert (Martinez et al., 2008).

Für die Synthese viraler mRNA vom negativ strängigen RNA-Genom gibt es nur einen einzigen Transkriptionspromotor für alle sieben Gene, der sich im 3' Bereich des Genoms befindet, was erstmals für VSV gezeigt werden konnte (Emerson, 1982). An diesen bindet nach der Modellvorstellung die bei der Infektion in die Wirtszelle eingebrachte RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp), um die einzelnen Gene sukzessiv in 3'→5' Richtung abzulesen. Der Transkriptionspromotor ist bei Ebolaviren noch nicht kartiert, so dass bislang unbekannt ist, wo genau die Transkription initiiert wird und inwiefern der Leader als Matrize kurzer RNAs dient. Wie für die Modellviren gezeigt werden konnte, verläuft die Transkription bei den *Mononegavirales* obligatorisch sequenziell und polar. Dies bedeutet, dass der Polymerasekomplex, sobald er im 3' Bereich des Genoms gebunden hat, in 5' Richtung zu lesen beginnt und die mRNA-Synthese für jedes der sieben Gene nacheinander initiiert bzw. terminiert. Dieser Vorgang wird reguliert über die an den GGs gelegenen Transkriptionsstart- und Transkriptionsstoppsignale. Die Transkription folgt daher der Reihenfolge der Gene auf dem Genom (Abraham und Banerjee, 1976; Ball und White, 1976; Ball, 1977; Glazier et al., 1977; Collins et al., 1980). Das so genannte Stopp-Start-Modell besagt, dass eine Reinitiation an einem stromabwärts gelegenen Transkriptionsstartsignal nur dann erfolgen kann, wenn die RdRp zuvor die mRNA des stromaufwärts gelegenen Gens über Polyadenylierung terminiert hat (Whelan et al., 2004). Da IRs nicht in RNA übersetzt werden

und die Polymerasemoleküle bevorzugt an den GGs von der Matrize abfallen (Iverson und Rose, 1981), wurde die Vorstellung entwickelt, dass IRs in einem Scanningmechanismus überlesen werden (Plattet et al., 2007). Bei dieser Suche nach einem Transkriptionsstartsignal wäre die RdRp weniger fest an den Matrizenstrang gebunden und könnte leichter dissoziieren.

Weil nach dem Abfallen der Polymerase ein erneutes Binden an die Matrize nur am im 3' Ende gelegenen Promotorbereich stattfinden kann und folglich wieder mit der Synthese des ersten Gens begonnen werden muss, entsteht ein so genannter Attenuierungseffekt (Abbildung 5). Das bedeutet, dass promotorproximale Gene sehr häufig, am 5' Ende des Genoms gelegene Gene sehr selten transkribiert werden. Bei VSV korreliert die Häufigkeit einer mRNA direkt mit der Lage des entsprechenden Gens auf dem Genom (Villarreal et al., 1976), während die Halbwertszeiten der einzelnen mRNAs sich nicht unterscheiden (Penica et al., 1979).

Dass diese Modellvorstellung für alle NNS RNA-Viren zutrifft, ist aufgrund der hoch konservierten Reihenfolge der Gene auf dem Genom (siehe 2.4.2) anzunehmen, da die promotor-

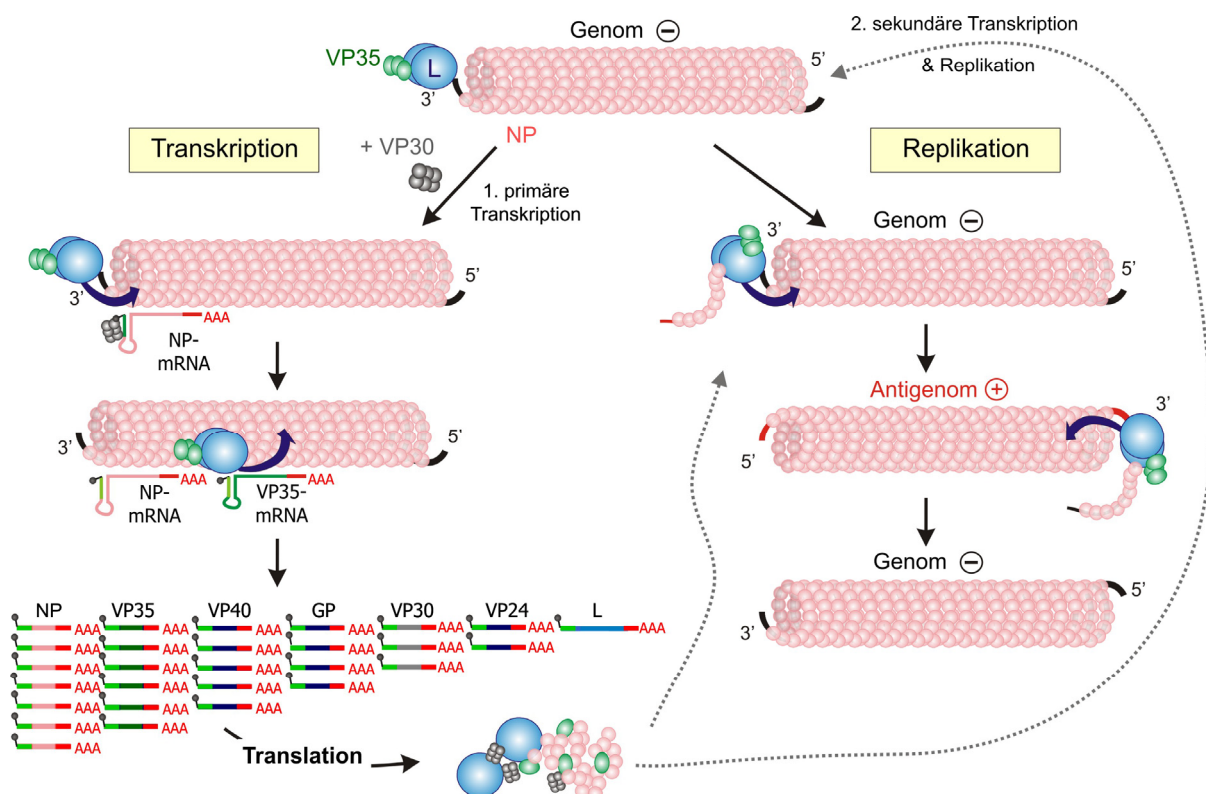


Abbildung 5 : Schematische Darstellung der Transkription und Replikation in Zaire Ebolavirus

Modifiziert nach: Mühlberger, 2007. Nach Freisetzung des viralen Nukleokapsids in das Cytoplasma beginnt die virale Polymerasekomplex mit der primären Transkription. Hierbei wird VP30 zur Überwindung der am 3' Start der ersten mRNA gebildeten Sekundärstruktur benötigt. Da es nur einen einzigen Transkriptionspromotor am 3' Ende des Genoms gibt, entsteht der dargestellte Transkriptgradient. Die virale mRNA wird von der Wirtszelle translatiert. Neu synthetisierte Polymerasekomplexe können das Genom erneut transkribieren und replizieren, wobei die replizierten Antigenome und Genome noch während der Synthese mit NP verpackt werden.

proximal kodierten Nukleoproteine für die Verpackung des Genoms in hohen, die promotor-distal kodierten katalytische Polymeraseuntereinheiten jedoch nur in geringen Mengen benötigt werden.

Bei Ebolavirus konnte ein Vorhandensein eines Transkriptgradienten anhand der in der Real-Time PCR Analyse gebildeten mRNA-Mengen in infizierten Zellen bestätigt werden. So war die mRNA des Nukleoproteins sehr früh nachweisbar und es folgten mit abnehmender Menge die mRNAs des Glykoproteins (4. Gen) sowie die der viralen Polymerase L (letztes Gen) (Beck, 2005). Zudem werden auch in Filoviren die intergenischen Regionen nicht in mRNA übersetzt (Mühlberger et al., 1996) und es existieren Hinweise für eine von voriger Termination abhängige Reinitiation der Transkription (Boehmann, 2002). Die in Ebolavirus gebildeten mRNAs sind am 5' Ende gecappt und am 3' Ende polyadenyliert (Sanchez und Kiley, 1987; Feldmann et al., 1992; Weik et al., 2002). Beide Modifikationen werden vermutlich in Analogie zu anderen NNS RNA-Viren von dem L-Protein kotranskriptionell angefügt. Untersuchungen der Capping-Reaktion bei VSV zeigten, dass die CAP eine einzigartige Struktur trägt und sich auch die Reaktion, über die diese an das 5' Ende der mRNA angefügt und anschließend methyliert wird, deutlich von Eukaryoten und anderen Viren unterscheidet (Ogino und Banerjee, 2007). Um den Poly-Adenosin Schwanz an das 3' Ende der mRNA anzufügen, synthetisiert das L-Protein bei der Termination der Transkription mehrfach über die im Transkriptionsstoppsignal vorhandene Abfolge aus Uridinen. Bei diesem so genannten Stottern werden ca- 100-300 Adenosinreste an das 3' Ende der mRNA angehängt (Wheeler et al., 2004).

Vermutlich über den gleichen Mechanismus wird bei Ebolavirus auch die mRNA des Glykoproteingens kotranskriptionell editiert (Volchkov et al., 2001). In 20% der GP-mRNA wird an der Sequenz 5' GAAACUA₇ 3' (in mRNA-Orientierung), die in der Genomorientierung den Transkriptionsstoppsignalen der Gene sehr ähnlich ist, ein achter Adenosinrest eingefügt. Die Editierung an der Grenze von zwei sonst getrennten und überlappenden offenen Leserahmen führt durch das zusätzliche Nukleotid zu einer Leserasterverschiebung bei der Translation. Ein kontinuierliches Ablesen beider offener Leserahmen wird so ermöglicht und führt zur Bildung eines Proteins voller Länge (Sanchez et al., 1996; Volchkov et al., 1995). Wie Studien an rekombinanten Ebolaviren zeigen, ist das GP stark zytotoxisch. Darum wird über das Editieren der mRNA vermutlich die Menge an gebildetem Protein herunterreguliert (Volchkov et al., 2001). Obwohl auch *Paramyxovirinae* die Kodierungsvielfalt der Phosphoproteingene über mRNA-Editierung erhöhen, unterscheidet sich die genutzte Editierungsstrategie deutlich von der der Ebolaviren. Es werden anstelle eines Adenosins 1-6 Guanosine eingefügt und ausschließlich die virale RdRp kann die Sequenz editieren, während diese bei Ebolaviren auch von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen erkannt werden kann (Volchkov et al., 1995; Volchkov et al., 2001). Für MARV ist kein Editierungs-

mechanismus bei der mRNA-Synthese bekannt, es kodiert ausschließlich für ein GP voller Länge.

Eine weitere Besonderheit für Filoviren sind die in ihrer Struktur konservierten, an den 5' Enden aller mRNAs in ZEBOV und MARV vorhergesagten Sekundärstrukturen, die das jeweilige Transkriptionsstartsignal mit den nachfolgenden Sequenzen ausbildet (Mühlberger et al., 1996; Sanchez et al., 1993). Bisher konnte jedoch ausschließlich der am Start der NP-mRNA in ZEBOV entstehenden Struktur eine Bedeutung in der Transkriptionsregulation nachgewiesen werden. Sie vermittelt während der Transkriptionsinitiation die Abhängigkeit von VP30 (Abbildung 5). Da die mRNA von Filoviren mit einer CAP versehen wird, ist eine Rolle als interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) unwahrscheinlich (Weik et al., 2002).

2.5.2 Virale Replikation

Für die virale Replikation werden bei EBOV und MARV die RNP Komponenten NP, VP30 und L (Mühlberger et al., 1998; Mühlberger et al., 1999) benötigt. Der so gebildete Polymerasekomplex repliziert zwei unterschiedliche Matrizen. Komplementär zum negativ strängigen RNA-Genom werden positiv strängige Antigenome synthetisiert, die im viralen Lebenszyklus nur als Replikationsintermediate dienen, da sie die Matrize für neue virale Genome darstellen (Abbildung 5). Im Unterschied zur Transkription muss die virale Polymerase bei der Replikation alle Start- und Stoppsignale an den GGs überlesen, um eine vollständige Genomkopie synthetisieren zu können. Zudem wird die neu gebildete RNA noch während der Synthese mit den Nukleoproteinen verpackt (Portner, 1982; Carlsen et al., 1985). Im Unterschied zum Antigenom dient das RNA-Genom sowohl als Matrize für die Replikation als auch für die Transkription viraler mRNA. Dies hat zur Folge, dass an seinem 3' Ende der Replikations- und Transkriptionspromotor miteinander überlappen. Der genomische Replikationspromotor von Filoviren zeigt einen zweigeteilten Aufbau (Abbildung 3). Er besteht aus einem Promotorelement (PE) 1, das den kompletten Leaderbereich überspannt und einem zweiten, das sich in der 3' NTR des ersten Gens befindet und aus einer Abfolge von UN₆ Hexameren besteht (Weik et al., 2005; Enterlein et al., 2009). Getrennt werden beide PE durch eine Spacerregion, die das Transkriptionsstartsignal des ersten Gens beinhaltet. Die Sequenz der Spacerregion ist für die Replikationseffizienz unerheblich, Verkürzungen und Verlängerungen des Spacers werden toleriert, wenn sie Vielfaches von sechs Nukleotiden umfassen (Weik et al., 2005). Damit folgen filovirale Replikationspromotoren der für die ebenfalls zweigeteilten Promotoren der *Paramyxovirinae* beschriebenen sogenannten „Rule of six“. Diese bezieht sich bei diesen Viren jedoch auch auf die Genomlänge, die für einen effizienten Ablauf der Replikation durch sechs teilbar sein muss (Calain

und Roux, 1993). Eine solche Regel konnte für die Länge von Filovirusgenomen nicht bestätigt werden (Calain et al., 1999). Damit stellen Filoviren eine Zwischenstufe zwischen Paramyxo- und Pneumoviren dar. Die genaue Länge des Genoms ist bei letzteren, wie auch bei den Filoviren, unwichtig doch ihre ungeteilten Replikationspromotoren sind vollständig im Leader, bzw. Trailer enthalten.

2.5.3 Regulation zwischen Transkription und Replikation

Transkription und Replikation von NNS RNA-Virusgenomen werden von den gleichen RNP Komponenten bewerkstelligt, wobei für beide Prozesse das negativ strängige RNA-Genom als Matrize genutzt wird. Für die Regulation eines Umschaltungsprozesses gibt es zwei unterschiedliche Modelle. Dass Versuche mit Mitgliedern der *Paramyxovirinae* eher Modell 1, solche mit Rhabdoviren eher Modell 2 unterstützen, könnte darauf hindeuten, dass verschiedene Virusfamilien innerhalb der Mononegavirales unterschiedliche Regulationsmechanismen für die RNA Synthese nutzen.

In **Modell 1** wird postuliert, dass der Polymerasekomplex immer am 3' Ende der Matrize binden muss, um von dort beginnend die Nukleoproteine (NP/N) von der Matrize verdrängen zu können. Liegt neu synthetisiertes NP/N nur in geringen Mengen vor, kommt es zu einer Initiation der RNA-Synthese am ersten Nukleotid des 3' Genomendes und somit zur Synthese einer zum Leader komplementären RNA. Durch dabei frei werdende Energie können die NP/N-Proteine besser von der Matrize abgelöst werden, was einen effizienteren Zugang zum Transkriptionsstartsignal des ersten Gens erlaubt. Hier kann nach Freisetzung der Leader-RNA mit der Synthese der mRNA begonnen werden. Bei spät in der Infektion gebildeten großen Mengen an N/NP wird die Synthese der Leader-RNA an ihre gleichzeitige Verpackung gekoppelt und so die Replikation eingeleitet. Hierbei würde die Polymerase über Interaktion mit an der neu gebildeten RNA gebundenen Proteinen in eine prozessivere Form überführt werden und so die Transkriptionssignale überlesen. (Kolakofsky et al., 2004; Curran und Kolakofsky, 2008). Nach diesem Modell reguliert hauptsächlich die Menge an neu gebildetem NP/N, ob die Polymerase als Replikase oder Transkriptase agiert.

Die Grundannahme für **Modell 2** ist, dass es zwei unterschiedliche Polymerasekomplexe gibt, die entweder als Replikase oder als Transkriptase fungieren (Banerjee, 2008; Whelan, 2008). Diese konnten aus mit VSV infizierten Zellen gereinigt werden. Hierbei initiierte die Transkriptase die RNA-Synthese direkt am ersten Genstartsignal, wohingegen die Replikase am 3' Ende des Genoms startete (Qanungo et al., 2004).

Für Ebolaviren ist die Datenlage bisher nicht ausreichend, um das eine oder andere Modell zu stützen. Dennoch spricht die Tatsache, dass VP30 für eine effiziente Replikation des Ge-

noms nicht gebraucht wird, während es für die Transkriptionsinitiation am ersten Gen essenziell ist, für die Ausbildung von Polymerasekomplexen unterschiedlicher Zusammensetzung.

2.6 Ebolavirus-spezifisches Replikations- und Transkriptionssystem

Da alle Arbeiten mit EBOV auf ein Labor der höchsten Sicherheitsstufe beschränkt sind, wurde zur Untersuchung wichtiger cis-aktiver Genomelemente unter reduzierten Sicherheitsbedingungen ein artifizielles ZEBOV-spezifisches Replikations- und Transkriptionssystem etabliert (Mühlberger et al., 1999; Weik, 2001), das in dieser Arbeit in modifizierter Form für die Analyse der GGs eingesetzt wurde. Es basiert auf der Erkenntnis, dass alle für eine effiziente Replikation, Transkription und Verpackung des ZEBOV-Genoms wichtigen cis-aktiven Elemente in den 3' und 5' Enden der genomischen RNA enthalten sind. Im so genannten Minigenom wurden die für die einzelnen Proteine kodierenden Bereiche des Genoms durch ein Chloramphenicolacetyltransferase-Reportergen (CAT) ersetzt (Abbildung 6 A). Dieses steht somit unter der Kontrolle der cis-aktiven Signale der Genomenden. Das so entstandene monocistronische Minigenom 3E-5E dient als Genomäquivalent und kann vom viralen Polymerasekomplex effizient repliziert, transkribiert und verpackt werden.

Im rekonstituierten Replikations- und Transkriptionssystem (Abbildung 6 B) steht das Minigenom in einem Expressionsplasmid unter der Kontrolle eines T7-RNA-Polymerase-Promotors. Zellen, die die DNA-abhängige RNA-Polymerase des T7 Phagen konstitutiv exprimieren, werden mit dem Minigenom-Plasmid transfiziert. Dieses wird von der T7-RNA-Polymerase in negativ orientierte einzelsträngige RNA übersetzt. Das 3'-Ende des Minigenoms wird von der Ribozymsequenz des Hepatitis δ -Virus flankiert, welche nach RNA-Synthese durch ihre autokatalytische Aktivität entfernt wird, so dass das 3'-Ende der geschnittenen RNA dem Leader-Bereich des Filovirusgenoms entspricht. Das 5' Ende ist durch den T7-RNA-Polymerase-Promotor und damit den Startpunkt der RNA-Synthese durch die T7-RNA-Polymerase definiert. Zusätzlich werden Expressionsplasmide in die Zelle eingebracht, die für den EBOV-spezifischen Polymerasekomplex, bestehend aus dem L-, NP- VP35 und VP30-Protein, kodieren. Auch diese werden über einen T7-Promotor von der T7-RNA-Polymerase erkannt, in mRNA transkribiert und anschließend von der Zelle translatiert. Es bildet sich ein viraler Polymerasekomplex, der nun – analog zur Situation in infizierten Zellen – das Minigenom als Substrat für Replikation und Transkription nutzen kann. Über Isolierung der mRNA und CAT-Assay lässt sich die Transkription des Minigenoms direkt und indirekt nachweisen.

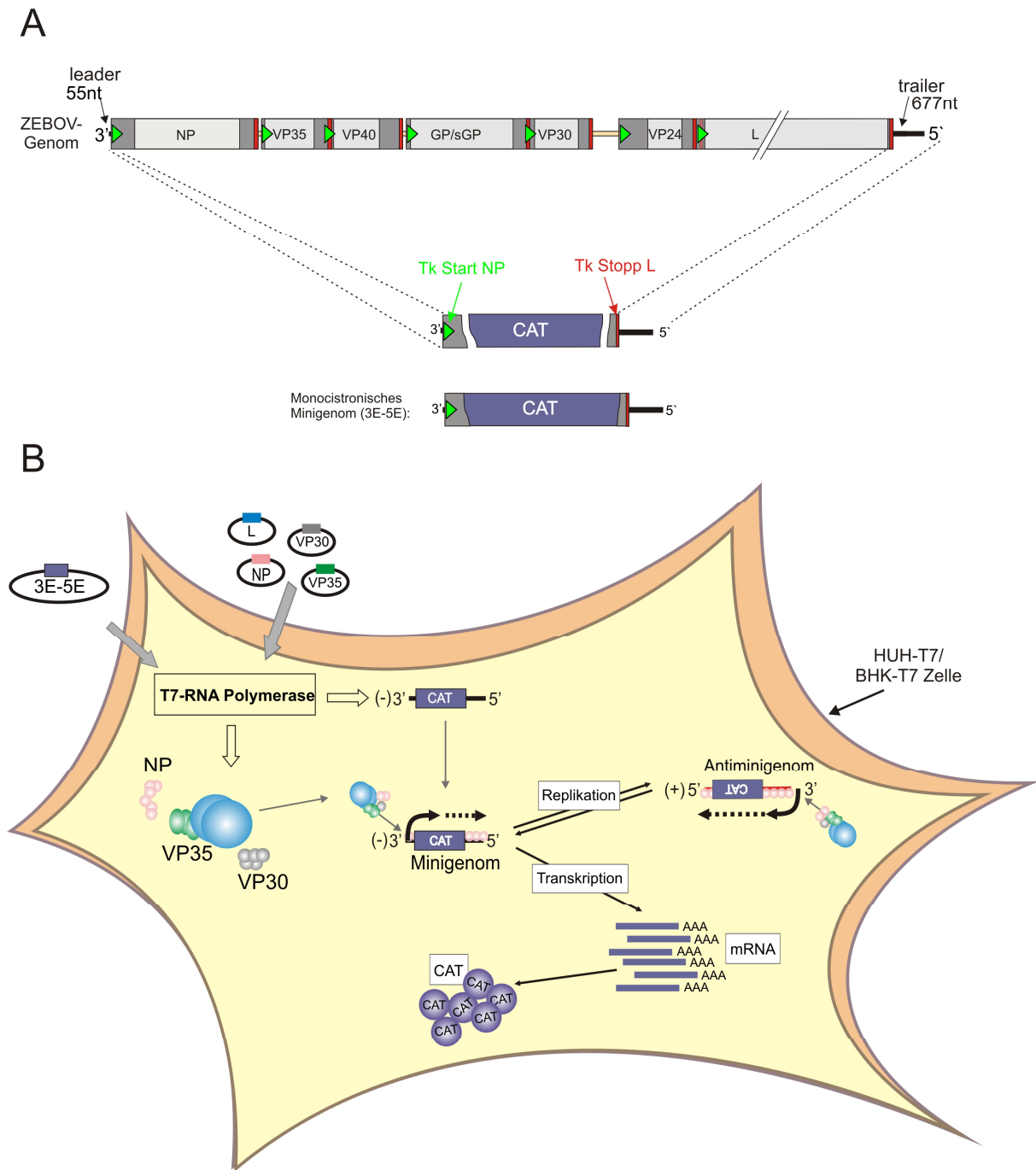


Abbildung 6 : Aufbau des monocistronischen Minigenoms und Funktionsprinzip des rekonstituierten EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystems

A) Schematische Darstellung des monocistronischen Minigenoms. Die Minigenome enthalten am 3'-Ende den Leader und die nicht-translatierte Region des NP-Gens sowie am 5'-Ende den Trailer und die nicht-translatierte Region des L-Gens. **B)** Funktionsprinzip des rekonstituierten EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystems. Zellen, die konstitutiv die T7-RNA-Polymerase exprimieren, werden mit Expressionsplasmiden kodierend für das Minigenom (3E-5E) und für einen funktionellen Polymerasekomplex (L, NP, VP35, VP30) transfiziert. Die T7-RNA-Polymerase transkribiert das Minigenomplasmid in eine einzelsträngige RNA mit negativer Polarität. Die Expressionsplasmide für die Polymerasekomponenten werden ebenfalls von der T7-RNA-Polymerase in mRNA übersetzt und von der Zelle translatiert, so dass sich eine funktionelle virale Polymerase formieren kann. Diese akzeptiert das RNA-Minigenom als Genomäquivalent, das repliziert und transkribiert wird. Es kommt zur Bildung von CAT-mRNA, die mittels Northern Hybridisierung nachgewiesen werden kann, sowie zur Anhäufung von CAT-Enzym, das im CAT-Assay detektierbar ist.

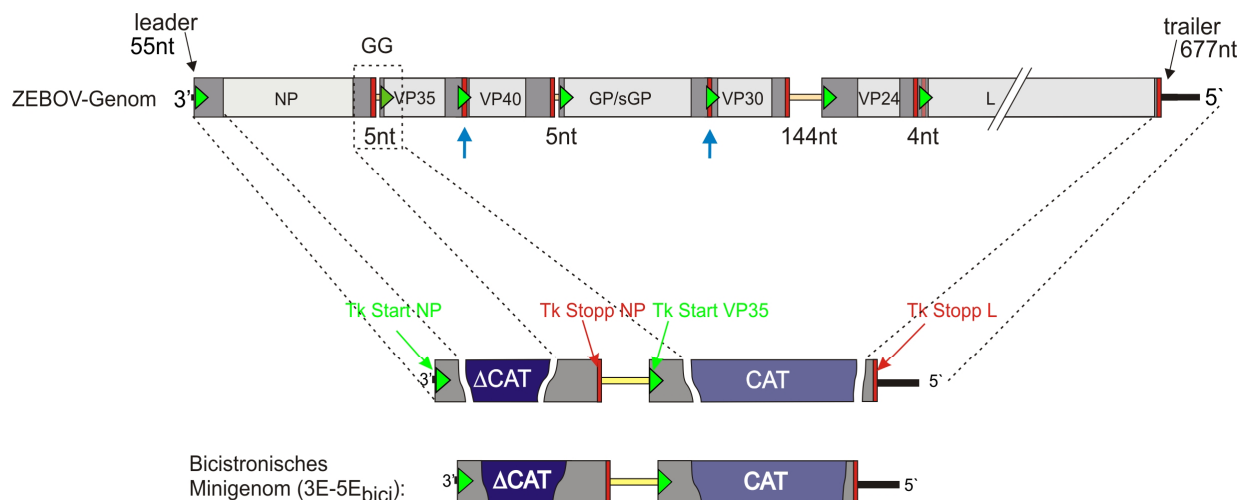


Abbildung 7 : Aufbau des bicistronischen Minigenoms

Das bicistronische Minigenom enthält im Vergleich zu dem monocistronischen 3E-5E ein zusätzliches, verkürztes Reporter gen (Δ CAT) und die zu untersuchende Gengrenze (GG) mit den darin enthaltenen Transkriptionssignalen (Transkriptionsstartsignal: Tk Start; Transkriptionsstoppsignal: Tk Stopp). Hier ist beispielhaft die GG zwischen erstem und zweitem Gen dargestellt.

Zur Untersuchung der GGs wurde das monocistronische Minigenom modifiziert (Abbildung 7). Die zu analysierende Gengrenzregion wurde zusammen mit Teilen der nicht translatierten Regionen der angrenzenden Gene zwischen ein verkürztes CAT-Gen (Δ CAT) und das für ein aktives Enzym kodierende CAT-Gen einkloniert. Die Transkription der in diesem bicistronischen Minigenom ($3E-5E_{bici}$) vorhandenen Reporter gene steht unter der Kontrolle der jeweiligen in der GG enthaltenen Transkriptionssignale. Die Transkription des Δ CAT wird durch das Transkriptionsstartsignal des NP-Gens und das Stoppsignal der GG reguliert. Für die Transkription des vollständigen CAT-Gens müssen das in der GG vorhandene Startsignal und das Transkriptionsstoppsignal des L-Gens erkannt werden.

2.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Der Erkenntnisstand bezüglich der Regulation der viralen RNA-Synthese bei Ebolaviren ist im Vergleich zu anderen NNS RNA-Viren noch sehr lückenhaft. Ziel dieser Arbeit war es, die hoch variablen Gengrenzstrukturen (2.4.3) und ihre Rolle in der Regulation der Transkription zu analysieren.

Dafür wurden drei charakteristische Gengrenzstrukturen untersucht:

- (i) eine GG mit einer kurzen intergenischen Region zwischen erstem und zweitem Gen (GG NP/VP35);

- (ii) die GG zwischen den Genen für VP30 und VP24 mit einer außergewöhnlich langen intergenischen Region von 144 Nukleotiden (GG VP30/VP24);
- (iii) eine für Filoviren einzigartige GG, in der die Transkriptionssignale überlappen (GG VP35/VP40).

1. Transkriptionsregulation in der Virusinfektion

Zunächst sollten die GGs im natürlichen Kontext, also innerhalb des Virusgenoms und während einer Virusinfektion untersucht werden. Es stellte sich die Frage, welche mRNA-Spezies bei einer Infektion gebildet werden und ob die Struktur der GGs die Erkennung der Transkriptionssignale durch die native virale Polymerase beeinflusst.

2. Transkriptionsregulation über Gengrenzen in bicistronischen Minigenomen

Ein weiterer Schritt war die Analyse der GGs unabhängig von ihrer Lage im Genom, da sie dort dem für alle NNS RNA-Viren beschriebenen Attenuierungseffekt der Transkription unterliegen (2.5.1). Hierbei sollten drei ausgewählte GGs mittels bicistronischer Minigenome untersucht werden (2.6). Die Konstrukte sollten in einer Virusinfektion der viralen Polymerase als Genomäquivalent angeboten werden, um zu überprüfen, ob sie als Matrize akzeptiert, repliziert, transkribiert und ausgeschleust werden.

3. Mutationsanalyse der einzelnen Gengrenzen- welche Auswirkung hat die Struktur auf die Transkription?

Anschließend an diese Experimente war geplant, die drei GGs durch Mutationsanalyse mit Hilfe des rekonstituierten EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystems genauer zu untersuchen.

Die Rolle der intergenischen Region

Die nicht konservierte Sequenz und Länge der intergenischen Regionen in den filoviralen Genomen lässt zunächst vermuten, dass diesen Bereichen keine regulatorische Bedeutung bei der Transkription zukommt. Towner et al., 2006 verglichen die Genomsequenzen acht verschiedener MARV Stämme von geographisch wie zeitlich weit auseinander liegenden Ausbrüchen, sowie die bei einem Ausbruch von zehn Patienten gesammelten Virusisolate miteinander. Erstaunlicherweise konnte in beiden Fällen für alle sechs GGs (und damit auch für die intergenischen Regionen) eine hohe genetische Stabilität beobachtet werden. Diese Tatsache legt eine funktionelle Bedeutung der intergenischen Regionen bei der Virusvermehrung nahe. Daher sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, welche Rolle die intergenischen Regionen für die Transkription der angrenzenden Gene

spielen und ob sie essentiell für die Erkennung der angrenzenden Transkriptionssignale sind.

Bezüglich der kurzen und der langen intergenischen Region sollte unabhängig von der Lage der GGs im Genom untersucht werden, inwiefern die Länge der intergenischen Region Einfluss auf die Reinitiationsfrequenz am nachfolgenden Gen nimmt. Weiterhin sollte der Einfluss der Sequenz der intergenischen Region auf die Polymeraseaktivität untersucht werden.

Die Rolle von überlappenden Gengrenzen

Bei der überlappenden GG sollte geklärt werden, inwiefern die beiden aufeinander treffenden Transkriptionssignale sich gegenseitig beeinflussen können. Bedingen Transkriptionstermination und –initiation einander und folgt EBOV dem postulierten Stopp-Start-Modell? Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die Polymerase in der Lage ist, an der GG entgegen ihrer eigentlichen Leserichtung nach einem stromaufwärts gelegenen Transkriptionsstartsignal zu scannen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Brutschrank 6000	Heraeus Instruments, Hanau
Centro LB 960-Luminometer	Berthold Technologies
Certomat® S; Schüttler	B.Braun Biotech International, Melsungen
Entwicklermaschine Optimax 2010	Protec Medizintechnik GmbH&Co KG, Oberstenfelde
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Centrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Gel Doc™ 2000 Gel Documentation System	BioRad, München
GeneQuant <i>pro</i>	Amersham Europe, Freiburg
Horizontalschüttler HS 250 Basis	IKA Labortechnik, Staufen
J-25 Avanti™Centrifuge	Beckmann, Palo Alto, USA
Maxi 14 Hybridisierungsöfen	HYBAID, Heidelberg
Microfuge R Centrifuge	Beckmann, Palo Alto
Mikrowellengerät	Bosch
Nanodrop 1000	Peqlab, Erlangen
Odyssey Infrared Imaging System	Lincoln, USA
pH-Meter C6832	Schott Laborgeräte
Pipetboy comfort	Integra Bioscience, Fernwald
Primus Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments, Hanau
Steri-Cult 200 Inkubator	Forma Scientific
Vacuum Blotter	Appligene, Boekel, Feasterville, PA
Vakupack Tischschweißgerät	Krupps, Essen
Vakuum-Zentrifuge (Speed-vac)	von Keutz, Reiskirchen

3.2 Verbrauchsmaterialien

6x Loading Dye	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
RNA high range ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Blottingpapier GB 002 (Whatman 3MM)	Schleicher und Schuell, Dassel
Nylon membrane, positively charged	Roche Applied Science, Penzberg
Oligo-dT-Zellulose	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Parafilm	American National Can., Greenwich (USA)
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Polystyrolröhrchen (10 ml) REDCAP	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilme PR New CEA	CEA, Strangnäs, Schweden
Röntgenfilme Hyperfilm™	Amersham Biosciences
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Costar, Cambridge (USA)
Zellkulturplatten 6-well	Greiner, Nürtingen

3.3 Kits

AmpliScribe™ T7 Transcription Kit	Biozym Diagnostik Gmbh, Oldendorf
CDP-Star	Roche Applied Science, Penzberg
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche Applied Science, Penzberg
peqGold Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
Luciferase Assay System	Promega, Madison (USA)
QIAfilter HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Z-Competent <i>E.coli</i> Transformation Kit™ and Buffer Set	Zymo Research, Orange (USA)
MycoAlert Mycoplasma Detection Assay	Lonza
FAST-CAT Green (deoxy) Chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kit	Molecular Probes/ Invitrogen, Carlsbad, CA

3.4 Puffer

Für alle Puffer wurden Chemikalien der Firmen Merck, JT Baker, Serva oder Sigma-Aldrich benutzt. Zum Ansetzen der Lösungen wurde destilliertes, autoklaviertes H₂O verwendet. Für die RNA-Puffer wurden nur mit Handschuhen gehandhabte Chemikalien sowie autoklavierte Spatel und- wenn angegeben- RNase-freies H₂O der Firma Qiagen benutzt.

Puffer für mRNA-Isolierung mit Oligo-dT-Cellulose

Binding Buffer (BB)	500 µl 100 µl 500 µl 5 ml 43,9 ml	1 M Tris, pH 7.5 (Endkonz.: 10 mM) 0,5 M EDTA (Endkonz.: 1 mM) 10% SDS (Endkonz.: 0,1 %) 5M NaCl (Endkonz.: 0,5 M) dH ₂ O (RNase-frei) (unbedingt vorlegen!)
2x Elution Buffer (2x EB)	200 µl 40 µl 200 µl ad 10 ml	1 M Tris, pH 7.5 (Endkonz.: 20 mM) 0,5 M EDTA (Endkonz.: 2 mM) 10% SDS (Endkonz.: 0,2 %) dH ₂ O (RNase-frei)
1x Elution Buffer (1x EB)	500 µl 100 µl 500 µl ad 50 ml	1 M Tris, pH 7.5 (Endkonz.: 10mM) 0,5 M EDTA (Endkonz.: 1 mM) 10 % SDS (Endkonz.: 0,1%) dH ₂ O (RNase-frei)

Puffer für Northern Blot Analyse

5x FA-Laufpuffer	20,93 g in ca.700 ml 10 ml 13,3 ml ad 1L	MOPS (=0,1 M) dH ₂ O lösen, mit NaOH auf pH=7 justieren 500 mM EDTA-Lösung, pH=8,0 3 M NaAcetat, pH=7,0 (=40 mM) dH ₂ O
FA-Auftragspuffer (pro Probe)	2 µl 1 µl 1,75 µl 5 µl	dH ₂ O 5x FA-Laufpuffer 37%-Formaldehydlösung Formamid
Northern Blot- Puffer I	11,67 g 8,77 g ad 800 ml ad 1 L	Maleinsäure NaCl dH ₂ O, pH mit NaOH auf 7,5 justieren dH ₂ O auffüllen → autoklavieren

Northern Blot- Puffer III	12,11 g 5,84 g ad 900ml 1/10 Volumen	Tris (100 mM) NaCl (100 mM) dH ₂ O auffüllen → pH mit NaOH auf 9,5 justieren, autoklavieren MgCl ₂ (500mM)→ vor Gebrauch zugeben
20x SSC	175,32g 88,2 g in ca. 800 ml ad 1L	NaCl (3M) Na ₃ Citrat-Dihydrat (0,3M) dH ₂ O lösen, pH mit HCl auf 7,0 justieren dH ₂ O → autoklavieren
Alkalischer Transferpuffer für Northern Blot (pro Gel)	60 ml 0,8 ml ad 100 ml	5 M NaCl-Lösung 1 M NaOH-Lösung dH ₂ O (RNase-frei), frisch ansetzen!
Collins-Hybridisierungslösung (Grosfeld et al., 1995)	30 ml 10 ml 1 ml ad 95 ml	20xSSC 50xDenhardts Lösung 10% SDS dH ₂ O → -20°C
50x Denhardts Lösung	2,5 g 2,5 g 2,5 g ad 250 ml	Ficoll (Typ 400) Polyvinylpyrrolidon BSA dH ₂ O (RNase frei) → steril filtrieren, aliquotiert bei -20°C lagern
SDS / SSC-Waschpuffer	5 ml 10 ml ad 1L	20x SSC (Endkonz. 0,1xSSC) 10% SDS (Endkonz. 0,1% SDS) dH ₂ O
10% RNA-Blockingreagenz	25g ad 250 ml	Blocking Reagent (Roche) Northern Blot-Puffer I (vorher erwärmt) →lösen und autoklavieren, 4°C oder -20°C
NaCl (5 M)	292,2 g ad 1L	NaCl dH ₂ O (RNase-frei) → autoklavieren
EDTA (0,5 M)	146,125 g ad 1L	EDTA dH ₂ O → autoklavieren
Natriumacetat, pH=7,0 (3 M)	246,09 g in 800 ml ad 1L	Natriumacetat dH ₂ O lösen, pH mit NaOH auf 7,0 justieren dH ₂ O
MgCl ₂ (für Puffer III)	101,7 g ad 1L	MgCl ₂ •[6 H ₂ O] dH ₂ O → autoklavieren
SDS (10%)	100 g ca. 800 ml ad 1L	SDS in dH ₂ O (RNase-frei) lösen, auf 68° C erhitzen und mit HCl auf pH=7,2 justieren dH ₂ O → autoklavieren
1M Phosphatpuffer	1M 1M	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ → pH auf 6,8 einstellen
Puffer für DNA-Agarosegelanalyse		
50× TAE, pH 8,0	242 g 57,1 g 100 ml ad 1L	Tris-Base Eisessig 0,5 M EDTA, pH 8,0 dH ₂ O

10× TBE, pH 8,0	108 g 55 g 40 ml ad 1L	Tris-Base Borsäure 0,5 M EDTA, pH 8,0 dH ₂ O
-----------------	---------------------------------	--

Auftragspuffer für RNA-Analyse auf nicht-denaturierenden Agarosegelen

Gel Loading Buffer II	95 % 0,025 % 0,025 % 18 mM 0,025 %	Formamid Xylencyanol Bromphenolblau EDTA SDS
-----------------------	--	--

Puffer für Zellkultur

PBS _{def.} , pH 7.5	8 g 0,2 g 1,15 g 0,2 g ad 1L	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ dH ₂ O
------------------------------	--	---

Puffer für CAT-Assay

Tris, pH=7,5 (250 M)	30,35 g in 800 ml ad 1L	Tris dH ₂ O lösen und mit HCl auf pH=7,5 justieren dH ₂ O → autoklavieren
----------------------	-----------------------------------	--

3.5 Plasmide, Nukleinsäuren und Nukleotide

3.5.1 Vektoren und rekombinante Plasmide

3.5.1.1 Vektoren und erhaltene Plasmide

pTM1	erhalten von B.Moss	NIH, Bethesda, USA
pT/L _{EBO}	Mühlberger et al., 1999	Marburg
pT/NP _{EBO}	Mühlberger et al., 1999	Marburg
pT/VP35 _{EBO}	Mühlberger et al., 1999	Marburg
pT/VP30 _{EBO}	Mühlberger et al., 1999	Marburg
3E-5E	Mühlberger et al., 1999	Marburg
3E-5E(+)	Mühlberger et al., 1999	Marburg
DIG-BS/CAT = pBluescript/(-)CAT	Mühlberger et al., 1999	Marburg
pGL3-control	Promega	Madison, USA
pSV40-Renilla	Promega	Madison, USA
pCAGGS-T7	Neumann et al., 2002	Zur Verfügung gestellt von T. Takimoto, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN und Y. Kawaoka, University of Wisconsin, Madison, WI

3.5.1.2 Hergestellte Plasmide

Plasmidname (alternativer Name)	Besonderheit, Referenz und Herstellung
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{wt}	Bicistronisches Minigenom mit der Gengrenzregion NP/VP35 zwischen den Reportergenen ΔCAT und CAT; hergestellt aus 3E-5E (3.5.1.1) Siehe Weik et al., 2002
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{CAGUU} (=Bici 436-A1)	IR teilweise substituiert (wt: 3'-GAUUA-5'; A1: 3' <u>CAGUU</u> 5'). Mittels Quickchange-Mutagenese auf Grundlage von Bici 436-wt. Siehe Boehmann, 2002; Brauburger, 2004
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{CCGGU} (=Bici 436-A2)	IR vollständig substituiert (wt: 3'-GAUUA-5'; A2: 3' <u>CCGGU</u> 5'). Mittels Quickchange-Mutagenese auf Grundlage von Bici 436-wt. Siehe Boehmann, 2002; Brauburger, 2004
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR3nt} (=Bici 436-B)	IR auf 3 Nukleotide verkürzt (wt: 3'-GAUUA-5'; B: 3' - <u>AUU</u> - 5'). Mittels Quickchange-Mutagenese auf Grundlage von Bici 436-wt. Siehe Boehmann, 2002; Brauburger, 2004
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR0nt} (=Bici 436-C)	IR deletiert. Mittels Quickchange-Mutagenese auf Grundlage von Bici 436-IR3nt. Siehe Boehmann, 2002; Brauburger, 2004
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{CCGGA} (=Bici 436-D)	Nukleotide 1-4 der IR substituiert (wt: 3'-GAUUA-5; D: 3' <u>CCGGA</u> 5') Siehe Brauburger, 2004
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{GCGGA} (=Bici 436-E)	Nukleotide 2-4 der IR substituiert (wt: 3'-GAUUA-5; D: 3' <u>GCGGA</u> 5') Siehe Brauburger, 2004
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR10nt} (=Bici 436-IR10nt-3)	IR NP/VP35 um 5nt verlängert. Auf Grundlage von Bici436-IR10nt-2 kloniert. Dieses enthielt fälschlicherweise das Stoppsignal des VP30-Gens, anstelle des von NP. Darum per QC-Mutagenese das fehlende Uracil eingefügt.
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR10nt*} (=Bici 436-IR10nt-4)	IR NP/VP35 um 5nt verlängert und Sequenz angepasst an IR VP30/VP24. Mittels Quickchange-Mutagenese auf Grundlage von Bici 436-IR10nt-3 die IR-Sequenz der der GG VP30/VP24 angeglichen.
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR15nt} (=Bici 436-IR15nt)	IR NP/VP35 um 10nt verlängert. Mittels Quickchange-Mutagenese auf Grundlage von Bici 436-IR10nt-2 die IR um 5nt verlängert.
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR15nt*} (=Bici 436-IR15nt-2)	IR NP/VP35 um 10nt verlängert und Sequenz angepasst an IR VP30/VP24. Mittels Quickchange-Mutagenese auf Grundlage von Bici 436-IR15nt die IR-Sequenz der der GG VP30/VP24 angeglichen.
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR25nt} (=Bici 436-IR25nt)	IR NP/VP35 um 20nt verlängert. Mittels Quickchange-Mutagenese auf Grundlage von Bici 436-IR20nt hergestellt.
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR30nt} (=Bici 436-IR30nt)	IR NP/VP35 um 25nt verlängert, mittels Quickchange-Mutagenese auf Grundlage von Bici436-IR30nt hergestellt.
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR30nt*} (=Bici 436-IR30nt-2)	IR NP/VP35 um 25nt verlängert und Sequenz angepasst an IR VP30/VP24. Mittels Quickchange-Mutagenese mit Bici 436-IR30nt Sequenz an IRVP30/VP24 angepasst.
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR35nt*} (=Bici 436-IR35nt)	IR NP/VP35 um 30nt verlängert und Sequenz angepasst an IR VP30/VP24. Mittels Quickchange-Mutagenese mit Bici-IR30nt* IR um 5nt verlängert
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR40nt*} (=Bici 436-IR40nt)	IR NP/VP35 um 35nt verlängert und Sequenz angepasst an IR VP30/VP24. Mittels Quickchange-Mutagenese mit Bici-IR35nt* IR um 5nt verlängert
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR45nt*} (=Bici 436-IR45nt)	IR NP/VP35 um 40nt verlängert und Sequenz angepasst an IR VP30/VP24. Mittels Quickchange-Mutagenese mit Bici-IR40nt* IR um 5nt verlängert.
3E-5E _{bici} NP/VP35 _{IR50nt*} (=Bici 436-IR50nt)	IR NP/VP35 um 45nt verlängert und Sequenz angepasst an IR VP30/VP24. Mittels Quickchange-Mutagenese mit Bici-IR50nt* IR um 5nt verlängert
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{wt} (=Bici 440-wt)	Bicistronisches Minigenom mit der Gengrenzregion VP30/VP24 (Tk-Stopp VP30-IR (144nt)-Tk-Start VP24) zwischen den Reportergenen ΔCAT und CAT; hergestellt aus 3E-5E (3.5.1.1). War im Labor bereits vorhanden.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{Ins148nt} (=Bici440-2= Bici440-IR292nt)	IR VP30/VP24 um 148nt auf 292nt verlängert. Klonierung siehe Brauburger, 2004.

Plasmidname (alternativer Name)	Besonderheit, Referenz und Herstellung
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 131nt*} (=Bici440-IR131nt)	IR VP30/VP24 um 13 Nukleotide verkürzt. Mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt hergestellt.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 111nt*} (=Bici440-IR111nt)	IR VP30/VP24 um 33 Nukleotide verkürzt. Mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt hergestellt.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 91nt*} (=Bici440-IR91nt)	IR VP30/VP24 um 53 Nukleotide verkürzt. Mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt hergestellt.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 51nt*} (=Bici440-IR51nt)	IR VP30/VP24 um 93 Nukleotide verkürzt. Mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt hergestellt.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 46nt*} (=Bici440-IR46nt)	IR VP30/VP24 um 98 Nukleotide verkürzt. Mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt hergestellt.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 40nt} (=Bici440-IR40nt)	IR VP30/VP24 um 104 Nukleotide verkürzt. Mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt hergestellt. Nukleotid an Position 4 der IR deletiert.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 35nt} (=Bici440-IR35nt)	IR VP30/VP24 um 109 Nukleotide verkürzt. Mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt hergestellt. Nukleotid an Position 4 der IR deletiert.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 30nt} (=Bici440-IR30nt)	IR VP30/VP24 um 114 Nukleotide verkürzt. Mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt hergestellt. Nukleotid an Position 4 der IR deletiert.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 20nt} (=Bici440-IR20nt)	IR VP30/VP24 um 124 Nukleotide verkürzt. Mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt hergestellt. Nukleotid an Position 4 der IR deletiert.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 10nt} (=Bici440-IR10nt)	IR VP30/VP24 um 134 Nukleotide verkürzt. Mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt hergestellt. Nukleotid an Position 4 der IR deletiert.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 10nt*} (=Bici440-IR10nt-2)	IR VP30/VP24 um 134 Nukleotide verkürzt und Sequenz an wt-IR angepasst. Mittels Quickchange-Mutagenese aus Bici440-IR10nt hergestellt.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 20nt*} (=Bici440-IR20nt-2)	IR VP30/VP24 um 124 Nukleotide verkürzt und Sequenz an wt-IR angepasst. Mittels Quickchange-Mutagenese aus Bici440-IR20nt hergestellt.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 30nt*} (=Bici440-IR30nt-2)	IR VP30/VP24 um 114 Nukleotide verkürzt und Sequenz an wt-IR angepasst. Mittels Quickchange-Mutagenese aus Bici440-IR30nt hergestellt.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 40nt*} (=Bici440-IR40nt-2)	IR VP30/VP24 um 104 Nukleotide verkürzt und Sequenz an wt-IR angepasst. Mittels Quickchange-Mutagenese aus Bici440-IR40nt hergestellt.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 5nt*} (=Bici440-IRNP/VP35)	IR VP30/VP24 um 139 Nukleotide verkürzt. Sequenz entspricht der wt-IR von GG NP/VP35. Hergestellt mittels Deletions-PCR aus Bici440-wt.
3E-5E _{bici} VP30/VP24 _{IR 0nt*} (=Bici440-delIR)	IR VP30/VP24 vollständig deletiert. Hergestellt aus Bici440-IR5nt mittels Quickchange-Mutagenese.
3E-5E _{bici} VP35/VP40 _{wt}	Bicistronisches Minigenom mit der Gengrenzregion VP35/VP40 (Tk-Start VP40-Tk-Stopp VP35) zwischen den Reporterregionen ΔCAT und CAT; hergestellt aus 3E-5E (3.5.1.1)
3E-5E _{bici} VP35/VP40 _{ins8nt}	Tk-Start VP40 um 8nt von Tk-Stopp VP35 separiert. Klonierung siehe Brauburger, 2004.
3E-5E _{bici} VP35/VP40 _{ins11nt}	Tk-Start VP40 um 11nt von Tk-Stopp VP35 separiert. Klonierung siehe Brauburger, 2004.
3E-5E _{bici} VP35/VP40 _{ins15nt}	Tk-Start VP40 um 15nt von Tk-Stopp VP35 separiert. Klonierung siehe Brauburger, 2004.
3E-5E _{bici} VP35/VP40 _{ins21nt}	Tk-Start VP40 um 21nt von Tk-Stopp VP35 separiert. Klonierung siehe Brauburger, 2004.
3E-5E _{bici} VP35/VP40 _{ins31nt}	Tk-Start VP40 um 31nt von Tk-Stopp VP35 separiert. Klonierung siehe Brauburger, 2004.
3E-5E _{bici} VP35/VP40 _{ins39nt}	Tk-Start VP40 um 39nt von Tk-Stopp VP35 separiert. Klonierung siehe Brauburger, 2004.
3E-5E _{bici} VP35/VP40 _{Stoppmut}	Tk-Stopp VP40 durch Substitutionen zerstört. Klonierung siehe Boehmann, 2002 und Brauburger, 2004
3E-5E _{bici} VP35/VP40 _{Startmut}	Tk-Start VP40 durch Substitutionen zerstört. Klonierung siehe Boehmann, 2002 und Brauburger, 2004

3.5.2 Primer

Interne Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendet:
369	215 v - 95	CTT GAA GAG ATG TTT TTA TCT CAT ATG GAG	PCR
370	CAT 517 / Ase I, Bgl II	GGA att aat aga tct AGT TTC AGT TTG CTC ATG GAA AAC GGT GTA	PCR
436	EBO - 2728 v / Bgl II	gat aga tct GCT AAC ATT AAG TAG TCA AGG AAC	Seq Bici436
437	EBO - 3128 m / Bam HI	gat gga tcc CTT GTT AGA CCA GCT TTT CTT TTA	Seq Bici436
438	EBO - 4152 v / Bgl II	gat aga tct GCC AAT CTC CCT TCC CTC CGA AAG	Seq Bici438
439	EBO - 4478 m / Bam HI	ggg gga tcc ATT TTT AAC AAT TTT GCT CAA CGT	Seq Bici438
440	EBO - 9425 v / Bgl II	gat aga tct GTA TAC CTA TCA TCA TAT ATT TAA	Seq Bici440
441	EBO - 9991 m / Bam HI	gat gga tcc GGA CTA CCC TGA AAT AGT ACT TTG	Seq Bici440
2074	2074_Bici440-IR20_F	CTA AAC TAA TGA TGA AGA TTA ATG CGG	Del-PCR
2075	2075_Bici440-IR20_R	TGT TCC GCA GTT TTT CTT AAT ATT TTA AG	Del-PCR
2076	2076_Bici440-IR50_F	TTG TGA CCG GAA ATG CTA AAC TAA TG	Del-PCR
2077	2077_Bici440-IR50_R	AGC ATA AAG AAT TTA TGT TCC GCA G	Del-PCR
2094	2094_ZEBOV-VP35-SP6-rev	att tag gtg aca cta taG ATT CAA TCT TAC CCC GAA TCG C	Sonde
2095	2095_ZEBOV-VP35-SP6-for	CTA ATG ACC GGA AGA ATT CCT GTA AGC GAC ATC TTC TGT G	Sonde
2096	2096_ZEBOV-VP40-SP6-rev	att tag gtg aca cta taG ATC GGC ACT GTT CCC CTT CTT CC	Sonde
2097	2097_ZEBOV-VP40-SP6-for	CAC ACC AGG CAG TGT GTC ATC AGC ATT CAT CCT TGA AGC	Sonde
2098	2098_ZEBOV-VP30-SP6-rev	att tag gtg aca cta taG AGT CAA CAA TGC TCT TAA TTT TG	Sonde
2099	2099_ZEBOV-VP30-SP6-for	GAC ACG ACC ACC ATG TTC GAG CAC GAT CAT CAT CCA GAG A	Sonde
2100	2100_ZEBOV-VP24-SP6-rev	att tag gtg aca cta taG AGC ATC CAA TTT GTT AAT AAA CcT GAG	Sonde
2101	2101_ZEBOV-VP24-SP6-for	GCT AAA GCT ACG GGA CGA TAC AAT CTA ATA TCG CCC AAA AAG G	Sonde
2106	2106_Bici440-IR30_F	AAA TGC TAA ACT AAT GAT GAA GAT TAA TGC GG	Del-PCR
2107	2107_Bici440-IR30_R	ATT TAT GTT CCG CAG TTT TTC TTA ATA TTT TAA G	Del-PCR
2108	2108_Bici440-IR35_F	CGG AAA TGC TAA ACT AAT GAT GAA GAT TAA TG	Del-PCR
2109	2109_Bici440-IR35_R	GAA TTT ATG TTC CGC AGT TTT TCT TAA TAT TTT AAG	Del-PCR
2110	2110_Bici440-IR40_F	ACC GGA AAT GCT AAA CTA ATG ATG AAG ATT AAT G	Del-PCR
2111	2111_Bici440-IR40_R	AAA GAA TTT ATG TTC CGC AGT TTT TCT TAA TAT TTT AAG	Del-PCR
2112	2112_Bici440-IR45_F	GTG ACC GGA AAT GCT AAA CTA ATG	Del-PCR
2113	2113_Bici440-IR45_R	ATA AAG AAT TTA TGT TCC GCA G	Del-PCR
2114	2114_Bici440-IR10_F	CGC AGT TTT TCT TAA TAT TTT AAG ATA TC	Del-PCR
2115	2115_Bici440-IR10_R	CTA ATG ATG AAG ATT AAT GCG GAG G	Del-PCR
2116	2116_Bici440-IR5-NP-VP35_F	AAT GAT GAA GAT TAA TGC GGA GG	Del-PCR
2117	2117_Bici440-IR5-NP-VP35_R	AGT TTT TCT TAA TAT TTT AAG AGA TCA TTA GTA AG	Del-PCR
2185	2185_Bici440-IR90_F_p	TTC TTG TTT CAA GAG GTA GAT TGT G	Del-PCR
2186	2186_Bici440-IR90_R_p	ACA CCT CCT CCA CAG CTT GAA G	Del-PCR
2187	2187_Bici440-IR110_F_p	AAA AAT ATT GTT CTT GTT TCA AGA GG	Del-PCR
2188	2188_Bici440-IR110_R_p	CCA ATA CCA AAC ACC TCC TCC ACA G	Del-PCR
2189	2189_Bici440-IR130_F_p	ACA AGC TTG TAA AAA TAT TG	Del-PCR
2190	2190_Bici440-IR130_R_p	ATA ACA ATA GCC AAT ACC AAA CAC CTC C	Del-PCR
2212	2212-Bici436IR10-30/24-F1	GTT TTA TAA TTA AGA AAA ACT GAG ATA ATG ATG AAG ATT AAA ACC	QC-M
2213	2213-Bici436IR10-30/24-R1	GGT TTT AAT CTT CAT CAT TAT CTC AGT TTT TCT TAA TTA TAA AAC	QC-M

Interne Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendet:
2214	2214-Bici436IR10-30/24-F2	GTT TTA TAA TTA AGA AAA ACT GCG CTA ATG ATG AAG ATT AAA ACC	QC-M
2215	2215-Bici436IR10-30/24-R2	GGT TTT AAT CTT CAT CAT TAG CGC AGT TTT TCT TAA TTA TAA AAC	QC-M
2216	2216-Bici436IR10-30/24-F3	GTT TTA TAA TTA AGA AAA AAC TGC GCT AAT GAT GAA GAT TAA AAC C	QC-M
2217	2217-Bici436IR10-30/24-R3	GGT TTT AAT CTT CAT CAT TAG CGC AGT TTT TTC TTA ATT ATA AAA C	QC-M
2223	2223-Bici436IR15-30/24-F	GAA AAA ACT GCG GAA AAC TAA TGA TGA AG	QC-M
2224	2224-Bici436IR15-30/24-R	CTT CAT CAT TAG TTT TCC GCA GTT TTT TC	QC-M
2227	2227-Bici436IR25-30/24-F	GAA AAA ACT GCG GAA CAT AAT GCT AAA CTA ATG ATG	QC-M
2228	2228-Bici436IR25-30/24-R	CTT CAT CAT TAG TTT AGC ATT ATG TTC CGC AGT	QC-M
2229	2229-Bici436IR30-30/24-F	GCG GAA CAT AAA TAA ATG CTA AAC TAA TG	QC-M
2230	2230-Bici436IR30-30/24-R	CAT TAG TTT AGC ATT TAT TTA TGT TCC GCA G	QC-M
2234	#2234-Bici440-IR10nt2-F	CTT AAA ATA TTA AGA AAA ACT <u>G</u> AC CTA ATG ATG AAG ATT AAT G	QC-M
2235	#2235-Bici440-IR10nt2-R	CAT TAA TCT TCA TCA TTA <u>G</u> G I CAG TTT TTC TTA ATA TTT TAA G	QC-M
2236	#2236-Bici440-IR20nt2-F	CTT AAA ATA TTA AGA AAA ACT <u>G</u> AC GGA ACC TAA ACT AAT GAT GAA G	QC-M
2237	#2237-Bici440-IR20nt2-R	CTT CAT CAT TAG TTT AGG TTC <u>C</u> G I CAG TTT TTC TTA ATA TTT TAA G	QC-M
2238	#2238-Bici440-IR40nt2-F	CTT AAA ATA TTA AGA AAA ACT <u>G</u> AC GGA ACA TAA ATT CTT ACC GGA AAT GC	QC-M
2239	#2239-Bici440-IR40nt2-R	GCA TTT CCG GTA AGA ATT TAT GTT CCG <u>I</u> CA GTT TTT CTT AAT ATT TTA AG	QC-M
2255	#2255-Bici436-IR10nt-4-F	GAA AAA ACT GAC CTA ATG ATG AAG	QC-M
2256	#2256-Bici436-IR10nt-4-R	CTT CAT CAT TAG GTC AGT TTT TTC	QC-M
2257	#2257-Bici436-IR15nt-2-F	GAA AAA ACT GAC GGA AAC TAA TGA TGA AG	QC-M
2258	#2258-Bici436-IR15nt-2-R	CTT CAT CAT TAG TTT CCG TCA GTT TTT TC	QC-M
2261	#2261-Bici440-IR30nt-2-F	CTT AAA ATA TTA AGA AAA ACT GAC GGA ACA TAA AAA ATG CTA AAC	QC-M
2262	#2262-Bici440-IR30nt-2-R	GTT TAG CAT TTT TTA TGT TCC GTC AGT TTT TCT TAA TAT TTT AAG	QC-M
2263	#2263-Bici436-IR30nt-2-F	GAA AAA ACT GAC GGA ACA TAA AAA ATG CTA AAC	QC-M
2264	#2264-Bici436-IR30nt-2-R	GTT TAG CAT TTT TTA TGT TCC GTC AGT TTT TTC	QC-M
2279	#2279-Bici436-IR35nt-F	GAA AAA ACT GAC GGA ACA TAA ATT CGG AAA TGC TAA ACT AAT G	QC-M
2280	#2280-Bici436-IR35nt-R	CAT TAG TTT AGC ATT TCC GAA TTT ATG TTC CGT CAG TTT TTT C	QC-M
2281	#2281-Bici436-IR40nt-F	CTG ACG GAA CAT AAA TTC TTA CCG GAA ATG CTA AAC	QC-M
2282	#2282-Bici436-IR40nt-R	GTT TAG CAT TTC CGG TAA GAA TTT ATG TTC CGT CAG	QC-M
2283	#2283-Bici436-IR45nt-F	GGA ACA TAA ATT CTT TAG TGA CCG GAA ATG CTA AAC	QC-M
2284	#2284-Bici436-IR45nt-R	GTT TAG CAT TTC CGG TCA CTA AAG AAT TTA TGT TCC	QC-M
2285	#2285-Bici436-IR50nt-F	GGA ACA TAA ATT CTT TAT GCT TGT GAC CGG AAA TGC TAA AC	QC-M
2286	#2286-Bici436-IR50nt-R	GTT TAG CAT TTC CGG TCA CAA GCA TAA AGA ATT TAT GTT CC	QC-M
2289	#2289- Bici440-dellR-F	CTC TTA AAA TAT TAA GAA AAA GAT GAA GAT TAA TGC GG	QC-M
2290	#2290- Bici440-dellR-R	CCG CAT TAA TCT TCA TCT TTT TCT TAA TAT TTT AAG AG	QC-M
2295	#2295-Bici440IR10ntmut-3a-f	CTT AAA ATA TTA AGA AAA A <u>t</u> T <u>a</u> Ag CgA <u>t</u> TG ATG AAG ATT AAT GC	QC-M
2296	#2296-Bici440IR10ntmut-3a-r	GCA TTA ATC TTC ATC A <u>a</u> T <u>c</u> Gg T <u>t</u> A <u>a</u> TT TTT CTT AAT ATT TTA AG	QC-M
2297	#2297-Bici440IR10ntmut-3-f	CTT AAA ATA TTA AGA AAA A <u>t</u> c <u>a</u> gg <u>t</u> cG ATG AAG ATT AAT GCG	QC-M
2298	#2298-Bici440IR10ntmut-3-r	CGC ATT AAT CTT CAT C <u>a</u> g <u>c</u> ct <u>c</u> at <u>q</u> aT TTT TCT TAA TAT TTT AAG	QC-M

Alle Primer wurden von der Firma Sigma-ARK GmbH/Darmstadt synthetisiert. Sie wurden als Lyophilisat geliefert und in entsprechender Menge dH₂O gelöst, um sie auf eine Endkonzentration von 100 pmol/μl einzustellen.

F/R, bzw. for/rev steht für vorwärts oder revers orientierte Primer. Sie sind am 5'-Ende nicht phosphoryliert, außer, sie tragen am Ende des Namens ein „p“ zur Kennzeichnung der Phosphorylierung.

QC-M: eingesetzt für Quickchange-Mutagenese; Del-PCR: eingesetzt für Deletions-PCR zur Verkürzung der IR; Sonde: eingesetzt zur Herstellung einer Sonden-Matrize mit SP6-Promotor. In fett dargestellt ist die Promotorsequenz der SP6-Polymerase. Seq: Klonierungsprimer der ursprünglichen bicistronischen Minigenome; eingesetzt für Sequenzierungen der GGs; PCR: Primer eingesetzt für PCR bei Herstellung der bicistronischen Minigenome.

Bici436: bicistronisches Minigenom mit GG NP/VP35; Bici438: bicistronisches Minigenom mit GG VP35/VP40; Bici440: bicistronisches Minigenom mit GG VP30/VP24

Sequenz: in Großbuchstaben dargestellt sind ZEBOV-spezifische Nukleotide, unspezifische Sequenz ist in Kleinbuchstaben geschrieben. Unterstrichen dargestellt sind über Quickchange-Mutagenese eingeführte Mutationen.

3.6 Enzyme und Antikörper

3.6.1 Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen sowie die zugehörigen Reaktionspuffer (10x konzentriert) wurden von der Firma New England Biolabs (Ipswich, MA) sowie von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

3.6.2 Sonstige Enzyme

Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal Phosphatase (CIP), 10 U/μl	New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA
Pfu- DNA Polymerase, 2,5 U/μl	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK)	Roche Applied Science, Penzberg
T4 DNA Ligase, 4 U/μl	New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA
Pwo DNA-Polymerase, 1 U/μl	Roche Applied Science, Penzberg
Ribonuklease Inhibitor, 20 U/μl	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot

3.6.3 Antikörper und Detektions-Agentien

Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	Roche Applied Science, Penzberg
Anti-Digoxigenin-Biotin; Mouse monoclonal ab419[BT.21H8], IgG1	Abcam, Cambridge
Streptavidin-IRDye800 CW	Rockland Immunochemicals, USA

3.7 Nährmedien

3.7.1 Nährmedien für Bakterienzellen

LB-Agar (1,5 %)	3,75 g	Bacto-Agar
	ad 250 ml	LB-Medium

LB-Medium	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Bacto-Pepton (Trypton)
	ad 1L	dH ₂ O
SOB-Medium (für Z-kompetente Zellen)	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	NaCl
	950 ml	dH ₂ O → rühren, bis alles gelöst ist
	10ml	KCl (250mM)
		→ pH-Wert auf 7,0 mit NaOH (ca. 0,2ml 5 N) einstellen
	ad 1L	dH ₂ O → autoklavieren
	5ml	MgCl ₂ (2M) (steril) → kurz vor Verwendung steril zugeben
250 mM KCl (für SOB)	1,86 g	KCl
	ad 100 ml	dH ₂ O
2 M MgCl₂	19 g	MgCl ₂
	ad 100 ml	→ autoklavieren

3.7.2 Nährmedien für Säugerzellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Gibco), Carlsbad, CA
Glasgow Medium (BHK 21 Medium) (GMEM)	
GMEM komplettiert mit:	
+ 2-10 % Newborn Calf Serum (10ml-50ml)	
+ 5 ml MEM non-essential amino acids solution (5ml)	
+ 1 % Pen/Strep (5ml)	
+ 5 % Tryptose Phosphate Broth (25ml)	Invitrogen (Gibco), Carlsbad, CA
Fetales Kälberserum (FCS)	Pan BIOTECH GmbH
L-Glutamin (200mM) (100x)	Invitrogen (Gibco), Carlsbad, CA
Penicillin/Streptomycin (100x) (Pen/Strep) (5000 U Penicillin G (Natriumsalz); 5000 µg Streptomycin (Sulfat in 0,85% Saline))	Invitrogen (Gibco), Carlsbad, CA
Trypsin/EDTA (0,05%) (5 g/L of Trypsin (1:250) and 0.2 g/L EDTA•4Na in Hanks' B.S.S)	Invitrogen (Gibco), Carlsbad, CA
Tryptose Phosphate Broth (29.5 g/L in deionized water)	Sigma, St. Louis; MO
MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100X)	Invitrogen (Gibco), Carlsbad, CA

3.8 Zellen und Viren

3.8.1 Prokaryotische Zellen

E. coli Stamm XL1-Blue

Stratagene, Heidelberg

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

3.8.2 Eukaryotische Zellen

BSR-T7/5-Zellen: Derivat einer Hamsternierenzelllinie, das konstitutiv die T7 RNA-Polymerase exprimiert (Buchholz et al., 1999). Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. K.K. Conzelmann, Max von Pettenkofer Institut und Genzenter, München

Huh-T7-Zellen: Derivat einer humane Hepatozytenzelllinie, das konstitutiv die T7-RNA-Polymerase exprimiert. Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. V. Gausmüller, Abteilung für Medizinische Molekularbiologie, Universität Lübeck

3.8.3 Viren

Zaire Ebolavirus (ZEBOV): Stamm Mayinga. Erhalten von: Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA).

Die Arbeiten mit ZEBOV- infizierten Zellen wurden bis zur Inaktivierung der Proben im Labor der Sicherheitsstufe L4 des Instituts für Virologie in Marburg von PD Dr. Elke Mühlberger, Dr. Verena Krähling, Dr. Michael Schümann oder Dr. Judith Olejnik durchgeführt.

3.9 Klonierung bicistronischer *Zaire Ebolavirus*-spezifischer Minigenome

Die bicistronischen Minigenome mit den Wildtyp-GGs waren bereits im Labor vorhanden. Sie wurden kloniert, wie in Weik (2002) für das bicistronische Minigenom der GG NP/VP35 beschrieben („E-bici-1,2“ in Weik, 2002). Alle Minigenome basieren auf dem Konstrukt 3E-5E (Mühlberger et al., 1999). In dieses wurden die ersten 300 Nukleotide des CAT-Gens einkloniert, so dass Konstrukt 3E-5E-ΔCAT entstand (Weik et al., 2002). Dieses enthielt das verkürzte CAT-Gen (ΔCAT) sowie das CAT-Gen voller Länge, getrennt durch eine Schnittstelle des Restriktionsenzym *Bgl*II. Mittels Reverser Transkriptions-PCR wurden die GG

NP/VP35 (Nukleotide 2728-3128, basierend auf Sequenz: AF086833), GG VP35/VP40 (Nukleotide 4152-4478, basierend auf Sequenz: AF086833) sowie GG VP30/VP24 (Nukleotide 9425-9992, basierend auf Sequenz: AF086833) amplifiziert. Der Primer, der für die Herstellung einer cDNA eingesetzt wurde, enthielt eine *Bgl*II-Restriktionsenzym-Schnittstelle, der zweite Primer wurde von einer *Bam*HI-Schnittstelle flankiert. Die jeweiligen PCR-Fragmente wurden in die *Bgl*II-Schnittstelle des Konstrukts 3E-5E- Δ CAT eingebracht (Abbildung 8).

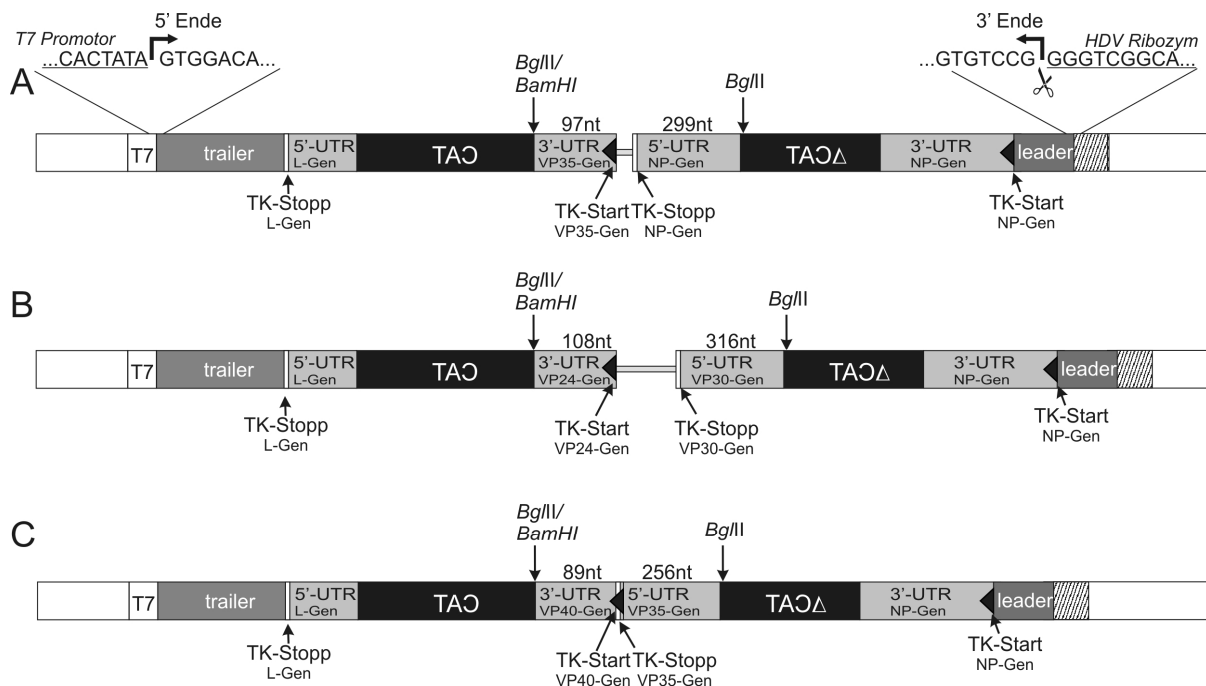


Abbildung 8 : Schematische Darstellung der drei verwendeten bicistronischen Minigenome

A) Bicistronisches Minigenom der GG NP/VP35. **B)** Bicistronisches Minigenom der GG VP30/VP24. **C)** Bicistronisches Minigenom der GG VP35/VP40. Die Minigenome sind in den Transkriptionsvektor 2,0 (Mühlberger et al., 1999) (weiße Bereiche) zwischen den T7-RNA-Polymerase-Promotor (T7) und die Ribozymsequenz des Hepatitis Delta Virus (schraffierte Bereiche) inseriert. Alle Minigenome enthalten den 55nt langen ZEBOV-leader (leader), das Transkriptionsstartsignal (TK-Start, dargestellt als schwarzes Dreieck) des NP-Gens, sowie einen 417nt langen Bereich der 3' untranslatierten Region (UTR, graue Bereiche) des NP-Gens. Weiterhin wurden in alle Minigenome die ersten 300 Nukleotide des Chloramphenicol-Acetyltransferasegens (CAT) als erstes (Δ CAT) und das vollständige CAT-Gen (CAT) als zweites Reportergen einkloniert. Beide Reportergene sind derartig eingebracht, dass sie erst nach der Transkription über die virale Polymerase in mRNA-Orientierung vorliegen. Des Weiteren enthielten alle Minigenome 55nt der 5'UTR des L-Gens, das Transkriptionsstoppsignal (TK-Stopp, weißer Balken) des L-Gens, sowie den 677nt langen Trailer (trailer) des ZEBOV. Die jeweiligen GGs wurden in die im Konstrukt 3E-5E- Δ CAT enthaltene *Bgl*II-Schnittstelle über *Bam*HI, bzw. *Bgl*II-geschnittene Enden inseriert. Die Längen der jeweiligen 3'- und 5'-UTRs der einklonierten GGs sind über den entsprechenden Regionen angegeben. In Abbildung A wurde auf der linken Seite die Grenze zwischen der Promotorsequenz der T7 RNA-Polymerase (unterstrichen) und dem 5'-Ende der Minigenome (negative RNA-Orientierung) dargestellt. Auf der rechten Seite wurde die Grenze zwischen der Sequenz des Hepatitis Delta Virus-Ribozyms (unterstrichen) und dem 3'-Ende des Minigenoms (negative RNA-Orientierung) dargestellt. Die Schnittstelle des Ribozyms ist durch eine Schere verdeutlicht.

3.10 Isolierung, Aufreinigung und Analyse von Nukleinsäuren

3.10.1 Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab (MINIPREP)

Mit dem peqGold Plasmid Miniprep Kit I der Firma Peqlab wurden Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden einzeln gewachsene Bakterienkolonien gepickt und jeweils in 5 ml LB-Medium + Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht oder in 3 ml LB-Medium + Ampicillin (100 µg/ml) für mindestens 7 h auf einem Schüttler bei 37°C kultiviert. Pro Ansatz wurden 1,5 ml dieser Bakteriensuspension für die Aufreinigung der Plasmid-DNA verwendet. Alle optionalen Waschschrirte des Protokolls wurden durchgeführt. Die Elution von der Säulenmatrix erfolgte mit 50 µl (bei über Tag gewachsenen Bakterienkulturen), bzw. 100 µl (bei über Nacht gewachsenen Bakterienkulturen) dH₂O.

3.10.2 Plasmidpräparationen im großen Maßstab (MAXIPREP)

Für die Aufreinigung größerer Plasmidmengen wurde das QIAfilter® HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen benutzt. Zur Anzucht wurden 150 ml LB-Medium + Ampicillin (100 µg/ml) mit 150 µl einer Bakterienkultur inokuliert und bei 37° C über Nacht schüttelnd inkubiert (200 rpm). Anschließend erfolgte die Aufreinigung der gesamten Kultur nach den Herstellerangaben und unter der Durchführung aller optionalen Waschschrirte. Die DNA wurde mit 500 µl frischem dH₂O von der Säulenmatrix eluiert und quantifiziert (3.13). Reinigung von Nukleinsäuren

3.10.3 QIAquick™ PCR Purification Kit

Dieses Kit wurde für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten >100bp eingesetzt, wobei nach den Herstellerangaben (Qiagen) verfahren wurde. Dabei wurden alle optionalen Waschschrirte durchgeführt. Die Elution erfolgte in 50 µl frischem dH₂O.

3.10.4 QIAquick Gel Extraction Kit

Dieses Kit wurde zur Elution von DNA aus Agarosegelen verwendet. Es können bis zu 400 mg Agarose in einer Säule aufgereinigt werden, wobei die Größe der zu reinigenden DNA 70 bp-10 kb betragen kann. Es wurde in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich zur Aufreinigung von Deletions-PCR-Ansätzen verwendet, um unspezifische PCR-Produkte sowie die PCR-Matrize zu entfernen. Die Aufreinigung erfolgte nach dem beiliegenden Handbuch; es wurden jedoch unabhängig von der Agarosekonzentration des Gels zum Auflösen der Gelmatrix immer 6 Volumen des Puffers QG zu einem Gelvolumen (100 mg ~ 100 µl) zugegeben. Nach der Durchführung aller optionalen Waschschriffe erfolgte die Elution mit 40 µl frischem dH₂O.

3.10.5 Reinigung und Isolierung von mRNA über Oligo-dT-Zellulose

Vorquellen der Oligo-dT-Zellulose:

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

Das Ernten der Zellen und die Isolierung der mRNA erfolgte 48 h nach Transfektion. Dafür wurden die Zellen zunächst auf einer Kühlplatte 2x mit kaltem PBS_{def} gewaschen, dann pro Zellkulturschälchen in 600 µl RLT-Puffer (+ 1% β-Mercaptoethanol, frisch zugegeben) (aus RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen) abgeschabt und in sterile, gekühlte 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellsuspension wurde dann 8x mit einer violetten Kanüle (= 0,55 x 25 mm) geschert und mit 600 µl 70% EtOH gemischt. Nach dem „Animal-Cell“ Protokoll des RNeasy Kits wurde dann aus diesem Zelllysat die gesamte RNA aufgereinigt. Im letzten Schritt der Aufreinigung wurde die RNA mit 200 µl RNase-freiem dH₂O von der Säule in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert. Nachdem der RNA-Lösung 200µl 2x Elution Buffer (2 x EB) zugegeben worden war, wurden die Reaktionsgefäße mit Plastikclips fest verschlossen und die Reaktionsansätze 5 min lang in einem Wasserbad gekocht, dann für 3 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 1/10 Vol. (= 44 µl) 5 M NaCl-Lösung gemischt. Jedem Ansatz wurden dann je 100 µl vorgequollene Oligo-dT-Zellulose zugegeben. Vor jeder Zugabe wurde die Zellulose erneut mit dem Vortex gemischt und mit abgeschnittenen

Spitzen pipettiert. Die zellulosehaltigen Ansätze wurden 5 min lang bei Raumtemperatur und Stufe 3 auf einem Vortex geschüttelt und die zellulosegebundene mRNA anschließend durch Zentrifugation von 6 s bei einer Geschwindigkeit von 3000 rpm pelletiert. Es folgten 3 Waschungen des Pellets mit je 800 μ l BB (je 15 s vortexen, 1-2 min lang bei einer Geschwindigkeit von 14000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen). Nach den Waschungen wurde die mRNA von der Oligo-dT-Zellulose in 4 Durchgängen mit je 100 μ l 70°C warmem 1x Elution Buffer (1 x EB) eluiert. Dazu wurde jedem Pellet der angewärmte 1xEB zugegeben, 8x mit einer 100 μ l Pipette mit abgeschnittener Spitze gemischt, 2 min lang bei einer Geschwindigkeit von 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Die vereinigten Überstände der 4 Elutionen wurden im Anschluss nochmals einer zweiminütigen Zentrifugation bei einer Geschwindigkeit von 14000 rpm unterworfen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um Zellulosereste aus der Lösung zu entfernen. Die isolierte mRNA wurde dann durch Zugabe von 1 ml 100%igem EtOH, 40 μ l 3M Natriumacetat, pH = 6,5 und 2 μ l Glykogen (20 μ g/ μ l) bei einer Temperatur von -20°C mindestens 12 h lang gefällt.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die RNA durch 25-minütige Zentrifugation bei 4° C und 15300 rpm pelletiert, das Pellet einmal mit 800 μ l 70%igem RNase-freiem Ethanol gewaschen und der gesamte Überstand mit langen, ausgezogenen 100 μ l-Spitzen sehr vorsichtig abgenommen, ohne das Pellet zu verlieren. Nachdem das Pellet 5 min bei RT getrocknet war, schloss sich eine Auftrennung der RNA-Fragmente im RNA-Formaldehyd-Agarosegel an.

3.11 Analyse von Nukleinsäuren

3.11.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten aufgrund ihrer Größe zur Überprüfungen von Testverdaus, PCRs oder zur Aufreinigung von DNA. Richtwerte für die Prozentualität der Gele waren: 1% für Fragmente von 2 kb - 6 kb, 1,5% für 0,5 - 2 kb und 2% für 50-500 bp lange Fragmente. Die entsprechende Agarosemenge (UltraPURE Agarose von Invitrogen) wurde mit 40 ml 1x TAE-Puffer versetzt, bis zum Lösen erhitzt und verdunstetes H₂O nach dem Aufkochen ergänzt. Die Proben wurden mit 6x Loading Dye von Fermentas versetzt und aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 1x TAE-Puffer. Nach einem Einlaufen bei 30 mA wurde die Stromstärke auf 50 mA erhöht und die Proben separiert, bis eine ausreichende Auftrennung erreicht war. Als Größenmarker wurde je 1 μ l 1 kb DNA-Marker von Fermentas verwendet, der ebenfalls auf 10 μ l mit H₂O aufgefüllt wurde.

Nach Anfärbung in frischer wässriger Ethidiumbromidlösung (15 min, 1:10 000; Stocklösung: 10 mg/ml) wurden das entstandene Auftrennungsmuster mit dem GelDoc2000 und der QuantityOne Software (BioRad) dokumentiert. Falls die Gelelektrophorese der Aufreinigung von DNA-Fragmenten diente, wurden diese unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des QIAquick™ Gel Extraction Kit (3.10.4) aus der Gelmatrix eluiert.

3.11.2 Analytische Agarosegelelektrophorese von RNA

Analytische RNA-Agarosegele wurden benutzt, um die synthetisierten Produkte einer *in-vitro-Transkription* zu überprüfen. Sie wurden hergestellt, wie für 1%ige DNA-Agarosegele beschrieben, mit frisch angesetztem 1xTAE-Puffer. Je 0,5 µl und 1 µl der Transkripte wurden mit je 10 µl Gel Loading Buffer II versetzt. Dieser denaturiert die RNA, da die Gele selbst hier keine denaturierenden Bedingungen boten. Ebenso wurden 2 µl des Markers RNA Ladder, High Range (Fermentas) mit 10 µl dieses Puffers versehen. Alle Proben wurden vor dem Gelauftrag für 3 min bei 95°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen und anschließend für 3 min auf Eis abgekühlt. Das Anfärben erfolgte, wie unter 3.11.1 beschrieben.

3.11.3 Northern Blot-Assay von mRNA

3.11.3.1 RNA-Formaldehyd-Agarosegele

FA-Agarosegel (1.8%)*

- 0,54 g Agarose UltraPURE (Invitrogen) → durch Kochen gelöst; verdunstetes dH₂O ergänzt
- 23.3 ml dH₂O (RNase frei)
- 6 ml 5x FA-Laufpuffer
- 1 ml 37% Formaldehyd

*1.8% ige Gele lieferten eine optimale Trennung der mRNA-Spezies mRNA 1 und mRNA 2

Die Größenauftrennung der verschiedenen RNA-Fragmente erfolgte im Rahmen der Isolierung transkribierter RNA (3.10.5) und diente als Vorbereitung für die Northern-Blot-Analyse (3.11.3).

Die RNA-Proben (getrocknete Pellets nach der Fällung von 3.10.5) wurden dazu in je 10 µl frischem FA-Auftragspuffer resuspendiert, 15 min bei einer Temperatur von 65°C denaturiert (Deckel mit Plastikclips verschlossen) und nach weiteren fünf Minuten Inkubation auf Eis mit je 1,5 µl RNA-Farbpuffer versetzt. Zusätzlich wurden je 3 µl einer 10⁻³ in RNase-freiem H₂O verdünnten Sondenkontrolle (*in vitro*-Transkript von 3E-5E(+)) und 3 µl RNA-high range ladder (Fermentas) mit 10 µl FA-Auftragspuffer versetzt und behandelt, wie oben beschrie-

ben. Sollten die Proben für eine Normalisierung auf zwei Gele aufgeteilt werden, so wurden sie in je 22 μl FA-Auftragspuffer aufgenommen und nach dem Aufkochen mit je 1.5 μl RNA-Farbpuffer versetzt. Die Sondenkontrolle diente der Überprüfung der Hybridisierungsreaktion. Der RNA-Marker wird ebenfalls von der Digoxigenin-markierten BS/-CAT-Sonde erkannt und ließ sich so als Größenmarker mit der mRNA nachweisen. Beim Auftragen wurden die jeweils äußeren Taschen des Gels ausgespart, um zu gewährleisten, dass beim anschließenden Northern Blot Assay jede Spur auf die Membran übertragen werden konnte, da die Folie den äußeren Teil des Gels aussparte.

Der Geleinlauf erfolgte bei einer Spannung von $U = 50 \text{ V}$ (bei I_{max}) und wurde dann auf $U = 75 - 80 \text{ V}$ erhöht. Das Gel wurde gestoppt, wenn die erste blaue Bande herausgelaufen war.

3.11.3.2 Northern Blot

Im Anschluss an ihre Auftrennung wurden die RNA-Fragmente von dem Formaldehyd-Agarosegel durch Alkalischen Transferpuffer mit dem Vakuum-Blotter der Firma Boekel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) transferiert. Vor dem Blotvorgang wurde die Membran durch kurzes Benetzen mit Methanol aktiviert und im Anschluss ca. 5 min in frisch angesetztem alkalischem Transferpuffer geschwenkt. Die Blotapparatur wurde, wie in Abbildung 9 gezeigt, aufgebaut. Dabei wurde die raue Seite der porösen Plastikplatte des Vakuumblotter mit der Unterseite in das Gerät hineingelegt. Auf die glatte Oberseite wurde ein Whatman-Papier in Größe der Membran gelegt, das mit Alkalischem Transferpuffer benetzt wurde. Auf diesem wurde die ebenfalls mit Puffer benetzte Membran platziert und darauf die Blotfolie gelegt, so dass die Membran unter der für das Gel ausgeschnittenen Aussparung der Folie zu liegen kam (siehe Abbildung 9). Die Membran wurde nochmals mit alkalischem Transferpuffer benetzt und das Gel darauf platziert, so dass es mit der Folie einen dichten Abschluss bildete. Nachdem auch das Gel mit Alkalischem Transferpuffer benetzt worden war, wurde die Folie in der Vakuumblot-Apparatur festgespannt und das Vakuum angestellt. Der Blotvorgang erfolgte für 2 h (für ein Gel mit 1.5% Agarosekonzentration nur 1,5 h) lang bei einem Vakuum von 50 mbar, wobei die Oberfläche des Gels stets mit Transferpuffer bedeckt wurde. Nach dem Transfer wurde die Membran 15 min in 200 mM Phosphatpuffer neutralisiert, kurz zwischen 2 Whatman-Papieren getrocknet und 2 min lang auf einem UV-Illuminator (253 nm) mit der RNA-Seite nach unten fixiert. Die Membranen konnten bis zur Prähybridisierung in Folie eingeschweißt bei 4°C gelagert werden.

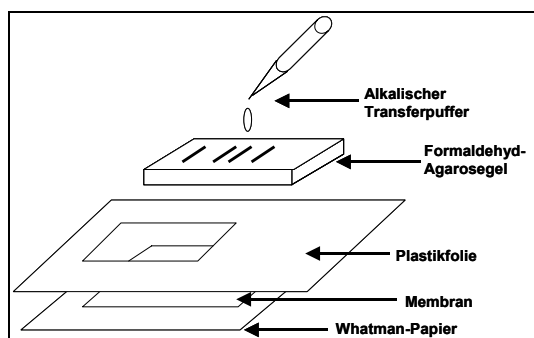


Abbildung 9 : Schematische Darstellung des Northern-Blot-Aufbaus.
 Schema nach Schlenz, 2002.

3.11.3.3 Prähybridisierung und Hybridisierung membranfixierter RNA

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurden die Membranen einer Prähybridisierung unterworfen, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dafür wurden sie in Hybridisierungsröhrchen mit 19 ml Collins-Hybridisierungslösung und 1 ml Heringsspermien-DNA (8x mit Kanüle (=0,55x25 mm) geschert, 10 min bei 95°C denaturiert und 5 min auf Eis gekühlt) überführt und ca. 6 h lang im Hybridisierungssofen bei einer Temperatur von 65°C rotiert. Anschließend wurden 6 µl der DIG-BS/CAT Digoxigenin-markierten RNA-Sonde (3 min denaturiert und 3 min auf Eis gekühlt) in 3 ml der Prähybridisierungs-Lösung verdünnt und die Membranen darin für mindestens weitere 12 h bei 65°C im Hybridisierungssofen rotierend inkubiert. Wurde die mRNA mittels 3E-5E-FLuz normalisiert, bzw. auf die Anwesenheit gleicher Mengen Polymerasekomplexe untersucht, so wurde der Normalisierungsblot extra prähybridisiert und mit je 6 µl anti-Luziferase-Sonde nachgewiesen.

3.11.3.4 Nachweis gebundener Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Mittels Chemilumineszenz:

Für die Detektion der RNA wurden die Membranen nach der Hybridisierung zunächst 5 min lang bei RT in SDS/SSC-Waschpuffer geschwenkt, dann in ein neues Hybridisierungsröhrchen – bis oben gefüllt mit auf 65°C vorgewärmtem SDS/SSC-Waschpuffer – transferiert und mindestens 2 h bei 65°C im Hybridisierungssofen rotierend inkubiert. Nach fünfminütigem Schwenken der Membran in Puffer I schloss sich eine 60-minütige Inkubation bei RT auf dem Horizontalschüttler in 60 ml Puffer I + 15 ml 10% Blockingreagenz (Roche) an.

Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit einem α -DIG-AP-Antikörper (Roche) in einer Verdünnung von 1:20 000 (2 µl Antikörper auf 40 ml Puffer I/Blockinglösung). Anschließend wurden die Membranen 3 x je 10 min lang in Puffer I + 0,3% Tween 20 gewaschen und danach für 5 min in Puffer III äquilibriert. Für die Detektion wurde auf jede Membran je

1 ml der CDP-Star-Lösung (995 µl Puffer III + 5 µl CDP-Star (Roche)) aufgetropft und 5 min auf einem Plastikschalendeckel inkubiert. Danach wurde die Membran in eine Einschweißfolie transferiert und nach Ausstreichen des CDP-Star-Reagenz' eingeschweißt. Es folgte die Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm™ von Amersham Biosciences oder CEA RP New von CEA). Je nach RNA-Menge und gewünschter Bandenstärke wurde dieser für 1 min bis zu mehreren Stunden exponiert.

Mittels Infrarot-Farbstoff und Scannen im Odyssey-Gerät (LI-COR):

Diese Detektion ermöglichte eine Quantifizierung gebildeter mRNA im Northern Blot. Allerdings waren trotz umfangreicher Optimierung der Methode keine ausreichend guten Signalstärken zu erhalten, weshalb diese Methode nur einmal mit einem befriedigenden Ergebnis in dieser Arbeit angewandt wurde. Die über Formaldehyd-Gelelektrophorese aufgetrennte mRNA wurde auf Biodyne B-Membran (Schleicher & Schuell) transferiert, wie zuvor beschrieben (3.11.3.2), da diese einen deutlich geringeren Hintergrund in diesem System zeigte, als die Nylonmembran von Roche. Wegen der Schwäche des Nachweises mittels Odysseygerät wurden zusätzlich je 50 µl DIG-markierte RNA-Sonde für die Hybridisierung eingesetzt; die Prähybridisierungslösung enthielt 2 ml Heringssperma-DNA. Das übrige Vorgehen entsprach dem oben bereits beschriebenen Standardprotokoll. Der Nachweis der gebundenen Sonden erfolgte zunächst ebenfalls wie oben beschrieben. Nach der Blockierung unspezifischer Bindestellen mittels 2% Blockingreagenz in Puffer I folgte eine Inkubation mit anti-DIG-Biotin-markierten Antikörper (ab 419 [BT.21H8]), der in der Blockierungslösung 1:500 verdünnt wurde. Anschließend wurde der Blot 3 x für 10 min mit Puffer I +0,3% Tween 20 gewaschen und erneut für 60 min in 50 ml 1 x Rotiblock (Roth) +1% SDS abgesättigt. Anschließend folgte eine Inkubation mit 1:10 000 verdünntem Streptavidin-IRDye 800 in 10 ml 1 x Rotiblock (Roth) mit 1% SDS. Danach wurde der Blot für 3 x 10 min in PBS_{def} + 0,3% Tween gewaschen und 5 min in PBS_{def} geschwenkt, bevor er mit höchster Intensität im Odysseygerät (LI-COR) eingescannt wurde.

3.11.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt, um Deletions-PCR-Ansätze zu ligieren. Wurden bereits phosphorylierte Primer in die PCR eingesetzt, dann erfolgte eine Gelextraktion der Fragmente und sie wurden anschließend nach unten stehendem Ansatz religiert. Falls die Primer nicht mit bereits phosphorylierten 5'-Enden in die PCR-Reaktion eingesetzt wurden, folgte auf die PCR und Gelextraktion zunächst die Phosphorylierung der PCR-Fragmente, sowie eine Reinigung mit dem PCR-Purification Kit. Anschließend wurde unten stehende Ligrationsreaktion angesetzt.

Ligationsansatz: 17 µl PCR-Fragment (bzw. H₂O als Negativkontrolle)
2 µl 10x Ligase-Puffer
1 µl T4-DNA-Ligase (400 cohesive end units/µl) (NEB)
20 µl gesamt
→ Inkubation: 2 h, 22°C

Es schloss sich eine Transformation von Bakterien mit den erhaltenen Ligationsprodukten an.

3.11.5 In-vitro-Transkription und Reinigung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Zur Markierung von RNA-Sonden mit Digoxigenin (DIG) wurde das DIG-RNA-Labeling Kit (T7/SP6) der Firma Roche verwendet. Als Vorlage für die markierte Sonde, die die CAT-mRNA erkennt, diente das Konstrukt BS/(-)CAT (Mühlberger et al., 1999), ein Bluescript-Vektor, der das CAT-Gen in negativer Orientierung enthält. Vor dem Einsatz in der *in-vitro*-Transkription wurde das BS/(-)CAT Plasmid über einen Verdau mit *Sa*I linearisiert, so dass bei der Transkription „run-off“-Transkripte gebildet wurden. Zur Herstellung einer Sonde, die die Luziferase-mRNA erkennt, wurde das Konstrukt pBS-KS-FLuz verwendet, das zuvor mit *Bsr*GI linearisiert worden war. Für die Sonden, die spezifisch die ZEBOV-mRNA erkennen, wurden die zuvor hergestellten PCR-Fragmente (3.12.1.2) mit den angefügten SP6-RNA-Polymerase-Promotoren verwendet.

Ansatz (auf Eis pipettiert): 13 µl linearisierte Matrize
2 µl dNTP-labeling Mix (enthält DIG-UTP)
2 µl 10x Transkriptionspuffer
1 µl Protector RNase-Inhibitor (20U/µl)
2 µl T7-RNA-Polymerase/bzw. SP6-RNA-Polymerase

Nach einer Inkubation von 2 h bei einer Temperatur von 37°C wurde dem Ansatz 2 µl DNase I (1 U/µl) (aus Kit) zugesetzt und er wurde für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die so transkribierte RNA nach dem „RNA-Cleanup“-Protokoll des RNeasy Mini Kits gereinigt und in 100 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Zur Stabilisierung der Sonden wurden 8 µl DTT (100 mM) und 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) (Fermentas) zugegeben.

Zum Test der Transkriptionseffizienz wurde ein Dot-Blot durchgeführt:

Die Sonden wurden in RNase-freiem H₂O in einer Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁶ verdünnt und je 1 µl jeder Verdünnung im Abstand von 1 cm auf positiv geladene Nylonmembran (Roche) aufgetropft. Nach dem Trocknen erfolgte eine UV-Fixierung von 2 min. Anschließend wurde die Sonde, wie in 3.11.3.4 beschrieben, nachgewiesen (das Protokoll setzte bei der fünfminütigen Inkubation mit Puffer I ein). Bei einer effizienten Transkription

sollte die Sonde sich nach 30 min bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} nachweisen lassen. Die Lagerung bis zum Gebrauch erfolgte in 10 μ l Aliquots bei einer Temperatur von -20°C .

3.11.6 In-vitro-Transkription und Reinigung einer RNA-Sondenkontrolle

Die Sondenkontrolle diente bei der Northern-Hybridisierung der Überprüfung der Hybridisierungsreaktion. Sie wurde als „run-off“-Transkript auf der Basis des vorher mit *Sa*II verdauten Matrizenplasmids 3E-5E(+) synthetisiert. Dieses enthält das CAT-Gen in positiver Orientierung. Es entspricht also der Orientierung der isolierten mRNA und wird wie diese über die DIG-BS/-CAT-Sonde nachgewiesen. Die Reaktion wurde nach der Herstelleranleitung mit dem AmpliScribe™ T7-Kit (Epicentre) bei Raumtemperatur nach dem folgenden Schema pipettiert:

9 μ l	linearisiertes 3E-5E(+)
2 μ l	AmpliScribe™ T7-Reaktionspuffer*
1,5 μ l	ATP (100 mM)
1,5 μ l	CTP (100 mM)
1,5 μ l	GTP (100 mM)
1,5 μ l	UTP (100 mM)
2 μ l	DTT (gut gemischt)
1 μ l	AmpliScribe T7-Enzymlösung
<u>20 μl</u>	

*der Puffer wurde vor dem Einsetzen in die Reaktion 5' bei 37°C inkubiert.

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 μ l DNaseI (1 U/ μ l) (aus dem AmpliScribe™T7-Kit) zugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der Säulchen des „RNA-Cleanup“-Protokolls (RNeasy Mini Kit), von denen die transkribierte RNA mit 40 μ l RNase-freiem dH_2O eluiert wurde. Anschließend wurden noch 3,2 μ l DTT (100 mM) und 1 μ l RNase-Inhibitor (40 U/ μ l) zugegeben. Die Effizienz der Transkription wurde auf einem Agarosegel überprüft (3.11.2). Die Sondenkontrolle wurde in 10 μ l-Aliquots bei -20°C gelagert und für den Auftrag auf das Formaldehyd-Agarosegel mit RNase-freiem dH_2O verdünnt.

3.12 Synthese und Modifikation von Nukleinsäuren

3.12.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

3.12.1.1 Deletions-PCR

Diese PCR diente der Herstellung von bicistronischen Minigenomen mit verkürzter IR. Dafür wurden (phosphorylierte) Primer eingesetzt, die links und rechts des zu deletierenden Bereichs an die Matrize binden.

PCR-Ansatz:	250 ng	Matrize (Plasmid-DNA)
	125 ng	Forward Primer
	125 ng	Reverse Primer
	1 µl	dNTP-Mix (10 mM/Nukleotid)
	5 µl	10x Pfu-Puffer+ MgSO ₄ (Fermentas)
	<u>1 µl</u>	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)*(Fermentas))*
	ad 50 µl	H ₂ O

*Da eine "Hot-Start"-PCR durchgeführt wurde, wurde die Polymerase erst nach dem Denaturierungsschritt zugegeben.

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	99°C	5 min
Polymerase-Zugabe*	1	92°C	2 min
Denaturierung	30	95°C	30 s
Anlagerung	30	40°C	1 min
Synthese	30	68°C	12 min
Endverlängerung	1	72°C	10 min
	1	8°C	∞

Die PCR-Ansätze wurden mit *DpnI* verdaut, um Matrizen-DNA zu entfernen. Anschließend wurden die kompletten Ansätze über 1% DNA-Agarosegele aufgetrennt (3.11.1), um unspezifisch amplifizierte PCR-Produkte zu entfernen, die Banden der erwarteten Größe ausgeschnitten, mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits gereinigt (3.10.4) und für eine Religationsreaktion eingesetzt. Wurden unphosphorylierte Primer eingesetzt, wurden nach der PCR-Reaktion die Ansätze gereinigt und die 5'-Enden phosphoryliert (3.12.3). Nach einer weiteren Reinigung (3.10.3) erfolgte die Religation.

3.12.1.2 Amplifikation von Sondenmatrizen zum Nachweis virusspezifischer mRNAs

Die Amplifikation diente der Herstellung von DNA-Fragmenten, die anschließend als Matrize für eine *in-vitro-Transkription* dienen sollten. Sie sollten zum Nachweis von ZEBOV-spezifischer mRNA eingesetzt werden. Die eingesetzten Primer enthielten daher endständige Promotoren für die SP6 Polymerase, eine DNA abhängige RNA-Polymerase. Als Matrizen wurden die jeweiligen pTM1-Expressionsplasmide der jeweiligen ZEBOV-Gene verwendet.

PCR-Ansatz: 10 μ l 10x Pwo-Puffer
 2 μ l dNTP-Mix (2,5 mM/Nukleotid)
 3 μ l Primer forward (100 ng/ μ l)
 3 μ l Primer reverse (100 ng/ μ l)
 1 μ l pTM1-VP30/ pTM1-VP24/ pTM1-VP35/ pTM1-VP40 (10 ng/ μ l)
 2,5 μ l *Pwo*TM-DNA-Polymerase (1 U/ μ l)*
 ad 100 μ l dH₂O

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	94°C	5 min
Polymerase-Zugabe*	1	90°C	1 min
Denaturierung		94°C	30 s
Anlagerung	30	60°C	30 s
Synthese		72°C	1,5 min
Endverlängerung	1	72°C	5 min
	1	8°C	∞

*Da eine "Hot-Start"-PCR durchgeführt wurde, wurde die Polymerase erst nach dem Denaturierungsschritt zugegeben

Nach der PCR- Reaktion erfolgte eine Aufreinigung der Fragmente mit dem PCR Purification Kit von Qiagen (3.10.3). Für die Herstellung einer Sondenmatritze gegen NP-mRNA wurden 5 μ g des pBluescript-NP-Plasmids (Beck, 2005) mit *Nco*I verdaut und ebenfalls mit dem PCR-Purification Kit gereinigt. Anschließend wurden die entstandenen Matrizen für die Herstellung von DIG-markierten ZEBOV-mRNA-spezifischen Sonden in die *in-vitro-Transkription* eingesetzt (3.11.5).

3.12.2 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA (Quickchange-Mutagenese)

Diese Methode diente zur Einführung kleinerer Mutationen in Plasmid-DNA (Punktmutationen, Insertion/Deletion von 5-10 Nukleotiden) und erfolgte auf der Grundlage des Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), auch wenn dieses nicht verwendet wurde.

Bei dieser Methode werden zwei zueinander vollständig komplementäre Primer zusammen mit dem zu mutierenden Plasmid als Matrize in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die Primer besitzen die Sequenz der Plasmid-DNA am Mutageneseort, allerdings mit der einzuführenden Mutation. Nach dem 1. Zyklus entstehen zunächst Plasmidhybride aus je einem parentalem DNA-Strang und einem an dem Primer neusynthetisierten Tochterstrang. Nach dem 2. Zyklus liegen dann bereits vollständig neusynthetisierte Plasmide mit entsprechender Mutation vor, die in den folgenden Zyklen exponentiell vermehrt werden.

PCR-Ansatz:	250 ng	Matrize (Plasmid-DNA)
	125 ng	Forward Primer
	125 ng	Reverse Primer
	4 µl	dNTP-Mix (2,5 mM/Nukleotid)
	5 µl	10x Pfu-Puffer+ MgSO ₄ (Fermentas)
	(1 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)*(Fermentas)
	ad 50 µl	H ₂ O

*Da eine "Hot-Start"-PCR durchgeführt wurde, wurde die Polymerase erst nach dem Denaturierungsschritt zugegeben

PCR-Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung:	1	99°C	5 min
Polymerase-Zugabe*:	1	92°C	2 min
Denaturierung:	16	95°C	30 sec
Anlagerung:	16	40-60°C*	1 min
Synthese:	16	68°C	12 min (2 min pro 1000 nt)
Endverlängerung:	1	72°C	10 min
Aufbewahrung:	1	8°C	∞

* die besten Ergebnisse wurden mit Anlagerungstemperaturen erzielt, die 20°C unter der Schmelztemperatur der Primer lagen.

Anschließend wurden 5 µl des PCR-Ansatzes für ein Testgel entfernt und der Rest mit 20 U *DpnI* versetzt und 1 h bis über Nacht bei 37°C inkubiert. *DpnI* verdaut nur methylierte DNA. Da die in der PCR-Reaktion entstandene DNA im Gegensatz zur Matrizen-DNA nicht methy-

liert ist, ist sie gegen die *DpnI*-Behandlung unempfindlich und wurde somit nicht abgebaut. An den Verdau anschließend wurden dieser sowie die PCR-Reaktion mittels Agarosegelelektrophorese überprüft, indem je 5 µl des PCR-Ansatzes vor und nach Verdau aufgetragen wurden. Die Anwesenheit einer Bande in Höhe der erwarteten Plasmidlänge in beiden Ansätzen ließ auf eine erfolgreiche Mutagenese schließen.

Anschließend wurden je 2 µl der verdauten, nicht gereinigten Ansätze in chemisch kompetente *E.coli* (3.14) eingebracht.

3.12.3 5'- Phosphorylierung von PCR-Fragmenten

Um Deletions-PCR-Fragmente, die mit unphosphorylierten Primern amplifiziert worden waren, mit einer 5'-Phosphatgruppe zu versehen, wurden diese mit Hilfe der T4-PNK phosphoryliert.

Ansatz: 23 µl PCR-Fragment
 3 µl 10x PNK-Puffer (Roche)
 2 µl 10mM ATP(Fermentas)r
 1 µl T4-PNK (10U/µl) (Roche)
 ad 30 µl dH₂O

Der Ansatz wurde für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte eine Hitzeinaktivierung der PNK bei 75°C für 10 min und eine Aufreinigung der Fragmente (3.10.3, bzw. 3.10.4), bevor sie religiert werden konnten (3.11.4).

3.13 Konzentrations- und Sequenzbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte über die Bestimmung der OD_{260nm} mit dem GeneQuant pro DNA/RNA-Calculator, sowie alternativ mit einem Nanodrop 2000-Gerät. Mit ersterem wurden 1:500 in H₂O verdünnte DNA-Proben gemessen; mit letzterem je 2 µl unverdünnter Proben.

Zur Sequenzanalyse wurde die Software Chromas 2.23, Clone Manager 5.20, HUSAR (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de>) sowie BioEdit verwendet.

3.14 Arbeiten mit Bakterien

3.14.1 Herstellung Z-kompetenter Bakterien

Die Z-kompetenten Bakterien wurden mit Hilfe des Z-Competent™ *E.coli* Transformation Kit & Buffer Set (Katalognummer #T3002) der Firma Zymo Research hergestellt.

Dabei wurde zunächst eine Vorkultur in einem 15 ml Röhrchen angeimpft:

5 µl XL1 blue *E.coli* aus einem nur kurz auf Eis angetauten -80°C Glycerinstock (siehe 3.8.1) in 5 ml SOB-Medium versetzt mit 5 µl Tetrazyklin [10mg/ml]. Diese wurde für 16 h bei 200 rpm auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Danach wurden 500 µl dieser Vorkultur auf 50 ml SOB-Medium in einem 500 ml Glaskolben überimpft und dieser bei 24°C, 200 rpm für ca. 17 -19 h inkubiert und die OD_{600nm} bestimmt. Diese sollte zwischen 0,4 - 0,6 liegen; die Ernte erfolgte in den meisten Fällen bei 0,5. Die Aufbereitung der Kultur erfolgte nach den Angaben des Kit-Herstellers. Die Zellen wurden sofort in 100 µl-Aliquots auf Flüssigstickstoff eingefroren und direkt bei -80°C eingelagert.

3.14.2 Transformation Z-kompetenter Bakterien

Die Z-kompetenten *E.coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und transformiert, indem 100 µl Zellsuspension mit der DNA-Lösung (7,5 µl Ligationsansatz, 2 µl *DpnI*-verdauter Muta-gene-se-PCR-Ansatz) vermischt und für 30 - 60 min auf Eis inkubiert wurden.

Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf einer ampicillinhaltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei einer Temperatur von 37°C kultiviert.

3.15 Zellbiologische Methoden

3.15.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Inkubation aller Zelllinien erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ – Begasung im Brutschrank. Jeweils zweimal wöchentlich wurden die Zellen subkultiviert.

Die Huh-T7 Zellen wurden in DMEM kultiviert, dem 10% fötales Kälberserum (FCS), L-Glutamin (2 mM) und die Antibiotika Penicillin und Streptomycin (jeweils 50 µg/ml) zugesetzt waren. Zusätzlich musste dem Medium Geneticin (0,5 mg/ml) zugegeben werden, damit die Expression der T7-RNA-Polymerase aufrechterhalten wurde.

Für die Subkultivierung wurde das Medium aus den 75 cm²-Zellkulturflaschen konfluent gewachsener Zellen durch Dekantieren entfernt und die Zellen zweimal mit 37°C warmem

PBS_{def} gewaschen. Durch Zugabe von 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurde das Ablösen der Zellen vom Untergrund forciert. Nach einer Inkubation von 3 Minuten wurde die Wirkung der Trypsin-EDTA-Lösung durch Zugabe von 8,5 ml DMEM + 10% FCS gestoppt. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette durch Auf- und Abpipettieren gut vereinzelt und je nach Umsetzungsverhältnis ein Teil davon in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche überführt (meist 1/10 Volumen für eine 1:10 - Umsetzung). Für Transfektionen wurden die Zellen, je nach gewünschtem Dichtegrad für das Experiment, in DMEM + 10% FCS verdünnt und in 6er-Zellkulturplatten ausgesät. Für einige Experimente wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Zur Kultivierung von BHK-T7-Zellen wurde Glasgow-Medium verwendet, das mit den Antibiotika Penicillin, Streptomycin, 10% NCS (newborne calf serum) sowie den nicht essentiellen Aminosäuren und „Tryptose Phosphate Broth“ angereichert wurde. Außerdem wurde dem Medium zur Selektion T7-RNA-Polymerase-positiver Zellen Geneticin (1 mg/ml) zugesetzt. Die Zellen wurden regelmäßig auf die Anwesenheit von Mycoplasmen überprüft (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit von Lonza) und nach einem neuen Auftauen für 4 Passagen mit Mycokill AB (PAA) behandelt.

3.15.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA

3.15.2.1 Transfektion mit FuGENE/LT-1

Die Transfektionen mit Fugene/bzw. LT-1 wurden nach demselben unten stehenden Protokoll durchgeführt. Wie ein Vergleichstest im Northern Blot-Assay zeigte, unterschieden sich die Ergebnisse bei der Verwendung von LT-1 oder FuGENE nicht voneinander. Darum wurden beide Transfektionsreagenzien alternierend verwendet.

BSR-T7/5 oder Huh-T7-Zellen wurden in 6er-Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von 60 - 70% kultiviert.

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit 1x DMEM (ohne FCS, ohne Penicillin/Streptomycin) gewaschen und anschließend mit je 1 ml 1 x DMEM (siehe Waschmedium) pro Zellkulturschälchen überschichtet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Während dieser Zeit wurden pro zu transfizierendem Zellkulturschälchen die DNA-Ansätze in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Schraubdeckel hergestellt:

A) DNA-Ansatz:

200 µl DMEM (-FCS,-Penicillin/Streptomycin)

y µg DNA-Mix (siehe Tabelle)

↓

Mischen durch Vortex

Mengen für den DNA-Mix:

ZEBOV-Plasmide	Ansatz für mRNA-Isolierung BSR-T7/5-Zellen	Ansatz für mRNA-Isolierung Huh-T7-Zellen	Ansatz für CAT-Assay BSR-T7/5-Zellen	Ansatz für CAT-Assay Huh-T7-Zellen
pT/L _{EBO}	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
pT/NP _{EBO}	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg
pT/VP35 _{EBO}	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg	0,5 µg
pT/VP30 _{EBO}	0,1 µg	0,1 µg	0,1 µg	0,1 µg
Bicistronisches Minigenom	1,5 µg	1,5 µg	1,5 µg	1,5 µg
pCAGGS-T7	-	0,5 µg		0,5 µg
pGL3-control	-	-	0,3 µg	0,3 µg

Bei einer Transfektion von Huh-T7-Zellen für eine anschließende mRNA-Isolierung musste dem DNA-Mix pCAGGS-T7 Plasmid zugegeben werden, um eine ausreichend hohe Expression der T7-RNA-Polymerase zu gewährleisten. Die Transfektionsansätze, die später für einen CAT-Assay eingesetzt wurden, enthielten zusätzlich pGL3-control-Plasmid, welches das Luziferasegen des Glühwürmchens trägt und für eine Normalisierung der Transfektionseffizienzen eingesetzt wurde. Wenn, wie für manche Versuche beschrieben, die Transfektionseffizienz der Polymerasekomplexkomponenten überprüft wurde, dann wurden zusätzlich 0,5 µg des Minigenoms 3E-5E-FLUZ in die Zellen eingebracht. Dies konnte im Northern Blot Assay mit einer gegen die Luziferase-mRNA gerichteten Sonde nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde ein FuGENE-Mix hergestellt, der pro Transfektionsansatz die folgenden Mengen enthielt:

B) FuGENE-Ansatz:

800 µl DMEM (-FCS,-P/S)

3 x y [µg] µl FuGENE6 (y[µg]: Menge DNA-Mix in µg)

↓

Mischen durch Anschnippfen und Invertieren

Das DNA [µg] : FuGENE [µl]-Verhältnis betrug 1:3.

Nach fünfminütiger Inkubation des FuGENE-Mixes (B) bei RT wurden je 800 + x µl (x: FuGENE-Menge) des Gemischs in jeden DNA-Ansatz (A) zugegeben. Das Mischen erfolgte über mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer Eppendorfpipette. Anschließend wurden die Transfektionsansätze 30 min bei RT inkubiert.

Danach wurde der jeweilige komplette Transfektionsansatz (1 ml) ringförmig auf die entsprechenden Zellen aufgetropft. Es folgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht, wonach das Transfektionsmedium gegen 1xDMEM mit 2%FCS und Penicillin/Streptomycin ausgetauscht wurde und sich eine weitere Inkubation bei 37°C anschloss (ca. 24 h).

Die Zellernte erfolgte nach 48h, mit Ausnahme der Sicherheitslaborversuche. Bei diesen wurden die Zellen 12 Stunden nach der Transfektion im Sicherheitslabor überinfiziert.

3.16 Arbeiten mit Viren

3.16.1 Infektion und Ernte von Zellen für mRNA-Isolierung im BSL-4 Labor

Bei der Überinfektion von Zellen, die zuvor mit Minigenomplasmiden transfiziert worden waren, wurde die Infektion 12 h nach der Transfektion vorgenommen. Die eingesetzten Virusstocks waren nach TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose)-Assays titriert worden (Olejnik, 2008). Für die hier gezeigten Versuche wurden entsprechend angegebene Mengen Virusstock mit je 500 µl 1x DMEM-Medium (ohne FCS) pro 6-Well Vertiefung gemischt und bei vorher transfizierten Zellen das Transfektionsmedium gegen dieses Infektionsmedium ausgetauscht. Für Negativkontrollen (Mock) wurden je 500 µl 1x DMEM-Medium ohne Virus auf die Zellen gegeben. Die Infektion erfolgte für eine Stunde bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank mit regelmäßigem Schwenken der Platten zur gleichmäßigen Verteilung des Inokulums. Danach wurden je 2,5 ml 1x DMEM +2,5% FCS +Pen/Strep +L-Glutamin zu dem Infektionsmedium zugegeben und die Zellen bis zur Ernte im Brutschrank unter oben genannten Bedingungen inkubiert. Zur Ernte der mRNA wurden die Zellen zweimal mit PBS_{def} (4°C) gewaschen und anschließend in je 600 µl RLT-Puffer (+1% β-Mercaptoethanol) geerntet. Die Zellyse erfolgte durch 30 s Mischen auf dem Vortex. Anschließend wurden je 600 µl 70% Ethanol zugegeben und erneut für 5 s gemischt. Die Proben wurden in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und aus dem Sicherheitslabor ausgeschleust. Die Aufreinigung der mRNA erfolgte, wie unter 3.10.5 beschrieben.

3.17 Biochemische Methoden

3.17.1 Normalisierung der Transfektionseffizienzen mittels Luziferaseassay

Dieser Versuch wurde mit dem Luziferase-Assay-System (Promega) durchgeführt. Das Reporterplasmid pGL3-control enthält das Luziferase-Gen des Glühwürmchens *Photinus pyralis* unter der Kontrolle des SV 40-Promotors. Im Falle einer erfolgreichen Transfektion

mit diesem Plasmid wurde die Luziferase in den Zellen exprimiert und konnte nachgewiesen werden. Die Luziferase katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm. Diese Reaktion wurde mit dem Lumi-Star-Luminometer oder dem Centro LB 960 der Firma Berthold gemessen und mit Hilfe der Software Microwin 2000 ausgewertet.

Die Messung der Luziferaseaktivität diente der Normalisierung der Zelllysate. Hierfür wurden die Zellen wie unter 3.17.2 beschrieben geerntet. Die Zelllysate wurden nach einem Abzentrifugieren der Zelltrümmer 1:100 in 1x Reporter Lysis Puffer des Luziferase-Assay-Systems (Promega) verdünnt, damit die gemessenen Lichteinheiten nicht den Grenzwert für eine zuverlässige Messung von $1,8 \times 10^7$ RLU (relative light units) überschritten.

Von den Verdünnungen wurden je 20 μ l in eine Vertiefung einer 96 well-Luminometerplatte (nunc) pipettiert. Zur Ermittlung eines Leerwerts wurde außerdem eine Vertiefung der Platte mit 20 μ l Reporter-Lysis-Puffer versehen. Die Zugabe des Luziferase-Reagenz (100 μ l) sowie die Messung der relativen Lichteinheiten erfolgten durch das Luminometer.

Das verwendete Messprogramm war wie folgt:

1. Zugabe von 100 μ l Luziferasesubstrat
2. Mischen, mittlere Geschwindigkeit: 1 s
3. Verzögerung: 2 s
4. Messung: 3 s

3.17.2 Nachweis der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivität

Der Nachweis der CAT-Aktivität erfolgte mit dem FAST CAT® Green (deoxy) Chloramphenicol Acetyltransferase Assay Kit der Firma Invitrogen/Molecular Probes. Die CAT katalysiert die Übertragung der Acetylgruppe des Donors Acetyl-Coenzym A auf den Akzeptor Chloramphenicol (CAM). Dabei entstehen die Reaktionsprodukte 1'-Acetyl-CAM, 3'-Acetyl-CAM und 1'-3'-Diacetyl-CAM

Dieses Kit hat den Vorteil, dass es der CAT als Substrat ein modifiziertes Chloramphenicol (CAM) zur Verfügung stellt, das BODIPY 1-Deoxychloramphenicol. Dieses kann im Gegensatz zu normalem CAM nur an einer Position von der CAT acetyliert werden. Im normalen CAM findet eine nicht enzymatische Transacetylierungsreaktion statt, die als limitierender Schritt der CAT-Reaktion diese nicht mehr quantitativ auswertbar macht. In dem BODIPY 1-Deoxychloramphenicol ist die zweite Acetylierungsstelle reduziert. So entsteht nur ein Reaktionsprodukt, das sich gut quantifizieren lässt und direkt die enzymatische Aktivität wider-

spiegelt (Abbildung 10). Durch eine bei UV-Licht emittierende Fluoreszenzmarkierung lassen sich das BODIPY 1-Deoxychloramphenicol und die acetylierten Reaktionsprodukte nach Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie unter einem UV-Illuminator nachweisen.

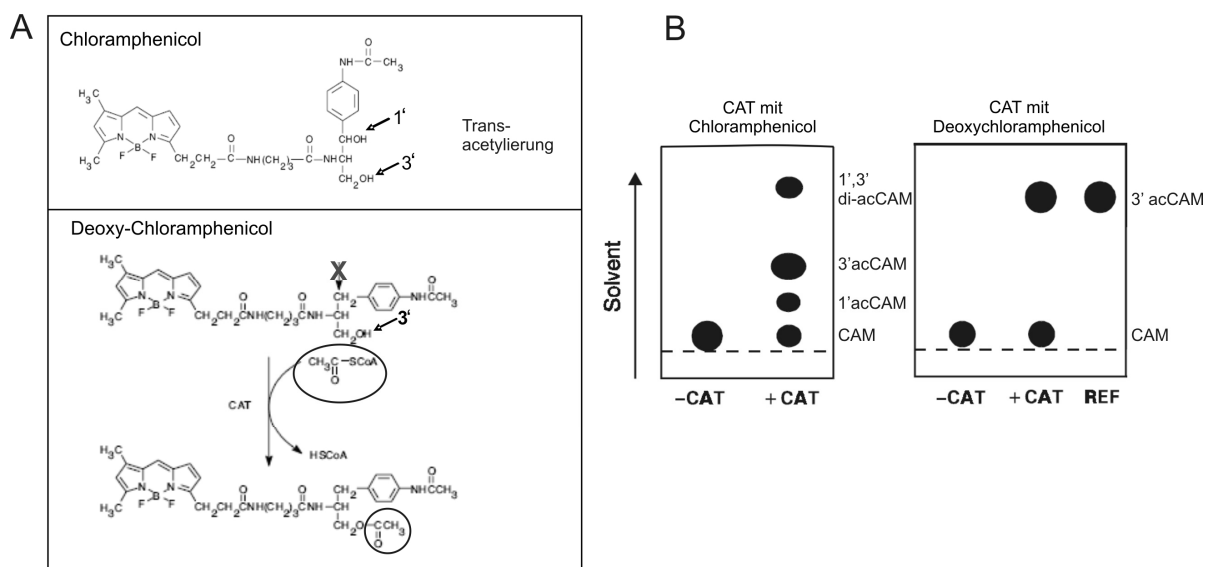


Abbildung 10 :Vergleich einer CAT-Reaktion mit Chloramphenicol und Deoxychloramphenicol

A) CAT-vermittelte Acetylierungsreaktion von CAM und Deoxy-CAM. Dargestellt sind die beiden Acetylierungsstellen am 1' und 3' C-Atom des CAM, sowie die nicht enzymatische Transacetylierungsreaktion, die nur bei Acetylierung von CAM stattfindet. Deoxy-CAM kann hingegen nur am 3'C-Atom acetyliert werden. **B)** Beispielhaftes Ergebnis der Auftrennung des Edukts und der gebildeten Produkte nach der CAT-Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie bei Anwesenheit (+CAT) und Abwesenheit (-CAT) des CAT-Enzyms. REF: Positivkontrolle von acetyliertem Deoxychloramphenicol.

Transfizierte Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in 6er Zellkulturplatten zunächst 2x mit PBS_{def} gewaschen. Nach der vollständigen Entfernung des Waschpuffers wurden pro Zellkulturschälchen 150 µl 1x Reporter-Lysis-Puffer (Luziferase Assay System, Promega) zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen abgeschabt, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die Zelltrümmer durch zweiminütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C pelletiert. Es erfolgte die Normalisierung der Transfektionseffizienz mittels Luziferase-Assay.

Mit normalisierten Mengen Zelllysat wurden folgende Ansätze für den CAT-Assay vorbereitet.

Ansatz für den CAT-Assay:

x * μ l	Zellysate	
1 μ l	Acetyl-Coenzym-A (70mg/ml in 250 mM Tris/HCl pH 7,5)	
2 μ l	Component A (BODIPY 1- Deoxychloramphenicol)	
ad 79 μ l	250 mM Tris/HCl pH 7,5	Inkubation bei 37°C, 5 min
+1 μ l		Inkubation bei 37°C, 2 h

x*: Die für den CAT-Assay eingesetzte Menge Zellysate beruhte auf den Luziferase-Normalisierungen. Von der Probe, die die geringste Luziferaseaktivität zeigte, wurden 20 μ l 1:20 verdünntes Zellysate eingesetzt, von allen übrigen entsprechend der Luziferaseaktivität weniger. Die Verdünnungen wurden in Tris/HCl-Puffer (250 mM; pH 7,5) angesetzt.

Die Reaktionen wurden für 2 h bei 37° C inkubiert, bis die Katalyse schließlich durch Zugabe von je 1000 μ l Ethylacetat (-20°C) gestoppt wurde. Nach einem Vortexen für 30 s und zwei-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm (4°C) wurden 750 μ l der oberen, organischen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in der SpeedVac vollständig eingedampft (15-30 min (je nach Anzahl der Proben) mit Heizung). Das entstandene Pellet wurde in je 20 μ l Ethylacetat (-20°C) gelöst und unter Föhnen auf eine mit Kieselgel beschichtete DC-Platte 1 cm oberhalb des unteren Platten-Randes aufgetropft. Die Platte wurde in eine abgeschlossene Kammer mit DC-Laufmittel (95% Trichlormethan und 5% Methanol) gestellt, bis die Edukte und Produkte sich voneinander getrennt hatten (30 min). Anschließend wurde die Platte mit Hilfe des GelDoc 2000 und der Software QuantityOne, Version 4.4.0 (BioRad) unter UV-Licht (302 nm) fotografiert. Der Umsatz des Wildtyps sollte ungefähr 50% betragen, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Es wurde darauf geachtet, dass die Signale nicht überbelichtet aufgenommen wurden. Die Quantifizierung der Signale wurde mit der QuantityOne Software der Firma BioRad vorgenommen. Hierbei wurde mit dem „Volume Circle Tool“ die Menge an acetyliertem CAM bestimmt, mit dem „Volume Rect Tool“ die Menge des Gesamt-CAM quantifiziert. Die Background-Subtraktion wurde dabei auf „local“ gesetzt. Die Berechnung der relativen CAT-Aktivität erfolgte in Microsoft Excel als Anteil von acetyliertem CAM an Gesamt-CAM in Bezug auf den jeweiligen Wert des Wildtyp-Minigenoms, der auf 100% gesetzt wurde.

3.18 Statistische Methoden

Zur quantitativen Beschreibung der CAT-Assay-Ergebnisse wurden nach der Normalisierung der Werte auf die Aktivität des Wildtyps mit Excel Mittelwerte und Standardfehler aller Versuche berechnet.

Bei mehr als 3 Versuchswiederholungen wurden die erhaltenen Messwerte zusätzlich auf signifikante Unterschiede getestet. Hierfür wurde das Programm SPSS verwendet. Zunächst wurden die Messwerte für die einzelnen Mutanten über den Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft (Signifikanzniveau: 0,05). Die Homogenität der Varianzen wurde mit der Levene-Statistik getestet (Signifikanzniveau: 0,05). Wenn die Daten normal verteilt waren und Homogenität der Varianzen vorlag, wurde einfaktorielle ANOVA, kombiniert mit Bonferroni Post-Hoc Test, eingesetzt, um signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen (wt, Mutanten) zu ermitteln (Signifikanzniveau: 0,05). War eine von beiden Voraussetzungen nicht erfüllt, so wurde ANOVA mit Games-Howell Post-Hoc Test kombiniert. Für alle Berechnungen blieben die Negativkontrollen unberücksichtigt, da diese im Vergleich zu allen übrigen Ansätzen keine Polymerasemoleküle enthielten und somit die Ursache der zu untersuchenden Unterschiede in der Transkriptionsaktivität nicht vergleichbar war.

4 ERGEBNISSE

4.1 Transkriptionsregulation an den Wildtyp-Gengrenzen

Zur Aufklärung der Bedeutung verschiedener Gengrenzstrukturen für die Regulation der Transkription in *Zaire Ebolavirus* wurden drei unterschiedliche Gengrenzen (GGs) genauer analysiert.

Während die Grenzen zwischen erstem und zweitem (GG NP/VP35) und fünftem und sechstem Gen (GG VP30/VP24) eine kurze (5nt) und eine lange (144nt) intergenische Region (IR) enthalten, überlappen die Transkriptionssignale der Gene VP35 und VP40 miteinander (Abbildung 11).

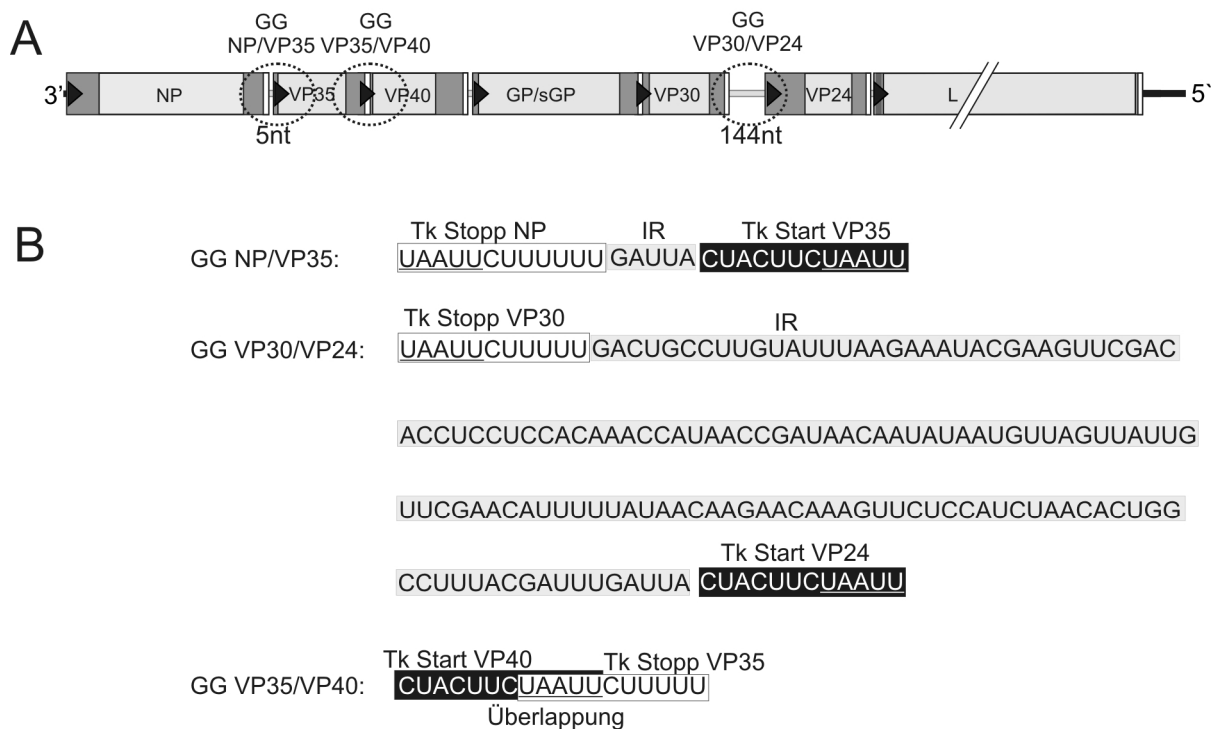


Abbildung 11 : Struktur und Sequenz der untersuchten Gengrenzen von *Zaire Ebolavirus*

A) Schematische, maßstabgetreue Darstellung des ZEBOV-RNA-Genoms (Länge der intergenischen Regionen (IR) 10× vergrößert). Die Transkriptionsstoppsignale (Tk Stopp) sind in weiß, die Transkriptionsstartsignale (Tk Start) in schwarz und die IR als hellgraue Linien dargestellt. Die Lage der drei genauer untersuchten Gengrenzen (GGs) zwischen dem NP- und dem VP35-Gen (GG NP/VP35), dem VP35- und dem VP40-Gen (GG VP35/VP40) und dem VP30- und dem VP24-Gen (GG VP30/VP24) im Genom ist gekennzeichnet und die Länge der IR aufgeführt. **B)** Sequenz der drei GGs. Tk Stopp sind weiß, Tk Start schwarz und die IR hellgrau hinterlegt. Das in allen Transkriptionssignalen hoch konservierte Pentamer ist unterstrichen.

4.1.1 Transkriptionsregulation an den Gengrenzen in der Virusinfektion

Zunächst wurden die ausgewählten GGs innerhalb des Virusgenoms in mit ZEBOV infizierten Zellen untersucht. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob nur die erwarteten monocistronischen Transkripte während einer Infektion gebildet werden oder sich auch so genannte Readthrough (Rd) - mRNAs nachweisen lassen, die entstehen, wenn die virale Polymerase bei der Transkription ein Stoppsignal überliest und so ein langes Transkript aus zwei aufeinander folgenden Transkriptionseinheiten entsteht. Diese wurden für andere Mitglieder der Mononegavirales bereits beschrieben (Whelan et al., 2004), konnten jedoch bei bisherigen Untersuchungen in Ebolaviren nicht detektiert werden (Sanchez und Kiley, 1987). Weiterhin war interessant, ob Rd-Transkripte abhängig von kurzen oder langen intergenischen Regionen sowie überlappenden Transkriptionssignalen entstehen, also die Transkriptionsstoppsignale bei GGs unterschiedlicher Struktur verschieden gut erkannt werden.

Hierfür wurde die mRNA von mit ZEBOV infizierten Huh-T7-Zellen 24 h *post infectionem* (*p.i.*) mit Oligo-dT-Zellulose gereinigt, über ein Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Es schloss sich eine Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten negativsträngigen RNA-Sonden an, die gegen die mRNA der für NP, VP35, VP40, VP30 und VP24 kodierenden Gene gerichtet waren. Der Nachweis der Transkripte erfolgte über die Inkubation mit an alkalische Phosphatase gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörpern sowie Chemilumineszenzdetektion (Abbildung 12).

Es wurden ausschließlich in mit ZEBOV infizierten Proben spezifische Banden detektiert. Unabhängig von der Struktur der GG konnten sowohl mono-, als auch bicistronische Transkripte nachgewiesen werden. Die Rd-mRNAs waren in allen Ansätzen in geringerer Menge vorhanden als die monocistronischen Transkripte (vgl. z.B. Bande 1 und 3; Abbildung 12 B). Bei Hybridisierung mit beiden genspezifischen Sonden der jeweiligen GG wurden alle vorhergesagten mono- und bicistronischen Transkripte detektiert, die auch in den Einzelhybridisierungen nachzuweisen waren. Eine Ausnahme stellt hier die VP35-VP40-Rd-mRNA dar (Bande 4, Abbildung 12 B). Diese konnte bei der Doppelhybridisierung mit NP- und VP35-genspezifischen Sonden nicht nachgewiesen werden, da sich die monocistronische NP-mRNA auf nahezu gleicher Höhe befand und in sehr viel größerer Menge vorhanden war. Bei Hybridisierung mit der VP40-genspezifischen Sonde konnte eine zusätzliche mRNA detektiert werden, die knapp unter der Bande der VP35-VP40-Rd-Transkripte lief (Bande 6, Abbildung 12 C). Aufgrund der Länge ist es möglich, dass es sich hierbei um VP40-sGP-Rd-Transkripte handelt, die entstehen könnten, wenn die virale Polymerase die Editierungs-

sequenz in der Mitte des GP-Gens als Stoppsignal erkennt, da sich beide Sequenzmotive stark ähneln (siehe Einleitung).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die virale Polymerase sowohl an GGs mit kurzer und langer intergenischer Region als auch an solchen mit direkt überlappenden Transkriptionssignalen die mRNA-Synthese nicht einwandfrei terminiert. Sie synthetisiert, unabhängig von der Struktur der GG, zu einem geringen Anteil polyadenylierte, bicistronische Transkripte.

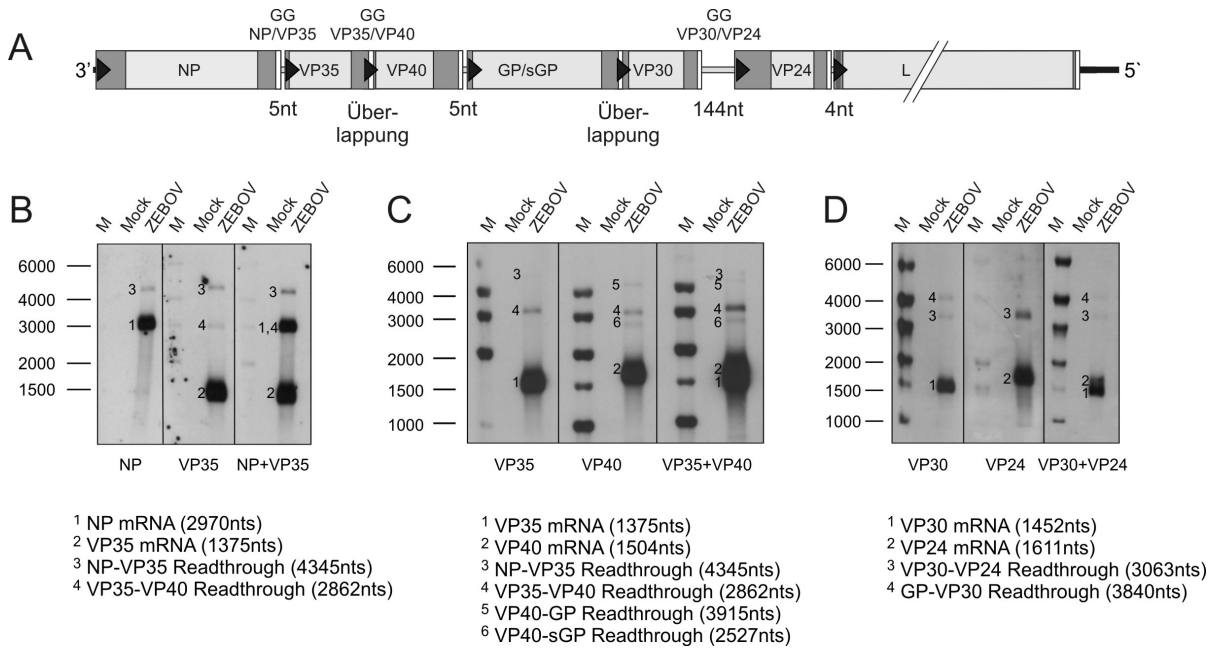


Abbildung 12 : Nachweis von virusspezifischer mRNA

A) Schematische Darstellung des ZEBOV Genoms mit den drei untersuchten Gengrenzen (GGs). Die Darstellung der cis-aktiven Elemente entspricht der in Abbildung 11. **B-D)** Northern Blot-Assay viraler mRNA: **B)** GG NP/VP35, **C)** GG VP35/VP40, **D)** GG VP30/VP24. Huh-T7 Zellen mit einer Konfluenz von 30% wurden mit ZEBOV mit einer multiplicity of infection (moi) von 3 infiziert (ZEBOV) bzw. nicht infiziert (Mock) und 24h *p.i.* geerntet. Die mRNA wurde mit oligo-dT-Zellulose isoliert, über ein Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit den jeweiligen genspezifischen Digoxigenin-markierten Sonden hybridisiert. Der Nachweis erfolgte über einen an alkalische Phosphatase gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper (1:20000) und eine anschließende Chemilumineszenzreaktion. M: RNA high Range Marker (Fermentas). Die Sonden wurden getrennt (linker und mittlerer Teil der Northern Blot Abbildungen) und gemeinsam (rechter Teil) in der Hybridisierung eingesetzt; ihre jeweilige Spezifität ist unter den Abbildungen angegeben (NP: Sonde gegen NP-mRNA, VP35: Sonde gegen VP35-mRNA usw.). Die vorhergesagten mRNA-Spezies für jede GG sind mit den erwarteten Größen (ohne den Poly-Adenosin-Schwanz) angegeben und den jeweiligen Banden zugeordnet. In B und D wurden aus Gründen der besseren Visualisierung verschiedene Belichtungszeiten eines Blots kombiniert.

4.1.2 Transkriptionsregulation an den Gengrenzen in bicistronischen Minigenomen

Um Auswirkungen der unterschiedlichen Gengrenzstrukturen auf die Regulation der Transkription genauer untersuchen zu können, wurden bicistronische Minigenome eingesetzt. In

diesen können die GGs unabhängig von ihrer Lage im Genom analysiert werden. Der Aufbau bicistronischer Minigenome ist in Kapitel 2.6 näher erläutert.

Die Gengrenzregion wurde in die bicistronischen Minigenome zwischen das Δ CAT- und das CAT-Reportergen kloniert. Bei der Transkription durch die virale Polymerase können von dieser Matrize grundsätzlich drei verschiedene mRNA-Spezies entstehen (Abbildung 13):

(i) mRNA 1, die am Transkriptionsstartsignal des NP-Gens beginnt und an dem in der GG vorhandenen Stoppsignal terminiert wird, (ii) mRNA 2, die am Transkriptionsstartsignal der GG beginnt und mit dem Stoppsignal des L-Gens endet und (iii) ein Rd-Transkript, das entsteht, wenn die virale Polymerase das Transkriptionsstoppsignal an der GG überliest und eine mRNA bildet, die sowohl das Δ CAT- als auch das CAT-Gen beinhaltet. Die bicistronischen Minigenome unterscheiden sich ausschließlich im Bereich der Gengrenzregion.

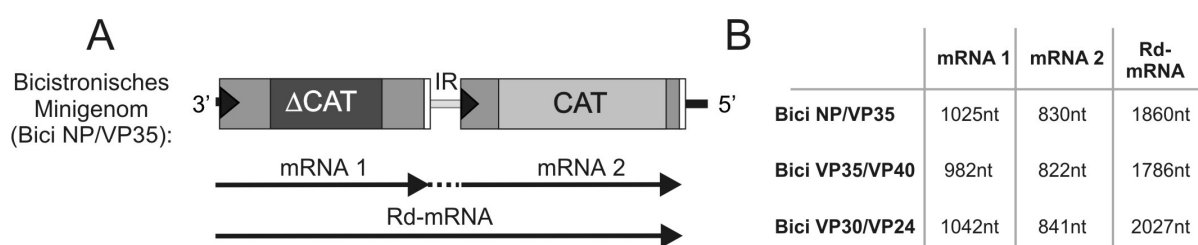


Abbildung 13 : Gebildete mRNA-Spezies bei Transkription bicistronischer Minigenome

A) Beispielhafte schematische Darstellung des bicistronischen Minigenoms (Bici) mit der ersten Gengrenze (Bici NP/VP35). Das Bici ist so dargestellt, wie es nach Synthese durch die T7 RNA-Polymerase in der Zelle als einzelsträngige, negativ orientierte RNA vorliegt und der viralen Polymerase als Matrize zur Verfügung steht. Δ CAT kennzeichnet das verkürzte Chloramphenicolacetyltransferasegen, CAT das Gen vollständiger Länge. Die Darstellung der Transkriptionssignale und der intergenischen Region (IR) entspricht der in Abbildung 11. Die Lage der GG im Bici ist mit einem Rechteck verdeutlicht. Pfeile markieren die Leserichtung der viralen Polymerase auf der bicistronischen Matrize und kennzeichnen die drei gebildeten mRNA-Spezies **B)** Längen der gebildeten mRNA-Spezies bei Transkription der drei untersuchten bicistronischen Minigenome.

4.1.2.1 Transkription von bicistronischen Minigenomen bei viraler Überinfektion

Die Transkription der bicistronischen Minigenome wurde zunächst in virusinfizierten Zellen untersucht. Hierzu wurden Huh-T7-Zellen mit Plasmiden transfiziert, in denen die bicistronischen Minigenome unter der Kontrolle des T7-RNA-Polymerasepromotors stehen, zusammen mit einem Expressionsplasmid für die T7-RNA-Polymerase. Diese setzt die Minigenome in einzelsträngige RNA negativer Orientierung um, die dann der viralen Polymerase als Matrize dienen können. 12h nach Transfektion wurden die transfizierten Zellen mit ZEBOV infiziert. Die Zellyse erfolgte zwei Tage *p.i.*, die gebildete mRNA wurde über Oligo-dT Zellularose gereinigt, gelelektrophoretisch über Formaldehyd-Agarosegele aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer gegen die CAT-mRNA gerichteten RNA-Sonde (DIG-BS/CAT; Mühlberger et al., 1998) hybridisiert. Als Positivkontrolle wurde das monocis-

tronische Minigenom 3E-5E eingesetzt, von dem bereits bekannt war, dass es als Matrize im Viruskontext akzeptiert wird (Mühlberger et al., 1999). Weder in Zellen, die nur das Minigenom enthielten, jedoch nicht infiziert waren, noch in infizierten Zellen, die nicht mit Minigenomen transfiziert worden waren, konnten Signale detektiert werden (Abbildung 14 A und B).

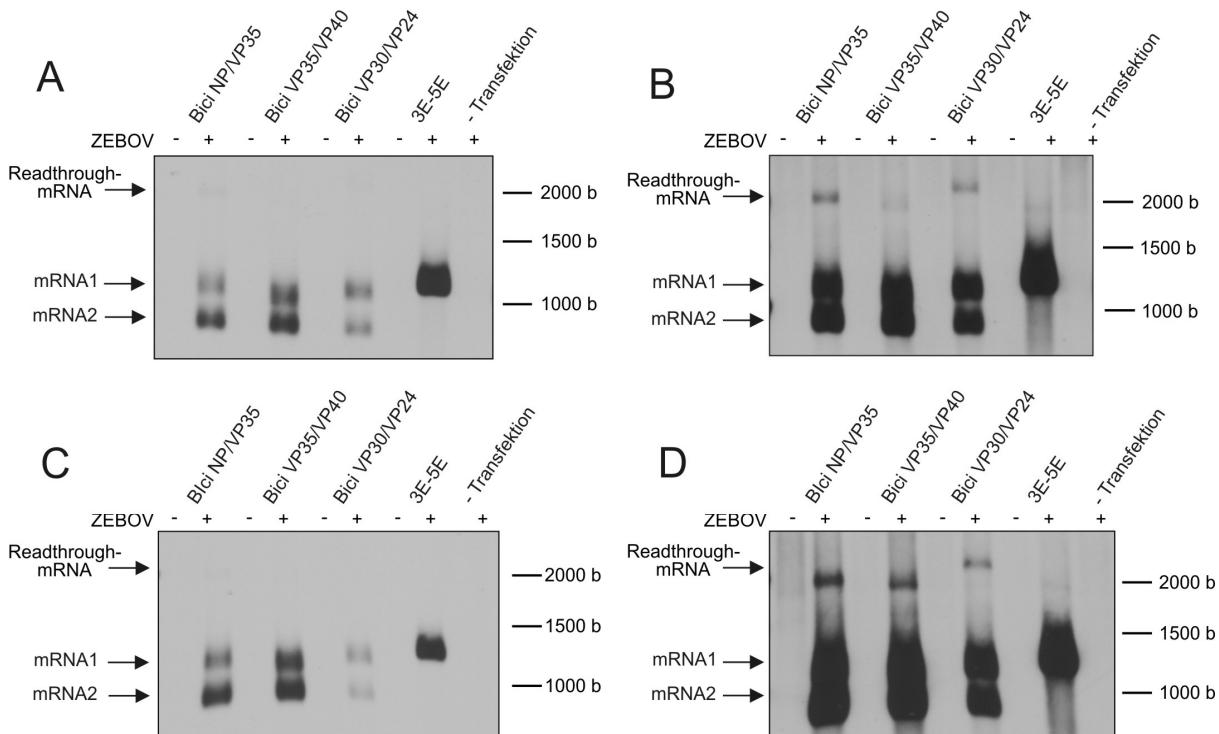


Abbildung 14 : Transkription von bicistronischen Minigenomen in ZEBOV-infizierten Zellen

A) und **B)** $1,2 \times 10^5$ Huh-T7-Zellen pro Vertiefung wurden in 6er Zellkulturplatten ausgesät und nach 24h bei einer Konfluenz von 70% mit jeweils 2 μg Bici der drei unterschiedlichen Gengrenzen (Bici NP/VP35, Bici VP35/VP40 und Bici VP30/VP24) bzw. mit dem monocistronischen Minigenom 3E-5E und je 1 μg pCAGGS-T7 Expressionsplasmid transfiziert. 12 h später wurden die transfizierten Zellen wie angegeben mit ZEBOV infiziert ($\text{moi}=5$) und das Inokulum auf den Zellen belassen. 48 h *p.i.* wurde die mRNA isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer CAT-spezifischen, Digoxigenin-markierten RNA-Sonde hybridisiert. Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit einem anti-Digoxigenin-Antikörper und Chemilumineszenznachweis A) kurze Expositionszeit des Röntgenfilms: 1,5 min B) lange Expositionszeit: 20 min **C)** und **D)** Zellen wurden wie unter A beschrieben transfiziert und infiziert. 72h *p.i.* wurden die Überstände geerntet. $1,2 \times 10^5$ Huh-T7 Zellen wurden ausgesät und 24 h später mit je 250 μl Überstand + 250 μl 1x DMEM für 48 h infiziert. Anschließend erfolgte die Isolierung und Analyse der CAT-spezifischen mRNA mittels Northern Blot Hybridisierung wie für A und B beschrieben. C) Expositionszeit: 30 s D) Expositionszeit: 5 min.

Die erwarteten mRNA-Spezies ließen sich in allen transfizierten und anschließend infizierten Zellen nachweisen, wobei die Rd-Transkripte in so geringer Menge vorhanden waren, dass sie erst nach längerer Belichtungszeit detektiert werden konnten (Abbildung 14 B). Der starke Mengenunterschied zwischen mono- und bicistronischen Transkripten entspricht damit den in der natürlichen Infektion beobachteten mRNA-Verhältnissen (Abbildung 12). Vergleicht man die Verhältnisse von mRNA 1 und mRNA 2 der unterschiedlichen GGs miteinander, so war auffällig, dass für Bici VP30/VP24 weniger mRNA 2 detektiert wurde (Abbildung 14 A).

Um die Frage zu beantworten, ob die bicistronischen Minigenome nicht nur von der ZEBOV-Polymerase transkribiert, sondern auch repliziert, in Nukleokapside verpackt und ausgeschleust werden, wurden die Überstände transfizierter und infizierter Zellen nach 72 h geerntet und zur Infektion frischer Zellen verwendet. 48 h *p.i.* wurde die zelluläre mRNA isoliert und einer Northern Blot-Analyse mit einer gegen die CAT-mRNA gerichteten Sonde unterzogen. Wie in Abbildung 14 C und D zu sehen ist, konnten die von den bicistronischen Minigenomen transkribierten mRNA-Spezies nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die bicistronischen Minigenome in ZEBOV-infizierten Zellen als Genomäquivalente akzeptiert, in Nukleokapside verpackt und in Form von infektiösen Partikeln ausgeschleust werden. Die gebildeten mRNA-Mengen der unterschiedlichen Minigenome entsprachen denjenigen, die in transfizierten und anschließend infizierten Zellen beobachtet wurden (vgl. Abbildung 14 A, B und C, D).

4.1.2.2 Transkription von bicistronischen Minigenomen im rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystem

Da die bicistronischen Minigenome von der viralen Polymerase als Genomäquivalente akzeptiert werden, stellen sie ein ausgezeichnetes Instrument dar, um die Strukturen der GGs unabhängig von den im Genom auftretenden Attenuierungseffekten (siehe Einleitung) genauer zu analysieren. Um für weitere Versuche nicht mehr von der Arbeit im Hochsicherheitslabor abhängig zu sein, sollten die bicistronischen Minigenome im rekonstruierten ZEBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem eingesetzt werden, das in Kapitel 2.6 näher erläutert ist. Hierbei wird das virale Genom durch ein Minigenom ersetzt und der virale Polymerasekomplex über Expressionsplasmide, die für die einzelnen Komponenten kodieren, bereitgestellt (Mühlberger et al., 1999). Zunächst wurde untersucht, ob die bicistronischen Minigenome im rekonstruierten Minigenomsystem korrekt transkribiert wurden.

Wie über Western Blot-Analyse in einem Vorversuch ermittelt wurde, exprimieren BSR T7/5-Zellen in einem sehr viel höheren Maße die in diesen Zelllinien stabil exprimierte T7-RNA-Polymerase als die Huh-T7-Zellen. Die größere Menge an vorhandener T7-RNA-Polymerase korrelierte direkt mit einer stärkeren Expression des Plasmids pT/NP_{EBO}, welches für das Nukleokapsidprotein des ZEBOV kodiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden für die folgenden Versuche BSR T7/5-Zellen eingesetzt.

Diese wurden mit den Expressionsplasmiden für die Polymerasekomplexkomponenten L, NP, VP35 und VP30, sowie mit den Plasmiden für die drei unterschiedlichen bicistronischen Minigenome transfiziert.

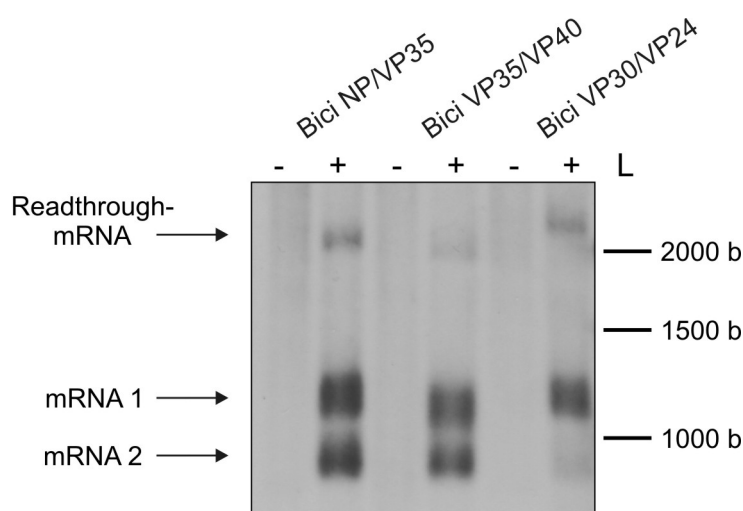


Abbildung 15 : Transkriptionsanalyse der bicistronischen Minigenome im Ebolavirus-spezifischen rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystem

70% konfluente BSR T7/5-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für den ZEBOV-spezifischen Polymerasekomplex kodieren (Mühlberger et al., 1999): pT/L_{EBO}: 1 µg, pT/NP_{EBO}: 0,5 µg, pT/VP35_{EBO}: 0,5 µg, pT/VP30_{EBO}: 0,1 µg. Das Plasmid pT/L_{EBO} wurde in den Negativkontrollen durch Leervektorplasmid ersetzt (-L). Zusätzlich wurden von den die drei unterschiedlichen GG enthaltenden Bicis je 1,5 µg in die Zellen eingebracht. 2 d nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, die mRNA isoliert, aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mittels Northern Hybridisierung die CAT-spezifischen mRNA-Spezies nachgewiesen.

Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und die mRNA einer Northern Hybridisierung mit der gegen die CAT-mRNA gerichteten Sonde unterzogen. Auch im rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystem lassen sich die drei erwarteten mRNA-Spezies nachweisen (Abbildung 15). Wie auch in der Virusinfektion sind hier die Rd-Transkripte im Vergleich zu den monocistronischen mRNA-Spezies in sehr viel geringerer Menge vorhanden. Dieser Unterschied ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in transfizierten und anschließend infizierten Zellen (Abbildung 14). In Analogie zu den Ergebnissen aus transfizierten und anschließend infizierten Zellen liegt die mRNA 2 von Bici VP30/VP24 auch hier in wesentlich geringerer Menge vor (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 15). Dies lässt vermuten, dass eine lange IR zu einer schlechteren Reinitiation am nachfolgenden Transkriptionsstartsignal führen könnte. Darum sollte im Weiteren die Rolle der IR für die Regulation der Transkription genauer analysiert werden.

Aufgrund der übereinstimmenden Ergebnisse von Virusinfektion und rekonstruiertem System wurden weitere Untersuchungen der Gengrenzstrukturen auf letztere Methode beschränkt.

4.2 Untersuchung einer Gengrenze mit einer kurzen intergenischen Region

Es wurde zunächst die zwischen dem ersten und zweiten Gen gelegene GG mit einer IR von fünf Nukleotiden (siehe Abbildung 11) mittels Mutationsanalyse im bicistronischen Minigenom Bici NP/VP35 untersucht.

4.2.1 Einfluss der Sequenz der intergenischen Region

Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob die Sequenz der intergenischen Nukleotide für die Transkription essentiell ist. Dazu wurden Mutanten eingesetzt, in denen drei bzw. alle intergenischen Nukleotide substituiert waren (Boehmann, 2002). Purinbasen wurden durch Pyrimidinbasen ersetzt und umgekehrt (Abbildung 16 A). Es wurde weiterhin getestet, ob den direkt an die Transkriptionssignale angrenzenden intergenischen Nukleotiden eine besondere Bedeutung zukommt. Dafür wurden die Nukleotide 1 und 5 der IR ausgehend von der Mutante mit vollständig substituiertes IR in die Wildtypsequenz zurückmutiert (Abbildung 16 A).

Alle Minigenome wurden im rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystem hinsichtlich ihrer Transkriptionsaktivität getestet. Hierfür wurden die synthetisierten mRNA-Spezies im Northern Blot-Assay detektiert. Um zu überprüfen, ob in allen Ansätzen die gleichen Mengen an Polymerasekomplexkomponenten vorhanden waren, wurde als Kontrolle ein monocistronisches Minigenom in die Zellen eingebracht, das anstelle des CAT-Gens für die Firefly-Luziferase kodiert (3E-5E-FLuz). Dieses wurde parallel zu den bicistronischen Minigenomen vom viralen Polymerasekomplex repliziert und transkribiert und konnte ebenfalls im Northern Blot detektiert werden. Es ließen sich keine Unterschiede hinsichtlich der Polymeraseaktivität der einzelnen Ansätze feststellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

In Abbildung 16 B ist zu sehen, dass weder der Austausch von drei intergenischen Nukleotiden, noch die vollständige Substitution der IR eine Auswirkung auf die gebildeten mRNA-Spezies zeigte. Auch in Mutanten, bei denen nur die mittleren intergenischen Nukleotide substituiert worden waren, war im Vergleich zum Wildtyp keine auffällige Veränderung der mRNA-Mengen zu beobachten.

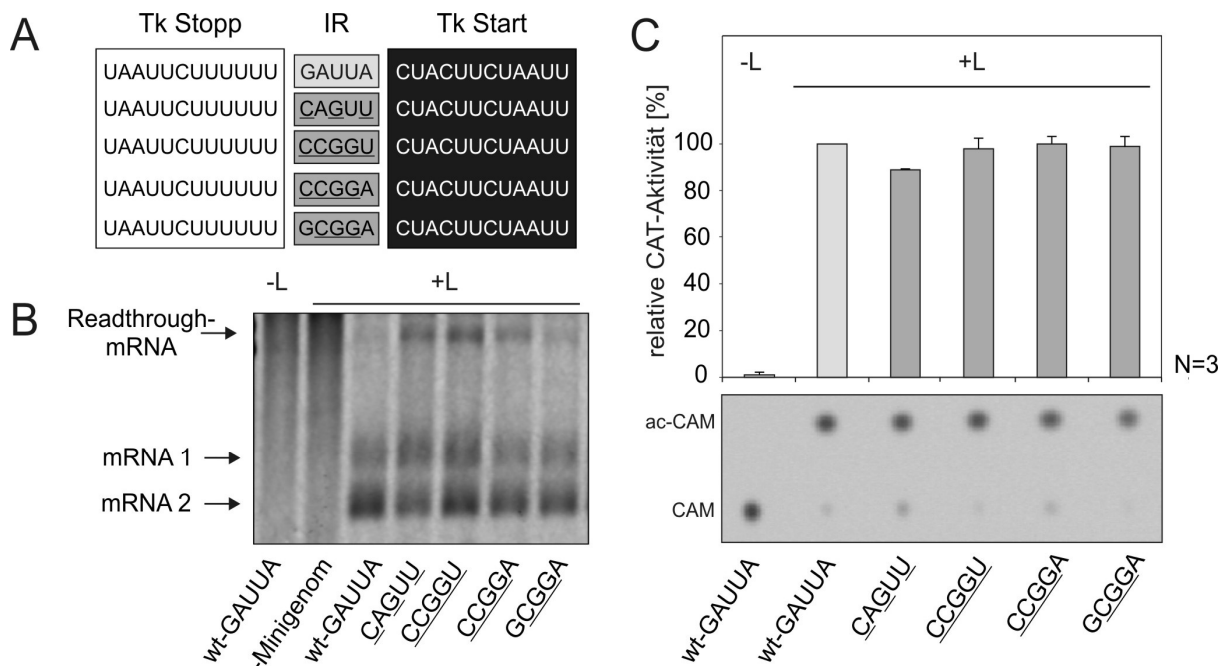


Abbildung 16 : Substitution der intergenischen Region an der Gengrenze zwischen dem NP- und VP35-Gen

A) Darstellung der GG-Sequenz der untersuchten Bicis in 3'→5' Genomorientierung. In hellgrau hinterlegt ist die intergenische Region (IR) des Wildtyp Minigenoms Bici NP/VP35 (wt), die mutierten IR sind in dunkelgrau hervorgehoben; substituierte Nukleotide sind unterstrichen. **B)** und **C)** Analyse der Bicis im ZEBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem. **B)** 70% konfluente BSR T7/5 Zellen wurden mit Expressionsplasmiden der ZEBOV-Nukleokapsidproteine und jeweils 1,5 µg des jeweiligen bicistronischen Minigenoms transfiziert (siehe Abbildung 15). Als Kontrolle für die Polymeraseaktivität wurden die Zellen zusätzlich mit 0,5 µg des monocistronischen Minigenoms 3E-5E-Fluz transfiziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Die mRNA der transfizierten Zellen wurde 2 d nach Transfektion isoliert und einer Northern Blot-Analyse unterzogen. Der Nachweis der Signale erfolgte mit dem Odyssey-System (LI-COR). Die Sequenzen unter der Abbildung kennzeichnen die IR-Sequenz der eingesetzten Bicis. **C)** BSR T7/5-Zellen wurden mit folgenden Mengen an Polymerasekomponenten und bicistronischen Minigenomen transfiziert: pT/LEBO: 1 µg, pT/NPEBO: 0,5 µg, pT/VP35EBO: 0,5 µg, pT/VP30EBO: 0,1 µg. Das Plasmid pT/LEBO wurde in den Negativkontrollen durch Leervektorplasmid ersetzt (-L). Zusätzlich wurden von den die drei unterschiedlichen GG enthaltenden Bicis je 1,5 µg in die Zellen eingebracht zusammen mit 0,3 µg pGL3-control-Plasmid (Promega). Das Plasmid trägt das firefly-Luziferasegen unter der Kontrolle eines eukaryotischen Promotors und dient als Transfektionskontrolle. 2 d nach der Transfektion erfolgten die Zellyse und die Normalisierung der Lysate mittels Luziferase-Assay. Normalisierte Zellysatmengen wurden in den Fast-CAT-Assay eingesetzt. Acetyliertes und nicht acetyliertes Chloramphenicol (ac-CAM, bzw. CAM) wurden über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, die Platten mittels GelDoc System gescannt (Bio-Rad) und mit der QuantityOne-Software (Bio-Rad) quantifiziert. Dargestellt ist beispielhaft ein repräsentatives Ergebnis sowie die auf den wt normalisierten Mittelwerte aller Versuche (mit Standardfehlern).

Da eine quantitative Auswertung der Northern Blot-Assays nicht möglich war, wurden die Minigenome zusätzlich im Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) -Assay analysiert. Mit dieser Methode wird das funktionelle CAT-Enzym nachgewiesen. Die in mRNA 1 kodierte verkürzte Version ist enzymatisch inaktiv und trägt darum nicht zur CAT-Aktivität bei. Der ORF für eine aktive CAT ist sowohl in mRNA 2 als auch in den Rd-Transkripten vorhanden (Abbildung 13). Letztere dienen den Ribosomen nicht bzw. nur sehr ineffizient als Matrize, wie an anderer Stelle gezeigt werden konnte (siehe 4.4.1). Die CAT-Aktivität spiegelt demnach hauptsächlich die Menge der mRNA 2-Spezies wider.

Für die Analyse der CAT-Aktivität wurden die Minigenome wie zuvor beschrieben im rekonstruierten Replikations- und Transkriptionsassay eingesetzt. Zusätzlich zu den bicistronischen

Minigenomen und den Expressionsplasmiden für einen aktiven Polymerasekomplex wurde ein Plasmid eingebracht, das das firefly-Luziferasegen unter der Kontrolle eines eukaryotischen Promotors trägt und als Transfektionskontrolle diente. Die Zellen wurden nach 2 d geerntet und mittels Luziferaseassay die Transfektionseffizienz überprüft. Normalisierte Mengen Zellysat wurden anschließend im quantitativen Fast CAT-Assay eingesetzt. Dabei konnte das Ergebnis der Northern Hybridisierung bestätigt werden. Bei der Mehrzahl der eingesetzten Mutanten zeigte sich keine deutliche Änderung der CAT-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 16 C). Lediglich bei dem Austausch von drei intergenischen Nukleotiden nahm die CAT-Aktivität leicht um $11\% \pm 1\%$ (Mittelwert \pm Standardfehler) ab.

Beide angewandten Methoden weisen folglich übereinstimmend darauf hin, dass die Substitution der IR die Erkennung der angrenzenden Startsignale durch die virale Polymerase nicht wesentlich beeinflusst.

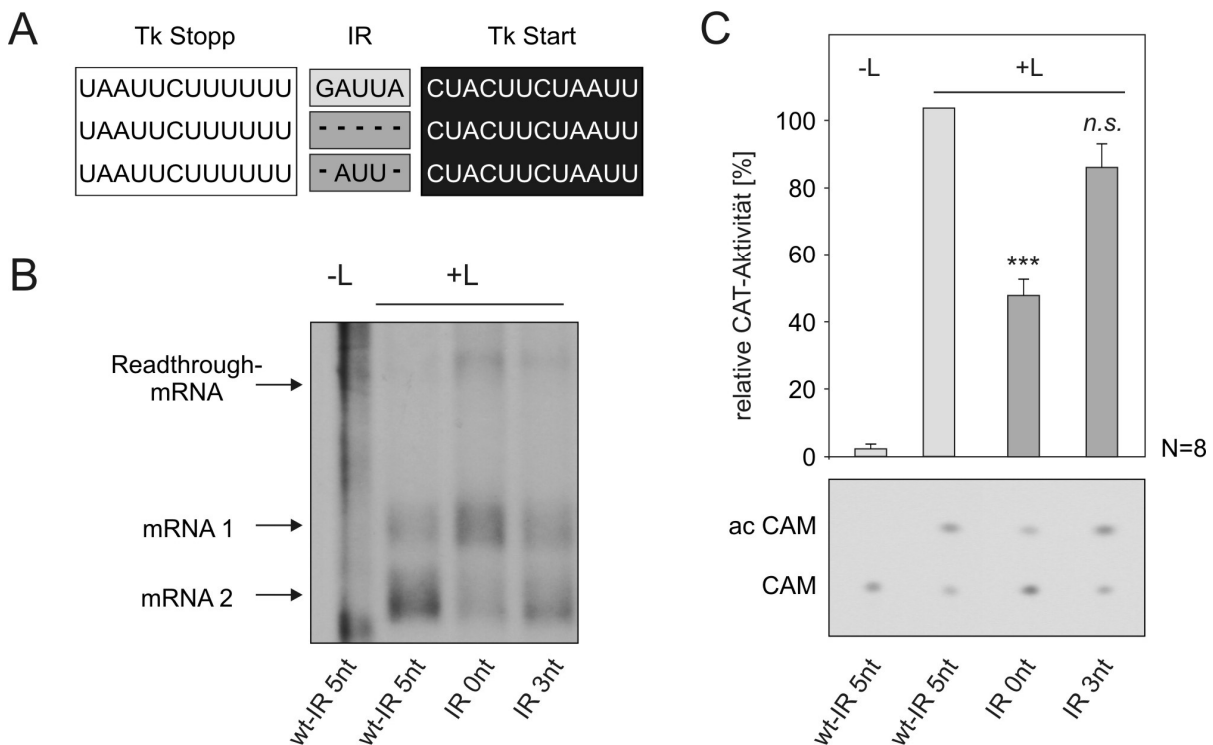


Abbildung 17 : Verkürzung und Deletion der intergenischen Region an der Gengrenze zwischen dem NP- und VP35- Gen

A) Dargestellt ist die Sequenz der wt Gengrenze (intergenische Region (IR): hellgrau hinterlegt), sowie die der Deletionsmutanten. Deletierte Nukleotide wurden durch Striche ersetzt. **B**) Northern Blot-Analyse der Bicis. Die IR-Längen der getesteten Bicis sind als Beschriftung angegeben. BSR-T7/5-Zellen wurden wie in Abbildung 15 beschrieben transfiziert. 2 d nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die mRNA analysiert. **C**) CAT-Assay. Der CAT-Assay wurde durchgeführt wie Abbildung 16 beschrieben. Dargestellt ist beispielhaft das Ergebnis eines Versuchs sowie die auf den wt normalisierte Quantifizierung aller Versuche mit Standardfehlerbalken. Überprüfung der Signifikanz der relativen CAT-Aktivitäten mittels ANOVA-Analyse und Bonferroni-Post-Hoc-Test (p -Werte beim Test gegen den wt: * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$, *n.s.*: Unterschied zum wt ist nicht signifikant). Die Negativkontrolle (-L) wurde nicht getestet (siehe Methoden).

4.2.2 Einfluss der Länge der intergenischen Region

Die Sequenz der IR zeigt keinen drastischen Einfluss auf die Reinitiationsfrequenz am nachfolgenden Transkriptionsstartsignal. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob der Länge der IR bei der Regulation der Reinitiation eine größere Bedeutung zukommt als der Sequenz. Hierfür wurde die in der natürlichen GG fünf Nukleotide lange IR zwischen den Genen NP und VP35 entweder vollständig deletiert, auf 3nt verkürzt oder aber auf 10, 15, 25 und 30nt verlängert und die Auswirkungen auf die Transkriptionsaktivität untersucht.

Zunächst wurden die Deletionsmutanten (Boehmann, 2002) (Abbildung 17 A) im ZEBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem eingesetzt, über Northern Hybridisierung analysiert und im CAT-Assay quantifiziert.

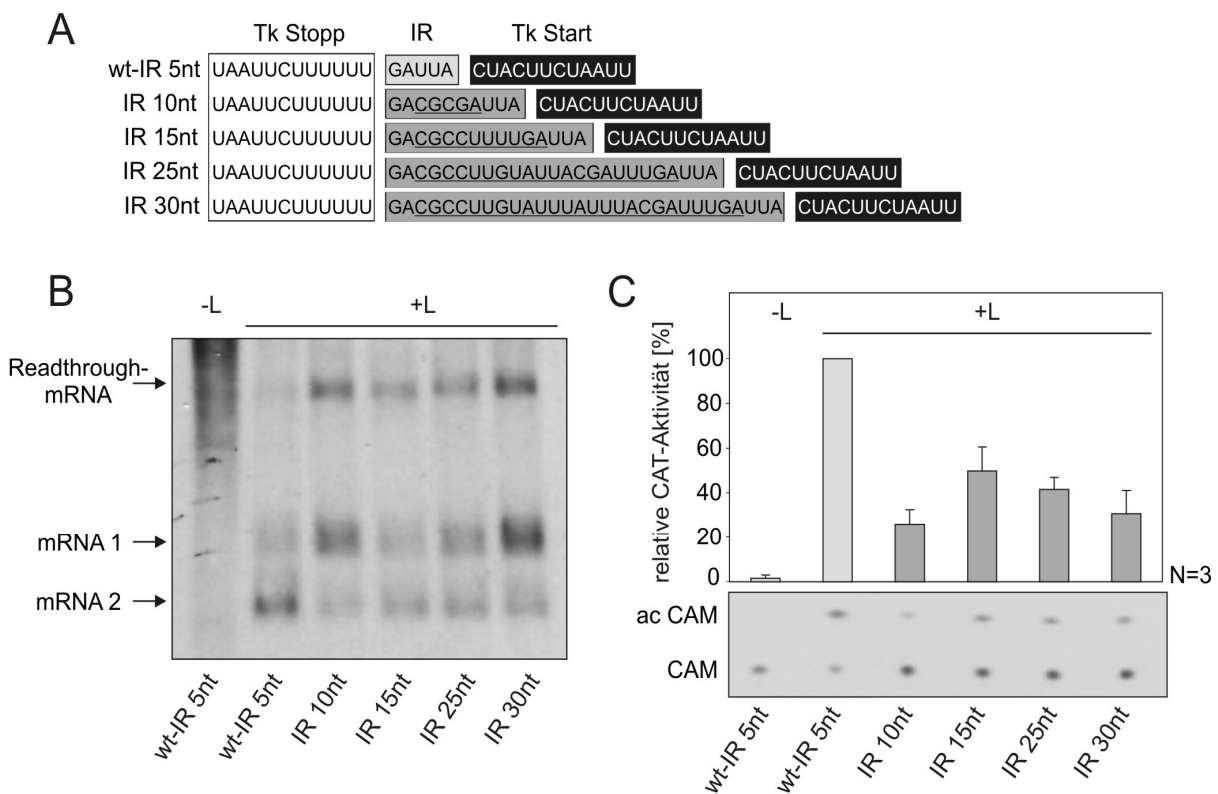


Abbildung 18 : Verlängerung der intergenischen Region an der Gengrenze zwischen dem NP- und VP35-Gen

A) Darstellung der GG-Sequenz der untersuchten Bicis in 3'→5' Genomorientierung. In hellgrau hinterlegt ist die IR des wt, die verlängerten IR sind in dunkelgrau hervorgehoben; inserierte Nukleotide sind unterstrichen. **B)** und **C)** Analyse der Bicis im ZEBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem. Wie in Abbildung 15 beschrieben, wurden die mutierten Minigenome zusammen mit Expressionsplasmiden für den ZEBOV-Polymerasekomplex in 70% konfluente BSR T7/5-Zellen eingebracht und 2 d nach Transfektion die Transkriptionsaktivität mittels Northern Blot-Analyse (B) und Bestimmung der Enzymaktivität im Fast-CAT-Assay (C) wie in Abbildung 16 beschrieben untersucht. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen CAT-Assays und die Quantifizierung der CAT-Aktivität aller Versuche normalisiert auf den jeweiligen wt mit Standardfehlern. Für Bici IR 25nt entsprach N = 2.

Weder die Verkürzung noch die vollständige Deletion der IR führten zu einem Verlust der Transkriptionsaktivität an der untersuchten GG (Abbildung 17 B).

Obwohl alle mRNA-Spezies gebildet wurden, zeigte die Untersuchung der Deletionsmutante jedoch einen deutlichen Rückgang an mRNA 2 im Vergleich zum Wildtyp-Minigenom (Abbildung 17 B). Dieser Unterschied spiegelte sich auch im quantitativen Fast-CAT-Assay wider (Abbildung 17 C). Während das Minigenom mit einer verkürzten IR eine CAT-Aktivität von $83\% \pm 7\%$ bezogen auf den Wildtyp zeigte, war die Aktivität der Mutante mit deletierter IR und somit direkt aufeinander treffenden Transkriptionssignalen auf $46\% \pm 5\%$ reduziert. Über ANOVA Analyse und Bonferroni- Post-Hoc-Test bestätigte sich, dass dieser Effekt hoch signifikant war (p -Wert beim Test gegen den wt: $0nt < 0,001$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die IR zwar für die Transkriptionsaktivität nicht essentiell ist, jedoch für eine Feinregulation der mRNA-Synthese benötigt wird.

Um diese Hypothese weiter zu überprüfen, wurde die IR auf 10, 15, 25 und 30nt verlängert (Abbildung 18 A) und die Auswirkungen auf die Transkriptionsaktivität untersucht. Beim Test der Minigenome zeigte sich in der Northern Blot-Analyse bei allen Insertionsmutanten ein deutlicher Rückgang der mRNA 2 im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 18 B). Die Abnahme der mRNA 2-Spezies war am stärksten ausgeprägt bei IRs von 10 und 30 Nukleotiden Länge. Die Ergebnisse konnten im quantitativen CAT-Assay bestätigt werden. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Mutante IR 10nt eine um $74\% \pm 7\%$ reduzierte CAT-Aktivität, bei einer IR von 30 Nukleotiden Länge betrug die Abnahme $69\% \pm 10\%$ (Abbildung 18 C). Ein Rückgang der Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp-Minigenom war auch bei den anderen Mutanten zu beobachten. Während bei 15 intergenischen Nukleotiden die CAT-Aktivität einen Rückgang um den Faktor zwei zeigte ($50\% \pm 10\%$), nahm bei zunehmender Länge der IR der inhibitorische Effekt zu.

Wie die vorigen Ergebnisse zeigten, inhibiert eine Verlängerung der IR die Reinitiation am nachfolgenden Gen, wobei die Stärke der Inhibition von der Länge der IR abhängig zu sein scheint. Dabei ließ sich jedoch kein offensichtlich linearer Zusammenhang zwischen der IR-Länge und der Reinitiationsfrequenz beobachten.

Dies könnte möglicherweise auf die Sequenz der IR zurückzuführen sein. Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, zeigte eine Substitution der IR zwar keinen starken Effekt auf die Transkriptionsaktivität der angrenzenden Gene, führte aber dennoch zu leichten Unterschieden. Sequenzspezifische Effekte sind daher bei einer verlängerten IR nicht auszuschließen. Darum sollte die IR in den untersuchten Verlängerungsmutanten der natürlicherweise im Virusgenom vorliegenden Sequenz der IR zwischen den Genen für VP30 und VP24 ange-

nisse des Northern Blot-Assays nicht eindeutig und eine Wiederholung dieses Tests war aus technischen und zeitlichen Gründen nicht möglich. Diese vorläufigen Resultate konnten jedoch im CAT-Assay bestätigt werden. Eine IR-Verlängerung auf 10-30 Nukleotide ging mit einer statistisch signifikanten Reduktion der CAT-Aktivität einher. Wurde die IR jedoch weiter auf 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide verlängert, stieg die Menge an zweiter mRNA sowie die CAT-Aktivität auf ein Niveau, das sich von dem des Wildtyps nicht mehr signifikant unterschied (Abbildung 19 B und C).

4.2.3 Zusammenfassung Kapitel 4.2

In diesem Kapitel wurde der Einfluss von Länge und Sequenz der fünf Nukleotide umfassenden IR der GG NP/VP35 analysiert.

Wie in Abbildung 20 zusammenfassend dargestellt, führte keine der eingefügten Mutationen zu einer vollständigen Inhibition der CAT-Aktivität. In Northern Blot-Analysen konnte die

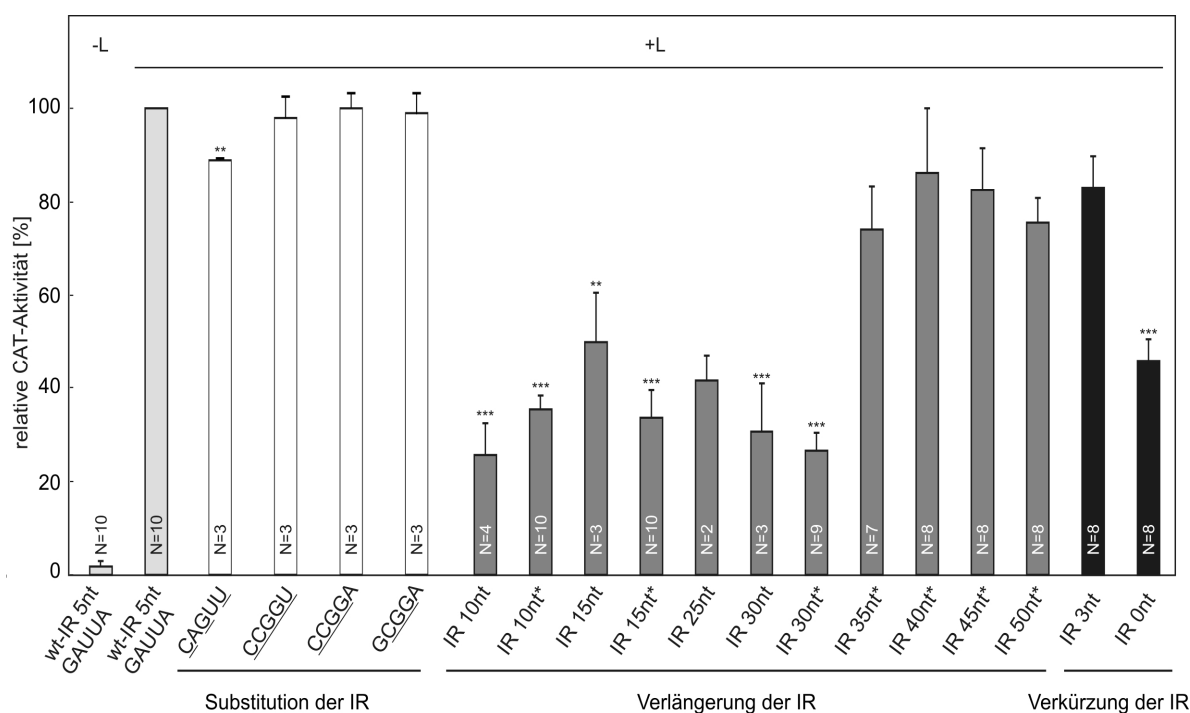


Abbildung 20 : Übersicht der CAT-Assay-Ergebnisse aller IR-Mutanten der Gengrenze zwischen erstem und zweitem Gen

Dargestellt sind die relativen CAT-Aktivitäten bezogen auf den wt mit Angabe der Standardfehler. Die Wiederholungszahl der Versuche ist für jede Mutante innerhalb der Balken angegeben. Mit einem Sternchen an den Namen sind diejenigen Mutanten gekennzeichnet, deren intergenische Region (IR) der IR-Sequenz zwischen dem VP30- und VP24-Gen angeglichen wurde. Sternchen oberhalb der Fehlerbalken kennzeichnen die Signifikanz der Werte im Vergleich zum wt (p-Werte: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001, keine Markierung: Unterschied zum wt ist nicht signifikant; bzw. Mutanten wurden nicht getestet: dies war der Fall für $N \leq 3$). Für Details der verwendeten Tests siehe Abbildung 17, Abbildung 19. Die Negativkontrolle wurde nicht getestet. Ein Vergleich der Verlängerungsmutanten gleicher Länge und unterschiedlicher Sequenz untereinander ergab keine signifikanten Unterschiede in der ANOVA-Analyse und anschließendem Bonferroni-Test. ($p = 1$ für Mutanten IR 10nt & IR 10nt*, IR 15nt & IR 15nt*, IR 30nt & IR 30nt*).

Transkription beider Gene nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob die IR substituiert, deletiert oder verlängert wurde. Die IR ist daher für die Transkriptionsaktivität an der ersten GG nicht essentiell.

Wie die Unterschiede in der CAT-Aktivität der einzelnen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zeigen, scheint die IR jedoch für die Feinregulation der Reinitiationsfrequenz am zweiten Gen verantwortlich zu sein.

Dabei spielt die Sequenz der IR eine untergeordnete Rolle. Die teilweise oder vollständige Substitution der fünf intergenischen Nukleotide hatte keinen starken Einfluss auf die Transkription des nachfolgenden Gens.

Größere Effekte wurden dagegen bei Veränderung der IR-Länge beobachtet. So wurde ein starker Rückgang der Transkription am der IR nachfolgenden Gen durch Verlängerung der IR auf 10, 15 oder 30 Nukleotide hervorgerufen, der sich in der Menge der nachgewiesenen mRNA und in der Reporteragenaktivität abzeichnete. Längere IR von 35-50nt konnten wiederum wie im Wildtyp überlesen werden. Die vollständige Deletion der IR hatte einen Rückgang der Reporteragenaktivität des zweiten Gens um 50% zur Folge.

Alle untersuchten Substitutions-, Deletions- und Insertionsmutanten zeigten gleich bleibende Mengen oder einen Rückgang an mRNA 2 im Vergleich zum Wildtyp. Keine der eingeführten Mutationen resultierte in einer Verstärkung der mRNA 2-Menge oder CAT-Aktivität. Die Reinitiationsfrequenz für die im Wildtyp an dieser GG vorhandenen fünf intergenischen Nukleotide scheint also optimal zu sein.

4.3 Untersuchung einer Gengrenze mit einer langen intergenischen Region

4.3.1 Schwächt die intergenische Region die Transkriptionsinitiation des nachfolgenden Gens?

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die kurze IR zwischen dem NP- und VP35-Gen für die Transkription der angrenzenden Gene nicht benötigt wird, sollte untersucht werden, welche Rolle die mit 144 Nukleotiden für NNS-RNA-Viren außergewöhnlich lange IR zwischen den Genen für VP30 und VP24 für die Erkennung der benachbarten Transkriptionssignale spielt.

Für diese Untersuchungen wurden zunächst zwei Bici-Mutanten hergestellt, in denen die lange IR entweder vollständig deletiert oder aber in ihrer Länge mehr als verdoppelt wurde. Für die Verlängerung wurde die natürliche IR mittels PCR amplifiziert und in die Mitte der Wildtyp-IR inseriert. Dies ermöglichte es, die im ursprünglichen Zustand vorhandene Nukleotidkomposition beizubehalten. Das so hergestellte bicistronische Minigenom enthielt 292 intergenische Nukleotide. Beide Mutanten wurden, wie zuvor beschrieben, im rekonstruierten ZEBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem getestet. Die Analyse der Transkriptionsaktivität erfolgte für die Verlängerungsmutante mittels Northern Blot sowie im quantitativen CAT-Assay. Die Deletionsmutante wurde nur im CAT-Assay getestet. Eine Verlängerung um die mehr als doppelte IR-Länge zeigte einen starken Effekt auf die Synthese von mRNA 2 (Abbildung 21 A) sowie auf die Reporteragenaktivität, die auf 33% ($\pm 14\%$) sank (Abbildung 21 B).

Dahingegen führte eine vollständige Deletion der IR zu einem weniger drastischen Rückgang der Reinitiationsfrequenz (Abbildung 21 C). Für die Mutante ließ sich eine CAT-Aktivität von 67% ($\pm 23\%$) im Vergleich zum Wildtyp nachweisen.

In Analogie zu den Beobachtungen an der ersten GG ist demnach auch die lange IR für die Transkription des nachfolgenden Gens nicht essentiell, zeigt jedoch einen Einfluss auf die Regulation der Reinitiation.

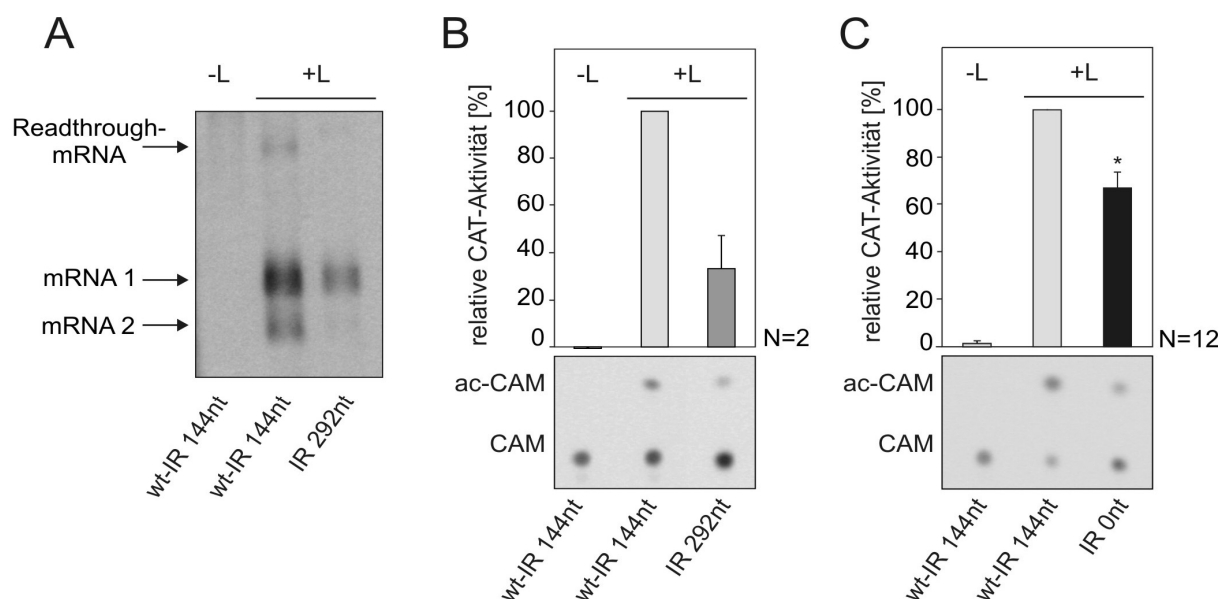


Abbildung 21 : Verlängerung und Deletion der intergenischen Region an der GG VP30/VP24

A) Northern Blot-Analyse einer Mutante mit einer 292 Nukleotiden langen intergenischen Region (IR). BSR-T7/5-Zellen wurden wie in Abbildung 15 beschrieben transfiziert und die mRNA analysiert. **B)** Quantitativer Fast CAT-Assay der Verlängerungsmutante. BSR-T7/5-Zellen wurden wie in Abbildung 16 beschrieben transfiziert. Anstelle des pGL3-control Plasmids wurde die gleiche Menge pSV40-Renilla zur Normalisierung verwendet. Dargestellt ist beispielhaft ein Ergebnis eines repräsentativen CAT-Assays sowie die quantifizierten Mittelwerte aller Versuche mit Standardfehler. **C)** Quantitativer Fast CAT-Assay der Deletionsmutante. BSR-T7/5-Zellen wurden wie in Abbildung 16 beschrieben transfiziert und im CAT-Assay analysiert. Die Darstellung entspricht der in B beschriebenen. Die Signifikanz der CAT-Aktivitäten in C wurde im Vergleich zum wt mittels ANOVA-Analyse und Games-Howell-Post-Hoc-Test ermittelt und ist im Diagramm dargestellt (p-Werte: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001). Die Negativkontrollen (-L) wurden nicht getestet (siehe Methoden). Diese Analyse wurde für B aufgrund der geringen Wiederholungszahl nicht durchgeführt.

4.3.2 Verkürzung der intergenischen Region

Da eine vollständige Deletion der langen IR sich auf die Transkription des nachfolgenden Gens weniger stark auswirkte als eine Verlängerung, sollte nun untersucht werden, welchen Effekt verkürzte IR auf die Reinitiation zeigen. Dafür wurde die IR der GG zwischen dem VP30- und VP24-Gen von der Mitte her deletiert, um die an die Transkriptionssignale direkt angrenzenden Bereiche in der Wildtypsequenz beizubehalten (Abbildung 22 A).

Wie der Test im rekonstruierten System zeigte, ließ sich bei der Mutante mit der kürzesten getesteten IR-Länge von 5 Nukleotiden eine im Vergleich zum Wildtyp gesteigerte Transkriptions-Reinitiation mit einer CAT-Aktivität von 131% ($\pm 11\%$) nachweisen. Interessanterweise war bei einer IR-Länge von 10 und 20 Nukleotiden ein deutlicher Rückgang der Reinitiationsfrequenz beobachten, der sich sowohl in der Menge an isolierter mRNA 2 als auch in der detektierten CAT-Aktivität widerspiegelte (IR 10nt: 51% $\pm 10\%$; IR 20nt: 50% $\pm 12\%$; Abbildung 22 B und C). Dieser Effekt war weniger stark ausgeprägt bei den Mutanten mit einer IR-Länge von 30 und 35 Nukleotiden, die sowohl in der mRNA-Analyse als auch im

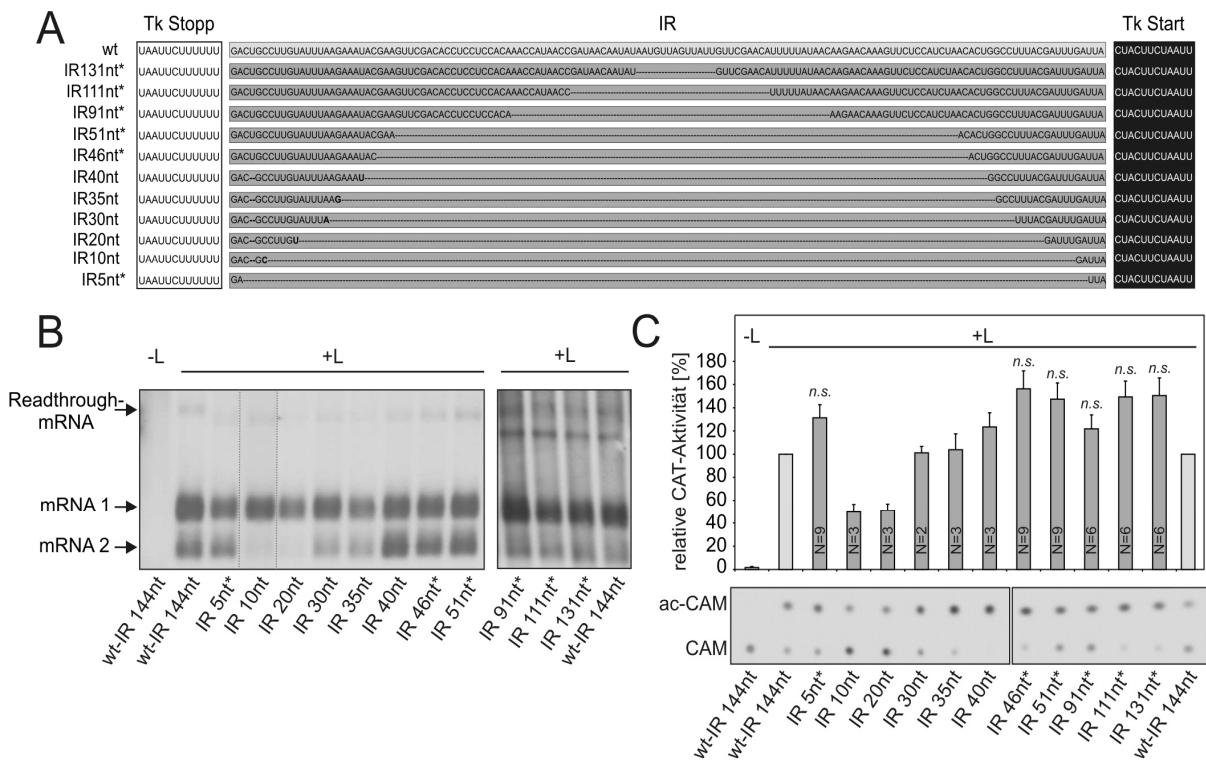


Abbildung 22 : Verkürzung der intergenischen Region an der Grenze zwischen dem VP30- und VP24-Gen
A) Darstellung der Gengrenzsequenz der untersuchten Bicis in 3'→5' Genomorientierung. In hellgrau hinterlegt ist die intergenische Region (IR) des wt, die verkürzten IR der Mutanten sind in dunkelgrau hervorgehoben. Deletierte Nucleotide wurden durch Striche ersetzt. Das in den Mutanten IR 10,20,30,35 und 40nt fehlende Nucleotid ist ebenfalls durch einen Strich gekennzeichnet. Die in diesen Mutanten fett markierten Nucleotide wurden beim Anpassen der IR an die Wildtypsequenz entfernt, um die IR-Längen beizubehalten (siehe Abbildung 23). Die Sternchen an den Namen der Mutanten kennzeichnen die Homologie mit der Sequenz der wt-IR. Die Sequenzen aller Mutanten sind im Anhang noch einmal vergrößert dargestellt. **B)** und **C)** Analyse der Bicis im ZEBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem in BSR-T7/5-Zellen. Die Durchführung erfolgte, wie in Abbildung 16 beschrieben. **B)** Northern Blot-Analyse. Zur besseren Visualisierung wurden verschiedene Belichtungszeiten des Northern Blots kombiniert, die vergleichbare Gesamt-Signalstärken zeigen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 5 unabhängigen Versuchen für Mutanten IR 5-51nt, und aus zwei Versuchen für IR 91-131nt. **C)** Bestimmung der Enzymaktivität im Fast CAT-Assay. Gezeigt sind die Ergebnisse von repräsentativen CAT-Assays und die Quantifizierung der CAT-Aktivitäten aller Versuche normalisiert auf den jeweiligen wt mit Angabe der Standardfehler. Der in hellgrauen Balken dargestellte Wildtyp ist doppelt aufgeführt. Die Signifikanz der CAT-Aktivitäten bei Wiederholungszahlen N > 3 wurde im Vergleich zum wt mittels ANOVA-Analyse und Games-Howell-Post-Hoc-Test überprüft. Es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen.

CAT-Assay eine dem Wildtyp vergleichbare oder schwächere Reinitiationsfrequenz aufwiesen (Abbildung 22). Weniger starke Verkürzungen auf 131-40 intergenische Nucleotide führten dagegen vergleichbar mit Mutante IR 5nt zu einem Ansteigen der mRNA 2-Synthese und damit zu einer erhöhten Reportergenaktivität.

Wie sich im Verlauf der Versuche herausstellte, trugen die Mutanten mit einer IR von 10, 20, 30, 35 und 40 Nucleotiden Länge aufgrund der Verwendung einer fehlerhaften Referenzsequenz eine Deletion an Position 4 der IR im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 22 A). Darum wurden diese Mutanten, mit Ausnahme des Minigenoms IR 35nt, unter Beibehaltung der IR-Länge, der Wildtypsequenz angeglichen (Abbildung 23 A) und erneut getestet (Abbildung 23 B und C).

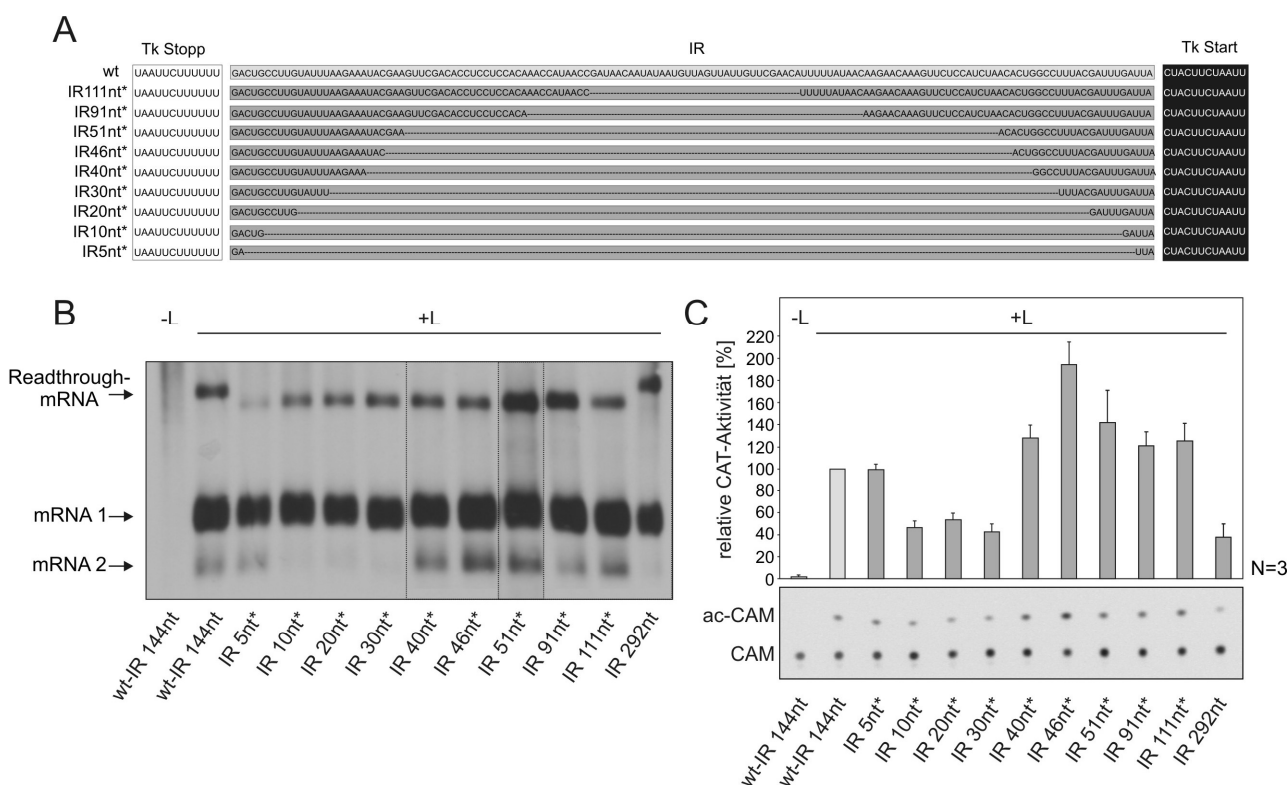


Abbildung 23 : Verkürzung der intergenischen Region an der Grenze der Gene VP30 und VP24 und Anpassung an die Wildtyp-Sequenz

A) Darstellung der Gengrenzsequenz der untersuchten Bicis in 3'→5' Genomorientierung. In hellgrau hinterlegt ist die intergenische Region (IR) des wt, die verkürzten IR sind in dunkelgrau hervorgehoben. Deletierte Nukleotide im Vergleich zum Wildtyp wurden durch Striche ersetzt. Die Sternchen an den Namen der Mutanten kennzeichnen die Homologie mit der Sequenz der wt-IR (im Gegensatz zu den Mutanten gleicher IR-Länge in Abbildung 22). Die Sequenzen aller Mutanten sind im Anhang noch einmal vergrößert dargestellt. **B)** und **C)** Analyse der Bicis im ZEBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem. Wie in Abbildung 15 beschrieben, wurden die mutierten Minigenome zusammen mit den Expressionsplasmiden für den ZEBOV-Polymerasekomplex in 70% konfluente Huh-T7-Zellen eingebracht und nach 2 d die Transkriptionsaktivität mittels Northern Blot-Analyse (B) und Bestimmung der Enzymaktivität im Fast CAT-Assay (C) wie in Abbildung 16 beschrieben untersucht. Zur besseren Visualisierung wurden in Abbildung B verschiedene Belichtungszeiten des Northern Blots kombiniert, die vergleichbare Gesamt-Signalstärken zeigen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Duplikaten geblottet wurden. C) Quantifizierung der CAT-Aktivitäten aller Versuche normalisiert auf den jeweiligen wt, sowie Darstellung der Ergebnisse eines repräsentativen CAT-Assays.

Die Anpassung der IR an die natürliche Sequenz bestätigte den drastischen Rückgang von mRNA 2 in Mutanten mit einer IR von 10 und 20 Nukleotiden Länge (Abbildung 23 B). Eine IR von 30 Nukleotiden führte hier ebenfalls zu einer abgeschwächten Reinitiationsfrequenz am nachfolgenden Gen. Die geringere Transkription des zweiten Gens dieser Mutanten spiegelt sich auch hier in einem Absinken der CAT-Aktivität auf 46% (± 6%) für IR 10nt, 54% (± 6%) für IR 20nt bzw. 42% (± 7%) für IR 30nt im Vergleich zum Wildtyp wider (Abbildung 23 C). Der beobachtete Unterschied der Mutanten IR 30nt und IR 30nt* könnte entweder auf die Sequenzunterschiede oder aber auf die geringe Wiederholungszahl der Versuche sowie den Wechsel der Zellen zurückzuführen sein und bedarf noch einer genaueren Untersuchung. Ein bicistronisches Minigenom mit 40 intergenischen Nukleotiden in der Wildtypsequenz zeigte den schon zuvor beobachteten Anstieg in der Syntheserate von mRNA 2 sowie damit übereinstimmend eine CAT-Aktivität von 128% ± 12%.

Eine differenzielle Regulation des Neustartens durch verkürzte IR an der untersuchten GG konnte somit bestätigt werden. Der geringe Einfluss der Nukleotidaustausche in den Mutanten IR 10nt*, IR 20nt* und IR 40nt* mit angepasster IR deutet auf einen primär durch die Länge vermittelten Effekt hin.

4.3.2.1 Einfluss der IR-Länge auf die Reinitiation in der Virusinfektion

Wie im vorigen Versuch gezeigt werden konnte, führten bestimmte IR-Längen zu einer gestörten Transkriptions-Reinitiation im rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystem. Das Minigenom mit einer IR-Länge von 20 Nukleotiden, das in diesem System einen starken Rückgang der mRNA 2-Menge zeigte, sollte nun in der Virusinfektion untersucht werden. Dazu wurden Huh-T7-Zellen mit dem Minigenom transfiziert und anschließend mit Ebolavirus infiziert. Die Analyse der gebildeten CAT-spezifischen mRNA erfolgte 48 h *p.i.* wie zuvor beschrieben. In der Northern Blot-Analyse zeigte die Mutante einen deutlichen Rückgang der Menge an gebildeter mRNA 2 im Vergleich zum Wildtyp-Minigenom (Abbildung 24).

Eine Hemmung der Reinitiation bei einer IR-Länge von 20nt tritt demnach auch bei Transkription der Minigenome im Kontext einer Virusinfektion auf.

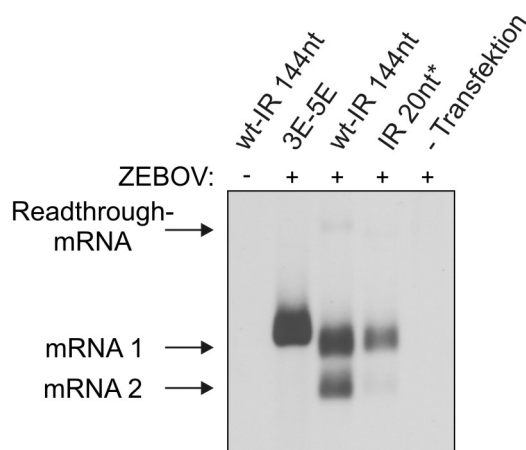


Abbildung 24 : Untersuchung eines bicistronischen Minigenoms mit einer intergenischen Region von 20 Nukleotiden in der Virusinfektion

$1,2 \times 10^5$ Huh-T7-Zellen pro Vertiefung wurden in 6er Zellkulturplatten ausgesät und nach 24 h bei einer Konfluenz von 70% mit jeweils 2 μg Bici mit der intergenischen Region (IR) des wt (wt-IR144nt) oder mit einer IR von 20 Nukleotiden (IR20nt*) und je 1 μg pCAGGS-T7 Expressionsplasmid transfiziert. Als Positivkontrolle diente das monocistronische Minigenom 3E-5E-CAT (3E-5E). 12 h später wurden die transfizierten Zellen wie angegeben mit ZEBOV infiziert (moi = 5) und das Inokulum auf den Zellen belassen. 48 h *p.i.* wurde die mRNA isoliert und die CAT-spezifischen mRNAs mittels Northern Blot-Analyse untersucht.

4.3.2.2 Einfluss der Sequenz der intergenischen Region auf die Inhibition der Reinitiation

Um zu untersuchen, ob die Sequenz der IR bei der beobachteten Hemmung der Reinitiation eine Rolle spielt, wurde die IR im bicistronischen Minigenom IR 10nt* schrittweise substituiert. So wurde erst jedes zweite, dann alle Nukleotide ausgetauscht (Abbildung 25 A). Der Test der bicistronischen Minigenome erfolgte über die Detektion der CAT-Aktivität im rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystem mit BHK-T7 Zellen. Hierbei zeigte die Mutante mit der auf 10 Nukleotide verkürzten IR einen hoch signifikanten Unterschied zum Wildtyp ($p < 0,001$). Die Substitution der IR führte weder bei teilweise noch bei vollständig ausgetauschter Sequenz zu einer Erhöhung der Reinitiationsfrequenz (Abbildung 25 B). Wie die statistische Analyse der Daten mittels ANOVA und Games-Howell Post-Hoc-Test ergab, unterschieden sich die CAT-Aktivitäten der Substitutionsmutanten nicht signifikant voneinander oder von der Ursprungsmutante (p-Werte im Vergleich zwischen IR 10nt_{mut1} und IR 10nt_{mut2}: $p = 0,993$; im Vergleich zu IR 10nt*: $p = 0,999$ für IR 10nt_{mut1}, $p = 0,527$ für IR 10nt_{mut2}). Daraus folgt, dass maßgeblich die Länge der IR von 10 Nukleotiden die Erkennung des nachfolgenden Transkriptionsstartsignals negativ beeinflusst, nicht jedoch die Sequenz.

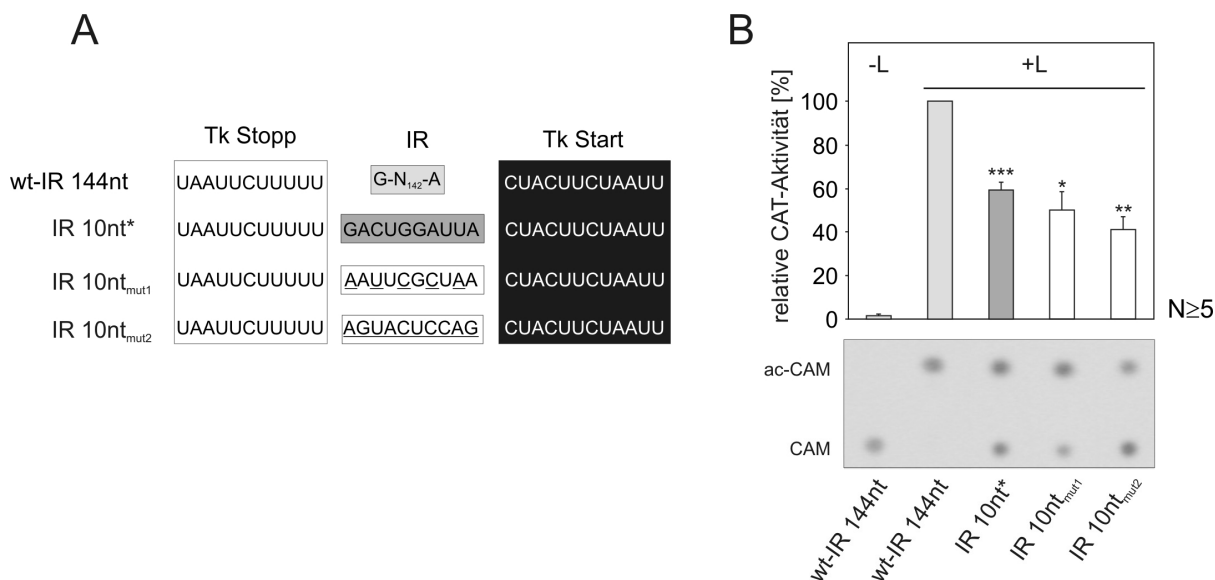


Abbildung 25 :Substitution der 10nt langen intergenischen Region im bicistronischen Minigenom
A) Darstellung der Gengrenzsequenz der untersuchten Bicis. Die intergenische Region (IR) des wt ist in hellgrau, die der IR 10nt* Mutante in dunkelgrau und die der beiden Mutanten mit substituierter Sequenz in weiß hinterlegt.
B) Ermittlung der Transkriptionsaktivität der Mutanten mittels Fast CAT-Assay. Die Durchführung erfolgte wie in Abbildung 16 beschrieben. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen CAT-Assays und die Quantifizierung der CAT-Aktivität aller Versuche normalisiert auf den jeweiligen wt. Die Signifikanz der Unterschiede in den CAT-Aktivitäten der Mutanten zum wt wurde mittels ANOVA-Analyse und Games-Howell Post-Hoc-Test ermittelt und ist im Diagramm dargestellt (p -Werte: * $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$). Die Negativkontrolle (-L) wurde nicht getestet.

4.3.3 Zusammenfassung Kapitel 4.3

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss der außergewöhnlich langen IR von 144 nt zwischen den Genen für VP30 und VP24 auf die Erkennung des angrenzenden Transkriptionsstartsignals untersucht.

Wie schon für die kurze IR zwischen den Genen für NP und VP35 beobachtet wurde, sind auch die 144 intergenischen Nukleotide in der hier untersuchten GG für die Erkennung des nachfolgenden Transkriptionsstartsignals nicht essentiell. So hatte eine vollständige Deletion nur eine geringe Auswirkung auf die Reinitiationsfrequenz (Abbildung 26, IR 0nt). Verlängerung oder Verkürzung der IR hingegen beeinflusste die Syntheserate am nachfolgenden Gen in stärkerem Maße. Eine Verlängerung der IR auf über das Doppelte der Wildtyp-Länge führte zwar immer noch zu einer Erkennung des nachfolgenden Transkriptionsstartsignals, doch war die Reinitiationsfrequenz im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert.

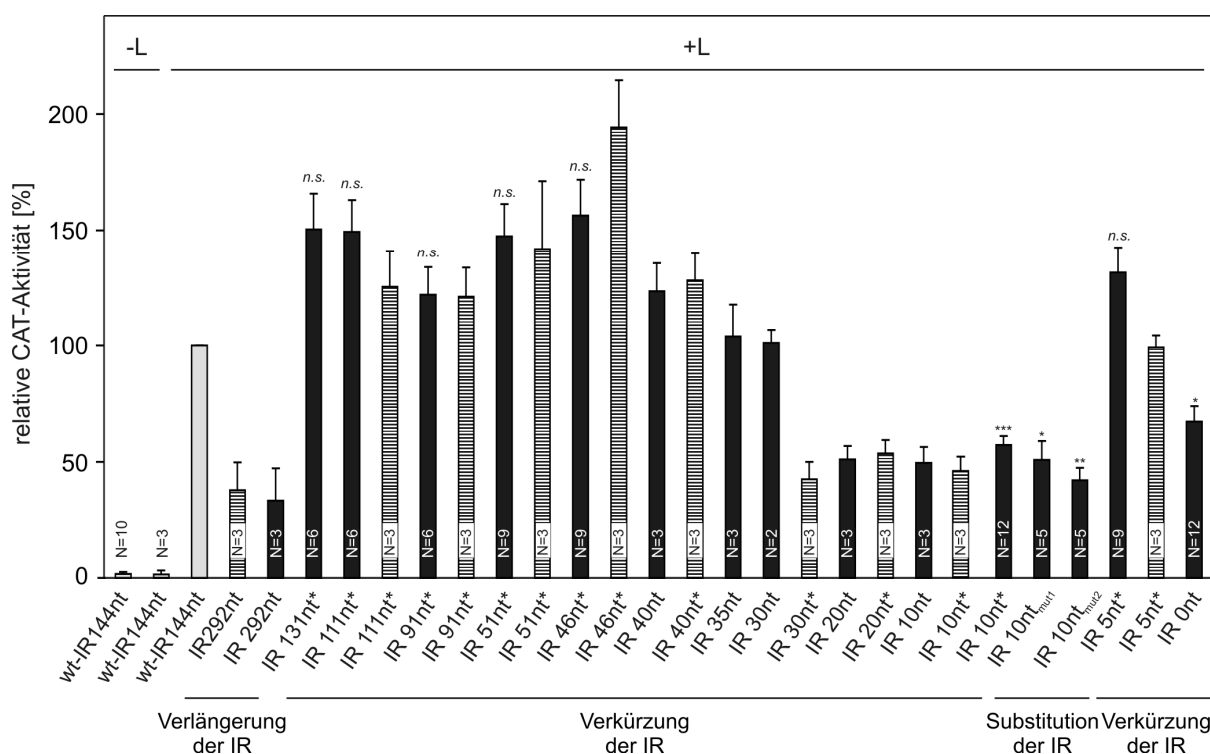


Abbildung 26 : Übersicht der CAT-Aktivitäten aller IR-Mutanten der Gengrenze zwischen fünftem und sechstem Gen

Dargestellt sind die relativen CAT-Aktivitäten bezogen auf den wt mit Angabe der Standardfehler. Mit einem Sternchen am Namen sind diejenigen Mutanten gekennzeichnet, deren intergenische Region (IR) der wt-Sequenz angeglichen wurde. Sternchen oberhalb der Fehlerbalken kennzeichnen die Signifikanz der Werte im Vergleich zum wt (p-Werte: * < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001; n.s.: Unterschied zum wt ist nicht signifikant; keine Markierung: Mutanten wurden aufgrund geringer Wiederholungszahl (N ≤ 3) nicht getestet). In den Balken ist die Wiederholungszahl der CAT-Assays angegeben. Schraffiert dargestellt sind die Mutanten, die in Huh-T7 Zellen getestet wurden; alle übrigen Versuche wurden mit BSR T7/5-Zellen durchgeführt.

Während IRs von über 40 Nukleotiden Länge zu einer im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Menge des zweiten Genprodukts führten, zeigten Mutanten mit 10 und 20 intergenischen Nukleotiden eine deutliche Inhibition der mRNA 2-Synthese. Der inhibierende Effekt der Mutante IR 30nt war nicht eindeutig nachzuweisen. Dahingegen vermittelte eine IR von 5 Nukleotiden - analog zur Grenze zwischen NP- und VP35-Gen - eine im Vergleich zu 10nt gesteigerte Syntheserate des nachfolgenden Gens (Abbildung 26, IR 5nt*). Der Inhibitionseffekt für eine 10nt lange IR, der ebenfalls bei Mutanten der GG zwischen dem NP- und VP35-Gen beobachtet werden konnte, war hoch signifikant ($p < 0,001$).

Die Ergebnisse im rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystem konnten auch in der Virusinfektion bestätigt werden. Ein Minigenom mit 20 intergenischen Nukleotiden zeigte auch bei der Transkription in virusinfizierten Zellen eine deutliche Inhibition der Reinitiationsfrequenz.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bezüglich der ersten GG ergab die Analyse von Substitutionsmutanten, dass die Sequenz der IR eine untergeordnete Rolle bei der Transkriptions-Reinitiation spielt. So war der für Mutante IR 10nt nachgewiesene hemmende Effekt auf die Transkription des zweiten Gens unabhängig von der eingefügten Sequenz zu beobachten (Abbildung 26, vgl. IR 10nt*, 10nt_{mut1}, 10nt_{mut2}).

Für einige der IR-Verkürzungsmutanten ließ sich eine deutlich stärkere Transkriptionsaktivität des zweiten Gens nachweisen als für den Wildtyp (Abbildung 26, IR 131nt*-IR40nt*). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen mit der ersten GG, bei der die Wildtyp-IR von 5 Nukleotiden eine optimale Transkriptionsreinitiation vermittelte. Das legt den Schluss nahe, dass die 144 Nukleotide lange IR zwischen fünftem und sechstem Gen eine Herabregulation der VP24-Expression vermittelt.

4.4 Transkriptionsregulation bei überlappenden Transkriptionssignalen

4.4.1 Wechselseitige Beeinflussung der Transkriptionssignale

An der GG zwischen dem zweiten und dritten Gen überlappt das Stoppsignal des VP35-Gens mit dem Startsignal des VP40-Gens über das in beiden Signalen vorhandene hoch konservierte Pentamer. An dieser GG gibt es folglich keine IR. Auch kommen die Transkriptionssignale durch die Überlappung in umgekehrter Reihenfolge zu liegen. Bei der Transkription muss der Polymerasekomplex also zuerst das Startsignal des dritten Gens überlesen, um am Stoppsignal des zweiten Gens die mRNA zu terminieren. Danach muss das stromaufwärts gelegene Transkriptionsstartsignal erkannt werden, um die Reinitiation der mRNA-Synthese einzuleiten.

Diese Form der Überlappung der Transkriptionssignale ist einzigartig für Filoviren. Es stellte sich die Frage, ob durch die Überlappung der Signale ihre Erkennung beeinflusst wird. Darum wurden bicistronische Minigenome mit dieser GG im rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystem getestet, die entweder ein mutiertes Transkriptionsstoppsignal oder ein mutiertes Transkriptionsstartsignal enthielten (siehe auch Boehmann, 2002). Wie die Analyse der gebildeten mRNA-Spezies ergab, wurde durch die Mutation des Transkriptionsstartsignals die Synthese von mRNA 2 vollständig unterbunden. Auf die Synthese der ersten mRNA und der Rd-Transkripte zeigte diese Mutation allerdings keinerlei Auswirkungen. Sie wurden in zum Wildtyp vergleichbarer Menge synthetisiert (Abbildung 27 B). Im Gegensatz dazu konnte bei Mutation des Transkriptionsstoppsignals des ersten Gens weder mRNA 1 noch mRNA 2 nachgewiesen werden. Die einzige im Northern Blot detektierte Bande lief auf der Höhe der Rd-Transkripte. Die vorläufigen Ergebnisse von Boehmann (2002) zu diesen Mutanten konnten somit bestätigt werden: ein Neustarten der Transkription ist von einer vorher erfolgten Termination abhängig. Im CAT-Assay, der aufgrund der eindeutigen Aussage nicht quantifiziert wurde, zeigte sich bei Mutation des Startsignals gar keine, bei der des Stoppsignals nur minimale CAT-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Daraus folgt, dass von den Rd-Transkripten kein funktionelles CAT-Enzym translatiert wurde.

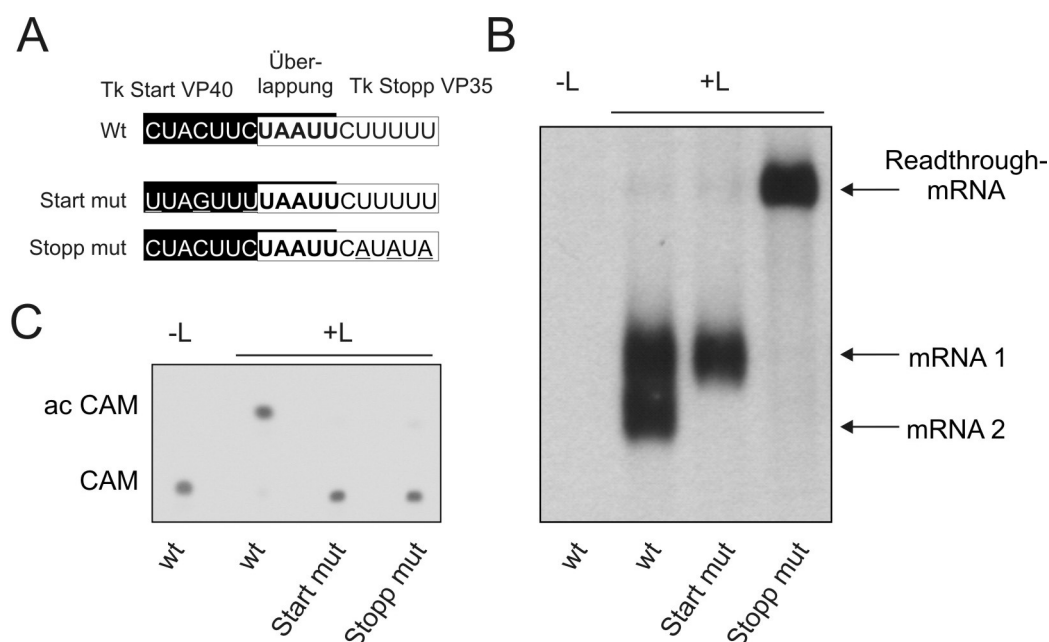


Abbildung 27 : Mutation überlappender Transkriptionssignale

A) Darstellung der GG-Sequenz der untersuchten Bicis in 3'→5' Genomorientierung. Das Tk Start ist in schwarz hinterlegt, das Tk Stopp in weiß. Das überlappende hoch konservierte Pentamer ist in fett geschrieben, substituierte Nukleotide sind unterstrichen. **B)** Northern Blot-Assay der Substitutionsmutanten. BSR T7/5-Zellen wurden wie in Abbildung 15 beschrieben transfiziert und mittels Northern Blot die CAT-mRNA analysiert. **C)** Fast-CAT-Assay. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte wie in Abbildung 16 beschrieben. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen CAT-Assays in BSR T7/5-Zellen.

4.4.2 Trennung der überlappenden Transkriptionssignale

Da die überlappenden Transkriptionssignale in umgekehrter Reihenfolge zu liegen kommen, muss die Polymerase für die Erkennung des Transkriptionsstartsignals auf der Matrize stromaufwärts zurückwandern. Dazu wurde untersucht, wie weit die überlappenden Signale voneinander getrennt werden können, ohne ihre Erkennung zu beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden mutierte Minigenome hergestellt und getestet, in denen das Transkriptionsstartsignal um 8-39 Nukleotide nach stromaufwärts verschoben war (Abbildung 28 A).

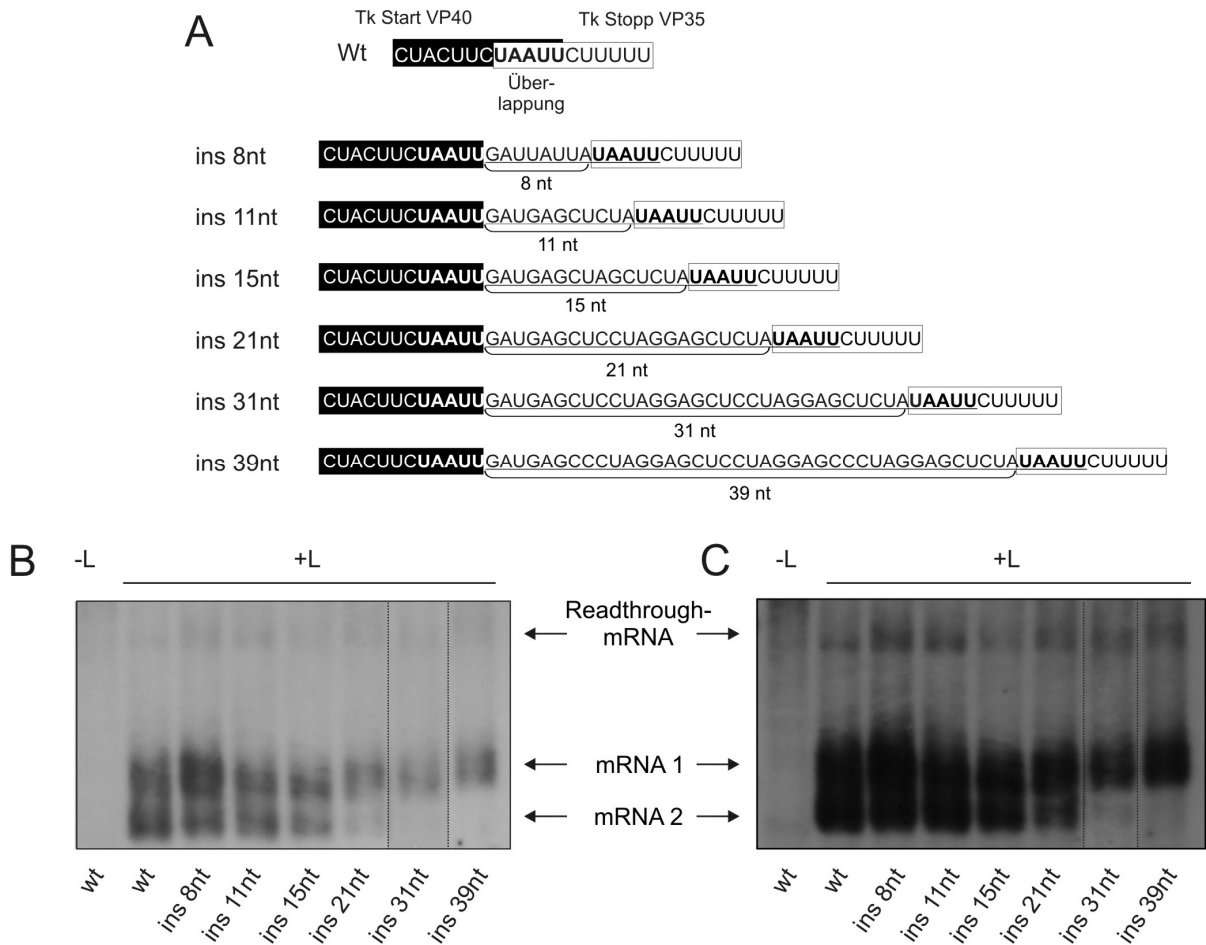


Abbildung 28 : Trennung der überlappenden Transkriptionssignale

A) Darstellung der GG-Sequenz der untersuchten Bicis in 3'→5' Genomorientierung. Das Tk Start ist in schwarz hinterlegt, das Tk Stopp in weiß. Das im Wildtyp überlappende hoch konservierte Pentamer ist in fett geschrieben, inserierte Nukleotide sind unterstrichen. Um nach der Trennung der Tk Signale ein vollständiges Tk Stopp zu generieren, musste die im Wildtyp überlappende Pentamersequenz ebenfalls inseriert werden. **B)** und **C)** Northern Blot-Assay zur Analyse der mRNA der Substitutionsmutanten. BSR T7/5-Zellen wurden wie in Abbildung 15 beschrieben transfiziert und mittels Northern Blot die CAT-mRNA analysiert. **B)** Expositionszeit 40 min; **C)** Expositionszeit: 3 h. Die Spur des Blots, die die Mutante mit 31 inserierten Nukleotiden zeigt (ins 31nt), wurde von längeren Belichtungszeiten eingefügt, um ähnliche Signalstärken nebeneinander stellen zu können.

Wie die Analyse der gebildeten mRNA nach dem Test im Replikations- und Transkriptionssystem zeigt (Abbildung 28 B), ließ sich mRNA 2 noch in zum Wildtyp vergleichbarer Menge nachweisen, wenn die Transkriptionssignale um 15 Nukleotide getrennten waren. Erst bei einem Abstand von 21 Nukleotiden zwischen Start- und Stoppsignal wurde mRNA 2 in geringerem Maße gebildet. Bei einer Trennung um 31 Nukleotide konnte die zweite mRNA-Spezies nur noch nach sehr langer Belichtungszeit schwach detektiert werden (Abbildung 28 C). Eine Insertion von 39 Nukleotiden führte schließlich zu nicht mehr nachweisbaren Mengen an mRNA 2.

4.4.3 Zusammenfassung Kapitel 4.4

In diesem Kapitel wurde die für Filoviren einzigartige Überlappung von GGs genauer untersucht, bei denen das Transkriptionsstoppsignal des vorangehenden Gens direkt mit dem Transkriptionsstartsignal des Nachfolgegens überlappt.

Wie durch Mutationsanalyse der beiden Transkriptionssignale gezeigt werden konnte, war eine Erkennung des funktionellen Startsignals nicht mehr möglich, wenn das Stoppsignal durch Mutationen zerstört worden war. Somit ist die korrekte Termination am Transkriptionsstoppsignal der GG essentiell für eine Reinitiation am überlappenden Transkriptionsstartsignal.

Lag jedoch ein inaktives Startsignal vor, so konnte die Transkription an diesem nicht reinitiiert werden, die Termination am überlappenden Stoppsignal blieb jedoch unbeeinflusst.

Die Untersuchung von Insertionsmutanten an dieser GG ergab, dass die überlappenden Transkriptionssignale auch dann erkannt werden, wenn sie in umgekehrter Reihenfolge voneinander separiert vorliegen. Das Verschieben des Transkriptionsstartsignals stromaufwärts zeigte bei kurzen Insertionen gar keinen Effekt und führte erst nach Einfügen von 31 Nukleotiden zu einem drastischen Rückgang der mRNA 2-Menge. Demnach kann die virale Polymerase entgegen ihrer Leserichtung die Matrize nach einem stromaufwärts gelegenen Startsignal scannen.

5 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Gengrenzen (GGs) für die Regulation der Transkription bei ZEBOV untersucht. Anhand der Analyse von drei verschiedenen Gengrenzstrukturen konnten grundlegende Erkenntnisse zum Ablauf der viralen Transkription gewonnen werden. Überraschenderweise zeigte sich, dass weder die 5nt umfassende kurze, noch die 144nt umfassende lange intergenische Region (IR), für die Transkription angrenzender Gene essentiell ist. Gleichwohl legen die gewonnenen Ergebnisse nahe, dass die IR für eine Regulation der Reinitiationseffizienz am nachfolgenden Transkriptionsstartsignal von Bedeutung ist. Wie sowohl für kurze als auch für lange IRs nachgewiesen wurde, wird diese Regulation hauptsächlich über die Länge und nicht die Sequenz der IR vermittelt.

Die Untersuchung einer überlappenden GG bestätigte, dass das Stoppen und anschließende Neustarten der mRNA-Synthese in ZEBOV funktionell miteinander verknüpft sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die virale Polymerase nach der Termination einer mRNA die RNA-Matrize sowohl stromabwärts als auch stromaufwärts des Terminationssignals nach einem funktionalen Transkriptionsstartsignal scannen kann.

Wie schon bei der Analyse der filoviralen Replikationspromotoren deutlich wurde, finden sich auch im Bereich der über *cis*-aktive Elemente vermittelten Transkriptionsregulation Besonderheiten, die die Filoviren von den übrigen nicht segmentierten negativ-strängigen RNA-Viren unterscheiden.

5.1 Die intergenische Region

5.1.1 Die intergenische Region ist für die Transkription in *Zaire Ebolavirus* nicht essentiell

Die Regulation der mRNA-Reinitiation an den GGs von nicht segmentierten Negativstrang-RNA-Viren ist bislang nur sehr lückenhaft verstanden. Die bisherigen Erkenntnisse deuten auf eine allen Viren dieser Gruppe gemeinsame Transkriptionsstrategie hin, die jedoch beträchtliche virusspezifische Unterschiede aufweist. Diese Unterschiede betreffen u.a. die Struktur der GGs. Während die Transkriptionsregulation über *cis*-aktive Signale bei vielen anderen nicht segmentierten Negativstrang-RNA-Viren bereits gut untersucht ist, lagen für Filoviren am Beginn dieser Arbeit nur wenige Erkenntnisse vor. Die Unterschiede in der

Struktur der GGs im Vergleich zu den am besten untersuchten Prototypviren, dem Rhabdovirus vesikuläres Stomatitis-Virus (VSV) und dem Paramyxovirus Sendaivirus (SeV), ließen jedoch auch grundlegende Unterschiede in den Regulationsmechanismen vermuten.

Die nicht segmentierten Negativstrang-RNA-Viren können bezüglich der Struktur ihrer GGs grundsätzlich in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Entweder sind die IR kurz (2-3 Nukleotide) und hoch konserviert, wie für das Rhabdovirus VSV, sowie die Paramyxoviren SeV, Hendra-, Nipah-, Masern-Virus, Humanes Parainfluenzavirus 3 (HPIV3) und Rinderpestvirus, oder sie variieren stark in ihrer Länge und Sequenz (Abbildung 29). Filoviren besitzen IRs, die der letzteren Gruppe angehören, ebenso wie das Pneumovirus Humanes Humanes respiratorisches Syncytial-Virus (HRSV), das Rhabdovirus Rabies-Virus und die *Paramyxovirinae* Mumps Virus, Newcastle Disease Virus (NDV) und Simian Virus 5 (SV 5).

Familie	Unterfamilie	Genus	Spezies:	Tk-Stopp (3'→5')	IR (3'→5')	Tk-Start (3'→5')
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	SeV	nAUUCU ₅	Gaa	UCCCanUU
		<i>Morbillivirus</i>	MeV	AuuuuU ₄	Gaa	UCCcnggU
		<i>Henipavirus</i>	NiV	AAuUcU _{5,6}	GAA	UCCUngGU
		<i>Rubulavirus</i>	SV5	aauuCU ₄₋₇	1-22nt	UcCgggCa
		<i>Avulavirus</i>	NDV	AnUCU ₆₋₇	1-48nt	UGCCCAUCnUn
	<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	HRSV	UCAAUn ₁₋₄ U ₄₋₇	1-56nt	CCCcGUUUa _{1,2}
<i>Rhabdoviridae</i>		<i>Vesiculovirus</i>	VSV _{Indiana}	AUACU ₇	gA	UUGUCnnUAG
		<i>Vesiculovirus</i>	VSV _{New Jersey}	AUACU ₇	GA (zwischen 1.-4. Gen)	UUGUCnnUAG
					GACCUUAUCUUCGUAUUGAGG (zwischen 4. und 5. Gen)	
		<i>Lyssavirus</i>	RV	G(c/t)aCU ₇	2-29nt	UUGUggGA
<i>Filoviridae</i>		<i>Marburgvirus</i>	MARV	UaAUUCU ₅	4-97nt	CUuCuUgUAAUU
		<i>Ebolavirus</i>	ZEBOV	UAAUucU _{5,6}	4-144nt	CUaCUUCUAAUU

Abbildung 29 : Vergleich der Transkriptionssignale sowie intergenischen Regionen verschiedener nicht-segmentierter negativ-strängiger RNA Viren.

Die Sequenzen sind in in vRNA-Orientierung dargestellt. Hochkonservierte Nukleotide sind als Großbuchstaben aufgeführt, solche, die am häufigsten auftreten (drei von sechs GGs oder mehr) sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Die Sequenzen von SeV (Sendaivirus), MeV (Masernvirus), Nipah-Virus (NiV) und SV 5 (Simian Virus 5) wurden entnommen aus Lamb und Parks (2007). Die Sequenz der HRSV-(humanes respiratorisches Syncytial-Virus) spezifischen GG stellt einen Konsensus dar und wurde aus Moudy et al. (2003) entnommen. Die GG des NDV (Newcastle Disease Virus) stammt aus Galinski und Wechsler (1991). Die Sequenz der VSV_{Indiana} (vesikuläres Stomatitis-Virus, Subtyp Indiana)-Gengrenzregion stammt aus Hinzman et al. (2002), die des VSV_{New Jersey} (vesikuläres Stomatitis-Virus, Subtyp New Jersey) aus Stillman und Whitt (1998) und die von RV (Rabies-Virus) aus Finke et al. (2000). MARV- (Marburg-Virus) und ZEBOV-spezifische Signalsequenzen basieren auf: Feldmann et al., 1992; Mühlberger et al., 1992; Sanchez et al., 1993.

Für Viren der ersten Gruppe finden sich hauptsächlich IRs mit der Konsensussequenz in viraler Genomorientierung von 3' GA 5', bzw. 3' GAA 5' (Whelan et al., 2004). Dagegen zei-

gen Viren mit variabler IR keine Konsensussequenz mit Ausnahme eines gehäuft vorkommenden Adenosins am 5'-Ende (bei ZEBOV in drei der vier IRs). Auch die Längen der IR sind hoch variabel (von 1 bis 144nt). Die bei den Filoviren enthaltenen langen IRs von 97 (MARV) bis 144 (ZEBOV) Nukleotiden Länge sind für diese Familie charakteristisch.

Für Viren mit kurzen, hoch konservierten IR konnte gezeigt werden, dass sie für die Transkription der angrenzenden Gene eine essentielle Rolle spielen.

Wurde beispielsweise in VSV die IR deletiert, führte dies zu einem vollständigen Verlust der mRNA-Synthese des stromabwärts gelegenen Gens und zu einer starken Beeinträchtigung der Termination am vorangehenden Gen (Barr et al., 1997). Dahingegen tolerierte das Pneumovirus HRSV mit hoch variablen IR deren Fehlen deutlich besser. Für den Subtyp A2 von HRSV, der IR von 1-52 Nukleotiden Länge enthält, konnte in bicistronischen Minigenomen gezeigt werden, dass das vollständige Deletieren der IR keinen Effekt auf die Synthese des ersten Gens hatte und eine nur auf 70% reduzierte Aktivität des stromabwärts gelegenen Gens hervorrief (Kuo et al., 1996). Es gibt jedoch auch Viren mit variablen IR, die für die Expression der angrenzenden Gene essentiell sind. Eine deletierte IR führte im Fall des Rhabdovirus Rabies-Virus zu einem vollständigen Verlust der Reinitiation (Finke und Conzelmann, 1997).

Um eine Einordnung der von Filoviren genutzten Transkriptionsstrategie innerhalb der *Mono-negavirales* vornehmen zu können, wurden die IR in bicistronischen Minigenomen der GGs zwischen NP- und VP35-Gen (IR 5nt) und zwischen VP30- und VP24- Gen (IR 144nt) zunächst deletiert. Hierbei ließen sich sehr ähnliche Resultate wie für HRSV beobachten. Weder eine kurze, noch die sehr lange IR waren für die mRNA-Synthese der angrenzenden Gene von essentieller Bedeutung. Die drei bei Transkription des Wildtyps gebildeten mRNA-Spezies (mRNA 1, mRNA 2, Rd-mRNA) konnten auch bei Fehlen der IR der ersten GG nachgewiesen werden. Allerdings zeigte eine quantitative Analyse der gebildeten Reporterproteinmenge, dass die Expression des zweiten Gens um die Hälfte herabgesetzt war. Für die lange IR betrug die Reinitiationsfrequenz nach Deletion der IR am nachfolgenden Genstart noch 2/3 der Wildtypaktivität. Obwohl diese Mutante nicht auf die gebildeten mRNA-Mengen untersucht werden konnte, lässt die nachgewiesene Aktivität des zweiten Genprodukts darauf schließen, dass das Fehlen der IR auch hier nicht zu einem Verlust der Expression des ersten Gens führte. Dies beruht darauf, dass das zweite Gen nur dann transkribiert wird, wenn die Transkription des ersten Gens korrekt terminiert wurde (siehe 5.5).

Die dargestellten Ergebnisse stehen nur teilweise in Einklang mit kürzlich veröffentlichten Untersuchungen zu GGs in ZEBOV-spezifischen bicistronischen Minigenomen (Neumann et

al., 2009). Diese enthielten im Gegensatz zu den hier verwendeten Minigenomen nicht kurze Teile, sondern vollständige 3' und 5' untranslatierte Regionen (UTR) der die GGs flankierenden Gene. Die erste Transkriptionseinheit enthielt ein Luziferasegen zur Überprüfung der Genexpression. Die zweite Transkriptionseinheit wurde in Übereinstimmung mit den hier gezeigten bicistronischen Minigenomen mittels eines CAT Gens überprüft. Die Aktivität der Minigenome wurde ausschließlich über Reporteragenassays untersucht. Die Autoren zeigten, dass die Expression des ersten Gens bei Deletion der IR an der GG NP/VP35 im Vergleich zum Wildtyp gleich blieb (Luziferase-Aktivität) und die Expression des zweiten Gens auf 82% herabgesetzt war (CAT-Aktivität). Dies stimmt mit den hier dargestellten Ergebnissen unter Berücksichtigung experimenteller Unterschiede überein. Dagegen sank bei IR-Deletionsmutanten der GG VP30/VP24 bereits die nachgewiesene Aktivität des ersten Gens drastisch auf 5% des Wildtypniveaus. Die CAT-Aktivität am nachfolgenden Gen war auf 3% reduziert. Die starke Diskrepanz der Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen auf die Expression der angrenzenden Gene bei einer Deletion der 144 Nukleotide langen IR (Aktivität des zweiten Gens: 3% vs. 70%) könnte auf methodische Unterschiede bei der Analyse der Genexpression zurückzuführen sein. Obwohl auch in der hier vorliegenden Arbeit die gebildeten mRNAs der Deletionsmutante bisher nicht im Northern Blot untersucht wurden, lassen die konsistenten Ergebnisse der übrigen Verkürzungsmutanten dieser IR darauf schließen, dass die Menge an erster mRNA nicht wesentlich durch die Mutation der IR beeinflusst wird. Auch die in beiden Untersuchungen gleich bleibende Menge der ersten mRNA/bzw. der Luziferaseaktivität in der IR-Deletionsmutante von GG NP/VP35 deutet darauf hin, dass die Deletion der IR einen geringen Effekt auf die Expression des vorangehenden Gens hat. Neumann et al. (2009) normalisierten die transfizierten Ansätze vor der Durchführung von Reporteragenassays auf die jeweilige Gesamtproteinmenge. Stark schwankende Transfektionseffizienzen in den einzelnen Proben ließen sich somit nicht korrigieren. Es wäre auch möglich, dass die Mutante einen Replikationsdefekt zeigt und mangels Matrize auch schlechter transkribiert würde. So zeigen die Autoren keine Daten, die belegen, dass die transkriptionsdefiziente Mutante noch replikationsaktiv ist. Weitere Tests dieses Minigenoms im Northern Blot Assay müssten zeigen, ob es sich bei der von Neumann et al. (2009) beobachteten stark reduzierten Expression des ersten Gens um ein Artefakt oder eine tatsächliche Regulation aufgrund der deletierten IR handelt.

5.1.2 Einfluss der Sequenz der intergenischen Region auf die Reinitiation

Die Ergebnisse für die Deletionsmutanten legten einen regulatorischen Einfluss der IR auf die Erkennung des nachfolgenden Transkriptionsstartsignals in Filoviren nahe. So konnten direkt aufeinander folgende Transkriptionssignale zwar erkannt werden, dennoch ließ sich ein reduziertes Neustarten beobachten.

Zunächst wurde der Einfluss der IR-Sequenz auf die Reinitiation überprüft. Die Sequenz der IR ist innerhalb des ZEBOV-Genoms sowie im Vergleich der Genome verschiedener Filoviren hoch variabel und es ließen sich bislang keine konservierten Motive identifizieren (Abbildung 30). Die meisten IR sind A/U-reich, was allerdings für Filovirusgenome ein allgemeines Charakteristikum darstellt (Sanchez et al., 1993).

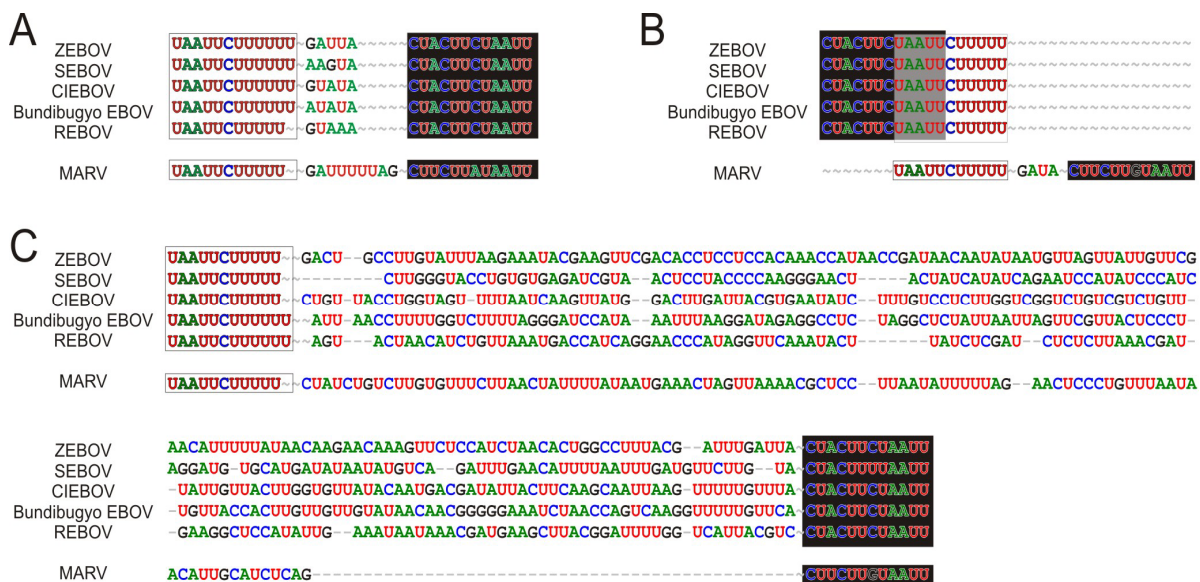


Abbildung 30 : Sequenzvergleich der untersuchten GGs in verschiedenen Filoviren.

A) GG NP/VP35 **B)** GG VP35/VP40 **C)** Vergleich der GG mit langer IR: GG VP30/VP24 für EBOV-Spezies, GG GP/VP30 für MARV. Das Alignment für die höchsten Sequenzübereinstimmungen der langen IR wurde mit ClustalW unter Standardeinstellungen durchgeführt. Alle Sequenzvergleiche wurden mit Bioedit editiert. Die Startsignale sind in schwarz und überlappende Sequenzbereiche in grau hinterlegt. Die Stoppsignale sind umrahmt. NCBI-Nummern: ZEBOV: NP_002549.1, SEBOV: NC_006432.1, CIEBOV: FJ_217162.1, Bundibugyo EBOV: FJ_217161.1, REBOV: NC_004161.1, MARV: NC_001608.2.

Wie die Analyse verschiedener Substitutionsmutanten der ersten GG ergab, spielt die IR-Sequenz für das Neustarten am nachfolgenden Gen für ZEBOV keine Rolle. Weder eine teilweise noch die vollständige Substitution der IR in der GG NP/VP35 konnte die nachgewiesenen mRNA-Mengen im Vergleich zum Wildtyp deutlich beeinflussen.

Daraus folgt, dass die IR in ZEBOV keine spezifischen Signale für Termination oder Reinitiation der mRNA-Synthese angrenzender Gene zu enthalten scheinen. Dieses Ergebnis

steht im Einklang mit Untersuchungen an klinischen HRSV-Isolaten (Moudy et al., 2004). Sequenzvariationen in den IR zeigten hier keinen Effekt auf die Reinitiation des nachfolgenden Gens. Auch für die in der Sequenz unterschiedlichen IR des HRSV-Wildtypgenoms ließen sich im Vergleich keinerlei Unterschiede in der Reinitiationsfrequenz beobachten. Dieses Ergebnis konnte auch für Rabies-Virus gezeigt werden. (Finke et al., 2000).

Im Gegensatz dazu spielt bei Viren mit konservierter IR deren Sequenz eine erheblich größere Rolle für die Reinitiation am Nachfolgenden. In mit Masern-Virus infizierten Zellen konnte ein zehnfacher Unterschied der H- im Vergleich zur L-mRNA Menge beobachtet werden, der auf die von der Konsensussequenz abweichende drei Nukleotide lange IR zurückgeführt wurde (Cattaneo et al., 1987). In VSV wurde experimentell bestätigt, dass die konservierte Sequenz der IR für Termination und Reinitiation wichtig ist. Ihr kommt in diesen Viren auch die Aufgabe zu, eine sequenzspezifische Trennung zwischen dem an der GG gelegenen Transkriptionsstoppsignal und dem nachfolgenden Transkriptionsstartsignal herzustellen. Da das Stoppsignal, wie bei allen NNS RNA Viren, mit einer Uracilabfolge endet und das Startsignal von VSV mit der Sequenz 3' UUGUC 5' beginnt, führten vor allem Mutationen der Wildtyp 3' GA 5'-Sequenz zu einer Inhibition der Reinitiation, die entweder beide oder das zweite intergenische Nukleotid zu einem U substituierten. Im ersten Fall konnte die RdRp Stopp- und Startsignal wegen der fehlenden GA-Sequenz nicht mehr voneinander unterscheiden und so die Neusynthese nicht beginnen. Bei einem zusätzlichen Uracil, das direkt vor dem Startsignal zu liegen kam, wurde letzteres für die Polymerase maskiert und die Initiationsfrequenz sank ebenfalls stark ab (Barr et al., 1997; Stillman und Whitt, 1997).

Zusätzlich zu Sequenzvariationen bestätigen Daten für gleichzeitige Längen- und Sequenzänderungen der IR die genannten Effekte für VSV. So konnte eine inhibierte Reinitiation durch Verkürzung der IR auf ein intergenisches Nukleotid durch die Wahl des Nukleotids weiter verstärkt werden. Ebenso konnte bei verlängerten IRs der Sequenz ein stärkerer Einfluss zugeschrieben werden als der inserierten IR-Länge (Barr et al., 1997; Stillman und Whitt, 1998). Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der sequenzvariierten Verkürzungsmutanten in ZEBOV. Der für eine Mutante mit 10 intergenischen Nukleotiden beobachtete hemmende Effekt auf das Neustarten in den Minigenomen VP30/VP24 und NP/VP35 erwies sich als unabhängig von der eingefügten Sequenz. Es ist jedoch nicht vollständig auszuschließen, dass die Sequenz die Reinitiation dennoch beeinflusst. So wurde für VSV gezeigt, dass bestimmte Substitutionen in der IR toleriert wurden (Stillman und Whitt, 1998).

Auswirkungen der IR-Sequenz auf ein Neustarten am nachfolgenden Gen konnten auch für G/C-reiche IR in HRSV gezeigt werden (Kuo et al., 1996). Diese Beobachtung wurde dahingehend interpretiert, dass die Sequenzkomposition der IR das Scanning der

Polymerase nach einem funktionellen Transkriptionsstartsignal beeinflussen kann. In dieser Vorstellung bewegt sich die RdRp über das Ausbilden elektrostatischer Interaktionen zwischen Polymerase und Matrize über die RNA, bis sie auf ein Startsignal trifft, das ein Stoppen und Ausrichten induziert. Über die Ausbildung stärkerer Wasserstoffbrückenbindungen würden G/C-reiche IRs ein Scanning behindern, während A/U-reiche einen förderlichen Effekt hätten und ein Überlesen der IR erleichtern würden (Cowton et al., 2006). Tatsächlich konnten auch Rassa und Parks (1999) bei Substitution der 22 Nukleotide langen IR zwischen dem M- und F-Gen im Rubulavirus SV 5 beobachten, dass eine artifizielle C-reiche IR die Reinitiation am nachfolgenden Gen in bicistronischen Minigenomen reduzierte. Ein Zusammenhang zwischen G/C-Gehalt und Reinitiationsfrequenz konnte für die hier untersuchten ZEBOV-IRs jedoch nicht bestätigt werden. So wurde der G/C-Gehalt der Wildtyp-IR zwischen NP- und VP35-Gen in den Substitutionsmutanten von 20% auf 80% gesteigert, ohne dass die Reinitiation reduziert wurde. Auch in den Minigenommutanten mit 10 oder 20 intergenischen Nukleotiden, die eine inhibierte Reinitiationsfrequenz zeigten, war der G/C-Gehalt gegenüber der Wildtypsituation oder im Vergleich zu Mutanten, die zu einer gesteigerten Genexpression des nachfolgenden Gens führten, nicht stark verändert. Zudem wurden für die Verlängerungs- und Verkürzungsmutanten die Sequenz der natürlich im Virusgenom vorkommenden IRs verwendet, bzw. aufrechterhalten. Ein Sequenzeffekt als Erklärung für die beobachtete Hemmung der Reinitiationsfrequenz ist daher unwahrscheinlich.

5.1.3 Einfluss der Länge der intergenischen Region auf die Reinitiation

Da die Ergebnisse für die Substitutionsmutanten auf eine untergeordnete Rolle der IR-Sequenz für die Genexpression des nachfolgenden Gens hindeuteten, wurde der Einfluss der IR-Länge genauer analysiert.

Hinweise auf einen Einfluss der IR-Länge für die Reinitiation gaben Vergleiche der Transkriptionsaktivitäten in den drei untersuchten GGs unterschiedlicher Struktur. Dabei wies die GG mit der 144 Nukleotide langen IR eine geringere Syntheserate des stromabwärts gelegenen Gens auf, als das für eine Grenze mit überlappenden Transkriptionssignalen oder einer kurzen IR der Fall war. Eine lange IR schien also die Reinitiation am nachfolgenden Startsignal zu reduzieren.

Dieses Ergebnis stimmt mit den von Neumann et al. (2009) erhaltenen nicht überein. Hier wurden Minigenome mit den unterschiedlichen Wildtyp-GGs im Reporterassay verglichen,

die die jeweils vollständigen UTRs der angrenzenden Gene enthielten. Wie die Autoren zeigten, hatten diese Regionen einen starken Einfluss auf die untersuchten Reporter-genaktivitäten. Aufgrund dieser und weiterer methodischer Unterschiede bei der Untersuchung der Aktivität der Minigenome (unterschiedliche Normalisierung, keine mRNA-Analyse) ist es problematisch, die erhobenen Daten mit den hier gezeigten zu vergleichen.

In der vorliegenden Arbeit weisen die konsistenten Ergebnisse mit Mutanten der gleichen IR-Länge in verschiedenen Minigenomen auf einen hier eher geringen Einfluss der verkürzten UTRs hin.

Eine Verlängerung der 144 Nukleotide langen IR in dem bicistronischen Minigenom VP30/VP24 auf mehr als die doppelte Länge (IR 292nt) wurde von der filoviralen Polymerase toleriert; allerdings kam es zu einer deutlichen Reduktion in der mRNA 2-Menge (um 70%). Grundsätzlich könnten folgende Hypothesen die verringerte Synthese der mRNA 2 in der Mutante IR 292nt erklären:

(I) Die Polymerase scannt die komplette verlängerte IR und ist aufgrund des nicht mit RNA-Synthese verbundenen Entlanggleitens auf der Matrize weniger prozessiv, was zu einer gesteigerten Dissoziationsrate führt.

(II) Die Polymerase beginnt innerhalb der verlängerten IR an suboptimalen Transkriptionsstartsignalen die mRNA-Synthese und initiiert aus diesem Grund weniger häufig am eigentlichen Startsignal.

Für VSV konnte dieses Starten an nicht optimalen Transkriptionsstartsignalen in verlängerten IRs gezeigt werden, doch wurden die suboptimale Startsignale nur in geringem Ausmaß genutzt und konnten die beobachteten Attenuierungseffekte bei verlängerten IRs nicht vollständig erklären (Stillman und Whitt, 1998; Hinzman et al., 2002; Barr et al., 2008). Da suboptimale Transkriptionsstartsignale vermutlich keine korrekte Prozessierung des 5' Endes der mRNA vermitteln (Stillman und Whitt, 1997), wären die gebildeten mRNAs instabil und zudem in dem hier gezeigten Fall über Isolierung mittels oligo-dT-Cellulose wahrscheinlich nicht nachweisbar. So wird für VSV diskutiert, dass Capping und Polyadenylierung funktionell miteinander verküpft sind (Stillman und Whitt, 1997; Li et al., 2009).

Bezüglich der Hypothese I, des häufigeren Abfallens der RdRp verursacht durch geringere Prozessivität, wurde für VSV- und SeV-Minigenome mit schrittweise verlängerten IRs nachgewiesen, dass die Fähigkeit der RdRp, ein nachfolgendes Transkriptionsstartsignal zu erkennen, hier umgekehrt proportional zur IR Länge war (Barr et al., 2008, Plattet et al., 2007). Auch bei Rabies-Virus korrelierten die variierenden IR-Längen im Wildtyp mit der Reinitiationsfrequenz (Finke et al., 2000).

Im Unterschied zu VSV und SeV ließ sich ein solcher Zusammenhang bei Verkürzung der langen oder Verlängerung der im Wildtyp nur fünf Nukleotide umfassenden IR in ZEBOV nicht zeigen. Eine Korrelation der IR-Länge mit der Reinitiationsfrequenz ließ sich weder im einen noch im anderen Fall beobachten.

Interessanterweise wurden jedoch bestimmte IR-Längen von der filoviralen Polymerase weniger gut toleriert als andere. So ergaben die Versuche mit den unterschiedlichen GGs übereinstimmend, dass eine IR von 10 bis vermutlich 30 Nukleotiden zu einer starken Inhibition der Reinitiation am nachfolgenden Gen im Vergleich zum Wildtyp führte. Dahingegen war die Reinitiationsfrequenz bei einer IR von 5 Nukleotiden, was der ersten GG im ZEBOV-Genom entspricht, im Vergleich wieder deutlich erhöht. Der Rückgang des Neustartens im Vergleich von IR 5nt zu IR 10nt lag für beide GGs konsistent bei 70-80%. Dies deutet darauf hin, dass die Reinitiation in beiden GGs unabhängig von den unterschiedlichen Stoppsignalen (3' UAAUUCUUUUU 5', bzw. 3' UAAUUCUUUUU 5') und weiteren umgebenden Nukleotiden reguliert wurde. Erstaunlicherweise wurde bei IRs, die länger als 30 Nukleotide waren, das nachfolgende Gen wieder stärker transkribiert.

Damit unterscheidet sich ZEBOV nicht nur von den oben genannten Viren, sondern auch von dem in der Struktur der GGs ähnlichen HRSV. Für dieses konnte gezeigt werden, dass die Länge der IR wenig Einfluss auf die Reinitiationsfrequenz der viralen Polymerase hat. Eine Reinitiation an kurzen IRs war nur geringfügig effizienter als an im Wildtyp vorhandenen IRs mit 43, 46 oder 52 Nukleotiden (Kuo et al., 1996). Auch eine auf 160 Nukleotide verlängerte IR führte nicht zu detektierbaren Unterschieden in den nachgewiesenen mRNA-Mengen (Bukreyev et al., 2000). Allerdings wurden in dieser Studie nur die Effekte auf die Transkription stromabwärts gelegener Gene quantitativ untersucht, was eine Bewertung der Reinitiationsfrequenz erschwert.

Wie ein Test der VP30/VP24-Minigenommutante mit 20 intergenischen Nukleotiden in virusinfizierten Zellen zeigte, war die beobachtete Inhibition der mRNA 2-Synthese kein Artefakt des rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystems, sondern konnte auch unter Infektionsbedingungen nachgewiesen werden. Unterstrichen wird die generelle Gültigkeit dieser Beobachtungen auch durch die Tatsache, dass die genannten Effekte sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene übereinstimmend gezeigt werden konnten. Die filovirale Polymerase wurde also offensichtlich an einer Erkennung des in der GG gelegenen Transkriptionsstartsignals bei IRs von 10, 15, 20 25 und eventuell auch 30 Nukleotiden gehindert, wobei die Sequenz der IR für diesen Effekt keine Rolle zu spielen scheint.

Interessanterweise gibt es in allen filoviralen Genomen zwar eine große Variabilität bezüglich der IRs, doch nehmen diese nie eine der als inhibierend wirkenden Längen ein (siehe

Einleitung, Abbildung 4). Obwohl eine endgültige Erklärung dieser Effekte noch aussteht, sollen im Folgenden mögliche Hypothesen zu deren Entstehung erläutert werden.

5.2 Sekundärstruktur der intergenischen Region und Reinitiation

Die genomische RNA von nicht segmentierten Negativstrang-RNA-Viren liegt während des gesamten Infektionszyklus als mit dem Nukleoprotein (NP) verpackter RNase-resistenter Komplex vor. Es existiert bislang kein experimentell bestätigtes Modell, das die genauen Vorgänge während der Replikation oder Transkription beschreibt. Wie Strukturanalysen von Nukleoproteinen anderer Viren aufdeckten, bilden diese Proteine hauptsächlich laterale Verbindungen untereinander aus (Schoehn et al., 2004; Albertini et al., 2008). Vorstellbar wäre daher, dass die RNA aus den miteinander verbundenen NP-Proteinen abschnittsweise herausgelöst und somit der viralen Polymerase zugänglich gemacht wird (Albertini et al., 2008). In einem solchen Moment könnten sich in der genomischen RNA regulatorische Sekundärstrukturen ausbilden. Dass Sekundärstrukturen grundsätzlich einen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität filoviraler Gene besitzen können, zeigten Untersuchungen zur Transkriptionsinitiation des ersten Gens (Weik et al., 2002). Komplexe Strukturen wie Pseudoknoten, denen bei Positivstrang-RNA-Viren und Retroviren bedeutende Aufgaben in Genomreplikation und Translationsregulation beigemessen werden (Brierley et al., 2007), sind bislang für nicht segmentierte Negativstrang-RNA-Viren allerdings nicht beschrieben.

Neumann et al. (2009) sagten für die 144 lange IR zwischen dem VP30- und VP24-Gen die Bildung einer stabilen Sekundärstruktur voraus und untersuchten deren Einfluss auf die Reporter-genaktivität der angrenzenden Gene in bicistronischen Minigenomen. Die vorhergesagte Struktur enthielt zwei „stem-loop“-Regionen („rechter und linker Arm“) (Abbildung 31A), die die Autoren nacheinander deletierten. Sie konnten anhand von Reporter-genaktivität feststellen, dass sich die Deletion des so genannten „linken Arms“ (intergenische Nukleotide 1-50) steigernd auf die Aktivität des ersten Gens auswirkte, während ein Fehlen des „rechten Arms“ (intergenische Nukleotide 51-144) den gleichen Effekt auf das erste und zusätzlich einen Rückgang der Reporter-genaktivität des zweiten Gens zeigte. Die Strukturvorhersagen bezogen sich allerdings auf positiv-strängige RNA (mRNA-Orientierung). Da die IR jedoch bei der Transkription außer in der Readthrough-mRNA nicht übersetzt wird, ist schwer vorstellbar, wie sich eine solche Struktur regulatorisch auf die Expression der angrenzenden Gene auswirken sollte. Eine regulatorisch wirksame IR-Struktur müsste sich in der genomischen, also negativ-strängigen RNA ausbilden, um die Erkennung des nachfolgenden Startsignals oder das Scanning der Polymerase zu beeinflussen. Für die IR in dieser

Orientierung wird jedoch eine abweichende Sekundärstruktur (Abbildung 31A) vorhergesagt. Die Ergebnisse von Neumann et al. (2009) bestätigen jedoch grundsätzlich den beobachteten Einfluss einer Verkürzung der IR auf die Reinitiationsfrequenz.

Die beobachtete Inhibition der Reinitiation bei Mutanten mit IRs von 10-30 Nukleotiden könnte auf die Ausbildung oder Zerstörung von Sekundärstrukturen in der IR beruhen. Wie jedoch aus Abbildung 31B und C ersichtlich ist, lässt sich kein einheitliches Muster bezüglich Mutanten, die gut initiieren und solchen, die eine reduzierte Initiation zeigen, erkennen. Vielmehr wird für die Mutante IR 5nt eine der Mutante IR 10nt* auffällig ähnliche Struktur vorhergesagt, wobei erstere eine starke Expression und letztere eine starke Inhibition der mRNA 2-Synthese zeigte. Es ist daher unwahrscheinlich, dass Sekundärstrukturen an den beobachteten Effekten beteiligt sind.

Bislang gibt es bei nicht segmentierten Negativstrang-RNA-Viren keine Hinweise auf eine regulatorische Funktion von Sekundärstrukturen, die von den GGs gebildet werden. In der VSV Spezies New Jersey, die im Unterschied zu VSV Indiana eine 21 Nukleotide lange IR zwischen dem G- und L-Gen enthält, wurde aufgrund der Komplementarität der IR-Enden vermutet, dass sich eine Sekundärstruktur ausbildet. Diese könnte es der Polymerase erlauben, die IR zu überlesen (Shuman, 1997; Stillman und Whitt, 1998). Durch Mutation der komplementären Nukleotide zeigte sich jedoch, dass die ausgebildete Sekundärstruktur keinerlei Einfluss auf die im Wildtyp herabgesetzte Reinitiationsfrequenz hatte (Stillman und Whitt, 1998). In RSV zeigte eine Mutante, die durch Insertion einer artifiziellen G/C-reichen Sequenz eine stabile „stem-loop“-Struktur ausbildete, eine 30% reduzierte Reinitiationsfrequenz. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob diese aufgrund der Sekundärstruktur oder wegen des hohen G/C-Gehalts der IR die Reduktion des Neustartens auslöste (Kuo et al., 1996).

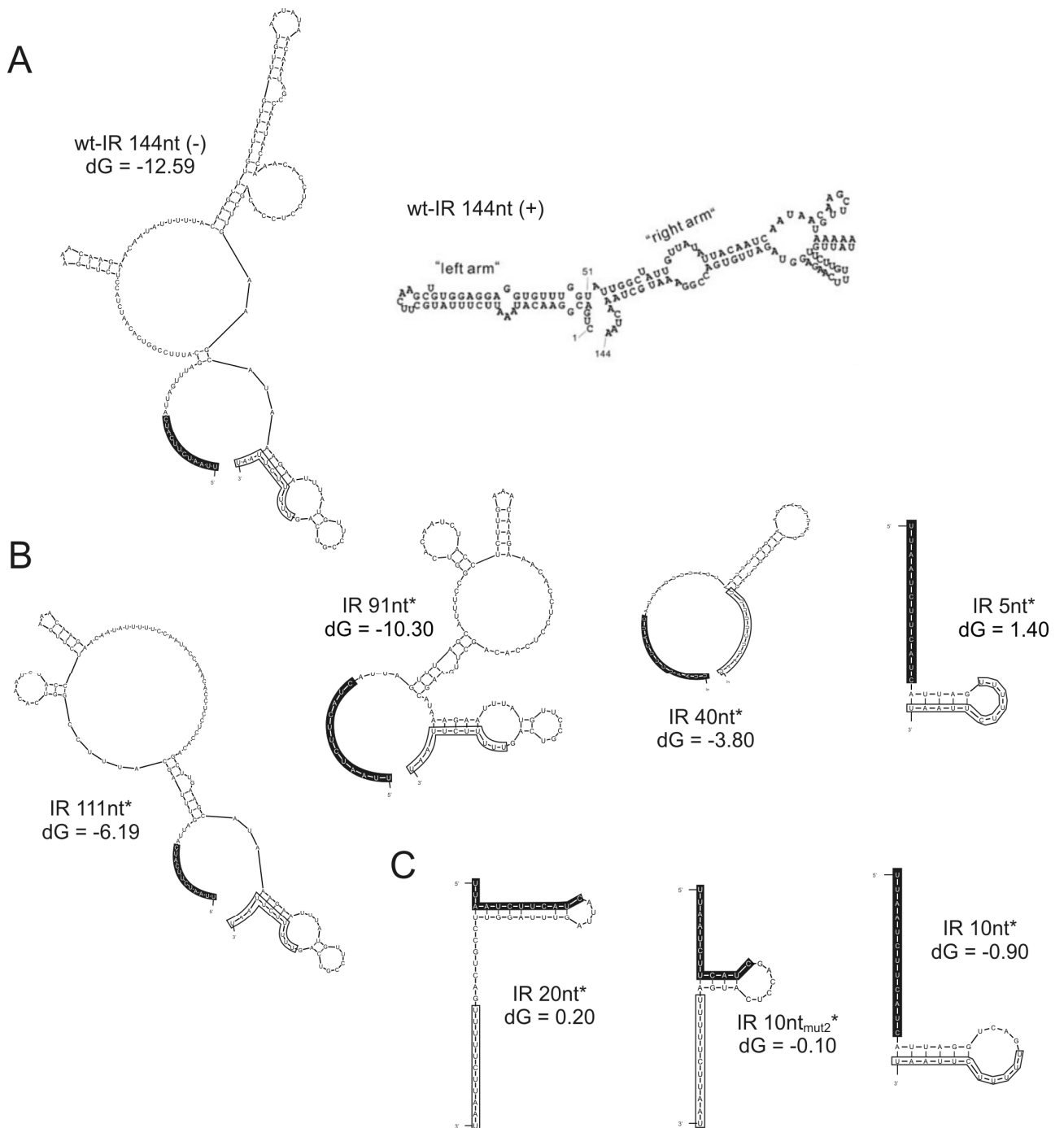


Abbildung 31 : Sekundärstrukturen der GG zwischen VP30- und VP24-Gen

Dargestellt sind die vorhergesagten Sekundärstrukturen der GG VP30/VP24 für einige Minigenommutanten. Gezeigt ist jeweils die stabilste Strukturvorhersage, die mit mfold Version 3.2 erstellt wurde (Zuker, 2003; Mathews et al., 1999). Die Änderung der Gibbs-Energie bei Ausbildung der jeweiligen Struktur ist unter der Bezeichnung der Mutanten angegeben (dG). Die Transkriptionsstartsignale sind in schwarz hinterlegt, die Stoppsignale durch Rahmen gekennzeichnet. Die IR sind nicht hervorgehoben. **A**) Darstellung der Wildtyp-GG und Wildtyp-IR. (-) bezeichnet die wt-GG in Negativstrang-Orientierung. (+) kennzeichnet die von Neumann et al., 2009 veröffentlichte Strukturvorhersage für die IR zwischen VP30 und VP24-Gen in positiver (mRNA-) Orientierung. **B**) Darstellung der Struktur von GG-Mutanten mit nicht inhibierter Reinitiationsfrequenz **C**) Sekundärstrukturen für GGs von Minigenommutanten mit inhibierter Reinitiationsfrequenz.

5.3 NP-Phase und Reinitiation

Wie bereits beschrieben, ist die Matrize für die RNA-Synthese aller Negativstrang-RNA-Viren ein eng mit den Nukleoproteinen (N/NP) verpacktes helikales Nukleokapsid. Diese enge Verpackung hat für Mitglieder der *Paramyxovirinae* funktionelle Konsequenzen bezüglich der Regulation von Replikation und Transkription. So folgen diese Viren der so genannten „Rule of six“. Diese Regel besagt, dass die Genomlänge ein Vielfaches von sechs betragen muss, damit eine effiziente RNA-Synthese stattfinden kann (Kolakofsky et al., 2005). Der Grund für diese Beobachtung ist die Verpackungseinheit der N-Proteine, die je genau sechs Nukleotide der RNA-Matrize umschließen. Es wird nun angenommen, dass die virale Polymerase die *cis*-aktiven Signale im Kontext dieser Verpackung erkennt. Auch für Filoviren konnte eine solche Sechserregel nachgewiesen werden. Sie betrifft hier jedoch nicht die Gesamtgenomlänge (Calain et al., 1999), sondern den Abstand der beiden Promotorelemente des zweigeteilten Replikationspromotors, der ein Vielfaches der Zahl sechs betragen muss, um eine effiziente Replikation zu gewährleisten (Weik et al., 2005; Enterlein et al., 2009). Bei Viren der Unterfamilie *Paramyxovirinae* konnte auch für die Transkription ein Einfluss der Hexamerphase entdeckt werden. So steuert sie in SeV die Frequenz des kotranskriptionellen Editings sowie die Anzahl der dabei inserierten Nukleotide, abhängig davon, an welcher Position innerhalb eines N-Moleküls (1-6) das Editingsignal zu liegen kommt (Iseni et al., 2002; Kolakofsky et al., 2005). Erklärt wurde dieser Effekt über Strukturanalysen des N:RNA-Ribonukleoproteins, die für SeV eine stark unterschiedliche Zugänglichkeit der einzelnen Basen innerhalb eines N-Proteins für chemische Modifizierung, und damit vermutlich auch für die RdRp, zeigten (Iseni et al., 2002).

Das lässt darauf schließen, dass die Polymerase auch bei der Transkription auf die Verpackungsphase der Matrize reagieren kann und führte zu der Frage, ob eine phasenspezifische Erkennung der Transkriptionssignale eventuell die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf die Reinitiationsfrequenz bestimmter Mutanten erklären könnte.

Filoviren nehmen innerhalb der der „Rule of six“ folgenden Viren eine Sonderstellung ein, da nur einzelne Teile des Genoms, nicht aber dessen Gesamtlänge, dieser Regel gehorchen. Es gibt bislang keine molekulare Erklärung für diesen Effekt. Auch wurde die genomische Verpackungseinheit der im Vergleich zu den übrigen nicht segmentierten Negativstrang-RNA-Viren größeren NP-Proteine bisher noch nicht identifiziert. Untersuchungen an MARV deuten anhand der Größe der NP-Proteine, sowie des beobachteten Durchmessers der Nukleokapside auf eine Enkapsidierung von je 12 oder 15 Nukleotiden pro NP-Molekül hin (Mavrakis et al., 2002). Für ZEBOV gibt es bislang keinerlei Hinweise auf eine mögliche

Verpackungseinheit. Da auch das Enkapsidierungssignal für Filoviren bislang nicht identifiziert werden konnte, lässt sich nicht genau sagen, anhand welcher Kriterien eine Verpackung des RNA-Genoms vorgenommen wird. Die Tatsache, dass die Gesamtgenomlänge keinen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit der Viren hat, könnte darauf hindeuten, dass die Enkapsidierung einer gewissen Flexibilität unterliegt. Die hauptsächlich lateralen Interaktionen der N-Moleküle anderer nicht segmentierter Negativstrang-RNA-Viren (Schoehn et al., 2004; Albertini et al., 2008) könnten ein Gleiten interagierender N-Oligomere auf der RNA-Matrize ermöglichen (Kolakofsky et al., 2005). Damit wäre ein Ausrichten der N-Phase unabhängig vom 3'-Genomende denkbar. Dies würde erklären, warum eine definierte Gesamtgenomlänge in Filoviren nicht notwendig wäre. Basierend auf dieser Annahme wurde

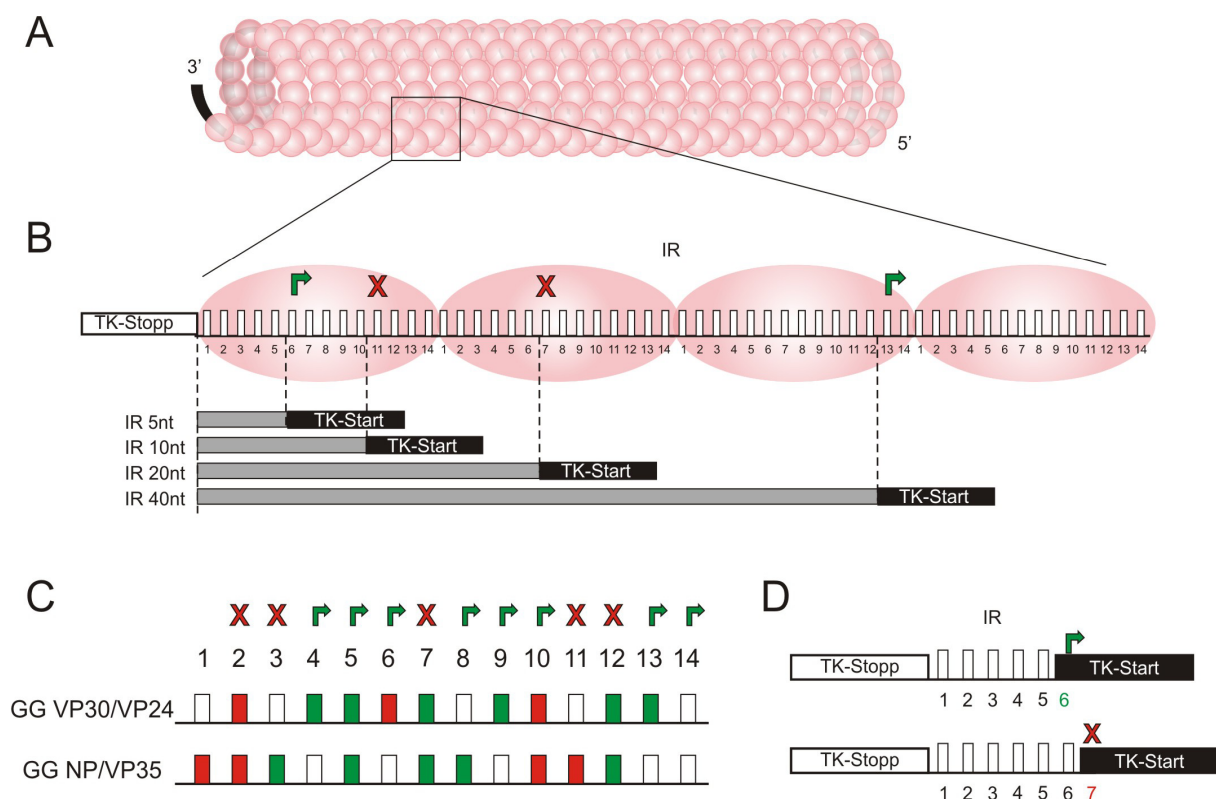


Abbildung 32 : Modell zur NP-Phasen-abhängigen Erkennung der Transkriptionsstartsignale

A) Darstellung des mit NP-Molekülen (rosa Kugeln) enkapsidierten Virusgenoms. **B)** Modell zur NP-phasen-abhängigen Erkennung der Transkriptionsstartsignale. Das Transkriptionsstoppsignal ist als weißer, die Startsignale und die IRs sind als schwarze bzw. graue Balken dargestellt. Die jeweilige IR-Länge gibt die Position des ersten Nukleotids der Transkriptionsstartsignale innerhalb einer Verpackungseinheit vor (gestrichelte Linien). Als Verpackungseinheit wurden hier 14 Nukleotide (weiße Rechtecke) pro NP-Molekül (rosa Kugeln) angenommen. Die absolute Lage des NP-Proteins relativ zur Matrize ist nicht Bestandteil des Modells. Voraussetzung ist lediglich, dass die Lage in allen Gegenden identisch ist. Grüne Pfeile kennzeichnen die Lage von Startsignalen, die an einer für die Polymerase gut zugänglichen Position innerhalb des NPs zu liegen kommen würden, rote Kreuze kennzeichnen Positionen, die von der Polymerase nicht gut erkannt werden könnten. **C)** Modell von IR-Längen und Transkriptionsstartstellen. Dargestellt sind IR-Längen, die zu einer Erkennung (grüne Rechtecke), bzw. einer inhibierten Erkennung (rote Rechtecke) des nachfolgenden Transkriptionsstartsignals führen. Die Transkriptionsstartstellen beginnen zur IR-Länge um jeweils 1 Nukleotid verschoben. Sie sind gekennzeichnet durch grüne Pfeile (gute Reinitiation) oder rote X (schlechte Reinitiation). Die Darstellung basiert auf den gewonnenen Ergebnissen aller in dieser Arbeit getesteten Mutanten zu GG VP35/VP40 und GG NP/VP35. Ausgenommen wurden Mutanten, bei denen nicht auszuschließen war, dass die beobachteten Effekte durch zusätzliche Regulationsmechanismen überlagert wurden (IR 292nt, IR 0nt). **D)** Beispielhafte Vorhersage des Modells für IR-Längen, die eine effiziente (IR 5nt, oben), bzw. eine ineffiziente (IR 6nt, unten) Reinitiation ermöglichen würden.

versucht, den Abstand der Transkriptionssignale in Mutanten mit aktiver und inhibierter Reinitiation zu interpretieren und eine mögliche NP-Phase zu berechnen, die eine bessere oder schlechtere Erkennung der Transkriptionssignale erklären könnte. Dabei wurde von einer Ausrichtung der NP-Phase am Beginn der IR ausgegangen (Abbildung 32).

Nach diesen Berechnungen würde eine hypothetische Enkapsidierungseinheit von 14 Nukleotiden mit den gefundenen Ergebnissen übereinstimmen (Abbildung 32). Bei dieser Verpackungseinheit würden die ersten Nukleotide aller inaktiven Startsignale in der Phase 2,3,7,11 oder 12 zu liegen kommen (Abbildung 32 C, rote X). Alle anderen Positionen wären für die Polymerase besser zugänglich und würden somit zu einer stärkeren Reinitiationsfrequenz führen (Abbildung 32 C, grüne Pfeile). Ausgenommen wurden Mutanten, bei denen nicht auszuschließen war, dass die beobachteten Effekte durch zusätzliche Regulationsmechanismen überlagert wurden (IR 292nt, IR Ont).

Inwiefern diese Hypothese haltbar ist, müssten weitere Versuche mit Mutanten zeigen, die Startsignale tragen, die nicht in der richtigen Phase zu liegen kommen (Abbildung 32 D). Weiterhin wäre zu klären, wie eine Enkapsidierungseinheit von 14 Nukleotiden mit der Sechserregel der Replikationspromotorelemente vereinbar wäre.

5.4 Termination und Transkriptionsregulation über Readthrough-mRNA

Wenn an einer GG das Transkriptionsstoppsignal von der RdRp nicht erkannt wird, kommt es zur Bildung von Readthrough-mRNAs (Kolakofsky et al., 1974; Varich et al., 1979; Collins et al., 1982). Diese Transkripte enthalten zwei oder mehrere aufeinander folgende Gene und werden nicht am Stoppsignal des ersten, sondern an dem eines darauf folgenden Gens terminiert und polyadenyliert (Whelan et al., 2004). Readthrough-Transkripte wurden bislang für Familien der *Rhabdoviridae* (Wagner und Rose, 1996) und *Paramyxoviridae* (Lamb und Kolakofsky, 2001) und im Einzelnen für SeV (Gupta und Kingsbury, 1985), VSV (Masters und Samuel, 1984), Adelaide River-Rhabdovirus (Wang et al., 1994), SV 41 (Tsurudome et al., 1991), SV 5 (Hiebert et al., 1985) und NDV (Collins et al., 1980) nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass sie die vollständigen IRs enthielten und keine Polyadenylierung an der überlesenen GG stattfand (Wilde und Morrison, 1984; Gupta und Kingsbury, 1985).

Für Filoviren konnten polycistronische mRNAs bislang nicht detektiert werden (Sanchez und Kiley, 1987). Bei der Transkription von Readthrough-mRNA wird eine GG, bei der die Polymerase normalerweise mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit von der Matrize abfallen könnte, überlesen. Daher erreichen mehr Polymerasemoleküle promotor-distal gelegene Be-

reiche, als das bei Synthese von ausschließlich monocistronischen mRNAs der Fall wäre. Der für Negativstrang-RNA-Viren typische Transkriptgradient wird dadurch überlagert. Zusätzlich kommt es zu einer Herabregulation des im zweiten ORF einer Readthrough-mRNA kodierten Proteins, wie die hier dargestellten Ergebnisse mit Stoppsignalmutanten belegen konnten: Ein bicistronisches Transkript, das nach Synthese einer Matrize mit zerstörtem Transkriptionsstoppsignal gebildet wurde, zeigte im CAT-Assay nahezu keine Aktivität mehr.

Eine Beeinflussung der Termination und damit die gehäufte Bildung von Readthrough-mRNA Spezies stellt so eine Möglichkeit zur Regulation der Genexpression stromabwärts gelegener Gene dar. Daraus ergab sich die Frage, ob polycistronische Transkripte grundsätzlich in mit ZEBOV infizierten Zellen gebildet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Readthrough-mRNAs in ZEBOV-infizierten Zellen unabhängig von der Struktur der jeweiligen GG gebildet werden. Sie wurden sowohl bei überlappenden, als auch bei GGs mit kurzer oder langer IR gebildet. Eine Transkription von mRNAs, die mehr als zwei Gene umfassten, wie sie zum Beispiel bei Masernviren nachgewiesen werden konnten (Rima und Duprex, 2009), ließ sich hier nicht zeigen. Wie für einige Paramyxoviren gezeigt werden konnte, induzieren diese eine erhöhte Readthrough-mRNA-Synthese an der GG zwischen M- und F-Genen, um spezifisch die Menge an gebildeten F-Proteinen herabzuregulieren (Rassa und Parks, 1998; Tsurudome et al., 1991).

Auch in den hier gezeigten Versuchen konnte bei Mutation der IR zwischen NP- und VP35-Gen eine leichte Erhöhung der Readthrough-mRNA-Menge festgestellt werden; der Effekt war allerdings bislang nicht quantifizierbar. Generell ließen sich, wenn überhaupt, nur schwache Effekte auf die Terminationseffizienz des ersten Gens bei Mutation der IR detektieren, was für eine von der IR unabhängige Termination bei ZEBOV spricht. Weitere quantitative Analysen müssten dies jedoch bestätigen, da in den Versuchen von Neumann et al. (2009) Veränderungen der IR mit teilweise starken Auswirkungen auf die Expression des ersten Gens verbunden waren.

Bestätigen sich die hier gezeigten Ergebnisse, würde dies für einen weiteren Unterschied in der Regulation der RNA-Synthese zwischen Filoviren und den Pneumoviren sprechen. Für HRSV konnte ein Einfluss der variierenden IR auf die Terminationseffizienz am vorangehenden Gen gezeigt werden (Hardy et al., 1999; Sutherland et al., 2001; Harmon und Wertz, 2002).

5.5 Hinweise zu den Vorgängen an der Gengrenze - Stoppen, Scannen und Neustarten

Ergebnisse zu den Prototypviren SeV und VSV deuteten darauf hin, dass allein die konservierten Signale an den GGs in der Lage sind, die aufeinander folgenden Ereignisse, die zur Termination und Polyadenylierung des stromaufwärts liegenden Gens sowie zur Reinitiation und Capping der mRNA des nachfolgenden Gens führen, zu vermitteln.

In den hier gezeigten Versuchen mit ZEBOV wurden die Vorgänge bei Stoppen und Neustarten an überlappenden Transkriptionssignalen der GG zwischen dem zweiten und dritten Gen untersucht. Das Stoppsignal des VP35-Gens überlappt mit dem Startsignal des VP40-Gens. Der überlappende Bereich umfasst dabei das in beiden Signalen vorhandene hoch konservierte Pentamer. Durch die Überlappung kommen die Transkriptionssignale in umgedrehter Reihenfolge zu liegen. Wurde nun das Transkriptionsstoppsignal des vorangehenden Gens mutiert, konnte das überlappende Startsignal nicht mehr erkannt werden, obwohl es durch die Mutation in seiner Integrität unbeeinflusst war. In der entsprechenden Mutante konnte ausschließlich Readthrough-mRNA nachgewiesen werden (Rd-mRNA, Abbildung 33). Daraus folgt, dass (i) die virale Polymerase entweder ein vollständiges Stoppsignal für die Erkennung des überlappenden Startsignals benötigt, oder (ii), dass der Prozess der Termination für ein Neustarten von Bedeutung ist.

Zu (i): Eine Bedeutung des Stoppsignals für die Erkennung des Startsignals konnte für VSV und SeV gezeigt werden (Hinzman et al., 2002; Plattet et al., 2007). In neueren Untersuchungen wurde der Einfluss des Stoppsignals und der IR für die Reinitiation unabhängig von der zuvor erfolgten Termination analysiert. Dies war möglich durch die Insertion eines zusätzlichen Stoppsignals in der 5' UTR des vorangehenden Gens, das zu einer Termination der mRNA 1 vor Erreichen der GG führte. So konnte der Einfluss des verbleibenden Stoppsignals und der IR auf die Erkennung des Startsignals unabhängig untersucht werden. Die Ergebnisse legten nahe, dass für eine Reinitiation nicht nur das konservierte Transkriptionsstartsignal, sondern ebenfalls die IR und die Uracilabfolge des Stoppsignals (VSV) (bzw. Teile davon bei SeV) benötigt wurden. Somit kommt es an der GG zu einer funktionellen Überlappung der *cis*-aktiven Signale für Termination und Reinitiation (Hinzman et al., 2002; Plattet et al., 2007).

Eine solche Bedeutung des vorangehenden Transkriptionsstoppsignals für ein effizientes Erkennen des Startsignals in ZEBOV scheint schon durch die Variabilität der GGs im Genom unwahrscheinlich. So befinden sich die hoch konservierten Stoppsignale nicht immer in der Nähe der nachfolgenden Startsignale und werden zum Beispiel zwischen dem VP30- und

VP24-Gen durch 144 intergenische Nukleotide getrennt. Dennoch wurde für die Spezies VSV New Jersey, die ebenfalls eine 21 Nukleotide lange IR vor dem L-Gen trägt, eben diese Stoppsignal-abhängige Starterkennung als mögliche Begründung für den beobachteten Abfall der mRNA 2-Synthese beschrieben (Hinzman et al., 2002; Hinzman et al., 2008). Die hier gezeigten Versuche konnten eine solche Verknüpfung jedoch auch für GGs widerlegen, in denen Start- und Stoppsignal natürlicherweise nahe beieinander zu liegen kommen, wie in solchen mit kurzer IR oder einer Überlappung. Eine Trennung der Signale war hier ohne direkten Effekt auf die Reinitiation möglich. Damit unterscheiden sich die Beschaffenheit und der Erkennungsmechanismus der Transkriptionsstartsignale von ZEBOV grundsätzlich von denen des VSV und SeV (Hinzman et al., 2002; Plattet et al., 2007). Das konnte auch für das Startsignal des L-Gens in ZEBOV bestätigt werden (Boehmann, 2002). In der GG VP24/L wird das VP24-Gen durch zwei aufeinander folgende Stoppsignale begrenzt. Das erste ist durch eine vier Nukleotide lange IR vom nachfolgenden Transkriptionsstartsignal des L-Gens getrennt, das zweite überlappt, wie bereits für GG VP35/VP40 beschrieben, mit dem Startsignal des L-Gens. Die Mutation der Uracilabfolge je eines der Stoppsignale konnte die Erkennung des Startsignals in beiden Fällen nicht beeinflussen (Boehmann, 2002).

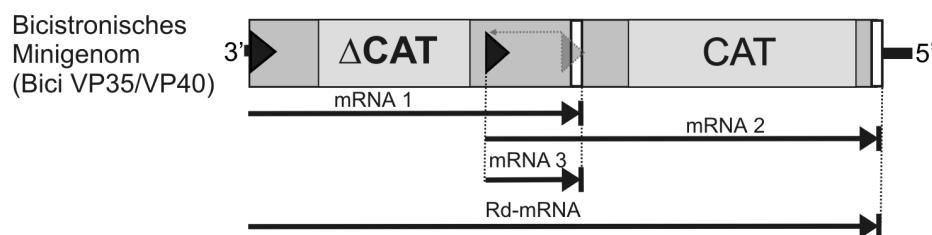


Abbildung 33 : Schema der entstehenden mRNAs an GG VP35/VP40 bei Transkription mutierter Minigenome mit stromaufwärts verschobenem Startsignal

Dargestellt ist das bicistronische Minigenom in negativer RNA-Orientierung, wie es der viralen Polymerase als Matrize für die Transkription dient. Transkriptionsstartsignale sind als schwarze Dreiecke, Transkriptionsstoppsignale als weiße Balken dargestellt. Die ursprüngliche Lage des stromaufwärts verschobenen Startsignals an der wt-GG ist in transparenter Farbe aufgezeigt. Schwarze Pfeile kennzeichnen die synthetisierten mRNA-Spezies. mRNA 3 würde entstehen, wenn der Abstand zwischen verschobenem Startsignal des zweiten Gens und dem Stoppsignal des ersten Gens ausreichend groß wird, um die Termination des Transkripts zu erlauben.

Da folglich die Polymerase das vollständige Stoppsignal nicht für die Erkennung des Startsignals benötigt, ergibt sich nach Hypothese (ii) eine direkte Abhängigkeit der Reinitiation von einer vorher erfolgten Termination. Damit konnte eine Transkription von Filoviren nach dem für alle nicht segmentierten Negativstrang-RNA-Viren postulierten Stopp-Start Mechanismus (Whelan et al., 2004) bestätigt werden.

Zusätzlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Polymerase durch das Terminieren und Polyadenylieren des vorangehenden Transkripts in einen Modus umgeschaltet wird, der vielfach als Scanning bezeichnet wird. In diesem erfolgt ein Überlesen der IR ohne RNA-Synthese und damit die Suche nach einem funktionellen Startsignal.

Wie die hier gezeigten Versuche nahe legen, findet ein solcher Scanningprozess an den GGs sowohl in Stromabwärts- als auch in Stromaufwärtsrichtung statt. So konnten die im Wildtyp direkt überlappenden Transkriptionssignale der GG VP35/VP40 voneinander um bis zu 21 Nukleotide getrennt werden (Abbildung 33), ohne zu einem Verlust der Genexpression am stromaufwärts verschobenen Startsignal zu führen.

Auch andere Viren der *Mononegavirales* besitzen überlappende GGs, so zum Beispiel das HRSV, bei dem allerdings nicht die Transkriptionssignale direkt überlappen, sondern sich das M2- und L-Gen um eine 68 Nukleotide lange Region überschneiden (Collins et al., 1987). Trotz dieser Anordnung findet eine Synthese der L-mRNA nur in einer um Faktor drei reduzierten Menge im Vergleich zu den anderen GGs statt, was auch für HRSV auf ein effizientes Scanning der RdRp in Stromaufwärtsrichtung an der GG hindeutet (Collins et al., 1987; Kuo et al., 1996; Fearn und Collins, 1999). Wie erst kürzlich gezeigt werden konnte, findet ein solches Scanning der Matrize in beide Richtungen auch bei solchen Viren statt, die natürlicherweise keine überlappenden GGs im Genom tragen. So konnte ein nach den oben beschriebenen Voraussetzungen angepasstes Startsignal in VSV bis zu 200 Nukleotide stromaufwärts oder -abwärts zu einem Terminationssignal verschoben werden, ohne seine Funktionalität einzubüßen (Barr et al., 2008). Das bedeutet, dass ein Suchen nach Transkriptionsstartsignalen an den GGs in beide Richtungen auf einen grundsätzlichen Mechanismus der RdRp bei der Transkription hindeuten könnte. Es ist jedoch bislang vollkommen ungeklärt, wie ein Scanning – vor allem in Stromaufwärtsrichtung – energetisch überhaupt möglich ist. Denkbar wäre ebenfalls, dass unterschiedliche Polymerasemoleküle an den verschiedenen Startsignalen die mRNA-Synthese initiieren. Diese müssten jedoch aufgrund der experimentellen Bestätigung des Stopp-Start-Modells funktionell miteinander verknüpft sein.

Es ist aus den hier gezeigten Versuchen nicht eindeutig erkennbar, warum überlappende Signale im ZEBOV-Minigenom nur bis zu einer Grenze von 21 überlappenden Nukleotiden zur Synthese von mRNA 2 führten, bei 31 und 39 inserierten Nukleotiden die zweite mRNA jedoch nur noch schwach (IR 31nt), bzw. nicht mehr (IR 39nt) nachweisbar war. Es gäbe dafür mindestens zwei mögliche Erklärungen:

(i) Entweder ist die RdRp der Filoviren ab einer bestimmten Trennung der überlappenden Signale nicht mehr dazu in der Lage, in einem stromaufwärts gelegenen Bereich nach einem funktionellen Startsignal zu scannen oder (ii) es kommt bei einer gewissen Länge des überlappenden Bereichs zur Bildung einer weiteren mRNA-Spezies in den untersuchten bicistronischen Minigenomen (mRNA 3, Abbildung 33). Diese würde am stromaufwärts verschobenen Transkriptionsstartsignal die Synthese initiieren, dann jedoch bereits am Stoppsignal

des ersten Gens wieder terminieren. So würde anstelle von mRNA 2 die viel kürzere mRNA 3 gebildet werden (Abbildung 33). Diese wäre aufgrund ihrer geringen Größe mit den hier verwendeten Methoden nicht nachweisbar.

Für letztere Hypothese (ii) sprechen Beobachtungen bei VSV, die zeigen, dass Transkriptionsstartsignal und -stoppsignal einen bestimmten Mindestabstand (bei VSV 51 Nukleotide) zueinander haben müssen, um ein Stoppen der Transkription zu ermöglichen (Whelan et al., 2000). Mit einem stromaufwärts verschobenen Transkriptionsstartsignal einer überlappenden GG konnte genau diese Hypothese in einem bicistronischen VSV-Minigenom bestätigt werden. Hier wurden die angenommenen Transkripte mittels Primer-Extension nachgewiesen, die bei einer Trennung der Signale um Längen über 51 Nukleotide synthetisiert wurden (Barr et al., 2008). Allerdings nahmen die detektierten mRNA Mengen aufgrund der schwachen Scanningeffizienz der viralen Polymerase mit ansteigender Überlappungslänge ab.

Eine genauere Untersuchung der gebildeten Transkripte würde in den hier beschriebenen Mutanten demnach nicht nur einen Aufschluss geben bezüglich eines filoviralen Mindestabstands von Start- und Stoppsignalen, sondern ebenfalls Rückschlüsse auf die Scanningfähigkeit der RdRp in einem Virus mit variablen IR erlauben.

5.6 Die Rolle der Transkriptionsregulation über intergenische Regionen im viralen Infektionszyklus

Für viele Mitglieder der nicht segmentierten Negativstrang-RNA-Viren konnte bereits gezeigt werden, dass sie bestimmte Gene innerhalb des Genoms spezifisch über die Struktur der GG herunterregulieren. Dabei ist in den meisten Fällen die virale Polymerase betroffen, wie gezeigt für HRSV (Collins et al., 1987), Rabies-Virus (Conzelmann et al., 1990) und VSV New Jersey (Stillman und Whitt, 1998). In den letzten beiden Fällen wird über eine dem L-Gen vorgeschaltete besonders lange IR dessen Transkription herabgesetzt.

Ein solcher Mechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit auch für ZEBOV beobachtet. Die besonders lange IR mit 144 Nukleotiden konnte mit einer ineffizienteren Reinitiation des nachfolgenden Gens assoziiert werden. Die natürlicherweise an der ersten GG im ZEBOV-Genom vorkommende IR von 5 Nukleotiden zeigte in dieser GG im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Transkriptionsaktivität. Dies deutet zusammen mit der konservierten Lage der langen IR innerhalb aller Ebolavirusgenome auf eine spezifische Inhibition der nachfolgenden Gene, nämlich des VP24- und L-Gens, über die IR hin. Das VP24 ist ein zusätzliches Protein der Filoviren ohne Entsprechung in anderen nicht segmentierten

Negativstrang-RNA-Viren. Es konnte als wichtige Pathogenitätsdeterminante bei der Anpassung an Nagetierwirte identifiziert werden (Volchkov et al., 2000; Ebihara et al., 2006). Zusätzlich hemmt es die Immunantwort der Wirtszelle und spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung der Nukleokapside und damit bei der Verschiebung des viralen Infektionszyklus von der RNA-Synthese hin zum Zusammenbau der Virionen (Reid et al., 2006; Watanabe et al., 2007). Eine differenzielle Regulation dieses Proteins wäre daher für den viralen Infektionszyklus sinnvoll. Wie Neumann et al. (2009) zeigen konnten, bewirkt das von der Konsensussequenz der Transkriptionsstartsignale um ein Nukleotid abweichende Start des L-Gens zusätzlich eine Hemmung der Reinitiation. Die Tatsache, dass die Lage der langen IR zwar innerhalb der EBOV-Spezies konserviert ist, jedoch im MARV um eine Position in 3'-Richtung des Genoms verschoben ist (nämlich zwischen die Gene GP und VP30); siehe Einleitung, Abbildung 4), könnte auf eine spezifische Regulation in den unterschiedlichen Viren hindeuten.

Hierfür spricht auch die unterschiedliche Funktion des VP30, das in EBOV als essentieller Transkriptionsinitiationsfaktor identifiziert werden konnte, in MARV jedoch für die mRNA-Synthese nicht benötigt wird (Weik et al., 2002; Mühlberger et al., 1998, 1999). Weitergehende Versuche müssten zeigen, inwiefern die lange IR in MARV eine herabgesetzte Transkription des nachfolgenden Gens vermitteln kann und ob das VP30 über die vorgeschaltete IR reguliert wird. Ein Rescue rekombinanter MARV gelang nicht in der Abwesenheit von VP30, weshalb diesem Protein auch in MARV eine essentielle, wenn auch vermutlich zu EBOV grundsätzlich verschiedene Aufgabe zuzukommen scheint (Enterlein et al., 2006).

Die hohe genetische Stabilität, die für die GGs bei der Analyse verschiedenen MARV-Ausbruchs isolate beobachtet werden konnte, legt ebenfalls eine wichtige Rolle dieser Regionen im Infektionszyklus von Filoviren nahe (Towner et al., 2006).

Auch neuere Ergebnisse mit rekombinantem NDV konnten die IR als wichtige Elemente für die Genregulation identifizieren. Hier wurde die IR an den GGs F-HN (31nt) oder HN-L (47nt) in der Länge verkürzt oder verlängert und die Auswirkungen auf Transkription und Pathogenese in Hühnern untersucht. Wie auch bei der Verlängerung der IR 144nt auf 292nt konnte hier eine Reduktion der Transkription nachfolgender Gene beobachtet werden. Bemerkenswerter Weise zeigten alle hergestellten Mutanten mit verkürzter oder verlängerter IR ein herabgesetztes Wachstum sowie eine reduzierte Pathogenität im natürlichen Wirt, was auf eine am besten abgestimmte Gengregulation durch die im Wildtypvirus vorhandenen GGs mit variablen IR schließen lässt (Yan und Samal, 2008).

Versuche in rekombinanten ZEBOV mit mutierten IRs könnten zeigen, inwieweit die Strukturen der hochvariablen GGs in Ebolaviren an der Regulation der im Verlauf der Infektion fein abgestimmten Verhältnisse exprimierter Proteine beteiligt sind. Da gezeigt

werden konnte, dass das Verhältnis an NP und VP35 für die effiziente Synthese viraler RNA eine essentielle Bedeutung hat (Mühlberger et al., 1999), wäre es besonders interessant, die beschriebenen inhibierend wirkenden IRs zwischen die für diese Proteine kodierenden Gene in ein rekombinantes Virus einzubringen. Der hohe Selektionsdruck, der aufgrund der essentiellen optimalen Stöchiometrie der beiden Proteine auf dieser GG liegt, müsste eine schnelle Reversion der eingefügten Mutation zur Folge haben, vorausgesetzt, die IR spielt tatsächlich eine essentielle Rolle für die Regulation der Reinitiation.

Ließen sich die gewonnenen Ergebnisse vom Minigenomsystem auf rekombinante Viren übertragen, könnten Manipulationen in den GGs zu genau regulierten Genexpressionsleveln führen, die für die Herstellung attenuierter Viren hilfreich wären.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham G, Banerjee AK (1976) Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73:1504-1508.
- Albertini AAV, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RWH (2008) Structural aspects of rabies virus replication. *Cell Mol Life Sci* 65:282-94.
- Baize S, Leroy EM, Georges-Courbot MC, Capron M, Lansoud-Soukate J, Debre P, Fisher-Hoch SP, McCormick JB, Georges AJ (1999) Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in *Ebola* virus-infected patients [see comments]. *Nat Med* 5:423-6.
- Baize S, Leroy EM, Mavoungou E, Fisher-Hoch SP (2000) Apoptosis in fatal *Ebola* infection. Does the virus toll the bell for immune system? *Apoptosis* 5:5-7.
- Ball LA (1977) Transcriptional mapping of vesicular stomatitis virus in vivo. *Journal of Virology* 21:411-414.
- Ball LA, White CN (1976) Order of transcription of genes of vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73:442-446.
- Banerjee AK (2008) Response to 'Non-segmented negative-strand RNA virus RNA synthesis in vivo'. *Virology* 371:231-3.
- Baron RC, McCormick JB, Zubeir OA (1983) *Ebola* virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull World Health Organ* 61:997-1003.
- Barr JN, Tang X, Hinzman E, Shen R, Wertz GW (2008) The VSV polymerase can initiate at mRNA start sites located either up or downstream of a transcription termination signal but size of the intervening intergenic region affects efficiency of initiation. *Virology* 374:361-70.
- Barr JN, Whelan SP, Wertz GW (1997) Role of the intergenic dinucleotide in vesicular stomatitis virus RNA transcription. *J Virol* 71:1794-801.
- Basler CF, Mikulasova A, Martinez-Sobrido L, Paragas J, Mühlberger E, Bray M, Klenk HD, Palese P, Garcia-Sastre A (2003) The *Ebola* virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 77:7945-56.
- Basler CF, Wang X, Mühlberger E, Volchkov V, Paragas J, Klenk HD, 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.
- Beck S. (2005) Etablierung einer quantitativen Taqman-PCR fuer *Ebola*-Viren. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Becker S, Rinne C, Hofsäss U, Klenk H, Mühlberger E (1998) Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology* 249:406-17.
- Bermejo M, Rodriguez-Teijeiro JD, Illera G, Barroso A, Vila C, Walsh PD (2006) *Ebola* outbreak killed 5000 gorillas. *Science* 314:1564.
- Biacchesi S, Skiadopoulou M. H.; Boivin, M. H.; Boivin, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, Buchholz UJ (2003) Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 315:1-9.
- Boehmann Y, Enterlein S, Randolph A, Mühlberger E (2005) A reconstituted replication and

- transcription system for *Ebola* virus Reston and comparison with *Ebola* virus Zaire. *Virology* 332:406-17.
- Boehmann Y. (2002) Replikation und Transkription des *Ebola* Virus Reston: Vergleich mit *Ebola* Virus Zaire mit Hilfe der reversen Genetik. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Bowen ET, Lloyd G, Harris G, Harris WJ, Platt GS, Baskerville A, Vella EE. (1977) Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent. *Lancet* 1:571-3.
- Bradford SB, Warfield KL, Bavari S (2008) Functional CD8+ T cell responses in lethal *Ebola* virus infection. *J Immunol* 180:4058-66.
- Brauburger K. (2004) Untersuchung cis-regulatorischer Elemente im Genom des *Ebola*-Virus Zaire. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Brierley I, Pennell S, Gilbert RJC (2007) Viral RNA pseudoknots: versatile motifs in gene expression and replication. *Nat Rev Microbiol* 5:598-610.
- Buchmeier MJ, DeFries RU, McCormick JB, Kiley MP (1983) Comparative analysis of the structural polypeptides of *Ebola* viruses from Sudan and Zaire. *J Infect Dis* 147:276-81.
- Bukreyev A, Murphy BR, Collins PL (2000) Respiratory syncytial virus can tolerate an intergenic sequence of at least 160 nucleotides with little effect on transcription or replication in vitro and in vivo. *J Virol* 74:11017-26.
- Bwaka MA, Bonnet MJ, Calain P, Colebunders R, De Roo A, Guimard Y, Katwili KR, Kibadi K, Kipasa MA, Kuvula KJ, Mapanda BB, Massamba M, Mupapa KD, Muyembe-Tamfum JJ, Ndaberey E, Peters CJ, Rollin PE, 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 199140654:S1-7.
- Calain P, Monroe MC, Nichol ST (1999) *Ebola* virus defective interfering particles and persistent infection. *Virology* 262:114-28.
- 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.
- Cardenas WB, Loo YM, Gale MJ, Hartman AL, Kimberlin CR, Martinez-Sobrido L, Saphire EO, Basler CF (2006) *Ebola* virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol* 80:5168-78.
- Carlsen SR, Peluso RW, Moyer SA (1985) In vitro replication of Sendai virus wild-type and defective interfering particle genome RNAs. *Journal of Virology* 54:493-500.
- Cattaneo R, Rebmann G, Baczko K, ter Meulen V, Billeter MA (1987) Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains.
- CDC (1990a) Update: filovirus infection in animal handlers. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 39:221.
- CDC (1990b) Update: *Ebola*-related filovirus infection in nonhuman primates and interim guidelines for handling nonhuman primates during transit and quarantine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 39:22-4, 29-30.
- CDC (1996) *Ebola-Reston* virus infection among quarantined nonhuman primates-- Texas, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 45:314-6.
- Collins PL, Dickens LE, Buckler-White A, Olmsted RA, Spriggs MK, Camargo E, Coelingh

- KV (1986) Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4594-8.
- Collins PL, Hightower LE, Ball LA (1980) Transcriptional map for Newcastle disease virus. *Journal of Virology* 35:682-693.
- Collins PL, Olmsted RA, Spriggs MK, Johnson PR, Buckler-White AJ (1987) Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5134-8.
- Collins PL, Wertz GW, Ball LA, Hightower LE (1982) Coding assignments of the five smaller mRNAs of Newcastle disease virus. *J Virol* 43:1024-31.
- Conzelmann KK, Cox JH, Schneider LG, Thiel HJ (1990) Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* 175:485-99.
- Cowton VM, McGivern DR, Fearn R (2006) Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. *J Gen Virol* 87:1805-21.
- Cox NJ, McCormick JB, Johnson KM, Kiley MP (1983) Evidence for two subtypes of *Ebola* virus based on oligonucleotide mapping of RNA. *J Infect Dis* 147:272-5.
- Crary SM, Towner JS, Honig JE, Shoemaker TR, Nichol ST (2003) Analysis of the role of predicted RNA secondary structures in *Ebola* virus replication. *Virology* 306:210-8.
- Curran J, Kolakofsky D (2008) Nonsegmented negative-strand RNA virus RNA synthesis in vivo. *Virology* 371:227-30.
- Ebihara H, Takada A, Kobasa D, Jones S, Neumann G, Theriault S, Bray M, Feldmann H, Kawaoka Y (2006) Molecular determinants of *Ebola* virus virulence in mice. *PLoS Pathog* 2:e73.
- Elliott LH, Kiley MP, McCormick JB (1985) Descriptive analysis of *Ebola* virus proteins. *Virology* 147:169-76.
- Emerson SU (1982) Reconstitution studies detect a single polymerase entry site on the vesicular stomatitis virus genome. *Cell* 31:635-642.
- Enterlein S, Schmidt KM, Schumann M, Conrad D, Krähling V, Olejnik J, Mühlberger E (2009) The *Marburg* virus 3' noncoding region structurally and functionally differs from that of *Ebola* virus. *J Virol* 83:4508-19.
- Enterlein S, Volchkov V, Weik M, Kolesnikova L, Volchkova V, Klenk HD, Mühlberger E (2006) Rescue of recombinant *Marburg* virus from cDNA is dependent on nucleocapsid protein VP30. *J Virol* 80:1038-43.
- Enterlein S. (2005) Untersuchungen zur Replikation und Transkription von *Marburg*- und *Ebolavirus*. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Fearn R, Collins PL (1999) Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 73:5852-64.
- Feldmann H, Geisbert TW, Jahrling PB, Klenk H, Netesov SV, Peters CJ, Sanchez A, Swanepoel R, Volchkov VE. (2005) Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. In: Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L, editors. San Diego: Elsevier/Academic Press. p 645-653.
- Feldmann H, Klenk HD, Sanchez A (1993) Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch Virol Suppl* 794034398:81-100.

- Feldmann H, Mühlberger E, Randolph A, Will C, Kiley MP, Sanchez A, Klenk HD (1992) *Marburg* virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Res* 24:1-19.
- Feldmann H, Volchkov VE, Volchkova VA, Stroher U, Klenk HD (2001) Biosynthesis and role of filoviral glycoproteins. *J Gen Virol* 82:2839-48.
- Finke S, Conzelmann KK (1997) Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions. *J Virol* 71:7281-8.
- Finke S, Cox JH, Conzelmann KK (2000) Differential transcription attenuation of rabies virus genes by intergenic regions: generation of recombinant viruses overexpressing the polymerase gene. *J Virol* 74:7261-9.
- Formenty P, Hatz C, Le Guenno B, Stoll A, Rogenmoser P, Widmer A (1999) Human infection due to *Ebola* virus, subtype *Cote d'Ivoire*: clinical and biologic presentation. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S48-53.
- Galinski MS, Wechsler SL (1991) The Paramyxoviruses. In: Kingsbury D, editors. New York: Plenum Press. p 41-82.
- Gear JS, Cassel GA, Gear AJ, Trappler B, Clausen L, Meyers AM, Kew MC, Bothwell TH, Sher R, Miller GB, Schneider J, Koornhof HJ, Gomperts ED, Isaacson M, Gear JH (1975) Outbreak of *Marburg* virus disease in Johannesburg. *Br Med J* 4:489-93.
- Geisbert TW, Hensley LE, Larsen T, Young HA, Reed DS, Geisbert JB, Scott DP, Kagan E, Jahrling PB, Davis KJ (2003) Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. *Am J Pathol* 163:2347-70.
- Geisbert TW, Jahrling PB (1995) Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res* 39:129-50.
- Geisbert TW, Jahrling PB, Hanes MA, Zack PM (1992) Association of Ebola-related Reston virus particles and antigen with tissue lesions of monkeys imported to the United States. *J Comp Pathol* 106:137-52.
- Glazier K, Raghow R, Kingsbury DW (1977) Regulation of *Sendai* virus transcription: evidence for a single promoter in vivo. *Journal of Virology* 21:863-871.
- Groseth A, Charton JE, Sauerborn M, Feldmann F, Jones SM, Hoenen T, Feldmann H (2009) The *Ebola* virus ribonucleoprotein complex: a novel VP30-L interaction identified. *Virus Res* 140:8-14.
- Gupta KC, Kingsbury DW (1985) Polytranscripts of *Sendai* virus do not contain intervening polyadenylate sequences. *Virology* 141:102-9.
- Hardy RW, Harmon SB, Wertz GW (1999) Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol* 73:170-6.
- Harmon SB, Wertz GW (2002) Transcriptional termination modulated by nucleotides outside the characterized gene end sequence of respiratory syncytial virus. *Virology* 300:304-15.
- Hartlieb B, Modrof J, Mühlberger E, Klenk HD, Becker S (2003) Oligomerization of *Ebola* virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide. *J Biol Chem* 278:41830-6.

- Hartlieb B, Muziol T, Weissenhorn W, Becker S (2007) Crystal structure of the C-terminal domain of *Ebola* virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:624-9.
- Harty RN, Brown ME, Wang G, Huibregtse J, Hayes FP (2000) A PPxY motif within the VP40 protein of *Ebola* virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: Implications for filovirus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13871-6.
- Hiebert SW, Paterson RG, Lamb RA (1985) Identification and predicted sequence of a previously unrecognized small hydrophobic protein, SH, of the paramyxovirus simian virus 5. *J Virol* 55:744-51.
- Hinzman EE, Barr JN, Wertz GW (2002) Identification of an upstream sequence element required for vesicular stomatitis virus mRNA transcription. *J Virol* 76:7632-41.
- Hinzman EE, Barr JN, Wertz GW (2008) Selection for gene junction sequences important for VSV transcription. *Virology* 380:379-87.
- Hoenen T, Groseth A, Kolesnikova L, Theriault S, Ebihara H, Hartlieb B, Bamberg S, Feldmann H, Stroher U, Becker S (2006) Infection of naive target cells with virus-like particles: implications for the function of *Ebola* virus VP24. *J Virol* 80:7260-4.
- Huang Y, Xu L, Sun Y, Nabel GJ (2002) The assembly of *Ebola* virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Mol Cell* 10:307-16.
- Izeni F, Baudin F, Garcin D, Marq J, Ruigrok RWH, Kolakofsky D (2002) Chemical modification of nucleotide bases and mRNA editing depend on hexamer or nucleoprotein phase in *Sendai* virus nucleocapsids. *RNA* 8:1056-67.
- Iverson LE, Rose JK (1981) Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell* .
- Jahrling PB, Geisbert J, Swearengen JR, Jaax GP, Lewis T, Huggins JW, Schmidt JJ, LeDuc JW, Peters CJ (1996b) Passive immunization of *Ebola* virus-infected cynomolgus monkeys with immunoglobulin from hyperimmune horses. *Arch Virol Suppl* 1196379543:135-40.
- Jahrling PB, Geisbert TW, Jaax NK, Hanes MA, Ksiazek TG, Peters CJ (1996a) Experimental infection of cynomolgus macaques with *Ebola-Reston* filoviruses from the 1989-1990 U.S. epizootic. *Arch Virol Suppl* 11:115-34.
- Jasenosky LD, Neumann G, Lukashevich I, Kawaoka Y (2001) *Ebola* virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *J Virol* 75:5205-14.
- John SP, Wang T, Steffen S, Longhi S, Schmaljohn CS, Jonsson CB (2007) *Ebola* virus VP30 is an RNA binding protein. *J Virol* 81:8967-76.
- Johnson KM, Lange JV, Webb PA, Murphy FA (1977) Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* 1:569-71.
- Johnson RF, McCarthy SE, Godlewski PJ, Harty RN (2006) *Ebola* virus VP35-VP40 interaction is sufficient for packaging 3E-5E minigenome RNA into virus-like particles. *J Virol* 80:5135-44.
- Kiley MP, Bowen ET, Eddy GA, Isaacson M, Johnson KM, McCormick JB, Murphy FA, Pattyn SR, Peters D, Prozesky OW, Regnery RL, Simpson DI, Slenczka W, Sureau P, van der Groen G, Webb PA, Wulff H (1982) Filoviridae: a taxonomic home for *Marburg* and *Ebola* viruses? *Intervirology* 18:24-32.

- Kiley MP, Regnery RL, Johnson KM (1980) *Ebola* virus: identification of virion structural proteins. *J Gen Virol* 49:333-41.
- Kindzelskii AL, Yang Z, Nabel GJ, Todd RF, Petty HR (2000) *Ebola* virus secretory glycoprotein (sGP) diminishes Fc gamma RIIIB-to- CR3 proximity on neutrophils. *J Immunol* 164:953-8.
- Kolakofsky D, Boy de la Tour E, Delius H (1974) Molecular weight determination of *Sendai* and Newcastle disease virus RNA. *J Virol* 13:261-8.
- Kolakofsky D, Le Mercier P, Iseni F, Garcin D (2004) Viral DNA polymerase scanning and the gymnastics of *Sendai* virus RNA synthesis. *Virology* 318:463-73.
- Kolakofsky D, Roux L, Garcin D, Ruigrok RW (2005) *Paramyxovirus* mRNA editing, the "rule of six" and error catastrophe: a hypothesis. *J Gen Virol* 86:1869-77.
- Kolesnikova L, Mühlberger E, Ryabchikova E, Becker S (2000) Ultrastructural organization of recombinant *Marburg* virus nucleoprotein: comparison with *Marburg* virus inclusions. *J Virol* 74:3899-904.
- Kuhn JH (2008) *Filoviruses: a compendium of 40 years of epidemiological, clinical, and laboratory studies*. Springer Verlag.
- Kuo L, Fearn R, Collins PL (1996) The structurally diverse intergenic regions of respiratory syncytial virus do not modulate sequential transcription by a dicistronic minigenome. *J Virol* 70:6143-50.
- Lamb RA, Kolakofsky D. (2001). *Paramyxoviridae: the viruses and their replication*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia/New York: Lippincott–Raven. p 1305-1340.
- Lamb RA, Parks GD. (2007) *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. Philadelphia/New York: Lippincott–Raven. p 1449-1484.
- Le Guenno B, Formenty P, Wyers M, Gounon P, Walker F, Boesch C (1995) Isolation and partial characterisation of a new strain of *Ebola* virus. *Lancet* 345:1271-4.
- Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, Souquiere S, Kilbourne A, Froment J, Bermejo M, Smit S, Karesh W, Swanepoel R, Zaki SR, Rollin PE (2004) Multiple *Ebola* virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science* 303:387-90.
- Li J, Rahmeh A, Brusica V, Whelan SPJ (2009) Opposing effects of inhibiting cap addition and cap methylation on polyadenylation during vesicular stomatitis virus mRNA synthesis. *J Virol* 83:1930-40.
- Lobe M. (2007) Funktionelle Charakterisierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des *Ebolavirus Zaire*. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Manicassamy B, Wang J, Jiang H, Rong L (2005) Comprehensive analysis of ebola virus GP1 in viral entry. *J Virol* 79:4793-805.
- Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD (2001) HIV-1 and *Ebola* virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7:1313-9.
- Martinez MJ, Biedenkopf N, Volchkova V, Hartlieb B, Alazard-Dany N, Reynard O, Becker S, Volchkov V (2008) Role of *Ebola* virus VP30 in transcription reinitiation. *J Virol* 82:12569-73.

- Martini GA. 1971. *Marburg* virus disease. In: Martini G, Siegert R, editors. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. p 1-9.
- Masters PS, Samuel CE (1984) Detection of in vivo synthesis of polycistronic mRNAs of vesicular stomatitis virus. *Virology* 134:277-86.
- Mathews DH, Burkard ME, Freier SM, Wyatt JR, Turner DH (1999) Predicting oligonucleotide affinity to nucleic acid targets. *RNA* 5:1458-69.
- Mavrakis M, Kolesnikova L, Schoehn G, Becker S, Ruigrok RW (2002) Morphology of *Marburg* virus NP-RNA. *Virology* 296:300-7.
- McCormick JB, Bauer SP, Elliott LH, Webb PA, Johnson KM (1983) Biologic differences between strains of *Ebola* virus from Zaire and Sudan. *J Infect Dis* 147:264-7.
- Möller P, Pariente N, Klenk HD, Becker S (2005) Homo-oligomerization of *Marburgvirus* VP35 is essential for its function in replication and transcription. *J Virol* 79:14876-86.
- Moudy RM, Harmon SB, Sullender WM, Wertz GW (2003) Variations in transcription termination signals of human respiratory syncytial virus clinical isolates affect gene expression. *Virology* 313:250-60
- Moudy RM, Sullender WM, Wertz GW (2004) Variations in intergenic region sequences of Human respiratory syncytial virus clinical isolates: analysis of effects on transcriptional regulation. *Virology* 327:121-33.
- Mühlberger E (2007) Filovirus replication and transcription. *Future Virology* 2:205-215.
- Mühlberger E, Löffering B, Klenk H, 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, Sanchez A, Randolph A, Will C, Kiley MP, Klenk HD, Feldmann H (1992) The nucleotide sequence of the L gene of *Marburg* virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses. *Virology* 187:534-47.
- Mühlberger E, Trommer S, Funke C, Volchkov V, Klenk H, Becker S (1996) Termini of all mRNA species of *Marburg* virus: sequence and secondary structure. *Virology* 223:376-80.
- Mühlberger E, Weik M, Volchkov VE, Klenk H, 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.
- Mühlberger E. (2004). *Ebola* and *Marburg* viruses: Molecular and cellular biology. In: Feldmann HH, editor. Wymondham, Norfolk: Horizon Scientific Press. p 1-12.
- Neumann G, Watanabe S, Kawaoka Y (2009) Characterization of *Ebolavirus* regulatory genomic regions. *Virus Res.*
- Neumann G, Feldmann H, Watanabe S, Lukashevich L und Kawaoka Y (2002) Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol* 76: 406-410.
- Noda T, Aoyama K, Sagara H, Kida H, Kawaoka Y (2005) Nucleocapsid-like structures of *Ebola* virus reconstructed using electron tomography. *J Vet Med Sci* 67:325-8.
- Normile D (2009) Emerging infectious diseases. Scientists puzzle over *Ebola-Reston* virus in pigs. *Science* 323:451.
- Ogino T, Banerjee AK (2007) Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-de-

- pendent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Mol Cell* 25:85-97.
- Olejnik J (2008) Regulation von Apoptose in Ebolavirus-infizierten Zellen. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Pattyn SR (1978) *Ebola* virus haemorrhagic fever. Elsevier/North.HollandPattyn, S.R, Amsterdam.
- Pennica D, Lynch KR, Cohen PS, Ennis HL (1979) Decay of vesicular stomatitis virus mRNAs in vivo. *Virology* 94:484.
- Peters CJ (1996) Emerging infections--*Ebola* and other filoviruses. *West J Med* 164:36-8.
- Plattet P, Strahle L, le Mercier P, Hausmann S, Garcin D, Kolakofsky D (2007) *Sendai* virus RNA polymerase scanning for mRNA start sites at gene junctions. *Virology* 362:411-420.
- Poch O, Blumberg BM, Bougueleret L, Tordo N (1990) Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71:1153-62.
- Portner A (1982) Synthesis of message and genome RNAs in vitro by *Sendai* virus-infected cell nucleocapsids. *Journal of General Virology* 60:67-75.
- Prins KC, Cardenas WB, Basler CF (2009) *Ebola* virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKKepsilon and TBK-1. *J Virol* 83:3069-77.
- Qanungo KR, Shaji D, Mathur M, Banerjee AK (2004) Two RNA polymerase complexes from vesicular stomatitis virus-infected cells that carry out transcription and replication of genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5952-7.
- Rassa JC, Parks GD (1998) Molecular basis for naturally occurring elevated readthrough transcription across the M-F junction of the paramyxovirus SV5. *Virology* 247:274-86.
- Rassa JC, Parks GD (1999) Highly diverse intergenic regions of the paramyxovirus simian virus 5 cooperate with the gene end U tract in viral transcription termination and can influence reinitiation at a downstream gene. *J Virol* 73:3904-12.
- Regnery RL, Johnson KM, Kiley MP (1980) Virion nucleic acid of *Ebola* virus. *J Virol* 36:465-9.
- Reid SP, Leung LW, Hartman AL, Martinez O, Shaw ML, Carbonnelle C, Volchkov VE, Nichol ST, Basler CF (2006) *Ebola* virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J Virol* 80:5156-67.
- Rima BK, Duprex WP (2009) The measles virus replication cycle. *Curr Top Microbiol Immunol* 329:77-102.
- Rippey JJ, Schepers NJ, Gear JH (1984) The pathology of *Marburg* virus disease. *S Afr Med J* 66:50-4.
- Rollin PE, Williams RJ, Bressler DS, Pearson S, Cottingham M, Pucak G, Sanchez A, Trappier SG, Peters RL, Greer PW, Zaki S, Demarcus T, Hendricks K, Kelley M, Simpson D, Geisbert TW, Jahrling PB, Peters CJ, Ksiazek TG (1999) *Ebola* (subtype *Reston*) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States. *J Infect Dis* 179 Suppl 1:S108-14.
- Ryabchikova E, Kolesnikova L, Smolina M, Tkachev V, Pereboeva L, Baranova S, Grazhdantseva A, Rassadkin Y (1996a) *Ebola* virus infection in guinea pigs:

- presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. *Arch Virol* 141:909-21.
- Ryabchikova E, Strelets L, Kolesnikova L, Pyankov O, Sergeev A (1996b) Respiratory *Marburg* virus infection in guinea pigs. *Arch Virol* 141:2177-90.
- Sanchez A, Kiley MP (1987) Identification and analysis of *Ebola* virus messenger RNA. *Virology* 157:414-20.
- Sanchez A, Kiley MP, Holloway BP, Auperin DD (1993) Sequence analysis of the *Ebola* virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of *Marburg* virus. *Virus Res* 29:215-40.
- Sanchez A, Kiley MP, Holloway BP, McCormick JB, Auperin DD (1989) The nucleoprotein gene of *Ebola* virus: cloning, sequencing, and in vitro expression. *Virology* 170:81-91.
- Sanchez A, Ksiazek TG, Rollin PE, Miranda ME, Trappier SG, Khan AS, Peters CJ, Nichol ST (1999) Detection and molecular characterization of *Ebola* viruses causing disease in human and nonhuman primates. *J Infect Dis* 179 Suppl 199140679:S164-9.
- Sanchez A, Trappier SG, Mahy BW, Peters CJ, Nichol ST (1996) The virion glycoproteins of *Ebola* viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3602-7.
- Sanchez A, Yang ZY, Xu L, Nabel GJ, Crews T, Peters CJ (1998) Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of *Ebola* virus. *J Virol* 72:6442-7.
- Schlenz K. (2002) Untersuchungen zur Struktur des Replikationspromotors des *Ebola*-Virus
Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Schnittler HJ, Feldmann H (1999) Molecular pathogenesis of filovirus infections: role of macrophages and endothelial cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 235/99109262:175-204.
- Schoehn G, Mavrikakis M, Albertini A, Wade R, Hoenger A, Ruigrok RWH (2004) The 12 A structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J Mol Biol* 339:301-12.
- Shuman S (1997) A proposed mechanism of mRNA synthesis and capping by vesicular stomatitis virus. *Virology* 227:1-6.
- Slenczka WG (1999) The *Marburg* virus outbreak of 1967 and subsequent episodes. *Curr Top Microbiol Immunol* 235:49-75.
- Stillman EA, Whitt MA (1997) Mutational analyses of the intergenic dinucleotide and the transcriptional start sequence of vesicular stomatitis virus (VSV) define sequences required for efficient termination and initiation of VSV transcripts. *J Virol* 71:2127-37.
- Stillman EA, Whitt MA (1998) The length and sequence composition of vesicular stomatitis virus intergenic regions affect mRNA levels and the site of transcript initiation. *J Virol* 72:5565-72.
- Sui J, Marasco WA (2002) Evidence against *Ebola* virus sGP binding to human neutrophils by a specific receptor. *Virology* 303:9-14.
- Sutherland KA, Collins PL, Peebles ME (2001) Synergistic effects of gene-end signal mutations and the M2-1 protein on transcription termination by respiratory syncytial virus. *Virology* 288:295-307.
- Towner JS, Khristova ML, Sealy TK, Vincent MJ, Erickson BR, Bawiec DA, Hartman AL, Comer JA, Zaki SR, Ströher U, Gomes da Silva F, del Castillo F, Rollin PE, Ksiazek

- TG, Nichol ST (2006) *Marburgvirus* genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J Virol* 80:6497-516.
- Towner JS, Rollin PE, Bausch DG, Sanchez A, Crary SM, Vincent M, Lee WF, Spiropoulou CF, Ksiazek TG, Lukwiya M, Kaducu F, Downing R, Nichol ST (2004) Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. *J Virol* 78:4330-41.
- Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, Albarino CG, Conlan S, Reeder SA, Quan P, Lipkin WI, Downing R, Tappero JW, Okware S, Lutwama J, Bakamutumaho B, Kayiwa J, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST (2008) Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog* 4:e1000212.
- Tsurudome M, Bando H, Kawano M, Matsumura H, Komada H, Nishio M, Ito Y (1991) Transcripts of simian virus 41 (SV41) matrix gene are exclusively dicistronic with the fusion gene which is also transcribed as a monocistron. *Virology* 184:93-100.
- Varich NL, Lukashevich IS, Kaverin NV (1979) Newcastle disease virus-specific RNA: an analysis of 24 S and 35 S RNA transcripts. *Acta Virol* 23:273-83.
- Villarreal LP, Breindl M, Holland JJ (1976) Determination of molar ratios of vesicular stomatitis virus induced RNA species in BHK21 cells. *Biochemistry* 15:1663-1667.
- Volchkov VE, Becker S, Volchkova VA, Ternovoj VA, Kotov AN, Netesov SV, Klenk HD (1995) GP mRNA of *Ebola* virus is edited by the *Ebola* virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology* 214:421-30.
- Volchkov VE, Chepurnov AA, Volchkova VA, Ternovoj VA, Klenk HD (2000) Molecular Characterization of Guinea Pig-Adapted Variants of *Ebola* Virus. *Virology* 277:147-155.
- Volchkov VE, Volchkova VA, Mühlberger E, Kolesnikova LV, Weik M, Dolnik O, Klenk HD (2001) Recovery of infectious *Ebola* virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* 291:1965-9.
- Wagner RR, Rose JK. (1996). Rhabdoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia/New York: Lippincott-Raven. p 1121-1135.
- Wahl-Jensen V, Kurz SK, Hazelton PR, Schnittler HJ, Stroher U, Burton DR, Feldmann H (2005) Role of *Ebola* virus secreted glycoproteins and virus-like particles in activation of human macrophages. *J Virol* 79:2413-9.
- Wang L, Harcourt BH, Yu M, Tamin A, Rota PA, Bellini WJ, Eaton BT (2001) Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3:279-87.
- Wang Y, McWilliam SM, Cowley JA, Walker PJ (1994) Complex genome organization in the GNS-L intergenic region of Adelaide River rhabdovirus. *Virology* 203:63-72.
- Watanabe S, Noda T, Halfmann P, Jasenosky L, Kawaoka Y (2007) *Ebola* virus (EBOV) VP24 inhibits transcription and replication of the EBOV genome. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S284-90.
- Watanabe S, Noda T, Kawaoka Y (2006) Functional mapping of the nucleoprotein of *Ebola* virus. *J Virol* 80:3743-51.
- Watanabe S, Watanabe T, Noda T, Takada A, Feldmann H, Jasenosky LD, Kawaoka Y (2004) Production of novel *Ebola* virus-like particles from cDNAs: an alternative to ebola virus generation by reverse genetics. *J Virol* 78:999-1005.
- Weik M, Enterlein S, Schlenz K, Mühlberger E (2005) The *Ebola* virus genomic replication

- promoter is bipartite and follows the rule of six. *J Virol* 79:10660-71.
- Weik M, Modrof J, Klenk HD, Becker S, Mühlberger E (2002) *Ebola* Virus VP30-Mediated Transcription Is Regulated by RNA Secondary Structure Formation. *J Virol* 76:8532-9.
- Weik M. (2001) Untersuchungen cis-aktiver Elemente im Genom des *Ebola*-Virus Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Whelan SP, Barr JN, Wertz GW (2004) Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 283:61-119.
- Whelan SPJ (2008) Response to 'Non-segmented negative-strand RNA virus RNA synthesis in vivo'. *Virology* 371:234-7.
- WHO (1978a) *Ebola* haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team. *Bull World Health Organ* 56:247-70.
- WHO (1978b) *Ebola* haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull World Health Organ* 56:271-93.
- WHO (1990) *Ebola* virus. *Wkly Epidemiol Rec* 65:45-7.
- Wilde A, Morrison T (1984) Structural and functional characterization of Newcastle disease virus polycistronic RNA species. *J Virol* 51:71-6.
- Yan Y, Samal SK (2008) Role of intergenic sequences in newcastle disease virus RNA transcription and pathogenesis. *J Virol* 82:1323-31.
- Zaki SR, Goldsmith CS (1999) Pathologic features of filovirus infections in humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 23599109259:97-116.
- Zaki SR, Peters CJ (1997) Viral hemorrhagic fevers. *Diagnostic pathology of infectious diseases*. Appleton Lange, Stamford, Conn 347-364.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406-15.

7 DANKSAGUNG

Ich danke Frau Professor Elke Mühlberger, meiner Doktormutter, ganz besonders für die Betreuung der vorliegenden Arbeit sowie für die wissenschaftliche Unterstützung in den letzten Jahren. Ebenfalls möchte ich ihr für viele motivierende Gespräche, konstruktive Kritik und verlässliche Hilfe und nicht zuletzt für die unglaubliche Chance danken, mit der Arbeit in Boston einen großen – wissenschaftlichen wie auch persönlichen- Blick über den Tellerrand wagen zu können.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Professor Klaus Lingelbach für die Bereitwilligkeit bedanken, die Betreuung meiner Promotion am Fachbereich Biologie so kurzfristig, unkompliziert und unglaublich entgegenkommend zu übernehmen. Außerdem möchte ich ihm für viele sehr motivierende Seminare im Hauptstudium und für eine schöne Zeit in der AG Parasitologie als wissenschaftliche Hilfskraft während des Studiums danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Professor Renate Renkawitz-Pohl und Herrn Professor Hans-Ulrich Mösch, die sich – trotz übervoller Terminkalender - die Zeit nehmen, als Mitglieder meiner Prüfungskommission zur Verfügung zu stehen. Herrn Professor Michael Bölker danke ich für die ursprüngliche Betreuung meiner Arbeit am Fachbereich Biologie und den unkomplizierten Wechsel, um einen passenden Prüfungstermin zu ermöglichen.

Ein ganz besonders großer Dank gilt an dieser Stelle auch Frau Gertrud Pega für die kompetente, rettende und sehr nette Hilfe bei dem –hoffentlich letztlich erfolgreichen- Unterfangen, meine Dissertation von Boston aus einzureichen.

Bei dem Leiter des Instituts für Virologie, Herrn Professor Dr. Stephan Becker, möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die Möglichkeit, meine Arbeit in unserem ehemaligen Labor in Marburg fertig stellen zu können.

Mein Dank gilt ebenfalls der Bischöflichen Studienförderung, dem Cusanuswerk, das meine Promotion finanziell und ideell unterstützt hat. Für die Ausstiege aus dem Laboralltag durch die vielen motivierenden und interessanten Tagungen, Workshops sowie HSG-Veranstaltungen bin ich sehr dankbar. Weiterhin wären die wirklich sehr bereichernden Kongressteilnahmen im Ausland ohne die finanzielle Unterstützung nicht möglich gewesen.

Ganz besonders herzlich möchte ich allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die sehr schöne und lebhaftere Arbeitsatmosphäre danken. Kristina Schmidt, Judith Olejnik, Verena Krähling, Michel Schumann, Melanie Grosch, Dominik Conrad, Steffi Beck, Thorsten Gantke, Monika Strengert, Sven Enterlein, Martina Lobe und allen anderen. Einigen unter ihnen vor allem auch für die schönen Gespräche und tolle Erlebnisse außerhalb von E104 oder +1/63330/63340!! Ein ganz besonders tolles Erlebnis war der unglaublich hilfsbereite und liebe Empfang, den mir die Bostonians unserer AG (Judith, Karsten, Kristina und Dom) in der neuen Heimat bereitet haben.

Die Sicherheitslaborversuche, die in dieser Arbeit enthalten sind, wurden von Elke Mühlberger, Michael Schumann, Verena Krähling und Judith Küsters durchgeführt. Ihnen gilt ein ganz herzlicher Dank für die fantastische Arbeit!!

Für eine tolle und sehr lehrreiche Betreuung während meiner ersten Zeit am Institut für Virologie in der Robert-Koch-Straße danke ich allen damaligen Mitgliedern der AGs Mühlberger und Becker. Hier vor allem Michael Weik, Yannik Boehmann und Katrin Schlenz für die Einarbeitung in die Methoden und Yannik für die Vorarbeiten an meinem Thema. Ebenso bedanke ich mich bei allen Praktikanten (hauptsächlich Antonella Carambia, Anita

Masic und Irine Montilla), die ich während meiner Laborzeit betreuen durfte, für die motivierenden Stunden und das teilweise Mitwirken an meiner Arbeit.

Es gab viele Menschen, die die letzte Zeit in Marburg – ohne große Teile der eigenen AG und mit einfach nicht klappen wollenden Versuchen- erträglicher gemacht und mir vieles sehr erleichtert haben.

Besonders genannt seien dabei natürlich Michel, Melanie und Verena, aber auch die gesamte AG Parasitologie, die viele Versuche überhaupt erst ermöglicht haben (z.B. durch das zur Verfügung stellen ihres Hybridisierungsovens) und ohne die die Wochenenden sehr deprimierend gewesen wären. Besonders die Gespräche mit Dr. Hosam Shams-Eldin, Dr. *Françoise* Debierre-Grockiego und Melli Sauer waren eine große Bereicherung. Ein großer Dank aber wirklich an alle Mitglieder dieser tollen AG für die große Hilfsbereitschaft, immer aufbauende und liebe Worte und Melli Schwalm für die vielen leckeren Zuckersachen.

Weiterhin gilt mein Dank der tollen AG Becker (Nadine, Eva, Larissa, Astrid, Katarina und allen anderen) mit allen ehemaligen Mitgliedern, die durch viele liebe Gespräche, große technische und wissenschaftliche Hilfe und aufbauende Worte am Ende das Vermissen der eigenen AG sehr viel erträglicher gemacht haben. Aber auch allen übrigen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Virologie sei ganz herzlich gedankt für eine tolle Atmosphäre, nette Gespräche und eine schöne Zeit. Dem Institut für Immunologie danke ich recht herzlich für die Mitbenutzung des NanoDrop-Geräts.

Mein besonderer Dank gilt Caro Weise. Für viele rettende Gespräche, eine schöne letzte Zeit gemeinsam im Labor, die geteilte Liebe zum Wald und eine tolle, hoffentlich auch nach dem gemeinsamen Laboralltag andauernde Freundschaft.

Ganz besonders danke ich weiterhin Amélie Rosset, die mich in schlimmen Zeiten niemals alleine gelassen und mir als fantastische Freundin immer treu zur Seite gestanden hat.

Ebenso Sylvia Ewald und Kerstin Hofmann für die große Geduld und die gute Freundschaft.

Marc Grünert und Michael Funke danke ich für viele schöne Stunden (Marc vor allem für die vielen Afrikatipps und geduldiges Zuhören) und das gemeinsame Durchstehen schwieriger Promotionsphasen.

Sebastian Dworok danke ich von Herzen für viele wunderschöne Erinnerungen, den Beitrag an dieser Arbeit und für ein immer wieder rettendes Backup-Programm.

Meiner ganzen Familie ein großes Dankeschön für viel Geduld, liebe und aufbauende Worte, für das in Gedanken beistehen und die ideelle und finanzielle Unterstützung.

Mein größter Dank gilt hierbei meinen Eltern, Doris und Rainer Brauburger, die mich mein ganzes Leben lang und ganz besonders während der Promotion unendlich liebevoll und vorbehaltlos auf jegliche Art und Weise unterstützt haben, die man sich nur wünschen kann!

Der allergrößten aller großen Schwestern, Daniela Berg, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls ganz ausdrücklich danken für ein unermüdliches, liebevolles Aufbauen, eine rosa Schulter zum Anlehnen und alles andere. Ohne sie und meinen lieben Schwager, Uli Berg sowie meine Eltern, wäre im wahrsten Sinne des Wortes nichts möglich gewesen, da sie diese Arbeit gedruckt, gebunden und nach Marburg gebracht haben. DANKE!!

Ich kann in Worten unmöglich ausdrücken, wie viel ich meinem Freund, Stanley Heinze, verdanke, der mit schier unbezwingbarer Geduld, riesigem Durchhaltevermögen, viel Kraft, Liebe und großem Mut immer an uns und mich geglaubt hat. Für eine Rettung in vielfältigster Weise, die Bewahrung der Hoffnung, dass am Ende vielleicht doch alles gut wird und für die Aussicht auf eine wundervolle Zukunft, auf die ich mich mehr als auf alles andere freue!

8 ANHANG

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Taxonomie der Filoviren innerhalb der Ordnung Mononegavirales.....	5
Abbildung 2 : Struktur eines EBOV-Virions (verändert nach: Weik, 2001).....	6
Abbildung 3 : Struktur von Genom, Promotor und Gengrenzen in <i>Zaire Ebolavirus</i>	8
Abbildung 4 : Schematische Darstellung der Genome verschiedener Filoviren.....	10
Abbildung 5 : Schematische Darstellung der Transkription und Replikation in <i>Zaire Ebolavirus</i> ...	13
Abbildung 6 : Aufbau des monocistronischen Minigenoms und Funktionsprinzip des rekonstituierten EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystems	18
Abbildung 7 : Aufbau des bicistronischen Minigenoms.....	19
Abbildung 8 : Schematische Darstellung der drei verwendeten bicistronischen Minigenome.....	33
Abbildung 9 : Schematische Darstellung des Northern-Blot-Aufbaus.	39
Abbildung 10 : Vergleich einer CAT-Reaktion mit Chloramphenicol und Deoxychloramphenicol...	52
Abbildung 11 : Struktur und Sequenz der untersuchten Gengrenzen von <i>Zaire Ebolavirus</i>	55
Abbildung 12 : Nachweis von virusspezifischer mRNA	57
Abbildung 13 : Gebildete mRNA-Spezies bei Transkription bicistronischer Minigenome	58
Abbildung 14 : Transkription von bicistronischen Minigenomen in ZEBOV-infizierten Zellen.....	59
Abbildung 15 : Transkriptionsanalyse der bicistronischen Minigenome im Ebolavirus-spezifischen rekonstruierten Replikations- und Transkriptionssystem	61
Abbildung 16 : Substitution der intergenischen Region an der Gengrenze zwischen dem NP- und VP35-Gen	63
Abbildung 17 : Verkürzung und Deletion der intergenischen Region an der Gengrenze zwischen dem NP- und VP35- Gen.....	64
Abbildung 18 : Verlängerung der intergenischen Region an der Gengrenze zwischen dem NP- und VP35-Gen	65
Abbildung 19 : Anpassung der Sequenz der intergenische Region in Minigenom Bici NP/VP35 an eine natürlich vorkommende Sequenz und weitere Verlängerung	67
Abbildung 20 : Übersicht der CAT-Assay-Ergebnisse aller IR-Mutanten der Gengrenze zwischen erstem und zweitem Gen.....	68
Abbildung 21 : Verlängerung und Deletion der intergenischen Region an der GG VP30/VP24.....	71
Abbildung 22 : Verkürzung der intergenischen Region an der Grenze zwischen dem VP30- und VP24-Gen	72
Abbildung 23 : Verkürzung der intergenischen Region an der Grenze der Gene VP30 und VP24 und Anpassung an die Wildtyp-Sequenz	73

Abbildung 24 : Untersuchung eines bicistronischen Minigenoms mit einer intergenischen Region von 20 Nukleotiden in der Virusinfektion	74
Abbildung 25 : Substitution der 10nt langen intergenischen Region im bicistronischen Minigenom.	75
Abbildung 26 : Übersicht der CAT-Aktivitäten aller IR-Mutanten der Gengrenze zwischen fünftem und sechstem Gen	76
Abbildung 27 : Mutation überlappender Transkriptionssignale	79
Abbildung 28 : Trennung der überlappenden Transkriptionssignale.....	80
Abbildung 29 : Vergleich der Transkriptionssignale sowie intergenischen Regionen verschiedener nichtsegmentierter negativ-strängiger RNA Viren.	83
Abbildung 30 : Sequenzvergleich der untersuchten GGs in verschiedenen Filoviren.....	86
Abbildung 31 : Sekundärstrukturen der GG zwischen VP30- und VP24-Gen.....	93
Abbildung 32 : Modell zur NP-Phasen-abhängigen Erkennung der Transkriptionsstartsignale	95
Abbildung 33 : Schema der entstehenden mRNAs an GG VP35/VP40 bei Transkription mutierter Minigenome mit stromaufwärts verschobenem Startsignal.....	99

8.2 Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	analysis of variance
Bici	bicistronisches Minigenom
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CIEBOV	<i>Côte d'Ivoire Ebolavirus</i>
EBOV	Ebolavirus
GG	Gengrenze
GGs	Gengrenzen
GP	Glycoprotein
IR	intergenische Region
IRs	intergenische Regionen
L	virale Polymerase (L = large)
MARV	Marburgvirus
NNS RNA-Viren	nichtsegmentierte negativsträngige RNA-Viren
NP	Nukleoprotein
nt	Nukleotid(e)
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
Rd	readthrough

REBOV	<i>Reston Ebolavirus</i>
RNP	Ribonucleoproteinkomplex
RdRp	RNA abhängige RNA-Polymerase
SEBOV	<i>Sudan Ebolavirus</i>
SeV	Sendaivirus
VP X	virales Protein X (X = Molekulargewicht in kD)
VSV	vesikuläres Stomatitis-Virus
ZEBOV	<i>Zaire Ebolavirus</i>

8.4 Lebenslauf

KRISTINA BRAUBURGER

48 Dwight Street #5,
Brookline, 02446, MA, USA
(01-617) 6060 542
brauburk@bu.edu

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Geburtsdatum: 25.01.1980

Geburtsort: Friedberg

Familienstand: ledig

SCHUL- UND BERUFSAUSBILDUNG

- | | |
|-------------------|--|
| 1986 – 1990 | Fritz-Erler-Schule
Grundschule des Wetteraukreises in Wöllstadt |
| 1990 – 1999 | St. Lioba-Schule Bad Nauheim
staatlich anerkanntes Gymnasium in kirchlicher Trägerschaft
Leistungskurse: Biologie, Französisch
Allgemeine Hochschulreife, Durchschnittsnote: 2,1 |
| 1999 – 2004 | Studium der Biologie
Philipps Universität Marburg
Hauptfächer: Virologie, Parasitologie, Genetik
Abschluss: Diplom, Ausgezeichnet (1,0) |
| 12/2003 – 09/2004 | Diplomarbeit
Institut für Virologie
Betreuerin: PD Dr. Elke Mühlberger
Thema: „Untersuchung regulatorischer Elemente im Genom des Zaire
Ebolavirus“
Abschluss: Diplom, Ausgezeichnet (1,0) |
| seit 05/2005 | Promotion
Institut für Virologie
Betreuerin: PD Dr. Elke Mühlberger
Thema: „Die Rolle der Gengrenzen in der Transkriptionsregulation von
Zaire Ebolavirus“ |

seit 06/2009 **Research Scholar**
Department of Microbiology
Boston University School of Medicine

WISSENSCHAFTLICHE WEITERBILDUNG

08/1999 – 09/1999 **Praktikum zur Studiumsorientierung**

Max Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung
W.G. Kerckhoff- Institut
Abteilung für Molekulare Zellbiologie
Betreuer: Dr. Friedemann Kiefer, E-Mail: fkiefer@gwdg.de

07/2001 – 08/2001 **Studentische Hilfskraft**

10/2000 – 11/2000 **Max Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung**
02/2000 – 03/2000 **W.G. Kerckhoff- Institut**
Abteilung für Molekulare Zellbiologie
Betreuer: Dr. Friedemann Kiefer, E-Mail: fkiefer@gwdg.de

05/2002 – 10/2002 **Praktikum/Studentische Hilfskraft**
Philipps-Universität Marburg
Arbeitsgruppe Parasitologie
Betreuer: PD Dr. Frank Seeber, E-Mail: seeberfr@staff.hu-berlin.de

11/2004 – 04/2005 **Virologisches Praktikum**
Institute of Virology, Glasgow, Schottland
Betreuer: Prof. Dr. Richard Elliott, E-Mail: rme1@st-andrews.ac.uk

STIPENDIEN

05/2005-05/2008 **Promotionsstipendium**
Cusanuswerk (Bischöfliche Studienförderung)

03/2008 **Reisekostenstipendium**
Glaxo Smith Kline Stiftung für die Teilnahme am „IV. International Symposium on Filoviruses“ in Libreville, Gabun, Zentralafrika.

VERÖFFENTLICHUNGEN UND PRÄSENTATIONEN

Veröffentlichungen

Shi, X., **Brauburger, K.** and Elliott, R. M. „Role of N-linked glycans on bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity.” J Virol. 2005 Nov; 79 (21): 13725-34.

Präsentationen

Brauburger, K., Boehmann, Y. and Mühlberger, E. „The role of cis-acting elements in transcription of Zaire Ebola virus.“
Vortrag, Seminar des Sonderforschungsbereichs 535, Juli 2005, Gießen.

Brauburger, K. „Molekularbiologische Untersuchung des Zaire Ebolavirus.“ Vorstellung des Promotionsprojekts.
Vortrag, Graduiertentagung des Cusanuswerks, November 2005, Papenburg.

Brauburger, K., Boehmann, Y. and Mühlberger, E. „The role of cis-acting elements in transcription of Zaire Ebola virus.“ Vortrag,
Virologisches Seminar der Philipps Universität Marburg, Februar 2006, Marburg.

Brauburger, K., Boehmann, Y. and Mühlberger, E. „Transcriptional regulation of Ebola virus: analysis of the gene borders.“
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, März 2006, München.

Brauburger, K., Boehmann, Y. and Mühlberger, E. „Transcriptional regulation of Ebola virus: analysis of the gene borders.“
Posterpräsentation, 13th International Conference on Negative Strand Viruses, Juni 2006, Salamanca, Spanien.

Brauburger, K. „Molekularbiologische Untersuchung des Zaire Ebolavirus.“ Vorstellung des Promotionsprojekts. Vortrag,
Graduiertentagung des Cusanuswerks, Oktober 2006, Schwerte.

Brauburger, K., Conrad, D., Boehmann, Y. and Mühlberger, E. „Role of the gene borders in regulation of Ebola virus transcription.“
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, März 2008, Heidelberg.

Brauburger, K., Boehmann, Y. and Mühlberger, E. „Role of the gene borders in regulation of Ebola virus transcription.“ Posterpräsentation,
4th International Symposium on Filoviruses, März 2008, Libreville, Gabun, Afrika.

8.5 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die Rolle der Gengrenzen in der Transkriptionsregulation von *Zaire Ebola*virus“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Ort/Datum

Kristina Brauburger