

Strukturelle Charakteristika des Ebola-Virus- VP30 und deren funktionelle Bedeutung

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
vorgelegt von

Jens Modrof
aus Königswinter

Marburg/Lahn 2002

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 1999 bis November 2001 am Institut für Virologie des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. H.-D. Klenk durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie

Der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

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

Tag der Disputation: 14.02.02

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Publikationen erstellt:

Modrof, J., Möritz, C., Kolesnikova, L., Konakova, T., Hartlieb, B., Randolph, A., Mühlberger, E. & Becker, S. (2001). Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. *Virology* **287**, 171-82.

Modrof, J., Mühlberger, E., Klenk, H.-D. & Becker, S. Phosphorylation of VP30 differentially influences Ebola virus transcription and binding to NP induced inclusions. Submitted.

Weik, M., Modrof, J., Becker, S. & Mühlberger, E. The Ebola virus nucleocapsid protein VP30 is a transcription initiation factor. In preparation.

Die Arbeit wurde auf folgenden Kongressen und Tagungen präsentiert:

Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie

April 2000, Wien, Österreich

Modrof, J., Mühlberger E. & Becker S. Ebola-Virus VP30: Untersuchungen zur Funktion der Phosphorylierung. (Poster).

11th International Conference on Negative Strand Viruses

Juni 2000, Quebec City, Canada

Modrof, J., Mühlberger E. & Becker S. N-terminal phosphorylation of Ebola virus VP30 influences binding to NP. (Poster).

Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie

April 2001, Dresden

Modrof, J., Mühlberger E. & Becker S. Das Ebola-Virus VP30 hat abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus unterschiedliche Funktionen. (Vortrag).

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	2
2 Einleitung	3
2.1 Das Ebola-Virus	3
2.1.1 Epidemiologie	3
2.1.2 Klinik	4
2.1.3 Taxonomie Morphologie und Genomstruktur	5
2.1.4 Therapie und Prophylaxe	6
2.1.5 Replikationszyklus	7
2.1.6 Ebola-Virus-Proteine	7
2.2 Reverse Genetik zur Untersuchung des Ebola-Virus	9
2.3 Die Bedeutung von Zink für die Funktion von Proteinen	10
2.3.1 Zinkfinger-vermittelte Bindung an DNA	10
2.3.2 Zinkfinger-vermittelte Protein-Protein Interaktionen	10
2.3.3 Das Zinkfingermotiv bei Viren	11
2.4 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen	11
2.4.1 Proteinkinasen	11
2.4.2 Proteinphosphatasen	12
2.4.3 Inhibitoren von Serin-/Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen	13
2.4.4 Phosphorylierung und Dephosphorylierung viraler Proteine	13
2.5 Problemstellung	15

3	Material und Methoden	16
3.1	Verwendete Materialien	16
3.2	Molekularbiologische Methoden	18
3.2.1	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	18
3.2.2	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	18
3.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten in vektorielle DNA	19
3.2.4	Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	20
3.2.5	Plasmidpräparation	20
3.2.6	Automatische Sequenzierung von DNA	21
3.2.7	Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Ketten-Reaktion	22
3.2.8	Ortsgerichtete in vitro-Mutagenese von DNA	23
3.3	Zellbiologische Methoden und bakterielle Proteinexpression	25
3.3.1	Kultur von HeLa- , Vero- und BSR T7/5-Zellen	25
3.3.2	Infektion von Vero-Zellen mit Ebola-Virus für anschließende Immunfluoreszenz	25
3.3.3	Herstellung eines MVA-T7 Virusstocks	26
3.3.4	Expression von Fremdgenen mit dem MVA-T7 Expressionssystem	26
3.3.5	Metabolische Markierung mit [³⁵ S]-Methionin/[³⁵ S]-Cystein oder [³² P]-Orthophosphat	27
3.3.6	Immunpräzipitation	27
3.3.7	Indirekte Immunfluoreszenz	28
3.3.8	Das Ebola-Virus-spezifische Transkriptionssystem	29
3.3.9	Bakterielle Expression von Glutathion S-Transferase-Fusionsproteinen und Reinigung über Glutathion Sepharose	30
3.3.10	Quantifizierung der zellulären Proteinbiosynthese unter dem Einfluss von Okadainsäure	31
3.3.11	Quantifizierung der NP-Synthese Ebola-Virus infizierter Vero-Zellen unter dem Einfluss von Okadainsäure	32
3.4	Biochemische Methoden	33
3.4.1	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	33
3.4.2	Nachweis radioaktiver Signale	33
3.4.3	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)	34
3.4.4	Proteindetektion mit Chemiluminiszenz	34
3.4.5	Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität	35
3.4.6	Phosphoaminosäure-Analyse	36
3.4.7	Zink-Nachweis	37
3.4.8	Proteinbestimmung	37
3.4.9	Ameisensäureverdau	38
3.4.10	Dephosphorylierung des VP30 mit HeLa-Zelllysate	38
3.4.11	Dephosphorylierung des VP30 mit Proteinphosphatasen	39

4	Ergebnisse	41
4.1	VP30 ist mit dem Nukleokapsidkomplex assoziiert und fungiert als Transkriptionsaktivator	41
4.1.1	Die Interaktion des VP30 mit NP-induzierten Einschlusskörpern	41
4.1.2	Eingrenzung des Bereichs auf dem VP30 für die Bindung an NP-induzierte Einschlusskörper	43
4.1.3	Transkriptionsaktivierung durch VP30-Deletionsmutanten	45
4.2	Das VP30 besitzt ein Zink-bindendes Motiv	46
4.2.1	Die Konstruktion von Glutathion S-Transferase-VP30-Fusionsproteinen	46
4.2.2	Die Bindung von Zink an den Aminosäurebereich 68 – 95 des VP30	48
4.2.3	Die Bindung von Zink an den mutierten Bereich 68 – 95 des VP30	51
4.2.4	Die Bedeutung des Zinkfingermotivs für die Bindung des VP30 an NP-induzierte Einschlusskörper	53
4.2.5	Transkriptionsaktivierung durch VP30-Mutanten mit zerstörtem Zink-bindenden Motiv	54
4.3	Das VP30 bildet Multimere	56
4.3.1	Untersuchungen zur Stöchiometrie der VP30-Multimere	56
4.3.2	Eingrenzung der Multimerisierungsdomäne auf dem VP30	57
4.3.3	Die Zerstörung des Leucinclusters innerhalb der AS 100 – 102 und die Oligomerisierung des VP30	59
4.3.4	Die Bedeutung der AS 100 – 102 für die Bindung an NP-induzierte Einschlusskörper	61
4.3.5	Die Bedeutung der AS 100 – 102 für die Transkriptionsaktivierung durch VP30	61
4.4	Charakterisierung der Phosphorylierung des VP30	63
4.4.1	Die Phosphoaminosäuren des VP30	63
4.4.2	Proteolytischer Verdau des VP30	64
4.4.3	Der Phosphorylierungsstatus von VP30-Substitutionsmutanten	65
4.4.4	Der Einfluss der Phosphorylierung des VP30 auf die Bindung an NP-induzierte Einschlusskörper	67
4.4.5	Der Einfluss der Serin-Phosphorylierung des VP30 auf dessen transkriptionsaktivierende Funktion	68
4.5	Der Einfluss von Okadainsäure auf Ebola-Virus-spezifische Transkription	70
4.5.1	Okadainsäure inhibiert die Dephosphorylierung des VP30 durch zelluläre Phosphatasen	70
4.5.2	Die Phosphatasen PP1 und PP2A erkennen das VP30 als Substrat	71
4.5.3	Okadainsäure inhibiert die EBOV Transkription	72
4.5.4	VP30 _{S29-46A} kann den Verlust VP30-vermittelter Transkription durch Okadainsäure komplementieren	74
4.5.5	Die Konzentrationsabhängigkeit der Transkriptionsaktivierung durch VP30 _{S29-46D}	75
4.5.6	Der Einfluss von Okadainsäure auf die virale Proteinbiosynthese	76

5	Diskussion	78
6	Literatur	87
7	Anhang	97

Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
DRC	Demokratische Republik Kongo
DTT	1,4-Dithiothreit
EBOV	Ebola-Virus
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GP	Glykoprotein
GSH	Glutathion-Sepharose
GST	Glutathion S-Transferase
HIV	Humanes-Immundefizienz-Virus
IC ₅₀	Konzentration 50%iger Inhibition
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
NNS	nichtsegmentiert, negativ orientiert, einzelsträngig
NP	Nukleoprotein
ntr	nichttranskribierte Region
MBGV	Marburg-Virus
m.o.i.	multiplicity of infection
MVA	Modified Vaccinia-Virus Ankara
OA	Okadainsäure
PAR	4-(2-Pyridylazo)resorcinol
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PKA	cAMP-abh. Proteinkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD-	Peroxidase-gekoppelt
PP	Proteinphosphatase
PS / PT / PY	Phosphoserin / Phosphothreonin / Phosphotyrosin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sGP	kleines GP
VP	Virusprotein

2 Einleitung

2.1 Das Ebola-Virus

Das Auftreten von unbekanntem Krankheitserregern oder Erregern mit neuen pathogenen Eigenschaften führte während der letzten Jahre zur Definition des Begriffs der „emerging diseases“. Zu den Erregern dieser Erkrankungen gehören beispielsweise Influenza-, Lassa-, Hanta-, Nipah-, Marburg- und Ebola-Viren. Viele dieser Viren lösen ein hämorrhagisches Fieber aus, das häufig zum Tode der Patienten führt. Eine auffällige Gemeinsamkeit dieser Erreger ist, dass sie alle ein RNA-Genom besitzen. Möglicherweise führen die hohen Mutationsraten, die diese Viren besitzen, im Zusammenhang mit zunehmenden globalen und lokalen Umgestaltungen von Landschaften und einer ansteigenden Bevölkerungsfluktuation in diesem Jahrhundert zu einem gehäuftem Auftreten von emerging diseases. (Nichol et al., 2000)

2.1.1 Epidemiologie

In der zweiten Hälfte des Jahres 1976 ereigneten sich in den äquatorialen Provinzen von Sudan und Zaire (heute: Demokratische Republik Kongo, DRC) simultan zwei Epidemien schweren hämorrhagischen Fiebers. Insgesamt traten über 600 Fälle auf; die Mortalitätsrate variierte zwischen 53% und 88% (Johnson et al., 1977; WHO, 1978a, 1978b). Als Erreger dieser Erkrankungen wurden Viren isoliert, die nach einem Fluss in der DRC Ebola-Viren (EBOV) genannt wurden. Erstaunlicherweise handelte es sich nicht um identische Viren, sondern zwei Spezies (EBOV-Zaire und EBOV-Sudan), die sich bezüglich Pathogenität und Antigenität unterschieden. Diese Isolate waren dem Marburg-Virus (MBGV), das im Jahr 1967 in Marburg als Erreger eines fulminanten hämorrhagischen Fiebers identifiziert worden war, morphologisch sehr ähnlich (Martini & Siebert, 1971). MBGV und EBOV wurden taxonomisch in eine Familie gruppiert und sind bislang auch die einzigen Vertreter der Familie Filoviridae.

In den folgenden Jahren nach 1976 ereigneten sich weitere EBOV-Ausbrüche, beispielsweise in Kikwit / DRC im Jahre 1995 oder im Norden von Uganda im Jahre 2000 (Feldmann et al., 1996a; CDC, 2001). Seit Dezember 2001 wird ein erneuter Ausbruch von EBOV aus Gabun und angrenzenden Gebieten des Kongo gemeldet (WHO, 2002).

Der natürliche Wirt der Filoviren ist trotz intensiver Studien bis heute unbekannt. Obwohl Affen an der Verbreitung der Viren beteiligt sind, stellen sie vermutlich nicht den natürlichen Wirt von EBOV dar, da experimentell infizierte Affen ausnahmslos an den Infektionen

verstarben (Fisher-Hoch & McCormick, 1999; Fisher-Hoch et al., 1992; Ryabchikova et al., 1999). Im Verdacht stehen Fledermäuse, die nach einer Infektion EBOV mit dem Kot ausscheiden, jedoch keine Anzeichen für eine Erkrankung aufweisen (Swanepoel et al., 1996).

2.1.2 Klinik

Das EBOV ruft ein schweres hämorrhagisches Fieber hervor. Die Krankheit beginnt mit plötzlichem hohem Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Erbrechen und häufig auch abdominellen Beschwerden. Auch Halsschmerzen und Mundtrockenheit treten auf. (Bwaka et al., 1999 ; Baron et al., 1983; WHO, 1978a). Bei manchen Patienten treten neurologische Begleitsymptome auf, die sich vorwiegend in Verwirrheitszuständen äußern.

Bei der klinischen Erstuntersuchung wird eine auffallende Apathie beschrieben und bei der Hälfte der Fälle ein rubeoliformes Exanthem, welches im späteren Krankheitsverlauf eine Hautschuppung zur Folge hat. Hämorrhagische Manifestationen finden sich bei 70-80% der Erkrankten. Der dafür verantwortliche Thrombozytenabfall ist ebenso wie eine Serumtransaminasenerhöhung an pathologischen Laborwerten feststellbar. Die Hämorrhagien beruhen vermutlich auf einer erhöhten Durchlässigkeit der Endothelien, die durch eine verstärkte Zytokinausschüttung infizierter Makrophagen hervorgerufen werden könnte. Des weiteren wird diskutiert, ob die Infektion der Endothelzellen selbst die Zerstörung der Zellen hervorruft und so die Integrität der Gefäßwand zerstört (Feldmann et al., 1996b; Ströher et al., 2001). Der Tod durch unkontrollierbares Multiorganversagen und hypovolämischen Schock tritt 6 bis 9 Tage nach Beginn der ersten klinischen Symptome ein. In den letal verlaufenden Fällen treten eine Verbrauchskoagulopathie und Schock auf. Bei den Überlebenden dauerte die Erkrankung durchschnittlich 12 - 22 Tage (Becker, 2000).

Bei letalem Verlauf der EBOV-Infektionen ist die spezifische Immunantwort der Patienten nur sehr schwach ausgeprägt. Bis zum Zeitpunkt des Todes wurden keine antiviralen IgG detektiert (Ksiazek et al., 1999; Baize et al., 1999). Bei Überlebenden und asymptomatischen Fällen wurden IgM- und IgG-Antikörper sowie Hinweise auf die Aktivierung cytotoxischer T-Zellen gefunden (Leroy et al., 2001).

2.1.3 Taxonomie, Morphologie und Genomstruktur

Das Genom der Filoviridae besteht aus einem Molekül einzelsträngiger RNA in negativer Orientierung (NNS-RNA). Daher werden die Filoviren zusammen mit den Rhabdo-, Paramyxo- und Bornaviridae in der Ordnung Mononegavirales zusammengefasst (Abb. 1).

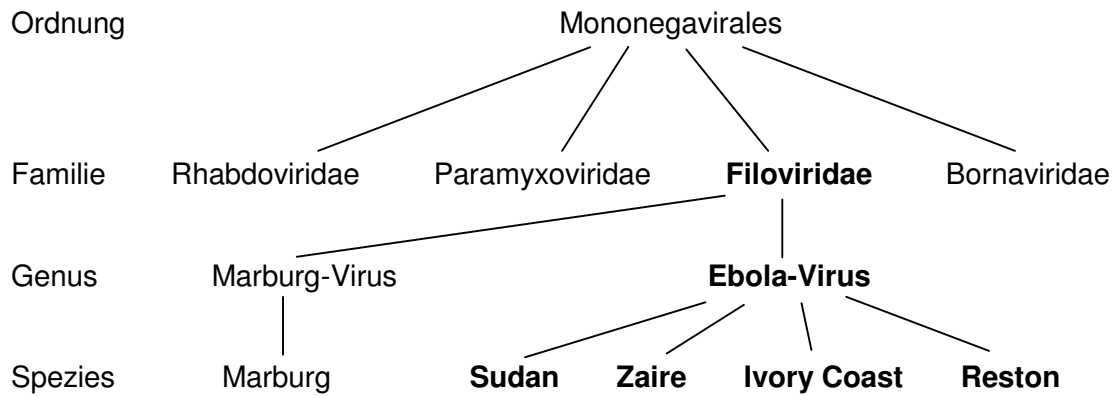


Abb. 1: Taxonomie der Filoviridae. (ICTV, 2001)

Das EBOV ist membranumhüllt und von filamentöser Gestalt, wobei die Virionen meist langgestreckt sind (Abb. 2).

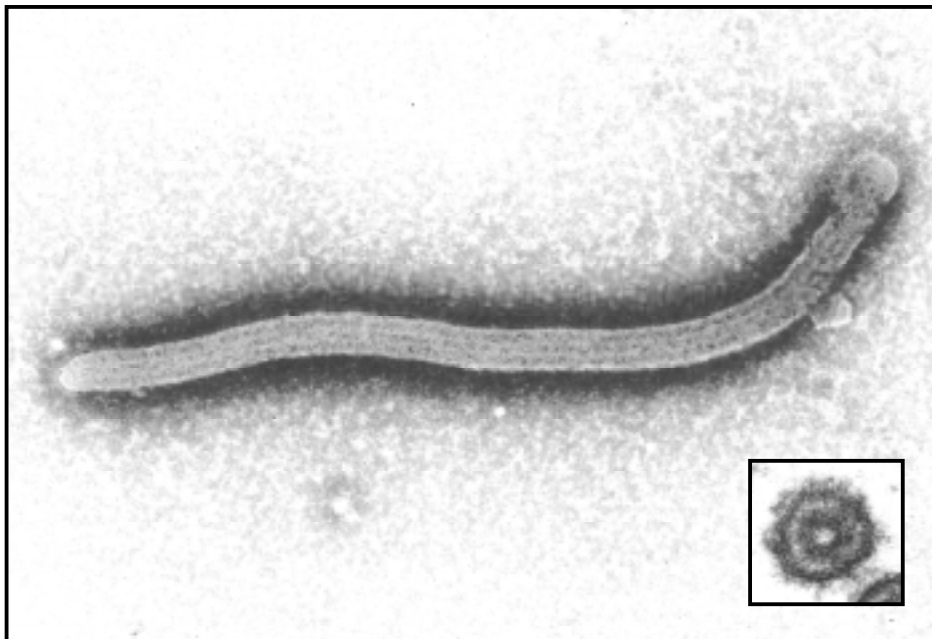


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBOV-Partikels mit Querschnitt durch ein Virion. Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure, 80000-fache Vergrößerung (zur Verfügung gestellt von Dr. L. Kolesnikova)

Während der Durchmesser der Virionen konstant 80 nm beträgt, ist ihre Länge variabel (bis 14000 nm). Durchschnittlich beträgt die Länge 970 nm. In die virale Membran, die sich von

der Plasmamembran der Wirtszelle ableitet, ist als einziges Oberflächenprotein das Glykoprotein (GP) eingelagert. Zwischen Virusmembran und Nukleokapsidkomplex befinden sich zwei Matrixproteine, VP24 und VP40 (VP steht für Virus-Protein). Der Nukleokapsidkomplex besteht aus 4 viralen Strukturproteinen (Nukleoprotein [NP], VP35, VP30 und L) und der genomischen RNA.

Diese ist etwa 19 kb lang und enthält 7 Gene in folgender Reihenfolge:

3' ntr – **NP** – **VP35** – **VP40** – **GP** – **VP30** – **VP24** – **L** – ntr 5'

Das GP-Gen kodiert als einziges für 2 Proteine: das Strukturprotein GP und ein kleines lösliches GP (sGP), das nicht mit dem Virion assoziiert ist. Das sGP ist das primäre Translationsprodukt. Das Volle-Länge-GP entsteht durch RNA-Editing, wobei in etwa 20% der Transkripte ein zusätzlicher Adenin-Rest, innerhalb eines Clusters von 7 Adenin-Resten, in die GP-mRNA eingefügt wird (Volchkov et al., 1995).

Die Gene weisen an ihren Enden nichtkodierende Regionen auf und sind entweder durch intergenische Regionen getrennt oder überlappen einander. Diese Überlappungen umfassen meist die hoch konservierten Transkriptionsstart- und Transkriptionsstoppsignale, die alle Gene flankieren (3'-UAAUU-5'). An den Genomenden befinden sich ausgedehnte nichttranskribierte Sequenzen (ntr), die alle cis-aktiven Signale für Replikation und Enkapsidierung des Genoms (durch das NP) enthalten.

Die genomische RNA ist per se nicht infektiös.

2.1.4 Therapie und Prophylaxe

Eine spezifische antivirale Therapie gegen Filoviren gibt es bislang nicht. Allerdings konnte durch den Einsatz von Adenosinanaloga eine Inhibition der EBOV-Replikation in Zellkultur erreicht werden. Dieser Effekt geht wahrscheinlich auf die Blockade der zellulären S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase zurück (Bray et al., 2000).

Zur Entwicklung einer Vakzine gegen Ebola-Virus wurden in jüngster Zeit verschiedene Strategien verfolgt. Ein passiver Schutz gegen eine tödliche Infektion von Mäusen konnte erreicht werden durch Übertragung monoklonaler Antikörper gegen das EBOV-GP oder cytotoxischer T-Zellen, die gegen das EBOV-NP gerichtet waren (Wilson et al., 2000; Wilson & Hart, 2001).

Eine aktive Immunisierung gegen EBOV war mittels DNA-Vakzinierung ebenfalls möglich, wobei als virale Antigene GP und NP dienten (Vanderzanden et al., 1998; Xu et al., 1998). Durch diese Strategie konnten Mäuse und Meerschweinchen vor einer Infektion mit EBOV geschützt werden.

Der Schutz von Primaten gelang 1998, als Cynomolgus-Affen mit einem rekombinanten Alphavirusreplikon inokuliert worden waren, über das die MBGV-Proteine GP und NP exprimiert wurden (Hevey et al., 1998). Dieselben Antigene des EBOV wurden in dem bisher vielversprechendsten Versuch eingesetzt, als eine Kombination aus DNA-Immunisierung und Infektion mit einem rekombinanten Adenovirusvektor zu einer zellulär- und humoral-vermittelten Immunität von Cynomolgus-Affen führte (Sullivan et al., 2000).

2.1.5 Replikationszyklus

Die Vermehrung der Filoviren findet im Zytoplasma der infizierten Zelle statt (Feldmann & Kiley, 1999). Zunächst werden polyadenylierte, monocistronische mRNAs gebildet (Transkription), die dann von der zellulären Translationsmaschinerie in Proteine übersetzt werden. Die Replikation des Genoms erfolgt wahrscheinlich erst dann, wenn genügend virale Proteine (NP) gebildet wurden, um die neu synthetisierte RNA zu enkapsidieren (Kolakofsky et al., 1991). Bei EBOV sind neben der genomischen RNA drei Proteinkomponenten des Nukleokapsidkomplexes notwendig, um Replikation zu vermitteln (NP, VP35 und L). Für die virale Transkription ist zusätzlich das vierte Nukleokapsidprotein, VP30, essentiell (Mühlberger et al., 1999). Die Neusynthese des Genoms erfolgt über die Synthese von antigenomischer RNA, die dann als Template für die Synthese der genomischen RNA dient. Genomische und antigenomische RNA wird im Gegensatz zu den mRNAs vom NP enkapsidiert.

2.1.6 Ebola-Virus-Proteine

Vom Genom des EBOV werden 8 Proteine kodiert, von denen 7 Strukturproteine darstellen. Die viralen Proteine können in 3 Gruppen eingeteilt werden:

Das GP und davon abgeleitete Proteine

Das einzige Oberflächenprotein ist das GP (676 Aminosäuren [AS], 150 kDa), das posttranslational durch die Prohormonkonvertase Furin in die Untereinheiten GP₁ (140 kDa) und GP₂ (26 kDa) gespalten wird (Volchkov et al., 1998). Die Untereinheiten bleiben über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (GP_{1,2}). Das GP_{1,2} ist als Trimer in die Membranhülle des Virions inseriert (Sanchez et al., 1998). Die Adsorption und Aufnahme des Virus in die Zielzelle wird durch das GP vermittelt. Dieses kann an den zellulären Folsäure-Rezeptor- α binden, der dann die Aufnahme der Viren in die Zelle vermitteln kann. Darüber hinaus wird eine Beteiligung von β 1-Integrinen an der Endozytose der Viren diskutiert (Chan et al., 2001; Takada et al., 2000).

Von der nichteditierten mRNA des GP-Gens wird das kleine Glykoprotein sGP (364 AS) synthetisiert, das zunächst als endoplasmatischer Vorläufer (sGP_{er}) vorkommt und dann in das reife sGP und das Fragment Δ -Peptid gespalten wird (Volchkova et al., 1999). sGP und Δ -Peptid werden in hohen Mengen von der infizierten Zelle sekretiert. Man vermutet, dass sGP als Köder dient, um neutralisierende Antikörper gegen das GP zu binden und so die spezifische immunologische Abwehr zu schwächen. Zusätzlich wurde berichtet, dass rekombinant exprimiertes sGP an Neutrophile bindet, was möglicherweise deren Aktivierung verhindert (Yang et al., 1998).

Matrixproteine

VP40 und VP24 sind die Matrixproteine des EBOV. Das VP40 (326 AS) wird aufgrund der Lage des kodierenden Gens auf dem Genom und seines mengenmäßigen Vorkommens in Virionen als Homologon der Matrixproteine M anderer NNS-RNA-Viren betrachtet (Peters et al., 1996). Man nimmt an, dass das VP40 eine zentrale Rolle bei der Morphogenese neuer viraler Partikel spielt, indem es einerseits eng mit den Nukleokapsiden assoziiert ist und andererseits mit der negativ geladenen Plasmamembran interagiert (Ruigrok et al., 2000). Unterhalb der viralen Membran bildet das VP40 eine dicht gepackte Schicht (Geisbert & Jahrling, 1995; Kolesnikova et al., 2002).

Das VP24 (251 AS) ist als zweites Matrixprotein einzigartig bei Filoviren (Elliott et al., 1985). Seine genaue Funktion ist bislang unbekannt, jedoch konnte für MBGV eine Assoziation des VP24 mit dem zytoplasmatischen Teil des GP gezeigt werden (Sänger, 2000).

Die Nukleokapsid-assoziierten Proteine

Die Proteine NP, VP35, VP30 und L sind die Proteinkomponenten des Nukleokapsidkomplexes, der die genomische RNA umhüllt. Das NP (739 AS) determiniert die Struktur des Nukleokapsides indem es durch Selbstassemblierung Helices ausbildet, die die genomische RNA enkapsidieren. Das NP ist stark phosphoryliert, und vom MBGV-NP ist bekannt, dass es nur in phosphorylierter Form in Virionen eingebaut wird (Becker et al., 1994). Der nicht-phosphorylierte N-terminale Teil des MBGV-NP hat eine hohe Sequenzhomologie mit dem EBOV-NP, während der stark saure C-Terminus variabel ist.

Das VP35 (340 AS) des EBOV ist ein Kofaktor des L-Proteins und stellt so ein Äquivalent der Phospho(P)-Proteine anderer NNS-RNA-Viren dar (Becker & Mühlberger 1999; Mühlberger et al., 1999). Das VP35 ist in der Lage, die unspezifische antivirale Immunantwort von infizierten Zellen zu unterdrücken, indem es die Typ-I-Interferonantwort inhibiert (Basler et al., 2000).

Das L-Protein (2212 AS) ist das größte virale Protein, welches in EBOV-Virionen und infizierten Zellen nur in katalytischen Mengen vorkommt. Dem L-Protein werden die enzymatischen Funktionen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase zugeschrieben. Es

beinhaltet 3 Regionen, die damit im Zusammenhang stehen könnten: ein RNA-bindendes Motiv (AS 553-571), eine Domäne, die möglicherweise Phosphodiester-Brücken bildet (AS 738-744) und ein ATP-bindendes Motiv (AS 1815-1841; Volchkov et al., 1999).

Das VP30 (288 AS, apparentes Molekulargewicht: 34 kDa) ist stark phosphoryliert und stellt als viertes Nukleokapsidprotein eine Besonderheit bei den NNS-RNA-Viren dar, da diese meist nur über 3 Nukleokapsidproteine verfügen. Einzige Ausnahme ist das M2-1 Protein der Pneumoviren (Familie Paramyxoviridae), welches ebenfalls als zusätzliches Protein im Nukleokapsid dieser Viren gebunden ist (Garcia et al., 1993). Das VP30 ist fester Bestandteil des Nukleokapsidkomplexes und dissoziiert erst bei Zugabe erhöhter Salzkonzentrationen (nach dem VP35) aus dem Komplex (Elliott et al., 1985). Aus Untersuchungen mit einem reversen Genetiksystem ist bekannt, dass das VP30 eine entscheidende Rolle bei der Transkription des EBOV spielt, indem es die Transkriptionseffizienz des ersten Gens (NP) um mehr als den Faktor 100 steigert (Mühlberger et al., 1999). Das VP30 stellt vermutlich einen EBOV-spezifischen Transkriptionsinitiationsfaktor dar (Weik, 2001).

2.2 Reverse Genetik zur Untersuchung des Ebola-Virus

Aufgrund der hohen Pathogenität der Filoviren für den Menschen sind die Arbeiten mit infektiösem Virus auf Laboratorien beschränkt, die den höchsten Sicherheitsstandards genügen. Durch die Entwicklung eines reversen Genetiksystems für MBGV und EBOV wurden die Voraussetzungen geschaffen, die Abläufe viraler Transkription und Replikation unter niedrigeren Sicherheitsanforderungen zu erforschen (Mühlberger et al., 1998; 1999).

Das EBOV-spezifische Transkriptions- und Replikationssystem basiert kurz gefasst auf folgenden Grundlagen: In BSR T7/5-Zellen, die die T7-Polymerase stabil exprimieren, werden Plasmide transfiziert, die unter Kontrolle des T7 Promoters für die EBOV-Nukleokapsidproteine kodieren. Gleichzeitig wird ein Plasmid für ein EBOV-Minigenom transfiziert, welches von der T7-Polymerase in RNA überschrieben wird. Dieses Minigenom besteht aus einzelsträngiger RNA deren Enden den nicht-translatierten Enden des EBOV-Genoms entsprechen und alle cis-aktiven Signale für virale Replikation und Enkapsidierung enthalten. Zwischen diesen Funktionseinheiten liegt das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT). Über Bestimmung der CAT-Aktivität kann EBOV-spezifische Transkription bestimmt werden.

Vor kurzem wurde, ausgehend von dem beschriebenen Minigenomsystem, ein System entwickelt, um infektiöse Ebola-Viren ausschließlich aus cDNA in Zellen herzustellen. Diese Technik ermöglicht nun die gezielte genetische Manipulation des EBOV, wodurch dessen Pathogenitätsmechanismen aufgeklärt werden sollen (Volchkov et al., 2001).

2.3 Die Bedeutung von Zink für die Funktion von Proteinen

Bereits seit 1869 ist Zink als essentielles Spurenelement für Eukaryoten bekannt. Die Zink-Bindung eines Enzyms wurde zuerst von Keilin und Mann beschrieben, die 1940 Zink in der Carboanhydrase nachwiesen (Coleman, 1992). Mittlerweile sind mehrere hundert Proteine bekannt, die Zink binden. Das gebundene Zink kann zum einen die Funktion von Enzymen wie der alkalischen Phosphatase, Laktatdehydrogenase oder den Metalloproteinasen beeinflussen. Die Speicherung und den Transport von Zink übernehmen Metallothioneine bzw. Serumalbumin (Coleman, 1992). Bei der großen Gruppe der Zinkfingerproteine wird über die Bindung eines Zink-Ions eine strukturelle Domäne im Protein (Zinkfinger) stabilisiert, die unterschiedliche Funktionen wie DNA-Erkennung, Transkriptionsaktivierung, RNA-Verpackung und Protein-Protein Interaktionen vermitteln kann. Der Zinkfinger besteht aus vier konservierten Cystein- und Histidinresten oder nur aus Cysteinresten, die ein Zink-Ion koordinieren. Als funktionelle Einheit wurde der Zinkfinger zuerst bei dem Transkriptionsfaktor IIIA von *Xenopus* charakterisiert (Miller et al., 1985).

2.3.1 Zinkfinger-vermittelte Bindung an DNA

Die meisten Zinkproteine in eukaryotischen Zellen enthalten das klassische Zinkfingermotiv Cys₂-His₂. Diese Proteine sind häufig genregulatorische Transkriptionsfaktoren, deren Zinkfinger die Aufgabe der spezifischen DNA-Erkennung hat (Laity et al., 2001). „Zink-sensing“-Proteine, wie der Transkriptionsfaktor für das Metallothionein MTF-1, können ebenso den klassischen Cys₂-His₂ Zinkfinger enthalten (Bittel et al., 2000). Bestimmte Typen von Hormonrezeptoren, wie der Glukocortikoidrezeptor, enthalten zwei Zinkfinger vom Typ Cys₄, die für die DNA-Bindung essentiell sind. Innerhalb DNA-bindender Proteine befinden sich meist mehrere hintereinander-geschaltete Zinkfinger.

2.3.2 Zinkfinger-vermittelte Protein-Protein Interaktionen

Obwohl die Mehrzahl der bekannten Zinkfinger eine Nukleinsäure-Bindung vermittelt, können über eine solche Domäne auch Protein-Protein-Interaktionen stattfinden. Das Zinkfingerprotein Ikaros, das wichtig ist zur Ausdifferenzierung von Lymphoidzellen, bildet über Assoziation zweier klassischer Zinkfinger Homodimere (Sun et al., 1996). Eine breitere Spezifität der durch Zinkfinger-vermittelten Proteininteraktion findet man bei dem Transkriptionsadapterprotein CBP, das mit vielen verschiedenen zellulären Transkriptionsfaktoren (z.B. p53) und viralen Onkogenen interagiert (De Guzman et al., 2000).

2.3.3 Das Zinkfingermotiv bei Viren

Das Gen-32-Protein des Bakteriophagen T4 besitzt ein Cys-His-Cys₂-Motiv, über das es kooperativ und nicht-spezifisch an einzelsträngige DNA der Replikationsgabel bindet. Die Nukleokapsidproteine (NC) verschiedener Retroviren haben ein ähnliches Motiv wie das Gen-32-Protein (Coleman, 1992). Das HIV-NC, auch p15 genannt, verpackt das einzelsträngige RNA-Genom. Wurden Cysteinreste innerhalb des NC mutiert, führte das zu viralen Partikeln, die keine virale RNA enthielten (Berkowitz et al., 1996). Einer der Zinkfinger des NC ist verantwortlich für spezifische Interaktion mit Sekundärstrukturen innerhalb des genomischen Verpackungssignals Ψ (De Guzman et al., 1998).

2.4 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen

Die Phosphorylierung an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten ist eine der häufigsten Formen posttranslationaler Modifikation von Proteinen in eukaryotischen Zellen. Sie kann Einfluss nehmen auf die Struktur des modifizierten Proteins und darüber hinaus auf die Wechselwirkungen, die das Protein eingeht. So ist die Proteinphosphorylierung mit der Kontrolle und Regulation einer Vielzahl zellulärer Funktionen verbunden. Prozesse, die durch Proteinphosphorylierung reversibel kontrolliert werden, benötigen nicht nur eine Proteinkinase, sondern auch eine Proteinphosphatase. Der Zyklus aus Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen stellt einen Hauptmechanismus der zellulären Regulation dar. Die Anzahl von Phosphatresten, die innerhalb eines Proteins identifiziert wurden, schwankt zwischen einem (Glykogen Phosphorylase von Säugern) und über hundert (Phosvitin) (Roach, 1991).

2.4.1 Proteinkinasen

Da die meisten Proteinkinasen über eine Vielzahl von Substraten verfügen, werden sie eher über die Art ihrer Akzeptor-Aminosäure als die Proteinspezifität klassifiziert. Für eukaryotische Systeme wird unterschieden zwischen Serin/Threonin Kinasen, Tyrosin Kinasen und Histidin/Arginin/Lysin Kinasen. Die meisten untersuchten Kinasen gehören den Kategorien Ser/Thr oder Tyr-Kinasen an. Histidin/Arginin/Lysin Kinasen kommen dagegen selten vor (Hunter, 1991, 2000). Für einige gut untersuchte Ser/Thr Kinasen wurden konservierte Erkennungssequenzen entdeckt, innerhalb derer sie häufig bestimmte Reste phosphorylieren (Tab. 1).

Viele Proteinkinasen werden durch reversible Phosphorylierung reguliert. Beispielsweise ist die Phosphorylierung des Threonin 197 essentiell für die Stabilisierung der aktiven Konformation der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA). Eine Dephosphorylierung dieses

Threoninrestes durch die Proteinphosphatase 2A inaktiviert die Kinaseaktivität der PKA (Liauw & Steinberg, 1996; Millward et al., 1999).

Proteinkinase	Motiv
Casein Kinase I	PS/PT X X S
Proteinkinase CKII	S/T X X E/D/PS/PT
Proteinkinase C (PKC)	S/T X K/R >> K/R X X S/T > K/R X S/T
cGMP-abh. Proteinkinase (PKG)	R/K (X) ₁₋₃ S/T > R/K R/K X S/T
cAMP-abh. Proteinkinase (PKA)	(R) ₁₋₂ (X) ₁₋₂ S/T
Calmodulin-abh. Proteinkinase II	R X X S/T
Mitogen-aktivierte Proteinkinase	P X S/T P > S/T P
Glykogensynthase Kinase-3	S X X X PS
Phosphorylase Kinase	K/R X X S V/I
EGF-Rezeptorkinase	X E/D Y I/L/V/X

Tab. 1: Häufig phosphorylierte Erkennungsstellen von Proteinkinasen. Innerhalb der Motive sind Phosphatakzeptorstellen fett gedruckt. Die Aminosäuren werden durch den Ein-Buchstabencode beschrieben. X steht dabei für jegliche Art von Aminosäuren. PS und PT stehen für Phosphoserin und Phosphothreonin. (In Anlehnung an Pearson et al., 1991; Davis, 1993; Pyerin et al., 1996).

2.4.2 Proteinphosphatasen

Die Anzahl der Proteinphosphatasen, die im eukaryotischen Genom kodiert werden, scheint etwa um das 3fache geringer zu sein als die der Proteinkinasen (Cohen, 1999). Damit einhergehend besitzen Proteinphosphatasen meist eine geringere Spezifität gegenüber Substraten. Aufgrund struktureller Merkmale und der Substratspezifität werden Proteinphosphatasen, die Serin- und Threoninreste dephosphorylieren, in 2 Hauptgruppen unterteilt (Cohen, 1997). Zur PPP-Familie gehören die im eukaryotischen Organismus ubiquitär vorkommenden Phosphatasen PP1, PP2A und PP2B (Calcineurin, eine Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase). Zudem wurden vier weitere zu dieser Familie gehörende Proteinphosphatasen gefunden, die ebenfalls in einer großen Anzahl untersuchter Gewebe von Säugern vorkamen, PP4 – PP7. Die PPM-Familie umfasst die Mg²⁺-abhängigen Proteinphosphatasen, wie PP2C und Pyruvatdehydrogenase Phosphatase. Für die Serin / Threonin Phosphatasen sind keine Konsensussequenzen bekannt, die als Substrat bevorzugt erkannt werden.

Viele bislang untersuchte Serin/Threonin-spezifische Phosphatasen besitzen einen modularen Aufbau und setzen sich neben den katalytischen Untereinheiten noch aus

verschiedenen regulatorischen Untereinheiten zusammen (Cohen, 1997; Bollen, 2001). Für die PP2A, die in den meisten Geweben und Zellen etwa 1% des Gesamtproteins ausmacht, sind theoretisch mehr als 50 verschiedene Holoenzyme vorstellbar. Die Zusammensetzung der Untereinheiten bestimmt über die intrazelluläre Lokalisation, Enzymaktivität und Substratspezifität (Millward et al., 1999; Sontag, 2001).

2.4.3 Inhibitoren von Serin- / Threonin-spezifischen Phosphatasen

Neben den 6 bekannten endogenen inhibitorischen Proteinen für PP1 und PP2A gibt es eine Reihe natürlich vorkommender Substanzen aus verschiedenen Stoffgruppen wie zyklische Peptide, Polyketone, Alkaloide und Terpene, die inhibitorische Wirkungen auf Proteinphosphatasen haben (Shepcock et al., 1997). Eines dieser Toxine ist Okadainsäure (OA), ein potenter Inhibitor der Phosphatasen PP1, PP2A und PP4 – PP6. Die Phosphatasen PP2B und PP2C werden in ihrer Aktivität durch OA nur schwach oder gar nicht gestört. OA wurde in marinen Dinoflagellaten, beispielsweise *Dinophysis* oder *Prorocentrum*, entdeckt. Es löst beim Menschen nach dem Verzehr von Muscheln, die diese Mikroorganismen enthalten, eine starke Lebensmittelvergiftung aus. OA ist ein Polyetherderivat einer 38C-Fettsäure, das membrangängig ist und in eukaryotischen Zellen die Proteinphosphorylierung stimulieren kann (Haystead et al., 1989). In höheren Konzentrationen wird durch OA in vivo eine Vielzahl biologischer Effekte induziert. Darunter zählen anhaltende Kontraktion glatter Muskeln, Förderung genetischer Instabilitäten, wie Schwester-Chromatid-Austausche, und eine Verstärkung des Wachstums transformierten Gewebes (Janssens & Goris, 2001).

2.4.4 Phosphorylierung und Dephosphorylierung viraler Proteine

Die Phosphorylierung viraler Genprodukte wurde bereits für die meisten Viren berichtet. Funktionelle Aspekte dieser Modifikation konnten dabei nur in einigen Fällen bestimmt werden. Beispielsweise steuert das Rex-Protein des humanen T-Zell-Leukämie-Virus die Expression viraler Gene durch die phosphorylierungs-abhängige Bindung an Virus-spezifische RNA (Green et al., 1992; Narayan et al., 2001). Die Dephosphorylierung viraler Proteine ist bisher wenig untersucht.

Bei NNS-RNA-Viren wurde vor allem die Funktion der Phosphorylierung der P-Proteine, die Kofaktoren der RNA-abhängigen RNA-Polymerase darstellen, untersucht (De et al., 1997). Das P-Protein des Vesikular-Stomatitis-Virus wird sowohl im C-Terminus als auch im N-Terminus phosphoryliert. Die N-terminale Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten durch die CKII ist Voraussetzung für die Multimerisierung des Proteins. Erst als Multimer interagiert P mit der Polymerase (L) und genomischer RNA und ist transkriptionell aktiv

(Gao & Lenard, 1995a; Pattnaik et al., 1997). In vitro Experimente zeigten, dass die Replikation des viralen Genoms von der Phosphorylierung zweier Serine im C-Terminus des Proteins abhängig ist (Hwang et al., 1999).

Das P-Protein des Respiratorischen-Syncytial-Virus kann durch die Caseinkinase I an Serin 215 und durch CKII an Serin 232 phosphoryliert werden. Für die Elongation der viralen Transkription in vitro ist die Phosphorylierung des Serinrestes 232 essentiell. (Dupuy et al., 1999).

2.5 Problemstellung

Das VP30 ist ein essentieller Faktor für die virale Transkription und stellt eine Strukturkomponente des EBOV-Nukleokapsids dar. Da das NP bei Einzelexpression Nukleokapsid-ähnliche Strukturen bildet, sollte untersucht werden, ob das VP30 an diese Strukturen, die sich in der Immunfluoreszenzanalyse als Einschlusskörper darstellen, bindet. Aus Sequenzanalysen hatte sich ergeben, dass das VP30 innerhalb der AS 68 – 93 eine Region besitzt, deren Primärstruktur eine hohe Ähnlichkeit zu einem Zinkfingermotiv des menschlichen Proteins Nup475 aufweist. Es sollte untersucht werden, ob das Motiv innerhalb des VP30 Zink-Ionen bindet und ob diese Bindung durch Mutationen der möglicherweise Zink-koordinierenden Cystein- und Histidinreste verhindert werden kann.

Neben dem NP ist das EBOV-VP30 das zweite stark phosphorylierte Protein im Virion. Vom MBGV-VP30 war bekannt, dass sich der Hauptteil der Phosphatakzeptorstellen innerhalb der AS 40 - 51 im N-Terminus des Proteins befindet. Es sollten die phosphorylierten Aminosäuren innerhalb EBOV-VP30 lokalisiert werden, mit dem Ziel, Mutanten des VP30 herzustellen, die nur noch schwach oder gar nicht mehr phosphoryliert sind.

Die VP30-Mutanten, bei denen die Zink-Bindung oder die Phosphorylierung zerstört waren, sollten dann auf ihre Funktionalität untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungsmittel, Chemikalien und Feinchemikalien von den Firmen Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Bio-Rad (München), Fluka (Buchs, Schweiz), Life Technologies (Eggenstein), J.T.Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Bayer (Leverkusen) bezogen.

Restriktionsendonukleasen wurden von Boehringer (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

Eukaryotische Zelllinien

An eukaryotischen Zellen wurden HeLa-Zellen (permanente humane Zelllinie aus einem Zervixkarzinom), BSR T7/5-Zellen (permanente Babyhamsternierenzelllinie, die die Polymerase des Bakteriphagen T7 (T7-Polymerase) konstitutiv exprimiert (Buchholz et al., 1999) und Vero-Zellen (permanente Affennierenzelllinie) verwendet.

Viren

Verwendete Viren waren das rekombinante Vaccinia-Virus MVA-T7 (Sutter et al., 1995) und das Ebola-Virus (EBOV-Zaire), Institut für Virologie, Marburg.

Antikörper

Die nichtgekoppelten monoklonalen α -VP30 IgM und monoklonalen α -NP IgG stammten aus dem Institut für Virologie, Marburg. Der monoklonale α -Flag IgG M2 stammte von Sigma, Deisenhofen. Alle FITC-, Rhodamin- und Peroxidase-konjugierten Antikörper wurden von Dianova, Hamburg bezogen.

Bakterien

An Bakterien wurden zur Plasmidamplifikation der Stamm *E.coli* XL1-Blue (Amersham, Freiburg) und zur Proteinexpression der Stamm *E.coli* BL-21 (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

Plasmide

Verwendete Plasmide waren pGEX-5X-1 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und pTM-1 (Vektor zur T7-gestützten Proteinexpression in eukaryotischen Zellen, erhalten von B. Moss, NIH, Bethesda/USA).

Kloniertes Plasmid	Matrizen-DNA	Oligonukleotide #	Amplifikation	Zielvektor
pT-VP30f	pT-VP30	408 / 409	PCR	pTM-1
pT-VP30 _{Δ234}	pT-VP30	408 / 645	PCR	pTM-1
pT-VP30 _{Δ214}	pT-VP30	408 / 643	PCR	pTM-1
pT-VP30 _{Δ194}	pT-VP30	410 / 700	PCR	pTM-1
pT-VP30 _{Δ174}	pT-VP30	410 / 701	PCR	pTM-1
pT-VP30 _{Δ154}	pT-VP30	410 / 709	PCR	pTM-1
pT-VP30 _{Δ134}	pT-VP30	410 / 710	PCR	pTM-1
pT-VP30 _{Δ114}	pT-VP30	408 / 711	PCR	pTM-1
pT-VP30 _{Δ114f}	pT-VP30	409 / 711	PCR	pTM-1
pT-VP30 _{Δ2-68}	pT-VP30	409 / 833	PCR	pTM-1
pGEX-VP30	pT-VP30	412 / 434	PCR	pGEX-5X-1
pGEX-VP30 ₆₁₋₁₀₇	pT-VP30	740 / 741	PCR	pGEX-5X-1
pGEX-VP30 ₆₁₋₉₅	pT-VP30	740 / 654	PCR	pGEX-5X-1
pGEX-VP30 ₆₈₋₁₀₇	pT-VP30	653 / 741	PCR	pGEX-5X-1
pGEX-VP30 ₆₈₋₉₅ (pGEX-Z)	pT-VP30	653 / 654	PCR	pGEX-5X-1
pGEX-Z _{II}	pGEX-Z	459 / 460, 499 / 500	OM	
pGEX-Z _{IV}	pGEX-Z _{II}	803 / 804	OM	
pT-VP30 _{H90L}	pT-VP30	459 / 460	OM	
pT-VP30 _{IV(f)}	pT-VP30 _{H90L(f)}	499 / 500, 803 / 804	OM	
pT-VP30 _{Δ72-93f}	pT-VP30f	742 / 743	OM	
pT-VP30 _{Δ72-112f}	pT-VP30f	744 / 745	OM	
pT-VP30 _{3LA(f)}	pT-VP30 (f)	778 / 779	OM	
pT-VP30 _{E60D}	pT-VP30f	514 / 515	OM	
pT-VP30 _{S29-31A}	pT-VP30f	455 / 456	OM	
pT-VP30 _{S42-46A}	pT-VP30f	422 / 433, 457 / 458	OM	
pT-VP30 _{S29-46A}	pT-VP30 _{S29-31A}	422 / 433, 457 / 458	OM	
pT-VP30 _{S29-46 T52A}	pT-VP30 _{S29-46A}	538 / 539	OM	
pT-VP30 _{S29-31D}	pT-VP30f	602 / 603	OM	
pT-VP30 _{S29-31, 44, 46D}	pT-VP30 _{S29-31D}	604 / 605	OM	
pT-VP30 _{S29-46D}	pT-VP30 _{S29-31, 44, 46D}	651 / 652	OM	
pT-VP30 _{S42-46D}	pT-VP30f	604 / 605, 651 / 652	OM	

Tab. 2: Für Klonierungen verwendete DNA-Matrizen und Oligonukleotide. Die Oligonukleotide sind mit der internen Labornummer bezeichnet. Deren genaue Bezeichnung und Sequenz ist dem Anhang (S. 98 und 99) zu entnehmen. Die Klonierungsstrategien im Anschluss an die Amplifikationen sind im Ergebnissteil (4) beschrieben. Plasmidbezeichnungen tragen am Anfang immer ein kleines p wie z.B. pT-VP30. PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion (3.2.7); OM: Ortsgerichtete Mutagenese (3.2.8).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der analytische Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte standardgemäß in 10 µl Gesamtvolumen, das 0,5 - 2 U einer Restriktionsendonuklease enthielt. Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers für 2 - 5 h bei 37°C. Anschließend wurde der Verdau mit Hilfe eines analytischen Agarosegels überprüft (3.2.2). Sollte die DNA in weiteren Reaktionen verwendet werden, war es notwendig einen Reinigungsschritt anzuschließen. Hierzu wurde das QIAquick-spin PCR Purification Kit der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet.

Der präparative Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte in 60 µl Gesamtvolumen, das 2 - 8 U einer Restriktionsendonuklease enthielt. Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers für 2 - 5 h bei 37°C. Anschließend wurde die geschnittene DNA auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment präpariert (3.2.2).

3.2.2 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Um eine größenabhängige Auftrennung fragmentierter DNA zu erreichen, wurde die Probe mit 1/6 Volumen 6x Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 40% Saccharose, 10 % Glycerin) versetzt und anschließend zusammen mit einem DNA-Längenstandard (Roche, Mannheim) in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (Agarose in TBE). Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA. Als Laufpuffer diente TBE, pH 8,0 (Sambrook et al., 1989; S. B23).

Um bei präparativen DNA-Agarosegelen eine leichte Solubilisierung der DNA zu gewährleisten, wurde für präparative Gele Agarose NA (Pharmacia, Uppsala / Schweden) mit besonders niedrigem Schmelzpunkt verwendet. Die Agarose NA wurde in TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989; S. B23) gelöst. Im Anschluß an die Auftrennung der DNA mittels präparativem Agarosegel wurde die gewünschte Bande auf dem UV-Schirm mit einem Skalpell ausgeschnitten und daraus die DNA eluiert. Hierzu wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN (Hilden) verwandt. Die Extraktion wurde entsprechend der dem Kit beiliegenden Arbeitsanleitung durchgeführt. Ein Zehntel des Eluats wurde zur Kontrolle der Präparation auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt.

Nach der Auftrennung erfolgte eine zwanzigminütige Färbung der DNA-Fragmente in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (1µg/ml). Schließlich konnten die DNA-Banden auf einem

UV-Schirm sichtbar gemacht und fotografiert werden. Bei präparativen DNA-Gelen wurde das Gel auf einem UV-Schirm mit Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 302 \text{ nm}$ betrachtet, um Schädigungen der DNA zu vermeiden.

3.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten in vektorielle DNA

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in einen zuvor mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektor (3.2.1) katalysieren die Ligasen die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen freien 5'-Phosphatgruppen des Genfragments und freien 3'-Hydroxylgruppen der Vektor- und Insert-DNA. Um eine Religation der Vektor-DNA zu verhindern, wurden die 5'-Enden der linearisierten Plasmide zunächst durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (Calf intestinal phosphatase, CIP) dephosphoryliert. Zu 44,5 μl linearisierter Plasmid-DNA (1 μg – 3 μg) wurden 0,5 μl CIP (1 U / μl) und 5 μl 10 x Dephosphorylierungspuffer gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der CIP erfolgte anschließend durch zehninütige Inkubation bei 72°C nach Zugabe von 0,5 μl einer 0,5 M EDTA-Lösung mit pH 8,0. Die DNA wurde abschließend mit dem QIAquick-spin PCR Purification Kit gereinigt und in 50 μl dH₂O aufgenommen.

Die Insertions- und Vektor-DNA wurde in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:5 eingesetzt. Ligase, Ligationpuffer und dATP wurden von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen.

Ligationsansatz:	20-200 ng	verdautes, gereinigtes Genfragment
	20-50 ng	linearisierte, gereinigte Vektor-DNA
	1,5 μl	10x Ligationpuffer + 10 mmol dATP
	0,5 μl	T4-DNA-Ligase (0,5 U)
	mit dH ₂ O <i>ad</i> 15 μl	

Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Als Kontrollen dienten folgende Ansätze: 1. Positivkontrolle: Ansatz wie oben; anstelle des Genfragments wurden 50 ng nichtlinearisierte Vektor-DNA eingesetzt. 2. Religationskontrolle: Ansatz wie oben, ohne Genfragment. 3. Insertkontrolle: Ansatz wie oben, ohne linearisierte Vektor-DNA.

Der vollständige Ansatz (15 μl) wurde zur Transformation (3.2.4) verwendet.

3.2.4 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von Bakterien wurden sogenannte Z-kompetente Zellen verwendet. Die Bakterienzellen wurden mit Hilfe von Puffern und Lösungen der Firma Zymo Research (Orange, USA) kompetent gemacht und konnten zur Aufbewahrung anschließend bei -80°C für mindestens ein halbes Jahr eingefroren werden.

Zur Herstellung der Z-kompetenten Zellen wurden 50 ml SOB-Medium (Sambrook et al., 1989; S. A2) mit 0,5 ml frischer Übernachtskultur inokuliert. Die Proben wurden bei Raumtemperatur geschüttelt bis eine OD_{600} von 0,2 - 0,3 erreicht war. Dann folgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis der sich eine Zentrifugation für 10 min bei 2500 g (4°C) anschloss. Nach dem Resuspendieren der Zellen in 5 ml Waschpuffer erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 2500 g (4°C). Zum Schluß wurde der Überstand vollständig entfernt und die Zellen vorsichtig in 5 ml eiskaltem Kompetenzpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden nun zu je 100 μl aliquotiert und zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Vor der Transformation wurden die Z-kompetenten *E.coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 100 μl Zellsuspension zur DNA-Lösung (z.B. 15 μl Ligationsansatz) erfolgte eine Inkubation der Zellen für 1 h auf Eis. Schließlich wurde der komplette Ansatz auf 2YT-Agarplatten (Sambrook et al., 1989; S. A3, 4) mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.5 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab wurden unter Verwendung des QIAprep-spin Plasmid Kits (QIAGEN, Hilden) und des QIAprep 8 Plasmid Kits (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Die Beschreibung der Durchführung der Präparation wurde den beiliegenden Arbeitsprotokollen entnommen. Pro Ansatz wurde eine Menge von 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in 2YT-Medium (Sambrook et al., 1989; S. A3) mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin verwendet. Zum Schluß wurden 5 μl des gewonnenen Eluats zur Analyse mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (3.2.1) und auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt (3.2.2).

Um Plasmide in großer Menge ($>100 \mu\text{g}$) zu erhalten war es notwendig, eine Plasmidpräparation im großen Maßstab durchzuführen. Diese erfolgte unter Verwendung des QIAfilter Plasmid Maxi Kits (QIAGEN, Hilden). Als Ausgangsmaterial wurden 100 - 500 ml einer Übernachtskultur des gewünschten Bakterienklons verwendet (Wachstumsmedium: 2YT-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin). Die Präparation wurde anhand des mitgelieferten

Handbuches durchgeführt. Nach Beendigung der Präparation wurde eine quantitative und qualitative DNA-Bestimmung durchgeführt.

Die Nukleinsäurekonzentration einer Probe wurde mittels eines Gene Quant II (Pharmacia, Uppsala/Schweden) UV-spektrometrisch analysiert. Dabei ist die Optische Dichte der Lösung bei einer Wellenlänge γ von 260 nm (OD_{260}), direkt proportional zu ihrem Nukleinsäuregehalt.

Für doppelsträngige DNA gilt: $OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 = \text{DNA-Gehalt in } \mu\text{g/ml}$

Um die Reinheit von Nukleinsäurepräparationen zu definieren, wurde der Quotient OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Ein Wert von kleiner als 1,8 deutet auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin (Absorptionsmaximum: 280 nm). Bei einem Wert von über 2,2 ist anzunehmen, dass die DNA entweder denaturiert ist oder die Probe zuviel RNA enthält.

3.2.6 Automatische Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgt nach der Kettenabbruchmethode von Sanger unter Zuhilfenahme von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Didesoxynukleotiden (ddNTP's). Zur Sequenzierung wurde ein ABI Prism™ 377 DNA-Sequenzierer (Perkin Elmer Cetus, Norwalk/USA) unter Verwendung des ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer Cetus, Norwalk/USA) benutzt.

Das System beruht auf einer Amplifikation der DNA mit Hilfe des Terminator Ready Reaction Mix, der eine gekoppelte Elektrophorese und Fluoreszenzdetektion mit dem ABI Prism™ DNA-Sequenzierer folgt. Die Sequenzierreaktion der DNA mittels PCR wurde mit Hilfe des Terminator Ready Reaction Mix (TerMix), dessen genaue Zusammensetzung dem Begleitheft des Kits zu entnehmen ist, durchgeführt. In dem TerMix sind außer der Ampli Taq Polymerase sowohl die dNTP's als auch die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten ddNTP's enthalten. Im Gegensatz zur radioaktiven Sequenzierung, bei der vier Ansätze benötigt werden, läuft die Reaktion aufgrund der ddNTP-Kopplung mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen in einem Ansatz ab.

Ansatz für eine Sequenzierung:

4 μl TerMix
1 μg dsDNA
5 pmol Oligonukleotid
mit dH_2O ad 20 μl

PCR-Bedingungen: (25 Zyklen)	Denaturierung:	96°C, 30 s
	Annealing:	50°C, 15 s
	Amplifikation:	60°C, 4 min

Eine darauffolgende Ethanol-fällung entfernt nichteingebaute Nukleotide und Salze. Dazu wurden die 20 µl PCR-Ansatz mit 80 µl dH₂O, 10 µl Na-acetat (3M, pH 5,7) und 150 µl Ethanol (100 %) versetzt und gevortext. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz bei 20000 g für 30 min zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und im Vakuumtrockner getrocknet. Anschließend konnte die sedimentierte DNA in 4 µl Sequenzier-Probenpuffer (1% Dextran-Blau, 5 mM EDTA, 80% Formamid) aufgenommen werden. Vor dem Beladen des Sequenziergels wurde die Probe 10 min bei 95°C aufgeköcht. Von diesem Ansatz wurden 2 µl auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte unter Verwendung eines Harnstoff-Polyacrylamidgels von 2,2 mm Dicke und 36 cm Länge. Als Laufpuffer wurde 1x TBE, pH 8,0 verwendet. Die Sequenzierdaten wurden mit einer Geschwindigkeit von 100 Basenpaaren pro Stunde gemessen und über einen Zeitraum von 10 h aufgezeichnet.

Sequenziergel:	21 g	Harnstoff
	8,4 ml	30% Polyacrylamidlösung
	20 ml	dH ₂ O
	6 ml	10x TBE, pH 8,0
	300 µl	10% Ammoniumpersulfat
	20 µl	TEMED

3.2.7 Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um die gewünschte DNA-Sequenz mittels PCR zu amplifizieren, wurden spezifische Oligonukleotide und eine Matrizen-DNA (Tab. 3) verwendet. Ein PCR-Zyklus besteht aus Denaturierung der DNA, Bindung der Oligonukleotide und Amplifikation der Zielsequenz unter Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Pwo-Polymerase). Die Basenzusammensetzung und Länge der Oligonukleotide bestimmt die Bindungstemperatur („Annealing“) an die DNA.

Ansatz:	100-750 ng	Matrizen-DNA
	10 μ l	10 x PCR-Puffer (mit MgSO ₄ , 20 mM)
	je 1 μ l	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (10 mM)
	je x μ l	Oligonukleotid 1 bzw.2 (Endkonzentration je 0,6 μ M)
	0,5 μ l	Pwo-Polymerase (5 U/ μ l)
	ad 50 μ l dH ₂ O	

Um am Anfang eine Verlängerung von evtl. unspezifisch an die DNA angelagerten Oligonukleotide zu verhindern, wurde eine sogenannte hot start-PCR durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionsansatz ohne Polymerase zunächst für 5 min auf 99°C erhitzt, dann auf 94°C abgekühlt, und erst zu diesem vorgeheizten Ansatz wurde die Polymerase gegeben.

PCR-Bedingungen:	Denaturierung	94°C, 15 s
	Anlagerung	50-65°C, 30 s
	Amplifikation	72°C, 2 min

Nach 30 Zyklen schloß sich eine Polymerisationsphase von 72°C für 10 min an.

Das Ergebnis der PCR wurde auf einem Agarosegel überprüft (3.2.2). Für die Analyse wurden 8 μ l des PCR-Ansatzes eingesetzt. Anschließend wurde der verbleibende Ansatz mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und in 50 μ l dH₂O aufgenommen.

3.2.8 Ortsgerichtete in vitro-Mutagenese von DNA

Die ortsgerechte in vitro-Mutagenese von DNA beruht auf einer PCR mit mutagenisierten Oligonukleotiden und wurde mit Hilfe von Komponenten des „Quick Change“ Mutagenese Systems (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Hierbei enthalten die verwendeten Mutageneseoligonukleotide, die komplementär zueinander sind, die gewünschte Mutation und führen entweder zur Insertion, Deletion oder zum Nukleotidaustausch an der entsprechenden Position. Bei der PCR lagern diese Oligonukleotide an die Matrizen-DNA an und schließlich wird jeweils das ganze Plasmid amplifiziert. Zur Amplifikation wurde rekombinante *PfuTurbo*TM-DNA-Polymerase verwendet. Die sich an die PCR anschließende Selektion der mutierten DNA beruht auf der Eigenschaft der Restriktionsendonuklease *DpnI*, ausschließlich methylierte DNA zu schneiden. Die in vitro entstandene mutagenisierte DNA ist im Gegensatz zur eingesetzten bakteriell replizierten DNA nicht methyliert. Daher wird selektiv nur die ursprünglich eingesetzte, nicht mutagenisierte Plasmid-DNA zerstört. Zur Transfektion stehen daher lediglich die mutagenisierten Plasmide zur Verfügung.

Ansatz für die PCR:	5 µl	10x Puffer
	je 1 µl	dATP, dCTP, dGTP und dTTP
	40 ng	Plasmid
	125 ng	Oligonukleotide in (+)- bzw (-)-Orientierung
		mit H ₂ O <i>ad</i> 50 µl
	+ 1 µl	<i>PfuTurbo</i> TM -DNA-Polymerase (2,5 U)

Die PCR wurde in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer-Cetus (Norwalk, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	95 °C, 30 s	} 1 Zyklus
Denaturierung:	95 °C, 30 s	} 16 Zyklen
Anlagerung:	55 °C, 1 min	
Amplifikation:	68 °C, 14 min	

Anschließend wurde die DNA mit 1 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 5 µl zur Transformation von Z-kompetenten (3.2.4) *E.coli* Bakterien vom Stamm XL1-Blue verwendet. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf einer 2YT-Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die auf der Platte gewachsenen Klone wurden in 5 ml 2YT-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) resuspendiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde eine Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (3.2.5) durchgeführt. Die isolierte DNA wurde mittels Sequenzierung (3.2.6) auf die Anwesenheit der gewünschten Mutation überprüft.

3.3 Zellbiologische Methoden und bakterielle Proteinexpression

3.3.1 Kultur von HeLa-, Vero- und BSR T7/5-Zellen

Um fortlaufend Tests mit Vertebratenzellen durchführen zu können, wurden die in dieser Arbeit verwendeten HeLa-, Vero- und BSR T7/5-Zellen alle 3 - 4 Tage umgesetzt. HeLa- und Vero-Zellen wurden in Dulbecco`s-Medium (Life Technologies, Karlsruhe) kultiviert. Das Dulbecco`s-Medium wurde immer frisch mit 1% L-Glutamin (Life Technologies) und 10 % Fetales Kälberserum (PAA, Linz/Österreich) komplementiert. BSR T7/5-Zellen wurden in BHK-21-Medium (Glasgow MEM, Life Technologies), dem 10% Newborn Calf Serum (Life Technologies) zugesetzt worden waren, kultiviert. Nach Dekantieren des verbrauchten Mediums und zweimaligem Waschen mit Phosphatpuffer (PBS, Sambrook *et al.*, 1989; S. B12) wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung (Life Technologies) auf die Zellen gegeben (2 ml / 75 cm²-Flasche) und 2 min bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgekugelt und vom Flaschenboden gelöst hatten, wurden 8 ml Dulbecco`s-Medium hinzugegeben. Mit dieser Zellsuspension wurde die neue, bereits mit 20 ml Dulbecco`s-Medium beschickte 75 cm²-Flasche versetzt. Beim Umsetzen wurden die Zellen 1:8 (HeLa), 1:10 (Vero) bzw. 1:20 (BSR T7/5) verdünnt.

Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem begasteten Brutschrank bei 37°C. Im Folgenden wird die CO₂-Begasung der Wärmeschränke für die Eukaryontenzellkultur als gegeben vorausgesetzt und nicht jedesmal gesondert erwähnt.

3.3.2 Infektion von Vero-Zellen mit Ebola-Virus für anschließende Immunfluoreszenz

Die Arbeiten mit EBOV wurden von Dr. S. Becker in einem Labor der Sicherheitsstufe L4 durchgeführt.

Um Versuche mit EBOV-infizierten Zellen durchzuführen war es notwendig, eine EBOV-Vorkultur herzustellen. In 75 cm² Flaschen kultivierte, 80% konfluente Vero-Zellen wurden mit EBOV in 5 ml Dulbecco`s-Medium + 2% Fetales Kälberserum bei einer „multiplicity of infection“ (m.o.i.) von 0,01 infiziert. Nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C wurde der Überstand abgenommen und direkt zur Inokulierung von Zellen verwendet.

Die zu analysierenden Vero-Zellen wurden auf runden Deckgläsern (12 mm) in 6-„Well“ Zellkulturschalen angezüchtet und die Zelldichte zur Infektion mit EBOV auf ca. 50% Konfluenz eingestellt. Die Zellen wurden mit einer m.o.i. von 1 infiziert, und mit verschiedenen Konzentrationen OA (3.3.11) versetzt. Vor dem Ausschleusen wurden zur

Fixierung auf die Zellen 2 ml 3,5% Paraformaldehyd (in PBS) gegeben und für mindestens 12 h bei 4°C gelagert bis die Viren vollständig inaktiviert waren.

3.3.3 Herstellung eines MVA-T7 Virusstocks

Das verbrauchte Kulturmedium von 10 Kulturflaschen (162 cm²) konfluenten HeLa-Zellen (3.3.1) wurde entfernt und die Zellen mit 10 ml Dulbecco`s-Medium pro Flasche gewaschen und anschließend mit einer m.o.i. von 0,5 mit MVA-T7 (3.3.4) in 10 ml Dulbecco`s-Medium infiziert. Die Inkubation erfolgte auf einem Kippschüttler bei 37°C. Nach 1 h wurde der Überstand abgenommen und 50 ml Dulbecco`s-Medium pro Flasche auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubationsphase von 2 - 3 Tagen im Wärmeschrank bei 37°C. Danach wurden die infizierten Zellen geerntet und bei 2800 rpm abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden nun in 50 ml Dulbecco`s-Medium aufgenommen. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen sowie durch eine Homogenisation mit Hilfe eines Ultraschallgerätes (Branson Sonifier[®]B15, Danbury/USA) für 2 min bei voller Leistung wurde gewährleistet, dass sich das Virus von den übriggebliebenen Zelltrümmern löst und in den Überstand gelangt. Schließlich wurde die Suspension aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

3.3.4 Expression von Fremdgenen mit dem MVA-T7 Expressionssystem

Das Vaccinia-Virus ist ein komplexes, im Zytoplasma der infizierten Zellen replizierendes Virus mit einem Doppelstrang-DNA-Genom. Es gehört zum Genus Orthopoxvirus der Familie der *Poxviridae*. Das Vaccinia-Virus-T7-Expressionssystem beruht auf dem Austausch des viralen Thymidinkinasegens (TK-Gen) gegen das Gen der T7-Polymerase. Dieses steht unter der Kontrolle des viruseigenen "early-late"-p-7,5 Promotors (Mackett et al., 1984). Das rekombinante Vaccinia-Virus trägt die Bezeichnung MVA-T7 (Sutter et al., 1995).

Zuerst wurden subkonfluente HeLa-Zellen (70%) in 3 cm²-Zellkulturschälchen (3.3.1) mit MVA-T7 infiziert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit je 2 ml Dulbecco`s-Medium gewaschen. Die Infektion mit MVA-T7 erfolgte in einem Gesamtvolumen von 500 µl Dulbecco`s-Medium mit einer m.o.i von 10. Zur Kontrolle wurden nicht-infizierte Zellen (HeLa) und infizierte, aber nicht transfizierte Zellen (MVA-T7) mitgeführt. Nach der Infektion wurden die Schälchen auf dem Wäger für 1 h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden die Transfektionsansätze vorbereitet. Hierzu wurden jeweils 1 ml Dulbecco`s-Medium mit 5 µl Lipofectin (Life Technologies) oder mit 1 - 8 µg Plasmid beschickt. Als Plasmide dienten pTM-1 Vektoren. Der Lipofectinansatz wurde 20 min vor dem Plasmidansatz hergestellt, um eine höhere Transfektionseffizienz zu erreichen. Anschließend wurden die beiden Ansätze vereinigt und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Das Transfektionsgemisch (2 ml) wurde eine Stunde nach der Infektion auf die

Zellen gegeben. Die Mock- bzw. MVA-T7-Ansätze wurden mit jeweils 2 ml Dulbecco`s-Medium versetzt. Die Zellen wurden für 12 - 15 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze gegebenenfalls mit radioaktivem [³⁵S]-Methionin/ Cystein-Gemisch bzw. mit radioaktivem [³²P]-Orthophosphat markiert (3.3.5).

3.3.5 Metabolische Markierung mit [³⁵S]-Methionin/[³⁵S]-Cystein oder [³²P]-Orthophosphat

Zur metabolischen Markierung von Proteinen mit [³⁵S]-Methionin/[³⁵S]-Cystein wurde das „Promix [³⁵S] Cell-labeling Mix“ (PROMIX) der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) verwendet.

12 h nach der Transfektion (3.3.4) wurde das Medium von den Zellen abgenommen. Die Zellen wurden mit Dulbecco`s Modified Eagles Medium ohne Methionin und Cystein (Sigma) gewaschen und anschließend mit je 1 ml desselben Mediums versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde das Medium erneut abgenommen und gegen 1 ml Dulbecco`s Modified Eagles Medium ohne Methionin und Cystein ausgetauscht, dem je 100 µCi [³⁵S]-PROMIX zugegeben wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 3 h. Dann wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Die markierten Zellen wurden in je 0,5 ml CoIP-Puffer (20 mM Tris/HCl [pH 7,6], 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0,4% Desoxycholsäure, 2 mM 1,4-Dithiothreit), dem frisch 2 mM PMSF und 0,5% SDS zugesetzt wurden, abgeschabt. Das Zellysate wurde gleich weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

Zur Markierung von Proteinen mit radioaktivem Phosphat wurde [³²P]-Orthophosphat in HCl ([³²P]_i, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. 12 h nach der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen wurden mit phosphatfreiem Dulbecco`s-Medium (Minimum Essential Medium Eagle ohne Natrium-phosphat, Firma Sigma) gewaschen und die Zellen für 1 h in 1 ml des gleichen Mediums ausgehungert. Dann wurde das Medium erneut abgenommen und durch 1 ml phosphatfreies Dulbecco`s-Medium ersetzt, dem je 150 µCi [³²P]_i zugesetzt wurden. Danach schloss sich eine Inkubationsphase von 3 h bei 37°C an. Die Ernte erfolgte in je 500 µl CoIP-Puffer, dem frisch 2 mM PMSF, 0,5% SDS, 100 mM NaVO₃, 50 mM NaF und 1U RNase A (Qiagen, Hilden) zugegeben wurden. Das Zellysate wurde ebenfalls sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

3.3.6 Immunpräzipitation

Die unter 3.3.5 beschriebenen gewonnenen Zellysate wurden mit Hilfe des Branson Sonifiers für 2 min bei voller Leistung homogenisiert und noch vorhandene Zelltrümmer anschließend

bei 15000 g in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Vorinkubation wurden die Proben mit je 20µl Protein A-Sepharose (1:2 in CoIP-Puffer gelöst) versetzt und 1 h bei 4°C auf einem Überkopftrotierer inkubiert. Die mit Protein A-Sepharose vorinkubierten Proben wurden für 2 min bei 15000 g zentrifugiert und der Überstand in neue Gefäße überführt. Nun wurde jede Probe mit 1 µl des α-Flag-Antikörpers M2 versetzt. Es schloss sich eine Inkubation von 2 h auf dem Überkopftrotierer bei 4°C an. Nach der Antikörperinkubation wurden pro Ansatz 20 µl Protein A-Sepharose-Suspension zugegeben und die Reaktionsgefäße nochmals für 3 h auf dem Überkopftrotierer inkubiert. Den beiden Inkubationsschritten folgte ein fünfmaliges Waschen mit je 800 µl CoIP-Puffer. Schließlich wurden zu den sedimentierten Immunkomplexen 20 µl 2x Proteinprobenpuffer (Sambrook *et al.*, 1989; S. B25) gegeben. Die Probe war nun bereit zur Auftrennung mittels SDS-PAGE (3.4.1).

3.3.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Die zu analysierenden Zellen (3.3.1) wurden auf runden Deckgläsern (12 mm) in 6-„Well“ Zellkultur-schalen angezüchtet.

Wurden rekombinante Proteine untersucht, die mit dem MVA-T7 Expressionssystem (3.3.4) exprimiert wurden, wurde die Zelldichte auf ca. 50% Konfluenz eingestellt. 8 h nach Infektion und Transfektion wurden die Zellen 3 x mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 3,5% Paraformaldehyd (in PBS) für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS und eine Inkubation der Zellen mit 2 ml 100 mM Glycin (in PBS) für 10 min. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,2% Triton X100 (in PBS) für 20 min. Anschließend wurden die Zellen mit dem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte im IF-Fixierungspuffer (5% Glycerol, 2% Rinderserumalbumin, 0,2% Tween20 und 0,05% Natrium-Azid in PBS). Zur Inkubation wurden 25 µl des verdünnten Antikörpers tropfenförmig auf Parafilm gegeben und das Deckglas mit der zellbewachsenen Seite nach unten daraufgelegt. Die Inkubation fand in einer feuchten dunklen Kammer für 1 h statt.

Verdünnungsverhältnisse für die verwendeten Primärantikörper:

monoklonaler anti-VP30 IgM-Antikörper	1:10
monoklonaler anti-NP IgG-Antikörper	1:20

Nach der Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper folgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS. Anschließend wurde die Zweitinkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper für 1 h in einer dunklen feuchten Kammer durchgeführt.

Verdünnungsverhältnisse für die verwendeten Sekundärantikörper:

FITC-konjugiertes α -Maus-IgM F(ab') ₂ -Fragment von der Ziege	1:100
Rhodamin-konjugierter α -Maus-IgG Antikörper von der Ziege	1:100

Die Zellen wurden mit PBS 3x gewaschen und anschließend wurden die Deckgläser in dH₂O getaucht und mit der zellbewachsenen Seite nach unten mittels Fluoprep (BioMerieux, Marcy l'Etoile/Frankreich) auf dem Objektträger eingedeckt. Nachdem das Präparat getrocknet war, konnten die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Axioplan, Zeiss, Oberkochen) analysiert werden. Dabei war zu beachten, dass für die Rhodamin gefärbten Zellen ein FT 580- und für die FITC gefärbten Zellen ein FT 510-Filter verwendet werden muss. Die photographische Dokumentation wurde mit Hilfe einer digitalen Kameraausrüstung (Spot Kamera, Version 3.1.2, Diagnostic Instruments, Michigan/USA) durchgeführt.

3.3.8 Das Ebola-Virus-spezifische Transkriptionssystem

In der Arbeitsgruppe wurde ein artifizielles EBOV Replikations- und Transkriptionssystem etabliert [Mühlberger et al., 1999]. Dazu wurde das Plasmid p2,0-E konstruiert, das für ein EBOV-spezifisches RNA-Minigenom unter Kontrolle des T7 Promotors kodiert. Nach Transfektion von p2,0-E in BSR T7/5-Zellen, die die T7-Polymerase stabil exprimieren, wird über Transkription das Minigenom exprimiert. Dieses RNA-Minigenom verfügt an seinen 3'- und 5'-Enden über die Enden des EBOV-Genoms, die alle notwendigen genomischen Signale für virale Transkription und Replikation enthalten. Diese Regionen flankieren das Chloramphenicol Acetyltransferase-Gen (CAT-Gen), das in negativer Orientierung vorliegt. Gleichzeitig werden Plasmide transfiziert, die für die EBOV-Nukleokapsid-Proteine NP, VP35, L und VP30 unter Kontrolle des T7-Promotors kodieren. Diese Proteine werden nun in den BSR T7/5-Zellen synthetisiert und führen zur Transkription und Replikation des Minigenoms, wodurch ein Transkript für die CAT entsteht, die dann durch die zelluläre Proteinbiosynthesemaschinerie hergestellt wird. CAT-Aktivität zeigt daher in diesem System EBOV-spezifische Transkription an.

Zuerst wurden subkonfluente BSR T7/5-Zellen (60%) in 3 cm²-Zellkulturschälchen (3.3.1) zweimal mit jeweils 2 ml Dulbecco's-Medium gewaschen und für 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurden die Transfektionslösungen vorbereitet. Dazu wurde

zuerst ein Mastermix aus 1 ml Dulbecco`s-Medium und 9 µl Fugene (Roche) / Ansatz hergestellt. Dann wurden für jeden Ansatz 1 ml Dulbecco`s-Medium in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit folgendem Plasmidgemisch beschickt: 500 ng pT-NP, 500 ng pT-VP35, 1 µg pT-L, 1 µg p2,0-E und 100 ng pT-VP30. Die Mengen an pT-VP30 wurden gegebenenfalls variiert oder ein Plasmid für eine VP30-Mutante eingesetzt. Anschließend wurde in jedes Reaktionsgefäß 1 ml des Mastermixes gegeben, gevortext und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Das Transfektionsgemisch (2 ml) wurde dann auf die Zellen gegeben, bei 37°C im Brutschrank inkubiert, und 8 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit 2 ml Dulbecco`s-Medium gewaschen.

Nach weiteren 24 – 36 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geerntet. Zunächst wurden sie zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann für in 150 µl 1x Reporter Lysis Puffer (Promega, Madison/USA) bei Raumtemperatur für 15 min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt, für 30 s gevortext und Zentrifugation bei 20000 g für 2 min der Überstand. Mit dem Überstand wurde dann der biochemische Nachweis der CAT-Aktivität durchgeführt (3.4.5).

3.3.9 Bakterielle Expression von Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen und Reinigung über Glutathion Sepharose

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurden *E.coli* BL21-Zellen verwendet, die eine Tetrazyklinresistenz tragen. Diese Bakterien eignen sich besonders zur Expression von Fremdproteinen, da ihnen einerseits eine vom *ompT*-Gen kodierte Protease der äußeren Membran und andererseits eine weitere endoproteolytisch wirksame Protease (*lon*-Gen) fehlt.

Die Transformation der Bakterien mit dem Vektor pGEX-5X-1, der das Gen für die Glutathion S-Transferase (GST) bzw. den GST-VP30-Fusionsproteinen trägt, wurde wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt. 100 ml LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989; S. A1) + 100 µl Ampicillin wurden mit 1 ml aus einer Übernachtskultur der transformierten BL21-Zellen beimpft und für 2,5 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 200 mM IPTG zugegeben und für weitere 2 h bei 30°C inkubiert, bis die Zellen geerntet wurden.

Zur Kontrolle der Expression wurden von der Zellkultur vor der IPTG-Induktion sowie vor der Zellernte jeweils 1 ml Aliquots genommen, bei 20000 g abzentrifugiert und das Pellet in 25 µl bzw. 50 µl 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen. Davon wurden 10 µl bzw. 4 µl über eine 12% SDS-PAGE aufgetrennt und eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt (3.4.1).

Im Folgenden wurde die Bakteriensuspension 10 min bei 4300 g (4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 5 ml PBS aufgenommen. Zur Lyse der Zellen wurden 2 mg/ml Lysozym zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Durch dreimaliges

Frieren und Tauen wurde das Aufbrechen der Zellwände unterstützt. Nach Zugabe von 50 µl Triton X100 erfolgte eine weitere Inkubation für 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Die Proben waren nach diesem Procedere oft von schleimiger Konsistenz. Dies ließ sich beseitigen indem die Ansätze für 3 min mit dem Branson Sonifier behandelt wurden. Die Bakterientrümmen wurden nun durch eine zehnmündige Zentrifugation bei 20000 g sedimentiert. Die Überstände wurden zu je 800 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Als Kontrolle der Löslichkeit des Proteins wurden von dem jeweiligen Überstand 10 µl sowie von dem in 100 µl 4x Probenpuffer resuspendierten Pellet der letzten Zentrifugation 1 µl über SDS-PAGE aufgetrennt und eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt (3.4.1). War das exprimierte Protein im Pellet und nicht im Überstand des Zelllysats vorhanden, zeigte dies, dass das Protein aggregiert war.

Da das VP30 eine ausgeprägte Aggregationsneigung aufwies, wurde zunächst versucht diese Aggregate zu vermindern. Die Expressionstemperatur wurde dazu auf 12°C oder 22°C abgesenkt. Die Expressionszeiten waren dabei 48 h bzw. 11 h. Des weiteren wurde versucht, die Aggregate aufzulösen, indem bei der Zellyse (zu den 5 ml PBS) 5 M Guanidinium-Hydrochlorid, 2 M NaCl oder 5 M Harnstoff zugegeben wurde.

Zur Reinigung des GST oder der GST-Fusionsproteine wurden diese an Glutathion-Sepharose (Amersham-Pharmacia, Freiburg i.B.) gekoppelt. Dazu wurden 60 µl Glutathion-Sepharose entsprechend den Anweisungen des Herstellers aufbereitet, mit den 800 µl Aliquoten vereinigt und 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die mit GST oder mit einem GST-Fusionsprotein gekoppelte Sepharose 3 x mit PBS gewaschen, in 60 µl PBS aufgenommen und bei -20°C weggefroren.

Als Kontrolle für die Abschätzung der Menge des sedimentierten Proteins wurden schließlich 4 µl der Protein-Sepharose Suspension in 2 µl 2x Proteinprobenpuffer aufgenommen und über SDS-PAGE und eine Coomassie-Blau-Färbung analysiert (3.4.1).

3.3.10 Quantifizierung der zellulären Proteinbiosynthese von Vero-Zellen unter dem Einfluss von Okadainsäure

Subkonfluente Vero-Zellen (70%), in 1 cm²-Zellkulturschälchen (3.3.1) wurden mit 2 ml Dulbecco`s-Medium gewaschen und in 1 ml Dulbecco`s-Medium, das mit 2% Fetalem Kälberserum sowie mit 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM, 200 nM oder 300 nM OA versetzt war, für 14 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, bei dem keine OA eingesetzt wurde. Die Menge an Dimethylsulfoxid wurde in allen Ansätzen auf 0,2% eingestellt außer dem Ansatz mit 300 nM OA, bei dem 0,3% Dimethylsulfoxid vorhanden waren.

Nach 14 h Inkubation wurde das Medium von den Zellen abgenommen. Die Zellen wurden mit Dulbecco`s Modified Eagles Medium, ohne Methionin und Cystein, gewaschen und

anschließend mit je 1 ml des gleichen Mediums versetzt. Nach einer halbstündigen Inkubation bei 37°C wurde das Medium erneut abgenommen und gegen Dulbecco's Modified Eagles Medium ohne Methionin und Cystein ausgetauscht, dem je 7 µCi [³⁵S]-PROMIX zugegeben wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 1 h. Dann wurde der Überstand verworfen, die Zellen viermal mit eiskaltem PBS gewaschen und nach vollständiger Abnahme des PBS die Zellkulturschälchen bei -20°C gelagert.

Die Zellen wurden lysiert und anschließend die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt.

Auf die Zellen wurden 250 µl alkalische Lösung (250 mM NaOH, 1% Mercaptoethanol) gegeben und der Ansatz für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und mit Hilfe des Branson Sonifiers für 2 min bei voller Leistung homogenisiert. Es wurden 160 µl einer 50%igen Trichloressigsäure-Lösung zugegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Dann wurde für 10 min bei 20000 g (4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen und wie vorher zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet und in 200 µl SDS-Puffer (100 mM Tris, 4% SDS) resuspendiert. 20 µl davon wurden einer Szintillationsmessung mit dem Flüssig-Szintillationszähler LS1801 (Beckmann, München) unterzogen. Die gemessene Radioaktivität des Ansatzes ohne OA wurde gleich 100% gesetzt und die anderen Werte damit verrechnet.

3.3.11 Quantifizierung der NP-Synthese Ebola-Virus-infizierter Vero-Zellen unter dem Einfluss von Okadainsäure

EBOV-infizierte Vero-Zellen, die ohne oder in Gegenwart von 20 nM, 40 nM, 80 nM, 100 nM und 200 nM OA oder ohne OA auf Deckgläsern (12 mm) für 14 h kultiviert worden waren, wurden permeabilisiert und durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert (3.3.7). Es wurde eine Färbung gegen EBOV-NP und gleichzeitig eine Färbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Verdünnung 1:10000) durchgeführt.

Die Auswertung des Versuchs fand statt, indem über die DAPI-gefärbten Zellen jeweils die Zellzahl / Sichtfeld bei 40facher Vergrößerung ausgezählt wurden. Die NP-Färbung des Kontrollansatzes lieferte dann die Anzahl infizierter Zellen, deren Prozentsatz bei etwa 30% lag. Dieser Wert wurde gleich 100% gesetzt und die Anzahl der Zellen, bei denen NP unter Zugabe von OA detektiert werden konnte, damit verrechnet. Pro Versuch wurden 5 Sichtfelder ausgezählt. Dabei war zu beachten, dass für die Rhodamin Färbung ein FT 580- und für DAPI-Färbung ein FT 395-Filter verwendet werden musste. Die photographische Dokumentation wurde mit Hilfe einer digitalen Kameraausrüstung (Spot Kamera, Version 3.1.2, Diagnostic Instruments, Michigan/USA) durchgeführt.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE). Die Gelmatrix wurde anhand von Literaturrezepten hergestellt (Sambrook et al., 1989, S.18.52). Es wurden 4%ige Sammelgele und 12%ige bzw. 15%ige Trenngele verwendet. Als Größenmarker wurden 3 µl Rainbow-Marker (2,3 - 46 kDa, Amersham Pharmacia Biotech) bzw. im Fall von radioaktiven Gelen, 3 µl [¹⁴C]-Rainbow-Protein-Marker (2,3 - 46 kDa, Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Gelauftrag mit 2x Proteinprobenpuffer im Verhältnis 1:2 bzw. 4x Proteinprobenpuffer (Sambrook *et al.*, 1989; S. B25) im Verhältnis 1:4 versetzt und für mindestens 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Proteinlaufpuffer (Sambrook *et al.*, 1989, S.18.53) bei einer Stromstärke von 15 - 30 mA/Gel und dauerte ca. 1,5 - 2 h. Zur Durchführung der Elektrophorese wurden Proteingelkammern (Keutz, Reiskirchen) und Stromquellen der Firma Consort (Turnhout, Belgien) verwendet. Zur Darstellung der gelelektrophoretisch aufgetrennten nichtradioaktiven Proteine wurden die Gele in einer Coomassie-Blau-Lösung (0,1% Coomassie-Brilliant-Blue R250, 10% Essigsäure, 40% vergälltes Ethanol) für 30 min auf dem Schüttler inkubiert und anschließend unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung (10% Essigsäure und 30% vergälltes Ethanol) so lange entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Die Gele wurden über Nacht zwischen Einmachfolie bei Raumtemperatur getrocknet.

3.4.2 Nachweis radioaktiver Signale

Radioaktiv markierte Proteine, die auf einem Gel aufgetrennt worden waren (3.4.1) oder auf eine Blotmembran transferiert worden waren (3.4.2), sowie DC-Platten mit radioaktiven Proben (3.4.5 und 3.4.6) wurden mittels des Biolumineszenz Analysers (BAS-1000, Fuji Kangawa/Japan) oder über Autoradiographie nachgewiesen.

Ein Gel wurde für die Exposition nach der Elektrophorese für 15 min in Fixierlösung (10% Essigsäure und 30% vergälltes Ethanol) geschwenkt, anschließend gewässert und unter Vakuum getrocknet. Die Blotmembran musste für eine Exposition nur an der Luft getrocknet werden.

Sollten die radioaktiven Signale quantifiziert werden, wurde das Gel, die Blotmembran oder die DC-Platte auf einer Biolumineszenz Platte (Fuji Kangawa/Japan) exponiert. Die Expositionszeit lag je nach Signalstärke zwischen 1 h und 2 d. Die Entwicklung der Biolumineszenz Platte erfolgte

mit einem Biolumineszenz Analyser. Zur Auswertung und Verarbeitung der erhaltenen Daten wurden die Programme BasReader und TINA2.0 (RayTest, Freiburg) verwendet.

Für eine Autoradiographie wurde das getrocknete Gel oder die Blotmembran auf einem Biomax Röntgenfilm (Kodak, Rochester/USA) für 1h bis 4 Tage exponiert.

3.4.3 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Beim Western Blot wurden die auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine (3.4.1) in einer Elektroblot-Apparatur (Phase, Lübeck) auf eine PVDF-Membran (Millipore, Bedford/USA) transferiert. Dabei findet eine praktisch irreversible Bindung der Proteine an die Membran statt. Hierdurch werden die Proteine immunologischen Nachweisreaktionen zugänglich. Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer in 100% Methanol eingelegt und anschließend mit Anodenpuffer II (25 mM Tris, 20% Ethanol) gewaschen. Anschließend wurden jeweils 3-5 Blätter Gel-Blotting-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) mit Anodenpuffer I (300 mM Tris, 20% Ethanol), Anodenpuffer II bzw. Kathodenpuffer (25 mM Tris, 20% Ethanol, 40 mM ϵ -Amino-n-Caprinsäure) getränkt. Der Elektrotransfer der Proteine wurde für 75 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² durchgeführt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in PBS mit 10% Milchpulver und 0,1% Tween20 über Nacht inkubiert.

3.4.4 Proteindetektion mit Chemiluminiszenz

Proteine, die über SDS-PAGE (3.4.1) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Millipore, Bedford/USA) transferiert (3.4.2) waren, wurden mittels Peroxidase-gekoppeltem Antikörpern (POD-Antikörper) indirekt detektiert. Als Erstantikörper diente ein Protein-spezifischer Antikörper an den dann der POD Antikörper binden konnte.

Die Membran mit den Proteinen wurde 3x auf dem Schüttler gewaschen, 1 h mit 10 ml Erstantikörperverdünnung inkubiert, anschließend 3x gewaschen, mit 10 ml POD-Antikörper für 1 h inkubiert und erneut 3x gewaschen. Die Waschschrte bis hierhin erfolgten jeweils in PBS mit 0,2% Tween20 für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde noch 2x mit PBS für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen.

Als Erstantikörper wurde der α -Flag-Antikörper M2 (Verd. 1:3000) verwendet.

Als Zweitantikörper diente der POD-gekoppelte Schaf α -Maus Antikörper (Verd. 1:20000).

Die Antikörperverdünnung erfolgte jeweils in PBS mit 1% Milchpulver und 0,2% Tween20.

Die Detektion des gebundenen POD-Antikörpers erfolgte mittels Chemiluminiszenz. Hierzu wurde das Super Signal Ultra™ Reagenz der Firma Pierce (Rockford/USA) verwendet. Nach dem letzten Waschschriff wurde die Membran in eine nach einer Seite geöffnete Plastiktasche gegeben. Die Detektionslösungen 1 und 2 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben, so dass diese gerade mit Flüssigkeit bedeckt war. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit mit einem Papiertuch aus der Folientasche gewischt, die Membran in der Tasche luftdicht verschweißt und auf einem Biomax Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeit richtete sich nach der Menge an detektierbarem Material auf der Membran und konnte von 2 Sekunden bis 1h variieren. Zur Quantifizierung der detektierten Proteinmengen auf einer Blotmembran wurde der Röntgenfilm eingescannt und mit dem Programm TINA2.0 analysiert.

3.4.5 Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität

Im EBOV-Transkriptionssystem (3.3.8) wird EBOV-spezifische Transkription über gebildete CAT-Aktivität detektiert. Die CAT katalysiert die Übertragung von Acetyl-Gruppen des Donors Acetyl-Coenzym A auf den Akzeptor Chloramphenicol. Es entstehen die Produkte 1'-Acetylchloramphenicol, 3'-Acetylchloramphenicol und 1',3'-Acetylchloramphenicol, die in ihrem Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie (DC) unterschieden werden können.

Ansatz:

0,2 - 2 µl	Zellysate
148 µl	250 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 µl	Acetyl-Coenzym A (70mg/ml in 250 mM Tris/HCl, pH 7,5)
2 µl	[¹⁴ C]-Chloramphenicol (25 µCi/ml in 250 mM Tris/HCl, pH 7,5)

Der Ansatz wurde 3 bis 15 h bei 37°C inkubiert, bis die Katalyse durch Zugabe von 750 µl Ethylacetat gestoppt wurde. Nach kräftigem Vortexen und 2 min Zentrifugation bei 20000 g wurde die obere organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Vakuumverdampfer vollständig eingedampft. Das dabei entstandene Pellet wurde in 15 µl Ethylacetat aufgenommen und auf eine kieselgelbeschichtete DC-Platte (Merck) aufgetropft. Die Platte wurde in eine abgeschlossene Kammer in DC-Laufpuffer (95% Dichlormethan und 5% Methanol) gestellt, bis die Lauffront sich 2 cm unter dem Rand der Platte befand. Die Auswertung erfolgte über Exposition der DC-Platte auf einer Biolumineszenz-Platte mit dem Biolumineszenz Analyser BAS-1000 (3.4.2).

3.4.6 Phosphoaminosäure-Analyse

Mittels einer zweidimensionalen Dünnschicht-Chromatographie-Elektrophorese wurde der Typ der phosphorylierten Aminosäure im VP30 ermittelt. Für die Expression des VP30 im MVA-T7 Expressionssystem wurden ca. 4×10^6 HeLa-Zellen (4 Schalen) mit MVA-T7 infiziert und mit insgesamt 8 μg des Plasmids pT-VP30f transfiziert (3.3.4). Bei dem Ansatz „MVA-T7“ fand keine Transfektion statt. Die Zellen wurden mit [$^{32}\text{P}_i$] markiert (3.3.5), lysiert und immunpräzipitiert (3.3.6). Die Immunkomplexe wurden über 12%ige SDS-PAGE aufgetrennt (3.4.1), im Western-Blot-Verfahren auf eine ImmobilonTM P-Membran transferiert (3.4.3) und die VP30 spezifische Bande ausgeschnitten.

Für die saure Hydrolyse wurden die zerschnittenen Membranstücke mit 500 μl Methanol für 1 min benetzt und einmal mit 500 μl 0,5 N HCl gewaschen. Im Anschluss wurde das Protein in 250 μl 5,7 N HCl durch einstündige Inkubation bei 110°C hydrolysiert. Danach wurden die Probengefäße auf Eis abgekühlt, der Deckel durchlöchert und das Hydrolysat - nach Entfernen der ImmobilonTM P-Membranstücke - getrocknet. Zur vollständigen Entfernung der Säure wurde die eingedampfte Probe in 100 μl dH₂O resuspendiert und erneut getrocknet. Dieser Schritt wurde noch einmal mit 50 μl dH₂O und mit 30 μl dH₂O wiederholt.

Das getrocknete Hydrolysat wurde nun der Aktivitätsmessung nach Cherenkov mittels des Flüssig-Szintillationszählers LS1801 unterzogen und dann in 10 μl Phosphoaminosäure-Standard (Phosphoserin, Phosphothreonin und Phosphotyrosin, jeweils 1 mg / ml) aufgenommen. Damit die Probenauftragsfläche möglichst klein blieb, wurde die Probe in fünf Fraktionen zu je 2 μl auf eine Cellulose Dünnschicht-Chromatographie-Platte (DC-Platte, Merck) aufgetropft und nach jeder einzelnen Probenapplikation mit dem Fön getrocknet. Die Platte wurde anschließend in die horizontale Elektrophoresekammer überführt und mit PAA-Puffer 1 (7,8% Eisessig und 2,2% Ameisensäure, pH 1,9) benetzt. Die Trennung in der ersten Dimension fand über 90 min bei 1000 Volt statt. Die Platte wurde getrocknet, mit PAA-Puffer 2 (5% Eisessig und 0,5% Pyridin, pH 3,5) befeuchtet und zur Trennung in der zweiten Dimension für 45 min einer Spannung von 1000 Volt ausgesetzt. Die Elektrophorese einer DC-Platte lief optimal bei einer Stromstärke von 16 mA, die über die Einstellung der Wasserkühlung geregelt wurde. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Platten getrocknet, zur Färbung der nichtmarkierten Standard-Phosphoaminosäuren mit Ninhydrin-Färbelösung (0,4% Ninhydrin, 1% Eisessig, 98,6% Aceton) besprüht und zur Detektion der hydrolysierten [$^{32}\text{P}_i$]-markierten Phosphoaminosäuren eine Biolumager-Platte aufgelegt, die mittels des Biolumager Analyser BAS-1000 analysiert wurde (3.4.2).

Durch Überlagerung der [^{32}P]-Signale mit der gefärbten DC-Platte konnte der phosphorylierte Aminosäurerest identifiziert werden.

3.4.7 Zink-Nachweis

Die in Bakterien exprimierten GST-VP30 Fusionsproteine, die mittels Glutathion-Sepharose gekoppelt gereinigt worden waren (3.3.9), wurden zunächst 2x in HBS 200 (50 mM HEPES/KOH [pH 7,5], 200 mM NaCl, 1 mM DTT) gewaschen und das Glutathion-Sepharose Sediment anschließend im gleichen Volumen HBS 200 aufgenommen. 2 µl dieser Protein-Glutathion-Sepharose Suspensionen (im Folgenden nur Proteinsuspension genannt) wurden jeweils über SDS-PAGE (3.4.1) aufgetrennt und quantifiziert (3.4.8), um abschätzen zu können, wieviel Protein in dem folgenden Zink-Nachweis eingesetzt werden sollte. 15 µl bis 30 µl der Proteinsuspensionen wurden nun zwei unterschiedlichen Inkubationsfolgen unterzogen. (i) Für die EDTA-Inkubation wurde zunächst in 500 µl HBS 200 / 0,1 mM Zinkacetat und dann in 500 µl HBS 200 / 1mM EDTA inkubiert. (ii) Für die Zinkacetat-Inkubation wurde zuerst in 500 µl HBS 200 / 1mM EDTA und dann in 500 µl HBS 200 / 0,1 mM Zinkacetat inkubiert. Zwischen den Inkubationen und danach wurden die Proteinsuspensionen 3x bzw. 4x mit 1 ml HBS 200 / 5 mM DTT bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubationen fanden jeweils für 15 min bei 30°C statt.

Das Volumen der Ansätze wurde nun mit HBS 200 auf 55 µl gebracht, wovon 5 µl für die Proteinbestimmung (3.4.8) und 48 µl für einen Verdau mit 2 µl Proteinase K (20 µg/µl, Ambion, Ausin/USA) bei 60°C für 30 min eingesetzt wurden. Anschließend wurden 50 µl HBS 200, der 0,2 mM 4-(2-Pyridylazo)resorcinol (PAR) enthielt, hinzugefügt. PAR chelatiert divalente metallische Kationen und ändert dabei sein Absorptionsmaximum. Die Extinktion der Lösung wurde nun in einer Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) mittels eines ELISA-Readers MR700 (Dynatech, Denkendorf) bei 490 nm bestimmt.

Ein Schema zum Ablauf des Zink-Nachweises findet sich im Ergebnisteil auf S. 50.

Zur Konzentrationsmessung von Zink wurde eine Standardkurve erstellt. Dazu wurden 50 µl HBS 200 mit 2 µl Proteinase K und 10 µl Glutathion-Sepharose (HBS 200*) mit jeweils 0 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM und 60 µM Zinkacetat, wie oben beschrieben, mit PAR inkubiert und die Extinktion bei 490 nm gemessen.

3.4.8 Proteinbestimmung

Nach der EDTA- bzw. Zinkacetat-Inkubation des Zink-Nachweises (3.4.7) wurden 5 µl der an GSH-Sepharose gekoppelten Proteine in 5 µl 4x Probenpuffer aufgenommen, aufgeköcht und 8 µl davon über SDS-PAGE (3.4.1) aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt, entfärbt, getrocknet und eingescannt. Die Stärke der Proteinbanden wurden mit dem Programm TINA2.0 (RayTest, Freiburg) analysiert und über den Vergleich mit einem Rinderserumalbumin-Standard quantifiziert.

Für eine Standardkurve wurden jeweils 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg und 2 µg Rinderserumalbumin (Pierce, Rockford/USA), dessen Konzentration in HBS 200-Puffer eingestellt wurde, auf dem gleichen Gel wie die Proteinproben der Zink-Bestimmung aufgetrennt.

3.4.9 Ameisensäureverdau

Für die Proteolyse mit Ameisensäure wurden VP30 oder die Mutante VP30_{E60D} eingesetzt, die in HeLa-Zellen mittels des MVA-T7 Expressionssystems synthetisiert (3.3.4), metabolisch mit [³⁵S]-PROMIX oder mit [³²P;] markiert (3.3.5) und durch Immunpräzipitation gereinigt (3.3.6) worden waren. 50 µl der Immunkomplexe wurden mit 500 µl 70% Ameisensäure für 60 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Ameisensäure im Vakuumverdampfer eingedampft und das Pellet dreimal mit 300 µl, 100 µl und 50 µl dH₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 20 µl 4× Proteinprobenpuffer aufgenommen. Mit 1N NaOH-Lösung wurde die Probe schließlich neutralisiert und mittels SDS-PAGE (3.4.1) aufgetrennt.

3.4.10 Dephosphorylierung des VP30 mit HeLa-Zellysat

VP30 wurde in HeLa-Zellen mittels des MVA-T7 Expressionssystems exprimiert (3.3.4), metabolisch mit [³²P;]-markiert (3.3.5) und durch Immunpräzipitation (3.3.6) gereinigt.

Anschließend wurde das Präzipitat dreimal mit CoIP-Puffer gewaschen, worauf sich zwei Waschschrte in Puffer D (20 mM Tris/HCl [pH 7,5] 100 mM NaCl) anschlossen. Das Präzipitat wurde schließlich im gleichen Volumen Puffer D aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Für das HeLa-Zellysat wurden HeLa-Zellen einer konfluent bewachsenen 75 cm² Kulturflasche (3.3.1) einmal mit eiskaltem PBS und dreimal mit eiskaltem D-Lysepuffer (10 mM Tris/HCl [pH 7,5], 250 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylflourid, 20 µg/ml Trasylol, 40 µg/ml Trypsininhibitor, 8 µg/ml Leupeptin und 2 µg/ml Pepstatin) gewaschen. Die Zellen wurden in 2 ml D-Lysepuffer abgeschabt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellyse erfolgte über 20 Passagen durch eine 20G-Kanüle. Das Zellysat wurde nun 5 min bei 800 g (4°C) zentrifugiert und der Überstand als HeLa-Zellysat im Testansatz verwandt.

Als Kontrollen dienten Ansätze, bei denen entweder kein Zellysat oder keine OA eingesetzt wurde. Die Menge an Dimethylsulfoxid wurde in allen Ansätzen auf 0,2% eingestellt außer dem Ansatz mit 500 nM OA, bei dem 0,5% Dimethylsulfoxid vorhanden war.

Ansatz:

100 µl	HeLa-Zelllysat bzw. kein Zelllysat
40 µl	[³² P]-VP30 Präzipitat
50 µl	10x Phosphatasepuffer (500 mM Tris/HCl [pH 7,5], 50 mM DTT, 0,1% NP40, 10 mM MnCl ₂ , 10 mM MgCl ₂)
x µl	100 µM OA (gelöst in Dimethylsulfoxid) bzw. 1 µl Dimethylsulfoxid mit dH ₂ O <i>ad</i> 500 µl.

Der Ansatz wurde für 30 min bei 30 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das [³²P]-VP30 Präzipitat für 2 min bei 12000 g herunterzentrifugiert und 400 µl des Überstands abgenommen.

Der Überstand wurde mittels des Flüssig-Szintillationszählers LS1801 einer Aktivitätsmessung nach Cherenkov unterzogen.

3.4.11 Dephosphorylierung des VP30 mit Proteinphosphatasen

Zur Dephosphorylierung mit den katalytischen Untereinheiten gereinigter Proteinphosphatasen wurde VP30 verwendet, das in HeLa-Zellen mittels des MVA-T7 Expressionssystems exprimiert (3.3.4), metabolisch mit [³²P_i]-markiert (3.3.5) und durch Immunpräzipitation gereinigt (3.3.6) worden war. Der CoIP-Puffer für Präzipitation und die anschließenden Waschschrte enthielt kein SDS.

Das Präzipitat wurde fünfmal mit CoIP-Puffer gewaschen, worauf sich drei Waschschrte in Puffer E (20 mM Tris/HCl [pH 7,5], 50 mM NaCl) anschlossen. Das Präzipitat wurde schließlich im fünfachen Volumen Puffer E aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Für die Reaktionen wurden jeweils 10 µl des [³²P]-VP30 Präzipitats, 1,5 µl 10x Phosphatasepuffer und 300 ng Enzym eingesetzt und mit dH₂O auf 15 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Für die Inkubationen mit PP1 (Calbiochem, Bad Soden) und PP2A (Upstate, Waltham/USA) wurde PP1/2A-10x Puffer (500 mM Tris/HCl [pH 7,5], 10% Glycerol, 1% Mercaptoethanol 50 mM MnCl₂) verwendet.

Die Inkubation mit PP2C (rekombinant, AG Klumpp, Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität-Marburg) erfolgte in PP2C-Puffer (250 mM Tris/HCl [pH 7,5], 10% Glycerol, 1% Mercaptoethanol, 100 mM MgCl₂).

Mit der Alkalischen Phosphatase (AP, Firma Sigma) wurde in PP_{OH^-} -Puffer (500 mM Tris/HCl [pH 8,5], 100 mM $MgCl_2$) inkubiert.

Als Kontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, bei dem keine Phosphatase eingesetzt wurde.

Die Dephosphorylierungsansätze wurden nun jeweils in 10 μ l 4x Proteinprobenpuffer aufgenommen, 5 min aufgeköcht und einer SDS-PAGE unterzogen (3.4.1). Die aufgetrennten Proteine wurden dann im Western Blot-Verfahren auf eine Immobilon PVDF-Membran transferiert (3.4.3). Über eine Antikörperinkubation mit dem α -Flag M2 und einem POD-gekoppelten α -Maus Antikörper und anschließender Chemiluminiszenz (3.4.4) wurde sichergestellt, dass in allen Ansätzen gleiche Mengen an VP30 auf das Gel aufgetragen worden waren. Einen Tag später wurde die Membran auf einer Biolumager-Platte exponiert und die radioaktiven Signale im Biolumager mit Hilfe des Computerprogramms TINA2.0 analysiert und quantifiziert (3.4.2).

Die Proteinphosphatasen sowie die Phosphatase-Puffer wurden freundlicherweise von Dr. Dagmar Selke (AG Klumpp, Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität, Marburg) zur Verfügung gestellt.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war, das EBOV-VP30 bezüglich struktureller Merkmale und deren Funktionen zu charakterisieren. Dies implizierte die rekombinante Expression des VP30 mit verschiedensten Deletionen und Mutationen. Um die VP30-Mutanten trotz der Veränderungen gleichmäßig gut detektieren zu können, wurden einige der in dieser Arbeit exprimierten VP30-Moleküle als Fusionsprotein mit einem Flag-Epitop am N- oder C-Terminus synthetisiert. Das Flag-Epitop stellt ein Oktapeptid der Abfolge DYKDDDDK dar. Die Klonierungsstrategie zur Herstellung der Flag-markierten Proteine ist unter 4.1.2 beschrieben. Als Hinweis für ein Flag-markiertes VP30 ist an die Proteinbezeichnung ein f angehängt (z.B. VP30f). Der Einfluss des Flag-Epitops auf die intrazelluläre Lokalisation und auf die transkriptionsaktivierende Funktion des VP30 wurde durch Immunfluoreszenz- und Transkriptionsanalysen untersucht. Diese Voruntersuchungen zeigten, dass weder die intrazelluläre Verteilung noch die transkriptionsaktivierende Funktion des VP30 durch das Flag-Epitop verändert wurden.

4.1 VP30 ist mit dem Nukleokapsidkomplex assoziiert und fungiert als Transkriptionsaktivator

4.1.1 Die Interaktion des VP30 mit NP-induzierten Einschlusskörpern

Das NP der Filoviren ist der Hauptbestandteil des Nukleokapsidkomplexes und führt bei rekombinanter Expression und in Virus-infizierten Zellen zur Bildung charakteristischer Einschlusskörper. Innerhalb dieser Einschlusskörper bildet es hochgeordnete tubuläre Strukturen, die in ihrer Form dem Grundgerüst der Nukleokapside entsprechen (Kolesnikova et al., 2000).

Um zu überprüfen, ob das EBOV-VP30 mit den NP-induzierten Einschlusskörpern wechselwirkt, wurden VP30 und NP in HeLa-Zellen mittels des MVA-T7 Expressionssystems (3.3.4) synthetisiert und einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse (3.3.7) unterzogen. Abb. 3A zeigt bei Einzelexpression der Proteine eine homogene Verteilung des VP30 und bei NP die Bildung der typischen NP-induzierten Einschlusskörper. Nach Koexpression beider Proteine kolokalisierte das VP30 mit den NP-induzierten Einschlusskörpern

(Abb. 3B, Überlagerung). Bei nichttransfizierten (MVA) oder nichtinfizierten Zellen (HeLa) waren nur sehr schwache unspezifische Hintergrundsignale sichtbar (Abb. 3C und 3D). Dieses Ergebnis zeigte, dass das EBOV VP30 an das NP-induzierte Grundgerüst des Nukleokapsids assoziiert ist.

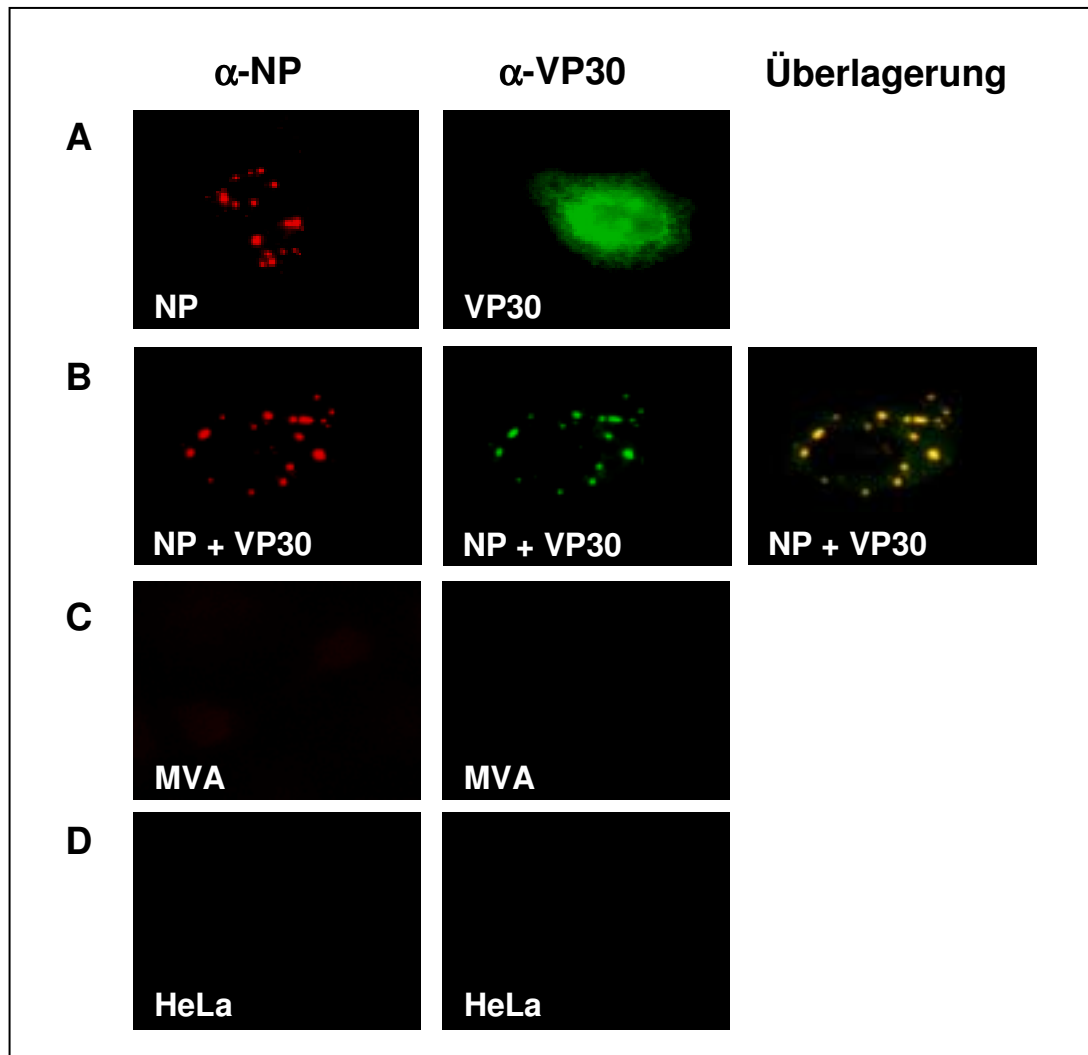


Abb. 3: Interaktion zwischen VP30 und NP-induzierten Einschlusskörpern. HeLa-Zellen, auf Deckgläsern kultiviert, wurden mit MVA-T7 infiziert und mit pT-VP30f (200 ng) bzw. pT-NP (1 μ g) transfiziert. 8 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzanalyse mit einem monoklonalen α -NP IgG (1:20) und einem monoklonalen α -VP30 IgM (1:10) unterzogen. Gebundene Antikörper wurden mit einem FITC-konjugierten Ziege α -Maus-IgM F(ab')₂-Fragment (1:100) und einem Rhodamin-konjugierten Ziege α -Maus-IgG Antikörper (1:100) detektiert. **(A)** Einzeldarstellung von NP (links) und VP30 (rechts). **(B)** Koexpression von NP und VP30. **(C)** MVA-T7-infizierte HeLa-Zellen. **(D)** HeLa-Zellen.

4.1.2 Eingrenzung des Bereichs auf dem VP30 für die Bindung an NP-induzierte Einschlusskörper

Um den Bereich auf dem VP30 zu bestimmen, der die Interaktion zum NP vermittelt, sollten folgende VP30-Deletionsmutanten hergestellt werden: 1) eine Mutante, bei der die N-terminalen AS 2 - 68 des VP30 fehlten und 2) sechs weitere Mutanten, bei denen der C-Terminus des Proteins schrittweise deletiert war (Abb. 4).

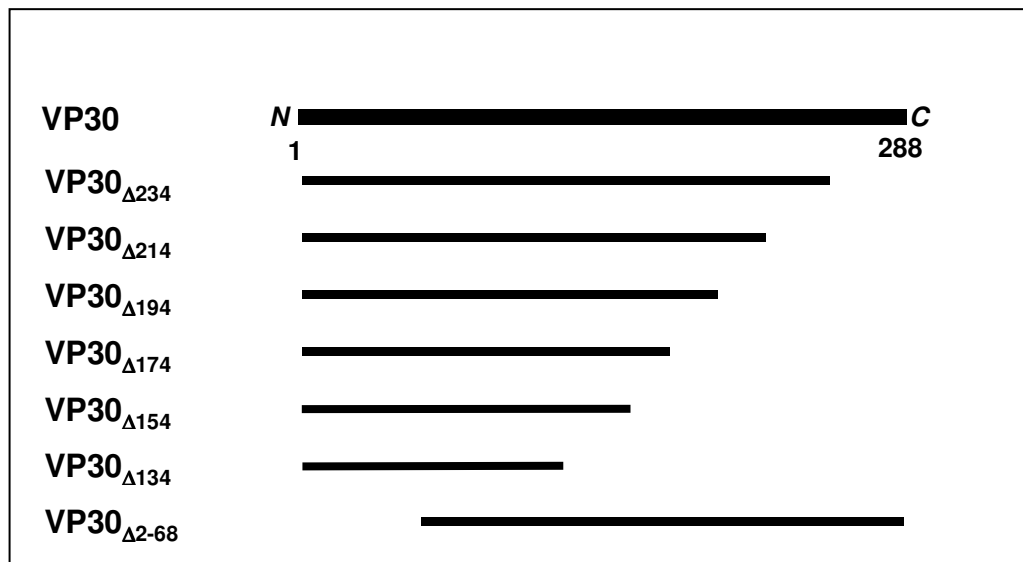


Abb. 4: Schema von VP30-Deletionsmutanten I. Oberhalb ist das VP30 gezeigt und im Vergleich dazu zeigen die Balken für die Deletionsmutanten den Teil des Proteins, der exprimiert wurde. C-terminale Deletionsmutanten sind so bezeichnet, dass hinter dem Δ die erste deletierte AS angegeben ist.

Zur Herstellung der Plasmide, die für die Deletionsmutanten kodieren, wurde eine PCR (3.2.7) durchgeführt, bei der jeweils die in Tab. 2 angegebenen Oligonukleotidpaare und DNA-Matrizen verwandt wurden. Die PCR-Produkte waren aufgrund der Oligonukleotidsequenzen flankiert von *Bam*HI- und *Xho*I-Schnittstellen. Der Vektor pTM-1 und die amplifizierten Fragmente wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Bam*HI verdaut (3.2.1), jeweils ligiert (3.2.3) und in *E.coli* XL1 Blue-Zellen transformiert (3.2.4). Positive Klone wurden selektioniert und mit diesen eine Plasmidpräparation (3.2.5) durchgeführt. Die Richtigkeit der klonierten Gensequenzen wurde durch automatische Sequenzierung (3.2.6) überprüft. Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Klonierungen wurde bezüglich der Arbeitsschritte ab Transformation des ligierten Plasmids in *E.coli* XL1 Blue-Zellen bis zur Verifizierung der klonierten Sequenz gleich verfahren. Diese Arbeitsschritte (3.2.4 – 3.2.6) werden daher im Folgenden nicht mehr extra erwähnt. Die in Abb. 4 schematisch gezeigten Deletionsmutanten des VP30 wurden jeweils zusammen mit dem NP in HeLa-Zellen exprimiert und einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen.

Abb. 5 zeigt die intrazelluläre Verteilung des VP30 bzw. die der VP30-Mutanten bei Koexpression mit NP.

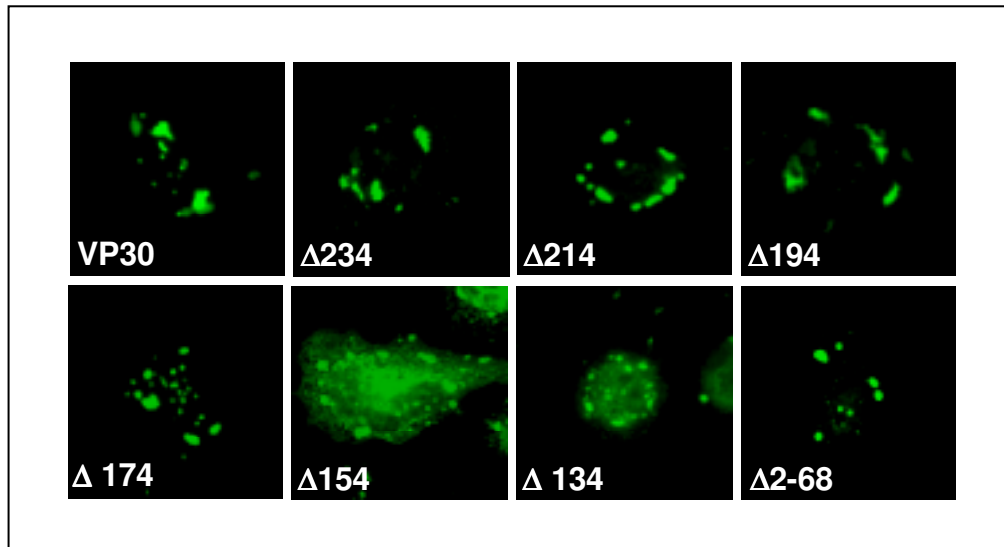


Abb. 5: Die Interaktion zwischen VP30-Deletionsmutanten und NP-induzierten Einschlusskörpern. HeLa-Zellen, auf Deckgläserengläsern kultiviert, wurden mit MVA-T7 infiziert und mit pT-VP30 (200 ng) oder mit pT-VP30-Deletionsmutanten (200 ng) und pT-NP (1 µg) kotransfiziert. 8 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzanalyse mit einem monoklonalen α -VP30 IgM (1:10) unterzogen. Gebundene Antikörper wurden mit einem FITC-konjugierten Ziege α -Maus-IgM F(ab')₂-Fragment (1:100) detektiert. Eine Parallelfärbung gegen das NP hatte ergeben, dass in allen Ansätzen NP, in Form der NP-typischen Einschlusskörper (s. Abb. 3), exprimiert wurde. Die Bezeichnungen innerhalb der Fluoreszenzbilder geben an, ob VP30 oder eine VP30-Deletionsmutante transfiziert wurde. Bei den Deletionsmutanten wurde auf die Bezeichnung VP30 verzichtet (vgl. Abb. 4).

Eine Akkumulation des VP30 in den NP-induzierten Einschlusskörpern wurde, wie erwartet, beim VP30 beobachtet, ebenso bei der N-terminalen Deletionsmutante VP30_{Δ2-68} und bei allen C-terminalen Deletionsmutanten bis zu einer Verkürzung auf 174 AS des N-Terminus (VP30_{Δ174}). Dagegen zeigten die Mutanten VP30_{Δ154} und VP30_{Δ134} hauptsächlich eine homogene Verteilung in der Zelle. Eine Kolo-kalisation mit den NP-induzierten Einschlusskörpern war in diesen Fällen nur noch in stark abgeschwächter Form zu detektieren. Für die Interaktion des VP30 mit den NP-induzierten Einschlusskörpern ist der AS-Bereich 68 – 174 entscheidend. Diese Region des VP30 ist möglicherweise direkt an der Bindung zu den NP-induzierten Nukleokapsid-ähnlichen Strukturen beteiligt.

4.1.3 Transkriptionsaktivierung durch VP30-Deletionsmutanten

Es wurde nun untersucht, welche der in Abb. 4 skizzierten VP30-Deletionsmutanten die EBOV Transkription aktivieren konnten. Dazu wurden BSR T7/5-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für ein EBOV-spezifisches Minigenom sowie für die 4 Nukleokapsid-assoziierten Proteine NP, VP35, L und VP30 kodieren (3.3.8). Das VP30 wurde in den jeweiligen Ansätzen durch eine der in Abb. 4 beschriebenen Deletionsmutanten ersetzt. 24 h nach Transfektion wurde mit den Zellysaten eine CAT-Aktivitätsbestimmung durchgeführt (3.4.5).

EBOV-spezifische Transkription war, wie erwartet, in Anwesenheit von VP30 detektierbar (Abb. 6, Spur 2). Keine der VP30-Deletionsmutanten konnte das VP30 ersetzen (beispielhaft dargestellt: Spuren 3 - 5). Eine schwache Aktivität konnte durch die Mutante $VP30_{\Delta 234}$ detektiert werden, die jedoch nur noch in sehr geringem Ausmaß funktionell war (Spur 3, 2% des CAT-Umsatzes von VP30). Eine Deletion von 68 AS des N-terminus bzw. 54 AS des C-Terminus führte zum vollständigen Verlust der Transkriptionsaktivierung des Proteins (Spuren 4 und 5).

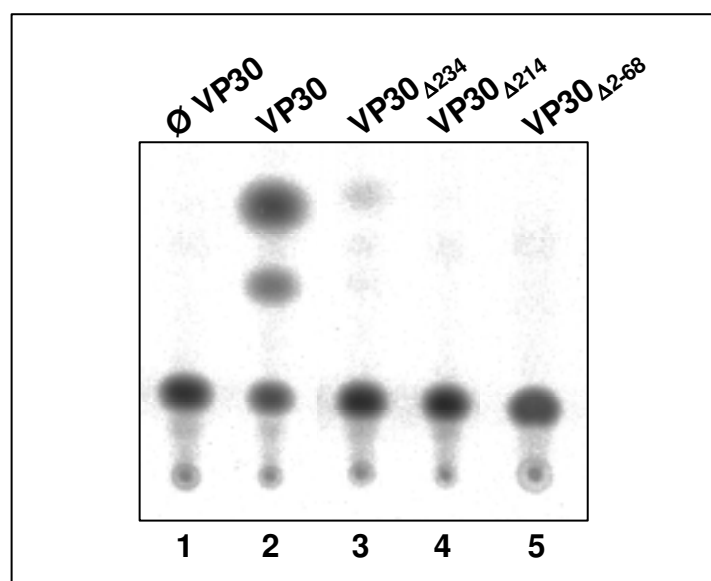


Abb. 6: Transkriptionsaktivierung durch VP30 und VP30-Deletionsmutanten: 5×10^5 BSR T7/5-Zellen wurden mit Plasmiden, die für die Nukleokapsidproteine (NP, VP35, L und VP30 oder VP30-Deletionsmutanten) des EBOV kodieren, transfiziert. Zusätzlich wurde ein Plasmid kotransfiziert, das für ein Ebola-Virus-spezifisches Minigenom kodiert, welches die 3' und 5'-Enden des EBOV-Genoms enthält. Dazwischen liegt das CAT-Reportergen. Die Zellen wurden 2 d nach Transfektion lysiert und die CAT-Aktivität gemessen. Spur 1: Kontrolle, ohne VP30; Spur 2: VP30; Spuren 3 - 5: VP30-Deletionsmutanten.

4.2 Das VP30 besitzt ein Zink-bindendes Motiv

Zinkfinger sind Proteindomänen, die durch Koordination von Zink-Ionen stabilisiert werden und spezifische Interaktionen zu Nukleinsäuren oder anderen Proteinen vermitteln können. Die Zink-Ionen werden meist durch 4 Cystein- bzw. Histidinreste innerhalb des Zinkfingers koordiniert (Laity et al., 2001).

Das humane Kernprotein Nup475 besitzt ein unkonventionelles Zink-bindendes Motiv mit der Sequenzfolge $CX_8CX_5CX_3H$ (DuBois et al., 1990). Eine ähnliche Sequenzfolge ($CX_8CX_4CX_3H$) befindet sich innerhalb des EBOV-VP30 zwischen den AS 72 und 90. Es wurde nun untersucht, ob dieses Motiv tatsächlich Zink-Ionen bindet und inwiefern die Zerstörung des Motivs die bekannten Funktionen des VP30 beeinflusst.

4.2.1 Die Konstruktion von Glutathion S-Transferase-VP30 Fusionsproteinen

Für die Untersuchungen zur Zink-Bindung des VP30 war es notwendig, größere Mengen des Proteins zu gewinnen. Daher sollte das VP30 als Fusionsprotein mit der Glutathion S-Transferase (GST) in *E.coli*-Zellen exprimiert werden. Zur Herstellung des Fusionskonstruktes GST-VP30 wurde der offene Leserahmen des VP30-Gens über PCR amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde über die durch die Primer eingeführten *Bam*HI- und *Eco*RI-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGEX-5X-2 kloniert und das konstruierte Plasmid als pGEX-VP30 bezeichnet. Das pGEX-VP30 wurde in *E.coli* BL21-Zellen transformiert und die Expression des Fusionsproteins GST-VP30 mittels IPTG induziert (3.3.9). Obwohl sich das etwa 60 kDa große Protein gut exprimieren ließ, war es gar nicht oder nur in geringen Mengen löslich. Weder die Veränderung der Wachstumsbedingungen (Absenkung der Inkubationstemperatur auf 12°C) noch die Behandlung der GST-VP30 Aggregate mit hohen Salzkonzentrationen (5 M Harnstoff, oder 2 M NaCl) konnten die Löslichkeit des Fusionsproteins nennenswert erhöhen. Nur unter Verwendung des stark denaturierend wirkenden Guanidinium-Hydrochlorid (5 M) konnte ein Teil des exprimierten Proteins in Lösung gebracht werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der Schwierigkeiten, ein lösliches GST-VP30 zu erhalten, wurde nun die vorhergesagte Zink-bindende Domäne des VP30 allein an das GST fusioniert. Da jedoch nur schwer vorhergesagt werden konnte, welches Ausmaß die flankierenden Sequenzen um das möglicherweise Zink-bindende Motiv mindestens haben mussten, um die strukturelle Integrität dieser Domäne zu erhalten, wurden zunächst vier Fusionskonstrukte des GST hergestellt. Diese enthielten verschieden große Bereiche des VP30 innerhalb der AS 61 und 107 (Abb. 7A). Die Klonierung der Mutanten verlief analog zu der des pGEX-VP30.

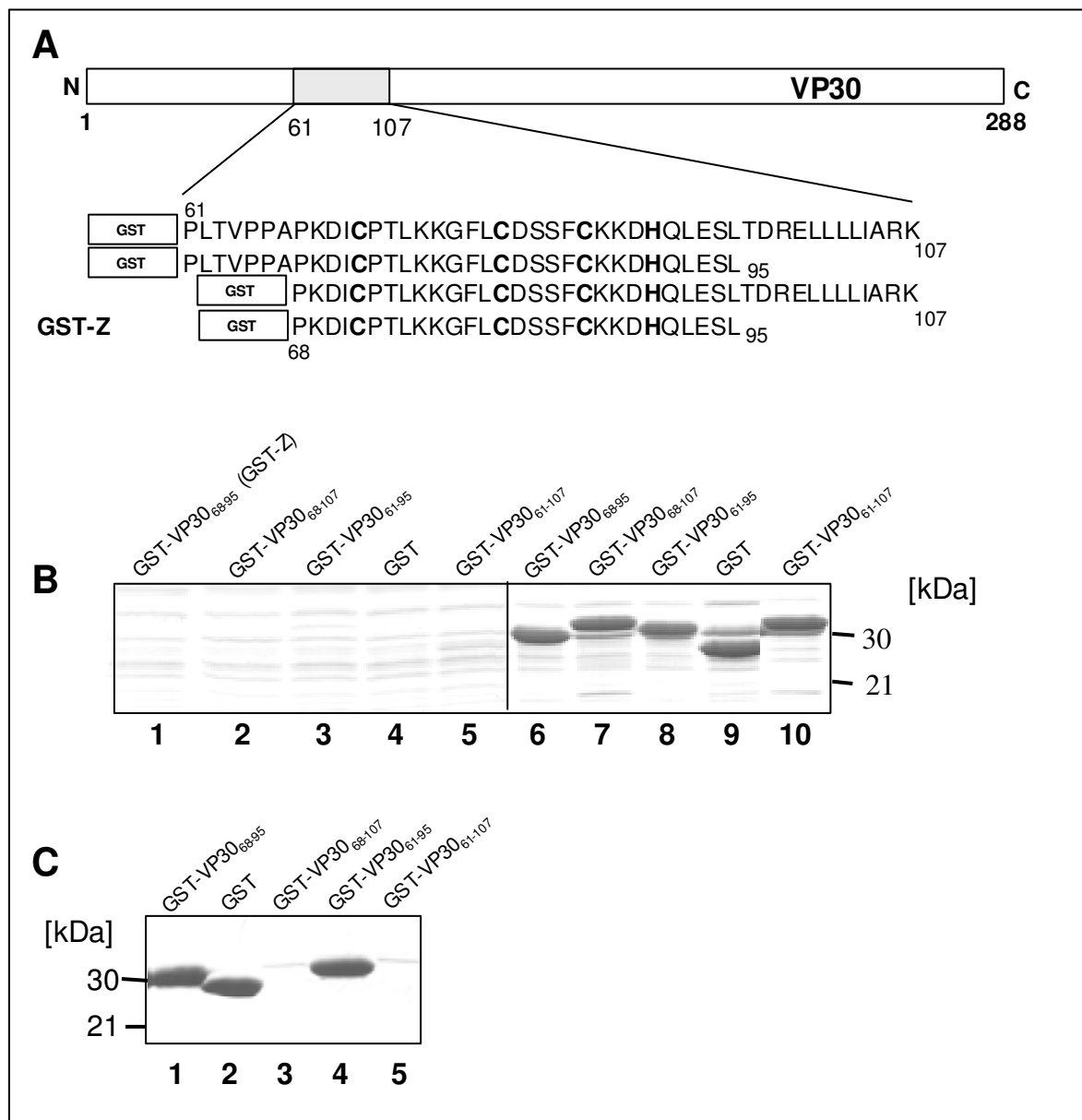


Abb. 7: Expression und Reinigung von GST-VP30 Fusionsproteinen. (A) Schema der 4 Fusionskonstrukte aus GST und einem VP30-Fragment innerhalb der AS 61-107. GST stellt die AS-Sequenz des GST dar, und dahinter sind jeweils die damit fusionierten VP30-spezifischen AS notiert. (B) Expression von GST-VP30 Fusionsproteinen. 100 ml LB-Medium wurde mit *E.coli* BL21-Zellen, die mit den jeweiligen pGEX-Plasmiden, die für die GST-VP30 Fusionskonstrukte kodieren, transformiert waren, 1:100 angeimpft und 2,5 h bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Ein Aliquot wurde jeweils abgenommen, das Lysat über SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Spuren 1 - 5). Die Expression der GST-VP30-Konstrukte wurde durch Zugabe von IPTG induziert (Endkonz. 0,1 mM). Nach einer erneuten Inkubation von 2 h bei 30°C auf dem Schüttler wurden die Zellen geerntet. Es wurden Aliquots entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Spuren 6 - 10). (C) Reinigung von GST-VP30 Fusionsproteinen. Die *E.coli* BL21-Zellen mit exprimierten GST-VP30-Fusionsproteinen wurden lysiert, nach Abzentrifugation der Zelltrümmer die löslichen GST-VP30-Fusionskonstrukte an GSH-Sepharose gekoppelt und über 4 Waschschriffe gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Abb. 7B zeigt die Expression der GST-VP30 Fusionsproteine in *E.coli* BL21-Zellen. Die Zellen wurden lysiert und nach Abzentrifugation der Zelltrümmer die Fusionsproteine aus dem löslichen Überstand mittels Glutathion-Sepharose (GSH) gereinigt (Abb. 7C). Die Reinigung der Fusionskonstrukte GST-VP30₆₈₋₉₅ und GST-VP30₆₁₋₉₅ sowie des GST, welches als Kontrolle mitgeführt wurde, war in ausreichenden Mengen möglich (Abb. 7C, Spuren 1, 2 und 4). Dagegen konnte von den Proteinen GST-VP30₆₈₋₁₀₇ und GST-VP30₆₁₋₁₀₇ nur verhältnismäßig wenig gereinigt werden (Spuren 3 und 5), da der Großteil des exprimierten Proteins nicht löslich war. Gemeinsam ist den unlöslichen Fusionsproteinen ein Tetra-Leucin-Motiv, welchem ein Isoleucin folgt (AS 100 - 104). Vermutlich führten diese hydrophoben Aminosäuren zur Unlöslichkeit der Fusionsproteine. Die folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich mit dem Fusionsprotein GST-VP30₆₈₋₉₅ durchgeführt, das als GST-Z bezeichnet wurde (Abb. 7A; B, Spuren 1 und 6; C, Spur 1).

4.2.2 Die Bindung von Zink an den Aminosäurebereich 68 – 95 des VP30

Der verwendete colorimetrische Zink-Nachweis basiert darauf, dass das zu untersuchende Protein zunächst durch Inkubation mit EDTA von allen zweiwertigen Kationen befreit wird. Anschließend wird das Protein mit Zink-Ionen beladen, die dann durch 4-(2-Pyridylazo) resorcinol (PAR), das divalente metallische Kationen chelatiert, nachgewiesen wird. PAR ändert sein Absorptionsmaximum in Gegenwart von Zink. Die Extinktion der PAR-Lösung wird bei 490 nm gemessen. Über die Bestimmung der Menge des eingesetzten Proteins war dann eine Abschätzung des molaren Verhältnisses von gebundenen Zink-Ionen und Protein möglich.

In einer Voruntersuchung wurde bestimmt, innerhalb welcher Zinkacetatkonzentration die Messung der Extinktionsänderung bei 490 nm linear war. Abb. 8A zeigt, dass die Standardkurve zwischen 5 und 60 μM Zinkacetat linear verlief.

In einer weiteren Voruntersuchung sollte geklärt werden, ob sich die im Versuch eingesetzte Menge an Fusionsprotein quantitativ über ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel bestimmen lässt (3.4.8). Als Standardprotein wurde Serumalbumin (Pierce) verwandt, das in unterschiedlichen Konzentrationen auf ein SDS Gel aufgebracht und dann mittels Coomassie-Blau sichtbar gemacht wurde. Das getrocknete Gel wurde eingescannt und die Stärken der Proteinbanden mit dem Programm TINA2.0 quantifiziert. In Abb. 8B ist gezeigt, dass die ermittelte Kurve im Bereich von 0,5 μg – 3 μg Serumalbumin linear verlief.

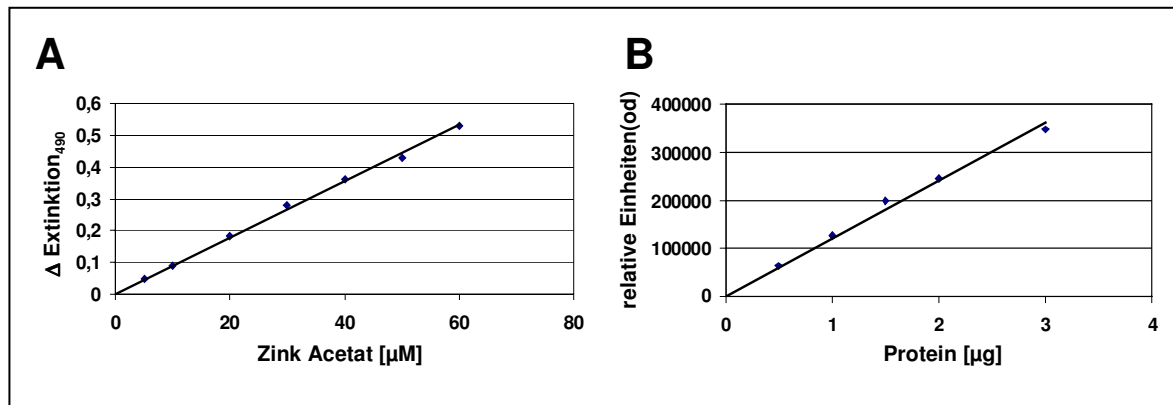


Abb. 8: Standardkurven für die Konzentrationsmessung von Zinkacetat und Protein. **(A)** 50 μl verschiedener Zinkacetat-Konzentrationen (5 – 60 μM) wurden in HBS-200* mit 50 μl einer 0,2 mM PAR-Lösung inkubiert und die Extinktion bei 490 nm mit einem Elisa-Reader gemessen. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden mit einer Nullwert-Messung (ohne Zinkacetat) im HBS-Puffer* verrechnet und die erhaltenen Werte als Δ Extinktion bei 490 nm gegen die jeweiligen Zinkacetat-Konzentrationen aufgetragen. **(B)** Verschiedene Serumalbumin-Konzentrationen (0,5 – 3 μg) in HBS-200* wurden einer SDS-PAGE und Coomassie-Färbung unterzogen. Die getrockneten Gele wurden eingescannt und die Signale der Proteinbanden mit dem ProgrammTINA2.0 quantifiziert. Die dadurch erhaltenen relativen Einheiten (od) sind gegen die jeweiligen Serumalbumin-Konzentrationen aufgetragen.

Das bakteriell exprimierte Protein GST-Z wurde nach der Reinigung über Bindung an GSH-Sepharose zwei unterschiedlichen Inkubationsfolgen unterzogen: einer EDTA-Inkubation und einer Zinkacetat-Inkubation (3.4.7; Schema Abb. 9). Da PAR nicht nur mit Zink, sondern mit allen divalenten metallischen Kationen reagiert, wurden diese zunächst mit 1 mM EDTA weitgehend abgezogen. Bei der folgenden Inkubation mit 0,1 mM Zinkacetat konnte das Protein mit Zink beladen werden. Als Kontrolle diente die EDTA-Inkubation, bei der zunächst mit 0,1 mM Zinkacetat und dann mit 1 mM EDTA inkubiert wurde, um zu verifizieren, dass EDTA tatsächlich metallische Kationen aus der Lösung und vom Protein entfernt (Pfister et al., 2000). Nach 4 Waschschrinen wurde zunächst ein Proteinase K Verdau durchgeführt, um gebundene Zink-Ionen in die Lösung zu entlassen. Zur Detektion der Zink-Ionen wurde schließlich mit 0,2 mM PAR inkubiert und die Extinktion bei 490 nm gemessen (Abb. 9).

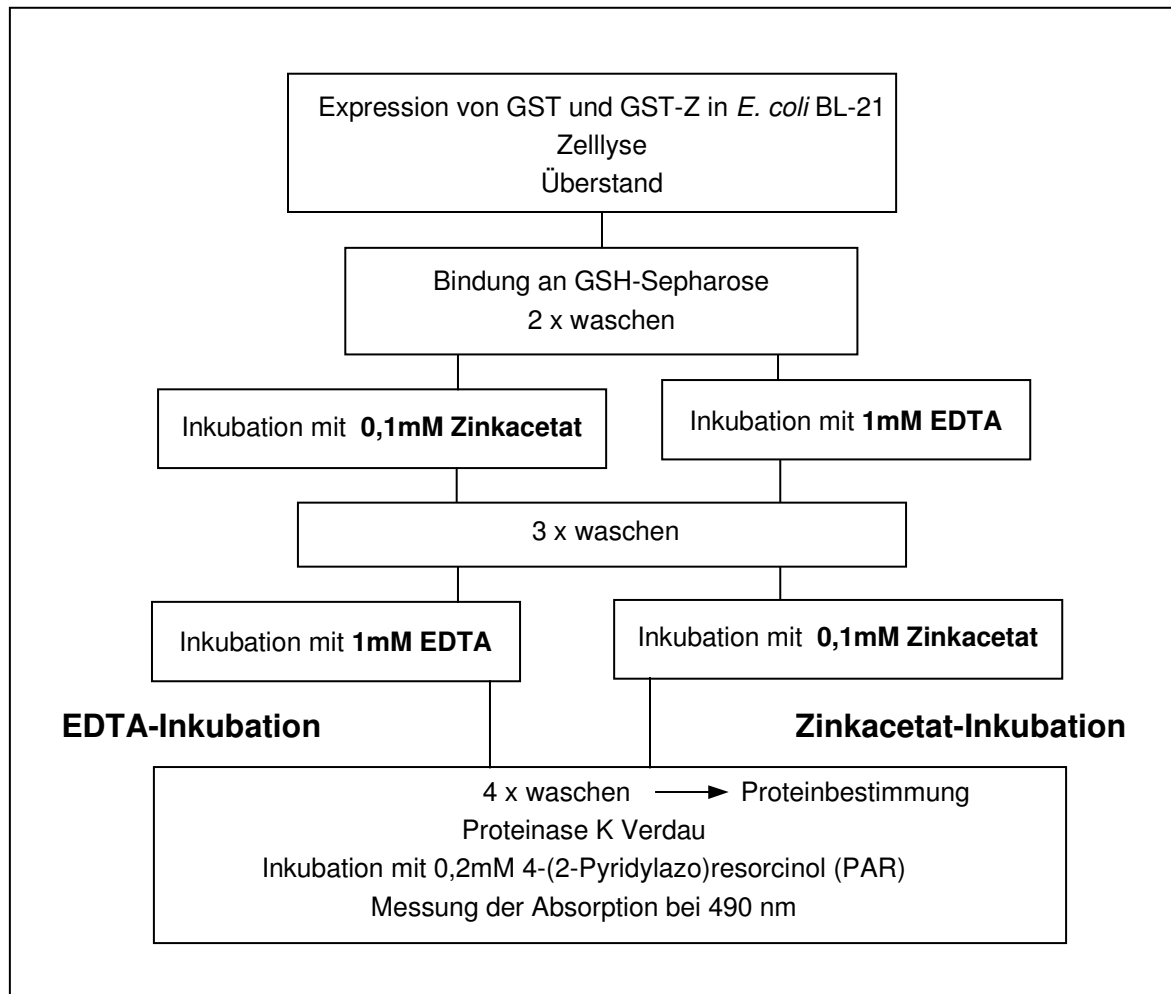


Abb. 9: Schema zum Ablauf des Zink-Nachweises. Die exprimierten und an GSH-Sepharose gekoppelten Proteine GST und GST-Z wurden entweder einer EDTA- oder einer Zinkacetat-Inkubation unterzogen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Ansatz wurde ein Aliquot genommen. Es folgte ein Proteinase K Verdau und die Inkubation mit einer 0,2 mM PAR-Lösung. Über die Messung der Extinktion bei 490 mM wurden dann Zink-Ionen in Lösung detektiert. In Anlehnung an Pfister et al. (2000).

Die Proteinkonzentration an GST-Z wurde mittels der beschriebenen Coomassie-Methode und die gebundenen Zink-Ionen mittels der PAR-Methode bestimmt. Aus den gemessenen Werten konnte nun eine Abschätzung der Konzentration an Zink-Ionen erfolgen, die pro mol GST-Z gebunden wurden. Als Kontrolle wurde mit dem GST ebenso verfahren.

Bei der EDTA-Inkubation wurde für GST und GST-Z nur ein Hintergrund von etwa 0,2 mol Zink / mol Protein gemessen (Abb. 10). Nach der Zinkacetat-Inkubation wurden für GST-Z 1,1 mol Zink / mol Protein detektiert, was bedeutete, dass GST-Z bei der Inkubation mit der Zinkacetat-Lösung tatsächlich mit Zink-Ionen beladen wurde (Abb. 10). Für GST wurden nach der Zinkacetat-Inkubation 0,1 mol Zink / mol Protein gemessen, was wieder als Hintergrund betrachtet werden konnte. Zog man diesen Hintergrund vom gemessenen Wert der Zinkacetat-Inkubation für GST-Z ab, ergab sich die Bindung von 1 mol Zink / mol Protein.

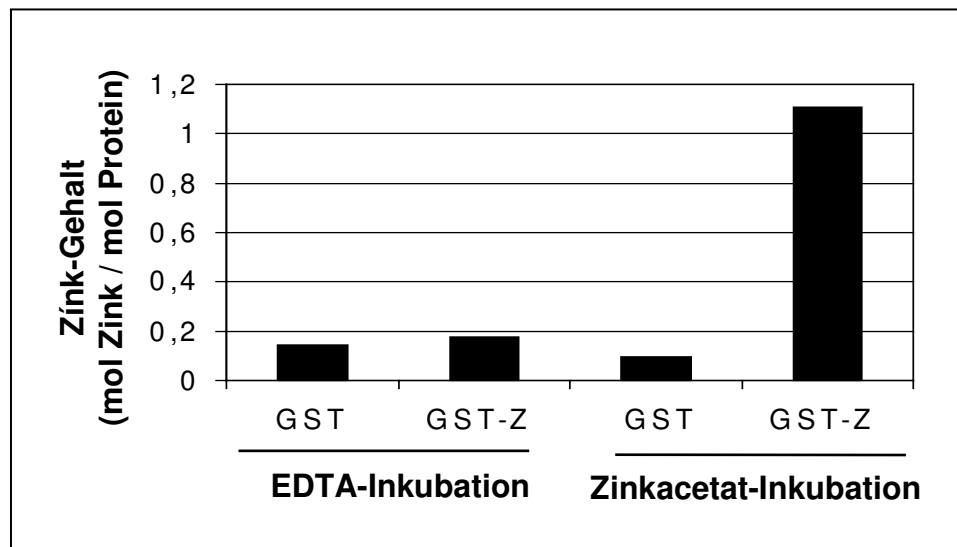


Abb. 10: Zink-Bindung durch GST-Z. Das Diagramm zeigt den Zink-Gehalt für GST und GST-Z nach EDTA-Inkubation bzw. Zinkacetat-Inkubation. Der Zink-Gehalt (mol Zink / mol Protein) wurde durch Messung der jeweiligen Zink- bzw. Proteinkonzentrationen über Standardkurven bestimmt, die für jeden Versuch erstellt wurden (Abb. 8).

4.2.3 Die Bindung von Zink an den mutierten Bereich 68 – 95 des VP30

Es stellte sich nun die Frage, ob Mutationen im Bereich der AS 68 – 95 zum Verlust der Zink-Bindung führen würden.

Es wurden mittels Quick Change-Mutagenese (3.2.8) zwei Mutanten des GST-Z Fusionsproteins konstruiert, bei denen entweder zwei oder alle vier der AS ausgetauscht wurden, die möglicherweise Zink koordinieren (C72 und H90 oder C72, 81, 86 und H90). Diese Mutanten wurden als GST-Z_{II} bzw. GST-Z_{IV} bezeichnet (Abb. 11A). Die Cysteinreste wurden jeweils durch Serin und das Histidin durch Leucin substituiert.

Die Fusionsproteine GST-Z_{II} bzw. GST-Z_{IV} (Abb. 11A) wurden in *E.coli* BL-21-Zellen exprimiert, gereinigt und einem Zink-Nachweis unterzogen. Für das GST wurden $0,15 \pm 0,09$ mol Zink / mol Protein ($n=6$) und für das GST-Z $1,12 \pm 0,25$ mol Zink / mol Protein ($n=6$) gemessen (Abb. 11B).

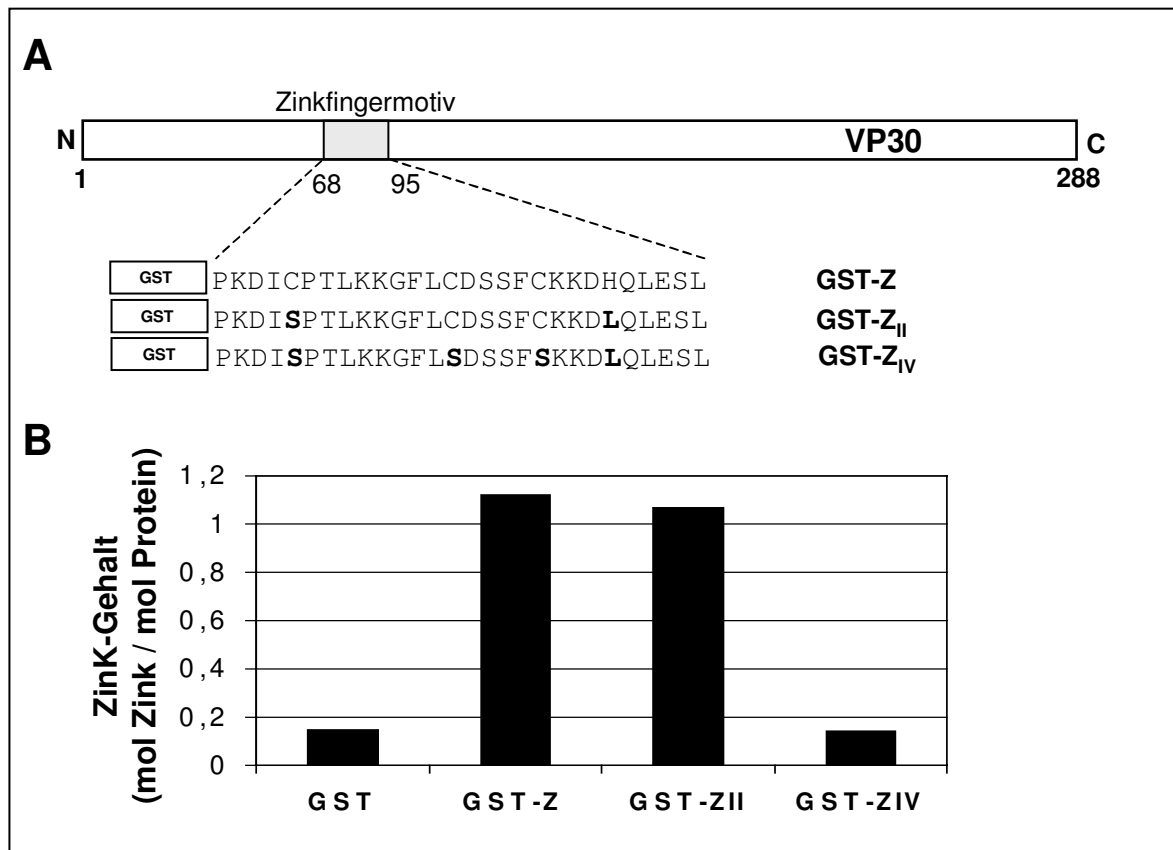


Abb. 11: Zink-Bindung durch GST-Z Mutanten. (A) Schema des GST-Z Fusionsproteins und dessen Mutanten. gst stellt die AS-Sequenz des GST dar, und dahinter sind die damit fusionierten AS 68 – 95 des VP30 notiert. Mutierte AS sind fett gedruckt. (B) Das Diagramm zeigt den gemessenen Zink-Gehalt für GST, GST-Z, GST-Z_{II} und GST-Z_{IV} nach einfacher Zinkacetat-Inkubation (Abb. 9). Der Zink-Gehalt (mol Zink / mol Protein) wurde durch Messung der jeweiligen Zink- bzw. Proteinkonzentrationen über Standardkurven bestimmt, die für jeden Versuch erstellt wurden (Abb. 8).

Für GST-Z_{II} ergab sich ein Wert von $1,07 \pm 0,29$ mol Zink / mol Protein ($n=6$), woraus geschlossen wurde, dass die Substitutionen der Reste Cystein72 und Histidin90 zu Serin bzw. Leucin die Zink-Bindungskapazität nicht beeinträchtigten.

Für das Fusionskonstrukt GST-Z_{IV}, wurden $0,14 \pm 0,07$ mol Zink / mol Protein ($n=4$) gemessen, was etwa dem Wert für GST entsprach (Abb. 11B). Die spezifische Zink-bindende Eigenschaft des VP30-Fragments war durch die Mutation von drei Cysteinen und einem Histidin zerstört. Ein Fusionskonstrukt, in dem nur 3 der 4 möglicherweise Zink-koordinierenden AS ausgetauscht waren (C72+86 und H90 zu S bzw. L), konnte ebenfalls kein Zink mehr binden (nicht gezeigt).

4.2.4 Die Bedeutung des Zinkfingermotivs für die Bindung des VP30 an NP-induzierte Einschlusskörper

Es wurde nun untersucht, wie sich Mutationen innerhalb des Zink-bindenden Motivs auf die Bindung des VP30 an die NP-induzierten Einschlusskörper auswirkten. Dazu wurden mittels Quick Change-Mutagenese im Plasmid pT-VP30, welches das Gen für das VP30 enthält, Mutationen gesetzt, durch die jeweils einer (VP30_{C72S} und VP30_{H90L}) oder alle der Zink-koordinierenden Reste substituiert wurden (VP30_{IV}, Abb. 12A). Die verwendeten Mutageneseoligonukleotide und DNA-Matrizen sind Tab. 2 zu entnehmen. Die hergestellten Plasmide wurden als pT-VP30_{C72S}, pT-VP30_{H90L} und pT-VP30_{IV} bezeichnet.

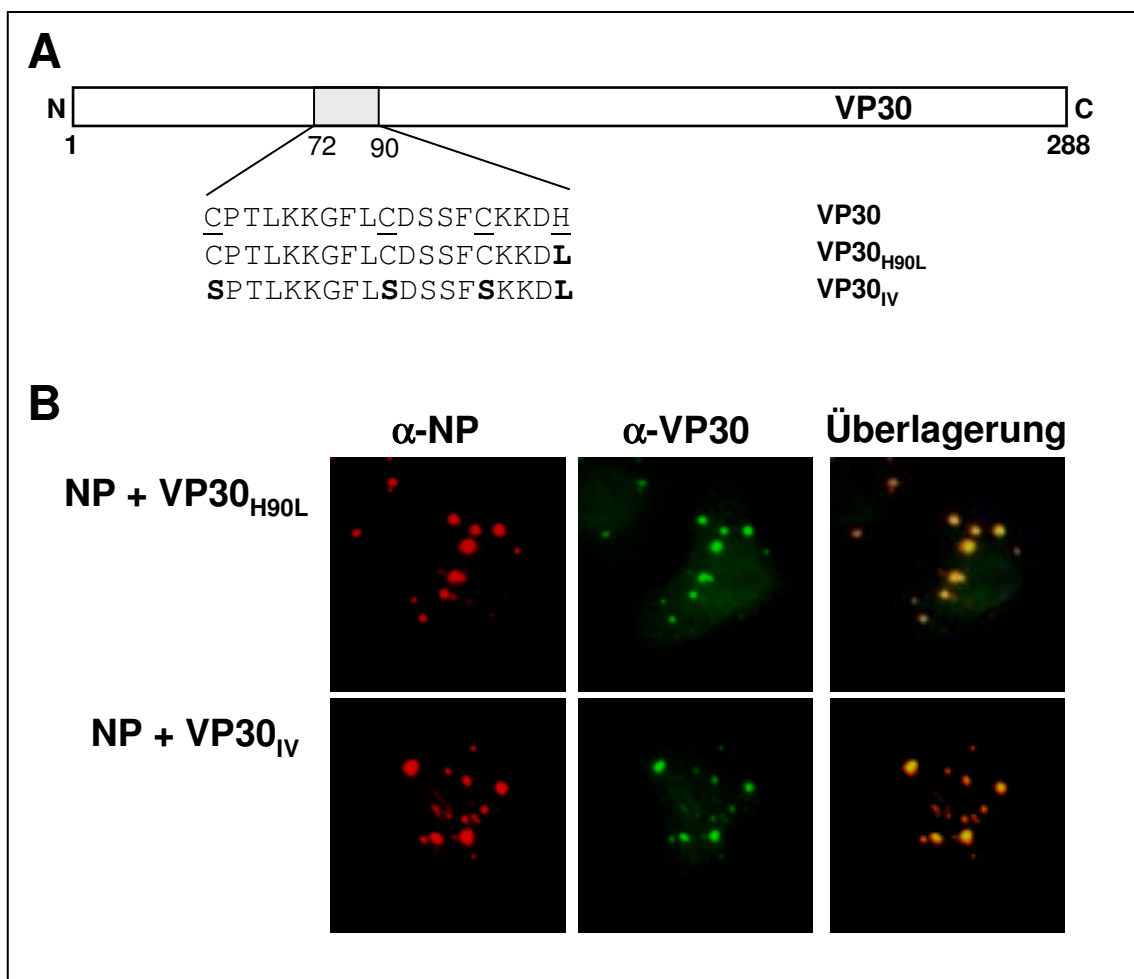


Abb. 12: Die Interaktion zwischen NP-induzierten Einschlusskörpern und VP30-Substitutionsmutanten mit zerstörtem Zink-bindenden Motiv. (A) Schema der VP30-Substitutionsmutanten, wobei der mutierte Bereich des VP30 als AS-Sequenz herausgehoben ist. Die mutierten AS-Reste sind fett gedruckt. **(B)** HeLa-Zellen, auf Deckgläsern kultiviert, wurden mit MVA-T7 infiziert und mit pT-VP30_{H90L} (200 ng) oder pT-VP30_{IV} (200 ng) und pT-NP (1 μ g) kotransfiziert. Die Zellen wurden einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen, wie unter Abb. 1 beschrieben.

Die in Abb. 12A aufgeführten Substitutionsmutanten des VP30 wurden nun zusammen mit dem NP in HeLa-Zellen exprimiert und einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen. In Abb. 12B ist beispielhaft die Koexpression der VP30-Mutanten VP30_{H90L} und VP30_{IV} mit dem NP gezeigt. In beiden Fällen kolokalisierten die VP30-Mutanten deutlich mit den NP-induzierten Einschlusskörpern. Das gleiche Ergebnis wurde mit der Mutante VP30_{C72S} erzielt (nicht gezeigt). Die Zerstörung des Zink-bindenden Motivs innerhalb des VP30 durch Substitutionsmutationen hatte demnach keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen VP30 und den NP-induzierten Einschlusskörpern.

4.2.5 Transkriptionsaktivierung durch VP30-Mutanten mit zerstörtem Zink-bindenden Motiv

VP30-Substitutionsmutanten wurden im EBOV-spezifischen Transkriptionssystem eingesetzt, um zu ermitteln, ob ein intaktes Zink-bindendes Motiv für die transaktivierende Funktion des VP30 notwendig war.

Durch die CAT-Aktivitätsbestimmung zeigte sich, dass die EBOV-spezifische Transkription zwar durch das VP30 (Abb. 13, Spur 2), jedoch nicht durch die Mutanten VP30_{H90L} und VP30_{IV} aktiviert werden konnte (Spuren 3 und 4). Das gleiche galt für den Einsatz der Substitutionsmutante VP30_{C72S} (nicht gezeigt).

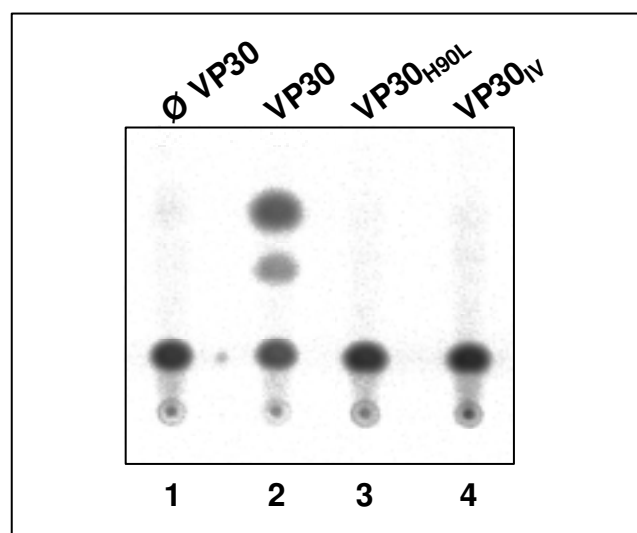


Abb. 13: Transkriptionsaktivierung durch VP30 und VP30-Substitutionsmutanten mit zerstörtem Zink-bindenden Motiv: 5×10^5 BSR T7/5-Zellen wurden mit Plasmiden, die für die EBOV-Nukleokapsidproteine (NP, VP35, L und VP30 oder VP30-Substitutionsmutanten) und das Minigenom kodieren, transfiziert und ein Transkriptions-Testansatz durchgeführt, wie unter Abb. 6 beschrieben. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion lysiert und die CAT-Aktivität bestimmt. Spur 1: Kontrolle, ohne VP30; Spur 2: VP30; Spuren 3 und 4: VP30-Substitutionsmutanten.

Der Verlust der Transkriptionsaktivierung erfolgte schon, wenn nur eine der für die Zink-Bindung notwendigen AS substituiert war. Diese Beobachtung deutete auf die besondere Bedeutung des Zink-bindenden Motivs für den Ablauf der viralen Transkription hin.

4.3 Das VP30 bildet Multimere

Von vielen Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass sie erst in oligomerer Form aktiv sind. Deshalb wurde untersucht, ob auch das VP30 multimerisiert.

Diese Untersuchung basierte auf der Beobachtung, dass ein mit dem Flag-Epitop (8 AS) fusioniertes VP30 (VP30f) aufgrund seiner langsameren Wandergeschwindigkeit in der SDS-PAGE (3.4.1) von VP30 deutlich zu unterscheiden ist. Wurden beide Proteine gemeinsam exprimiert und das VP30f mit einem α -Flag Antikörper M2 gefällt, wurde das nichtmarkierte VP30 ebenfalls präzipitiert (Abb. 14, Spur 3), obwohl es nicht mit dem α -Flag Antikörper reagieren konnte (Abb. 14, Spur 1). Dieser Befund zeigt, dass das VP30 homooligomere Komplexe eingeht.

4.3.1 Untersuchungen zur Stöchiometrie der VP30-Multimere

Zur Bestimmung der Stöchiometrie der VP30-Oligomere wurde ein „epitope dilution assay“ durchgeführt, wie er bei Curran et al. (1995) beschrieben wurde. Dazu wurden HeLa-Zellen mit MVA-T7 infiziert und anschließend mit den Plasmiden pT-VP30 und pT-VP30f transfiziert. Die Zellen wurden mit [³⁵S]-PROMIX metabolisch markiert (3.3.5) und lysiert. Das Flag-getaggte VP30 wurde dann mit dem α -Flag Antikörper M2 und Protein A-Sepharose immunpräzipitiert (3.3.6). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das getrocknete Gel auf eine Biolumineszenz-Platte aufgelegt (3.4.2) und die radioaktiven Signale von VP30f und dem kosedimentierten VP30 mittels des Programms TINA2.0 quantifiziert (Abb. 14, Spuren 4 - 8). Bei der Transfektion der Plasmide wurde die Menge von pT-VP30 bei 5 μ g konstant gehalten, dagegen die Menge des pT-VP30f schrittweise bis auf 0,1 μ g herabgesetzt (Abb. 14, oben). Dies entsprach schließlich einem Verhältnis für pT-VP30 zu pT-VP30f von 50:1. Ziel dieser Titration war es, das VP30 im Gegensatz zum VP30f in einem derart großen Überschuss zu exprimieren, dass aus dem Verhältnis des kopräzipitierten VP30 zum präzipitierten VP30f eine Aussage über die Stöchiometrie der Oligomerisierung des VP30 gemacht werden konnte. Erreicht beispielsweise der Quotient aus präzipitiertem VP30 / VP30f auch bei sehr großem Überschuss an VP30 nicht den Wert 1, nähert sich diesem aber asymptotisch an, so ließe sich schließen, dass das VP30 Dimere bildet.

Bei Kotransfektion gleicher Mengen der Plasmide für VP30 und VP30f ergab sich ein Quotient von 0,8 für die sedimentierten Proteine VP30 / VP30f (Abb. 14, Spur 3). Dieser Wert stieg mit zunehmendem Überschuss an VP30 an, bis er bei 4,3 ein Maximum erreichte (Spuren 4 - 7). Daraus ist zu schließen, dass die Anzahl an VP30 Molekülen in einem Komplex größer als fünf ist.

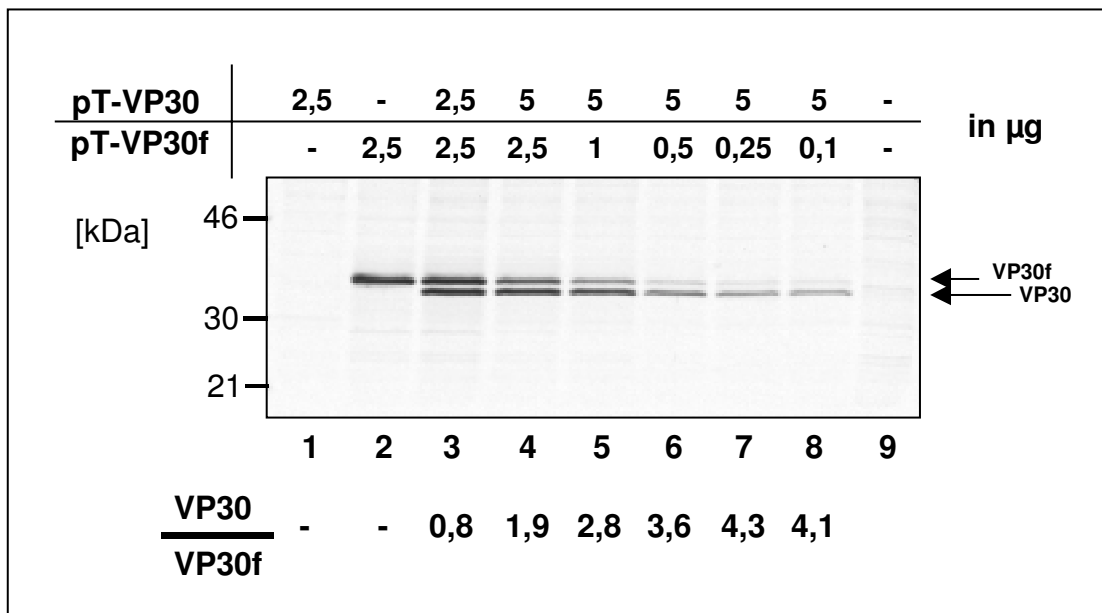


Abb. 14: Stöchiometrie der VP30-Multimerisierung. HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und mit verschiedenen Mengen an pT-VP30 und pT-VP30f kotransfiziert. Die kotransfizierten Mengen für die jeweiligen Plasmide sind oberhalb in der Tabelle angegeben. 12 h nach Transfektion wurden die Zellen mit [³⁵S]-PROMIX metabolisch markiert und VP30f aus dem Überstand über den α -Flag Antikörper M2 und Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiven Signale der Proteinbanden wurden mittels des Programms TINA2.0 quantifiziert und der Quotient aus VP30 / VP30f gebildet (unten). Spuren 1 und 2: Kontrollen, Einzeltransfektion von pT-VP30 bzw. pT-VP30f. Spuren 3 – 8: Kotransfektion von pT-VP30 bzw. pT-VP30f. Die Menge des pT-VP30 wurde (ab Spur 4) konstant gehalten, die Menge des pT-VP30f immer weiter verringert. Spur 9: MVA-T7-infizierte HeLa-Zellen.

4.3.2 Eingrenzung der Multimerisierungsdomäne auf dem VP30

Um auf dem VP30 die Region zu lokalisieren, die für die Multimerisierung des Proteins notwendig ist, wurden Deletionsmutanten des VP30 in der Koimmunpräzipitation eingesetzt. Die verwendeten Proteine sind in Abb. 15 schematisch gezeigt.

Neben dem VP30 handelt es sich um die N-terminale Deletionsmutante VP30 $_{\Delta 2-68}$, deren Klonierung unter 4.1.2 beschrieben wurde, und C-terminale Deletionsmutanten bei denen sukzessive Teile des C-Terminus entfernt wurden (Abb. 4). Exemplarisch ist die kürzeste der Mutanten dargestellt (VP30 $_{\Delta 114}$). Das VP30 und jeweils eine der Deletionsmutanten wurde mittels des MVA-T7-Expressionsystems in HeLa-Zellen exprimiert und metabolisch mit [³⁵S]-PROMIX markiert. Das weitere Verfahren verlief analog zu der unter 4.3.1 beschriebenen Koimmunpräzipitation, wobei hier von jedem Plasmid gleiche Mengen (1,5 µg) transfiziert wurden.

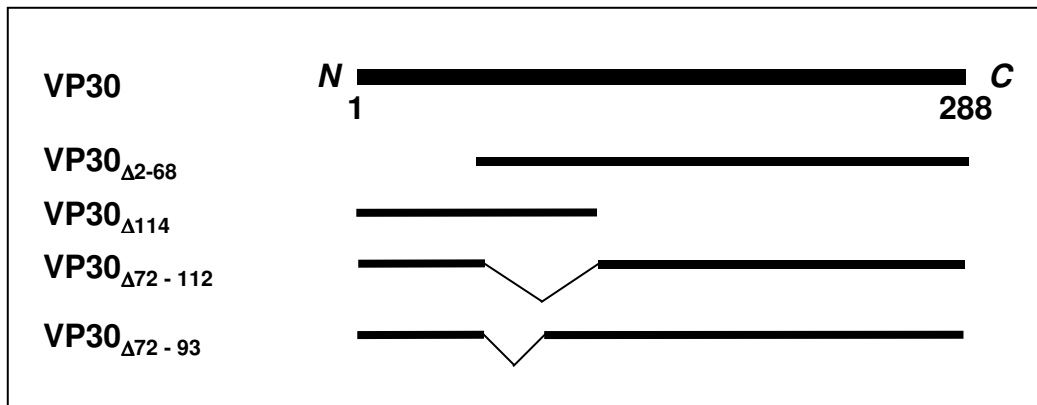


Abb. 15: Schema von VP30-Deletionsmutanten II. Dargestellt ist das VP30 und die verschiedenen Deletionsmutanten. Die Balken stellen den Bereich des Proteins dar, der exprimiert wurde.

Es zeigte sich, dass das VP30 über das Flag-getaggte VP30 $_{\Delta 2-68}$, das in der SDS-PAGE bei 31 kDa läuft, kopräzipitiert werden konnte (Abb. 16, Spur 1). Die Bande in Spur 1, die in Höhe des VP30f läuft ist möglicherweise ein zelluläres Protein, das kopräzipitiert wurde. Weiterhin wurde die Mutante VP30 $_{\Delta 114}$ (16 kDa) durch das VP30f kosedimentiert (Spur 2). Dies Ergebnis ließ vermuten, dass innerhalb der AS 69 - 113 ein Bereich liegt, der die Multimerisierung des VP30 vermittelt.

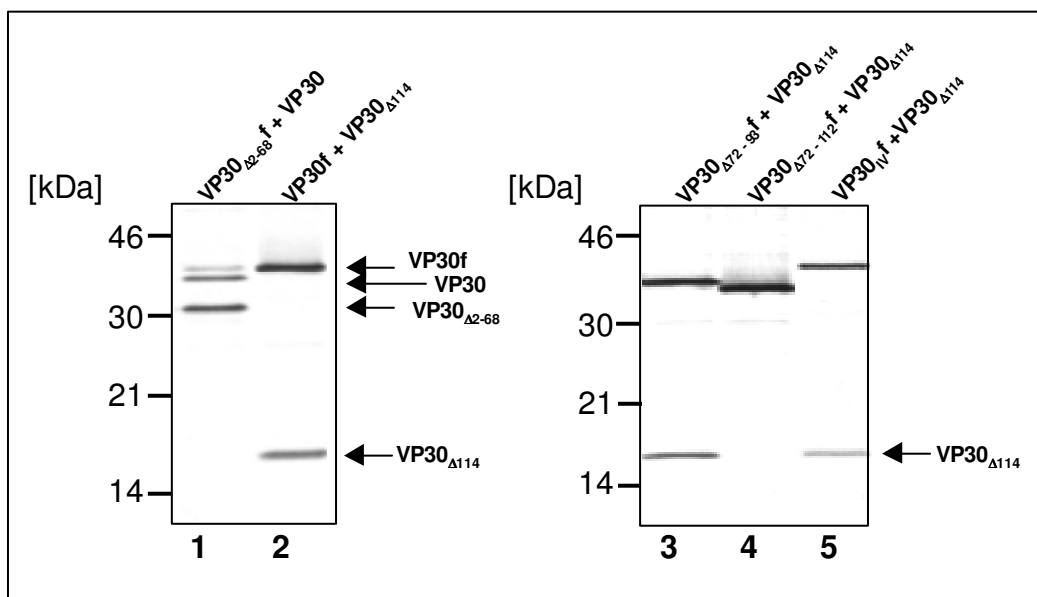


Abb. 16: Koimmunpräzipitationen von VP30 und VP30-Mutanten. HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und mit jeweils 2 Plasmiden, die für die in Abb. 15 gezeigten Proteine kodieren, kotransfiziert. 12 h nach Transfektion wurden die Zellen mit [35 S]-PROMIX metabolisch markiert und die Proteine über den α -Flag Antikörper M2 und Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Transfektionen: Spur 1: pT-VP30 $_{\Delta 2-68}$ f und pT-VP30; Spur 2: pT-VP30f und pT-VP30 $_{\Delta 114}$; Spur 3: pT-VP30 $_{\Delta 72-93}$ f und pT-VP30 $_{\Delta 114}$; Spur 4: pT-VP30 $_{\Delta 72-112}$ f und pT-VP30 $_{\Delta 114}$; Spur 5: pT-VP30 $_{IV}$ f und pT-VP30 $_{\Delta 114}$.

Die multimerisierungskompetente Mutante VP30 $_{\Delta 114}$ wurde auch in den folgenden Koimmunpräzipitationen eingesetzt. Es sollten nun zwei interne Deletionsmutanten des VP30 konstruiert werden, bei denen die Bereiche AS 72 - 93 bzw. 72 - 112 fehlten (Abb. 15). Durch Quick Change-Mutagenese wurde jeweils eine neue *PshAI*-Schnittstelle in das VP30 Gen eingebracht, zusätzlich zu der *PshAI*-Schnittstelle an Position 8721 (Position im viralen Genom). Für VP30 $_{\Delta 72-93}$ wurde eine *PshAI*-Schnittstelle an Position 8786 und für VP30 $_{\Delta 72-112}$ eine an Position 8843 eingeführt. Die verwendeten Mutageneseoligonukleotide und DNA-Matrizen sind Tab. 2 zu entnehmen. Die mutagenisierten Plasmide wurden mit *PshAI* verdaut, wodurch jeweils zwei DNA-Fragmente entstanden (ca. 5200 Basenpaare und < 130 Basenpaare). Das jeweils größere Fragment wurde über ein Agarosegel gereinigt und mit sich selbst ligiert. Die neu konstruierten Plasmide pT-VP30 $_{\Delta 72-93}$ f und pT-VP30 $_{\Delta 72-112}$ f sowie pT-VP30 $_{IV}$ f wurden jeweils gemeinsam mit pT-VP30 $_{\Delta 114}$ in HeLa Zellen transfiziert, mit Hilfe des MVA-T7 Expressionssystems synthetisiert und metabolisch radioaktiv markiert. Anschließend wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Deletion der AS 72 - 93, die auch das Zink-bindende Motiv des VP30 enthalten, keinen Einfluss auf die VP30 - VP30 Interaktion hatte (Abb. 16, Spur 3). Dass das Zink-bindende Motiv nicht für die Multimerisierung von Bedeutung ist, wurde durch die Kosedimentation des VP30 $_{\Delta 114}$ durch VP30 $_{IV}$ f, in dem das Zink-bindende Motiv zerstört ist, bestätigt (Spur 5). Wurde im VP30 der Bereich AS 72 - 112 deletiert, konnte keine Interaktion mit dem VP30 $_{\Delta 114}$ mehr nachgewiesen werden (Spur 4). Aus diesen Versuchen lässt sich vermuten, dass ein wichtiger Bereich für die Interaktion des VP30 mit sich selbst zwischen AS 94 und 112 liegt.

4.3.3 Die Zerstörung des Leucinclusters innerhalb der AS 100 - 102 und die Oligomerisierung des VP30

Innerhalb der AS 94 - 112 des VP30 ist ein Cluster von 4 Leucinresten (AS 100 - 103) besonders auffällig (Abb. 17A). Um die Bedeutung dieser Leucinreste für die VP30-VP30-Interaktion zu untersuchen, wurden durch Quick Change-Mutagenese die ersten drei Leucine dieses Clusters zu Alaninen substituiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind Tab. 2 zu entnehmen. Die von den klonierten Plasmiden pT-VP30 $_{3LA}$ und pT-VP30 $_{3LAf}$ abgeleiteten rekombinanten Proteine wurden als VP30 $_{3LA}$ bzw. VP30 $_{3LAf}$ bezeichnet (Abb. 17A).

Die Mutante VP30 $_{3LA}$ wurde nun mit VP30f in der Koimmunpräzipitation eingesetzt, wie unter 4.3.2 beschrieben. Es zeigte sich, dass die Oligomerisierung des VP30 durch die Zerstörung des Leucinclusters deutlich gestört war (Abb. 17, Vergleich der Spuren 1 und 2).

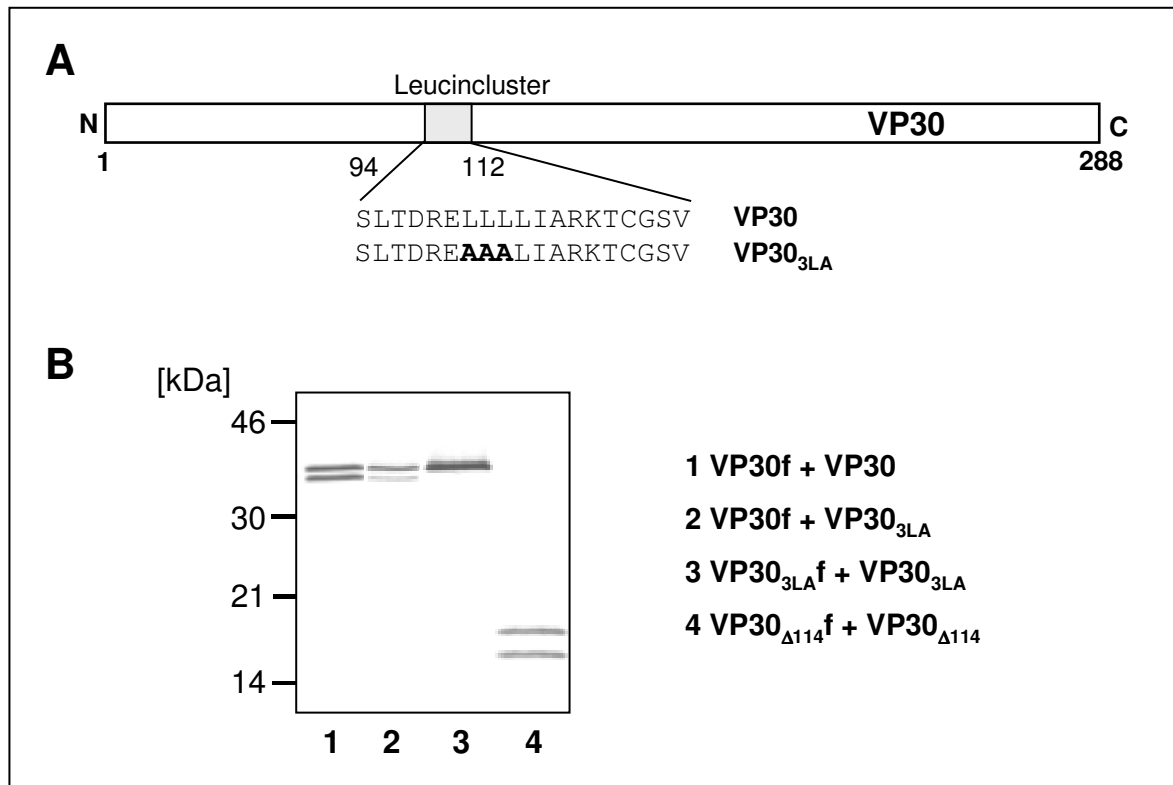


Abb. 17: Koimmunpräzipitation von VP30 und VP30-Mutanten mit zerstörtem Leucin-Cluster. (A) Schema der VP30-Substitutionsmutanten. Die AS-Sequenz 94 – 112 des VP30 ist herausgehoben. Mutierte AS sind fett gedruckt. (B) HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und mit jeweils 2 Plasmiden kotransfiziert. 12 h nach Transfektion wurden die Zellen mit [³⁵S]-PROMIX metabolisch markiert und die Proteine nach Zentrifugation aus dem Überstand über den α-Flag Antikörper M2 und Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt ist eine Autoradiographie des getrockneten Gels. Transfektionen: Spur 1: pT-VP30^f und pT-VP30; Spur 2: pT-VP30^f und pT-VP30_{3LA}; Spur 3: pT-VP30_{3LA}^f und pT-VP30_{3LA}; Spur 4: pT-VP30_{Δ114}^f und pT-VP30_{Δ114}.

Wenn die eingesetzten Proteine beide die Substitutionen 3LA enthielten, konnte keine Interaktion mehr detektiert werden (Spur 3). Dadurch ließ sich erkennen, dass die Leucinreste 100 - 102 eine unmittelbare Bedeutung für die Oligomerisierung des VP30 besitzen.

Es war jedoch nicht auszuschließen, dass noch andere Bereiche auf dem VP30 für Oligomerisierung notwendig sind, da die Kopräzipitationsstudien immer mit mindestens einem Protein gemacht wurden, bei dem der gesamte C-Terminus ab AS 115 vorhanden war. Deshalb wurde nun die Frage untersucht, ob der N-Terminus des VP30 für die Multimerisierung des Proteine ausreichend ist. Dazu wurden die Mutanten VP30_{Δ114} und VP30_{Δ114}^f in der Kosedimentation eingesetzt. Die Durchführung dieses Versuches zeigte, dass die Interaktion der Mutanten durch die Deletion des C-Terminus nicht gestört war (Abb. 17B, Spur 4).

4.3.4 Die Bedeutung der AS 100 - 102 für die Bindung an NP-induzierte Einschlusskörper

Um die funktionelle Bedeutung der Leucinreste AS 100 - 102 des VP30 (s. Abb. 17) für die Bindung an NP-induzierte Einschlusskörper zu untersuchen, wurde die Substitutionsmutante VP30_{3LA} zusammen mit dem NP in HeLa-Zellen mit Hilfe des MVA-T7-Expressionssystems synthetisiert und die Zellen einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. In Abb. 18 ist gezeigt, dass die Mutation der Leucinreste 100 - 102 keinen Einfluss auf die Bindung von VP30 an die NP-induzierten Einschlusskörper hatte, da VP30_{3LA} und NP vollständig kolokalisierten.

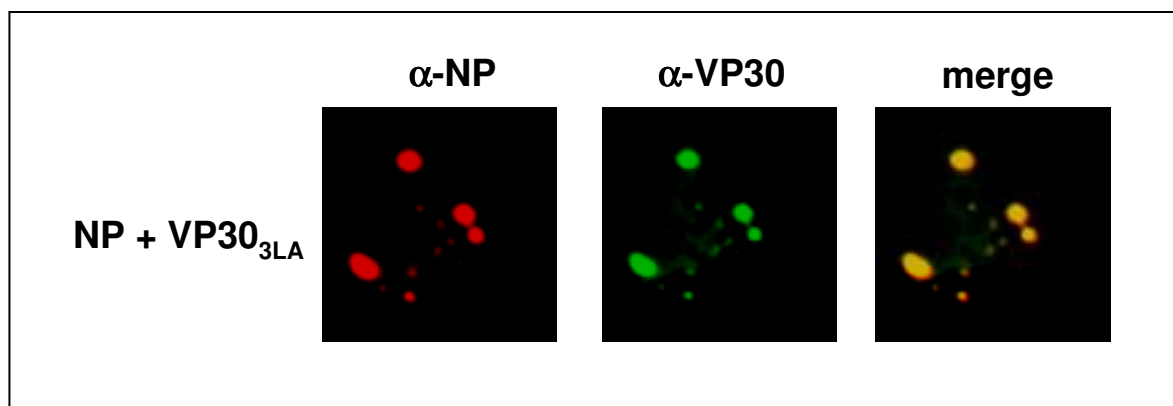


Abb. 18: Die Interaktion zwischen NP-induzierten Einschlusskörpern und VP30_{3LA}. HeLa-Zellen, auf Deckgläsern kultiviert, wurden mit MVA-T7 infiziert und mit pT-VP30_{3LA} (200 ng) und pT-NP (1 μ g) kotransfiziert. Die Zellen wurden einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen, wie unter Abb. 3 beschrieben.

4.3.5 Die Bedeutung der AS 100 - 102 für die Transkriptionsaktivierung durch VP30

Die Mutante VP30_{3LA} wurde anschließend im EBOV-spezifischen Transkriptionssystem eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Mutation der Leucine AS 100 - 102 die transkriptionsaktivierende Funktion des Proteins verändert. Die CAT-Aktivitätsbestimmung zeigte, dass die Mutante VP30_{3LA} keine EBOV-spezifische Transkription aktivieren konnte (Abb. 19, Spur 3). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das VP30 erst in oligomerer Form transkriptionell aktiv ist.

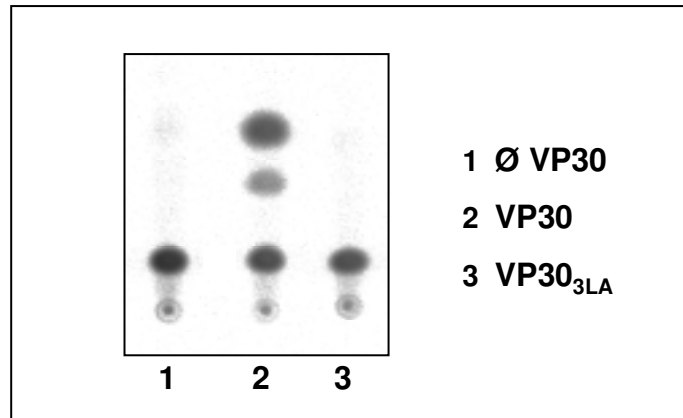


Abb. 19: Transkriptionsaktivierung durch VP30 und VP30_{3LA}. 5×10^5 BSR T7/5-Zellen wurden mit Plasmiden, die für die Nukleokapsidproteine (NP, VP35, L und VP30 oder VP30_{3LA}) kodieren, transfiziert und ein Transkriptions-Testansatz durchgeführt, wie unter Abb. 6 beschrieben. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion lysiert und die CAT-Aktivität bestimmt. Spur 1: Kontrolle, ohne VP30; Spur 2: VP30; Spur 3: VP30_{3LA}.

4.4 Charakterisierung der Phosphorylierung des VP30

Die Phosphorylierung des VP30 ist innerhalb der Familie Filoviridae konserviert, weshalb vermutet wurde, dass diese Modifikation eine funktionelle Bedeutung für die Proteine besitzt. Die phosphorylierten Bereiche des EBOV-VP30 sollten lokalisiert werden, um dann den Einfluss der Phosphorylierung auf die Interaktion des VP30 mit den NP-Einschlusskörpern und für die Transkriptionsaktivierung durch das VP30 zu charakterisieren.

4.4.1 Die Phosphoaminosäuren des VP30

Zunächst wurde bestimmt, welche Art von Aminosäuren innerhalb des VP30 phosphoryliert sind. Dazu wurde eine Phosphoaminosäure-Analyse durchgeführt. VP30, das in HeLa-Zellen mittels des MVA-T7 Expressionssystems synthetisiert worden war, wurde mit [$^{32}\text{P}_i$] metabolisch markiert und über Immunpräzipitation und Blot auf eine Membran (3.4.3) gereinigt. Das Protein wurde mit 5,7 N HCl hydrolysiert (3.4.6) und die Hydrolysate

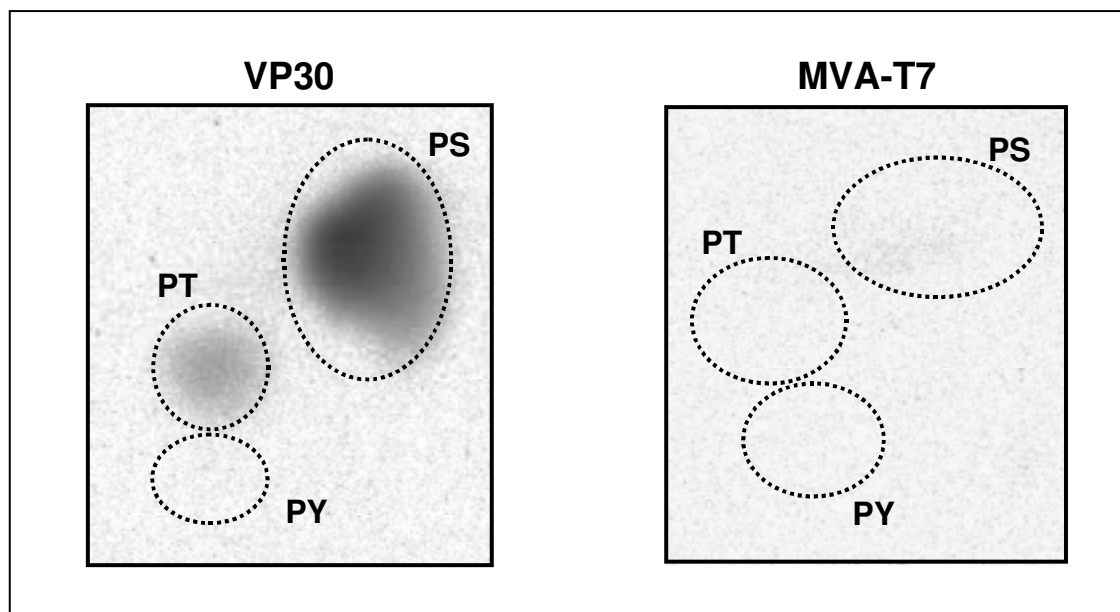


Abb. 20: Phosphoaminosäureanalyse des VP30. (VP30) HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und mit pT-VP30 transfiziert. 14 h nach Infektion wurden die Zellen mit [$^{32}\text{P}_i$] markiert und das VP30f über den α -Flag Antikörper M2 und Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon-PSQ-Membran gebロットet und die VP30-spezifische Bande ausgeschnitten. Das Protein wurde in 5,7 N HCl hydrolysiert, in einer Mischung von Standard-Phosphoaminosäuren resuspendiert und auf einer DC-Platte in 2 Dimensionen chromatographiert. Die DC-Platte wurde auf eine Biolumineszenz-Platte aufgelegt und die radioaktiven Signale über das TINA2.0-Programm sichtbar gemacht. (MVA-T7) Kontrolle. MVA-T7-infizierte Zellen, die nicht transfiziert wurden und mit denen ebenso verfahren wurde wie unter (VP30) beschrieben. PS: Phosphoserin. PT: Phosphothreonin. PY: Phosphotyrosin.

anschließend in einer 2-dimensionalen Dünnschichtchromatographie / Elektrophorese aufgetrennt (Abb. 20). Die Chromatographie-Platten wurden auf eine Biomager-Platte aufgelegt und die radioaktiven Signale mittels des Programms TINA2.0 quantifiziert. Es ergab sich für das VP30 ein Verhältnis zwischen Phosphoserin zu Phosphothreonin von 40:1. Phosphotyrosin wurde nicht detektiert.

4.4.2 Proteolytischer Verdau des VP30

Vom MBGV-VP30 war bekannt, dass dessen Phosphatakzeptorstellen innerhalb des N-terminalen Teils des Proteins in Clustern vorliegen (Modrof et al., 2001). Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung des EBOV-VP30 ebenfalls innerhalb des N-Terminus des Proteins stattfindet, wurde eine pH-abhängige proteolytische Spaltstelle in das Protein eingeführt, indem das Glutamat an Position 60 zu Aspartat ausgetauscht wurde. Die Klonierung des Plasmids pT-VP30_{E60D} wurde über Quick Change-Mutagenese durchgeführt (Tab. 2). Die davon abgeleitete Flag-markierte VP30-Mutante wurde als VP30_{E60D} bezeichnet. VP30 und VP30_{E60D} wurden im MVA-T7 Expressionssystem synthetisiert, mit [³⁵S]-PROMIX oder [³²P_i] markiert und über den α-Flag Antikörper M2 und Protein A-Sepharose immunpräzipitiert.

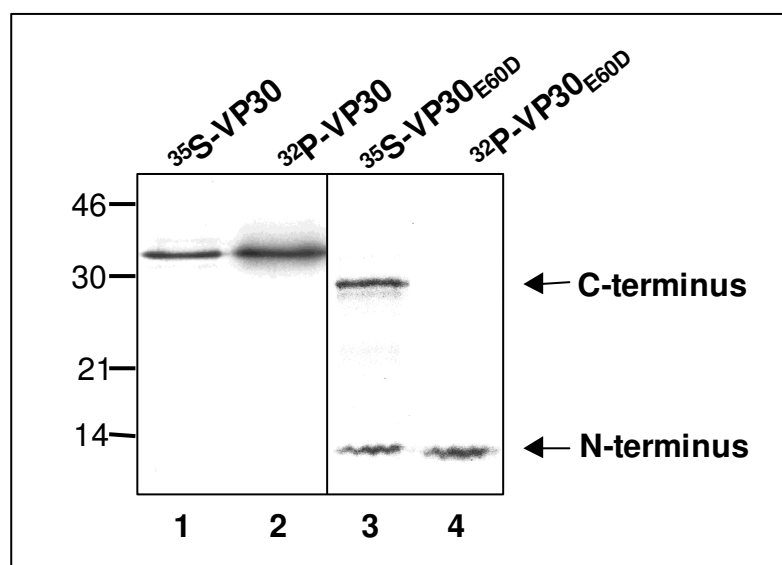


Abb. 21: Proteolytische Spaltung des VP30_{E60D}. HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und mit pT-VP30f bzw. pT-VP30_{E60D}f transfiziert. 14 h nach Transfektion wurden die Zellen mit [³⁵S]-PROMIX oder [³²P_i] metabolisch markiert und VP30 sowie VP30_{E60D} über den α-Flag Antikörper M2 und Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Immunkomplexe des VP30_{E60D} wurden für 60 h mit 70%iger Ameisensäure bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden dann über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Spuren 1 und 2: unbehandeltes VP30; Spuren 3 und 4 Ameisensäure-behandeltes VP30_{E60D}.

VP30_{E60D} wurde dann mit 70%iger Ameisensäure inkubiert (3.4.9), um es zwischen den Resten Aspartat 60 und Prolin 61 zu spalten (Landon, 1977). Die proteolytischen Fragmente wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiven Signale durch eine Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 21). Während das VP30 (Spuren 1 und 2) bei 34 kDa lief, war die mit Ameisensäure behandelte Mutante VP30_{E60D} in zwei Fragmente gespalten (Spur 3). Diese liefen bei etwa 29 kDa (C-Terminus, 228 AS) und 11 kDa (N-Terminus, 60 AS). Die Ameisensäurebehandlung des [³²P_i]-markierten VP30_{E60D} zeigte schließlich nur die 11 kDa Bande, die den N-Terminus des Proteins darstellte (Spur 4). Demnach war das VP30 hauptsächlich innerhalb der 60 N-terminalen AS phosphoryliert.

4.4.3 Der Phosphorylierungsstatus von VP30-Substitutionsmutanten

Sequenzanalysen der 60 N-terminalen AS des VP30 ergaben, dass sich innerhalb des Bereichs AS 29 - 46 zwei Serincluster befinden. Jedes dieser Cluster (AS 29 - 31 und AS 42 - 46) enthält 3 Serinreste (Abb. 22, oben). Es sollten nun Flag-markierte VP30-Substitutionsmutanten hergestellt werden, bei denen diese Serinreste und Threoninrest 52 zu Alanin ausgetauscht waren. Diese Mutanten wurden durch Quick Change-Mutagenese hergestellt, mittels der DNA-Matrizen und Oligonukleotide, die in Tab. 2 dargestellt sind. Die Herstellung der Deletionsmutante VP30_{Δ2-68} ist unter 4.1.2 beschrieben.

Die Mutanten wurden in HeLa-Zellen mit dem MVA-T7 Expressionssystem synthetisiert, metabolisch mit [³²P_i] markiert, immunpräzipitiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Über Antikörperbindung und Detektion durch Chemiluminiszenz (3.4.4) wurde die Expression der jeweiligen Mutante kontrolliert und quantifiziert. Die [³²P_i]-Signale wurden anschließend mit dem Biolumineszenz-Analyzator und dem Programm TINA2.0 quantifiziert und über eine Bestimmung der jeweiligen Expressionsstärke der Proteine normalisiert. Für jede Mutante wurden mindestens 3 unabhängige Analysen des Phosphorylierungsstatus durchgeführt.

Der Austausch eines der Serincluster, 29 - 31 oder 42 - 46, führte zu einer Reduktion der ³²P-Signalstärke von 41% bzw. 56%. (Abb. 22, Spuren 1, 3 und 4). Waren alle 6 Serinreste innerhalb der AS 29 - 46 substituiert, betrug das radioaktive Signal etwa noch 16% von dem des VP30 (Spur 5). Der zusätzliche Austausch des Threonin 52 führte zu einer weiteren Abnahme der Phosphatmarkierung auf 6% im Vergleich zum VP30 (Spur 6). Schließlich wurde die Mutante VP30_{Δ2-68} auf ihren Phosphorylierungsstatus hin untersucht mit dem Ergebnis, dass diese ein ebenso starkes Phosphorsignal zeigte wie die Mutante VP30_{S29-46T52A} (Spuren 2 und 6). Daraus lässt sich schließen, dass mit den Serinen 29 – 46 und Threonin 52 alle Phosphorylierungsstellen innerhalb des N-Terminus des VP30 identifiziert wurden.

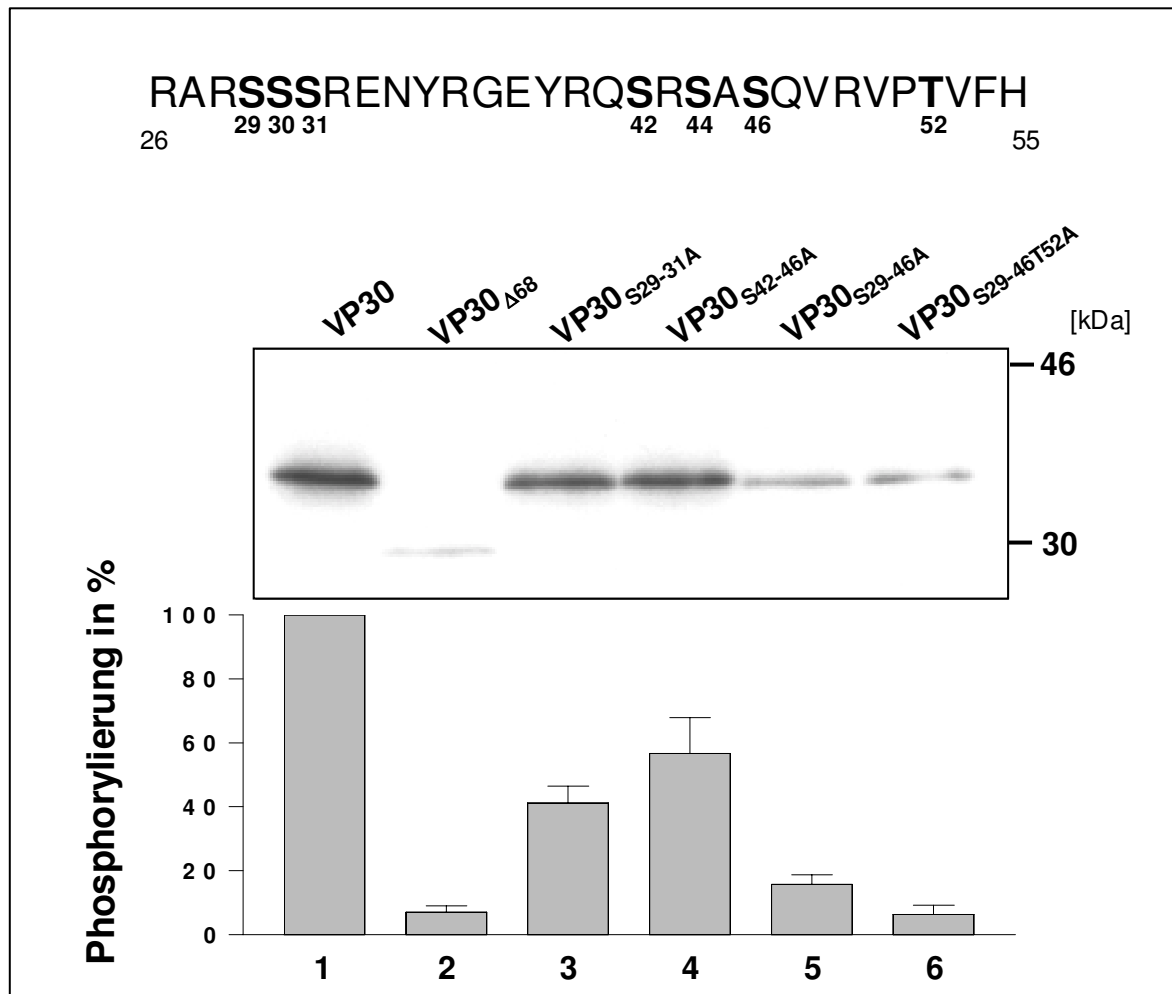


Abb. 22: Phosphorylierungsstatus von VP30 und VP30-Mutanten. (Oben) Aminosäuresequenz 26 - 55 des VP30. Serin- und Threoninreste, die mutiert wurden, sind fett gedruckt. (Mitte) HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und mit Plasmiden, die für VP30 oder eine VP30 Substitutionsmutante kodieren, transfiziert. 12 h nach Transfektion wurden die Zellen mit [32 P $_i$] metabolisch markiert und immunpräzipitiert, wie unter Abb. 20 beschrieben. Die Immunkomplexe wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran auf eine Biolumineszenz-Platte aufgelegt. Die radioaktiven Signale wurden mittels des Programms TINA2.0 quantifiziert und über die Expressionsstärke der einzelnen Proteine, die durch Western-Blot bestimmt worden war, normalisiert. Als Primärantikörper wurde der α -Flag Antikörper M2 (1:3000) und als Sekundärantikörper ein POD-gekoppelter Schaf α -Maus Antikörper (1:20000) verwendet. (Unten) Quantifizierung der Phosphorylierungsstatusanalyse.

4.4.4 Der Einfluss der Phosphorylierung auf die Bindung des VP30 an NP-induzierte Einschlusskörper

Um zu untersuchen, ob die Bindung des VP30 an NP-induzierte Einschlusskörper durch die Phosphorylierung beeinflusst wird, wurden phosphorylierungsdefiziente VP30-Substitutionsmutanten (Abb. 22) zusammen mit dem NP in HeLa-Zellen exprimiert. Dazu wurde wieder das MVA-T7 Expressionssystem benutzt. 16 h nach Infektion wurden die Zellen einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen.

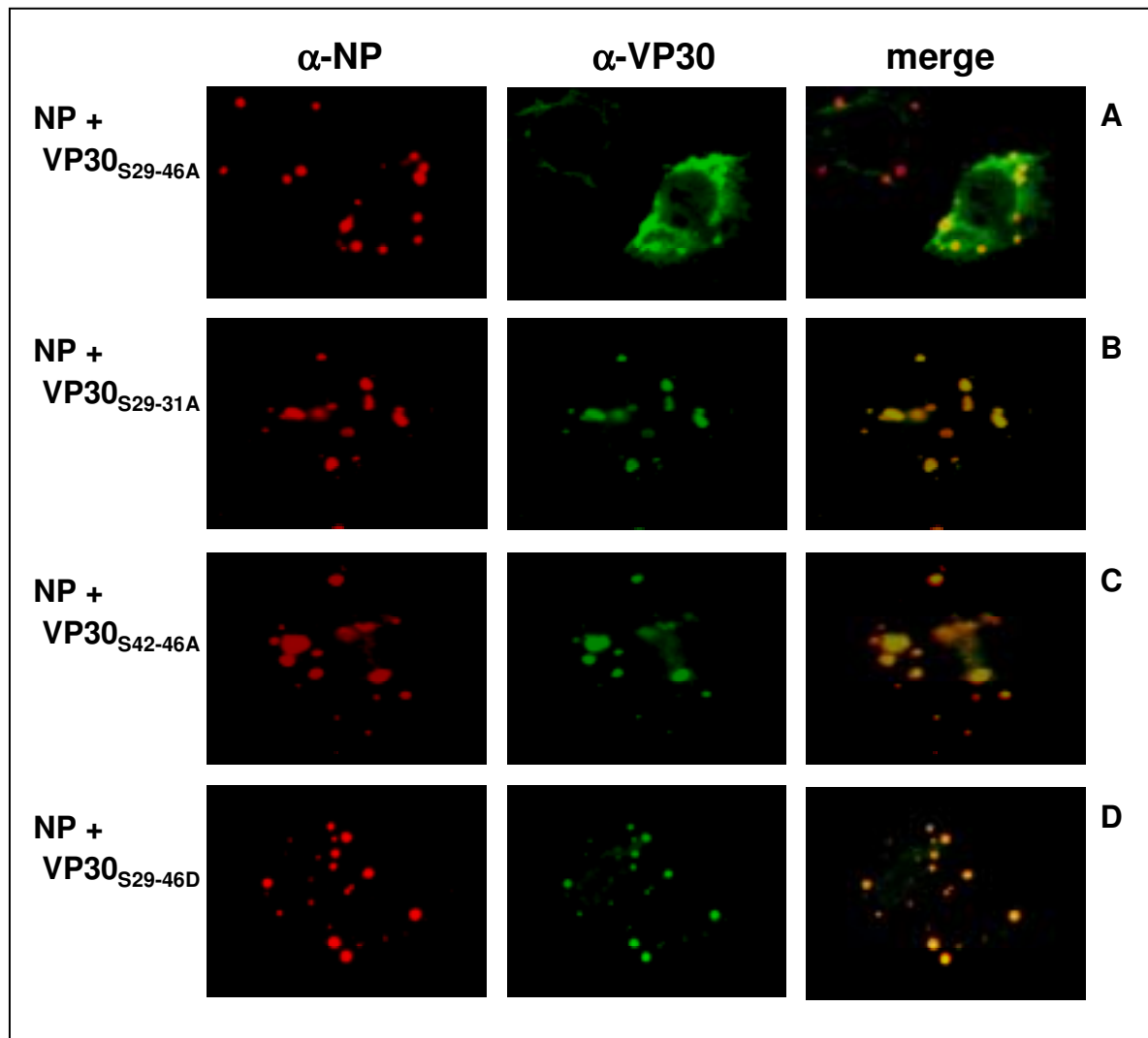


Abb. 23: Die Interaktion zwischen NP-induzierten Einschlusskörpern und VP30-Substitutionsmutanten mit mutierten Phosphatakzeptorstellen. HeLa-Zellen, auf Deckgläsern kultiviert, wurden mit MVA-T7 infiziert und mit pT-Plasmiden, die für VP30-Substitutionsmutanten (200 ng) und NP (1 µg) kodieren, kotransfiziert. Die Zellen wurden einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen, wie unter Abb. 3 beschrieben.

Die Koexpression der Mutante VP30_{S29-46A} mit NP zeigte, dass NP, wie gewöhnlich, in Form von Einschlusskörpern vorkam, das VP30_{S29-46A} aber homogen in der Zelle verteilt war

(Abb. 23A). Im Gegensatz dazu war das nichtmutierte VP30 vollständig mit den NP-induzierten Einschlusskörpern kolokalisiert (Abb. 3). Die Substitution der Serinreste 29 – 31 oder 42 – 46 beeinträchtigten die Interaktion mit den NP-Einschlusskörpern nur schwach (Abb. 23, B und C). Daraus wurde geschlossen, dass die Phosphorylierung eines der beiden Serincluster im VP30 für die Interaktion mit den NP-induzierten Einschlusskörpern notwendig war.

Es war nicht auszuschließen, dass der veränderte Phänotyp der Mutante VP30_{S29-46A} auf das Fehlen der Serinreste selbst zurückgeht und nicht auf die fehlende Phosphorylierung an diesen Stellen. Deshalb sollte eine VP30-Mutante konstruiert werden, bei der die negativen Ladungen der Phosphatgruppen an den Serinen 29 – 46 durch Substitutionen dieser 6 AS zu Aspartaten nachgeahmt wurden. Das Plasmid für diese Mutante, pT-VP30_{S29-46D}, wurde durch Quick Change-Mutagenese hergestellt (Tab. 2). VP30_{S29-46D} wurde zusammen mit dem NP koexprimiert und eine Immunfluoreszenzanalyse angeschlossen. Abb. 23D zeigt, dass die Einführung von sechs Aspartatresten den VP30-Phänotyp induzierte. Dieses Ergebnis zeigte die Relevanz negativer Ladungen an den Serinresten 29 – 46.

Die Substitution des Threonin 52 zu Alanin veränderte die intrazelluläre Verteilung des VP30 bei Koexpression mit dem NP nicht.

4.4.5 Der Einfluss der Serin-Phosphorylierung des VP30 auf dessen transkriptionsaktivierende Funktion

Die VP30 Substitutionsmutanten, bei denen phosphorylierte Serine zu Alaninen ausgetauscht worden waren (s. Abb. 22), wurden im EBOV-spezifischen Transkriptionssystem eingesetzt, um zu untersuchen, ob die Serin-Phosphorylierung des VP30 seine transaktivierende Funktion beeinflusst. In Abb. 24 ist gezeigt, dass die phosphorylierungsdefizienten Mutanten, ebenso wie das VP30, in der Lage waren, Transkription zu vermitteln (Spuren 3 – 5). Die Funktion der Mutanten war unabhängig davon, ob einzelne (Spuren 3 und 4) oder beide (Spur 5) Serincluster innerhalb der AS 29 – 46 des VP30 zu Alaninen ausgetauscht waren.

Zusätzlich wurde die Funktionalität von VP30-Substitutionsmutanten untersucht, bei denen eins oder beide Serincluster zu Aspartaten ausgetauscht waren. Abb. 24 zeigt, dass die VP30-Mutanten, bei denen nur ein Serincluster zu Aspartaten substituiert war (d.h. AS 29 - 31 oder AS 42, 44 und 46), ebenso funktionell waren wie VP30 (Spuren 2, 6 und 7). Wurden jedoch alle 6 phosphorylierten Serinreste zu Aspartaten ausgetauscht, war die transkriptions-aktivierende Funktion des Proteins überraschenderweise fast vollständig inhibiert (Spur 8).

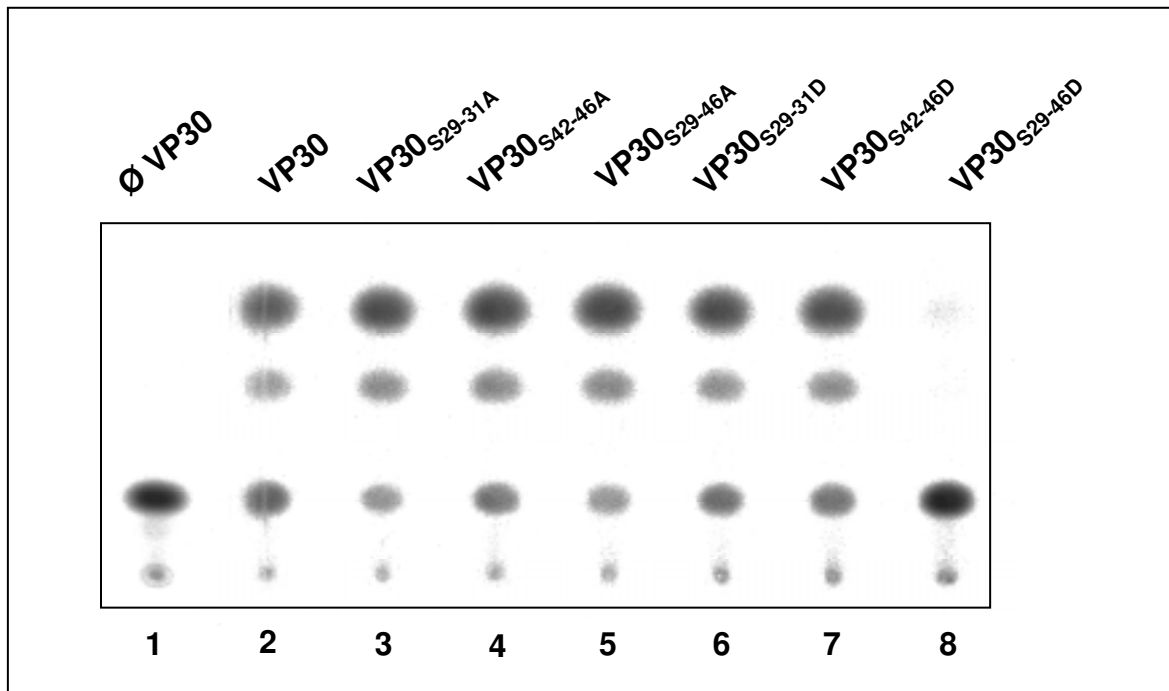


Abb. 24: Transkriptionsaktivierung durch VP30 und VP30-Substitutionsmutanten. Ein Transkriptions-Testansatz wurde durchgeführt, wie unter Abb. 6 beschrieben. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion lysiert und die CAT-Aktivität bestimmt. Spur 1: Kontrolle, ohne VP30; Spur 2: VP30; Spuren 3 - 8: VP30-Substitutionsmutanten.

Da die Aspartatreste der Mutante VP30_{S29-46D} Phosphoserine imitierten, ließ sich nun vermuten, dass eine vollständige Phosphorylierung des VP30 seine transkriptionsaktivierende Funktion hemmt.

4.5 Der Einfluss von Okadainsäure auf die Ebola-Virus-spezifische Transkription

Zur Bestätigung der oben beschriebenen Ergebnisse wurde nun versucht, die Phosphorylierung des VP30 durch die Inhibition von intrazellulären Phosphatasen zu verstärken und die Auswirkungen auf die EBOV-spezifische Transkription zu untersuchen. Dazu wurde der Phosphatase-Inhibitor Okadainsäure (OA) verwendet. OA ist ein potenter Inhibitor zumindest zweier ubiquitär vorkommender Serin- / Threonin-spezifischer Proteinphosphatasen, PP1 und PP2A (Cohen, 1990). Da der Phosphorylierungsstatus von Proteinen oft einen dynamischen Prozess aus Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen widerspiegelt, wurde vermutet, dass OA eine starke Phosphorylierung des VP30 induziert, indem es dessen Dephosphorylierung verhindert. Dieses stark phosphorylierte VP30 sollte dann im EBOV-Transkriptionssystem inaktiv sein.

4.5.1 Okadainsäure inhibiert die Dephosphorylierung des VP30 durch zelluläre Phosphatasen

Das VP30 wurde mittels des MVA-T7 Expressionssystems in HeLa-Zellen synthetisiert, metabolisch mit [^{32}P]-markiert und durch Immunpräzipitation mit dem α -Flag Antikörper M2 und Protein A-Sepharose gereinigt.

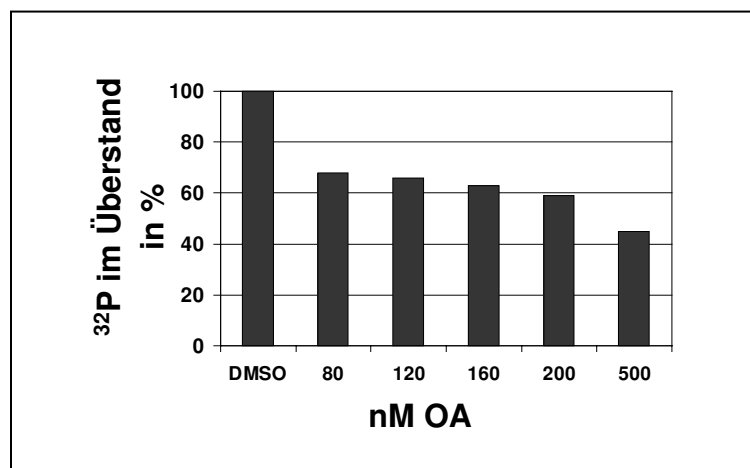


Abb. 25: Inhibition VP30-spezifischer Phosphatasen durch OA. VP30f wurde in HeLa-Zellen mittels des MVA-T7 Expressionssystems synthetisiert, mit [^{32}P] metabolisch markiert und immunpräzipitiert, wie unter Abb. 20 beschrieben. Die Immunkomplexe wurden für 30 min bei 30°C in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an OA mit frischem HeLa-Zellysat inkubiert. Die Freisetzung von [^{32}P] in den Überstand wurde durch Cherenkov-Zählung gemessen. Die [^{32}P]-Aktivität in Abwesenheit von OA (+ 0,2% Dimethylsulfoxid) wurde gleich 100% gesetzt und die anderen gemessenen Werte damit verrechnet.

Das Präzipitat wurde dann in der Gegenwart verschiedener OA-Konzentrationen (80 nM – 500 nM) mit frischem HeLa-Zelllysate inkubiert (3.4.10).

Die in das Medium freigesetzte Radioaktivität wurde schließlich im Flüssigszintillationszähler gemessen. In Abb. 25 ist gezeigt, dass das HeLa-Zelllysate Phosphatasen enthielt, die in der Lage waren, radioaktives Phosphat vom VP30 abzuspalten. Die Menge des abgespaltenen [$^{32}\text{P}_i$] reduzierte sich mit steigenden Mengen an OA im Ansatz. Das bedeutet, dass OA die VP30-Dephosphorylierung verhindern konnte. Während 80 nM OA die Dephosphorylierung von VP30 zu 32% blockierten, zeigte sich die effizienteste Inhibition mit 500 nM OA (55%).

4.5.2 Die Phosphatasen PP1 und PP2A erkennen das VP30 als Substrat

Da OA die Dephosphorylierung des VP30 verhindern konnte, wurde vermutet, dass die OA-sensitiven Phosphatasen PP1 oder PP2A oder beide zusammen das VP30 dephosphorylieren können. Dies wurde untersucht, indem, wie unter 4.5.1 beschrieben, [$^{32}\text{P}_i$]-markiertes VP30 aus HeLa-Zellen durch Immunpräzipitation gereinigt wurde und anschließend mit den katalytischen Untereinheiten der Phosphatasen 1, 2A, 2C oder der Alkalischen Phosphatase inkubiert wurde (3.4.11). Die Proteine wurden dann über SDS-PAGE aufgetrennt und die [^{32}P]-Signale mit dem Biolumineszenz-Analyser und dem Programm TINA2.0 sichtbar gemacht und quantifiziert.

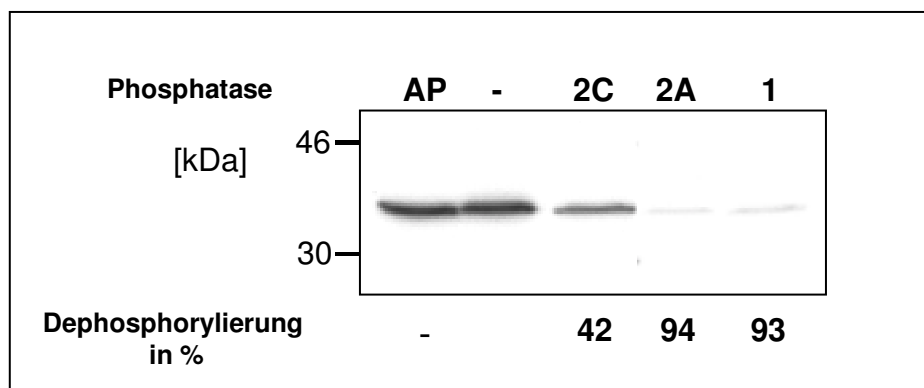


Abb. 26: Inkubation von [^{32}P]-VP30 mit gereinigten Phosphatasen. VP30 wurde in HeLa-Zellen exprimiert mit [$^{32}\text{P}_i$] metabolisch markiert und immunpräzipitiert, wie unter Abb. 20 beschrieben. Die Immunkomplexe wurden für 30 min bei 30°C mit 300 ng der gereinigten katalytischen Untereinheiten der Phosphatasen Alkalische Phosphatase (AP), PP2C, PP2A und PP1 inkubiert, über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und die Membran auf eine Biolumineszenz-Platte aufgelegt. Die radioaktiven Signale wurden mit dem Programm TINA2.0 quantifiziert. Das Signal des Kontrollansatzes ohne Phosphatase wurde gleich 100% gesetzt und die anderen gemessenen Werte damit verrechnet (unten).

Abb. 26 zeigt, dass die Alkalische Phosphatase das VP30 nicht dephosphorylieren konnte. Dagegen waren die katalytischen Untereinheiten der Phosphatasen 2C, 2A und 1 in der Lage, das VP30 zu dephosphorylieren. Während die PP2C nur 42% der Phosphatreste des VP30 entfernte, wurden von den Phosphatasen PP1 und PP2A 93% bzw. 94% der Phosphatreste abgespalten.

4.5.3 Okadainsäure inhibiert die EBOV Transkription

OA ist ein spezifischer Hemmstoff der Phosphatasen PP1 und PP2A und inhibiert die Dephosphorylierung des VP30. Es stellte sich nun die Frage, ob OA auch die EBOV-spezifische Transkription hemmen konnte. Da OA zahlreiche Effekte auf den Zellstoffwechsel hat (Matias et al., 1996), musste jedoch ausgeschlossen werden, dass in dem EBOV-Transkriptionssystem Effekte der OA z.B. auf die zelluläre Proteinsynthese beobachtet und nicht eine spezifische Inhibition der EBOV-Transkriptionsaktivierung. Deshalb wurde neben dem VP30 auch die konstitutiv aktive Mutante VP30_{S29-46A} im Testansatz eingesetzt. Die transkriptionsaktivierende Funktion von VP30_{S29-46A} kann durch ihren Phosphorylierungsstatus nicht beeinflusst werden, da im Gegensatz zum VP30 alle phosphorylierbaren Serinreste im N-Terminus des Proteins entfernt wurden. Ein Unterschied in der Aktivität dieser beiden Proteine zeigt daher einen OA-spezifischen Effekt auf die Transkriptionsaktivierung. VP30 und VP30_{S29-46A} wurden im Transkriptionssystem eingesetzt und nach der Transfektion wurde OA in Konzentrationen von 80 – 300 nM zugegeben. 24 – 36 h nach der Transfektion wurde die CAT-Aktivität bestimmt und die Signale mittels des Biolumineszenzassays und dem Programm TINA2.0 quantifiziert. Abb. 27A zeigt die durch VP30 bzw. VP30_{S29-46A} vermittelte Transkriptionsaktivität ohne OA (0,2% Dimethylsulfoxid) und beispielhaft mit 120 und 300 nM OA im Ansatz. Während die Transkriptionsaktivität, die durch beide Proteine vermittelt wurde, in Abwesenheit von OA gleich stark war (Spuren 1 und 2), entstand durch Zugabe von 120 nM OA eine Differenz zwischen VP30 und VP30_{S29-46A}, die bei 300 nM OA am deutlichsten ausgeprägt war. Zur quantitativen Auswertung des Versuchs wurde die VP30_{S29-46A}-vermittelte Transkriptionsaktivität gleich 100% gesetzt und die VP30-vermittelte Transkriptionsaktivität im Verhältnis dazu verrechnet. Die daraus resultierende Inhibition der Transkriptionsaktivierung ist in Abb. 27B aufgetragen. Hier wird deutlich, dass OA die VP30-vermittelte Transkription konzentrationsabhängig hemmt. Diese Hemmung betrug 24% bei 80 nM OA und stieg an bis zu 95% bei 300 nM OA. Eine 50%ige Inhibition der EBOV-spezifischen Transkription wurde bei einer Konzentration von 130 nM OA festgestellt.

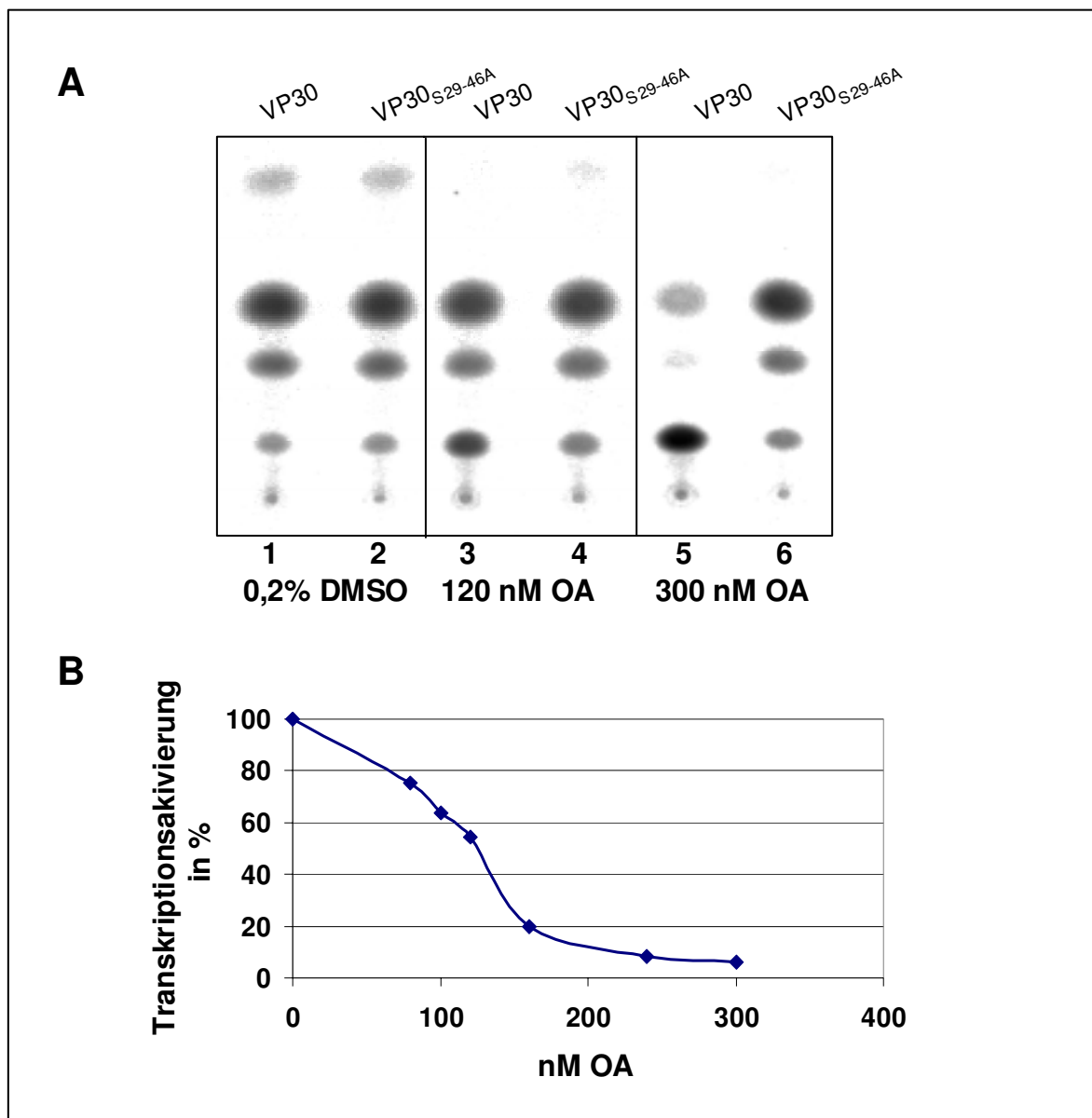


Abb. 27: Inhibition der VP30-vermittelte Transkriptionsaktivierung durch OA. VP30 oder VP30_{S29-46A} wurden im Transkriptionssystem eingesetzt, wie unter Abb. 6 beschrieben. 8 h nach Transfektion wurde OA in steigenden Konzentrationen zugegeben. Die Zellen wurden 24 bis 36 h nach Transfektion lysiert und die CAT-Aktivität bestimmt. **(A)** CAT-Aktivitätsbestimmung für die Ansätze ohne OA (Spuren 1 und 2) und in Anwesenheit von 120 nM OA (Spuren 3 und 4) und 300 nM OA (Spuren 5 und 6). Spuren 1, 3 und 5: VP30; Spuren 2, 4 und 6: VP30_{S29-46A}. **(B)** Die durch VP30_{S29-46A}-vermittelte Transkriptionsaktivierung wurde gleich 100% gesetzt und die durch VP30-vermittelte Aktivität damit verrechnet und im Graphen gegen die OA Konzentrationen aufgetragen.

4.5.4 VP30_{S29-46A} kann den Verlust VP30-vermittelter Transkription durch Okadainsäure komplementieren

Da der Mechanismus der Transkriptionsaktivierung durch VP30 noch nicht geklärt ist, stellte sich die Frage, ob die Anwesenheit von OA eine Transkriptionsaktivierung durch VP30 generell ausschließt. Die EBOV-spezifische Transkription wurde in Anwesenheit von 240 nM OA untersucht, und beide Plasmide, pT-VP30 und pT-VP30_{S29-46A}, gleichzeitig eingesetzt. Die Menge des pT-VP30 wurde bei 100 ng konstant gehalten und die Mengen für das pT-VP30_{S29-46A} von 50 bis 200 ng gesteigert. Abb. 28 zeigt, dass das VP30 durch OA in seiner Aktivität, wie erwartet, stark beeinträchtigt war. Im Gegensatz dazu war das VP30_{S29-46A} in der Lage, die EBOV Transkription auch in Gegenwart von OA zu aktivieren (Spuren 2 und 6). Wurden VP30 und VP30_{S29-46A} gemeinsam eingesetzt, war die Transkription des Systems genauso aktiv, wie in der Gegenwart von VP30_{S29-46A} alleine. Hierbei war es unerheblich, ob von pT-VP30_{S29-46A} die Hälfte, ebensoviel oder das Doppelte von pT-VP30 eingesetzt wurde (Spuren 3 - 5). Der Verlust der Transkriptionsaktivierung des VP30 durch OA konnte also schon durch geringe Konzentrationen des VP30_{S29-46A} vollständig komplementiert werden. Daraus wurde geschlossen, dass ein stark phosphoryliertes, inaktives VP30 nicht in Konkurrenz zu einem aktiven VP30 steht.

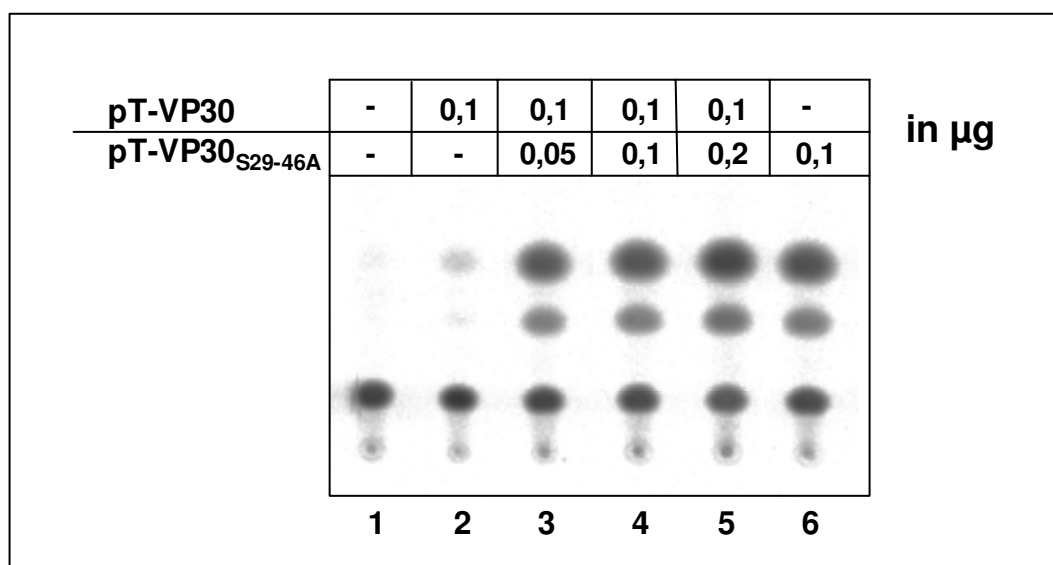


Abb. 28: Komplementation der Transkriptionsaktivierung durch VP30_{S29-46A} in Anwesenheit von OA. pT-VP30 und pT-VP30_{S29-46A} wurden im EBOV-Transkriptionssystem eingesetzt, wie unter Abb. 6 beschrieben. 8 h nach Transfektion wurden 240 nM OA (Endkonz. 240 nM) zugegeben. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion lysiert und die CAT-Aktivität bestimmt. Spur 1: Kontrolle, ohne pT-VP30; Spur 2: pT-VP30; Spuren 3 – 5: pT-VP30 und pT-VP30_{S29-46A}; Spur 6: pT-VP30_{S29-46A}.

4.5.5 Die Konzentrationsabhängigkeit der Transkriptionsaktivierung durch VP30_{S29-46D}

Das VP30_{S29-46D} konnte die Transkription des EBOV nur in sehr geringem Ausmaß aktivieren (4.4.5 und Abb. 24). Es war nun von Interesse, ob die transkriptionsaktivierende Funktion des VP30 durch die Einführung der Aspartatreste vollständig zerstört war oder ob höhere Konzentrationen des VP30_{S29-46D} die Transkriptionsaktivierung wiederherstellen kann. Dazu wurden steigende Mengen an pT-VP30_{S29-46D} in dem EBOV-Transkriptionssystem eingesetzt (50 ng bis 2000 ng). Zum Vergleich wurden parallel Ansätze mitgeführt, bei denen das pT-VP30 titriert wurde. Vorrangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, dass beim Einsatz von 100 ng pT-VP30 eine maximale Transkriptionsaktivierung zu verzeichnen war, die bei Verwendung von höheren Konzentrationen kontinuierlich abnahm (Mühlberger et al., 1999). In dem hier durchgeführten Versuch konnte dieses Ergebnis im Prinzip bestätigt werden, allerdings war das Maximum der Transkriptionsaktivierung schon bei 50 ng pT-VP30 erreicht (Abb. 29, ◆).

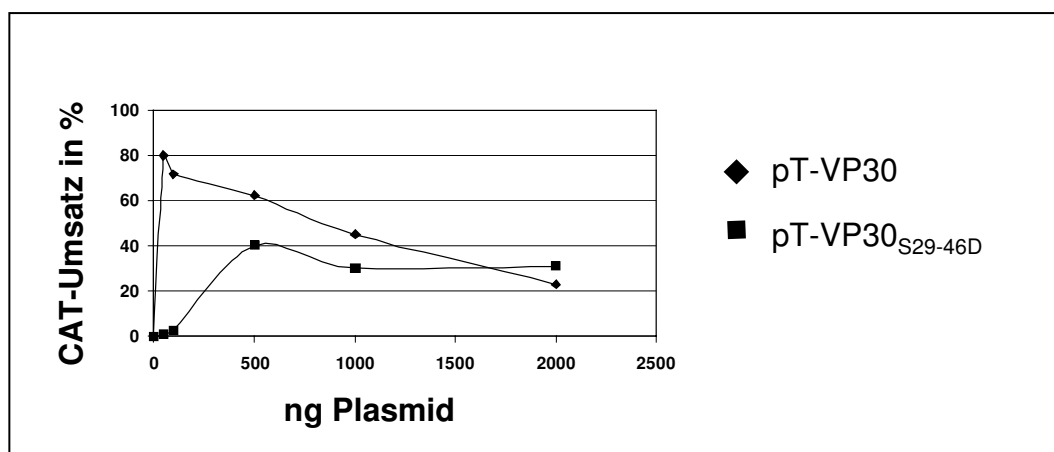


Abb. 29: Titration von pT-VP30 und pT-VP30_{S29-46D} im Transkriptionssystem. Ein Transkriptions-Testansatz wurde mit verschiedenen Konzentrationen von pT-VP30 und pT-VP30_{S29-46D} durchgeführt, wie unter Abb. 6 beschrieben. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion lysiert und die CAT-Aktivität bestimmt.

Die Titration des pT-VP30_{S29-46D} zeigte, dass – tatsächlich - höhere Mengen des Plasmids die Transkription des Systems aktivieren konnten. Ein Maximum war bei 500 ng pT-VP30_{S29-46D} zu verzeichnen (Abb. 29, ■). Die maximale Transkriptionsaktivität durch VP30_{S29-46D} lag bei etwa 50% der durch VP30-vermittelten Aktivität. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Substitution der Serinreste zu Aspartat die Funktion des Proteins als Transkriptionsaktivator nicht vollständig inhibiert.

4.5.6 Der Einfluss von Okadainsäure auf virale Proteinbiosynthese

Es wurde im EBOV-Transkriptionssystem gezeigt, dass OA die EBOV-spezifische Transkription hemmt. Nun sollte untersucht werden, ob eine solche Hemmung auch im viralen Kontext beobachtet werden konnte. Da diese Versuche in Vero-Zellen durchgeführt werden sollten, wurde zunächst untersucht, inwieweit OA die zelluläre Proteinbiosynthese der Vero-Zellen hemmt. Dazu wurden Vero-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an OA inkubiert und nach 24 h die Zellen mit [³⁵S]-PROMIX markiert. Die Proteine wurden dann aus dem Überstand des Zelllysats gefällt und die eingebaute Radioaktivität über Szintillationsmessung bestimmt (3.3.10). Die gemessene Radioaktivität bei dem Ansatz ohne OA (0,2% Dimethylsulfoxid) wurde gleich 100% gesetzt und die anderen Werte damit verrechnet. Abb. 30 zeigt bei einer Konzentration von 20 nM OA eine Inhibition der Proteinbiosynthese von 13%, die mit steigender Konzentration OA ebenfalls anstieg, bis bei 300 nM OA im Medium fast 80% der zellulären Proteinbiosynthese gehemmt waren.

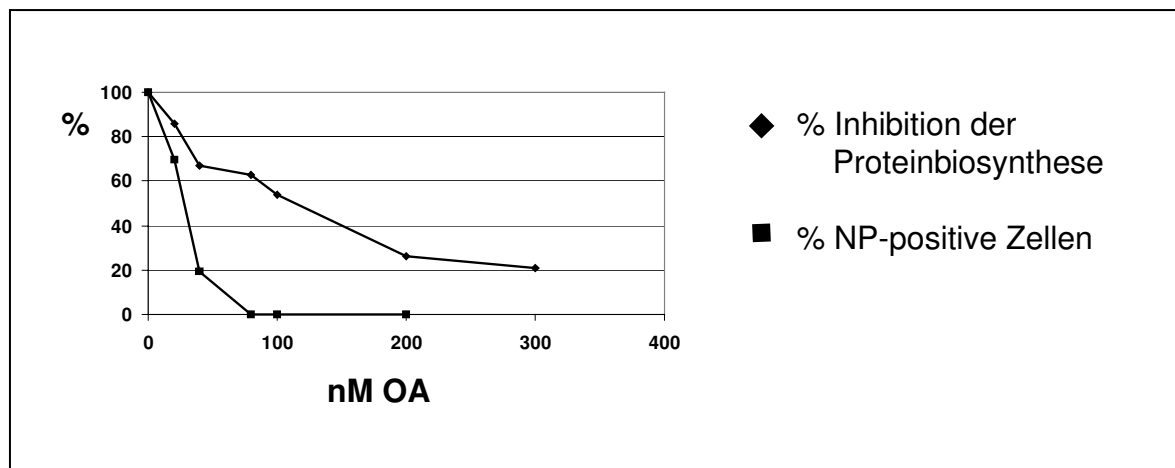


Abb. 30: Der Einfluss von OA auf die Proteinbiosynthese von Vero-Zellen und auf die EBOV-spezifische Proteinexpression. (Einfluss von OA auf die Proteinbiosynthese in Vero-Zellen) Zu 2×10^5 Verozellen wurden verschiedene Konzentrationen OA gegeben und die Zellen mit [³⁵S]-PROMIX nach 24 h markiert. Die Proteine wurden mittels Trichloressigsäure gefällt und die präzipitierte Radioaktivität über Szintillationsmessung bestimmt. Die gemessene Radioaktivität bei dem Kontrollansatz ohne OA (mit 0,2% Dimethylsulfoxid) wurde gleich 100% gesetzt und die anderen Werte damit verrechnet. (Einfluss von OA auf virale Proteinsynthese in EBOV-infizierten Zellen) Dem Medium EBOV-infizierter Veroellen wurden 2 h nach Infektion unterschiedliche Mengen an OA zugegeben (Endkonz.: 40 – 200 nM OA). Nach 24 h wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenz gegen NP und eine DAPI-Färbung durchgeführt. Über die DAPI-Färbung wurden bei der anschließenden Mikroskopie (x40) die Zellen / Sichtfeld ausgezählt, und über die NP-Färbung konnte dann der Anteil infizierter und NP-synthetisierender Zellen ausgezählt werden. Dieser Anteil wurde bei dem Kontrollansatz ohne OA (mit 0,2% Dimethylsulfoxid) gleich 100% gesetzt und die übrigen Werte damit verrechnet

Eine 50%ige Hemmung der zellulären Proteinbiosynthese wurde in Anwesenheit von 120 nM OA detektiert.

Nun wurde der Einfluss von OA auf virale Proteinsynthese in EBOV-infizierten Zellen untersucht. Den infizierten Zellen (3.3.2) wurden 3 h nach der Infektion unterschiedliche Mengen an OA zugegeben (Endkonz.: 40 – 200 nM OA). Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse gegen NP und eine DAPI-Färbung zur Detektion der Zellkerne durchgeführt. Die Detektion des NP diente in diesem Versuch als Maß für die Biosynthese viraler Proteine. Über die DAPI-Färbung wurden bei der anschließenden Mikroskopie (x 40) die Zellen / Sichtfeld ausgezählt, und über die NP-Färbung konnte dann der Anteil infizierter und NP-synthetisierender Zellen ausgezählt werden. Dieser Anteil wurde bei dem Ansatz ohne OA (0,2% Dimethylsulfoxid) gleich 100% gesetzt und die anderen Werte damit verrechnet (3.3.11). Abb. 30 zeigt, dass bereits bei einer Konzentration von 20 nM OA die Anzahl NP-positiver Zellen um über 30% vermindert ist. Wurden 40 nM OA verwandt, ging der Prozentsatz NP-positiver Zellen bereits um etwa 80% zurück, bis in Anwesenheit von 80 nM kein NP mehr sichtbar war. Die Konzentration der OA für eine 50%ige Inhibition viraler Proteinsynthese (repräsentiert durch NP-Synthese) lag bei 30 nM. Verglichen mit den 120 nM OA, die notwendig waren, um die zelluläre Proteinbiosynthese zu 50% zu hemmen, lässt sich vermuten, dass der Effekt von OA auf die Synthese viraler Proteine spezifisch war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass OA die Vermehrung des EBOV effizient inhibieren konnte.

5 Diskussion

Das VP30 ist ein viraler Transkriptionsaktivator ohne bekannte Homologe. Bei Beginn dieser Arbeit war in struktureller Hinsicht zum VP30 neben der Aminosäuresequenz lediglich bekannt, dass es ein Phosphoprotein darstellt. Ziel der Arbeit war, verschiedene Strukturmerkmale des VP30 und deren Funktion zu charakterisieren.

Identifiziert wurden ein unkonventioneller Zinkfinger, die Phosphatakzeptorstellen sowie ein relevanter Bereich für die Oligomerisierung des VP30. Es folgten Analysen zur Bedeutung dieser Strukturmerkmale für die Aktivierung der EBOV-spezifischen Transkription und der Assoziation mit dem Nukleokapsidkomplex (Elliott et al., 1985; Mühlberger et al., 1999).

Die Hauptkomponente des Nukleokapsids von Viren, die ein einzelsträngiges RNA-Genom negativer Orientierung besitzen (NNS-RNA-Viren), ist das Translationsprodukt des ersten Gens, N oder NP. Für einige NNS-RNA-Viren, wie Masern-, Sendai- und Marburg-Virus, ist beschrieben, dass das NP die Bildung von cytoplasmatischen Einschlusskörpern induziert, die mikroskopisch erkennbar sind (Spehner et al., 1991; Buchholz et al., 1993; Becker et al., 1998). Diese Einschlusskörper finden sich sowohl in infizierten Zellen als auch bei Einzelexpression der Nukleoproteine und werden als Bildungszentren neuer Nukleokapside betrachtet. Innerhalb der Einschlusskörper akkumulieren bei MBGV und EBOV tubuläre Strukturen, die in der elektronenmikroskopischen Analyse dem Grundgerüst der Nukleokapside sehr ähnlich sind (Kolesnikova et al., 2000; pers. Mitteilung). Das MBGV-VP30 bindet an diese NP-induzierten Einschlusskörper (Becker et al., 1998). Durch Immunfluoreszenzanalysen wurde nun gezeigt, dass das EBOV-VP30 ebenfalls mit den NP-induzierten Aggregaten kolokalisiert. Ob diese Interaktion direkt über eine Protein-Protein-Wechselwirkung NP-VP30 stattfindet oder das VP30 an RNA bindet, die möglicherweise über das NP in den Einschlusskörpern gebunden ist, ist bisher nicht geklärt. Darüber hinaus könnte die Bindung des VP30 innerhalb der Einschlusskörper die NP-induzierte Struktur eines Nukleokapsidgrundgerüsts voraussetzen. Eine solche Quartärstruktur-abhängige Bindung von Proteinen wurde auch bei Paramyxoviren beobachtet. Deren Nukleokapside lagern sich in 2 Schritten zusammen. Zuerst assoziieren freie NP-Moleküle zu helikalen Strukturen, die auch RNA enthalten können, an die sich dann der Polymerasekomplex, bestehend aus P-Protein und L-Protein, anlagert (Lamb & Kolakofsky, 1996).

Zink-Bindungseigenschaften des VP30

Computeranalysen der Aminosäuresequenz des VP30 ergaben, dass es ein Motiv besitzt, das einem Zinkfinger im menschlichen Kernprotein Nup475 sehr ähnlich ist (DuBois et al., 1990). Dieses Zinkfingermotiv vom Typ C₃H findet sich auch bei einer Reihe anderer Proteine des Menschen und anderen Säugern sowie dem *Drosophila*-Protein Suppressor of

Sable und bei dem M2-1 des Respiratorischen-Syncytial-Virus. Ein Homologievergleich dieser Motive ergab eine Konsensussequenz für das Zink-bindende Motiv (Worthington et al., 1996):

Konsensussequenz	YKTEL CX₈CX₅CX₃HX₃E/D
EBOV-VP30 (AS 67-93)	APKDI CX₈CX₄CX₃HX₂E
MBGV-VP30 (AS 73-99)	PPKDM CX₈CX₄CX₃HX₂D

Ein Sequenzvergleich zwischen MBGV-VP30 und EBOV-VP30 zeigt, dass die Abstände der möglicherweise Zink-koordinierenden Reste konserviert sind trotz der geringen Sequenzähnlichkeit innerhalb dieser Bereiche (s Alignment S. 97).

Um die Frage zu klären, ob das VP30 tatsächlich in der Lage ist, Zink zu binden, wurde eine kolorimetrische Bestimmung durchgeführt, für die das VP30 in µg-Mengen benötigt wurde (Bird et al., 1998). Die Expression und besonders die Reinigung des VP30 im bakteriellen System erwiesen sich als problematisch. Gleichgültig, ob das authentische VP30 oder ein GST-Fusionsprotein exprimiert wurden, befanden sich die Expressionsprodukte nach der Zelllyse in der unlöslichen Fraktion. Alle Versuche, das Protein in Lösung zu bringen, schlugen fehl. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Fusionsproteine aus GST und kurzen VP30-Fragmenten konstruiert, die das fragliche Zink-bindende Motiv enthielten. Verfügten die Mutanten über den Bereich AS 97 – 107, neigten die Fusionsproteine stark zur Aggregation und waren ebenso wie das Volle-Länge-VP30 kaum zu reinigen. Innerhalb dieses Bereichs befindet sich ein Tetra-Leucin Motiv, das aufgrund seiner starken Hydrophobizität die Aggregation dieser Fragmente möglicherweise verstärkt. Für die folgenden Zinkbindungsversuche wurde das Fusionsprotein GST-VP30₆₈₋₉₅ (GST-Z), bei dem C-terminal an das GST die AS 68 – 95 des VP30 fusioniert waren, verwendet. Bei dem GST-Z wurden die Zink-koordinierenden Reste von jeweils 5 AS der VP30-spezifischen Sequenz flankiert. Auch bei einer Untersuchung des Sendai-Virus V Proteins hatte sich gezeigt, dass für eine intakte Zink-bindende Domäne 5 bzw. 6 V Protein-spezifische flankierende Reste ausreichten (Huang et al., 2000).

Die Zinkbindung des Zinkfingermotivs wurde schließlich mit 4-(2-Pyridylazo)resorcinol(PAR) bestimmt (Bird et al., 1998). PAR ändert sein Absorptionsmaximum nach Bindung divalenter metallischer Kationen, wodurch die Zink-assoziierte Form bei 490nm nachgewiesen werden konnte. Bei dieser Methode der Detektion von Zink wird das Protein nicht denaturiert, wie beispielsweise bei dem Zinknachweis mit radioaktivem ⁶⁵Zn, bei dem das zu untersuchende Protein zuvor auf eine Membran geblottet wird (Schiff et al., 1988), sondern im nativen Zustand belassen. Darüber hinaus ist eine Abschätzung möglich, wieviel mol Zink / mol Protein gebunden wird.

Um die Zink-Ionenkonzentration pro mol Protein bestimmen zu können, war eine Bestimmung der Proteinkonzentration des Fusionsproteins GST-Z nötig. Da das GST-Z an GSH-Sepharose gekoppelt war, konnten zur Proteinbestimmung nicht die üblichen Methoden (Bradford etc) benutzt werden. Der hier verwandte Test beruht auf der Coomassie-Färbung des GST-Z im SDS-Gel. Mittels dieser Methode war es möglich, das Protein gezielt zu detektieren, da der Test nicht durch proteolytische Abbaufragmente verfälscht wurde.

Es wurde ermittelt, dass pro mol GST-Z etwa ein mol Zink gebunden wurde. Wurden die Cystein- und Histidin-Reste, die das Zink koordinieren sollten, mutiert, konnte keine Zinkbindung mehr detektiert werden. Dieser Effekt trat jedoch erst dann ein, wenn mindestens drei der Zink-koordinierenden Reste (C₇₂₊₈₆S und H₉₀L) ausgetauscht worden waren. Im Gegensatz dazu reichte bereits die Substitution einer der Aminosäuren innerhalb des Zinkfingermotivs (C₇₂S oder H₉₀L) für einen vollständigen Verlust der transkriptionsaktivierenden Funktion des VP30. Dies deutet darauf hin, dass die transkriptionsaktivierende Funktion des VP30 auf der Integrität des Zinkfingermotivs basiert. Ein ähnliches Phänomen wurde bei der Metallo-β-Lactamase CcrA von *B. fragilis* beobachtet. Diese zeigte schon bei einer Substitution eines einzigen Zink-koordinierenden Restes innerhalb des Proteins (C zu S oder H zu N) einen signifikanten Verlust der hydrolytischen Aktivität gegenüber β-Lactamen. In Metallbindungsstudien wurde jedoch deutlich, dass auch nach Austausch von zwei Cysteinen die Zinkbindungskapazität intakt war (Yang et al., 1999).

Zur genauen Funktion des Zinkfingermotivs im VP30 kann derzeit noch keine Aussage gemacht werden. Von anderen Proteinen, die ein ähnliches Motiv besitzen, ist ebenfalls noch keine Funktion dieser Domäne bekannt (Turnage et al., 2000; Batchelder et al., 1999). Zusätzlich ist die Frage offen, ob die Funktion dieses neuartigen Motivs in den verschiedenen Proteinen überhaupt vergleichbare Funktionen hat. Vom klassischen Zinkfingermotiv Cys₂His₂, ist bekannt, dass es einerseits eine DNA-bindende Funktion besitzt und andererseits, dass es Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln kann (Hanas et al., 1983; Nagadoi et al., 1999).

Die Oligomerisierung des VP30

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass das VP30 Homooligomere ausbildet. Zur Bestimmung der Stöchiometrie der Oligomerisierung wurde ein „epitope dilution assay“ angewandt, der darauf beruht, dass über ein Epitop-markiertes VP30 nichtmarkiertes VP30 kosedimentiert wurde (Curran et al., 1995). Das Verhältnis von markiertem zu nichtmarkiertem Protein in den Immunpräzipitaten, bei einem gleichzeitig hohen Überschuss an nichtmarkiertem Protein in der Probe, lässt in diesem Versuchsansatz eine

näherungsweise Bestimmung der Stöchiometrie der Multimerisierung zu. Es zeigte sich, dass das molare Verhältnis VP30 / VP30f auch bei sehr großem Überschuss an nichtmarkiertem VP30 den Wert 4,3 nicht übersteigt. Dieser Wert war unerwartet hoch und erschwerte die Bestimmung der Stöchiometrie, da die Wahrscheinlichkeit, dass nicht nur nichtmarkierte Proteine kopräzipitiert werden, mit steigender Größe der Aggregate ebenfalls ansteigt. Nach einer Berechnungsgrundlage von Tarbouriech et al. (2000) lässt sich schließen, dass sich das VP30 mindestens zu Pentameren, wahrscheinlich aber zu Hexameren zusammenlagert (Abb. 31).

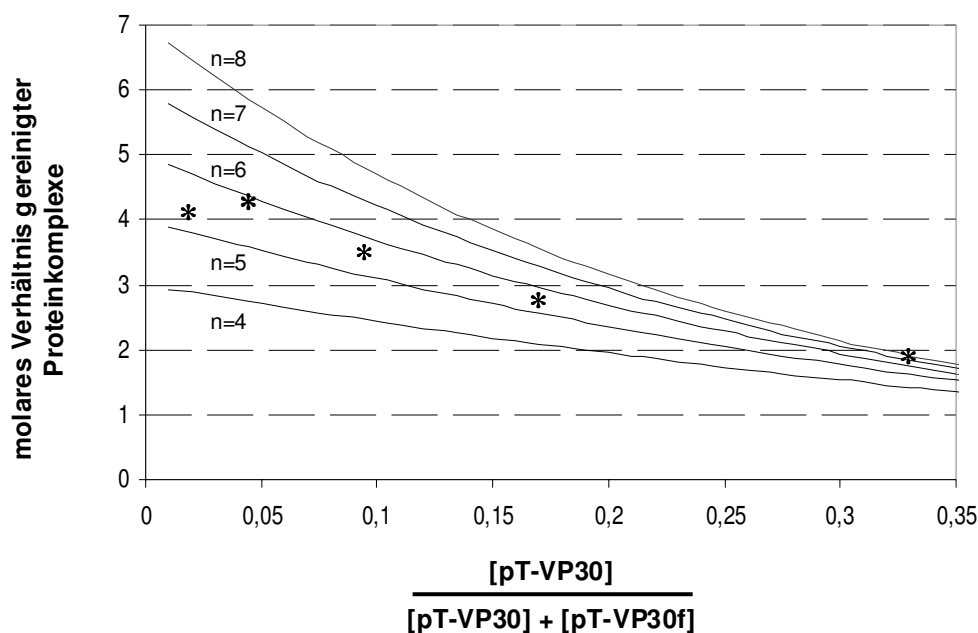


Abb. 31: Stöchiometrie der VP30-Multimerisierung. Das molare Verhältnis von präzipitiertem VP30 zu VP30f ist gegen den Anteil des transfizierten Plasmids für das VP30 ($\text{pT-VP30} / \text{pT-VP30} + \text{pT-VP30f}$) aufgetragen. * stehen für die im "epitope dilution assay" gemessenen Werte für VP30-Proteinkomplexe (4.3.1). Die Kurven sind theoretische Berechnungen für die Ausbildung von Tetrameren ($n=4$), Pentameren ($n=5$), Hexameren ($n=6$) usw. und wurden berechnet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Y. Gaudin (CNRS, Gif sur Yvette, Frankreich).

Bedingung für die Oligomerisierung des VP30 war die Anwesenheit des AS-Bereichs 94 - 112. Innerhalb dieses Bereichs befindet sich ein Tetra-Leucin Cluster, gefolgt von einem Isoleucinrest (AS 100 – 104). Die Substitution der drei Leucine 100 – 102 zu Alaninen führte zum vollständigen Verlust der Oligomerisierung. Die Multimerisierung von Proteinen wird häufig durch sogenannte coiled coils vermittelt (Burkhard et al., 2001). Für die Ausbildung von coiled coils findet sich innerhalb des VP30 allerdings kein Hinweis. Gemäß einer Sekundärstrukturvorhersage nach Rost & Sander (1993) bildet der AS-Bereich 97 – 106 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine α -helikale Struktur. Vom E4-Protein des Humanen Papillomvirus 1 wurde ebenfalls gezeigt, dass der Austausch zweier hydrophober

Aminosäuren (I und L) innerhalb einer vorhergesagten α -Helix zum vollständigen Verlust der Oligomerisierung des Proteins führte (Ashmole et al. 1998).

Die Oligomerisierung des VP30 war nicht notwendig für die Interaktion des Proteins mit NP-induzierten Einschlusskörpern. Die Zerstörung der Oligomere führte jedoch zum vollständigen Funktionsverlust des Proteins bezüglich seiner Transkriptionsaktivierung. Möglicherweise ist die Oligomerisierung des VP30 eine Voraussetzung für seine transaktivierende Funktion. So konnte beispielsweise für das Tax-Protein des Humanen T-Zell Leukämie-Virus gezeigt werden, dass es erst in dimerer Form als Transkriptionsaktivator dient (Jin & Jeang, 1997).

Die Phosphorylierung des VP30

Als Phosphatakzeptorstellen wurden im VP30 zwei N-terminale Serincluster und das Threonin 52 identifiziert. Innerhalb der beiden Serincluster befinden sich jeweils drei Serinreste, die wahrscheinlich alle phosphoryliert werden können. Die Substitutionen von einem oder zwei Serinresten innerhalb eines Clusters zu Alaninen führte in keinem der Fälle zu einer drastischen Reduktion des Phosphorsignals (nicht gezeigt). Nur wenn alle drei Serine innerhalb eines Clusters ausgetauscht wurden, reduzierte sich die Phosphorylierung des VP30 signifikant. An den 7 detektierten Phosphorylierungsstellen finden etwa 94% der Phosphorylierung des Proteins statt. Ein ähnliches Ergebnis wurde für das homologe MBGV-VP30 ermittelt, das ebenfalls hauptsächlich an Serinresten im N-Terminus (AS 40 – 51) phosphoryliert wird (Modrof et al., 2001). Obwohl die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der jeweiligen phosphorylierten Regionen beider Proteine geringer als 30% ist, ließ die konservierte Lokalisation der Phosphatakzeptorstellen eine funktionelle Bedeutung dieser posttranslationalen Modifikation vermuten (s. Alignment S. 97). Tatsächlich zeigte sich im Falle des MBGV-VP30, dass die Interaktion des Proteins mit NP-induzierten Einschlusskörpern von der Phosphorylierung der Serine 40 und 42 abhängig ist (Modrof et al., 2001). Analog dazu war auch für die Bindung des EBOV-VP30 an NP-induzierte Einschlusskörper eine Phosphorylierung des Proteins notwendig. Während der Austausch nur jeweils eines der Serincluster zu Alanin einen geringen Effekt zeigte, war die Interaktion des VP30 mit NP-induzierten Einschlusskörpern weitgehend blockiert, wenn alle 6 phosphorylierbaren Serinreste zu Alaninen ausgetauscht waren. Dieser Befund konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden, bei denen die phosphorylierungsdefiziente Mutante VP30_{S29-46A} ebenfalls in ihrer Bindung an NP-induzierte Einschlusskörper gehemmt war (Kolesnikova, pers. Mitteilung). Die funktionelle Bedeutung von Serin- und Threoninphosphorylierungen kann auch überprüft werden, indem die negative Ladung der phosphorylierten AS durch Aspartat simuliert wird (Benndorf et al., 2001; Leger et al., 1997). Da die Substitution der phosphorylierbaren Serinreste im VP30 durch

Aspartatreste zur Wiederherstellung der Bindung des VP30 an NP-induzierte Einschlusskörper führte, wurde daraus geschlossen, dass die Einführung negativer Ladung im VP30 durch Phosphorylierung tatsächlich von funktioneller Bedeutung ist.

Untersuchungen zur Bedeutung der Phosphorylierung des VP30 bezüglich der transkriptionsaktivierenden Funktion zeigten, dass die EBOV-spezifische Transkription ebenfalls durch die Phosphorylierung der beiden Serincluster moduliert wird. Die transkriptionsaktivierende Funktion des VP30 war unverändert, wenn die phosphorylierbaren Serinreste zu Alaninen ausgetauscht worden waren. Stark inhibiert hingegen war diese Funktion, wenn ein vollständig phosphoryliertes Protein nachgeahmt wurde. Diese VP30-Mutante zeigte jedoch eine transkriptionsaktivierende Funktion, wenn sie in einer zehnfach höheren Konzentration eingesetzt wurde. Dies deutete darauf hin, dass die Mutante zwar in ihrer Fähigkeit, die virale Transkription zu unterstützen, eingeschränkt, jedoch nicht vollständig inaktiv war.

Um die Beziehung zwischen Phosphorylierung und Transkriptionsaktivierung des nichtmutierten VP30 zu untersuchen, wurde der Phosphataseinhibitor OA verwendet. Zunächst konnte gezeigt werden, dass VP30 tatsächlich von zellulären Phosphatasen als Substrat erkannt wird und deshalb der Phosphorylierungsstatus des Proteins als ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung angesehen werden muss. Die Dephosphorylierung des VP30 durch zelluläre Phosphatasen konnte durch OA zu etwa 50% blockiert werden. Das spricht sowohl dafür, dass OA-sensitive als auch insensitive Phosphatasen an der Dephosphorylierung des VP30 beteiligt sind. Diese Annahme wurde durch in vitro Untersuchungen bestätigt. Während VP30 von den OA-sensitiven Phosphatasen PP1 und PP2A als Substrat erkannt und fast vollständig dephosphoryliert wurde, dephosphorylierte die nicht OA-sensitive PP2C das VP30 nur teilweise.

Im Transkriptionssystem zeigte sich, dass der Einsatz von OA das VP30 konzentrationsabhängig in eine inaktive Form überführen konnte. Den komplexen Effekten der OA auf die zelluläre Protein- und RNA-Synthese (Matias et al., 1996; Traoré et al., 2001) wurde dadurch Rechnung getragen, dass die phosphorylierungsunabhängige Mutante VP30_{S29-46A} als Kontrolle mitgeführt wurde. Da diese die EBOV-Transkription auch bei hohen Konzentrationen von OA im System effizient unterstützte, wurde deutlich, dass der Effekt der OA tatsächlich auf die Phosphorylierung des VP30 zurückgeht. Ein Einfluss der OA konnte auch in EBOV-infizierten Zellen beobachtet werden. Die virale Proteinbiosynthese in EBOV-infizierten Vero-Zellen wurde in Gegenwart von 80 nM OA vollständig inhibiert. Die zelluläre Proteinbiosynthese war bei dieser Konzentration nur zu etwa 30% gehemmt. Daraus wird geschlossen, dass die OA einen spezifischen Effekt auf die virale Reproduktion ausübt, der

aufgrund der Ergebnisse aus dem Transkriptionssystem als Effekt auf die virale Transkription gedeutet werden kann.

OA ist ein potenter Inhibitor vieler Serin / Threonin Phosphatasen (Nagao et al., 1995; Sheppeck et al., 1997). Zwei dieser Proteinphosphatasen, die in hohen Konzentrationen in den meisten Säugergeweben vorkommen, sind PP1 und PP2A (Cohen, 1997; Bialojan & Takai, 1988). Von den katalytischen Untereinheiten beider Enzyme wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sie VP30 dephosphorylieren können. Der Effekt der Transkriptionshemmung durch OA spricht dafür, dass die beiden Phosphatasen eine wichtige Rolle bei der Dephosphorylierung des VP30 spielen könnten. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass Phosphatasen in vivo meist als Heterooligomere vorliegen. An die katalytischen Untereinheiten sind noch ein bis zwei regulatorische Untereinheiten assoziiert. Die Komposition des Holoenzym determiniert dann die intrazelluläre Lokalisation, Aktivität und auch Substratspezifität der Phosphatasen PP1 und PP2A (Bollen, 2001; Sontag, 2001). Die Erkennung des VP30 durch die katalytischen Untereinheiten der Phosphatasen ist daher ein erster Schritt zur Identifikation relevanter VP30-dephosphorylierender Phosphatasen. Weitere Hinweise auf die Identität VP30 spezifischer Phosphatasen liefern die ermittelten IC_{50} -Werte von OA für die EBOV-Transkription (130 nM) und für die EBOV-spezifische Proteinbiosynthese in infizierten Zellen (30 nM). Der in der Literatur angegebene IC_{50} -Wert zur Inhibition der intrazellulären PP2A in MCF7-Zellen liegt nach 8 h Inkubation bei 30 nM OA. Die intrazelluläre PP1 war jedoch auch in Gegenwart von 1 μ M OA vollständig aktiv (Favre et al., 1997). Diese Analysen sprechen eher für eine Relevanz der PP2A als PP1 bei der Dephosphorylierung des VP30. Gerade die PP2A hat sich auch bei anderen viralen Proteinen als Interaktionspartner herausgestellt (Garcia et al., 2000). Darüber hinaus ist die PP2A in die Regulation des zellulären Phosphorylierungs- / Dephosphorylierungs-Netzwerks involviert, indem sie eine Reihe zellulärer Kinasen durch Dephosphorylierung aktiviert oder inaktiviert. So wird z.B. die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA bei einer Inhibition der PP2A aktiviert (Liau & Steinberg, 1996; Millward et al., 1999). Die Serinreste 29 - 31, 42 und 46 liegen innerhalb einer PKA Konsensus-Erkennungssequenz. PKA kommt deshalb als VP30 phosphorylierende Proteinkinase in Betracht (vgl. Tab. 1 und VP30-Sequenz S. 97). Die Inhibition der PP2A durch OA führt daher möglicherweise nicht nur zur Inhibition der Dephosphorylierung des VP30, sondern auch zu einer Verstärkung der Phosphorylierung durch PKA. Beide Effekte würden synergistisch wirken und in der transkriptionell inaktiven Form des VP30 münden.

Der genaue Mechanismus der Transkriptionsaktivierung durch VP30 ist nicht erforscht. Die Initiation der Transkription des NP-Gens ist von VP30 abhängig, wenn sich am Transkriptionsstart eine intakte RNA-Sekundärstruktur befindet. (Weik, 2001).

Möglicherweise dient das VP30 dazu, den Weg für den viralen Polymerasekomplex L-VP35 freizumachen, der durch die RNA-Sekundärstruktur blockiert sein könnte. Wie sich die Phosphorylierungs-abhängige Aktivität des VP30 in dieses Szenario einpasst und ob weitere, möglicherweise auch zelluläre, Proteine in den Vorgang der viralen Transkription eingebunden sind, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Ein Hinweis darauf, dass diese funktionelle Interaktion des VP30 mit einem bislang unbekanntem Partner in stark phosphoryliertem Zustand abgeschwächt ist, zeigte sich dadurch, dass es möglich war, den Effekt durch Okadainsäure auf VP30-vermittelte Transkription zu komplementieren. Schon mit geringen Konzentrationen der Mutante VP30_{S29-46A} im Transkriptionssystem wurde eine vollständige transkriptionelle Aktivität detektiert, was eine Kompetition beider Proteine (VP30 und VP30_{S29-46A}) um die Vermittlung der Transaktivierung ausschloss.

Die einzigen anderen NNS-RNA-Viren, die ein Strukturprotein mit ähnlichen Charakteristika wie das VP30 enthalten, gehören zu der Subfamilie Pneumovirinae der Paramyxoviridae. Das M2-1 Protein der Respiratorischen-Syncytial-Virus stellt ebenso wie das VP30 ein viertes Nukleokapsid-assoziiertes Protein dar und wird in dem Genom ebenfalls 5' eines Glykoproteingens kodiert. Strukturelle Gemeinsamkeiten des VP30 und des M2-1 sind, dass beide im N-Terminus phosphoryliert werden, ein ähnliches Zink-bindendes Motiv besitzen und darüber hinaus mit den durch das Nukleoprotein induzierten Einschlusskörpern interagieren. (Cuesta et al., 2000; Cartee & Wertz, 2001). Das M2-1 ist ebenfalls ein viraler Transkriptionsfaktor, dient aber der Elongation- und Antitermination der viralen mRNA. Im Gegensatz dazu ist das VP30 an der Initiation der Transkription beteiligt und vermittelt nicht die Bildung polycistronischer mRNAs (Collins et al., 1996, Fearn & Collins, 1999; Weik, 2001). Obwohl bislang nicht gezeigt werden konnte, dass das Zinkfingermotiv im M2-1 tatsächlich Zink bindet (Wertz, pers. Mitteilung), ist ein funktionelles Zinkfingermotiv essentiell für die virale Replikation (Hardy & Wertz, 2000; Tang et al., 2001). Die Bindung des M2-1 an den Nukleokapsidkomplex und an das NP wird wahrscheinlich über eine Bindung an RNA vermittelt (Cartee & Wertz, 2001). Die Phosphorylierung des M2-1 beeinflusst die Bindung an das NP nicht, ist aber essentiell für dessen transkriptionelle Funktion (Cartee & Wertz, 2001).

Für das M2-1 wird angenommen, dass die Assoziation mit dem Nukleoprotein nicht relevant ist für seine Funktion in der Transkription (Hardy & Wertz, 2000). Dies scheint auch bei VP30 der Fall zu sein. Für die Bindung des VP30 an die NP-induzierten Einschlusskörper ist zwar die Serinphosphorylierung des VP30 essentiell, jedoch waren dafür weder die Integrität des Zinkfingermotivs noch die Oligomerisierung notwendig. Für die Transkriptionsaktivierung dagegen mussten sowohl der Zinkfinger als auch die Oligomerisierungsdomäne intakt sein, wogegen eine starke Phosphorylierung des Proteins die Transkriptionsaktivierung inhibierte. Aus diesen Hinweisen ergibt sich, dass das VP30 seine bekannten Funktionen unabhängig

voneinander ausübt und diese über den Phosphorylierungsstatus unterschiedlich reguliert werden könnten. Während ein schwach oder gar nicht phosphoryliertes VP30 als Transkriptionsaktivator aktiv ist, könnte ein stark phosphoryliertes VP30 eine wichtige Rolle für beim Zusammenbau des Nukleokapsidkomplexes spielen. Die dritte Form, ein moderat phosphoryliertes VP30 könnte beide Funktionen vermitteln. Über die Phosphorylierung werden daher die unterschiedlichen Funktionen des VP30 möglicherweise durch Verlagerung des intrazellulären VP30-Pools in Richtung Transkriptionsaktivierung oder Nukleokapsid-Zusammenbau reguliert, je nachdem, welchen Phosphorylierungsstatus die VP30-Moleküle haben. Möglicherweise steht das schwach oder gar nicht phosphorylierte VP30 für Transkriptionsaktivierung zur Verfügung, bis es aus dem löslichen cytoplasmatischen Pool aufgrund stärkerer Phosphorylierung abgezogen wird und mit den sich neu bildenden Nukleokapsidkomplexen fest assoziiert.

Aus dem Befund, dass stark phosphoryliertes VP30 die EBOV-Transkription nicht mehr vermitteln kann, ergab sich die Möglichkeit, die virale Vermehrung spezifisch durch OA zu hemmen. Aufgrund der schweren Nebeneffekte der OA kommt es für einen Einsatz als Therapeutikum für den Menschen nicht in Frage. Die weitreichenden Effekte der OA auf den zellulären Stoffwechsel sind nicht vollständig verstanden und beruhen neben der Hemmung mehrerer ubiquitär vorkommender Proteinphosphatasen wahrscheinlich noch auf anderen Faktoren (Matias et al., 1999). Sollte es in Zukunft gelingen, die Phosphatasen, die das VP30 beeinflussen, spezifischer zu hemmen, ist auf dieser Basis die Entwicklung eines Therapeutikums gegen eine EBOV-Infektion denkbar.

6 Literaturverzeichnis

- Ashmole, I., Gallimore, P. H. & Roberts, S. (1998).** Identification of conserved hydrophobic C-terminal residues of the human papillomavirus type 1 E1E4 protein necessary for E4 oligomerisation in vivo. *Virology* **240**, 221-31.
- Baize, S., Leroy, E. M., Georges-Courbot, M. C., Capron, M., Lansoud-Soukate, J., Debre, P., Fisher-Hoch, S. P., McCormick, J. B. & Georges, A. J. (1999).** Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med* **5**, 423-6.
- Baron, R. C., McCormick, J. B. & Zubeir, O. A. (1983).** Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull World Health Organ* **61**, 997-1003.
- Basler, C. F., Wang, X., Mühlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H. -D., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. (2000).** The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12289-94.
- Batchelder, C., Dunn, M. A., Choy, B., Suh, Y., Cassie, C., Shim, E. Y., Shin, T. H., Mello, C., Seydoux, G. & Blackwell, T. K. (1999).** Transcriptional repression by the *Caenorhabditis elegans* germ-line protein PIE-1. *Genes Dev* **13**, 202-12.
- Becker, S., Huppertz, S., Klenk, H.-D. & Feldmann, H. (1994).** The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated. *J Gen Virol* **75**, 809-18.
- Becker, S., Rinne, C., Hofsäss, U., Klenk, H.-D. & Mühlberger, E. (1998).** Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology* **249**, 406-17.
- Becker, S. & Mühlberger, E. (1999).** Co- and posttranslational modifications and functions of Marburg virus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**, 23-34.
- Becker, S. (2000).** Struktur, Funktion und Biosynthese von Proteinen des Marburg-Virus. Habilitation. Philipps-Universität, Marburg
- Benndorf, R., Sun, X., Gilmont, R. R., Biederman, K. J., Molloy, M. P., Goodmurphy, C. W., Cheng, H., Andrews, P. C. & Welsh, M. J. (2001).** HSP22, a new member of the small heat shock protein superfamily, interacts with mimic of phosphorylated HSP27 ((3D)HSP27). *J Biol Chem* **276**, 26753-61.
- Berkowitz, R., Fisher, J. & Goff, S. P. (1996).** RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 177-218.
- Bialojan, C. & Takai, A. (1988).** Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* **256**, 283-90.

- Bird, A. J., Turner-Cavet, J. S., Lakey, J. H. & Robinson, N. J. (1998).** A carboxyl-terminal Cys2/His2-type zinc-finger motif in DNA primase influences DNA content in *Synechococcus* PCC 7942. *J Biol Chem* **273**, 21246-52.
- Bittel, D. C., Smirnova, I. V. & Andrews, G. K. (2000).** Functional heterogeneity in the zinc fingers of metalloregulatory protein metal response element-binding transcription factor-1. *J Biol Chem* **275**, 37194-201.
- Bollen, M. (2001).** Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci* **26**, 426-31.
- Bray, M., Driscoll, J. & Huggins, J. W. (2000).** Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral Res* **45**, 135-47.
- Buchholz, C. J., Spehner, D., Drillien, R., Neubert, W. J. & Homann, H. E. (1993).** The conserved N-terminal region of Sendai virus nucleocapsid protein NP is required for nucleocapsid assembly. *J Virol* **67**, 5803-12.
- Buchholz, U.J., Finke, S. & Konzelmann, K.K. (1999)** Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* **73**, 251-9.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. & Strelkov, S.V. (2001).** Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* **11** (2): 82-8.
- Bwaka, M. A., Bonnet, M. J., Calain, P., Colebunders, R., De Roo, A., Guimard, Y., Katwiki, K. R., Kibadi, K., Kipasa, M. A., Kuvula, K. J., Mapanda, B. B., Massamba, M., Mupapa, K. D., Muyembe-Tamfum, J. J., Ndaberey, E., Peters, C. J., Rollin, P. E. & Van den Enden, E. (1999).** Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J Infect Dis* **179**, Suppl 1, S1-7.
- Cartee, T. L. & Wertz, G. W. (2001).** Respiratory Syncytial Virus M2-1 protein requires phosphorylation for efficient function and binds viral RNA during infection. *J Virol* **75**, 12188-97.
- CDC (2001).** Outbreak of Ebola hemorrhagic fever Uganda, August 2000-January 2001. *MMWR* **50** (5): 73-7.
- Chan, S. Y., Empig, C. J., Welte, F. J., Speck, R. F., Schmaljohn, A., Kreisberg, J. F. & Goldsmith, M. A. (2001).** Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell* **106**, 117-26.
- Cohen, P. T. (1997).** Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**, 245-51.

- Cohen, P (1990).** Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* **15**(3), 98-102.
- Cohen, P. (1999).** The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 459-65.
- Coleman, J. E. (1992).** Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem* **61**, 897-946.
- Collins, P. L., Hill, M. G., Cristina, J. & Grosfeld, H. (1996).** Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 81-5.
- Cuesta, I., Geng, X., Asenjo, A. & Villanueva, N. (2000).** Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J Virol* **74**, 9858-67.
- Curran, J., Boeck, R., Lin-Marq, N., Lupas, A. & Kolakofsky, D. (1995).** Paramyxovirus phosphoproteins form homotrimers as determined by an epitope dilution assay, via predicted coiled coils. *Virology* **214**, 139-49.
- Davis, R. J. (1993).** The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **268**, 14553-6.
- De, B. P., Das, T. & Banerjee, A. K. (1997).** Role of cellular kinases in the gene expression of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Biol. Chem* **378**: 489-93.
- De Guzman, R. N., Liu, H. Y., Martinez-Yamout, M., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2000).** Solution structure of the TAZ2 (CH3) domain of the transcriptional adaptor protein CBP. *J Mol Biol* **303**, 243-53.
- De Guzman, R. N., Wu, Z. R., Stalling, C. C., Pappalardo, L., Borer, P. N. & Summers, M. F. (1998).** Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* **279**, 384-8.
- DuBois, R. N., McLane, M. W., Ryder, K., Lau, L. F. & Nathans, D. (1990).** A growth factor-inducible nuclear protein with a novel cysteine/histidine repetitive sequence. *J Biol Chem* **265**, 19185-91.
- Dupuy, L. C., Dobson, S., Bitko, V. & Barik, S. (1999).** Casein kinase 2-mediated phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase 1 occurs mainly at Ser(215) and is without effect. *J Virol* **73**, 8384-92.
- Elliott, L. H., Kiley, M. P. & McCormick, J. B. (1985).** Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* **147**, 169-76.
- Favre, B., Turowski, P. & Hemmings, B. A. (1997).** Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J Biol Chem* **272**, 13856-63.

- Fearns, R. & Collins, P. L. (1999).** Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* **73**, 5852-64.
- Feldmann, H., Bugany, H., Mahner, F., Klenk, H.-D., Drenckhahn, D. & Schnittler, H. J. (1996a).** Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol* **70**, 2208-14.
- Feldmann, H., Slenczka, W. & Klenk, H.-D. (1996b).** Emerging and reemerging of filoviruses. *Arch Virol Suppl* **11**, 77-100.
- Feldmann, H. & Kiley, M. P. (1999).** Classification, structure, and replication of filoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**, 1-21.
- Fisher-Hoch, S. P. & McCormick, J. B. (1999).** Experimental filovirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**, 117-43.
- Fisher-Hoch, S. P., Perez-Oronoz, G. I., Jackson, E. L., Hermann, L. M. & Brown, B. G. (1992).** Filovirus clearance in non-human primates. *Lancet* **340**, 451-3.
- Gao, Y. & Lenard, J. (1995a).** Cooperative binding of multimeric phosphoprotein (P) of vesicular stomatitis virus to polymerase (L) and template: pathways of assembly. *J Virol* **69**, 7718-23.
- Gao, Y. & Lenard, J. (1995b).** Multimerization and transcriptional activation of the phosphoprotein (P) of vesicular stomatitis virus by casein kinase-II. *Embo J* **14**, 1240-7.
- Garcia, A., Cayla, X. & Sontag, E. (2000).** Protein phosphatase 2A: a definite player in viral and parasitic regulation. *Microbes Infect* **2**, 401-7.
- Garcia, J., Garcia-Barreno, B., Vivo, A. & Melero, J. A. (1993).** Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* **195**, 243-7.
- Geisbert, T. W. & Jahrling, P. B. (1995).** Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res* **39**, 129-50.
- Green, P. L., Yip, M. T., Xie, Y. & Chen, I. S. (1992).** Phosphorylation regulates RNA binding by the human T-cell leukemia virus Rex protein. *J Virol* **66**, 4325-30.
- Hanas, J. S., Hazuda, D. J., Bogenhagen, D. F., Wu, F. Y. & Wu, C. W. (1983).** Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene. *J Biol Chem* **258**, 14120-5.
- Hardy, R. W. & Wertz, G. W. (2000).** The Cys(3)-His(1) motif of the respiratory syncytial virus M2-1 protein is essential for protein function. *J Virol* **74**, 5880-5.
- Haystead, T. A., Sim, A. T., Carling, D., Honnor, R. C., Tsukitani, Y., Cohen, P. & Hardie, D. G. (1989).** Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* **337**, 78-81.

- Hevey, M., Negley, D., Pushko, P., Smith, J. & Schmaljohn, A. (1998).** Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology* **251**, 28-37.
- Huang, C., Kiyotani, K., Fujii, Y., Fukuhara, N., Kato, A., Nagai, Y., Yoshida, T. & Sakaguchi, T. (2000).** Involvement of the zinc-binding capacity of Sendai virus V protein in viral pathogenesis. *J Virol* **74**, 7834-41.
- Hunter, T. (1991).** Protein kinase classification. *Methods Enzymol* **200**, 3-37.
- Hunter, T. (2000).** Signaling-2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-27.
- Hwang, L. N., Englund, N., Das, T., Banerjee, A. K. & Pattnaik, A. K. (1999).** Optimal replication activity of vesicular stomatitis virus RNA polymerase requires phosphorylation of a residue(s) at carboxy-terminal domain II of its accessory subunit, phosphoprotein P. *J Virol* **73**, 5613-20.
- ICTV (2001).**
- Janssens, V. & Goris, J. (2001).** Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353**, 417-39.
- Jin, D. Y. & Jeang, K. T. (1997).** HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. *Nucleic Acids Res* **25**, 379-87.
- Johnson, K. M., Lange, J. V., Webb, P. A. & Murphy, F. A. (1977).** Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* **1**, 569-71.
- Kolakofsky, D., Vidal, S. & Curran J. (1991).** Paramyxovirus RNA synthesis and P gene expression. In Kingsbury DW, ed. *The Paramyxoviruses*. New York: Plenum, 1991:215-33.
- 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.
- Kolesnikova, L., Bugany, H., Klenk, H.-D. & Becker S. (2002).** VP40, the matrix protein of Marburg virus is associated with membranes of the late endosomal compartment. *J Virol* **76**, In press.
- Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Williams, A. J., Bressler, D. S., Martin, M. L., Swanepoel, R., Burt, F. J., Leman, P. A., Khan, A. S., Rowe, A. K., Mukunu, R., Sanchez, A. & Peters, C. J. (1999).** Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen and IgM and IgG antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* **179** Suppl 1, S177-78.
- Lamb, R. A. & Kolakofsky, D. (1996)** Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Fields, B. N. (ed.). *Virology*, third edn., pp. 1177-204. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia.

- Laity, J. H., Lee, B. M. & Wright, P. E. (2001).** Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 39-46.
- Leger, J., Kempf, M., Lee, G. & Brandt, R. (1997).** Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *J Biol Chem* **272**, 8441-6.
- Leroy, E. M., Baize, S., Debre, P., Lansoud-Soukate, J. & Mavoungou, E. (2001).** Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections. *Clin Exp Immunol* **124**, 453-60.
- Liau, S. & Steinberg, R. A. (1996).** Dephosphorylation of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase at Thr-197 by a cellular protein phosphatase and by purified protein phosphatase-2A. *J Biol Chem* **271**, 258-63.
- Mackett, M., Smith G. L. & B. Moss. (1984).** General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* **49**: 857-64.
- Martini, G.A., & Siegert, R. (ed.) (1971).** *Marburg Virus Disease*. 1st ed., pp. 1-230. Springer, New York.
- Matias, W. G., Bonini, M. & Creppy, E. E. (1996).** Inhibition of protein synthesis in a cell-free system and Vero cells by okadaic acid, a diarrhetic shellfish toxin. *J Toxicol Environ Health* **48**, 309-17.
- Matias, W. G., Traoré, A., Bonini, M., Sanni, A. & Creppy, E. E. (1999).** Oxygen reactive radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. *Hum Exp Toxicol* **18**, 634-9.
- Miller, J., McLachlan, A. D. & Klug, A. (1985).** Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J* **4**, 1609-14.
- Millward, T. A., Zolnierowicz, S. & Hemmings, B. A. (1999).** Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci* **24**, 186-91.
- Modrof, J., Moritz, C., Kolesnikova, L., Konakova, T., Hartlieb, B., Randolph, A., Mühlberger, E. & Becker, S. (2001).** Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. *Virology* **287**, 171-82.
- Mühlberger, E., Lötfering, B., Klenk, H.-D. & Becker, S. (1998).** Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J Virol* **72**, 8756-64.
- Mühlberger, E., Weik, M., Volchkov, V. E., Klenk, H.-D. & Becker, S. (1999).** Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J Virol* **73**, 2333-42.

- Nagadoi, A., Nakazawa, K., Uda, H., Okuno, K., Maekawa, T., Ishii, S. & Nishimura, Y. (1999).** Solution structure of the transactivation domain of ATF-2 comprising a zinc finger-like subdomain and a flexible subdomain. *J Mol Biol* **287**, 593-607.
- Nagao, M., Shima, H., Nakayasu, M. & Sugimura, T. (1995).** Protein serine/threonine phosphatases as binding proteins for okadaic acid. *Mutat Res* **333**, 173-9.
- Narayan, M., Kusuhara, K. & Green, P. L. (2001).** Phosphorylation of two serine residues regulates human T-cell leukemia virus type 2 Rex function. *J Virol* **75**, 8440-8.
- Nichol, S. T., Arikawa, J. & Kawaoka, Y. (2000).** Emerging viral diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12411-2.
- Pattnaik, A. K., Hwang, L., Li, T., Englund, N., Mathur, M., Das, T. & Banerjee, A. K. (1997).** Phosphorylation within the amino-terminal acidic domain I of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is required for transcription but not for replication. *J Virol* **71**, 8167-75.
- Pearson, R. B. & Kemp, B. E. (1991).** Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* **200**, 62-81.
- Peters, C. J., Sanchez, A., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G. & Murphy, F. A. (1996).** Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. *Fields, B. N. (ed.). Virology, third edn., pp. 1161-76.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Peters, C. J. & Khan, A. S. (1999).** Filovirus diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**, 85-95.
- Pfister, T., Jones, K. W. & Wimmer, E. (2000).** A cysteine-rich motif in poliovirus protein 2C(ATPase) is involved in RNA replication and binds zinc in vitro. *J Virol* **74**, 334-43.
- Pyerin, W., Ackermann, K., and Lorenz, P. (1996).** Casein kinases. In: Marks, F. (ed.). *Protein Phosphorylation*, pp. 117-47. VCH, Weinheim.
- Roach, P. J. (1991).** Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J Biol Chem* **266**, 14139-42.
- Rost, B. & Sander, C. (1993).** Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* **232**, 584-99.
- Ruigrok, R. W., Schoehn, G., Dessen, A., Forest, E., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H.-D. & Weissenhorn, W. (2000).** Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J Mol Biol* **300**, 103-12.
- Ryabchikova, E. I., Kolesnikova, L. V. & Netesov, S. V. (1999).** Animal pathology of filoviral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**, 145-73.
- Sänger, C. (2000).** Untersuchungen zum Transport und zur Reifung des Marburg-Virus Oberflächenproteins GP. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg.

- Sanchez, A., Yang, Z. Y., Xu, L., Nabel, G. J., Crews, T. & Peters, C. J. (1998).** Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J Virol* **72**, 6442-7.
- Sambrook, A., E. F. Fritsch & A. K. Maniatis. (1989).** *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schiff, L., Nibert, M. L. & Fields, B. (1988).** Characterisation of a zinc-blotting technique: evidence that a retroviral gag protein binds zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4195-9.
- Sheppeck, J. E., Gauss, C. M. & Chamberlin, A. R. (1997).** Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg Med Chem* **5**, 1739-50.
- Sontag, E. (2001).** Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal* **13**, 7-16.
- Spehner, D., Kirn, A. & Drillien, R. (1991).** Assembly of nucleocapsidlike structures in animal cells infected with a vaccinia virus recombinant encoding the measles virus nucleoprotein. *J Virol* **65**, 6296-300.
- Ströher, U., West, E., Bugany, H., Klenk, H. D., Schnittler, H. J. & Feldmann, H. (2001).** Infection and activation of monocytes by marburg and ebola viruses. *J Virol* **75**, 11025-33.
- Sullivan, N. J., Sanchez, A., Rollin, P. E., Yang, Z. Y. & Nabel, G. J. (2000).** Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* **408**, 605-9.
- Sun, L., Liu, A. & Georgopoulos, K. (1996).** Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo J* **15**, 5358-69.
- Sutter, G., Ohlmann, M. & Erfle, V. (1995).** Non replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett* **371**, 9-12.
- Swanepoel, R., Leman, P. A., Burt, F. J., Zachariades, N. A., Braack, L. E., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Zaki, S. R. & Peters, C. J. (1996).** Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg Infect Dis* **2**, 321-5.
- Takada, A., Watanabe, S., Ito, H., Okazaki, K., Kida, H. & Kawaoka, Y. (2000).** Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* **278**, 20-6.
- Tang, R. S., Nguyen, N., Cheng, X. & Jin, H. (2001).** Requirement of cysteines and length of the human respiratory syncytial virus M2-1 protein for protein function and virus viability. *J Virol* **75**, 11328-35.
- Tarbouriech, N., Curran, J., Ebel, C., Ruigrok, R. W. & Burmeister, W. P. (2000).** On the domain structure and the polymerization state of the sendai virus P protein. *Virology* **266**, 99-109.

- Traoré, A., Baudrimont, I., Ambaliou, S., Dano, S. D. & Creppy, E. E. (2001).** DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco-2 cells, a human colonic epithelial cell line. *Arch Toxicol* **75**, 110-7.
- Turnage, M. A., Brewer-Jensen, P., Bai, W. L. & Searles, L. L. (2000).** Arginine-rich regions mediate the RNA binding and regulatory activities of the protein encoded by the *Drosophila melanogaster* suppressor of sable gene. *Mol Cell Biol* **20**, 8198-208.
- Vanderzanden, L., Bray, M., Fuller, D., Roberts, T., Custer, D., Spik, K., Jahrling, P., Huggins, J., Schmaljohn, A. & Schmaljohn, C. (1998).** DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* **246**, 134-44.
- Volchkov, V. E., Becker, S., Volchkova, V. A., Ternovoj, V. A., Kotov, A. N., Netesov, S. V. & Klenk, H.-D. (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, V. E., Feldmann, H., Volchkova, V. A. & Klenk, H.-D. (1998).** Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5762-7.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Chepurnov, A. A., Blinov, V. M., Dolnik, O., Netesov, S. V. & Feldmann, H. (1999).** Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol* **80**, 355-62.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Mühlberger, E., Kolesnikova, L. V., Weik, M., Dolnik, O. & Klenk, H.-D. (2001).** Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* **291**, 1965-9.
- Volchkova, V. A., Klenk, H.-D. & Volchkov, V. E. (1999).** Delta-peptide is the carboxy-terminal cleavage fragment of the nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus. *Virology* **265**, 164-71.
- Weik, M. (2001).** Untersuchungen cis-aktiver Elemente im Genom des Ebola-virus. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg.
- Wilson, J. A. & Hart, M. K. (2001).** Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. *J Virol* **75**, 2660-4.
- Wilson, J. A., Hevey, M., Bakken, R., Guest, S., Bray, M., Schmaljohn, A. L. & Hart, M. K. (2000).** Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science* **287**, 1664-6.
- World Health Organisation (WHO) (1978a).** Ebola hemorrhagic fever in Sudan, 1976. *Bull WHO* **56**, 247-70.
- World Health Organisation (WHO) (1978b).** Ebola hemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull WHO* **56**, 271-93.

- World Health Organisation (WHO) (2002).** <http://www.who.int/disease-outbreak-news/n2002/january/02january2002.html>
- Worthington, M. T., Amann, B. T., Nathans, D. & Berg, J. M. (1996).** Metal binding properties and secondary structure of the zinc-binding domain of Nup475. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13754-9.
- Xu, L., Sanchez, A., Yang, Z., Zaki, S. R., Nabel, E. G., Nichol, S. T. & Nabel, G. J. (1998).** Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med* **4**, 37-42.
- Yang, Y., Keeney, D., Tang, X., Canfield, N. & Rasmussen, B. A. (1999).** Kinetic properties and metal content of the metallo-beta-lactamase CcrA harboring selective amino acid substitutions. *J Biol Chem* **274**, 15706-11.
- Yang, Z., Delgado, R., Xu, L., Todd, R. F., Nabel, E. G., Sanchez, A. & Nabel, G. J. (1998).** Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science* **279**, 1034-7.

7 Anhang

Alignment der Proteinsequenzen des EBOV-VP30 und des MBGV-VP30.

```

EBOV-VP30 1 MEASYERGRPRAARQHSRDGHDHVRARSSSRENYRGEYRQSRSASQVR. 49
                ||| | | | :| . |: .| : ..|| | |
MBGV-VP30 1 ..MQQPRGRSR.TRNHQVTPTIYH.ETQLPSKPHYTNYHPRARSMSSTRS 45

50 ....VPTVFHKKRVEPLTV.....PPAPKDICPTLKKGFLCDSSFCKKD 89
                || | | | . || |||. | :| | | | :|
46 SAESSP.T.NHIPRARPPSTFNLSKPPPPPKDMCRNMKIGLPCADPTCNRD 94

90 HQLESLTDRELLILIARKTCGSVEQQLNITAPKD...SRLANPTADDFQQ 136
  | |:.||.|||||.||| . :. . |. | . . | |:
95 HDLDNLTNRELLLLMARKMLPNTDKTFRM..PQDCGSPSLSKGLSKDKQE 142

137 EEGPKITLLTLIKTAEHWARQDIRTIEDSKLRALLTLCAVMTRKFSKSQL 186
  : :|| | : | :| :::: ||| |. | || :| :
143 QTKDVLTLLENLGHILSYLHRSEIGKLDETSLRAALSLTCAGIRKTNRSLI 192

187 SLLCETHLRREGLGQDQAEPVLEVYQRLHSDKGGSFEEALWQQWDRQSLI 236
  . : | |: | | ||| : : | :| |||| ||||| | |:.|:
193 NTMTELHMNHENLPQDQNGVIKQTYTGIHLDKGGQFEAALWQGWDKRSIS 242

237 MFITAFNLIALQLPCESS.AVVVSGLRTLVPQSDNEEASTNPGTCSWSDEGTP* 285
  :|: | | : :|||| .| | :. |||
243 LFVQAALYVMNNIPCESSISVQASYDHFILPQSQGKQ* 280

```

Die Sequenzähnlichkeit beträgt 47% und die Sequenzidentität 36%. Phosphorylierte Aminosäuren sind in beiden Sequenzen fett gedruckt. Das Zinkfingermotiv (AS 67 – 93) und die Leucinreste 100 – 102 sind in der EBOV-VP30 Sequenz grau unterlegt bzw. umrahmt.

Oligonukleotide, die für VP30-spezifische Mutagenese bei den Klonierungen eingesetzt wurden (Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind kursiv dargestellt):

- #408 E.30 N-term fwd, BamHI**
5'-ACCGGATCCATGGAAGCTTCATATGAGAGA-3'
- #409 E.30flag C-term rev, XhoI**
5'-AGACTCGAGTTACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCAGGGGTACCCTCATCAGACCATG-3'
- #410 E.30flag N-term fwd, BamHI**
5'-ACCGGATCCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGAAGCTTCATATGAGAGAGGACG-3'
- #412 E.30 BamHI fwd pGEX**
5'-GAATCGGATCCTCGAAGCTTCATATGAGAGAGGAC-3'
- #422 E.30 S44+46A fwd**
5'-GTACCGTCAATCAAGGGCCGCCGACACAAGTGCGCGTTCC-3'
- #433 E.30 S44+46A rev**
5'-GGAACGCGCACTTGTGCGGCGGCCCTTGATTGACGGTAC-3'
- #434 E.30 C-term rev, XhoI**
5'-AGACTCGAGTTAAGGGGTACCCTCATCAGACC-3'
- #455 E.30 S29-31A fwd**
5'-CATGTTTCGAGCAGCAGCAGCCAGAGAGAATTATCGAG-3'
- #456 E.30 S29-31A rev**
5'-CTCGATAATTCTCTCTGGCTGCTGCTCGTCTCGAACATG-3'
- #457 E.30 S44+46A → S42-46A fwd**
5'-GAGTACCGTCAAGCAAGGGCCGC-3'
- #458 E.30 S44+46A → S42-46A rev**
5'-GCGGCCCTTGCTTGACGGTACTC-3'
- #459 E.30 H90L fwd**
5'-GCAAAAAGATCTCCAGTTGGAG-3'
- #460 E.30 H90L rev**
5'-CTCCAAGTGGAGATCTTTTTTGC-3'
- #499 E.30 C72S fwd**
5'-CTAAAGACATAAGTCCGACCTTG-3'
- #500 E.30 C72S rev**
5'-CAAGGTCGGACTTATGTCTTTAG-3'
- #514 E.30 E60D fwd**
5'-GAGAGTTGACCCATTAACAG-3'
- #515 E.30 E60D rev**
5'-CTGTTAATGGGTCAACTCTC-3'
- #538 E.30 T52A fwd**
5'-CAAGTGC GCGTTCCTGCTGTATTCATAAG-3'
- #539 E.30 T52A rev**
5'-CTTATGAAATACAGCAGGAACGCGCACTTG-3'
- #602A E.30 S29-31D fwd**
5'-GACCACCATGTTTCGAGCAGCAGACGATGACAGAGAGAATTATCGAGGTGAG-3'
- #603A E.30 S29-31D rev**
5'-CTCACCTCGATAATTCTCTGTGCATCGTCTCGTGCTCGAACATGGTGGTC-3'
- #604 E.30 S44+46D fwd**
5'-GAGTACCGTCAATCAAGGGACGCCGATCAAGTGCGCGTTCCTACTG-3'

#605 E.30 S44+46D rev
5'-CAGTAGGAACGCGCACTTGATCGGCGTCCCTTGATTGACGGTACTC-3'

#643 E.30 flag d214 rev, XhoI
5'-AGACTCGAGTTACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCTCGTTGATATACTTCGAGAACGG-3'

#645 E.30 flag d234 rev, XhoI
5'-AGACTCGAGTTACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCTTGTCCGTCCTTGTGGCCATAG-3'

#651 E.30 S40-46D fwd
5'-CGAGGTGAGTACCGTCAAGATAGGGACGCCGATCAAG-3'

#652 E.30 S40-46D rev
5'-CTTGATCGGCGTCCCTATCTTGACGGTACTCACCTCG-3'

#653 E.30 fwd 68-, BamHI
5'-CATGGATCCCTAAAGACATATGTCCGACCTTG-3'

#654 E.30 rev -95, EcoRI
5'-CATGAATTCTTATAAACTCTCCAAGTGGTATCTTTTTTGC-3'

#700 E.30 d194 rev, XhoI
5'-AGACTCGAGTTAGTGTGTCTCACATAAAAGACTCAGC-3'

#701 E.30 d174 rev, XhoI
5'-AGACTCGAGTTATAGAGTCAACAATGCTCTTAATTTTG-3'

#709 E.30 d154 rev, XhoI
5'-AGACTCGAGTTAGTGTCTGCCGTCCTTGATCAGTGTC-3'

#710 E.30 d134 rev, XhoI
5'-AGACTCGAGTTAATCATCAGCCGTTGGATTTGCTAAGC-3'

#711 E.30 d114 rev, XhoI
5'-AGACTCGAGTTATTCTACTGATCCACAAGTCTTACGG-3'

#740 E.30 fwd 61-, BamHI
5'-CATGGATCCCATTAACAGTTCCCTCCAGCACC-3'

#741 E.30 rev -107, EcoRI
5'-CATGAATTCTTACTTACGGGCGATTAGTAGGAG-3'

#742 E.30 R! 8786 PshAI, fwd
5'-CAAAAAGATCACCAGGACGAAAGTCTAACTGATAGGGAATTAC-3'

#743 E.30 R! 8786 PshAI, rev
5'-GTAATCCCTATCAGTTAGACTTTTCGTCCTGGTATCTTTTTTG-3'

#744 E.30 R! 8843 PshAI, fwd
5'-CCGTAAGACTTGTGGAGACGTAGGTCAACAATTAATATAACTGC-3'

#745 E.30 R! 8843 PshAI, rev
5'-GCAGTTATATTTAATTGTTGACCTACGTCTCCACAAGTCTTACGG-3'

#778 E.30 3LA fwd
5'-GAGAGTTTAACTGATAGGGAAGCAGCCGCACTAATCGCCCGTAAGACTTG-3'

#779 E.30 3LA rev
5'-CAAGTCTTACGGGCGATTAGTGC GGCTGCTTCCCTATCAGTTAACTCTC-3'

#803 E.30 CCH → SSL fwd
5'-CCTTGAAAAAAGGATTTTTGTCTGACAGTAGTTTTTCCAAAAAAGATCTCCAG-3'

#804 E.30 CCH → SSL rev
5'-CTGGAGATCTTTTTTGAAAAACTACTGTCAGACAAAAATCCTTTTTTCAAGG-3'

#833 E.30 68-, fwd BamHI
5'-ACCGGATCCATGCCTAAAGACATATGTCCG-3'