



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

---

# **Charakterisierung von Oligomerisierungsdomänen des Marburg-Virus Nukleoprotein und deren funktionelle Bedeutung**

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

dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von  
**Andrea Di Carlo**  
aus Lich

Marburg/ Lahn 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2000 bis April 2003 am Institut für Virologie des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. H.-D. Klenk durchgeführt.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
Der Philipps-Universität Marburg am 11.11.2004.

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

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

Koreferent: Prof. Dr. R. Jacob

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit werden folgende Publikationen erstellt:

---

**Di Carlo, A., Klenk, H.-D. & Becker, S.** Potential coiled coil structures crucial for Marburg virus NP homo- and heterooligomerization. In preparation.

**Di Carlo, A., Klenk, H.-D. & Becker, S.** Phosphorylation of NP serine cluster differentially influences Marburg virus transcription and oligomerization. In preparation.

Die Arbeit wurde auf folgenden Kongressen und Tagungen präsentiert:

---

#### **Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie**

April 2000, Wien, Österreich

**Di Carlo A., Mühlberger E. & Becker S.** Regulation der viralen RNA-Synthese durch negative Ladungen in der phosphorylierten sauren Region II des Marburg-Virus Nukleoproteins. (Poster).

#### **Symposium on Marburg and Ebola Viruses**

Oktober 2000, Marburg, Deutschland

**Di Carlo, A., Mühlberger, E. & Becker, S.** Regulation of viral RNA synthesis by negative charges in a phosphorylated acidic region of Marburg virus nucleoprotein. (Poster).

#### **Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie**

April 2002, Erlangen, Deutschland

**Di Carlo, A., Lötfering, B., Mühlberger, E. & Becker, S.** Homooligomerisation of Marburg virus NP and interaction with VP35. (Poster).

---

Inhaltsangabe	Seite
Abkürzungsverzeichnis	1
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Das Marburg-Virus</b>	<b>6</b>
2.1.1. Taxonomie und Vorkommen	6
2.1.2. Pathogenese	7
2.1.3. Epidemiologie	8
2.1.4. Klinik von Marburg-Virus-Infektionen	11
2.1.5. Therapie und Prophylaxe	11
2.1.6. Morphologie des Marburg-Virus	12
2.1.7. Genomaufbau	13
2.1.8. Virusproteine	13
2.1.9. Interaktion der Marburg-Virus-Nukleokapsidproteine	15
2.1.10. Transkription und Replikation	16
<b>2.2. Reverse Genetik zur Untersuchung des Marburg-Virus</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Proteinkomplexe</b>	<b>18</b>
2.3.1. Coiled-Coil-Motive	18
2.3.2. Coiled-Coil Computer-Analyseprogramm	19
<b>2.4. Protein-Phosphorylierung</b>	<b>19</b>
2.4.1. Proteinkinasen	19
2.4.2. Phosphorylierung viraler Proteine	20
<b>2.5. Problemstellung</b>	<b>23</b>
<b>3 Material</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Chemikalien</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Geräte und Materialien</b>	<b>25</b>
<b>3.3. Kits</b>	<b>25</b>
<b>3.4. Nukleinsäuren und Nukleotide</b>	<b>26</b>
3.4.1. DNA-Oligonukleotide (Primer)	26
3.4.2. Nukleinsäuren als Größenmarker	27
3.4.3. Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide	27
<b>3.5. Proteine</b>	<b>27</b>
3.5.1. Proteine, Peptide, Aminosäuren	27
3.5.2. Enzyme	27
3.5.3. Antikörper	28
<b>3.6. Puffer und Lösungen</b>	<b>28</b>
<b>3.7. Radioaktiv markierte Substanzen</b>	<b>30</b>
<b>3.8. Vektoren und rekombinante Plasmide</b>	<b>30</b>
<b>3.9. Viren</b>	<b>31</b>

---

<b>3.10.</b>	<b>Wachstumsmedien</b>	<b>32</b>
	Wachstumsmedien für Bakterienzellen	32
	Wachstumsmedien für Säugerzellen	32
<b>3.11.</b>	<b>Zellen</b>	<b>32</b>
	Prokaryotische Zellen	32
	Eukaryotische Zellen	32
<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
<b>4.1.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
4.1.1.	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	32
	Isolierung von annealten Primern über eine Phenol/Chloroform-Extraktion	32
	Isolierung von doppelsträngiger DNA (dsDNA)	33
	DNA-Reinigung über Ethanol-Fällung	33
4.1.2.	Modifizierung von Nukleinsäuren	33
	Verdau von DNA mit Restriktions-Endonukleasen	33
	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	33
	Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden	34
	Abdauen von 3'-überhängenden DNA-Enden	34
	Abdauen von 5'-überhängenden DNA-Enden	34
4.1.3.	Primer-Anlagerung ( <i>primer-Annealing</i> )	34
4.1.4.	Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
4.1.5.	Ortsgerichtete Mutagenese	35
4.1.6.	Inverse-PCR	36
4.1.7.	DNA-Ligation	36
4.1.8.	Nichtradioaktive Sequenzierung mit ABI Prism™	37
4.1.9.	In vitro Translation	38
4.1.10	Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	38
	Analytische DNA-Agarosegele	38
	Präparative DNA-Agarosegele	38
4.1.11.	Plasmidpräparation	39
	Plasmidpräparation im kleinen Maßstab	39
	Plasmidpräparation im großen Maßstab	39
4.1.12.	Quantitative und Qualitative DNA-Bestimmung	39
	Konzentrationsbestimmung von dsDNA	39
	Reinheitsbestimmung von dsDNA	39
<b>4.2.</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>40</b>
4.2.1.	Das E.coli-Expressionssystem	40
	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen	40
	Transformation von Bakterienzellen	40

---

Expression von Fremdgenen in BL21-E.coli	40
Bakterienzellyse	41
4.2.2. Kultivierung von HeLa-, BSR T7/5- oder HUH T7-Zellen	41
4.2.3. Das Vaccinia-Virus-Expressionssystem	42
Infektion von HeLa-Zellen mit Vaccinia-Virus MVA-T7	42
DNA-Transfektion von infizierten HeLa-Zellen mit Lipofektin	42
Säugerzellyse	42
<b>4.3. Biochemische Methoden</b>	<b>43</b>
4.3.1. Untersuchungen zur Funktion von Proteinen	43
MARV-spezifischer Replikations-/ Transkriptionsassay	43
Titration der pT-NP bzw. Ser-Cluster NP-Substitutionsmutanten	44
Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität	44
Dephosphorylierung von immobilisierten Proteinen	44
In vitro Kinasierungsassay für Proteinkinase CKII	45
4.3.2. Metabolische radioaktive Markierung von HeLa-Zellen	45
Metabolische Markierung mit [ <sup>35</sup> S]-Promix (Methionin/ Cystein)	45
Metabolische Markierung mit [ <sup>32</sup> P <sub>i</sub> ]-Orthophosphat	45
Pulse-Chase-Experiment	46
4.3.3. Isolierung und Reinigung von Proteinen	46
Immunpräzipitation/ Radioimmunpräzipitation	46
Bindung an Glutathion-S-Transferase (GST pull-down)	47
Quantifizierung der Daten des GST pull-down	47
4.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz	48
4.3.5. Elektrophoretische Trennung von Proteinen	49
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
Fixieren & Trocknen	49
4.3.6. Visualisierung gelelektrophoretisch getrennter Proteine	49
Coomassie-Blau-Färbung	49
Elektrotransfer von Proteinen (Western-Immuno-Blot)	49
Proteindetektion über Chemiluminiszenz	50
Nachweis markierter Proteine mit dem BiImage Analyser BAS-1000	50
4.3.7. Entfernen von Proteinen von Membranen ( <i>Stripping</i> )	51
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>52</b>
<b>5.1. Charakterisierung von NP-Homooligomerisierungsdomänen</b>	<b>52</b>
<b>5.1.1. Eingrenzung der NP-Homooligomerisierungsdomänen</b>	<b>53</b>
5.1.1.1. Eingrenzung der NP-Homooligomerisierungsdomänen durch C-terminale Deletionsmutanten	53
5.1.1.2. Charakterisierung der NP-Homooligomerisierungsdomänen durch interne Deletionsmutanten	56

<b>5.1.2.</b>	<b>Coiled-Coil-Motive im NP als Homooligomerisierungsdomäne</b>	<b>64</b>
5.1.2.1.	Einfluss der Coiled-Coil-Motive auf die Homooligomerisierung	65
5.1.2.2.	Übertragung der NP-Coiled-Coil-Motive auf ein heterologes Reporterprotein	67
5.1.2.3.	Funktionelle Arbeiten zu den Coiled-Coil-Motiven	70
<b>5.1.3.</b>	<b>Interaktion des NP N- und C-Terminus</b>	<b>71</b>
<b>5.1.4.</b>	<b>Untersuchung zur N-terminalen Homooligomerisierungsdomäne</b>	<b>74</b>
<b>5.1.5.</b>	<b>Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Homooligomerisierung</b>	<b>77</b>
<b>5.2.</b>	<b>Charakterisierung von VP35-Heterooligomerisierungsdomänen</b>	<b>80</b>
<b>5.2.1.</b>	<b>Eingrenzung der VP35-Heterooligomerisierungsdomänen</b>	<b>81</b>
<b>5.2.2.</b>	<b>Einfluss der AS 350-480 auf die Oligomerisierung mit VP35</b>	<b>83</b>
<b>5.2.3.</b>	<b>Einfluss der NP-Coiled-Coil-Motive auf die Oligomerisierung mit VP35</b>	<b>85</b>
5.2.3.1.	Interaktion der NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten mit VP35	86
5.2.3.2.	Interaktion der NP-Coiled-Coil-Fusionsproteinen mit VP35	87
<b>5.2.4.</b>	<b>Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Oligomerisierung mit VP35</b>	<b>90</b>
<b>5.3.</b>	<b>Arbeiten zur VP30-NP-Interaktion</b>	<b>92</b>
5.3.1.	Identifizierung von NP-Bereichen, die zur Oligomerisierung mit VP30 dienen	92
5.3.2.	Einfluss der Phosphorylierung des NP auf die Oligomerisierung mit VP30	93
<b>5.4.</b>	<b>Untersuchungen zur Phosphorylierung der Region II des NP</b>	<b>95</b>
5.4.1.	Phosphorylierungsstatus der Region II und Einfluss der Proteinkinase CKII	95
5.4.2.	Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Bildung der Einschlusskörper	99
5.4.3.	Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die virale RNA-Synthese	99
5.4.4.	Einfluss des Phosphorylierungsstatus des Serinclusters der Region II auf die Stabilität des NP	101
<b>5.5.</b>	<b>Eingrenzung des Epitops des monoklonalen <math>\alpha</math>-NP-Antikörper 2B10</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>135</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

∅	ohne
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CIP	Alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CoIP	Coimmunpräzipitation
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DOC	Desoxycholinsäure
DRC	Demokratische Republik Kongo
ds	doppelsträngig
DTT	1, 4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
EB	Elution buffer
EBOV	Ebola-Virus
EDTA	Dinatriummethylendiamintetraacetat
EtAc	Ethylacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GP	Glykoprotein
GSH	Glutathion-Sepharose

GST	Glutathion S-Transferase
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
HIV	Humanes-Immundefizienzvirus
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHPO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
m.o.i.	multiplicity of infection
M30	Marburg-Virus VP30
MARV	Marburg-Virus
MEASV	Masern-Virus
MEM	Minimal essential medium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MVA	Modified vaccinia virus Ankara
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natrium-Orthovanadat
NaAc	Natriumacetat
Na-Azid	Natriumazid
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NCS	Newborn calf serum
NNS	nichtsegmentiert, negativ orientiert, einzelsträngig
NP	Nukleoprotein
NP40	Nonidet P40
nt	nichttranskribierte Region
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PIC	Phosphatase-Inhibitor-Cocktail
PK CKII	Proteinkinase CKII
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD-	Peroxidase-gekoppelt
PS / PT / PY	Phosphoserin / Phosphothreonin / Phosphotyrosin
pT	pTM1

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RABV	Rabies-Virus
rATP	Adenosin-Triphosphat
RE	Restriktionsendonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratorisches-Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Speed-Vac	Vakuum-Zentrifuge
TAE	Tris-Acetat/ EDTA-Elektrophoresepuffer
TBE	Tris-Borat/ EDTA-Elektrophoresepuffer
TE	Elution buffer, endotoxine-free
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TerMix	Terminator Ready Reaction Mix
TK-Gen	Thymidinkinasegen
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
USA	United states of america
Verd.	Verdünnung
VP	Virusprotein
VSV	Vesiculo-Stomatitis-Virus
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfat

## 1. Zusammenfassung

Das phosphorylierte Nukleokapsidprotein NP ist Hauptbestandteil des Marburg-Virus (MARV)-Nukleokapsidkomplexes (NC). Neben NP sind drei weitere virale Strukturproteine, VP35, VP30, L, und die genomische RNA in den NC eingebunden. NP, VP35 und L können die virale Transkription und Replikation in einem in vitro Transkriptions/Replikationssystem vermitteln. NP interagiert mit sich selbst, mit VP35 und VP30. Die Interaktion des NP mit sich selbst (Homooligomerisierung) führt zur Ausbildung von helikalen Strukturen, die das Grundgerüst des NC bilden. In MARV-infizierten Zellen sowie bei rekombinanter Expression des NP lagern sich die NC zu charakteristischen Einschlusskörpern (EK) zusammen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Homo- und Heterooligomerisierungsdomänen auf dem NP charakterisiert und strukturelle sowie funktionelle Merkmale untersucht. Durch Deletionsmutanten des NP wurden drei wichtige Aminosäurebereiche bestimmt, die die Homooligomerisierung beeinflussen: AS 118-234 (N), AS 320-400 (CC) und AS 522-695 (C). Für CC konnte direkt gezeigt werden, dass dieser Bereich notwendig und ausreichend zur Vermittlung der Homooligomerisierung ist. CC zeigt alle Merkmale zweier Coiled-Coil-Motive (C1: AS 320-50, C2: AS 371-400; CC). Die durch CC-vermittelte Interaktion konnte durch den monoklonalen  $\alpha$ -NP Antikörper 2B10 gehemmt werden. Das von diesem Antikörper erkannte Epitop wurde auf die AS 391-410 eingegrenzt. Deletionen von CC zeigten, dass ein intaktes Doppel-Coiled-Coil-Motiv für die NP-abhängige virale Transkription unerlässlich ist. Die Bereiche N und C können miteinander interagieren. Wahrscheinlich findet der Kontakt von N und C intramolekular statt und reguliert die Aktivität von CC.

Die kürzeste NP-Mutante, die zur Bildung von Einschlusskörpern fähig ist, umfasst die ersten 270 AS. Wahrscheinlich sind diese AS ausreichend, helikale Nukleokapsidähnliche Strukturen auszubilden, die sich in Einschlusskörpern aneinanderlagern.

VP35 bindet in den ersten 390 AS des NP. Die Bindung zwischen beiden Proteinen ist offenbar abhängig von der Kooperation verschiedener NP-Bereiche. Erforderlich, aber nicht ausreichend für die Interaktion zwischen VP35 und NP ist CC.

Sowohl die Bindung des NP an sich selbst als auch die Bindung an VP35 sind von der Phosphorylierung eines charakteristischen Serinclusters (AS 450-455) abhängig. Die VP35-Interaktion nimmt mit zunehmender Phosphorylierung des Serinclusters ab. Die Homooligomerisierung ist bei dephosphoryliertem oder komplett phosphorylierten Serincluster gering. Sind einige Serinreste nicht phosphoryliert ist die Homooligomerisierung wildtypisch.

Die Phosphorylierung des Serinclusters reguliert auch die Funktion des NP während der viralen Transkription. NP mit dephosphoryliertem oder komplett phosphoryliertem Serincluster vermittelt keine Transkription mehr. Für die Funktion des NP ist unerlässlich, dass einige Serinreste des Serinclusters nicht phosphoryliert sind.

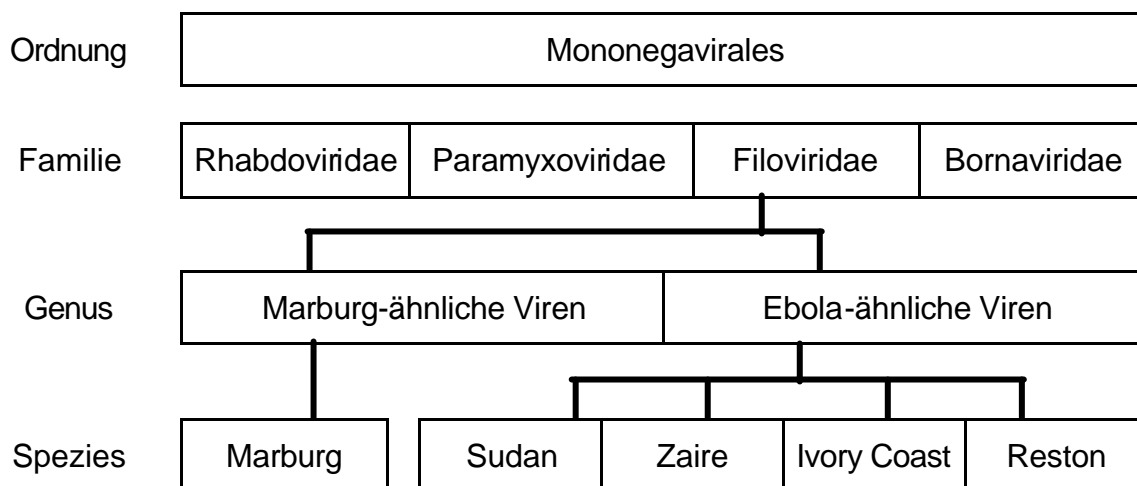
## 2. Einleitung

### 2.1. Marburg-Virus

Während der letzten Jahre führte das Auftreten unbekannter Krankheitserreger oder Erregern mit neuen pathogenen Eigenschaften zur Definition des Begriffs der „*emerging diseases*“. Zu Erregern dieser Erkrankungen zählen Corona-, Influenza-, Lassa-, Hanta-, Nipah-Viren und die Filoviren Marburg- und Ebola-Virus (MARV, EBOV). Letztere lösen ein hämorrhagisches Fieber mit hoher Mortalitätsrate aus. Allen genannten Erregern gemein ist ein RNA-Genom. Es besteht die Möglichkeit, dass hohe Mutationsraten der Viren zusammen mit einer zunehmenden globalen und lokalen Umgestaltung von Landschaften und einer ansteigenden Bevölkerungsfuktuation zu einem gehäuften Auftreten von *emerging diseases* führen (Nichol et al., 2000).

#### 2.1.1. Taxonomie und Vorkommen

Aufgrund der fadenförmigen Gestalt und serologischer, biochemischer und molekularbiologischer Eigenschaften wurden MARV und EBOV zur Familie der Filoviridae<sup>1</sup> zusammengefasst (Kiley et al., 1982). Ihr Genom besteht aus einem Molekül einzelsträngiger RNA in negativer Orientierung (NNS-RNA). Wie Vertreter der Familien Rhabdo-, Paramyxo- und Bornaviridae gehören die Filoviren zur Ordnung Mononegavirales (Abb. 1). Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die Filoviridae den Paramyxoviridae phylogenetisch am nächsten stehen (Mühlberger et al., 1992; Sanchez et al., 1992).



**Abb. 1: Taxonomie der Filoviridae.** In Anlehnung an van Regenmortel et al. (2000), ICTVdB Management (2002), ICTVdB Management (2003).

<sup>1</sup> lat.: filum = Faden

Filoviren verursachen beim Menschen schwere fieberhafte Erkrankungen mit hämorrhagischer Diathese. MARV tritt vor allem in Ostafrika, EBOV in Westafrika und Südostasien auf. In Europa kommen beide Viren unter natürlichen Bedingungen nicht vor, können aber durch Import infizierter Tiere oder Tourismus aus den betroffenen Gebieten eingeschleust werden. Der natürliche Wirt der Filoviren ist bislang unbekannt.

### 2.1.2. Pathogenese

Filoviren werden durch Kontakt mit infizierten Personen und deren Ausscheidungsprodukten wie Blut, Speichel und Sperma von Mensch zu Mensch übertragen und gelangen über kleine Haut- und Schleimhautläsionen in den Körper (Simpson and Zuckermann, 1977). Für das MARV konnte experimentell eine Übertragung durch Aerosole gezeigt werden (Pokhodjaev et al., 1991). Das Ausmaß der 1989 stattgefundenen Ebola-Virus Reston (RESV)-Epidemie bei Affen ist unter anderem auf Tröpfchen- und Aerosolinfektionen zurückzuführen (Jaax et al., 1995; Johnson et al., 1995). Eine aerogene Infektionsübertragung von Filoviren wurde beim Menschen jedoch nicht nachgewiesen.

Die Zellen des monozytären phagozytischen Systems (MPS) stellen vermutlich die primären Ziele der Virusinfektion dar. Bei ihrer Wanderung durch das Lymph- und Blutgefäßsystem sorgen infizierte Monozyten und Makrophagen für die Virusausbreitung (Feldmann et al., 1996b; Ströher et al., 2001; Skripchenko et al., 1994). Im Frühstadium betroffene Organe sind Lymphknoten, Leber und Milz (Feldmann et al., 1996b; Peters et al., 1996). Die Hepatozyten verkörpern weitere Zielzellen der Viren (Murphy et al., 1978; Ellis et al., 1979; Geisbert and Jahrling 1995). Histopathologisch lassen sich im Spätstadium der Erkrankung Nekrosen fast aller Organe beobachten (Murphy et al., 1978; WHO, 1978a, 1978b; Dietrich et al., 1978; Rippey et al., 1984; Zaki et al., 1996; Goldsmith et al., 1997; Zaki and Kilmarx, 1997; Zaki and Peters, 1997). Ablagerungen von Fibrin und Fibrinolytprodukten in den Nierentubuli weisen auf eine generelle Störung der Blutgerinnung hin (Martini, 1971). Die Instabilität des Endothels scheint die Ursache für das Auftreten von Hämorrhagien und des Schocksyndroms zu sein. Diese Instabilität könnte unter anderem von infizierten Makrophagen verursacht werden, die vermehrt Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), einen Mediator der Schocksymptomatik, ausschütten. Eine Freisetzung der Zytokine führt vermutlich zur Erhöhung der Permeabilität der Endothelzellen, ohne dass die Zellen direkt infiziert sein müssen (Schnittler et al., 1993; Strieter et al., 1993; Feldmann et al., 1996a).

### 2.1.3. Epidemiologie

1967 trat in Marburg, Frankfurt und Belgrad eine bis dahin in Europa unbekannte, ungewöhnlich schwere Infektion auf, die zum Teil mit hämorrhagischer Diathese (Martini et al., 1968; Stille et al., 1968) einherging. Davon betroffen waren Laborarbeiter und Tierpfleger, die Kontakt zu Blut, Organ- oder Gewebekulturen von aus Uganda importierten grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) hatten. Neben 26 Primärinfizierten - sieben von diesen verstarben- gab es sechs Sekundärfälle (Feldmann et al., 1996a). Die Sekundärinfektionen waren durch einen wesentlich mildereren Krankheitsverlauf gekennzeichnet (Martini et al., 1968). Die Infektion bewirkte teilweise ein hämorrhagisches Fieber. Das verursachende Virus konnte kurze Zeit später isoliert werden (Siegert et al., 1967). Da das Virus in Marburg gereinigt und morphologisch charakterisiert wurde (Siegert et al., 1968), erhielt es den Namen der Stadt: Marburg-Virus.

Nach 1967 tauchte das Virus nur selten und dann ausschließlich in Afrika auf. So gab es Einzelfälle oder kleinere Episoden in Zimbabwe, Südafrika (1975) und Kenia (1980 und 1987) (Gear et al., 1975; Smith et al., 1982; Centers for Disease Control (CDC), 1980; Johnson 1996; Kiley et al., 1988; Feldmann et al., 1996a; WHO, 1999).

Seit Ende 1998 wurde aus Durba in der Demokratischen Republik Kongo (DRC, ehemals Zaire) wiederholt von durch MARV verursachten hämorrhagischen Fiebererkrankungen berichtet (Bertherat et al., 1999; WHO, 1999). Jedoch scheint die Erkrankung, die in der dortigen Bevölkerung unter dem Namen *Durba disease* bekannt ist, schon längere Zeit in dieser Region endemisch zu sein (Bausch et al., 2003). Tabelle 1 fasst alle bekannten Ausbrüche von 1967 bis heute zusammen.

Virus	Subtyp	Jahr	Ort	humane Krankheitsfälle (Todesfälle)	Isolat
Marburg		1967	Deutschland / Jugoslawien	32 (7)	Rataycak / Popp
		1975	Zimbabwe	3 (1)	Ozolin
		1980	Kenia	2 (1)	Musoke
		1987	Kenia	1 (1)	Ravn
		seit 1998	DRC	>90 (>50)	?
Ebola	Sudan	1976	Sudan	284 (141)	Boneface
	Zaire	1976	Zaire	318 (280)	Mayinga
	Zaire	1977	Zaire	1 (1)	Bonduni
	Sudan	1979	Sudan	34 (22)	Maleo



Reston	1989	USA	4 (0)	Philippines-Reston
Reston	1992	Philippinen	0	Philippines
Reston	1992	Italien	0	Siena
Zaire	1994	Gabun	unbekannt	Gabon94
Ivory Coast	1994	Elfenbeinküste	1 (0)	Ivory Coast
Zaire	1995	Kikwit (Zaire)	315 (243)	Kikwit95
Zaire	1996	Gabun	50 (25)	Gabon96 (Feb.)
Zaire	1996	Gabun	54 (41)	Gabon96 (Okt.)
Reston	1996	USA	0	Pennsylvania
Sudan	2000-1	Uganda	425 (224)	?
Zaire	2001-2	Gabun/ DRC	97 (73)	?
	2003	DRC	143 (128)	?
	2003-4	DRC	35 (29)	?
	2004	Süd-Sudan	25 (6)	?

**Tab. 1: Durch Filoviren verursachte Ausbrüche von hämorrhagischem Fieber.** In Anlehnung an Feldmann et al., 1996a; WHO, 1992, 1996, 1997, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003a, 2003b, 2004a, 2004b; CDC, 1996. DRC = Demokratische Republik Kongo.

1976 trat bei zwei annähernd zeitgleichen, aber voneinander unabhängigen Ausbrüchen fieberhafter Erkrankungen in Zaire (heute DRC) und Sudan ein weiteres hämorrhagisches Fiebertypus in Erscheinung: das Ebola-Virus. Das Virus wurde nach einem Fluss, der sich in der Nähe der Epidemiegebiete befindet, benannt (Johnson et al., 1977; Murphy et al., 1978). Die isolierten Erreger wurden in zwei unterschiedliche Subtypen (Zaire und Sudan) eingeteilt. Morphologisch war das neuentdeckte EBOV dem MARV sehr ähnlich, ließ sich jedoch serologisch unterscheiden. (Bowen et al., 1977; Johnson et al., 1977; Pattyn et al., 1977). Bei den Ausbrüchen in Sudan und Zaire wurden insgesamt 602 Krankheitsfälle mit Mortalitätsraten von 88% in Zaire und 53% im Sudan registriert. Ähnlich dem MARV traten nach 1976 eher kleinere Episoden von EBOV hämorrhagischen Fiebern (EHF) auf. (Feldmann et al., 1996a). Anfang 1995 kam es in Kikwit (Zaire) zu einer bedeutenden Epidemie von EHF, bei der von 315 infizierten Menschen 244 starben (CDC, 1995). Sie wurde ausgelöst durch den EBOV-Subtyp Zaire. 1989 wurde das Reston-Virus (RESV; CDC, 1990; Jahrling et al., 1990) aus fieberhaft erkrankten Cynomolgus-Affen isoliert, die von den Philippinen in die USA importiert worden waren. Es wird heute als weiterer Subtyp von EBOV angesehen (Feldmann et al., 1996a). Für Affen ist das Virus hochpathogen - alle bisher registrierten RESV-Infektionen verliefen für die Affen letal - (Jahrling et al.,

1990). Beim Menschen verliefen die nachgewiesenen Infektionen asymptomatisch. 1994 erkrankte eine Wissenschaftlerin bei der Untersuchung eines toten Schimpansen an einem schweren hämorrhagischen Fieber. Der isolierte Krankheitserreger erwies sich als weiterer EBOV-Subtyp: EBOV Ivory Coast (Formenty et al, 1999). 2000 ereignete sich eine EBOV-Epidemie im Gulu-Distrikt im Norden Ugandas, die 224 Todesopfer von 425 Erkrankten forderte (CDC, 2001, WHO, 2001). 2001 wurde ein erneuter Ausbruch von EBOV aus Gabun und angrenzenden Gebieten der DRC gemeldet (WHO, 2002). Von berichteten 97 Krankheitsfällen verliefen 73 tödlich (65 Krankheitsfälle in Gabun, davon 53 Todesfälle, und 32 Krankheitsfälle in der DRC, davon 20 Todesfälle) (WHO, 2002). Von Januar bis April 2003 ereignete sich eine weitere EBOV-Epidemie in der DRC. Von 143 erkrankten Personen verstarben 128 (WHO, 2003a, 2003b). Von November 2003 bis Januar 2004 brach EHF in der DRC erneut aus. Von 35 Krankheitsfällen verliefen 29 tödlich (WHO, 2004a). Seit Mai 2004 werden Fälle von EHF aus dem Süd-Sudan gemeldet. Bis heute wurden 25 Krankheitsfälle mit 6 Todesfällen registriert (WHO, 2004b).

Trotz intensiver Studien ist der natürliche Wirt der Filoviren bis heute unbekannt. Obwohl Affen an der Verbreitung der Viren beteiligt sind, können sie aufgrund der für sie außerordentlich hohen Pathogenität als natürliches Reservoir ausgeschlossen werden (Fisher-Hoch et al., 1992; Fisher-Hoch and McCormick, 1999; Ryabchikova et al., 1999). Kandidaten sind Fledermäuse, die nach einer EBOV-Infektion das Virus mit dem Kot ausscheiden, jedoch keine Anzeichen für eine Erkrankung aufweisen (Swanepoel et al., 1996). Durch eine Vielzahl serologischer Studien konnte der zentralafrikanische Raum als endemischer Lebensraum der Filoviren festgelegt werden. Ausgangspunkt der meisten bekannt gewordenen Ausbrüche waren die Länder des so genannten Ebola-Gürtels (Sudan, DRC, Kenia und Uganda), die das Zentrum filoviraler Aktivität zu sein scheinen. Etwa 10% der untersuchten Personen aus diesen Ländern hatten Filovirus-spezifische Antikörper, was darauf hindeutet, dass Filovirusinfektionen ohne klinische Symptome auftreten und somit unbemerkt bleiben können (Slenczka et al., 1984; Hughes et al., 1986). Anhand von Untersuchungen zum EBOV-Ausbruch von 1996 in Gabun wurde gezeigt, dass Erkrankungen mit asymptomatischen Verläufen vorkommen (Baize et al., 1999; Leroy et al., 2000). In den USA, in Deutschland und auf den Philippinen konnten Antikörper bei Menschen nachgewiesen werden, die in keinem Zusammenhang mit filoviralen Infektionen standen. Entweder kursieren weltweit Filoviren geringer Pathogenität oder es handelt sich um serologische Kreuzreaktionen mit anderen Vertretern der Mononegavirales

---

(Becker et al., 1992).

#### **2.1.4. Klinik von MARV-Infektionen**

Das MARV ruft ein schweres hämorrhagisches Fieber hervor. Nach einer Inkubationszeit von 5 bis 9 Tagen beginnt die Erkrankung plötzlich mit hohem Fieber sowie Kopf- und Gliederschmerzen. Im weiteren Verlauf treten Übelkeit, Erbrechen, abdominale Schmerzen sowie nicht-blutige Durchfälle auf. Zum Teil kommt es zu neurologischen Begleitsymptomen, wie Verwirrheitszuständen und Bewusstseinsstörungen bis hin zur Bewusstlosigkeit. Am Ende der ersten Krankheitswoche entwickelt sich ein rubeoliformes, makulopapulöses Exanthem, welches im weiteren Krankheitsverlauf eine Hautschuppung zur Folge hat. Ferner werden Lymphknotenschwellungen und Konjunktividen beobachtet. Charakteristisch für diese Infektionskrankheit ist eine extreme Thrombozytopenie (Thrombozytenabfall), die symptomatisch mit hämorrhagischen Diathesen, Blutungen des Zahnfleisches, der Nase, des Gaumens und des Gastrointestinaltraktes einhergeht. Die Hämorrhagien beruhen vermutlich auf einer erhöhten Durchlässigkeit der Endothelien, die durch eine verstärkte Zytokinausschüttung infizierter Makrophagen hervorgerufen werden könnte. Es 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 tritt ein bis zwei Wochen nach Krankheitsbeginn ein und ist durch schwere Hämorrhagien, Verbrauchskoagulopathie, hypovolämischen Schock und Multiorganversagen gekennzeichnet. Die Letalität der Epidemie von 1967 betrug 25%. Die Dauer der Erkrankung liegt bei unkompliziertem Verlauf zwischen 12 und 22 Tagen (Martini et al., 1968; Stille and Böhme, 1971, Becker, 2000).

#### **2.1.5. Therapie und Prophylaxe**

Gegen MARV-Infektionen existiert weder ein Impfstoff noch eine spezifische Therapie. Die Behandlung erfolgt symptombezogen, wobei im Vordergrund eine intensivmedizinische Therapie des hämorrhagischen Schocks und der Verbrauchskoagulopathie steht. Die Gabe von Rekonvaleszentenblut oder -plasma hat möglicherweise eine positive therapeutische Wirkung auf den Krankheitsverlauf (Mupapa et al., 1999).

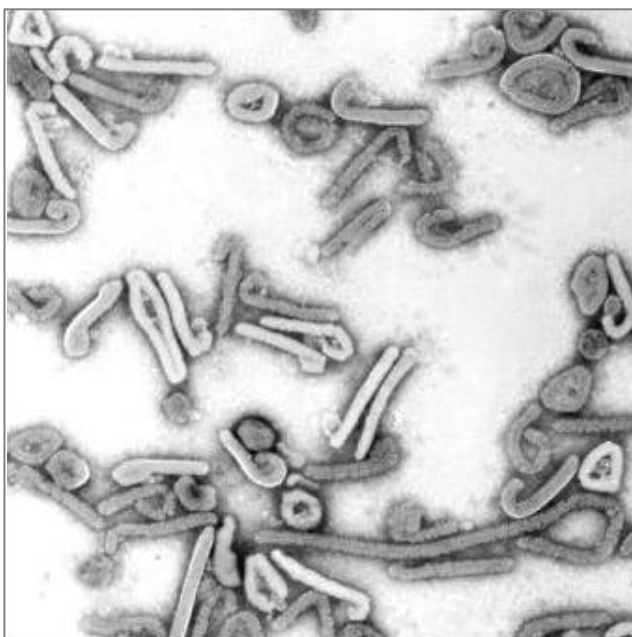
1998 gelang der Schutz von Primaten, als man Cynomolgus-Affen mit einem rekombinanten Alphavirusreplikon inokulierte, über das die MARV-Proteine GP und NP exprimiert wurden (Hevey et al., 1998). Für EBOV erzielte man mit den homologen Antigenen in Cynomolgus-Affen große Erfolge bei einer Kombination aus DNA-Immunisierung und Immunisierung mit einem rekombinanten Adenovirusvektor. Die

Impfung führte zu einer zellulär- und humoral-vermittelten Immunität (Sullivan et al., 2000).

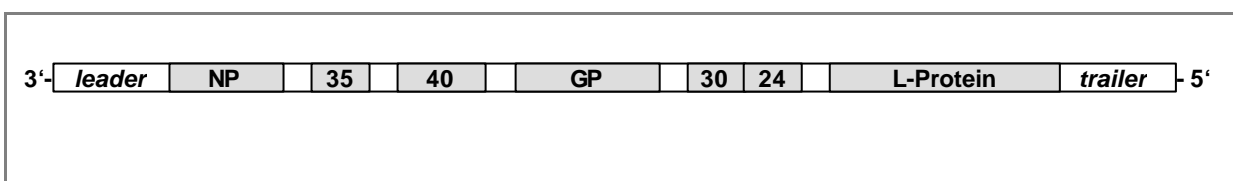
### 2.1.6. Morphologie des MARV

Die Virionen sind umhüllt und haben eine pleomorphe, meist filamentöse Gestalt mit einem Durchmesser von 80 nm. Ihre Länge ist variabel und beträgt durchschnittlich 665 nm (Feldmann et al., 1993). Wie in der elektronenmikroskopischen Aufnahme in Abb. 2 zu sehen ist, treten sowohl lang gestreckte und verzweigte als auch zirkuläre und gebogene Formen auf. Die Virionen bestehen aus einem helikalen Nukleokapsid von 50 nm Durchmesser, umgeben von einer Proteinmatrix und einer Membranhülle, die von der Wirtszelle stammt. Das in die Membran inserierte homotrimere Glykoprotein GP ragt etwa 7 nm aus der Virusoberfläche heraus (Feldmann et al., 1991; Sanchez et al., 1998).

Das Nukleokapsid besteht aus der viralen genomischen RNA und vier viralen Proteinen NP, VP35, VP30 und L (Becker et al., 1998). Es enthält in der Mitte einen elektronendichten Axialstab (Geisbert and Jahrling, 1995). Das Nukleokapsid ist über die viralen Matrixproteine VP24 und VP40 mit der Virushülle verbunden.



**Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von MARV-Partikeln.** Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure, 33.500fache Vergrößerung. Zur Verfügung gestellt von Dr. L. Kolesnikova.



**Abb. 3: Schematische Darstellung des MARV-Genoms.** Das Genom kodiert für sieben Strukturproteine in der Reihenfolge 3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5'. Am 3'- und 5'-Ende des Genoms befinden sich 3'-Leader und 5'-Trailer mit Signalen zur Initiation der Replikation und Enkapsidierung.

### 2.1.7. Genomaufbau

Das Genom besteht aus einem einzelsträngigen, nicht segmentierten RNA-Genom negativer Polarität. Bei einer Länge von 19,1 kb hat es ein Molekulargewicht von  $6,3 \times 10^6$  Da. Die genomische RNA ist nicht infektiös und kodiert für sieben Strukturproteine (Abb. 3.). Am 3'- und 5'-Ende des Genoms befinden sich der 3'-Leader und der 5'-Trailer. Es handelt sich dabei um nicht transkribierte Sequenzen, deren äußere Enden zueinander komplementär sind und die vermutlich stabile Sekundärstrukturen ausbilden können. Außerdem enthalten sie Signale zur Initiation der Replikation und Einkapsidierung durch das Nukleoprotein (NP) (Mühlberger et al., 1996 und 1998). Das Genom enthält sieben Gene, deren Genanordnung schematisch in Abb. 3 dargestellt ist. Die offenen Leserahmen (ORF, graue Balken) der linear angeordneten Gene sind von langen, nicht kodierenden, hochkonservierten Sequenzen flankiert (helle Balken), die nicht translatiert werden und Transkriptionsstart- und -stoppsignale enthalten (Mühlberger et al., 1996; 1998). Zwischen VP30 und VP24 überlappen die intergenischen Sequenzen (Feldmann et al., 1992).

### 2.1.8. Virusproteine

Das MARV setzt sich aus sieben Strukturproteinen zusammen: ein Oberflächenprotein GP, die Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und L sowie die Matrixproteine VP24 und VP40.

#### Glykoprotein GP

Das virale Glykoprotein **GP** (170 kDa) ist das einzige Oberflächenprotein. Es handelt sich um ein Homotrimer mit charakteristischen Merkmalen eines Typ I-Membranproteins (Feldmann et al., 1991; Will et al., 1993). Neben einer starken Glykosylierung wird es durch Acylierung und Phosphorylierung posttranslational modifiziert (Geyer 1992, Funke et al., 1995; Sängler, 2002). Mittels der zellulären Prohormonkonvertase Furin wird das GP in zwei über Disulfidbrücken miteinander verbundene Untereinheiten  $GP_1$  und  $GP_2$  gespalten, wobei das  $GP_2$  den Membrananker trägt (Volchkov et al., 2000).

#### Matrixproteine

Das Matrixprotein **VP40** (38 kDa) ist ein Membran-assoziiertes Protein und befindet sich im Virion zwischen dem Nukleokapsid und der Virushülle (Becker et al., 1998; Kolesnikova et al., 2002). Aufgrund der Genomlokalisierung, seiner hydrophoben Eigenschaften und seiner Funktion während der Ausschleusung von Viren aus der infizierten Zelle wird es als Analogon zu den M-Proteinen anderer nicht-segmentierter negativ-Strang-(NNS) RNA-Viren betrachtet. MARV-VP40 wird sehr schnell nach der

Synthese an zelluläre Membranen gebunden und akkumuliert in intrazellulären Membranclustern, den multivesikulären Körpern (MVB). Der Transport der VP40-reichen MVBs an die Plasmamembran erfolgt über den endosomalen Stoffwechselweg (Kolesnikova et al., 2004).

Das **VP24** (24 kDa) ist als weiteres Matrixprotein zwischen dem Nukleokapsid und der Virushülle lokalisiert (Elliott et al., 1985) und ist in der Lage, mit der zytoplasmatischen Domäne des GP zu interagieren (Sänger et al., 1998; Bamberg, 2000). Es handelt sich um ein partiell integrales Membranprotein (Bamberg, pers. Mitteilung) mit bislang ungeklärter Funktion. Bei EBOV ist es möglicherweise für die Bildung der Nukleokapside erforderlich (Han et al., 2003).

### **Nukleokapsid-assoziierte Proteine**

**L** (220 kDa) heißt der katalytische Teil der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Mühlberger et al., 1992 und 1998). Es hat ein Molekulargewicht von 220 kDa und ist mengenmäßig am wenigsten im Nukleokapsid vertreten.

**VP35** (32 kDa) bindet sowohl L als auch NP. Es wird durch das zweite Gen des MARV-Genoms kodiert und wirkt als Kofaktor der RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Somit spielt es eine wesentliche Rolle bei der Transkription und Replikation der viralen RNA. VP35 gilt als Äquivalent der P-Proteine der Rhabdo- und Paramyxoviridae, obwohl es im Gegensatz zu diesen nur sehr schwach phosphoryliert ist (Becker et al., 1998, Mühlberger et al., 1998; 1999).

EBOV-VP35 fungiert ferner als Typ I Interferon-Antagonist und schwächt so die unspezifischen zellulären Abwehrmechanismen gegen eine Virusinfektion (Basler, et al., 2000 und 2003).

**VP30** (33 kDa) bindet NP (Becker et al., 1998) und wird durch das sechste Gen des MARV-Genoms kodiert. Es ist stark phosphoryliert und fester Bestandteil des Nukleokapsids (Becker et al., 1998; Mühlberger et al., 1998; Modrof et al., 2001). Innerhalb der Ordnung der Mononegavirales besitzen nur noch die Pneumovirinae ein viertes Nukleokapsidprotein (Huang et al., 1985; Garcia et al., 1993). Allerdings wird dieses M2-Protein aufgrund einer anderen Position seines Gens im Genom nicht als Homolog zum VP30 betrachtet. Die Funktionen des MARV-VP30 sind noch nicht bekannt.

Untersuchungen mit einem reversen Genetiksystem zeigten im Falle des EBOV eine entscheidende Rolle des VP30 bei der viralen Transkription. Es steigert die Transkriptionseffizienz des ersten Gens (NP) um mehr als den Faktor 100 (Mühlberger et al., 1999). Vermutlich fungiert das VP30 als Transkriptionsinitiationsfaktor (Weik et al., 2002).

Das Nukleoprotein **NP** (94 kDa) ist das Produkt der ersten Gens des MARV-Genoms und mengenmäßig am stärksten im Virion vertreten. Es enkapsidiert die virale RNA und spielt eine zentrale Rolle bei Replikation und Transkription (Becker et al., 1998; Mühlberger et al., 1998; Kolesnikova et al., 2000, Mavrakis et al., 2003). Das NP ist ein 695 Aminosäuren (AS) großes Protein. Anhand von Hydrophobizitätsplots lässt sich NP in eine hydrophile Carboxy (C)-terminale und eine hydrophobe Amino (N)-terminale Domäne einteilen. Der N-Terminus zeigt Sequenzhomologie zu den Nukleoproteinen anderer nicht-segmentierter negativsträngiger RNA-Viren (Sanchez et al., 1992). Der sehr saure C-Terminus ist dagegen hochvariabel. Das NP ist stark phosphoryliert (Becker et al., 1994). Eine solche Modifizierung ist auch bei EBOV-NP (Elliot et al., 1985) und einigen Vertretern der Familien Paramyxoviridae und Rhabdoviridae zu finden (Hsu and Kingsbury, 1982; Sokol and Clark, 1973; Naruse et al., 1981; Robbins and Bussel, 1979; Tuffereau et al., 1985). In virusinfizierten Zellen kommt phosphoryliertes und nicht-phosphoryliertes NP vor. Diese beiden Formen unterscheiden sich im elektrophoretischen Laufverhalten: nichtphosphoryliertes NP hat eine molekulare Masse von 92 kDa, die phosphorylierte Form von 94 kDa. Es ist bekannt, dass NP nur in phosphorylierter Form in Virionen eingebaut wird (Becker et al., 1994). Dies führte zu der Vermutung, dass über die Phosphorylierung des NP entscheidende Prozesse im MARV-Vermehrungszyklus reguliert werden können. Die Phosphorylierung findet in der C-terminalen Domäne an Serin- und Threoninresten statt und umfasst sieben phosphorylierte Regionen (I-VII) (Lötfering et al., 1999). Wahrscheinlich sind an der Phosphorylierung mehrere Serin-/Threonin-Proteinkinasen verantwortlich beteiligt, so zum Beispiel prolin-abhängige Proteinkinasen oder die Proteinkinase CKII. Die phosphorylierte Region II liegt in einem auffälligen Bereich des Proteins. Ein Vergleich mit einigen Vertretern der Familien Paramyxoviridae und Rhabdoviridae zeigt eine Übereinstimmung in einer negativen Nettoladung dieses Bereichs. Eine Phosphorylierung dieser Region führt zur Verstärkung der negativen Ladung. Die Funktion der Phosphorylierung im Hinblick auf Replikation/ Transkription und Nukleokapsid-Morphogenese, ist bislang noch nicht geklärt.

### **2.1.9. Interaktion der MARV-Nukleokapsidproteine**

Die vier viralen Proteine NP, VP35, VP30 und L sind als strukturelle Komponenten am Aufbau des helikalen Nukleokapsids beteiligt. Ferner sind sie in verschiedene Proteinkomplexe involviert, über deren Funktionen bisher wenig bekannt ist. Mit Hilfe eines artifizialen Transkriptions- und Replikationssystems konnte gezeigt werden, dass die Nukleokapsidproteine NP, VP35 und L für die Transkription und Replikation

der viralen RNA des MARV notwendig und ausreichend sind (Mühlberger et al., 1998). Da die Nukleokapsidproteine somit strukturelle und funktionelle Aufgaben erfüllen, wird vermutet, dass die Ausbildung der unterschiedlichen Proteinkomplexe eine wichtige Rolle für die Regulation der Transkription und Replikation spielt. Die zentrale Komponente bei den Interaktionen der Nukleokapsidproteine ist das NP. Es ist in der Lage, mit sich selbst zu interagieren und Nukleokapsid-ähnliche helikale Strukturen auszubilden (Kolesnikova et al., 2000). Neben der Selbstaggregation erwies sich, dass das NP sowohl mit dem VP35 als auch mit dem VP30 interagiert. Weiterhin wurden trimere Komplexe aus NP, VP35 und L identifiziert, wobei das VP35 als Brücke zwischen dem NP und L agiert. Eine direkte Interaktion von NP und L wurde nicht nachgewiesen (Becker et al., 1998). In Anlehnung an die Rhabdo- und Paramyxoviridae handelt es sich bei dem Proteinkomplex aus VP35 und L um die aktive Polymerase des MARV (Banerjee and Barik, 1992; Horikami et al., 1992; Mühlberger et al., 1999). Die Bindungsdomäne des VP35 konnte auf die ersten 530 N-terminalen AS des L eingegrenzt werden (Becker et al., 1998). Da das VP35 als Homolog zu den P-Proteinen anderer Mononegavirales gilt, ist es vermutlich in der Lage, Multimere auszubilden (Curran et al., 1995a). Für das VP30 des EBOV existiert der Nachweis, dass es in Form von Homooligomeren den Transkriptionsprozess initiiert (Hartlieb et al., 2003).

#### **2.1.10. Transkription und Replikation**

Replikation und Transkription des MARV finden im Zytoplasma der Wirtszelle statt (Feldmann and Kiley, 1999). Im Gegensatz zu anderen Vertretern der Ordnung Mononegavirales enthalten MARV und EBOV vier Nukleokapsidproteine anstelle der sonst üblichen drei (Becker et al., 1998; Elliot et al., 1985). Diese vier Proteine komplexieren die genomische RNA und bilden so den Nukleokapsidkomplex, der als Matrice bei Transkription und Replikation dient. Wird der Nukleokapsidkomplex nach dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle im Zytoplasma freigesetzt, werden monocistronische, polyadenylierte, nicht-encapsidierte mRNAs der einzelnen Strukturproteine synthetisiert (Feldmann et al., 1992; Sanchez et al., 1993; Mühlberger et al., 1996 und 1998). Diese Transkripte enthalten lange, nicht-translatierte Bereiche, die eventuell regulatorische Funktion bei der Protein-Synthese ausüben (Mühlberger et al., 1996). Die mRNAs werden von der zellulären Translationsmaschinerie in Proteine übersetzt. Wie die Transkription, findet die Replikation nur an encapsidierter RNA statt. Während des Replikationsvorganges wird die genomische (-)-Strang RNA zunächst vollständig in antigenomische (+)-Strang RNA umgeschrieben und dient dann



als Matrize zur Synthese viraler Genome. Die genomische RNA wird ihrerseits von den Nukleokapsidproteinen enkapsidiert. Wie sich der Wechsel zwischen Transkription und Replikation vollzieht, ist bislang unklar. 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). Die neusynthetisierten Nukleokapside erscheinen zehn bis zwölf Stunden nach Infektion in typischen intrazytoplasmatischen Einschlusskörpern. Diese stellen vermutlich die Syntheseorte der Nukleokapside dar (Kolesnikova et al., 2000). Reife Nukleokapsidkomplexe wandern zur Zelloberfläche und nehmen über die Matrixproteine Kontakt zu den Ausschleusungspunkten an der Plasmamembran auf, in die auch das GP eingelagert ist. Die Freisetzung von MARV-Partikeln erfolgt etwa 22 Stunden nach Infektion.

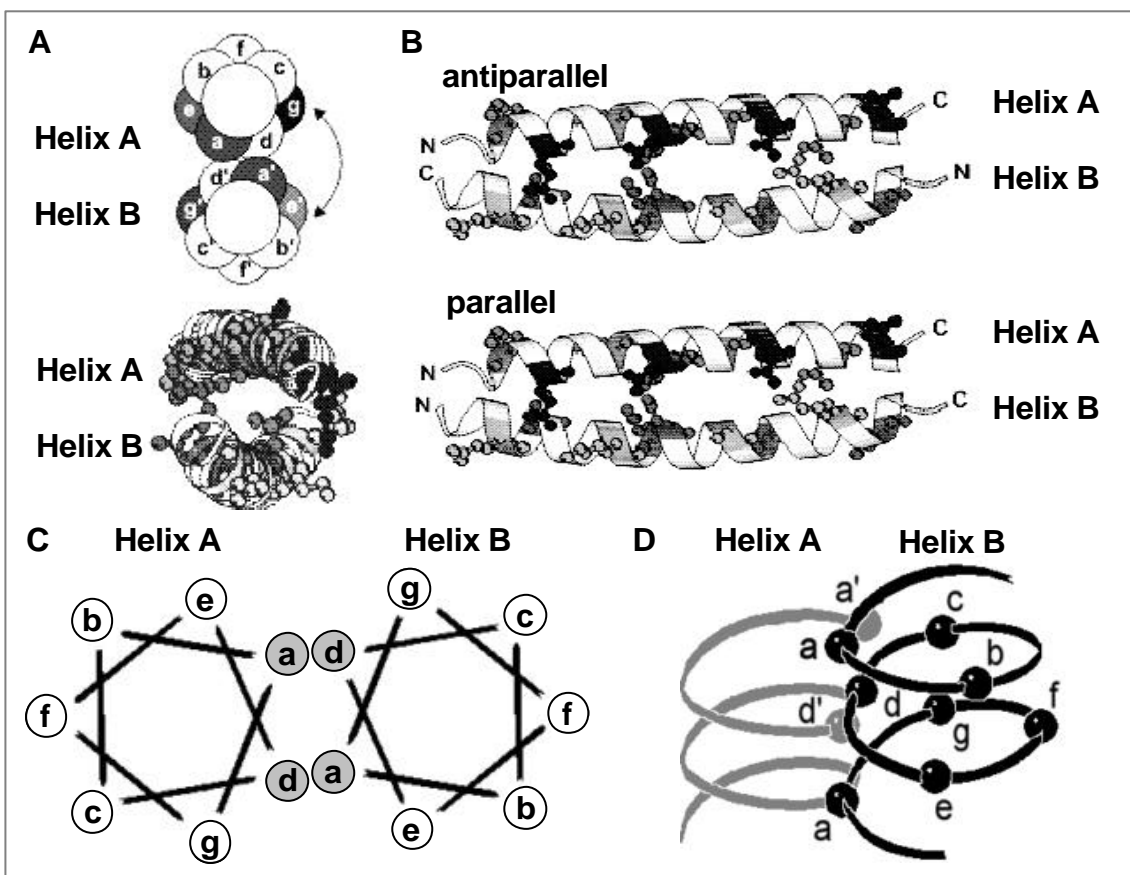
## **2.2. Reverse Genetik zur Untersuchung des Marburg-Virus**

Arbeiten mit infektiösen Filoviren sind auf Laboratorien beschränkt, die den höchsten Sicherheitsstandards (P4) genügen. Durch die Entwicklung eines reversen Genetiksystems für MARV und EBOV wurden die Voraussetzungen geschaffen, die Abläufe viraler Transkription und Replikation unter niedrigeren Sicherheitsanforderungen zu erforschen (Mühlberger et al., 1998; 1999). Das artifizielle MARV-spezifische Transkriptions- und Replikationssystem funktioniert wie folgt: BSR-T7/5- oder HUH-T7-Zellen, die stabil die Polymerase des Phagen T7 exprimieren, werden mit Expressionsplasmiden der drei MARV-Nukleokapsidproteine NP, VP35 und L transfiziert. Gleichzeitig wird ein Plasmid für ein MARV-spezifisches Minigenom (MG) transfiziert, welches von der T7-Polymerase in RNA überschrieben wird. Das Minigenom besteht aus einzelsträngiger RNA, deren Enden den nichttranskribierten Enden des MARV-Genoms entsprechen und alle cis-aktiven Signale für virale Replikation und Enkapsidierung enthalten. Zwischen diesen Funktionseinheiten liegt das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT). Wird das Minigenom transkribiert, entsteht die CAT mRNA, die dann von der Zelle translatiert wird. Über Bestimmung der CAT-Aktivität kann dann MARV-spezifische Transkription bestimmt werden. Von dem beschriebenen Minigenomssystem ausgehend, wurde für EBOV eine Methode entwickelt, um ausgehend von cDNA infektiöse Viren in Zellen herzustellen. Diese Technik ermöglicht eine gezielte genetische Manipulation des Virus, die zum besseren Verständnis der Pathogenitätsmechanismen führen soll (Volchkov et al., 2001). Für MARV laufen ähnliche Untersuchungen.

## 2.3. Proteinkomplexe

### 2.3.1. Coiled-Coil-Motive

Die  $\alpha$ -helikalen Coiled-Coils sind höchst vielfältige Protein-Faltungsdomänen und hauptsächliche Bestandteile von Oligomerisierungsmotiven. Die charakteristischste Eigenschaft von Coiled-Coil-Motiven ist die heptamere Abfolge von meist apolaren Aminosäureresten, die die Interaktionsfläche der Oligomere bildet (Abb. 4A, C). Diese typische Periodizität der Sequenz heißt *Heptaden-Repeat* und ist dadurch gekennzeichnet, dass polare Aminosäurereste bevorzugt an erster (a) und vierter (d) Position vorkommen (Abb. 4C). Viele Coiled-Coil-Proteine werden nur anhand des Vorhandenseins dieses *Repeats* klassifiziert. Der Zustand der Coiled-Coil-Domäne bestimmt den Oligomerisierungsstatus, die Beweglichkeit oder die Funktion innerhalb des molekularen Erkennungssystems (Burkhard et al., 2001). Coiled-Coils bestehen aus zwei bis fünf amphipatischen  $\alpha$ -Helices, die miteinander verdrillt sind und die sogenannte Superhelix (supercoil) bilden (Abb. 4A, B, D).



**Abb. 4 Schematische Darstellung von Coiled-Coils.** A. Aufsicht auf 2 Helices mit *Heptaden-Repeat* in der oberen Skizze. B. Verdrillung zweier Helices zur Supercoil in Seitensicht. C. Schematische Darstellung des *Heptaden-Repeat*. D. Räumliches Modell eines Coiled-Coil aus zwei Helices. Abb. A und B: In Anlehnung an: [http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio3/arndt/de/KA\\_coiled\\_coils\\_D.html](http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio3/arndt/de/KA_coiled_coils_D.html)

### 2.3.2. Coiled-Coil Computer-Analyseprogramme

COILS ist ein Computerprogramm, das Sequenzen mit einer Datenbank bekannter paralleler doppelsträngiger Coiled-Coils vergleicht und Ähnlichkeiten ableitet. Durch den Vergleich mit Werten in globulären und Coiled-Coil-Proteinen kalkuliert das Programm die Wahrscheinlichkeit, dass die untersuchte Sequenz eine Coiled-Coil-Konformation einnehmen wird. Um möglichst wenig Falschaussagen zu geben, wurden nur Wahrscheinlichkeiten ab 0,5 für positiv bewertet (Lupas, A., et al., 1991; Lupas, A. 1996).

### 2.4. Protein-Phosphorylierung

Die Phosphorylierung an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten ist eine der häufigsten Formen posttranslationaler Modifikation von Proteinen in eukaryotischen Zellen. Über sie kann sowohl die Struktur des modifizierten Proteins reguliert werden als auch Wechselwirkungen, die das Protein eingeht. So ist die Proteinphosphorylierung mit der Kontrolle und Steuerung 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

Proteinkinasen besitzen eine regulatorische und eine hochkonservierte katalytische Domäne (Marks, 1996). In der katalytischen Domäne werden Hydroxyaminosäuren der Proteinsubstrate mit  $\gamma$ -Phosphaten, die von Nukleotiden geliefert werden, verestert. Durch die wenig konservierte regulatorische Domäne kann intrazelluläre Lokalisation, Wechselwirkung mit akzessorischen Proteinen und Unterstützung der Katalyse vermittelt werden (Marks, 1996; Hunter, 1991).

Da die meisten Proteinkinasen über eine Vielzahl von Substraten verfügen, werden sie anhand ihrer Aminosäure- nicht ihrer Proteinspezifität klassifiziert. Allerdings existieren Kinasen mit dualer Spezifität, so dass diese Zuordnung nicht konsequent aufrechterhalten werden kann (Wang et al., 1994). Für eukaryotische Systeme wird unterschieden zwischen drei Familien: Serin/Threonin-Kinasen, Tyrosin-Kinasen und Histidin/Arginin/Lysin-Kinasen. Die am häufigsten beschriebenen Proteinkinasen gehören der Kategorie Serin/Threonin-Kinase an, gefolgt von Tyrosin-Kinasen. Histidin/

Arginin/Lysin-Kinasen kommen dagegen selten vor (Hunter, 1991, 2000).

Anhand struktureller und funktioneller Parameter können die Proteinkinasen in Untergruppen unterteilt werden (Hunter, 1991). Für einige gut untersuchte Serin/Threonin-Kinasen konnte gezeigt werden, dass die phosphorylierbaren Aminosäurereste in einem bestimmten Kontext stehen müssen. Anhand dieser Konsensus-Erkennungssequenzen lassen sich die Proteinkinasen in Prolin-abhängige (sie erkennen die Serine/Threonine ausschließlich in Nachbarschaft von Prolinen), basotrope (sie benötigen basische Aminosäurereste in der Umgebung), acidotrope (sie bevorzugen saure oder phosphorylierte Aminosäurereste) und Proteinkinasen, die Phosphoaminosäuren benötigen (z.B. CKI und GSK3), unterscheiden (Tab. 2).

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

**Tab. 2 Häufig phosphorylierte Erkennungsstellen von Proteinkinasen.** Innerhalb der Motive sind Phosphatakzeptorstellen fett gedruckt. Die Aminosäuren werden durch den Einbuchstabencode beschrieben. X steht dabei für jegliche Art von Aminosäuren. PS und PT stehen für Phosphoserin und Phosphothreonin. (In Anlehnung an Pearson and Kemp, 1991; Davis, 1993; Pyerin et al., 1996).

Viele Proteinkinasen werden durch reversible Phosphorylierung reguliert. So ist die Phosphorylierung des Threonin 197 entscheidend 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).

#### 2.4.2. Phosphorylierung viraler Proteine

Über die Phosphorylierung viraler Genprodukte wurde bereits für eine Vielzahl von Viren berichtet. Virale Proteine können konstitutiv, hierarchisch oder reguliert phosphoryliert werden (Beckes and Perrault, 1992; Jackson et al., 1995; Gombart et

al., 1995; De et al., 1997). Virale Proteinkinasen konnten bislang nur bei einigen DNA- und Retroviren nachgewiesen werden. Bei nichtsegmentierten negativorientierten Einzelstrang (NNS)-Viren konnte eine solche Aktivität nicht eindeutig identifiziert werden. Wahrscheinlich sind bei diesen Viren zelluläre Proteinkinasen für die Phosphorylierung viraler Proteine verantwortlich (Leader and Katan, 1988). Bei einigen Viren katalysiert die zelluläre Proteinkinase CKII die Phosphorylierung (Wu et al., 2003; Kaushik and Shaila, 2004).

Funktionelle Aspekte der Phosphorylierung konnten in vielen Fällen bestimmt werden. Meist wird die Interaktion zu anderen Komponenten wie DNA, RNA oder Proteinen moduliert. Beispielsweise steuert das Rex-Protein des humanen T-Zell-Leukämie-Virus die Expression viraler Gene durch die phosphorylierungsabhängige Bindung an Virus-spezifische RNA (Green et al., 1992; Narayan et al., 2001). Das T-Antigen der Polyomaviren und SV40 steuert die virale DNA-Synthese durch die phosphorylierungsabhängige Bindung an den Replikationsursprung der viralen DNA (Leader and Katan, 1988; Chatterjee et al., 1997). Außerdem kann über phosphorylierungsabhängige Protein-Protein-Wechselwirkungen die virale Nukleinsäuresynthese reguliert werden. Beispielsweise ist eine CKII-vermittelte Phosphorylierung des VP16 des Herpes simplex Virus (HSV) für die Transaktivierung und Komplexbildung mit zwei zellulären Transkriptionsfaktoren wichtig (O'Reilly et al., 1997).

Das M2-1 Protein des Respiratorischen-Syncytial-Virus (RSV) benötigt Phosphorylierung zur Interaktion mit der viralen RNA und Beeinflussung der Transkription (Cartee and Wertz, 2001). Das EBOV-VP30 interagiert phosphorylierungsabhängig mit den NP-induzierten Nukleokapsiden. Ebenso agiert es phosphorylierungsabhängig als Aktivator der viralen Transkription (Modrof et al., 2002 und 2003). Vor allem wurde bei NNS-RNA-Viren die Funktion der Phosphorylierung der P-Proteine, die Kofaktoren der RNA-abhängigen RNA-Polymerase darstellen, untersucht (De et al., 1997; Liu et al., 1997). Das P-Protein des Vesiculo-Stomatitis-Virus (VSV) wird sowohl im C-Terminus als auch im N-Terminus phosphoryliert. Die Nterminale 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 and Lenard, 1995; 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 RSV kann durch die Caseinkinase I an Serin 215 und durch CKII an Serin 232 phosphoryliert werden. Für die Elongation der

viralen Transkripte in vitro ist die Phosphorylierung des Serinrestes 232 entscheidend (Dupuy et al., 1999).

Eine Funktion der Phosphorylierung der Nukleoproteine konnte bei NNS-RNA-Viren vor allem für das Rabies-Virus (RABV)-N gezeigt werden. RABV-N bindet in dephosphoryliertem Zustand stärker an die Leader-RNA (Yang et al., 1999). Außerdem ist bei dephosphoryliertem RABV-N die virale Replikation und Transkription reduziert (Wu et al., 2002).

## 2.5. Problemstellung

Das NP enkapsidiert das virale Genom und ist eine entscheidende Komponente der viralen Transkription/ Replikation. NP bildet bei Einzelexpression hochgeordnete Nukleokapsid-ähnliche Strukturen, die aus mehreren hundert NP-Molekülen bestehen. Wahrscheinlich ist mehr als eine Homooligomerisierungsdomäne nötig, solche komplexe Strukturen zu formen.

Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, wo Homooligomerisierungsdomänen auf dem NP liegen und ob diese für die Funktion des NP während der viralen Transkription erforderlich sind.

Das NP interagiert auch mit dem Polymerasekofaktor VP35 und rekrutiert diesen zu dem Nukleokapsid. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, wo die VP35-Bindungsstellen auf dem NP liegen.

NP ist das am stärksten phosphorylierte Protein im Virion. 85% der Phosphorylierung findet in einem Serincluster (S450-5) statt (Di Carlo, 2000). Die Funktion der Phosphorylierung für Homo- und Heterooligomerisierung des NP sollte untersucht werden. Ferner sollte die Abhängigkeit der viralen Transkription von der Phosphorylierung des Serinclusters analysiert werden.

### 3. Material

#### 3.1. Chemikalien

6-Amino-n-Caprinsäure	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Lösung (29:1)	Biorad, Richmond (USA)
Agarose, NA	Amersham, Freiburg
Agarose, ultrarein	Gibco BRL, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydrogenkarbonat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Richmond (USA)
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit (USA)
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie®-Brilliant-Blue R250	Serva, Heidelberg
Dekonex	Bohrer Chemie, Zuchwil (Schweiz)
Desoxycholinsäure, Natriumsalz (DOC)	Sigma, Deisenhofen
Dextranblau	Amersham, Freiburg
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Dinatriummethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Biorad, Richmond (USA)
Essigsäure (HAc) (98%)	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethanol (EtOH)	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethidiumbromid (EtBr)	Roche, Zürich (Schweiz)
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
FuGene®-Transfektionsreagenz	Roche, Zürich (Schweiz)
Glycerin	Gibco BRL, Karlsruhe
Glycin	Riedel-de-Haën, Seelze
Harnstoff	Gibco BRL, Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Isopropanol (Isoprop)	Merck, Darmstadt
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche, Zürich (Schweiz)
Jodacetamid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KHPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Lipofektin <sup>R</sup> -Transfektionsreagenz	Life Technologies, Karlsruhe
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
Methanol (MetOH)	Riedel-de-Haën, Seelze
N(onidet)P40	Amersham, Freiburg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Biorad, Richmond (USA)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid (Na-Azid)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Orthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma, Deisenhofen
Ninhydrin	Merck, Darmstadt
Pepton	Roche, Zürich (Schweiz)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Zürich (Schweiz)
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma, Deisenhofen



Pyridin  
 Rinderserumalbumin (BSA)  
 Salzsäure (HCl)  
 $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -Mercapto-EtOH)  
 Tetracyclin  
 Trishydroxymethylaminomethan (Tris)  
 Tween 20

Merck, Darmstadt  
 Serva, Heidelberg  
 Merck, Darmstadt  
 Serva, Heidelberg  
 Roche, Zürich (Schweiz)  
 Merck, Darmstadt  
 Serva, Heidelberg

### 3.2. Geräte und Materialien

ABI PRISM™377 DNA Sequenzer  
 Biofuge 13  
 Biofuge A  
 Biome Image Analyzer BAS-1000  
 Biomax-Röntgenfilm  
 Branson Sonifier 450  
 Digitale Kameraausrüstung Spot Kamera, Version 3.1.2  
 DNA Thermal Cycler Primus  
 DNA Thermal Cycler TC1  
 Dünnschichtchromatographie (DC)-Platte  
 Eppendorf-Kühlzentrifuge 5417 R  
 Eppendorf-*research* Pipetten  
 Eppendorf-Tischzentrifuge 5415C  
 Fluoprep

Perkin-Elmer Cetus, Norwalk (USA)  
 Heraeus Sepatech GmbH, Hanau  
 Heraeus Sepatech GmbH, Hanau  
 Fuji, Kanagawa (Japan)  
 Kodak, Rochester (USA)  
 Heinemann, Schwäbisch Gmünd  
 Diagnostic Instruments, Michigan (USA)  
 MWG Biotech, Ebersberg  
 Perkin-Elmer Cetus, Norwalk (USA)  
 Merck, Darmstadt  
 Eppendorf, Hamburg  
 Eppendorf, Hamburg  
 Eppendorf, Hamburg  
 BioMerieux, Marcy l'Etoile (Frankreich)

Fluoreszenz-Mikroskop  
 Geiger-Müller-Zähler  
 Horizontalschüttler  
 J2 21 Zentrifuge  
 J25,5 Zentrifuge  
 Keutz®-Elektroblotkammer mit Graphitelektrode  
 Keutz®-Gel-Trocken-Rahmen  
 Keutz®-Minigelkammer  
 Kippschüttler  
 Metallblockthermostat TCS  
 Mikrowellengerät  
 Minifuge RF  
 pH-Meter CG 832 (Schott-Gerät)  
 Polypropylen-Reaktionsgefäße (1,5 ml & 2 ml)  
 Polypropylen-Reaktionsgefäße (15 ml & 50 ml)  
 Polypropylen-Reaktionsgefäße (15 ml & 50 ml)  
 Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran  
 Protean II Gelkammer  
 QIAvac Manifold 6S  
 Polaroid MP4 Land Camera-Kamera  
 Stromquellen  
 Super Signal Ultra™ Reagenz  
 Überkopffrotierer  
 UV-Durchflußphotometer Uvicord® SII  
 UV-Schirm 302 nm  
 Vakuum-Geltrockner  
 Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac)  
 Gel-Blot-Papier

Axioplan, Zeiss, Oberkochen  
 Berthold, Wildbad  
 IKA-Labortechnik, Stauffen  
 Beckmann, Palo Alto (USA)  
 Beckmann, Palo Alto (USA)  
 von Keutz, Reiskirchen  
 von Keutz, Reiskirchen  
 von Keutz, Reiskirchen  
 von Keutz, Reiskirchen  
 Lab Tech Barkey, Bielefeld  
 Bosch, Stuttgart  
 Heraeus Sepatech GmbH, Hanau  
 MAGV GmbH, Rabenau  
 Eppendorf, Hamburg  
 Greiner, Solingen  
 Sarstedt, Nümbrecht  
 Millipore, Bedford (USA)  
 Biorad, Richmond (USA)  
 Qiagen, Hilden  
 Polaroid, Cambridge (USA)  
 Consort, Turnhout (Belgien)  
 Pierce, Rockford (USA)  
 Heidolph, Schwabach  
 Amersham, Freiburg im Breisgau  
 Bachofer, Reutlingen  
 von Keutz, Reiskirchen  
 von Keutz, Reiskirchen  
 Schleicher & Schuell, Dassel

### 3.3. Kits

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle

Perkin-Elmer Cetus, Norwalk (USA)

Coomassie® Plus Protein Assay Reagent	Pierce, St. Augustin
E.coli Z competent Kit	Zymo Research, Orange (USA)
GeneAmp® PCR-Reagent Kit	Perkin-Elmer Cetus, Norwalk (USA)
Peq Lab Miniprep Kit I	PeqLab, Erlangen
Qiagen Plasmid MAXI Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep 8 Plasmid Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Sequencing Ready Reaction Kit	Amersham, Freiburg im Breisgau
T7/5-Transcription System	Promega, Heidelberg
T7-Sequencing™ Kit	Amersham, Freiburg im Breisgau
TNT® Quick Coupled Transcription/ Translation Systems	Promega, Heidelberg

### 3.4. Nukleinsäuren und Nukleotide

#### 3.4.1. DNA-Oligonukleotide (Primer)

##### MARV-Spezifische Vorwärtsprimer

Nr.	Bezeichnung und Sequenz
132	NPv 98-Eco RI, cag gaa ttc GAA GAt ATG GAT TTA CAC AGT TTG TTG GA
553	NPmut1_349/F, GAA TCT ACA GAA GAT gcC gCT gCT gCA gcT gcC TTT G
659	NP-916_Stop/F: CCT CAG CTT TCA GCA taa GCG CTG GGT GTG GC
661	NP-826_Stop/F: GTT GAG CAA CCT AGC CtG AgA TGG GGA ATA CGC AC
663	NP-1005_Stop/F: CGA GAG GCG GCA CAT tAa GaG GAA GTA AAA CTA C
734	NP1358_S453-5D: GAA GAT AGC TCT TCT gac gaT gaC TTT GTT GAC TTGAATG
800	NP(1382)/F: TTT GTT GAC TTG AAT GAT CCA TTT GCA
881	NP(pT)2461: A CAT CAG GAA ATT
883	NP(pT)2491: T GAC GAG GAA AGG
885	NP(pT)2521: TTC CAC CTT CAG AAA
941	NP2251/F: AGT CAG ACA CTA GCC GTC CT
943	NP2581/F: CGA GAA AAA TTA GCT CGT CT
945	NP2611/F: ATT GAA AAC AAT ATT GTG GA
947	NP2641/F: TTT AAG CAA TCA CAG AAT CG
949	NP2671/F: TCG TTT TTG AAT GAC CCT AC
951	NP2701/F: GTA ACG GTT CAA GCC AGG CC
965	NP2731/F: CCt ACT GCT CTG CCT CCC CC
967	NP2761/F: AAG ATT GAG CAT GAA TCT AC
969	NP2781/F: TCT TCT TCA AGT AGC TTT GT
971	NP2821/F: T CCA TTT GCA CTG CTG AA
973	NP2851/F: GAT ACT CTT GAT GAC AGT GT
975	NP2881/F: C ACA ACA TCG AGA GAA TT
1008	NP2485/F: GCC GAG GAT GAC GAG GAA AG
1237	NP2368EcoRI, GGA ATT CAG CAT GGG CAG TAC ATT GGC TGG
1238	NP2521EcoRI, GGA ATT CAG CAT GTT CCA CCT TCA GAA AAC
1252	NP2782AD: gAA GaT gcT GCC Gca GAT GAC Gat
1254	NP2773DA: GAA gCT ACA GAA GAT gat gac gat
1259	MNPCtermNmyc: ggg aat cca tgg aac aaa aac tca tct cag aag agg atc tgA AGA TTG AGC ATG AAT CTA CAG

##### MARV-Spezifische Rückwärtsprimer

Nr.	Bezeichnung und Sequenz
131	NPm 2375 Eco RI: cag gaa ttc GAC CAC CAT AGT ATG CCC AGT CCT TGC CCG
554	NPmut1_385/R, CTT AGA TGT CTT CTA CGG CGA CGA CGT CGA CGG AAA C
660	NP-916_Stop/R: GCC ACA CCC AGC GcT taT GCT GAA AGC TGA GG
662	NP-826_Stop/R: GTG CGT ATT CCC CAT cTC aGG CTA GGT TGC TCA AC

664	NP-1005_Stop/R: A GTT TTA CTT CCt CtT aAT GTG CCG CCT CTC G
735	NP1397_S453-5D: CAT TCA AGT CAA CAA AGt cAt cgt cAG AAG AGC TAT CcT C
765	Mut30 (XmaI)/R, CCC CCC GGG TCA AGC TTC GAG AAC TG
799	NP(1636)/R: ATC TTC TGT AGc TTC ATG CTC AAT CTT
880	NP(pT)2430: ATG TGC CGC CTC TCG
882	NP(pT)2460: ATG TCG CCT TTG TAG
884	NP(pT)2490: CTC GGC AAT AGC TTG
940	NP2520/R: G TTC TAA TAT CTT CCT TT
942	NP2550/R: GTG TGT GAT TTC AGT TTT CT
944	NP2580/R: TTT CTG GCT GAG GAC GGC TA
946	NP2610/R: TTC TGC AGC GAG ACG AGC TA
948	NP2640/R: TCC CTG ATC TTC CAC AAT AT
950	NP2670/R: CTG TGA CAC CCG ATT CTG TG
964	NP2700/R: TTC CAC AGG TGT AGG GTC AT
966	NP2730/R: cCt ATT CAT GGG CCT GGC TT
968	NP2760/R: GTC GTC AAC TGG GGG AGG CA
970	NP2790/R: GCT ATC TTC TGT AGA TTC AT
972	NP2820/R: ATT CAA GTC AAC AAA GCT AC
974	NP2850/R: CTC GTC CTC ATT CAG CAG TG
1007	NP2397/R: GCC AAC ATT GAC ACC AGC CA
1253	NP2821AD: CAT TCA AGT CAA CAA Aat cgt cat c
1255	NP2812DA: CAA CAA ATG CGG CAG CAT CGT CAT C

### Vektorspezifische Primer

Nr.	Bezeichnung und Sequenz
#125	pTM1-F: ATT GTA TGG GAT CTG ATC TGG
#174	pTM1-R: GCC AAC TCA GCT TCC TTT CGG
#600	pGEX-F: GCA GGG CTG GAC AGC CAC GTT TGG TGG TGG CG
#601	pGEX-R: CCG TCT CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG
#F	Universal-Vorwärtsprimer: Promega, Heidelberg
#R	Universal-Rückwärtsprimer: Promega, Heidelberg

### 3.4.2. Nukleinsäuren als Größenmarker

DNA-Marker III, $\gamma$ -DNA EcoRI/HindIII	Roche, Zürich (Schweiz)
DNA-Marker IX, X174 DNA HaeIII	Roche, Zürich (Schweiz)

### 3.4.3. Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide

dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Trisphosphat	10 mM	Eurogentech, Heidelberg
dCTP	2'-Desoxycytidin 5'-Trisphosphat	10 mM	Eurogentech, Heidelberg
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Trisphosphat	10 mM	Eurogentech, Heidelberg
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Trisphosphat	10 mM	Eurogentech, Heidelberg
rATP	Adenosin 5'-Trisphosphat	10 mM	Roche, Zürich (Schweiz)

## 3.5. Proteine

### 3.5.1. Proteine, Peptide, Aminosäuren

Biotin NHS	Pierce, St. Augustin
Glutathion, gebunden an Sepharose CL-4B	Sigma, Deisenhofen
ProteinA, gebunden an Sepharose CL-4B	Sigma, Deisenhofen
Rainbow™ Markerproteine 14,3 – 220 kDa	Amersham, Freiburg im Breisgau
L-Methionin	Merck, Darmstadt
L-Cystein	Merck, Darmstadt

### 3.5.2. Enzyme

Acetyl-Coenzym A	Roche, Zürich (Schweiz)
Alkalische Phosphatase (CIP) (1 unit bzw. 4 unit/ $\mu$ l)	Roche, Zürich (Schweiz)

Aprotinin (Trasylo <sup>TM</sup> )	Roche, Zürich (Schweiz)
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment (2 unit/ µl)	Roche, Zürich (Schweiz)
Leupeptin	Serva, Heidelberg
Pepstatin A	Serva, Heidelberg
Pfu-Turbo <sup>TM</sup> DNA-Polymerase (2,5 unit/ µl)	Roche, Zürich (Schweiz)
Protease-Inhibitor-Cocktail complete	Roche, Zürich (Schweiz)
Pwo DNA-Polymerase (1 unit/ µl)	New England Biolabs, Schwalbach
Pwo DNA-Polymerase (5 unit/ µl)	Roche, Zürich (Schweiz)
Restriktionsendonukleasen: Soweit nicht anders vermerkt wurden sie von Boehringer (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen	
RNase A	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase (4 unit/ µl)	Stratagene, Heidelberg
Trypsin-Inhibitor aus der Sojabohne	Roche, Zürich (Schweiz)

### 3.5.3. Antikörper

Anti-Ebo30-Antiserum vom Meerschweinchen	Institut für Virologie, Marburg
Anti-Flag-Antikörper M2 aus der Maus	Sigma, Deisenhofen
Anti-Flag-Antiserum aus dem Kaninchen	Sigma, Deisenhofen
Anti-Kaninchen-Ig-FITC-Konjugat vom Schaf	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-Ig-HRP-Konjugat vom Esel	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-Ig-HRP-Konjugat vom Schwein	DAKO, Hamburg
Anti-Kaninchen-Ig-Rhodamin-Konjugat vom Schaf	Dianova, Hamburg
Anti-MARV-NC-Antiserum vom Kaninchen	Institut für Virologie, Marburg
Anti-Maus-Ig-FITC-Konjugat vom Schaf	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-Ig-HRP-Konjugat vom Esel	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-Ig-HRP-Konjugat vom Kaninchen	DAKO, Hamburg
Anti-Maus-Ig-Rhodamin-Konjugat vom Schaf	Dianova, Hamburg
Anti-NP-Antikörper 2B10 von der Maus	Institut für Virologie, Marburg
Anti-VP35/2-Antiserum vom Meerschweinchen	Institut für Virologie, Marburg

### 3.6. Puffer und Lösungen

Acetyl-Coenzym A-Stammlösung	Aliquotiert in 70 mg/ ml in 250 mM Tris-HCl (pH 7,5)
CIP-Puffer (10x)	50 mM Tris-HCl, 100 nM EDTA, pH 8,5
CKII-Puffer (10x)	20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,5
ColP-Puffer (∅ BSA) (nach Parks et al., 1994)	20 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% (w/v) NP40, 0,4% (w/v) DOC
ColP-Puffer (∅ BSA) mit Phosphatase- & Protease-Inhibitoren	ColP-Puffer (s. o.) mit: 1. 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 100 µM Na-Orthovanadat und 100 ng/ µl RNase A 2. 1:25 Protease-Inhibitor-Cocktail, 2 µg/ ml Pepstatin, 50 mM NaF, 100 µM Na-Orthovanadat und 100 ng/ µl RNase A
Coomassie-Blau-Lösung	0,1% Coomassie-Brilliant-Blue R250, 10% HAC, 40% vergälltes EtOH
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 40% (w/v) Saccharose, 10% (w/v) Glycerin
Dünnschichtchromatographie(DC)-Laufpuffer	95% Dichlormethan, 5% Methanol
EDTA-Stammlösung, pH 8,8 (0,5 M)	186,1 g EDTA x 2 H <sub>2</sub> O in dH <sub>2</sub> O; mit NaOH einstellen auf pH 8,0
Gel-Fixierlösung	10% Essigsäure (HAc), 30% vergällter EtOH in H <sub>2</sub> O
Glycin-Lösung (100 mM)	100 mM Glycin in PBS
GST-Bindungspuffer 1	0,5% NP40, 50 mM HEPES, 10% Glycerol, 200

	mM NaCl, 0,1% BSA
GST-Bindungspuffer 2	0,5% NP40, 50 mM HEPES, 10% Glycerol, 500 mM NaCl
HEPES-Stammlösung (1 M)	238,3 g HEPES, ad 1 Liter dH <sub>2</sub> O
Immunfluoreszenz-Blockierungspuffer	5% Glycerol, 2% BSA, 0,2% Tween20 und 0,05% Na-Azid in PBS
IPTG-Stammlösung (100 mM)	1,41 g Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid ad 50 ml dH <sub>2</sub> O, steril filtriert (0,2 μm)
Klenow-Puffer (10x)	0,4 M Kaliumacetat (pH 7,5), 66 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM β-Mercapto-EtOH (Roche, Zürich, Schweiz)
Mungobohnen-Nukleasepuffer (10x)	50 mM NaAc, 30 mM NaCl, 1 mM ZnSO <sub>4</sub> , pH 5,0; Roche, Zürich (Schweiz)
Natriumacetat (NaAc), 3 M, pH 5,7	123 g NaAc (CH <sub>3</sub> COONa) ad 500 ml dH <sub>2</sub> O. Mit Essigsäure auf pH 5,7 einstellen
Natrium-Orthovanadat- Stammlösung, pH 10 (100 mM)	368 mg Natrium-Orthovanadat, ad 20 ml dH <sub>2</sub> O, bei -20°C lagern
PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7,5	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,13 g CaCl <sub>2</sub> , ad 1 Liter dH <sub>2</sub> O Sambrook et al., 1989; S B12
PBS def(icient), pH 7,5	Wie PBS, jedoch ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>
PMSF-Stammlösung (100 mM)	360 mg PMSF, ad 21 ml Isopropanol, bei -20°C lagern
DNA-Probenpuffer, 6x	0,25% Bromphenolblau, 40% Saccharose, 10% Glycerin
Probenpuffer für Sequenzgele (4x)	500 μl deionisiertes Formamid, 100 μl 25 mM EDTA, pH 8,0, mit 50 mg/ ml Dextranblau
Proteingel-Laufpuffer (10x)	10 g SDS, 30 g Tris-Base, 250 g Glycin, ad 1 Liter dH <sub>2</sub> O
Proteingel-Probenpuffer (2x)	10 ml Glycin, 5 ml β-Mercaptoethanol, 15 ml 20% SDS, 12,5 ml 0,5 M Tris-Base, 1,25 ml gesättigte Bromphenolblau-Lösung in dH <sub>2</sub> O, ad 50 ml dH <sub>2</sub> O
Proteingel-Probenpuffer (4x)	10 ml Glycin, 5 ml β-Mercaptoethanol, 15 ml 40% SDS, 12,5 ml 3 M Tris-Base, 1,25 ml gesättigte Bromphenolblau-Lösung in dH <sub>2</sub> O, ad 50 ml dH <sub>2</sub> O (Sambrook et al., 1989; S. B25)
Pwo-Reaktionspuffer, 10x	Roche, Zürich (Schweiz)
Sammelgel für Proteingele: 4%	2,2 ml dH <sub>2</sub> O, 0,67 ml 30% Acrylamid Mix, 1,0 ml 0,5 M Tris, pH 6,8, 40 μl 10% SDS, 50 μl 10% APS, 5 μl TEMED
Reporter-Lysis-Puffer	Promega, Madison (USA)
SDS-Stammlösung (20%)	Sambrook et al., 1989; S. B13
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 1 mM β-Mercapto-EtOH
TAE (Tris-Acetat/ EDTA-Elektrophorese-puffer)-Stammlösung, pH 8,0 (50x)	242 g Tris-Base, 57,1 g Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, ad 1 Liter dH <sub>2</sub> O (Sambrook et al., 1989; S. B23)
TBE (Tris-Borat/ EDTA-Elektrophorese-puffer)-Stammlösung, pH 8,0 (10x)	108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, ad 1 Liter dH <sub>2</sub> O (Sambrook et al., 1989; S. B23)
Trenngel für Proteingele: 10% (12%)	2,0 (1,6) ml dH <sub>2</sub> O, 1,7 (2,0) ml 30% Polyacrylamid-Mix, 1,3 ml 1,5 M Tris, pH 8,8, 50 μl 10% SDS, 50 μl 10% APS, 5 μl TEMED (Sambrook et al., 1989, S.18.52)
Tris-HCl-Stammlösung, pH 6,8/ pH 7,5 (1 M)	Sambrook et al., 1989; S. B1, B13 - B14

Western-Immuno-Blot		
Anodenpuffer 1	36,34 g Tris-Base, 200 ml EtOH, ad 1 Liter dH <sub>2</sub> O	
Anodenpuffer 2	5,25 g 6-Amino-N-Caprone Säure, 3,03 g Tris-Base, 200 ml EtOH, ad 1 Liter dH <sub>2</sub> O	
Kathodenpuffer	3,04 g Tris-Base, 200 ml EtOH, ad 1 Liter dH <sub>2</sub> O	
WB-Antikörper-Inkubationslösung: 1% Milchpulver/ 0,1% Tween	1% (w/v) Milchpulver, 0,1% (v/v) Tween 20 in PBS (def)	
WB-Blockierungspuffer	10% (w/v) Milchpulver in PBS (def)	
Protease-Inhibitor-, DTT- und Aminosäure-Stammlösungen		
DTT (Dithiothreitol)	Aliquotiert in 1M	(500x)
Leupeptin	Aliquotiert in 1 mg/ ml	(125x)
Pepstatin A	Aliquotiert in 500 µg/ ml	(250x)
Protease-Inhibitor-Cocktail™ (PIC)	Aliquotiert in 2 Tabletten/ ml	(25x)
Trasyol (Aprotinin)	Aliquotiert in 2,8 mg/ ml	(140x)
Trypsin-Inhibitor (aus Soja)	Aliquotiert in 4 mg/ ml	(100x)
L-Methionin	Aliquotiert in 3 mg/ ml	(100x)
L-Cystein	Aliquotiert in 4,8 mg/ ml	(100x)

### 3.7. Radioaktiv markierte Substanzen

PROMIX™ in vivo Zellmarkierung 70% [ <sup>35</sup> S]-L-Methionin, 15% [ <sup>35</sup> S]-L-Cystein, >1000Ci/mmol	Amersham, Freiburg
Rainbow™ [ <sup>14</sup> C]-methylierte Proteine 14,3 - 220 kDa, 1 µCi	Amersham, Freiburg
[ <sup>32</sup> P] <sub>i</sub> -Orthophosphat, 370 MBq/ ml, 10 mCi/ ml	Amersham, Freiburg
[ <sup>35</sup> S]-L-Methionin-Redivue, 10 mCi/ ml	Amersham, Freiburg
[ <sup>14</sup> C]-Chloramphenicol, 25 µCi/ ml in 250 mM Tris-HCl (pH 7,5)	Amersham, Freiburg

### 3.8. Vektoren und rekombinante Plasmide

Plasmide, d.h. extrachromosomale, meistens zirkuläre DNA, kommen in Mikroorganismen häufig natürlich vor. Sie können eine Größe zwischen 2 und >200kb besitzen und die verschiedensten genetischen Funktionen erfüllen. Im Laboralltag versteht man unter Plasmiden ausschließlich die aus verschiedenen genetischen Elementen (Replikationsursprung, Resistenzgen, Polylinker) zusammengesetzten Plasmidvektoren, die für viele Anwendungen (z.B. Klonierung, Fragmentisolierung, Sequenzbestimmung, in vitro Transkription) essentiell sind. Plasmide können in Bakterien durch Antibiotika-Selektion vermehrt werden und tragen ein Antibiotikaresistenz-Gen, das die Bakterien befähigt, im Selektionsmedium zu wachsen.

pGEM-NP: MARV-NP-Gen, kloniert in pGEM3Zf(+)	Sanchez et al., 1992
pGEM3Zf(+)	Promega, Heidelberg
pGEM-NPΔMutanten: Δ235-695, Δ390-695, Δ441-695, Δ481-695, Δ522-695, Δ580-695, Δ1-265	Lötfering, Doktorarbeit
pT-NP: MARV-NP-Gen, kloniert in pTM1	Institut für Virologie, Marburg
pTM1: Vektor zur T7-gestützten Proteinexpression in eukaryotischen Zellen	B. Moss, NIH, Bethesda (USA)
pT-Lmut: mutiertes MARV-L-Gen, kloniert in pTM1	Institut für Virologie, Marburg
pT-VP35: MARV-VP35-Gen, kloniert in pTM1	Institut für Virologie, Marburg
pT-Ebo30: EBOV-VP30-Gen, kloniert in pTM1	Institut für Virologie, Marburg
3M5M: MARV-spezifisches Minigenom bestehend aus 3'leader-CAT-Reportergen-5'trailer, kloniert in den Vektor 2.0	A. Ball, University of Alabama Medical School (USA)
pGEX-NP: MARV-NP-Gen, kloniert in pGEX-5x-1	Institut für Virologie,

pT-E30mM35  
 pT-E30mM35Flag  
 pGEM-NPmut4  
 pGEM-NP<sup>ST/A</sup>AA  
 pGEM-NP<sup>ST/A</sup>AS  
 pGEX-5x-1

Marburg  
 Möller, 2002  
 Möller, 2002  
 Di Carlo, 1999  
 Di Carlo, 1999  
 Di Carlo, 1999  
 Amersham, Freiburg

Kloniertes Plasmid	Matrizen-DNA	Oligonukleotide (#)	Klonierungsstrategie	Zielvektor
pGEM-NP $\Delta$ 271-695	pGEM-NP $\Delta$ 390-695	661 / 662	PCR	pGEM
pGEM-NP $\Delta$ 301-695	pGEM-NP $\Delta$ 390-695	659 / 660	PCR	pGEM
pGEM-NP $\Delta$ 331-695	pGEM-NP $\Delta$ 390-695	663 / 664	PCR	pGEM
pT-NP $\Delta$ 351-360	pT-NP	884 / 885	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 371-380	pT-NP	942 / 943	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 381-390	pT-NP	944 / 945	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 391-400	pT-NP	946 / 947	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 401-410	pT-NP	948 / 949	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 411-420	pT-NP	950 / 951	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 421-430	pT-NP	964 / 965	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 431-440	pT-NP	966 / 967	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 441-450	pT-NP	968 / 969	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 451-460	pT-NP	970 / 971	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 461-470	pT-NP	972 / 973	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 471-480	pT-NP	974 / 975	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 320-400	pT-NP	1008 / 947	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 320-350	pT-NP	1008 / 1007	IvP+R+L	pTM1
pT-NP $\Delta$ 371-400	pT-NP	942 / 947	IvP+R+L	pTM1
pT-myc-NP $\Delta$ 1-440	pT-NP	1259 / 131	PCR+R+L	pTM1
pT-E30m*	pT-E30mM35	-	R	pTM1
pT-E30m*Flag	pT-E30mM35Flag	-	R	pTM1
NPC1C2	pT-NP	1237 / 948	PCR+R	pT-E30m* bzw. pT-E30m*Flag
NPC1	pT-NP	1237 / 884	PCR+R	s. o.
NPC2	pT-NP	1238 / 948	PCR+R	s. o.
pGEX-NP $\Delta$ 235-695	pGEM-NP $\Delta$ 235-695	132 / 765	PCR+R	pGEX-5x-1
pGEM-Npmut5.2	pGEM-NPmut4	553 / 554	OM	pGEM
pT-NP <sup>ST/A</sup> SA	pT-NP <sup>ST/A</sup>	734 / 735	OM	pTM1
pT-NP <sup>ST/A</sup> linearisiert	pT-NP <sup>ST/A</sup>	800 / 799	IvP+R	pTM1
pT-NP <sup>ST/A</sup> AD	pT-NP <sup>ST/A</sup> AS	1252 / 1253	IvP+R+L	pTM1
pT-NP <sup>ST/A</sup> DA	pT-NP <sup>ST/A</sup> SA	1254 / 1255	IvP+R+L	pTM1
DD-Cluster	Primer annealing	801 / 802	P	pTM1

**Tab. 3 Für Klonierungen verwendete DNA-Matrizen und Oligonukleotide.** Die Bezeichnung der Oligonukleotide erfolgt mit der internen Labornummer, deren genaue Bezeichnung und Sequenz bei 3.4.1 steht. Die an die Amplifikation anschließenden Klonierungsstrategien sind im Ergebnisteil (5) beschrieben. Plasmidbezeichnungen tragen am Anfang immer ein kleines p (z. B. pT-NP). PCR+R: Polymerase-Ketten-Reaktion (4.1.4.) mit anschließendem Restriktionsverdau (4.1.2.); OM: Ortsgerichtete Mutagenese (4.1.5.); IvP: Inverse PCR (4.1.6.); L: Ligation (4.1.7.).

### 3.9. Viren

Rekombinantes Vaccinia-Virus MVA-T7  
 Marburg-Virus (MARV-Musoke)

Sutter et al., 1995  
 Institut für Virologie, Marburg

### 3.10. Wachstumsmedien

#### 3.10.1. Wachstumsmedien für Bakterienzellen

LB-Medium	Sambrook et al., 1989; S. A1
2YT-Medium	Sambrook et al., 1989; S. A3
2YT-Agarplatten	Sambrook et al., 1989; S. A3, 4
SOB-Medium	Sambrook et al., 1989; S. A2

#### 3.10.2. Wachstumsmedien für Säugerzellen

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco BRL, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) ohne Methionin/ Cystein	Sigma, Deisenhofen
Minimal Essential Medium (MEM) ohne Orthophosphat	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum	PAA, Linz (Österreich)
Newborn Calf Serum	Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe

### 3.11. Zellen

#### 3.11.1. Prokaryotische Zellen

E.coli Stamm XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg
Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> ΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	
E.coli Stamm BL21	Promega, Heidelberg
Genotyp: F <sup>-</sup> , ompT, hsdS <sub>B</sub> /r <sub>B</sub> -r <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), dcm, gal, (DE3), pLysS, Cm <sup>r</sup>	

#### 3.11.2. Eukaryotische Zellen

HeLa	Permanente humane epitheliale Zervixkarzinomzelllinie, ATCC KlonCCL-2	
HUH T7	Permanente humane Hepatoblastomazelllinie, exprimiert konstitutiv die Polymerase des Bakteriophagen T7 (T7-Polymerase)	Schultz et al., 1996
BSR T7	Permanente Babyhamsternierenzelllinie, exprimiert konstitutiv die Polymerase des Bakteriophagen T7 (T7-Polymerase)	Buchholz et al., 1999

## 4. Methoden

### 4.1. Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1. Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

##### Isolierung von *annealten* Primern über eine Phenol/Chloroform-Extraktion

Diese Methode wurde angewandt für Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Fragmente kleiner als 100 bp bzw. Oligonukleotide. Die Aufreinigung der *annealten* Primer (s. 4.1.3.) geschah wie folgt: Zur Suspension wurde ein gleiches Volumen Phenol zugegeben und 30 s langsam geschüttelt (30-60 rpm unter Verwendung eines Schüttelgerätes oder alternativ von Hand durchgemischt durch regelmäßiges Kippen des Gefäßes). Anschließend wurde die Emulsion durch Zentrifugation von 2 min bei 10.000 x g (Raumtemperatur, RT) in die zwei Phasen Phenol und Wasser sowie eine dazwischen befindliche, weißlich gefärbte Interphase aufgetrennt. Die Interphase besteht aus den im Phenol koagulierten Proteinen. Der wässrige Überstand, in dem sich die Nukleinsäuren befinden, wurde vorsichtig abpipettiert. Dann wurde ein gleiches Volumen Phenol/ Chloroform [1:1 (w/ w)] zugegeben, gemischt, zentrifu-



giert und wie oben beschrieben abpipettiert. Hinterher wurde ein gleiches Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol [24:1(w/ w)] zugegeben, gemischt, zentrifugiert und abpipettiert. Für diesen Vorgang sind Polypropylen-Reaktionsgefäße geeignet. Der Überstand wurde in ein kleines 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und eine Ethanol (EtOH)-Fällung angeschlossen (s. u.). Der Verlust an DNA während der Aufreinigung beläuft sich auf ca. 50%.

### **Isolierung von doppelsträngiger DNA (dsDNA)**

Die Aufreinigung der dsDNA erfolgte über das *QIAquick-spin PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) nach beiliegendem Protokoll. Die DNA wurde am Ende in 50 µl Elutionspuffer (EB oder TE) eluiert.

Die Elution der dsDNA aus präparativen Agarosegelen (4.1.10.) erfolgte über das *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen (Hilden). Es wurde nach beiliegendem Protokoll unter Berücksichtigung aller optionalen Reinigungsschritte gearbeitet. Die DNA wurde am Ende in 50 µl Elutionspuffer (EB oder TE) eluiert. Ein Zehntel des Eluats wurde zur Kontrolle der Präparation auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt (4.1.10.).

### **DNA-Reinigung über Ethanol-Fällung**

Die DNA-Lösung, hier ein PCR-Ansatz, wurde mit 1/10 3M Natriumacetat (pH 5,7) und 2,5x EtOH (100%) versetzt, gemischt und 10 min inkubiert (RT). Danach wurde die DNA durch Zentrifugation von 30 min bei 20.000 x g (RT) pelletiert. Die präzipitierte DNA wurde mit 70% EtOH gewaschen und in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet.

## **4.1.2. Modifizierung von Nukleinsäuren**

### **Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Der **analytische Verdau** von DNA über Restriktionsendonukleasen (RE) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl und enthielt 0,5 - 2 Einheiten der jeweiligen RE. Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Herstellerangaben für mindestens 1 h bei 37°C. Anschließend wurde der Verdau mit Hilfe eines analytischen Agarosegels überprüft (4.1.10.). Sollte die DNA in weiteren Reaktionen eingesetzt werden, wurde sie anschließend über *QIAquick-spin PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt (4.1.1.).

Der **präparative Verdau** von DNA mittels RE erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 - 100 µl und enthielt 2 - 8 Einheiten der jeweiligen RE. Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Herstellerangaben für 4 - 10 h bei 37°C. Hinterher wurde die geschnittene DNA auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt (4.1.10.) und das gewünschte DNA-Fragment aufgereinigt (4.1.1.).

### **Dephosphorylierung von Vektor-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. Es wurden 0,5 µl CIP (1 U/ µl) und 5 µl 10x CIP-Puffer zu 44,5 µl linearisierter Plasmid-DNA (1 µg - 3 µg) gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C

inkubiert. Die Inaktivierung der CIP erfolgte anschließend nach Zugabe von 0,5 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) für 10 min bei 72°C. Die DNA wurde zuletzt mit dem *QIAquick-spin PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt und in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen (4.1.1.).

#### **Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden**

Durch die Modifizierung einer Restriktionsschnittstelle kann diese zu einer anderen Erkennungsstelle umgewandelt werden. Um 5'-Überhänge mit Nukleotiden aufzufüllen, wurde folgendes Protokoll verwendet: 1 µg DNA wurde mit je 1 mM Desoxynukleotiden (dNTP) und 1 Einheit Klenow-Fragment in 20 µl Klenow-Reaktionspuffer (Roche, Zürich/ Schweiz) für 15 min. (37°C) inkubiert. Zum Anhalten der Reaktion wurden 2 µl einer 0,2 M EDTA-Lösung (pH 8,0) zu gesetzt und 10 min bei 65°C inkubiert. Die DNA wurde abschließend mit dem *QIAquick-spin PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt und in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen (4.1.1.).

#### **Abdauen von 3'-überhängenden DNA-Enden**

Um 3'-Überhänge in glatte Enden umzuwandeln, wird die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität des Klenow-Fragments in Abwesenheit von Nukleotiden nach folgendem Protokoll verwendet: 1 µg DNA wurde mit 1 Einheit Klenow-Fragment in 20 µl Klenow-Reaktionspuffer 15 min. (37°C) inkubiert. Zum Anhalten der Reaktion wurden 0,8 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) zugesetzt und 10 min bei 65°C inkubiert. Die DNA wurde abschließend mit dem *QIAquick-spin PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt und in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen (4.1.1.).

#### **Abdauen von 5'-überhängenden DNA-Enden**

Um 5'-Überhänge in glatte Enden umzuwandeln, wird eine 5'-3'-Exonuklease aus der Mungbohne verwendet. Folgendes Protokoll wurde verwendet: 1 µg DNA wurde mit 5 Einheiten Mungbohnen-Nuklease (Roche, Zürich/ Schweiz) in 10 µl Mungbohnen-Nuklease-Reaktionspuffer 60 min (25°C) inkubiert. Zum Anhalten der Reaktion wurden 0,2 µl einer 50 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) zu gesetzt. Die DNA wurde abschließend mit dem *QIAquick-spin PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt und in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen (4.1.1.).

#### **4.1.3. Primer-Anlagerung (*primer annealing*)**

Das Anlagern erfolgt mit dem *Annealing*-Puffer des T7/5-Transcription System der Firma Promega (Heidelberg). Folgendes Protokoll wurde verwendet: je 40 µM Primer 1 und 2, 2,8 µl *Annealing*-Puffer und dH<sub>2</sub>O ad 50 µl wurden auf Eis in einem 100 µl-Reaktionsgefäß pipettiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Nachher wurden die *annealten* Primer über Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt (4.1.1.) und für weitere Reaktionen (z. B. DNA-Ligation, 4.1.7.) verwendet.

#### 4.1.4. Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt es, beliebige DNA-Abschnitte ohne Verwendung von RE, Vektoren und Wirtszellen zu vermehren (amplifizieren). Benötigt werden zwei Oligonukleotide (Primer), die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren und außerdem vier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase (z. B. Pwo). Zur Amplifizierung der gewünschten DNA-Sequenzen wurden Primer und Matrizen-DNA entsprechend Tabelle 3 verwendet. Ein PCR-Zyklus besteht aus 1) Denaturierung der DNA, 2) Bindung der Primer (Hybridisierung) und 3) Amplifikation der Zielsequenz unter Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Pwo). Die Basenzusammensetzung und Länge der Primer bestimmt die Bindungstemperatur an die DNA.

Es wurde folgender **Ansatz** verwendet: 100 - 750 ng Matrizen-DNA, 10 µl 10x Pwo-Reaktionspuffer (Roche, Zürich/ Schweiz), je 200 nM Desoxyadenosin-, Desoxycytidin, Desoxyguanosin- und Desoxythymidin-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP; Eurogentech, Heidelberg), 600 mM Primer 1 bzw. 2, 2,5 Einheiten Pwo-Polymerase (5 U/ µl; Roche, Zürich/ Schweiz) und dH<sub>2</sub>O ad 50 µl.

Um anfangs eine Verlängerung von evtl. unspezifisch an die DNA angelagerten Primern zu verhindern, wurde eine so genannte „*hot start*“-PCR durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst ohne Polymerase für 5 min auf 99°C erhitzt, wieder auf 94°C abgekühlt und dann mit Polymerase komplettiert.

Die **PCR-Bedingungen** waren: 1) Denaturierung für 15 s bei 94°C, 2) Anlagerung für 30 s bei 50-65°C, 3) Amplifikation für 2 min bei 72°C. Die Amplifikationszeit wurde nach 10 Zyklen um 5 s pro Zyklus verlängert, um eine höhere Ausbeute zu erzielen. Nach weiteren 25 Zyklen schloss sich eine Polymerisationsphase für 10 min bei 72°C an. Das Ergebnis der PCR wurde auf einem Agarosegel kontrolliert (4.1.10.). Für die Analyse wurden 8 µl des PCR-Ansatzes eingesetzt. Anschließend wurde der verbleibende Ansatz mit dem *QIAquick-spin PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt und in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen (4.1.1.).

#### 4.1.5. Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte in vitro Mutagenese von DNA beruht auf einer PCR mit mutagenisierten Primern und wurde mit Hilfe von Komponenten des *Quick-Change* Mutagenese-Systems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. Hierbei enthielten die verwendeten Mutagenese-Primer, die komplementär zueinander sind, die gewünschte Mutation und führten entweder zur Insertion, Deletion oder zum Nukleotidaustausch an der entsprechenden Position. Zur Amplifikation wurde rekombinante *PfuTurbo*<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase verwendet.

Die sich an die PCR anschließende Selektion der mutierten DNA beruht auf der Eigenschaft der RE *DpnI* (NEB, Schwalbach), ausschließlich methylierte DNA zu schneiden. Die in vitro entstandene mutagenisierte DNA ist im Gegensatz zur eingesetzten, bakteriell replizierten DNA nicht methyliert. Daher wird nur die ursprünglich eingesetzte, nichtmutagenisierte Plasmid-DNA selektiv zerstört. Zur Transformation stehen dann lediglich die mutagenisierten Plasmide zur Verfügung.

Folgender **PCR-Ansatz** wurde verwendet: 5 µl 10x Pfu-Reaktionspuffer (Roche, Zürich/Schweiz), je 0,2 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Eurogentech, Heidelberg), 10 - 25 ng Plasmid-DNA, je 125 ng Primer in (+)- bzw (-)-Orientierung, 2,5 Einheiten *PfuTurbo*<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase (2,5 U/ µl, Roche, Zürich/ Schweiz) und dH<sub>2</sub>O ad 50 µl.

Folgende **PCR-Bedingungen** wurden im Thermocycler der Firma Perkin Elmer-Cetus (Norwalk, USA) eingehalten: 1 Zyklus für 30 s bei 95°C, 18 Zyklen je 1) Denaturierung für 30 s bei 95°C, 2) Anlagerung für 1 min bei 50° - 55°C und 3) Amplifikation für 11 - 14 min bei 68°C. Anschließend wurde die DNA mit 1 Einheit der RE *DpnI* (NEB, Schwalbach) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 5µl zur Transformation (4.2.1.) verwendet.

### 4.1.6. Inverse PCR

Bei der Inversen PCR, eine Variation der ortsgerichteten in vitro Mutagenese-PCR (4.1.5.), wurden ebenfalls mutagenisierte oder nicht-mutagenisierte Primer sowie die Komponenten des *Quick-Change* Mutagenese-Systems (Stratagene, Heidelberg) benutzt. Im Gegensatz zur ortsgerichteten in vitro Mutagenese-PCR waren die Primer nicht komplementär zueinander und waren so gewählt, dass die Polymerase die Amplifikate, ausgehend von den Primern, in entgegengesetzter Richtung synthetisierte. Diese Versuchsanordnung führte dazu, dass der zwischen den 5'-Enden der Primer gelegene Bereich der Matrizen-DNA nicht amplifiziert wurde. Je nach Lage der Primer konnten so beliebig große Deletionen eingeführt werden. Die Amplifikate wurden anschließend mit *DpnI* (NEB, Schwalbach) analog zur ortsgerichteten Mutagenese verdaut (4.1.5.) und mit DNA-Ligase religiert (4.1.7.). Mit dieser Methode konnten auch Insertionen eingeführt werden. Dabei trug ein nicht-kodierender 5'-Überhang des Primers die Insertionssequenz. 5µl des Ansatzes wurde zur Transformation (4.2.1.) verwendet.

### 4.1.7. DNA-Ligation

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in einen zuvor mit geeigneten RE geschnittenen Vektor 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 dephosphoryliert (4.1.2.). Die DNA wurde abschließend mit

dem *QIAquick-spin PCR Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt und in 50 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen (4.1.1.).

Die Insertions- und Vektor-DNA wurde in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:5 eingesetzt. Ligase, Ligase-Reaktionspuffer und Adenosin-Triphosphat (rATP) kamen von der Firma Stratagene (Heidelberg). Folgendes **Protokoll** wurde verwendet: 20 - 200 ng verdautes, gereinigtes Genfragment, 20 - 50 ng linearisierte, gereinigte Vektor-DNA, 1 mM rATP und 2 Einheiten T4-DNA-Ligase (4 U/ µl) wurden in 15 µl Ligase-Reaktionspuffer für 2 h (RT) inkubiert. Als Kontrollen dienten folgende Ansätze: 1) Positivkontrolle (Ligase): Ansatz wie oben, ohne Genfragment, aber mit 50 ng nicht-linearisierter Vektor-DNA. 2) Vektorkontrolle (Religation): Ansatz wie oben, ohne Genfragment. 3. Insertkontrolle (Kontamination): Ansatz wie oben, ohne linearisierte Vektor-DNA. Der vollständige Ansatz (15 µl) wurde zur Transformation (4.2.1.) verwendet.

#### 4.1.8. Nichtradioaktive Sequenzierung mit ABI Prismä .

Die Sequenzierung erfolgt nach der Kettenabbruchmethode von Sanger and Coulson (1975) unter Zuhilfenahme von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Didesoxynukleotiden (ddNTPs). Zur Sequenzierung wurde ein *ABI Prism™ 377 DNA-Sequencer* (Perkin Elmer Cetus, Norwalk/ USA) unter Verwendung des *ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Cetus, Norwalk/ USA) benutzt.

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

Der **Ansatz** für eine Sequenzierung bestand aus: 4 µl TerMix, 1 µg dsDNA, 5 µM Primer und dH<sub>2</sub>O ad 20 µl.

Folgende **PCR-Bedingungen** mussten erfüllt sein: 15 Zyklen à 1) Denaturierung bei 96°C für 30 s, 2) Anlagerung bei 50°C für 15 s und 3) Amplifikation bei 60°C für 4 min.

Eine folgende EtOH-Fällung (4.1.1.) entfernte nicht-eingebaute Nukleotide und Salze. Die sedimentierte DNA konnte dann in 4 µl Sequenzier-Probenpuffer (1% Dextran-Blau, 5 mM EDTA, 80% Formamid) aufgenommen werden. Vor dem Beladen des Sequenziergels wurde die Probe für 5 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 (Sambrook et al., 1989; S. B23; pH 8,0) verwendet. Die Sequenzierdaten wurden mit einer Geschwindigkeit von 100 bp/ h gemessen und über einen Zeitraum von 8 - 10 h aufgezeichnet. Die **Zu-**

**sammensetzung des Sequenziergels** lautet: 21 g Harnstoff, 8,4 ml 30%ige Polyacrylamid-lösung, 20 ml dH<sub>2</sub>O, 6 ml 10x TBE (pH 8,0), 300 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS) und 20 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED).

#### 4.1.9. In vitro Translation

Die Proteinsynthese erfolgte mit dem *TNT-T7 quick-coupled Transcription and Translation-System* der Firma Promega (Heidelberg). Die für Transkription und Translation notwendigen Enzyme, Nukleotide, Aminosäuren und Faktoren sind im verwendeten Kaninchenretikulytenlysat (TNT-Quick-Mix) bereits enthalten. Diesem Ansatz mussten nur noch DNA, dH<sub>2</sub>O und Methionin zugesetzt werden. Letzteres wurde entweder [<sup>35</sup>S]- oder nicht markiert verwendet.

Der **Ansatz** aus 2 µg Plasmid-DNA, 40 µl TNT-Quick-Mix, 20 µCi [<sup>35</sup>S]-Methionin-redivue (bzw. 80 nM nicht-radioaktives Methionin) und dH<sub>2</sub>O (ad 50 µl) wurde auf Eis pipettiert und für 90 min bei 30°C inkubiert. 3 µl des Mixes wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 4x Proteingel-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 5 min erhitzt (75°C oder 37°C) und anschließend über eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; 4.3.4.) aufgetrennt. Das Gel wurde fixiert, auf Gel-Blot-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) platziert und unter Vakuum (Vakuum-Geltrockner) getrocknet. Zum restlichen in vitro Translat wurden 65 µl GST-Bindungspuffer 1 ad 2 mM Dithiotreitol (DTT), 100 µM Natrium-Orthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 1:25 Phosphatase-Inhibitor-Cocktail™ (PIC, Roche, Zürich) und 2 µg/ml Pepstatin zugegeben und im GST pull-down Assay (4.3.3.) verwendet. Während der Kontrollen (Einzeltranslation) bei Kotranslationsstudien wurde die Menge der Plasmid-DNA durch den entsprechenden Leervektor komplementiert.

#### 4.1.10. Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

##### Analytische DNA-Agarosegele

Um die DNA anhand ihrer Größe aufzutrennen, wurde die DNA enthaltende Probe mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt und dann zusammen mit einem DNA-Längenstandard (Roche, Mannheim) in einem 0,8%, 1% oder 2%igen Agarosegel aufgetrennt (Agarose in TBE-Puffer gelöst, Sambrook et al., 1989; S. B23). Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Als Laufpuffer diente TBE (pH 8,0). Nach der Auftrennung erfolgte eine 20 min Färbung der DNA-Fragmente in einer wässrigen Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung (1µg/ml, Roche, Zürich). Darauf konnten die DNA-Banden über das interkalierende EtBr auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht und photographiert werden.

##### Präparative DNA-Agarosegele

Zur Gewährleistung leichter Solubilisierung der DNA bei präparativen DNA-Agarosegelen, wurde für präparative Gele Agarose NA (Amersham, Freiburg im Breisgau) mit besonders niedrigem Schmelzpunkt verwendet. Die Agarose NA wurde in TAE-Puffer gelöst. Im Anschluss an die Auftrennung der DNA mittels präparativem Agarosegels wurde die gewünsch-

te Bande auf dem UV-Schirm mit einem Skalpell ausgeschnitten und daraus die DNA mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen (Hilden) eluiert (4.1.1.). Auftrennung, Färbung und Visualisierung auf dem UV-Schirm erfolgte wie oben beschrieben. 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.

#### 4.1.11. Plasmidpräparation

##### Plasmidpräparation im kleinen Maßstab

Die Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab wurden unter Verwendung des *QIAprep-spin Plasmid Kits* und des *QIAprep 8 Plasmid Kits* der Firma Qiagen (Hilden) oder des *Miniprep Kit 1* der Firma PeqLab (Erlangen) durchgeführt. Die Verlaufsbeschreibung der Präparation wurde den beiliegenden Arbeitsprotokollen entnommen. Pro Ansatz wurde eine Menge von 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in 2YT-Medium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin verwendet. Zum Schluss wurden 5  $\mu\text{l}$  des gewonnenen Eluats zur Analyse mit geeigneten RE verdaut (4.1.2.) und auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt (4.1.10.).

##### Plasmidpräparation im großen Maßstab

Um Plasmide in großer Menge ( $>100 \mu\text{g}$ ) zu erhalten, war die Durchführung einer Plasmidpräparation im großen Maßstab notwendig. Diese erfolgte unter Verwendung des *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen (Hilden). Als Ausgangsmaterial wurden 100 - 500 ml einer Übernachtskultur des gewünschten Bakterienklons verwendet (Wachstumsmedium: LB-Medium) mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin. Die Präparation wurde anhand des mitgelieferten Handbuches durchgeführt. Nach Beendigung der Präparation wurde eine quantitative und qualitative DNA-Bestimmung durchgeführt (4.1.12.).

#### 4.1.12. Quantitative und qualitative DNA-Bestimmung

##### Konzentrationsbestimmung von dsDNA

Die Nukleinsäurekonzentration einer Probe wurde mittels UV-Durchflußphotometer UV-spektrometrisch analysiert. Dabei ist die optische Dichte der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ), direkt proportional zu ihrem Nukleinsäuregehalt. Für dsDNA gilt:  $\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 = \text{DNA-Gehalt in } \mu\text{g/ml}$ .

##### Reinheitsbestimmung von dsDNA

Um die Reinheit von Nukleinsäurepräparationen zu definieren, wurde der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  bestimmt. Ein Wert unter 1,8 deutete auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin (Absorptionsmaximum: 280 nm). Bei einem Wert von über 2,2 war anzunehmen, dass die DNA entweder denaturiert ist oder die Probe zuviel RNA enthält. Der Quotient der präparierten DNA war im Mittel 1,8.

## 4.2. Zellbiologische Methoden

### 4.2.1. Das E.coli-Expressionssystem

#### Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen

Die Bakterienzellen wurden mit Hilfe von Puffern und Lösungen der Firma Zymo Research (Orange, USA) kompetent gemacht und konnten zur Aufbewahrung anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für mindestens ein halbes Jahr eingefroren werden.

Zur Herstellung der Zkompetenten Zellen wurden 50 ml SOB-Medium mit 0,5 ml frischer Übernachtskultur inokuliert. Die Proben wurden bei RT bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 - 0,3 geschüttelt, dann 10 min. auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei  $2.500 \times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) zentrifugiert. Die Zellen wurden 1x in 5 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut für 10 min bei  $2.500 \times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand vollständig entfernt und die Zellen vorsichtig in 5 ml eiskaltem Kompetenzpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden nun zu je 100  $\mu\text{l}$  oder 200  $\mu\text{l}$  aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### Transformation von Bakterienzellen

Zur Transformation wurden Z-kompetente *E.coli* Zellen verwendet (s. o.), die vorher circa 10 min. auf Eis aufgetaut wurden. Nach der Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension zur DNA-Lösung (z. B. 15  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz, 4.1.7.) 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 für 12 - 16 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

#### Expression von Fremdgenen in BL21-E.coli

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. die GST-Fusionsproteine trägt, wurde wie oben beschrieben durchgeführt. 50 ml LB-Medium, 1:1000 mit Ampicillin (100  $\text{mg}/\text{ml}$ ) ergänzt, wurden mit 625  $\mu\text{l}$  (1:80) aus einer frischen Übernachtskultur der transformierten BL21-Zellen beimpft und für 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem 50 ml Reaktionsgefäß unter Schütteln inkubiert. Dann wurden 50  $\mu\text{l}$  einer 200 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration: 0,2 mM)-Lösung zugegeben und für weitere 4 - 5 h bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bis die Zellen geerntet wurden.

Zur Expressionskontrolle wurden von der Zellkultur vor der IPTG-Induktion sowie vor der Zellernte jeweils 1 ml Aliquots genommen, bei  $20.000 \times g$  (RT) abzentrifugiert und das Pellet in 25  $\mu\text{l}$  bzw. 50  $\mu\text{l}$  4x Proteingel-Probenpuffer aufgenommen. Davon wurden 10  $\mu\text{l}$  bzw. 4  $\mu\text{l}$  über eine 12% SDS-PAGE aufgetrennt und eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt



(4.3.4. und 4.3.5.). GST-NP hat ein ungefähres Molekulargewicht von 115 Kilodalton (kDa), GST-VP35 von 60 kDa und GST-NP $\Delta$ 235-695 von 55 kDa.

### **Bakterienzellyse**

Die Bakteriensuspension wurde für 10 min bei 4.300 x g (4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 2 ml Phosphatpuffer (PBS) ad 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 mM DTT aufgenommen. Zur Zellyse wurden 2 mg/ ml Lysozym zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. 3x Frieren und Tauen unterstützte das Aufbrechen der Zellwände. Nach Zugabe von 1% Triton X100 erfolgte eine weitere Inkubation für 1 h bei 4°C auf dem Überkopftrotierer. Nach diesem Prozess hatten die Proben oft eine schleimige Konsistenz. Dies ließ sich beseitigen, indem die Ansätze 3x für 10 s bei -10°C mit dem *Branson Sonifier 450* behandelt wurden. Die Bakterentrümmer wurden nun durch eine 10 min Zentrifugation bei 20.000 x g (4°C) sedimentiert. Anschließend wurde die Affinität des GST an Glutathion (GSH)-Sephrose durch die Verwendung des stark reduzierend wirkenden DTT (5 mM Endkonzentration) erhöht. Die Überstände wurden zu je 1 ml aliquotiert und direkt weiter behandelt (z. B. GST pull-down Assay, 4.3.3.) oder bei 4°C über Nacht gelagert. Zur 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 (4.3.5.). Kam das exprimierte Protein im Pellet und nicht im Überstand des Zellysats vor, zeigte dies, dass das Protein aggregiert war. NP zeigt eine ausgeprägte Aggregationsneigung. Mit der vorgestellten Expressionsstrategie konnten ca. 50% des Proteins in die Löslichkeit (Überstand) überführt werden. GST-VP35 und GST-NP $\Delta$ 235-695 ließen sich nur in geringer Menge in die Löslichkeit überführen.

Untersuchungen über SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung (4.3.4. und 4.3.5.) zeigten eine starke Denaturierung des NP. Daher wurden alle nachfolgenden Experimente mit GST-NP bzw. NP-Mutanten in Gegenwart von Proteaseinhibitoren (3.5.) sowie niedrigen Temperaturen zwischen 0 und 4°C durchgeführt.

### **4.2.2. Kultivierung von HeLa-, BSR T7/5- oder HUH T7-Zellen**

Um fortlaufend Tests mit Vertebratenzellen durchführen zu können, wurden die in dieser Arbeit verwendeten HeLa-, BSR T7/5 und HUH T7-Zellen alle 3 - 4 Tage umgesetzt. HeLa- und HUH T7-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert. Das DMEM wurde immer frisch mit 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/ Streptavidin (P/S) und 10 % fetalem Kälberserum (FCS) komplementiert. BSR T7/5-Zellen wurden in BHK-21-Medium (Glasgow-MEM), dem 10% Newborn Calf Serum (NCS) zugesetzt worden waren, kultiviert. Für BSR T7/5- und HUH T7-Zellen war außerdem die Zugabe von Geneticin (1 mg/ mg) nötig.

Die Zellen wurden alle 3 - 4 Tage umgesetzt. Nach Dekantieren des verbrauchten Mediums und 2x Waschen mit PBS wurde eine Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben (2 ml/ 75 cm<sup>2</sup>-Flasche) und 2 min bei 37°C inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgekugelt und vom

Flaschenboden gelöst hatten, wurden 8 ml DMEM hinzugegeben. Mit dieser Zellsuspension wurde die neue, bereits mit 20 ml DMEM/ 10% FCS oder NCS beschickte 75 cm<sup>2</sup>-Flasche versetzt. Beim Umsetzen wurden die Zellen 1:8 (HeLa und HUH T7) bzw. 1:20 (BSR T7/5) verdünnt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem begasteten Brutschrank bei 37°C in Anwesenheit von 5% CO<sub>2</sub>.

### 4.2.3. Das Vaccinia-Virus-Expressionssystem

#### Infektion von HeLa-Zellen mit Vaccinia-Virus MVA-T7

Das Vaccinia-Virus ist ein komplexes, im Zytoplasma der infizierten Zellen replizierendes Virus mit einem dsDNA-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.

Von subkonfluenten HeLa-Zellen (70%), kultiviert in 3 oder 5 cm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen (4.2.2.), wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen 2x mit je 2 ml DMEM gewaschen. Die Infektion mit MVA-T7 erfolgte in einem Gesamtvolumen von 500 µl DMEM mit einer *multiplicity of infection* (m.o.i.) von 1. Zur Kontrolle wurden nicht-infizierte Zellen (Mock, HeLa) und infizierte, aber nicht-transfizierte Zellen (MVA-T7) mitgeführt. Die Schalen wurden auf einem Kippschüttler für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend zur DNA-Transfektion weiterverwendet.

#### DNA-Transfektion von infizierten HeLa-Zellen mit Lipofektin

Während der Infektion (s. o.) wurden die Transfektionsansätze vorbereitet. Hierzu wurden jeweils 1 ml DMEM mit 5 µl Lipofektin-Transfektionsreagenz oder mit 1 - 8 µg Expressionsplasmid beschickt. Als Expressionsplasmide dienten pTM1- und pGEM-Vektoren. Der Lipofektinansatz wurde 20 min vor dem Plasmidansatz hergestellt, um eine höhere Transfektionseffizienz zu erreichen. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt, 30 s mit einem Schüttelgerät gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Das Transfektionsmedium (2 ml) wurde 1 h nach der Infektion auf die Zellen gegeben. Die Mock- bzw. MVA-T7-Ansätze wurden mit jeweils 2 ml DMEM ØFCS versetzt. Dann wurden die Zellen für 12 - 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze gegebenenfalls (z. B. Bestimmung des Phosphorylierungsstatus, *pulse-chase*-Experiment) mit einem radioaktiven [<sup>35</sup>S]-Methionin/ Cystein-Gemisch bzw. mit radioaktivem [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat markiert (4.3.1.) oder einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen (4.3.4.).

#### Säugerzellyse

Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, dem PIC (1:25), 2 µg/ ml Pepstatin, 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, evtl. 50 mM NaF und 1 mM PMSF zugesetzt waren. Anschließend wurden die Zellen in mindestens 500 µl Lysis-Puffer (versetzt mit 1:25 PIC oder 1 mM PMSF,

1 mM DTT, 100  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , evtl. 50 mM NaF und evtl. 0,5% SDS) pro 3 cm-Zellkulturschale abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Als Lysis-Puffer wurden der Coimmunpräzipitations (CoIP)-Puffer oder GST-Bindungspuffer 1 verwendet. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min, eine Behandlung mit dem *Branson Sonifier 450* von 3x 10 Pulsen (maximal) bei  $-10^\circ\text{C}$  und schließlich eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 rpm ( $4^\circ\text{C}$ ). Auf diese Weise konnten die löslichen Proteine bzw. Proteinkomplexe in den Überstand überführt und von den Zelltrümmern getrennt werden. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und weiteren Analysen unterzogen. Es zeigte sich, dass NP in Zellysate-Überständen extrem empfindlich auf Frieren und Auftauen reagierte und stark degradierte. Daher erfolgte die kurzfristige Lagerung der Zellysate-Überstände bei  $4^\circ\text{C}$ .

### 4.3. Biochemische Methoden

#### 4.3.1. Untersuchungen zur Funktion von Proteinen

##### MARV-spezifischer Replikations-/ Transkriptionsassay

In der Arbeitsgruppe wurde ein artifizielles MARV-Replikations-/ Transkriptionssystem etabliert (Mühlberger et al., 1998). Dazu wurde das Plasmid 3M5M konstruiert, das für ein MARV-spezifisches RNA-Minigenom unter Kontrolle des T7-Promotors kodiert. MARV 5'-Leader- und 3'-Trailer-Regionen flankieren ein Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Reportergen. Nach Transfektion von 3M5M in BSR T7/5- oder HUH-T7-Zellen, die die T7-Polymerase stabil exprimieren, wird über Transkription das Minigenom synthetisiert. Das RNA-Minigenom verfügt an seinen 3'- und 5'-Enden über die Enden des MARV-Genoms, die alle notwendigen genomischen Signale für virale Transkription und Replikation enthalten. Diese Regionen flankieren das CAT-Reportergen, das in negativer Orientierung vorliegt. Gleichzeitig mit dem 3M5M werden Plasmide transfiziert, die für die MARV-Nukleokapsid-Proteine NP, VP35, und L unter Kontrolle des T7-Promotors kodieren. Diese Proteine werden nun in den BSR T7/5- bzw. HUH-T7-Zellen synthetisiert und führen zur Transkription und Replikation des Minigenoms. Dadurch entsteht ein CAT-Transkript, von dem das Enzym durch die zelluläre Proteinbiosynthesemaschinerie hergestellt wird. CAT-Aktivität zeigt daher in diesem System MARV-spezifische Transkription an.

Zuerst wurden subkonfluente BSR T7/5- (60%) oder HUH T7-Zellen (80%) in 3 cm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen (4.2.2.) 2x mit jeweils 1 ml DMEM gewaschen und für 1 h im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  (5%  $\text{CO}_2$ ) inkubiert. In dieser Zeit wurden die Transfektionslösungen vorbereitet. Zuerst wurde ein *FuGENE*-Mastermix aus 800  $\mu$ l DMEM und 9  $\mu$ l *FuGene*<sup>®</sup>-Transfektionsreagenz/Ansatz hergestellt. Später wurden für jeden Ansatz 200  $\mu$ l DMEM in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit folgendem Plasmidgemisch beschickt: 100 ng pT-NP, 500 ng pT-VP35, 1  $\mu$ g pT-L und 1  $\mu$ g 3M5M. Für pT-NP wurde gegebenenfalls ein Plasmid für eine Mutante verwendet oder die Menge variiert. Anschließend wurden in jedes 2 ml-Reaktionsgefäß 800  $\mu$ l des *FuGENE*-Mastermixes gegeben, durch regelmäßiges Kippen des Gefäßes vorsichtig

von Hand gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Das Transfektionsgemisch (1 ml) wurde dann zu 1 ml Medium auf die Zellen gegeben und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. 8 h (BSR-T7/5) bzw. max. 18 h (HUH-T7) nach der Transfektion wurden die Zellen 2x mit 2 ml DMEM gewaschen. Nach weiteren 25 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geerntet. Zunächst wurden sie 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in 150 µl Reporter-Lysis-Puffer für 15 min bei RT auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen abgeschabt, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, für 30 s mit einem Schüttelgerät gemischt und der Überstand nach Zentrifugation für 2 min bei 20.000 x g (RT) abgenommen. Mit dem Überstand wurde dann der biochemische Nachweis der CAT-Aktivität durchgeführt (s. u.).

### **Titration der pT-NP bzw. Serincluster-NP-Substitutionsmutanten**

Die im MARV-Replikations-/ Transkriptionssystem (s. o.) gebildete CAT-Enzym-Menge ist abhängig von der Proteinmenge der synthetisierten MARV-spezifischen Proteine - besonders des Verhältnisses VP35:NP. Bei der Titration wurde die Plasmidmenge einer Komponente variiert (z. B. pT-NP-AD = 0,1/ 0,2/ 0,5 µg) und überprüft, wie sich die Aktivität des CAT-Enzyms verhält. Die Plasmidmenge, die eine maximale Aktivität ergab, wurde in den folgenden Versuchen eingesetzt. Die Gesamt-Plasmidmenge wurde durch den Einsatz von Leervektor (pTM1) konstant gehalten und betrug 2,7 µg.

### **Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität**

Im MARV-Replikations-/ Transkriptionssystem (s. o.) wird MARV-spezifische Transkription über die Aktivität des gebildeten CAT-Enzyms detektiert. Die CAT katalysiert die Übertragung von Acetyl-Gruppen des Donors Acetyl-Co(enzym) 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.

Der **Ansatz** aus 0,5 - 5 µl Zelllysate, 145 µl einer 250 mM Tris/ HCl-Lösung (pH 7,5), 1 µl Acetyl-CoA-Stammlösung und 2 µl [<sup>14</sup>C]-Chloramphenicol 3 - 15 h bei 37°C inkubiert, bis die Katalyse durch Zugabe von 750 µl Ethylacetat (EtAc) gestoppt wurde. Nach kräftigem Mischen und 2 min Zentrifugation bei 20.000 x g wurde die obere organische Phase in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und in der Vakuum-Zentrifuge vollständig eingedampft. Das dabei entstandene Pellet wurde in 15 µl EtAc aufgenommen und auf eine Kieselgel-beschichtete DC-Platte aufgetropft. Die Platte wurde in eine abgeschlossene Kammer in DC-Laufpuffer gestellt, bis die Lauffront den oberen Rand der Platte erreichte. Die Auswertung erfolgte über Exposition der DC-Platte auf einer Biolume-Platte mit dem Biolume Analyzer BAS-1000 (4.3.5.).

### **Dephosphorylierung von immobilisierten Proteinen**

Proteine wurden immunpräzipitiert (4.3.3.) und dann wie folgt behandelt. Die Präzipitate wurden 2x mit ColP-Puffer und 1x mit CIP-Puffer gewaschen und dazu je 2 min bei 20.000 x

g (4°C) abzentrifugiert. Anschließend wurden die immobilisierten Proteine in 50 µl CIP-Puffer und 20 Einheiten CIP (Roche, Zürich) für 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proteine 2x mit CoIP-Puffer, einmal mit CKII-Puffer gewaschen und für den in vitro Kinasierungsassay für CKII (s. u.) verwendet.

### **In vitro Kinasierungsassay für Proteinkinase CKII**

Der Versuch wurde wie bei Zhi and Goldin (1999) beschrieben durchgeführt. HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und 1 h später mit Plasmiden für NP-Wildtyp oder NP<sup>RegII</sup> transfiziert (4.2.3.). Nach 14 h wurde ein Teil der Zellen für 1 h metabolisch mit [<sup>35</sup>S]-PROMIX markiert (4.3.1.). Darauf wurden die Zellen lysiert und einer Radioimmunpräzitationsanalyse unterworfen (4.3.3.). Die Zelllysate wurden mit dem Kaninchen αNC-Antiserum (Verdünnung 1:500) präzipitiert. Die Präzipitate wurden gewaschen und in vitro mit CIP dephosphoryliert (s. o.). Danach wurde eine Hälfte der unmarkierten Zelllysate mit [<sup>32</sup>P]-ATP und rekombinanter CKII und die andere Hälfte mit [<sup>32</sup>P]-ATP ohne CKII für 90 min bei 37°C in CKII-Puffer inkubiert. Alle Proben wurden 3x mit CoIP-Puffer gewaschen und einer SDS-PAGE (4.3.4.) unterzogen. Das Gel wurde fixiert, unter Vakuum getrocknet und die radioaktiven Signale mit dem BiImage Analyzer BAS-1000 analysiert (4.3.5.).

### **4.3.2. Metabolische radioaktive Markierung von HeLa-Zellen**

#### **Metabolische Markierung mit [<sup>35</sup>S]-PROMIX (Methionin/ Cystein)**

Zur metabolischen Markierung von Proteinen mit [<sup>35</sup>S]-Methionin/ [<sup>35</sup>S]-Cystein wurde der Promix [<sup>35</sup>S] *Cell-labeling Mix* (PROMIX) der Firma Amersham (Freiburg) verwendet. 12 h nach der Transfektion (4.2.3.) wurde das Medium von den Zellen abgenommen. Die Zellen wurden mit DMEM ohne Methionin/ Cystein gewaschen und anschließend mit je 1 ml desselben Mediums überschichtet. Nach einer 1 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium erneut abgenommen und gegen Markierungsmedium, bestehend aus je 1 ml DMEM ohne Methionin/ Cystein versetzt mit 25 µCi [<sup>35</sup>S]-PROMIX, ausgewechselt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 37°C. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen 3x mit eiskaltem PBS gewaschen. Die markierten Zellen wurden in je 0,5 ml CoIP-Puffer abgeschabt, dem frisch 1 mM PMSF oder 1:25 PIC, 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 µg/ml Pepstatin, 1 mM DTT und eventuell 50 mM NaF, 0,5% SDS und 1 Einheit RNase A zugesetzt wurden. Das Zelllysate wurde sofort weiterverarbeitet (z. B. Radioimmunpräzitation, 4.3.3.) oder kurzfristig bei 4°C gelagert.

#### **Metabolische Markierung mit [<sup>32</sup>P<sub>i</sub>]-Orthophosphat**

Zur Markierung von Proteinen mit radioaktivem Phosphat wurde [<sup>32</sup>P<sub>i</sub>]-Orthophosphat in HCl ([<sup>32</sup>P<sub>i</sub>], Amersham, Freiburg) verwendet. 12 h nach der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen mit phosphatfreiem Medium (Minimum Essential Medium Eagle (MEM) ohne Natrium-Phosphat) 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 Medium ersetzt, dem je 150  $\mu\text{Ci}$  [ $^{32}\text{P}_i$ ] / 3 cm-Schale zugesetzt wurden. Danach schloss sich eine Inkubationsphase von 2 h bei 37°C an. Die Ernte erfolgte in je 500  $\mu\text{l}$  CoIP-Puffer, dem frisch 1 mM PMSF oder 1:25 PIC, 100  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin, 50 mM NaF, 0,5% SDS und 1 Einheit RNase A zugegeben wurden. Das Zelllysate wurde ebenfalls sofort weiterverarbeitet (z. B. Radioimmunpräzipitation, 4.3.3.) oder kurzfristig bei 4°C gelagert.

### **Pulse-chase-Experiment**

Zur metabolischen Markierung von Proteinen mit [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin/ [ $^{35}\text{S}$ ]-Cystein wurde das *Promix [ $^{35}\text{S}$ ] Cell-labeling Mix* (PROMIX) der Firma Amersham (Freiburg) verwendet. Die Zellmenge richtet sich nach der Anzahl der Zeitwerte, d.h. bei drei Zeitwerten sind es 3x 6well-Platten (1 Platte mit 6 Vertiefungen à 3 cm). 12 h nach der Transfektion (4.2.3.) wurde das Medium von den Zellen abgenommen, die Zellen mit DMEM ohne Methionin/ Cystein gewaschen und anschließend mit je 1 ml desselben Mediums überschichtet. Nach einer 1 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium erneut abgenommen und gegen Markierungsmedium, bestehend aus je 1 ml DMEM ohne Methionin/ Cystein versetzt mit 25  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-PROMIX, ausgewechselt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min (*pulse*). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen des ersten Zeitwerts ( $t$  (*chase*)=0) 3x mit eiskaltem PBS gewaschen und lysiert (4.2.3.). Die übrigen Zellen wurden 1x mit DMEM, ergänzt mit 1/10 einer 100x-Stammlösung Methionin/ Cystein (3.6.), gewaschen und dann mit demselben Medium inkubiert. Nach den gewählten Inkubationszeiten (z. B.  $t$  (*chase*) = 60, 90 min) wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und lysiert (4.2.3.). Die Zelllysate wurden sofort weiterverarbeitet (z. B. Radioimmunpräzipitation, 4.3.3.) oder kurzfristig bei 4°C gelagert.

### **4.3.3. Isolierung und Reinigung von Proteinen**

#### **Immunpräzipitation/ Radioimmunpräzipitation**

Die bei 4.2.3. oder 4.3.1. gewonnenen Zelllysate wurden mit Hilfe des *Branson Sonifier 4503x* für 10 s bei voller Leistung homogenisiert und noch vorhandene Zelltrümmer danach bei 10.000 rpm (4°C) in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Vorinkubation wurden die Proben mit je 20  $\mu\text{l}$  Protein A-Sepharose (PAS; 1:2 in CoIP-Puffer versetzt und 1 h bei 4°C in einem Überkoprotierer inkubiert (Prä-PAS). Währenddessen wurde der Antikörper an die PAS gekoppelt, d.h. der Antikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung (s. u.) mit 25  $\mu\text{l}$  PAS (1:2 suspendiert in CoIP-Puffer) pro Ansatz in 500  $\mu\text{l}$  CoIP-Puffer oder MVA-T7-infiziertem HeLa-Zelllysate-Überstand (ad 1 mM PMSF und 1 mM DTT) für 1 h bei 4°C in einem Überkoprotierer inkubiert. Die Antikörper-PAS-Komplexe wurden 2x mit je 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem CoIP-Puffer gewaschen und nachher in 50  $\mu\text{l}$  CoIP-Puffer (ad 1 mM PMSF, 1 mM DTT oder 2 mM DTT, 100  $\mu\text{M}$  Na-Orthovanadate, 1:25 PIC und 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin) pro Ansatz resuspendiert. Die Prä-PAS-Proben wurden für 2 min bei 10.000 rpm (4°C) zentrifugiert, der Überstand in

frische Reaktionsgefäße überführt und jede Probe mit 25 µl der Antikörper-PAS-Komplexe versetzt. Hinterher wurden die Proben für 2 h bei 4°C in einem Überkopftrotierer inkubiert. Dem Inkubationsschritt folgte 3x Waschen mit je 500 µl CoIP-Puffer (s. o.). Schließlich wurde zu den sedimentierten Immunkomplexen 15 µl 4x Proteingel-Probenpuffer gegeben und 5 min aufgekocht. Die Probe war nun bereit zur Auftrennung mittels SDS-PAGE (4.3.4.).

Verdünnungsverhältnisse für die verwendeten Antikörper:

monoklonaler $\alpha$ -NP IgG-Antikörper 2B10	1:500-1:1.000
polyklonales $\alpha$ -NC-Antiserum	1:500
monoklonaler $\alpha$ -Flag IgG-Antikörper M2	1:1.000
polyklonales $\alpha$ -VP35-Antiserum	1:2.000
polyklonales $\alpha$ -VP30-Antiserum	1:1.000
polyklonales $\alpha$ -Ebo-VP30-Antiserum	1:1.000

### **Bindung an Glutathion-S-Transferase (GST pull-down)**

Zur Reinigung des GST oder der GST-Fusionsproteine wurden diese an Glutathion (GSH)-Sephrose gekoppelt. Dazu wurden 25 µl GSH-Sephrose entsprechend den Herstelleranweisungen aufbereitet, mit dem 1 ml-Aliquot (GST oder GST-Fusionsprotein; s. 4.2.1.) vereinigt und 12 - 14 h bei 4°C auf dem Überkopftrotierer inkubiert. Die Inkubation erfolgte in Gegenwart von 5 mM DTT. Dadurch erhöhte sich die Bindung des GST an das GSH. Anschließend wurde die mit GST oder mit einem GST-Fusionsprotein gekoppelte GSH-Sephrose 3x mit PBS (ad 1 mM PMSF, 1 mM DTT oder 100 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1:25 PIC, 2 µg/ml Pepstatin, 1 mM DTT) gewaschen, in 15 µl 4x Proteingel-Probenpuffer aufgenommen und bei -20°C weggefroren.

Zur Abschätzung der Menge des sedimentierten Proteins wurde schließlich die Protein-Sephrose Suspension für 5 min bei 75°C (37°C) aufgekocht und über SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung analysiert (4.3.4. und 4.3.5.). Im Verlauf der pull-down-Analysen wurden gleiche Mengen GST-Fusionsprotein (NP bzw. VP35) und GST verwendet.

### **Quantifizierung der Daten des GST pull-down**

Sollten radioaktive Signale quantifiziert werden, wurde das Gel, die PVDF-Membran oder die DC-Platte auf einer Platte des Biolumager (Fuji Kangawa, Japan) exponiert (4.3.5.). Die Expositionszeit lag je nach Signalstärke zwischen 0,5 h und 2 d. Die Entwicklung der Platte erfolgte mit dem Biolumager. Zur Auswertung und Verarbeitung der erhaltenen Daten wurden die Programme BasReader und TINA 2.0 (RayTest, Freiburg) verwendet.

Die GST-Inkubation stellt den Hintergrund dar. Die Signale der GST-Inkubation jeder Probe wurde von ihrem GST-Fusionsprotein-Wert abgezogen. 1/8 der in vitro Translationsprodukte wurde über SDS-PAGE analysiert, je circa 25 µl für GST bzw. GST-Fusionsprotein eingesetzt. Die Signale der in vitro Translationsprodukte werden mit 3,125 (25/ 8) multipliziert, das ergibt die Signalstärke des Gesamttranslationsprodukts. Die bereinigten Werte der GST-

Fusionsprotein-Interaktion und des Gesamttranslationsprodukts werden ins Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis ist die Menge (%) an präzipitiertem Protein. Die Bindung des NP-Wildtyp an das GST-Fusionsprotein wurde willkürlich 100% gesetzt. Zum Schluss wurden alle Werte zum NP-Wildtyp-Wert ins Verhältnis gesetzt und so die Bindung der einzelnen Mutanten bestimmt. Von allen mindestens dreimal durchgeführten Versuchen wurde die Standardabweichung (s) bestimmt.

#### 4.3.4. Indirekte Immunfluoreszenz

Die zu analysierenden Zellen (4.2.2.) wurden auf runden Deckgläsern (12 mm) in 6well-Platten (s. pulse-chase-Experiment, 4.3.1.) angezchtet. Wurden rekombinante, mit dem MVA-T7 Expressionssystem (4.2.3.) exprimierte Proteine untersucht, wurde die Zelldichte auf ca. 50% Konfluenz eingestellt. 8 h nach Infektion und Transfektion wurden die Zellen 3x mit kaltem PBS gewaschen und dann mit 3% Paraformaldehyd (in PBS) für 5 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung folgten 2x Waschen mit PBS und eine Inkubation der Zellen für 10 min mit 2 ml 100 mM Glycin (in PBS). Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte die Permeabilisierung der Zellen für 7 min mit 0,1% Triton X-100 (in PBS) und die Inkubation mit 2 ml IF-Blockierungspuffer. Anschließend wurden die Zellen mit dem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte im IF-Blockierungspuffer. Zur Inkubation wurden 25 µl des verdünnten Antikörpers tropfenförmig auf Parafilm aufgebracht und das Deckglas mit der zellbewachsenen Seite nach unten darübergerlegt. Die Inkubation fand in einer feuchten, dunklen Kammer für 1 h statt.

Verdünnungsverhältnisse für die verwendeten Primärantikörper:

monoklonaler $\alpha$ -NP IgG-Antikörper 2B10	1:25
polyklonales $\alpha$ -NC-Antiserum	1:100

Nach der Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper folgte 3x Waschen der Zellen mit PBS. Danach wurde die Zweitinkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper für 1 h in einer feuchten, dunklen Kammer durchgeführt.

Verdünnungsverhältnisse für die verwendeten Sekundärantikörper:

FITC-konjugiertes $\alpha$ -Maus-IgM F(ab') <sub>2</sub> -Fragment von der Ziege	1:200
Rhodamin-konjugierter $\alpha$ -Maus-IgG Antikörper von der Ziege	1:200

Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen. Dann wurden die Deckgläser in dH<sub>2</sub>O getaucht und mit der zellbewachsenen Seite nach unten mittels Fluoprep auf dem Objektträger eingedeckt. Nachdem das Präparat getrocknet war, konnten die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop 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 musste. Die photographische Dokumentation wurde mit Hilfe einer digitalen Kameraausrüstung (Spot Kamera, Version 3.1.2) durchgeführt.



### 4.3.5. Elektrophoretische Trennung von Proteinen

#### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE. Die Gelmatrix wurde anhand von Literaturrezepten hergestellt. Es wurden 4%ige Sammelgele und 8%, 10% bzw. 12%ige Trenngele verwendet. Als Größenmarker dienten 2 µl Rainbow-Protein-Marker (14 - 220 kDa) bzw. bei radioaktiven Gelen 0,5-1 µl [<sup>14</sup>C]-Rainbow-Protein-Marker (14 - 220 kDa). Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Gelauftrag mit 4x Proteingel-Probenpuffer im Verhältnis 1:2 versetzt und für maximal 5 min bei 37°C, 75°C oder 95°C aufgekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Proteingel-Laufpuffer bei einer Stromstärke von 15 - 30 mA/ Gel und dauerte 1 - 2 h. Zur Durchführung der Elektrophorese wurden Proteingelkammern der Firma von Keutz (Reiskirchen) und Stromquellen der Firma Consort (Turnhout, Belgien) verwendet.

#### Fixieren & Trocknen von SDS-Gelen

SDS-PAGE-Gele wurden nach der Elektrophorese für 10 min in Gel-Fixierlösung geschwenkt oder einer Coomassie-Blau-Färbung unterzogen (4.3.5.), anschließend auf drei Lagen Gel-Blot-Papier platziert, mit Frischhaltefolie abgedeckt und mit Hilfe des Vakuummeltrockners getrocknet.

### 4.3.6. Visualisierung gelelektrophoretisch getrennter Proteine

#### Coomassie-Blau-Färbung

Zur Darstellung der gelelektrophoretisch aufgetrennten, nicht-radioaktiven Proteine wurden die Polyacrylamidgele in einer Coomassie-Blau-Lösung für 20 - 30 min (RT) auf einem Horizontalschüttler inkubiert und anschließend unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung (Gel-Fixierlösung) so lange entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Die Gele wurden zwischen Einmachfolie auf spezielle Rahmen aufgezogen und über Nacht bei RT getrocknet.

#### Elektrotransfer von Proteinen (Western-Immuno-Blot)

Bei dieser Methode wurden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (4.3.4.) mittels einer Elektroblo-Apparatur auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dabei wurden die Proteine irreversibel an die Membran gebunden und immunologischen Nachweisreaktionen zugänglich. Die PVDF-Membran musste vor dem Transfer für 2 - 5 min in 100% EtOH eingelegt und anschließend mit Anodenpuffer II gewaschen werden. Dann wurden jeweils 3 - 5 Blätter Gel-Blot-Papier mit Anodenpuffer I, Anodenpuffer II bzw. Kathodenpuffer getränkt. Der Elektrotransfer der Proteine vollzog sich für 80 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/ cm<sup>2</sup> Membran. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in PBS mit WB-Blockierungspuffer und 0,1% Tween20 für 1 h (RT) oder 12-16 h (4°C) inkubiert.

### Proteindetektion über Chemiluminiszenz

Gelottete Proteine wurden mittels Protein-spezifischem Erstantikörper und Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörpern (POD-Zweitantikörper) detektiert.

Die Membran wurde 3x auf dem Horizontalschüttler in PBS mit 0,1% Tween20 gewaschen und dann 1 h (RT) mit der Erstantikörperverdünnung inkubiert. Die Menge richtete sich nach dem Grad der Verdünnung (Verd. s. u.). Danach folgte 3x Waschen in PBS mit 0,1% Tween20, Inkubation mit 25 ml POD-Zweitantikörperverdünnung - (Verd. s. u.) - für 1 h (RT) und erneut 3x Waschen. Die Waschschritte bis hierhin erfolgten jeweils in PBS mit 0,1% Tween20 für 5 - 10 min bei RT. Zuletzt wurde noch 2x mit PBS für 5 - 10 min bei RT gewaschen.

Erstantikörper	Verdünnung für Western-Immuno-Blot
monoklonaler $\alpha$ -NP IgG-Antikörper 2B10	1: 10.000
polyklonales $\alpha$ -NC Antiserum	1: 10.000
Zweitantikörper	Verdünnung für Western-Immuno-Blot
Esel $\alpha$ -Maus Antikörper (Dianova)	1:50.000 – 1:80.000
Ziege $\alpha$ -Kaninchen Antikörper (Dianova)	1:50.000 – 1:80.000
Kaninchen $\alpha$ -Maus Antikörper (Dako)	1:25.000

Die Detektion des gebundenen POD-Zweitantikörpers erfolgte mittels Chemiluminiszenz. Hierzu wurde das *Super Signal Ultra<sup>TM</sup> Reagenz* verwendet. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Membran in eine nach einer Seite geöffnete Plastiktasche gegeben. Die mitgelieferten Detektionslösungen 1 und 2 wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und so auf die Membran gegeben, dass diese gerade mit Flüssigkeit bedeckt war. Nach 5 min 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 variierte zwischen 10 s und 1 h.

### Nachweis radioaktiv-markierter Proteine mit dem Biolumineszenz Analyzer BAS-1000

Radioaktiv markierte Proteine, die auf einem Gel aufgetrennt (4.3.4.) oder auf eine PVDF-Membran transferiert worden waren (s. o.), sowie DC-Platten mit radioaktiven Proben (4.3.2.) wurden mittels des Biolumineszenz Analyzer BAS-1000 (Biolumineszenz Analyzer) oder über Autoradiographie nachgewiesen. Ein Gel wurde für die Exposition nach der Elektrophorese fixiert wie bei 4.3.4. beschrieben. Eine PVDF-Membran oder DC-Platte musste für eine Exposition nur an der Luft getrocknet werden.

Sollten die radioaktiven Signale quantifiziert werden, wurde das getrocknete Gel, die Membran oder die DC-Platte auf einer Biolumineszenz-Platte exponiert. Die Expositionszeit lag je nach Signalstärke zwischen 1 h und 2 d. Die Entwicklung der Biolumineszenz-Platte erfolgte mit dem

Biolmager. Zur Auswertung und Verarbeitung der erhaltenen Daten wurden die Programme BasReader und TINA 2.0 (RayTest, Freiburg) verwendet. Für eine Autoradiographie wurde das getrocknete Gel oder die Membran auf einem Biomax-Röntgenfilm für 1 h bis 4 d exponiert.

#### **4.3.7. Entfernen von Proteinen von Membranen (*stripping*)**

PVDF-Membranen wurden nach der Proteindetektion mittels Chemilumineszenz für 10 min in PBS geschwenkt und dann 30 min bei 50°C in *stripping*-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran 3x in PBS mit 0,1% Tween20 für 5 - 10 min (RT) gewaschen. Im Anschluss an das *stripping* wurde die Proteindetektion über Chemilumineszenz (4.3.6.) wiederholt.

## 5. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war, Bereiche innerhalb des MARV-NP zu bestimmen, die für Homo- und Heterooligomerisierung des Hauptnukleokapsidproteins notwendig sind. Diese Bereiche sollten im Hinblick auf strukturelle Merkmale und Funktionen während der viralen RNA-Synthese charakterisiert werden.

### 5.1. Charakterisierung von NP-Homooligomerisierungsdomänen

Das NP, Hauptbestandteil des Nukleokapsidkomplexes, interagiert mit anderen Proteinen des MARV Nukleokapsidkomplexes und auch mit sich selbst (Becker et al., 1994, 1998). Es führt in Virus-infizierten Zellen sowie bei rekombinanter Expression zur Bildung charakteristischer Einschlusskörper. Innerhalb dieser NP-induzierten Einschlusskörper bildet es hochgeordnete tubuläre Strukturen, die in ihrer Form dem Grundgerüst der Nukleokapside entsprechen (Nukleokapsid-ähnliche Strukturen) (Kolesnikova et al., 2000). Im Verlauf seiner Reifung bildet das NP vermutlich auch andere oligomere Formen wie Dimere, Trimere oder Hexamere. Die vorliegende Arbeit sollte zunächst die Homooligomerisierungsdomänen auf dem NP identifizieren und charakterisieren. Dazu wurden GST-Bindungs- und Immunfluoreszenzanalysen benutzt.



**Abb. 5: Übersicht der zu Beginn der Untersuchungen bekannten Daten zur Homooligomerisierung des Marburg-Virus-NP. A. Verteilung der zur Homooligomerisierung erforderlichen Bereiche auf dem linear dargestellten MARV-NP.** NP-Wildtyp (695 AS) ist als Balken dargestellt. Heller Kasten: N-terminaler Bereich: war zur Homooligomerisierung unentbehrlich (AS 118-234). Gestreifter Kasten: C-terminaler Bereich: unterstützt die Homooligomerisierung (AS 235-695). **B. Bildung von Einschlusskörpern durch NP-Deletionsmutanten.** NP-Wildtyp und verschiedene NP-Deletionsmutanten sind als Balken dargestellt. Die Fähigkeit der Mutanten, Einschlusskörper zu bilden, ist mit + oder - bezeichnet.

Aus Vorversuchen mit einer Reihe von C- und N-terminalen NP-Deletionsmutanten war bekannt, dass eine NP-Homooligomerisierungsdomäne im Bereich der Aminosäuren 118-235 (HOD<sub>N</sub>) liegen musste und mindestens eine weitere C-terminal davon (AS 235-695, siehe Abb. 5A). Durch Immunfluoreszenzanalysen wurde außerdem

festgestellt, dass die Bildung von Einschlusskörpern offensichtlich einer Kooperation beider Homooligomerisierungsdomänen bedarf (Abb. 5B).

### **5.1.1. Eingrenzung der NP-Homooligomerisierungsdomäne**

#### **5.1.1.1. Eingrenzung der NP-Homooligomerisierungsdomäne durch C-terminale Deletionsmutanten**

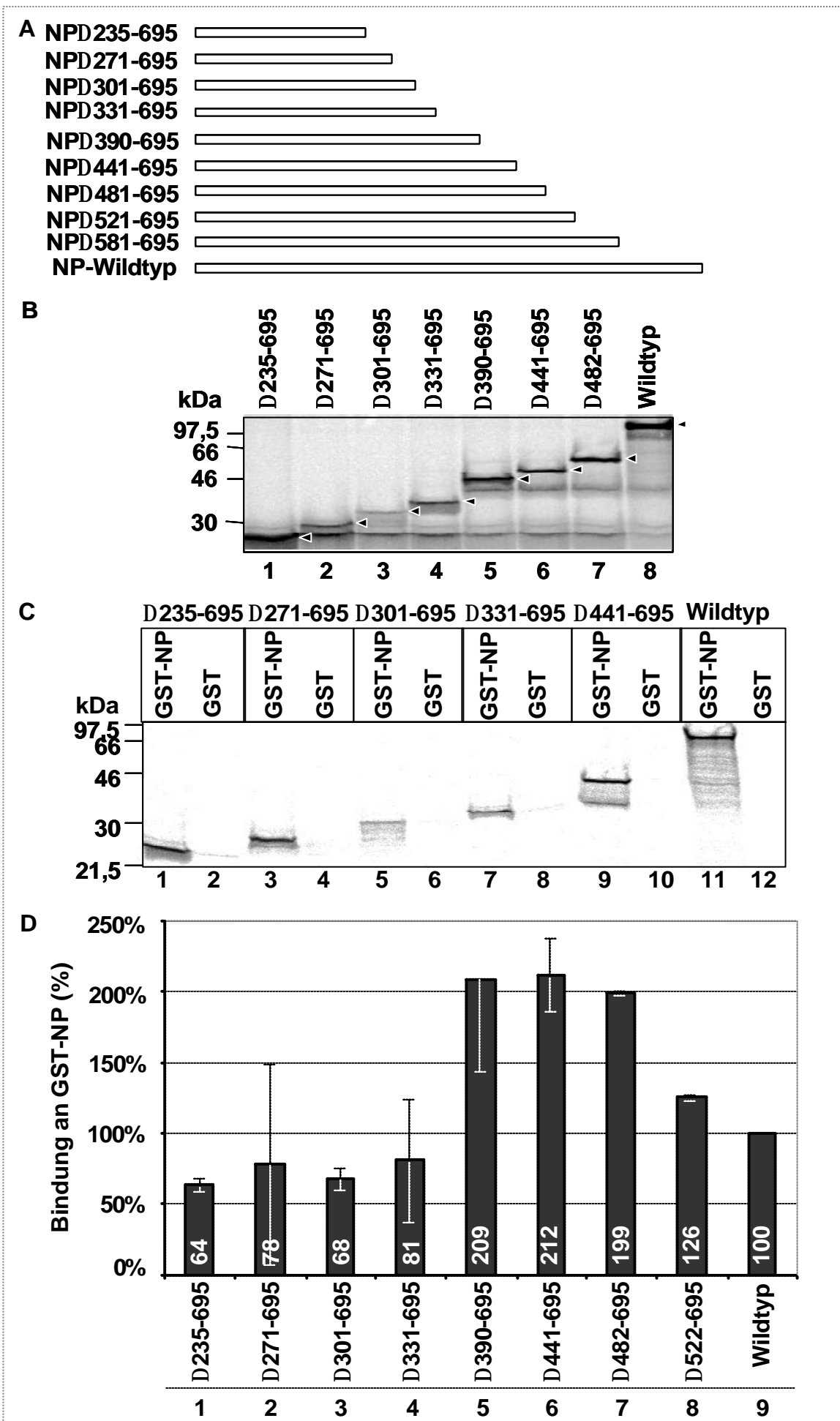
Um die C-terminale Oligomerisierungsdomäne näher zu charakterisieren, wurden NP-Deletionsmutanten durch sukzessive C-terminale Verkürzung des NP hergestellt. Die C-terminalen NP-Deletionsmutanten wurden anschließend im Glutathion-S-Transferase (GST) pull-down eingesetzt. Hier lässt man die *in vitro* translatierten, radioaktiv-markierten Proteine mit einem Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und NP (GST-NP) reagieren, um ihre Affinität zu dem bakteriell exprimierten GST-NP zu bestimmen.

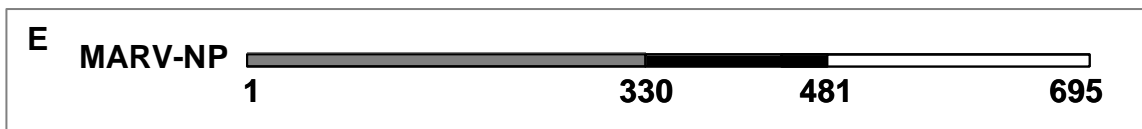
#### **Herstellung der C-terminalen NP-Deletionsmutanten**

Die C-terminalen NP-Deletionsmutanten NP $\Delta$ 235-695, NP $\Delta$ 390-695, NP $\Delta$ 441-695, NP $\Delta$ 481-695, NP $\Delta$ 521-695 und NP $\Delta$ 581-695 lagen der Arbeitsgruppe bereits vor. Zusätzlich wurden folgende Mutanten durch Einführen eines Stopp-Kodons aus NP $\Delta$ 390-695 mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, 4.1.4.) hergestellt: NP $\Delta$ 271-695, NP $\Delta$ 301-695 und NP $\Delta$ 331-695. Alle bereits vorhandenen NP-Mutanten waren in den Vektor pGEM-3zf inkloniert (4.1.2.). In Abb. 6A sind die erwarteten Translationsprodukte der C-terminalen NP-Deletionsmutanten als sich verkürzende Balken dargestellt. Die Bezeichnung der Mutanten richtet sich nach der eingebrachten Deletion.

#### **In vitro Translation der C-terminalen NP-Deletionsmutanten**

Die konstruierten Plasmide wurden mit dem TNT quick-coupled Kit unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin *in vitro* synthetisiert und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft (4.1.9. und 4.3.5.). Je ein Achtel der Proben wurde auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die C-terminalen NP-Deletionsmutanten ließen sich alle exprimieren (Abb. 6B, Pfeilköpfe). Die eingebrachten Deletionen sorgten für eine leiterartige Auftrennung der Proteine. Diese reicht von NP $\Delta$ 235-695 mit einem Molekulargewicht von 26 kDa bis NP-Wildtyp mit 97 kDa. Am schwächsten war die Synthese des NP $\Delta$ 301-695 (Spur 3).





**Abb. 6: Eingrenzung der NP-Homooligomerisierungsdomänen durch C-terminale Deletionsmutanten.** **A. Schemata der verwendeten C-terminalen NP-Deletionsmutanten.** Die C-terminalen NP-Deletionsmutanten sind anhand der eingebrachten Deletion bezeichnet. Der synthetisierte Bereich der Proteine ist als heller Balken dargestellt. **B. In vitro Translation.** Die NP-Mutanten wurden mit TNT quick-coupled Mix synthetisiert. Anschließend wurde ein Aliquot jeder Probe einer SDS-PAGE unterzogen. Das Gel wurde fixiert, unter Vakuum getrocknet und die radioaktiven Signale mit dem Biolumineszenzanalysator analysiert. Links neben der Gel-Abbildung befinden sich die Markerbanden. Die Laufhöhe der jeweiligen NP-Mutanten ist mit einem Pfeilkopf markiert. **C. GST pull-down.** Der restliche Translationsmix wurde geteilt und einem GST pull-down Assay unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung befinden sich die Markerbanden. Die spezifischen Präzipitate mit GST-NP sind in den Spuren 1, 3, 5, 7, 9 und 11 gezeigt. Die Spuren 2, 4, 6, 8 und 10 zeigen die GST-Kontrolle. **D. Quantifizierung der radioaktiven Signale.** Gezeigt ist das prozentuale Verhältnis von eingesetzter und präzipitierter Menge der jeweiligen NP-Deletionsmutante. Die Bindung des NP-Wildtyp an das GST-NP wurde auf 100% gesetzt. Der Mittelwert aus drei Versuchen ist eingetragen. **E. Schematische Darstellung der Ergebnisse.** Schraffierter Kasten: Die Deletion dieses Bereichs (AS 331-695) führte zu einer Verminderung der NP-Homooligomerisierung. Die Bindungsstärke der N-terminalen AS 1-330 ist kleiner als NP-Wildtyp. Dunkler Kasten: Die Deletion dieses Bereiches (AS 482-695) verstärkt die Bindung gegenüber NP-Wildtyp.

### Expression und Aufreinigung von GST-NP aus *E. coli*

GST-NP und GST wurden in *E. coli* synthetisiert (4.2.1.), an Glutathion-Sepharose gekoppelt und über 4 Waschschriffe gereinigt (4.3.3.). Gleiche Mengen der gereinigten Proteine wurden in dem GST pull-down Assay eingesetzt (nicht gezeigt).

### Interaktion der C-terminalen NP-Deletionsmutanten mit GST-NP

Die *in vitro* translatierten C-terminalen NP-Deletionsmutanten (Abb. 6A) und NP-Wildtyp wurden mit dem gereinigten GST-NP bzw. GST für 12 h bei 4°C inkubiert. Die Inkubation der *in vitro* Translationsprodukte mit GST diente als Hintergrundkontrolle. Die Präzipitate wurden über drei Waschschriffe gereinigt (4.3.3.) und mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 6C). Zur Kontrolle der bakteriellen Expression wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt. Das getrocknete Gel wurde im Bio-Image Analyser BAS-1000 (Biolumineszenzanalysator) eingelesen und die Stärke der radioaktiven Signale mit dem Programm TINA 2.0 quantifiziert (Abb. 6A). Die Stärke des radioaktiven Signals, das sich bei der Präzipitation des NP-Wildtyp mittels GST-NP ergab, wurde gleich 100% gesetzt. Die Deletion der letzten 360 AS (AS 235-695, 301-695, 271-695 bzw. 331-695) hemmt die Bindung an NP-Wildtyp (Balken 1-4). Wurden aber die AS 390-695 des C-Terminus deletiert, so verdoppelte sich die Affinität für GST-NP. Gleiches ließ sich für die Deletion der AS 441-695 und 482-695 beobachten (Balken 5, 6 und 7). Demnach muss innerhalb des Bereichs der AS 330-390 eine weitere Oligomerisierungsdomäne lokalisiert sein. Wurde der C-Terminus nur um die AS 522-695 verkürzt, näherte sich die Affinität für GST-NP dem des NP-Wildtyp an (Balken 8).

Der C-Terminus des NP scheint die Bindung des NP an sich selbst zu inhibieren. Die Daten sind in Abb. 6D zusammengefasst. Auf dem schematisch dargestellten NP-Wildtyp sind die Bereiche eingetragen, deren Deletion die Homooligomerisierung beeinflussen. Daraus ergeben sich folgende Aussagen: 1) innerhalb der Aminosäuren 1-330 gibt es eine Bindungsstelle, 2) bis AS 390 eine weitere Bindungsstelle und 3) der C-terminale Bereich ab AS 480 wirkt sich hemmend auf die Bindung des NP an sich selbst aus. Es ist nicht klar, ob die Hemmung auf HOD<sub>N</sub> oder die AS 330-390 wirkt.

#### **5.1.1.2. Charakterisierung der NP-Homooligomerisierungsdomänen durch interne Deletionsmutanten**

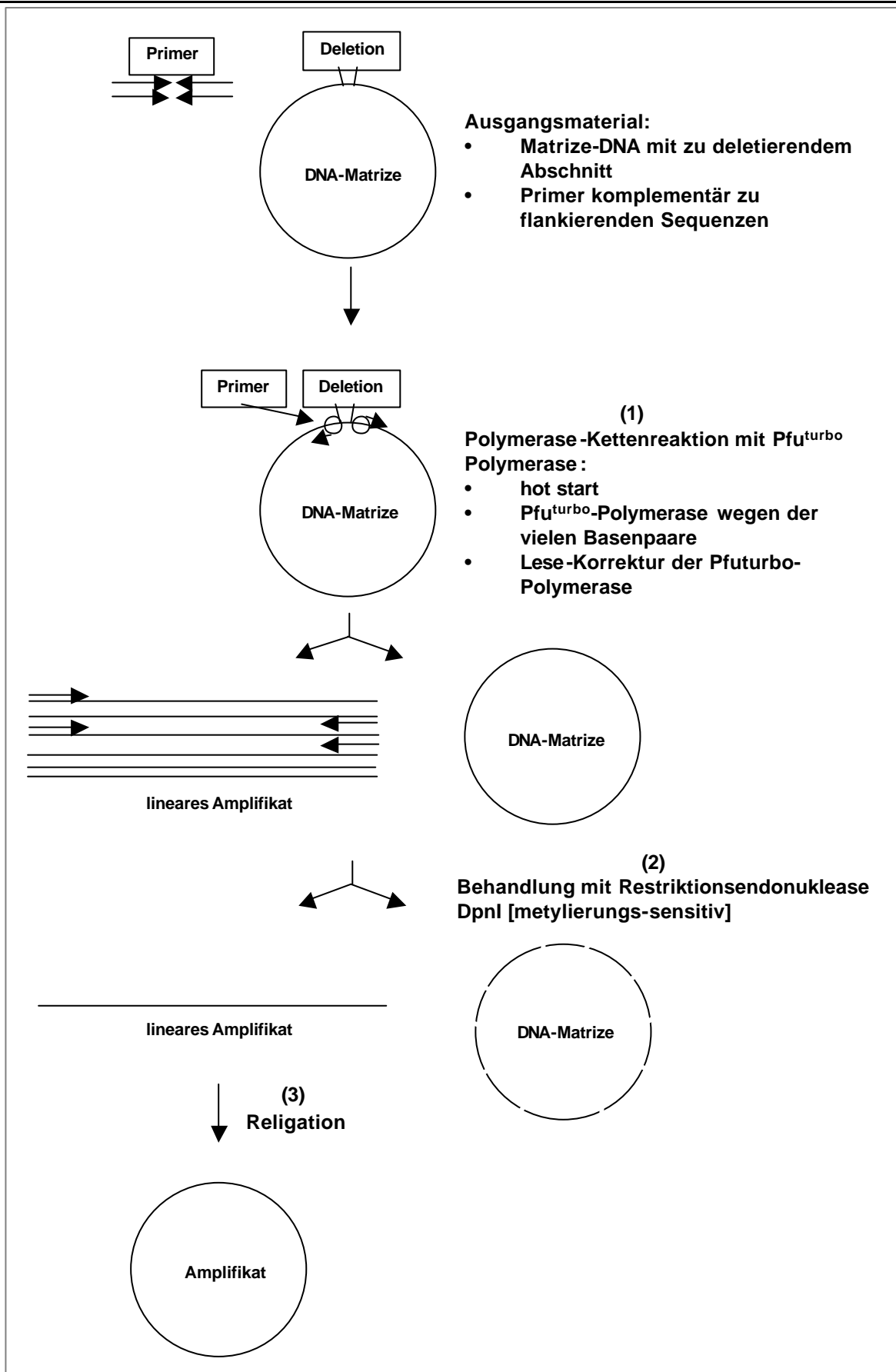
Als nächstes wurde der Bereich der AS 330-480 (Abb. 6D) genauer untersucht, der die Homooligomerisierung verstärkte. Dies geschah mittels Deletionen von je 10 AS, die den Bereich 330-480 überspannten (Abb. 8A). Die hergestellten Mutanten wiesen keine Überlappungen auf.

##### **Herstellung der internen NP-Deletionsmutanten**

Zur Herstellung der internen Deletionsmutanten wurde folgendes Mutagenese-Verfahren benutzt: Amplifizierung des Vektor-Rückgrats über glatte Enden produzierende Oligonukleotide (4.1.6.; Imai et al., 1991). Über diese kam es zur Aussparung der zu deletierenden Stelle. Das nicht-methylierte lineare Amplifikat war gegenüber der Restriktionsendonuklease (RE) Dpn I resistent, während das aus Bakterien gewonnene Ausgangsplasmid sensitiv war. Der Ansatz wurde mit Dpn I verdaut und das Amplifikat schließlich religiert (Abb. 7, 4.1.2., 4.1.7.). Mit Hilfe dieser Methode konnten 13 der geplanten 15 Mutanten hergestellt werden. Alle eingebrachten Mutationen wurden durch Sequenzierung verifiziert (4.1.8.).

Abb. 8A zeigt die internen NP-Deletionsmutanten als Balken mit einem Strich an der Position der eingeführten Deletion. Die Bezeichnung der Mutanten richtet sich nach der eingebrachten Deletion.





**Abb. 7: Ablauf der Klonierung mittels inverser PCR.** Die Mutagenese gliederte sich in drei Schritte: 1) Die PCR mit der Pfu-turbo-Polymerase nach der *hot start* Methode. 2) Die Behandlung mit der methylierungssensitiven RE DpnI verdaute spezifisch die methylierte Matrizen-DNA. Übrig blieben die linearisierten Amplifikate. 3) Am Schluss wurden die Amplifikate mit einer T4-DNA-Ligase religiert. Die Mutagenese wurde abschließend mittels Sequenzierung überprüft.

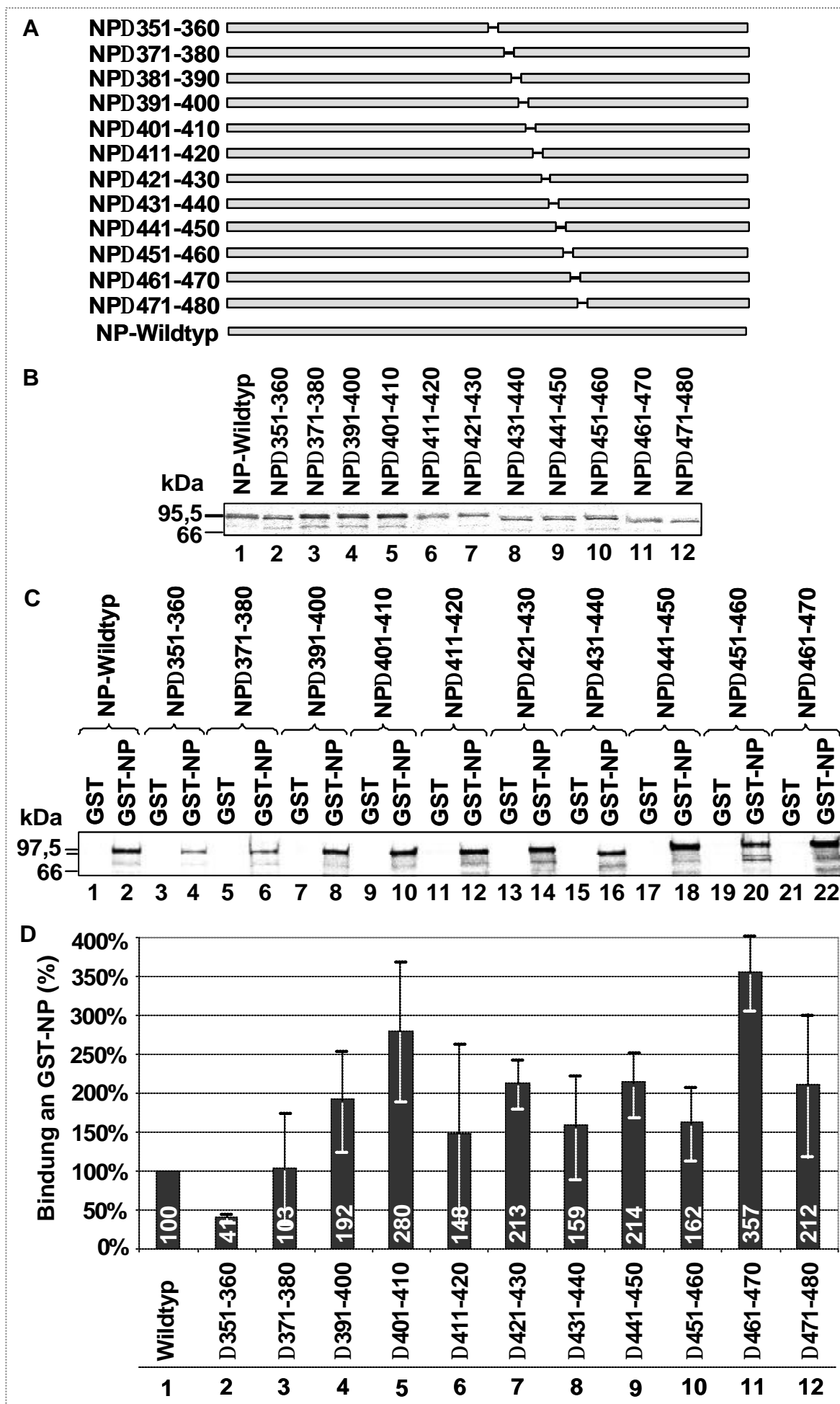
### **In vitro Translation der internen NP-Deletionsmutanten**

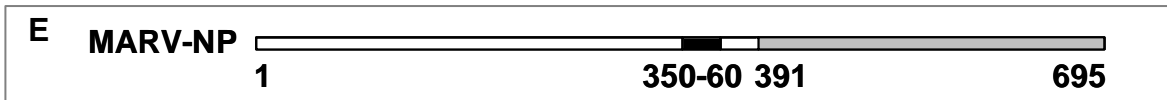
Die konstruierten Plasmide wurden mit dem TNT quick-coupled Kit unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin in vitro synthetisiert und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft (5.1.1., 4.1.9. und 4.3.5.). Je ein Achtel der Proben wurde auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Fast alle internen NP-Deletionsmutanten wurden stabil exprimiert (Abb. 8B). Einzig NP $\Delta$ 381-90 ließ sich nicht in vitro synthetisieren. Bei allen Mutanten und NP-Wildtyp konnte eine Doppelbande mehr oder weniger starker Ausprägung festgestellt werden. Ihre Bedeutung ist noch unklar.

### **Interaktion der internen NP-Deletionsmutanten mit GST-NP**

Die in vitro translatierten internen NP-Deletionsmutanten (Abb. 8A) und NP-Wildtyp wurden nun analog zu 5.1.1.1. im GST pull-down eingesetzt und mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt (4.1.9., 4.3.3. und 4.3.5.; Abb. 8C). Die Inkubation der in vitro Translationsprodukte mit GST diente wieder als Hintergrundkontrolle. Das getrocknete Gel wurde eingescannt und die Stärken der Proteinbanden mit dem Programm TINA 2.0 quantifiziert. Abb. 8D zeigt die Auswertung des pull-down. Die Bindung des NP-Wildtyp an GST-NP wurde gleich 100% gesetzt. Es zeigte sich, dass die Anwesenheit der AS 351-60 notwendig war, um eine NP-Wildtyp entsprechende Oligomerisierung zu vermitteln (Balken 2). Dagegen hatte die Deletion der AS 371-80 keinen Einfluss auf die NP-Interaktion (Balken 3). Die Mutante mit der Deletion AS 381-90 wurde nicht untersucht, da das konstruierte Plasmid nicht synthetisiert werden konnte. Es zeigte sich, dass die Deletion der AS 391-480 die Homooligomerisierung förderte. Die Steigerung der NP-Homooligomerisierung war periodisch: der positive Einfluss wurde abwechselnd alle 20 AS stärker. Die Deletion der AS 401-10 und 461-70 (Balken 5 und 11) lösten eine sehr starke Homooligomerisierung aus. Besonders die Deletion der AS 461-70 schien eine maximale Oligomerisierung zu erlauben (Balken 11).

In Abb. 8E wurde das Experiment zusammengefasst: die Deletion der AS 350-60 inhibiert die Homooligomerisierung. Möglicherweise befindet sich dort eine Bindungsstelle (HOD 2). Deletionen im Bereich der AS 391 – 480 wirken sich positiv auf die Homooligomerisierung des NP aus. Diese Ergebnisse decken sich mit den Versuchen, die in Abb. 6 dargestellt sind.





**Abb. 8: Charakterisierung der NP-Homooligomerisierungsdomäne durch interne Deletionsmutanten. A. Schemata der internen NP-Deletionsmutanten.** Im Bereich der Aminosäure 330-480 des NP werden schrittweise je 10 AS deletiert. Die hellen Kästen markieren den kodierten Proteinbereich, die Striche die Deletion. 12 der geplanten 15 internen Deletionsmutanten wurden untersucht. Die internen NP-Deletionsmutanten sind anhand der eingebrachten Deletion bezeichnet. **B. In vitro Translation.** Die konstruierten NP-Mutanten wurden, wie unter Abb. 6 beschrieben, in vitro translatiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. **C. GST pull-down.** Der restliche Translationsmix wurde, wie unter Abb. 6 beschrieben, einem GST pull-down Assay und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die spezifischen Präzipitate sind in den Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 und 22 gezeigt. Die Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21 zeigen den GST-Hintergrund. **D. Quantifizierung der radioaktiven Signale.** s. Abb. 6. **E. Auswirkung der Deletionen auf die Homooligomerisierung.** Die Deletion der AS 350-360 vermindert die Homooligomerisierung deutlich (schwarzer Kasten). Im Gegensatz dazu verstärken Deletionen im Bereich der AS 391-400 des C-Terminus die Homooligomerisierung deutlich (schraffierter Kasten).

### Einfluss der internen NP-Deletionen auf die virale RNA-Synthese

Das NP ist ein essentieller Faktor für Transkription und Replikation der MARV-RNA (Mühlberger et al., 1998). In einem artifizialen Replikationssystem wurde untersucht, welche Auswirkung die internen Deletionen im NP (Abb. 8A) auf seine Funktion während der viralen RNA-Synthese hatten. Dazu wurden HUH T7-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für ein MARV-spezifisches Minigenom sowie für die drei Nukleokapsid-assoziierten Proteine NP, VP35, und L kodieren (4.3.1.). Das NP wurde in den jeweiligen Ansätzen durch eine der in Abb. 8A beschriebenen Deletionsmutanten ersetzt. 38 h nach Transfektion wurde mit den Zellysaten eine CAT-Aktivitätsbestimmung durchgeführt (4.3.1.; Abb. 9 unten).

Zur Expressionskontrolle wurde ein Western-Immunoblot durchgeführt (4.3.6., Abb. 9A oben). Die MARV-spezifische Transkription war, wie erwartet, in Anwesenheit von NP-Wildtyp detektierbar (Spur 1). Die internen NP-Deletionsmutanten NP $\Delta$ 371-80, 381-90, 391-400 sowie 451-60 konnten NP-Wildtyp nicht ersetzen (beispielhaft Spur 3, 4 und 5). Im Bereich der AS 451-60 liegt ein Aspartat-Rest (458), dessen essentielle Rolle für die virale Transkription schon früher gezeigt werden konnte (Di Carlo, 2000). Die interne NP-Deletionsmutante NP $\Delta$ 381-90 war negativ, da sie in HUH T7-Zellen nicht exprimiert werden konnte (Spur 4). Zusammengefasst, scheint der Bereich der AS 371-400 wesentlich für die MARV-spezifische Transkription zu sein. Bei den internen NP-Deletionsmutanten, die NP-Wildtyp ersetzen konnten, ließ sich keine Korrelation zwischen Bindungsstärke und Transkriptionseffizienz feststellen (z. B. Transkriptionseffizienz: vgl. Spur 5 und 7 mit Spur 6; Bindungsstärke: s. Abb. 8D).

## **Intrazelluläre Verteilung der internen NP-Deletionsmutanten in Gegenwart des Replikationskomplexes**

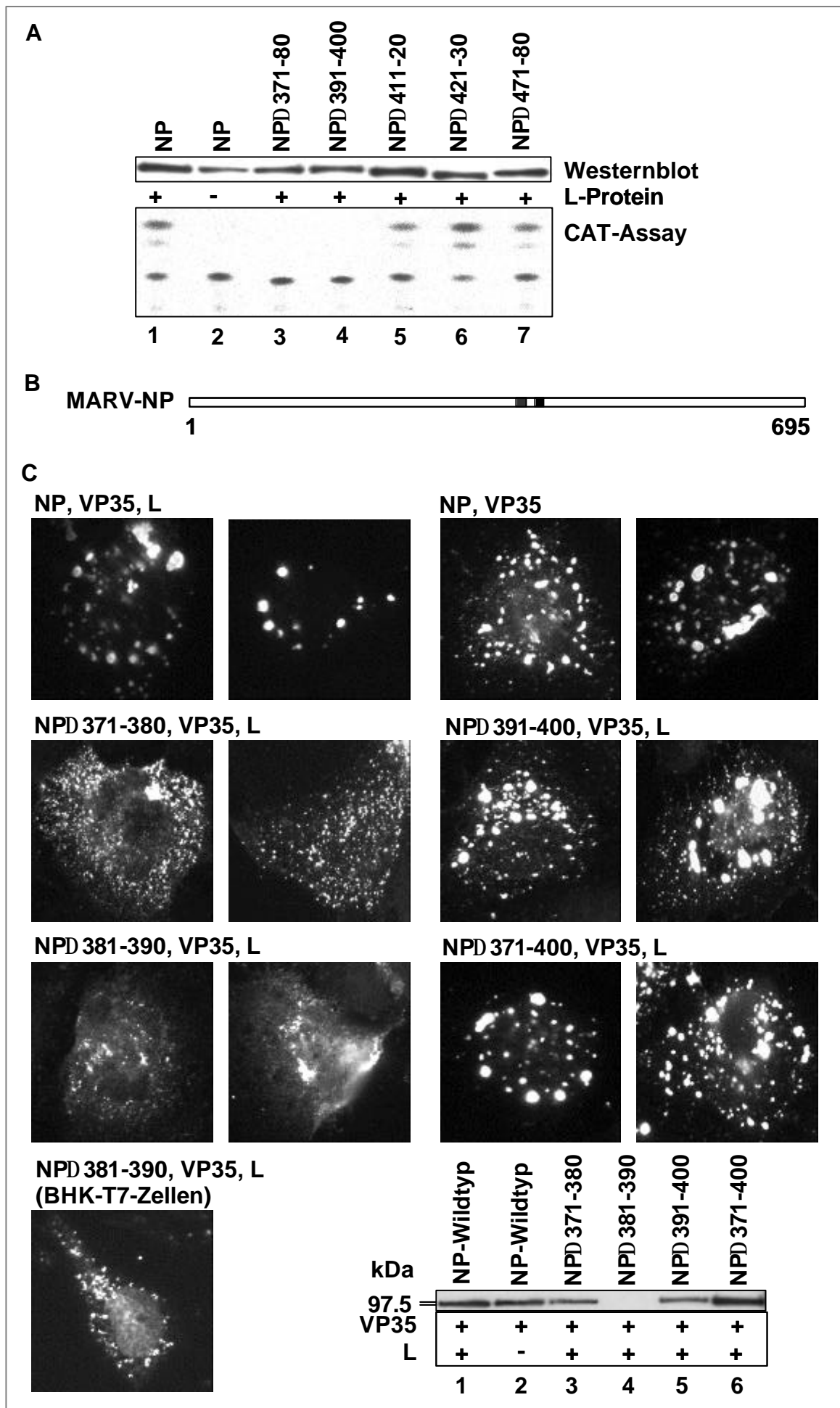
Um zu untersuchen, ob durch die internen Deletionen die Zusammenlagerung des NP zu Einschlusskörpern gestört ist, wurden HUH T7-Zellen analog zu oben transfiziert und 38 h p. t. einer indirekten Immunfluoreszenz unterzogen (4.3.4.). Das NP wurde in den jeweiligen Ansätzen durch eine der transkriptions-inkompetenten internen NP-Deletionsmutanten NP $\Delta$ 371-80,  $\Delta$ 381-90,  $\Delta$ 391-400 und  $\Delta$ 371-400 (Abb. 3A) ersetzt.

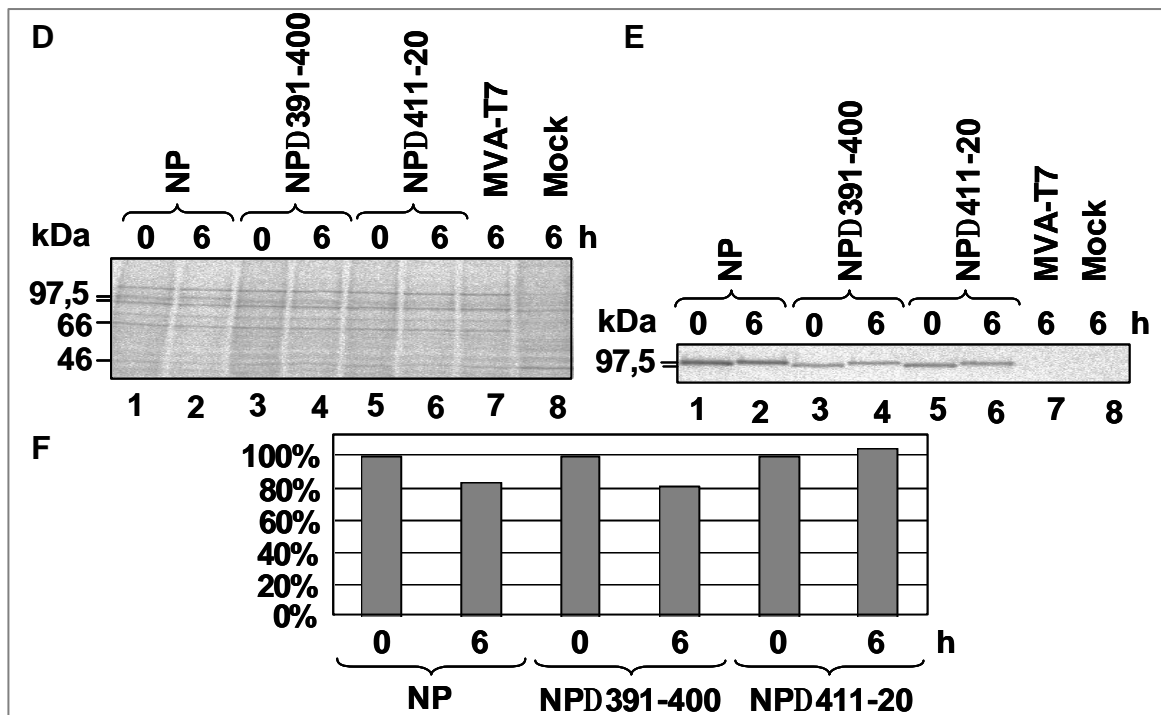
Abb. 9D zeigt die Überprüfung der Expression der getesteten Mutanten über einen Western-Immunoblot. Mit Ausnahme von NP $\Delta$ 381-390 waren alle Mutanten in der Lage, Einschlusskörper zu induzieren (Abb. 9C). NP $\Delta$ 381-390 wurde in HUH T7-Zellen fast gar nicht exprimiert. Offensichtlich war die Expression dieser Mutante Zelltyp-abhängig. Untersuchungen in BHK T7/5-Zellen enthüllten eine etwas stärkere Expression. Trotzdem konnte die Mutante NP-Wildtyp nicht im Replikations-/ Transkriptionsassay ersetzen. Die Aggregate waren deutlich kleiner als NP-Wildtyp. Die intrazelluläre Verteilung von NP $\Delta$ 391-400 und NP $\Delta$ 371-400 unterschied sich kaum von NP-Wildtyp. Im Gegensatz dazu war NP $\Delta$ 371-80 in kleinen Aggregaten über das gesamte Zytoplasma verteilt.

Diese Analyse machte deutlich, dass für die Transkriptionsunterstützende Funktion des NP die NP-typischen Einschlusskörper wahrscheinlich nötig sind. Eine korrekte intrazelluläre Verteilung garantiert dennoch nicht, dass NP ordnungsgemäß arbeitet.

### **Einfluss der internen Deletionen auf die Stabilität des NP**

Die internen NP-Deletionsmutanten, die die virale Transkription nicht mehr unterstützten, wurden auf ihre intrazelluläre Stabilität geprüft. Damit sollte untersucht werden, ob die fehlende Transkriptionsaktivität auf einer zu geringen NP-Konzentration beruhte. NP-Wildtyp und einige interne NP-Deletionsmutanten wurden mittels MVA-T7 Expressionssystem in HeLa-Zellen exprimiert und einem *pulse-chase*-Experiment unterzogen (4.2.3. und 4.3.2.). Der *chase* erstreckte sich über 6 h. Die Proben wurden zuletzt einer Immunpräzipitation mit dem  $\alpha$ -NC Antiserum unterzogen (4.3.3.) (Abb. 9F). Zur Quantifizierung wurden die NP-spezifischen Signale (Abb. 9F) mit der Gesamtproteinmenge (Abb. 9E) verrechnet (3.6.). Keine der funktionsletalen Deletionen führte zu einem verstärkten Abbau des NP. Vielmehr zeigte sich, dass NP sehr stabil ist. Noch nach 6 h waren circa 80% der Proteine vorhanden (Abb. 9G). Die Deletion der AS 411-20 scheint das NP sogar zu stabilisieren. Die Proteinmenge war nach 6 h unverändert (Abb. 9G, NP $\Delta$ 411-420).





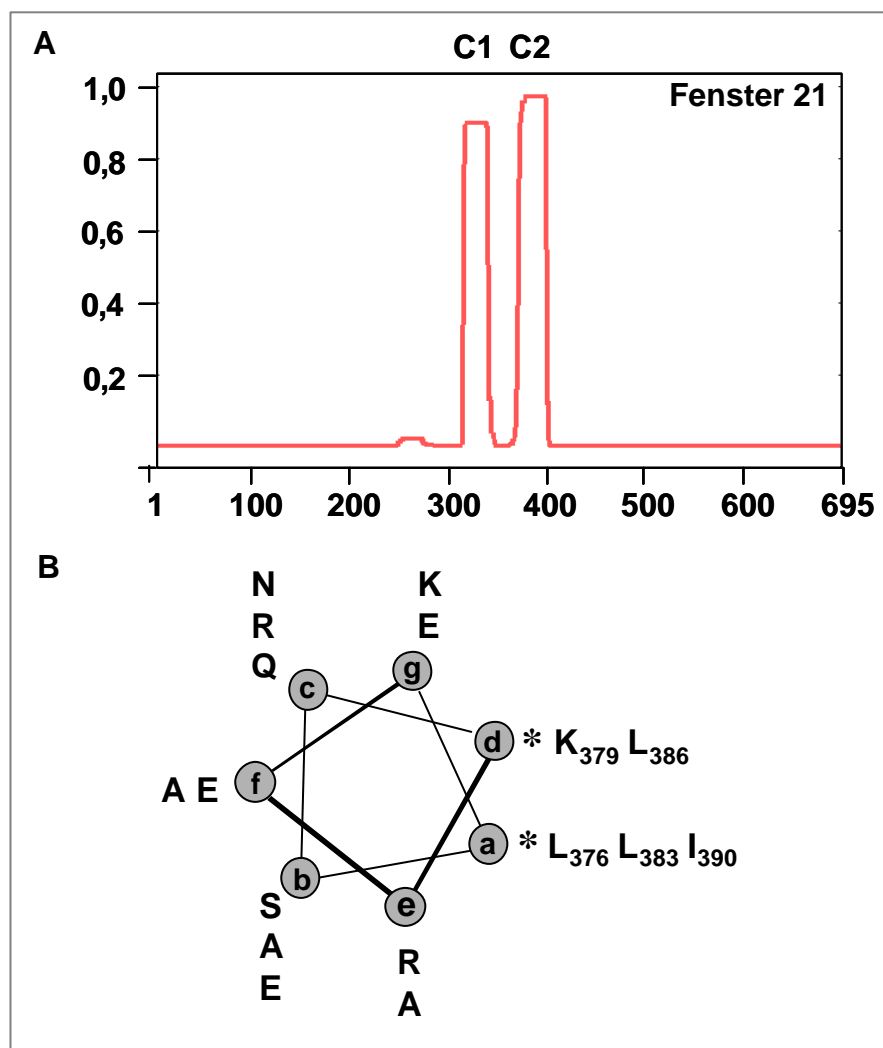
**Abb. 9: Einflusses der internen NP-Deletionen auf die viralen RNA-Synthese.** HUH-T7-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für das MARV-spezifische Minigenom, L und VP35 kodieren. Außerdem wurde jeweils entweder ein Plasmid transfiziert, das für NP-Wildtyp oder die angegebenen NP-Mutanten kodiert. Nach 38 h wurden die Zellen gewaschen und lysiert. **A. Replikations-/Transkriptionsassay.** Oben: Ein Aliquot des Zelllysats wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit einem Kaninchen  $\alpha$ -NC Antiserum (Verdünnung 1:10.000) inkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem POD-markierten  $\alpha$ -Kaninchen IgG Zweitantikörper (Verdünnung 1:50.000) detektiert. Unten: 1-3  $\mu$ l des Zelllysats wurde einem CAT-Reportergenassay unterworfen. Die Proben wurden auf einer Dünnschichtchromatographieplatte (DC-Platte) aufgetragen und aufgetrennt. Die DC-Platte wurde auf einer Bio-Image Analyser-Platte (Biolumager-Platte) je nach Signalstärke 1-12 h exponiert. **B. Zusammenfassung der Ergebnisse am linearen MARV-NP-Modell.** Schwarze Bereiche ( $\Delta$ 371-80 und  $\Delta$ 391-400) sind für die Funktion des Proteins während Replikation und Transkription essentiell.

**Einfluss der internen NP-Deletionen auf die Bildung der Einschlusskörper.** HUH-T7-Zellen (zum Teil auf Deckgläschen) wurden mit den oben beschriebenen Plasmiden transfiziert. Nach 38 h wurden die Zellen auf dem Deckgläschen gewaschen und fixiert, die restlichen Zellen gewaschen und lysiert. **C. Immunfluoreszenz- und Western-Immunoblot-Analyse.** Die Zellen auf den Deckgläschen wurden permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzanalyse unterworfen. Die NP-Mutanten wurden mit einem Kaninchen  $\alpha$ -NC Antiserum (Verdünnung 1:100) inkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem FITC-markierten  $\alpha$ -Kaninchen IgG Zweitantikörper (Verdünnung 1:200) detektiert. Ein Aliquot des Zelllysats wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit einem Kaninchen  $\alpha$ -NC Antiserum (Verdünnung 1:10.000) inkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem POD-markierten  $\alpha$ -Kaninchen IgG Zweitantikörper (Verdünnung 1:50.000) detektiert. Für NP $\Delta$ 381-390 wurde der Versuch in BHK-T7/5-Zellen wiederholt. BHK-T7/5-Zellen wurden mit den oben beschriebenen Plasmiden transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen gewaschen, fixiert und einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. **Einfluss der internen NP-Deletionen auf die intrazelluläre Stabilität.** HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und 1 h später mit den angegebenen NP-Mutanten transfiziert. Nach 14 h wurden die Zellen gewaschen und einem *pulse-chase*-Experiment unterworfen. 1 h bzw. 7 h p.i. wurden die Zellen gewaschen und lysiert. **D. Gesamtproteinmenge.** Ein Aliquot des Zelllysats wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Biolumager analysiert. **E. Immunpräzipitation.** Die restliche Probe wurde einer Immunpräzipitationsanalyse unterworfen. Die NP-Mutanten wurden mit einem Kaninchen  $\alpha$ -NC Antiserum (Verdünnung 1:500) 1 h inkubiert, das 30 min mit Zelllysats vorbehandelt war, und die gebundenen Antikörper 1 h mit Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Präzipitate wurden gewaschen und einer SDS-PAGE unterzogen. Das Gel wurde auf einer Biolumagerplatte über Nacht exponiert. **F. Quantifizierung der radioaktiven Signale.** Die Signale der Immunpräzipitation wurden mit der Gesamtproteinmenge normalisiert. Die 0 h-Werte wurden auf 100% gesetzt. Das prozentuale Verhältnis der 6 h-Werte ist nebenan dargestellt.

### 5.1.2. Coiled-Coil-Motive im NP als Homooligomerisierungsdomäne

Coiled-Coil-Strukturen sind eine der hauptsächlichsten Aminosäuretertiärstrukturen, die Oligomerisierung von Proteinen vermitteln. Die typischste Eigenschaft solcher Aminosäuresequenzen ist die *Heptaden-Repeat* genannte heptamere Abfolge meist apolarer Aminosäurereste, die die Interaktionsfläche der Oligomere bildet. Der *Heptaden-Repeat* ist dadurch gekennzeichnet, dass apolare Aminosäurereste bevorzugt an erster (a) und vierter (d) Position vorkommen. Der Zustand der Coiled-Coil-Domäne bestimmt den Oligomerisierungsstatus, die Beweglichkeit oder die Funktion innerhalb eines molekularen Erkennungssystems (Burkhard et al., 2001). Coiled-Coils bestehen aus zwei bis fünf amphipatischen  $\alpha$ -Helices, die miteinander verdreht sind und die sogenannte Superhelix (supercoil) bilden.

Eine Analyse der Aminosäuresequenz des MARV-NP mit dem Computerprogramm COILS 2.2 (2.3.2.; Lupas, A., et al., 1991; Lupas, A. 1996) offenbarte zwei Coiled-Coils (C1: AS 321-350 und C2: AS 371-400). Beide liegen in einem Bereich, der einen deutlichen Einfluss auf die Homooligomerisierung besitzt (AS 331-480).





**Abb. 10: Die zwei Coiled-Coil-Motive des Marburg-Virus-NP. A. Vorhersage mit dem Programm COILS 2.2.** Die Wahrscheinlichkeiten für die Ausbildung von Coiled-Coil-Strukturen sind auf der Y-Achse, die AS des MARV-NP auf der X-Achse aufgetragen. Zwischen AS 300-400 liegen zwei Spitzen für potentielle Coiled-Coils (C1, AS 320-350; C2, AS 371-400). **B. Heptaden-Repeat am Beispiel des MARV Coiled-Coil 2 (C2).** Der *Heptaden-Repeat* ist die typischste Eigenschaft von Coiled-Coil-Motiven. Er bildet die Interaktionsfläche der Oligomere. Es handelt sich um die heptamere Abfolge von meist apolaren Aminosäureresten. Die apolaren Aminosäuren liegen bevorzugt an Position a und d. Beim C2 liegen dort ein Lysin, Leucin und ein Isoleucin.

In Abb. 10A ist das Ergebnis der COILS-Analyse graphisch dargestellt. Auf der X-Achse wurde die Aminosäuresequenz des MARV-NP eingetragen, auf der Y-Achse die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Coiled-Coil-Struktur. In Abb. 10B wurden nun die sieben Positionen der heptameren Periodizität beispielhaft für das zweite Coil (C2: AS 371-400) in Aufsicht auf einen Arm eines Coiled-Coil dargestellt. Mit Sternchen sind die Aminosäuren der Position a und d hervorgehoben. Es wurde geprüft, ob die Coiled-Coil-Motive tatsächlich an der Homooligomerisierung beteiligt sind und inwiefern die Zerstörung der Motive die bekannten Funktionen des NP beeinflusst.

#### 5.1.2.1. Einfluss der Coiled-Coil-Motive auf die Homooligomerisierung

Zuerst sollte geklärt werden, ob die Coiled-Coils zur Homooligomerisierung notwendig sind. Daher wurden in NP-Wildtyp interne Deletionen der AS 320-350 (Coiled-Coil 1, C1), 371-400 (Coiled-Coil 2, C2) und 320-400 (Coiled-Coil 1+2, C1C2) eingeführt.

##### Herstellung der NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten

Die Klonierung der NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten verlief analog zu 5.1.1.2. Alle eingebrachten Mutationen wurden durch automatische Sequenzierung verifiziert (4.1.8.). In Abb. 11A stellen Balken die NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten mit einem Strich an Position der eingeführten Deletion dar. Die Bezeichnung der Mutanten richtet sich nach dem fehlenden Coiled-Coil: NP $\Delta$ C1 (ohne Coiled-Coil 1,  $\Delta$ 320-350), NP $\Delta$ C2 (ohne Coiled-Coil 2,  $\Delta$ 371-400) und NP $\Delta$ C1C2 (ohne Coiled-Coil 1+2,  $\Delta$ 320-400).

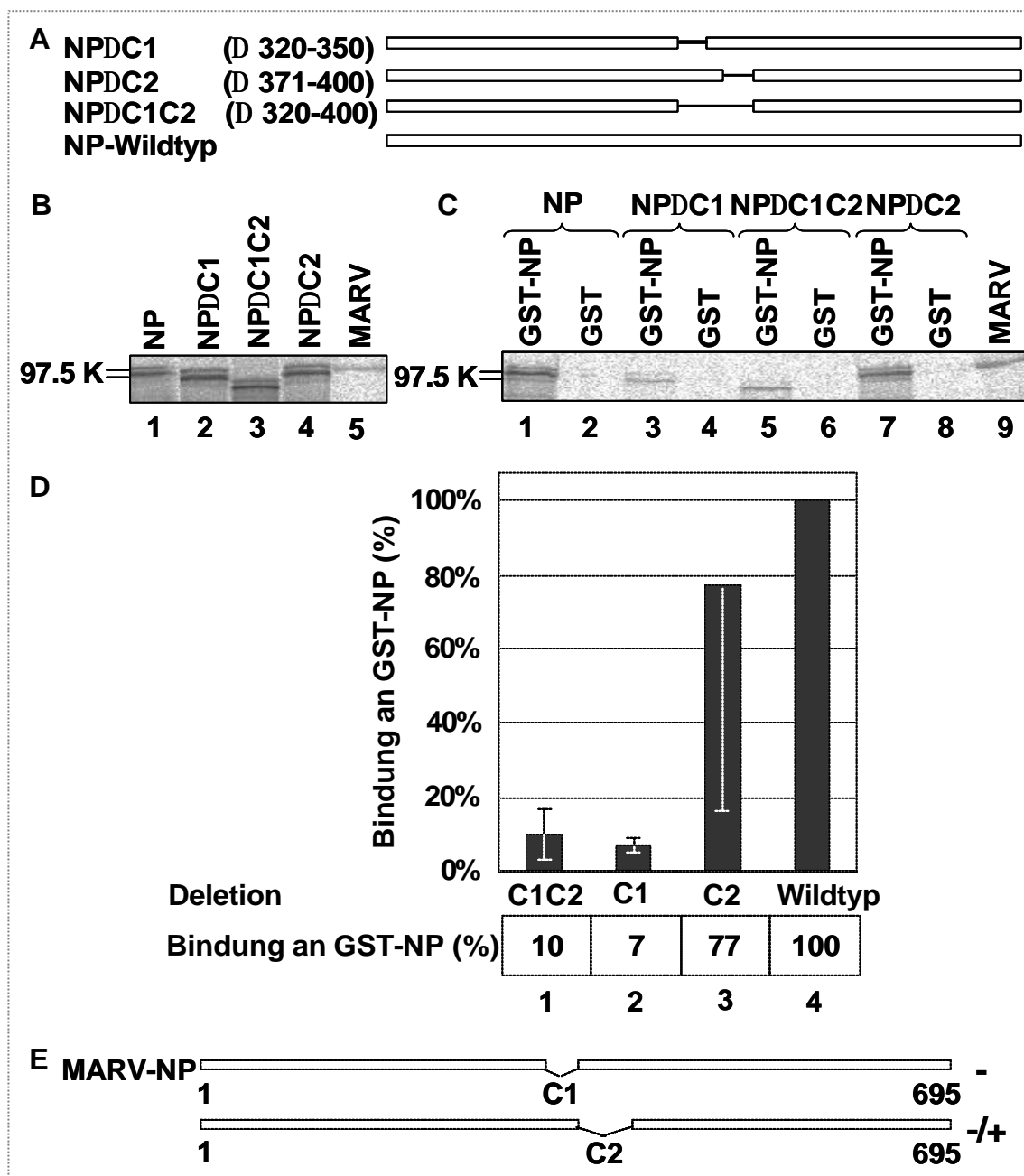
##### In vitro Translation der NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten

Die konstruierten Plasmide wurden mit dem TNT quick-coupled Kit unter Verwendung von [ $^{35}$ S]-Methionin in vitro synthetisiert und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft (5.1.1., 4.1.9. und 4.3.5.). Je ein Achtel der Proben wurde auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Synthese aller NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten war erfolgreich (Abb. 11B, Spur 1-4). Durch die eingebrachten Deletionen änderte sich das

Laufverhalten von NP $\Delta$ C2 und NP $\Delta$ C1 gegenüber dem NP-Wildtyp kaum. NP $\Delta$ C1C2 hingegen zeigte eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit. Die Proteine liefen als Doppelbande. Die Bedeutung dieser zweiten Bande ist zurzeit unklar.

### Interaktion der NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten mit GST-NP

Die NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten und NP-Wildtyp wurden nun analog zu 5.1.1.1. im GST pull-down eingesetzt und die gefällten Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt (4.1.9., 4.3.3. und 4.3.5.; Abb. 11C). Das getrocknete Gel wurde eingescannt und die Stärken der Proteinbanden mit dem Programm TINA 2.0 quantifiziert.



**Abb. 11: Einfluss der Coiled-Coil-Motive auf die Homooligomerisierung. A. Schemata der verwendeten NP-Deletionsmutanten.** Die hellen Kästen markieren den kodierten Proteinbereich, die Striche die Deletion. Die Coiled-Coil-NP-Deletionsmutanten sind anhand der fehlenden Coiled-Coils bezeichnet. **B. In vitro Translation.** Die genannten NP-Mutanten wurden, wie in Abb. 6 beschrieben, in vitro synthetisiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Das NP wandert als Doppelbande von unklarer Natur. **C. GST pull-down.** Der restliche Translationsmix wurde, wie in Abb. 6 beschrieben, einem GST pull-down Assay und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die spezifischen Präzipitate sind in den Spuren 1, 3, 5 und 7 dargestellt. Die Spuren 2, 4, 6 und 8 zeigen die jeweilige GST-Kontrolle. In Spur 9 ist MARV aufgetragen. **D. Quantifizierung der radioaktiven Signale.** s. Abb. 6. **E. Auswirkung der Deletionen auf die Homooligomerisierung.** Die Deletion beider Coiled-Coils beeinflusst die Homooligomerisierung. Das Fehlen des C1 wirkt sich stärker aus als das Fehlen des C2.

Abb. 11D zeigt die Auswertung des pull-down-Experiments. Die Bindung des NP-Wildtyp an GST-NP wurde gleich 100% gesetzt. Es zeigte sich, dass die AS 320-50 (C1) notwendig waren, um eine Oligomerisierung zu vermitteln (Balken 2). Die AS 371-400 (C2) hatten dagegen nur schwach hemmenden Einfluss auf die NP-NP-Interaktion (Balken 3). Fehlten beide Coiled-Coil-Motive ( $NP\Delta C1C2$ ), so entsprach die Bindung an NP ungefähr  $NP\Delta C1$  (Balken 4).

Diese Ergebnisse sind in Abb. 11E zusammengefasst. Für die NP-NP-Interaktion ist der AS-Bereich 321-50 (C1), das erste vorhergesagte Coiled-Coil-Motiv, essentiell. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterstützen die Ergebnisse vorheriger Untersuchungen von kleineren Deletionen in dem NP (Abb. 8).

### 5.1.2.2. Übertragung der Coiled-Coil-Motive auf ein heterologes Reporterprotein

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Coiled-Coils (AS 321-400) zur Vermittlung der NP-Multimerisierung ausreichen. Aus diesem Anlass wurde das vorhergesagte Doppel-Coiled-Coil-Motiv N-terminal an ein monomeres Reporterprotein fusioniert. Das Reporterprotein trägt ein C-terminales Flag-Epitop.

#### Herstellung des NP-Coiled-Coil-Fusionsproteins

Zur Herstellung des heterologen Fusionsproteins wurden aus dem NP-Gen die für beide Coiled-Coil-Motive kodierenden Nukleotide sowie, um die strukturelle Integrität der Coiled-Coils zu erhalten, weitere 3' gelegene 30 Nukleotide mittels PCR amplifiziert (4.1.4.). Es handelte sich um den Bereich, der für die AS 310-400 (MC1C2) kodiert. Die für dieses Peptid kodierende Sequenz sollte in ein Plasmid kloniert werden, das für ein monomeres Reporterprotein kodiert. So entstand ein Fusionsprotein aus Doppel-Coiled-Coil-Motiv und Reporterprotein. Das gewählte Reporterprotein war eine Mutante des EBOV-VP30 (E30m), das nachweislich als Monomer vorliegt (Hartlieb et al., 2003) und ein C-terminales Flag-Epitop trug. Die Klonierung geschah

wie folgt: Im mit BamHI linearisierten Plasmid pT-M35E30<sub>FLAG</sub> (Möller, P. zur Verfügung gestellt) wurde die Schnittstelle über Klenow mit dATP und dGTP aufgefüllt und die überstehenden Nukleotide mit *mungbean*-Exonuklease verdaut. Anschließend wurde über einen Restriktionsverdau mit EcoRI der M35-Anteil herausgeschnitten, verworfen und der Vektor mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Mittels PCR wurden die für das Doppel-Coiled-Coil-Motiv kodierenden Sequenzen mit Primern amplifiziert, die am 5'-Ende des Amplifikats eine EcoRI-Schnittstelle einführen. Nach einer EcoRI-Behandlung der Amplifikate wurden Vektor und Insert ligiert (*sticky/ blunt*), die Plasmide in Bakterien vermehrt und isoliert. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung bestätigt (4.1.8.). Abb. 12A zeigt schematisch das MARV-NP-Coiled-COIL-E30mFlag-Fusionsprotein. Es wird im weiteren Verlauf als MC1C2-Flag bezeichnet.

#### **In vitro Translation des NP-Coiled-Coil-Fusionsproteins und NPD441-695**

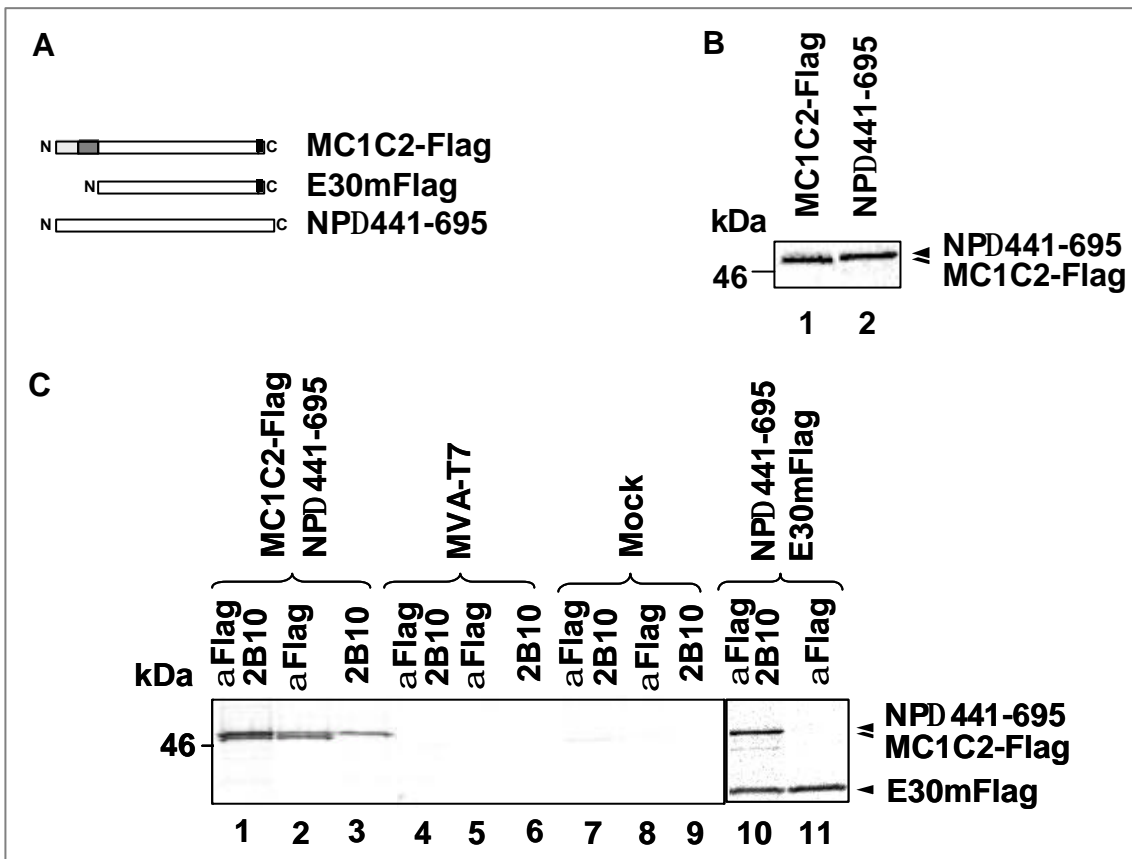
Analog zu 5.1.1. wurden das konstruierte Plasmid mit dem TNT quick-coupled Kit unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin in vitro synthetisiert und eine SDS-PAGE durchgeführt (4.1.9. und 4.3.5.). Das Fusionsprotein und die NP-Deletionsmutante wurden stabil synthetisiert (Abb. 12B).

#### **Koimmunpräzipitation des NP-Coiled-Coil-Fusionsproteins MC1C2-Flag und der Deletionsmutante NPD441-695**

Die Coiled-Coil-vermittelte Interaktion wurde untersucht, in dem das Fusionsprotein MC1C2-Flag zusammen mit der N-terminalen Mutante NP $\Delta$ 441-695, die das Doppel-Coiled-Coil-Motiv enthält, in der Koimmunpräzipitation eingesetzt wurde.

MC1C2-Flag bzw. E30mFlag und die NP-Mutante NP $\Delta$ 441-695 wurden mittels MVA-T7-Expressionssystem in HeLa-Zellen exprimiert und metabolisch mit [<sup>35</sup>S]-PROMIX markiert (4.2.3. und 4.3.2.). Die Transfektion der für das Flag-markierte bzw. nicht markierte Protein kodierenden Plasmide erfolgte im Verhältnis 1:10. Die Zellysate wurden gedrittelt und je mit einer Kombination aus monoklonalem  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 und monoklonalem  $\alpha$ Flag Antikörper M2, dem monoklonalen  $\alpha$ Flag Antikörper M2 oder dem monoklonalem  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 immunpräzipitiert (4.3.3.). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Biolumineszenzuntersucher untersucht (4.3.5. und 4.3.6.; Abb. 12C, Spuren 1 - 11). Es zeigte sich, dass das Doppel-Coiled-Coil-Motiv (MC1C2) eine Assoziation des Fusionsproteins und der NP-Mutante vermitteln konnte (Abb 12C, Spur 2). Der eingesetzte  $\alpha$ -Flag-Antikörper präzipitierte nicht nur das Flag-markierte MC1C2, sondern auch die NP-Mutante. Keine Interaktion

fand zwischen dem Reporterprotein E30m und der NP-Mutante statt (Spur 11). Dieses Ergebnis unterstützte die oben beschriebenen Befunde, dass die Coiled-Coil-Domänen als Homooligomerisierungsdomäne des NP fungieren (HOD<sub>CC</sub>). Wurde der monoklonale 2B10-Antikörper eingesetzt, konnte dieser nur die NP-Mutante präzipitieren. Noch ist unklar, ob der Antikörper die Bindung sterisch behindert oder um die Bindungsstelle kompetitiert (s. a. 5.5., Abb. 29).



**Abb. 12: Übertragung des Doppel-Coiled-Coil-Motivs auf ein heterologes Reporterprotein und Einfluss des 2B10.** **A. Schemata der verwendeten Mutanten.** Die NP-Coiled-Coil-Motive wurden zusammen (MC1C2, hell-/ dunkelgrauer Kasten) an ein monomeres Reporterprotein (E30mFlag, heller Kasten; Flag-Epitop: schwarzer Kasten) fusioniert. **B. In vitro Translation.** Die genannten NP-Mutanten wurden, wie in Abb. 6 beschrieben, in vitro translatiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die Proteine sind mit Pfeilköpfen markiert. **C. Koimmunpräzipitation von MC1C2-Flag und NPD441-695.** HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und 1 h später mit Plasmiden für das Fusionsprotein MC1C2-Flag bzw. E30mFlag und die NP-Mutante NP $\Delta$ 441-695 transfiziert. Die Plasmide wurden im Verhältnis Flag-markiert:nicht-Flag-markiert 1:10 eingesetzt. Nach 14 h wurden die Zellen metabolisch mit [ $^{35}$ S]-PROMIX für 1 h markiert, lysiert und einer Immunpräzipitation unterzogen. Die Zellysate wurden entweder mit einer Kombination aus monoklonalem  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 (Verdünnung 1:1.000) und monoklonalem  $\alpha$ Flag Antikörper M2 (Verdünnung 1:1.000), dem monoklonalen  $\alpha$ Flag Antikörper M2 (Verdünnung 1:1.000) oder dem monoklonalem  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 (Verdünnung 1:1.000) präzipitiert. Mit 2B10 konnte die Coiled-Coil vermittelte Interaktion nicht dargestellt werden (Spur 3). Die Präzipitate wurden gewaschen und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die Proteine sind durch Pfeilköpfe markiert.

### 5.1.2.3. Funktionelle Arbeiten zu den Coiled-Coil-Motiven

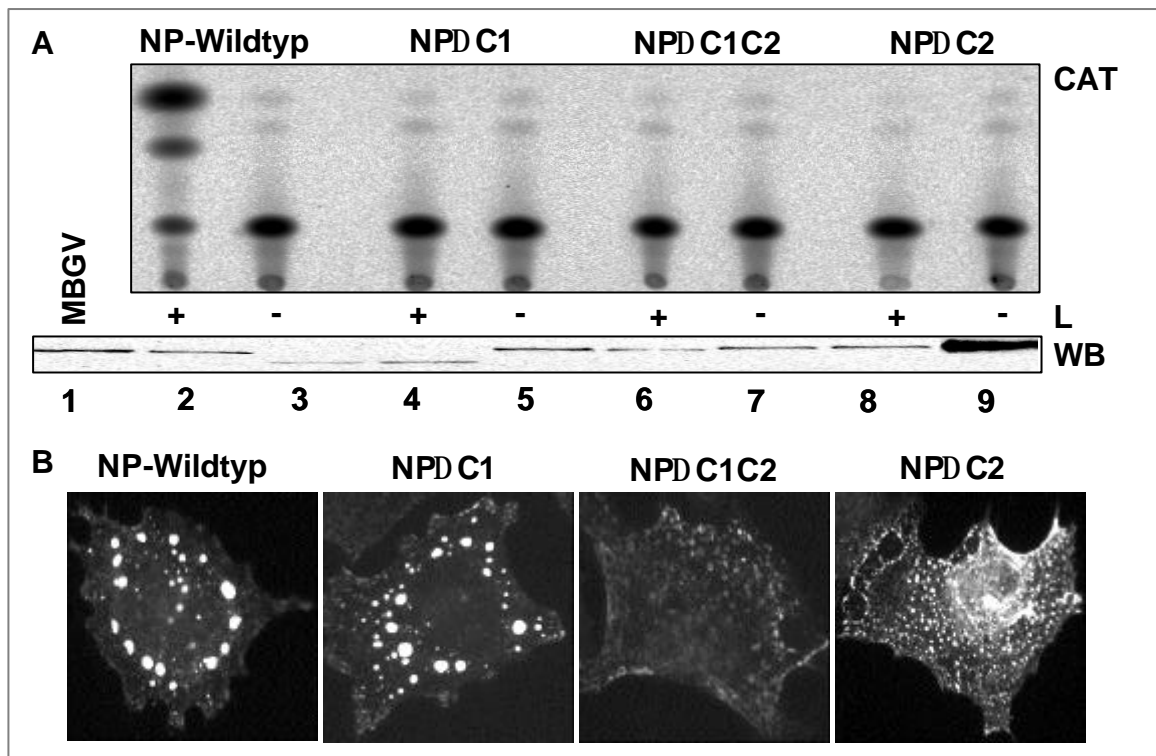
#### **Einfluss der Coiled-Coil-Motive auf die virale RNA-Synthese**

Die NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten (siehe Abb. 11A) wurden im MARV-spezifischen Transkriptionssystem eingesetzt, um zu ermitteln, ob intakte Coiled-Coils für die Funktion des NP bei der viralen RNA-Synthese erforderlich sind. Dazu wurden HUH T7-Zellen gemäß 5.1.1.2. transfiziert, nach 38 h lysiert und einer CAT-Aktivitätsbestimmung unterzogen (4.3.1.). Das NP wurde in den jeweiligen Ansätzen durch eine der in Abb. 11A beschriebenen NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten ersetzt. Die Expression wurde jeweils durch einen Western-Immunoblot kontrolliert (Abb. 13B). Durch die CAT-Aktivitätsbestimmung zeigte sich, dass die MARV-spezifische Transkription zwar durch den NP-Wildtyp (Abb. 13A, Spur 1), jedoch nicht durch die Mutanten NP $\Delta$ C1, NP $\Delta$ C1C2 oder NP $\Delta$ C2 erfolgen konnte (Spuren 3, 4 und 5). Obwohl der Verlust des Coiled-Coil 2 (C2) die Homooligomerisierung nur leicht störte (siehe Abb. 11D), war der Funktionsverlust total. Dieser Befund zeigt, dass in dem Bereich der Coiled-Coil-Motive essentielle Funktionen für das NP liegen. Außer der Homooligomerisierung des NP werden wahrscheinlich auch andere Funktionen durch die Coiled-Coil-Domänen beeinflusst, da die Deletionsmutante NP $\Delta$ C2, die nur schwach in der Homooligomerisierung eingeschränkt ist, ebenfalls keine RNA-Synthese mehr vermitteln kann.

#### **Einfluss der Coiled-Coil-Motive auf die Bildung von NP-Einschlusskörpern**

Um zu prüfen, ob die Coiled-Coil-Motive die Bildung von NP-Einschlusskörpern beeinflussen, wurden die NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten (Abb. 11A) in HUH T7-Zellen exprimiert und die Zellen einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse unterzogen (4.3.1. und 4.3.4.). Alle Mutanten waren in der Lage, Einschlusskörper zu induzieren (Abb. 13B).

NP $\Delta$ C1 kam in Form von Einschlusskörpern vor, die sich nicht vom Phänotyp des NP-Wildtyp unterschieden. Im Gegensatz dazu wurde NP $\Delta$ C1C2 schwächer exprimiert und in kleinen Einschlusskörper im Zytoplasma lokalisiert. NP $\Delta$ C2 führte ebenfalls zur Bildung kleiner, über das gesamte Zytoplasma verteilter Einschlusskörper. Außerdem war diese Mutante auch um den Zellkern verteilt. Aus den Daten wurde geschlossen, dass die Coiled-Coil-Motive zwar für die Induktion von Einschlusskörper nicht notwendig waren, jedoch die Abwesenheit des zweiten Coiled-Coil-Motivs die Morphologie der Einschlusskörper deutlich veränderte.



**Abb. 13: Einfluss der Coiled-Coil-Motive auf die virale RNA-Synthese.** HUH-T7-Zellen wurden mit den in Abb. 9 beschriebenen Plasmiden (Minigenom, VP35, L, NP-Wildtyp oder NP-Mutante) transfiziert. Nach 38 h wurden die Zellen gewaschen und lysiert. **A. Replikations-/Transkriptionsassay.** Unten: Ein Aliquot des Zelllysats wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit einem Kaninchen  $\alpha$ -NC Antiserum (Verdünnung 1:10.000) inkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem POD-markierten  $\alpha$ -Kaninchen IgG Zweitantikörper (Verdünnung 1:50.000) detektiert. Oben: 1-3  $\mu$ l des Zelllysats wurde einem CAT-Reportergenassay unterworfen. Die Proben wurden auf eine DC-Platte (s. Abb. 9) aufgetragen und aufgetrennt. Die Platte wurde auf eine Biolumineszenz-Platte je nach Signalstärke 1-12 h exponiert und der Versuch am nächsten Tag ausgewertet. **B. Einfluss der Coiled-Coil-Motive auf die Bildung von Einschlusskörpern.** HUH-T7-Zellen mit Deckgläschen wurden mit den angegebenen NP-Mutanten transfiziert. Nach 38 h wurden die Zellen auf dem Deckgläschen gewaschen und fixiert. Die Deckgläschen-Zellen wurden permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzanalyse unterworfen wie unter Abb. 9 beschrieben.

### 5.1.3. Interaktion des NP N- und C-Terminus

Folgende Hypothese soll die oben beschriebenen Ergebnisse erklären: MARV-NP ist ein komplex gefaltetes, multimeres Protein. Es besitzt offensichtlich mehrere Homooligomerisierungsdomänen: Eine liegt im Bereich AS 118 – 235 ( $HOD_N$ ). Eine zweite wird durch die Coiled-Coil-Motive gebildet (AS 320 – 400,  $HOD_{CC}$ ). Letztere wird offensichtlich durch den C-Terminus negativ beeinflusst. Eine Möglichkeit, wie der C-Terminus die  $HOD_{CC}$  maskieren könnte, wäre eine Interaktion zwischen N- und C-Terminus. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten eine N- und eine C-terminale NP-Deletionsmutante in der Koimmunpräzipitation eingesetzt werden. Es wurden zwei Kombinationen aus C- und N-terminalen NP-Deletionsmutanten geplant: Kombination 1 bestand aus den AS 1-440 ( $NP_{\Delta 441-695}$ ) und den AS 441-695 ( $NP_{\Delta 1-$

440). Kombination 2 bestand aus den AS 1-234 (NP $\Delta$ 235-695) und AS 266-695 (NP $\Delta$ 1-265).

### **Herstellung der N-terminalen NP-Deletionsmutante**

Zur Herstellung der N-terminalen NP-Deletionsmutante (NP $\Delta$ 1-440) wurde eine PCR (4.1.4.) durchgeführt, wobei das pT-NP-Plasmid als Matrize diente. Mithilfe der synthetisierten Oligonukleotide wurde eine EcoRI-Schnittstelle am 5`-Ende des PCR-Produktes eingeführt. Der Vorwärtsprimer brachte außerdem die kodierende Sequenz für das *Myc*-Epitop mit. Das PCR-Fragment wurde dann über ein 3`-*blunt*-Ende und eine 5`-EcoRI Restriktionsstelle in den Vektor pTM-1 kloniert, der zuvor mit EcoRI und BsmI verdaut worden war. Der entstandene Vektor wurde in *E. coli* XL1 Blue-Zellen transformiert (4.2.1.). Positive Klone wurden selektioniert und mit diesen eine Plasmidpräparation (4.1.11.) durchgeführt. Die Richtigkeit der klonierten Gensequenzen wurde durch automatische Sequenzierung (4.1.8.) überprüft. Die weiteren verwendeten NP-Deletionsmutanten (NP $\Delta$ 441-695, NP $\Delta$ 235-695, NP $\Delta$ 271-695 und NP $\Delta$ 1-265) lagen in der Arbeitsgruppe bereits vor (Abb. 14A, Lötfering, 1998).

### **In vitro Translation der N- und C-terminalen NP-Deletionsmutanten**

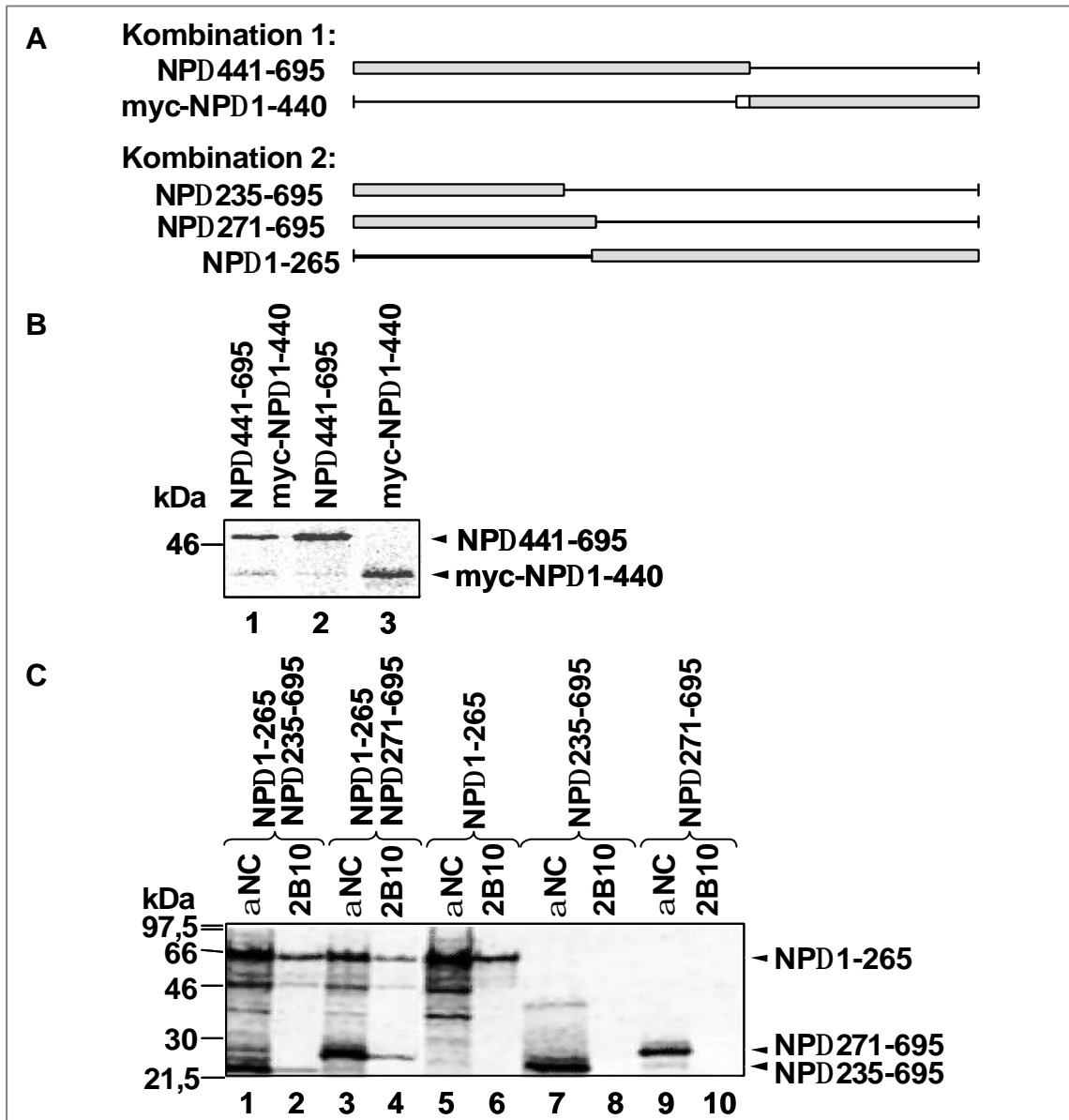
Alle NP-Deletionsmutanten wurden analog zu 5.1.1. mit dem TNT quick-coupled Kit unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin in vitro synthetisiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (4.1.9. und 4.3.5.). Alle NP-Deletionsmutanten wurden stabil exprimiert. Abb. 14B zeigt die Koexpression von NP $\Delta$ 441-695 / *Myc*-NP $\Delta$ 1-440. NP $\Delta$ 441-695 (440 AS, Molekulargewicht: 48 kDa) zeigt das erwartete Laufverhalten in der SDS-PAGE (oberer Pfeilkopf, Spur 1 und 2). Die elektrophoretische Mobilität des *Myc*-NP $\Delta$ 1-440 (255 AS, apparentes Molekulargewicht: 35 kDa) war dagegen deutlich verlangsamt (unterer Pfeilkopf, Spur 1 und 3). Gleiches wurde bereits bei einer weiteren N-terminalen NP-Deletionsmutante NP $\Delta$ 1-265 sowie NP-Wildtyp (695 AS, apparentes Molekulargewicht 92 bzw. 94 kDa) beobachtet. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen erwartetem und beobachtetem Molekulargewicht liefern posttranslationale Phosphorylierungen des C-Terminus. Bei Koexpression beider Proteine wurde *Myc*-NP $\Delta$ 1-440 wenig bis gar nicht gebildet (unterer Pfeilkopf, Spur 1 im Vgl. mit Spur 3).

### **Koimmunpräzipitation der N- und C-terminalen NP-Deletionsmutanten**

Um eine mögliche Interaktion zwischen dem MARV-NP N- und C-Terminus zu prüfen, wurden die NP-Deletionsmutanten (Kombination 1 oder 2, siehe Abb. 14A) in der Koimmunpräzipitationsanalyse eingesetzt (4.3.3.). Es zeigte sich, dass *Myc*-NP $\Delta$ 1-



440 weder über einen  $\alpha$ -Myc-Antikörper noch einen monoklonalen  $\alpha$ -NP-Antikörper (2B10) präzipitiert werden konnte. Später wurde ausschließlich die Kombination aus AS 1-234 (NP $\Delta$ 235-695) bzw. AS 1-270 (NP $\Delta$ 271-695) und AS 266-695 (NP $\Delta$ 1-265) untersucht.



**Abb. 14: Interaktion des Marburg-Virus N- und C-Terminus. A. Schemata der verwendeten C- und N-terminalen NP-Mutanten.** Die NP-Mutanten sind anhand der eingebrachten Deletion bezeichnet. Der synthetisierte Bereich der Proteine ist als hellgrauer Kasten dargestellt. **B. In vitro Translation der Kombination 1.** Die genannten NP-Mutanten wurden, wie unter Abb. 6 beschrieben, kotranslatiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Bei Einzelsynthese wurde die Plasmidmenge mit Leervektor komplementiert. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die Proteinbanden sind mit einem Pfeil markiert. **C. Koimmunpräzipitation der Kombination 2.** Die genannten NP-Mutanten wurden, wie unter Abb. 6 beschrieben, in vitro kotranslatiert, immunpräzipitiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Plasmide wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Bei Einzelsynthese wurden die Gesamtplasmidmenge durch den Einsatz von Leervektor (pTM1) konstant gehalten. Die NP-Mutanten wurden entweder mit einer Kombination aus Kaninchen  $\alpha$ NC-Antiserum (Verdünnung 1:500) und monoklonalem  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 (Verdünnung 1:1.000) oder dem monoklonalen  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 (Verdünnung 1:1.000) präzipitiert. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die Proteine sind mit Pfeilköpfen markiert.

Die Proteine wurden mittels MVA-T7-Expressionssystem in HeLa-Zellen exprimiert und metabolisch mit [ $^{35}\text{S}$ ]-PROMIX markiert (4.2.3., 4.3.2.). Der weitere Ablauf erfolgte wie unter 5.1.2.2. beschrieben. NP $\Delta$ 1-265 wurde mit dem monoklonalen  $\alpha$ -NP Antikörper 2B10 präzipitiert, der im N-Terminus des NP bindet (s. 5.5.). Als Kontrolle diente das  $\alpha$ -NC Antiserum, das alle Konstrukte erkennt (Spuren 7, 9, 11 und 13; 4.3.3.). Die radioaktiven Signale des NP $\Delta$ 1-265 und des kosedimentierten Proteins (NP $\Delta$ 235-695 bzw. NP $\Delta$ 271-695) sind in Abb. 14C dargestellt (Spuren 1-12). Beide, NP $\Delta$ 235-695 und NP $\Delta$ 271-695 interagierten mit NP $\Delta$ 1-265 (Spur 2 und 4).

Zusammengefasst bedeutet dieses Ergebnis, dass der N- und C-Terminus des NP miteinander interagieren kann. Diese Interaktion verläuft wahrscheinlich ohne Beteiligung des Doppel-Coiled-Coil-Motivs, da in Gegenwart des verwendeten monoklonalen  $\alpha$ -NP Antikörpers 2B10 die Coiled-Coil-vermittelte Oligomerisierung nicht zustande kam (5.1.2. und Abb. 12C).

#### 5.1.4. Untersuchung zur N-terminalen Homooligomerisierungsdomäne

Nun wurde die Interaktion des NP N-Terminus mit sich selbst näher charakterisiert. Für die Untersuchungen zur Interaktion der ersten Oligomerisierungsdomäne (AS 118-234) mit anderen Bereichen des NP wurde die C-terminale NP-Deletionsmutante NP $\Delta$ 235-695 als Fusionsprotein mit der Glutathion S-Transferase (GST) hergestellt. Das Konstrukt wurde dann mit anderen C-terminalen NP-Deletionsmutanten im GST pull-down getestet (NP $\Delta$ 235-695, NP $\Delta$ 390-695 und NP-Wildtyp).

##### Herstellung des GST-NP $\Delta$ 235-695

Die Nukleotidsequenz, die für die ersten 234 AS des NP kodieren (NP $\Delta$ 235-695), wurde über PCR aus pGEM-NP amplifiziert und das PCR-Fragment über die durch die Primer eingeführten EcoRI- und XmaI-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGEX-5X-1 kloniert (4.1.2.). Das konstruierte Plasmid trug die Bezeichnung pGEX-NP $\Delta$ 235-695. Das Fusionskonstrukt wurde in E. coli BL21-Zellen exprimiert, aufgereinigt, wie unter 5.1.1.1. beschrieben, und im pull-down Assay eingesetzt (4.2.1. und 4.3.3.). Im Folgenden wurde die Interaktion des NP-Wildtyp sowie der C-terminalen NP-Deletionsmutanten NP $\Delta$ 235-695 und NP $\Delta$ 390-695 mit GST-NP $\Delta$ 235-695 untersucht. In Abb. 15A sind die C-terminalen NP-Deletionsmutanten bzw. NP-Wildtyp schematisch dargestellt.

### **Interaktion der C-terminalen NP-Deletionsmutanten mit GST-NPD235-695**

NP-Wildtyp, NP $\Delta$ 235-695 und NP $\Delta$ 390-695 wurden nun analog zu 5.1.1.1. in vitro synthetisiert, im GST pull-down Assay eingesetzt und die Präzipitate mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt (4.1.9., 4.3.3. und 4.3.5.; Abb. 15B). Bindungspartner war GST-NP $\Delta$ 235-695 bzw. GST. Die Inkubation der in vitro Translationsprodukte mit GST diente als Hintergrundkontrolle (Spuren 2, 5 und 8).

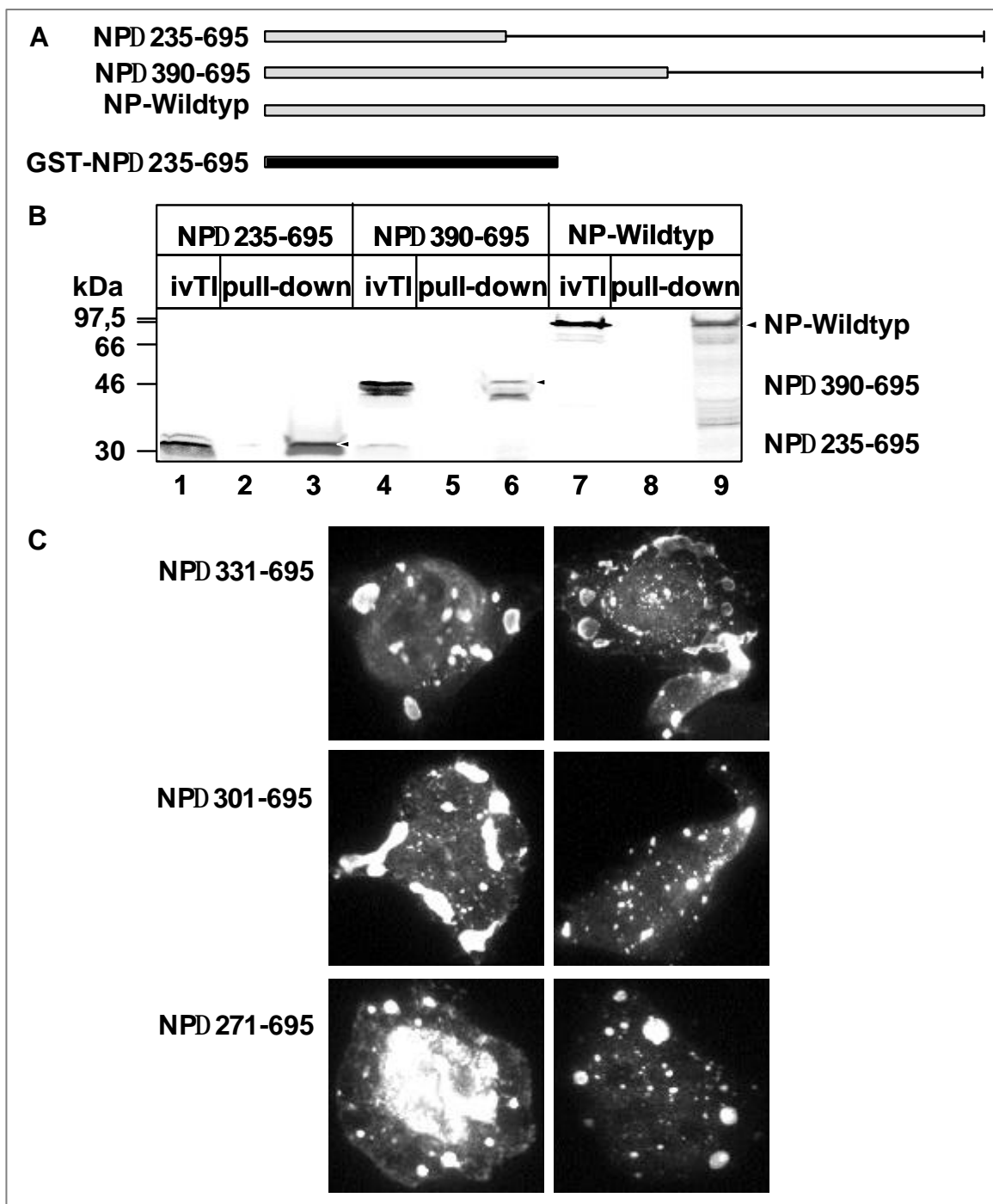
In allen drei Fällen fand eine Interaktion statt. Folgende Tendenz zeichnete sich ab: Die AS 1-234 interagierten mit sich selbst (NP $\Delta$ 235-695, Pfeil, Spur 3). Diese Interaktion wurde durch eine Verlängerung des Konstrukts um ca. 155 AS abgeschwächt (NP $\Delta$ 390-695, Pfeil, Spur 6). Bei NP-Wildtyp war die Interaktion wieder stärker (Pfeil, Spur 9). Das heißt, dass die N-terminal gelegene Homooligomerisierungsdomäne mit sich selbst und mit dem C-Terminus des NP interagieren kann (Abb. 14). Die Multimerisierung der N-terminalen Oligomerisierungsdomäne erfährt möglicherweise eine Regulation durch weiter C-terminal gelegene Bereiche des NP.

### **Untersuchung der C-terminalen NP-Deletionsmutanten hinsichtlich der Bildung von Einschlusskörpern**

Frühere Arbeiten ergaben, dass NP $\Delta$ 235-695 homogen verteilt ist, wogegen NP $\Delta$ 390-695 in Einschlusskörpern im Zytoplasma vorliegt (Löffering, 1998). Zur näheren Untersuchung des Bereichs auf dem NP, der für die Bildung der Einschlusskörper essentiell ist, wurden folgende C-terminalen NP-Deletionsmutanten getestet: NP $\Delta$ 271-695, NP $\Delta$ 301-695 und NP $\Delta$ 331-695 (siehe Abb. 6A). Die Herstellung der Plasmide wurde bereits unter 5.1.1.1. beschrieben. Die C-terminalen NP-Deletionsmutanten oder NP-Wildtyp wurden jeweils in HeLa-Zellen mit dem MVA-T7-Expressionssystem exprimiert und einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse unterzogen (4.2.3. und 4.3.4.; Abb. 15C). Interessanterweise wurde bei allen C-terminalen NP-Deletionsmutanten die Bildung der Einschlusskörper beobachtet.

Für die Induktion der Einschlusskörper scheint demnach der AS-Bereich 235-270 (35 AS) entscheidend. Diese Region des NP enthält möglicherweise regulierende/stabilisierende Sequenzen. Die Morphologie ist jedoch unterschiedlich zu NP-Wildtyp.

Die Einschlusskörper, die von der Mutante  $\Delta$ 271-695 gebildet werden, erscheinen runder als die der längeren NP-Mutanten.



**Abb. 15: Charakterisierung der N-terminalen Homooligomerisierungsdomäne** **A. Schemata der NP-Mutanten.** Die NP-Mutanten sind anhand der eingebrachten Deletion bezeichnet. Der synthetisierte Bereich der Proteine ist als hellgrauer Kasten dargestellt. Darunter ist das Fusionsprotein GST-NP $\Delta$ 235-695 (N-terminale 234 AS des MARV-NP, N-terminal an das GST fusioniert) als schwarzer Kasten gezeigt. **B. In vitro Translation und GST pull-down.** Die genannten NP-Mutanten wurden, wie in Abb. 6 beschrieben, in vitro synthetisiert und ein Aliquot einer SDS-PAGE unterzogen. Der restliche Translationsmix wurde, wie in Abb. 6 beschrieben, einem GST pull-down Assay und einer SDS-PAGE unterzogen. Bei beiden Gelen wurden die radioaktiven Signale mit dem Biomager analysiert. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die spezifischen Präzipitate sind in den Spuren 3, 6, und 9 gezeigt. Die Spuren 2, 5 und 8 zeigen den GST-Hintergrund. Die Proteine sind mit Pfeilen markiert. **C. Immunfluoreszenz.** HeLa-Zellen (auf Deckgläschen) wurden mit MVA-T7 infiziert und nach 1 h mit den angegebenen NP-Mutanten transfiziert. Nach 8 h wurden die Zellen auf den Deckgläschen gewaschen und fixiert. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzanalyse unterworfen wie in Abb. 9 beschrieben. Alle NP-Mutanten zeigten intrazelluläre Einschlusskörper.

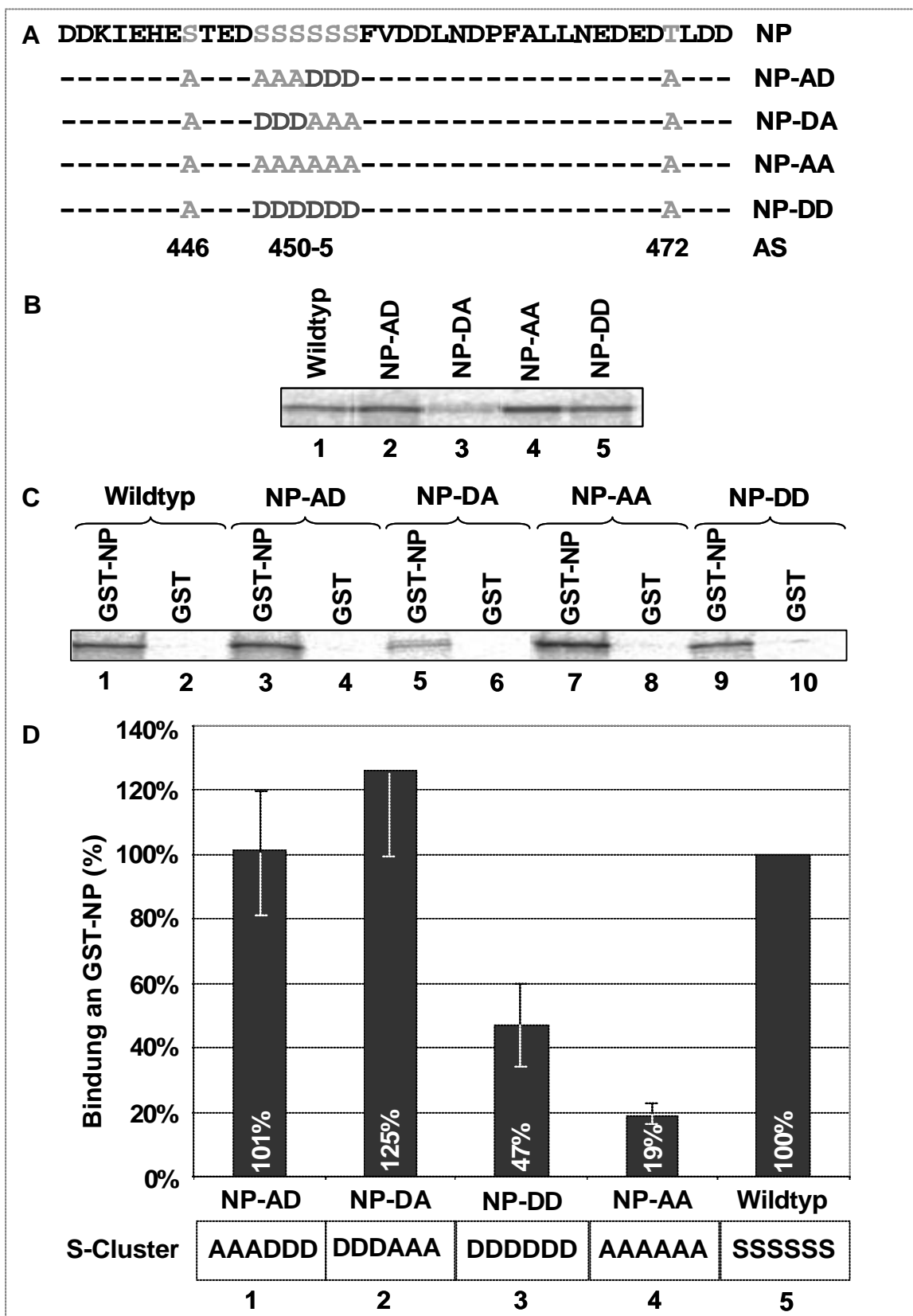
### 5.1.5. Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Homooligomerisierung

Der Aminosäurebereich 390-480 beinhaltet zwei phosphorylierte Regionen des NP. Diese werden nach einer Veröffentlichung von Löffering et al. (1999) als Region I (AS 390-438) und II (AS 439-475) bezeichnet. Innerhalb der AS 439-475 der Region II des NP ist ein Cluster von 6 Serinresten (AS 450-5) besonders prominent (Abb. 20A). Frühere Analysen zeigten, dass dort der Hauptteil der Phosphorylierung des NP erfolgt (Di Carlo, 2000). Um die Bedeutung der Phosphorylierung dieser Serinreste für die NP-NP-Interaktion zu untersuchen, wurden durch *Quick-Change*-Mutagenese die Serinreste zu Alanin- und/ oder Aspartatresten substituiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 in 3.8. aufgeführt. Alanin soll einen nicht phosphorylierten, Aspartat einen phosphorylierten Serinrest imitieren.

#### Herstellung der Serincluster-NP-Substitutionsmutanten

Ausgangspunkt für die Klonierung der Serincluster-Mutanten waren NP-Mutanten (NP<sup>ST/A</sup>), bei denen die in Nachbarschaft zu dem Serincluster gelegenen Serin- und Threoninreste schon zu Alanin ausgetauscht waren (S446/A, T472/A; Di Carlo, 2000). Diese Mutation wird im Folgenden nicht mehr erwähnt. Folgende Konstrukte sollten eingesetzt werden: Das Serincluster wurde gedanklich in zwei Hälften geteilt und diese jeweils durch drei Alanin- und drei Aspartatreste ersetzt (NP-AD, NP-DA, Abb. 16A). Außerdem wurden zwei Mutanten eingesetzt, in denen das gesamte Serincluster zu Alaninen oder Aspartaten ausgetauscht war (NP-AA, NP-DD, Abb. 16A). Die Mutante NP-AA lag bereits vor. Ausgangspunkt für die Konstruktion der Mutante NP-DD war das Plasmid NP $\Delta$ Cluster, in dem durch inverse PCR (4.1.6.; Imai et al., 1991) das Serincluster deletiert wurde. Mittels Primer-Anlagerung (*Primer annealing*) wurden die Nukleotide, die für das Aspartatcluster kodieren, generiert und in den linearisierten Vektor pT-NP<sup>ST/A</sup> $\Delta$ Cluster kloniert (4.1.3. und 3.8.). NP-AD und NP-DA wurden analog zu 5.1.2. hergestellt. Zur Herstellung der Mutante NP-AD und Mutante NP-DA dienten die vorhandenen Vektoren pT-NP<sup>ST/A</sup>AS und pT-NP<sup>ST/A</sup>SA als Matrize. Anstelle der gewünschten Aspartatreste enthielten die Ausgangsvektoren jeweils drei Serinreste, die substituiert werden mussten. Die verwendeten Oligonukleotide wiesen im Überhang komplementäre Sequenzen auf, die für Aspartate anstelle von Serinresten kodierten (4.1.6. und 3.8.). Alle Konstrukte wurden durch automatische DNA-Sequenzierung bestätigt (4.1.8.). Von NP-Wildtyp und den Serincluster-NP-Substitutionsmutanten ist in Abb. 16A die Aminosäuresequenz der Region II im Einbuchsta-

bencode dargestellt. Bei den Serincluster-NP-Substitutionsmutanten entsprechen die Striche homologen Aminosäuren.



**Abb. 16: Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Homooligomerisierung. A. Schemata der Serincluster NP-Substitutionsmutanten.** Die Serincluster-NP-Substitutionsmutanten sind anhand der eingebrachten Substitutionen bezeichnet. Gezeigt sind die Region II des MARV-NP und die Veränderungen bei den einzelnen Mutanten. ST/A bezeichnet S446 und T472, die durch Alanin ersetzt wurden. Das hexamere Serincluster (S450-455) wurde willkürlich in zwei Blöcke zu drei Serinresten unterteilt, die jeweils durch einen Buchstaben repräsentiert werden (SS). Das Serincluster wurde auf vier verschiedene Arten mutiert: AD, DA, AA oder DD. Alanine imitieren nicht-phosphorylierte, Aspartate phosphorylierte Serine. **B. in vitro Translation.** Die genannten NP-Mutanten wurden, wie unter Abb. 6 beschrieben, in vitro synthetisiert und einer SDS-PAGE unterzogen. **C. GST pull-down.** Der restliche Translationsmix wurde, wie unter Abb. 6 beschrieben, einem GST pull-down Assay und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung befinden sich die Markerbanden. Die spezifischen Präzipitate sind in den Spuren 1, 3, 5, 7 und 9 gezeigt. Die Spuren 2, 4, 6, 8 und 10 zeigen den GST-Hintergrund. **D. Quantifizierung der radioaktiven Signale.** s. Abb. 6. Ein teilweise phosphoryliertes Serincluster erlaubt wildtypische NP-NP-Interaktion. Dem entgegen ist bei dephosphoryliertem oder komplett phosphoryliertem Serincluster die Homooligomerisierung stark eingeschränkt.

Die Substitutionen an Position 446, 450-5 und 472 sind farbig hervorgehoben. Das hexamere Serincluster wurde zur einfacheren Benennung in zwei trimere Cluster geteilt und die Änderungen jeweils mit einem A für den Austausch dreier Serinreste zu Alaninen oder einem D für den Austausch dreier Serinreste zu Aspartaten bezeichnet.

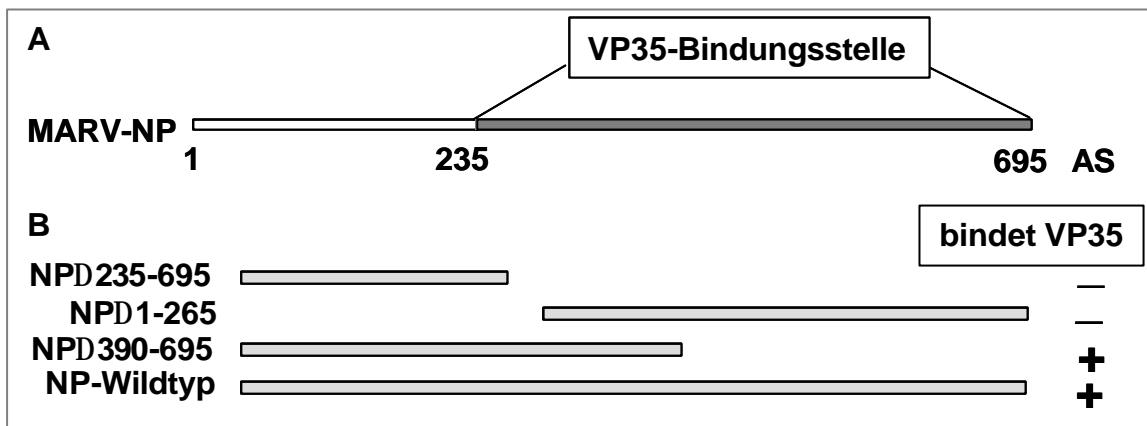
#### **In vitro Translation der Serincluster-NP-Substitutionsmutanten und Interaktion mit GST-NP**

Die Serincluster-NP-Substitutionsmutanten wurden analog zu 5.1.1. mit dem TNT quick-coupled Kit unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin in vitro synthetisiert und über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt (4.1.9. und 4.3.5.; Abb. 16B). Die Synthese aller Serincluster-NP-Substitutionsmutanten war erfolgreich. Die in vitro Translationsprodukte wurden im Anschluss einem GST pull-down unterzogen (4.3.3.; Abb. 16C). Die Stärken der Proteinbanden wurden mit dem Programm TINA 2.0 quantifiziert (Abb. 16D). Die Bindung des NP-Wildtyp an GST-NP wurde gleich 100% gesetzt. Ein teilweise phosphoryliertes Serincluster beeinflusste die Oligomerisierung des NP nicht (Balken 1 und 2). Wurde jedoch das komplette Serincluster durch Alanin- oder Aspartatreste substituiert, verminderte sich die Affinität des NP zu GST-NP. Der Effekt fiel besonders deutlich aus (Abnahme auf 20% des NP-Wildtyp), wenn das Cluster permanent dephosphoryliert war (Balken 4).

Diese Beobachtung führte zu dem Schluss, dass die Ladung des Serinclusters, die durch Phosphorylierung verändert wird, die Multimerisierung des NP beeinflusst.

## 5.2. Charakterisierung von VP35-Heterooligomerisierungsdomänen

Frühere Arbeiten zeigten, dass NP mit dem VP35, dem Kofaktor der Polymerase des MARV, interagiert (Becker et. al., 1994, 1998). In Immunfluoreszenzanalysen von Zellen, die sowohl NP als auch VP35 exprimierten, zeigte sich, dass das VP35 mit den NP-induzierten Einschlusskörpern assoziiert war. Wurde das VP35 jedoch einzeln exprimiert, war es in der Zelle homogen verteilt. (Abb. 17B).



**Abb. 17: Übersicht der anfänglich bekannten, zur Heterooligomerisierung mit VP35 wichtigen NP-Bereiche. A. Verteilung der zur Heterooligomerisierung erforderlichen Bereiche auf dem linear dargestellten MARV-NP.** Deletionsanalysen zeigten keine NP-VP35 Interaktion mit den N-terminalen 234 AS. Im C-terminalen Bereich muss eine VP35-Bindungsstelle liegen (gestreifter Kasten). **B. GST-Bindungsstudien zur NP-VP35 Interaktion.** Gezeigt sind schematisch verschiedene NP-Deletionsmutanten und NP-Wildtyp. Links sind die Namen vermerkt, rechts die Fähigkeit GST-VP35 zu binden (+/- = ja/nein). Die Einschlusskörper-induzierenden NP $\Delta$ 390-695 und NP-Wildtyp interagieren mit VP35. Im Gegensatz dazu binden weder das homogen verteilte NP $\Delta$ 235-695 noch NP $\Delta$ 1-265 an VP35. Daraus folgt: Faltung und Oligomerisierung des NP beeinflussen vermutlich die NP-VP35 Interaktion. Die Untersuchungen zeigen ferner, dass der N-terminale Bereich zur NP-VP35 Interaktion ausreicht.

Da sich in den NP-induzierten Einschlusskörpern Nukleokapsidvorläuferstrukturen befinden kann vermutet werden, dass die Interaktion des VP35 mit den Einschlusskörpern die Interaktion mit dem viralen Nukleokapsid widerspiegelt (Kolesnikova et al., 2000; Mavrakis et al., 2002). Die Interaktion von NP und VP35 lässt sich auch mittels GST pull-down Analysen nachweisen. Aus solchen Experimenten mit einer Reihe von C- und N-terminalen NP-Deletionsmutanten war bereits bekannt, dass eine NP-VP35-Interaktionsdomäne im C-terminalen Bereich (AS 235-695) des NP liegen musste (Abb. 17A).

Allerdings reichte der NP-C-Terminus alleine nicht aus, die Interaktion des VP35 mit den NP-Einschlusskörpern zu vermitteln. Entweder ist für die Heterooligomerisierung auch die Interaktion des NP mit sich selbst notwendig, oder es bedarf mehrere VP35-Oligomerisierungsdomänen auf dem NP. In der vorliegenden Arbeit sollten nun die VP35-Interaktionsdomänen auf dem NP identifiziert und charakterisiert werden.



### 5.2.1. Eingrenzung der VP35-Heterooligomerisierungsdomänen

Um die C-terminale Heterooligomerisierungsdomäne näher zu beschreiben, wurden die unter 5.1.1.1. beschriebenen C-terminalen NP-Deletionsmutanten benutzt. Diese sollten im GST pull-down eingesetzt und ihre Affinität zu bakteriell exprimiertem GST-VP35 bestimmt werden (4.3.3.). Abb. 18A zeigt schematisch die C-terminalen NP-Deletionsmutanten.

#### In vitro Translation der C-terminalen NP-Deletionsmutanten

Die konstruierten Plasmide wurden analog zu 5.1.1. mit dem TNT quick-coupled Kit unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin in vitro synthetisiert und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft (4.1.9. und 4.3.5., Abb. 18B). Je ein Achtel der Proben wurde auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Alle Mutanten wurden erfolgreich synthetisiert. Die eingebrachten Deletionen sorgten für eine leiterartige Auftrennung der Proteine. Sie erstreckte sich von NP $\Delta$ 301-695 mit 33 kDa bis NP-Wildtyp mit 97 kDa.

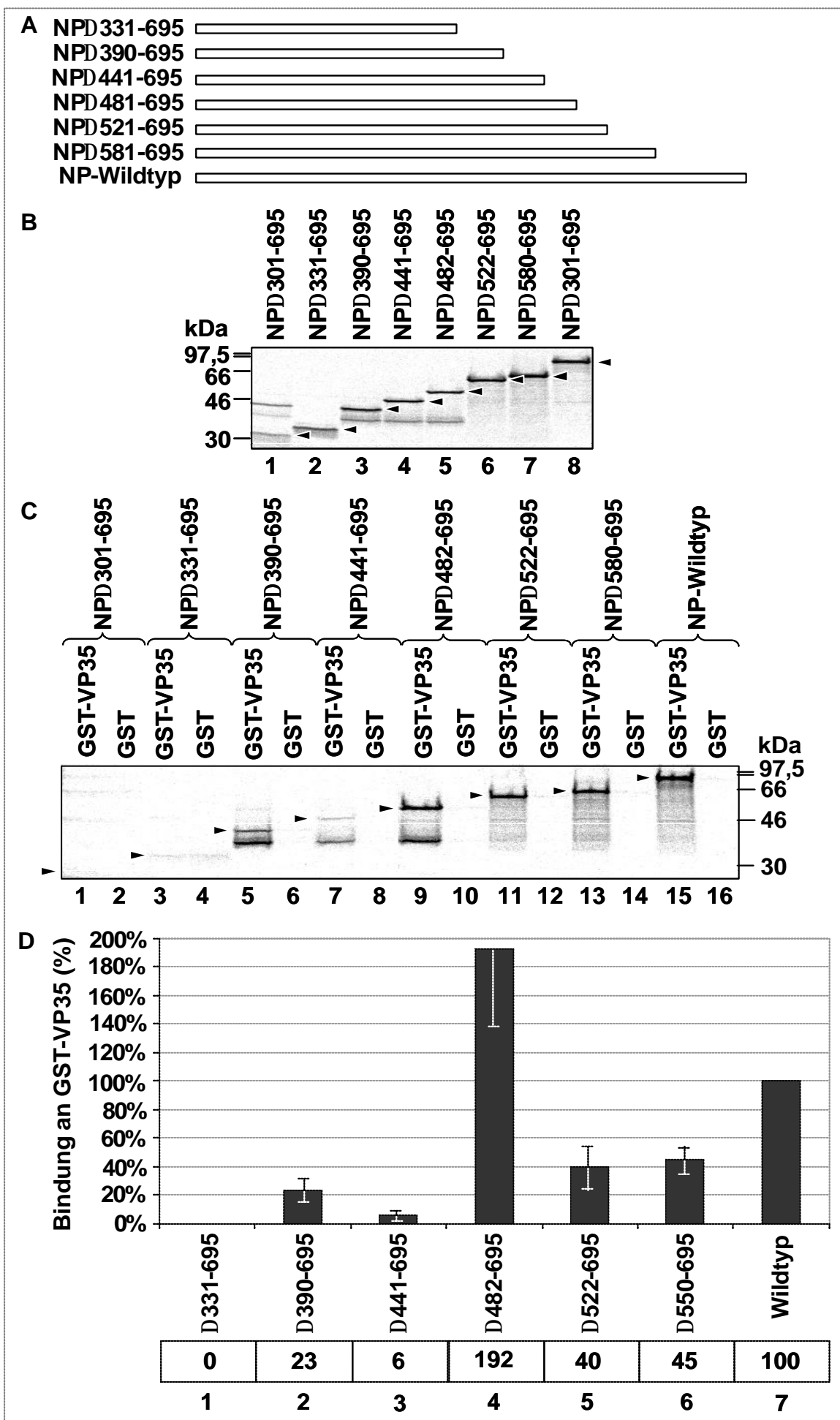
#### Expression und Aufreinigung von GST-VP35 aus E. coli

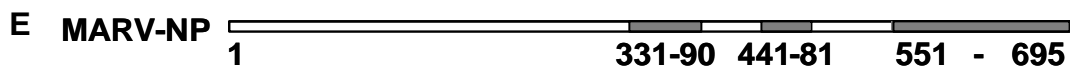
GST-VP35 und GST wurden in E. coli synthetisiert (4.2.1. – 4.3.3.), in Gegenwart von 5 mM DTT an GSH-Separose gekoppelt und über 4 Waschschrte gereinigt (4.3.3.). Die gereinigten Proteine wurden im GST pull-down eingesetzt.

#### Interaktion der C-terminalen NP-Deletionsmutanten mit GST-VP35

Die Durchführung des Versuchs entsprach dem Abschnitt 5.1.1.1. Allerdings wurde anstelle von GST-NP GST-VP35 verwandt. Die SDS-PAGE erfolgte mit einem 12%igen Gel (Abb. 18C). Die Menge an exprimierten Proteinen war gleich und wurde durch eine Coomassie-Blau-Färbung überprüft (nicht gezeigt). Das getrocknete Gel wurde eingescannt und die Stärken der Proteinbanden mit dem Programm TINA 2.0 quantifiziert. Die Bindung des NP-Wildtyp an GST-VP35 wurde gleich 100% gesetzt (Abb. 18D). Die AS 1-330 unterstützten die Oligomerisierung mit VP35 nicht (beispielhaft NP $\Delta$ 331-695, Balken 1). Die Mutante AS 1-389 zeigte eine schwache Interaktion mit VP35.

Eine weitere Verlängerung des Proteins bis zur AS 440 änderte die Interaktionsstärke kaum ( $\Delta$ 441-695). Wurde der C-Terminus jedoch weiter bis zu AS 480 verlängert (AS 1-480), war plötzlich eine extrem starke Interaktion mit VP35 möglich. Innerhalb der Aminosäuren 441-480 liegt folglich eine Interaktionsdomäne für das VP35. Fand eine Verlängerung des C-Terminus statt (AS 1-521 bzw. 579), nahm die Interaktionsstärke mit VP35 wieder ab und betrug circa 40 - 45% gegenüber NP-Wildtyp.





**Abb. 18: Eingrenzung der VP35-Heterooligomerisierungsdomänen durch Cterminale NP-Deletionsmutanten. A. Schemata der verwendeten C-terminalen NP-Deletionsmutanten.** Die C-terminalen NP-Deletionsmutanten sind anhand der eingebrachten Deletion bezeichnet. Der synthetisierte Bereich der Proteine ist als heller Balken dargestellt. **B. In vitro Translation.** Die genannten NP-Mutanten wurden, wie in Abb. 6 beschrieben, in vitro synthetisiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Lauffhöhe der Markerbanden angezeigt. Die Proteinbanden sind mit einem Pfeil markiert. **C. GST pull-down.** Der restliche Translationsmix wurde, wie in Abb. 6 beschrieben, einem GST pull-down Assay (GSH-GST-VP35 bzw. GSH-GST) und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Lauffhöhe der Markerbanden angezeigt. Die spezifischen Präzipitate sind in den Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 gezeigt. Die Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 zeigen den GST-Hintergrund. **D. Quantifizierung der radioaktiven Signale.** s. Abb. 6. **E. Auswirkung der Deletionen auf die NP-VP35 Interaktion.** Zwei NP-Bereiche fördern die Heterooligomerisierung mit VP35: 1) AS 331-390 und 2) 441-480 (schraffierter Kasten). In den Nterminalen 390 AS scheint eine VP35-Bindungsstelle verborgen zu sein. Die AS 441-480 weisen möglicherweise auf eine weitere VP35-Bindungsstelle hin. Die C-terminalen AS 551-695 ermöglichen eine wildtypische VP35-Interaktion.

Die Daten sind in Abb. 18E zusammengefasst. Dort ist NP-Wildtyp linear skizziert. Eingezeichnet sind drei Bereiche, die Einfluss auf die Interaktion mit VP35 besitzen: 1) die AS 331-390 erlauben eine schwache Interaktion, 2) die AS 441-480 verstärken die Interaktion, 3) die AS 481-551 inhibieren die Bindung zwischen VP35 und NP, 4) die Anwesenheit von AS 551-695 lässt die Bindungsstärke wieder ansteigen.

### 5.2.2. Einfluss der AS 350-480 auf die Oligomerisierung mit VP35

Als nächstes wurde der Bereich der AS 331-480 näher untersucht. Innerhalb des Bereiches liegen zwei potentielle Interaktionsdomänen für VP35. Die bereits beschriebenen internen NP-Deletionsmutanten (Abb. 19A, siehe 5.1.1.2.) wurden im GST pull-down mit GST-VP35 und GST eingesetzt. Durch diesen Versuch sollte der Einfluss der internen Deletionen auf die Heterooligomerisierung untersucht werden.

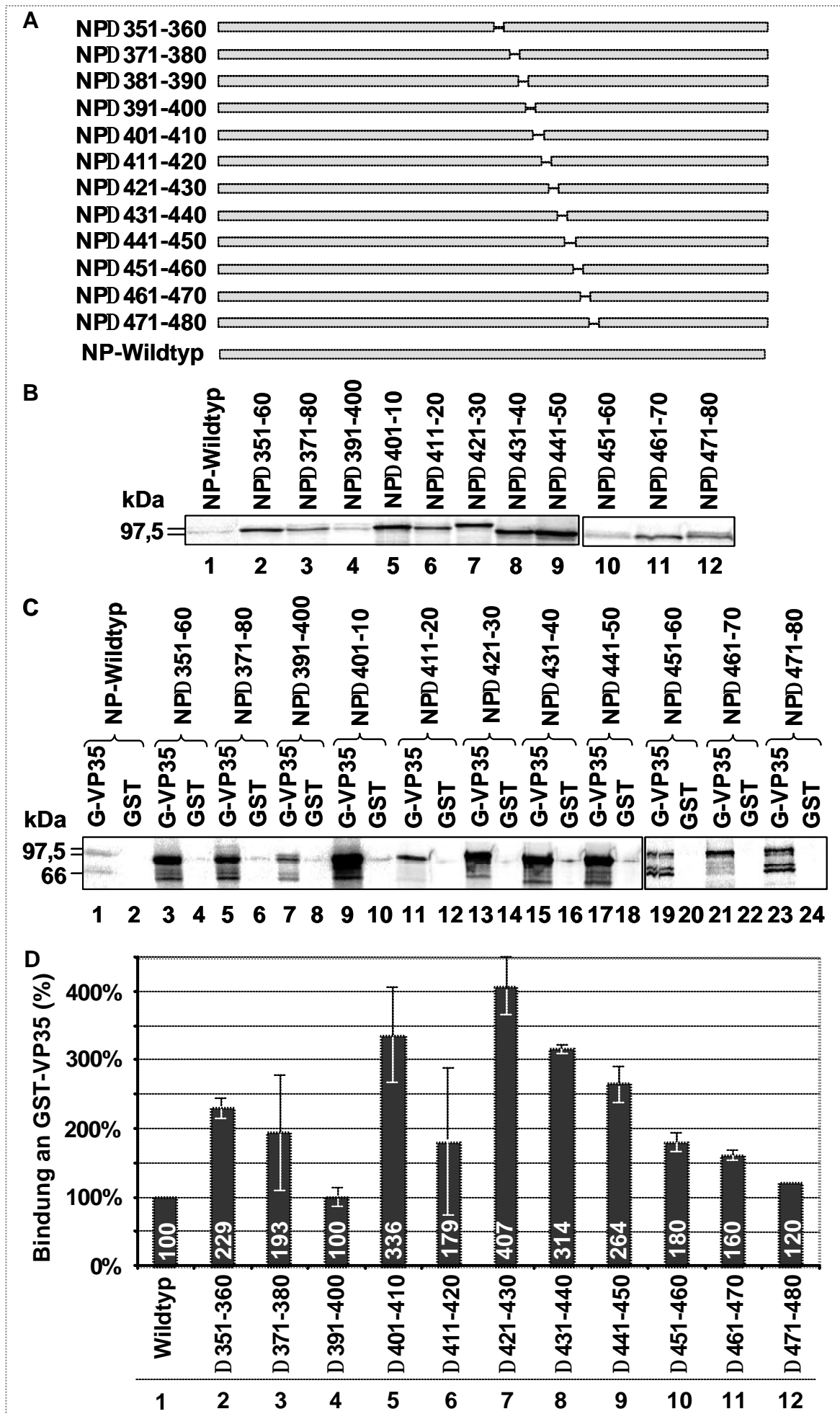
#### Herstellung der internen NP-Deletionsmutanten

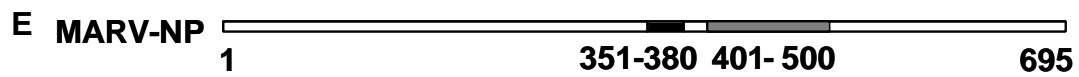
Die Herstellung wurde unter 5.1.1.2. beschrieben. In Abb. 19A (wie auch Abb. 7A) sind die internen NP-Deletionsmutanten schematisch dargestellt.

#### In vitro Translation der internen NP-Deletionsmutanten

Die konstruierten Plasmide wurden analog zu 5.1.1.2. mit dem TNT quick-coupled Kit unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin in vitro synthetisiert und die Expression mittels SDS-PAGE überprüft (4.1.9. und 4.3.5.). Je ein Achtel der Proben wurde auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt.

Fast alle internen NP-Deletionsmutanten wurden stabil exprimiert (Abb. 19B). Einzig NP $\Delta$ 381-90 ließ sich nicht in vitro synthetisieren (siehe 5.1.1.2.). Einige der eingebrachten Deletionen sorgten für eine von NP-Wildtyp abweichende





**Abb. 19: Einfluss der AS 350-480 auf die Oligomerisierung mit VP35. A. Schemata der internen NP-Deletionsmutanten.** Es wurden die unter Abb. 6 beschriebenen NP-Mutanten verwendet. **B. In vitro Translation.** Die genannten NP-Mutanten wurden, wie in Abb. 6 beschrieben, in vitro synthetisiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung befinden sich die Markerbanden. Die Proteinbanden sind mit einem Pfeil markiert. **C. GST pull-down.** Der restliche Translationsmix wurde, wie in Abb. 6 beschrieben, einem GST pull-down Assay (GSH-GST-VP35 bzw. GSH-GST) und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die spezifischen Präzipitate sind in den Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 und 23 gezeigt. Die Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 und 24 zeigen den GST-Hintergrund. **D. Quantifizierung der radioaktiven Signale.** s. Abb. 6. **E. Auswirkung der Deletionen auf die NP-VP35-Interaktion.** Die Deletion der AS 350-380 und 400-500 verstärkt die Interaktion (schwarzer bzw. schraffierter Kasten).

Wanderungsgeschwindigkeit, die vermutlich durch eine Änderung der Protein-Faltung hervorgerufen wurde (Spur 8 und 9).

### Interaktion der internen NP-Deletionsmutanten mit GST-VP35

Die internen NP-Deletionsmutanten und NP-Wildtyp wurden nun analog zu 5.1.1.2. in vitro translatiert, im GST pull-down eingesetzt und die Präzipitate mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt (4.1.9., 4.3.3. und 4.3.5.; Abb. 19C).

Das getrocknete Gel wurde eingescannt und die Stärken der Proteinbanden mit dem Programm TINA 2.0 quantifiziert. Die Abb. 19D zeigt die Auswertung des Versuchs. Die Bindung des NP-Wildtyp an GST-VP35 wurde gleich 100% gesetzt. Es zeigte sich, dass keine der eingebrachten internen Deletionen die NP-VP35-Interaktion inhibierte. Im Gegenteil hatten einige der Deletionen sogar einen positiven Effekt auf die Interaktion mit VP35.

Der untersuchte Bereich enthielt zwei Domänen, deren Deletion die Interaktion mit VP35 positiv beeinflussten: 1) die AS 351-80 und 2) die AS 401-80. Die Deletion der AS 391-400 hatte keinen Einfluss auf die NP-Interaktion (Balken 4). Die AS 381-90 wurden nicht überprüft, da das konstruierte Plasmid nicht synthetisiert werden konnte. Die Deletion der AS 401-80 hatte einen sehr viel stärkeren Effekt als die Deletion der AS 351-80. Deletionen jenseits von AS 430 hatten zur Folge, dass die Interaktion mit VP35 wieder schwächer wurde. In Abb. 19E ist das Experiment zusammengefasst: die Domänen AS 351-80 und AS 401-480 sind in das lineare NP eingezeichnet.

### 5.2.3. Einfluss der NP-Coiled-Coil-Motive auf die Oligomerisierung mit VP35

Die bereits beschriebenen, vorhergesagten Coiled-Coil-Motive im NP liegen in einem Bereich, von dem gezeigt werden konnte, dass er für die Ausbildung der NP-VP35-Interaktion von entscheidender Bedeutung ist (C1: AS 320-50, C2: 371-400, siehe 5.4.). Möglicherweise handelte es sich bei dem ersten Coiled-Coil (C1) um die N-terminale

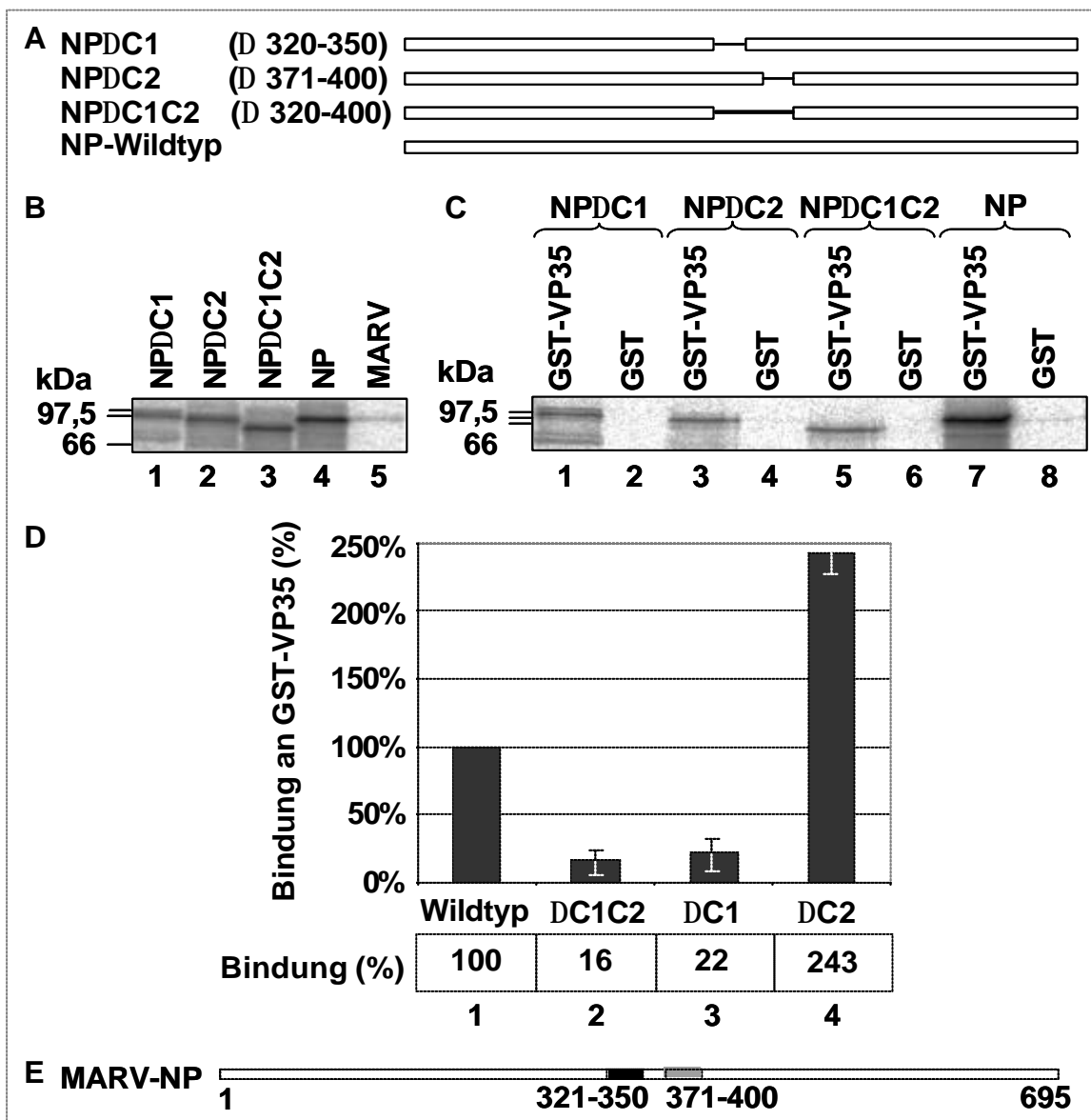
NP-VP35-Oligomerisierungsdomäne. Es wurde im Folgenden geprüft, ob die Coiled-Coils für die Heterooligomerisierung des NP mit VP35 bedeutsam sind.

### 5.2.3.1. Interaktion der NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten mit VP35

Zuerst sollte geklärt werden, ob die Coiled-Coils zur Heterooligomerisierung notwendig sind. In NP-Wildtyp wurden durch interne Deletionen die Coiled-Coil-Motive zerstört: AS 320-350 (C1), 371-400 (C2) und 320-400 (C1C2). Die NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten wurden im GST pull-down eingesetzt und ihre Affinität zu GST-VP35 bestimmt.

#### Verwendete NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten

Es wurden die NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten gemäß 5.1.2.1. verwendet. Diese sind in Abb. 20A nochmals dargestellt.



**Abb. 20: Einfluss der NP-Coiled-Coil-Motive auf die Oligomerisierung mit VP35. A. Schemata der Coiled-Coil-NP-Deletionsmutanten.** Es handelt sich um den gleichen Satz von NP-Mutanten wie in Abb. 11. **B. In vitro Translation.** Die genannten NP-Mutanten wurden, wie in Abb. 6 beschrieben, in vitro synthetisiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung befinden sich die Markerbanden. In Spur 5 ist MARV aufgetragen. **C. GST pull-down.** Der restliche Translationsmix wurde, wie in Abb. 6 beschrieben, einem GST pull-down Assay (GSH-GST-VP35 bzw. GSH-GST) und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung befinden sich die Markerbanden. Die spezifischen Präzipitate sind in den Spuren 1, 3, 5 und 7 gezeigt. Die Spuren 2, 4, 6 und 8 zeigen den GST-Hintergrund. **D. Quantifizierung der radioaktiven Signale.** s. Abb. 6. **E. Auswirkung der Deletionen auf die NP-VP35 Interaktion.** Die Deletion beider Coiled-Coils beeinflusst die VP35-Heterooligomerisierung. Das Fehlen des C1 (schwarzer Kasten) vermindert die NP-VP35 Interaktion stark. Im Gegensatz dazu wird die Interaktion durch das Fehlen des C2 (schraffierter Kasten) extrem verstärkt. Das Fehlen von C1 dominiert über C2.

### Interaktion der NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten mit GST-VP35

Die NP-Coiled-Coil-Deletionsmutanten (Abb. 20A) und NP-Wildtyp wurden nun analog zu 5.1.2.1. in vitro translatiert (Abb. 20B), im GST pull-down eingesetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 20C, 4.1.9., 4.3.3. und 4.3.5.). Die Abb. 20D zeigt die quantitative Auswertung des pull-down. Die Bindung des NP-Wildtyp an GST-VP35 wurde gleich 100% gesetzt.

Die Daten enthüllten, dass das Fehlen der AS 320-50 (C1) die Oligomerisierung mit VP35 stark verminderte, das Fehlen der AS 371-400 (C2) aber die Oligomerisierung im Gegenteil extrem verstärkte. Dieser Befund zeigt, dass beide Coiled-Coil-Motive die Oligomerisierung von NP mit VP35 gegenläufig beeinflussen. Fehlten beide Coiled-Coil-Motive (AS 320-400, C1C2), war die Oligomerisierung mit VP35 stark inhibiert. Somit scheint der negative Effekt des Fehlens von C1 dominant zu sein.

Abb. 20E fasst die Ergebnisse zusammen: beide AS-Bereiche sind notwendig zur Wildtyp-entsprechenden NP-VP35-Interaktion.

### 5.2.3.2. Interaktion der NP-Coiled-Coil-Fusionsproteine mit VP35

Um zu untersuchen, ob der Coiled-Coil-Bereich ausreicht, eine Oligomerisierung mit VP35 zu vermitteln, wurde NP-Coiled-Coil-Fusionsproteine zusammen mit VP35 bzw. VP35Flag eingesetzt. Einerseits wurde das Fusionsprotein MC1C2-Flag (s. 5.1.2.2.) verwendet. Andererseits wurden die NP-Genbereiche, die für ein Coiled-Coil-Motiv kodierten sowie, um die strukturelle Integrität der Coiled-Coils zu erhalten, weitere 3` gelegene 30 Nukleotide, mittels PCR amplifiziert (4.1.4.). Es handelte sich um den Bereich, der für die AS 310-350 (MC1) und 370-400 (MC2) kodiert. Die für diese Peptide kodierenden Sequenzen wurden analog zu 5.1.5. hergestellt. Das gewählte Reporterprotein E30m trug teilweise ein C-terminales Flag-Epitop. Außerdem wurde nach gleichem Verfahren ein MC1C2-E30m-Fusionsprotein (MC1C2) hergestellt. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung bestätigt (4.1.8.). Abb. 21A zeigt schematisch

die NP-Coiled-Coil-E30m-Fusionsproteine. Sie werden anhand der NP-Coiled-Coil-Bereiche benannt. Beide, VP35 und die Fusionsproteine, wurden gemeinsam exprimiert und das Flag-markierte Protein mit einem  $\alpha$ -Flag-Antikörper gefällt. Zur Kontrolle der Expression beider Proteine diente in einem parallelen Ansatz eine Mischung aus Reporterprotein-spezifischer Antikörper und  $\alpha$ -VP35-Antiserum.

### **In vitro Translation der NP-Coiled-Coil-Fusionsproteine und VP35**

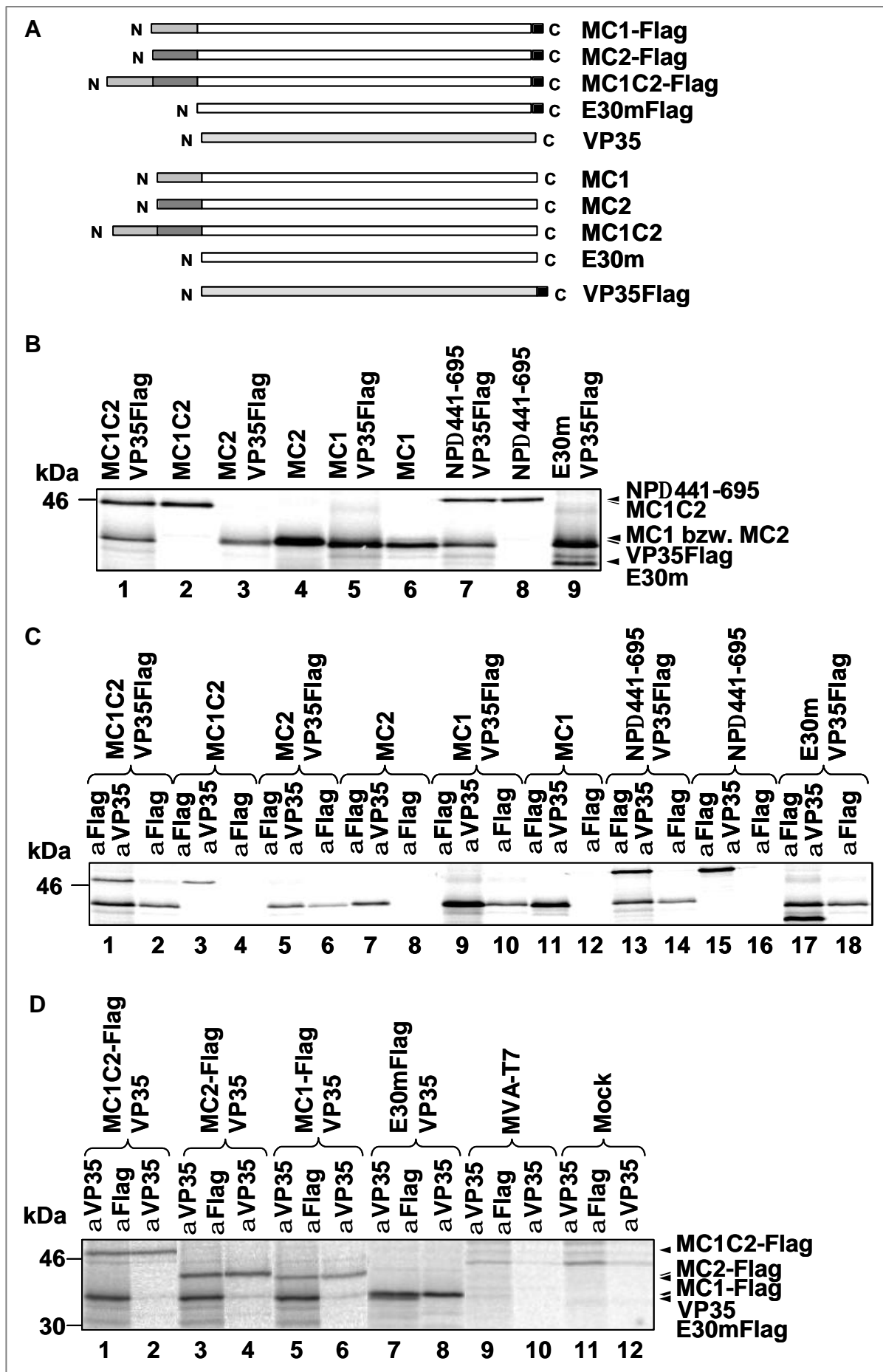
Die Coiled-Coil-Fusionsproteine und VP35 wurden analog zu 5.1.2.2. hergestellt. Alle Fusionsproteine und VP35Flag wurden erfolgreich synthetisiert (Abb. 21B). MC1-E30m (330 AS, apparentes Molekulargewicht: 34 kDa), MC2-E30m (330 AS, errechnetes Molekulargewicht: 34 kDa) und VP35Flag (errechnetes Molekulargewicht 35 kDa) besaßen die gleiche elektrophoretische Mobilität.

### **Koimmunpräzipitation der NP-Coiled-Coil-Fusionsproteine und VP35**

Um zu untersuchen, ob die Coiled-Coil-Bereiche im NP ausreichend sind, die Oligomerisierung mit VP35 zu vermitteln, wurden die Flag-markierten NP-Coiled-Coil-Fusionsproteine zusammen mit VP35 in der Koimmunpräzipitation eingesetzt (4.1.9. und 4.3.3.). In Abb. 21C ist die Koimmunpräzipitation nach in vitro Translation gezeigt. Keines der einzeln exprimierten Fusionsproteine interagiert mit dem  $\alpha$ -Flag-Antikörper M2 (Spur 4, 8 und 12). Keines der untersuchten Fusionsproteine zeigte eine deutliche Interaktion mit VP35Flag. Der Versuch wurde unter anderen Bedingungen wiederholt. Das VP35 und jeweils eins der Flag-markierten Fusionsproteine wurden mittels MVA-T7-Expressionssystem in HeLa-Zellen exprimiert und metabolisch mit [ $^{35}$ S]-PROMIX markiert (4.2.3. und 4.3.2.). Die Transfektion der für das Flag-markierte bzw. nicht markierte Protein kodierenden Plasmide erfolgte im Verhältnis 1:10. Die Flag-markierten Proteine wurden dann mit dem  $\alpha$ -Flag-Antikörper M2 immunpräzipitiert (4.3.3.) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das getrocknete Gel wurde auf eine Biomager-Platte aufgelegt (4.3.5. und 4.3.6.) und die radioaktiven Signale dargestellt. (Abb. 21D, Spuren 1-12). Es zeigte sich, dass weder das Doppel-Coiled-Coil-Motiv (MC1C2), noch die einzelnen Coiled-Coils (MC1 oder MC2) VP35 kopräzipitieren konnten (Spur 2, 4 und 6).

Zusammengefasst bedeutet das: Das Coiled-Coil-Motiv 1 ist für die Oligomerisierung des NP mit VP35 erforderlich und das Coiled-Coil-Motiv 2 beeinflusst die Oligomerisierung des NP mit VP35 negativ (Abb. 20). Allerdings reichen die Coiled-Coil-Motive nicht aus, die Interaktion des NP mit VP35 zu vermitteln. Hierzu bedarf es offensichtlich mehrerer Domänen auf dem NP.





**Abb. 21: Interaktion NP-Coiled-Coil-Fusionsproteine mit VP35. A. Schemata der Coiled-Coil-Fusionsproteine.** Die verwendeten Coiled-Coil-Fusionsproteine wurden in Abb. 12 beschrieben und hier zusammen mit VP35 bzw. VP35Flag eingesetzt. **B. In vitro Translation.** Die genannten Fusionsproteine und VP35/ VP35Flag wurden, wie in Abb. 6 geschildert, in den gezeigten Kombinationen in vitro kosynthetisiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Plasmide wurden im Verhältnis Flag:nicht-Flag 1:10 eingesetzt. Bei Einzelsynthese wurde die Plasmidmenge mit Leervektor komplementiert. **C. Koimmunpräzipitation I.** Die genannten Kombinationen wurden einer Koimmunpräzipitation mit anschließender SDS-PAGE unterzogen. Die Kosyntheseprodukte wurden entweder mit einer Kombination aus Kaninchen  $\alpha$ E30-Antiserum (Verdünnung 1:1.000) und monoklonalem  $\alpha$ Flag-Antikörper M2 (Verdünnung 1:1.000) oder dem monoklonalen  $\alpha$ Flag-Antikörper M2 (Verdünnung 1:1.000) präzipitiert. **D. Koimmunpräzipitation II.** HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und 1 h später mit Plasmiden für die genannten Proteine transfiziert. Nach 14 h wurden die Zellen metabolisch mit [ $^{35}$ S]-PROMIX für 1 h markiert, lysiert und einer Immunpräzipitation mit anschließender SDS-PAGE unterzogen. Die Präzipitation der Zellysate erfolgte entweder mit einer Kombination aus Meerschweinchen  $\alpha$ VP35-Antiserum (Verdünnung 1:2.000) und monoklonalem  $\alpha$ Flag-Antikörper M2 (Verdünnung 1:1.000) oder dem Meerschweinchen  $\alpha$ VP35-Antiserum (Verdünnung 1:2.000). Bei B, C und D ist links neben der Gel-Abbildung die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die Proteine sind durch Pfeile markiert.

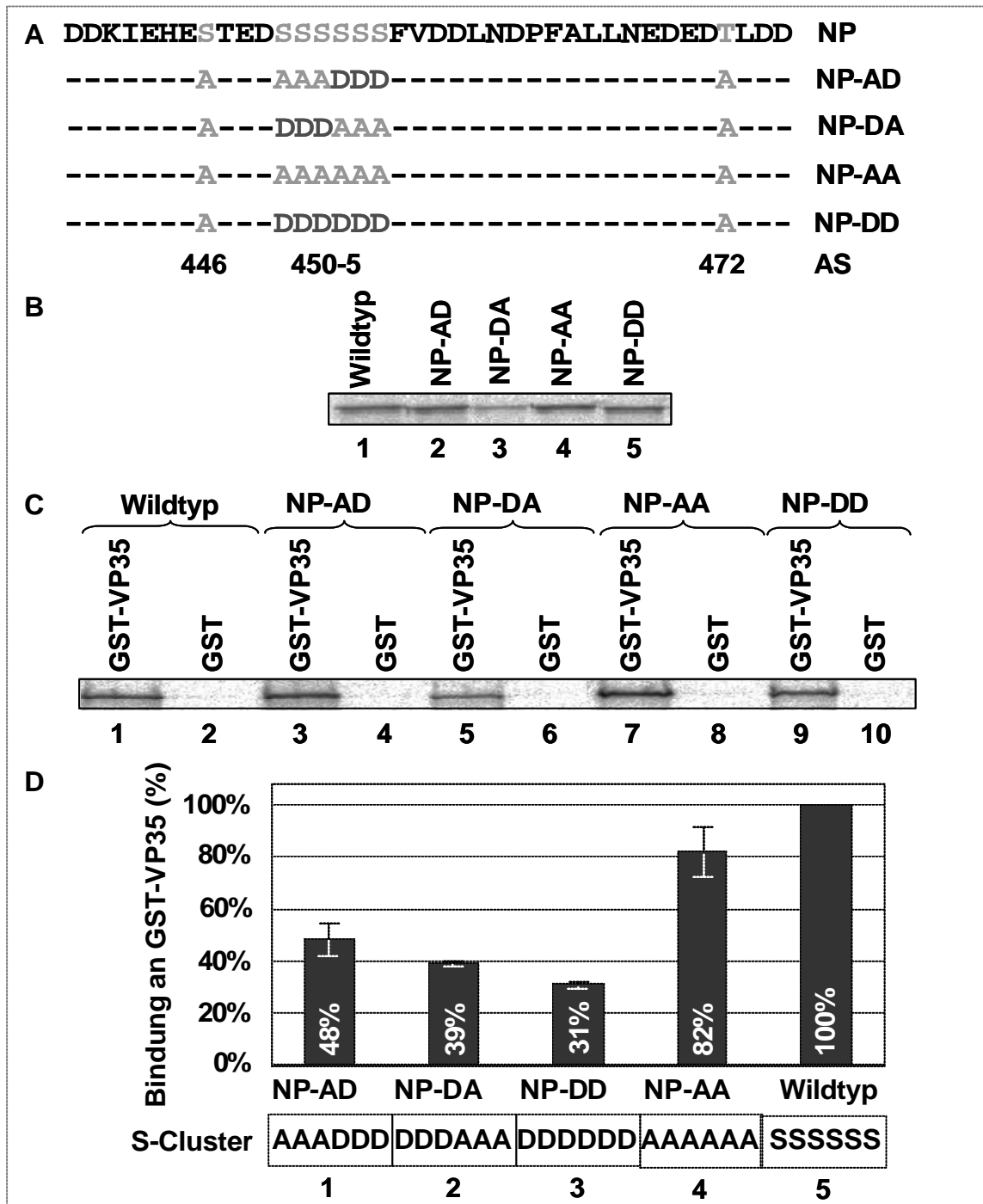
#### 5.2.4. Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Oligomerisierung mit VP35

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine NP-NP-Interaktion über Phosphorylierungsprozesse des Serinclusters in der phosphorylierten Region II reguliert werden kann. Um nun die Bedeutung der Phosphorylierung dieser Serinreste für die NP-VP35-Interaktion zu untersuchen, wurden die unter 5.1.5. hergestellten vier Serincluster-NP-Substitutionsmutanten im GST pull-down eingesetzt und ihre Affinität zu bakteriell exprimiertem GST-VP35 bestimmt.

##### **In vitro Translation der Serincluster-NP-Substitutionsmutanten und Interaktion mit GST-VP35**

Die Serincluster-NP-Substitutionsmutanten wurden analog zu 5.1.1. exprimiert. Die Synthese aller Serincluster-NP-Substitutionsmutanten war erfolgreich (Abb. 22B). Die in vitro Translationsprodukte wurden im Anschluss mit aufgereinigtem GST-VP35 bzw. GST inkubiert (4.3.3.). Das weitere Verfahren entsprach dem unter 5.2.4. beschriebenen Ablauf. Die SDS-PAGE wurde mit einem 10%igen Gel durchgeführt. Die Inkubation der in vitro Translationsprodukte mit GST diente als Hintergrundkontrolle. Das getrocknete Gel wurde eingescannt (Abb. 22C) und die Stärken der Proteinbanden mit dem Programm TINA 2.0 quantifiziert. Die Abb. 22D zeigt die Auswertung des *pull-down*-Experiments. Die Bindung des NP-Wildtyp an GST-VP35 wurde gleich 100% gesetzt. Die komplette Dephosphorylierung des Serinclusters beeinflusste die Oligomerisierung mit VP35 kaum (NP-AA, 82%, Balken 4). Ein permanent phosphoryliertes Serincluster verminderte hingegen die Oligomerisierung auf 31% (NP-DD, Balken 3). Wurde das Serincluster teilweise phosphoryliert/

dephosphoryliert, verringerte sich ebenfalls die Affinität zu GST-VP35 (NP-AD: 48%, NP-DA: 39%, Balken 1 und 2). Aufgrund der vorliegenden Daten wurde folgender Schluss gezogen: die Oligomerisierung mit VP35 kann über die Phosphorylierung des Serinclusters der Region II reguliert werden.



**Abb. 22:** Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Oligomerisierung mit VP35. **A.** Schemata der Serincluster-NP-Substitutionsmutanten. Die verwendeten NP-Mutanten wurden in Abb. 16 eingeführt. **B.** *in vitro* Translation. Die genannten NP-Mutanten wurden, wie in Abb. 6 beschrieben, *in vitro* synthetisiert und einer SDS-PAGE unterzogen. **C.** **GST pull-down.** Der restliche Translationsmix wurde, wie in Abb. 6 beschrieben, einem GST pull-down Assay (GSH-GST-VP35 bzw. GSH-GST) und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung befinden sich die Markerbanden. Die spezifischen Präzipitate sind in den Spuren 1, 3, 5, 7 und 9 gezeigt. Die Spuren 2, 4, 6, 8 und 10 zeigen den GST-Hintergrund. **D.** **Quantifizierung der radioaktiven Signale.** s. Abb. 6.

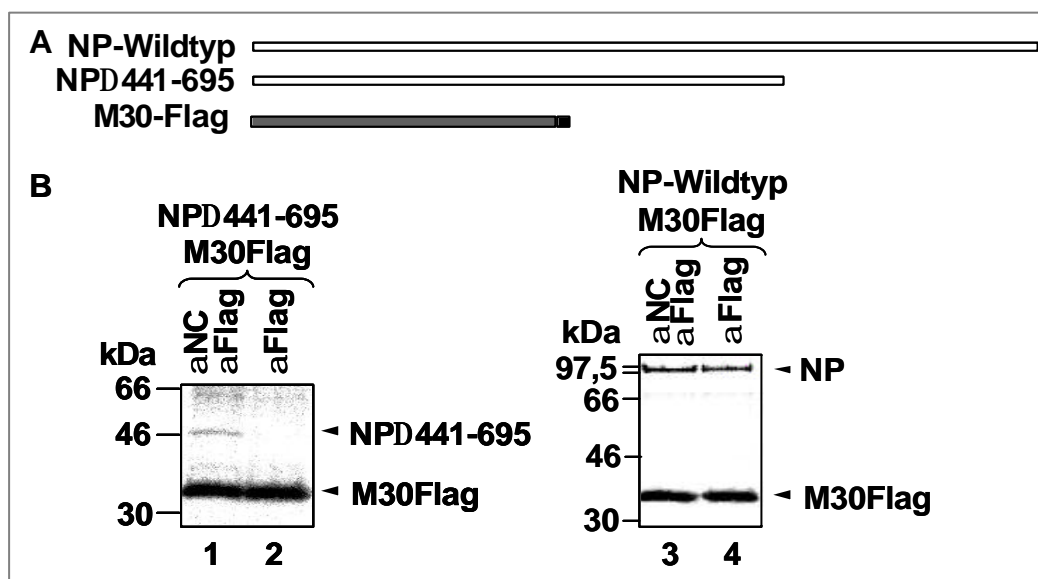
### 5.3. Arbeiten zur VP30-NP-Interaktion

#### 5.3.1. Identifizierung von NP-Bereichen, die zur Oligomerisierung mit VP30 dienen

Nach rekombinanter Einzelexpression zeigt das MARV-VP30 eine homogene Verteilung im Zytoplasma der transfizierten Zellen. Nach Koexpression mit NP kolokalisiert es mit den NP-induzierten Einschlusskörpern (Becker et al., 1998). D. h., das MARV-VP30 ist, wie auch das VP35, wahrscheinlich mit dem NP-induzierten Nukleokapsid-Grundgerüst assoziiert. Dafür sprechen auch elektronenmikroskopische Untersuchungen, bei denen gezeigt werden konnte, dass das VP30 an die durch das NP gebildeten NP-Helices bindet (L. Kolesnikova, pers. Mitteilung). Die VP30-Bindungsstelle auf dem NP sollte mittels Koimmunpräzipitation eingegrenzt werden.

#### Koimmunpräzipitation von NPD441-695 und VP30

Es wurden NP-Wildtyp und die NP-Mutante NP $\Delta$ 441-695 eingesetzt, die in der Arbeitsgruppe bereits vorlag. In Abb. 23A sind die eingesetzten Proteine schematisch dargestellt.



**Abb. 23: Untersuchung zur VP30-Heterooligomerisierung. A. Schemata der verwendeten Proteine.** Eingesetzt wurden die Gterminale NP-Deletionsmutante NP $\Delta$ 441-695, NP-Wildtyp und M30Flag (MARV-VP30Flag). Die Balken repräsentieren das synthetisierte Protein (Flag-Epitop: schwarzer Kasten am G-Terminus des M30). **B. Koimmunpräzipitation.** Die genannten NP-Mutanten und M30Flag wurden in den genannten Kombinationen, wie in Abb. 6 beschrieben, in vitro kosynthetisiert, koimmunpräzipitiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Plasmide wurden im Verhältnis 1:10 (Flag:nicht-Flag) eingesetzt. Die Kosyntheseprodukte wurden entweder mit einer Kombination aus Kaninchen  $\alpha$ NC-Antiserum (Verdünnung 1:500) und monoklonalem  $\alpha$ Flag-Antikörper M2 (Verdünnung 1:1.000) oder dem monoklonalen  $\alpha$ Flag-Antikörper M2 (Verdünnung 1:1.000) präzipitiert. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die Proteine sind mit Pfeilen markiert.

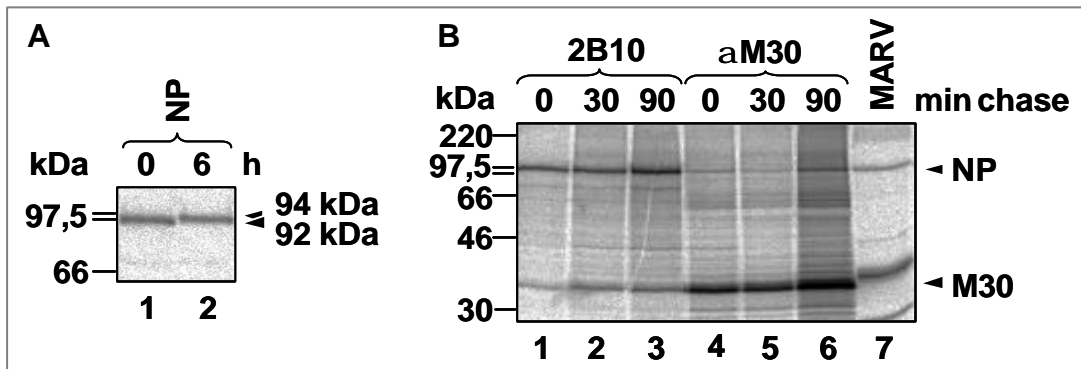
Die Plasmide für NP $\Delta$ 441-695 bzw. NP-Wildtyp und VP30Flag (M30Flag) wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt, in MVA-T7 infizierte HeLa-Zellen transfiziert und die Zellen metabolisch mit [ $^{35}$ S]-PROMIX markiert (4.2.3. und 4.3.1.). M30Flag wurde anschließend mit dem  $\alpha$ -Flag-Antikörper M2 präzipitiert. In einem Parallelansatz wurden die NP-Mutanten und das M30Flag durch eine Kombination von  $\alpha$ -Flag und  $\alpha$ -NP-Antikörper präzipitiert (4.3.3.). Alle Proben wurden einer SDS-PAGE unterzogen und die radioaktiven Signale nach Fixieren und Trocknen des 12%igen Gels mit dem BioLmager dargestellt (4.3.5. und 4.3.6., Abb. 23B). Die Deletionsmutante NP $\Delta$ 441-695 (48 kDa, Spur 1) wurde nicht über das Flag-markierte VP30 (apparentes Molekulargewicht: 33 kDa) kopräzipitiert (Spur 2). NP-Wildtyp konnte hingegen kopräzipitiert werden (Spur 4). Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die Gegenwart der AS 441-695 bedeutend für die Oligomerisierung des NP mit VP30 ist.

### **5.3.2. Einfluss der Phosphorylierung des NP auf die Oligomerisierung mit VP30**

Das MARV-NP liegt nach rekombinanter Expression und in Virus-infizierten Zellen in einer 92 kDa und einer 94 kDa Form vor. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Dephosphorylierung des NP die 94 kDa-Form in die 92 kDa-Form überführt werden konnte (Becker et al., 1994). Nun sollte untersucht werden, ob die Interaktion von NP und VP30 von der Phosphorylierung des NP, die sich in der Molekulargewichtsänderung äußert, beeinflusst wird. Zuerst wurde untersucht, wann nach der Expression des NP die 92 kDa-Form in die 94 kDa-Form umgewandelt wird. Dazu wurde eine Kinetik der Umwandlung mittels *pulse-chase*-Experiments durchgeführt.

#### ***Pulse-chase* des NP**

Das MARV-NP wurde analog zu 5.1.1.2. mittels MVA-T7-Expressionssystem in HeLa-Zellen exprimiert und metabolisch mit [ $^{35}$ S]-PROMIX markiert. Dann wurde ein *pulse-chase*-Experiment durchgeführt (4.2.3. und 4.3.2.). Nach 0 und 6 h *chase* fand die Zellyse statt. Die Proben wurden einer Immunpräzipitation mit dem  $\alpha$ -NP-Antikörper 2B10 unterzogen (4.3.3.) und über SDS-PAGE analysiert (4.3.5.; Abb. 24A). Es zeigte sich, dass das MARV-NP nach 0 h *chase* nur in der 92 kDa-Form vorlag (Spur 1). Nach 6 h lag vorwiegend die 94 kDa-Form vor (Spur 2). Frühere Untersuchungen zeigten, dass NP den 94 kDa-Zustand bereits nach 60 min erreichte (Lötfering, 1998).



**Abb. 24: Einfluss posttranslationaler NP-Phosphorylierung auf die Oligomerisierung mit VP30. A. Pulse-chase-Experiment mit NP-Wildtyp.** HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und 1 h später mit Plasmiden für NP-Wildtyp transfiziert. Nach 14 h wurden die Zellen metabolisch mit [ $^{35}$ S]-PROMIX für 30 min markiert (*pulse*). Ein Teil der Zellen wurde anschließend lysiert (*chase* = 0 h). Beim anderen Teil wurde das Markierungsmedium durch Kulturmedium ersetzt, die Zellen weitere 6 h inkubiert (*chase* = 6 h), lysiert, alle Proben einer Immunpräzipitation und SDS-PAGE unterworfen. Die Zellysate wurden mit dem monoklonalen  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 (Verdünnung 1:1.000) präzipitiert. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die beiden Laufformen des NP sind durch Pfeile markiert. Bei MVA-T7 und Mock wurden keine Signale detektiert (nicht gezeigt). **B. Pulse-chase-Experiment mit NP und VP30.** HeLa-Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit MVA-T7 infiziert und mit Plasmiden für NP-Wildtyp und M30 (MARV-VP30) transfiziert. Nach 14 h wurden die Zellen metabolisch mit [ $^{35}$ S]-PROMIX für 30 min markiert (*pulse*). Ein Teil der Zellen wurden anschließend lysiert (*chase* = 0 min). Beim anderen Teil wurde das Markierungsmedium durch Kulturmedium ersetzt, die Zellen weitere 30 min (*chase* = 30 min) und 90 min (*chase* = 90 min) inkubiert und anschließend lysiert. Alle Proben wurden einer Immunpräzipitation mit anschließender SDS-PAGE unterworfen. Die Zellysate wurden geteilt und entweder mit dem monoklonalen  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 (Verdünnung 1:1.000) oder dem Meerschweinchen  $\alpha$ M30-Antiserum (Verdünnung 1:1.000) präzipitiert. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. Die NP und M30-Präzipitate sind durch Pfeile markiert. In Spur 7 wurde MARV aufgetragen. MVA-T7 und Mock zeigten keine Signale (nicht gezeigt). M30 interagiert mit NP. Die Kopräzipitation lässt sich über beide Antikörper zeigen.

### Pulse-chase des NP/ VP30-Komplexes

Um zu überprüfen, ob das MARV-VP30 (M30) zur Interaktion eine der beiden intrazellulären NP-Formen (92 kDa und/ oder 94 kDa) bevorzugt, wurden M30 und NP in HeLa-Zellen mittels des MVA-T7 Expressionssystems synthetisiert und in einem *pulse-chase*-Experiment analog zu 5.1.1.2. analysiert (4.2.3. und 4.3.2.). Der *pulse* erfolgte über einen Zeitraum von 30 min und der *chase* für 0, 30 und 90 min. Das weitere Verfahren verlief gemäß der oben beschriebenen Koimmunpräzipitation (4.3.3.). Nach Teilung der Zellysate erfolgte die Präzipitation der exprimierten Proteine jeweils mit einem  $\alpha$ -NP-Antikörper 2B10 und einem  $\alpha$ -VP30-Antiserum. Die Proben wurden schließlich einer SDS-PAGE unterzogen (Abb. 24B). Es zeigte sich, dass NP schon nach 30 min über M30 kopräzipitiert werden konnte (Spur 1). Ebenso wurde M30 über NP kopräzipitiert (Spur 4). Bei gesteigerter Expressionszeit (60 bzw. 120 min, Spuren 2, 3, 5, 6) konnte eine Verstärkung der Interaktion beobachtet werden (30%). Wie in Abb. 24A gezeigt, existiert nach 30 min Expression

ausschließlich NP mit einem Molekulargewicht von 92 kDa. Die Beobachtungen aus Abb. 24A und 24B lassen vermuten, dass die Molekulargewichtsänderung des NP für die Interaktion des MARV-VP30 mit NP nicht essentiell ist (Abb. 24B, Spur 1).

#### **5.4. Untersuchungen zur Phosphorylierung der Region II des NP**

Das NP ist das am stärksten phosphorylierte Protein des MARV. Nach rekombinanter Expression und in Virus-infizierten Zellen liegt NP phosphoryliert und nicht-phosphoryliert vor. Aus Virionen kann dagegen nur die phosphorylierte Form isoliert werden (Becker et al., 1994). Daher scheint diese Modifikation eine funktionelle Bedeutung für das Protein zu besitzen. Dies konnte durch die hier vorgelegten Ergebnisse erhärtet werden. Frühere Arbeiten stellten fest, dass die Phosphorylierung des NP in sieben definierten Bereichen des hochvariablen C-Terminus erfolgt (Regionen I-VII, Lötfering et al., 1999). Ein Vergleich des MARV-NP mit Nukleoproteinen der Vertreter der Ordnung Mononegavirales zeigt, dass die AS 390-480 teilweise konserviert sind. Die phosphorylierte Region II (AS 439-475) liegt damit zwar in einem Bereich des NP, der als variabel angesehen wird (Sanchez et al., 1992), zeigt selbst jedoch Homologien zu anderen Vertretern der Ordnung Mononegavirales. Die Region II weist eine negative Nettoladung auf und besitzt ferner ein einzigartiges Motiv: ein Cluster von sechs Serinresten (AS 450-5) (Abb. 25). Frühere Untersuchungen zeigten, dass in der Region II Serin- und Threoninreste modifiziert werden und im Serincluster der Hauptteil der Phosphorylierung des NP erfolgt (Di Carlo, 2000).

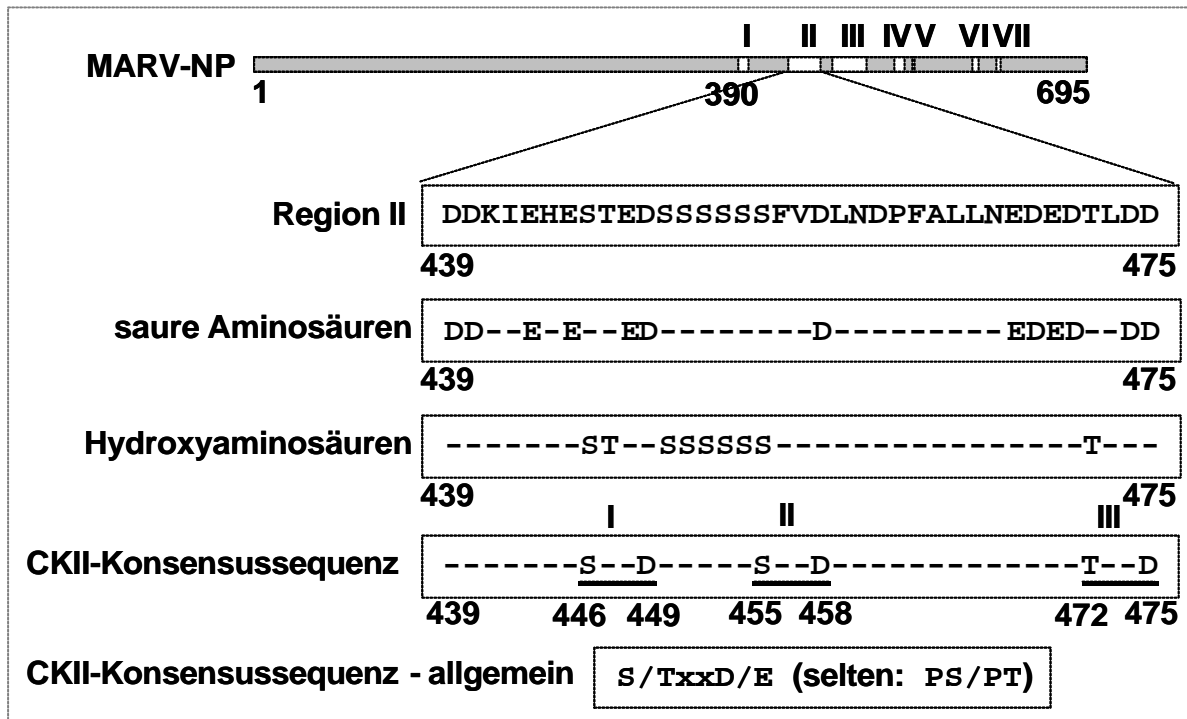
##### **5.4.1. Phosphorylierungsstatus der Region II und Einfluss der Proteinkinase CKII**

Sequenzanalysen der Region II des NP (AS 439-475) ergaben, dass in diesem Bereich drei potentielle Erkennungsstellen der Serin/ Threonin-Kinase CKII (Proteinkinase (PK) CKII; S/ TxxD/ E selten: PS/ PT) existieren.

In Abb. 25 sind unterhalb der Aminosäuresequenz der vergrößert dargestellten Region II (AS 439-475) die drei potentiellen PK CKII-Phosphorylierungsstellen hervorgehoben. Ausgehend von einer NP-Mutante, die als einzigen phosphorylierten Bereich die Region II enthielt, wurden die vorhandenen PK CKII Phosphorylierungsstellen durch Substitution der Aspartat- oder Serinreste des Motivs zu Alaninen sukzessive zerstört. Die Mutanten lagen bereits vor und sind in Abb. 26A schematisch dargestellt. Die NP-Mutante mit Wildtyp-Region II trägt die Bezeichnung NP<sup>RegII</sup>.

Durch Zerstörung des zweiten CKII-Motivs wurde die Mutante NP<sup>RegII</sup>D/A (D458A) kreiert. Bei NP<sup>RegII</sup>DD/A wurde das dritte CKII-Motiv zerstört (D458A, D475A). Diese

Mutante diente letztlich zur Herstellung von NP<sup>RegII</sup>SDD/A (S446A, D458A, D475A), bei der zusätzlich das erste CKII-Motiv zerstört worden war.



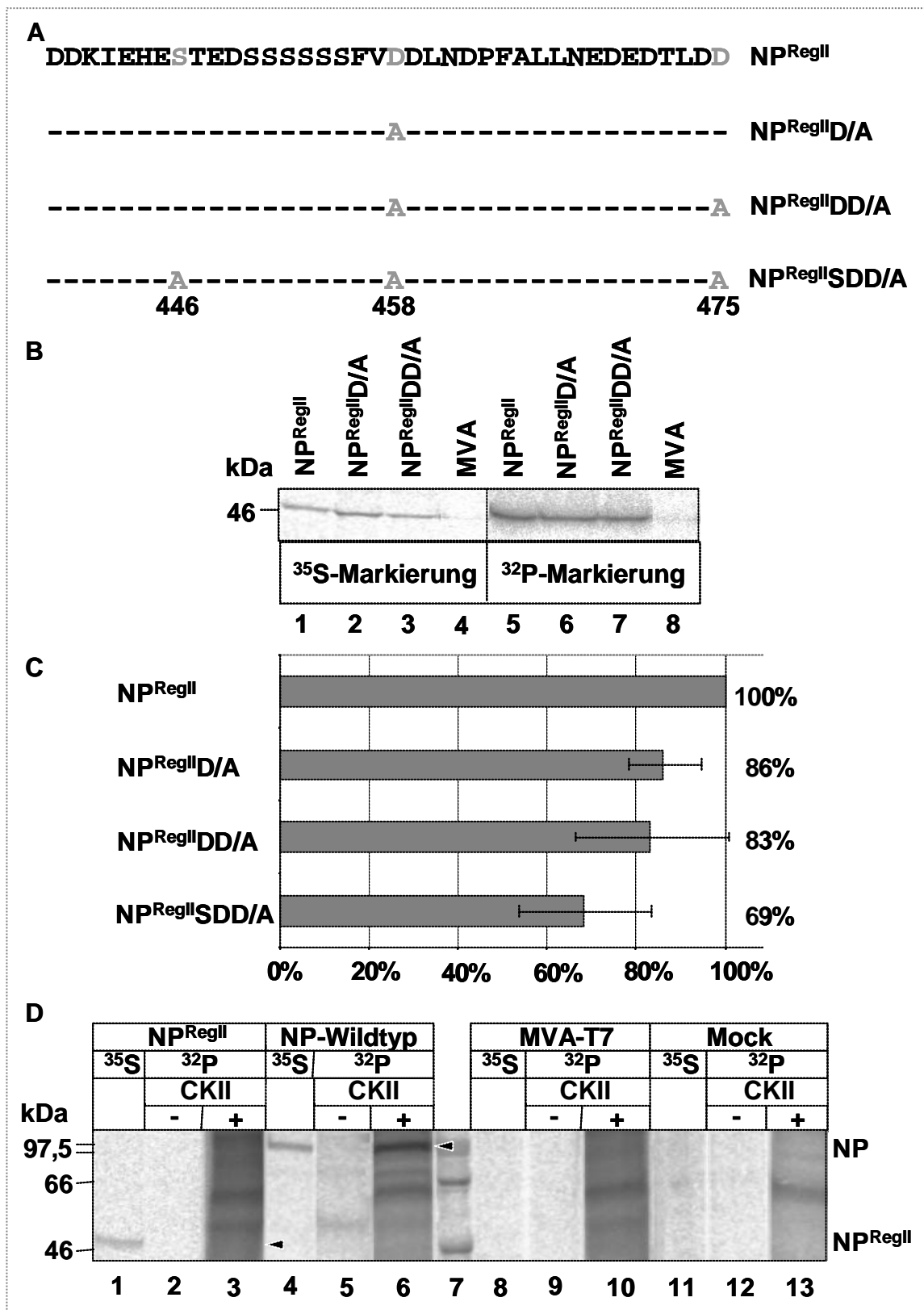
**Abb. 25: Übersicht über die Region II des NP.** Die starke Phosphorylierung des MARV vollzieht sich im C-terminalen Bereich in sieben definierten Regionen (AS 390-695, Regionen I-VII). Die Aminosäuresequenz der Region II (AS 439-475) ist hervorgehoben (Einbuchstabencode). Gesondert hervorgehoben sind die zahlreichen sauren Aminosäuren, die der Region eine negative Nettoladung bescheren. Darunter sind die Hydroxyaminosäuren (2 Threonin- und 7 Serinreste) gezeigt, die bei Phosphorylierung durch die Phosphatgruppen die negative Nettoladung verstärken können. Prominent ist eine hexameres Serincluster (S450-455). Zuletzt sind drei Konsensussequenzen für die PK CKII (S/TxxD/E, selten PS/PT) gezeigt: S<sub>446</sub>xxD<sub>449</sub>, S<sub>455</sub>xxD<sub>458</sub> und T<sub>472</sub>xxD<sub>475</sub>.

Die Region II NP-Mutanten wurden in HeLa-Zellen mit dem MVA-T7 Expressionssystem synthetisiert, metabolisch mit [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat oder [<sup>35</sup>S]-PROMIX markiert, immunpräzipitiert und über SDS-PAGE aufgetrennt (4.2.3., 4.3.2., 4.3.3. und 4.3.5.). Gezeigt ist in Abb. 26B beispielhaft die Expression bzw. Phosphorylierung von NP<sup>RegII</sup>, NP<sup>RegII</sup>D/A und NP<sup>RegII</sup>DD/A. Die MVA-T7-Kontrolle war negativ. Die Markierung mit [<sup>35</sup>S]-PROMIX diente der Kontrolle der Expression und Quantifizierung der jeweiligen Region II-NP-Mutanten. Die [<sup>32</sup>P]-Signale wurden anschließend mit dem Biolumineszenz-Messgerät und dem Programm TINA 2.0 quantifiziert sowie über eine Bestimmung der jeweiligen Expressionsstärke der Proteine normalisiert. Für jede Region II-NP-Mutante wurden mindestens 3 unabhängige Analysen des Phosphorylierungsstatus durchgeführt. Der Austausch des Aspartatrestes 458 oder 475 reduzierte nur unwesentlich die <sup>32</sup>P-Signalstärke (Abb. 26C, Balken 2 und 3). Erst die Substitution des Serinrestes 446 zu Alanin führte zu einer Reduktion der <sup>32</sup>P-Signalstärke auf 54%.



(Abb. 26C, Balken 4). Daraus ließ sich vermuten, dass der Serinrest 446 phosphoryliert wird.

Um die Rolle der PK CKII bei der Phosphorylierung der Region II ausführlicher zu untersuchen, wurde ein in vitro Kinasierungsassay durchgeführt, wie er bei Zhi et al. (1999) beschrieben ist.



**Abb. 26: Untersuchung zum Phosphorylierungsstatus der Region II und Einfluss der PK CKII auf die Modifizierung der Region II.**

**A. Schemata der NP-Mutanten.** Untersucht wurden NP-Deletionsmutanten mit sukzessiv substituierten CKII-Erkennungsstellen. NP<sup>RegII</sup> besteht aus dem nicht-phosphorylierten N-Terminus (AS 1-390) und der wildtypischen Region II (AS 439-475). NP<sup>RegII</sup>D/A: durch Substitution D458/A wurde die CKII-Erkennungsstelle II (S455xxD458) zerstört. NP<sup>RegII</sup>DD/A: bei NP<sup>RegII</sup>D/A wurde die CKII-Erkennungsstelle III (T472xxD475) substituiert (D475/A). NP<sup>RegII</sup>DDS/A: bei NP<sup>RegII</sup>DD/A wurde die CKII-Erkennungsstelle I (S446xxD449) substituiert (S446/A).

**B. Phosphorylierungsstatus.** HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und 1 h später mit Plasmiden für die oben genannten NP-Mutanten transfiziert. Nach 14 h wurden die Zellen metabolisch mit [<sup>35</sup>S]-PROMIX für 1 h oder [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat für 2 h markiert, lysiert und die Proben einer Radioimmunpräzipitationsanalyse unterworfen. Die Proben wurden mit dem Kaninchen  $\alpha$ NC-Antiserum (Verdünnung 1:500) präzipitiert und dann einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. In den Spuren 1-4 ist die [<sup>35</sup>S]-Markierung, in den Spuren 5-8 die [<sup>32</sup>P]-Markierung gezeigt. Alle NP-Mutanten werden phosphoryliert. Bei MVA-T7 (Spur 4 und 8) und Mock (nicht gezeigt) wurden keine Signale detektiert.

**C. Quantifizierung der Phosphorylierung.** Die [<sup>32</sup>P]-markierten Proben wurden über die [<sup>35</sup>S]-markierten Proben normalisiert. Der normalisierte [<sup>32</sup>P]-NP<sup>RegII</sup>-Wert wurde gleich 100% gesetzt. Die Werte der übrigen Mutanten wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. Der Mittelwert aus drei Bestimmungen ist rechts neben den Balken eingetragen. Die Zerstörung der CKII-Erkennungsstelle II und III hat keinen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung der Region II. Die Zerstörung der CKII-Erkennungsstelle I reduziert die Phosphorylierung um ca. 30%. S446 wird vermutlich phosphoryliert.

**D. In vitro Kinasierungsassay für CKII.** HeLa-Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit MVA-T7 infiziert und mit Plasmiden für NP-Wildtyp oder NP<sup>RegII</sup> transfiziert. Nach 14 h wurden die Zellen metabolisch mit [<sup>35</sup>S]-PROMIX oder [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat für 2 h markiert, anschließend lysiert und einer Radioimmunpräzipitationsanalyse, s. o., unterworfen. Die gewaschenen Präzipitate wurden zuerst einem in vitro Kinasierungsassay mit rekombinanter CKII und dann einer SDS-PAGE unterworfen. Links neben den Gelen sowie zwischen den Proben und MVA-T7 sind Markerbanden aufgetragen. In den Spuren 1-3 ist NP<sup>RegII</sup>, in den Spuren 4-6 NP-Wildtyp, in den Spuren 8-10 MVA-T7 und in den Spuren 11-13 Mock gezeigt. Die Spuren 1, 4, 8 und 11 zeigen die [<sup>35</sup>S]-Markierung (Expressionskontrolle). NP-Wildtyp wurde durch rekombinante CKII in vitro phosphoryliert (Spur 6). NP<sup>RegII</sup> konnte nicht in vitro phosphoryliert werden (Spur 3). Die Proteine sind durch Pfeile markiert. Bei MVA-T7 und Mock wurden keine Signale detektiert.

Dazu wurde das zu untersuchende Protein zunächst in HeLa-Zellen mit dem MVA-T7-System exprimiert, mit [<sup>32</sup>P] metabolisch markiert, lysiert und mittels Immunpräzipitation gereinigt (4.2.3., 4.3.2. und 4.3.3.).

Dann wurde es durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase von allen Phosphatgruppen befreit und anschließend mit einer rekombinanten PK CKII und [<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert (4.3.1.). Um die Expression des Proteins zu kontrollieren, wurde ein Ansatz mit [<sup>35</sup>S]-PROMIX markiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne PK CKII (Spur 2) und NP-Wildtyp als Positivkontrolle (Abb. 26D, Spur 6). NP enthält neben den Phosphorylierungsstellen der Region II weitere C-terminal gelegene PK CKII-Phosphorylierungsstellen und wird offensichtlich durch CKII modifiziert (Spur 6). Das Experiment zeigte jedoch, dass die Region II nicht durch die PK CKII phosphoryliert werden konnte (Abb. 26D, Spur 3).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden folgende Schlüsse gezogen: 1) Die Region II enthält Konsensuserkennungsstellen für die PK CKII. Werden diese durch Mutationen

zerstört, sinkt die Phosphorylierung der Region nur geringfügig. 2) Die Phosphorylierung der Region II lässt sich nicht durch PK CKII initiieren.

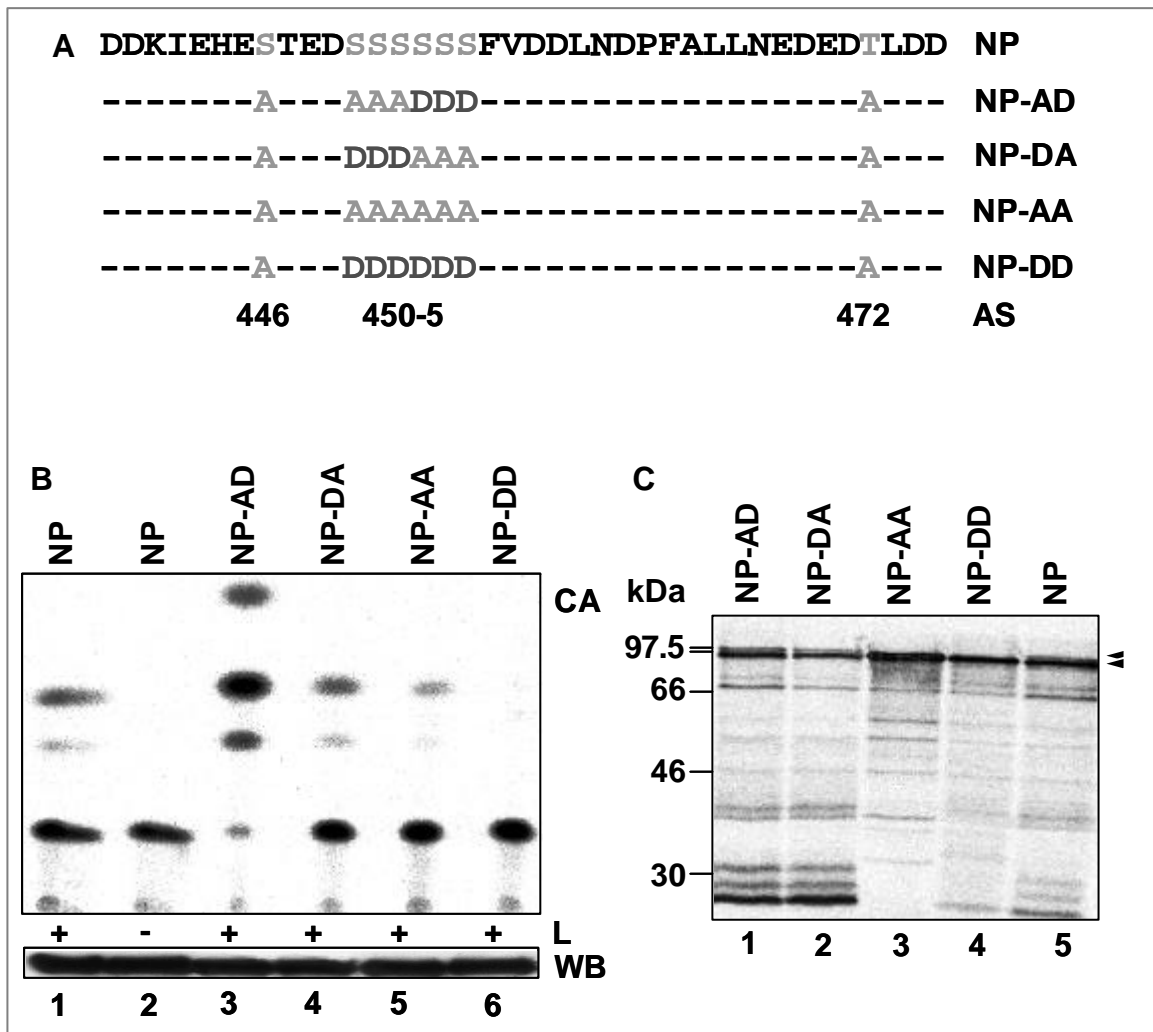
#### **5.4.2. Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Bildung der Einschlusskörper**

Um zu untersuchen, ob die Bildung der NP-Einschlusskörper durch die Phosphorylierung des Serinclusters der Region II beeinflusst wird, wurden phosphorylierungsdefiziente Serincluster-NP-Substitutionsmutanten (Abb. 27A) mit dem MVA-T7 Expressionssystem in HeLa-Zellen exprimiert. 16 h nach Infektion wurden die Zellen einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse unterzogen (4.2.3. und 4.3.4.). Alle Mutanten waren in der Lage, Einschlusskörper zu induzieren (nicht gezeigt).

#### **5.4.3. Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die virale RNA-Synthese**

Als Nächstes wurde geprüft, welchen Einfluss die Phosphorylierung der Region II auf die MARV-Transkription ausübte. Diese Analyse wurde mit dem zuvor beschriebenen MARV-Replikations-/ Transkriptionssystem durchgeführt. Dazu wurden HUH T7-Zellen entsprechend zu 5.1.1.2. mit Plasmiden transfiziert, die für die Nukleokapsidproteine NP, VP35 und L sowie für ein MARV-spezifisches Minigenom kodieren. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und einer CAT-Aktivitätsbestimmung unterzogen (4.3.1.). Das NP wurde in den jeweiligen Ansätzen durch einen der in Abb. 27A beschriebenen Serincluster-NP-Substitutionsmutanten ersetzt. In dem Minigenomsystem ist das Verhältnis von NP zu VP35 kritisch für die Aktivität des Systems (Mühlberger et al., 1998). Um sicherzustellen, dass nicht ein Missverhältnis zwischen NP und VP35, sondern tatsächlich die jeweils eingeführte Mutation für die beobachteten Ergebnisse verantwortlich war, fand eine Titration der Plasmidmengen der Serincluster-NP-Substitutionsmutanten statt (nicht gezeigt). Es zeigte sich, dass von NP-AD und NP-AA die doppelte Plasmidmenge (200 ng) zur Transfektion eingesetzt werden musste. Die Expression wurde mittels Western-Immunoblot-Analyse kontrolliert (Abb. 27B). Abb. 27C zeigt, dass die Mutante NP-AD (S 450-2 A, S 453-5 D) in sehr viel stärkerem Maß funktionell war als NP-Wildtyp (Spur 1 und 3). NP-DA (S 450-2 D, S 453-5 A), vermittelte eine mit NP-Wildtyp vergleichbare Transkriptionsaktivität des Systems (Spur 4). Wurden jedoch alle 6 Serinreste gegen Alanine oder Aspartate ausgetauscht (NP-AA oder NP-DD), war die Transkription fast vollständig inhibiert (Spur 5 und 6). Da Aspartatreste Phosphoserine und Alaninreste dephosphorylierte Serine imitierten (Benndorf et al., 2001; Leger et al., 1997), wurde vermutet,

dass sowohl eine komplette Phosphorylierung als auch Dephosphorylierung des Serinclusters die Funktion des NP bei der Transkription hemmt. Die durch eine permanente Dephosphorylierung hervorgerufene Hemmung (NP-AA, Spur 5) ist jedoch weniger stark als die, die durch eine permanente Phosphorylierung hervorgerufen wird (NP-DD, Spur 6).



**Abb. 27: Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Funktion des Proteins während der viralen RNA-Synthese und die Stabilität des Proteins. A. Schemata der NP-Mutanten.** Es wurden die in Abb. 16 eingeführten Serincluster-NP-Substitutionsmutanten verwendet. **B. Replikation/Transkriptionsassay.** HUH-T7-Zellen wurden mit Plasmiden, wie in Abb. 9 beschrieben, transfiziert und die Zellen nach 38 h lysiert. **Oben:** Ein Aliquot des Zelllysats wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und die Proteine, wie in Abb. 9 beschrieben, detektiert. **Unten:** 2 µl des Zelllysats wurde einem CAT-Reportergenassay unterworfen. Die Proben wurden auf einer DC-Platte aufgetragen und aufgetrennt. Die Platte wurde auf eine Biomege-Platte je nach Signalstärke 1-12 h exponiert und der Versuch am nächsten Tag ausgewertet. **C. Einfluss der Phosphorylierung der Region II des NP auf die Stabilität.** Die genannten NP-Mutanten wurden wie in Abb. 6 beschrieben in vitro synthetisiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angezeigt. NP-AD und NP-DA zeigen eine Abbaubandenleiter wie NP-Wildtyp – aber deutlich stärker (vgl. Spur 1 und 2 mit 5). Bei NP-DD ist das wildtypische Abbaubandenmuster deutlich schwächer ausgeprägt (vgl. Spur 4 und 5). NP-AA zeigt ein ganz anderes Muster. Die Mutation führt zu einer Stabilisierung des Volle-Länge Proteins. Die Ladung des Proteins an der Position des Serinclusters scheint Einfluss auf den Abbau des NP zu haben. Die Doppelbanden sind mit Pfeilen markiert. NP-AA bildet keine Doppelbande aus.

Zusammenfassend heißt das: eine Mutante, bei der eine permanente Dephosphorylierung der ersten drei Serinreste des Clusters und eine permanente Phosphorylierung der letzten drei Serinreste imitiert wurde, erzielte die stärkste Transkriptionsaktivität. Ein ebensolches Ergebnis wurde mit einer NP-Mutante erzielt, deren erste drei Serinreste einer dynamischen Phosphorylierung/ Dephosphorylierung und die letzten drei Serinreste permanent phosphoryliert waren (NP-SD, nicht gezeigt).

#### **5.4.4. Einfluss des Phosphorylierungsstatus des Serinclusters der Region II auf die Stabilität des NP**

NP-Wildtyp und Serincluster-NP-Substitutionsmutanten wurden mittels TNT quick-coupled Kit (Promega, Heidelberg) unter Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin in vitro synthetisiert und über SDS-PAGE analysiert (4.1.9. und 4.3.5.; Abb. 27D). Aufgrund besserer Detektionsmethoden wurde klar, dass in vitro synthetisiertes NP genau wie rekombinant exprimiertes Protein in zwei Formen vorliegt: 92 und 94 kDa. Die höhermolekulare Bande ist bei NP-Wildtyp allerdings nur schwach ausgeprägt (Spur 5). Vom Zustand des Serinclusters war es abhängig, wie deutlich die größere Bande detektiert werden konnte.

War das Cluster nur teilweise phosphoryliert, konnte die Bande detektiert werden, war das Cluster komplett phosphoryliert, konnte es manchmal ganz schwach detektiert werden, war es jedoch komplett dephosphoryliert, konnte keine 94 kDa-Form nachgewiesen werden (vgl. Spuren 1-5).

Nach Quantifizierung aller Spuren zeigte sich, dass die Gesamtproteinmenge in allen Spuren gleich war (nicht gezeigt). Bei der Betrachtung von Abb. 27D fällt außerdem auf, dass die proteolytischen Abbaubanden im Falle der Mutante NP-AA weniger stark ausgeprägt sind. Deutlich wird das anhand dreier charakteristischer Banden um die 30 kDa, die mit dem Vorhandensein der höhermolekularen Bande verkettet sind (vgl. Spur 1, 2 und 3). Möglicherweise ist die nicht phosphorylierte Mutante weniger stark der Proteolyse ausgesetzt.

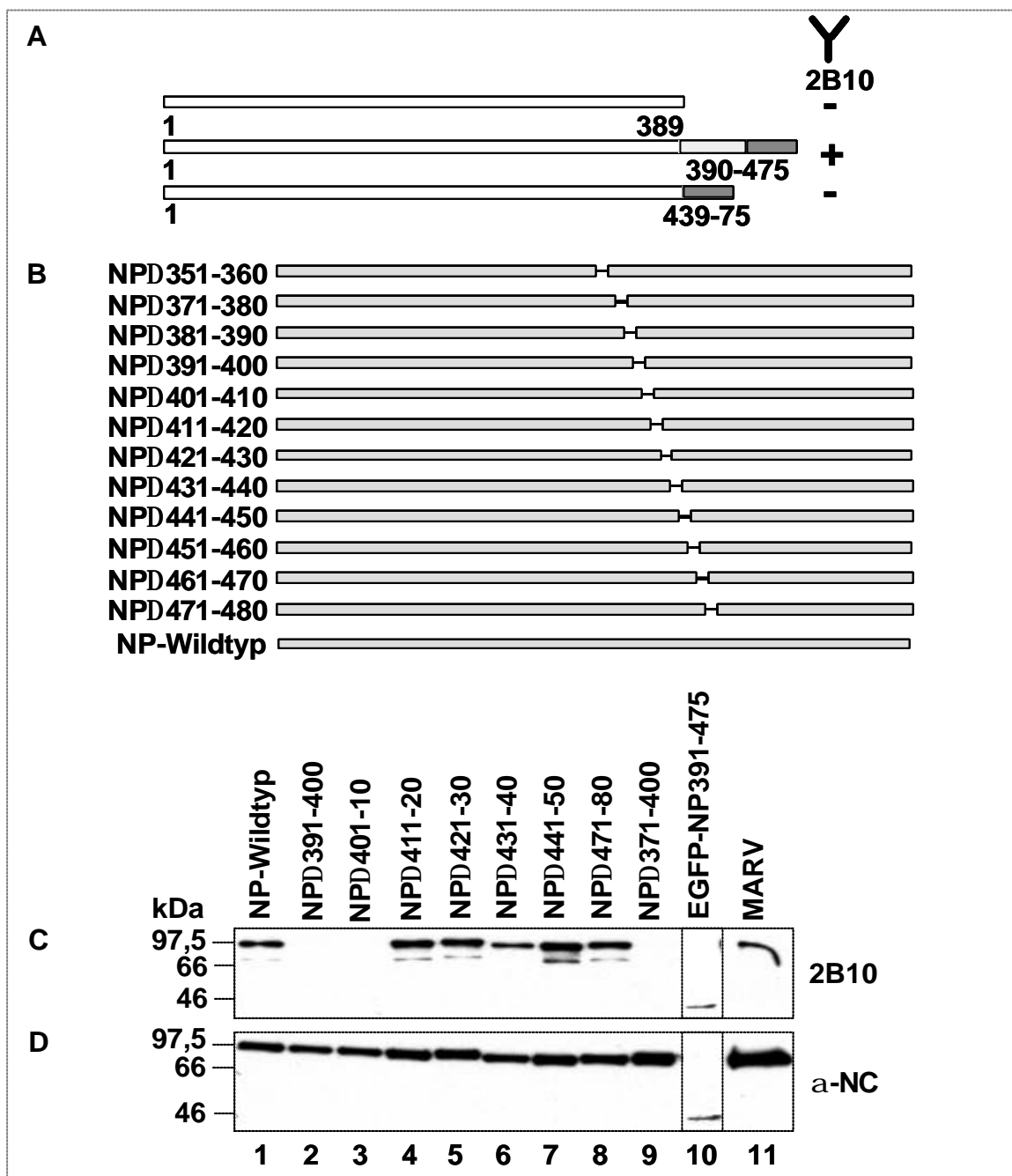
#### **5.5. Eingrenzung des Epitops des monoklonalen $\alpha$ -NP Antikörper 2B10**

Der monoklonale Antikörper 2B10 wurde gegen SDS-inaktiviertes MARV-NP generiert. Unter diesen Bedingungen ist es wahrscheinlich, dass das erkannte Epitop aus einer kurzen linearen Peptidsequenz besteht (Schikore, 1990, Viveros et al., 2000; Stricker et al., 1997). In dieser Untersuchung sollte nun das Epitop lokalisiert werden, das der NP-spezifische monoklonale Antikörper 2B10 auf dem MARV-NP erkennt.

Vorversuche, bei denen C-terminale NP-Deletionsmutanten mittels Western-Immunoblot analysiert wurden, enthüllten, dass der Antikörper den N-Terminus des NP (AS 1-389) nicht detektierte. Eine NP-Mutante hingegen, die die AS 1-480 enthielt, wurde erkannt. Wurden in diesem Protein nun die AS 390-438 deletiert, konnte die NP-Mutante nicht mehr durch 2B10 detektiert werden (NP $\Delta$ 390-438 $\Delta$ 476-695 auch NP<sup>RegII</sup>, Abb. 28A).

### Verwendete NP-Deletionsmutanten

Durch Verwendung interner NP-Deletionsmutanten, die den Bereich der AS 390-440 überspannten (Abb. 28B), sollte das Epitop in Western-Immunoblot-Analysen genauer eingegrenzt werden (siehe 5.1.2.).



**Abb. 28: Eingrenzung des 2B10-Epitops auf Marburg-Virus-NP durch interne Deletionsmutanten. A. Vorversuche.** Immunpräzipitations- und Immunfluoreszenzanalysen mit NP-Deletionsmutanten zeigten, dass eine NP-Mutante nur von dem monoklonalen  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 erkannt wurde, wenn sie die AS 390-438 enthielt. Innerhalb dieser 49 AS musste das 2B10-Epitop liegen. **B. Schemata der NP-Mutanten.** Es wurden die in Abb. 6 beschriebenen NP-Mutanten verwendet. **C. Western-Immunoblot-Analyse mit 2B10.** HUH-T7-Zellen wurden mit den angegebenen NP-Mutanten transfiziert. Getestet wurde außerdem ein Fusionskonstrukt aus MARV-NP391-475 und EGFP (EGFP-NP391-475) und NP $\Delta$ 371-400 (NP $\Delta$ C2). Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Ein Aliquot des Zelllysats wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit dem monoklonalen  $\alpha$ NP-Antikörper (Verdünnung 1:10.000) inkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem POD-markierten  $\alpha$ -Maus IgG Zweitantikörper (Verdünnung 1:50.000) detektiert. NP $\Delta$ 391-400, NP $\Delta$ 401-410 und NP $\Delta$ 371-400 konnten nicht mittels monoklonalen  $\alpha$ NP-Antikörpers 2B10 detektiert werden. Das 2B10-Epitop liegt wahrscheinlich innerhalb der AS 391-410. **D. Immunoblot-Analyse mit  $\alpha$ NC.** Die gleichen Proben - wie oben beschrieben - wurden mit einem Kaninchen  $\alpha$ NC-Antiserum (Verdünnung 1:10.000) inkubiert und die gebundenen Antikörper mit einem POD-markierten  $\alpha$ -Kaninchen IgG Zweitantikörper (Verdünnung 1:50.000) detektiert. Alle Proteine konnten mittels Kaninchen  $\alpha$ NC-Antiserum detektiert werden.

### Western-Immunoblot-Analyse

Die internen NP-Deletionsmutanten und NP-Wildtyp wurden mittels MVA-T7 Expressionssystem in HeLa-Zellen synthetisiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert (4.2.3., 4.3.5. und 4.3.6.). Es wurden zwei parallele Western-Immunoblot-Analysen durchgeführt. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich einerseits um den monoklonalen  $\alpha$ -NP-Antikörper 2B10 und andererseits um das  $\alpha$ -NC-Antiserum. Nach der ersten Runde des Western-Immunoblots wurden von beiden Membranen die Antikörper entfernt (4.3.7.) und eine erneute Färbung mit dem jeweils anderen Antikörper durchgeführt.

Die Expression aller internen NP-Deletionsmutanten und NP-Wildtyp war erfolgreich ( $\alpha$ NC-Antiserum, Abb. 28C). Im Gegensatz zum  $\alpha$ NC-Antiserum konnten bei der Färbung mit dem  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 die internen NP-Deletionsmutanten NP $\Delta$ 391-400 und NP $\Delta$ 401-10 nicht nachgewiesen werden (Abb. 28D). Der Bereich der AS 390-410 (20 AS) ist damit entscheidend zur Erkennung des NP durch 2B10. Dort befindet sich wahrscheinlich das Epitop. Die Kontrollen MVA-T7 und Mock waren ohne Signale.

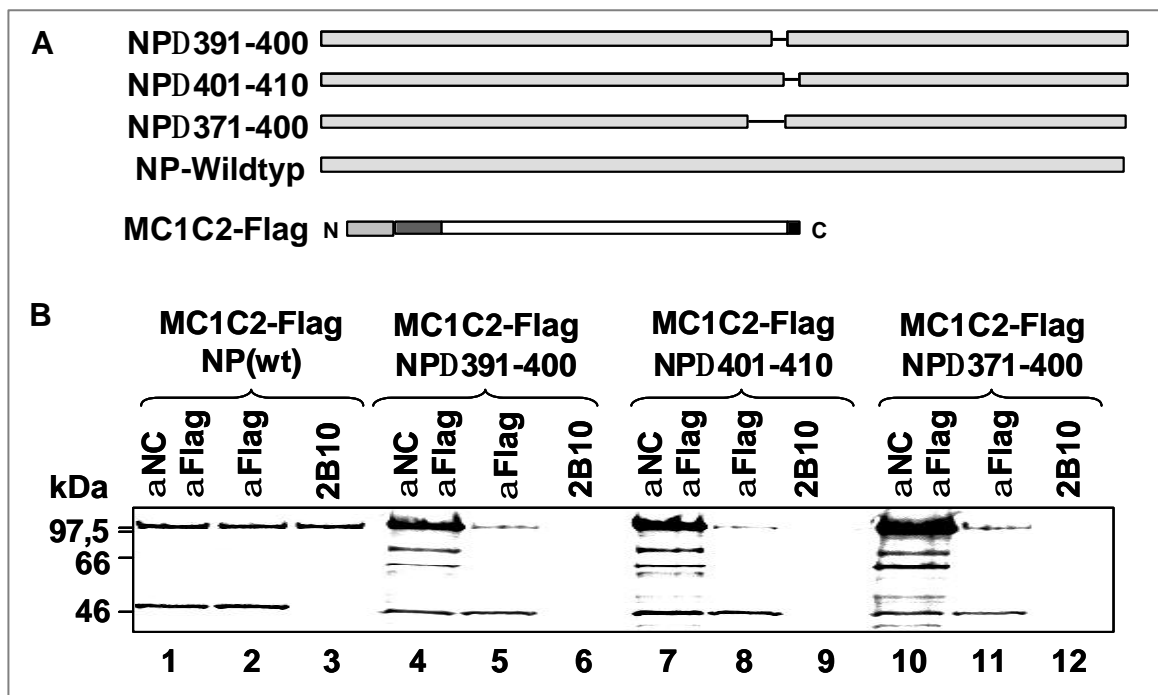
### Einfluss des 2B10-Epitops auf die NP-NP-Interaktion

Schon unter 5.1.2.2. konnte gezeigt werden, dass die Coiled-Coil-vermittelte NP-Oligomerisierung nicht durch den monoklonalen  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 darzustellen war. Die 2B10-Epitopdefizienten internen NP-Deletionsmutanten NP $\Delta$ 391-400, NP $\Delta$ 401-10 und NP $\Delta$ 371-400 wurden zusammen mit dem Fusionsprotein MC1C2-Flag (Abb. 29A) in HeLa-Zellen exprimiert, um zu analysieren, ob das 2B10-Epitop die NP-NP-Interaktion direkt beeinflusste. Die Expression und Zellyse erfolgte analog zu 5.1.2.2. Die Zelllysate wurden gedrittelt und eine Koimmunpräzipitation mit  $\alpha$ NC-

Antiserum und  $\alpha$ VP30-Antiserum,  $\alpha$ Flag-Antikörper M2 oder  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 durchgeführt (4.2.3. und 4.3.3.). Wie erwartet, wurde nur NP-Wildtyp durch den  $\alpha$ -NP Antikörper 2B10 präzipitiert (Abb. 29B, Spur 3).

Die Präzipitation mit  $\alpha$ NC-Antiserum und  $\alpha$ VP30-Antiserum zeigte, dass die Expression aller Proteine erfolgreich war (Abb. 29B, Spuren 1, 4, 7 und 10). Es zeigte sich auch, dass NP-Wildtyp über das Flag-markierte MC1C2, das in der SDS-PAGE bei 46 kDa läuft, kopräzipitiert werden konnte (Abb. 29B, Spur 2).

Die Coiled-Coil-vermittelte NP-NP-Interaktion war allerdings durch die Zerstörung des 2B10-Epitops deutlich gestört (Abb. 29B, Vergleich der Spuren 2, 5, 8 und 11). Die Ergebnisse machten deutlich, dass das 2B10-Epitop (AS 390-410) vermutlich eine unmittelbare Bedeutung für die Oligomerisierung des NP besitzt, dessen Blockade durch den 2B10 Antikörper die Coiled-Coil-vermittelte NP-NP-Interaktion beeinflusst.



**Abb. 29: Einfluss des 2B10-Epitops auf die Homooligomerisierung. A. Schemata der NP-Mutanten.** Von den in Abb. 6 beschriebenen NP-Mutanten wurden die gezeigten drei verwendet. **B. Koimmunpräzipitation.** HeLa-Zellen wurden mit MVA-T7 infiziert und 1 h später mit Plasmiden für die angegebenen Proteine transfiziert. Nach 14 h wurden die Zellen metabolisch mit [ $^{35}$ S]-PROMIX für 1 h markiert, lysiert und einer Immunpräzipitation unterzogen. Die Zelllysate wurden gedrittelt und entweder mit einer Kombination aus monoklonalem  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 (Verdünnung 1:1.000) und monoklonalem  $\alpha$ Flag-Antikörper M2 (Verdünnung 1:1.000), monoklonalem  $\alpha$ Flag-Antikörper M2 (Verdünnung 1:1.000) oder monoklonalem  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 (Verdünnung 1:1.000) präzipitiert und einer SDS-PAGE unterzogen. Links neben der Gel-Abbildung ist die Laufhöhe der Markerbanden angegeben. Das MC1C2-Flag läuft bei ca. 46 kDa, NP-Wildtyp und die Mutanten bei ca. 97,5 kDa. Wie erwartet, kann die Interaktion von MC1C2-Flag und NP-Wildtyp nicht über 2B10 gezeigt werden (Spur 3). Die Interaktion der NP-Mutanten mit deletiertem 2B10-Epitop und MC1C2-Flag ist deutlich abgeschwächt (vgl. Spur 2 mit 1, 5 mit 4, 8 mit 7 und 11 mit 12).



## 6. Diskussion

Die folgende Diskussion gliedert sich in drei Bereiche:

1) Charakterisierung der Oligomerisierungsdomänen des NP hinsichtlich der Interaktion mit sich selbst und mit VP35. 2) Einfluss der charakterisierten Oligomerisierungsdomänen auf die MARV-spezifische RNA-Synthese und die Bildung von NP-induzierten Einschlusskörpern. 3) Funktionelle Untersuchung zur Phosphorylierung des NP.

### 1) Charakterisierung der Oligomerisierungsdomänen des NP hinsichtlich der Interaktion mit sich selbst und mit VP35

Das nicht-segmentierte, negativ-orientierte, einzelsträngige virale RNA-Genom von Viren der Ordnung Mononegavirales wird durch das virale Nukleoprotein verpackt (Enkapsidierung) und bildet so den Nukleokapsidkomplex der Viren. Viren der Ordnung Mononegavirales benutzen den Nukleokapsidkomplex als Matrize für Transkription und Replikation (besprochen in: Lamb and Kolakofsky, 2001; Mühlberger et al., 1998). Nicht-verpackte RNA wird weder repliziert noch transkribiert (Lamb and Kolakovsky, 2001; Curran and Kolakovsky, 1999; Mühlberger et al., 1998).

Nukleoproteine von Viren der Ordnung Mononegavirales haben die Fähigkeit zur Selbstaggregation und bilden Nukleokapsid-ähnliche Partikel in Abwesenheit viraler RNA und anderer viraler Proteine (Warnes et al., 1995; Karlin et al., 2002; Fooks et al., 1993; Bhella et al., 2002; Spehner et al., 1991; Kolesnikova et al., 2000; Mavrakis et al., 2003). In vielen Fällen wird unspezifisch zelluläre RNA in die Nukleokapsid-ähnlichen Partikel verpackt.

Das Hauptnukleokapsidprotein NP des MARV bildet bei rekombinanter Expression ebenfalls hochgeordnete tubuläre Strukturen - die Grundgerüste der Nukleokapside (Kolesnikova et al., 2000). Diese lagern sich zu Einschlusskörper-ähnlichen Komplexen zusammen. In der MARV-infizierten Zelle enthalten die von NP induzierten Einschlusskörper alle Nukleokapsidproteine und die virale RNA. Sie werden als Bildungszentren neuer Nukleokapside und Zentren der viralen Replikation angesehen. Zur Ausbildung der durch das NP induzierten Nukleokapside und Einschlusskörper sind auf dem NP vermutlich mehrere Homooligomerisierungsdomänen (HOD) notwendig, deren Identifizierung Ziel der vorliegenden Arbeit war.

#### NP-NP

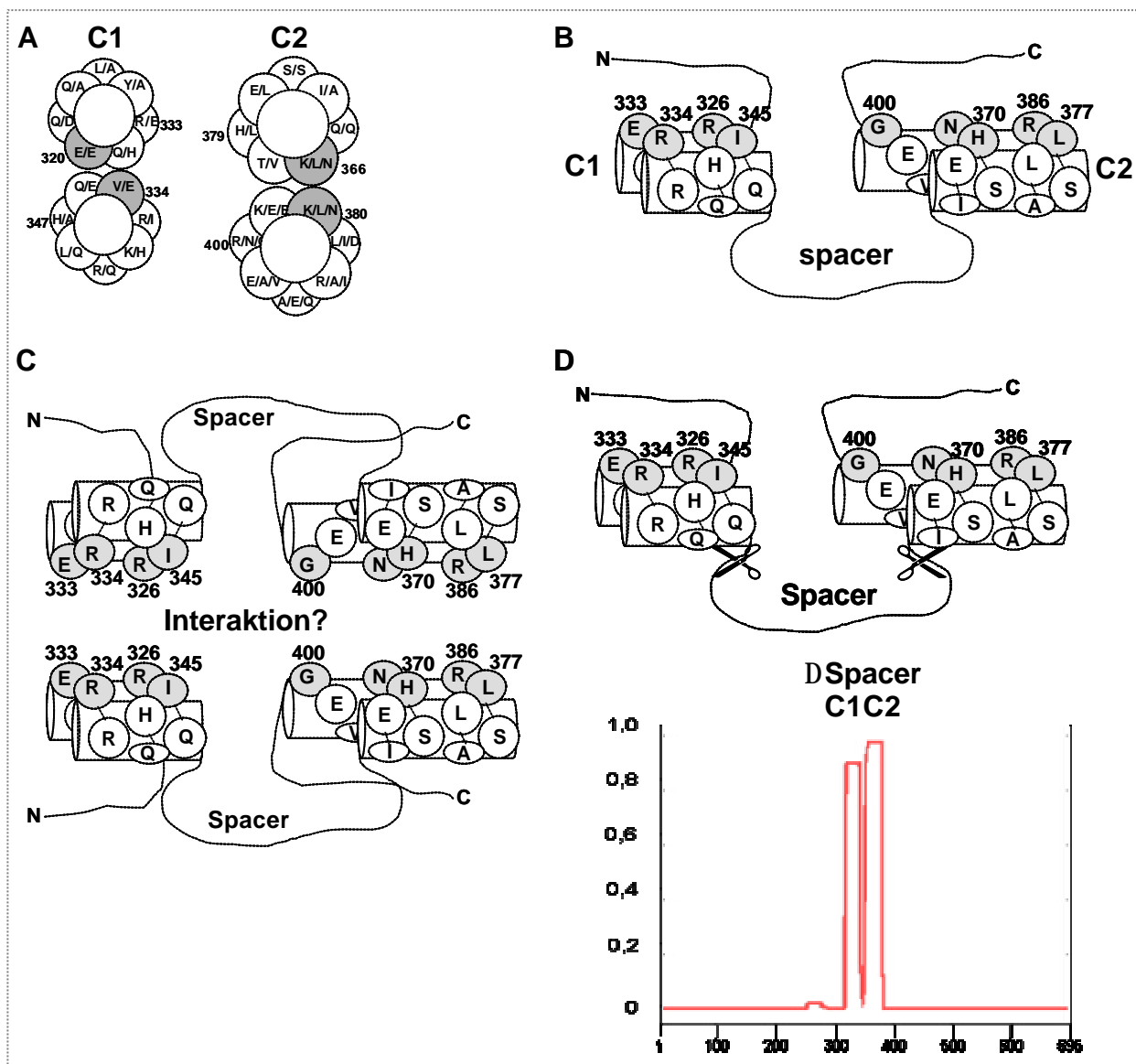
Die Untersuchungen zeigten, dass die Amino(N)-terminalen 234 AS des NP mit sich selbst interagieren. Deletionsanalysen ergaben einen notwendigen Bereich für die

Homooligomerisierung zwischen den AS 118 und 234 (N-terminale Homooligomerisierungsdomäne, HOD<sub>N</sub>). Sekundärstrukturanalysen des N-terminalen Fragments NP1-234 und NP-Wildtyp nach Garnier-Osguthorpe-Robson und Chou-Fasman (Pascarella and Bossa, 1987) ergaben, dass durch die zusätzlichen C-terminalen AS statt einer  $\beta$ -Faltblatt Struktur im Bereich der AS 228 bzw. 226-234 nun eine  $\alpha$ -helikale Struktur (AS 228-238 bzw. 226-239) vorhergesagt wurde. Die NP-Mutante, die zur Bildung gleichmäßig runder Einschlusskörper fähig ist, umfasst die ersten 270 AS. Die helikale Sekundärstruktur (AS 228-238 bzw. 226-239) stabilisiert offensichtlich die N-terminale Selbstaggregation und ist unerlässlich für die Bildung der NP-Einschlusskörper. Die Verlängerung von NP1-270 um 60 AS (NP1-330) förderte die Homooligomerisierung nicht weiter.

Wurde der N-Terminus des NP über die AS 330 hinaus verlängert (1-389), stieg die Fähigkeit zur Homooligomerisierung stark und dauerte bis zur AS 480 an. Dies war ein Hinweis darauf, dass sich in dem Bereich AS 330 bis 480 eine weitere HOD des NP befand. Mit Hilfe eines Coiled-Coil-Vorhersageprogramms konnten zwei potentielle Coiled-Coil-Motive als mögliche weitere Homooligomerisierungsdomäne identifiziert werden. Das erste Coiled-Coil-Motiv (C1) umfasst die AS 320-350, das zweite Coiled-Coil-Motiv (C2) umfasst die AS 370-400. Coiled-Coil-Strukturen dienen zum einen der Ausbildung von Aminosäuretertiärstrukturen und können außerdem die Oligomerisierung von Proteinen vermitteln (Burkhard et al., 2001). Coiled-Coils bestehen aus mindestens zwei miteinander verdrillten amphipatischen  $\alpha$ -Helices (supercoil). Ihr typisches Merkmal ist der so genannte *Heptaden-Repeat*, der die Interaktionsfläche der Oligomere bildet und durch apolare Aminosäurereste, bevorzugt an erster (a) und vierter (d) Position, gekennzeichnet ist. Abb. 30A zeigt die NP-Coiled-Coil-Motive als *Heptaden-Repeat*. Der Zustand der Coiled-Coil-Domäne bestimmt den Oligomerisierungsstatus, die Beweglichkeit der Helices und damit die Rolle des Motivs innerhalb eines molekularen Erkennungssystems (Burkhard et al., 2001).

Die experimentellen Untersuchungen der Coiled-Coil-Strukturen des NP enthüllten, dass C1 zwar erforderlich für die Homooligomerisierung ist, alleine diese Funktion aber nicht vermitteln kann. Dagegen wurde ein monomeres Reporterprotein homooligomerisierungskompetent, wenn es mit C1 + C2 fusioniert wurde. Beide Coiled-Coil-Motive zusammen (Doppel-Coiled-Coil-Motiv) bilden also die zweite Homooligomerisierungsdomäne (HOD<sub>CC</sub>) (Abb. 30B). Der Ablauf der Interaktion über die HOD<sub>CC</sub> ist noch unklar. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die HOD<sub>CC</sub>-vermittelte Interaktion zwischen NP-Molekülen über die polaren Außenseiten der Supercoils erfolgt (Abb.

30C). Untersuchungen mit internen Deletionsmutanten bestätigten, dass für die Funktion der Coiled-Coil-Motive auch der Bereich zwischen C1 und C2 (Spacer) entscheidend ist.



**Abb. 30:** Die Homooligomerisierung über das Coiled-Coil-Motiv ( $HOD_{CC}$ ). **A.** Seiten- und Aufsicht auf ein Coiled-Coil (Schema). Interaktion der zwei Helices über a und d, e und g möglicherweise Interaktionsfläche zu weiteren Coiled-Coils. **B.** Seiten- bzw. Aufsicht der  $HOD_{CC}$  des MARV-NP (Schema). **C.** Modell der NP-NP-Interaktion über  $HOD_{CC}$ . **D.** Deletion des Spacers der  $HOD_{CC}$  (Schema). Seitenansicht und COILS 2.2 Analyse.

Die Deletion des Spacers (AS 350-60) verringerte die Homooligomerisierung des NP auf einen Wert, der der durch  $HOD_N$ -vermittelten Interaktionsstärke entspricht (50%). Das lässt sich damit erklären, dass durch die Deletion beide Coiled-Coils sehr dicht aneinander rücken und so eine Unbeweglichkeit der Helices induziert wird (Abb. 30D). Diese Experimente lassen vermuten, dass die Coiled-Coil-Motive zusammen eine Tertiärstruktur ausbilden, die die NP-NP-Bindung verstärkt (Abb. 30B). Für das

P-Protein der Paramyxoviren konnte gezeigt werden, dass sie Homotrimere über vorhergesagte Coiled-Coil-Motive formen (Curran et al., 1995a).

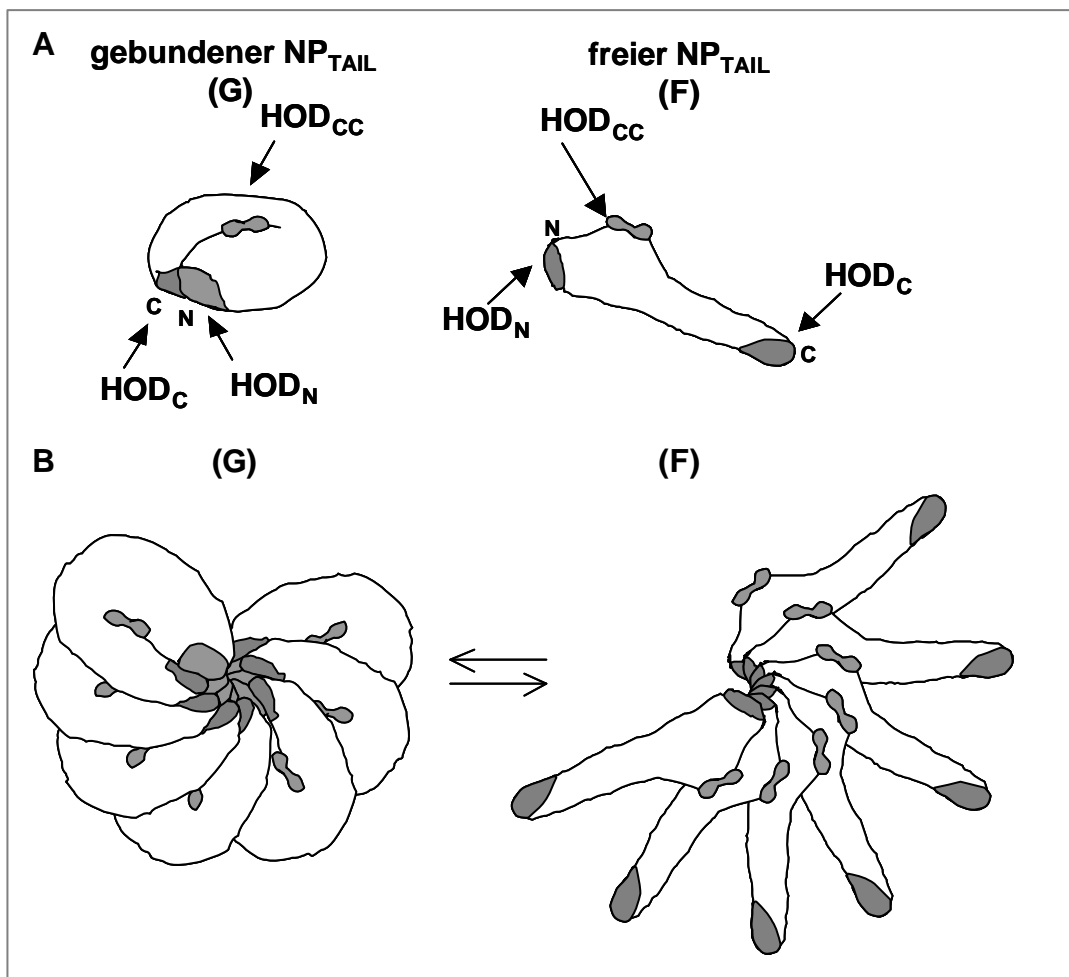
Mehrere Beobachtungen verweisen auf die Möglichkeit einer Interaktion zwischen N- und C-Terminus des NP. 1) Der C-terminale NP-Anteil AS 481-695 hemmt die Homooligomerisierung. 2) Ein N-terminales Fragment des NP interagiert mit dem Volle-Länge NP schwächer als mit einem weiteren N-terminalen Fragment. 3) NP<sub>1-234</sub> und die um 36 AS längere Mutante NP<sub>1-270</sub> interagieren mit einem C-terminalen NP-Fragment (NP266-695). Der zur Kopräzipitation verwendete monoklonale  $\alpha$ NP-Antikörper 2B10 verhinderte eine Interaktion des Doppel-Coiled-Coil-Motivs mit dem N-Terminus. Dabei scheint die oben erwähnte, in NP<sub>1-270</sub> enthaltene  $\alpha$ -Helix die Interaktion mit dem C-Terminus zu stabilisieren. Die C-terminale Oligomerisierungsdomäne befindet sich innerhalb der AS 481-695 (HOD<sub>C</sub>).

Der monoklonale  $\alpha$ -NP-Antikörper 2B10 blockiert die Coiled-Coil-vermittelte Homooligomerisierung. Die Anwesenheit des 2B10 verhindert jedoch nicht die Interaktion zwischen C- und N-Terminus. Dies bedeutet, die HOD<sub>CC</sub>-vermittelte Interaktion des NP mit sich selbst ist keine Voraussetzung für die Interaktion zwischen N- und C-Terminus. Die Aufgabe der Interaktion zwischen N- und C-Terminus des NP kann bislang noch nicht erklärt werden. Zum einen könnte die Interaktion eine NP-Tertiärstruktur stabilisieren oder durch den Kontakt zwischen N- und C-Terminus würde eine weitere Interaktionsdomäne zwischen den NP-Molekülen gebildet.

Dass die Homooligomerisierung des NP durch die Anwesenheit des C-Terminus inhibiert wird, weist darauf hin, dass sich N- und C-Terminus intramolekular verbinden und so möglicherweise die intermolekulare Verbindung zwischen NP-Molekülen reguliert wird. Aus den bisherigen Daten lässt sich folgendes Modell der Homooligomerisierung des NP ableiten (Abb. 31):

NP-Moleküle multimerisieren zunächst über ihre HOD<sub>N</sub>. Dabei verbinden sich die NP-Moleküle zu helikalen Nukleokapsid-ähnlichen Komplexen, die sich zu Einschlusskörpern zusammenlagern (Abb. 31A und B). Diese haben in der Immunfluoreszenz eine gleichmäßig runde Form. Der C-Terminus des NP ist entweder an den N-Terminus gebunden (G) oder ragt aus dem Nukleokapsid-ähnlichen Komplex heraus (F). Interagieren N- und C-Terminus miteinander (G), wird die HOD<sub>CC</sub> verdeckt, bzw. schlechter zugänglich und die Interaktion über die HOD<sub>CC</sub> findet nicht statt. Die HOD<sub>CC</sub> können mehrere Nukleokapsid-ähnliche Komplexe verbinden. Es entstehen große Einschlusskörper, die eine NP-Wildtyp entsprechende unregelmäßige Gestalt in der Immunfluoreszenz zeigen (nicht gezeigt). Die Interaktion zwischen C- und N-

terminalem NP-Anteil könnte die intermolekularen NP-NP-Interaktionen temporär abschwächen, dadurch die Abstände zwischen den Windungen der helikalen Nukleokapside vergrößern und so die Zugänglichkeit des Genoms für die Polymerase verbessern.



**Abb. 31: Modell zur Homooligomerisierung des NP. A. Modell eines NP-Moleküls.** Drei Homooligomerisierungsdomänen (HOD): HOD<sub>N</sub> (AS 118-234 bzw. 240), HOD<sub>CC</sub> (AS 320-400), HOD<sub>C</sub> (AS 522-695). Freier, möglicherweise beweglicher C-Terminus (NP<sub>TAIL</sub>). Zwei absolute Zustände denkbar: 1) NP mit freiem G-Terminus. D. h., keine Interaktion zwischen N- und G-Terminus (F). 2) NP mit gebundenem G-Terminus. D. h., Interaktion zwischen N- und G-Terminus (G). **B. Zusammenlagerung der NP-Moleküle zu Nukleokapsid-ähnlichen Komplexen.** Selbstaggregation über HOD<sub>N</sub> und Ausbildung langer helikal gewundener NP-Molekül-Stränge.

Mit der gefundenen Organisation von NP-NP-Homooligomerisierungsdomänen ähnelt das NP des MARV den funktionsanalogen Proteinen der Familie der Paramyxoviren. Die Nukleoproteine dieser Viren bestehen aus einem konservierten N-terminalen (N<sub>CORE</sub>) und einem variablen C-terminalen Anteil (N<sub>TAIL</sub>) (Lamb and Kolakofsky, 2001). N<sub>CORE</sub> enthält alle zur Selbstaggregation und RNA-Bindung notwendigen Regionen (Curran et al., 1993; Buchholz et al., 1993; Karlin et al., 2002; Liston et al., 1997; Bankamp et al., 1996; Myers et al., 1997; Bankamp et al., 1996).

$N_{TAIL}$  ist intrinsisch unstrukturiert, d. h., unter physiologischen Bedingungen fehlen beständige Sekundärstrukturen (Longhi et al., 2003).  $N_{TAIL}$  ragt aus der Oberfläche der viralen Nukleokapside heraus (Heggeness et al., 1980, 1981). Die Gegenwart flexibler Regionen, die an der Oberfläche der viralen Nukleokapside exponiert werden, begünstigt idealerweise die Interaktion mit verschiedenen viralen Proteinen (Johansson et al., 2003; Dunker et al., 1998, 2001; Dunker and Obradovic, 2001; Liu et al., 2002; Uversky, 2002; Wright and Dyson, 1999).  $N_{TAIL}$  enthält die verantwortlichen Regionen zur Interaktion mit P (Longhi et al., 2003; Liston et al., 1997; Bankamp et al., 1996; Harty and Palese, 1995; Curran et al., 1993), mit dem aktiven Polymerase-Komplex P-L und möglicherweise dem Matrixprotein (Coronel et al., 2001).  $N_{TAIL}$  ist notwendig, damit das Nukleoprotein als Matrize für den Polymerasekomplex dienen kann (Buchholz et al., 1994, Curran et al., 1993, Zhang et al., 2002).

Der variable C-Terminus des MARV-NP kann vermutlich mit  $N_{TAIL}$  gleichgesetzt werden. Der Befund, dass der C-Terminus die Homooligomerisierung des NP moduliert, scheint hingegen typisch für MARV. Da das MARV-NP bei weitem das größte enkapsidierende Protein in der Ordnung Mononegavirales ist, enthält es möglicherweise eine zusätzliche Funktion in dem variablen Tail-Bereich. (Abb. 32A).

### NP-VP35

In der Literatur sind zwei unterschiedliche Formen der Nukleoproteine von Paramyxoviren beschrieben: die lösliche Form  $N^0$  und die zu Nukleokapsidstrukturen selbst-aggregierte Form  $N^{NUC}$  (Curran et al., 1995b). Die Zusammenlagerung von P mit  $N^0$  schützt das Nukleoprotein vor der Bindung an zelluläre RNA (Spehner et al., 1997; Huber et al., 1991; Curran et al., 1995b). Der lösliche  $N^0$ -P Komplex veranlasst die Enkapsidierung der genomischen RNA. Die enkapsidierte RNA dient dann als Matrize für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (Curran et al., 1995, Horikami et al., 1992; Ryan and Portner 1990; Buchholz et al., 1994; Curran, 1996, 1998). Diese Daten zeigen, dass ein Wechselspiel zwischen unterschiedlich oligomerisierten Formen derselben Proteine unterschiedliche Funktionen erfüllt.

Das MARV-NP interagiert mit VP35, dem Kofaktor der Polymerase des MARV (Becker et al., 1994, 1998, Mühlberger et al., 1998). Diese Interaktion wird als Analogon zu den Komplexen aus NP und P anderer Viren der Ordnung Mononegavirales gesehen (Mühlberger et al., 1998). Die Untersuchungen zur Interaktion von NP und VP35 ergaben, dass weder N-terminale (AS 1-330) noch C-terminale (AS 266-695) Anteile des NP alleine ausreichen, die VP35-NP-Interaktion zu vermitteln. Es bedarf vermutlich der Kooperation mehrerer Domänen im NP. Möglicherweise entsteht die

VP35-Bindungsstelle auch erst durch die korrekte Faltung des NP und umfasst Teile des N- und C-Terminus. Ein 389 AS großes Protein interagiert schwach mit VP35. Diese schwache Interaktion verschwand bei einer Verlängerung des Proteins auf 440 AS. Eine weitere Verlängerung um 40 AS führte hingegen zu einer extrem starken Interaktion mit VP35. Wurde nun der Bereich AS 350 bis 470 im Volle-Länge NP mittels 10 AS-großen Deletionen gescannt, zeigte sich, dass die Bindung an VP35 durch keine der internen Deletionen unter das Niveau von NP-Wildtyp abgesenkt wurde. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Verstärkung der Interaktion von NP<sub>1-389</sub> zu NP<sub>1-480</sub> nicht auf eine zusätzliche Bindungsstelle zurückzuführen ist, denn diese sollte durch eine der internen Deletionen zerstört werden. Vielmehr wird wahrscheinlich die Bindung des N-Terminus durch konformationelle Änderungen verstärkt. Eine weitere Verlängerung des NP N-Terminus auf 522 bzw. 550 AS schwächt die Interaktion zu VP35 wieder ab, um dann im Volle-Länge NP wieder anzusteigen. Es ist gegenwärtig nicht klar, ob sich dieser Anstieg auf eine weitere C-terminale VP35-Bindungsstelle zurückführen lässt oder auch hier die N-terminale Bindungsstelle wieder verstärkt wird.

Die Untersuchungen der Coiled-Coil-Motive in Bezug auf die Interaktion von NP und VP35 ergeben folgendes Bild. Die schwach-bindende NP-Mutante NP<sub>1-389</sub> enthält C1 und Teile von C2 (AS 320-350 bzw. AS 370-400), die nicht-bindende NP-Mutante NP<sub>1-440</sub> enthält das komplette Doppel-Coiled-Coil-Motiv und zusätzliche 40 AS. Interne Deletionen zeigten hingegen, dass C1 oder die durch C1 hervorgerufene NP-Konformation zur Interaktion des Volle-Länge NP mit VP35 notwendig ist. Die Deletion des C2 in dem Volle-Länge NP bewirkt hingegen eine deutliche Verstärkung der NP-VP35-Interaktion (2,5fach). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen waren weder das isolierte, an ein Reporterprotein fusionierte C1 noch das vollständige Doppel-Coiled-Coil-Motiv (C1C2) in der Lage, eine Interaktion mit VP35 zu vermitteln. Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass eine durch das C1 vermittelte Konformation und/ oder Homooligomerisierung des NP für die Interaktion mit VP35 erforderlich ist. Möglicherweise wirkt C2 als Regulator der Interaktion zwischen NP und VP35. Aus den erhobenen Daten kann gefolgert werden, dass VP35 an den konservierten N-terminalen Anteil des NP bindet (NP<sub>CORE</sub>). Noch geklärt werden muss, ob eine C-terminal gelegene HED<sub>C</sub> oder eine geänderte NP-Konformation die NP-VP35 Interaktion moduliert.

Bei den gut untersuchten Paramyxoviren bildet sich die Bindungsstelle für das P-Protein aus N- und C-terminalen Anteilen des N-Proteins, bzw. NP (Buchholz et al.,

1994, Liston et al., 1997, Bankamp et al., 1996, Ryan et al., 1993, Curran et al., 1993, Harty and Palese, 1995).

## 2) Einfluss der charakterisierten Oligomerisierungsdomänen auf die MARV-spezifische RNA-Synthese und die Bildung von NP-induzierten Einschlusskörpern

Mittels eines künstlichen Replikations/ Transkriptionssystems konnte vor einiger Zeit gezeigt werden, dass das NP ein notwendiger Faktor für Transkription und Replikation der MARV-RNA ist (Mühlberger et al., 1998). Dieses Replikations/ Transkriptionssystem wurde auch benutzt, um die hergestellten NP-Mutanten hinsichtlich ihrer Funktion während der viralen RNA Synthese zu untersuchen. Hier zeigte sich, dass die Deletion der Bereiche AS 371-380, 381-390, 391-400, 451-460 sowie Deletionen im Bereich der Coiled-Coils (AS 320-350, AS 320-400 bzw. AS 370-400) eine erfolgreiche Transkription verhinderten (Tab. 4).

Im Bereich der AS 451-60 liegt auch ein bereits früher identifizierter Aspartatrest (AS 458), dessen negative Ladung für die virale Transkription unerlässlich ist (Di Carlo, 2000). Die Deletion der AS 381-390 verhinderte die Expression des NP vollständig. Offensichtlich wird durch diese Deletion die Zugänglichkeit und/ oder Empfindlichkeit für proteolytischen Abbau verstärkt.

NP Mutante	Transkription	Homooligomerisierung	VP35-Interaktion	EK-Bildung
NP 1-270	-	+	-	+
NP 266-695	-	-	-	-
NP $\Delta$ C1	-	-	+/-	+
NP $\Delta$ C2	-	+	+++++	+
NP $\Delta$ C1C2	-	-	+/-	+
NP $\Delta$ 351-60	-	+	++++	+
NP $\Delta$ 371-80	-	++	++++	+
NP $\Delta$ 381-90	n. e.	n. e.	n. e.	n. e.
NP $\Delta$ 391-400	-	++++	++	+
NP $\Delta$ 401-10	+	+++++	+++++	+
NP $\Delta$ 451-60	-	+++	++++	+
NP $\Delta$ 461-70	+	+++++	+++	+
NP-Wildtyp	+	++	++	+



**Tab. 4: Einfluss von Deletionen im NP auf virale Transkription, Homooligomerisierung, VP35-Interaktion und Bildung der Einschlusskörperchen.** NP-Wildtyp = 100%. n.e.: nicht exprimiert, Protein instabil

Die Homooligomerisierung des NP ist höchstwahrscheinlich unerlässlich für die Funktion des NP. Es konnte keine Mutante identifiziert werden, deren Homooligomerisierung komplett inhibiert, die aber trotzdem im Transkriptionssystem aktiv war. Allerdings ist die Stärke der Homooligomerisierung kein Prädiktor für die Funktion des NP. Die Transkription wurde durch eine sehr starke Homooligomerisierung weder verhindert noch verstärkt. Ebenso konnte keine absolute Korrelation zwischen Homo- und Heterooligomerisierung festgestellt werden. Allerdings zeigten homooligomerisierungs-unfähige NP-Mutanten auch nur eine schwache Affinität zu VP35. Im Bereich der Coiled-Coil-Motive liegen essentielle Funktionen für das NP. Deletionen in diesem Bereich sind sämtlich letal für die Funktion des NP. Die Deletion des C2 vermittelt keine RNA-Synthese mehr, obwohl die Auswirkungen auf die Homo- und VP35-Heterooligomerisierung nur gering sind. Außer der Interaktion des NP mit sich selbst und mit VP35 werden anscheinend weitere Funktionen über die Coiled-Coil-Motive vermittelt.

Die Deletion des C1 (AS 320-350) beeinflusste die Morphologie der Einschlusskörper im Vergleich zu NP-Wildtyp nicht. Im Gegensatz dazu ergab die Deletion des C2, dass kleine, über das gesamte Zytoplasma verteilte Einschlusskörper gebildet und am Zellkern assoziiert wurden. Der Einfluss von C2 auf die EK-Bildung dominierte gegenüber C1 - genau entgegengesetzt zu dem Einfluss von C1 und C2 auf die Interaktion des NP mit sich selbst und mit VP35. Die Wirkung des deletierten C2 auf die EK-Bildung wurde durch Koexpression mit VP35 aufgehoben. Durch die NP-VP35-Interaktion wird die NP-Konformation offensichtlich so moduliert, dass Wildtyp-phänotypische Einschlusskörper entstehen. Bei Deletion der AS 371-80 konnte VP35 die Wildtyp-phänotypischen Einschlusskörper nicht rekonstituieren. Die Ergebnisse machten deutlich, dass 1) Bereiche im NP, die unerlässlich für die Bildung von EK sind, die Transkription wesentlich beeinflussen. 2) Eine korrekte intrazelluläre NP-Verteilung trotz allem keine ordnungsgemäße Funktion des Proteins garantiert.

### **3) Funktionelle Untersuchungen zur Phosphorylierung des NP**

Das NP ist das am stärksten phosphorylierte Protein des MARV. Nach rekombinanter Expression und in Virus-infizierten Zellen liegt NP phosphoryliert und nicht phosphoryliert vor. Aus Virionen hingegen kann nur die phosphorylierte Form isoliert werden (Becker et al., 1994). Daher scheint diese Modifikation eine funktionelle Bedeutung

für das Protein zu besitzen. Lötfering et al. (1999) stellten fest, dass die Phosphorylierung des NP in sieben definierten Bereichen des hochvariablen C-Terminus erfolgt (Regionen I-VII). Ein Vergleich des MARV-NP mit N-Proteinen anderer NNS-RNA-Viren zeigt, dass die AS 390-480 teilweise konserviert sind. Die Regionen I und II (AS 390-438 und AS 439-475) liegen damit zwar in einem Bereich des NP, der als variabel angesehen wird (Sanchez et al., 1992), zeigen jedoch Homologien zu anderen Vertretern der Ordnung Mononegavirales. Die Region II weist eine negative Nettoladung auf und besitzt ein charakteristisches Cluster von sechs Serinresten (AS 450-5).

In der Region II werden Serin- und Threoninreste phosphoryliert. Der Hauptteil der Phosphorylierung erfolgt im Serincluster (Di Carlo, 2000). Überdies wurde demonstriert, dass negative Ladungen rund um das Serincluster bedeutend sind für die Funktion des Proteins während Transkription und Replikation (z.B. D<sub>458</sub>, Di Carlo, 2000). Aus dem Kontext der identifizierten Phosphorylierungsstellen wurde gefolgert, dass mehrere zelluläre Proteinkinasen das NP phosphorylieren. Dazu zählen Prolin-abhängige Kinasen, Proteinkinase C und Serin/ Threoninkinase CKII (Lötfering et al., 1999). Die hier vorgestellten Untersuchungen ergaben, dass die Serin/ Threoninkinase CKII eine nur untergeordnete Rolle bei der Phosphorylierung der Region II spielt. Obwohl drei potentielle Erkennungsstellen der Serin/ Threoninkinase CKII (S/ TxxD/ E selten: PS/ PT) vorhanden sind, sinkt die Phosphorylierung der Region nur geringfügig, wenn alle drei potentiellen Erkennungsstellen zerstört sind. Möglicherweise wird nur Serin 446 durch die Serin/ Threoninkinase CKII modifiziert. Die Phosphorylierung des Serins 446 ist für die virale Transkription jedoch irrelevant. Ein in vitro Kinasierungsassay mit rekombinanter Proteinkinase CKII enthüllte, dass sich die Phosphorylierung der Region II (d. h. besonders des Serinclusters) nicht durch die Serin/ Threoninkinase CKII initiieren lässt. Der Hauptteil der Phosphorylierung innerhalb der Region II wird also durch eine bislang unbekannte Proteinkinase veranlasst.

Die Phosphorylierung von AS durch zelluläre Kinasen bedeutet eine reversible Einführung negativer Ladungen, die durch zelluläre Phosphatasen wieder entfernt werden können. Diese Reversibilität der Phosphorylierung macht es möglich, die Funktion von Proteinen durch die Phosphorylierung an- bzw. auszuschalten. Zur Analyse der Funktion von Proteinphosphorylierungen werden Mutanten der untersuchten Proteine benutzt, in denen die phosphorylierte AS (in Säugerzellen meistens Serin, Threonin oder Tyrosin) entweder durch eine negativ geladene AS (Glutamat oder Aspartat) oder eine ungeladene AS (meistens Alanin) ersetzt wird. Dadurch entstehen mutante Proteine, die entweder einen permanent phosphorylierten oder nicht-

phosphorylierten Status des wt Proteins nachahmen. In dieser Untersuchung imitierten Aspartatreste Phosphoserine, Alaninreste dephosphorylierte Serine in der Region II des NP (Benndorf et al., 2001; Leger et al., 1997). Diese Phosphorylierungsmutanten enthüllten im Replikation/ Transkriptionsassay, dass eine permanente Phosphorylierung oder Dephosphorylierung (S 450-5 D bzw. S 450-5 A) des Serinclusters die Transkription inhibierte. Die permanente Phosphorylierung hemmte das System stärker als eine permanente Dephosphorylierung. Beim Einsatz von Mutanten, deren Serincluster teilweise durch Alanin und teilweise durch Aspartatreste ausgetauscht wurde (S 450-2 D, S 453-5 A, bzw S 450-2 A, S 453-5 D), war die Transkriptionsaktivität des Systems nicht eingeschränkt. Die permanente Phosphorylierung der ersten drei Serinreste, aber Dephosphorylierung der letzten drei Serinreste, vermittelte eine NP-Wildtyp vergleichbare Transkriptionsaktivität. Bei permanenter Dephosphorylierung der ersten drei Serinreste des Clusters und Phosphorylierung der letzten drei Serinreste, wurde dagegen die stärkste Transkriptionsaktivität erzielt.

Möglicherweise induziert NP mit einem derartigen Phosphorylierungsstatus vorwiegend die Transkription des Systems. Diese Frage muss weiter untersucht werden. Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass Phosphorylierung/ Dephosphorylierungsprozesse im Serincluster der Region II die virale Replikation/ Transkription steuern. Die Verteilung der negativen Ladungen im Bereich der AS 450-458 ist bedeutend für die Funktion des NP. Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass die Phosphorylierung der Region II jedoch keinen Einfluss auf die Ausbildung der NP-induzierten Einschlusskörper hatte.

Weiter wurde untersucht, inwieweit die Phosphorylierungsprozesse im Serincluster die Homooligomerisierung des NP bzw. die Interaktion mit VP35 steuern. Mit komplett dephosphoryliertem Serincluster interagiert NP nur äußerst schwach mit sich selbst. Mit zunehmender Phosphorylierung steigt die Bindungsstärke an. Komplett phosphoryliert interagiert NP wieder schwächer mit sich selbst. Die Daten weisen darauf hin, dass auch die Polymerisierung des NP zum Nukleokapsid über die Phosphorylierung reguliert werden kann. So ist vorstellbar, dass nicht phosphorylierte NP-Moleküle unter Phosphorylierung interagieren und das helikale Nukleokapsid bilden. Für das Rabies-Virus wird diskutiert, ob durch Phosphorylierung/ Dephosphorylierungsprozesse die Abstände der einzelnen NP-Moleküle im NC reguliert werden (Yang et al., 1999).

VP35 bindet stark an NP mit permanent nicht phosphoryliertem Serincluster. Mit zunehmender Phosphorylierung reduziert sich die Bindungsstärke des VP35. Am

schwächsten ist sie bei NP mit permanent phosphoryliertem Serincluster. Dies kann wie folgt ausgelegt werden: VP35 interagiert mit dem NP mit nicht-phosphoryliertem Serincluster. Dieser Komplex entspräche dem für Paramyxoviren beschriebenen Komplex NP<sup>0</sup>-P (Curran et al., 1995b). Weitere Phosphorylierungsschritte im Serincluster lockern die Interaktion des NP mit VP35 und führen zur verstärkten Selbstaggregation. Eine andere Funktion des Proteinkomplexes könnte sein, dass das zunächst nur schwach phosphorylierte NP den über VP35 vermittelten Polymerasekomplex stark anziehen vermag, damit Replikation und Transkription effizient verlaufen. In späteren Stadien der Infektion nimmt die Phosphorylierung des NP zu und die Affinität zum Polymerasekomplex ab, was eine abgeschwächte RNA-Synthese zur Folge hat. In diesen Infektionsstadien werden dann möglicherweise bevorzugt die Nukleokapside für den Transport zur Zelloberfläche vorbereitet.

Auch die Bindung von VP30 an NP wird durch die Phosphorylierung positiv beeinflusst. VP30 interagiert zwar auch mit dem nicht-phosphorylierten NP, die Bindung wird jedoch durch die Phosphorylierung intensiviert.

Die Phosphorylierung der Region II veränderte die Sensibilität des NP gegenüber Proteolyse. Durch permanente Dephosphorylierung des Serinclusters wurde NP resistent gegenüber Proteolyse. Entweder modulieren die Phosphorylierungsprozesse die Konformation des NP derart, dass dadurch die Protease-Angriffsmöglichkeiten verändert werden. Oder die phosphorylierungsabhängige Interaktion mit zellulären oder viralen Bindungspartnern könnte die Zugänglichkeit und/ oder Empfindlichkeit für die Proteolyse modulieren.

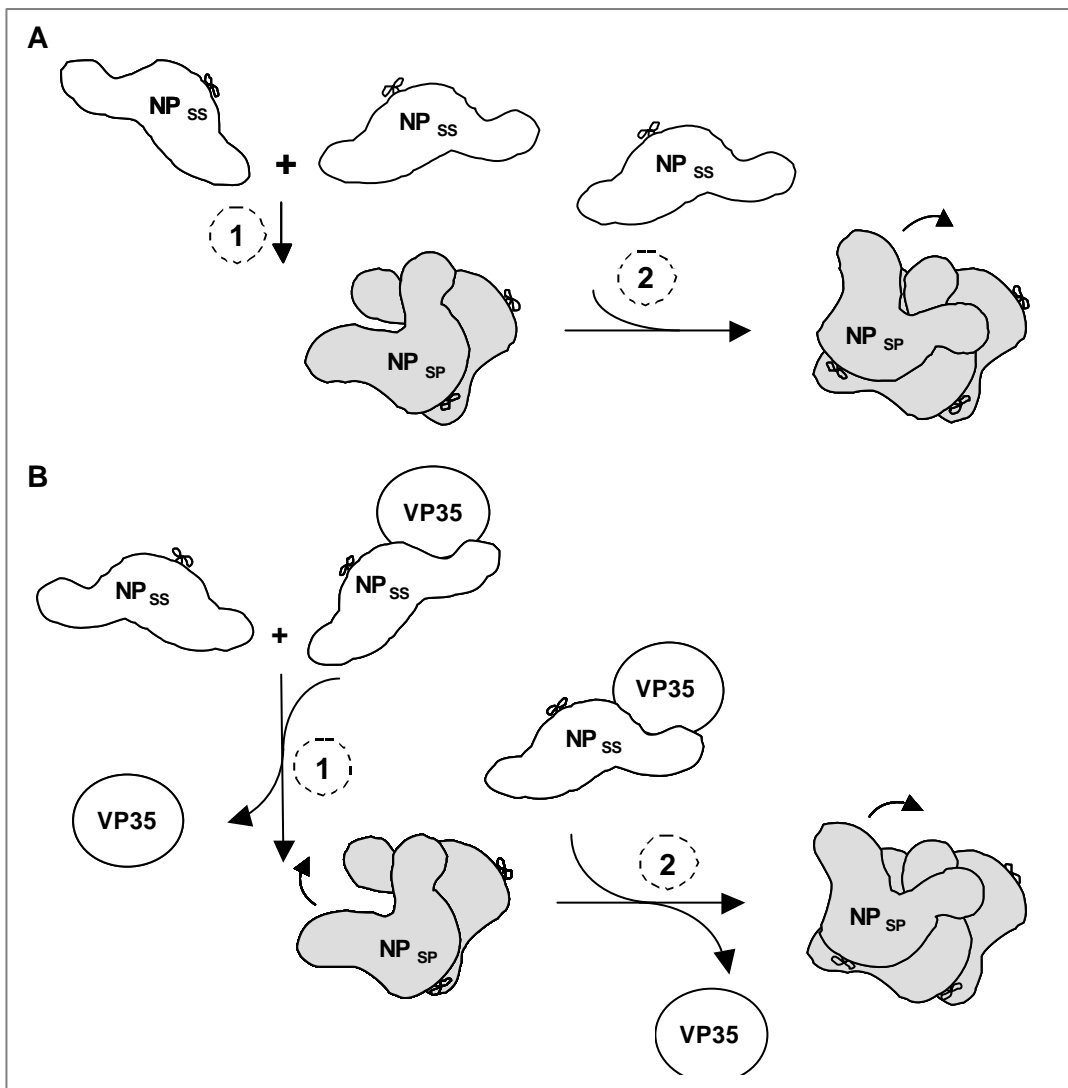
Bei dem Rabies-Virus inhibiert dephosphoryliertes N fast völlig die virale Transkription (Wu et al., 2002). Das wird darauf zurückgeführt, dass nicht-phosphoryliertes N das virale Genom stärker bindet als phosphoryliertes N (Yang et al., 1999). Dadurch hat der Polymerasekomplex keinen Zugang zum viralen Genom und die Transkription unterbleibt. Obwohl N während Transkription und Replikation an das RNA-Genom gebunden bleibt (Emerson, 1982), muss das mit dem Genom assoziierte N Übergangsweise umgefaltet werden, so dass L in Kontakt mit dem viralen RNA-Genom treten kann (Banerjee and Chattopadhyay, 1990). Möglicherweise vermindert die Phosphorylierung die Interaktion zwischen dem N-Protein und der genomischen RNA, da sich die negativ geladenen Phosphatgruppen und die negativ geladene RNA abstoßen. So kann L die RNA-Matrize binden und Transkription und Replikation initiieren (Wu et al., 2002). Die Phosphorylierung des N verändert nicht die Menge an enkapsidierter genomischer oder antigenomischer RNA (Wu et al., 2002).

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann für MARV-NP keine Aussage darüber gemacht werden, wie die Phosphorylierung des Serinclusters die Bindung der genomischen RNA beeinflusst. Allerdings lässt sich aus freigesetzten MARV-Partikeln nur die phosphorylierte 94 kDa Form des NP isolieren. Die Phosphorylierung ist daher wahrscheinlich notwendig für das Ausschleusen der Viren oder die Morphogenese des Nukleokapsids. Weitere Analysen müssen klären, ob, analog zu Rabies-Virus, nicht-phosphoryliertes NP eine starke Affinität zur genomischen RNA hat (Yang et al., 1999).

Folgende Modelle zum Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II des MARV-NP auf die Bildung der Nukleokapside wären denkbar: 1) NP-Moleküle mit nicht-phosphoryliertem Serincluster ( $NP_{SS}$ ) lagern sich unter Phosphorylierung des Serinclusters zusammen ( $NP_{SP}$ , Abb. 33A). Durch weitere NP-Moleküle wächst der Nukleokapsid-ähnliche Komplex. 2) VP35 interagiert mit  $NP_{SS}$  (entsprache  $N^0$ -P) und bringt seinen Bindungspartner zu einem weiteren  $NP_{SS}$ . Unter Phosphorylierung des Serinclusters interagieren beide miteinander zu Nukleokapsid-ähnlichen Komplexen ( $NP_{SP}$ , Abb. 33B). Weitere VP35-Moleküle bringen  $NP_{SS}$  an das naszierende Nukleokapsid. In diesem Fall wäre VP35 ein Chaperone des NP.

Die Interaktion zwischen NP und VP35 muss im Verlauf des Infektionszyklus gelockert werden (möglicherweise durch eine stärkere Phosphorylierung des Serinclusters des NP), damit Transkription und Replikation stattfinden können. Für die virale Transkription/ Replikation scheint eine abgeschwächte VP35-Bindung (ca. 50%) optimal (Tab. 5). Unter Umständen sind ein bestimmter Modifizierungsgrad des NP und die dadurch veränderten Interaktionen zu den übrigen Nukleokapsidproteinen nötig, damit die Nukleokapside ausgeschleust werden können.

**Zusammenfassend** bedeutet das: Das NP des Marburg-Virus (MARV) enthält mindestens drei Homooligomerisierungsdomänen:  $HOD_N$  (AS 118-234 bzw. 240),  $HOD_{CC}$  (AS 320-400) und  $HOD_C$  (AS 522-695).  $HOD_N$  und  $HOD_{CC}$  sind vermutlich ausreichend zur Bildung der Nukleokapsid-ähnlichen Komplexe (Einschlusskörper). Die Interaktion mit VP35 geschieht primär im N-terminalen Anteil des NP (AS 1-390). Homo- und Heterooligomerisierung wird über Phosphorylierung/ Dephosphorylierungsprozesse reguliert. Die Interaktion mit VP30 erfolgt über den C-terminalen NP-Anteil. Die Transkription des MARV wird durch Phosphorylierung des NP stark beeinflusst.



**Abb. 33: Zusammenlagerung der NP-Moleküle zu Nucleokapsiden. A. Ohne VP35.** 1: 2 NP-Moleküle interagieren unter Phosphorylierung des Serinclusters zu Nucleokapsid-ähnlichen Komplexen. 2: Weitere NP-Moleküle lagern sich an. NP<sub>SS</sub> = NP mit nicht-phosphoryliertem Serincluster, NP<sub>SP</sub> = NP mit teilweise phosphoryliertem Serincluster. **B. Mit VP35.** 1 VP35 interagiert mit NP<sub>SS</sub> und bringt es zu einem weiteren NP<sub>SS</sub>. Unter Phosphorylierung des Serinclusters aggregieren sie zu Nucleokapsiden (NP<sub>SP</sub>). 2: Der Prozess wiederholt sich mehrmals.

Serincluster	Transkription	NP-NP	NP-VP35	Bildung von EK
wt	++	++	++	+
AAAAAA	keine	+	++	+
AAADDD	++	++	+	+
DDDDAA	++++	++	+	+
DDDDDD	keine	+	+/-	+

**Tab. 5: Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II des MARV-NP auf die virale Transkription, die NP-NP und NP-VP35-Interaktion.** Links ist Aminosäuresequenz der NP Mutanten an der Stelle des Serinclusters im Einbuchstabenkode beschrieben, rechts daneben das Verhalten bei Transkription, NP-NP- und NP-VP35-Interaktion.

## 7. Literaturverzeichnis

- (2003). 01. Mononegavirales. In: **ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3** (Büchen-Osmond, C., ed.), ICTVdB Management, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Columbia University, Oracle, USA
- Baize, S., Leroy, E. M., Georges-Courbot, M. C., Capron, M., Lansoud-Soukate, J., Debre, P., Fisher-Hoch, S. P., McCormick, J. B., and Georges, A. J. (1999).** Defective Humoral Responses and Extensive Intravascular Apoptosis Are Associated with Fatal Outcome in Ebola Virus-Infected Patients. *Nat. Med.* **5**(4), 423-6
- Bamberg, S. (2000):** Interaktion des Marburg-Virus VP24 mit dem Oberflächenprotein GP und anionischen Membranstrukturen. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg
- Bamberg, S., Sängler, C., Mühlberger, E. und Becker, S. (2001).** Interaktion des Marburg-Virus VP24 mit dem Oberflächenprotein GP und anionischen Membranstrukturen. Poster. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden
- Banerjee, A. K., and Chattopadhyay, D. (1990).** Structure and Function of the RNA Polymerase of Vesicular Stomatitis Virus. *Adv. Virus Res.* **38**, 99-124
- Banerjee, A. K., and Barik, S. (1992).** Gene Expression of Vesicular Stomatitis Virus Genome RNA. *Virology* **188**(2), 417-28
- Bankamp, B., Horikami, S. M., Thompson, P. D., Huber, M., Billeter, M., and Moyer, S. A. (1996).** Domains of the Measles Virus N Protein Required for Binding to P Protein and Self-Assembly. *Virology* **216**(1), 272-7
- Basler, C. F., Mikulasova, A., Martinez-Sobrido, L., Paragas, J., Mühlberger, E., Bray, M., Klenk, H.-D., Palese, P., and Garcia-Sastre, A. (2003).** The Ebola Virus VP35 Protein Inhibits Activation of Interferon Regulatory Factor 3. *J. Virol.* **77**(14), 7945-56
- Basler, C. F., Wang, X., Mühlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H.-D., Garcia-Sastre, A., and Palese, P. (2000).** The Ebola Virus VP35 Protein Functions as a Type I IFN Antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(22), 12289-94
- Bausch, D. G., Borchert, M., Grein, T., Roth, C., Swanepoel, R., Libande, M. L., Talarmin, A., Bertherat, E., Muyembe-Tamfum, J. J., Tugume, B., Colebunders, R., Konde, K. M., Pirad, P., Olinda, L. L., Rodier, G. R., Campbell, P., Tomori, O., Ksiazek, T. G., and Rollin, P. E. (2003).** Risk Factors for Marburg Hemorrhagic Fever, Democratic Republic of the Congo. *Emerg. Infect. Dis.* **9**(12), 1531-7
- Becker, S. (2000):** Struktur, Funktion und Biosynthese von Proteinen des Marburg-Virus. Habilitation. Philipps-Universität, Marburg
- Becker, S., Feldmann, H., Will, C., and Slenczka, W. (1992).** Evidence for Occurrence of Filovirus Antibodies in Humans and Imported Monkeys: Do Subclinical Filovirus Infections Occur Worldwide? *Med. Microbiol. Immunol.* **181**(1), 43-55
- Becker, S., Huppertz, S., Klenk, H.-D., and Feldmann, H. (1994).** The Nucleoprotein of Marburg Virus Is Phosphorylated. *J. Gen. Virol.* **75**(Pt 4), 809-18

- Becker, S., Rinne, C., Hofsäss, U., Klenk, H.-D., and Mühlberger, E. (1998).** Interactions of Marburg Virus Nucleocapsid Proteins. *Virology* **249**(2), 406-17
- Beckes, J. D., and Perrault, J. (1992).** Stepwise Phosphorylation of Vesicular Stomatitis Virus P Protein by Virion-Associated Kinases and Uncoupling of Second Step from In Vitro Transcription. *Virology* **188**(2), 606-17
- Benndorf, R., Sun X., Gilmont, R. R., Biederman, K. J., Molloy, M. P., Goodmurphy, C. W., Cheng, H., Andrews, P. C., and 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**(29), 26753-61
- Bertherat, E., Talarmin A., and Zeller H. (1999).** Democratic Republic of the Congo: Between Civil War and the Marburg Virus. International Committee of Technical and Scientific Coordination of the Durba Epidemic. *Med. Trop.* **59**(2), 201-4
- Bhella, D., Ralph, A., Murphy, L. B., and Yeo, R. P. (2002).** Significant Differences in Nucleocapsid Morphology within the Paramyxoviridae. *J. Gen. Virol.* **83**(Pt 8), 1831-9
- Bowen, E. T., Lloyd, G., Harris, W. J., Platt, G. S., Baskerville, A., and Vella, E. E. (1977).** Viral Haemorrhagic Fever in Southern Sudan and Northern Zaire. Preliminary Studies on the Aetiological Agent. *Lancet* **1**(8011), 571-3
- Buchholz, C. J., Retzler, C., Homann, H. E., and Neubert, W. J. (1994).** The Carboxy-Terminal Domain of Sendai Virus Nucleocapsid Protein Is Involved in Complex Formation Between Phosphoprotein and Nucleocapsid-Like Particles. *Virology* **204**(2), 770-6
- Buchholz, C. J., Spehner, D., Drillien, R., Neubert, W. J., and Homann, H. E. (1993).** The Conserved N-Terminal Region of Sendai Virus Nucleocapsid Protein NP Is Required for Nucleocapsid Assembly. *J. Virol.* **67**(10), 5803-12
- Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S. V., (2001).** Coiled Coils: a Highly Versatile Protein Folding Motif. *Trends Cell. Biol.* **11**(2), 82-8
- Cartee T. L., Megaw, A. G., Oomens, A.G. P., and Wertz G. W. (2003).** Identification of a Single Amino Acid Change in the Human Respiratory Syncytial Virus L Protein That Affects Transcriptional Termination. *J. Virol.* **77**(13) 7352-60
- Cartee, T. L., and Wertz, G. W. (2001).** Respiratory Syncytial Virus M2-1 Protein Requires Phosphorylation for Efficient Function and Binds Viral RNA During Infection. *J. Virol.* **75**(24), 12188-97
- CDC (Centers for Disease Control) (1980).** Marburg Virus Disease: Kenya. *MMWR* **29**, 145-6
- CDC (Centers for Disease Control) (1990).** Epidemiologic Notes and Reports Update: Filovirus Infection in Animal Handlers. *MMWR* **39**(13), 221
- CDC (Centers for Disease Control) (1995)** Update: Outbreak of Ebola Viral Hemorrhagic Fever - Zaire, 1995. *MMWR* **44**(25), 468-9, 475; **44**(20), 399
- CDC (Centers for Disease Control) (1996)** Ebola Reston Virus Infection Among Quarant



- tioned Nonhuman Primates - Texas, 1996. *MMWR* **45**(15), 314-6
- CDC (Centers for Disease Control) (2001)** Outbreak of Ebola Hemorrhagic Fever Uganda, August 2000 - January 2001. *MMWR* **50**(5), 73-7
- Chatterjee, A., Bockus, B. J., Gjorup, O. V., and Schaffhausen, B. S. (1997)**. Phosphorylation Sites in Polyomavirus Large T Antigen That Regulate its Function in Viral, but not Cellular, DNA Synthesis. *J. Virol.* **71**(9), 6472-78
- Coronel, E. C., Takimoto, T., Murti, K. G., Varich, N., and Portner, A. (2001)**. Nucleocapsid Incorporation into Parainfluenza Virus Is Regulated by Specific Interaction with Matrix Protein. *J. Virol.* **75**(3), 1117-23
- Curran, J. (1996)**. Reexamination of the Sendai Virus P Protein Domains Required for RNA Synthesis: A Possible Supplemental Role for the P Protein. *Virology* **221**(1), 130-40
- Curran, J. (1998)**. A Role for the Sendai Virus P Protein Trimer in RNA Synthesis. *J. Virol.* **72**(5), 4274-80
- Curran, J., and Kolakofsky, D. (1999)**. Replication of Paramyxoviruses. *Adv. Virus Res.* **54**, 403-22
- Curran, J., Boeck R., Lin-Marq N., Lupas A., and Kolakofsky D. (1995a)**. Paramyxovirus Phosphoproteins Form Homotrimers as Determined by an Epitope Dilution Assay, via Predicted Coiled Coils. *Virology* **214**(1), 139-49
- Curran, J., Homann, H., Buchholz, C., Rochat, S., Neubert, W., and Kolakofsky, D. (1993)**. The Hypervariable C-Terminal Tail of the Sendai Paramyxovirus Nucleocapsid Protein Is Required for Template Function but not for RNA Encapsidation. *J. Virol.* **67**(7), 4358-64
- Curran, J., Marq, J. B., and Kolakofsky, D. (1995b)**. An N-Terminal Domain of the Sendai Paramyxovirus P Protein Acts as a Chaperone for the NP Protein During the Nascent Chain Assembly Step of Genome Replication. *J. Virol.* **69**(2), 849-55
- Davis, R. J. (1993)**. The Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *J. Biol. Chem.* **268**, 14553-6
- De, B. P., Das, T., and Banerjee, A. K. (1997)**. Role of Cellular Kinases in the Gene Expression of Nonsegmented Negative Strand RNA Viruses. *Biol. Chem.* **378**(6), 489-93
- Di Carlo, A. (1999)**: Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus der Region II des Nukleoproteins von Marburgvirus. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg
- Di Carlo, A., Mühlberger E. und Becker S. (2000)**. Regulation der viralen RNA-Synthese durch negative Ladungen in der phosphorylierten sauren Region II des Marburg-Virus Nukleoproteins. Poster. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie, Wien
- Dietrich, M., Schumacher, H. H., Peters, D., and Knobloch, J. (1978)**. Human Pathology of Ebola (Maridi) Virus Infection in the Sudan. In: **Ebola Virus Hemorrhagic Fever** (Pattyn, S. R., ed.) Elsevier, Amsterdam, North-Holland, pp. 37-41

- Dunker, A. K., and Obradovic, Z. (2001).** The Protein Trinity-Linking Function and Disorder. *Nat. Biotechnol.* **19**(9), 805-6
- Dunker, A. K., Garner, E., Guilliot, S., Romero, P., Albrecht, K., Hart, J., Obradovic, Z., Kissinger, C., and Villafranca, J. E. (1998).** Protein Disorder and the Evolution of Molecular Recognition: Theory, Predictions and Observations. *Pac. Symp. Bio-comput.* **3**, 473-84
- Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J., Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hipps, K. W., Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C. R., Bailey, R. W., Griswold, M. D., Chiu, W., Garner, E. C., and Obradovic, Z. (2001).** Intrinsically Disordered Protein. *J. Mol. Graph. Model.* **19**(1), 26-59
- Dupuy, L. C., Dobson, S., Bitko, V. and 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**(10), 8384-92
- Elliott, L. H., Kiley, M. P., and McCormick, J. B. (1985).** Descriptive Analysis of Ebola Virus Proteins. *Virology* **147**(1), 169-76
- Ellis, D. S., Stamford, S., Lloyd, G., Bowen, E. T. W., Platt, G. S., Way, H. J., and Simpson, D. I. H. (1979).** Ebola and Marburg Viruses: I. Some Ultrastructural Differences Between Strains When Grown in Vero Cells. *J. Med. Virol.* **4**(3), 201-11
- Emerson, S. U. (1982).** Reconstitution Studies Detect a Single Polymerase Entry Site on the Vesicular Stomatitis Virus Genome. *Cell* **31**(3 Pt 2), 635-42
- Feldmann, H., and Kiley, M. P. (1999).** Classification, Structure, and Replication of Filoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **235**, 1-21
- Feldmann, H., Bugany, H., Mahner, F., Klenk, H.-D., Drenckhahn, D., and Schnittler, H. J. (1996b).** Filovirus-Induced Endothelial Leakage Triggered by Infected Monocytes/Macrophages. *J. Virol.* **70**(4), 2208-14
- Feldmann, H., Klenk, H.-D., and Sanchez, A. (1993).** Molecular Biology and Evolution of Filoviruses. *Arch. Virol. Suppl.* **7**, 81-100
- Feldmann, H., Mühlberger, E., Randolph, A., Will, C., Kiley, M. P., Sanchez, A., and Klenk, H.-D. (1992).** Marburg Virus, a Filovirus: Messenger RNAs, Gene Order, and Regulatory Elements of the Replication Cycle. *Virus Res.* **24**(1), 1-19
- Feldmann, H., Slenczka, W., and Klenk, H.-D. (1996a).** Emerging and Reemerging of Filoviruses. *Arch. Virol. Suppl.* **11**, 77-100
- Feldmann, H., Will, C., Schikore, M., Slenczka, W., and Klenk, H.-D. (1991).** Glycosylation and Oligomerization of the Spike Protein of Marburg Virus. *Virology* **182**(1), 353-6
- Fisher-Hoch, S. P., and McCormick, J. B. (1999).** Experimental Filovirus Infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **235**, 117-43

- Fisher-Hoch, S. P., Perez-Orozco, G. I., Jackson, E. L., Hermann, L. M., and Brown, B. G. (1992).** Filovirus Clearance in Non-Human Primates. *Lancet* **340**(8817), 451-3
- Fooks, A. R., Stephenson, J. R., Warnes, A., Dowsett, A. B., Rima, B. K., and Wilkinson, G. W. (1993).** Measles Virus Nucleocapsid Protein Expressed in Insect Cells Assembles Into Nucleocapsid-Like Structures. *J. Gen. Virol.* **74**(Pt 7), 1439-44
- Formenty, P., Hatz, C., Le Guenno, B., Stoll, A., Roggenmoser, P., and Widmer, A. (1999).** Human Infection Due to Ebola Virus, Subtype Cote d'Ivoire: Clinical and Biologic Presentation. *J. Infect. Dis.* **179** (Suppl 1), 48-53
- Funke, C., Becker, S., Dartsch, H., Klenk, H.-D., and Mühlberger, E. (1995).** Acylation of the Marburg Virus Glycoprotein. *Virology* **208**(1), 289-97
- Gao, Y., and Lenard, J. (1995).** Cooperative Binding of Multimeric Phosphoprotein (P) of Vesicular Stomatitis Virus to Polymerase (L) and Template: Pathways of Assembly. *J. Virol.* **69**(12), 7718-23
- Garcia, J., Garcia-Barreno, B., Vivo, A., and 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**(1), 243-7
- Gear, J. S., Cassel, G. A., Gear, A. J., Trappler, B., Clausen, L., Meyers, A. M., Kew, M. C., Bothwell, T. H., Sher, R., Miller, G. B., Schneider, J., Koornhof, H. J., Gomperts, E. D., Isaacson, M., and Gear, J. H. (1975).** Outbreak of Marburg Virus Disease in Johannesburg. *Br. Med. J.* **4**(5995), 489-93
- Geisbert, T. W., and Jahrling, P. B. (1995).** Differentiation of Filoviruses by Electron Microscopy. *Virus Res.* **39**, 129-50
- Geisbert, T. W., Young, H. A., Jahrling, P. B., Davis, K. J., Kagan, E., and Hensley, L. E. (2003).** Mechanisms Underlying Coagulation Abnormalities. In **Ebola Hemorrhagic Fever**, Overexpression of Tissue Factor in Primate Monocytes/ Macrophages Is a Key Event. *J. Infect. Dis.* **188**, 1618–29
- Geyer, H., Will, C., Feldmann, H., Klenk, H.-D., and Geyer, R. (1992).** Carbohydrate Structure of Marburg Virus Glycoprotein. *Glycobiology* **2**(4), 299-312
- Goldsmith, C. S., Rollin, P. E., Zhang, X. H., Peters, C. J., and Zaki, S. R. (1997).** Ebola Virus Hemorrhagic Fever, Zaire, 1995: an Ultrastructural Study. *Microsc. Microanalysis* **3**, 77-78
- Gombart, A. F., Hirano, A., and Wong, T. C. (1995).** Nucleoprotein Phosphorylated on Both Serine and Threonine Is Preferentially Assembled into the Nucleocapsids of Measles Virus. *Virus Res.* **37**(1), 63-73
- Green, P. L., Yip, M. T., Xie, Y., and Chen, I. S. (1992).** Phosphorylation Regulates RNA Binding by the Human T-Cell Leukemia Virus Rex Protein. *J. Virol.* **66**, 4325-30
- Han, Z., Boshra, H., Sunyer, J. O., Zwiers, S. H., Paragas, J., and Harty, R. N. (2003).**

- Biochemical and Functional Characterization of the Ebola Virus VP24 Protein: Implications for a Role in Virus Assembly and Budding. *J. Virol.* **77**(3), 1793-800
- Hartlieb, B., Modrof, J., Mühlberger, E., Klenk, H. D., and Becker, S. (2003).** Oligomerization of Ebola Virus VP30 Is Essential for Viral Transcription and Can Be Inhibited by a Synthetic Peptide. *J. Biol. Chem.* **278**(43), 41830-6
- Harty, R. N., and Palese, P. (1995).** Measles Virus Phosphoprotein (P) Requires the NH<sub>2</sub>- and COOH-Terminal Domains for Interactions with the Nucleoprotein (N) but Only the COOH Terminus for Interactions with Itself. *J. Gen. Virol.* **76**(Pt 11), 2863-7
- Heggeness, M. H., Scheid, A., and Choppin, P. W. (1980).** Conformation of the Helical Nucleocapsids of Paramyxoviruses and Vesicular Stomatitis Virus: Reversible Coiling and Uncoiling Induced by Changes in Salt Concentration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**(5), 2631-5
- Heggeness, M. H., Scheid, A., and Choppin, P. W. (1981).** The Relationship of Conformational Changes in the Sendai Virus Nucleocapsid to Proteolytic Cleavage of the NP Polypeptide. *Virology* **114**(2), 555-62
- Hevey, M., Negley, D., Pushko, P., Smith, J., and Schmaljohn, A. (1998).** Marburg Virus Vaccines Based Upon Alphavirus Replicons Protect Guinea Pigs and Nonhuman Primates. *Virology* **251**(1), 28-37
- Horikami, S. M., Curran, J., Kolakofsky, D., and Moyer, S. A. (1992).** Complexes of Sendai Virus NP-P and P-L Proteins Are Required for Defective Interfering Particle Genome Replication In Vitro. *J. Virol.* **66**, 4901-8
- Hsu, C. H., and Kingsbury, D. W. (1982).** Topography of Phosphate Residues in Sendai Virus Proteins. *Virology* **120**(1), 225-34
- Huang, Y. T., Collins, P. L., and Wertz, G. W. (1985).** Characterization of the 10 Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus: Identification of a Fourth Envelope-Associated Protein. *Virus Res.* **2**, 157-73
- Huber, M., Cattaneo, R., Spielhofer, P., Orvell, C., Norrby, E., Messerli, M., Perriard, J. C., and Billeter, M. A. (1991).** Measles Virus Phosphoprotein Retains the Nucleocapsid Protein in the Cytoplasm. *Virology* **185**(1), 299-308
- Hughes, J. M., Slenczka, W., and Neppert, J. (1986).** Serologic Evidence for the Occurrence of Human Infections with Marburg and Ebola Virus in the Republic of Liberia. *Zb. Bakt. Hyg. I Abtlg. Orig.* **267**, 128
- 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. and 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**(7), 5613-20

- ICTVdB Management (2002)** 01.025.0.01. "Marburg-like viruses". In: **ICTVdB - The Universal Virus Database, version 3** (Büchen-Osmond, C., ed.), ICTVdB Management, Columbia University, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Oracle, USA
- Imai, Y., Matsushima, Y., Sugimura, T., Terada, M. (1991)**. A Simple and Rapid Method for Generating a Deletion by PCR. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2785
- Jaax, N., Jahrling, P., Geisbert, T., Geisbert, J., Steele, K., McKee, K., Nagly, D., Johnson, E., Jaax, G., and Peters, C. J. (1995)**. Transmission of Ebola Virus (Zaire Strain) to Uninfected Control Monkeys in a Biocontainment Laboratory. *Lancet* **346**(8991-2), 1669-71
- Jackson, R. L., Spadafora, D., and Perrault, J. (1995)**. Hierarchical Constitutive Phosphorylation of the Vesicular Stomatitis Virus P Protein and Lack of Effect on P1 to P2 Conversion. *Virology* **214**(1), 189-97
- Jahrling, P. B., Geisbert, T. W., Dalgard, D. W., Johnson, E. D., Ksiazek, T. G., Hall, W. C., and Peters, C. J. (1990)**. Preliminary Report: Isolation of Ebola Virus from Monkeys Imported to USA. *Lancet* **335**, 502-5
- Johansson, K., Bourhis, J. M., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., and Longhi, S. (2003)**. Crystal Structure of the Measles Virus Phosphoprotein Domain Responsible for the Induced Folding of the C-Terminal Domain of the Nucleoprotein. *J. Biol. Chem.* **278**(45), 44567-73
- Johnson, K. M., Lange, J. V., Webb, P. A., and Murphy, F. A. (1977)**. Isolation and Partial Characterisation of a New Virus Causing Acute Haemorrhagic Fever in Zaire. *Lancet* **1**(8011), 569-71
- Johnson, E. D., Johnson, B. K., Silverstein, D., Tukei, P., Geisbert, T. W., Sanchez, A. N., and Jahrling, P. B. (1996)**. Characterization of a New Marburg Virus Isolated From a 1987 Fatal Case in Kenya. *Arch. Virol. Suppl.* **11**, 101-14
- Johnson, E., Jaax, N., White, J., and Jahrling, P. (1995)**. Lethal Experimental Infections of Rhesus Monkeys by Aerosolized Ebola Virus. *Int. J. Exp. Pathol.* **76**, 227-36
- Karlin, D., Ferron, F., Canard, B., and Longhi, S. (2003)**. Structural Disorder and Modular Organization in Paramyxovirinae N and P. *J. Gen. Virol.* **84**, 3239-52
- Karlin, D., Longhi, S., and Canard, B. (2002)**. Substitution of Two Residues in the Measles Virus Nucleoprotein Results in an Impaired Self-Association. *Virology* **302**(2), 420-32
- Kaushik, R., and Ratner, L. (2004)**. Role of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Matrix Phosphorylation in an Early Postentry Step of Virus Replication. *J. Virol.* **78**(5), 2319-26
- Kaushik, R., and Shaila, M. S. (2004)**. Cellular Casein Kinase II-Mediated Phosphorylation of Rinderpest Virus P Protein Is a Prerequisite for its Role in Replication/ Transcription of the Genome. *J. Gen. Virol.* **85**(Pt 3), 687-91
- Kiley, M. P., Bowen, E. T. H., Eddy, G. A., Isaacson, M., Johnson, K. M., McCormick, J. B., Murphy, F. A., Pattyn, S. R., Peters, D., Prozesky, O. W., Regeney, R. L.,**

- Simpson, D. I. H., Slenczke, W., Sureau, P., van der Groen, G., Webb, P. A., and Wulff, H. (1982).** Filoviridae: a Taxonomic Home for Marburg and Ebola Viruses? *InterVirology* **18**, 14-32
- Kiley, M. P., Cox, N. J., Elliot, L. H., Sanchez, A., DeFries, R., Buchmeyer, M. J., Richmann, D. D., and McCormick, J. B. (1988).** Physicochemical Properties of Marburg Virus: Evidence for Three Distinct Virus Strains and Their Relationship to Ebola Virus. *J. Gen. Virol.* **69**(Pt 8), 1957-67
- Kolakofsky, D., Vidal, S., and Curran J. (1991).** Paramyxovirus RNA Synthesis and P Gene Expression. In: **The Paramyxoviruses** (Kingsbury, D. W., ed.). Plenum, New York, NY, 1991, pp. 215-33
- Kolesnikova, L., Bamberg, S., Berghöfer, B., and Becker, S. (2004).** The Matrix Protein of Marburg Virus Is Transported to the Plasma Membrane Along Cellular Membranes: Exploiting the Retrograde Late Endosomal Pathway. *J. Virol.* **78**(5), 2382-93
- Kolesnikova, L., Bugany, H., Klenk, H.-D., and Becker, S. (2002).** VP40, the Matrix Protein of Marburg Virus, Is Associated with Membranes of the Late Endosomal Compartment. *J. Virol.* **76**, 1825-38
- Kolesnikova, L., Mühlberger, E., Ryabchikova, E., and Becker, S. (2000).** Ultrastructural Organization of Recombinant Marburg Virus Nucleoprotein: Comparison with Marburg Virus Inclusions. *J. Virol.* **74**, 3899-904
- Lamb, R. A., and Kolakofsky, D. (2001).** Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. In: **Fields Virology** (Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., eds) **4<sup>th</sup> Ed.** Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, pp. **1305-1340**
- Leader, D. P., and Katan, M. (1988).** Viral Aspects of Protein Phosphorylation. *J. Gen. Virol.* **69**(Pt 7), 1441-64
- Leger, J., Kempf, M., Lee, G., and 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**(13), 8441-6
- Leroy, E. M., Baize, S., Volchkov, V. E., Fisher-Hoch, S. P., Georges-Courbot, M. C., Lansoud-Soukate, J., Capron, M., Debre, P., McCormick, J. B., and Georges, A. J. (2000).** Human Asymptomatic Ebola Infection and Strong Inflammatory Response. *Lancet* **355**, 2210-5
- Li, M., and Garcea, R. L. (1994).** Identification of the Threonine Phosphorylation Sites on the Polyomavirus Major Capsid Protein VP1: Relationship to the Activity of Middle T Antigen. *J. Virol.* **68**(1), 320-7
- Liau, S., and 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**(1), 258-63

- Liston, P., Batal, R., DiFlumeri, C., and Briedis, D. J. (1997).** Protein Interaction Domains of the Measles Virus Nucleocapsid Protein (NP). *Arch. Virol.* **142**(2), 305-21
- Liu, J., Tan, H., and Rost, B. (2002).** Loopy Proteins Appear Conserved in Evolution. *J. Mol. Biol.* **322**(1), 53-64
- Liu, N., and Brown, D. T. (1993).** Phosphorylation and Dephosphorylation Events Play Critical Roles in Sindbis Virus Maturation. *Virology* **196**(2), 703-11
- Liu, Z., Huntley, C. C., De, B. P., Das, T., Banerjee, A. K., and Oglesbee, M. J. (1997).** Phosphorylation of Canine Distemper Virus P Protein by Protein Kinase C-Zeta and Casein Kinase II. *Virology* **232**(1), 198-206
- Longhi, S., Receveur-Bréchet, V., Karlin, D., Johansson, K., Darbon, H., Bhella, D., Yeo, R., Finet, S., and Canard, B. (2003).** The C-Terminal Domain of the Measles Virus Nucleoprotein Is Intrinsically Disordered and Folds Upon Binding to the C-Terminal Moiety of the Phosphoprotein. *J. Biol. Chem.* **278**(20), 18638-48
- Lötfering, B., Mühlberger, E., Tamura, T., Klenk, H.-D., and Becker, S. (1999).** The Nucleoprotein of Marburg Virus Is Target for Multiple Cellular Kinases. *Virology* **255**, 50-62
- Lötfering, B (1998):** Das Nukleoprotein des Marburg-Virus: Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg
- Lupas, A. (1996).** Coiled Coils: New Structures and New Functions. *Trends Biochem. Sci.* **21**(10), 375-82
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991).** Predicting Coiled Coils From Protein Sequences. *Science* **252**(5010), 1162-4
- Mackett, M, Smith, G. L., Moss B. (1984).** General Method for Production and Selection of Infectious Vaccinia Virus Recombinants Expressing Foreign Genes. *J. Virol.* **49**(3), 857-64
- Marks, F. (1996).** The Brain of the Cell. In: **Protein Phosphorylation** (Marks, F., ed.). VCH, Weinheim, pp. 1-35
- Martini, G. A. (1971).** Marburg Virus Disease, Clinical Syndrome. In: **Marburg Virus Disease** (Martini, G. A., and Siegert, R., ed.), 1<sup>st</sup> ed. Springer, New York, USA, pp. 1-230
- Martini, G. A., Knauff, H. G., Schmidt, H. A., Mayer, G. und Baltzer, G. (1968).** Über eine bisher unbekannte, von Affen eingeschleppte Infektionskrankheit: Marburg-Virus-Krankheit. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **93**, 559-71
- Mavrakis, M., Iseni, F., Mazza, C., Schön, G., Ebel, C., Gentzel, M., Franz, T., and Ruigrok, R. W. (2003).** Isolation and Characterisation of the Rabies Virus N Degrees-P Complex Produced in Insect Cells. *Virology* **305**(2), 406-14
- Mavrakis, M., Kolesnikova, L., Schön, G., Becker, S., and Ruigrok, R. W. (2002).** Morphology of Marburg Virus NP-RNA. *Virology* **296**(2), 300-7
- Millward, T. A., Zolnierowicz, S., and Hemmings, B. A. (1999).** Regulation of Protein Kinase Cascades by Protein Phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.* **24**(5), 186-91

- Modrof, J., Becker, S., and Mühlberger, E. (2003).** Ebola Virus Transcription Activator VP30 Is a Zinc-Binding Protein. *J. Virol.* **77**(5), 3334-8
- Modrof, J., Möritz, C., Kolesnikova, L., Konakova, T., Hartlieb, B., Randolph, A., Mühlberger, E., and 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., and Becker, S. (2002).** Phosphorylation of VP30 Impairs Ebola Virus Transcription. *J. Biol. Chem.* **277**(36), 33099-104
- Möller, P. (2002):** Charakterisierung von Interaktionsdomänen auf dem Marburg-Virus VP35. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg
- Mühlberger, E., Lötfering, B., Klenk, H.-D., and 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., and Becker, S. (1999).** Comparison of the Transcription and Replication Strategies of Marburg Virus and Ebola Virus by Using Artificial Replication Systems. *J. Virol.* **73**, 2333-42
- Mühlberger, E., Sanchez, A., Randolph, A., Will, C., Kiley, M. P., Klenk, H.-D., and Feldmann, H. (1992).** The Nucleotide Sequence of the L Gene of Marburg Virus, a Filovirus: Homologies with Paramyxoviruses and Rhabdoviruses. *Virology* **187**, 534-547
- Mühlberger, E., Trommer, S., Funke, C., Volchkov, V., Klenk, H.-D., and Becker, S. (1996).** Termini of All mRNA Species of Marburg Virus: Sequence and Secondary Structure. *Virology* **223**, 376-80
- Mupapa, K., Massamba, M., Kibadi, K., Kuvula, K., Bwaka, A., Kipasa, M., Colebunders, R., and Muyembe-Tamfum, J. J. (1999).** Treatment of Ebola Hemorrhagic Fever with Blood Transfusions from Convalescent Patients. International Scientific and Technical Committee. *J. Infect. Dis.* **179** (Suppl 1), 18-23
- Murphy, F. A., van der Groen, G., Whitfield, S. G., and Lange, J. V. (1978).** Ebola and Marburg Virus Morphology and Taxonomy. In: **Ebola Virus Hemorrhagic Fever** (Pattny, S. R., ed.) 1<sup>st</sup> edn. Elsevier, Amsterdam, North-Holland, pp. 61-84
- Myers, T. M., Pieters, A., and Moyer, S. A. (1997).** A highly Conserved Region of the Sendai Virus Nucleocapsid Protein Contributes to the NP-NP Binding Domain. *Virology* **229**(2), 322-35
- Myers, T. M., Smallwood, S., and Moyer, S. (1999).** Identification of Nucleocapsid Protein Residues Required for Sendai Virus Nucleocapsid Formation and Genome Replication. *J. Gen. Virol.* **80**(Pt 6), 1383-91
- Narayan, M., Kusuhara, K., and Green, P. L. (2001).** Phosphorylation of Two Serine Residues Regulates Human T-Cell Leukemia Virus Type 2 Rex Function. *J. Virol.* **75**(18), 8440-8



- Naruse, H., Nagai, Y., Yoshida, T., Hamaguchi, M., Matsumoto, T., Isomura, S., and Suzuki, S. (1981).** The Polypeptides of Mumps Virus and Their Synthesis in Infected Chick Embryo Cells. *Virology* **112**(1), 119-30
- Nichol, S. T., Arikawa, J., and Kawaoka, Y. (2000).** Emerging Viral Diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**(23), 12411-2
- O'Reilly, D., Hanscombe, O., and O'Hare, P. (1997).** A Single Serine Residue at Position 375 of VP16 Is Critical for Complex Assembly with Oct-1 and HCF and Is a Target of Phosphorylation by Casein Kinase II. *EMBO J.* **16**(9), 2420-30
- Pascarella, S., and Bossa, F. (1987).** A Simple Microcomputer Program for Predicting the Secondary Structure of Proteins. *Comput. Meth. Programs Biomed.* **24**(3), 207-8
- Pattnaik, A. K., Hwang, L., Li, T., Englund, N., Mathur, M., Das, T., and 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**(11), 8167-75
- Pattyn, S., van der Groen, G., Courteille, G., Jacob, W., and Piot, P. (1977).** Isolation of Marburg-Like Virus from a Case of Haemorrhagic Fever in Zaire. *Lancet* **1**(8011), 581-582
- Pearson, R. B. and 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., and Murphy, F. A. (1996).** Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. In: **Fields Virology** (Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M., eds) **4<sup>th</sup> Ed.** Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, **pp. 1305-1340**
- Pokhodiaev, V. A., Gonchar, N. I., and Pshenichnov, V. A. (1991).** An Experimental Study of the Contact Transmission of the Marburg Virus *Vopr. Virusol.* **36**(6), 506-8
- Pyerin, W., Ackermann, K., and Lorenz, P. (1996).** Casein Kinases. In: **Protein Phosphorylation** (Marks, F. (ed.)). VCH, Weinheim, **pp. 117-47**
- Rippey, J. J., Schepers, N. J., and Gear, J. H. (1984).** The Pathology of Marburg Virus Disease. *South Afr. Med. J.* **66**(2), 50-4
- Roach, P. J. (1991).** Multisite and Hierarchical Protein Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266**(22), 14139-42
- Robbins, S. J., and Bussel, R. H. (1979).** Structural Phosphoproteins Associated with Purified Measles Virions and Cytoplasmic Nucleocapsids. *Intervirology* **12**, 96-102
- Ryabchikova, E. I., Kolesnikova, L. V., and Netesov, S. V. (1999).** Animal Pathology of Filoviral Infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **235**, 145-73
- Ryan, K. W., and Portner, A. (1990).** Separate Domains of Sendai Virus P Protein are Required for Binding to Viral Nucleocapsids. *Virology* **174**(2), 515-21
- Ryan, K. W., Portner, A., and Murti, K. G. (1993).** Antibodies to Paramyxovirus Nucleoproteins Define Regions Important for Immunogenicity and Nucleocapsid Assembly. *Virology* **193**(1), 376-84

- Sambrook, A., Fritsch, E. F., and Maniatis, A. K. (1989).** Molecular Cloning, A Laboratory Manual **2<sup>nd</sup> ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA
- Sanchez, A., Kiley, M. P., Klenk, H.-D., and Feldmann, H. (1992).** Sequence Analysis of the Marburg Virus Nucleoprotein Gene: Comparison to Ebola Virus and Other Non-Segmented Negative-Strand RNA Viruses. *J. Gen. Virol.* **73**(Pt 2), 347-57
- Sanchez, A., Kiley, M. P., Holloway, B. P., and Auperin, D. D. (1993).** Sequence Analysis of the Ebola Virus Genome: Organization, Genetic Elements, and Comparison with the Genome of Marburg Virus. *Virus Res.* **29**(3), 215-40
- Sanchez, A., Yang, Z. Y., Xu, L., Nabel, G. J., Crews, T., and Peters, C. J. (1998).** Biochemical Analysis of the Secreted and Virion Glycoproteins of Ebola Virus. *J. Virol.* **72**(8), 6442-7
- Sänger, C. (2000):** Untersuchungen zum Transport und zur Reifung des Marburg-Virus Oberflächenproteins GP. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg
- Sänger, C., Mühlberger, E., Klenk, H.-D. und Becker, S. (1998).** Untersuchungen zur Interaktion des Marburg-Virus GP mit den Matrixproteinen VP24 und VP40. Poster. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Regensburg
- Sänger, C., Mühlberger, E., Kolesnikova, L., Ryabchikova, E., Klenk, H.-D., and Becker, S. (2002).** The Marburg Virus Surface Protein GP Is Phosphorylated at its Ectodomain. *Virology* **295**(1), 20-9
- Schikore, M. (1990):** Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Strukturproteine des Marburg-Virus. Diplomarbeit. Philipps-Universität, Marburg
- Schnittler, H. J., Mahner, F., Drenckhahn, D., Klenk, H.-D., and Feldmann, H. (1993).** Replication of Marburg Virus in Human Endothelial Cells. A Possible Mechanism for the Development of Viral Hemorrhagic Disease. *J. Clin. Invest.* **91**(4), 1301-9
- Siegert, R., Shu, H. L. und Slenczka, W. (1968).** Isolierung und Identifizierung des „Marburg-Virus“. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **93**, 604-612
- Siegert, R., Shu, H. L., Slenczka, W., Peters, D. und Muller, G. (1967).** Zur Ätiologie einer unbekanntenen, von Affen ausgegangenen menschlichen Infektionskrankheit. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **92**, 2341-3
- Simmons, G., Rennekamp, A. J., Chai, N., Vandenberghe, L. H., Riley, J. L., and Bates, P. (2003).** Folate Receptor Alpha and Caveolae Are Not Required for Ebola Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection. *J. Virol.* **77**(24), 13433-8
- Simpson, D. I. H., and Zuckermann, A. J. (1977).** Marburg and Ebola: Viruses in Search of a Relation. *Nature* **266**, 217-8
- Skipchenko, A. A., Riabchikova, E. I., Vorontsova, L. A., Shestopalov, A. M., and Viazunov, S. A. (1994).** Marburg Virus and Mononuclear Phagocytes: Study of Interactions. *Vopr. Virusol.* **39**(5), 214-8
- Slenczka, W., Rietschel, M., Hoffmann, C. und Sixl, W. (1984).** Seroepidemiologische

- Untersuchungen über das Vorkommen von Antikörpern gegen Marburg- und Ebola-Virus in Afrika. *Mitt. Oesterr. Ges. Tropenmed. Parasit.* **6**, 53-60
- Smith, D. H., Johnson, B. K., Isaacson, M., Swanapoel, R., Johnson, K. M., Killey, M., Bagshawe, A., Siongok, T., and Keruga, W. K. (1982).** Marburg Virus Disease in Kenya. *Lancet* **1**, 816-20
- Sokol, F., and Clark, H. F. (1973).** Phosphoproteins, Structural Components of Rhabdoviruses. *Virology* **52**, 246-63
- Spehner, D., Drillien, R., and Howley, P. M. (1997).** The Assembly of the Measles Virus Nucleoprotein Into Nucleocapsid-Like Particles Is Modulated by the Phosphoprotein. *Virology* **232(2)**, 260-268
- Spehner, D., Kirn, A., and Drillien, R. (1991).** Assembly of Nucleocapsid-Like Structures in Animal Cells Infected with a Vaccinia Virus Recombinant Encoding the Measles Virus Nucleoprotein. *J. Virol.* **65**, 6296-6300
- Stille, W., and Böhme, E. (1971).** Clinical Course and Prognosis of Marburg Virus ("Green Monkey") Disease. In: **Marburg Virus Disease** (Martini, G. A., and Siebert, R., eds.). Springer Verlag, New York, USA, pp. 10-18
- Stille, W., Bohle, E., Helm, E., van Rey, W. and Siede, W. (1968).** An Infectious Disease Transmitted by Cercopithecus Aethiops. ("Green Monkey Disease"). *Ger. Med. Mon.* **13**, 470-8
- Stricker, R. B., Goldberg, B., and Epstein, W. L. (1997).** Topical Immune Modulation (TIM): a Novel Approach to the Immunotherapy of Systemic Disease. *Immunol. Lett.* **59(3)**, 145-50
- Strieter, R. M., Kunkel, S. L., and Bone, R. C. (1993).** Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha in Disease States and Inflammation. *Crit. Care Med.* **21**, 447-463 (81)
- Ströher, U., West, E., Bugany, H., Klenk, H. D., Schnittler, H. J., and 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., and Nabel, G. J. (2000).** Development of a Preventive Vaccine for Ebola Virus Infection in Primates. *Nature* **408**, 605-9
- Sutter, G., Ohlmann, M., and Erfle, V. (1995).** Non-Replicating Vaccinia Vector Efficiently Expresses Bacteriophage T7 RNA Polymerase. *FEBS Lett.* **371(1)**, 9-12
- Swanapoel, R., Leman, P. A., Burt, F. J., Zachariades, N. A., Braack, L. E., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Zaki, S. R., and Peters, C. J. (1996).** Experimental Inoculation of Plants and Animals with Ebola Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 321-5
- Tuffereau, C., Fischer, S., and Flamand, A. (1985).** Phosphorylation of the N and M1 Proteins of Rabies Virus. *J. Gen. Virol.* **66(Pt 10)**, 2285-9
- Uversky, V. N. (2002).** Natively Unfolded Proteins: a Point Where Biology Waits for Physics. *Protein Sci.* **11(4)**, 739-756

- van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., and Wickner, R. B. (2000).** Virus Taxonomy, VII<sup>th</sup> report of the ICTV. Academic Press, San Diego, USA
- Viveros, M., Dickey, C., Cotropia, J. P., Gevorkian, G., Larralde, C., Broliden, K., Levi, M., Burgess, A., Cao, C., Weiner, D. B., Agadjanyan, M. G., and Ugen, K. E. (2000).** Characterization of a Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Neutralizable Epitope within the Immunodominant Region of gp41. *Virology* **270**(1), 135-45
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Mühlberger, E., Kolesnikova, L. V., Weik, M., Dolnik, O., and 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
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Ströher, U., Becker, S., Dolnik, O., Cieplik, M., Garten, W., Klenk, H.-D., and Feldmann, H. (2000).** Proteolytic Processing of Marburg Virus Glycoprotein. *Virology* **268**(1), 1-6
- Wang, C., Lamb, R. A., and Pinto, L. H. (1994).** Direct Measurement of the Influenza A Virus M2 Protein Ion Channel Activity in Mammalian Cells. *Virology* **205**(1), 133-40
- Warnes, A., Fooks, A. R., Dowsett, A. B., Wilkinson, G. W., and Stephenson, J. R. (1995).** Expression of the Measles Virus Nucleoprotein Gene in Escherichia Coli and Assembly of Nucleocapsid-Like Structures. *Gene (Amst.)* **160**(2), 173-8
- Weik, M., Modrof, J., Klenk, H.-D., Becker, S., and Mühlberger, E. (2002).** Ebola Virus VP30-Mediated Transcription Is Regulated by RNA Secondary Structure Formation. *J. Virol.* **76**, 8532-9
- Will, C., Mühlberger, E., Linder, D., Slenczka, W., Klenk, H.-D., and Feldmann, H. (1993).** Marburg Virus Gene 4 Encodes the Virion Membrane Protein, a Type I Transmembrane Glycoprotein. *J. Virol.* **67**, 1203-10
- Witt, D. J., Naeve, C. W., and Summers, D. F. (1981).** Phosphorylation of Vesicular Stomatitis Virus Proteins as a Possible Contributing Factor in Virion Uncoating. *J. Gen. Virol.* **56**(Pt 2), 383-91
- 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) (1992).** Viral Hemorrhagic Fever in Imported Monkeys. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **67**, 142-43
- World Health Organisation (WHO) (1996).** Outbreak of Haemorrhagic Fever in Gabon Officially Declared Over. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **71**, 125-126
- World Health Organisation (WHO) (1997).** Ebola Haemorrhagic Fever. A Summary of the Outbreak in Gabon. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **72**, 7-8

- World Health Organisation (WHO) (1999).** Marburg Fever, Democratic Republic of the Congo. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **74**, 145
- World Health Organisation (WHO) (2000).** Outbreak News. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **75(50)**, 409
- World Health Organisation (WHO) (2001).** Outbreak of Ebola Haemorrhagic Fever, Uganda, August 2000 - January 2001. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **76**, 41-6
- World Health Organization (WHO) (2002).** Ebola Haemorrhagic Fever in Gabon/ The Republic of the Congo - update 21. [http://www.who.int/csr/don/2002\\_03\\_22/en/](http://www.who.int/csr/don/2002_03_22/en/)
- World Health Organization (WHO) (2003a).** Outbreak(s) of Ebola Haemorrhagic Fever in the Republic of the Congo, January - April 2003. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **78** (No. 33), 285-9
- World Health Organization (WHO) (2003b).** Ebola Haemorrhagic Fever in the Republic of the Congo - Update 12. [http://www.who.int/csr/don/2003\\_05\\_07/en/](http://www.who.int/csr/don/2003_05_07/en/)
- World Health Organization (WHO) (2004a).** Ebola Haemorrhagic Fever in the Republic of the Congo - update 6. [http://www.who.int/csr/don/2004\\_01\\_06/en/](http://www.who.int/csr/don/2004_01_06/en/)
- World Health Organization (WHO) (2004b).** Ebola Haemorrhagic Fever in south Sudan - update 3. [http://www.who.int/csr/don/2004\\_06\\_01a/en/](http://www.who.int/csr/don/2004_06_01a/en/)
- Wright, P. E., and Dyson, H. J. (1999).** Intrinsically Unstructured Proteins: Re-Assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *J. Mol. Biol.* **293(2)**, 321-31. Review
- Wu, X., Gong, X., Foley, H. D., Schnell, M. J., and Fu, Z. F. (2002).** Both Viral Transcription and Replication Are Reduced When the Rabies Virus Nucleoprotein Is Not Phosphorylated. *J. Virol.* **76(9)**, 4153-61
- Wu, X., Lei, X., and Fu, Z. F. (2003).** Rabies Virus Nucleoprotein Is Phosphorylated by Cellular Casein Kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304(2)**, 333-8
- Yang, J., Koprowski, H., Dietzschold, B., and Fu, Z. F. (1999).** Phosphorylation of Rabies Virus Nucleoprotein Regulates Viral RNA Transcription and Replication by Modulating Leader RNA Encapsidation. *J. Virol.* **73(2)**, 1661-4
- Zaki, S. R., and Kilmarx, P. H. (1997).** Ebola Virus Hemorrhagic Fever. In **Pathology of Emerging Infections** (Horsburgh, C. Jr., Nelson, A. M., eds.). ASM Press, Washington D. C., USA, pp. 299-312
- Zaki, S. R., and Peters, C. J. (1997).** Viral Hemorrhagic Fever. In **Diagnostic Pathology of Infectious Diseases** (Connor, D. H., Chandler, F. W., Schwartz, D. A., Manz, H. J., Lack, E. E., eds.). Appleton and Lange, Stamford, USA, pp. 347-364
- Zaki, S. R., Greer, P. W., Goldsmith, C. S., Coffield, L. M., Rollin, P. E., Callain, P., and others (1996).** Proceedings of the International Colloquium on Ebola Virus Research. Sept 4-7, Antwerpen

- Zhang, X., Glendening, C., Linke, H., Parks, C. L., Brooks, C., Udem, S. A., and Oglesbee, M. (2002).** Identification and Characterization of a Regulatory Domain on the Carboxyl Terminus of the Measles Virus Nucleocapsid Protein. *J. Virol.* **76**(17), 8737-46
- Zhi, Y., and Sandri-Goldin, R. M. (1999).** Analysis of the Phosphorylation Sites of Herpes Simplex Virus Type 1 Regulatory Protein ICP27. *J. Virol.* **73**(4), 3246-57

---

**8. Anhang**
**Abbildungen****Seite**Einleitung:

<b>Abb. 1:</b> Taxonomie der Filoviridae	6
<b>Abb. 2:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahme der MARV-Partikel	12
<b>Abb. 3:</b> Schematische Darstellung des MARV-Genoms	12
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung von Coiled Coils: Helix, Heptad-Repeat, Torsion	18

Ergebnisse:

<b>Abb. 5:</b> Übersicht der zu Beginn der Untersuchungen bekannten Daten zur Homooligomerisierung des Marburg-Virus-NP	52
<b>Abb. 6:</b> Eingrenzung der NP-Homooligomerisierungsdomänen durch C-terminale Deletionsmutanten	54-5
<b>Abb. 7:</b> Ablauf der Klonierung mittels inverser PCR	57
<b>Abb. 8:</b> Charakterisierung der NP-Homooligomerisierungsdomäne durch interne Deletionsmutanten	59-60
<b>Abb. 9:</b> Einfluss der internen NP-Deletionen auf die virale RNA-Synthese, die Bildung der Einschlusskörper und die intrazelluläre Stabilität	62-3
<b>Abb. 10:</b> Die zwei Coiled-Coil-Motive des Marburg-Virus-NP	64
<b>Abb. 11:</b> Einfluss der Coiled-Coil-Motive auf die Homooligomerisierung	66
<b>Abb. 12:</b> Übertragung der Coiled-Coil-Motive auf ein heterologes Reporterprotein und Einfluss des 2B10	69
<b>Abb. 13:</b> Einfluss der Coiled-Coil-Motive auf die virale RNA-Synthese und Bildung der Einschlusskörper	71
<b>Abb. 14:</b> Interaktion des Marburg-Virus-NP N- und C-Terminus	73
<b>Abb. 15:</b> Charakterisierung der N-terminalen Homooligomerisierungsdomäne	76
<b>Abb. 16:</b> Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Homooligomerisierung	78
<b>Abb. 17:</b> Übersicht der anfänglich bekannten, zur Heterooligomerisierung mit VP35 wichtigen NP-Bereiche	80
<b>Abb. 18:</b> Eingrenzung der VP35-Heterooligomerisierungsdomänen durch C-terminale NP-Deletionsmutanten	82-3
<b>Abb. 19:</b> Einfluss der AS 350-480 auf die Oligomerisierung mit VP35	84-5
<b>Abb. 20:</b> Einfluss der NP-Coiled-Coil-Motive auf die Oligomerisierung mit VP35	86
<b>Abb. 21:</b> Interaktion der NP-Coiled-Coil-Fusionsproteine mit VP35	89
<b>Abb. 22:</b> Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die Oligomerisierung mit VP35	91

<b>Abb. 23:</b> Untersuchung zur VP30-Heterooligomerisierung	92
<b>Abb. 24:</b> Einfluss posttranslationaler NP-Modifikationen auf die Oligomerisierung mit VP30	94
<b>Abb. 25:</b> Übersicht über die Region II des NP	96
<b>Abb. 26:</b> Untersuchung zum Phosphorylierungsstatus der Region II und Einfluss der PK CKII an der Phosphorylierung der Region II	97
<b>Abb. 27:</b> Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf die biologische Funktion während der viralen RNA-Synthese und auf die Protein-Stabilität	100
<b>Abb. 28:</b> Eingrenzung des 2B10-Epitops auf Marburg-Virus-NP durch interne Deletionsmutanten	102
<b>Abb. 29:</b> Einfluss des 2B10-Epitops auf die Homooligomerisierung	104
<u>Diskussion:</u>	
<b>Abb. 30:</b> Modell zur Homooligomerisierung über das Doppel-Coiled Coil-Motiv	107
<b>Abb. 31:</b> Modell der Homooligomerisierung des NP	109
<b>Abb. 32:</b> Zusammenlagerung der NP-Moleküle zu Nukleokapsiden	118

---

## Tabellen

---

### Einleitung:

<b>Tab. 1:</b> Durch Filoviren verursachte Ausbrüche von hämorrhagischem Fieber	8/9
<b>Tab. 2:</b> Häufig phosphorylierte Erkennungsstellen von Proteinkinasen	20

### Material und Methoden:

<b>Tab. 3:</b> Für Klonierungen verwendete DNA-Matrizen und Oligonukleotide	31
---	----

### Diskussion:

<b>Tab. 4:</b> Einfluss von Deletionen im NP auf virale Transkription, Homooligomerisierung, VP35-Interaktion und Bildung der Einschlusskörper	112
<b>Tab. 5:</b> Einfluss der Phosphorylierung des Serinclusters der Region II auf virale Transkription, Homooligomerisierung und VP35-Interaktion	118



## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk vom Institut für Virologie für die Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Themas.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. S. Becker für die Betreuung meiner Dissertation in der Arbeitsgruppe am Institut für Virologie. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und förderte den erfolgreichen Fortgang der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau PD Dr. E. Mühlberger, die mir ebenfalls hilfreich zur Seite stand.

Den Kollegen des Labors G23 am Institut für Virologie spreche ich meinen herzlichen Dank aus. Angelika Lander belebte die Laborarbeit durch ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Art. Sandra Bamberg, Bettina Hartlieb, Dr. Larissa Kolesnikova, Peggy Möller, Beate Berghöfer, Niko Deubner, Yannik Boehmann, Dr. Christian Sängler und Dr. Michael Weik trugen gleichfalls zum freundschaftlichen und fruchtbaren Betriebsklima bei.

Danke an Netzwerkadministrator Rüttger Ebent, der die Computer reibungslos am Laufen hielt.

Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für ihre Kollegialität.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern für die großzügige materielle und ideelle Förderung während meines Studiums bedanken. Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Franz Feldmann für seine seelische und motivierende Unterstützung.

## **Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung von Oligomerisierungsdomänen des Marburg-Virus Nukleoproteins und deren funktionelle Bedeutung“ im Institut für Virologie unter Leitung von Prof. Dr. H.-D. Klenk mit Unterstützung durch PD Dr. Stephan Becker ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 14.07.2004

Andrea Di Carlo

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

G. Aumüller, H.-G. Aurich, H.-D. Basler, S. Becker, M. Dobbelstein, A. Dressler, H.-P. Elsässer, W. Fuhs, W. Garten, C. Giese, A. Habermehl, K. Hartmann, A. Hasilik, H. F. Kern, C. Kirchner, H.-D. Klenk, J. Koolman, R. E. Lang, R. Lill, E. Mühlberger, R. Müller, T. Penzel, W. Risau, D.-O. Schachtschabel, H. Schäfer, J. Seitz, K.-A. Seitz, A. Steinmetz, K.-H. Voigt, H.-W. Waßmuth, E. Weihe, G. Weiser, R. Westermann, H. Feldmann