

Funktionelle Charakterisierung der cytoplasmatischen Domäne des Marburgvirus Oberflächenproteins GP

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt von

Eva-Maria Mittler

aus Kirchhain

Marburg/Lahn, 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2005 bis Juni 2009 am Robert-Koch Institut, Berlin bzw. am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Stephan Becker durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 01.07.2009 angenommen.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Klaus Lingelbach
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Stephan Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2009

I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Taxonomie und Epidemiologie der Filoviren	1
1.2	Klinik und Pathogenese der MARV- Infektion.....	5
1.3	Morphologie des Marburgvirus.....	8
1.4	Genomstruktur des Marburgvirus.....	9
1.5	Die viralen Strukturproteine.....	9
1.6	Der Replikationszyklus des Marburgvirus.....	17
1.7	Das infektiöse filovirale VLP-System.....	19
1.8	Separierung von sphärischen und filamentösen (i)VLPs.....	22
1.9	Die Fusion viraler mit zellulären Membranen	24
1.10	Einfluss der cytoplasmatischen Domäne viraler Oberflächenproteine auf den viralen Lebenszyklus.....	26
1.11	Fragestellung.....	28
2	Material	29
2.1	Chemikalien	29
2.2	Verbrauchsmaterialien	31
2.3	Kits.....	32
2.4	Geräte.....	32
2.5	Puffer und Lösungen.....	33
2.5.1	Puffer.....	33
2.5.2	Lösungen	35
2.6	Wachstumsmedien.....	36
2.6.1	Wachstumsmedien für Bakterien.....	36
2.6.2	Wachstumsmedien für Säugerzellen.....	36
2.7	Nukleinsäuren und Nukleotide	37
2.7.1	Nukleinsäuren als Größenmarker.....	37
2.7.2	Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide.....	37
2.7.3	DNA-Oligonukleotide (Primer für Sequenzierungen/ Mutagenesen).....	37
2.8	Vektoren und rekombinante Plasmide.....	39
2.8.1	Vektoren	39
2.8.2	Rekombinante Plasmide	39
2.9	Proteine, Peptide und Aminosäuren.....	40
2.9.1	Enzyme.....	40
2.9.2	Antikörper	40
2.9.3	Proteinmarker	41
2.10	Zellen.....	41

2.10.1	Prokaryotische Zellen.....	41
2.10.2	Eukaryotische Zellen.....	42
3	Methoden.....	43
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.1.1	Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mittels Polymerase- Kettenreaktion (PCR).....	43
3.1.1.1	Rekombinante PCR.....	44
3.1.2	Ortsgerichtet Mutagenese von Plasmid- DNA.....	46
3.1.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	47
3.1.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	47
3.1.4.1	Analytische bzw. präparative DNA-Agarosegele.....	48
3.1.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	48
3.1.6	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	48
3.1.7	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren.....	49
3.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren.....	50
3.1.9	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen.....	50
3.1.10	Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterien.....	51
3.1.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (kleiner Maßstab).....	51
3.1.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (großer Maßstab).....	52
3.1.13	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren.....	52
3.1.14	DNA-Sequenzierung.....	53
3.2	Zellbiologische Methoden.....	54
3.2.1	Kultivierung von HEK293-, HUH7- und Hela-Zellen.....	54
3.2.2	Transiente DNA-Transfektion mit <i>TransIT</i>	54
3.2.3	Transfektion von Hela-Zellen mit <i>Lipofectamine Plus</i> TM	55
3.2.4	Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot.....	56
3.2.5	Infektiöser Marburgvirus VLP-Assay.....	56
3.2.6	Infektiöser EBOV VLP-Assay.....	59
3.2.7	Aufreinigung bzw. Auftrennung von filamentösen und sphärischen Partikeln aus Zellkulturüberstand.....	60
3.2.8	Zell-Zell Fusionsassay.....	61
3.2.9	Aufnahmeassay.....	62
3.3	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	64
3.3.1	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und deren Visualisierung... 64	
3.3.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	64
3.3.1.2	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot).....	65
3.3.1.3	Antikörperfärbung des Western Blots und Detektion des Antikörpers... 66	

3.3.2	Affinitätsreinigung von MARV VP40-Antikörpern.....	67
3.3.3	Chemische Vernetzung (Crosslinking) von Proteinen.....	68
3.3.4	Endoglykosidase H- (Endo H-) Behandlung	69
3.3.5	Peptid-N-Glykosidase F- (PNGase F-) Behandlung	69
3.3.6	Lektinfärbung mit anschließendem Chemolumineszenztest	70
3.3.7	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	71
3.3.7.1	Immunfluoreszenzanalyse von intrazellulären Proteinen	71
3.3.7.2	Native Immunfluoreszenzanalyse von Oberflächenproteinen	72
3.3.8	Indirekte Immunelektronenmikroskopie	73
4	Ergebnisse.....	74
4.1	Charakterisierung von MARV GP Δ CD	74
4.1.1	Untersuchung der Coexpression von MARV VP40 und GP bzw. GP Δ CD ..	76
4.2	Analyse der Integration von MARV GP Δ CD in iVLPs	77
4.3	Analyse posttranslationaler Modifikationen des MARV GP bzw. GP Δ CD inkorporiert in iVLPs	78
4.3.1	Analyse des Oligomerisierungsstatus von MARV GP Δ CD in iVLPs	78
4.3.2	N- und O-Glykosylierungsmuster von MARV GP bzw. GP Δ CD.....	79
4.4	Untersuchung der iVLP Infektiosität	83
4.5	Charakterisierung von MARV GP Δ MLD	86
4.5.1	Untersuchung der N- und O-Glykosylierungsstruktur von GP Δ MLD	86
4.5.2	Charakterisierung von MARV GP Δ MLD einbauenden iVLPs	88
4.6	Etablierung eines Fusionsassays für virale Oberflächenproteine.....	90
4.7	Untersuchungen über den Einfluss der cytoplasmatischen Domäne von MARV GP auf den zellulären Eintritt von VLPs.....	93
4.7.1	Grundlagen des Aufnahmeassays	94
4.7.2	Etablierung eines Aufnahmeassays	95
4.7.3	Untersuchung der Aufnahme von VLPs	98
4.8	Einfluss der MARV GP Acylierung auf die Infektiosität von iVLPs	101
4.9	Untersuchung der Infektiosität von EBOV GP Δ CD integrierenden iVLPs ...	104
5	Diskussion.....	107
5.1	Intrazellulärer Transport von MARV GP	107
5.2	Zusammenbau MARV-spezifischer iVLPs.....	108
5.3	Modifikation der iVLP Infektiosität	110
5.3.1	Einfluss der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP	110
5.3.2	Einfluss der O-Glykosylierung des MARV GP	111
5.3.3	Einfluss der Acylierung des MARV GP	111
5.4	Strukturelle Veränderungen der MARV GP Ektodomäne durch Deletion	

	der cytoplasmatischen Domäne	113
5.4.1	Beeinflussung der durch MARV GP vermittelten Fusion.....	113
5.4.2	Anwendungsmöglichkeiten des etablierten Aufnahmeassays	115
6	Zusammenfassung.....	118
7	Literaturverzeichnis	119
8	Abkürzungsverzeichnis.....	136
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	140
10	Anhang	142

1 Einleitung

1.1 Taxonomie und Epidemiologie der Filoviren

Das Marburgvirus (MARV) bildet zusammen mit dem Ebolavirus (EBOV) die Familie der *Filoviridae*, welche ihren Namen der im Elektronenmikroskop erkennbaren charakteristischen fadenförmigen Erscheinung ihrer Vertreter verdankt (lat.: *filum* = der Faden) (Kiley et al., 1982). Da es sich hierbei um hochpathogene Erreger handelt, die sowohl bei menschlichen als auch nicht-menschlichen Primaten schwere, oft tödliche Erkrankungen mit einem hämorrhagischen Fieberverlauf verursachen und da keine virus-spezifische Therapie bzw. zugelassene Vakzine zur Verfügung steht, erfolgte ihre Einstufung in die höchste biologische Sicherheitsstufe L4 (BSL4).

Aufgrund ihres nichtsegmentierten, negativsträngigen RNA-Genoms bilden die Filoviren zusammen mit den Virusfamilien der *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* und *Bornaviridae* die Ordnung der *Mononegavirales*.

Ordnung	Familie	Genus	Spezies
Mononegavirales	Rhabdoviridae		
	Paramyxoviridae		
	Filoviridae	Marburg	Lake Victoria
		Ebola	Sudan
			Zaire
			Reston
			Bundibugyo
			Ivory Coast
	Bornaviridae		

Tabelle 1: Taxonomie der Filoviren

(in Anlehnung an van Regenmortel et al., 2000; Towner et al., 2008)

Der erste dokumentierte MARV-Ausbruch fand gleichzeitig in Frankfurt, Marburg und Belgrad statt (Siegert, 1967). Bei den betroffenen Personen handelte es sich um Labormitarbeiter und Tierpfleger, die mit Blutproben oder Organen von aus Uganda importierten Grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) in Berührung gekommen waren. Die Patienten entwickelten ein schweres hämorrhagisches Fieber, woran sieben der 32 Erkrankten verstarben. Es traten sechs Sekundärinfektionen mit einem mildereren Krankheitsverlauf auf. Der Krankheitserreger konnte wenig später in Marburg isoliert werden und wurde nach dem Ort der Isolation benannt.

Virus	Genus	Jahr	Ort	humane Krankheitsfälle (Todesfälle)
Marburg		1967	Deutschland/Jugoslawien	32 (7)
		1975	Zimbabwe	3 (1)
		1980	Kenia	2 (1)
		1987	Kenia	1 (1)
		1998-2000	Republik Kongo	154 (128)
		2004-5	Angola	422 (356)
		2007	Uganda	2 (1)
		2008	Uganda	1 (1)
Ebola	Sudan	1976	Sudan	284 (151)
	Zaire	1976	Zaire	318 (280)
	Zaire	1977	Zaire	1 (1)
	Sudan	1979	Sudan	34 (22)
	Reston	1989	USA	4 (0)
	Reston	1992	Philippinen	0
	Reston	1992	Italien	0
	Zaire	1994	Gabun	52 (31)
	Ivory Coast	1994	Elfenbeinküste	1 (0)
	Zaire	1995	Zaire	315 (250)
	Zaire	1996	Gabun	37 (21)
	Zaire	1996	Gabun	60 (45)
	Reston	1996	USA	0
	Sudan	2000-1	Uganda	423 (169)
	Zaire	2001-2	Gabun/Kongo	122 (110)
	Zaire	2003	Republik Kongo	143 (128)
	Zaire	2003-4	Republik Kongo	35 (29)
	Sudan	2004	Sudan	17 (7)
	Zaire	2005	Republik Kongo	12 (9)
	Zaire	2007	Demokratische Republik Kongo	260 (186)
	Bundibugyo	2007-8	Uganda	93 (22)
Zaire	2008-9	Demokratische Republik Kongo	32 (15)	
Reston	2009	Philippinen	0	

Tabelle 2: Gemeldete Fälle und Ausbrüche von humanen Marburg- und Ebolavirus Infektionen

Auflistung aller dokumentierten Fälle von 1967 bis 2009 (ohne Aufführung der EBOV Laborinfektionen [1996 Russland 1(1†); 2004 Russland 1(1†); 2004 USA 1(0†); 2009 Deutschland 1(0†)] (Amblard, 1997; Bertherat et al., 1999; Bowen 1980; CDC, 1989, 1995, 1996, 2005; Feldmann, 1996b; Johnson et al., 1977; Le Gueno, 1999; Normile, 2009; Towner et al., 2008; WHO, 1978, 1992, 1996, 2001, 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 2005, 2007, 2008, 2009a, 2009b))

Nach 1967 wurden drei weitere, einzelne Krankheitsfälle von MARV-Infektionen aus Zimbabwe (1975) und Kenia (1980, 1987) bekannt. Als Ausgangspunkt aller bisher

beschriebenen MARV-Infektionen wurde die Region um die ostafrikanischen Länder Kenia, Uganda und Zimbabwe eingegrenzt. Von Ende 1998 bis 2000 traten dann gehäuft Fälle von MARV-Infektionen im nordöstlichen Teil der Demokratischen Republik Kongo (ehemaliges Zaire) in der Nähe der Stadt Durba auf (Bertherat et al., 1999). Durch serologische Studien konnte gezeigt werden, dass die hier dokumentierten Fälle auf den Aufenthalt der infizierten Personen in einer nahe gelegenen Goldmine zurückgingen. Die während dieses Zeitraums wiederholt auftretenden Infektionen stellten dabei keine Mensch zu Mensch Transmissionen dar, sondern eine wiederholt auftretende Einbringung des Virus in die menschliche Population (Bausch et al., 2003, 2006). Die bisher größte durch MARV verursachte Epidemie fand von 2004-2005 in der Provinz Uige, Angola statt, bei der 422 infizierte Personen identifiziert und 356 Todesfälle dokumentiert wurden. Die Transmission erfolgte vor allem durch die Verwendung von kontaminierten Kanülen bei Injektionen in den lokalen Gesundheitseinrichtungen, Kliniken und bei Eigeninjektionen (Ndayimirije and Kindhauser, 2005; Towner et al., 2006). Sowohl der einzelne Krankheitsfall im Jahr 2007 in Uganda, als auch der aus Uganda in die Niederlande importierte Fall einer MARV-Infektion im Jahr 2008 standen in engem Zusammenhang mit Aufhalten in Höhlen, welche von großen Kolonien fruchtfressender Flughunde besiedelt werden; dabei ist besonders die bei Touristen beliebte „python cave“ im Maramagambo Wald („Queen Elizabeth“ Nationalpark, Westuganda) zu nennen (WHO, 2008).

Die ersten beschriebenen Epidemien, die durch das EBOV verursacht wurden, wurden 1976 beinahe zeitgleich aus Zaire und dem Sudan gemeldet (Bres, 1978). Dabei erkrankten mehrere hundert Menschen an einem schweren hämorrhagischen Fieber, wobei die Mortalitätsrate in Zaire bei 88 %, im Sudan bei 53 % lag. Das Virus wurde nach einem Fluss, der in der Nähe der Endemiegebiete verläuft, benannt (Johnson et al., 1977). Morphologisch konnte eine sehr hohe Ähnlichkeit zwischen EBOV und MARV festgestellt werden, eine Differenzierung war nur durch serologische Untersuchungen möglich (Bowen et al., 1977; Pattyn et al., 1977). Im Jahre 1989 konnte ein neuer EBOV Subtyp in Reston (Virginia/USA) aus nicht-menschlichen Affen (*Macaca fascicularis*) importiert von den Philippinen isoliert werden (Jahrling et al., 1990). Dieses als EBOV Reston bezeichnete Virus ist für Affen hochpathogen, beim Menschen hingegen wurden noch keine Infektionen mit schwerem Krankheitsverlauf dokumentiert (Jahrling et al., 1996; Miranda et al., 1999). Im Oktober 2000 wurde der erste Ausbruch von EBOV Sudan seit 1979 aus Gulu, Norduganda gemeldet, bei dem zwischen September 2000 und Januar 2001 423 Personen infiziert wurden, von denen 169 an der Erkrankung starben. Der letzte bisherige Ausbruch von EBOV Sudan wurde 2004 aus dem Südsudan berichtet, bei dem erneut 7 von 17 diagnostizierten Patienten verstarben. Aus der Republik Kongo wurden in den Jahren 2001-2005 immer wieder Ausbrüche von EBOV Zaire gemeldet, die teilweise eine hohe Mortalitätsrate aufwiesen und bei denen

häufig ein vorheriger Kontakt der Patienten mit gejagten Affen oder anderem Wild berichtet wurde. Neben weiteren Ausbrüchen von EBOV Zaire in der Demokratischen Republik Kongo (2007 und 2008-2009), konnte bei einem Ausbruch 2008 in dem Bezirk Bundibugyo, Westuganda eine neue Spezies des EBOV durch Sequenzvergleiche identifiziert werden, welcher nach dem Ort der Entdeckung EBOV Bundibugyo benannt wurde (Towner et al., 2008). Von den Philippinen wurde 2009 der erste dokumentierte Ausbruch von EBOV Reston in Schweinen berichtet, was zu einer Infektion von sechs Farmarbeitern führte, welche in engem Kontakt mit den infizierten Schweinen standen; menschliche Erkrankungen konnten nicht festgestellt werden (Normile, 2009).

Seroepidemiologische Studien belegen das endemische Vorkommen von Filoviren in dem zentralafrikanischen Raum, dem so genannten Ebola-Gürtel, der die Länder Sudan, Kenia, Zaire und Uganda bis zur Elfenbeinküste umfasst, wo Filovirus-spezifische Antikörper auch bei Personen nachgewiesen werden konnten, die nachweislich zu keiner Zeit klinische Symptome einer EBOV-Infektion zeigten (Slenzcka, 1984). Allerdings konnte gezeigt werden, dass auch eine hohe Seroprävalenz in Gegenden außerhalb des beschriebenen Ebola-Gürtels nachgewiesen werden kann, in der jedoch keine filoviralen Infektionen vorkamen, so dass angenommen wird, dass Filoviren oder Filovirus-verwandte Viren in weiten Teilen Afrikas endemisch vorkommen (Feldmann et al., 2003; Gonzalez et al., 2005; Leroy et al., 2004).

Das natürliche Reservoir von Filoviren konnte trotz ausgedehnter Untersuchungen bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Zwar spielen Affen bei der Verbreitung der Viren oft eine wichtige Rolle (z. B. direkter Kontakt von Indexpatienten mit Gorillas und Schimpansen bzw. deren Kadavern [Gabun, 1996; Kongo, 2001]), doch können sie als das Reservoir der Viren nahezu ausgeschlossen werden, da experimentell infizierte Affen ausnahmslos an der Infektion versterben (Fisher-Hoch et al., 1992; Ryabchikova et al., 1999; Simpson, 1977). Als potentielle Wirte kommen vielmehr Flughunde in Betracht: Untersuchungen haben gezeigt, dass Fledermäuse nach einer Infektion das Virus mit ihrem Kot ausscheiden können. Da sie aber selbst keinerlei Krankheitssymptome zeigen, könnten sie den natürlichen Wirt der Filoviren darstellen (Swanepoel et al., 1996), was durch die Hinweise auf asymptomatische Infektionen durch MARV und EBOV in verschiedenen Flughundspezies (MARV: *Rousettus aegyptiacus*; EBOV: *Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti*, *Myonycteris torquata*) bestätigt werden konnte (Leroy et al., 2005; Pourrut et al., 2007; Swanepoel et al., 2007; Towner et al., 2007). Eine direkte Verbindung zwischen dem Indexpatienten eines schweren EBOV Ausbruchs und fruchtfressenden Flughunden konnte bei dem Ausbruch in der Demokratischen Republik Kongo, 2007 gezeigt werden: die Flughunde wurden dort als Nahrung verzehrt, womit ein enger Kontakt zum Menschen, welcher für eine Infektion mit Filoviren erforderlich ist, hergestellt war (Leroy et al., 2009). Obwohl bei vielen anderen

filoviralen Ausbrüchen die Infektionsquelle des Indexfalles nicht geklärt werden konnte, ist oftmals der Kontakt (Jagen, Nahrungszubereitung) mit durch Filoviren infizierbaren Tieren berichtet worden (z.B. Flughunde, Gorillas, Antilopen oder Schimpansen; Feldmann et al., 2003; Leroy et al., 2004). Die Mensch zu Mensch Transmission findet durch kontaminierte Körperflüssigkeiten, wie Speichel, Blut oder Sperma statt, wobei als Eintrittspforte in den Körper kleine Haut- und Schleimhautläsionen dienen (Simpson, 1977). Eine Verbreitung über Aerosole wurde diskutiert (Johnson et al., 1995), scheint aber bei bisher bekannt gewordenen Epidemien keine Rolle zu spielen, da die Transmission über den Respirations-trakt nicht effizient genug verläuft (Pokhodiaev et al., 1991). Zu den am meisten gefährdeten Personen gehören damit nahe Angehörige, Pflegepersonal in Krankenhäusern und, vor allem bei der Durchführung von Begräbnisriten, das Bestattungspersonal.

1.2 Klinik und Pathogenese der MARV-Infektion

Das MARV verursacht beim Menschen und bei nicht-menschlichen Affen ein schweres hämorrhagisches Fieber. Die Krankheit beginnt nach einer Inkubationszeit von drei bis neun Tagen mit ausgeprägten Kopf- und Gliederschmerzen, hohem Fieber und schwerem Krankheitsgefühl, gefolgt von gastrointestinalen Störungen wie Erbrechen und wässriger Diarrhöe (Bwaka et al., 1999; Formenty et al., 1999; Martini, 1968; Sureau, 1989). Zu Beginn der akuten Infektion kann es zu neurologischen Begleiterscheinungen wie Verwirrtheit oder Bewusstlosigkeit kommen. In der ersten Krankheitswoche entwickelt sich häufig ein charakteristisches Exanthem, das nach Abklingen in eine Hautschuppung übergeht. Während des Krankheitsverlaufes kann ein starker Abfall der Thrombozytenkonzentration im Blut nachgewiesen werden. Dies resultiert in einer reduzierten Koagulation, was wiederum mit der hämorrhagischen Diathese (Blutungen des Gaumens, der Nasenschleimhaut und des Gastrointestinaltrakts) korreliert; dabei ist der Verlauf der Erkrankung abhängig von dem Ausmaß der Hämorrhagien. Zwischen dem achten und zehnten Krankheitstag kann infolge Multiorganversagens und einer schweren hämorrhagischen Diathese, die mit einem hypovolämischen Schock einhergeht, der Tod eintreten. Während des Ausbruchs 1967 in Marburg betrug die Letalitätsrate 25 %, diese kann jedoch besonders in Entwicklungsländern aufgrund schlechter medizinischer Grundversorgung und einem allgemein schlechteren Gesundheitszustand der Patienten sehr viel höher liegen.

Die Ausbreitung des Virus im Körper beginnt damit, dass die Viren nach dem Eintritt in den Organismus über Hautläsionen zunächst in die lokalen Lymphknoten transportiert werden und dort ihre primären Zielzellen des monozytären phagozytischen Systems, vor allem Makrophagen bzw. Dendritische Zellen, infizieren (Feldmann, 1996b; Schnittler and Feldmann, 1998; Stroher et al., 2001). Diese sind auch im infizierten Zustand in der Lage, im Blutgefäß- und lymphatischen System zu zirkulieren und neues Gewebe zu penetrieren.

Monozyten bzw. Makrophagen scheinen damit für die Ausbreitung der Viren im Organismus essentiell zu sein. Die Verbreitung des Virus über infizierte Monozyten manifestiert sich im Verlauf einer MARV-Infektion histopathologisch in ausgeprägten Nekrosen fast aller inneren Organe (zunächst Lymphknoten, Milz, Leber, später Nieren und Lunge), was letztendlich zu dem bereits erwähnten Multiorganversagen führt (Feldmann et al., 1996a; Rippey et al., 1984; Zaki, 1997).

Für den während des Krankheitsverlaufs auftretenden hypovolämischen Schock scheint die erhöhte Durchlässigkeit der Endothelien verantwortlich zu sein, die mit fatalen Krankheitsverläufen einhergeht. Dabei wird davon ausgegangen, dass Endothelzellen zwar eine filovirale Replikation *in vitro* propagieren können (Geisbert et al., 2003c; Harcourt et al., 1999), allerdings gelten sie nicht als primäre Zielzellen, sondern sind erst in späten Phasen des Infektionsverlaufs betroffen. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass infizierte Makrophagen eine erhöhte Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen zeigen, darunter der Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) (Stroher et al., 2001; Villinger et al., 1999). TNF α gilt als möglicher Auslöser des oben erwähnten Schocks, da er die Permeabilität der Endothelien erhöhen kann bzw. das Endothelium seine Funktion als zelluläre Barriere verliert (Feldmann et al., 1996a; Wahl-Jensen et al., 2005), ohne dass eine direkte Infektion der Endothelzellen vorliegen muss (Schnittler and Feldmann, 1999; Strieter et al., 1993). Weiterhin induziert TNF α die Expression des Gerinnungsfaktors Thromboplastin in Makrophagen bzw. Endothelzellen und reduziert gleichzeitig die Expression des Antikoagulans Thrombomodulin (Geisbert et al., 2003b; Szotowski et al., 2005). Gesteigerte Mengen an Thromboplastin verursachen die Entwicklung einer disseminierten intravasalen Koagulation (DIC), welche durch die systemische Aktivierung des Blut-Koagulations-Systems mit Fibrinablagerungen und Thromben charakterisiert wird (Levi, 2004).

Die humorale Antwort des Immunsystems auf eine MARV-Infektion ist verzögert und bleibt in den tödlich verlaufenden Fällen ganz aus (Baize et al., 1999). Dies ist möglicherweise auf die massive Infektion von Zellen des monozytär phagozytotischen Systems, sowie eine Lymphozytendepletion zurückzuführen (Ksiazek et al., 1999). Vor allem Dendritische Zellen können ihre Aufgabe in der Immunantwort nicht mehr ausfüllen: die Synthese proinflammatorischer Cytokine sowie der für die T-Zellproliferation benötigten costimulativen Moleküle CD80 und CD86 ist stark eingeschränkt (Bosio et al., 2003; Mahanty et al., 2003). In fatalen Krankheitsverläufen können nur bei 30 % der Patienten spezifische IgMs und gar keine IgGs detektiert werden, wohingegen in nicht fatal verlaufenden Infektionen spezifische IgMs bereits zwei Tage und spezifische IgGs 5 bis 8 Tage nach Krankheitsbeginn nachgewiesen werden konnten (Baize et al., 1999; Ksiazek et al., 1999; Sanchez et al., 2004).

Bis heute sind weder eine spezifische Therapie noch eine zugelassene Vakzine gegen MARV oder EBOV verfügbar, so dass nur eine intensivmedizinische, symptombezogene Therapie

des hämorrhagischen Schocks erfolgt (Feldmann et al., 2005). Die Gabe von Rekonvaleszentenserum, equiner α -EBOV Immunglobuline und Interferon wurden in der Therapie humaner Filovirusinfektionen eingesetzt, ihre Effizienz ist aber bisher nicht einwandfrei belegt (Bray and Paragas, 2002; Bray and Pilch, 2006; Mupapa et al., 1999). Der Einsatz eines rekombinant hergestellten Inhibitors des Gewebefaktors VIIa (rekombinant Nematode Anticoagulant Protein c2, rNAPc2) bei einer für Makaken letalen EBOV Infektion, ließ deren Überlebensrate von 0 % auf 33 % steigen (Geisbert et al., 2003a, 2004, 2007).

Die Prävention einer Mensch zu Mensch Transmission beschränkt sich vor allem auf Hygienemaßnahmen und Isolierung infizierter Personen zur Unterbrechung der Infektionskette. Sowohl für das MARV als auch für das EBOV konnten im Tiermodell mit neu entwickelten Impfstoffen erste Erfolge erzielt werden. Klassische Impfstrategien mit abgetöteten Viren zeigten zwar teilweise Erfolge im Meerschweinchen- aber nicht im Affen-Modell (Geisbert et al., 2002; Hevey et al., 2001; Reed and Mohamadzadeh, 2007). Virus-ähnliche Partikel (VLPs), die bei Coexpression von VP40 und GP gebildet werden, wurden als Vakzine sowohl in Meerschweinchen als auch in Affen getestet, die dadurch bei einer Infektion mit MARV oder EBOV geschützt waren (Sun et al., 2009; Swenson et al., 2005; Warfield et al., 2004, 2007). Auch der Einsatz rekombinant hergestellter replikations-kompetenter oder auch -defizienter Vakzinen, welche GP alleine oder in Kombination mit NP und VP40 exprimierten, scheint erfolgreich zu sein (Bukreyev et al., 2006, 2007, 2009; Geisbert et al., 2002, 2008a, 2008b, 2009; Halfmann et al., 2009; Hevey et al., 1998; Jones et al., 2005, 2007; Mellquist-Riemenschneider et al., 2003; Rao et al., 2002; Riemenschneider et al., 2003; Sullivan et al., 2000, 2006; Swenson et al., 2008a, 2008b; Wang et al., 2006a, 2006b). Als besonders aussichtsreich gelten dabei eine replikations-kompetente Vakzine, beruhend auf einem rekombinanten Vesikulären Stomatitis Virus (VSV), als auch eine replikations-defiziente Vakzine beruhend auf einem Adenovirus-basierten Vektor, welche die Oberflächenproteine von MARV oder EBOV inkorporieren bzw. exprimieren. Mittels der VSV-basierten Vakzine konnte in nicht-menschlichen Affen (*Macaca fascicularis*) durch eine einzige Immunisierung eine Immunantwort verursacht werden, die einen vollständigen Schutz vor einer Virusinfektion zur Folge hatte (Geisbert et al., 2008a, 2008b, 2009; Jones et al., 2005, 2007; Qiu et al., 2009). Erstaunlicherweise war selbst eine therapeutische Immunisierung bis zu einer halben Stunde nach der MARV-Infektion für diesen Impfstoffkandidaten erfolgreich (Feldmann et al., 2007; Geisbert et al., 2008c; Jones et al., 2005). Auch bei der replikations-defizienten Vakzine, welche auf einem Adenovirus-basierten Vektor beruht und MARV bzw. EBOV GP exprimiert, konnte durch eine einzelne Immunisierung von Mäusen, Meerschweinchen oder nicht-menschlichen Affen ein Schutz gegenüber einer tödlichen Infektion induziert werden (Sullivan et al., 2000, 2006; Wang et al., 2006a, 2006b). Dieser konnte in Mäusen ähnlich wie die VSV-basierte Vakzine auch

therapeutisch angewandt werden: bis zu einer halben Stunde nach einer EBOV-Infektion konnte ein vollständiger Schutz gezeigt werden (Richardson et al., 2009).

Trotz all dieser Ansätze ist eine Impfung für Menschen zurzeit nicht verfügbar und wäre auch schwierig einsetzbar, da man aufgrund fehlender Informationen über den eigentlichen Wirtsorganismus die gefährdete und damit zu impfende Population nicht eingrenzen kann. Allerdings wäre eine Impfung für Laborpersonal oder Personen, die mit Infizierten in engem Kontakt stehen, äußerst wünschenswert.

1.3 Morphologie des Marburgvirus

Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen können neben für MARV charakteristischen filamentösen Partikeln auch gebogene und zirkuläre Strukturen entdeckt werden (Feldman et al., 1993; Feldmann and Kiley, 1999). Während der Durchmesser von 80 nm bei allen untersuchten MARV-Partikeln konstant ist, ist die Länge der Partikel variabel; es kommen Partikel vor, die bis zu 1400 nm lang sind (Feldmann et al., 1993; Feldmann and Kiley, 1999). Aufgebaut sind die Virionen aus sieben Strukturproteinen, wobei das einzige Oberflächenprotein GP in der Hüllmembran als Homotrimer vorliegt (Feldmann et al., 1991).

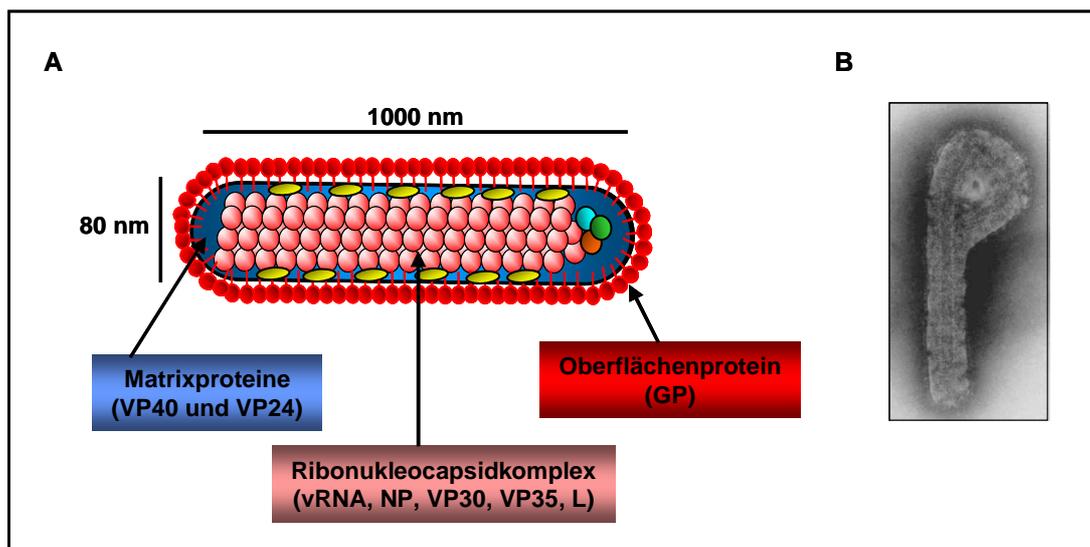


Abbildung 1: Morphologie des Marburgvirus

(A) Schematische Darstellung eines MARV-Partikels (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines MARV. Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure. Zur Verfügung gestellt von Dr. L. Kolesnikova.

Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau (A) und eine elektronenmikroskopische Aufnahme (B) von MARV-Partikeln. Im Inneren des Partikels liegt das helikale Nukleocapsid bzw. der Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex, welcher aus der viralen RNA (vRNA) und den Proteinen NP, VP30, VP35 und L aufgebaut ist. Die Verbindung zwischen dem RNP-Komplex und der Hüllmembran wird von den beiden Matrixproteinen VP40 und VP24

vermittelt (Bamberg et al., 2005; Becker et al., 1998; Han et al., 2003; Kiley et al., 1988; Noda et al., 2002).

1.4 Genomstruktur des Marburgvirus

Das MARV besitzt ein einzelsträngiges, nichtsegmentiertes RNA-Genom negativer Polarität, mit einer Länge von 19,1 kb. Die genomische RNA, welche selbst nicht infektiös ist, enthält sieben offene Leserahmen, die für die viralen Strukturproteine kodieren (Abb. 2).

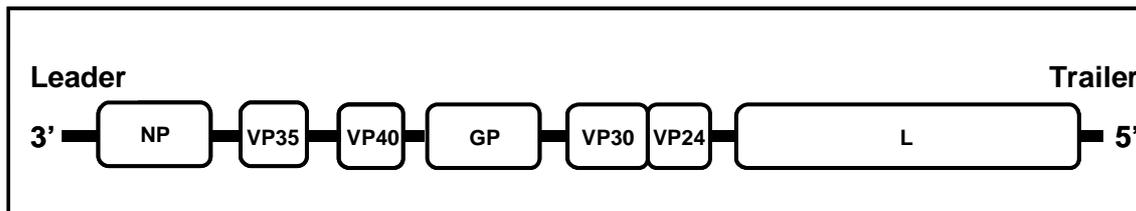


Abbildung 2: Genomstruktur des Marburgvirus

Ausgehend von dem nichtcodierenden 3' Leader werden auf der vRNA die Proteine NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24 und L codiert, gefolgt von der 5' Trailerregion. Zwischen den einzelnen Genen befinden sich nicht-transkribierende intergenische Sequenzen, die zwischen VP30 und VP24 überlappen.

Das Genom wird am 3' und 5' Ende von nicht-translatierten Sequenzen flankiert (3' Leader und 5' Trailer), welche Signale zur Initiation der Replikation und der Enkapsidierung des Genoms durch das Nukleoprotein NP beinhalten (Muhlberger et al., 1996, 1998). Die offenen Leserahmen der einzelnen Gene sind von nichttranslatierten Sequenzen, den intergenischen Regionen begrenzt, welche zwischen VP30 und VP24 überlappen und hochkonservierte Signale für Transkriptionsstart und -stopp beinhalten (Abb. 2; Feldmann et al., 1992; Muhlberger et al., 1996; Sanchez et al., 1993; Weik et al., 2005).

1.5 Die viralen Strukturproteine

NP Das Nukleoprotein (NP) ist das Produkt des ersten Gens und umfasst bei einem Molekulargewicht von 94 kDa 695 Aminosäuren (AS). Es ist die Hauptkomponente des Nukleocapsidkomplexes, enkapsidiert die vRNA und spielt eine zentrale Rolle sowohl bei Replikation und Transkription, als auch beim Zusammenbau nativer Viren (Becker et al., 1998; Kolesnikova et al., 2000; Mavrakis et al., 2002; Muhlberger et al., 1998). NP ist aus zwei distinkten Domänen aufgebaut: einer hydrophilen Carboxy (C)-terminalen und einer hydrophoben Amino (N)-terminalen Domäne, wobei der N-Terminus Sequenzhomologien zu den Nukleoproteinen anderer *Mononegavirales* aufweist, während der C-Terminus eine hohe Variabilität zeigt (Sanchez et al., 1992). Zusätzlich wird das Protein an Serin- und Threoninresten der C-terminalen Domäne stark phosphoryliert, wobei die Funktion der Phosphorylierungen momentan noch nicht geklärt ist (Lotfering et al., 1999). Dabei liegt NP in Virus-infizierten Zellen in phosphorylierter (94 kDa) als auch nicht-phosphorylierter Form

(92 kDa) vor, wird aber in das Virus nur in seiner phosphorylierten Form eingebaut (Becker et al., 1994). Bei rekombinanter Expression oder in MARV-infizierten Zellen akkumuliert NP in im Cytoplasma lokalisierten Einschlusskörpern (inclusion bodies), in denen auch die mit ihm interagierenden Nukleocapsidproteine VP35 und VP30 akkumulieren (Becker et al., 1998). Es wird angenommen, dass in diesen Einschlusskörpern der Zusammenbau und die Reifung der Nukleocapsidkomplexe stattfinden.

VP35 Das Strukturprotein VP35 besteht aus 329 AS und besitzt ein Molekulargewicht von 35 kDa. Es interagiert mit NP und L, wirkt als Cofaktor der RNA-abhängigen RNA-Polymerase L und wird, trotz seiner vergleichsweise schwachen Phosphorylierung, als Analogon zu den Phosphoproteinen der *Rhabdo-* und *Paramyxoviridae* angesehen (Becker et al., 1998; Muhlberger et al., 1998, 1999). Das VP35 besitzt eine essentielle Rolle bei der viralen Transkription und Replikation (Muhlberger et al., 1998), wofür die Homooligomerisierung des Proteins vermittelt über ein intrinsisches „coiled-coil“ Motiv notwendig zu sein scheint (Moller et al., 2005). Neben seiner Funktion als viraler Cofaktor kann VP35 zusammen mit VP40 die Inkorporation viraler RNA in VLPs vermitteln (Johnson et al., 2006a, 2006b). Filovirales VP35 fungiert außerdem als Typ I Interferonantagonist und gibt so dem Virus die Möglichkeit, die zellulären Abwehrmechanismen zu umgehen (Basler et al., 2000; Cardenas et al., 2006). Dabei inhibiert es die Aktivierung des Interferon Regulatorischen Faktors 3 (IRF-3) und der RNA-abhängigen Proteinkinase R (PKR), beides Schlüsselkomponenten für die Induktion der frühen antiviralen bzw. Interferon (IFN)-induzierten Immunantwort (Basler et al., 2003; Feng et al., 2007; Hartman et al., 2008; Prins et al., 2009; Schumann et al., 2009). Die Inhibition der Interferon-vermittelten Immunantwort stellt einen wichtigen Auslöser für die hohe Pathogenität von Filoviren dar.

VP40 VP40, das im Virion neben dem NP mengenmäßig am stärksten vertretene Protein der Filoviren, besteht aus 303 AS (Elliott et al., 1985). In einer denaturierenden SDS-PAGE kann es als eine Doppelbande mit Molekulargewichten von 37 und 39 kDa detektiert werden, wobei es sich bei der größeren Form um eine posttranslational phosphorylierte Form handelt (L. Kolesnikova, persönliche Mitteilung). Auf Grund seiner Position an dritter Stelle im Genom, seiner Lokalisation im Virus zwischen Nukleocapsid und Membranhülle und seines hydrophoben Profils wird VP40 als funktionshomolog zu den Matrixproteinen anderer *Mononegavirales* betrachtet (Becker et al., 1998; Bukreyev et al., 1993; Elliott et al., 1985); allerdings zeigt VP40 mit diesen keinerlei Sequenz- bzw. Strukturhomologie (Timmins et al., 2004). Den Matrixproteinen wird sowohl bei dem Zusammenbau der Viren (assembly), als auch bei der Abschnürung und Freisetzung der Viren (budding) eine essentielle Rolle zugesprochen. Untersuchungen zur Membranassoziation ergaben, dass es sich bei VP40

um ein peripheres Membranprotein handelt, das schon sehr früh nach seiner Translation im Cytoplasma mit zellulären Membranen assoziiert (Kolesnikova et al., 2002; Ruigrok et al., 2000). Durch Aufklärung der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass EBOV VP40 aus zwei über einen flexiblen Linker verbundene distinkte Domänen aufgebaut ist: N-terminale Bereiche werden für die Oligomerisierung des Proteins benötigt (Gomis-Ruth et al., 2003; McCarthy et al., 2007; Scianimanico et al., 2000; Timmins et al., 2003), wohingegen der hydrophobe C-Terminus des VP40 die Interaktion mit der Lipidmembran vermittelt (Dessen et al., 2000a, 2000b; Jasenosky et al., 2001).

Für VP40 des MARV konnte gezeigt werden, dass es mit multivesikulären Membranen des späten Endosoms, so genannten „multi vesicular bodies“ (MVB) interagiert, was schließlich zu einer Anreicherung von VP40 in MVB führt (Kolesnikova et al., 2002, 2004b, 2009). Das späte Endosom stellt dabei eine Zwischenstation für den Transport von VP40 an die Oberfläche von infizierten oder transfizierten Zellen dar, wobei die von VP40 verwendete Route als später retrograder endosomaler Transportweg bezeichnet wird. Aufgrund neuer Studien wird angenommen, dass die filoviralen Matrixproteine während ihres Wegs zur Plasmamembran eine Abhängigkeit von dem COP II-Transportweg, welcher den Transport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat vermittelt, aufweisen (Yamayoshi et al., 2008); dabei konnte für EBOV VP40 eine direkte Interaktion mit einer Komponente des COP II-Komplexes, Sec24C, nachgewiesen werden. Eine Coexpression von MARV VP40 mit dem viralen Oberflächenprotein GP induziert eine Umverteilung von GP in die mit VP40 angereicherten MVB, was eine Rolle der MVB als Schnittstelle für den von GP genutzten klassischen sekretorischen Transportweg und den von VP40 genutzten späten retrograden endosomalen Transportweg nahe legt (Kolesnikova et al., 2004a, 2004b; Mittler et al., 2007)

Des Weiteren ist VP40 in der Lage, seine Freisetzung von der Zelloberfläche in Form von Virus-ähnlichen Partikeln („virus-like particles“, VLPs) zu induzieren, die hinsichtlich ihrer Morphologie eine starke Ähnlichkeit zu Virionen zeigen. Eine Coexpression mit GP führt zum Einbau des viralen Oberflächenproteins in die filamentösen VLPs, wobei seitens des GP die Transmembrandomäne diesen Einbau induziert (Kolesnikova et al., 2004b; Mittler et al., 2007; Noda et al., 2002; Swenson et al., 2004; Timmins et al., 2001).

Für die VP40-induzierte Ausbildung von VLPs wurde eine wichtige Rolle für intrinsische prolin-reiche Motive, so genannte Late-Domain-Motive postuliert, wobei für MARV VP40 ein N-terminal lokalisiertes PPPY-Motiv identifiziert werden konnte. Über die Late-Domain-Motive interagieren Matrixproteine, wie EBOV und MARV VP40, mit ESCRT („endosomal sorting complexes required for transport“)-Proteinen der Wirtszelle. Im zellulären Kontext akkumulieren diese meist löslichen Proteine an Membranen und induzieren die Ausbildung intraluminaler Vesikel an der Plasma- bzw. endosomalen Membran (Katzmann et al., 2002;

Odorizzi et al., 1998). Es wird angenommen, dass die Ausbildung von intraluminalen Vesikeln in MVB und die Knospung von Viren morphologisch analoge Vorgänge sind. Eine effiziente Nutzung des ESCRT-Systems konnte für MARV VP40 gezeigt werden, da einerseits das PPPY-Motiv, welches eine Interaktion mit der Ubiquitin Ligase Nedd4 vermitteln kann, und andererseits die Aktivität von Tsg101 (Tumor suppressor gene 101, Bestandteil des ESCRT-I-Komplexes) für die Ausschleusung von VP40-induzierten VLPs essentiell sind (Urata et al., 2007). Zusätzlich kann durch Inhibition des Recyclings der ESCRT-Komponenten durch Verwendung einer dominant negativen VPS4-Mutante eine starke Reduktion der VLP- als auch der Virusfreisetzung verursacht werden (Kolesnikova et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Tsg101, Nedd4 und VPS4 in der Wirtszelle bei der Sortierung von Proteinen im endosomalen Stoffwechselweg und bei der Abschnürung von Vesikeln in das Innere der MVB eine wichtige Rolle spielen. Für die beiden überlappenden Late-Domain-Motive PTAP und PPxY des EBOV VP40 konnte gezeigt werden, dass sie mit Tsg101 und Nedd4 interagieren können (Harty et al., 2000; Jasenosky et al., 2001; Licata et al., 2003; Martin-Serrano et al., 2001, 2004; Timmins et al., 2003). Zwar führt die Mutation dieser Late-Domain-Motive zu einer starken Reduktion der Produktion von VLPs, allerdings konnte in einem rekombinanten EBOV System gezeigt werden, dass die Deletion der Motive eine effiziente Replikation und das Assembly der Viren nicht beeinflussen (Neumann et al., 2005). Diese Befunde deuten alle darauf hin, dass Filoviren das ESCRT-System für ihre Freisetzung ausnutzen. Zusätzlich muss es allerdings auch noch andere, ESCRT-unabhängige Prozesse geben, die die Abschnürung filoviraler Partikel ermöglichen.

In Virus-infizierten Zellen assoziiert VP40 mit perinukleären Nukleocapsidstrukturen bzw. zeigt eine Colokalisation mit NP-induzierten Inklusionen (Geisbert and Jahrling, 1995; Kolesnikova et al., 2002; Noda et al., 2006). In neueren Studien konnte eine führende Rolle des VP40 für die Sortierung der Nukleocapside von perinukleären Regionen an die Plasmamembran gezeigt werden (Dolnik et al., 2008; Noda et al., 2006). Sowohl für den intrazellulären Transport von mit MARV VP40-angereicherten Membranen, als auch für den VP40-vermittelten Transport von Nukleocapsiden scheint das Cytoskelett eine wichtige Rolle zu spielen. Eine Depolymerisierung von Aktin führte zu einem stark verminderten Transport von VP40 in die Zellperipherie, sowie zu einer reduzierten Freisetzung VP40-induzierter VLPs (Kolesnikova et al., 2004a, 2007a); Mikrotubuli hingegen scheinen für den Transport des VP40 keine Aufgabe wahrzunehmen. Während der Freisetzung von VP40-induzierten VLPs bzw. nativen MARV-Partikeln konnten sowohl Nukleocapside als auch Vorläufer der Virusmembranen in Assoziation mit parallel verlaufenden Aktinbündeln in Filopodien beobachtet werden. Eine Inhibition der Aktinpolymerisierung in MARV-infizierten Zellen verursachte eine starke Reduktion der Virusfreisetzung. VP40, welches eine Interaktion mit

Nukleocapsiden vermitteln kann, stellt damit eine Verbindung zwischen Filopodien und Nukleocapsiden dar (Kolesnikova et al., 2007a). Der Transport des EBOV VP40 erfolgte sowohl Aktin- als auch Mikrotubuli-vermittelt (Han and Harty, 2005; Noda et al., 2006; Ruthel et al., 2005).

Untersuchungen in polarisierten Zellen, wie z.B. Hepatozyten, haben gezeigt, dass MARV von der basolateralen Membran freigesetzt wird (Sanger et al., 2001), was in einem infektiösen System zur Zirkulation von infektiösen Partikeln im Gefäßsystem führt. Das Zusammenbau der Partikel bzw. VLPs an der basolateralen Membran wird dabei durch VP40 orchestriert, was auch zu einer Umverteilung des charakteristisch an der apikalen Membran lokalisierten GP an die basolaterale Membran führt (Kolesnikova et al., 2007b).

GP Als ein klassisches Typ I Transmembranprotein ist das einzige filovirale Oberflächenprotein GP aus 681 AS aufgebaut und wird wie in Abbildung 3 erkennbar in drei Domänen untergliedert: Ektodomäne (ED, 643 AS), Transmembrandomäne (TMD, 30 AS) und cytoplasmatische Domäne (CD, 8 AS).

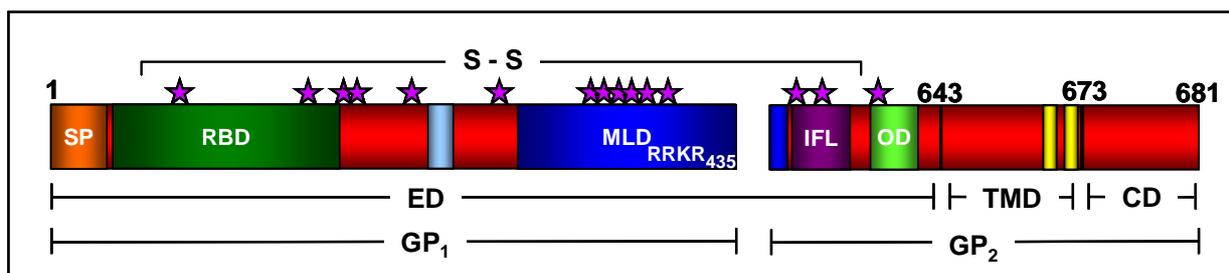


Abbildung 3: Aufbau des MARV Glykoproteins

Innerhalb des MARV GP findet man ausgehend vom N-Terminus folgende Domänen: AS 1-33 Signalpeptid (SP), AS 38-188 Rezeptorbindende Domäne (RBD), AS 260-273 Phosphorylierungsstellen, AS 289-501 Mucin-ähnliche Domäne („mucin-like domain“, MLD), AS 511-554 interne Fusionsschleife (IFL), AS 584-599 Oligomerisierungsdomäne (OD), AS 671+673 Acylierungsstellen. Zusätzlich fasst man die AS 1-642 zur Ektodomäne (ED), die AS 643-673 zur Transmembrandomäne (TMD) und die AS 674-681 zur cytoplasmatischen Domäne (CD) zusammen. Das Vorläuferprotein des Glykoproteins GP₀ wird durch Furin C-terminal der AS 435 in GP₁ und GP₂ gespalten, welche über eine durch Cysteine (S) vermittelte Disulfidbrücke kovalent verbunden bleiben. Die Spaltstellen der endosomalen Cathepsine wurden nicht in das Schema integriert, da diese bisher nur für EBOV GP experimentell nachgewiesen werden konnten. Die Sterne repräsentieren N-Glykosylierungsstellen.

Das MARV Glykoprotein GP wird von einem einzigen offenen Leserahmen codiert (Will et al., 1993), wohingegen für das EBOV GP zur Expression des membrangebundenen GP ein RNA-Editing benötigt wird (Sanchez et al., 1996; Volchkov et al., 1995). Das Glykoprotein wird cotranslational über seine TMD in die Membran des rauhen ERs inseriert, wobei der hydrophobe N-Terminus als Signalpeptid (SP) durch eine im Lumen des rauhen ERs liegende Signalpeptidase abgespalten wird (Will et al., 1993). Während seines Transports entlang des klassischen sekretorischen Transportwegs wird die ED des Glykoproteins durch die Anheftung von Glykanen stark modifiziert. Während der Translation ins Lumen des ERs werden Zuckerseitenketten vom mannosereichen Typ N-glykosidisch an Asparaginreste der

wachsenden AS-Kette angehängt. Dabei bildet sich die unreife so genannte ER-Form des GP (preGP_{ER}, 140 kDa), welche an ihrer Sensitivität gegenüber der Endoglykosidase H (Endo H) zu erkennen ist (Becker et al., 1996). Auf dem Weg durch den Golgi-Apparat werden zunächst Mannosereste von den N-glykosidisch gebundenen Zuckern abgespalten und durch Acetylglukosamin- und Galaktosereste ersetzt. Die entstandenen nun als komplex bezeichneten Kohlenhydratstrukturen sind an ihrer Resistenz gegenüber Endo H erkennbar (Becker et al., 1996). Zusätzlich werden im Golgi-Apparat Zuckerseitenketten O-glykosidisch an Serin- und Threoninreste angehängt, wobei diese sich in der so genannten Mucin-ähnlichen Domäne (MLD) des GP konzentrieren (Feldmann et al., 1991; Geyer et al., 1992). Auf dem Transport durch das ER lagern sich die GP-Monomere vermittelt über die postulierte Oligomerisierungsdomäne (OD) zu Trimeren zusammen (Feldmann et al., 1991). Durch die Aktivität zellulärer Acyltransferasen werden bei dem Übergang vom ER zum Golgi-Apparat zwei unter den filoviralen Glykoproteinen konservierte Cysteine im C-terminalen Bereich der TMD acyliert, wobei bevorzugt Palmitin- aber auch Myristin- und Stearinsäureketten angehängt werden (Funke et al., 1995). Eine vergleichbare Acylierung von Transmembran-ständigen Cysteinen konnte im EBOV GP von Ito et al. bestätigt werden (Ito et al., 2001). Der Acylierung wird eine für GP stabilisierende Funktion in der Membran zugeschrieben, allerdings konnte diese experimentell noch nicht direkt bestätigt werden. Damit einhergehend wurde eine Interaktion der Acylreste von EBOV GP mit Cholesterolreichen Mikrodomänen in Membranen (so genannten „lipid rafts“) postuliert, was zu einer Anreicherung des GP in diesen Domänen führt und für die Freisetzung von Viren von Bedeutung sein soll (Bavari et al., 2002). Neben der Acylierung und Glykosylierung wird das MARV GP im Golgi-Apparat an Serinresten seiner ED phosphoryliert, wobei die Funktion dieser Modifikation noch nicht bekannt ist (Sanger et al., 2002).

Im Trans Golgi Netzwerk (TGN) wird GP durch die Prohormonkonvertase Furin gespalten, wobei die beiden entstandenen Fragmente über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden bleiben: GP₁ (ED) besitzt ein Molekulargewicht von 170 kDa, GP₂ (Membrananker und CD) eine Größe von 46 kDa (Volchkov et al., 1998, 2000b). Lange Zeit nahm man an, dass diese Furinspaltung essentiell ist für die Aktivierung der in GP₂ lokalisierten internen Fusionsdomäne (IFL; Weissenhorn et al., 1998a, 1998b). Allerdings konnte mit einem EBOV-spezifischen reversen Genetiksystem gezeigt werden, dass trotz Mutation der Furinerkennungssequenz eine zwar verlangsamte aber effiziente Replikation und Partikelfreisetzung stattfand (Neumann et al., 2002). Aufgrund neuer Studien wird angenommen, dass die Fähigkeit des GP eine Fusion zu vermitteln nicht durch die Spaltung mittels Furin induziert wird. Stattdessen wird vermutet, dass nach Rezeptor-vermittelter Endozytose des Virus die Glykoproteine durch die Aktivität endosomaler Cysteinproteasen so genannten Cathepsinen (besonders Cathepsin B und L) zu einer fusionskompetenten Form abgebaut

werden. Die Reduktion der zellulären Expression endosomaler Cathepsine mittels RNA-Interferenz bzw. spezifischer Inhibitoren führte zu einer stark verminderten Freisetzung infektiöser EBOV-Partikel oder mit EBOV GP pseudotypisierter VSV oder HIV-Partikel (Chandran et al., 2005; Kaletsky et al., 2007; Schornberg et al., 2006, 2009). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass EBOV GP durch die Cathepsine B und L gespalten werden kann, wodurch ein 19 kDa umfassendes GP_{1,2}-Fragment (AS 33-190 des GP₁ über eine Disulfidbrücke verbunden mit GP₂) entsteht, welches vermutlich die Fusion der endosomalen mit der viralen Membran vermitteln kann (Dube et al., 2009; Schornberg et al., 2006).

Studien zum vektorialen Transport in polarisierten Zellen zeigen, dass GP bei solitärer Expression und bei MARV Infektion bevorzugt an die apikale Membran transportiert und von dieser in den Extrazellularraum abgegeben wird, obwohl die Virusfreisetzung an der basolateralen Membran stattfindet. Diese Ergebnisse zeigen, dass GP ein autonomes apikales Sortierungssignal enthält und die vektorielle Freisetzung von Virionen nicht abhängig vom Transport des MARV GP ist (Sanger et al., 2001).

Neben den Funktionen des Glykoproteins während der viralen Assemblierung oder einer Infektion, scheint es ähnlich wie VP35 oder VP24 einen Einfluss auf die zelluläre IFN-induzierte Antwort auf Virusinfektionen auszuüben. Tetherin, welches durch IFN induziert wird und als unspezifischer Inhibitor auf die Freisetzung umhüllter Viren durch Blockade der Partikelabschnürung an der Plasmamembran wirkt, kann durch EBOV GP direkt gebunden und dadurch inhibiert werden (Kaletsky et al., 2009).

VP30 Als Bestandteil des Nukleocapsidkomplexes besteht VP30 aus 281 AS (33 kDa) und beinhaltet eine starke Phosphorylierung (Becker et al., 1998; Modrof et al., 2002; Muhlberger et al., 1998). In infizierten oder rekombinant exprimierenden Zellen findet eine Interaktion von VP30 mit NP in den von NP induzierten Einschlusskörpern statt (Becker et al., 1998); bei EBOV vermittelt über den C-Terminus des VP30 [(Hartlieb et al., 2007)]. Seine Funktion für die Vermehrung des MARV ist bisher nicht eindeutig geklärt, da es in einem artifizialen Minigenomsystem für die virale Replikation und Transkription nicht benötigt wird. Wird die Expression des VP30 in MARV-infizierten Zellen jedoch mittels RNA-Interferenz minimiert, verursacht dies eine reduzierte Expression aller anderen viralen Proteine (Fowler et al., 2005; Muhlberger et al., 1998). Außerdem ist VP30 für die Herstellung rekombinanter MARV zwingend erforderlich (Enterlein et al., 2006).

Beim EBOV fungiert das VP30 eindeutig als Transkriptionsaktivator (Modrof et al., 2003; Muhlberger et al., 1998; Weik et al., 2002) und interagiert als solcher *in trans* mit RNA-Sekundärstrukturen auf dem 3' nicht-codierenden Bereich des viralen Genoms in der Nähe der ersten Transkriptionsstartstelle; zusätzlich ist VP30 auch für die Reinitiation der Transkription erforderlich (John et al., 2007; Martinez et al., 2008; Weik et al., 2002). Die

bereits beschriebene ausgeprägte Phosphorylierung von VP30 scheint eine regulierende Aufgabe bezüglich der transkriptionsaktivierenden Funktion des Proteins zu haben (Modrof et al., 2002, 2003).

VP24 VP24 wird neben VP40 als das zweite filovirale Matrixprotein angesehen und ist im Virus zwischen dem Nukleocapsidkomplex und der Membran lokalisiert (Becker et al., 1998; Elliott et al., 1985). Dabei ist es aus 253 AS aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 28 kDa. Ähnlich wie VP30 stellt VP24 eine Besonderheit in der Ordnung der *Mononegavirales* dar, da kein anderer Vertreter dieser Ordnung ein zweites Matrixprotein besitzt. Trotz der Annahme, dass es sich bei VP24 um ein zweites Matrixprotein handelt, ist seine genaue Funktion nicht bekannt.

Wie für ein Matrixprotein charakteristisch, ist MARV VP24 dazu in der Lage sowohl an Membranen als auch an die CD des Glykoproteins zu binden (Bamberg, 2000; Bamberg et al., 2005). Neben einer Interaktion mit GP konnte auch eine durch NP verursachte Rekrutierung in Einschlusskörper und eine durch VP40 ausgelöste Integration in VP40-induzierte VLPs nachgewiesen werden. Während einer solitären Expression von VP24 kann eine Produktion von VLPs beobachtet werden, wobei jedoch ungeklärt bleibt, ob VP24 nur in die induzierten Vesikel der Zelle eingebaut wird (Han et al., 2003). In MARV-infizierten Zellen verursacht die Reduktion der VP24 Expression mittels RNA-Interferenz, dass virale Partikel in reduzierter Menge ausgeschleust werden. Aufgrund dieser Befunde wird postuliert, dass VP24 für die Ausbildung Transport-kompetenter Nukleocapside und für die Interaktion zwischen diesen und der Plasmamembran essentiell ist (Bamberg et al., 2005; Fowler et al., 2005).

Für EBOV VP24 konnte eine essentielle Rolle während der Nukleocapsidmorphogenese beobachtet werden (Huang et al., 2002; Noda et al., 2005, 2007; Watanabe et al., 2004). In einem artifiziellen EBOV-spezifischen Minigenomsystem konnte weiterhin gezeigt werden, dass VP24 für die primäre Transkription essentiell ist und es wird angenommen, dass in Abwesenheit des VP24 die gebildeten Nukleocapside von dem Nukleocapsid-assoziierten Transkriptionskomplex nicht abgelesen werden können (Hoenen et al., 2006). Für EBOV konnte nachgewiesen werden, dass VP24 in die IFN-Signalkaskade eingreift, indem es direkt mit Karyopherin $\alpha 1$, 5 oder 6 interagiert, dem Rezeptor des STAT1 (Signal Transducers and Activator of Transcription 1), welches üblicherweise nach zellulärer Bindung von IFN α in den Zellkern transportiert wird und dort als Transkriptionsaktivator den Aufbau des zellulären antiviralen Zustands („antiviral state“) antreibt (Reid et al., 2006, 2007; Volchkov et al., 2000a).

L Das Protein L, der katalytische Anteil der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, ist mit 2331 AS und einem Molekulargewicht von 220 kDa das größte Protein des MARV (Muhlberger et al., 1992, 1998). Drei in L vorkommende unter den Viren der Ordnung *Mononegavirales* insbesondere den *Paramyxoviridae* hochkonservierte Bereiche, korrelieren vermutlich mit den enzymatischen Funktionen des Proteins (Muhlberger et al., 1992; Poch et al., 1990; Volchkov et al., 1999).

1.6 Der Replikationszyklus des Marburgvirus

Die Bindung und die Aufnahme des Virus an bzw. in die Zelle werden durch das einzige Oberflächenprotein GP vermittelt, welches die zentrale Rolle bei der Erkennung von zellulären Rezeptoren spielt. Die Rezeptorbindende Domäne (Abb. 3, RBD) des GP₁ konnte in dem AS-Bereich 38-188 lokalisiert werden (Dube et al., 2009; Kuhn et al., 2006). Bisher ist nur der Asialoglykoprotein-Rezeptor als möglicher Rezeptorkandidat für die Infektion von Hepatozyten beschrieben worden (Becker et al., 1995). Allerdings konnten einige Cofaktoren beschrieben werden, welche die Effizienz einer Infektion stark erhöhen können: auf unreifen Dendritischen Zellen und Makrophagen konnten die C-Typ Lektine DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin) bzw. auf Endothelzellen der Leber und Lymphknoten das Homolog L-SIGN oder LSECtin (lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin) als Bindungsfaktor allerdings nicht Rezeptor für Filoviren identifiziert werden (Alvarez et al., 2002; Dominguez-Soto et al., 2007; Gramberg et al., 2005; Marzi et al., 2004; Simmons et al., 2003a). Ein weiterer zur Ankonzentration von Filoviren an der Oberfläche von Makrophagen und Dendritischen Zellen befähigter Faktor ist hMGL (human macrophage galactose- and acetylgalactosamine-specific C-type lectin), welcher als einziger Bindungsfaktor O-Glykane binden kann (Takada et al., 2004). Bindungsfaktoren, welche im Organismus ubiquitär verbreitet sind und als Cofaktor für eine filovirale Infektion fungieren konnten, sind auch Mitglieder der Tyro3-Familie (Shimojima et al., 2006) und der Folat-rezeptor α (Chan et al., 2001), wobei jedoch gezeigt werden konnte, dass Letzterer beim Eintritt (Abb. 4, „Entry“) in primäre Zelllinien keine Rolle spielt (Simmons et al., 2003b; Sinn et al., 2003). Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose werden die viralen Partikel in die Zellen aufgenommen, bisher ist allerdings noch ungeklärt welcher Mechanismus (z.B. Macropinocytose, Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Endozytose) dafür ausgenutzt wird (Empig and Goldsmith, 2002; Mar'iankova et al., 1993; Sanchez, 2007; Simmons et al., 2003b).

Nach der mittels GP induzierten Fusion der Virushülle mit der Membran des Endozytosevesikels wird der RNP-Komplex in das Cytoplasma der Zelle freigesetzt (Abb. 4, „Uncoating“). Transkription (Synthese virusspezifischer mRNA) und Replikation (Vervielfältigung des viralen Genoms) werden durch den viralen Polymerasekomplex im Cytoplasma der infizierten Zelle katalysiert. Im Falle des MARV sind die Proteine NP, VP35

und L für die Transkription und auch für die Replikation sowohl notwendig als auch hinreichend (Abb. 4, Transkription/Translation), wobei die Effizienz der Replikation und Transkription abhängig ist vom Verhältnis der Proteine NP und VP35 (Muhlberger et al., 1998).

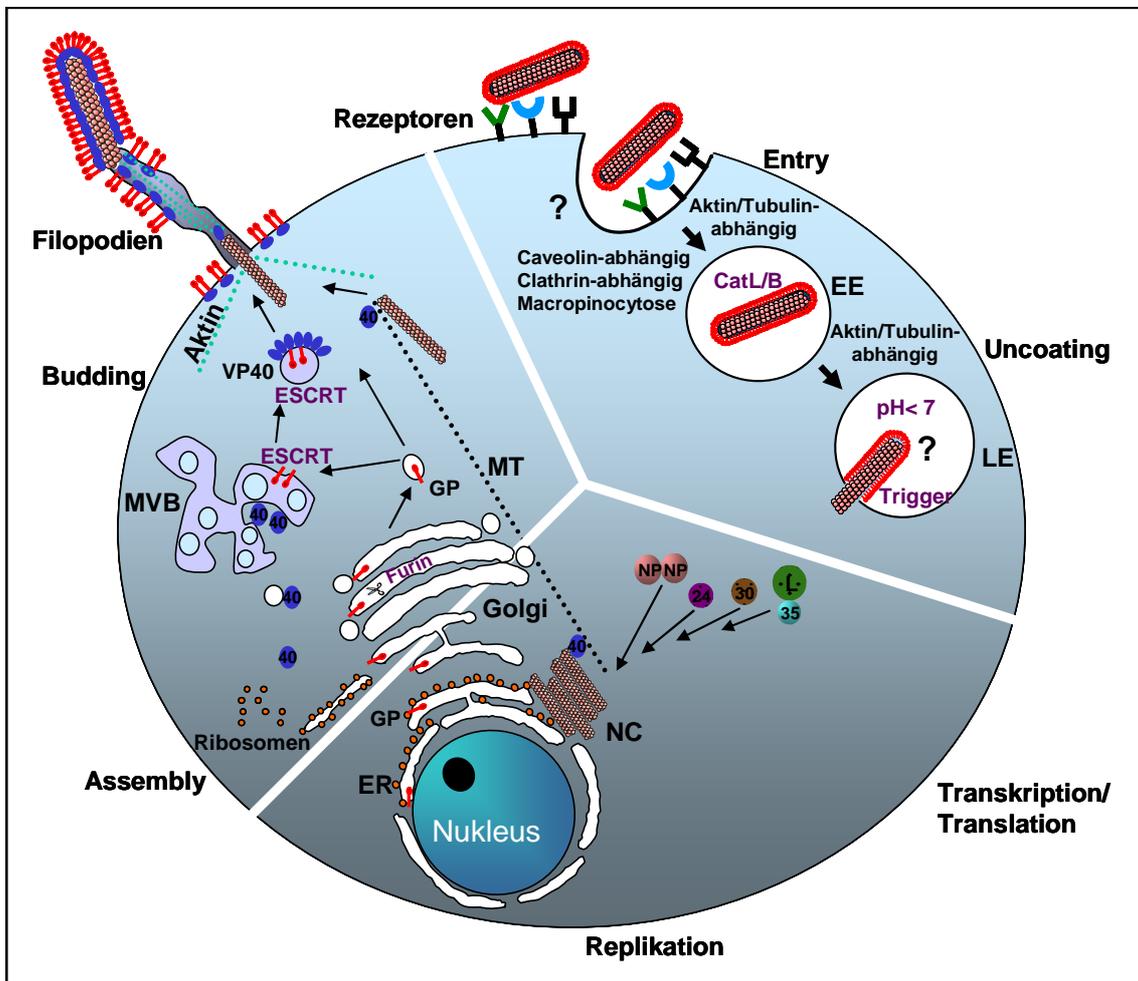


Abbildung 4: Der filovirale Replikationszyklus

Entry: Der filovirale Replikationszyklus beginnt mit der Bindung viraler Partikel an zelluläre Bindungsfaktoren und einen bisher unbekanntes zellulären peptid-spezifischen Rezeptor, gefolgt von einer Aufnahme der Partikel über Rezeptor-vermittelte Endozytose. **Uncoating:** Nach dem Eintritt der Viren in das endosomale Kompartiment findet vermittelt über einen sauren pH-Wert, Spaltung durch endosomale Cathepsine und möglicherweise einen weiteren bisher unbekanntes Auslöser die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran statt, wodurch die Nukleocapside ins Cytoplasma freigesetzt werden. **Transkription/ Translation/ Replikation:** Die virale Polymerase L vermittelt die Transkription der viralen mRNA gefolgt von Translation der viralen Proteine durch den zellulären Syntheseapparat. Die Replikation des viralen Genoms ist abhängig von der Anwesenheit der viralen Nukleocapsidproteine NP, VP35 und L, welche die neu synthetisierten Genome enkapsidieren. **Assembly/ Budding:** Der Zusammenbau der Partikel beginnt mit der Bildung von Nukleocapsidkomplexen in peripheren zellulären Einschlusskörpern („inclusion bodies“). Mit Hilfe des Cytoskeletts werden sowohl die Nukleocapside als auch VP40 zu den Orten der Virusfreisetzung an der Plasmamembran transportiert. GP wird über den klassischen sekretorischen Stoffwechselweg transportiert und akkumuliert teilweise in späten Endosomen, wo es auf VP40 trifft. Die Freisetzung der Partikel findet an langen Ausläufern der Zelle, so genannten Filopodien statt, in denen Nukleocapside von GP-angereicherten Membranen umschlossen werden. CatL/B: Cathepsin L/B; EE: frühes Endosom („early endosome“); ER: Endoplasmatisches Retikulum; ESCRT: „endosomal sorting complex required for transport“; LE: spätes Endosom („late endosome“); MT: Mikrotubuli; MVB: Multi vesikuläre Strukturen („multi vesicular bodies“); NC: Nukleocapsid. Die Abbildung wurde von Dr. O. Dolnik zusammengestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Dolnik et al., 2008).

Für EBOV gilt bezüglich der Replikation das gleiche, allerdings benötigt EBOV zur Transkription zusätzlich das vierte Nukleocapsidprotein VP30 (Muhlberger et al., 1999). Zuerst werden subgenomische, monocistronische, polyadenylierte, nichtenkapsidierte mRNAs hergestellt, die von der zellulären Translationsmaschinerie in Proteine übersetzt werden (Feldmann et al., 1992; Muhlberger et al., 1996; Sanchez et al., 1993). Bei der Replikation wird die genomische (-)-Strang RNA in antigenomische (+)-Strang RNA umgeschrieben, welche ihrerseits als Matrize für die Synthese neuer negativsträngiger Genome dient. Neu synthetisierte und durch NP enkapsidierte Negativstrang-RNA kann nun als neuerliche Matrize für die Replikation dienen, aber auch in Viruspartikel verpackt werden. Die Bildung neuer Nukleocapsidkomplexe wird durch die etwa 10 h nach der Infektion erscheinenden typischen intracytoplasmatischen Einschlusskörper angezeigt. Für den Transport reifer Nukleocapside aus den Einschlusskörpern an die Zelloberfläche ist das Matrixprotein VP40 verantwortlich (Dolnik et al., 2008; Noda et al., 2006). Daher nimmt man an, dass zwei unterschiedliche zelluläre VP40-Populationen vorliegen: entweder in Assoziation mit Nukleocapsiden, den Transport an die Plasmamembran vermittelnd oder in Assoziation mit Membranen des endosomalen Kompartiments. Für das verwandte EBOV ist gezeigt, dass VP40 mit Mikrotubuli interagieren kann, was eine Rolle beim Transport von viralen Komponenten nahe legt (Geisbert and Jahrling, 1995; Licata et al., 2004; Ruthel et al., 2005). Es wird vermutet, dass auch der Kontakt der Nukleocapside zu dem in die Plasmamembran eingelagerten GP über VP40 vermittelt wird. Schließlich ist VP40 der bestimmende Faktor, der die Ausstülpung der Wirtszellmembran initiiert und nach Zusammenbau der Partikel (Abb. 4, „Assembly“) die Freisetzung (Abb. 4, „Budding“) von Nachkommenviren an der Plasmamembran entlang von Filopodien ermöglicht (Kolesnikova et al., 2007a).

1.7 Das infektiöse filovirale VLP-System

Reverse Systeme, die auf der Herstellung von Virus-ähnlichen Partikeln aus cDNA basieren, ermöglichen in der molekularen Virologie die Untersuchung verschiedenster Aspekte der Virusvermehrung.

Für Filoviren konnten Systeme entwickelt werden, die die Herstellung von viralen Partikeln basierend auf der Einschleusung von cDNA in Zellen ermöglichten, allerdings war man dabei auf Arbeiten unter BSL-4 Bedingungen angewiesen (Enterlein et al., 2006; Neumann et al., 2002; Volchkov et al., 2001). Die Erforschung und Manipulation des filoviralen Lebenszyklus wird durch die Arbeit unter solch hohen Sicherheitsbestimmungen erschwert und ist weiterhin auf wenige Standorte beschränkt. Die Etablierung eines Minigenom-Systems für MARV ermöglichte es schließlich die Rolle der Nukleocapsidproteine für die virale Replikation und Transkription unter normalen Laborbedingungen (BSL-1) zu untersuchen.

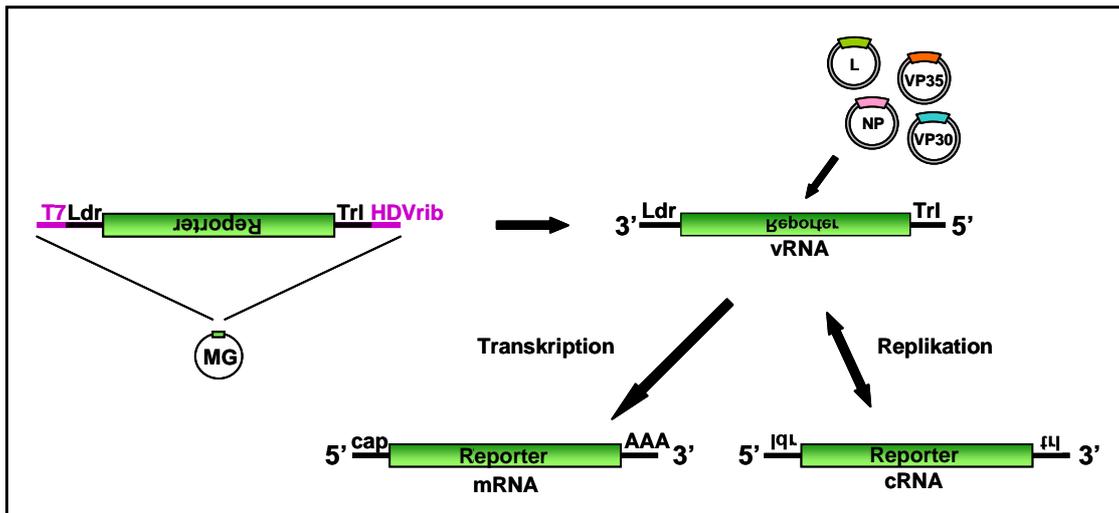


Abbildung 5: Das filovirale Minigenom-System

Ein Reporterprotein, welches von einer viralen Leader- und Trailer-Region flankiert wird, wird in Antisense Orientierung unter die Kontrolle eines T7-Promotors (T7) kloniert. Die durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase T7 induzierte Transkription führt zur Produktion einer vRNA, welche in negativer Orientierung vorliegt. Diese vRNA dient als Matrize für die spezifische Transkription und Replikation durch die Komponenten des viralen RNP-Komplexes NP, VP35, VP30 und L. Dabei entsteht über die Herstellung von cRNA neue vRNA, welche von NP enkapsidiert und im infektiösen VLP-System in iVLPs verpackt wird, als auch mRNA, was zur Expression und Aktivität des Reporterproteins führt. MG: Minigenom, HDVrib: Hepatitis Delta Virus Ribozym, Ldr: Leader-Region, Trl: Trailer-Region. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. T. Hoenen zur Verfügung gestellt (Hoenen, 2006).

Das verwendete Minigenom stellt eine Miniatur des viralen Genoms dar, in dem die für die viralen Proteine codierenden Regionen durch einen offenen Leserahmen (open reading frame, ORF) eines Reporterproteins ersetzt wurden. Dabei wird im Falle des MARV- oder EBOV-spezifischen Minigenoms ein ORF codierend für das Reporterprotein *Renilla* Luziferase in antisense Orientierung von den 3' Leader und 5' Trailer-Sequenzen des viralen Genoms flankiert (Abb. 5). Das Minigenom wird von einer cDNA (3M-5M Luc) unter der Kontrolle eines im 5' Bereich lokalisierten Promotors der T7 DNA-abhängigen RNA-Polymerase transkribiert, wobei ein exaktes 3' Ende der entstehenden vRNA durch die autokatalytische Spaltung an der Ribozymstelle des Hepatitis Delta Virus (HDVrib) gewährleistet wird. Das entstehende Analogon der viralen RNA (vRNA) vorliegend in negativer Orientierung wird durch cotransfizierte Komponenten des RNP-Komplexes als Bindungspartner erkannt, da die für Replikation, Transkription und Verpackung des Genoms notwendigen Informationen in den 3' Leader und 5' Trailer-Sequenzen enthalten sind. Die mittels des RNP-Komplexes synthetisierten mRNAs führen zur Expression des Reporterproteins, dessen Aktivität ein Maß für die virale Transkription und Replikation darstellt. Mit Hilfe dieses Systems konnte gezeigt werden, dass drei der vier Nukleocapsidproteine (L, NP, VP35) sowohl notwendig als auch ausreichend für die Transkription und Replikation des MARV sind (Muhlberger et al., 1998). Durch Kombination des vorliegenden Minigenomsystems mit der Expression der übrigen viralen Proteine folgte

der nächste experimentelle Schritt: die Etablierung eines infektiösen VLP (iVLP) Systems für EBOV (Watanabe et al., 2004).

Die Etablierung eines iVLP Systems für MARV ermöglicht es uns neben der viralen Replikation und Transkription auch die VLP Freisetzung, Morphogenese und Infektion von Zielzellen des Marburgvirus unter normalen Laborbedingungen (BSL-1) zu untersuchen (Wenigenrath, 2008).

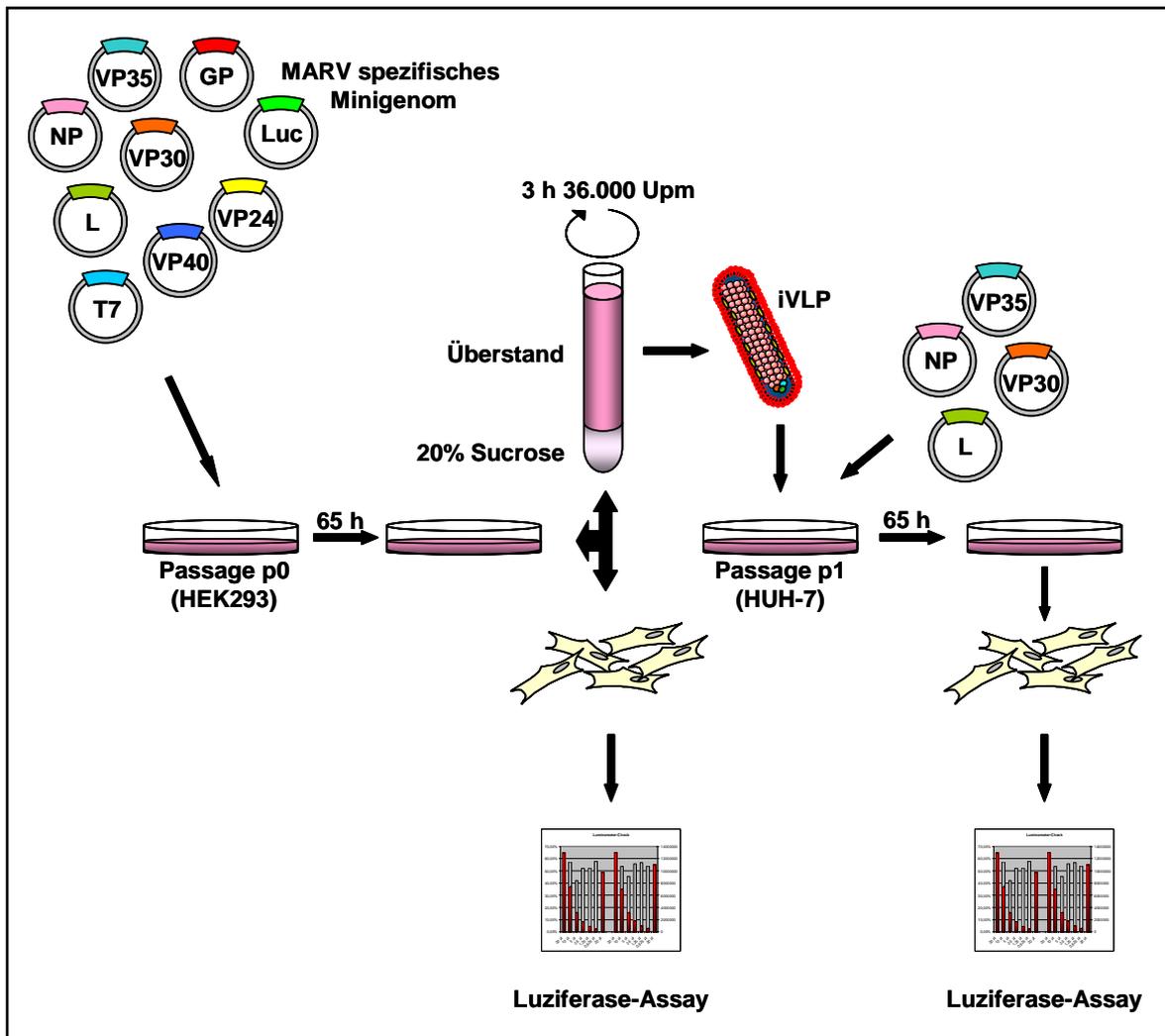


Abbildung 6: Schematische Übersicht über das MARV iVLP-System

HEK293-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV L, VP35, VP30, NP, VP24, VP40, GP, T7 und dem MARV-spezifischen Minigenom 3M-5M Luc, welches ein *Renilla* Luciferase-Reportergen enthält, transfiziert. Nach einer Inkubationszeit der Zellen (Passage p0) von 65 h, wurden diese lysiert und die Lysate für einen Luciferaseassay verwendet. Die in dem Zellkulturüberstand enthaltenen freigesetzten iVLPs wurden durch Ultrazentrifugation aufgereinigt und zur Infektion von HUH7-Zellen (Passage p1) verwendet. Diese Zellen waren 16 h vor der Infektion mit pCAGGS-MARV L, NP, VP35 und VP30 vortransfiziert worden, um eine Verstärkung der Reporter-genaktivität zu erreichen. Nach einer erneuten Inkubation von 65 h folgten die Zellyse und die Bestimmung der Reporter-genaktivität.

In diesem MARV-spezifischen iVLP System werden Zellen (p0) mit einem MARV-spezifischen Minigenom (3M-5M-Luc) und Plasmiden, welche für alle viralen Proteine und die T7-Polymerase codieren, transfiziert (Abb. 6). Die unter der Kontrolle des Polymerase II

Promotors stehenden viralen Gene und die T7-Polymerase werden durch die zelluläre Transkriptionsmaschinerie exprimiert. Die T7-Polymerase synthetisiert das Minigenom in negativer Orientierung, welches dann von den Nukleocapsidproteinen NP, VP35, VP30 und L verpackt wird und als Matrize für die folgende Transkription und Replikation erkannt wird. Die neu gebildeten Nukleocapside interagieren mit den Matrixproteinen und GP, was in den Zusammenbau und die Freisetzung von iVLPs resultiert. Diese ähneln dem nativen MARV, inkorporieren aber statt viraler RNA dessen Analogon, das enkapsidierte Minigenom. Die ausgeschleusten iVLPs können neue Zielzellen infizieren (p1), das eingeschleuste Minigenom wird transkribiert, was sich anhand der Aktivität der *Renilla* Luziferase nachweisen lässt. Die Signalstärke der Reportergenaktivität kann erhöht werden, wenn die Zielzellen vor der Infektion mit Plasmiden transfiziert werden, welche für die Nukleocapsidproteine codieren. Dadurch wird das eingedrungene Minigenom zusätzlich repliziert, was die Konzentration der Matrize und damit auch die Transkription verstärkt, was sich schließlich in einer erhöhten Luziferaseaktivität niederschlägt (Watanabe et al., 2004). Mit Hilfe von iVLPs kann somit die virale Replikation und Transkription als auch der Eintritt bzw. Infektion von Zielzellen studiert werden. Da dem Minigenom die genetische Information zur Produktion viraler Proteine und somit auch Nachkommenviren fehlt, kann nur eine Infektionsrunde durchlaufen werden; dadurch erhalten wir ein apathogens System.

1.8 Separierung von sphärischen und filamentösen (i)VLPs

Die zelluläre Expression von VP40 induziert die Bildung und Freisetzung von VLPs, wobei Form und Länge dieser Partikel sehr variabel sind (Kolesnikova et al., 2004a, 2004b; Noda et al., 2002; Swenson et al., 2004; Timmins et al., 2001). Es wurde bereits beschrieben, dass bei der Bildung von VLPs sowohl filamentöse als auch sphärische Partikel gebildet werden können (Kolesnikova et al., 2009). Die filamentösen VLPs werden als spezifisch freigesetzte Partikel angesehen, da ihre Morphologie und Proteinzusammensetzung mit nativen MARV-Partikeln vergleichbar ist. Die ebenfalls entstehenden sphärischen Partikel werden im Gegensatz dazu als unspezifisch freigesetzte, so genannte „host derived vesicles“ betrachtet, welche z.B. bei der Zellteilung oder Ausbildung von Filopodien von der Zelloberfläche abgeschnürt werden können (Bess et al., 1997; Kolesnikova et al., 2009). Zur Charakterisierung der filamentösen iVLPs hinsichtlich ihrer Morphologie und Infektiosität können diese mittels eines Nycodenzstufengradienten aufgrund ihrer Dichte von sphärischen Partikeln separiert werden (Durchführung siehe 3.2.7) und mittels Elektronenmikroskopie unterschieden werden (Abb. 7A; Wenigenrath, 2008).

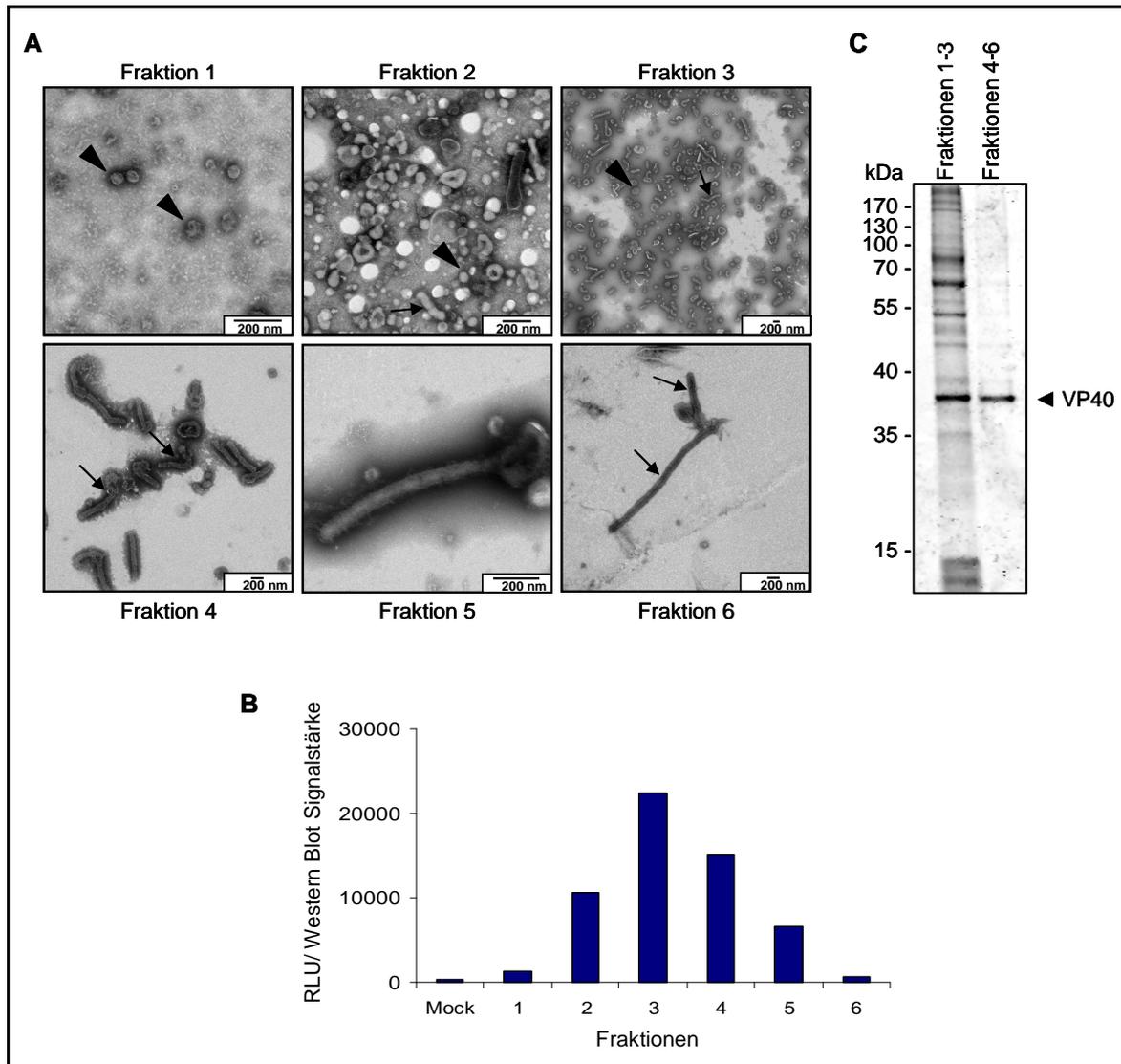


Abbildung 7: Unterscheidung MARV-spezifischer sphärischer und filamentöser Partikel

(A) *Morphologische Analyse sphärischer und filamentöser Partikel mittels Elektronenmikroskopie.* Durch eine Ultrazentrifugation und durch Verwendung eines Nycodenzstufengradienten wurden die sphärischen und filamentösen iVLP-Partikel voneinander getrennt (Durchführung 3.2.7). Von der Oberfläche des Stufengradienten wurden sechs Fraktionen abgenommen und die darin enthaltenen iVLPs mit 5 % PFA/DMEM (-) fixiert. Durch die folgende Negativfärbung konnte zwischen Partikeln unterschiedlicher Morphologie differenziert werden (Pfeile markieren filamentöse, geschlossene Pfeilspitzen markieren sphärische Partikel). Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden durchgeführt von Dr. L. Kolesnikova. (B) *Infektiosität der in den Fraktionen 1-6 enthaltenen Partikel.* Die in den einzelnen Fraktionen vorliegenden iVLPs wurden zur Infektion von vortransfizierten HUH7-Zellen (p1) verwendet (Durchführung siehe 3.2.5). Nach einer Inkubationszeit von 65 h wurde die *Renilla* Luziferase Aktivität in p1 bestimmt, welche ein Maß für die Infektiosität der iVLPs darstellt. Die Infektiosität wurde angegeben als Reporterogenaktivität korreliert mit der Quantifizierung der Signalstärke des Nukleoproteins in der Western Blot Analyse (Western Blot Daten nicht gezeigt). Die Versuche in Abbildung (A) und (B) wurden von Dr. J. Wenigenrath durchgeführt und die Abbildungen freundlicherweise aus seiner Dissertation zur Verfügung gestellt (Wenigenrath, 2008) (C) *Einbau zellulärer Proteine in VP40-induzierte VLPs.* Durch Transfektion subkonfluenter HEK293-Zellen mit einem für MARV VP40 codierenden Plasmid (3.3.2) und Aufreinigung des partikulären Materials mittels Ultrazentrifugation, konnten durch VP40 induzierte VLPs gewonnen werden. Mittels einer Zentrifugation über einen Nycodenzstufengradienten wurden sphärische (Fraktionen 1-3) und filamentöse Partikel (Fraktionen 4-6) separiert (3.2.7). Die Analyse der Proteinzusammensetzung erfolgte mittels einer 10 %igen SDS-PAGE und einer Markierung der Proteine durch Coomassie Brilliant Blau-Lösung (Kolesnikova et al., 2009).

In den von dem Nycodenzstufengradienten von oben abgenommenen Fraktionen 1 und 2 werden vorwiegend Partikel mit sphärischer Morphologie nachgewiesen (Abb. 7A,

Fraktionen 1 und 2, geschlossene Pfeilspitzen). Allerdings kann in Fraktion 2 auch eine Durchmischung mit wenigen kurzen filamentösen Partikeln entdeckt werden, wohingegen in Fraktion 3 hauptsächlich filamentöse Partikel zu beobachten sind (Abb. 7A, Fraktionen 2 und 3, Pfeile). Filamentöse Partikel unterschiedlicher Länge sind vor allem in den Fraktionen 4 bis 6 nachzuweisen (Abb. 7A, Fraktionen 4 bis 6, Pfeile): während in den Fraktionen 4 und 5 die Partikel oft der charakteristischen „9“-förmigen Erscheinung des nativen MARV entsprechen, sind nur wenige, dafür sehr lange Partikel in Fraktion 6 anzutreffen (Abb. 7A, Fraktion 6, Pfeil). Bei der Analyse der spezifischen Infektiosität der iVLPs verschiedener Fraktionen und damit unterschiedlicher Erscheinungsformen, zeigte sich, dass rein sphärische Partikel, wie sie in Fraktion 1 anzutreffen sind, keine Infektiosität zeigen (Abb. 7B). Die in Fraktion 2 enthaltenen Partikel zeigen eine geringere Infektiosität als die in Fraktion 3 enthaltenen Partikel, was mit der Zunahme an kurzen filamentösen Partikeln in Fraktion 3 korreliert. Fraktion 4 zeichnet sich wie auch Fraktion 5 durch eine geringere spezifische Infektiosität aus; beachtet man jedoch die Gesamtproteinmenge in diesen Fraktionen, so lässt sich festhalten, dass die wenigen Partikel der Fraktionen 4 und 5 zu äußerst hohen Infektionsraten führen (Abb. 7B). Fraktion 6 wiederum zeigt eine sehr geringe Infektiosität, vergleichbar mit der Infektiosität der Partikel in Fraktion 1. Zusätzlich zu der Differenzierung sphärischer (Fraktionen 1-3) und filamentöser Partikel (Fraktionen 4-6) mittels Elektronenmikroskopie und Infektiositätsstudien, kann auch der unspezifische Einbau zellulärer Proteine in VP40-induzierte VLPs bestimmt werden. Bei der Abschnürung filamentöser Partikel werden nur geringe Mengen zellulärer Proteine integriert, wohingegen bei sphärischen Partikeln eine hohe Anzahl zellulärer Proteine nachgewiesen werden kann (Abb. 7C, Kolesnikova et al., 2009). Es wird angenommen, dass durch die regelmäßige und hoch komplexe Anordnung der VP40-Matrix, welche die Innenseite der VLP-Membran auskleidet, zelluläre Proteine effizient ausgeschlossen werden können. Da auch bei Partikeln des nativen MARV dieser effektive Ausschluss zellulärer Proteine gezeigt werden konnte (Kolesnikova et al., 2009), wird das Konzept, filamentöse VLPs als spezifisch freigesetzte Partikel anzusehen, bestätigt.

1.9 Die Fusion viraler mit zellulären Membranen

Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose stellt die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran einen während des viralen Replikationszyklus essentiellen Schritt dar, welcher die Freisetzung des viralen Nukleocapsids in das Cytoplasma der Zielzelle und damit die anschließende Transkription und Replikation des viralen Genoms ermöglicht. Durch die katalytische Aktivität des Fusionsproteins, welche mit fundamentalen zeitlich und räumlich abgestimmten Konformationsänderungen innerhalb des Proteins einhergeht, wird die Fusion beider Membranen ermöglicht.

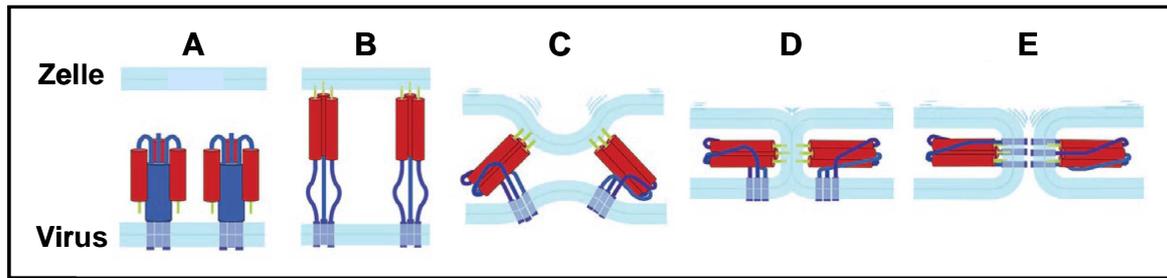


Abbildung 8: Fusion von zellulärer und viraler Membran vermittelt durch MARV GP

(A) Präfusionszustand des Glykoproteins. GP_{1/2} liegt als Trimer in seiner metastabilen Konformation integriert in die Virusmembran vor. Dabei wird folgende Farbgebung verwendet: HR₁ in rot, HR₂/TMD/CD in blau, IFL in hellgrün. **(B) Aktivierung des IFL und Integration in die Zielzellmembran.** Vermutlich aufgrund der Spaltung des GP₁ durch endosomale Cathepsine kombiniert mit einem niedrigen pH-Wert und vermittelt durch einen unbekanntes Aktivator wird das IFL aktiviert. Durch eine Konformationsänderung und somit Ausbildung einer 3HB der HR₁-Domänen des GP₂ wird die Integration des IFL in die endosomale Membran verursacht. **(C) Ausbildung der 6HB-Konformation.** Durch Ausbildung einer 3HB der HR₂-Domänen und „Umklappen“ dieser an die trimerisierten HR₁-Domänen kommt es zur Ausprägung der stabilen 6HB. **(D) Ausbildung der Hemifusion.** Die durch die Ausbildung des stabilen Zustandes der 6HB freigesetzte Energie wird zur Annäherung der Lipidmembranen genutzt, was in die Fusion der äußeren Schichten der Membranen resultiert. **(E) Bildung der Fusionspore.** Durch vollständige Fusion der Membranen kommt es zur Ausprägung der Fusionspore, die nach einer essentiellen abschließenden Konformationsänderung des GP durch Weitung der Pore beendet wird (Harrison, 2008).

Dabei wird die von MARV GP katalysierte Fusion der endosomalen mit der viralen Membran in folgende Schritte unterteilt:

- MARV GP wird als klassisches Typ I Transmembranprotein als Vorläuferprotein (GP₀) synthetisiert und durch eine zelluläre Protease in seine Untereinheiten GP₁ und GP₂ gespalten, von der GP₂ über seine TMD in der Membran verankert und mit GP₁ durch Disulfidbrücken kovalent verbunden ist. Am neu entstandenen N-Terminus der GP₂-Untereinheit ist das hydrophobe Fusionspeptid bzw. -schleife (IFL, AS 511-554) gefolgt von zwei Domänen, so genannten „Heptad Repeats“ (HR₁, AS 555-596 und HR₂, AS 597-629) lokalisiert. Nach Rezeptor-vermittelter Endozytose liegt GP_{1/2} in seiner metastabilen Konformation als Trimer vor (Abb. 8A).
- Im Endosom wird durch Cathepsin B/L der Hauptteil des GP₁, einschließlich der Mucin-ähnlichen Domäne abgespalten (Chandran et al., 2005; Kaletsky et al., 2007; Schornberg et al., 2006). Der Aktivator der fusogenen Aktivität des hydrophoben IFL ist ungeklärt, jedoch konnte von anderen viralen Oberflächenproteinen die Aktivierung der fusogenen Eigenschaften mittels Bindung von zellulären Rezeptoren, durch den niedrigen pH-Wert im endosomalen Kompartiment oder Interaktion mit anderen viralen Proteinen berichtet werden (Heinz et al., 1994; Helenius et al., 1980; Lee et al., 2008; Moore et al., 1990; Sattentau et al., 1993; Skehel et al., 1982). Die Aktivierung des Glykoproteins beinhaltet eine Konformationsänderung der C-terminal des IFL liegenden HR₁-Domäne: die drei HR₁-Domänen der GP-Monomere bilden ein aus parallel verlaufenden α -Helices bestehendes Trimer (so genannte „three helix bundle“, 3HB), was zu der Integration des IFL in die Zielzellmembran führt (Abb. 8B).

- Durch Konformationsänderung und dadurch Trimerisierung der HR₂-Domänen (3HB) und „Umklappen“ dieser an die entsprechenden HR₁-Domänen kommt es zur Ausprägung einer Gruppe parallel verlaufender α -Helices (so genannte „six helix bundle“, 6HB). Durch die Konformationsänderung d.h. den Übergang von dem metastabilen Zustand vor der Fusion (Abb. 8A) zu der stabilen Post-Fusions Konformation (6HB) kommt es zur Freisetzung von Energie, die zur Annäherung der in die Membranen verankerten IFL und TMD genutzt wird (Abb. 8C).
- Durch Annäherung beider Membran-verankerter Domänen (TMD und IFL) wird die Fusion des äußeren Anteils der Lipiddoppelschichten induziert: eine Hemifusion entsteht (Abb. 8D).
- Durch vollständige Fusion der zellulären mit der endosomalen Membran kommt es zur Ausbildung der Fusionspore. Aufgrund der Ähnlichkeit des MARV GP zu dem Influenzavirus Hämagglutinin wird angenommen, dass für die Ausprägung der Pore mehrere Trimere des GP benötigt werden (Abb. 8E, Danieli et al., 1996). Durch eine finale Änderung der Konformation wird die Pore stabilisiert, was ein Wachstum der Pore induziert und den Fusionsvorgang beendet.

1.10 Einfluss der cytoplasmatischen Domäne viraler Oberflächenproteine auf den viralen Lebenszyklus

Für die Assemblierung viraler Partikel ist sowohl ein gerichteter intrazellulärer Transport der viralen Proteine an den Ort der Virusfreisetzung, als auch die Interaktion zwischen den einzelnen viralen Proteinen bzw. Proteinkomplexen unabdinglich. Auch die Abschnürung infektiöser Partikel, sowie die Infektion neuer Zielzellen und damit Freisetzung der viralen Nukleocapside ins Cytoplasma ist abhängig von einem abgestimmten Zusammenspiel der viralen Proteine untereinander, sowie der Interaktion zwischen viralen und zellulären Proteinen, wie z.B. Rezeptoren oder Bindungsfaktoren.

Die Ausnutzung zellulär determinierter Transportwege ermöglicht die Orchestrierung des Partikelzusammenbaus an der Plasmamembran. Das MARV GP nutzt für seinen Transport an die Zelloberfläche den klassischen sekretorischen Transportweg, wobei es in Anwesenheit des Matrixproteins VP40 mit diesem in MVB, Kompartimenten des späten Endosoms, zusammentrifft (Becker et al., 1996; Kolesnikova et al., 2002, 2004a, 2004b; Will et al., 1993). Für dieses Zusammentreffen von Glyko- und Matrixproteinen des MARV ist die Transmembrandomäne des GP essentiell (Mittler et al., 2007). Bei anderen Viren der Ordnung *Mononegavirales* spielt für eine Interaktion zwischen Glyko- und Matrixproteinen auch die cytoplasmatische Domäne der jeweiligen Glykoproteine eine Rolle. So wurde nachgewiesen, dass das Fusionsprotein F des Sendaivirus (*Paramyxoviridae*) über seine cytoplasmatische Domäne mit dem Matrixprotein M interagieren kann und beide Proteine in

komplexierter Form an die Plasmamembran transportiert werden (Ali and Nayak, 2000; Sanderson et al., 1993).

Dieses Wechselspiel zwischen Glyko- und Matrixproteinen stellt eine wichtige Voraussetzung für die Produktion infektiöser Partikel dar, da dadurch der Einbau von viralen Oberflächenproteinen gewährleistet wird. Während einer Infektion vermittelt das virale Oberflächenprotein die Bindung an den zellulären Rezeptor und induziert durch exakt abgestimmte Konformationsänderungen die Fusion von viraler mit zellulärer Membran. Die cytoplasmatische Domäne des Oberflächenproteins kann zudem eine essentielle Rolle für die Proteinzusammensetzung und Morphologie freigesetzter Virionen, sowie für die Infektiosität der Partikel spielen. Die cytoplasmatischen Domänen des Hämagglutinins und der Neuraminidase des Influenzavirus haben zwar keine Auswirkung auf die Proteinzusammensetzung der Partikel, zeigen aber ausgeprägte Effekte auf Morphologie, Freisetzung und Infektiosität der Partikel (Jin et al., 1997). Es werden vorwiegend pleomorphe statt sphärischer viraler Partikel freigesetzt, welche im Vergleich zu wildtypischen Partikeln eine 10fach verringerte Partikelfreisetzung und 13fach reduzierte Infektiosität zeigen. Diese verursachten Veränderungen der Partikeleigenschaften sind vorrangig der Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne der Neuraminidase zuzurechnen (Bilsel et al., 1993; Mitnaul et al., 1996). Neben einem starken Einfluss der cytoplasmatischen Domäne des VSV Oberflächenproteins G auf die Partikelfreisetzung und Infektiosität, konnte auch gezeigt werden, dass die Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne die Inkorporation des Glykoproteins G in die Virushülle stark hemmt (Schnell et al., 1998).

Im Hinblick auf die Effekte auf die Infektiosität wird für manche Viren angenommen, dass die Auswirkungen der Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne über die Transmembrandomäne an die Ektodomäne signalisiert werden, die dadurch ihre Fusionsaktivität modifiziert (so genanntes „inside-out signaling“) und somit auch die Infektiosität viraler Partikel beeinflussen kann. In Zuge dessen kann bei einigen Viren durch die Deletion der cytoplasmatischen Domäne eine Verstärkung der fusogenen Eigenschaften beobachtet werden. Bei dem Oberflächenprotein env des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) konnte nachgewiesen werden, dass die Deletion der cytoplasmatischen Domäne eine beschleunigte Fusion verursacht, wahrscheinlich durch eine verstärkte laterale Mobilität des Oberflächenproteins env in der Membran. Dadurch wird die Ausbildung der Fusionspore begünstigt, da die für dessen Ausprägung benötigten trimeren Oberflächenproteine schneller interagieren können (Abrahamyan et al., 2005). Ein ähnliches Phänomen lässt sich auch bei dem Fusionsprotein F des SV5 beobachten: eine Stabilisierung in der Membran durch Verlängerung der cytoplasmatischen Domäne verursacht eine verringerte Ausprägung von Fusionskomplexen, was wiederum die Fusionsaktivität inhibiert (Waning et al., 2004).

1.11 Fragestellung

Zu der strukturellen und funktionellen Bedeutung des MARV Glykoproteins wurden bereits ausgedehnte Untersuchungen durchgeführt, wobei die cytoplasmatische Domäne des Glykoproteins bisher wenig Beachtung fand. Von anderen Mitgliedern der Ordnung *Mononegavirales* ist bekannt, dass der cytoplasmatische Anteil ihrer Oberflächenproteine im viralen Kontext eine essentielle Rolle spielt. Dementsprechend sind sie dazu in der Lage, die Virusmorphogenese, -proteinzusammensetzung und verschiedene Aspekte des viralen Eintritt- und Fusionsprozesses in die Zellen, gefolgt von der Infektion zu modifizieren.

Ein Grund für das geringe Interesse an der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP war sicherlich auch, dass in der nur acht Aminosäuren umfassenden Sequenz der cytoplasmatischen Domäne keine Signale identifiziert werden konnten, die klassischerweise die intrazelluläre Lokalisation von Transmembranproteinen oder deren Interaktion mit anderen viralen Proteinen bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen untersucht werden: 1) Welche Rolle spielt der cytoplasmatische Anteil des MARV GP während des intrazellulären Transports entlang des klassischen sekretorischen Transportwegs? 2) Wie beeinflusst der cytoplasmatische Anteil des MARV GP dessen posttranslationale Modifikationen (Becker, et al., 1996; Will et al., 1993)? 3) Welchen Einfluss hat die cytoplasmatische Domäne des MARV GP auf den Zusammenbau, die Freisetzung und Infektiosität von iVLPs (Wenigenrath, 2008)?

Darüber hinaus war es von Interesse, ob die bei MARV GP identifizierten Aufgaben der cytoplasmatischen Domäne auch für die äquivalente Domäne des nahe verwandten EBOV GP bestätigt werden können. Dies würde den cytoplasmatischen Domänen filoviraler Oberflächenproteine eine generelle Aufgabe während des viralen Lebenszyklus zuschreiben.

2 Material

2.1 Chemikalien

Agarose PeqGold universal	Peqlab, Erlangen (D)
Alcian Blue 8GX	Sigma-Aldrich, München (D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Hercules (USA)
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg (D)
Bacto™-Agar	Becto, Dickinson & Company, Sparks (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München (D)
Bromphenolblau (BPB)	Roth, Karlsruhe (D)
Calciumchlorid (CaCl₂ x 2H₂O)	Merck, Darmstadt (D)
Caseinhydrolysat	Merck, Darmstadt (D)
Chloroform	Acros Organics, Geel (B)
D(+)- Glucose	Merck, Darmstadt (D)
Dextranblau	Sigma-Aldrich, München (D)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, München (D)
1,4 Diazabicyclo-[2.2.2]-octan (DABCO)	Sigma-Aldrich, München (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Dinatriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt (D)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt (D)
Dinatriummethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe (D)
Essigsäure (HAc)	Merck, Darmstadt (D)
Ethanol abs. (EtOH)	Sigma-Aldrich, München (D)
Ethanol vergällt (EtOH)	Fischar, Saarbrücken (D)
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim (D)
Ethylen glycol bis[succinimidylsuccinate] (EGS)	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Fluoprep	BioMérieux, Nürtingen (D)
Formvar	Sigma-Aldrich, München (D)
Glutamin 200 mM (100x)	Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt (D)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (D)
Glycin	Roth, Karlsruhe (D)
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt (D)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'2-Ethan- Sulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, München (D)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München (D)

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe (D)
Lipofectamine™	Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg (D)
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt (D)
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt (D)
Manganchlorid ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, München (D)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München (D)
Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich, München (D)
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel-de-Haën, Seelze (D)
N(onidet)P40	Merck, Darmstadt (D)
Nycodenz	Axis-Shield, Oslo (N)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe (D)
Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Pepton	Merck, Darmstadt (D)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim (D)
Phosphorwolframsäure	Serva, Heidelberg (D)
Plus™ Reagenz	Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, München (D)
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe (D)
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt (D)
Stickstoff (99,996 %)	Messer-Griesheim, Siegen (D)
Sucrose	Serva, Heidelberg (D)
N, N, N', N', - Tetramethylethyl-ethylendiamin (TEMED)	Biorad, Hercules (USA)
TransIT® LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio, Madison (USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics, Geel (B)
TritonX- 100	Sigma-Aldrich, München (D)
Tween® 20	neoLab®, Heidelberg (D)
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich, München (D)

2.2 Verbrauchsmaterialien

6 well Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
75 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
96well Platten <i>LumiNunc™</i> , schwarz	Nunc, Roskilde (DK)
96well Platten <i>LumiNunc™</i> , weiß	Nunc, Roskilde (DK)
Blottingpapier <i>GB 002</i> (Whatman® 3 mm)	Whatman, Maidstone (UK)
Cellulosenitratfolie <i>PROTRAN®</i> , Ø 0,45 µm	Whatman, Maidstone (UK)
Deckgläser, Ø 12 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Filme für EM, <i>Ilford 50</i>	Ilford, Cheshire (UK)
Gewebekulturröhrchen (TC-Tube)	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Indikatorpapier	Merck, Darmstadt (D)
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Objektträger 76 x 22 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Parafilm	Pechiney Plastic, Menasha (USA)
PCR-tubes, 0.2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf (D)
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml, <i>Cellstar®</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen 0.1-1µl, 10-100µl, 100-1000µl, <i>TipOne®</i> (steril, unsteril)	Starlab, Ahrensburg (D)
Pipettenspitzen, 1250 µl, <i>Matrix®</i>	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml/ 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
PVDF-Membran, <i>Immobilon™ P</i> , Ø 0,45 µm	Millipore, Billerica (USA)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg (D)
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Röntgenfilme <i>RP NEW</i>	Ceaverken, Strängnäs (S)
Skalpell no.22	Feather, Osaka (J)
Spritzen 30 ml, <i>Omnifix®</i>	Braun, Melsungen (D)
Sterilfilter Ø 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Maidstone (UK)
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg (D)
Zentrifugenröhrchen <i>Microfuge® Tube</i>	Beckmann, Palo Alto (USA)
<i>Polyallomer</i> für TLA45	
Zentrifugenröhrchen, <i>Ultraclear™</i> für SW40, SW32, SW60	Beckmann, Palo Alto (USA)

2.3 Kits

DIG Glycan Differentiation Kit	Roche, Mannheim (D)
Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega, Mannheim (D)
HiSpeed [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden (D)
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim (D)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen (D)
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden (D)
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Qiagen, Hilden (D)
<i>Renilla</i> Luciferase Assay System	Promega, Mannheim (D)
SuperSignal [®] West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford (USA)
SuperSignal [®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford (USA)
Z-Competent <i>E.coli</i> Transformation Kit™ and Buffer Set	Zymo Research, Orange (USA)

2.4 Geräte

Brutschrank <i>HERAcell150</i>	Thermo Fisher, Hudson (USA)
DNA-Gelkammern	bsb11, Schauenburg (D)
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen (D)
Elektronenmikroskop <i>Zeiss 109</i>	Zeiss, Jena (D)
Entwicklermaschine <i>Optimax[®] 2010</i>	Protec Medizintechnik, Oberstenfeld (D)
Eppendorf Kühlzentrifuge <i>5415R</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf <i>Reference[®]</i> Pipetten (0.1-2.5 µl, 0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (D)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen (D)
Fluoreszenzmikroskop <i>Axiovert200M</i>	Zeiss, Jena (D)
Folienschweißgerät	Severin, Sundern (D)
Geldokumentationssystem <i>GeIDoc 2000</i>	Biorad, Hercules (USA)
Horizontalschüttler	GFL, Burgwedel (D)
Horizontalschüttler <i>TR</i>	Infors AG, Bottmingen (CH)
Lichtmikroskop <i>Wilovert[®]</i>	Will, Wetzlar (D)
Luminometer <i>Centro LB 960</i>	Berthold, Bad Wildbad (D)
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim (D)
Metallblockthermostat <i>TCS</i>	neoLab [®] , Heidelberg (D)

Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe (D)
Multikanal-Pipette <i>Matrix</i> [®]	Thermo Fisher, Hudson (USA)
<i>Odyssey Infrared Imaging System</i>	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
PCR Cycler <i>Primus 25</i>	Peqlab, Erlangen (D)
pH-Meter $\Phi 32$	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
Pipettierhilfe <i>pipetboy</i>	Integra Bioscience, Chur (CH)
Power Supply <i>PowerPac</i> [™] HC	Biorad, Hercules (USA)
Power Supply <i>Standard Power Pack P25</i>	Biometra, Göttingen (D)
Reagenzglasnischer <i>Vortex</i>	neoLab [®] , Heidelberg (D)
Rotator	neoLab [®] , Heidelberg (D)
Rotor Ultrazentrifuge SW41, SW60, SW32, TLA45	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
SDS-Gelkammern <i>Mini-Protean</i>	Biorad, Hercules (USA)
SemiDry Blotapparatur <i>Trans-Blot SD</i>	Biorad, Hercules (USA)
Sicherheitswerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen (D)
Spektralphotometer <i>GeneQuant pro</i>	GE Healthcare, Uppsala (S)
Spektralphotometer <i>Nanodrop ND1000</i>	Peqlab, Erlangen (D)
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischfuge <i>Spectrafuge</i> [®]	neoLab [®] , Heidelberg (D)
Tischkühlzentrifuge <i>Multifuge 3S-R</i>	Thermo Fisher, Hudson (USA)
Überkopffrotierer	Heidolph, Schwabach (D)
Ultrazentrifuge <i>Optima</i> [™] L-100K/ -80XP	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
Ultrazentrifuge <i>TL100</i>	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
UV-Schirm 302 nm	Bachofer, Reutlingen (D)
Vakuumpumpe <i>Mini-Vac E1</i>	Axonlab, Reichenbach (D)
Waage <i>excellence</i>	Sartorius, Göttingen (D)
Wasserbad <i>MT</i>	Lauda, Lauda-Königshofen (D)

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Puffer

Blockierungspuffer für IF und EM	2 %	Bovines Serumalbumin (BSA)
	5 %	Glycerin
	0,2 %	Tween [®] 20
	0,05 %	Natriumazid (NaN ₃)
		in PBS _{def}

Blockierungspuffer für WB	10 %	Magermilchpulver in PBS _{def}
DNA-Probenpuffer (6x)	0,09 %	Bromphenolblau
	0,09 %	Xylene Cyanol FF
	60 %	Glycerin
	60 mM	EDTA
Glycinpuffer, sauer, pH 2.5	100 mM	Glycin
	1 M	Tris/HCl, pH 2.5
Hepespuffer, pH 8.0	50 mM	Hepes
	100 mM	NaCl
	1 %	NP40 (frisch)
Lektinbindungspuffer I	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	MnCl ₂
	1 mM	CaCl ₂
	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl, pH7.5
PBS _{def} , pH 7.5 (Phosphatpuffer deficient)	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,15 g	Na ₂ HPO ₄
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	ad 1 l	dH ₂ O
Proteingellaufpuffer (10x)	10 g	SDS
	30 g	Tris
	144 g	Glycin
	ad 1 l	dH ₂ O
Proteinprobenpuffer (4x)	20 ml	Glycerin
	10 ml	β-Mercaptoethanol
	4 g	SDS
	10 ml	1 M Tris/HCl, pH 6.8
	200 mg	Bromphenolblau

	ad 100 ml	dH ₂ O
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	1 M	Tris/HCl, pH 6.8
	0,4 %	SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M	Tris/HCl, pH 8.8
	0,4 %	SDS
TAE-Puffer, pH 8.0 (50x)	242 g	Tris
	57,1 g	Essigsäure
	100 ml	0,5 M EDTA, pH 8.0
	ad 1 l	dH ₂ O
TBS-Puffer, pH 7.5 (10x)	1,5 M	NaCl
	0,5 M	Tris/HCl, pH 7.5
TNE-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA, pH 8
Transferpuffer für WB	300 mg	Tris
	144 mg	Glycin
	100 ml	Ethanol
	ad 1 l	dH ₂ O
Verdünnungspuffer für WB	1 %	Magermilchpulver
	0,1 %	Tween [®] 20
		in PBS _{def}
Waschpuffer für WB	0,1 %	Tween [®] 20
		in PBS _{def}

2.5.2 Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	100 mg	Ampicillin
	ad 1 ml	dH ₂ O

PMSF (100 mM)	360 mg	PMSF
	ad 21 ml	Isopropanol

2.6 Wachstumsmedien

2.6.1 Wachstumsmedien für Bakterien

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

LB-Medium	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	Pepton
	ad 1 l	dH ₂ O

SOB-Medium	20 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	0,58 g	NaCl
	0,19 g	KCl
	10 ml	1 M MgCl ₂
	10 ml	1 M MgSO ₄
	ad 1 l	dH ₂ O

NZY ⁺ -Medium	10 g	Caseinhydrolysat
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	ad 1 l	dH ₂ O, pH 7.5
	+ 12,5 ml	1 M MgCl ₂
	+ 12,5 ml	1 M MgSO ₄
	+ 20 ml	20 % Glucose in dH ₂ O

2.6.2 Wachstumsmedien für Säugerzellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)		Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
DMEM (+++)	500 ml	DMEM
	50 ml	FCS (Fötales Kälberserum)
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml

DMEM (+ Q)	500 ml	DMEM
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
DMEM (+++ / 2 % FCS)	500 ml	DMEM
	10 ml	FCS (Fötales Kälberserum)
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml
Fötales Kälberserum (FCS)		PAN Biotech GmbH, Aidenbach (D)
OPTI-MEM® I		Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Cell Dissociation Buffer, Enzyme-free		Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Trypsin-EDTA (0,5 %)		Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)

2.7 Nukleinsäuren und Nukleotide

2.7.1 Nukleinsäuren als Größenmarker

O'Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, 250-10.000 bp	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
O'Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder, 50-1000 bp	Fermentas, St.Leon-Rot (D)

2.7.2 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide

dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat	10 mM	Peqlab, Erlangen (D)
dCTP	2'-Desoxycytosin 5'-Triphosphat	10 mM	Peqlab, Erlangen (D)
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat	10 mM	Peqlab, Erlangen (D)
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat	10 mM	Peqlab, Erlangen (D)

2.7.3 DNA-Oligonukleotide (Primer für Sequenzierungen/ Mutagenesen)

<u>Nr.</u>	<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
20	VP30-2157 fwd	tac ctc cac cac tgc cca cag ccc
69	GPv-6220 fwd	aag tgt aac gga tcc ctc tg
71	GPv-7029 fwd	aca cac aga gca caa tca ctg
72	GPv-7244 fwd	cct ctg gag gga agg cga cat g
74	GPv-7712 fwd	cta ctc aca aga tgg gga gga ac
125	pTM1-F	att gta tgg gat ctg atc tgg
174	pTM1-R	gcc aac tca gct tcc ttt cgg
1233	pCAGGS-fw	cct tct tct ttt tcc tac ag

1234	pCAGGS-rev	cct tta tta gcc aga agt cag
1614	EBOV_GP_122_fw	cac att aca ggt tag tga tgt cga c
1615	EBOV_GP_990_fw	gga cca aca caa caa ctg aag acc
1616	EBOV_GP_1815_fw	cgg act gct gta tcg aac cac
1755	MV_ED_Sma1_fwd	gaa <u>ccc ggg</u> atg aag acc aca tgt ttc ctt atc ag
2317	FireflyLuc_EcoRI_fwd	ccg <u>gaa ttc</u> atg gaa gat gcc aaa aac att aag aag gg
2318	FireflyLuc_BamHI_rev	cgc <u>gga tcc</u> tta cac ggc gat ctt gcc gcc ctt c
2548	MarvGPdeltamucin1_rev	ctc cag agt agg cag ttt gct tgg tga ccg c
2549	MarvGPdeltamucin2_fw	gcg gtc acc aag caa act gcc tac tct gga g
2550	MarvGPdeltamucin2_rev	cta <u>gag ctc</u> tta tcc gat ata ttt agt aaa gat acg
2551	MarvGPdeltaCDArg_new	cta tcc tgt att tgt cgt taa gcg gcc gcg agc
2552	EbovGPdeltaCD_EcoRI_fw	ccg <u>gaa ttc</u> aca atg ggc gtt aca gga ata ttg cag tta cc
2553	EbovGPdeltaCD_XhoI_rev	ccg <u>ctc gag</u> cta gca tat aca gaa taa agc gat aac tgc
2612	MarvGPdeltaRBD_rev I	gta gaa gtc aga ttc atg cat acc gaa tcc ac
2613	MarvGPdeltaRBD_fw I	gtg gat tcg gta tgc atg aat ctg act tct ac
2614	MarvGPdeltaRBD_revSacl	cta <u>gag ctc</u> tta tcc gat ata ttt agt aaa gat acg
2665	MarvGPdeltaCD_C/A_rev	cta <u>gag ctc</u> tta agc aat agc gga tag agc aat caa gac agc
2666	MarvGP_CDscramble	cta <u>gag ctc</u> tta ttt ata gat acg gat aaa tcc agt aca aat aca gga tag agc aat c
2713	MarvGPdeltaCD_C/A_repf	cac aaa cca ttc cca aga tgc tgt gac tga act ag
2714	MarvGPdeltaCD_C/A_repr	cta gtt cag tca cag cat ctt ggg aat ggt ttg tg

Tabelle 3: Für Sequenzierungen und PCR verwendete Oligonukleotide

Die Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen wurden unterstrichen. Die Primer #20 bis #174 wurden von Dr. M. Krause am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (Marburg) synthetisiert. Die Primer #1233 bis #2714 wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

2.8. Vektoren und rekombinante Plasmide

2.8.1 Vektoren

pTM1	B. Moss, NIH, Bethesda (USA)
pCAGGS-MCS_WPG	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MCS-5	Institut für Virologie, Marburg (D)
pGL4	Promega, Mannheim (D)

2.8.2 Rekombinante Plasmide

pCAGGS-MARV NP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV VP30	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV VP35	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV L	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV VP40	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV VP24	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV GP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV GP Δ CD	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV GP-C/A	Institut für Virologie, Marburg (D)
pTM1-MARV GP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-EBOV NP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-EBOV VP35	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-EBOV VP30	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-EBOV VP30- Luc	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-EBOV L	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-EBOV VP40	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-EBOV VP24	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-EBOV GP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pTM1-EBOV GP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-T7 Polymerase	Y. Kawaoka, Wisconsin (USA)
3E-5E-Luc	Institut für Virologie, Marburg (D)
3M-5M-Luc	Institut für Virologie, Marburg (D)
phCMV-VSV G	N.Bannert, RKI, Berlin (D)

<u>Kloniertes Plasmid</u>	<u>Matrizen-DNA</u>	<u>Oligonukleotide</u>	<u>Zielvektor</u>
pTM1-Firefly Luciferase	pGL4	#2317, #2318	pTM1
pCAGGS-EBOV GPΔCD	pTM1-EBOV GP	#2552, #2553	pCAGGS
pCAGGS-MARV GPΔCD_R	pCAGGS-MARV GPΔCD	#2551	pCAGGS
pCAGGS-MARV GPΔRBD	pTM1-MARV GP	#1755, #2612 #2613, #2614	pCAGGS
pCAGGS-MARV GPΔMLD	pTM1-MARV GP	#1755, #2548 #2549, #2550	pCAGGS
pCAGGS-MARV GPCDscr	pTM1-MARV GP	#1755, #2666	pCAGGS
pCAGGS-MARV GPΔCD-C/A	pCAGGS-MARV GPΔCD	#1755, #2665 #2713, #2714	pCAGGS

Tabelle 4: Für Klonierungen verwendete Matrizen-DNA und Oligonukleotide

Die Bezeichnung der Oligonukleotide erfolgte mit der internen Labornummer (#n), deren genaue Bezeichnung und Sequenz unter 2.7.3 verzeichnet ist.

2.9 Proteine, Peptide und Aminosäuren

2.9.1 Enzyme

Alkalische Phosphatase,	NEB, Frankfurt (D)
Calf Intestinal Phosphatase (CIP) (10 U/μl)	
Endo H (500 U/μl)	NEB, Frankfurt (D)
Pfu-Turbo [®] DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	Stratagene, Heidelberg (D)
PNGase F (500 U/μl)	NEB, Frankfurt (D)
Proteinkinase K (0,9 U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
SAWADY Pwo DNA-Polymerase (1 U/μl)	Peqlab, Erlangen (D)
Restriktionsendonukleasen:	NEB, Frankfurt (D)
BamHI (20 U/μl), DpnI (20 U/μl), EcoRI (20 U/μL), SacI (20 U/μl), SmaI (20 U/μl), XhoI (20 U/μl)	
T4-DNA-Ligase (4 U/μl)	NEB, Frankfurt (D)

2.9.2 Antikörper

Erstantikörper

α-EBOV GP (1G12; Celline; 04.2000), Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)
α-EBOV GP/NP (19.06.97), Ziege	Institut für Virologie, Marburg (D)
α-EBOV VP40 (2C4, 60 μg/ml), Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)
α-Firefly Luziferase (L2164), Maus	Sigma-Aldrich, München (D)
α-MARV (Musoke) (37/6; 03.03.2004), Ziege	Robert-Koch-Institut, Berlin (D)

α -MARV GP (19-12-8-2), Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)
α -MARV GP (50-6-10), Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)
α -MARV GP (glykosyliert, 3/95, 11.9.96), Kaninchen	Institut für Virologie, Marburg (D)
α -MARV NP (59-9-10), Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)
α -MARV VP40 (40-2-2), Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)
α -MARV VP40 (aff.-gereinigt aus 37/6), Ziege	Robert-Koch-Institut, Berlin (D)
α -VSV G (mcmA), Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)

Zweitantikörper

Esel α -Kaninchen (H+L), TexasRed [®] -gekoppelt	Dianova, Hamburg (D)
Esel α -Maus (H+L), FITC- gekoppelt	Dianova, Hamburg (D)
Esel α -Maus (H+L), TexasRed [®] - gekoppelt	Dianova, Hamburg (D)
Esel α -Ziege (H+L), FITC-gekoppelt	Dianova, Hamburg (D)
Esel α -Ziege, HRP-gekoppelt, polyklonal (H+L)	Dianova, Hamburg (D)
Esel α -Ziege (H+L), RhodaminRed [™] -X-gekoppelt	Dianova, Hamburg (D)
Pferd α -Digoxigenin, POD-gekoppelt, Fab Fragment	Roche, Mannheim (D)
Ziege α -Maus, 5 nm-Goldpartikel-gekoppelt	BBInternational, Cardiff (UK)
Ziege α -Maus, AlexaFluor [®] 680-gekoppelt (H+L)	Molecular Probes, Karlsruhe (D)
Ziege α -Maus, HRP-gekoppelt, polyklonal (H+L)	Dako, Glostrup (DK)
Ziege α -Maus (H+L), RhodaminRed [™] -X-gekoppelt	Dianova, Hamburg (D)

2.9.3 Proteinmarker

PageRuler [™] Prestained Protein Ladder, 10-170 kDa	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
PageRuler [™] Prestained Protein Ladder Plus, 10-250 kDa	Fermentas, St.Leon-Rot (D)

2.10 Zellen

2.10.1 Prokaryotische Zellen

<i>E. coli</i> Stamm XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg (D)
<u>Genotyp</u> : recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	
<i>E. coli</i> Stamm XL10-Gold [®] ultrakompetent	Stratagene, Heidelberg (D)
<u>Genotyp</u> : Tet ^r Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]	

2.10.2 Eukaryotische Zellen

HEK293-Zellen	humane embryonale Nierenzelllinie transformiert mit adenoviraler Ad5-DNA
Hela-Zellen	humane Zervixkarzinomzelllinie
HUH7-Zellen	humane Hepatomazelllinie

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

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

Die PCR wird verwendet, um spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* zu vervielfältigen. Jede Reaktion benötigt einen Vorwärts- und einen Rückwärtsprimer, die an jeweils einen DNA-Strang binden und die Zielsequenz einrahmen. Die Primer bestehen aus je ca. 15 bis 25 Nukleotiden, die das 5´ und das 3´ Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments definieren. Je nach Klonierungsstrategie können Primer im 5´ Bereich zusätzliche Sequenzen z.B. für Schnittstellen von Restriktionsenzymen enthalten, die nicht spezifisch für die zu amplifizierende DNA sind (Abb. 9).

Im ersten Schritt des Amplifikationszyklus (Denaturierung) wird die DNA-Matrize durch Erhitzen in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend wird der Reaktionsansatz auf eine durch die Basenzusammensetzung und Länge der Primer festgelegte Temperatur abgekühlt, damit diese an die komplementären Sequenzabschnitte der einzelsträngigen DNA-Matrize binden können (Annealing). Ausgehend vom 3´ Ende des jeweiligen Primers erfolgt im letzten Schritt die Synthese des Doppelstranges (Elongation). Die dafür verwendete hitzestabile *Pwo* DNA-Polymerase verfügt neben ihrer 5´-3´-Polymerasefunktion über eine 3´-5´-Exonukleaseaktivität. Diese wird auch als Korrekturlesefunktion bezeichnet und gewährleistet die hohe Lesegenauigkeit der *Pwo* DNA-Polymerase. Der Reaktionszyklus durchläuft etwa dreißig Wiederholungen, wobei die zu amplifizierende DNA exponentiell im Reaktionsgemisch angereichert wird. Zur Amplifikation kann eine Touch-Down-PCR verwendet werden, bei der die Annealing-Temperatur schrittweise (0,5 °C pro Zyklus) oder in zwei Schritten (55 °C → 50 °C) auf die optimale Annealingtemperatur der Primer gesenkt wird, wodurch die Spezifität der Primer an komplementäre Sequenzen zu binden stark erhöht werden kann.

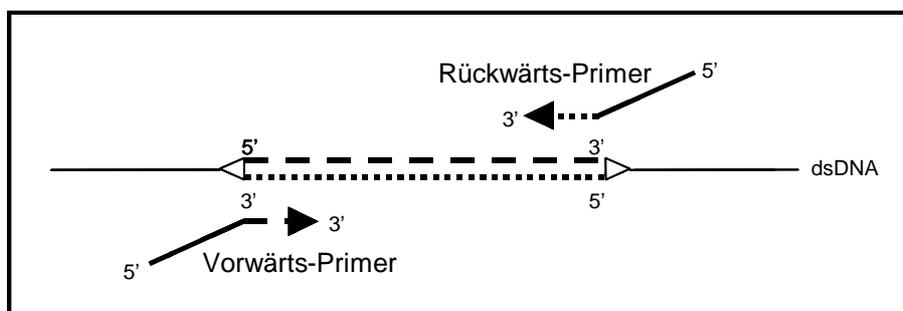


Abbildung 9: Prinzip einer PCR

Der vergrößerte DNA-Abschnitt soll mittels PCR amplifiziert werden. Nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA und Hybridisierung der Primer mit der Zielsequenz erfolgt die Synthese des gewünschten DNA-Fragments in 5´-3´-Richtung.

Reaktionsansatz: 10 ng DNA
 30 µM Vorwärts-Primer
 30 µM Rückwärts-Primer
 je 2 µl 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
 10 µl 10× Puffer für *Pwo* DNA-Polymerase (komplett)
 ad 99 µl dH₂O
 1 µl *Pwo* DNA-Polymerase

Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	3 min
Denaturierung	10	95 °C	1 min
Annealing		55 °C	1 min
Elongation		72 °C	2 min + 2 sec/Zyklus
Denaturierung	20	95 °C	1 min
Annealing		50 °C	1 min
Elongation		72 °C	2 min + 2 sec/Zyklus
Elongation	1	72 °C	5 min
Ende der Synthese	1	4 °C	∞

Die Überprüfung der PCR erfolgt im analytischen DNA-Agarosegel (3.1.4) mit 10 µl Reaktionsansatz. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden über ein präparatives DNA-Agarosegel aufgetrennt (3.1.4.1) und durch Gelextraktion gereinigt (3.1.5).

3.1.1.1 Rekombinante PCR

Mit Hilfe der rekombinanten PCR können lange Polynukleotide aus einer DNA-Sequenz z.B. eines Plasmids (hier Template A) in eine Sequenz eines anderen Plasmids (hier Template B) eingefügt werden (siehe Abb. 10).

Dafür werden zuerst mittels PCR (3.1.1) diejenigen DNA-Sequenzen aus Template A und B amplifiziert, die dann mittels einer rekombinanten PCR zusammengefügt werden sollen. Die Primer werden dabei so gewählt, dass der Vorwärtsprimer des Templates B und der Rückwärtsprimer des Templates A neben den spezifischen Sequenzen, die zur Hybridisierung mit der DNA benötigt werden, an ihren 5' Enden Sequenzen beinhalten, die flankierenden Sequenzen des jeweils anderen Templates entsprechen (Higuchi et al., 1988). In der rekombinanten PCR können während der Denaturierung die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen DNA der Templates A und B hybridisieren (1), die Synthese des Doppelstranges erfolgt vom 3' Ende des überlappenden Bereichs aus, so dass ein Produkt bestehend aus Sequenzen der Template A und B entsteht (2). Die durch die *Pwo* DNA-Polymerase aufgefüllten Fragmente können nach Zugabe der beiden äußersten

Primer, die während der ersten PCR verwendet wurden, als Template zur weiteren Amplifikation verwendet werden (3).

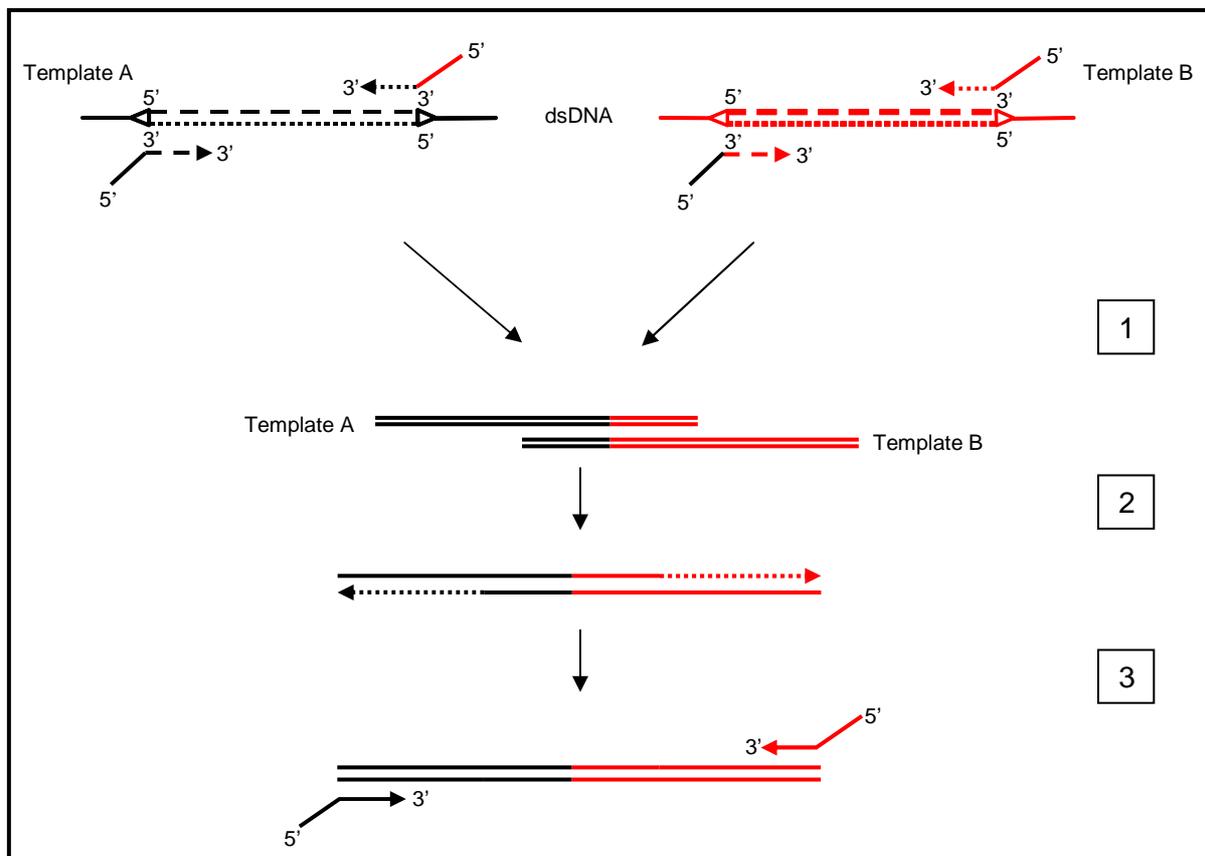


Abbildung 10: Prinzip der rekombinanten PCR

Während der ersten PCR werden zwei DNA-Fragmente mit komplementären DNA-Abschnitten eingeführt durch Primer hergestellt. Während der rekombinanten PCR findet die Hybridisierung der komplementären Sequenzen (1) und Auffüllen durch die DNA-Polymerase statt (2). Durch Zugabe der Primer dient der Hybrid aus Fragmenten von Template A und B als Template zur Amplifikation neuer DNA (3).

Der Reaktionsansatz für die erste PCR zur Amplifikation der DNA-Fragmente entspricht dem unter 3.1.1 beschriebenen Ansatz. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden über ein präparatives DNA-Agarosegel aufgetrennt (3.1.4.1) und durch Gelextraktion aufgereinigt (3.1.5). Die aufgereinigten DNA-Fragmente können dann in die rekombinante PCR eingesetzt werden.

Reaktionsansatz: je 10 μ l DNA (pro aufgereinigten Produkt [A, B] der ersten PCR)
je 2 μ l 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
10 μ l 10 \times Puffer für *Pwo* DNA-Polymerase (komplett)
ad 88 μ l dH₂O
2 μ l *Pwo* DNA-Polymerase
50 μ M Vorwärts-Primer
50 μ M Rückwärts-Primer

Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	3 min
Zugabe der <i>Pwo</i>	-	-	-
Denaturierung	20	95 °C	1 min
Hybridisierung		37 °C	1 min
Elongation		72 °C	5 min
Zugabe der Primer	-	-	-
Denaturierung	10	95 °C	1 min
Annealing		55 °C	1 min
Elongation		72 °C	2 min + 2 sec/Zyklus
Denaturierung	20	95 °C	1 min
Annealing		50 °C	1 min
Elongation		72 °C	2 min + 2 sec/Zyklus
Elongation	1	72 °C	10 min
Ende der Synthese	1	4 °C	∞

Die amplifizierten DNA-Fragmente werden über ein präparatives DNA-Agarosegel aufgetrennt (3.1.4.1) und durch Gelextraktion gereinigt (3.1.5).

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005).

3.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Mit Hilfe des *QuickChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* ist es möglich, Punktmutationen, kurze Deletionen oder Insertionen *in vitro* in Plasmid-DNA einzubringen. Die Methode beruht auf einer PCR-Reaktion, bei der das zu mutagenisierende Plasmid mittels eines spezifischen Enzymmixes, welcher auch *PfuTurbo®* DNA-Polymerase enthält, und einem Primer, welcher die einzuführende Mutationen beinhaltet, amplifiziert wird. Die anschließende Selektion erfolgt mit der Restriktionsendonuklease DpnI. Dieses Enzym ist dazu in der Lage methylierte DNA vollständig abzubauen, so dass die Template-DNA (isoliert aus Bakterienzellen), welche Methylierungen aufweist, nicht aber die durch PCR neusynthetisierte DNA aus dem Ansatz entfernt wird. Nach Reinigung mit dem *QIAquick™ PCR Purification Kit* (3.1.3) werden 5 µl des Reaktionsproduktes zur Kontrolle mit einem analytischen Agarosegel (3.1.4.1) dargestellt. Anschließend werden die amplifizierten Plasmide in hitzekompetente *E.coli* XL10Gold-Zellen transformiert (3.1.9).

Reaktionsansatz: 100 ng DNA
 100 ng Vorwärts- oder Rückwärts-Primer
 0,5 µl Quick Solution
 1 µl dNTP Mix
 2,5 µl 10x *Quick Change*[®] *Multi* Reaktionspuffer
 1 µl *Quick Change*[®] Enzymmix (2,5 U/µl)
 ad 25 µl dH₂O

Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	1 min
Denaturierung	30	95 °C	1 min
Annealing		55 °C	1 min
Elongation		65 °C	2 min/kb Plasmidlänge
Ende der Synthese	1	4 °C	∞

3.1.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Vor der Verwendung von DNA in molekularbiologischen Experimenten ist es erforderlich, Kontaminationen mit Phenol, Chloroform, Ethanol, EDTA, Detergenzien, Salzen oder Proteinen zu entfernen, welche einen negativen Einfluss auf biochemische Reaktionen haben können.

DNA-Fragmente, die größer als 100 bp sind, können nach biochemischen Reaktionen, wie z.B. PCR (3.1.1) oder Restriktionsverdau (3.1.6), mit dem *QIAquick*[®] *PCR Purification Kit* vom restlichen Ansatz getrennt werden. Die Aufreinigung erfolgt über eine Säulenmatrix und wird entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung durchgeführt.

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005).

3.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im DNA-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Wanderung erfolgt von der Kathode zur Anode, wobei die netzartige Struktur der Agarose bewirkt, dass sich die DNA-Moleküle in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedlich schnell fortbewegen. Die Größe unterschiedlicher DNA-Fragmente kann mit Hilfe eines geeigneten DNA-Größenstandards abgeschätzt werden. Unter Verwendung des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid und von UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) werden die Nukleinsäurefragmente sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder nach enzymatischen Reaktionen

verwendet man analytische DNA-Agarosegele, wohingegen präparative DNA-Agarosegele zur Aufreinigung von Nukleinsäuren benutzt werden. Die Gele unterscheiden sich in der eingesetzten Konzentration der Agarose und dem einzusetzenden Probenvolumen.

3.1.4.1 Analytische bzw. präparative DNA-Agarosegele

Agarosegel: 1 % -2 % (w/v) Agarose, in TAE-Puffer gelöst

Laufpuffer: TAE-Puffer, pH 8.0

Die Agarose wird durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und in einen Gelschlitten gegossen. Die DNA-Proben (5-10 µl [analytisches DNA-Agarosegel] bzw. 40-60 µl [präparatives DNA-Agarosegel] der PCR oder des Endonukleaseverdau) werden mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Längenstandard im polymerisierten Agarosegel bei 80-100 Volt und maximaler Spannung aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel für 20-30 min in wässriger Ethidiumbromidlösung (bei präparativen DNA-Agarosegelen Verwendung von frischem Ethidiumbromid) inkubiert und im Falle eines präparativen DNA-Agarosegels werden die gewünschten DNA-Banden auf einem UV-Schirm ($\lambda = 302 \text{ nm}$) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Im Anschluss an die Färbung bzw. dem Ausschneiden der DNA wird diese mit Hilfe des Geldokumentationssystems *GelDoc 2000* visualisiert. Mittels dem *QIAquick® Gel Extraction Kit* (3.1.5) wird im Falle des präparativen Agarose-Gels die DNA entsprechend der dem Kit beiliegenden Arbeitsanleitung aus dem Gel isoliert.

Die hier beschriebenen Methoden (3.1.4, 3.1.4.1) wurden aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005). Aus technischen Gründen wurden dabei die Abschnitte „Analytische DNA-Agarosegele“ und „Präparative DNA-Agarosegele“ kombiniert.

3.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA aus präparativen DNA-Agarosegelen erfolgt mithilfe des *QIAquick® Gel Extraction Kit* entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung. Die DNA wird nach Reinigung über eine Säulenmatrix in 50 µl dH₂O eluiert.

3.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA-Moleküle (dsDNA) können mithilfe von Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungsstellen hydrolytisch gespalten werden. Dabei erkennen diese Endonukleasen palindromische Sequenzen im DNA-Doppelstrang an denen der Phosphodiesterstrang geöffnet wird. Man kann die Restriktionsenzyme präparativ zum Herausschneiden eines Inserts aus einem Vektor oder zur Analyse von DNA verwenden, wobei zwei DNA-Moleküle, die sich in Anzahl oder Position der Schnittstellen unterscheiden, nach einem analytischen Restriktionsverdau und Elektrophorese im Agarosegel (3.1.4)

unterschiedliche Bandenmuster erzeugen. Der Reaktionsansatz wird entsprechend der Herstellerangaben bezüglich Pufferbedingungen, Temperaturoptimum und Zusatz von BSA inkubiert (nach Aktivität des verwendeten Enzyms 2-5 h). Ein Restriktionsverdau kann gleichzeitig mit zwei Endonukleasen erfolgen, sofern diese hinsichtlich ihrer Reaktions- und Temperaturbedingungen kompatibel sind. Andernfalls wird die DNA nacheinander mit den gewünschten Enzymen verdaut, wobei nach dem ersten Verdau entweder das Enzym durch eine Aufreinigung mit Hilfe des *QIAquick® PCR Purification Kits* (3.1.3) entfernt oder durch Erhitzen auf 65 °C inaktiviert werden kann. Soll die DNA in weiteren Reaktionen verwendet werden, müssen Enzym- und Pufferrückstände sowie kleine DNA-Fragmente entfernt werden. Diese Aufreinigung erfolgt mithilfe des *QIAquick® PCR Purification Kits* (3.1.3) oder über ein präparatives Agarosegel (3.1.4.1) mit anschließender Gelextraktion (3.1.5).

Ansatz für analytischen Verdau: 0,1 – 0,5 µg DNA

1 µl 10x Puffer geeigneter Ionenstärke
(1 µl 10 % BSA, falls notwendig)
1-5 U Restriktionsendonuklease
ad 10 µl dH₂O

Ansatz für präparativen Verdau:

5 µg DNA
5 µl 10x Puffer geeigneter Ionenstärke
(5 µl 10 % BSA, falls notwendig)
10-20 U Restriktionsendonuklease
ad 50 µl dH₂O

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005).

3.1.7 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Eine Behandlung der mit Restriktionsendonukleasen verdauten Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP) dient der Entfernung der 5' Phosphatgruppen. So kann eine Religation der linearisierten Plasmide verhindert werden.

Ansatz: 45 µl Vektor-DNA nach präparativem Restriktionsendonukleaseverdau (3.1.6)
6 µl 10x Puffer geeigneter Ionenstärke
1 µl CIP (1 U/µl)
ad 60 µl dH₂O

Die Inkubation erfolgt für mindestens eine Stunde bei 37 °C. Die DNA wird anschließend mit dem *QIAquick™ PCR Purification Kit* gereinigt (3.1.3), um die bei einer Ligation möglicherweise störenden Substanzen zu entfernen.

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005).

3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren

DNA-Ligasen katalysieren die Formierung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5´ Phosphatgruppe eines mit der freien 3´ OH-Gruppe eines zweiten DNA-Doppelstranges. Ein über PCR (3.1.1) und Verdau mit Restriktionsendonukleasen (3.1.6) erhaltenes Insert kann so in einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor (3.1.6, 3.1.7) ligiert werden.

Ansatz: 100 – 200 ng verdaute, gereinigte Insert-DNA
25 – 50 ng verdaute, gereinigte, CIP-behandelte Vektor-DNA
1 µl 10x Ligationspuffer mit 10 mM ATP
0,5 µl T4 DNA-Ligase (4 U/µl)
ad 10 µl dH₂O

Zur Abschätzung des Verhältnisses von religierten Plasmiden zu Plasmiden, die bei der Ligation das gewünschte DNA-Fragment inseriert haben, wird eine Religationskontrolle mitgeführt. Hierbei wird statt des zu klonierenden DNA-Fragmentes dH₂O eingesetzt. Als Transformationskontrolle werden 100 ng eines nicht linearisierten Plasmids eingesetzt, um die Transformationseffizienz der Z-kompetenten *E.coli*-Zellen zu testen. Die Ansätze der Ligation werden für eine Stunde bei RT inkubiert und im Anschluss daran vollständig in Z-kompetente *E.coli*-Zellen (XL1-Blue) transformiert (3.1.9).

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005).

3.1.9 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Die Vermehrung rekombinanter Plasmide erfordert deren Einbringung in Bakterienzellen. Damit Bakterienzellen fremde Plasmid-DNA aufnehmen können, müssen sie zuerst kompetent gemacht d.h. zur Aufnahme von DNA befähigt werden. Dies kann mithilfe des *Z-Competent E.coli Transformation Kit™ and Buffer Sets* erreicht werden. Die Bakterien werden entsprechend des beiliegenden Protokolls behandelt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Z-kompetenten *E.coli*-Zellen (XL1-Blue) werden auf Eis aufgetaut und transformiert, indem 100 µl Bakteriensuspension zur DNA-Lösung (z.B. 10 µl Ligationsansatz oder 10 ng Plasmid-DNA) hinzugegeben werden und dieser Ansatz für eine Stunde auf Eis

inkubiert wird. Im Falle des *QuickChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* werden hitze-kompetente *E.coli*-Zellen (XL10Gold) mitgeliefert, welche wie in der beiliegenden Arbeitsanleitung beschrieben für eine Transformation vorbehandelt werden müssen. Die Transformation erfolgt, indem 45 µL der Bakteriensuspension mit 3 µL des PCR-Produkts gemischt, auf Eis inkubiert und anschließend in NZY⁺-Medium einem Hitzeschock (30 sec, 42 °C) unterzogen werden.

Die hier beschriebene Methode wurde wörtlich aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005). Hinzugefügt wurde der Abschnitt über die Verwendung von XL10Gold *E.coli*-Zellen.

3.1.10 Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterien

Um Bakterienzellen, die transformiert wurden und damit Plasmid-DNA aufgenommen haben (3.1.9), von nicht transformierten Bakterienzellen unterscheiden zu können, tragen Plasmide, die als Vektoren genutzt werden, zur Selektion ein Antibiotika-Resistenzgen. Im Falle des *QuickChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* müssen transformierte *E.coli*-Zellen (XL10Gold) in NZY⁺-Medium für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd vorinkubiert werden. Wenn transformierte Bakterien auf LB-Agarplatten, die ein Antibiotikum (hier Ampicillin mit der c = 100 µg/ml) enthalten, ausplattiert und 16 h bei 37 °C inkubiert werden, können nur diejenigen Bakterien Kolonien ausbilden, die durch Transformation den Vektor mit dem entsprechenden Ampicillin-Resistenzgen aufgenommen haben.

Die hier beschriebene Methode wurde wörtlich aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005). Hinzugefügt wurde der Abschnitt über die Verwendung von XL10Gold *E.coli*-Zellen.

3.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (kleiner Maßstab)

Plasmidpräparationen kleinen Maßstabs dienen der Isolierung rekombinanter Plasmide aus Bakterien und deren späterer Charakterisierung. Dafür werden einzelne Bakterienkolonien in 5 ml LB-Medium versetzt mit Ampicillin (c = 100 µg/ml) aufgenommen und 16 h auf einem Schüttler bei 200 Upm und 37 °C inkubiert. Mithilfe des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* werden 1,5 ml dieser Bakteriensuspension zur Präparation der Plasmid-DNA entsprechend des Arbeitsprotokolls verwendet. Das Prinzip der Isolierung beruht auf der Bindung der Plasmid-DNA an die in der Säule enthaltene Silicamembran. Durch wiederholtes Waschen wird die Plasmid-DNA von Verunreinigungen befreit und nach dem Trocknen der Säule in 50 µl dH₂O eluiert. Zur Analyse der gewonnenen DNA wird ein Restriktionsverdau (3.1.6) mit ca. 5 µl Eluat durchgeführt, welcher anschließend auf einem analytischen Agarosegel visualisiert wird (3.1.4.1).

Die hier beschriebene Methode wurde wörtlich aus der Diplomarbeit von N. Biedenkopf übernommen (Biedenkopf, 2007).

3.1.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (großer Maßstab)

Eine Plasmidpräparation großen Maßstabs erfolgt unter Verwendung des *HiSpeed® Plasmid Maxi Kits*, dessen Durchführung nach der Anleitung des Herstellers erfolgt. Zur Anzucht des gewünschten Bakterienklons werden 100 µl einer Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium versetzt mit Ampicillin ($c = 100 \mu\text{g/ml}$) inokuliert und bei 37 °C 16 h schüttelnd inkubiert. Das Prinzip der Plasmid-Isolierung entspricht dem der DNA-Präparation im kleinen Maßstab: Bakterien werden pelletiert, alkalisch lysiert, das Lysat neutralisiert, die Plasmide an die Anionenaustauscher-Matrix der *QIAGEN-Tips* gebunden und die Plasmid-DNA mit 500 µl dH_2O eluiert. Die quantitative und qualitative Untersuchung der Plasmid-DNA erfolgt mit dem Photometer (*GeneQuant pro* oder *Nanodrop® ND1000*) (3.1.13). Anschließend kann die DNA-Präparation durch Sequenzierung (3.1.14) des Plasmids überprüft werden.

Die hier beschriebene Methode wurde wörtlich aus der Diplomarbeit von N. Biedenkopf übernommen (Biedenkopf, 2007).

3.1.13 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Ringstrukturen der Purin- und Pyrimidinbasen der DNA in wässriger Lösung haben die Eigenschaft UV-Licht bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda = 260 \text{ nm}$ zu absorbieren. Mit dem Spektralphotometer *GeneQuant pro* bzw. *Nanodrop® ND1000* kann die Extinktion E gemessen werden, die dem negativen Logarithmus der Transmission T entspricht, wobei die Transmission der Quotient aus einfallender Lichtintensität I_0 und durchdringender Lichtintensität I ist. Die Extinktion ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz abhängig vom spezifischen Extinktionskoeffizienten E_λ der Substanz (entspricht für dsDNA $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$), dem zurückgelegten Lichtweg (Schichtdicke d der Quarzküvette oder Distanz d zwischen den polierten Enden der Glasfaserkabel) und der Konzentration c einer Substanz in Lösung (hier dsDNA). Mit Hilfe dieses Gesetzes kann auf die Konzentration einer Lösung geschlossen werden.

$$E = -\log T$$

$$T = I_0 / I$$

$$E = E_\lambda \times c \times d$$

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung wird das Lambert-Beersche Gesetz für eine Schichtdicke der Küvette von 1 cm bzw. des zurückzulegenden Lichtwegs zwischen den Enden der Glasfaserkabel von 1 mm zusammengefasst zu:

$$\text{DNA-Konzentration } c \text{ in } \mu\text{g/ml} = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml für dsDNA. Eine Aussage über die Reinheit von Nukleinsäurepräparationen erlaubt der Quotient OD_{260}/OD_{280} . Reine Lösungen sind durch Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 charakterisiert. Verunreinigungen durch Proteine ergeben einen Wert kleiner als 1,8; Kontaminationen durch Phenol oder RNA hingegen ergeben deutlich höhere Quotienten.

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005).

3.1.14 DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger und Coulson (Sanger, 1975). Bei der hier verwendeten Modifikation der Methode wird die zu sequenzierende DNA durch PCR amplifiziert. Neben den Desoxynukleosid-triphosphaten (dNTPs) dATP, dTTP, dCTP und dGTP befinden sich im Reaktionsgemisch geringe Konzentrationen der verschiedenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosid-triphosphate (ddNTPs) ddATP, ddTTP, ddCTP und ddGTP. Während der DNA-Synthese kommt es durch den Einbau der ddNTPs zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen, da die ddNTPs nicht die für die 5'-3'-Phosphodiesterbindung notwendige 3'-OH-Gruppe besitzen. Somit entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die alle das gleiche 5' Ende besitzen und deren letztes Nukleotid am 3' Ende immer ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP ist. Nach der Aufreinigung werden die DNA-Fragmente elektrophoretisch ihrer Länge nach über eine Harnstoff-Polyacrylamidgel-Säule aufgetrennt, wobei ein Argon-Laser die Fluoreszenz des jeweiligen Fragments durch Abtasten des unteren Gelrandes detektiert. Zur Analyse der zu sequenzierenden DNA werden die Proben an die Firma SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH gesendet, wobei die DNA-Proben wie folgt vorbereitet werden.

Ansatz: 200 – 600 ng gereinigte Plasmid-DNA
20 pmol Primer
ad 7 µl dH₂O

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005). Da die Sequenzierungen nicht mehr im Institut selbst durchgeführt, sondern an die Firma SEQLAB übertragen wurden, wurde dieser Abschnitt in der Methodenbeschreibung ersetzt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von HEK293-, HUH7- und Hela-Zellen

Bei den verwendeten humanen Hepatomazellen (HUH-7), humanen Zervixkarzinomzellen (Hela) und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) handelt es sich um permanente Zelllinien, die in 75cm²-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert werden. Als Wachstumsmedium wird *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM +++) versetzt mit 10 % Fötalem Kälber Serum (FCS), L-Glutamin (Q) und Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Passage der Zelllinien findet alle 3 bis 4 Tage unter einer Sicherheitswerkbank statt, wobei die zur Passage verwendeten Medien und Substanzen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt werden müssen. Der konfluente Zellrasen wird nach Dekantieren des Zellkulturmediums zwei Mal mit PBS_{def} gewaschen und durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle wird durch Zugabe von 8 ml DMEM (++) die Reaktion abgestoppt, die Zellen resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturflaschen bzw. -platten ausgesät.

Wenn HEK293-Zellen zur Produktion und Analyse von infektiösen virusähnlichen Partikeln (iVLPs) genutzt werden und damit 72 h bei 37 °C inkubiert werden sollen, werden Zellkulturschalen mit Poly-D-Lysin (c = 0,1 mg/ml) für 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, danach zwei Mal gründlich mit PBS_{def} gewaschen und die Zellen darauf ausgesät. Durch die Beschichtung mit Poly-D-Lysin können HEK293-Zellen, die sich üblicherweise leicht vom Boden z.B. von Zellkulturflaschen ablösen, sich besser an den Boden der Zellkulturschalen anheften.

Die hier beschriebene Methode wurde wörtlich aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005).

3.2.2 Transiente DNA-Transfektion mit *TransIT*

Um DNA in Zellen einzubringen, wird die negative Ladung des Phosphatrückgrats durch Komplexbildung mit kationischen Lipiden (beinhaltet in *TransIT*) maskiert. In dieser Form können sich die DNA-Lipidkomplexe an die Zellmembran anlagern und diese passieren, so dass eine Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen ermöglicht wird.

Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion so umgesetzt, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 50 bis 70 % aufweisen (3.2.1). Soll eine Immunfluoreszenzanalyse (3.3.7) durchgeführt werden, müssen die Zellen auf Deckgläschen (Ø 12 mm) ausgesät werden. Die Transfektionsansätze werden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers von *TransIT* angesetzt.

Pro well einer 6 well-Platte:	Ansatz I	3 µl <i>TransIT</i> /1 µg Plasmid-DNA
		100 µl Opti-MEM®
	Ansatz II	x µg DNA
		100 µl Opti-MEM®

Die Ansätze I und II werden zunächst getrennt 5 min bei RT inkubiert, miteinander vereint, dabei gründlich gemischt und erneut für 20 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wird das FCS-haltige Wachstumsmedium von den Zellen abgenommen und diese einmal mit auf 37 °C vorgewärmten DMEM (+Q) gewaschen. Anschließend werden pro well einer 6 well-Zellkulturplatte 2 ml warmes DMEM (+Q) vorgelegt, denen dann nach Ablauf der Inkubationszeit 200 µl des Transfektionsansatzes zugesetzt werden. Die Transfektion erfolgt anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 37 °C, nach denen die Transfektion der Zellen weitgehend abgeschlossen sein sollte, kann ein Mediumwechsel zu DMEM (+++) stattfinden.

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von N. Biedenkopf übernommen (Biedenkopf, 2007).

3.2.3 Transfektion von Hela-Zellen mit *Lipofectamine Plus*™

Das Funktionsprinzip des Transfektionsreagenz *Lipofectamine Plus*™ entspricht dem von *TransIT* (3.2.2): auch dieses Reagenz maskiert das negativgeladene Phosphatrückgrat der DNA durch kationische Lipide.

Die Hela-Zellen werden einen Tag vor der Transfektion so umgesetzt, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 50 bis 60 % aufweisen. Die Transfektionsansätze werden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers von *Lipofectamine Plus*™ angesetzt.

Pro well einer 6 well-Platte:	Ansatz I	4 µl <i>Lipofectamine</i> ™
		100 µl DMEM (+Q)
	Ansatz II	0,25 µg - 1 µg DNA
		100 µl DMEM (+Q)
		6 µl <i>Plus</i> -Reagenz™

Die Ansätze werden getrennt voneinander jeweils 15 min bei RT inkubiert, miteinander vereint, dabei gründlich gemischt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wird das FCS-haltige Wachstumsmedium von den Hela-Zellen abgenommen und die Zellen einmal vorsichtig mit DMEM (+Q) gewaschen. Anschließend wird auf ein well einer 6 well-Platte 2 ml DMEM (+Q) vorgelegt und nach

Ablauf der Inkubationszeit das Gemisch aus Ansatz I und II zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 37 °C im Brutschrank, nach denen die Transfektion der Zellen weitgehend abgeschlossen sein sollte, findet ein Mediumwechsel zu DMEM (+++) statt.

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005). Der wesentliche Unterschied besteht aus der Verwendung von Hela- anstatt HUH7-Zellen.

3.2.4 Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot

Damit Zellen mit Hilfe eines Western Blots analysiert werden können, werden die Zellen 24 h – 72 h p.t. einmal mit PBS_{def} gewaschen. Die Ernte der Zellen erfolgt nach Zugabe von 1 ml PBS_{def} pro well einer 6 well-Zellkulturschale und Abkratzen mit Hilfe eines Zellschabers. Die aufgenommenen Zellen werden in ein Eppendorfröhrchen überführt und 5 min bei 3000 Upm (800 xg) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in 1x *Passive Lysis Buffer* lysiert (3.2.5) und mit 4x Proteinprobenpuffer versetzt. Danach können die Proben auf eine SDS-PAGE (3.3.1.1) aufgetragen und durch einen Western Blot (3.3.1.2) analysiert werden.

3.2.5 Infektiöser Marburgvirus VLP-Assay

Bei diesem Assay werden infektiöse Virus-ähnliche Partikel (iVLP) generiert, die statt der genomischen Marburgvirus (MARV)-spezifischen RNA eine artifizielle Minigenom-RNA enthalten. Diese Minigenom-RNA ist aufgebaut aus den für die Transkription und Replikation notwendigen Leader- und Trailer-Regionen des MARV-Genoms, welche ein Reporter-gen (in dem Fall von 3M-5M-Luc die *Renilla* Luziferase) flankieren. Das Reporter-gen besitzt negative Orientierung und ermöglicht den Nachweis MARV-spezifischer Transkription und Replikation unter BSL1-Bedingungen. Zusätzlich werden Plasmide transfiziert, die für alle viralen Proteine codieren und für die Generierung von iVLPs benötigt werden. Außerdem wird ein für die Firefly Luziferase codierendes Plasmid (pGL4) unter Kontrolle eines SV40-Promotors transfiziert, mit dem die zelluläre Transkription dargestellt werden kann und so der Kontrolle und Normalisierung der Zelllysate dient.

HEK293-Zellen (ausgesät auf Poly-D-Lysin beschichteten Zellkulturschalen zu 60 %iger Konfluenz) werden mittels *TransIT* mit folgenden Plasmiden transfiziert (Passage 0 [p0]) (3.2.2). Das Transfektionsmedium muss nach 20-24 h gegen DMEM (+++) ausgetauscht werden.

Plasmid	Menge	Promotor
1) pCAGGS- NP	500 ng	β-chicken actin
2) pCAGGS- VP30	100 ng	β-chicken actin
3) pCAGGS- VP35	100 ng	β-chicken actin
4) pCAGGS- L	1000 ng	β-chicken actin
5) pCAGGS- VP40	500 ng	β-chicken actin
6) pCAGGS- VP24	70 ng	β-chicken actin
7) 3M- 5M- Luc	1000 ng	T7
8) pCAGGS- T7- Polymerase	500 ng	β-chicken actin
9) pGL4	100 ng	SV40
10) pCAGGS- GP (wt oder Mutanten)	500 ng	β-chicken actin

Analyse der iVLPs

Hierzu wird der Zellkulturüberstand vorsichtig abgenommen und, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen, bei 4 °C und 2500 Upm (971 xg) 10 min zentrifugiert.

In *UltraClear™* Zentrifugenröhrchen für SW40 (SW60) Ultrazentrifugen-Rotoren werden 2 ml (1 ml) einer 20 %igen Sucrose-Lösung (gelöst in TNE-Puffer) vorgelegt und vorsichtig mit dem zuvor zentrifugierten Zellkulturüberstand überschichtet. Die Zentrifugenröhrchen werden mit PBS_{def} aufgefüllt, austariert und in der Ultrazentrifuge für drei Stunden bei 4 °C und 36.000 Upm (164.000 xg) in einem SW40-Rotor oder 40.000Upm (164.000 xg) in einem SW60-Rotor zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand dekantiert, die Röhrchen vorsichtig trocken gewischt und das Pellet je nach Fragestellung resuspendiert in:

- a) 60 µl PBS_{def}
→ Analyse der iVLPs mittels Proteinase K-Verdau
- oder b) 500 µl DMEM (+Q)
→ Analyse der iVLPs mittels Infektion von HUH7-Zellen (Passage 1)
- oder c) 45 µl PBS_{def} + 15 µl 4x Proteinprobenpuffer
→ Analyse der iVLPs mittels Western Blot (3.3.1.2)
- oder d) 20 µl PBS_{def} + 10 µl PBS_{def}/4 % Paraformaldehyd
→ Analyse der iVLPs mittels Immunelektronenmikroskopie (3.3.8)
- oder e) 2 x 365 µl TNE-Puffer
→ Analyse mittels Aufreinigung von filamentösen und sphärischen Partikeln (3.2.7)

Proteinase K-Verdau von iVLPs (a)

Virale Proteine, welche durch die virale Membran umschlossen werden (z.B. Nukleocapsidproteine oder VP40), sind nicht zugänglich für Proteinase K (wie die hier verwendete Proteinase K), wohingegen das Oberflächenprotein GP durch Proteinase K angegriffen werden kann. Durch Permeabilisierung der Membranen mittels Behandlung mit dem Detergenz TritonX-100, können auch umhüllte Proteine durch Proteinase K abgebaut werden, so dass mittels dieser Methode die Integration viraler Proteine in iVLPs untersucht werden kann. Die Vorgehensweise ist wie folgt:

- 1) 20 µl iVLPs + 5 µl PBS_{def}
- 2) 20 µl iVLPs + 5 µl Proteinase K (1:20 in PBS_{def} [entspricht 0,15 U])
- 3) 20 µl iVLPs + 5 µl Proteinase K (1:20 in PBS_{def} + 1 % TritonX-100 [entspricht 0,15 U])

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wird die Proteinase K durch Zugabe von 1 µl PMSF (c = 100 mM) für 5 min bei RT inaktiviert. Die Ansätze werden mit 15 µl 4x Proteinprobenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und die Proben mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und anschließendem Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) analysiert.

Nachweis der Marburgvirus-spezifischen Transkription (p0)

Damit transfizierte HEK293-Zellen bezüglich Marburgvirus-spezifischer Transkription untersucht werden können, werden diese 72 h p.t. einmal mit PBS_{def} gewaschen, in 1 ml PBS_{def} abgelöst und bei 3.000 Upm (800 xg) für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Pellet in 150 µl 1x *Passiv Lysis Buffer* des *Dual Luciferase® Reporter-Assay Systems* resuspendiert und für 20 min bei RT schüttelnd aufgeschlossen. Die Lysate werden anschließend zentrifugiert (13.000 Upm (15.700 xg), 4 °C, 5 min), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Durchführung des *Dual-Luciferase® Reporter-Assays* bei -20 °C gelagert. Der Assay erfolgt in einem Lumimeter nach Angaben des Herstellers. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich die Aktivität des Reportergens, der *Renilla* Luziferase zu messen, welche ein Maß für die Marburgvirus-spezifische Transkription und Replikation darstellt. Zusätzlich kann die Aktivität der Firefly Luziferase (pGL4) gemessen werden, welche ein Maß für die zelluläre Transkription darstellt und der Kontrolle und Normalisierung der Zelllysate dient.

Infektion von HUH7-Zellen (Passage 1 [p1]) (b)

Die zu infizierenden HUH7-Zellen werden einen Tag vor der Transfektion ausgesät (40-50 % Konfluenz) und mittels *TransIT* (3.2.2) die Plasmide transfiziert, welche für die MARV-spezifischen Nukleocapsidproteine codieren. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da die

Signale, die nach der Infektion von nativen HUH7-Zellen gemessen wurden zu schwach waren, um reproduzierbar detektiert zu werden. Wenn während einer Infektion mit iVLPs die Nukleocapsidproteine schon exprimiert in den Zellen vorliegen, kommt es zu einer signifikanten Verstärkung des Signals des Reportergens, weil unter diesen Umständen die RNA des Minigenoms zusätzlich repliziert wird. Dadurch wird die Anzahl der für die Transkription verfügbaren Matrizen erhöht und die messbare Reportergenaktivität gesteigert.

Plasmid	Menge
1) pCAGGS- NP	500 ng
2) pCAGGS- VP30	100 ng
3) pCAGGS- VP35	100 ng
4) pCAGGS- L	1000 ng

Die ausgeschleusten und in DMEM (+Q) resuspendierten iVLPs werden 20-24 h p.t. zur Infektion der vortransfizierten HUH7-Zellen verwendet. Dabei werden HUH7-Zellen 1x mit DMEM (+Q) gewaschen, die resuspendierten iVLPs hinzugegeben und bei 37 °C für 1,5 h unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 2 ml DMEM (+Q) und 1 ml DMEM (++++) pro Ansatz und eine weitere Inkubation bei 37 °C für 65 Stunden.

Für die Ernte (p1) werden die Zellen einmal mit PBS_{def} gewaschen, in 1 ml PBS_{def} abgelöst, 5 min bei 3.000 Upm (800 xg) abzentrifugiert und schließlich in 150 µl 1x *Renilla Lysis Buffer* des *Renilla Luciferase Assay Systems* resuspendiert. Die Zellyse erfolgt bei RT während einer Inkubation von 20 min auf dem Schüttler. Nach einer erneuten Zentrifugation (13.000 Upm [15.700 xg], 4 °C, 5 min) wird der Überstand in das *Renilla-Luciferase Assay System* nach Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich die Aktivität des Reporters, der *Renilla* Luziferase zu ermitteln, welche ein Maß für die MARV-spezifische Transkription in den HUH7-Zellen anzeigt und somit auch einen Nachweis für die Infektion der Zellen durch die rekombinanten iVLPs liefert.

Die hier beschriebene Methode wurde mit einigen Veränderungen aus der Diplomarbeit von N. Biedenkopf übernommen (Biedenkopf, 2007). Die Abweichungen bestehen aus dem Austausch der für die Generierung von Ebolavirus- (EBOV-) spezifischen iVLPs zu der für die Generierung von MARV-spezifischen iVLPs nötigen Angaben.

3.2.6 Infektiöser EBOV VLP-Assay

Bei diesem infektiösen VLP-Assay werden iVLPs generiert, die statt der genomischen EBOV-spezifischen RNA eine artifizielle Minigenom-RNA enthalten. Diese enthält die für die Transkription und Replikation notwendigen Leader- und Trailer-Regionen des EBOV-Genoms und ein Reportergen in negativer Orientierung, das den Transkriptions- und Replikationsnachweis unter BSL1-Bedingungen ermöglicht.

HEK293-Zellen (p0) werden mittels *TransIT* mit folgenden Plasmiden transfiziert (3.2.2):

Plasmid	Menge	Promotor
1) pCAGGS- VP40	250 ng	β -chicken actin
2) pCAGGS- VP24	30 ng	β -chicken actin
3) pCAGGS- VP30	100 ng	β -chicken actin
4) pCAGGS- VP35	125 ng	β -chicken actin
5) pCAGGS- L	1000 ng	β -chicken actin
6) pCAGGS- NP	125 ng	β -chicken actin
7) 3E-5E-Luc	250 ng	T7
8) pCAGGS- T7-Polymerase	250 ng	β -chicken actin
9) pGL4	100 ng	SV40
10) pCAGGS- GP (wt oder Mutanten)	250 ng	β -chicken actin

Die Aufreinigung der iVLPs, der Nachweis der EBOV-spezifischen Transkription und die Infektion von HUH7-Zellen (p1) werden durchgeführt wie unter 3.2.5 beschrieben.

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Doktorarbeit von B. Hartlieb übernommen (Hartlieb, 2006).

3.2.7 Aufreinigung bzw. Auftrennung von filamentösen und sphärischen Partikeln aus Zellkulturüberstand

Nachdem die iVLPs wie unter 3.2.5 beschrieben über ein Sucrosekissen aufgereinigt und das Pellet in TNE-Puffer resuspendiert wurde, können die iVLPs vorsichtig auf einen frischen Nycodenz-Stufengradienten aufgetragen werden. Mit Hilfe dieses Gradienten ist es möglich, filamentöse und sphärische Partikel aus dem Zellkulturüberstand durch Zentrifugation voneinander zu trennen. In *UltraClear*TM-Zentrifugenröhrchen für SW60-Rotoren werden 730 μ l 30 % Nycodenz und je 490 μ l 20 %, 15 %, 10 %, 7.5 %, 5 % und 2.5 % Nycodenz (gelöst in TNE-Puffer) übereinander geschichtet (Abb. 11) und mit resuspendierten iVLPs überschichtet.

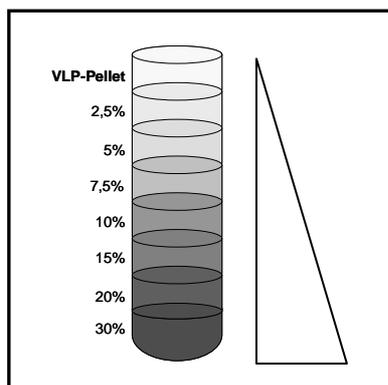


Abbildung 11: Herstellung eines Nycodenzstufengradienten

Die Nycodenz-Lösungen der unterschiedlichen Konzentrationen werden in den angegebenen Volumina vorsichtig in *UltraClear*TM-Zentrifugenröhrchen (für SW60-Rotoren) pipettiert und mit den iVLPs überschichtet. Während des Zentrifugationsschritts erfolgt die Auftrennung von filamentösen und vesikulären Membranen.

Der Zentrifugationsschritt erfolgt bei 16.000 Upm, bei 4 °C für 15 min. Von der Oberfläche des Gradienten werden sechs Fraktionen à 500 µl abgenommen, wobei die Fraktionen 1 bis 3 (sphärische Partikel) und die Fraktionen 4 bis 6 (filamentöse Partikel) in einem *Microfuge® Tube Polyallomer* TLA45-Röhrchen vereint werden. Es folgt eine weitere Ankonzentration der Partikel durch einen abschließenden Ultrazentrifugationsschritt in einem TLA45-Rotor bei 45.000 Upm für 2 h und 4 °C. Die dadurch ankonzentrierten Partikel werden in TNE-Puffer resuspendiert. Anschließend können die iVLPs mittels Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3), Lektinfärbung (3.3.6) oder Aufnahmeassay (3.2.9) untersucht werden.

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005).

3.2.8 Zell-Zell Fusionsassay

Virale Oberflächenproteine besitzen im viralen Kontext unter anderem die Aufgabe, durch Bindung an den zellulären Rezeptor die Fusion viraler mit zellulärer Membranen zu vermitteln und somit den Eintritt des Nukleocapsids in das Cytoplasma und anschließend Transkription und Replikation zu ermöglichen. Mit Hilfe des hier etablierten Assays wird analysiert, ob filovirale Glykoproteine, welche an der Zelloberfläche lokalisiert sind, eine Fusion zwischen Rezeptor-exprimierenden und Glykoprotein-präsentierenden Zellen vermitteln können. Bei der Etablierung dieses Systems wird ein bereits publizierter Assay modifiziert (Bär, 2006). Hela-Zellen (50 % Konfluenz) werden mittels *Lipofectamine Plus™* (3.2.3) mit folgenden Plasmiden transfiziert:

	Plasmid	Menge	Promotor
Ansatz I (6 well-Platten)	pCAGGS- T7- Polymerase	500 ng	β-chicken actin
	pCAGGS- MARV GP	1000 ng	β-chicken actin
	oder pCAGGS- EBOV GP	1000 ng	β-chicken actin
	oder phCMV- VSV G	1000 ng	CMV
Ansatz II (75cm ² -Flasche)	pTM1- Firefly Luziferase	8300 ng	T7

Die mit pTM1-Firefly Luziferase transfizierten Hela-Zellen (Ansatz II) werden 16-20 h p.t. zweimal mit PBS_{def} gewaschen und durch Zugabe von 5 ml *Cell Dissociation Buffer* und einer Inkubation bei 37 °C vom Flaschenboden abgelöst. Nach Zentrifugation der Zellen (200 xg, 5 min) wird das Pellet in DMEM (+++, 2 % FCS) gewaschen und abschließend in dem gleichen Medium resuspendiert. Die Zellen in Ansatz I werden 16-20 h p.t. zunächst mit DMEM (+++) und anschließend mit DMEM (+++, pH 5, 6 oder 7 [mit HCl frisch eingestellt und sterilfiltriert]) gewaschen. Nach einer anschließenden Inkubation der Zellen in DMEM (+++, pH 5, 6 oder 7) für 10 min bei RT, werden die Zellen einem Waschschrift mit DMEM

(+++ , 2 % FCS) unterzogen. Abschließend werden diese Zellen mit den Hela-Zellen des Ansatzes II überschichtet und 24 h bei 37 °C inkubiert. Bei der erwarteten Aktivierung der Glykoproteine (verursacht durch die Inkubation mit DMEM +++ pH 5, 6 oder 7) und somit Übergang der Glykoproteine in einen Fusions-kompetenten Zustand, ist auf einen schnellen Arbeitsablauf zu achten, da aufgrund der geringen Proteinstabilität die Fusionsaktivität schnell abnehmen kann. Am darauf folgenden Tag werden die Zellen mit PBS_{def} gewaschen, in 100 µl 1x *Passive Lysis Buffer* aufgeschlossen (3.2.5) und die Aktivität der Firefly Luziferase mit Hilfe des *Luciferase Assay Systems* in einem Luminometer nach Herstellerangaben gemessen. Die Aktivität der Firefly Luziferase stellt damit ein Maß für die stattgefundenen Fusionsereignisse zwischen Glykoprotein-exprimierenden (Ansatz I) und Rezeptor-präsentierenden Zellen (Ansatz II) dar.

3.2.9 Aufnahmeassay

Mit Hilfe des Aufnahmeassays können die Bindung und die Aufnahme von VLPs an oder in HEK293-Zellen vermittelt durch filovirale Oberflächenproteine analysiert werden. Bei der Durchführung des Versuchs orientieren wir uns an einem bereits etablierten Assay, der auf durch VP40 induzierten VLPs, welche filovirale Oberflächenproteine integrierten, beruht (Saeed et al., 2008). HEK293-Zellen (60 %ige Konfluenz in 75cm²-Zellkulturflaschen) werden mittels *TransIT* (3.2.2) mit folgenden Plasmiden transfiziert:

	Plasmid	Menge
1)	pCAGGS- EBOV NP	1000 ng
2)	pCAGGS- EBOV VP35	1000 ng
3)	pCAGGS- EBOV L	8300 ng
4)	pCAGGS- EBOV VP40	2000 ng
5)	pCAGGS- EBOV VP30- Luc	12.500 ng
6)	pCAGGS- EBOV GP/ MARV GP	2000 ng / 4000 ng

Das Transfektionsmedium kann nach 20-24 h gegen DMEM (++++) ausgetauscht werden. Um die freigesetzten VLPs aufzureinigen, wird der Zellkulturüberstand 72 h p.t. vorsichtig abgenommen und, um Zelldebris zu entfernen, bei 4 °C und 2500 Upm (971 xg) 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird in *UltraClear™* Zentrifugenröhrchen für SW32 Ultrazentrifugen-Rotoren überführt und vorsichtig mit 4 ml einer 20 %igen Sucrose-Lösung (gelöst in TNE-Puffer) unterschichtet. Die Zentrifugenröhrchen werden mit PBS_{def} aufgefüllt, austariert und in der Ultrazentrifuge für drei Stunden bei 4 °C und 30.000 Upm in einem SW32-Rotor zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand dekantiert, die Röhrchen vorsichtig trocken gewischt und das Pellet in 2x 365 µl TNE-Puffer gelöst. Die Separierung

sphärischer und filamentöser Partikel, sowie deren Ankonzentration erfolgt wie unter 3.2.7 dokumentiert. Die aufgereinigten Partikel werden in 75 µl TNE-Puffer resuspendiert und in folgende Analysen eingesetzt:

- a) 10 µl + 5 µl 4x Proteinprobenpuffer zur Western Blot Analyse (3.3.1.2, 3.3.1.3)
- b) 10 µl + 2,5 µl 5x *Passive Lysis Buffer* zur Ermittlung der Luziferaseaktivität
- c) 10 µl + 10 µl *Luciferase Assay Buffer* zur Ermittlung der Luziferaseaktivität
- d) 40 µl je 10 µl + 200 µl HEK293-Zellsuspension zum Einsatz in Zeitverlaufsanalysen

Die Inkubation der VLPs mit *Passive Lysis Buffer* (20 min, RT, schüttelnd [b]) führt zum Aufschluss der Membranen, so dass die Aktivität der Firefly Luziferase (gekoppelt an EBOV VP30) durch Einsatz in das *Luciferase Assay System* ermittelt werden kann. Dieses enthält Luziferin als Substrat der Firefly Luziferase. Dabei wurde folgendes Messprotokoll für das Luminometer verwendet:

Aktion	Zeit
Injektion 50 µl Substrat	-
Messung	10 sec

Die hier ermittelte Luziferaseaktivität entspricht der Gesamtaktivität der EBOV VP30-Luc, welche in VLPs eingebaut wird und welche wiederum in Zeitverlaufsanalysen eingesetzt werden.

Die Inkubation der VLPs mit *Luciferase Assay Buffer* (c) führt aufgrund der Abwesenheit von Detergenzien in diesem Puffer nicht zu einer Desintegration der VLP-Membranen. Durch Zugabe von Luziferin kann die Aktivität der Luziferase ermittelt werden, welche ein Maß für die Integrität der Partikel darstellt. Dabei wurde folgendes Messprotokoll für das Luminometer verwendet:

Aktion	Zeit
Injektion 50 µl Substrat	-
Pause	80 sec
Messung	10 sec

Die hier gemessene Luziferaseaktivität ist ein Maß für defekte VLP-Membranen (verursacht durch Aufreinigungs- oder Resuspensionsschritte) und damit ein Maß für den „Hintergrund“ der Firefly Luziferase Messung. Die Grundlage dieser Annahme ist, dass Luziferin, welches

durch Diffusion über Membranen gelangt, nicht durch die auf der Innenseite mit EBOV VP40 ausgekleidete VLP-Membran diffundieren kann.

Für den Aufnahmeassay selbst (d), werden HEK293-Zellen zweimal mit PBS_{def} gewaschen und durch Zugabe von 5 ml *Cell Dissociation Buffer* vom Flaschenboden abgelöst. Nach Zentrifugation der Zellen (200 xg, 5 min) wird das Pellet in DMEM (+Q) resuspendiert. Jeweils 10 µl der resuspendierten VLPs werden mit 200 µl Zellsuspension gemischt und bei 37 °C auf einem Drehrad 30, 60, 120 oder 180 min inkubiert. Nach Ablauf eines bestimmten Zeitintervalls werden die Zellen pelletiert (200 xg, 5 min), zweimal mit DMEM (+Q), einmal mit PBS_{def} gewaschen und abschließend in 100 µl Detergenzien-freiem *Firefly Assay Buffer* resuspendiert. Die Aktivitätsmessung der Firefly Luziferase erfolgt mit Hilfe des *Luciferase Assay Systems*, wobei das gleiche Messprotokoll wie für Messung (c) verwendet wird. Die enzymatischen Aktivitäten, die in den Zeitverlaufsanalysen gemessen werden, können gegen die in (b) ermittelte Gesamtaktivität normalisiert werden.

Die Zeitverzögerung nach Injektion des Firefly Substrats wird benötigt, da das Substrat über die intakte Zellmembran (keine Verwendung von Detergenzien) in das zelluläre Cytoplasma diffundieren muss, um dort durch die an das Nukleocapsid assoziierte Luziferase umgesetzt zu werden, was zu der messbaren Lichtemission führt. VLPs, welche nicht mit Glykoproteinen ausgestattet wurden, sind nicht dazu in der Lage, die Fusion von viraler mit endosomaler Membran zu vermitteln, was wiederum eine Freisetzung des Nukleocapsids in das Cytoplasma und somit eine Luziferaseaktivität verhindert.

3.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und deren Visualisierung

3.3.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden unter reduzierenden Bedingungen durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Proteine werden dabei mit SDS (Natriumdodecylsulfat) komplexiert und dadurch negativ geladen. Die negativen SDS-Protein-Komplexe wandern in einem Polyacrylamidgel nach Anlegen einer Spannung in Richtung Anode und trennen sich entsprechend ihrer Molekülgröße auf. Dabei zeigen kleine Proteine ein schnelleres Laufverhalten im Gel als Große. Das Gel besteht aus einem 4 %igen Sammelgel und, je nach Größe der aufzutrennenden Proteine, einem höherprozentigem Trenngel. In der vorliegenden Arbeit wird, wenn nicht anders angegeben, ein 10 %iges Trenngel verwendet.

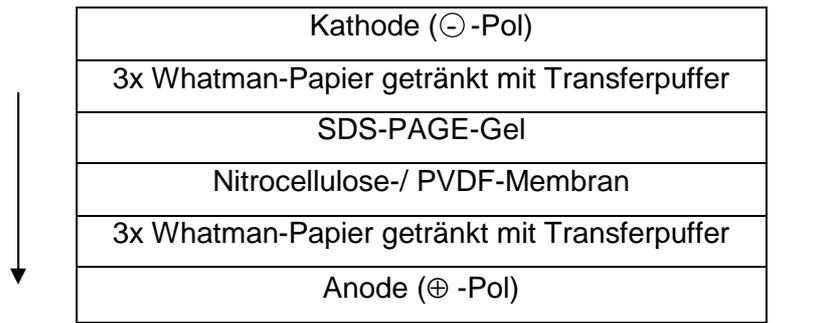
	Sammelgel 4 %	Trenngel 4 %	Trenngel 10 %
dH ₂ O	1,4 ml	2,95 ml	1,9 ml
30 % Polyacrylamid- Lösung (Rotiphorese® Gel 30)	0,33 ml	0,65 ml	1,7 ml
PAGE-Sammelgelpuffer	0,27 ml	-	-
PAGE-Trenngelpuffer	-	1,35 ml	1,35 ml
10 % APS	0,02 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	0,003 ml	0,002 ml

Da alle Proteine beim Eintritt in das höherprozentige Trenngel zunächst in ihrem Laufverhalten verlangsamt werden, ist die Auftrennung der Proteine ihrer Größe nach gewährleistet. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden, wird ihnen eine entsprechende Menge 4x Proteinprobenpuffer zugesetzt, die Proben (teilweise) bei 95 °C für 5 min inkubiert und damit die Proteine denaturiert. Neben den Proben wird ein Größenmarker aufgetragen, der die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine ermöglicht. Die Gelelektrophorese erfolgt in einer Biorad®-Minigelkammer mit 1x Proteingellaufpuffer bei 20 mA pro Gel und maximaler Spannung. Anschließend erfolgt zur Analyse der Proben ein Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3).

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005).

3.3.1.2 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Der Western Blot stellt mit einer Nachweisgrenze von 1 pg Protein eine empfindliche Nachweismethode für Proteine dar. Dafür werden diese zunächst mittels SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt (3.3.1.1) und anschließend während der Transferierung auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran irreversibel gebunden, so dass die Proteine immunologischen Nachweisreaktionen zugänglich werden. Zur Durchführung eines Western Blots nach dem Semi-Dry-Blot-Prinzip werden sowohl die Nitrocellulose- oder PVDF-Membran als auch pro Western Blot sechs Blätter Whatman-Papier (6x8 cm) mit Transferpuffer benetzt. Die PVDF-Membran wird vor dem Transfer in 100 %igen Methanol eingelegt und anschließend zur Entfernung des Methanols mit Transferpuffer äquilibriert. Die Nitrocellulose-Membran muss lediglich mit Transferpuffer benetzt werden und darf nicht in Methanol eingelegt werden. Der Western Blot zeigt in einer *Biorad*-Apparatur folgenden Aufbau:



Durch Überrollen mit einer Plastikpipette werden Luftblasen entfernt, um eine vollständige Übertragung der Proteine auf die Membran zu gewährleisten. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgt für 40 min bei 20 V und maximaler Stromstärke.

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005).

3.3.1.3 Antikörperfärbung des Western Blots und Detektion des Antikörpers

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran nach dem Proteintransfer für mindestens eine Stunde bei RT auf dem Schüttler oder über Nacht bei 4 °C in PBS_{def} versetzt mit 10 % Magermilchpulver inkubiert. Im Anschluss wird die Membran 3x10 min mit PBS_{def} gewaschen und für 1 h bei RT mit einem proteinspezifischen Erstantikörper inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen der Membran für je 10 min in PBS_{def}/0,1 % Tween[®]20 entfernt. Im nächsten Schritt wird die Membran entweder eine Stunde bei RT unter Schwenken mit einem geeigneten Peroxidase (POD/HRP)-gekoppelten Zweitantikörper oder lediglich für 45 min mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper im Dunkeln inkubiert. Abschließend folgen 3x10 min Waschen mit PBS_{def}/0,1 % Tween[®]20.

Die Detektion der POD-gekoppelten Zweitantikörper erfolgt mit Hilfe von Chemolumineszenz. Dazu wird die Membran auf Folie gelegt, zu gleichen Teilen *SuperSignal[®] West Dura Peroxide Buffer*, bei sehr schwachen Signalen *SuperSignal[®] West Femto Peroxide Buffer* und *Luminol/Enhancer-Solution* gemischt, auf der Membran verteilt und diese mit einer zweiten Folie bedeckt. Nach einer 5minütigen Inkubation wird die Membran luftblasenfrei in Folie eingeschweißt und in der Dunkelkammer je nach Signalstärke auf einem Röntgenfilm exponiert; anschließend findet die Entwicklung des Röntgenfilms mit Hilfe der automatischen Entwicklermaschine *Optimax 2010* statt.

Die Detektion der Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper erfolgt direkt durch Messung der Fluoreszenz mit dem *LiCor Odyssey Infrared Imaging System*. Dieses Gerät enthält zwei Laser, die mit einer Wellenlänge von 680 nm und 800 nm dazu in der Lage sind, zwei Fluorophore bei ihrem Absorptionsmaximum von 680 nm (*Alexa Fluor[®]680*) und 800 nm (*IRDye[™]800*) gleichzeitig anzuregen.

Folgende Antikörper mit ihren entsprechenden Verdünnungen wurden in den Western Blot-Analysen verwendet:

Erstantikörper	Verdünnung
α -MARV GP (50-6-10), monoklonal, Maus	1:200
α -MARV GP (19-12-8-2), monoklonal, Maus	1:100
α -MARV VP40 (40-2-2), monoklonal, Maus	1:200
α -MARV NP (59-9-10), monoklonal, Maus	1:200
α -MARV (Musoke) (37/6; 03.03.2004), polyklonal, Ziege	1:3000
α -EBOV GP (1G12; Celline; 04.2000), monoklonal, Maus	1:200
α -EBOV VP40 (2C4, 60 μ g/ml), monoklonal, Maus	1:100/ 1:200
α -Ebov GP/NP (19.06.97), polyklonal, Ziege	1:7500
α -Firefly Luziferase (L2164), monoklonal, Maus	1:150
α -VSV G (mcmA), monoklonal, Maus	1:25
Zweitantikörper	Verdünnung
Ziege α -Maus, HRP-gekoppelt, polyklonal (H+L)	1:30.000
Esel α -Ziege, HRP-gekoppelt, polyklonal (H+L)	1:30.000
Ziege α -Maus, <i>AlexaFluor</i> [®] 680-gekoppelt (H+L)	1:5000
Pferd α -Digoxigenin, POD-gekoppelt, Fab Fragment	1:3000

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005); ausgenommen davon sind die verwendeten Antikörper (siehe Tabelle).

3.3.2 Affinitätsreinigung von MARV VP40-Antikörpern

Um einen zusätzlichen Antikörper gegen MARV VP40 (neben aus Kaninchen und aus Mäusen gewonnenen IgGs) zur Verfügung zu haben, sollte aus einem polyklonalen Serum (α -MARV 37/6, Ziege) ein spezifischer VP40-bindender Antikörper mittels Affinitätsreinigung isoliert werden.

HEK293-Zellen werden zur Produktion von VP40-generierten VLPs mittels *Lipofectamine Plus*TM mit pCAGGS-MARV VP40 transfiziert (3.2.3), die VLPs 48 h p.t. mittels Zentrifugation über ein 20 %iges Sucrosekissen aufgereinigt, in 45 μ l PBS_{def} resuspendiert und mit 15 μ l 4x Proteinprobenpuffer versetzt. Die VLP-Suspension wird auf eine präparative SDS-PAGE (3.3.1.1) aufgetragen und mittels Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) auf eine PVDF-Membran transferiert. Durch die Inkubation eines Membranstreifens mit dem α -MARV Serum (37/6) und einem POD-gekoppelten Esel α -Ziege IgG mit anschließend durchgeführter Chemolumineszenz, kann die genaue Lokalisation von VP40 auf der PVDF-Membran bestimmt werden. Die VP40-Bande wird ausgeschnitten und zur Fixierung der Proteine vollständig bei

RT getrocknet. Vor der Affinitätsreinigung werden die Membranstreifen kurz in Methanol geschwenkt, um sie für Wasser benetzbar zu machen und anschließend wird unzureichend gebundenes Protein durch fünfminütiges Waschen in saurem Glycin-Puffer (100 mM Glycin in 1 M TrisHCl, pH 2.5) entfernt. Nach zweimaligem Waschen in TBS wird die Membran durch eine einstündige Inkubation in TBS (versetzt mit 3 % BSA) blockiert, anschließend wiederum zweimal in TBS gewaschen und klein geschnitten in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Das α -MARV Ziegenserum (37/6) wird in TBS-Puffer verdünnt (1:10, Gesamtvolumen 1 ml) und drei Stunden bei RT auf dem Überkopffrotierer mit den Blotstücken inkubiert. Nachdem die Serumverdünnung abgenommen wurde (Lagerung bei 4 °C), folgt ein 2x fünfminütiges Waschen der Membranstücke in TBS und 2x fünfminütiges Waschen in PBS_{def}. Zur Elution der gebundenen Antikörper werden die Membranstücke 10 min in 1 ml saurem Glycin-Puffer, pH 2.5 bei RT langsam geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wird der Puffer abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und sofort mit 1 M Tris/HCl, pH 8 auf einen pH-Wert von 7,0 neutralisiert. Der Elutionsschritt wird ein zweites Mal wiederholt, die neutralisierten Eluate vereinigt und zur Stabilisierung des Antikörpers mit BSA (Endkonzentration 1 mg/ml) versetzt. Anschließend konnte ein zweiter Aufreinigungsschritt mit der bei 4 °C gelagerten Serum-TBS-Verdünnung durchgeführt werden. Der so gereinigte Antikörper konnte im Folgenden für Immunfluoreszenzanalysen (3.3.7) verwendet werden.

Die hier beschriebene Methode wurde überwiegend aus der Doktorarbeit von S. Bamberg übernommen (Bamberg, 2004).

3.3.3 Chemische Vernetzung (Crosslinking) von Proteinen

Im Golgi-Apparat werden Monomere des MARV Glykoproteins kovalent zu Trimeren zusammen gelagert, welche in Membranen der iVLPs integriert werden. Um den Oligomerisierungsstatus von in iVLPs eingebauten GP zu untersuchen, werden Crosslinking-Experimente durchgeführt.

HEK293-Zellen werden mit Plasmiden, die zur Generierung von MARV iVLPs benötigt werden, transfiziert (3.2.2, 3.2.5), die iVLPs aufgereinigt (3.2.5) und in 50 μ l PBS_{def} resuspendiert. Je 10 μ l resuspendierte iVLPs werden mit verschiedenen Konzentrationen von Ethylen-glycol-bis [succinimidylsuccinat] kurz EGS (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM in dH₂O; EGS vorgelöst in DMSO) und aufgefüllt mit Hepespufer für 30 min bei RT vernetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 μ l 1 M Tris/HCl, pH 8 und einer Inkubation von 5 min abgestoppt. Die Proben werden mit 4x Proteinprobenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und mittels 4 %iger SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) analysiert.

wird die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit Blockierlösung (enthalten im Kit, Verdünnung 1:10 in TBS-Puffer, pH 7.5) inkubiert. Anschließend wird die Membran zweimal 10 min in TBS-Puffer und einmal 10 min mit Puffer I (1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂ in TBS, pH 7.5) gewaschen. Die Lektine werden entsprechend der Angaben des Herstellers in Puffer I verdünnt und die Membranen darin 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem Waschschrift von 3x10 min in TBS, werden die Membranen mit α -Marv NP (59-9-10, 1:100 in TBS) 1 h bei RT inkubiert (benötigt zur späteren Quantifizierung der eingesetzten iVLPs). Danach wird die Membran erneut 3x10 min mit TBS gewaschen und abschließend 1 h mit einem POD-gekoppelten α -DIG Antikörper und einem *AlexaFluor*[®] 680-gekoppelten α -Maus IgG inkubiert. Nach Waschen der Membran 3x10 min in TBS, werden der Chemolumineszenztest und die Quantifizierung der Banden am *LiCor Odyssey Infrared Imaging System* (3.3.1.3) durchgeführt wie bereits beschrieben.

3.3.7 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Zur Untersuchung der intrazellulären oder oberflächlichen Lokalisation von Proteinen bedient man sich der indirekten Immunfluoreszenzanalyse. Das Prinzip beruht auf zwei Antigen-Antikörper-Bindungen: Der Erstantikörper erkennt und bindet das Zielprotein in der Zelle; der Zweitantikörper ist gegen den Erstantikörper gerichtet und durch einen Fluoreszenzfarbstoff modifiziert. Dieser wird durch das UV-Licht des Fluoreszenzmikroskops angeregt, wodurch die Lokalisation des Proteins angezeigt wird.

Für Immunfluoreszenzanalysen werden HUH7-Zellen auf runden Deckgläsern (\varnothing 12 mm) in 6 well-Zellkulturplatten kultiviert (50 % Konfluenz) und mittels *TransIT* (3.2.2) mit Plasmiden transfiziert, die für die zu untersuchenden Proteine codieren.

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von N. Biedenkopf übernommen (Biedenkopf, 2007).

3.3.7.1 Immunfluoreszenzanalyse von intrazellulären Proteinen

Nach der Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank, werden die Zellen auf den Deckgläsern 3x5 min mit PBS_{def} gewaschen und anschließend mindestens 30 min in DMEM/4 % PFA fixiert. Die Fixierungslösung wird durch 3x5 min Waschen mit PBS_{def} entfernt. Zur Neutralisation der Aldehydgruppen des Paraformaldehyds werden die Zellen 10 min mit 100 mM Glycin/PBS_{def} inkubiert und schließlich zur Permeabilisierung der Zellmembranen 10 min mit 0,1 % Triton-X100/PBS_{def} behandelt. Die Zellen werden erneut mit PBS_{def} gewaschen und mit Blockierungspuffer für Immunfluoreszenzen überschichtet, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Die fixierten und permeabilisierten Zellen werden mit dem ersten antigenspezifischen Antikörper für eine Stunde in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert, wofür 20 μ l des verdünnten Antikörpers auf Parafilm gegeben und die Deckgläser mit der zellbewachsenen Seite darauf gelegt werden. Anschließend werden die

Deckgläser 3x5 min mit PBS_{def} gewaschen und für 1 Stunde mit 20 µl des verdünnten Zweitantikörpers und DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Anfärbung der Zellkerne), wie oben beschrieben, inkubiert. Der Zweitantikörper ist gekoppelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff und spezifisch gegen den ersten Antikörper gerichtet. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS_{def} werden die Deckgläser kurz in dH₂O getaucht und mit der zellbewachsenen Seite nach unten mittels *Fluoprep (+DABCO)* auf einem Objektträger eingedeckt. Nach dem Trocknen der Eindeckflüssigkeit können die gefärbten Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (*Axiovert 200M*) untersucht werden.

3.3.7.2 Native Immunfluoreszenzanalyse von Oberflächenproteinen

Die Immunfluoreszenzanalyse von Oberflächenproteinen erfolgt ähnlich wie die von intrazellulären Proteinen (3.3.7.1); dabei ist darauf zu achten, dass die gesamte Durchführung bei 4 °C stattfindet. Unfixierte Zellen werden 24 h p.t. vorsichtig 3x5 min mit 4 °C kaltem PBS_{def} gewaschen und anschließend mit dem spezifischen Erstantikörper für eine Stunde dunkel inkubiert. Danach erfolgen drei Waschschrte für 5 min mit PBS_{def}. Nach Fixierung der Zellen mit DMEM/4 % PFA für 10 min, Neutralisation mit 100 mM Glycin/PBS_{def} und Überschichtung mit dem Blockierungspuffer für Immunfluoreszenzen erfolgt die weitere Verarbeitung der Deckgläschen wie unter 3.3.7.1 beschrieben.

Folgende Antikörper mit entsprechenden Verdünnungen werden in dieser Arbeit verwendet:

Erstantikörper	Verdünnung
α MARV GP (glykosyliert, 3/95, 11.09.1996), Kaninchen	1:75
α MARV GP (50-6-10), monoklonal, Maus	1:100
α MARV VP40 (40-2-2), monoklonal, Maus	1:100
α MARV VP40 (affinitätsgereinigt aus 37/6), polyklonal, Ziege	1:10
α MARV (Musoke) (37/6; 03.03.2004), polyklonal, Ziege	1:50
α-EBOV GP/NP (19.06.97), polyklonal, Ziege	1:200
α-VSV G (mcmA), monoklonal, Maus	1:5
Zweitantikörper	
Esel α-Maus (H+L), <i>TexasRed</i> [®] -gekoppelt	1:100
Esel α-Ziege (H+L), RhodaminRed [™] -X-gekoppelt	1:100
Ziege α-Maus (H+L), Rhodamin-gekoppelt	1:100
Esel α-Kaninchen (H+L), <i>TexasRed</i> [®] -gekoppelt	1:100
Esel α-Ziege (H+L), FITC-gekoppelt	1:100
Esel α-Maus (H+L), FITC gekoppelt	1:100
DAPI	1:10.000

Die hier beschriebenen Methoden (3.3.7.1, 3.3.7.2) wurden aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005); ausgenommen davon sind die verwendeten Antikörper (siehe Tabelle).

3.3.8 Indirekte Immunelektronenmikroskopie

Um die Morphologie bzw. den Einbau von viralen Glykoproteinen in iVLPs zu untersuchen, können diese durch ein 20 %iges Sucrosekissen aufgereinigten iVLPs (3.2.5) mittels Immunelektronenmikroskopie analysiert werden.

Auf kleine zuerst mit einer Schicht aus 3 %igem Formvar in Chloroform und danach mit einer Schicht Kohlenstoff beschichtete Nickelgrids, werden 20 µl der vorbereiteten iVLPs (3.2.5) aufgebracht und je nach Konzentration 5 min bis 12 h darauf belassen. Während dieser Inkubationszeit findet die Anheftung über die Membranen der iVLPs an die Oberfläche der Nickelgrids statt; diese Anheftung kann durch eine einminütige Vorinkubation der Nickelgrids mit 1 % Alcian Blue 8GX verbessert werden. Die überschüssige Flüssigkeit wird vorsichtig vom Rand her mit Filterpapier abgesaugt. Durch eine 10minütige Inkubation der Grids mit dem Blockierungspuffer für Immunelektronenmikroskopie in einer feuchten Kammer, werden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Es folgt die Inkubation mit dem Erstantikörper (α MARV GP [50-6-10], 1:50 in Blockierungspuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Im Anschluss werden die Grids 6x2 min mit PBS_{def} gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper (Ziege α Maus IgG gekoppelt mit 5 nm-Goldpartikeln, 1:30 in Blockierungspuffer) für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen der Grids für 6x2 min mit PBS_{def}, erfolgt die Fixierung der Bindung zwischen dem Protein, Erst- und Zweitantikörper durch zehninütiges Auflegen der Grids in 0,25 % Glutaraldehyd/PBS_{def}. Nach zweimaligem Waschen für zwei Minuten in PBS_{def}, erfolgt die Kontrastierung mit 2 % Phosphorwolframsäure (gelöst in dH₂O, pH 7.2) für höchstens zwei Minuten. Anschließend werden die fertig behandelten Grids mit der iVLP-tragenden Seite nach oben auf ein Filterpapier gelegt, wodurch die überschüssige Phosphorwolframsäure abgesaugt wird und bis zur Betrachtung im Elektronenmikroskop in Glas-Petrischalen aufbewahrt.

Die hier beschriebene Methode wurde aus der Diplomarbeit von E. Mittler übernommen (Mittler, 2005); hinzugefügt wurden die Vorbehandlung der Grids mit 1 % Alcian Blue 8GX und die verwendeten Antikörper.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von MARV GP Δ CD

Um die Bedeutung der cytoplasmatischen Domäne des MARV Glykoproteins GP für dessen intrazellulären Transport bzw. dessen posttranslationale Modifikationen zu ermitteln, wurde mittels PCR (3.1.1) eine Mutante von MARV GP ohne cytoplasmatische Domäne (CD) hergestellt (Abb. 12A). Das mutierte Glykoprotein sollte im Vergleich zu dem wildtypischen MARV Glykoprotein hinsichtlich der Expression und Lokalisation in transfizierten Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz- und Western Blot Analysen charakterisiert werden. Als Typ I Transmembranprotein (Will et al., 1993) wird das MARV GP während der Translation in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) integriert und gelangt durch Nutzung des klassischen sekretorischen Transportwegs an die Zelloberfläche (Becker, et al., 1996; Kolesnikova et al., 2004b; Will et al., 1993).

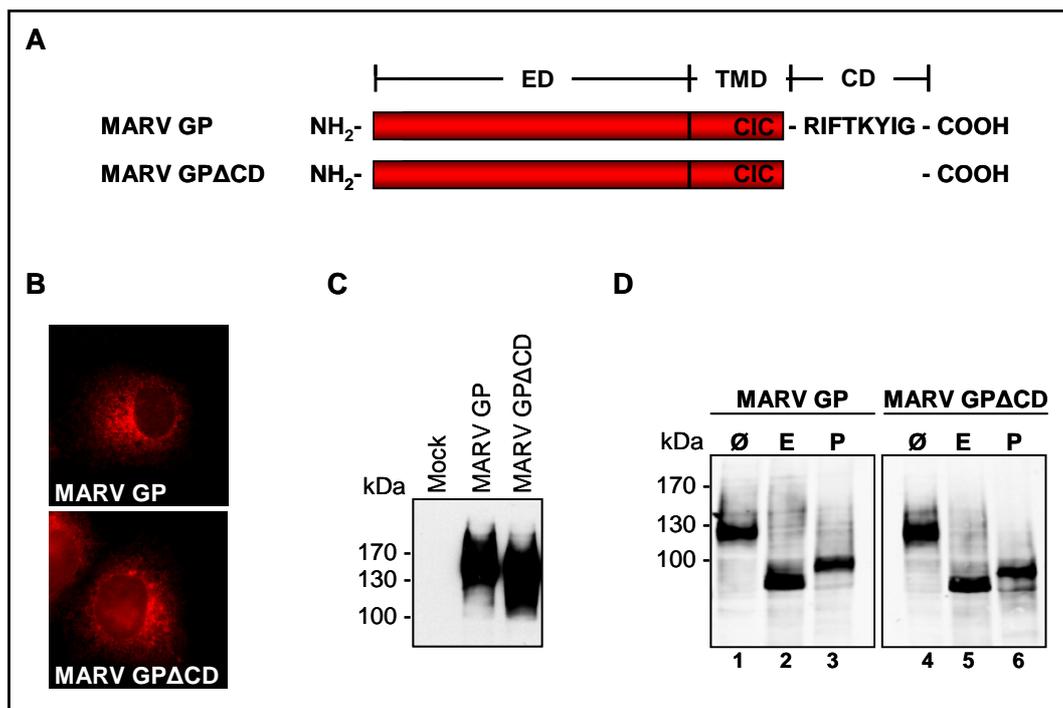


Abbildung 12: Einfluss der cytoplasmatischen Domäne von MARV GP auf dessen intrazelluläre Verteilung und posttranslationale Modifikationen

(A) Schematische Darstellung der durch inverse PCR hergestellten MARV GP Mutante ohne cytoplasmatische Domäne (MARV GP Δ CD). Dabei wurde folgende Nomenklatur verwendet: Ektodomäne (ED), Transmembrandomäne (TMD) und cytoplasmatische Domäne (CD). (B) Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von MARV GP und GP Δ CD. Subkonfluente HUH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV GP bzw. GP Δ CD transfiziert, 24 h p.t. fixiert, permeabilisiert und einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. Die Glykoproteine wurden mit einem monoklonalen α -MARV GP Antikörper (50-6-10) und einem Rhodamin-gekoppelten Ziege α -Maus-Antikörper detektiert. (C) Western Blot Analyse der zellulären Expression von MARV GP und GP Δ CD. Subkonfluente HEK293-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV GP bzw. GP Δ CD transfiziert, 65 h p.t. geerntet, lysiert und eine 10 %ige SDS-PAGE wurde durchgeführt. Während des Western Blots wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit einem monoklonalen α -MARV GP Antikörper (50-6-10) und einem HRP-gekoppelten Ziege α -Maus Antikörper markiert. (D) Western Blot Analyse des N-Glykosylierungsmusters von MARV GP und GP Δ CD. HEK293-Zellen wurden transfiziert, geerntet und lysiert wie unter (C) beschrieben. Die

Zelllysate wurden mit den Endoglykosidasen Endo H (E, Spur 2 und 5) oder PNGase F (P, Spur 3 und 6) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde weiter verfahren wie unter Punkt (C) aufgeführt.

Im Falle der Immunfluoreszenzanalyse wurden subkonfluente HUH7-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA (pCAGGS-MARV GP oder GP Δ CD) transfiziert (3.2.2), 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt (3.3.7.1). Vergleicht man die intrazelluläre Verteilung der Glykoproteine, so kann man deutlich erkennen, dass GP Δ CD ähnlich wie GP eine starke perinukleäre Lokalisation aufwies (Abb. 12B), was einer Lokalisation im ER oder Golgi-Apparat entspricht. Somit kann man davon ausgehen, dass GP Δ CD vergleichbar mit dem wildtypischen GP unabhängig von der Anwesenheit der cytoplasmatischen Domäne über ihren Transmembrananker cotranslational in die Membran des ERs integriert wurde und die ersten Schritte entlang des sekretorischen Transportwegs durchlief.

Im Falle der Western Blot Analyse (Abb. 12C) wurden subkonfluente HEK293-Zellen mit pCAGGS-MARV GP oder GP Δ CD transfiziert (3.2.2), nach 65 h p.t. lysiert (3.2.4), die Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.3.1.1) und über einen Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) analysiert. Anhand der Western Blot Analyse ist ersichtlich, dass beide Glykoproteine ähnlich effizient in HEK293-Zellen exprimiert wurden und eine vergleichbare Größe aufwiesen (ca. 130-150 kDa), was wiederum mit der in Zelllysaten am prägnantesten auftretenden Form, der so genannten ER-Form des GP (GP_{ER}) korreliert und auf ähnliche posttranslationale Modifikationen im ER schließen lässt.

Um diese posttranslationalen Modifikationen, hier die N-Glykosylierung der Oberflächenproteine genauer zu untersuchen und Rückschlüsse auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster ziehen zu können, sollten rekombinant exprimierte Glykoproteine mit den Endoglykosidasen Endo H und PNGase F behandelt werden. Dafür wurden HEK293-Zellen wie oben beschrieben transfiziert, lysiert, anschließend wie unter 3.3.4 und 3.3.5 dokumentiert mit den Endoglykosidasen inkubiert und mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) analysiert.

Die Behandlung mit Endo H (Abb. 12D, Spur 2 und 5) verursacht eine Abspaltung von mannosereichen N-glykosidisch gebundenen Glykanen von einem Polypeptid. Diese Behandlung führte sowohl beim wildtypischen GP als auch mutierten GP Δ CD zu einer signifikanten Änderung des Laufverhaltens in der SDS-PAGE, die auf die Abspaltung der mannosereichen N-glykosidischen Zuckerseitenketten zurückzuführen ist. Ähnliches kann man auch bei einer Behandlung mit PNGase F beobachten (Abb. 12D, Spur 3 und 6). PNGase F spaltet sowohl mannosereiche als auch komplexe N-Glykane, welche in einer späteren Phase des sekretorischen Transportwegs im Golgi-Apparat aufgebaut werden, von dem Polypeptid. Beide Glykoproteine sind vollständig sensitiv gegenüber einem Verdau mit

Endo H bzw. PNGase F d.h., dass es sich bei den in Western Blot Analysen detektierbaren Glykoproteinen überwiegend um GP_{ER}-Formen, d.h. mannosereiche Formen handelt.

4.1.1 Untersuchung der Coexpression von MARV VP40 und GP bzw. GP Δ CD

MARV GP und MARV VP40 werden bei solitärer rekombinanter Expression über zwei unterschiedliche Transportrouten an die zelluläre Oberfläche befördert. Das Glykoprotein wird über den klassischen sekretorischen Transportweg (Becker et al., 1996; Kolesnikova et al., 2004b), das Matrixprotein hingegen über den retrograden späten endosomalen Transportweg an die Oberfläche transportiert (Kolesnikova et al., 2004a). Werden beide Proteine coexprimiert oder eukaryotische Zellen mit MARV infiziert, wird das Glykoprotein aus dem Trans Golgi Netzwerk (TGN) in VP40-enhaltende MVB transportiert, was zu einer Colokalisation beider Proteine in den MVB führt (Kolesnikova et al., 2004b; Mittler et al., 2007).

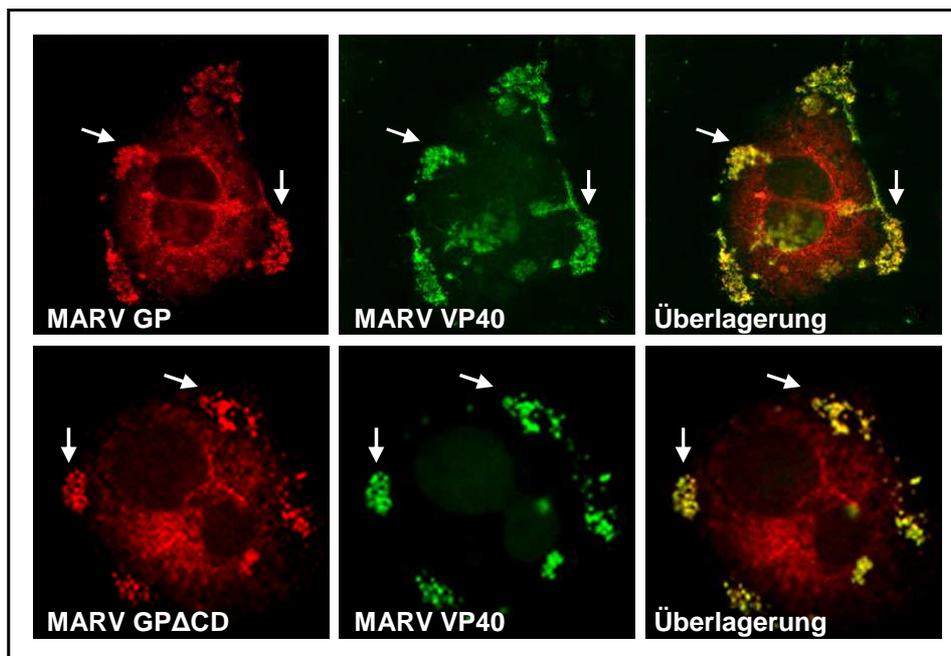


Abbildung 13: Immunfluoreszenzanalyse der Coexpression von MARV VP40 und MARV GP bzw. GP Δ CD

Subkonfluente HUH7-Zellen wurden mit pCAGGS-MARV VP40 und -MARV GP bzw. GP Δ CD im Verhältnis 4:1 transfiziert, 24 h p.t. fixiert und permeabilisiert. MARV VP40 wurde mit einem aus Ziege α -MARV Serum (37/6) affinitätsgereinigten α -VP40 und einem FITC-gekoppelten Esel α -Ziege Antikörper (obere Reihe) oder einem monoklonalen Maus α -MARV VP40 (40-2-2) und einem FITC-gekoppelten Esel α -Maus Antikörper (untere Reihe) detektiert. Die Glykoproteine wurden mit einem Kaninchen α -MARV GP und einem Texas Red[®]-gekoppelten Esel α -Kaninchen Antikörper markiert. Pfeile markieren periphere Cluster, in denen eine Colokalisation von MARV VP40 und MARV GP bzw. GP Δ CD beobachtet werden konnte.

Die Bedeutung der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP für die Colokalisation mit MARV VP40 sollte untersucht werden. Für die Colokalisationsstudien wurden subkonfluente HUH7-Zellen mit pCAGGS-MARV VP40 und -MARV GP bzw. GP Δ CD transfiziert (3.2.2). Für die Cotransfektion wird hier das Verhältnis 1:4 für die Proteine GP:VP40 verwendet, da die

Proteine dadurch in dem Verhältnis exprimiert werden, das dem Verhältnis in einer MARV-infizierten Zelle entspricht (Kolesnikova et al., 2004a).

Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit den entsprechenden Antikörpern detektiert, wie unter 3.3.7.1 beschrieben. Wie in Abbildung 13 sichtbar ist, colokalisieren sowohl GP als auch GP Δ CD deutlich mit VP40 in den cytoplasmatischen Clustern, die MVB entsprechen. Dabei ist die Colokalisation allerdings nicht vollständig, da perinukleäre Signale der Glykoproteine, die einer Anreicherung im ER und im Golgi-Apparat entsprechen (ähnlich wie in der solitären Expression), nicht mit VP40-Signalen überlappen. Das bedeutet, dass GP Δ CD in Anwesenheit von VP40 genau wie das wildtypische GP in die späten Endosomen rekrutiert wird d.h. den gleichen intrazellulären Transport in HUH7-Zellen zeigt.

4.2 Analyse der Integration von MARV GP Δ CD in iVLPs

Die Rolle der cytoplasmatischen Domäne viraler Oberflächenproteine für deren Einbau in virale Partikel bzw. die Morphologie der Partikel wird sehr unterschiedlich diskutiert. Für das Hämagglutinin (HA) des Influenzavirus wurde nur ein sehr geringer Einfluss der cytoplasmatischen Domäne auf den Einbau in Virionen oder deren Morphologie berichtet (Jin, et al., 1994), wohingegen der Einbau der Neuraminidase (NA) ohne cytoplasmatische Domäne nur reduziert erfolgte (Garcia-Sastre and Palese, 1995; Mitnaul et al., 1996). Dabei wurde auch die virale Morphologie stark beeinflusst: statt charakteristischer sphärischer waren nun pleomorphe bis filamentöse Partikel zu beobachten (Jin et al., 1997)..

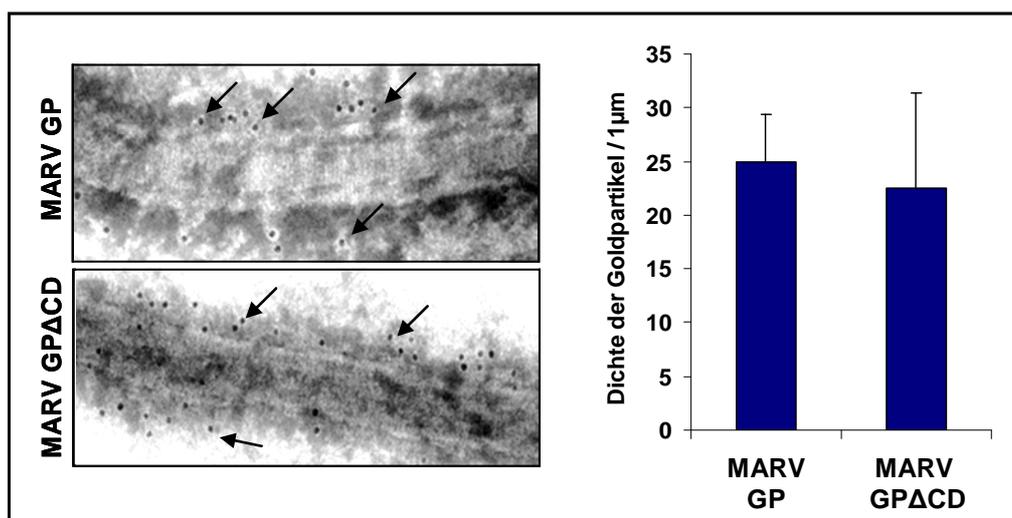


Abbildung 14: Einbau von MARV GP Δ CD in iVLPs

HEK293-Zellen wurden mit allen für die Generierung von iVLPs benötigten Plasmiden (einschließlich Plasmiden codierend für MARV GP oder GP Δ CD) transfiziert, 65 h p.t. wurde das im Überstand befindliche partikuläre Material durch Ultrazentrifugation durch ein Sucrosekissen aufgereinigt. Die resuspendierten iVLPs wurden einer quantitativen immunoelektronenmikroskopischen Analyse unterzogen. Dafür wurden die iVLPs wie unter 3.3.8 beschrieben vorbereitet und die Detektion der Glykoproteine erfolgte mit einem monoklonalen Maus α -MARV GP Antikörper (50-6-10) und einem Ziege α -Maus Antikörper gekoppelt mit 5 nm-Goldpartikeln. Die Quantifizierung

der Markierung (d.h. Quantifizierung des Einbaus von MARV GP bzw. GP Δ CD) erfolgte durch Auszählen der Goldpartikel pro μm iVLP ($n = 11$). Die Elektronenmikroskopie wurde von Dr. L. Kolesnikova durchgeführt.

Zusätzlich konnte sowohl bei dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV), als auch bei dem Rabies Virus eine drastische Reduktion der Partikelfreisetzung bei Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne der Oberflächenproteine ermittelt werden (Mebatsion et al., 1996; Schnell et al., 1998).

Unter Verwendung einer quantitativen immunelektronenmikroskopischen Untersuchung sollte analysiert werden, ob die Deletion der cytoplasmatischen Domäne Einfluss auf die Integration des Glykoproteins in iVLPs und deren Morphologie haben könnte. Bei dieser Analyse sollten freigesetzte iVLPs direkt durch Markierung mit spezifischen Antikörpern und kolloidalem Gold untersucht und damit die Menge an eingebautem Glykoprotein bestimmt werden. Die Herstellung von mit MARV GP oder GP Δ CD dekorierten iVLPs, als auch die Aufreinigung durch Ultrazentrifugation über ein Sucrosekissen erfolgte wie unter 3.2.5 beschrieben; die Vorbereitung der iVLPs für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen fand wie unter 3.3.8 gezeigt statt. Die qualitative und quantitative Auswertung der Analyse der immunelektronenmikroskopischen Bilder ist in Abbildung 14 dargestellt. Dabei kann man erkennen, dass die Abwesenheit der cytoplasmatische Domäne keinen Einfluss auf die Integration der Glykoproteine in die iVLPs zu haben schien. Zusätzlich wird aus den Aufnahmen deutlich, dass auch die filamentöse Morphologie durch Deletion der cytoplasmatischen Domäne des GP nicht modifiziert wurde.

4.3 Analyse posttranslationaler Modifikationen des MARV GP bzw. GP Δ CD inkorporiert in iVLPs

4.3.1 Analyse des Oligomerisierungsstatus von MARV GP Δ CD in iVLPs

Während des Transports entlang des klassischen sekretorischen Transportwegs lagern sich die filoviralen Glykoproteine zu Trimeren zusammen, wobei die nicht kovalenten Interaktionen der Monomere durch intermolekulare „coiled-coil“ Domänen in GP₂ (AS 583-598) vermittelt werden (Feldmann et al., 1991; Lee et al., 2008; Sanchez et al., 1998; Watanabe et al., 2000). Die monomere Form des Glykoproteins besitzt ein Molekulargewicht von ca. 220 kDa, wobei GP₁ ca. 170 kDa und GP₂ ca. 46 kDa beiträgt. Nach einer Zusammenlagerung der Proteine zu Trimeren lässt sich z.B. durch Quervernetzung der Proteine ein Molekulargewicht für GP₁ von ca. 510 kDa nachweisen. Um einen potentiellen Einfluss der cytoplasmatischen Domäne auf den Oligomerisierungsstatus der in iVLPs eingebauten Glykoproteine zu untersuchen, sollten diese mittels des Quervernetzers EGS untereinander fixiert und analysiert werden. Sowohl die Transfektion von subkonfluenten HEK293-Zellen, als auch die Aufreinigung der in den Überstand abgegebenen iVLPs wurde

durchgeführt wie beschrieben (3.2.5). Die in die iVLPs inserierten Glykoproteine (GP oder GP Δ CD) wurden mittels EGS quervernetzt und somit eine kovalente Verbindung der GP-Trimere herbeigeführt (3.3.3); die Analyse der Vernetzung erfolgte mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3).

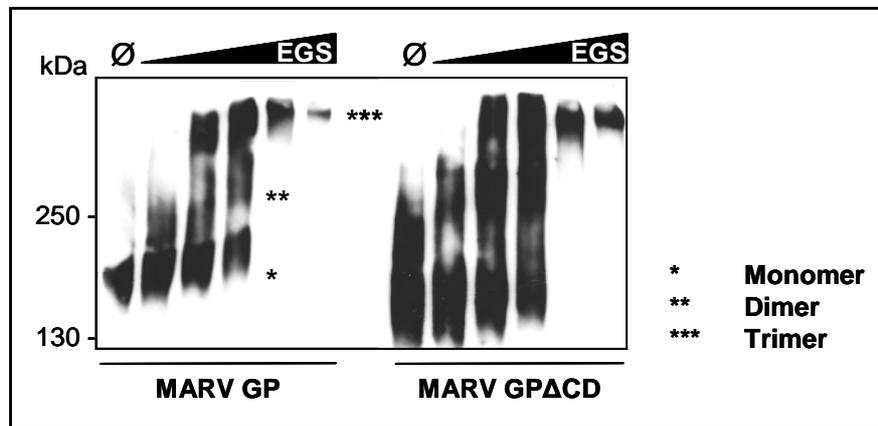


Abbildung 15: Oligomerisierung von in iVLPs integrierten MARV GP Δ CD

HEK293-Zellen wurden zur Produktion von iVLPs mit Plasmiden codierend für alle viralen Proteine und dem MARV-spezifischen Minigenom transfiziert und 65 h p.t. die in den Überstand freigesetzten iVLPs durch Ultrazentrifugation aufgereinigt. Für die Quervernetzung wurden iVLPs mit 0,01-1 mM EGS wie unter 3.3.3 beschrieben inkubiert und zur Analyse des Oligomerisierungsstatus eine 4 %ige SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Die Glykoproteine wurden mit einem monoklonalen Maus α -MARV GP Antikörper (50-6-10) und einem HRP-gekoppelten Ziege α -Maus Antikörper gefärbt. Die Sterne markieren die verschiedenen Oligomerisierungsstufen von MARV GP bzw. MARV GP Δ CD (* Monomer, ** Dimer, *** Trimer).

Anhand der Western Blot Analyse (Abb. 15) war ersichtlich, dass in iVLPs integriertes MARV GP bzw. GP Δ CD in unterschiedlicher Stöchiometrie vorzufinden war: sowohl Monomere als auch Dimere und Trimere konnten nachgewiesen werden, wobei die Menge an höheren oligomeren Formen mit ansteigender Konzentration an EGS zunahm. Indessen konnte keine wesentliche Differenz zwischen der Oligomerisierung der beiden Oberflächenproteine beobachtet werden, so dass angenommen werden kann, dass die Deletion der cytoplasmatischen Domäne keinen wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung oder Stabilität der Glykoproteinoligomere ausübte.

4.3.2 N- und O-Glykosylierungsmuster von MARV GP bzw. GP Δ CD

Während einer filoviralen Infektion üben die Glykane der Oberflächenproteine eine wichtige Funktion aus: sie vermitteln eine Interaktion mit zellulären Bindungsfaktoren, was zu einer Konzentration der Viren an der Zelloberfläche und zu einer Interaktion mit dem bis jetzt unbekanntem filoviralen Rezeptor führt. Dabei besitzen die O-Glykane, mannosereichen und komplexen N-Glykane (Feldmann et al., 1994; Geyer et al., 1992) unterschiedliche Affinitäten zu zellulären Bindungsfaktoren. Das auf Dendritischen Zellen lokalisierte C-ähnliche Lektin DC-SIGN(R) interagiert effizient mit mannosereichen N-Glykanen (Feinberg et al., 2001), welche in großer Menge in filoviralen Oberflächenproteinen zu finden sind. Diese Interaktion

verstärkt die virale Infektion von Dendritischen Zellen und Makrophagen (Alvarez et al., 2002; Lin et al., 2003; Marzi et al., 2004; Simmons et al., 2003a). Terminale Galaktosereste, welche für komplexe (nicht sialylierte) N-Glykane charakteristisch sind, können von dem Leberzell-spezifischen Asialoglykoproteinrezeptor erkannt und gebunden werden, was wiederum zu einer effizienten viralen Infektion von Leberzellen führt (Becker et al., 1995). Zusätzlich zu Faktoren, welche N-Glykane binden, findet man auf Makrophagen und unreifen Dendritischen Zellen auch hMGL (Higashi et al., 2002), einen Faktor der durch N-Acetylgalaktosamine von O-Glykanen effizient gebunden wird (Suzuki et al., 1996). Durch Bindung an hMGL vermittelt über filovirale Oberflächenproteine kann eine virale Infektion signifikant verstärkt werden (Takada et al., 2004). Alle hier zitierten wissenschaftlichen Untersuchungen berichten von einer Abschwächung der Infektiosität (von nativen Viren oder pseudotypisierten Partikeln) in für den entsprechenden Bindungsfaktor defizienten Zellen, was, im Umkehrschluss, diesen eine wesentliche Rolle bei der Infektion zuspricht.

Durch die Deletion der cytoplasmatischen Domäne wurde die N-Glykosylierung der zellulär exprimierten Glykoproteine scheinbar nicht wesentlich modifiziert (siehe Abb. 12). Trotzdem sollte der Einfluss der cytoplasmatischen Domäne auf die Verzuckerung der in die iVLPs integrierten Glykoproteine untersucht werden. Die Analysen hinsichtlich ihrer N- und O-Glykosylierung wurden durch Verdau mit Endoglykosidasen und durch Untersuchung der Bindung spezifischer Lektine durchgeführt. Dafür wurden zuerst HEK293-Zellen mit allen Plasmiden, die zur Generierung von iVLPs benötigt werden, transfiziert (3.2.2, 3.2.5), 65 h p.t. die Zellen lysiert (3.2.4) und die filamentösen Partikel aus dem Zellkulturüberstand mittels Ultrazentrifugation und Separierung über einen Nycodenzstufengradienten aufgereinigt (3.2.5, 3.2.7).

Die Behandlung der lysierten Zellen als auch der aufgereinigten Partikel mit den Glykosidasen Endo H und PNGase F (Abb. 16A) erfolgte wie unter 3.3.4 und 3.3.5 aufgezeichnet, die Analyse fand mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) statt. Ähnlich wie bereits in Abbildung 12 gezeigt, wiesen die zellulär rekombinant exprimierten Glykoproteine eine hohe Sensitivität gegenüber beiden verwendeten Endoglykosidasen auf (Abb. 16A, Spur 1-3 und 7-9), was zu einer signifikanten Reduktion der Größe und somit zu einer signifikanten Änderung des Laufverhaltens in der SDS-PAGE führte. Daraus konnte geschlossen werden, dass es sich hier vorwiegend um die Endo H-sensitive GP_{ER}-Form handelte. Im Gegensatz dazu zeigten die in iVLPs integrierten Glykoproteine eine Resistenz gegenüber Endo H (Abb. 16A, Spur 5 und 11) und eine hohe Sensitivität gegenüber PNGase F (Abb. 16A, Spur 6 und 12). Dieses Verhalten der in iVLPs eingebauten Glykoproteine gegenüber Endoglykosidasen ist für solche GPs charakteristisch, die während des Transports entlang des sekretorischen Stoffwechselwegs in ihrer N-Glykosylierung modifiziert wurden.

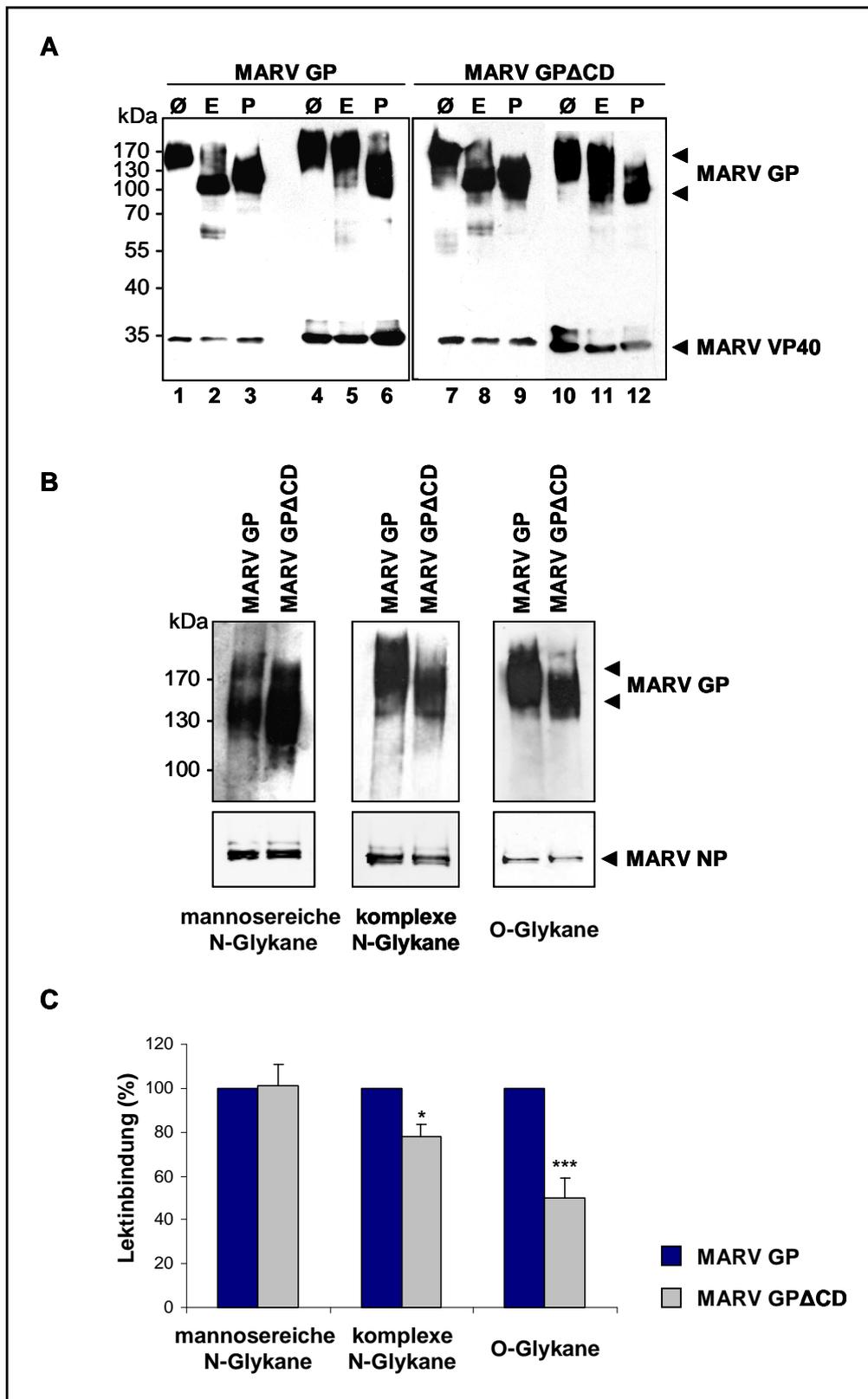


Abbildung 16: N- und O-Glykosylierungsmuster von in iVLPs integrierten MARV GP bzw. GPΔCD

(A) Western Blot Analyse der N-Glykosylierung von zellulär exprimierten und in iVLPs eingebauten MARV GP bzw. GPΔCD. HEK293-Zellen wurden mit allen für die Generierung von iVLPs benötigten Plasmiden (einschließlich Plasmiden codierend für MARV GP oder GPΔCD) transfiziert, 65 h p.t. wurde das im Überstand befindliche partikuläre Material durch Ultrazentrifugation durch ein Sucrosekissen pelletiert, resuspendiert und durch Zentrifugation über einen Nycodenzstufengradienten wurden sphärische (Fraktionen 1-3) und filamentöse (Fraktionen 4-6) Partikel voneinander separiert. Sowohl die aufgereinigten filamentösen iVLPs (Spur 4-6 und 10-12), als auch die gemetzten und lysierten Zellen (Spur 1-3 und 7-9) wurden mit den Endoglykosidasen Endo H

(E) bzw. PNGase F (P) für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend eine Western Blot Analyse durchgeführt. Die Glykoproteine wurden mit einem monoklonalen Maus α -MARV GP Antikörper (50-6-10) und das Matrixprotein mit einem monoklonalen Maus α -MARV VP40 Antikörper (40-2-2), sowie beide Erstantikörper mit einem sekundären HRP-gekoppelten Ziege α -Maus Antikörper detektiert. **(B) Nachweis von N- und O-Glykosylierungsmustern mit Hilfe spezifischer Lektine.** Mit den wie unter (A) beschriebenen aufgereinigten filamentösen iVLPs wurde eine 10 %ige SDS-PAGE und eine Transferierung auf eine Nitrocellulose-Membran durchgeführt. Zur Quantifizierung der eingesetzten Menge an iVLPs wurde das Nukleoprotein NP mit einem monoklonalen Maus α -MARV NP Antikörper (59-9-10) sowie einem *Alexa Fluor*[®]680-gekoppelten Ziege α -Maus Antikörper gefärbt. Zur Analyse des Glykosylierungsmusters der GPs wurden Lektine verwendet, welche spezifisch an bestimmte Glykanreste binden konnten (3.3.6). Bei in iVLPs eingebauten MARV GP bzw. GP Δ CD wurden die mannosereichen N-Glykane mit GNA (*Galanthus nivalis* Agglutinin), die komplexen N-Glykane mit DSA (*Datura stramonium* Agglutinin) und die O-Glykane mit PNA (Peanut *-Arachis hypogaea-* Agglutinin) nachgewiesen. Da alle Lektine mit Digoxigenin markiert waren, konnten diese mit einem POD-gekoppelten Schaf α -Digoxigenin Antikörper nachgewiesen werden. **(C) Quantitative Auswertung der Lektinbindung von in iVLPs integrierten MARV GP bzw. GP Δ CD.** Die Quantifizierung der Lektinbindung erfolgte mittels des Computerprogramms TINA2.0; die Sterne repräsentieren die statistisch signifikanten Unterschiede (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) im Vergleich zu der Lektinbindung von in iVLPs eingebauten MARV GP (gesetzt als 100 %), wobei $n \geq 3$ war.

Die Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne schien die während des Transports durch den Golgi-Apparat stattfindenden Modifikationen der N-Glykosylierung nicht zu beeinflussen, da zwischen MARV GP bzw. GP Δ CD kein Unterschied der Reaktion gegenüber den Endoglykosidasen festgestellt werden konnte, so dass beide Proteine in ihrer in iVLPs integrierten Form eine ähnliche Reaktion gegenüber Endo H und PNGase F aufwiesen.

Zusätzlich sollten mit aufgereinigten filamentösen Partikeln spezifische Lektinbindungsstudien durchgeführt werden (3.3.6, Abb. 16B-C). Dazu wurden die auf Nitrocellulose-Membran übertragenen Proteine der iVLPs mit für O-Glykane, mannosereiche oder komplexe N-Glykane spezifischen Digoxigenin-gekoppelten Lektinen inkubiert und die gebundenen Lektine mit einem HRP-gekoppelten α -Digoxigenin Antikörper detektiert. Anhand der Menge des in den iVLPs vorhandenen NPs konnte die Konzentration der eingesetzten iVLPs über eine Western Blot Analyse bestimmt und untereinander angeglichen werden (Abb. 16B). Die Quantifizierung der Lektinbindung zeigte, dass in iVLPs integriertes GP Δ CD im Vergleich zu dem wildtypischen GP ähnlich viel mannosereiche und etwas weniger komplexe N-Glykane trug (Abb. 16C); diese Ergebnisse korrelierten mit dem vorher durchgeführten Verdau mittels Endoglykosidasen (Abb. 16A). Die O-Glykosylierung von GP Δ CD hingegen war signifikant reduziert im Vergleich zu wildtypischen in iVLPs integrierten GP (Abb. 16C).

Fasst man die Ergebnisse der drei Analysen zusammen, so lässt sich schlussfolgern, dass die Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP keinen erkennbaren Effekt auf die mannosereiche N-Glykosylierung, allerdings einen schwachen Effekt auf die komplexe N-Glykosylierung und eine signifikant negative Auswirkung auf die O-Glykosylierung zeigte. Daraus lässt sich schließen, dass im Vergleich zu dem wildtypischen GP, die in der Ektodomäne des GP Δ CD vorliegenden N- bzw. O-Glykosylierungsstellen durch die modifizierenden Glykosylierungstransferasen nicht mehr effizient genutzt werden können. Die sich daraus ergebenden Modifikationen des GP waren jedoch nicht so dramatisch, dass der Transport oder der Einbau in iVLPs signifikant beeinflusst wurde.

4.4 Untersuchung der iVLP Infektiosität

Bei einer filoviralen Infektion stellt die Bindung des Oberflächenproteins an seinen spezifischen zellulären Rezeptor den ersten unabdinglichen Schritt dar. Dabei folgt der Interaktion mit Zell-spezifischen Bindungsfaktoren vermittelt über die Glykosylierungen des GPs (zitiert unter 4.3.2) eine peptidbasierte Bindung an den bis jetzt nicht identifizierten zellulären Rezeptor. Dabei wurden die in MARV GP₁ lokalisierten Aminosäuren 38-188 als essentiell für die Bindung an diesen auf zu infizierenden Zellen befindlichen Rezeptor beschrieben (Kuhn et al., 2006). Neben der Rezeptor-bindenden kann auch die cytoplasmatische Domäne für den Infektionsvorgang eine essentielle Rolle spielen. So konnte in Abwesenheit der cytoplasmatischen Domänen der NA und des HA des Influenza-virus ein inhibierender Einfluss auf die virale Infektiosität festgestellt werden (Jin et al., 1997; Mitnaul et al., 1996).

Bisher war der Einfluss von Deletion bzw. Mutation der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP in einem viralen Kontext nicht bekannt. Um diesen Einfluss genauer zu durchleuchten, wurden HEK293-Zellen mit allen zur Generierung von iVLPs nötigen Plasmiden transfiziert und in verschiedenen Ansätzen das Expressionsplasmid für das wildtypische GP durch die im Folgenden beschriebenen Mutanten ersetzt (Abb. 17A). Um die Auswirkung der cytoplasmatischen Domäne auf die Infektiosität von iVLPs zu analysieren, wurde eine Deletionsmutante hergestellt, bei der die vollständige cytoplasmatische Domäne entfernt worden war (GP Δ CD). Da postuliert wird, dass Transmembrandomänen von geladenen AS flankiert werden, um eine stabile Verankerung in der Membran zu gewährleisten, wurde auch eine Deletionsmutante konstruiert, bei der das positiv geladene Arginin am N-Terminus der cytoplasmatische Domäne in die Mutante integriert wurde (GP Δ CD_R). Bisher konnten in der cytoplasmatischen Domäne keinerlei Signalsequenzen, welche für intrazellulären Transport oder Proteininteraktionen essentiell wären, identifiziert werden. Um dahingehend den Einfluss der Aminosäuresequenz der cytoplasmatischen Domäne zu analysieren, wurden die darin enthaltenen AS in ihrer Reihenfolge durchmischt (GPCDscr, scr = „scramble“). Die Abhängigkeit der Bindung des zellulären Rezeptors durch die Rezeptorbindende Domäne (RBD) des GP konnte gezeigt werden (Kuhn et al., 2006); um auch die Notwendigkeit dieser Domäne für die Infektiosität von iVLPs zeigen zu können, wurde eine Deletionsmutante, der die RBD fehlt, verwendet (GP Δ RBD). Nach 65 h wurden die Zellen (p0) lysiert, iVLPs aufgereinigt (3.2.5) und diese abschließend mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot Analyse (3.3.1.2, 3.3.1.3) untersucht.

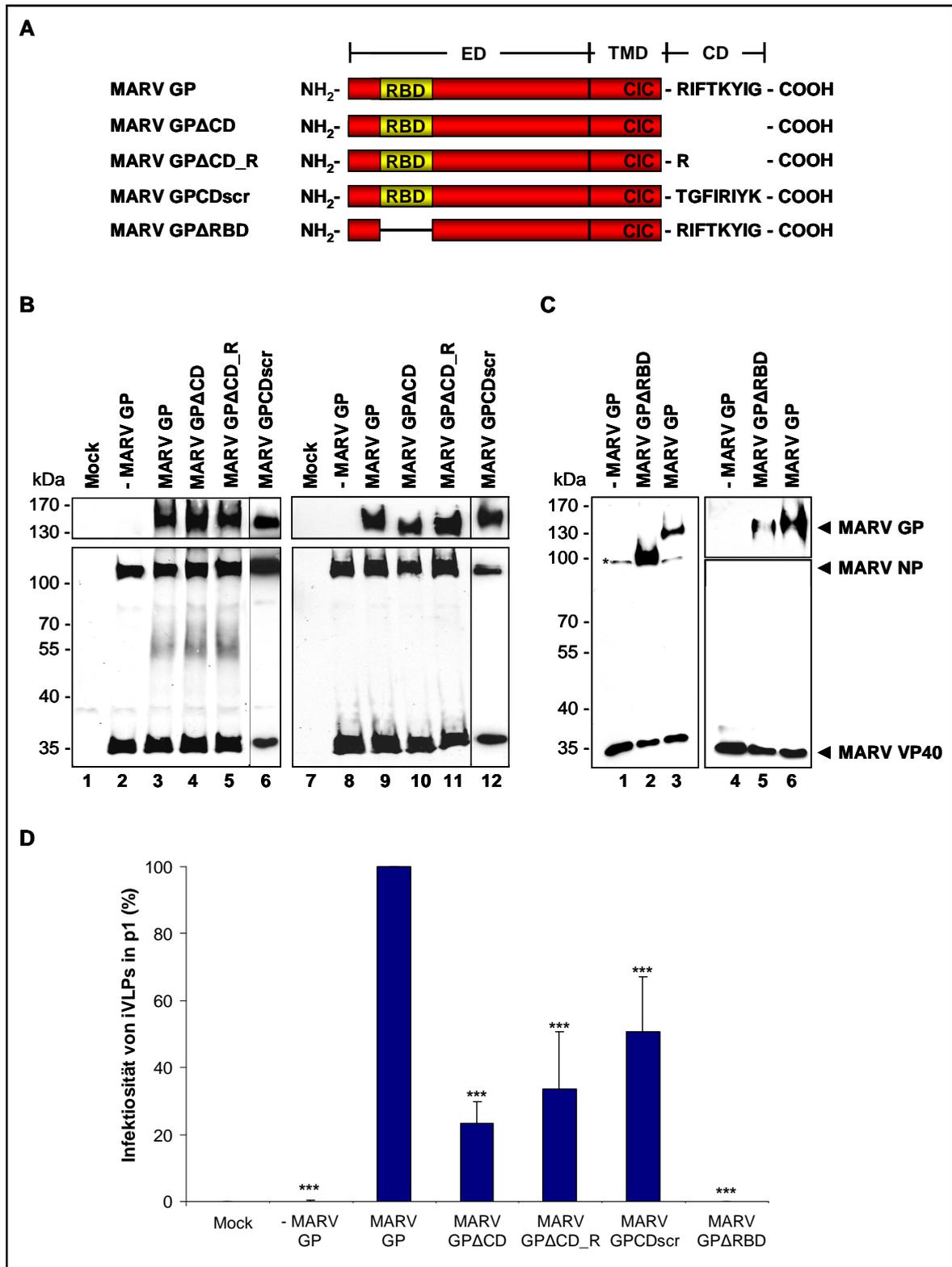


Abbildung 17: Einfluss von Mutationen in MARV GP auf die Infektiosität von iVLPs

(A) Schematische Darstellung der hergestellten MARV GP Mutanten. Folgende Nomenklatur wurde verwendet: Ektodomäne (ED), Transmembrandomäne (TMD), cytoplasmatische Domäne (CD) und Rezeptor-bindende Domäne (RBD). (B-C) Western Blot Analyse der zellulären Expression viraler Proteine und der Proteinzusammensetzung freigesetzter iVLPs. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden codierend für alle viralen Proteine und dem MARV-spezifischen Minigenom transfiziert, wobei das für GP codierende Plasmid partiell durch Plasmide, welche für die unter (A) beschriebenen GP-Mutanten codieren, ersetzt wurde. Nach 65 h p.t. wurden die in den Überstand freigesetzten iVLPs aufgereinigt. Diese iVLPs (Abbildung [B] Spur 7-12; Abbildung [C] Spur 4-6) wurden zusammen mit den entsprechenden Zelllysaten (Abbildung [B] Spur 1-6; Abbildung [C] Spur 1-3) einer SDS-PAGE und einer Western Blot Analyse zugeführt. Dabei wurde das Matrixprotein mit einem

monoklonalen Maus α -MARV VP40 Antikörper (40-2-2), das Nukleoprotein mit einem monoklonalen Maus α -MARV NP Antikörper (59-9-10), sowie die Glykoproteine mit einem monoklonalen Maus α -MARV GP Antikörper (50-6-10 [B] oder 19-12-8-2 [C]) markiert. Die Erstantikörper wurden mit einem HRP- oder *Alexa Fluor*[®]680-gekoppelten Ziege α -Maus Antikörper nachgewiesen. *: unbekanntes Protein. **(D) Bestimmung der Infektiosität der gereinigten iVLPs mittels eines iVLP Assays.** HEK293-Zellen wurden mit allen für die Generierung von iVLPs benötigten Plasmiden (einschließlich Plasmiden codierend für die unterschiedlichen Mutanten von MARV GP) transfiziert, 65 h p.t. wurde das im Überstand befindliche partikuläre Material mittels Ultrazentrifugation durch ein Sucrosekissen pelletiert, das Pellet resuspendiert und die iVLPs zur Infektion von HUH7-Zellen verwendet (Durchführung wie unter 3.2.5 beschrieben). Sowohl HEK293-Zellen (p0) als auch infizierte HUH7-Zellen (p1) wurden geerntet, lysiert und einem Luziferaseassay unterzogen (generierte Daten von p0 nicht gezeigt). Die Infektiosität von iVLPs wurde quantifiziert ($n \geq 3$); die Sterne repräsentieren die statistisch signifikanten Unterschiede (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) im Vergleich zu der Infektiosität von iVLPs dekoriert mit wildtypischen MARV GP (gesetzt als 100 %).

Die Analyse der Zelllysate ergab, dass alle Mutanten des GP intrazellulär vergleichbar mit dem wildtypischen GP exprimiert wurden (Abb. 17B, Vergleich von Spur 3 mit Spur 4-6; Abb. 17C, Vergleich von Spur 3 mit Spur 2). Zusätzlich wurde die Expression der viralen Proteine VP40 und NP in Anwesenheit modifizierten GP gegenüber der Expression in Anwesenheit des wildtypischen GP nicht beeinflusst.

Des Weiteren modifiziert die Mutation (GP Δ CD_R, GPCDscr, Abb. 17B, Spur 11 und 12) bzw. die Deletion (GP Δ CD, Abb. 17B, Spur 10) der cytoplasmatischen Domäne des GP weder dessen Inkorporation in noch die Freisetzung der iVLPs. Als Maß für die Menge freigesetzter Partikel wurde das in die iVLPs eingebaute NP quantitativ bestimmt. Um nachzuweisen, dass die Infektiosität der iVLPs durch GP selbst bzw. durch die Rezeptorbindende Domäne (RBD) des GP vermittelt wird, wurden auch iVLPs, welche kein Glykoprotein (-GP) oder eine Deletionsmutante des Glykoproteins (GP Δ RBD) integrierten, hergestellt (Abb. 17C). Auch GP Δ RBD wurde effizient vergleichbar mit dem wildtypischen GP exprimiert (Abb. 17C, Spur 2) und in iVLPs eingebaut (Abb. 17C, Spur 5). Die Menge freigesetzter Partikel wurde durch die Abwesenheit des Glykoproteins oder Mutation seiner Rezeptorbindenden Domäne nicht beeinflusst. Auch GP Δ RBD wurde effizient vergleichbar mit dem wildtypischen GP exprimiert (Abb. 17C, Spur 2) und in iVLPs eingebaut (Abb. 17C, Spur 5). Die Menge freigesetzter Partikel wurde durch die Abwesenheit des Glykoproteins oder Mutation seiner Rezeptorbindenden Domäne nicht beeinflusst. Als nächstes sollten diese iVLPs bezüglich ihrer Fähigkeit HUH7-Zellen (p1) zu infizieren untersucht werden (Abb. 17D, 3.2.5). Die Infektion der HUH7-Zellen zeigte, dass iVLPs, welche kein Glykoprotein oder die Mutante GP Δ RBD integrierten, keine Infektion von HUH7-Zellen vermitteln konnten, d.h. dass ohne eine Rezeptorbindende Domäne keine Bindung bzw. Infektion stattfinden kann. Inkorporieren iVLPs Glykoproteine, denen die vollständige (GP Δ CD) bzw. die letzten sieben Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne (GP Δ CD_R) entfernt wurden, führt das zu einer starken Reduktion ihrer Infektiosität. Im Vergleich zu iVLPs, welche wildtypisches GP integrierten, wurde die Infektiosität auf ca. 23 % (GP Δ CD) bzw. ca. 34 % (GP Δ CD_R) reduziert. Auch die Integration eines Glykoproteins, deren in der CD ent-

haltenen Aminosäuren in ihrer Reihenfolge durchmischt wurden (GPCDscr), führte zu einer starken Reduktion der iVLP Infektiosität auf ca. 51 %.

Zusammen gefasst lassen sich diese Ergebnisse wie folgt interpretieren: (i) Für die Infektion durch MARV iVLPs ist die Anwesenheit der Rezeptorbindenden Domäne des GP unabdinglich. (ii) Für die Infektiosität der iVLPs spielt weiterhin die Anwesenheit der cytoplasmatischen Domäne des GPs eine essentielle Rolle bzw. bei Vorhandensein dieser Domäne auch deren Aminosäuresequenz. (iii) Das positiv-geladene Arginin an Aminosäureposition 674, welches die Transmembrandomäne C-terminal flankiert, scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Infektiosität zu besitzen.

4.5 Charakterisierung von MARV GP Δ MLD

Wie gezeigt werden konnte, verursachte die Entfernung der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP im Kontext des iVLP Systems sowohl eine signifikante Reduktion der iVLP Infektiosität (4.4) als auch eine Verringerung der GP O-Glykosylierung (4.3.2). Weitere Analysen sollten klären, ob diese beiden Effekte in einem kausalen Zusammenhang stehen, d.h. sich gegenseitig bedingen. Der Großteil der O-Glykane ist in einem Bereich des GP lokalisiert, der als Mucin-ähnliche Domäne („mucin-like domain“, MLD) bezeichnet wird (Geyer et al., 1992). Es wurde eine Deletionsmutante hergestellt, welche keine MLD mehr enthält, diese in iVLPs integriert und anhand eines Verdaus durch Endoglykosidasen, elektronenmikroskopische Untersuchungen, Infektionsstudien usw. charakterisiert.

4.5.1 Untersuchung der N- und O-Glykosylierungsstruktur von GP Δ MLD

Durch Deletion der MLD (AS 289-501) sollten alle O-Glykosylierungsstellen in MARV GP entfernt worden sein (Abb. 18A). Um diese Annahme mittels Lektinbindung untersuchen zu können, wurden HEK293-Zellen mit allen Plasmiden, welche zur Herstellung von iVLPs benötigt werden (beinhaltend auch Plasmide codierend für GP oder GP Δ MLD) transfiziert (3.2.2, 3.2.5). Nach 65 h Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert (3.2.4) und filamentöse iVLPs aus dem Überstand aufgereinigt (3.2.5). Diese wurden mittels SDS-PAGE (3.3.1.1), Western Blot Analyse (3.3.1.2, 3.3.1.3) und Lektinfärbung (3.3.6) untersucht, wobei zur Detektion der O-Glykane der fixierten Glykoproteine das Lektin PNA verwendet wurde (Abb. 18B).

Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zu in iVLPs inkorporierten GP oder GP Δ CD, GP Δ MLD keine Bindung von PNA aufwies, d.h. keine O-Glykane beinhaltete. Zusätzlich zu der O-Glykosylierungsstruktur sollte auch das N-Glykosylierungsmuster des GP Δ MLD im Vergleich zu wildtypischem GP mit Hilfe eines Verdaus durch die Endoglykosidasen Endo H und PNGase F ermittelt werden. Sowohl aufgereinigte iVLPs als auch Zelllysate wurden mit den Endoglykosidasen behandelt (3.3.4, 3.3.5) und anschließend mit Hilfe von SDS-PAGE

(3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) ausgewertet. Wie in Abbildung 18C deutlich erkennbar war, zeigte rekombinant exprimiertes GP Δ MLD (Spur 5) eine andere Sensitivität gegenüber Endo H als rekombinant exprimiertes wildtypisches GP (Spur 2). Im Gegensatz zu dem vollständig Endo H-sensitiven GP, zeigte der größere Anteil des GP Δ MLD eine Resistenz gegenüber einem Verdau mit Endo H, wohingegen ein geringerer Anteil sensitiv blieb. Bei einer Inkubation mit PNGase F zeigten beide Proteine eine vollständige Sensitivität, welche sich durch eine signifikante Reduktion der Größe und der Laufhöhe in der SDS-PAGE bemerkbar machte (Abb. 18C, Spur 3 und 6). Wie zu erwarten fand sich bei den in iVLPs eingebauten Glykoproteinen (GP oder GP Δ MLD) eine vollständige Sensitivität gegenüber PNGase F (Abb. 18C, Spur 9 und 12) und eine vollständige Resistenz gegenüber einem Abbau mittels Endo H (Abb. 18C, Spur 8 und 11).

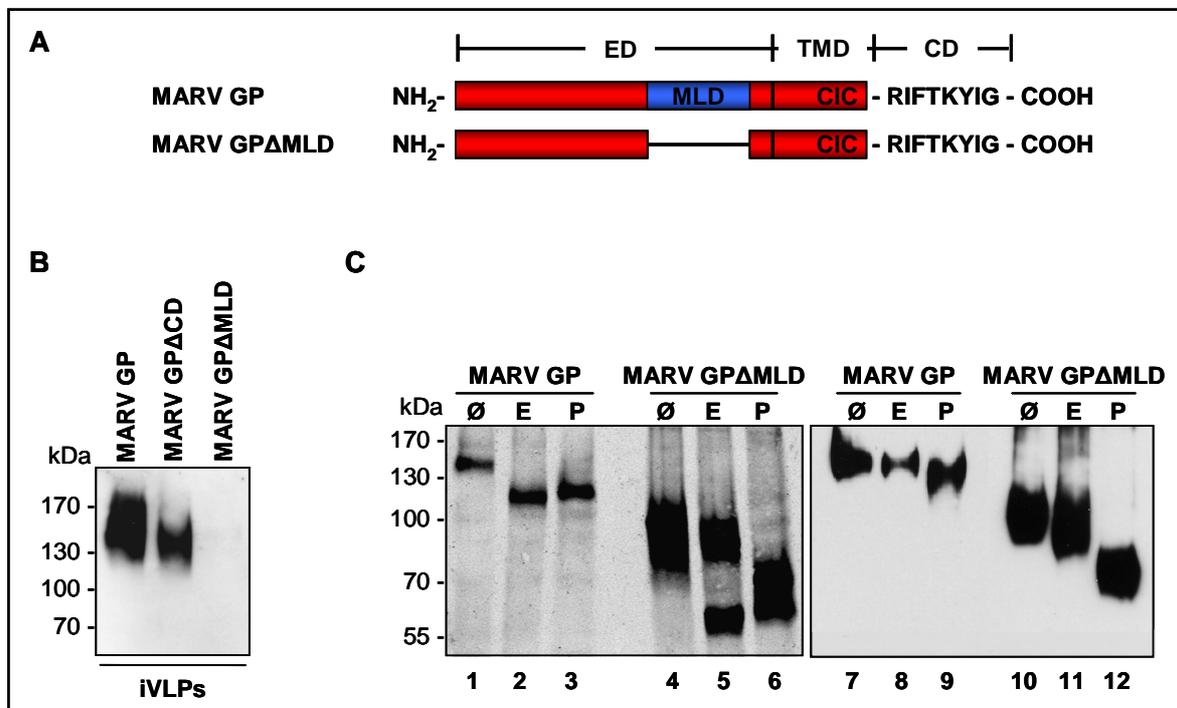


Abbildung 18: N- und O-Glykosylierungsmuster von MARV GP Δ MLD

(A) Schematische Darstellung der durch rekombinante PCR aus MARV GP hergestellten Mutante MARV GP Δ MLD; folgende Nomenklatur wurde verwendet: Ektodomäne (ED), Transmembrandomäne (TMD), cytoplasmatische Domäne (CD) und Mucin-ähnliche Domäne („mucin-like domain“, MLD). (B) Nachweis der fehlenden O-Glykosylierung in MARV GP Δ MLD mit Hilfe des Lektins PNA. HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden codierend für alle viralen Proteine (einschließlich MARV GP oder GP Δ MLD) und dem MARV-spezifischen Minigenom transfiziert. Nach 65 h wurden die Zellen lysiert, das im Überstand befindliche partikuläre Material durch Ultrazentrifugation durch ein Sucrosekissen pelletiert, resuspendiert und durch Zentrifugation über einen Nycodenzgradienten wurden sphärische (Fraktionen 1-3) und filamentöse (Fraktionen 4-6) Partikel voneinander separiert. Zur Untersuchung der O-Glykosylierung von in filamentösen iVLPs eingebauten GP, GP Δ CD oder GP Δ MLD wurden die iVLPs mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die O-Glykane wurden mit Digoxigenin-markiertem PNA (Peanut -*Arachis hypogaea*- Agglutinin), sowie das Digoxigenin mit einem mit POD-gekoppelten Schaf α -Digoxigenin Antikörper nachgewiesen (Durchführung beschrieben unter 3.3.6). (C) Western Blot Analyse der N-Glykosylierung von zellulär exprimierten und in iVLPs eingebauten MARV GP bzw. GP Δ MLD. Sowohl die wie unter (B) beschriebenen aufgereinigten filamentösen iVLPs (Spur 7-12), als auch die geernteten und lysierten Zellen (Spur 1-6) wurden mit den Endoglykosidasen Endo H (E) bzw. PNGase F (P) für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Die Glykoproteine wurden mit einem monoklonalen Maus α -MARV GP Antikörper (50-6-10) und einem Alexa Fluor[®]680-gekoppelten (Spur 1-6) oder HRP-gekoppelten (Spur 7-12) Ziege α -Maus Zweitantikörper detektiert.

Zusammenfassend kann man die Aussage treffen, dass die Entfernung der O-Glykosylierungsstellen nicht nur zu dem Verlust der O-Glykosylierung führt, sondern auch die N-Glykosylierung des rekombinant exprimierten GPs modifiziert. Möglicherweise wird der Transport von GP Δ MLD durch ER und Golgi-Apparat aufgrund der fehlenden O-Glykosylierung (entspricht ca. 50 % der Gesamtmasse der Glykosylierung) beschleunigt, so dass mehr Endo H-resistente Formen nachgewiesen werden konnten, welche charakteristisch für solche Glykoproteine sind, die den Golgi-Apparat durchlaufen haben.

4.5.2 Charakterisierung von MARV GP Δ MLD einbauenden iVLPs

Durch den vermuteten beschleunigten Transport des GP Δ MLD entlang der klassischen sekretorischen Transportroute zur Plasmamembran, könnte ein verstärkter Einbau des Glykoproteins in iVLPs erwartet werden. Um die Integration der Deletionsmutante in iVLPs mittels quantitativer Immunelektronenmikroskopie zu untersuchen, wurden iVLPs wie unter 3.2.5 beschrieben hergestellt, aufgereinigt und anschließend für eine Elektronenmikroskopie vorbereitet (3.3.8).

Durch Markierung der Glykoproteine mittels kolloidalen Goldpartikeln konnte die Dichte der gebundenen Partikel an der iVLP Oberfläche pro μm Länge quantitativ ermittelt werden (Abb. 19A). Da die Quantifizierung eindeutig eine verstärkte Inkorporation in iVLPs zeigte, sollte mittels einer Titrierung des GP Δ MLD der Einbau in iVLPs an den des wildtypischen GPs angeglichen werden (Abb. 19B). Aus diesem Grund wurden iVLPs wie unter 3.2.5 aufgezeichnet hergestellt, wobei die Menge an GP Δ MLD titriert wurde (eingesetzte Menge Plasmid: 0,05-0,5 μg). Transfizierte Zellen wurden einer Lyse unterzogen (3.2.4), iVLPs aufgereinigt (3.2.5) und beides, Zellysate und iVLPs, mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot Analyse (3.3.1.2, 3.3.1.3) untersucht. Sowohl die zelluläre Expression (Abb. 19B, Spur 1-6) als auch die Integration der Glykoproteine in iVLPs (Abb. 19B, Spur 7-12) zeigten deutlich, dass bei Transfektion von 0,5 μg pCAGGS-MARV GP (Spur 1 und 7) bzw. 0,5 μg MARV GP Δ MLD (Spur 2 und 8), letzteres in viel größeren Mengen zellulär als auch gebunden in iVLPs vorlag. Die zelluläre Expression zeigte, dass mit abnehmender transfizierter Menge an pCAGGS-MARV GP Δ MLD auch die Menge exprimierter Proteine abnahm. Dabei wurde einerseits die Menge stabil exprimierter viraler Proteine (NP) nicht beeinflusst und andererseits trat GP Δ MLD aufgrund der fehlenden Trypsinspaltstelle als GP_{1/2} Fusionsprotein auf (AS 431-435 [Spaltstelle] durch Deletion der AS 289-501 [MLD] entfernt, Spur 2-6). Bei der rekombinanten Expression von wildtypischen GP ließen sich vorwiegend GP_{ER}-Formen nachweisen, welche ein Molekulargewicht von 140 kDa besitzen und die am prägnantesten während einer zellulären Expression auftretende Form des GP darstellen (Spur 1, Becker et al., 1996).

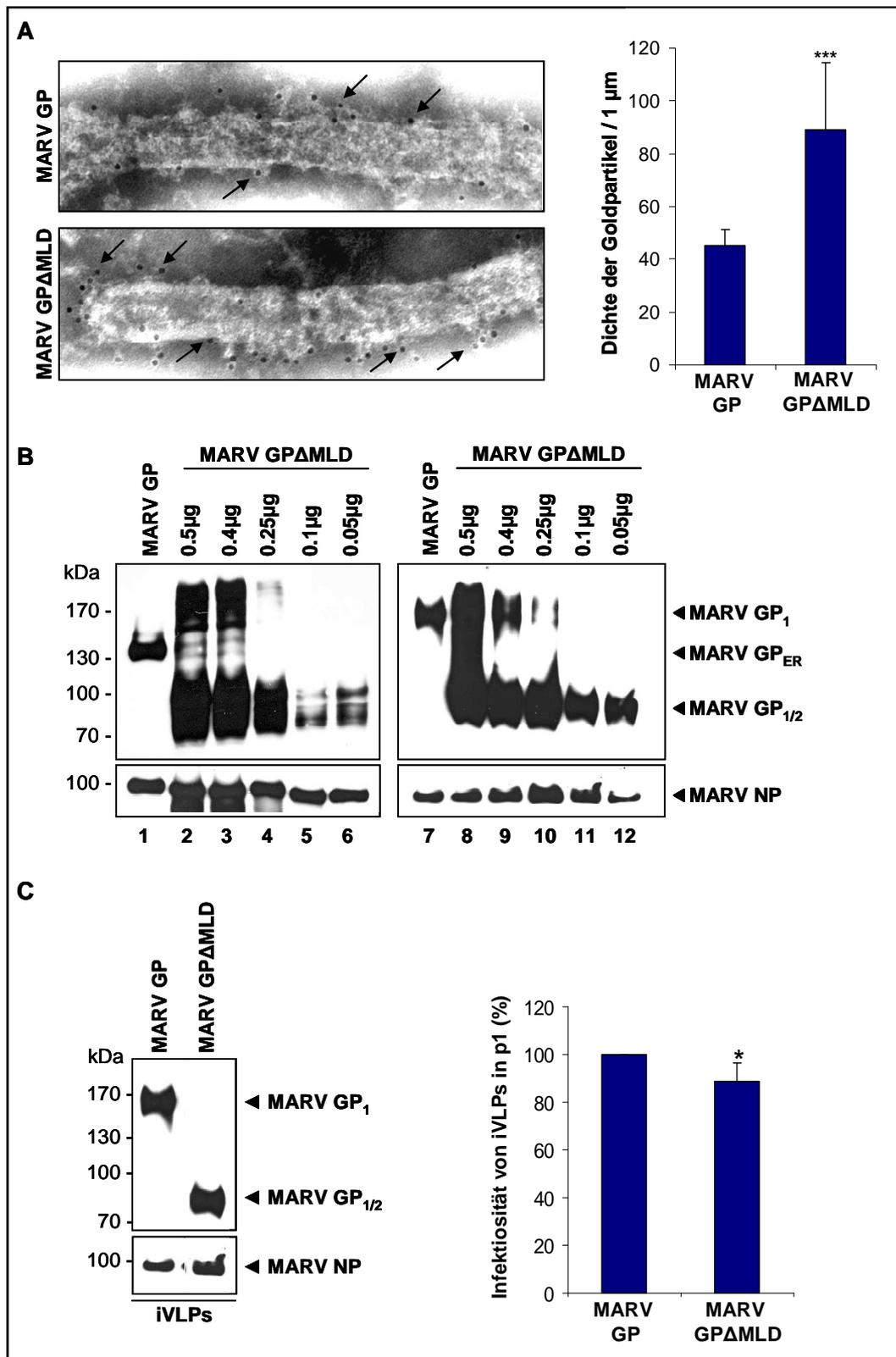


Abbildung 19: Einfluss der Mucin-ähnlichen Domäne des MARV GP auf den Einbau des GP in iVLPs und deren Infektiosität

(A) Analyse des Einbaus von MARV GP Δ MLD in iVLPs mittels Elektronenmikroskopie. HEK293-Zellen wurden mit allen für die Generierung von iVLPs benötigten Plasmiden transfiziert und 65 h p.t. wurde das im Überstand befindliche partikuläre Material mittels Ultrazentrifugation durch ein Sucrosekissen aufgereinigt. Mit diesen resuspendierten und aufgereinigten iVLPs wurde eine quantitative immunoelektronenmikroskopische Analyse durchgeführt. Mit einem monoklonalen Maus α -MARV GP Antikörper (50-6-10) und einem mit 5 nm-Goldpartikelgekoppelten Ziege α -Maus Antikörper wurden die Glykoproteine markiert. Die Dichte der Goldpartikel pro μ m

iVLP wurde quantifiziert ($n \geq 10$) und der statistisch signifikante Unterschied (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) im Vergleich zu wildtypisches MARV GP einbauenden iVLPs wurde berechnet. Die Elektronenmikroskopie wurde von Dr. L. Kolesnikova durchgeführt. **(B) Titration des Einbaus von MARV GP Δ MLD in iVLPs mittels Western Blot Analyse.** HEK293-Zellen wurden wie unter (A) beschrieben transfiziert (wobei die Menge an GP Δ MLD titriert wurde. Die für GP Δ MLD codierende Plasmid-DNA wurde in Mengen von 0,05-0,5 μ g eingesetzt. Nach 65 h p.t. wurden iVLPs aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt (Spuren 7-12). Zusammen mit den lysierten Zellen (Spuren 1-6) wurden die gereinigten iVLPs einer Western Blot Analyse zugeführt. Das Nukleoprotein wurde mit einem monoklonalen α -MARV NP Antikörper (59-9-10) und die Glykoproteine mit einem monoklonalen α -MARV GP Antikörper (50-6-10) markiert und mit einem HRP-gekoppelten Ziege α -Maus Antikörper nachgewiesen. **(C) Bestimmung der Infektiosität von GP Δ MLD integrierenden iVLPs.** Die Transfektion der HEK293-Zellen, sowie die Western Blot Analyse wurden durchgeführt wie unter (A und B) beschrieben. iVLPs, die einen vergleichbaren Einbau der Glykoproteine anhand der Western Blot Analyse aufzeigten (Quantifizierung mit TINA2.0), wurden in einen iVLP Assay eingesetzt, wobei die Durchführung wie unter 3.2.5 beschrieben erfolgte. Sowohl HEK293-Zellen (p0) als auch infizierte HUH7-Zellen (p1) wurden geerntet, lysiert und einem Luziferaseassay unterzogen (generierte Daten von p0 nicht gezeigt). Die Infektiosität wurde quantifiziert ($n = 4$) und der statistisch signifikante Unterschied (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) im Vergleich zu iVLPs, in welche wildtypisches Glykoprotein eingebaut worden war (gesetzt als 100 %), wurde ermittelt.

In den aufgereinigten iVLPs verursachte die abnehmende zelluläre Expression von GP Δ MLD einen verringerten Einbau, wohingegen die Freisetzung filamentöser Partikel (Nachweis durch NP) nicht beeinträchtigt wurde (Spur 8-12). Es lässt sich zusammenfassen, dass eine vergleichbare zelluläre Expression des wildtypischen GPs und GP Δ MLD (Abb. 19B), in einen ebenfalls vergleichbaren Einbau in iVLPs resultierte (Abb. 19C, linker Western Blot). Wurden diese iVLPs hinsichtlich ihrer Fähigkeit HUH7-Zellen zu infizieren untersucht (3.2.5), ließ sich feststellen, dass iVLPs, welche eine ähnliche Menge an Glykoproteinen in ihre Membran integriert hatten (GP oder GP Δ MLD, Abb. 19C) auch eine vergleichbare Infektiosität aufwiesen (Abb. 19C, rechtes Diagramm).

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die Entfernung der O-Glykosylierungsstellen zwar einen deutlichen Effekt auf die Integration der Glykoproteine in iVLPs zu haben scheint, jedoch keinen direkten Einfluss auf die Infektiosität der iVLPs zeigt. Zieht man zusätzlich die Ergebnisse in unsere Betrachtungen mit ein, dass die Deletion der cytoplasmatischen Domäne zu einer starken Reduktion der iVLP Infektiosität führt (siehe 4.4), muss man davon ausgehen, dass die nachgewiesene Veränderung der O-Glykosylierung (siehe 4.3.2) die iVLP Infektiosität nicht modifiziert. Vielmehr kann man davon ausgehen, dass die veränderte O-Glykosylierung ein Hinweis auf eine Konformationsänderung der Ektodomäne darstellt, die durch die Deletion der cytoplasmatischen Domäne induziert wird.

4.6 Etablierung eines Fusionsassays für virale Oberflächenproteine

Die Infektion von Zellen durch Lipid-umhüllte Viren wird durch die Fusion viraler und zellulärer Membranen eingeleitet vermittelt durch ein Fusionsprotein, bei Filoviren das Glykoprotein GP (Becker, et al., 1995; Feldmann and Kiley, 1999). Prinzipiell verursacht die Bindung des Glykoproteins an den zellulären Rezeptor oder auch die Absenkung des pH-Wertes (wie im endosomalen Kompartiment) eine Konformationsänderung, die ein zunächst maskiertes Fusionspeptid an die Oberfläche des Glykoproteins und in die Nähe der

zellulären Membran bringt. Das Eintauchen des Fusionspeptids in die Zielzellmembran führt abschließend zur Annäherung und Fusion viraler und zellulärer Membranen (Harrison, 2008).

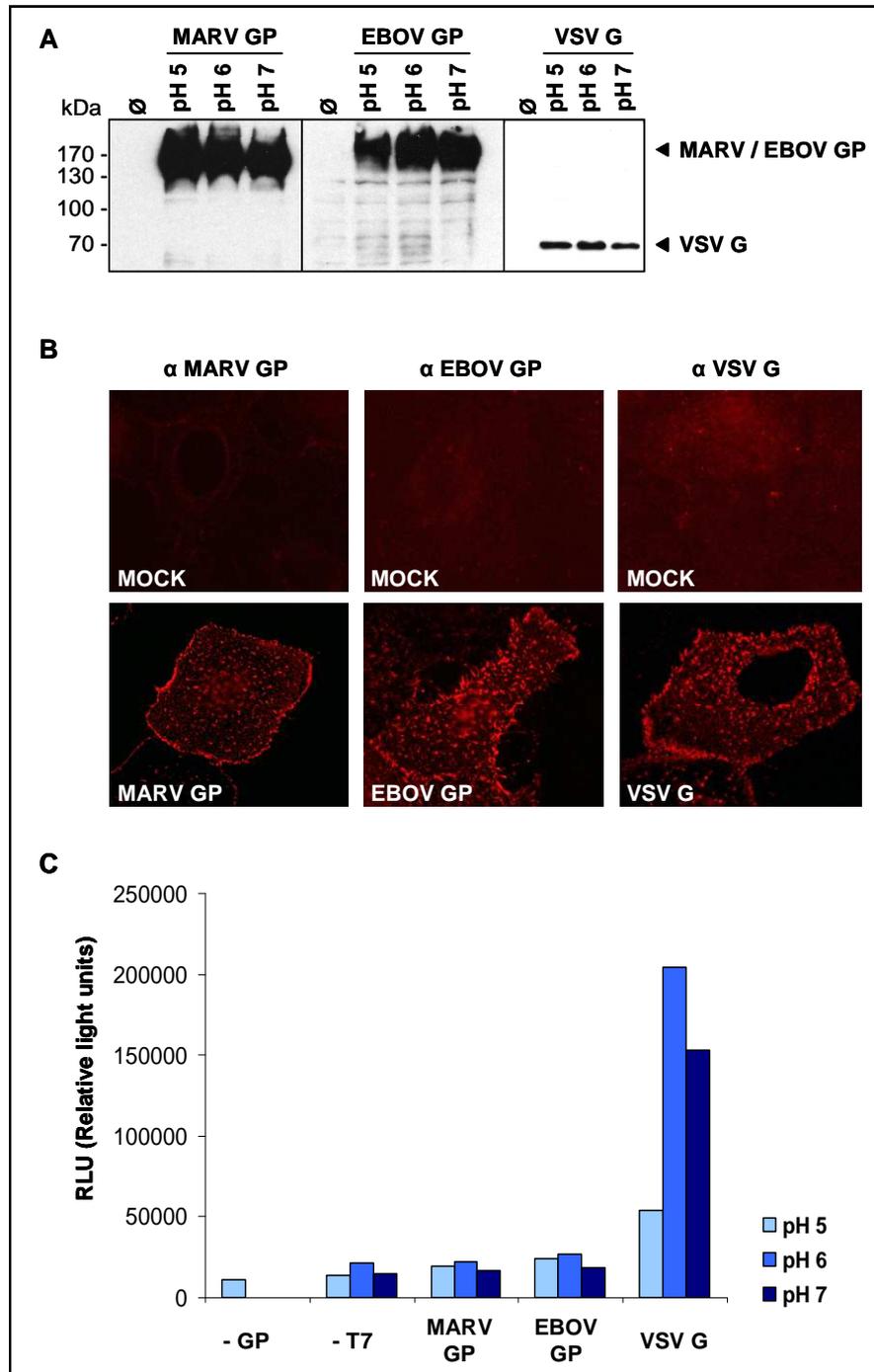


Abbildung 20: Etablierung eines Zell-Zell Fusionsassays

(A) Zelluläre Expression der im Fusionsassay verwendeten Glykoproteine. HeLa-Zellen wurden mit pCAGGS-T7 und pCAGGS-MARV GP, -EBOV GP oder pHCMV-VSV G transfiziert, 16-20 h p.t. mit DMEM (+++, pH 5, 6 oder 7) inkubiert und die Zellen nach einer zweiten Inkubationszeit von 24 h lysiert (Durchführung wie unter 3.2.8). Für eine Western Blot Analyse wurden die Zellen einer SDS-PAGE zugeführt und die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Das MARV Glykoprotein wurde mit einem monoklonalen Maus α-MARV GP Antikörper (50-6-10), das EBOV Glykoprotein mit einem polyklonalen Ziege α-EBOV GP Antikörper (GP/NP) und das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) mit einem Maus α-VSV G Antikörper (mcmA) detektiert. Die Erstantikörper wurden durch einen POD-gekoppelten Ziege α-Maus oder Esel α-Ziege Antikörper nachgewiesen.

(B) *Native Immunfluoreszenzanalyse der im Fusionsassay eingesetzten Glykoproteine.* HU7-Zellen wurden mit Plasmiden codierend für MARV GP, EBOV GP oder VSV G transfiziert und 24 h p.t. mittels einer Oberflächenimmunfluoreszenz analysiert. Dabei wurden die Oberflächenproteine mit folgenden Antikörpern markiert: das MARV Glykoprotein wurde mit einem polyklonalen Ziege α -MARV Serum (37/6), das EBOV Glykoprotein mit einem Ziege α -EBOV GP Antikörper (GP/NP) und das VSV Glykoprotein mit einem Maus α -VSV G Antikörper (mcmA) markiert. Die Erstantikörper wurden daraufhin mit einem *RhodaminRedTMX*- bzw. *TexasRed[®]*-gekoppelten Esel α -Maus oder Esel α -Ziege Zweitantikörper detektiert. (C) *Ermittlung der Fusionsaktivität von EBOV GP, MARV GP und VSV G.* Subkonfluente Hela-Zellen wurden mit pTM1-Firefly Luziferase bzw. pCAGGS-T7 kombiniert mit pCAGGS-MARV GP, -EBOV GP oder pCMV-VSV G transfiziert. 20 h p.t. wurde ein Zell-Zell Fusionsassay durchgeführt (3.2.8), wobei eine Cokultur der GP-exprimierenden und Rezeptor-präsentierenden Zellen hergestellt wurde. Die enzymatische Aktivität der Firefly Luziferase, welche ein Maß für die durch die Glykoproteine vermittelten Fusionsvorgänge der Hela-Zellen darstellt, wurde 48 h p.t. gemessen und als ermittelte Lichtemission dargestellt („relative light units“, RLU).

Zusätzlich können viele virale Oberflächenproteine auch die Fusion von Zellen untereinander vermitteln, was zur Ausprägung von mehrkernigen Zellen (Synzytien) führt (Bossart et al., 2002; Frey et al., 1995; Heminway et al., 1994; Wild et al., 1991). Um die fusogenen Eigenschaften viraler Oberflächenproteine zu ermitteln, werden häufig Oberflächenprotein-exprimierende Zellen verwendet und die durch Fusion entstandenen Synzytien ausgewertet; allerdings stellt die Quantifizierung dieser Versuche oftmals ein Problem dar. Um die Fähigkeit filoviraler Glykoproteine zu untersuchen, eine Fusion zellulärer Membranen zu vermitteln, sollte ein quantitativer Fusionsassay etabliert werden, wobei wir uns an einem bereits publizierten Assay orientieren konnten (Bär 2006).

Hela-Zellen wurden wie unter 3.2.8 beschrieben mit Plasmiden transfiziert, die die Expression von EBOV GP, MARV GP oder VSV G vermittelten. Nach 16-20 h Inkubationszeit wurden diese Zellen mit Medium verschiedener pH-Werte behandelt, erneut 24 h inkubiert, geerntet und mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) hinsichtlich der zellulären Expression der Glykoproteine untersucht (Abb. 20A). Es wurde deutlich, dass unabhängig von dem pH-Wert, dem die Zellen kurzzeitig während des Fusionsassays ausgesetzt waren, eine vergleichbare Expression der Glykoproteine stattfand, als auch die Stabilität der Glykoproteine durch verschiedene pH-Werte nicht beeinflusst wurde. Um eine Zell-Zell-Fusion vermitteln zu können, ist eine weitere wichtige Eigenschaft der Glykoproteine deren Transport an die Zelloberfläche. Mittels einer nativen Immunfluoreszenzanalyse (3.3.7.2) konnten die Glykoproteine an der Zellmembran detektiert werden (Abb. 20B). Die Nutzung des klassischen sekretorischen Transportwegs führte bei allen Glykoproteinen zu einer eindeutig vom Hintergrund unterscheidbaren Akkumulation in Clustern an der Zelloberfläche. Nachdem so geklärt werden konnte, dass die exprimierten Glykoproteine zur Plasmamembran transportiert wurden, wurden erneut Hela-Zellen jeweils mit den vorher beschriebenen Plasmiden und einem für die T7-Polymerase codierenden Plasmid transfiziert und 16-20 h p.t. mit Medium unterschiedlicher pH-Werte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit solchen Hela-Zellen überschichtet, die mit einem Plasmid transfiziert worden waren, welches die Firefly Luziferase unter der Kontrolle des T7-Promotors codierte. Eine stattfindende Zell-Zell-Fusion würde die Durchmischung des

Cytoplasmas der GP-exprimierenden und der Rezeptor-präsentierenden Zellen verursachen, was zu einer Interaktion der T7-Polymerase mit dem T7-abhängigen Promotor des Plasmids pTM1-Firefly Luziferase und damit zu einer Transkription und Expression der Luziferase führen würde. Die Cokultur der Hela-Zellen wurde erneut für 24 h inkubiert, die Zellen anschließend lysiert und die zelluläre Lumineszenz als Maß stattgefundenen Fusionsereignisse gemessen. In der Abbildung 20C ist deutlich erkennbar, dass wie zu erwarten in Abwesenheit der T7-Polymerase bzw. der Glykoproteine keine Fusionsereignisse mittels Lumineszenz gemessen werden konnten, da im Falle fehlender Glykoproteine keine Fusion und im Falle fehlender T7-Polymerase keine Expression der Firefly Luziferase stattgefunden hatte. Die Aktivierung der fusogenen Eigenschaften des VSV Oberflächenproteins G fand hingegen bei einem pH-Wert des Mediums von 6,2 statt, was mittels des Fusionsassays bestätigt werden konnte, da bei einem pH-Wert von 6 bzw. 7 eine starke zelluläre Lumineszenz gemessen wurde. Auf der anderen Seite zeigte sich, dass der etablierte Assay, welcher für VSV G eindeutige Daten lieferte, dies für die filoviralen Oberflächenproteine nicht konnte d.h. dass keine zelluläre Lumineszenz gemessen werden konnte. Vermutlich ist unser experimenteller Aufbau nicht für filovirale Oberflächenproteine geeignet. Dafür würden neue Untersuchungen sprechen, dass nicht nur die Anwesenheit eines niedrigen pH-Werts während eines Fusionsereignisses eine wichtige Rolle spielt, sondern vielmehr endosomale Cathepsine bei niedrigen pH-Werten ihr Aktivitätsmaximum besitzen und die filoviralen Glykoproteine zu fusionsaktiven Formen abbauen (Chandran et al., 2005; Dube et al., 2009; Kaletsky et al., 2007; Sanchez, 2007; Schornberg et al., 2006). Dieser Einfluss der Cathepsine kann durch unseren etablierten Fusionsassay natürlich nicht imitiert werden, eine Umstellung des experimentellen Aufbaus wäre nötig.

4.7 Untersuchungen über den Einfluss der cytoplasmatischen Domäne von MARV GP auf den zellulären Eintritt von VLPs

Durch die bis hierher erworbenen Erkenntnisse lässt sich folgendes Modell der Funktionalität des in iVLPs integrierten MARV GP zeichnen: Die Konformation der Ektodomäne wird durch Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne modifiziert, allerdings in einem begrenzten Ausmaß, so dass der intrazelluläre Transport, die posttranslationalen Modifikationen (ausgenommen der O-Glykosylierung) als auch der Einbau in iVLPs nicht signifikant beeinträchtigt werden. Andererseits verursacht die Konformationsänderung eine starke Reduktion der iVLP Infektiosität, die nicht auf die veränderte O-Glykosylierung zurückzuführen ist. Nach diesen Ergebnissen stand nun zu vermuten, dass durch die Deletion der cytoplasmatischen Domäne des GP eine Konformationsänderung der Ektodomäne stattfindet, die frühe Schritte beim Eindringen der iVLPs in die Zelle beeinflusst. Diese

Auswirkungen der Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne des GP auf die Aufnahme von VLPs sollten näheren Untersuchungen unterzogen werden.

4.7.1 Grundlagen des Aufnahmeassays

Die Etablierung dieses neuen Assays wurde uns, durch die Möglichkeit uns an einem publizierten Aufnahmeassay zu orientieren, erleichtert (Saeed et al., 2008). Bei unserem modifizierten Assay stellt das EBOV VLP System die Grundlage dar (Watanabe et al., 2004). Die entscheidende Komponente des Systems ist allerdings eine trunkierte Version des EBOV VP30 (AS 142-272), die an eine Firefly Luziferase fusioniert wurde (VP30-Luc; Abb. 21A; konstruiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Hartlieb).

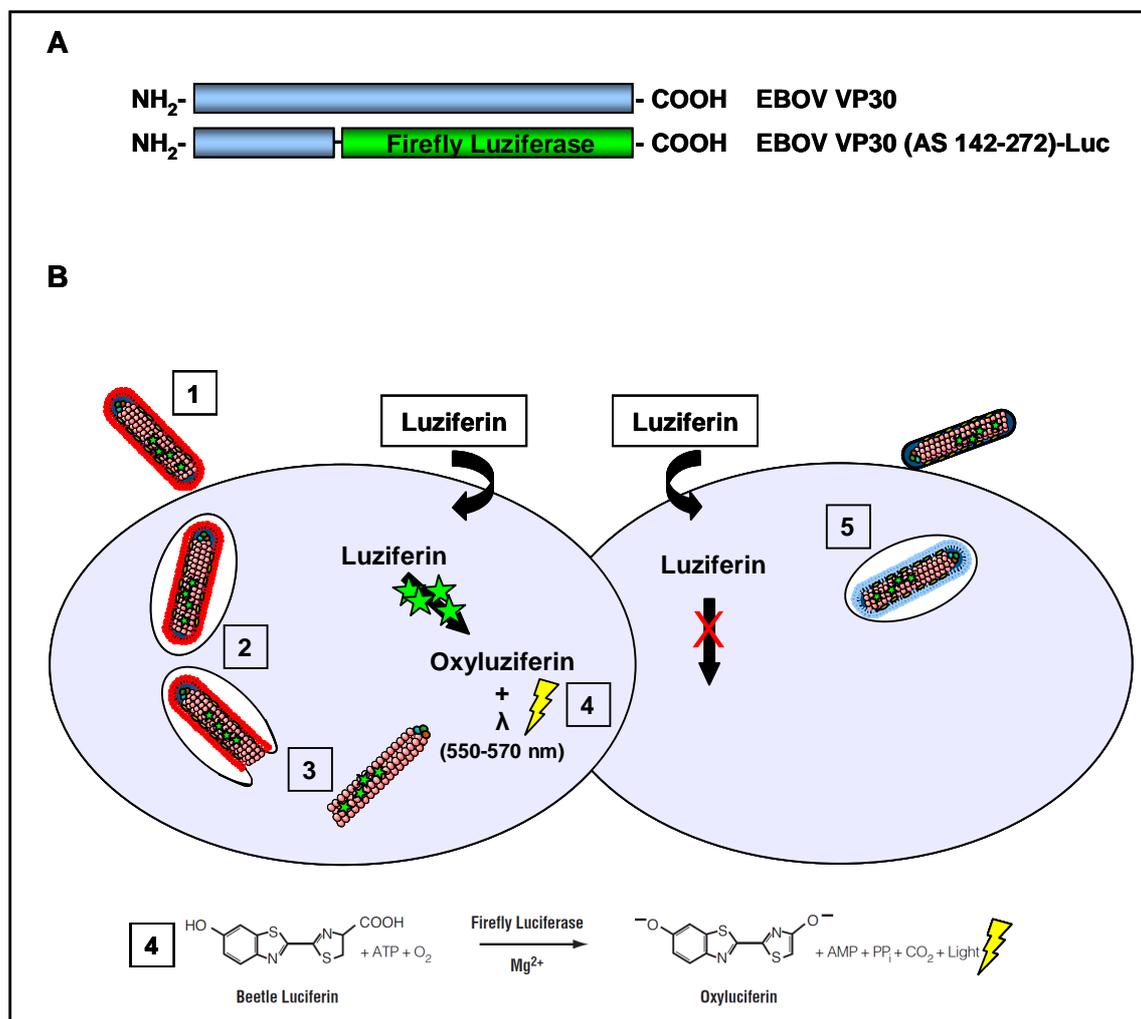


Abbildung 21: Etablierung eines Assays zur Aufnahme von VLPs in HEK293-Zellen

(A) Schematische Darstellung der durch rekombinante PCR hergestellten Mutante EBOV VP30 (AS 142-272)-Luc, aufgebaut aus der Firefly Luziferase, welche N-terminal mit dem C-Terminus von EBOV VP30 (AS 142-272) fusioniert wurde. (B) Schematische Darstellung des theoretischen Hintergrunds des Aufnahmeassays. (1) Bindung der VLPs an den filoviralen zellulären Rezeptor gefolgt von der Aufnahme der Partikel durch Rezeptorvermittelte Endozytose. (2) Fusion der endosomalen mit der VLP-Membran vermittelt durch die Aktivität des Glykoproteins. (3) Freisetzung der Nucleocapside ins Cytoplasma. (4) Metabolisierung des Luziferasesubstrats Luziferin durch VP30-Luc unter Verwendung von ATP und Mg²⁺ in Oxyluziferin verbunden mit einer Lichtemission (λ = 550-570 nm). (5) Keine Bindung an den zellulären Rezeptor in Abwesenheit eines

Glykoproteins bzw. keine oder reduzierte Fusion zellulärer mit VLP-Membranen bei Anwesenheit eines defekten Glykoproteins. Sterne repräsentieren aktive Firefly Luziferase.

Die in dem trunkierten VP30 vorliegenden Aminosäuren sind ausreichend, um eine Interaktion mit dem NP zu vermitteln, so dass im VLP System NP, VP35, L und VP30-Luc zu Nukleocapsiden verpackt werden können (Hartlieb et al., 2007). Damit enthalten die in Anwesenheit von VP40 und verschiedenen Mutanten des Glykoproteins in den Überstand freigesetzten VLPs eine enzymatisch aktive Firefly Luziferase (Abb. 21B, „1“).

Die so hergestellten VLPs werden mit Zielzellen inkubiert und können an den zellulären Rezeptor binden, wodurch die Endozytose der VLPs in die Zellen eingeleitet wird (Abb. 21B, „2“). Die Fusion von endosomalen Membranen mit der VLP-Membran wird durch ein aktives Glykoprotein vermittelt, wodurch die Freisetzung des Nukleocapsids in das Cytoplasma erfolgt (Abb. 21B, „3“). Das an das Nukleocapsid gebundene Fusionsprotein VP30-Luc kann das Substrat der Firefly Luziferase Luziferin metabolisieren, was zu einer messbaren Lichtemission führt ($\lambda = 550-570$ nm). Luziferin ist membranpermeabel und gelangt durch Diffusion über die Zellmembran in das Cytoplasma (Craig et al., 1991; Ignowski and Schaffer, 2004). Dabei stellt die in den inkubierten Zellen gemessene Luziferaseaktivität ein Maß für stattgefundenere Fusionsereignisse zwischen VLP- und endosomaler Membran dar (Abb. 21B, „4“). VLPs, welche keine oder defekte Glykoproteine inkorporiert haben, sollten nicht oder nur in einem stark verminderten Ausmaß in der Lage sein, eine Bindung an den Rezeptor und/oder die Fusion der endosomalen mit der VLP-Membran zu ermöglichen (Abb. 21B, „5“). In diesem Fall ist im Vergleich zu VLPs, die wildtypisches GP eingebaut haben, keine oder eine stark reduzierte Luziferaseaktivität zu erwarten.

4.7.2 Etablierung eines Aufnahmeassays

Der wichtigste Schritt bei der Etablierung des neuen Aufnahmeassays stellt die effiziente Inkorporation enzymatisch aktiver Firefly Luziferase in VLPs dar. Zur Überprüfung des Einbaus von VP30-Luc in VLPs sollte einerseits die Proteinzusammensetzung der in den Assay eingesetzten VLPs mittels Western Blot Analyse und andererseits die enzymatische Aktivität der eingebauten Luziferase mittels Lumineszenzmessung ermittelt werden.

HEK293-Zellen wurden mit Plasmiden, die zur Generierung von VLPs benötigt werden, transfiziert (pCAGGS-EBOV NP, L, VP35, VP30-Luc, VP40). Gleichzeitig wurden jeweils Plasmide transfiziert, die für verschiedene Glykoproteine codierten (EBOV GP, MARV GP oder MARV GPΔCD; 3.2.2, 3.2.9). Die gebildeten VLPs wurden über ein Sucrosekissen aufgereinigt (3.2.9), sphärische (Fraktionen 1-3) von filamentösen (Fraktionen 4-6) Partikeln separiert (3.2.7) und einem Proteinase K-Verdau (3.2.5) unterzogen. Mittels einer SDS-PAGE (3.3.1.1) und einer Western Blot Analyse (3.3.1.2, 3.3.1.3) konnte die Inkorporation der zu untersuchenden Proteine analysiert werden (Abb. 22A).

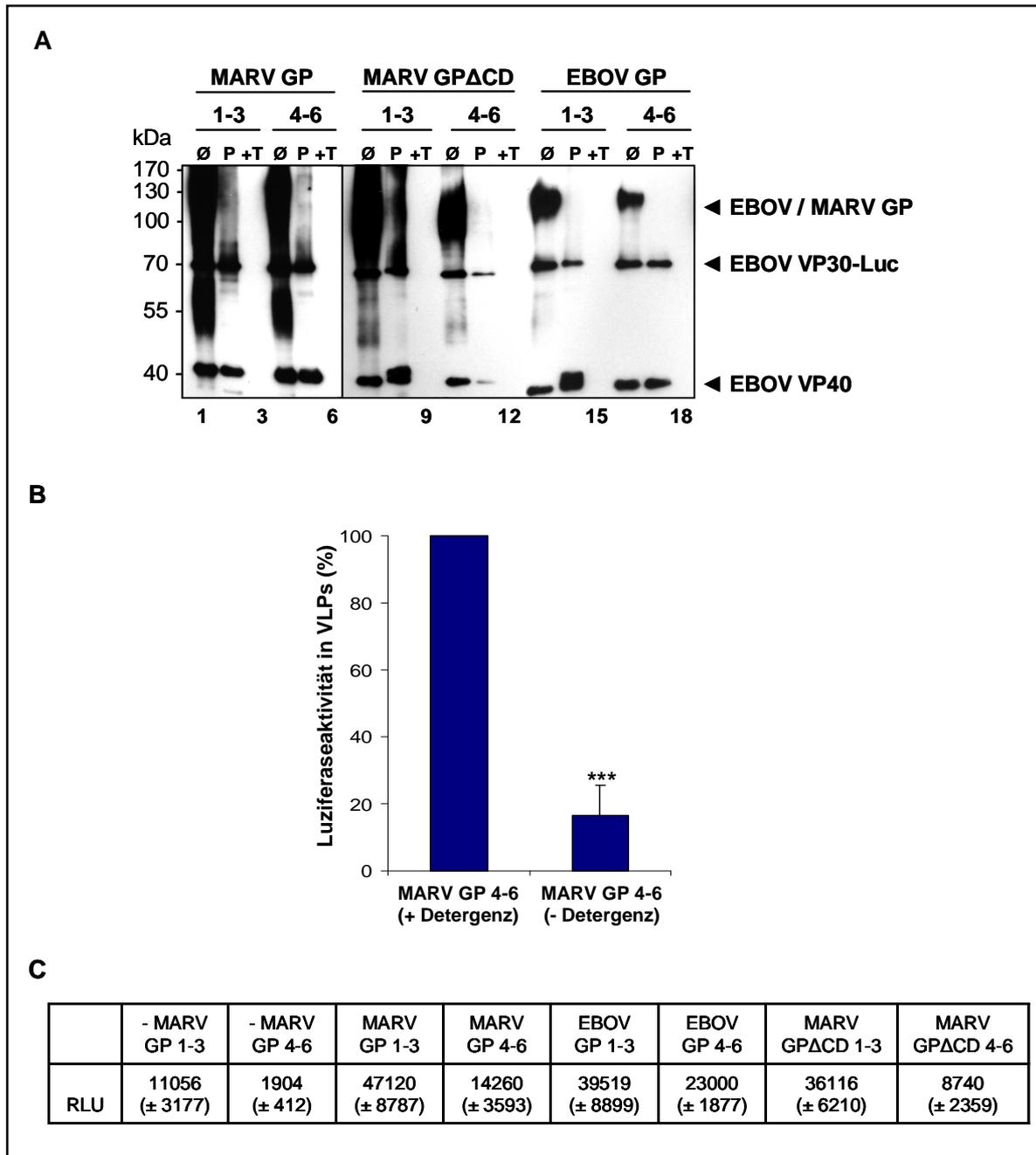


Abbildung 22: Analyse der Integration von VP30-Luc in VLPs

(A) Untersuchung des Einbaus von VP30-Luc in VLPs mittels Proteinase K-Verdau. HEK293-Zellen wurden mit pCAGGS-EBOV NP, VP35, L, VP40, VP30-Luc und Plasmiden codierend für verschiedene Glykoproteine (EBOV GP, MARV GP oder MARV GPΔCD) transfiziert. Die in den Zellkulturüberstand freigesetzten VLPs wurden 65 h p.t. über ein Sucrosekissen pelletiert und anschließend die filamentösen (Fraktionen 4-6) und sphärischen (Fraktionen 1-3) Partikel separiert. Mit den aufgereinigten VLPs wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt und die VLPs anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (P: Proteinase K, +T: Proteinase K in 0,1 % TritonX-100; 3.2.5). Der Nachweis der Proteine erfolgte mit folgenden Antikörpern: EBOV VP40 wurde mit einem monoklonalen Maus α-EBOV VP40 (2C4, 60 µg/mL), EBOV VP30-Luc mit einem monoklonalen Maus α-Firefly Luziferase und die Glykoproteine entweder mit einem Maus α-EBOV GP (1G12, Celline) oder einem Maus α-MARV GP (50-6-10) Antikörper gefärbt. Die Detektion der Erstantikörper erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Ziege α-Maus Antikörper. **(B)** Ermittlung der Integrität aufgereinigter filamentöser Partikel mittels Lumineszenzmessung. Die wie unter (A) beschrieben aufgereinigten filamentösen Partikel, welche MARV GP integrierten, wurden in einem Detergenzien-freien Puffer resuspendiert und die Aktivität der Firefly Luziferase gemessen. Die Luziferaseaktivität als Maß der Integrität der filamentösen Partikel wurde quantifiziert ($n = 3$) und der statistisch signifikante Unterschied (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) zwischen VLPs, welche mit Detergenzien-freiem und -haltigem Puffer (gesetzt als 100 %) inkubiert worden waren, wurde ermittelt. **(C)** Untersuchung des Einbaus von VP30-Luc in VLPs mittels Lumineszenzmessung. Die wie unter (A) beschrieben aufgereinigten sphärischen und filamentösen Partikel wurden in einem Detergenzien-haltigem Puffer

resuspendiert und in Anwesenheit von Luziferin die Aktivität der Firefly Luziferase gemessen, welche ein Maß für den Einbau enzymatisch aktiver Luziferase in VLPs darstellt. Die hier angegebene Lichtemission (in RLU, „relative light units“) entspricht dem Mittelwert und der Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Mit Hilfe des Proteinase K-Versuchs lies sich erkennen, dass die von der VLP-Membran umschlossenen Proteine (VP40 und VP30-Luc) erst in Anwesenheit des Detergenz TritonX-100 effizient von Proteinase K abgebaut werden konnten, was für ihre Lokalisation innerhalb der Partikel-membran sprach (Abb. 22A, z.B. Vergleich von Spur 13 [P] mit Spur 14 [+T]). Andererseits wurden die inserierten Oberflächenproteine auch ohne Zugabe des Detergenz direkt durch die Proteinase verdaut (Abb. 22A, z.B. Vergleich von Spur 10 [Ø] mit Spur 11 [P]). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die GPs als klassische Typ I Transmembranproteine so in die VLP-Membran inseriert waren, dass der Hauptteil auf der Oberfläche präsentiert und damit von keiner Membran umschlossen wurde.

Um die Integrität der aufgereinigten VLPs zu bestimmen, wurden die Partikel mit einem Puffer, welcher keine Detergenzien enthielt, inkubiert. Dies führte zur Messung von Luziferaseaktivitäten, die dem „Hintergrundsignal“ entsprachen, und ein Maß für die durch Zentrifugations- oder Resuspensionsschritte zerstörte Membranen und damit freigesetztes VP30-Luc darstellten. Dabei lag die Luziferaseaktivität bei mit Detergenzien-freiem Puffer resuspendierten filamentösen Partikeln, welche MARV GP inkorporierten, ca. 6fach niedriger (Abb. 22B, 16.4 % Luziferaseaktivität), als bei solchen Partikeln, welche mit Detergenzien-haltigem Puffer versetzt worden waren (Abb. 22B, gesetzt als 100 % Luziferaseaktivität). Daraus wird geschlossen, dass das Substrat Luziferin nicht dazu in der Lage ist, die VP40-Matrix, welche die Membraninnenseite der filamentösen VLPs auskleidet (Kolesnikova et al., 2002), zu durchdringen und mit der Luziferase zu interagieren.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität des in VLPs eingebauten VP30-Luc wurden aufgereinigte filamentöse und sphärische VLPs wie unter 3.2.9 beschrieben mit einem Detergenzien-haltigen Puffer inkubiert und anschließend die Luziferaseaktivität bestimmt (als „Gesamtaktivität“ bezeichnet). Wie in Abbildung 22C sichtbar, konnte in den aufgereinigten Partikeln Luziferaseaktivität gemessen werden, d.h. dass die Luziferase des VP30-Luc in ihrer enzymatisch aktiven Form in VLPs inkorporiert wurde. Darüber hinaus konnte man auch erkennen, dass der Einbau von VP30-Luc in sphärische Partikel begünstigt wurde. So war die Luziferaseaktivität der in den Überstand abgegebenen filamentösen Partikel im Vergleich zu sphärischen Partikeln immer niedriger, unabhängig von dem inkorporierten Oberflächenprotein (Abb. 22C, Vergleich z.B. von „MARV GP 1-3“ mit „MARV GP 4-6“). Die Menge an VLPs, die zur Ermittlung der Gesamtaktivität verwendet wurde, entspricht der während des Aufnahmeassay auf HEK293-Zellen aufbrachten Menge. Die während des Aufnahmeassays ermittelten Aktivitäten werden deshalb als Prozent (%) der Gesamtaktivität angegeben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl die verschiedenen Glykoproteine als auch VP30-Luc in seiner aktiven Form effizient in die spezifischen filamentösen Partikel (Fraktion 4-6; Kolesnikova et al., 2009) eingebaut wurden. Diese aufgereinigten VLPs waren daher für den Einsatz im Aufnahmeassay geeignet.

4.7.3 Untersuchung der Aufnahme von VLPs

Mit Hilfe des etablierten Aufnahmeassays war es uns möglich den Einfluss der cytoplasmatischen Domäne auf den GP-vermittelten Eintritt der VLPs in Zielzellen (HEK293) zu untersuchen. VLPs wurden mittels Transfektion von HEK293-Zellen hergestellt (3.2.7, 3.2.9) und entweder mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot Analyse (3.3.1.2, 3.3.1.3) oder Einbringung in den Aufnahmeassay (3.2.9) charakterisiert. Bei der Quantifizierung des Einbaus der Glykoproteine in VLPs (Verhältnis GP:VP40) und des Einbaus des VP30-Luc in VLPs (Verhältnis VP30-Luc:VP40) zeigte sich, dass sowohl die Glykoproteine als auch VP30-Luc effizient in VLP-Partikel eingebaut wurden (Abb. 23A). Weiterhin war auch die Menge produzierter Partikel durch Anwesenheit unterschiedlicher Glykoproteine nicht beeinflusst (Vergleich der Quantifizierung des VP40 der Spuren 4, 6 und 8).

Durch Inkubation von HEK293-Zellen mit VLPs bei 37 °C wie unter 3.2.9 beschrieben, wurde diesen eine Bindung des zellulären Rezeptors mit folgender Aufnahme in die Zellen ermöglicht (Abb. 23B). Da das Luziferin die VLP-Membran nicht permeieren kann, kann nur dann ein Signal der Luziferase gemessen werden, wenn die Nukleocapside der VLPs durch Fusion der Partikelmembran mit der endosomalen Membran in das Cytoplasma freigesetzt worden sind. Dies resultiert in der Metabolisierung des im Cytoplasma vorliegenden Substrats Luziferin durch VP30-Luc, die mit einer messbaren Lichtemission verbunden ist. Damit stellen die in den inkubierten Zellen gemessenen Luziferaseaktivitäten ein Maß für stattgefundenere Fusionsereignisse zwischen VLP- und endosomaler Membran dar. Die Luziferase-Gesamtaktivität der eingesetzten VLPs wird ermittelt (siehe 4.7.2) und mit den intrazellulär gemessenen Signalen verrechnet.

Es wurden sowohl sphärische VLPs (Fraktionen 1-3) als auch filamentöse VLPs (Fraktionen 4-6) untersucht. Wie zu erwarten, führte die Inkubation von HEK293-Zellen mit VLPs, welche keine Oberflächenproteine trugen, zu einem sehr schwachen messbaren Luziferasesignal (Abb. 23B; „ohne GP 1-3“ bzw. „ohne GP 4-6“). Die sphärischen Partikel, die als unspezifisch freigesetzte Partikel angesehen werden, also Vesikel die z.B. bei der Zellteilung oder Ausbildung von Filopodien von der Zelloberfläche unspezifisch freigesetzt werden (Bess et al., 1997), konnten unabhängig von der Art des integrierten Glykoproteins eine geringe Menge NP-gebundenes VP30-Luc in Zellen übertragen. Das daraus resultierende Lichtsignal und damit der zelluläre Eintritt von VLPs, nahm mit zunehmender Dauer des Versuchs stetig zu (Abb. 23B; „EBOV GP 1-3“, „MARV GP 1-3“, „MARV GPΔCD 1-3“).

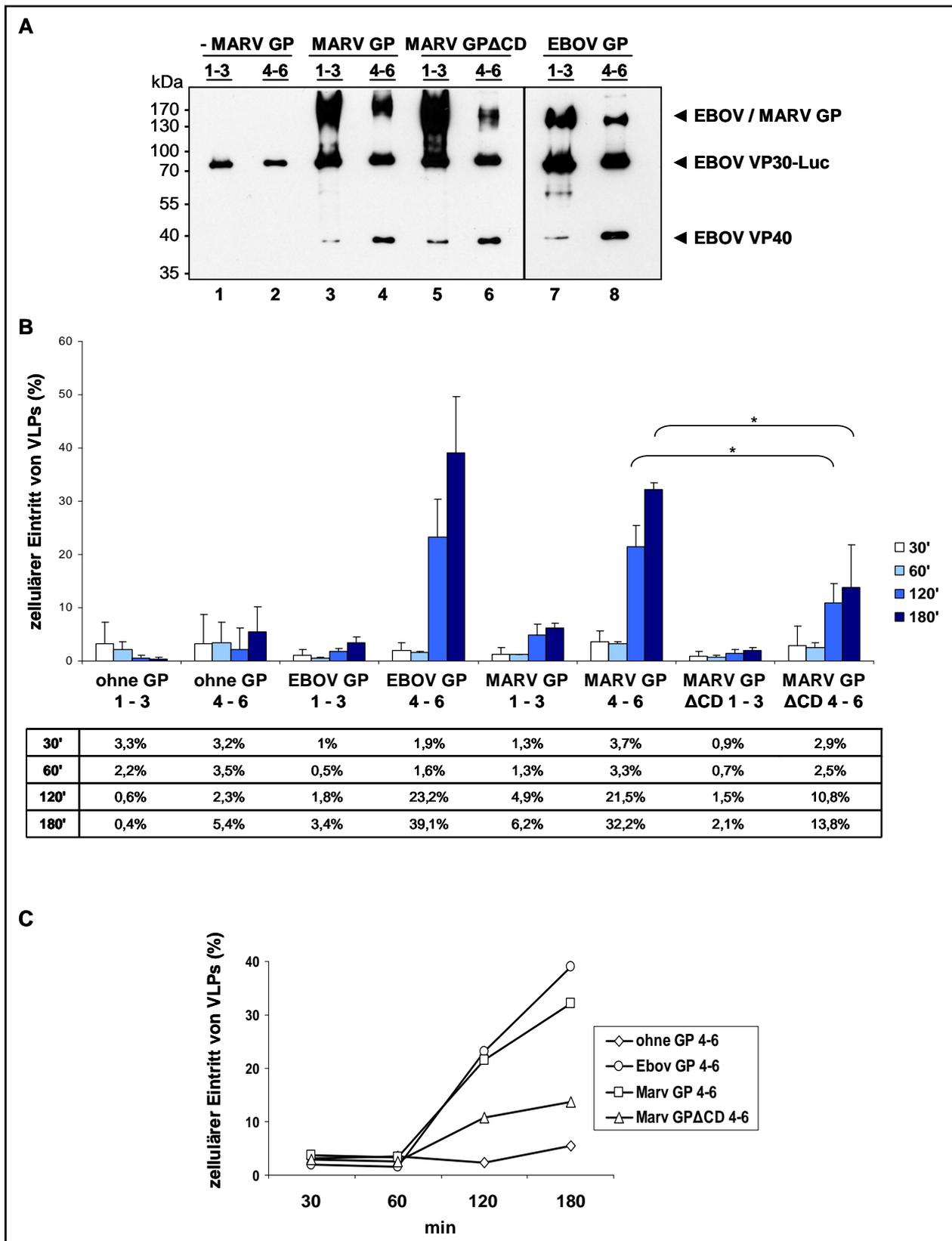


Abbildung 23: Einfluss der cytoplasmatischen Domäne von MARV GP auf die Aufnahme von VLPs in HEK293-Zellen

(A) Quantifizierung des Einbaus von VP30-Luc und verschiedenen Glykoproteinen in VLPs. HEK293-Zellen wurden mit pCAGGS-EBOV NP, VP35, L, VP40, VP30-Luc und Plasmiden codierend für verschiedene Glykoproteine (EBOV GP, MARV GP oder MARV GP Δ CD) transfiziert. Die in den Zellkulturüberstand freigesetzten VLPs wurden 65 h p.t. über ein Sucrosekissen pelletiert und anschließend die filamentösen (Fraktionen 4-6) und sphärischen (Fraktionen 1-3) Partikel separiert. Zur Quantifizierung des Einbaus von EBOV VP30-Luc und der Glykoproteine in sphärische bzw. filamentöse Partikel (d.h. das Verhältnis der Signalintensität

in einer Western Blot Analyse von GP:VP40 und VP30-Luc:VP40), wurden aufgereinigte VLPs mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. EBOV VP40 wurde mit einem monoklonalen Maus α -EBOV VP40 (2C4, 60 μ g/mL), EBOV VP30-Luc mit einem monoklonalen Maus α -Firefly Luziferase und die Glykoproteine entweder mit einem Maus α -EBOV GP (1G12, Celline) oder einem Maus α -MARV GP (50-6-10) Antikörper nachgewiesen. **(B) Aufnahme von VLPs in HEK293-Zellen.** VLPs wurden aufgereinigt wie unter (A) beschrieben. Die ankonzentrierten VLPs wurden mit HEK293-Zellen in Suspension bei 37 °C für 30, 60, 120 oder 180 min rotierend inkubiert (genaue Durchführung unter 3.2.9). Darauf folgend wurden die HEK293-Zellen pelletiert, in einem Detergenzien-freien Puffer resuspendiert, mit dem Luziferasesubstrat Luziferin versetzt und die enzymatische Aktivität der Firefly Luziferase sowohl in resuspendierten Zellen als auch in gereinigten, lysierten VLPs gemessen. Die in den gereinigten VLPs gemessene Aktivität wird als Gesamtaktivität bezeichnet, als 100 % gesetzt und die gemessene zelluläre Luziferaseaktivität damit verrechnet. Die Effizienz des VLP Eintritts in HEK293-Zellen wurde quantifiziert ($n = 3$) und der statistisch signifikante Unterschied (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) zwischen VLPs, in welche wildtypisches GP und solchen VLPs, in welche GP Δ CD eingebaut worden war, wurde ermittelt. **(C) Graphische Auswertung der Zeitverlaufstudie des Aufnahmeassay.**

Mittels der viralen Oberflächenproteine konnten die filamentösen Partikel hingegen sehr effizient in die Zellen aufgenommen werden (Abb. 23B). Dabei zeigten Partikel, welche EBOV GP integriert hatten (Abb. 23B; „EBOV GP 4-6“) eine Aufnahme in HEK293-Zellen, welche nach 180 min ca. 39 % der eingesetzten Luziferase-enthaltenden VLPs entsprach. Zusätzlich ließ sich erkennen, dass zwischen 60 und 120 min die gemessene Luziferaseaktivität stark zunahm, nachdem in den ersten 60 min die Lichtsignale kaum anstiegen (Abb. 23B, C; von 1,6 % auf 23,2 % der eingesetzten Gesamtaktivität). Dies würde bedeuten, dass zwischen einer und zwei Stunden nach dem Eindringen der VLPs in die Zellen VP30-Luc sehr effizient in das Cytoplasma entlassen wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die Aufnahme der VLPs in die Zellen d.h. die Bindung des Rezeptors gefolgt von Rezeptor-vermittelter Endozytose relativ lange dauert (ca. 60 min), bevor die Fusion von endosomaler und VLP-Membran stattfand. Ein ähnliches Phänomen ließ sich auch bei den filamentösen Partikeln, welche mit MARV GP oder MARV GP Δ CD dekoriert waren, beobachten (Abb.23B, C; „MARV GP 4-6, MARV GP Δ CD 4-6“). Einen mit EBOV GP dekorierten VLPs vergleichbaren effizienten Eintritt in HEK293-Zellen konnte man auch bei filamentösen Partikeln beobachten, welche MARV GP integrierten (Abb. 23B; „MARV GP 4-6“). Nach 180 min lag die Aufnahme bei ca. 32 % der eingesetzten Luziferase-enthaltenden VLPs. Vergleicht man die Datenauswertung der einzelnen Messpunkte, lässt sich erkennen, dass der Eintritt von filamentösen VLPs, die MARV oder EBOV GP inserierten, in Zellen ähnlich schnell und effizient verläuft: In dem Zeitfenster von 60 bis 120 min zeigten MARV GP einbauende VLPs einen Eintritt von 18,2 % und EBOV GP einbauende VLPs eine Aufnahme von 21,6 %. Deutlich war auch erkennbar, dass die Deletion der cytoplasmatischen Domäne dazu führte, dass die in VLPs integrierten Glykoproteine nur einen verringerten zellulären Eintritt vermitteln konnten. Die Aufnahme lag nach 180 min bei ca. 13 % der eingesetzten Luziferase-enthaltenden VLPs (Abb. 23B, C; „MARV GP Δ CD 4-6“). Vergleicht man den Eintritt der VLPs in HEK293-Zellen ließ sich erkennen, dass die Deletion der cytoplasmatischen Domäne des GP eine signifikante Reduktion der Aufnahme von filamentösen VLPs auf 42,9 % im Vergleich zu VLPs, die wildtypisches GP eingebaut hatten (gesetzt als 100 %), verursachte.

Obwohl die Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne einen starken Einfluss auf die Fähigkeit des GPs ausübte die Fusion viraler mit endosomaler Membran zu vermitteln, zeigte MARV GP Δ CD während des Aufnahmeassays ein ähnliches funktionelles Verhalten wie MARV GP. Nach 30 bzw. 60 min zeigten sowohl MARV GP als auch GP Δ CD integrierende VLPs eine relativ niedrige, miteinander vergleichbare Luziferaseaktivität (Abb. 23B, C; 3,7 % bzw. 3,3 % bei MARV GP, sowie 2,9 % bzw. 2,5 % bei MARV GP Δ CD). Zwischen 60 und 120 min der Zeitverlaufsstudie fand ein ausgeprägter Anstieg der Luziferaseaktivität statt, wobei sich MARV GP bzw. GP Δ CD inkorporierende VLPs in der Höhe des Anstiegs stark unterschieden (Abb. 23B, C; 21,5 % bei MARV GP, sowie 10,8 % bei GP Δ CD). Wildtypisches GP konnte somit im Vergleich zu GP Δ CD doppelt so schnell bzw. effizient die Membranfusion vermitteln. Während des letzten Messpunktes (180 min) wurde dieser Befund noch einmal bestätigt bzw. noch verstärkt: GP Δ CD konnte nur eine Fusion von 13,8 % der eingesetzten Gesamtaktivität vermitteln, im Vergleich zu wildtypischem GP, welches eine Fusion von 32,2 % verursachte. Somit ergab sich durch den Einbau von GP Δ CD in VLPs eine Reduktion der Aufnahme auf ca. 43 % im Vergleich zu VLPs, welche wildtypisches GP inkorporiert hatten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Etablierung eines Assays gelungen ist, mit Hilfe dessen es möglich war, den Eintritt filamentöser filoviraler VLPs in HEK293-Zellen hinsichtlich der Menge und Geschwindigkeit reproduzierbar zu quantifizieren. Mit Hilfe dieses Assays konnte nachgewiesen werden, dass die cytoplasmatische Domäne des MARV GP eine wichtige Rolle während des Eintritts in die Zielzellen spielt. Wahrscheinlich besteht die Rolle der cytoplasmatischen Domäne darin, das GP während der Fusion zu stabilisieren. Die Abwesenheit dieser Domäne verursachte eine signifikante Reduktion der Freisetzung von Nukleocapsiden aus in endosomalen Vesikeln befindlichen VLPs ins Cytoplasma. Die momentane Datenlage lässt die Schlussfolgerung zu, dass der verminderte zelluläre Eintritt von VLPs, welche MARV GP Δ CD integrierten und die bereits beschriebene Reduktion der iVLP Infektiosität (4.4) miteinander korrelieren.

4.8 Einfluss der MARV GP Acylierung auf die Infektiosität von iVLPs

Die Anheftung von Fettsäuren (Acylierung) ist eine charakteristische posttranslationale Modifikation viraler Oberflächenproteine, deren Funktion Gegenstand kontroverser Diskussionen ist. Es wird vermutet, dass die Anheftung von Fettsäuren in der unmittelbaren Nähe oder innerhalb einer Transmembrandomäne die Verankerung von Proteinen in der Membran verbessert. Darüber hinaus wird auch postuliert, dass diese Modifikation eine Sortierung von Transmembranproteinen in mit bestimmten Lipiden angereicherten Bereichen innerhalb einer Membran wie z.B. Cholesterol-reichen Mikrodomänen (so genannten „lipid rafts“) erlaubt. Das MARV Glykoprotein wird während seines Transports vom ER zum Golgi-

Apparat an zwei konservierten Cysteinen im C-terminalen Bereich der Transmembrandomäne (Cys₆₇₁₊₆₇₃) von zellulären Acyltransferasen acyliert (Funke et al., 1995); eine vergleichbare Acylierung wurde auch für das EBOV Glykoprotein berichtet (Ito et al., 2001). In einem auf VSV basierenden System, in dem G durch EBOV GP ausgetauscht worden war, wurde der Acylierung des EBOV GP (Cys₆₇₀₊₆₇₂) keine essentielle Rolle für die durch GP vermittelte Infektiosität zugesprochen (Ito et al., 2001). Andererseits konnte gezeigt werden, dass acylierungsdefizientes EBOV GP nicht mehr mit „lipid rafts“ assoziieren konnte, was für die Freisetzung von viralen Partikeln eine wesentliche Rolle spielte (Bavari et al., 2002).

Aufgrund dieser kontroversen Datenlage sollte die Funktion der Acylierung von MARV GP für die iVLP Proteinzusammensetzung und vor allem Infektiosität näher untersucht werden. Da angenommen werden kann, dass der Acylierung des GPs eine für GP stabilisierende Funktion in der Membran zugedacht wird, wurden neben acylierungsdefizienten Mutanten (MARV GP-C/A, Abb. 24A) auch Mutanten hergestellt, bei denen zusätzlich die cytoplasmatische Domäne deletiert wurde (MARV GP Δ CD-C/A). Es wurde vermutet, dass diese zusätzliche Mutation zu einer Verstärkung einer möglichen Proteinstabilisierung führen müsste.

Daraufhin wurden HEK293-Zellen mit allen zur Generierung von iVLPs benötigten Plasmiden transfiziert (3.2.2, 3.2.5; einschließlich Plasmiden codierend für MARV GP Δ CD, GP-C/A oder GP Δ CD-C/A, Abb. 24A). Nach 65 h p.t. wurden die Zellen lysiert (p0), iVLPs aufgereinigt und mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) analysiert oder zur Infektion vortransfizierter HUH7-Zellen verwendet (3.2.5). Die zelluläre Expression der Glykoproteine bzw. die Expression anderer viraler Proteine (NP/VP40) wurde durch die Einführung von Mutationen in GP (Abb. 24B, Spuren 4-6) im Vergleich zu wildtypischem GP (Abb. 24B, Spur 3) nicht beeinträchtigt. Zusätzlich zeigten die Mutationen in GP keine Auswirkungen auf die Inkorporation der Glykoproteine in iVLPs bzw. auf die Menge freigesetzter Partikel (als Maß wurde hier der Nachweis des NP herangezogen, Abb. 24B, Vergleich der Spuren 9 und 10-12). MARV GP Δ CD-C/A zeigte dabei ähnlich wie GP Δ CD eine deutliche Reduktion des Molekulargewichts (Abb. 24B, Spuren 10 und 12) und damit erhöhte Geschwindigkeit im Laufverhalten in der SDS-PAGE, welche vermutlich auf die veränderte Glykosylierung zurückzuführen war.

Wurden diese iVLPs zur Infektion von HUH7-Zellen eingesetzt (Abb. 24C) wurde deutlich, dass die Mutation der Acylierungsstellen keine Verringerung der iVLP Infektiosität verursachte; dieses Ergebnis korrelierte mit den oben zitierten Pseudotypenstudien von Ito et al. (Ito et al., 2001). Wenn allerdings neben den Acylierungsstellen auch die cytoplasmatische Domäne des GP deletiert wurde, nahm die iVLP Infektiosität im Vergleich zu iVLPs, welche MARV GP bzw. GP Δ CD bzw. GP-C/A inserierten, signifikant ab (Reduktion der Effizienz der Infektion von 100 % bzw. 29,3 % bzw. 101 % auf 6,7 %).

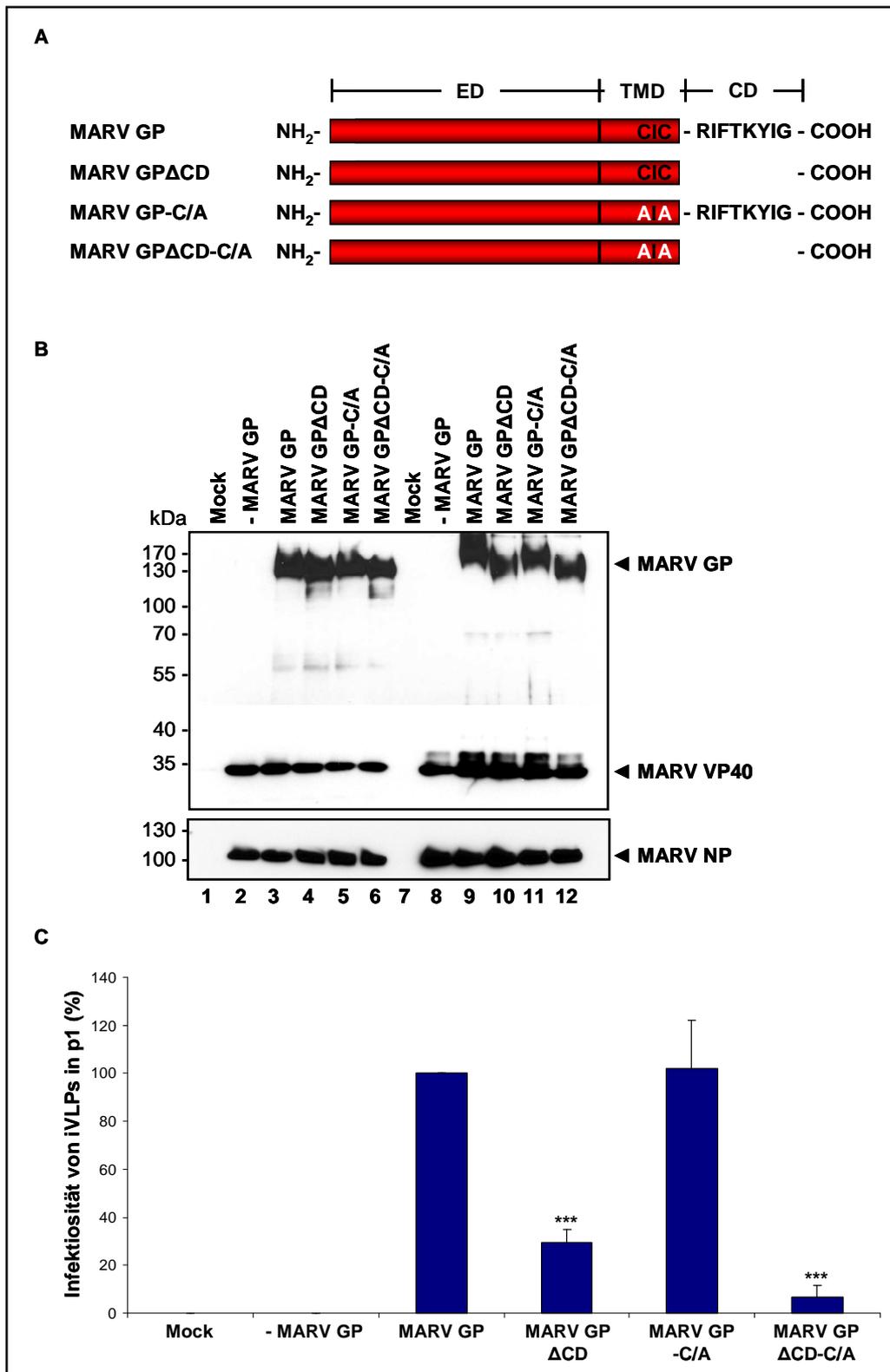


Abbildung 24: Einfluss der Acylierung des MARV GP auf die Infektiosität von iVLPs

(A) Schematische Darstellung der MARV GP Mutanten, deren in der Transmembrandomäne liegende Acylierungsstellen (zwei Cysteine [C]) partiell durch Mutagenese zu Alaninen (A) ersetzt wurden. Folgende Nomenklatur wurde verwendet: Ektodomäne (ED), Transmembrandomäne (TMD) und cytoplasmatische Domäne (CD). (B) Western Blot Analyse der zellulären Expression viraler Proteine und der Proteinzusammensetzung freigesetzter iVLPs. HEK293-Zellen wurden mit allen Plasmiden, die zur Herstellung infektiöser VLPs benötigt werden, transfiziert und 65 h p.t. sowohl die HEK293-Zellen (p0) lysiert, als auch die im Überstand angereicherten iVLPs durch Ultrazentrifugation pelletiert. Sowohl iVLPs (Spur 7-12) als auch Zellen (Spur 1-6) wurden einer Western Blot Analyse unterzogen. Dabei wurde das Matrixprotein VP40 mit einem Maus α -MARV VP40 (40-2-2),

das Nukleoprotein mit einem Maus α -MARV NP (59-9-10) und die Glykoproteine mit einem monoklonalen Maus α -MARV GP (50-6-10) Antikörper markiert. Die Erstantikörper konnten mit einem HRP-gekoppelten Ziege α -Maus Zweitantikörper detektiert werden. (C) *Bestimmung der Infektiosität der iVLPs*. Die Herstellung von iVLPs erfolgte wie unter (B) beschrieben; nach Resuspension der iVLPs wurden diese zur Infektion von vortransfizierten HUH7-Zellen verwendet (Durchführung wie unter 3.2.5 beschrieben). Sowohl HEK293-Zellen (p0) als auch infizierte HUH7-Zellen (p1) wurden geerntet, lysiert und ein Luziferaseassay wurde durchgeführt (generierte Daten von p0 nicht gezeigt). Die Infektiosität von iVLPs ($n \geq 4$) wurde quantifiziert; die Sterne repräsentieren die statistisch signifikanten Unterschiede (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$) im Vergleich zu der Infektiosität von iVLPs dekoriert mit MARV GP (gesetzt als 100 %).

Zusammengenommen lässt sich die Aussage treffen, dass die Acylierung des MARV GP keine wesentliche Rolle für die iVLP Infektiosität spielt. Eine Destabilisierung des Proteins durch Deletion der Acylierungsstellen und der cytoplasmatischen Domäne führte jedoch trotz eines effizienten Einbaus des Glykoproteins in iVLPs zu einer Minimierung der iVLP Infektiosität.

4.9 Untersuchung der Infektiosität von EBOV GP Δ CD integrierenden iVLPs

EBOV inkorporiert vergleichbar mit dem nah verwandten MARV ebenfalls ein klassisches Typ I Transmembranprotein, das Glykoprotein (GP) in seine Virusmembran. Dieses besitzt analog zu MARV GP, eine sehr kurze cytoplasmatische Domäne, welche nur aus vier AS aufgebaut ist. Vergleichende Untersuchungen zwischen der Rolle der cytoplasmatischen Domänen des EBOV und MARV GP sollten durchgeführt werden, da deren Aufgabe bis zu Beginn dieser Arbeit ungeklärt war. Darüber hinaus war eine weitere Untersuchung der cytoplasmatischen Domäne des EBOV GP nahe liegend, da sich für die cytoplasmatische Domäne des MARV GP eine wichtige Aufgabe in der Stabilisierung und Ausprägung der Konformation der Ektodomäne heraus kristallisiert hatte.

Um der Funktion der cytoplasmatischen Domäne des EBOV GP nachzugehen, wurde eine Deletionsmutante konstruiert, bei der die vollständige Aminosäuresequenz der cytoplasmatischen Domäne entfernt und dieses Konstrukt in einen EBOV-spezifischen iVLP-Assay eingesetzt wurde (Abb. 25A, Klonierung durchgeführt von S. Wolff).

Es wurden HEK293-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die zu Herstellung von EBOV-spezifischen iVLPs benötigt werden, wobei das Plasmid codierend für das wildtypische GP partiell durch GP Δ CD ersetzt wurde (3.2.2, 3.2.5, Abb. 25A). Nach 65 h Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert (p0), iVLPs aufgereinigt und mittels SDS-PAGE (3.3.1.1) und Western Blot (3.3.1.2, 3.3.1.3) charakterisiert bzw. zur Infektion vortransfizierter HUH7-Zellen verwendet (3.2.5). Anhand der Western Blot Analyse zeigte sich dass EBOV GP Δ CD ähnlich zu dem wildtypischen GP effizient zellulär exprimiert wurde und auch die Expression weiterer viraler Proteine (NP/VP40) nicht modifizierte (Abb. 25B, Spuren 3 und 4). Sowohl die Inkorporation der Deletionsmutante in iVLPs als auch die Menge an freigesetzten Partikeln (Nachweis von NP) war vergleichbar mit der des wildtypischen GPs (Abb. 25B, Spur 7 und

8). Wurden HUH7-Zellen mit diesen Partikeln infiziert, wurde deutlich, dass in Abwesenheit des Oberflächenproteins trotz einer effizienten Produktion von iVLPs (Abb. 25B, Spur 6) keine Infektion vermittelt werden konnte (Abb. 25C). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne des EBOV GP eine Reduktion der iVLP Infektiosität verursachte: die Infektionsrate wurde im Vergleich zu iVLPs, welche wildtypisches GP integrierten, auf 35,4 % verringert (Abb. 25C).

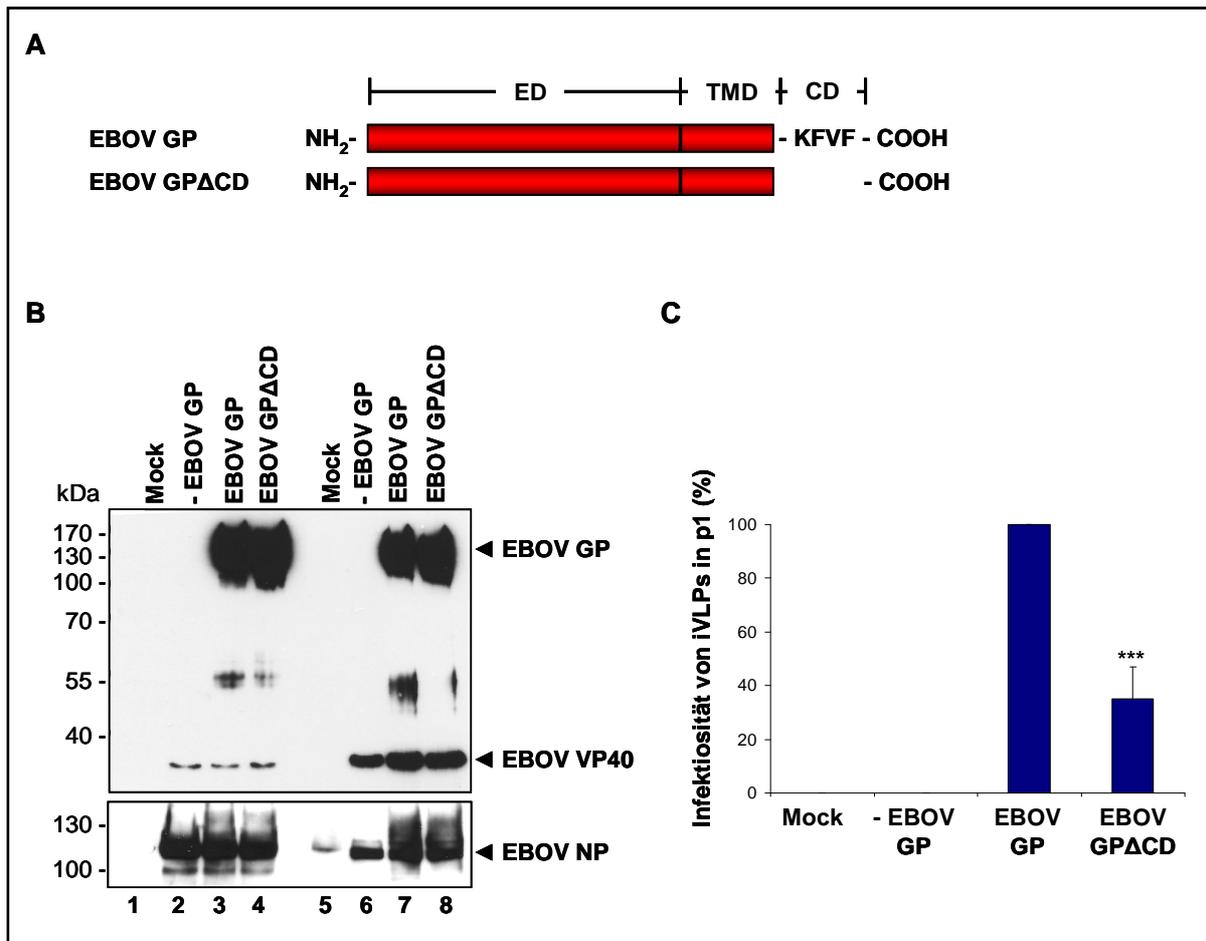


Abbildung 25: Einfluss der cytoplasmatischen Domäne des EBOV GP auf die Infektiosität von iVLPs

(A) Schematische Darstellung der aus EBOV GP hergestellten Deletionsmutante EBOV GPΔCD; folgende Nomenklatur wurde verwendet: Ektodomäne (ED), Transmembrandomäne (TMD), cytoplasmatische Domäne (CD). EBOV GPΔCD hergestellt von S. Wolff. (B) Western Blot Analyse der zellulären Expression viraler Proteine und der daraus resultierenden iVLP Proteinzusammensetzung. HEK293-Zellen wurden mit allen Plasmiden, die zur Herstellung infektiöser EBOV VLPs benötigt werden, transfiziert und 65 h p.t. die HEK293-Zellen (p0) lysiert, als auch die im Überstand angereicherten iVLPs durch Ultrazentrifugation pelletiert. Sowohl die iVLPs (Spuren 5-8) als auch die Zellen (Spuren 1-4) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Im Zuge dessen wurde das Matrixprotein mit einem Maus α-EBOV VP40 Antikörper (2C4, 60 µg/mL), das Nukleoprotein mit einem Ziege α-EBOV NP Serum (GP/NP) und das Glykoprotein mit einem Maus α-EBOV GP Antikörper (1G12, Celline) detektiert. Die Erstantikörper wurden mit einem POD-gekoppelten Esel α-Ziege oder einem Ziege α-Maus Antikörper sichtbar gemacht. (C) Bestimmung der Infektiosität der mit EBOV GPΔCD dekorierten iVLPs. Die wie unter (B) beschrieben aufgereinigten iVLPs wurden zur Infektion von HUH7-Zellen (p1), welche zuvor mit pCAGGS-EBOV NP, VP30, VP35 und L transfiziert worden waren, verwendet. Sowohl HEK293-Zellen (p0) als auch infizierte HUH7-Zellen (p1) wurden geerntet, lysiert und ein Luziferaseassay wurde durchgeführt (generierte Daten von p0 nicht gezeigt). Die Infektiosität von iVLPs (n = 5) wurde quantifiziert; die Sterne repräsentieren die statistisch signifikanten Unterschiede (*, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001) im Vergleich zu der Infektiosität von iVLPs dekoriert mit wildtypischen EBOV GP (gesetzt als 100 %).

Um die Datenlage zusammen zu fassen, lässt sich sagen, dass die cytoplasmatischen Domänen beider filoviraler Oberflächenproteine eine wichtige Rolle für die Konformation und Stabilität der GP Ektodomäne spielen. Der Einfluss auf die Konformation der Ektodomäne lässt sich vor allem durch eine Veränderung des Glykosylierungsmusters des MARV GP zeigen, verursacht dadurch, dass die zellulären Glykosidasen durch eine veränderte Struktur der Ektodomäne die Glykanbindungsstellen nicht mehr erkennen können. Ob die Glykanstruktur des EBOV GP auch modifiziert wurde als Indiz einer veränderten Konformation der Ektodomäne, wäre interessant näher zu untersuchen. Analog zu der Funktion der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP konnte gezeigt werden, dass auch die Deletion der cytoplasmatischen Domäne des EBOV GP im Kontext des iVLP Systems zu einer Verminderung der iVLP Infektiosität führte, die jedoch nicht so stark ausgeprägt war, wie der Effekt der Abwesenheit der MARV GP cytoplasmatischen Domäne (Reduktion der Infektiosität auf ca. 23 % bei MARV GP bzw. ca. 35 % bei EBOV GP).

5 Diskussion

5.1 Intrazellulärer Transport von MARV GP

Die Nutzung der klassischen sekretorischen Transportroute erlaubt dem MARV GP einen gerichteten und kontrollierten Weg an die Zelloberfläche, bei dem das Glykoprotein verschiedene posttranslationale Modifikationen durchläuft (Becker et al., 1996; Funke et al., 1995; Geyer et al., 1992; Sanger et al., 2002; Volchkov et al., 2000b). Diese Veränderungen z.B. Glykosylierungen, Acylierungen oder Phosphorylierungen stellen dabei einerseits Hinweise dar, die auf einen korrekten intrazellulären Transport schließen lassen und andererseits spielen sie oftmals eine wichtige Rolle für die Funktion des Glykoproteins. Für die Ausbildung von Vesikeln, die den Transport von Material zwischen unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten vermitteln, werden zelluläre periphere Membranproteine (COP II, AP1-3, GGA) benötigt. Es wird angenommen, dass eine Inkorporation der Fracht in die Transportvesikel über die Interaktion zwischen zellulären Proteinen und dem cytoplasmatischen Anteil der zu transportierenden Proteine ermöglicht wird.

Obwohl das MARV GP zur Plasmamembran transportiert wird, lässt es sich vorwiegend im Endoplasmatischen Retikulum nachweisen, da die Glykosylierung und Faltung des Proteins wahrscheinlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Transports darstellen (Becker et al., 1996). Während dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die intrazelluläre Verteilung und der Transport des GP auch in Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne nicht wesentlich beeinträchtigt waren. Für das Konstrukt GP Δ CD, in welchem die cytoplasmatische Domäne deletiert wurde, konnte sowohl eine Akkumulation im perinukleären Bereich, welche einer Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum bzw. Golgi-Apparat entspricht, als auch eine ebenfalls für diese Lokalisation sprechende mannosereiche N-Glykosylierung nachgewiesen werden (4.1, Kolesnikova et al., 2004b). Bei Coexpression mit dem Matrixprotein VP40 zeigte sich, dass die Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne den Transport des GP in periphere Cluster, so genannte Multivesikuläre Strukturen (MVB) und somit auch eine Colokalisation beider Proteine nicht tangierte (4.1.1, Mittler et al., 2007). Es wird angenommen, dass die zum späten Endosom gehörenden MVB eine Kreuzung der Transportwege des GP bzw. VP40 darstellen und die hier statt findenden Interaktionen Voraussetzung für die Inkorporation von GP in VP40-induzierte VLPs sind (Kolesnikova et al., 2004b; Mittler et al., 2007). Diese Ergebnisse zeigen Übereinstimmung mit Daten, welche der Transmembrandomäne die Aufgabe zusprechen, die Interaktion mit VP40 und somit Akkumulation im späten Endosom zu vermitteln. Der korrekte Transport scheint somit über die Transmembrandomäne gewährleistet zu werden, so dass die Interaktion zwischen dem cytoplasmatischen Anteil des GP und zellulären Transportproteinen nicht notwendig zu sein scheint (Mittler et al., 2007). MARV GP Δ CD wird in Anwesenheit des Matrixproteins VP40 in iVLPs inkorporiert, woraus

sich schließen lässt, dass die Deletion der cytoplasmatischen Domäne offensichtlich auch keine Auswirkung auf die Oligomerisierung zu Trimeren, den Transport an die Zelloberfläche und die Rekrutierung in freigesetzte Partikel hatte (4.3.1).

Obwohl die mannosereiche und die komplexe N-Glykosylierung in GP Δ CD ähnlich effizient verliefen wie bei dem wildtypischen GP, war deutlich erkennbar, dass die O-Glykosylierung stark reduziert wurde (4.3.2). Es wird angenommen, dass durch Deletion der cytoplasmatischen Domäne die Konformation der Ektodomäne verändert wurde, wodurch die O-Glykosylierungsstellen für die zellulären O-Glykosyltransferasen partiell unzugänglich wurden, was in eine verminderte Anheftung von O-Glykanen resultierte. Die veränderte Konformation der Ektodomäne bzw. veränderte Glykosylierungen hatten jedoch keine Auswirkungen auf den Transport an die Zelloberfläche. Für die zelluläre Metalloproteinase MT1-MMP konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Deletion der cytoplasmatischen Domäne in eine starke Reduktion der O-Glykosylierung der Ektodomäne resultiert, diese Deletion den intrazellulären Transport jedoch nicht beeinträchtigt (Ludwig et al., 2008).

Eine große Analogie konnte zwischen dem MARV GP und dem Influenzavirus Oberflächenprotein HA in Abwesenheit ihrer cytoplasmatischen Domänen beobachtet werden: ähnlich wie bei MARV GP Δ CD konnte bei HA Δ CD eine mit wild-typischem HA vergleichbare Oligomerisierung und N-Glykosylierung nachgewiesen werden. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass der intrazelluläre Transport des HA Δ CD nicht verändert wird, allerdings wurde in kinetischen Analysen gezeigt, dass der Transport des HA Δ CD durch die sekretorische Transportroute stark verlangsamt ablief (Jin et al., 1994; Simpson and Lamb, 1992). Im Gegensatz dazu resultierte die Entfernung der cytoplasmatischen Domäne des Oberflächenproteins HN des Simian Virus 5 (SV5) in einer fast vollständigen Blockade des intrazellulären Transports, was sich in einer kompletten Endo H-Sensitivität und einem minimalen Transport an die Plasmamembran ausdrückte (Schmitt et al., 1999).

5.2 Zusammenbau MARV-spezifischer iVLPs

Für die Assemblierung viraler Partikel bzw. iVLPs ist eine örtlich und zeitlich abgestimmte Orchestrierung viraler und zellulärer Proteine an der Ausschleusungsstelle unerlässlich. Dabei sind neben einem gerichteten intrazellulären Transport auch die Interaktionen der viralen Proteine untereinander wesentlich. So konnte für verschiedene Viren gezeigt werden, dass der Einbau der Nukleocapside und damit des viralen Genoms in virale Partikel über die Interaktion mit den membrangebundenen Matrixproteinen gewährleistet wird. Oftmals wird durch eine Wechselwirkung zwischen Matrixproteinen und dem cytoplasmatischen Anteil der viralen Oberflächenproteine der Zusammenbau der Partikel ermöglicht, wie z.B. für das Masern- und das Rabiesvirus gezeigt werden konnte (Mebatsion et al., 1996; Naim et al., 2000).

Die Deletion der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP scheint keinen Einfluss auf deren Interaktion mit Proteinen, welche für die Assemblierung benötigt werden, zu besitzen, da eine mit dem wildtypischen GP vergleichbare Integration des GP Δ CD in iVLPs festgestellt werden konnte (4.2). Zusätzlich hat die cytoplasmatische Domäne keinerlei Auswirkungen auf die Menge freigesetzter iVLPs oder deren für Filoviren charakteristische filamentöse Morphologie (4.2), was einen Hinweis darauf gibt, dass die Orchestrierung der Partikelfreisetzung und wahrscheinlich auch die Integration der Nukleocapsidkomplexe effizient stattfand.

Der Einfluss der cytoplasmatischen Domäne viraler Oberflächenproteine auf die Assemblierung viraler Partikel wird unterschiedlich diskutiert. So konnte für die Neuraminidase des Influenzavirus beobachtet werden, dass die Deletion der cytoplasmatischen Domäne sowohl eine reduzierte Inkorporation des Oberflächenproteins verursachte, als auch eine 10fach verringerte Ausschleusung von pleomorphen Partikeln im Vergleich zur Assemblierung und Freisetzung wildtypischer sphärischer Partikel (Bilsel et al., 1993; Jin et al., 1997; Mitnaul et al., 1996). Auch bei dem Oberflächenprotein G des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) bzw. den Oberflächenproteinen F und H des Masernvirus hat die Deletion der cytoplasmatischen Domäne negative Auswirkungen auf deren Inkorporation in virale Partikel (Cathomen et al., 1998; Schnell et al., 1998). Zusätzlich resultiert die Entfernung der cytoplasmatischen Domäne viraler Oberflächenproteine meist in einer signifikant verringerten Partikelproduktion. Bei dem Rabiesvirus konnte eine 6fache, bei VSV eine 20 bis 30fache und bei dem Sendavirus eine 25 bis 50fache Reduktion beobachtet werden (Fouillot-Coriou and Roux, 2000; Mebatsion et al., 1996; Schnell et al., 1998). Morphologische Veränderungen der freigesetzten Partikel lassen sich außer bei den durch die Neuraminidase des Influenzavirus verursachten Modifikationen nicht belegen: bei den Glykoproteinen des Rabiesvirus und des VSV konnte kein Effekt auf die Form der Partikel nachgewiesen werden (Mebatsion et al., 1996; Schnell et al., 1998).

Zusammengenommen zeigt das MARV GP die größte Analogie zu dem Hämagglutinin (HA) des Influenzavirus, bei dem die Deletion der cytoplasmatischen Domäne weder signifikante Auswirkungen auf den Einbau in Virionen, noch auf die Partikelausschleusung oder -morphologie zeigte (Jin et al., 1994; Jin et al., 1997). Vergleichbar mit der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP besteht die des HA nur aus 10 Aminosäuren und beinhaltet keine identifizierten intrazellulären Sortierungssignale. Allerdings konnte ein Einfluss der cytoplasmatischen Domäne des HA auf den Einbau von Nukleocapsidkomplexen in virale Partikel und die Membraninteraktion des Matrixproteins nachgewiesen werden (Enami and Enami, 1996; Nayak et al., 2004; Zhang and Lamb, 1996). Anhand der erhaltenen Ergebnisse und durch den Vergleich mit anderen Viren zeigt sich, dass die cytoplasmatische Domäne des MARV GP wahrscheinlich nicht direkt an einer Inkorporation von GP in iVLPs

bzw. deren Assemblierung beteiligt ist. Die hier gewonnenen Daten unterstützen frühere Studien, in denen gezeigt wurde, dass für die Integration des Glykoproteins in iVLPs die Transmembrandomäne essentiell und ausreichend war (Mittler et al., 2007).

5.3 Modifikation der iVLP Infektiosität

5.3.1 Einfluss der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP

Als bedeutendster Befund dieser Arbeit wird angesehen, dass, obwohl die cytoplasmatische Domäne des MARV GP keinen wesentlichen Einfluss auf den Zusammenbau, die Freisetzung oder Morphologie von iVLPs besitzt, deren Abwesenheit die Infektiosität der iVLPs signifikant reduziert (4.4).

Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem Befund um ein Spezifikum des MARV GP handelt, wurde untersucht, ob die cytoplasmatische Domäne des Glykoproteins des verwandten Ebolavirus (EBOV) eine vergleichbare Rolle spielt. Durch Verwendung eines EBOV-spezifischen iVLP Systems konnte nachgewiesen werden, dass auch EBOV GP Δ CD eine Verringerung der Infektiosität von iVLPs verursachte (4.9). Somit scheint der Einfluss der cytoplasmatischen Domäne auf die durch GP vermittelte Infektion für filovirale Glykoproteine universell zu sein.

Ein negativer Einfluss der cytoplasmatischen Domäne viraler Oberflächenproteine auf die Infektiosität viraler Partikel kann auch bei anderen Viren beobachtet werden und ist Gegenstand ausgedehnter Untersuchungen. Häufig korreliert die Reduktion der Infektiosität durch die Deletion der cytoplasmatischen Domäne mit weiteren Defekten seitens der mutierten Oberflächenproteine. Bei dem Influenzavirus konnte gezeigt werden, dass Partikel, welche Hämagglutinin und Neuraminidase ohne ihre entsprechende cytoplasmatische Domäne integrierten, im Vergleich zu wildtypischen Partikeln eine 13fach reduzierte Infektiosität aufwiesen. Gleichzeitig war die Anzahl der aberranten pleomorphen Partikel im Vergleich zu sphärischen Partikeln deutlich erhöht (Jin et al., 1997; Simpson et al., 1992). Vorstellbar ist, dass durch fehlende Interaktionen der cytoplasmatischen Domäne des Hämagglutinins bzw. der Neuraminidase mit dem Matrixprotein M₁ der Partikelzusammenbau behindert wird (Nayak et al., 2004; Whittaker et al., 1996). Bei dem zu der Familie der *Rhabdoviridae* gehörenden Rabiesvirus konnte man bei Einbau des Oberflächenproteins G ohne cytoplasmatische Domäne in virale Partikel sogar eine bis zu 100fache Reduktion der Infektiosität beobachten. Auch hier wurde postuliert, dass die fehlende Interaktion zwischen dem Matrixprotein M und der cytoplasmatischen Domäne des Oberflächenproteins G in einen reduzierten Einbau des G Δ CD in virale Partikel und einer reduzierten Partikel-freisetzung resultiert, was wiederum die reduzierte Infektiosität begründet (Mebatsion et al., 1996, 1999).

5.3.2 Einfluss der O-Glykosylierung des MARV GP

In Anbetracht einer reduzierten Infektiosität von iVLPs, welche MARV GP Δ CD inkorporierten, stellt sich die Frage, welche Veränderungen in dem Oberflächenprotein durch Entfernen der cytoplasmatischen Domäne induziert werden, wenn die bisher beschriebenen Parameter wie z.B. intrazellulärer Transport, Oligomerisierung oder Einbau in iVLPs nicht beeinflusst sind? Im Zuge der Charakterisierung von iVLPs, welche GP Δ CD einbauten, zeigte sich, dass GP Δ CD eine verringerte O-Glykosylierung im Vergleich zu eingebauten wildtypischen GP aufwies (4.5.1). Um die Frage zu beantworten, ob eine direkte Korrelation zwischen der reduzierten Infektiosität und der verringerten O-Glykosylierung bestand, wurde eine Deletionsmutante erzeugt, der die Mucin-ähnliche Domäne als Bereich, in der der Großteil der O-Glykane konzentriert ist, entfernt worden war (GP Δ MLD). Damit stand eine Mutante des GP zur Verfügung, welche keine Bindungsstellen für O-Glykane mehr beinhaltete und somit keine O-Glykosylierung mehr aufwies (4.5.1). Bei der Gegenüberstellung von iVLPs, welche entweder GP oder GP Δ MLD inkorporierten, zeigte sich, dass bei einem vergleichbaren Einbau von GP bzw. GP Δ MLD in iVLPs sich die Infektiosität der iVLPs nicht wesentlich unterschied (4.5.2). Aus diesem Grund konnte angenommen werden, dass die O-Glykosylierung keinen direkten Einfluss auf den Infektionsvorgang ausübte. Damit stellt die veränderte Glykosylierung in GP Δ CD auch nicht die Ursache der verminderten Infektiosität der iVLPs dar, sondern kann als Hinweis für eine veränderte Konformation der Ektodomäne angesehen werden, die in einer veränderten O-Glykosylierung resultiert.

Bisher hat die Rolle der O-Glykosylierung des MARV GP während des viralen Lebenszyklus wenig Beachtung gefunden: es konnte gezeigt werden, dass in frühen Phasen der Infektion die Bindung an Makrophagen und Dendritische Zellen durch die Interaktion zwischen O-Glykanen und dem auf den Zellen lokalisierten Bindungsfaktor hMGL vermittelt wird (Takada et al., 2004). Auch die Aufgabe der O-Glykane als ein Schutzschild gegenüber der Bindung neutralisierender Antikörper durch sterische Hinderung und damit Schutz vor dem humoralen Immunsystem wurde diskutiert (Lee et al., 2008); eine ähnliche Aufgabe konnte auch der ausgeprägten N-Glykosylierung des HIV env zugeschrieben werden (Wei et al., 2003).

5.3.3 Einfluss der Acylierung des MARV GP

Überraschend an den bisher dargestellten Befunden war, dass offensichtlich die Stabilität des MARV GP in der Membran durch die Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne nicht wesentlich gestört war, da die Menge an eingebautem Glykoprotein in iVLPs zwischen MARV GP und MARV GP Δ CD keine Veränderungen aufwies (4.2). An der Grenze zwischen der Transmembran- und der cytoplasmatischen Domäne besitzt das MARV GP zwei Acylierungsstellen, denen hinsichtlich der Verankerung des Glykoproteins in der Membran eine stabilisierende Aufgabe zugeschrieben wird (Funke et al., 1995). In Hinblick auf diese

stabilisierende Funktion sollte ermittelt werden, ob die Acylierungen des GP die Infektiosität von iVLPs modifizieren könnten. Es konnte beobachtet werden, dass die fehlende Acylierung in Anwesenheit der cytoplasmatischen Domäne keinen erkennbaren Effekt auf die Infektiosität der iVLPs ausübte. Wurde jedoch zusätzlich zur fehlenden Acylierung die cytoplasmatische Domäne deletiert, war die Infektiosität der entsprechenden iVLPs stärker reduziert, als bei der alleinigen Deletion der cytoplasmatischen Domäne (4.8). Damit zeigte die Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne und der Acylierungsstellen einen synergistischen d.h. sich verstärkenden Effekt auf die iVLP Infektiosität. Ähnliche Ergebnisse konnten für das EBOV GP ermittelt werden: in einem VSV-Pseudotypensystem zeigte sich, dass die Acylierung des GP keinen Einfluss auf die Effizienz der Infektion hatte (Ito et al., 2001). Acylierungen wurden als eine wichtige Modifikation des GP für die Interaktion mit „lipid rafts“ und damit verbundener Partikelfreisetzung angenommen (Bavari et al., 2002). Eine Auswirkung der Acylierungen auf die Partikelfreisetzung konnte jedoch für MARV iVLPs nicht bestätigt werden, da bei Deletion der Acylierungen die Produktion von iVLPs als auch deren Proteinzusammensetzung unbeeinflusst blieb (4.8). Für das Influenzavirus Oberflächenprotein HA konnte hingegen gezeigt werden, dass die Inhibition der Acylierung eine starke Reduktion der Infektiosität viraler Partikel induziert, vermutlich durch Inhibition der während der Fusion notwendigen Ausbildung der Fusionspore (Fischer et al., 1998; Wagner et al., 2005).

Wir können also zusammenfassen, dass sowohl die cytoplasmatische Domäne als auch die Acylierung des MARV GP zu der stabilen Verankerung des Oberflächenproteins in der Membran beitragen. Durch Modifikation dieser beiden stabilisierenden Elemente kann auch die Infektiosität von iVLPs beeinflusst werden. Dabei scheint die cytoplasmatische Domäne den wesentlicheren Effekt auszuüben, da der destabilisierende Effekt durch die Abwesenheit der Acylierung durch die Präsenz der cytoplasmatischen Domäne aufgefangen werden kann. Andererseits kann eine vorhandene Acylierung die durch eine fehlende cytoplasmatische Domäne vermittelte Reduktion der Infektiosität nicht kompensieren. Die Deletion der Acylierung bewirkt eine weitere Minimierung der durch die fehlende cytoplasmatische Domäne vermittelten Reduktion der iVLP Infektiosität. Ob der Einfluss der Acylierung einen Hinweis auf eine Interaktion mit „lipid rafts“ oder anderen Lipiddomänen darstellt, muss die Fragestellung weiterer Untersuchungen sein.

Die gewonnenen Daten legen nahe, mittels rekombinanter Marburgviren die im iVLP-System, einem Modellsystem der viralen Infektion, erhaltenen Ergebnisse in einer naiven Infektion zu bestätigen. Die Einschränkung, aber auch der Vorteil des iVLP Systems gegenüber der Untersuchung einer natürlichen Infektion ist, dass den iVLPs die genetische Information zur Produktion von Nachkommenviren fehlt und somit in den durch iVLPs infizierten Zellkulturen nur eine Infektionsrunde stattfindet. In der natürlichen Infektion

könnten weitere Funktionen der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP wirksam werden, welche sich in dem iVLP Assay nicht ausprägen und somit die Interpretation der durch eine naive Infektion erlangten Ergebnisse erschweren könnten. Die Konstruktion eines rekombinanten MARV, in dem die cytoplasmatische Domäne des Glykoproteins deletiert wurde, wurde bereits in Angriff genommen.

5.4 Strukturelle Veränderungen der MARV GP Ektodomäne durch Deletion der cytoplasmatischen Domäne

Wie bereits erwähnt, gehen wir von der Annahme aus, dass die beobachtete Reduktion der O-Glykosylierung keine direkte Auswirkung auf die Infektiosität der iVLPs hat. Stattdessen betrachten wir diese Veränderungen in der Glykosylierung als ein Indiz für eine modifizierte Konformation der Ektodomäne. Die Beeinflussung der Ektodomäne durch Veränderungen in der cytoplasmatischen Domäne (so genanntes „inside-out signaling“) wurde auch von anderen viralen Oberflächenproteinen berichtet. So wurde für die beiden Retroviren, das Simian Immunodeficiency Virus und das Moloney Murine Leukemia Virus gezeigt, dass die Entfernung der cytoplasmatischen Domäne der jeweiligen Oberflächenproteine eine Konformationsänderung der Ektodomäne verursacht, welche durch Verwendung von Konformations-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Aguilar et al., 2003; Spies et al., 1994). Auch für das zu den *Paramyxoviridae* gehörende SV5 hatte eine Modifikation der cytoplasmatischen Domäne (hier allerdings nicht Deletion sondern Elongation) Effekte auf die Struktur der Ektodomäne, welche ebenfalls durch Bindung spezifischer Antikörper gezeigt werden konnte (Waning et al., 2004).

Bisher bleibt allerdings vollkommen unklar, durch welchen Mechanismus Veränderungen in der cytoplasmatischen Domäne die Konformation der Ektodomäne modifizieren können. Es konnte jedoch wiederholt bestätigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne oftmals die fusogenen Eigenschaften der Oberflächenproteine modifiziert, vermutlich durch direkte Beeinflussung der Funktion der N-terminal des Transmembranankers lokalisierten Domänen, welche für die Fusion viraler mit endosomaler Membranen essentiell sind.

5.4.1 Beeinflussung der durch MARV GP vermittelten Fusion

Die Fusion der viralen mit der endosomalen Membran stellt für endozytierte Viren einen essentiellen Schritt dar, da dieser die Freisetzung des viralen Nukleocapsids in das Cytoplasma der Zielzelle und damit die anschließende Transkription und Replikation des viralen Genoms ermöglicht. Dabei wird die thermodynamisch bevorzugte Fusion beider Membranen durch die katalytische Aktivität des filoviralen Glykoproteins vermittelt. Das Vorläuferprotein des MARV GP (GP_0) wird durch die zelluläre Protease Furin gespalten, wodurch am N-Terminus der entstehenden GP_2 -Untereinheit eine hydrophobe Fusions-

schleife freigelegt wird. Durch einen bisher unbekanntem Auslöser werden die fusogenen Eigenschaften des GP aktiviert, was in ausgeprägten Konformationsänderungen resultiert: aus je drei parallel verlaufenden α -Helices der HR₁- und HR₂-Domänen, welche C-terminal der Fusionsschleife lokalisiert sind, kommt es zur Ausprägung einer „six helix bundle“ (6HB) mit gleichzeitig verlaufender Präsentation der zuvor maskierten Fusionsschleife an der Proteinoberfläche, Eintauchen der Fusionsschleife in die endosomale Membran, Annäherung dieser mit der viralen Membran und abschließender Membranfusion und Ausprägung einer Fusionspore (Harrison, 2008).

Die hier gewonnenen Daten zur Funktion der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP und zur durch GP vermittelten Fusion von zellulären mit VLP-Membranen wurden mit Hilfe eines neu etablierten Aufnahmeassays generiert (4.7). Dabei wurden VLPs, welche eine enzymatisch aktive Luziferase enthielten, durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zielzellen aufgenommen. Die Freisetzung von Nukleocapsiden aus VLPs, welche im Endosom vorlagen, ins Cytoplasma erfolgte durch die Fusion von endosomaler und VLP-Membran vermittelt durch ein funktionelles GP. Durch die am Nukleocapsidkomplex gebundene enzymatisch aktive Luziferase kann der Eintritt des Nukleocapsids in die Zielzelle ohne Zeitverzögerung gemessen werden, so dass frühe Stadien des Viruseintritts und potentieller Infektionen quantitativ untersucht werden können.

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP einen reduzierten Eintritt von VLPs in Zielzellen verursachte (4.7.3), was wiederum in einer reduzierten Infektion resultierte (4.4). Eine Reduktion des zellulären Eintritts der VLPs auf ca. 40 % im Vergleich zu dem Eintritt von mit wildtypischem GP dekorierten VLPs konnte gefunden werden (4.7.3). Allerdings ist bisher nicht geklärt welcher Schritt des komplexen Fusionsvorgangs inhibiert bzw. verlangsamt wurde.

Für das Fusionsprotein F von SV5 konnte beobachtet werden, dass für die Vermittlung von Zell-Zell-Fusionen die Anwesenheit der cytoplasmatischen Domäne unabdinglich ist. Durch deren Deletion wird nach Fusion der Membranen und Ausbildung der Fusionspore die weitere Vergrößerung der Pore blockiert und die effektive Membranfusion auf 7 % minimiert (Dutch and Lamb, 2001). Obwohl für das Fusionsprotein des SV5 klar gezeigt werden konnte, dass die cytoplasmatische Domäne die Vergrößerung der Fusionsporen wesentlich beeinflusst, gibt es bisher keinerlei direkte Untersuchungen die Struktur der Ektodomäne betreffend. Studien in denen gezeigt werden konnte, dass der Transport an die Zelloberfläche und die Oligomerisierung von F₁CD vergleichbar war mit wildtypischem F, legen nahe, dass die cytoplasmatische Domäne ähnlich wie bei MARV GP die wesentlichen intrazellulären Transportvorgänge nicht beeinflusst (Bagai and Lamb, 1996; Dutch and Lamb, 2001).

So wie die Deletion der cytoplasmatischen Domäne bei dem Fusionsprotein des SV5 einen negativen Effekt auf die fusogenen Eigenschaften des Proteins ausübt, kann eine vergleichbare Änderung der cytoplasmatischen Domäne bei anderen viralen Oberflächenproteinen andere Auswirkungen haben. Für das Oberflächenprotein env des HIV konnte nachgewiesen werden, dass die Entfernung der cytoplasmatischen Domäne im Vergleich zum wildtypischen Glykoprotein eine gesteigerte Fusion verursachte, wobei diese auf eine schnellere Ausbildung der in den frühen Phasen der Fusion essentiellen 6HB zurückzuführen war (Abrahamyan et al., 2005). Dabei ist in die Überlegungen mit einzubeziehen, dass eine erhöhte laterale Beweglichkeit der Transmembrandomänen der als Trimer vorliegenden Fusionsproteine die Ausprägung von Fusionsporen begünstigen könnte, da die daran beteiligten Oberflächenproteine schneller zusammen finden können. Ein solches kooperatives Wirken von viralen Oberflächenproteinen bei der Vermittlung der Fusion konnte für das Influenzavirus Hämagglutinin gezeigt werden (Danieli et al., 1996), für das HIV env hingegen gibt es bezüglich einer kooperativen Funktionsweise während des Fusionsvorgangs widersprüchliche Ergebnisse (Magnus et al., 2009; Yang et al., 2005). Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich der kinetische Vorteil einer gesteigerten lateralen Mobilität von Fusionsproteinen in der Membran in frühen Phasen der Fusion noch vor der Ausprägung der Fusionspore zeigt.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die cytoplasmatische Domäne des MARV GP in frühen Phasen der Fusion d.h. vor der Stabilisierung der 6HB keine wesentliche Rolle spielt. Ein beschleunigender Effekt auf den Fusionsvorgang durch Deletion der cytoplasmatischen Domäne, welcher bei anderen Fusionsproteinen beobachtet werden kann, ist nicht erkennbar. Möglicherweise wirkt die Anwesenheit von Acylierungen in der Transmembrandomäne einer erhöhten lateralen Mobilität durch eine stabile Verankerung in der Membran entgegen. Da die Entfernung der cytoplasmatischen Domäne die Fusion von VLP- mit zellulären Membranen inhibiert, wird ähnlich wie bei dem Fusionsprotein des SV5 eine wichtige Aufgabe in späten Phasen der Fusion wie der Porenbildung oder -vergrößerung postuliert.

5.4.2 Anwendungsmöglichkeiten des etablierten Aufnahmeassays

Der neu etablierte Aufnahmeassay, bei dem der Eintritt von VLPs in Zellen untersucht wird, vereint gegenüber klassischen Fusionsassays einige Vorteile. Durch Einbau eines enzymatisch aktiven Reporterproteins in VLPs kann deren Aufnahme in Zellen unmittelbar beobachtet werden. Eine Transkription des Reporterproteins oder im Falle einer Infektion eine Replikation des viralen Genoms muss nicht stattfinden, um den Eintritt von Partikeln in die Zelle zu messen. Dadurch dass ein großer Proteinkomplex wie das Nukleocapsid durch die Fusionspore gelangen muss, können mittels dieses Assays auch Untersuchungen, die

die Vergrößerung der Fusionspore anbelangen, durchgeführt werden. Für Arbeiten, welche auf Defekte in der Bildung der Fusionspore bzw. der Hemifusion abzielen, wäre die Markierung von iVLP Membranen mit fluoreszierenden Farbstoffen prinzipiell möglich. Durch Fluoreszenzmessung würde die anschließende Quantifizierung der Verteilung der Farbstoffe aufgrund stattfindender Fusionsvorgänge ermöglicht werden.

Ein klarer Vorteil des hier beschriebenen Aufnahmeassays in Bezug auf Analysen des durch MARV GP Δ CD induzierten bzw. modifizierten Fusionsablaufs ist die Verwendung von filamentösen VLPs. Diese zeigen eine große morphologische Ähnlichkeit zu naiven filamentösen MARV Partikeln und nutzen aus diesem Grund vermutlich auch dieselben zellulären Stoffwechselwege zur Aufnahme in die Zelle. Die damit erlangten Daten sollten somit auf die Situation einer natürlichen viralen Infektion d.h. die *in vivo* Situation übertragbar sein, was bei Fusionsassays, welche auf sphärischen pseudotypisierten VSV- oder HIV-Partikeln bzw. Untersuchungen anhand von rekombinant exprimierten Proteinen in Zell-Zell Fusionsassays nicht zwangsläufig zu erwarten ist. So konnte z.B. in einem Zell-Zell Fusionsassay für das Oberflächenprotein F des SV5 gezeigt werden, dass die Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne in eine Inhibition der durch F vermittelten Vergrößerung der Fusionspore resultiert (Dutch and Lamb, 2001). Erstaunlicherweise hatte jedoch das Fehlen der cytoplasmatischen Domäne des Fusionsproteins im Kontext eines rekombinanten SV5 nur einen geringen Einfluss auf die Fusion der Virus- mit der zellulären Membran (Waning et al., 2002).

Mit dem hier etablierten Assay haben wir nun eine geeignete Methode zur Verfügung um andere Schritte des viralen Lebenszyklus z.B. die Endozytose filoviraler Partikel und die damit einhergehende Nutzung zellulärer Stoffwechselwege genauer zu untersuchen. Bisher gibt es bezüglich dieser Fragestellung widersprüchliche Ergebnisse, so dass entweder eine Caveolae- oder eine Clathrin-vermittelte Aufnahme der MARV Partikel postuliert wird (Empig and Goldsmith, 2002; Sanchez, 2007; Simmons et al., 2003b). Auch die Aufnahme durch Aktin-abhängige Macropinocytose, wodurch Vakuolen entstehen, die einen Durchmesser von 0,5-10 μ m aufweisen und damit groß genug für die Aufnahme von viralen Partikeln erscheinen, wurde diskutiert (Mercer and Helenius, 2009).

Der hier etablierte Assay basiert auf EBOV-spezifischen VLPs, welche MARV GP oder GP Δ CD inkorporierten (3.2.9). Dieser Ansatz wurde ausgewählt, weil durch Interaktion des EBOV Nukleoproteins mit dem Fusionsprotein bestehend aus EBOV VP30 gebunden an das Reporterprotein Luziferase dessen Einbau in die VLPs ermöglicht wurde. In weiteren Arbeiten soll ein analoges System entwickelt werden, in dem das MARV GP im Kontext eines MARV-spezifischen VLP-System untersucht werden kann.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch die cytoplasmatische Domäne des MARV Glykoproteins die Konformation der Ektodomäne mittels eines so

genannten „inside-out signalings“ moduliert werden kann. Davon betroffen ist offensichtlich die Fusionsaktivität des GP, denn bei Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne ist die Freisetzung von Nukleocapsiden in das Cytoplasma der Zielzelle signifikant gehemmt, was darauf folgend in eine reduzierte Infektiosität von iVLPs resultieren kann. Dabei bleibt zu klären, welcher Vorgang während der komplexen Fusion zwischen endosomaler und VLP-Membran durch die verursachten Konformationsänderungen in der Ektodomäne negativ beeinflusst wird. Die Auswirkungen einer fehlenden cytoplasmatischen Domäne konnten auch für das EBOV Glykoprotein bestätigt werden; die Integration von EBOV GP Δ CD in iVLPs resultierte in deren reduzierte Infektiosität. Somit scheinen die cytoplasmatischen Domänen filoviraler Glykoproteine eine universelle Aufgabe während der zellulären Infektion wahr zu nehmen.

6 Zusammenfassung

Das Marburgvirus (MARV) bildet zusammen mit dem Ebolavirus die Familie der *Filoviridae*, welche in menschlichen und nicht-menschlichen Primaten schwere hämorrhagische Fieber verursachen können. Die Infektion von Zielzellen wird dabei durch das einzige Oberflächenprotein des MARV, das Glykoprotein GP vermittelt. Das Glykoprotein induziert die Bindung viraler Partikel an den zellulären Rezeptor, mit darauf folgender Endozytose, Fusion der viralen mit der endosomalen Membran, Freisetzung des Nukleocapsids in das Cytoplasma und darauf folgend Transkription und Replikation der viralen RNA. Bei dem MARV GP handelt es sich um ein klassisches Typ I Transmembranprotein bestehend aus einer großen Ektodomäne (220 kDa), einer Transmembran- und einer sehr kurzen cytoplasmatischen Domäne.

Die Funktionen der Ekto- und Transmembrandomäne des MARV GP für den viralen Lebenszyklus wurden bereits weit reichend untersucht. Die Aufgabe der cytoplasmatischen Domäne des GP blieb bislang ungeklärt, möglicherweise weil die aus acht Aminosäuren aufgebaute Domäne keine klassischen Signalsequenzen enthält, die z.B. den intrazellulären Transport oder die Assemblierung und Ausschleusung viraler Partikel beeinflussen könnten. Im Laufe dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne den intrazellulären Transport des MARV GP entlang des klassischen sekretorischen Transportwegs an die Plasmamembran nicht unmittelbar beeinflusst. Dies war erkennbar an den posttranslationalen Modifikationen wie N-Glykosylierung oder Oligomerisierung des GP, welche auch in Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne (GP Δ CD) nicht signifikant verändert waren. Der Einfluss der cytoplasmatischen Domäne des GP auf den Zusammenbau, Freisetzung und Infektiosität von MARV wurde mittels MARV-spezifischer infektiöser Virus-ähnlicher Partikel (iVLP) untersucht, die als Modellsystem für eine natürliche MARV Infektion gelten. Mittels quantitativer Immunelektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass die cytoplasmatische Domäne des GP den Einbau des Proteins in iVLPs, als auch deren filamentöse Morphologie nicht beeinflusste, jedoch die erzeugten iVLPs eine deutlich reduzierte Infektiosität aufzeigten. Die zeitgleich auftretende verminderte O-Glykosylierung des GP Δ CD wurde als ein Indiz für eine Konformationsänderung in der Ektodomäne angesehen, induziert durch die Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne.

Mit Hilfe eines neu etablierten Aufnahmeassays konnte nachgewiesen werden, dass GP Δ CD neben einer verringerten Infektiosität von iVLPs, auch deren verminderte Aufnahme in Zielzellen induzierte. Wir nehmen an, dass die Abwesenheit der cytoplasmatischen Domäne des Glykoproteins eine Konformationsänderung der Ektodomäne induziert (so genanntes „inside-out signaling“), was in einer verringerten Fusionsaktivität des GP und damit reduzierten Infektiosität resultiert.

7 Literaturverzeichnis

- Abrahamyan, L. G., Mkrtychyan, S. R., Binley, J., Lu, M., Melikyan, G. B., and Cohen, F. S. (2005). The cytoplasmic tail slows the folding of human immunodeficiency virus type 1 Env from a late prebundle configuration into the six-helix bundle. *J Virol* **79**(1), 106-15.
- Aguiar, H. C., Anderson, W. F., and Cannon, P. M. (2003). Cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein influences the conformation of the extracellular domain: implications for mechanism of action of the R Peptide. *J Virol* **77**(2), 1281-91.
- Ali, A., and Nayak, D. P. (2000). Assembly of Sendai virus: M protein interacts with F and HN proteins and with the cytoplasmic tail and transmembrane domain of F protein. *Virology* **276**(2), 289-303.
- Alvarez, C. P., Lasala, F., Carrillo, J., Muniz, O., Corbi, A. L., and Delgado, R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* **76**(13), 6841-4.
- Amblard, O. P., Edzang S, Prehaud C, Bouloy M, Guenno BL. (1997). Identification of the Ebola virus in Gabon in 1994. *Lancet* **349**(9046), 181-2.
- Bagai, S., and Lamb, R. A. (1996). Truncation of the COOH-terminal region of the paramyxovirus SV5 fusion protein leads to hemifusion but not complete fusion. *J Cell Biol* **135**(1), 73-84.
- 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 Marburgvirus VP24 mit dem Oberflächenprotein GP und anionischen Membranstrukturen. *Diplomarbeit*.
- Bamberg, S. (2004). Untersuchungen zur Rolle des VP24 im Vermehrungszyklus des Marburgvirus. *Dissertation*.
- Bamberg, S., Kolesnikova, L., Moller, P., Klenk, H. D., and Becker, S. (2005). VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles. *J Virol* **79**(21), 13421-33.
- Bär, T. A., Kawaoka Y, Alizon M (2006). Detection of cell-cell fusion mediated by Ebola virus glycoproteins. *J Virol* **80**(6), 2815-22.
- Basler, C. F., Mikulasova, A., Martinez-Sobrido, L., Paragas, J., Muhlberger, 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., Muhlberger, 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 U S A* **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., Pirard, 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.
- Bausch, D. G., Nichol, S. T., Muyembe-Tamfum, J. J., Borchert, M., Rollin, P. E., Sleurs, H., Campbell, P., Tshioko, F. K., Roth, C., Colebunders, R., Pirard, P., Mardel, S., Olinda, L. A., Zeller, H., Tshomba, A., Kulidri, A., Libande, M. L., Mulangu, S., Formenty, P., Grein, T., Leirs, H., Braack, L., Ksiazek, T., Zaki, S., Bowen, M. D., Smit, S. B., Leman, P. A., Burt, F. J., Kemp, A., and Swanepoel, R. (2006). Marburg hemorrhagic fever associated with multiple genetic lineages of virus. *N Engl J Med* **355**(9), 909-19.
- Bavari, S., Bosio, C. M., Wiegand, E., Ruthel, G., Will, A. B., Geisbert, T. W., Hevey, M., Schmaljohn, C., Schmaljohn, A., and Aman, M. J. (2002). Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med* **195**(5), 593-602.
- 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., Klenk, H. D., and Muhlberger, E. (1996). Intracellular transport and processing of the Marburg virus surface protein in vertebrate and insect cells. *Virology* **225**(1), 145-55.
- Becker, S., Rinne, C., Hofsass, U., Klenk, H. D., and Muhlberger, E. (1998). Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology* **249**(2), 406-17.
- Becker, S., Spiess, M., and Klenk, H. D. (1995). The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol* **76 (Pt 2)**, 393-9.
- 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 (Mars)* **59**(2), 201-4.
- Bess, J. W., Jr., Gorelick, R. J., Bosche, W. J., Henderson, L. E., and Arthur, L. O. (1997). Microvesicles are a source of contaminating cellular proteins found in purified HIV-1 preparations. *Virology* **230**(1), 134-44.
- Biedenkopf, N. (2007). Die Rolle der Phosphorylierung des Ebolavirus VP30 für die initiale virale Transkription und die Lokalisation der VP30-Interaktionsdomäne auf dem Nukleoprotein. *Diplomarbeit*.
- Bilsel, P., Castrucci, M. R., and Kawaoka, Y. (1993). Mutations in the cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase affect incorporation into virions. *J Virol* **67**(11), 6762-7.
- Bosio, C. M., Aman, M. J., Grogan, C., Hogan, R., Ruthel, G., Negley, D., Mohamadzadeh, M., Bavari, S., and Schmaljohn, A. (2003). Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation. *J Infect Dis* **188**(11), 1630-8.
- Bossart, K. N., Wang, L. F., Flora, M. N., Chua, K. B., Lam, S. K., Eaton, B. T., and Broder, C. C. (2002). Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the Nipah virus and Hendra virus envelope glycoproteins. *J Virol* **76**(22), 11186-98.
- 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.
- Bowen, P. G., Lloyd G, Raymond RT, Simpson DI (1980). A comparative study of strains of Ebola virus isolated from southern Sudan and northern Zaire in 1976. *J Med Virol.* **6**(2), 129-38.
- Bray, M., and Paragas, J. (2002). Experimental therapy of filovirus infections. *Antiviral Res* **54**(1), 1-17.
- Bray, M., and Pilch, R. (2006). Filoviruses: recent advances and future challenges. *Expert Rev Anti Infect Ther* **4**(6), 917-21.
- Bres, P. (1978). [The epidemic of Ebola haemorrhagic fever in Sudan and Zaire, 1976: introductory note.]. *Bull World Health Organ* **56**(2), 245.
- Bukreyev, A., Marzi, A., Feldmann, F., Zhang, L., Yang, L., Ward, J. M., Dorward, D. W., Pickles, R. J., Murphy, B. R., Feldmann, H., and Collins, P. L. (2009). Chimeric human parainfluenza virus bearing the Ebola virus glycoprotein as the sole surface protein is immunogenic and highly protective against Ebola virus challenge. *Virology* **383**(2), 348-61.
- Bukreyev, A., Rollin, P. E., Tate, M. K., Yang, L., Zaki, S. R., Shieh, W. J., Murphy, B. R., Collins, P. L., and Sanchez, A. (2007). Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus. *J Virol* **81**(12), 6379-88.
- Bukreyev, A., Yang, L., Zaki, S. R., Shieh, W. J., Rollin, P. E., Murphy, B. R., Collins, P. L., and Sanchez, A. (2006). A single intranasal inoculation with a paramyxovirus-vectored vaccine protects guinea pigs against a lethal-dose Ebola virus challenge. *J Virol* **80**(5), 2267-79.
- Bukreyev, A. A., Volchkov, V. E., Blinov, V. M., and Netesov, S. V. (1993). The VP35 and VP40 proteins of filoviruses. Homology between Marburg and Ebola viruses. *FEBS Lett* **322**(1), 41-6.
- Bwaka, M. A., Bonnet, M. J., Calain, P., Colebunders, R., De Roo, A., Guimard, Y., Katwiki, K. R., Kibadi, K., Kipasa, M. A., Kuvula, K. J., Mapanda, B. B., Massamba, M., Mupapa, K. D., Muyembe-Tamfum, J. J., Ndaberey, E., Peters, C. J., Rollin, P. E., and Van den Enden, E. (1999). Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**, S1-7.

- Cardenas, W. B., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Hartman, A. L., Kimberlin, C. R., Martinez-Sobrido, L., Saphire, E. O., and Basler, C. F. (2006). Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol* **80**(11), 5168-78.
- Cathomen, T., Naim, H. Y., and Cattaneo, R. (1998). Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol* **72**(2), 1224-34.
- CDC, C. f. D. C. a. P. (1989). Ebola virus infection in imported primates--Virginia, 1989. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **38**(48), 831-2; 837-8.
- CDC, C. f. D. C. a. P. (1995). From the Centers for Disease Control and Prevention. Update: outbreak of Ebola viral hemorrhagic fever--Zaire, 1995. *JAMA* **274**(5), 373-4.
- CDC, C. f. D. C. a. P. (1996). Outbreak of Ebola haemorrhagic fever in Gabon. *Commun Dis Rep CDR Wkly.* **6**(9), 75,78.
- CDC, C. f. D. C. a. P. (2005). Outbreak of Marburg virus hemorrhagic fever--Angola, October 1, 2004-March 29, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **54**(12), 308-9.
- Chan, S. Y., Empig, C. J., Welte, F. J., Speck, R. F., Schmaljohn, A., Kreisberg, J. F., and Goldsmith, M. A. (2001). Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell* **106**(1), 117-26.
- Chandran, K., Sullivan, N. J., Felbor, U., Whelan, S. P., and Cunningham, J. M. (2005). Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* **308**(5728), 1643-5.
- Craig, F. F., Simmonds, A. C., Watmore, D., McCapra, F., and White, M. R. (1991). Membrane-permeable luciferin esters for assay of firefly luciferase in live intact cells. *Biochem J* **276** (Pt 3), 637-41.
- Danieli, T., Pelletier, S. L., Henis, Y. I., and White, J. M. (1996). Membrane fusion mediated by the influenza virus hemagglutinin requires the concerted action of at least three hemagglutinin trimers. *J Cell Biol* **133**(3), 559-69.
- Dessen, A., Forest, E., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H. D., and Weissenhorn, W. (2000a). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the matrix protein from Ebola virus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**(Pt 6), 758-60.
- Dessen, A., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H. D., and Weissenhorn, W. (2000b). Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *Embo J* **19**(16), 4228-36.
- Dolnik, O., Kolesnikova, L., and Becker, S. (2008). Filoviruses: Interactions with the host cell. *Cell Mol Life Sci* **65**(5), 756-76.
- Dominguez-Soto, A., Aragonese-Fenoll, L., Martin-Gayo, E., Martinez-Prats, L., Colmenares, M., Naranjo-Gomez, M., Borrás, F. E., Munoz, P., Zubiaur, M., Toribio, M. L., Delgado, R., and Corbi, A. L. (2007). The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. *Blood* **109**(12), 5337-45.
- Dube, D., Brecher, M. B., Delos, S. E., Rose, S. C., Park, E. W., Schornberg, K. L., Kuhn, J. H., and White, J. M. (2009). The primed ebolavirus glycoprotein (19-kilodalton GP1,2): sequence and residues critical for host cell binding. *J Virol* **83**(7), 2883-91.
- Dutch, R. E., and Lamb, R. A. (2001). Deletion of the cytoplasmic tail of the fusion protein of the paramyxovirus simian virus 5 affects fusion pore enlargement. *J Virol* **75**(11), 5363-9.
- Elliott, L. H., Kiley, M. P., and McCormick, J. B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* **147**(1), 169-76.
- Empig, C. J., and Goldsmith, M. A. (2002). Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *J Virol* **76**(10), 5266-70.
- Enami, M., and Enami, K. (1996). Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol* **70**(10), 6653-7.
- Enterlein, S., Volchkov, V., Weik, M., Kolesnikova, L., Volchkova, V., Klenk, H. D., and Muhlberger, E. (2006). Rescue of recombinant Marburg virus from cDNA is dependent on nucleocapsid protein VP30. *J Virol* **80**(2), 1038-43.
- Feinberg, H., Mitchell, D. A., Drickamer, K., and Weis, W. I. (2001). Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* **294**(5549), 2163-6.

- Feldmann, H., Bugany, H., Mahner, F., Klenk, H. D., Drenckhahn, D., and Schnittler, H. J. (1996a). Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol* **70**(4), 2208-14.
- Feldmann, H., Jones, S., Klenk, H. D., and Schnittler, H. J. (2003). Ebola virus: from discovery to vaccine. *Nat Rev Immunol* **3**(8), 677-85.
- Feldmann, H., Jones, S. M., Daddario-DiCaprio, K. M., Geisbert, J. B., Stroher, U., Grolla, A., Bray, M., Fritz, E. A., Fernando, L., Feldmann, F., Hensley, L. E., and Geisbert, T. W. (2007). Effective post-exposure treatment of Ebola infection. *PLoS Pathog* **3**(1), e2.
- Feldmann, H., Jones, S. M., Schnittler, H. J., and Geisbert, T. (2005). Therapy and prophylaxis of Ebola virus infections. *Curr Opin Investig Drugs* **6**(8), 823-30.
- Feldmann, H., and Kiley, M. P. (1999). Classification, structure, and replication of filoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**, 1-21.
- Feldmann, H., Klenk, H. D., and Sanchez, A. (1993). Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch Virol Suppl* **7**, 81-100.
- Feldmann, H., Muhlberger, 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., Nichol, S. T., Klenk, H. D., Peters, C. J., and Sanchez, A. (1994). Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein. *Virology* **199**(2), 469-73.
- 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.
- Feldmann, S. W., Klenk HD. (1996b). Emerging and reemerging of filoviruses. *Arch Virol Suppl.* **11**, 77-100.
- Feng, Z., Cerveny, M., Yan, Z., and He, B. (2007). The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol* **81**(1), 182-92.
- Fischer, C., Schroth-Diez, B., Herrmann, A., Garten, W., and Klenk, H. D. (1998). Acylation of the influenza hemagglutinin modulates fusion activity. *Virology* **248**(2), 284-94.
- Fisher-Hoch, S. P., Perez-Oronoz, G. I., Jackson, E. L., Hermann, L. M., and Brown, B. G. (1992). Filovirus clearance in non-human primates. *Lancet* **340**(8817), 451-3.
- Formenty, P., Boesch, C., Wyers, M., Steiner, C., Donati, F., Dind, F., Walker, F., and Le Guenno, B. (1999). Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Cote d'Ivoire. *J Infect Dis* **179** Suppl 1, S120-6.
- Fouillot-Coriou, N., and Roux, L. (2000). Structure-function analysis of the Sendai virus F and HN cytoplasmic domain: different role for the two proteins in the production of virus particle. *Virology* **270**(2), 464-75.
- Fowler, T., Bamberg, S., Moller, P., Klenk, H. D., Meyer, T. F., Becker, S., and Rudel, T. (2005). Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNA interference. *J Gen Virol* **86**(Pt 4), 1181-8.
- Frey, S., Marsh, M., Gunther, S., Pelchen-Matthews, A., Stephens, P., Ortlepp, S., and Stegmann, T. (1995). Temperature dependence of cell-cell fusion induced by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**(3), 1462-72.
- Funke, C., Becker, S., Dartsch, H., Klenk, H. D., and Muhlberger, E. (1995). Acylation of the Marburg virus glycoprotein. *Virology* **208**(1), 289-97.
- Garcia-Sastre, A., and Palese, P. (1995). The cytoplasmic tail of the neuraminidase protein of influenza A virus does not play an important role in the packaging of this protein into viral envelopes. *Virus Res* **37**(1), 37-47.
- Geisbert, T. W., Daddario-DiCaprio, K. M., Geisbert, J. B., Reed, D. S., Feldmann, F., Grolla, A., Stroher, U., Fritz, E. A., Hensley, L. E., Jones, S. M., and Feldmann, H. (2008a). Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect nonhuman primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses. *Vaccine* **26**(52), 6894-900.
- Geisbert, T. W., Daddario-DiCaprio, K. M., Geisbert, J. B., Young, H. A., Formenty, P., Fritz, E. A., Larsen, T., and Hensley, L. E. (2007). Marburg virus Angola infection of rhesus macaques: pathogenesis and treatment with recombinant nematode anticoagulant protein c2. *J Infect Dis* **196** Suppl 2, S372-81.

- Geisbert, T. W., Daddario-Dicaprio, K. M., Lewis, M. G., Geisbert, J. B., Grolla, A., Leung, A., Paragas, J., Matthias, L., Smith, M. A., Jones, S. M., Hensley, L. E., Feldmann, H., and Jahrling, P. B. (2008b). Vesicular stomatitis virus-based ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates. *PLoS Pathog* **4**(11), e1000225.
- Geisbert, T. W., Daddario-DiCaprio, K. M., Williams, K. J., Geisbert, J. B., Leung, A., Feldmann, F., Hensley, L. E., Feldmann, H., and Jones, S. M. (2008c). Recombinant vesicular stomatitis virus vector mediates postexposure protection against Sudan Ebola hemorrhagic fever in nonhuman primates. *J Virol* **82**(11), 5664-8.
- Geisbert, T. W., Geisbert, J. B., Leung, A., Daddario-Dicaprio, K. M., Hensley, L. E., Grolla, A., and Feldmann, H. (2009). Single injection vaccine protects nonhuman primates against Marburg virus and three species of Ebola virus. *J Virol*.
- Geisbert, T. W., and Hensley, L. E. (2004). Ebola virus: new insights into disease aetiopathology and possible therapeutic interventions. *Expert Rev Mol Med* **6**(20), 1-24.
- Geisbert, T. W., Hensley, L. E., Jahrling, P. B., Larsen, T., Geisbert, J. B., Paragas, J., Young, H. A., Fredeking, T. M., Rote, W. E., and Vlasuk, G. P. (2003a). Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys. *Lancet* **362**(9400), 1953-8.
- Geisbert, T. W., and Jahrling, P. B. (1995). Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res* **39**(2-3), 129-50.
- Geisbert, T. W., Pushko, P., Anderson, K., Smith, J., Davis, K. J., and Jahrling, P. B. (2002). Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerg Infect Dis* **8**(5), 503-7.
- Geisbert, T. W., Young, H. A., Jahrling, P. B., Davis, K. J., Kagan, E., and Hensley, L. E. (2003b). Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. *J Infect Dis* **188**(11), 1618-29.
- Geisbert, T. W., Young, H. A., Jahrling, P. B., Davis, K. J., Larsen, T., Kagan, E., and Hensley, L. E. (2003c). Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells. *Am J Pathol* **163**(6), 2371-82.
- Geyer, H., Will, C., Feldmann, H., Klenk, H. D., and Geyer, R. (1992). Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein. *Glycobiology* **2**(4), 299-312.
- Gomis-Ruth, F. X., Dessen, A., Timmins, J., Bracher, A., Kolesnikowa, L., Becker, S., Klenk, H. D., and Weissenhorn, W. (2003). The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties. *Structure* **11**(4), 423-33.
- Gonzalez, J. P., Herbreteau, V., Morvan, J., and Leroy, E. M. (2005). Ebola virus circulation in Africa: a balance between clinical expression and epidemiological silence. *Bull Soc Pathol Exot* **98**(3), 210-7.
- Gramberg, T., Hofmann, H., Moller, P., Lalor, P. F., Marzi, A., Geier, M., Krumbiegel, M., Winkler, T., Kirchhoff, F., Adams, D. H., Becker, S., Munch, J., and Pohlmann, S. (2005). LSECTin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology* **340**(2), 224-36.
- Halfmann, P., Ebihara, H., Marzi, A., Hatta, Y., Watanabe, S., Suresh, M., Neumann, G., Feldmann, H., and Kawaoka, Y. (2009). Replication-deficient ebolavirus as a vaccine candidate. *J Virol* **83**(8), 3810-5.
- Han, Z., Boshra, H., Sunyer, J. O., Zwiars, 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.
- Han, Z., and Harty, R. N. (2005). Packaging of actin into Ebola virus VLPs. *Virology* **2**, 92.
- Harcourt, B. H., Sanchez, A., and Offermann, M. K. (1999). Ebola virus selectively inhibits responses to interferons, but not to interleukin-1beta, in endothelial cells. *J Virol* **73**(4), 3491-6.
- Harrison, S. C. (2008). Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**(7), 690-8.

- Hartlieb, B. (2006). Untersuchungen zur Funktion des Ebola-Virus-VP30 im Nukleokapsidkomplex basierend auf der Röntgenstrukturanalyse des VP30-C-Terminus. *Dissertation*.
- Hartlieb, B., Muziol, T., Weissenhorn, W., and Becker, S. (2007). Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid association. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(2), 624-9.
- Hartman, A. L., Bird, B. H., Towner, J. S., Antoniadou, Z. A., Zaki, S. R., and Nichol, S. T. (2008). Inhibition of IRF-3 activation by VP35 is critical for the high level of virulence of ebola virus. *J Virol* **82**(6), 2699-704.
- Harty, R. N., Brown, M. E., Wang, G., Huibregtse, J., and Hayes, F. P. (2000). A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25), 13871-6.
- Heinz, F. X., Stiasny, K., Puschner-Auer, G., Holzmann, H., Allison, S. L., Mandl, C. W., and Kunz, C. (1994). Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* **198**(1), 109-17.
- Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K., and Fries, E. (1980). On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J Cell Biol* **84**(2), 404-20.
- Heminway, B. R., Yu, Y., and Galinski, M. S. (1994). Paramyxovirus mediated cell fusion requires co-expression of both the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins. *Virus Res* **31**(1), 1-16.
- 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.
- Hevey, M., Negley, D., VanderZanden, L., Tammariello, R. F., Geisbert, J., Schmaljohn, C., Smith, J. F., Jahrling, P. B., and Schmaljohn, A. L. (2001). Marburg virus vaccines: comparing classical and new approaches. *Vaccine* **20**(3-4), 586-93.
- Higashi, N., Fujioka, K., Denda-Nagai, K., Hashimoto, S., Nagai, S., Sato, T., Fujita, Y., Morikawa, A., Tsuiji, M., Miyata-Takeuchi, M., Sano, Y., Suzuki, N., Yamamoto, K., Matsushima, K., and Irimura, T. (2002). The macrophage C-type lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells. *J Biol Chem* **277**(23), 20686-93.
- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **16**(15), 7351-67.
- Hoenen (2006). Function of the viral matrix proteins VP40 and VP24 for the life cycle of Ebolavirus. *Dissertation*.
- Hoenen, T., Groseth, A., Kolesnikova, L., Theriault, S., Ebihara, H., Hartlieb, B., Bamberg, S., Feldmann, H., Stroher, U., and Becker, S. (2006). Infection of naive target cells with virus-like particles: implications for the function of ebola virus VP24. *J Virol* **80**(14), 7260-4.
- Huang, Y., Xu, L., Sun, Y., and Nabel, G. J. (2002). The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Mol Cell* **10**(2), 307-16.
- Ignowski, J. M., and Schaffer, D. V. (2004). Kinetic analysis and modeling of firefly luciferase as a quantitative reporter gene in live mammalian cells. *Biotechnol Bioeng* **86**(7), 827-34.
- Ito, H., Watanabe, S., Takada, A., and Kawaoka, Y. (2001). Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *J Virol* **75**(3), 1576-80.
- 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**(8688), 502-5.
- Jahrling, P. B., Geisbert, T. W., Jaax, N. K., Hanes, M. A., Ksiazek, T. G., and Peters, C. J. (1996). Experimental infection of cynomolgus macaques with Ebola-Reston filoviruses from the 1989-1990 U.S. epizootic. *Arch Virol Suppl* **11**, 115-34.

- Jasenosky, L. D., Neumann, G., Lukashevich, I., and Kawaoka, Y. (2001). Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *J Virol* **75**(11), 5205-14.
- Jin, H., Leser, G. P., and Lamb, R. A. (1994). The influenza virus hemagglutinin cytoplasmic tail is not essential for virus assembly or infectivity. *Embo J* **13**(22), 5504-15.
- Jin, H., Leser, G. P., Zhang, J., and Lamb, R. A. (1997). Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. *Embo J* **16**(6), 1236-47.
- John, S. P., Wang, T., Steffen, S., Longhi, S., Schmaljohn, C. S., and Jonsson, C. B. (2007). Ebola virus VP30 is an RNA binding protein. *J Virol* **81**(17), 8967-76.
- 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**(4), 227-36.
- 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, R. F., Bell, P., and Harty, R. N. (2006a). Effect of Ebola virus proteins GP, NP and VP35 on VP40 VLP morphology. *Virology* **3**, 31.
- Johnson, R. F., McCarthy, S. E., Godlewski, P. J., and Harty, R. N. (2006b). Ebola virus VP35-VP40 interaction is sufficient for packaging 3E-5E minigenome RNA into virus-like particles. *J Virol* **80**(11), 5135-44.
- Jones, S. M., Feldmann, H., Stroher, U., Geisbert, J. B., Fernando, L., Grolla, A., Klenk, H. D., Sullivan, N. J., Volchkov, V. E., Fritz, E. A., Daddario, K. M., Hensley, L. E., Jahrling, P. B., and Geisbert, T. W. (2005). Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* **11**(7), 786-90.
- Jones, S. M., Stroher, U., Fernando, L., Qiu, X., Alimonti, J., Melito, P., Bray, M., Klenk, H. D., and Feldmann, H. (2007). Assessment of a vesicular stomatitis virus-based vaccine by use of the mouse model of Ebola virus hemorrhagic fever. *J Infect Dis* **196** Suppl 2, S404-12.
- Kaletsky, R. L., Francica, J. R., Agrawal-Gamse, C., and Bates, P. (2009). Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8), 2886-91.
- Kaletsky, R. L., Simmons, G., and Bates, P. (2007). Proteolysis of the Ebola virus glycoproteins enhances virus binding and infectivity. *J Virol* **81**(24), 13378-84.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12), 893-905.
- Kern, A. (2004). Posttranslationale Modifikationen des SARS-Coronavirus Membranproteins. *Diplomarbeit*.
- Kiley, M. P., Bowen, E. T., Eddy, G. A., Isaacson, M., Johnson, K. M., McCormick, J. B., Murphy, F. A., Pattyn, S. R., Peters, D., Prozesky, O. W., Regnery, R. L., Simpson, D. I., Slenczka, 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**(1-2), 24-32.
- Kiley, M. P., Cox, N. J., Elliott, L. H., Sanchez, A., DeFries, R., Buchmeier, M. J., Richman, 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.
- Kolesnikova, L., Bamberg, S., Berghofer, B., and Becker, S. (2004a). 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., Berghofer, B., Bamberg, S., and Becker, S. (2004b). Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope. *J Virol* **78**(22), 12277-87.
- Kolesnikova, L., Bohil, A. B., Cheney, R. E., and Becker, S. (2007a). Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cell Microbiol* **9**(4), 939-51.
- 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**(4), 1825-38.

- Kolesnikova, L., Muhlberger, E., Ryabchikova, E., and Becker, S. (2000). Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *J Virol* **74**(8), 3899-904.
- Kolesnikova, L., Ryabchikova, E., Shestopalov, A., and Becker, S. (2007b). Basolateral budding of Marburg virus: VP40 retargets viral glycoprotein GP to the basolateral surface. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**, S232-6.
- Kolesnikova, L., Strecker, T., Morita, E., Zielecki, F., Mittler, E., Crump, C., and Becker, S. (2009). Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus. *J Virol* **83**(5), 2327-37.
- Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Williams, A. J., Bressler, D. S., Martin, M. L., Swanepoel, R., Burt, F. J., Leman, P. A., Khan, A. S., Rowe, A. K., Mukunu, R., Sanchez, A., and Peters, C. J. (1999). Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**, S177-87.
- Kuhn, J. H., Radoshitzky, S. R., Guth, A. C., Warfield, K. L., Li, W., Vincent, M. J., Towner, J. S., Nichol, S. T., Bavari, S., Choe, H., Aman, M. J., and Farzan, M. (2006). Conserved receptor-binding domains of Lake Victoria marburgvirus and Zaire ebolavirus bind a common receptor. *J Biol Chem* **281**(23), 15951-8.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-5.
- Le Guenno, F. P., Boesch C. (1999). Ebola virus outbreaks in the Ivory Coast and Liberia, 1994-1995. *Curr Top Microbiol Immunol.* **235**, 77-84.
- Lee, J. E., Fusco, M. L., Hessell, A. J., Oswald, W. B., Burton, D. R., and Saphire, E. O. (2008a). Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature* **454**(7201), 177-82.
- Lee, J. K., Prussia, A., Paal, T., White, L. K., Snyder, J. P., and Plemper, R. K. (2008b). Functional interaction between paramyxovirus fusion and attachment proteins. *J Biol Chem* **283**(24), 16561-72.
- Leroy, E. M., Epelboin, A., Mondonge, V., Pourrut, X., Gonzalez, J. P., Muyembe-Tamfum, J. J., and Formenty, P. (2009). Human Ebola Outbreak Resulting from Direct Exposure to Fruit Bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis.*
- Leroy, E. M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Delicat, A., Paweska, J. T., Gonzalez, J. P., and Swanepoel, R. (2005). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* **438**(7068), 575-6.
- Leroy, E. M., Rouquet, P., Formenty, P., Souquiere, S., Kilbourne, A., Froment, J. M., Bermejo, M., Smit, S., Karesh, W., Swanepoel, R., Zaki, S. R., and Rollin, P. E. (2004). Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. *Science* **303**(5656), 387-90.
- Levi, M. (2004). Current understanding of disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol* **124**(5), 567-76.
- Licata, J. M., Johnson, R. F., Han, Z., and Harty, R. N. (2004). Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *J Virol* **78**(14), 7344-51.
- Licata, J. M., Simpson-Holley, M., Wright, N. T., Han, Z., Paragas, J., and Harty, R. N. (2003). Overlapping motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola virus VP40 protein function independently as late budding domains: involvement of host proteins TSG101 and VPS-4. *J Virol* **77**(3), 1812-9.
- Lin, G., Simmons, G., Pohlmann, S., Baribaud, F., Ni, H., Leslie, G. J., Haggarty, B. S., Bates, P., Weissman, D., Hoxie, J. A., and Doms, R. W. (2003). Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* **77**(2), 1337-46.
- Lotfering, B., Muhlberger, E., Tamura, T., Klenk, H. D., and Becker, S. (1999). The nucleoprotein of Marburg virus is target for multiple cellular kinases. *Virology* **255**(1), 50-62.

- Ludwig, T., Theissen, S. M., Morton, M. J., and Caplan, M. J. (2008). The cytoplasmic tail dileucine motif LL572 determines the glycosylation pattern of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* **283**(51), 35410-8.
- Magnus, C., Rusert, P., Bonhoeffer, S., Trkola, A., and Regoes, R. R. (2009). Estimating the stoichiometry of human immunodeficiency virus entry. *J Virol* **83**(3), 1523-31.
- Mahanty, S., Hutchinson, K., Agarwal, S., McRae, M., Rollin, P. E., and Pulendran, B. (2003). Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *J Immunol* **170**(6), 2797-801.
- Mar'iankova, R. F., Glushakova, S. E., Pyzhik, E. V., and Lukashovich, I. S. (1993). [The penetration of the Marburg virus into eukaryotic cells]. *Vopr Virusol* **38**(2), 74-6.
- Martinez, M. J., Biedenkopf, N., Volchkova, V., Hartlieb, B., Alazard-Dany, N., Reynard, O., Becker, S., and Volchkov, V. (2008). Role of Ebola virus VP30 in transcription reinitiation. *J Virol* **82**(24), 12569-73.
- Martini, K. H., Schmidt HA, Mayer G, Baltzer G. (1968). A hitherto unknown infectious disease contracted from monkeys. "Marburg-virus" disease. *Ger Med Mon* **13**(10), 457-70.
- Martin-Serrano, J., Perez-Caballero, D., and Bieniasz, P. D. (2004). Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J Virol* **78**(11), 5554-63.
- Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P. D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* **7**(12), 1313-9.
- Marzi, A., Gramberg, T., Simmons, G., Moller, P., Rennekamp, A. J., Krumbiegel, M., Geier, M., Eisemann, J., Turza, N., Saunier, B., Steinkasserer, A., Becker, S., Bates, P., Hofmann, H., and Pohlmann, S. (2004). DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* **78**(21), 12090-5.
- Mavrikakis, M., Kolesnikova, L., Schoehn, G., Becker, S., and Ruigrok, R. W. (2002). Morphology of Marburg virus NP-RNA. *Virology* **296**(2), 300-7.
- McCarthy, S. E., Johnson, R. F., Zhang, Y. A., Sunyer, J. O., and Harty, R. N. (2007). Role for amino acids 212KLR214 of Ebola virus VP40 in assembly and budding. *J Virol* **81**(20), 11452-60.
- Mebatsion, T., Konig, M., and Conzelmann, K. K. (1996). Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell* **84**(6), 941-51.
- Mebatsion, T., Weiland, F., and Conzelmann, K. K. (1999). Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol* **73**(1), 242-50.
- Mellquist-Riemenschneider, J. L., Garrison, A. R., Geisbert, J. B., Saikh, K. U., Heidebrink, K. D., Jahrling, P. B., Ulrich, R. G., and Schmaljohn, C. S. (2003). Comparison of the protective efficacy of DNA and baculovirus-derived protein vaccines for EBOLA virus in guinea pigs. *Virus Res* **92**(2), 187-93.
- Mercer, J., and Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* **11**(5), 510-20.
- Miranda, M. E., Ksiazek, T. G., Retuya, T. J., Khan, A. S., Sanchez, A., Fulhorst, C. F., Rollin, P. E., Calaor, A. B., Manalo, D. L., Roces, M. C., Dayrit, M. M., and Peters, C. J. (1999). Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**, S115-9.
- Mitnaul, L. J., Castrucci, M. R., Murti, K. G., and Kawaoka, Y. (1996). The cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase (NA) affects NA incorporation into virions, virion morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication. *J Virol* **70**(2), 873-9.
- Mittler, E. (2005). Identifizierung der Transmembrandomäne des Marburgvirus Oberflächenproteins als endosomales Sortierungssignal. *Diplomarbeit*.
- Mittler, E., Kolesnikova, L., Strecker, T., Garten, W., and Becker, S. (2007). Role of the transmembrane domain of marburg virus surface protein GP in assembly of the viral envelope. *J Virol* **81**(8), 3942-8.

- Modrof, J., Becker, S., and Muhlberger, E. (2003). Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein. *J Virol* **77**(5), 3334-8.
- Modrof, J., Muhlberger, E., Klenk, H. D., and Becker, S. (2002). Phosphorylation of VP30 impairs ebola virus transcription. *J Biol Chem* **277**(36), 33099-104.
- Moller, P., Pariente, N., Klenk, H. D., and Becker, S. (2005). Homo-oligomerization of Marburgvirus VP35 is essential for its function in replication and transcription. *J Virol* **79**(23), 14876-86.
- Moore, J. P., McKeating, J. A., Weiss, R. A., and Sattentau, Q. J. (1990). Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* **250**(4984), 1139-42.
- Muhlberger, E., Lotfering, 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**(11), 8756-64.
- Muhlberger, 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**(2), 534-47.
- Muhlberger, 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**(2), 376-80.
- Muhlberger, 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**(3), 2333-42.
- 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**, S18-23.
- Naim, H. Y., Ehler, E., and Billeter, M. A. (2000). Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *Embo J* **19**(14), 3576-85.
- Nayak, D. P., Hui, E. K., and Barman, S. (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**(2), 147-65.
- Ndayimirije, N., and Kindhauser, M. K. (2005). Marburg hemorrhagic fever in Angola--fighting fear and a lethal pathogen. *N Engl J Med* **352**(21), 2155-7.
- Neumann, G., Ebihara, H., Takada, A., Noda, T., Kobasa, D., Jasenosky, L. D., Watanabe, S., Kim, J. H., Feldmann, H., and Kawaoka, Y. (2005). Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* **79**(16), 10300-7.
- Neumann, G., Feldmann, H., Watanabe, S., Lukashevich, I., and Kawaoka, Y. (2002). Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol* **76**(1), 406-10.
- Noda, T., Aoyama, K., Sagara, H., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2005). Nucleocapsid-like structures of Ebola virus reconstructed using electron tomography. *J Vet Med Sci* **67**(3), 325-8.
- Noda, T., Ebihara, H., Muramoto, Y., Fujii, K., Takada, A., Sagara, H., Kim, J. H., Kida, H., Feldmann, H., and Kawaoka, Y. (2006). Assembly and budding of Ebolavirus. *PLoS Pathog* **2**(9), e99.
- Noda, T., Halfmann, P., Sagara, H., and Kawaoka, Y. (2007). Regions in Ebola virus VP24 that are important for nucleocapsid formation. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**, S247-50.
- Noda, T., Sagara, H., Suzuki, E., Takada, A., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2002). Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol* **76**(10), 4855-65.
- Normile, D. (2009). Emerging infectious diseases. Scientists puzzle over Ebola-Reston virus in pigs. *Science* **323**(5913), 451.
- Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S. D. (1998). Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* **95**(6), 847-58.
- 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), 573-4.

- Poch, O., Blumberg, B. M., Bougueleret, L., and Tordo, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* **71** (Pt 5), 1153-62.
- 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.
- Pourrut, X., Delicat, A., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Gonzalez, J. P., and Leroy, E. M. (2007). Spatial and temporal patterns of Zaire ebolavirus antibody prevalence in the possible reservoir bat species. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**, S176-83.
- Prins, K. C., Cardenas, W. B., and Basler, C. F. (2009). Ebola virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKKepsilon and TBK-1. *J Virol* **83**(7), 3069-77.
- Qiu, X., Fernando, L., Alimonti, J. B., Melito, P. L., Feldmann, F., Dick, D., Stroher, U., Feldmann, H., and Jones, S. M. (2009). Mucosal immunization of cynomolgus macaques with the VSVDeltaG/ZEBOVGP vaccine stimulates strong ebola GP-specific immune responses. *PLoS ONE* **4**(5), e5547.
- Rao, M., Bray, M., Alving, C. R., Jahrling, P., and Matyas, G. R. (2002). Induction of immune responses in mice and monkeys to Ebola virus after immunization with liposome-encapsulated irradiated Ebola virus: protection in mice requires CD4(+) T cells. *J Virol* **76**(18), 9176-85.
- Reed, D. S., and Mohamadzadeh, M. (2007). Status and challenges of filovirus vaccines. *Vaccine* **25**(11), 1923-34.
- Reid, S. P., Leung, L. W., Hartman, A. L., Martinez, O., Shaw, M. L., Carbonnelle, C., Volchkov, V. E., Nichol, S. T., and Basler, C. F. (2006). Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J Virol* **80**(11), 5156-67.
- Reid, S. P., Valmas, C., Martinez, O., Sanchez, F. M., and Basler, C. F. (2007). Ebola virus VP24 proteins inhibit the interaction of NPI-1 subfamily karyopherin alpha proteins with activated STAT1. *J Virol* **81**(24), 13469-77.
- Richardson, J. S., Yao, M. K., Tran, K. N., Croyle, M. A., Strong, J. E., Feldmann, H., and Kobinger, G. P. (2009). Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS ONE* **4**(4), e5308.
- Riemenschneider, J., Garrison, A., Geisbert, J., Jahrling, P., Hevey, M., Negley, D., Schmaljohn, A., Lee, J., Hart, M. K., Vanderzanden, L., Custer, D., Bray, M., Ruff, A., Ivins, B., Bassett, A., Rossi, C., and Schmaljohn, C. (2003). Comparison of individual and combination DNA vaccines for B. anthracis, Ebola virus, Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine* **21**(25-26), 4071-80.
- Rippey, J. J., Schepers, N. J., and Gear, J. H. (1984). The pathology of Marburg virus disease. *S Afr Med J* **66**(2), 50-4.
- Ruigrok, R. W., Schoehn, G., Dessen, A., Forest, E., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H. D., and Weissenhorn, W. (2000). Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J Mol Biol* **300**(1), 103-12.
- Ruthel, G., Demmin, G. L., Kallstrom, G., Javid, M. P., Badie, S. S., Will, A. B., Nelle, T., Schokman, R., Nguyen, T. L., Carra, J. H., Bavari, S., and Aman, M. J. (2005). Association of ebola virus matrix protein VP40 with microtubules. *J Virol* **79**(8), 4709-19.
- Ryabchikova, E. I., Kolesnikova, L. V., and Netesov, S. V. (1999). Animal pathology of filoviral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**, 145-73.
- Saeed, M. F., Kolokoltsov, A. A., Freiberg, A. N., Holbrook, M. R., and Davey, R. A. (2008). Phosphoinositide-3 kinase-Akt pathway controls cellular entry of Ebola virus. *PLoS Pathog* **4**(8), e1000141.
- Sanchez, A. (2007). Analysis of filovirus entry into vero e6 cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (B and L) activity. *J Infect Dis* **196 Suppl 2**, S251-8.
- 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., 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., Lukwiya, M., Bausch, D., Mahanty, S., Sanchez, A. J., Wagoner, K. D., and Rollin, P. E. (2004). Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J Virol* **78**(19), 10370-7.
- Sanchez, A., Trappier, S. G., Mahy, B. W., Peters, C. J., and Nichol, S. T. (1996). The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(8), 3602-7.
- 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.
- Sanderson, C. M., McQueen, N. L., and Nayak, D. P. (1993). Sendai virus assembly: M protein binds to viral glycoproteins in transit through the secretory pathway. *J Virol* **67**(2), 651-63.
- Sanger, C., Muhlberger, E., Lotfering, B., Klenk, H. D., and Becker, S. (2002). The Marburg virus surface protein GP is phosphorylated at its ectodomain. *Virology* **295**(1), 20-9.
- Sanger, C., Muhlberger, E., Ryabchikova, E., Kolesnikova, L., Klenk, H. D., and Becker, S. (2001). Sorting of Marburg virus surface protein and virus release take place at opposite surfaces of infected polarized epithelial cells. *J Virol* **75**(3), 1274-83.
- Sanger, F., and Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* **94**(3), 441-8.
- Sattentau, Q. J., Moore, J. P., Vignaux, F., Traincard, F., and Poignard, P. (1993). Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol* **67**(12), 7383-93.
- Schmitt, A. P., He, B., and Lamb, R. A. (1999). Involvement of the cytoplasmic domain of the hemagglutinin-neuraminidase protein in assembly of the paramyxovirus simian virus 5. *J Virol* **73**(10), 8703-12.
- Schnell, M. J., Buonocore, L., Boritz, E., Ghosh, H. P., Chernish, R., and Rose, J. K. (1998). Requirement for a non-specific glycoprotein cytoplasmic domain sequence to drive efficient budding of vesicular stomatitis virus. *Embo J* **17**(5), 1289-96.
- Schnittler, H. J., and Feldmann, H. (1998). Marburg and Ebola hemorrhagic fevers: does the primary course of infection depend on the accessibility of organ-specific macrophages? *Clin Infect Dis* **27**(2), 404-6.
- Schnittler, H. J., and Feldmann, H. (1999). Molecular pathogenesis of filovirus infections: role of macrophages and endothelial cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**, 175-204.
- Schorner, K., Matsuyama, S., Kabsch, K., Delos, S., Bouton, A., and White, J. (2006). Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J Virol* **80**(8), 4174-8.
- Schorner, K. L., Shoemaker, C. J., Dube, D., Abshire, M. Y., Delos, S. E., Bouton, A. H., and White, J. M. (2009). Alpha5beta1-integrin controls ebolavirus entry by regulating endosomal cathepsins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(19), 8003-8.
- Schumann, M., Gantke, T., and Muhlberger, E. (2009). Ebola virus VP35 antagonizes PKR activity through its C-terminal interferon inhibitory domain. *J Virol*.
- Scianimanico, S., Schoehn, G., Timmins, J., Ruigrok, R. H., Klenk, H. D., and Weissenhorn, W. (2000). Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein. *Embo J* **19**(24), 6732-41.
- Shimajima, M., Takada, A., Ebihara, H., Neumann, G., Fujioka, K., Irimura, T., Jones, S., Feldmann, H., and Kawakawa, Y. (2006). Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol* **80**(20), 10109-16.
- Siegert, R., Shu, H.L., Slenczka, W., Peters, D., and Muller, G. (1967). On the etiology of an unknown human infection originating from monkeys. *Dtsch Med Wochenschr* **92**(51), 2341-3.
- Simmons, G., Reeves, J. D., Grogan, C. C., Vandenberghe, L. H., Baribaud, F., Whitbeck, J. C., Burke, E., Buchmeier, M. J., Soilleux, E. J., Riley, J. L., Doms, R. W., Bates, P., and

- Pohlmann, S. (2003a). DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* **305**(1), 115-23.
- Simmons, G., Rennekamp, A. J., Chai, N., Vandenberghe, L. H., Riley, J. L., and Bates, P. (2003b). Folate receptor alpha and caveolae are not required for Ebola virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* **77**(24), 13433-8.
- Simpson, D. A., and Lamb, R. A. (1992). Alterations to influenza virus hemagglutinin cytoplasmic tail modulate virus infectivity. *J Virol* **66**(2), 790-803.
- Simpson, D. I. (1977). Marburg fever. *Nurs Mirror* **144**(21), 13-5.
- Sinn, P. L., Hickey, M. A., Staber, P. D., Dylla, D. E., Jeffers, S. A., Davidson, B. L., Sanders, D. A., and McCray, P. B., Jr. (2003). Lentivirus vectors pseudotyped with filoviral envelope glycoproteins transduce airway epithelia from the apical surface independently of folate receptor alpha. *J Virol* **77**(10), 5902-10.
- Skehel, J. J., Bayley, P. M., Brown, E. B., Martin, S. R., Waterfield, M. D., White, J. M., Wilson, I. A., and Wiley, D. C. (1982). Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(4), 968-72.
- Slenzcka, W., Rietschel, M., Hoffmann, C. and Sixl W. (1984). Seroepidemiologische Untersuchung über Vorkommen von Antikörpern gegen Marburg- und Ebola Virus in Afrika. *Mitt. Oesterr. Ges. Tropenmed. Parasit* **6**, 53-60.
- Spies, C. P., Ritter, G. D., Jr., Mulligan, M. J., and Compans, R. W. (1994). Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein alters the conformation of the external domain. *J Virol* **68**(2), 585-91.
- 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**(10 Suppl), S447-63.
- Stroher, 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**(22), 11025-33.
- Sullivan, N. J., Geisbert, T. W., Geisbert, J. B., Shedlock, D. J., Xu, L., Lamoreaux, L., Custers, J. H., Popernack, P. M., Yang, Z. Y., Pau, M. G., Roederer, M., Koup, R. A., Goudsmit, J., Jahrling, P. B., and Nabel, G. J. (2006). Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Med* **3**(6), e177.
- 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**(6812), 605-9.
- Sun, Y., Carrion, R., Jr., Ye, L., Wen, Z., Ro, Y. T., Brasky, K., Ticer, A. E., Schwegler, E. E., Patterson, J. L., Compans, R. W., and Yang, C. (2009). Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells. *Virology* **383**(1), 12-21.
- Sureau, P. H. (1989). Firsthand clinical observations of hemorrhagic manifestations in Ebola hemorrhagic fever in Zaire. *Rev Infect Dis* **11 Suppl 4**, S790-3.
- Suzuki, N., Yamamoto, K., Toyoshima, S., Osawa, T., and Irimura, T. (1996). Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin. Its unique carbohydrate binding specificity for Tn antigen. *J Immunol* **156**(1), 128-35.
- Swanepoel, 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**(4), 321-5.
- Swanepoel, R., Smit, S. B., Rollin, P. E., Formenty, P., Leman, P. A., Kemp, A., Burt, F. J., Grobbelaar, A. A., Croft, J., Bausch, D. G., Zeller, H., Leirs, H., Braack, L. E., Libande, M. L., Zaki, S., Nichol, S. T., Ksiazek, T. G., and Paweska, J. T. (2007). Studies of reservoir hosts for Marburg virus. *Emerg Infect Dis* **13**(12), 1847-51.
- Swenson, D. L., Wang, D., Luo, M., Warfield, K. L., Woraratanadharm, J., Holman, D. H., Dong, J. Y., and Pratt, W. D. (2008a). Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin Vaccine Immunol* **15**(3), 460-7.
- Swenson, D. L., Warfield, K. L., Kuehl, K., Larsen, T., Hevey, M. C., Schmaljohn, A., Bavari, S., and Aman, M. J. (2004). Generation of Marburg virus-like particles by co-expression of glycoprotein and matrix protein. *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**(1), 27-31.

- Swenson, D. L., Warfield, K. L., Larsen, T., Alves, D. A., Coberley, S. S., and Bavari, S. (2008b). Monovalent virus-like particle vaccine protects guinea pigs and nonhuman primates against infection with multiple Marburg viruses. *Expert Rev Vaccines* **7**(4), 417-29.
- Swenson, D. L., Warfield, K. L., Negley, D. L., Schmaljohn, A., Aman, M. J., and Bavari, S. (2005). Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine* **23**(23), 3033-42.
- Szotowski, B., Antoniak, S., Poller, W., Schultheiss, H. P., and Rauch, U. (2005). Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res* **96**(12), 1233-9.
- Takada, A., Fujioka, K., Tsuiji, M., Morikawa, A., Higashi, N., Ebihara, H., Kobasa, D., Feldmann, H., Irimura, T., and Kawaoka, Y. (2004). Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol* **78**(6), 2943-7.
- Timmins, J., Ruigrok, R. W., and Weissenhorn, W. (2004). Structural studies on the Ebola virus matrix protein VP40 indicate that matrix proteins of enveloped RNA viruses are analogues but not homologues. *FEMS Microbiol Lett* **233**(2), 179-86.
- Timmins, J., Schoehn, G., Ricard-Blum, S., Scianimanico, S., Vernet, T., Ruigrok, R. W., and Weissenhorn, W. (2003). Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol* **326**(2), 493-502.
- Timmins, J., Scianimanico, S., Schoehn, G., and Weissenhorn, W. (2001). Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40. *Virology* **283**(1), 1-6.
- Towner, J. S., Khristova, M. L., Sealy, T. K., Vincent, M. J., Erickson, B. R., Bawiec, D. A., Hartman, A. L., Comer, J. A., Zaki, S. R., Stroher, U., Gomes da Silva, F., del Castillo, F., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., and Nichol, S. T. (2006). Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J Virol* **80**(13), 6497-516.
- Towner, J. S., Pourrut, X., Albarino, C. G., Nkogue, C. N., Bird, B. H., Grard, G., Ksiazek, T. G., Gonzalez, J. P., Nichol, S. T., and Leroy, E. M. (2007). Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS ONE* **2**(1), e764.
- Towner, J. S., Sealy, T. K., Khristova, M. L., Albarino, C. G., Conlan, S., Reeder, S. A., Quan, P. L., Lipkin, W. I., Downing, R., Tappero, J. W., Okware, S., Lutwama, J., Bakamutumaho, B., Kayiwa, J., Comer, J. A., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., and Nichol, S. T. (2008). Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog* **4**(11), e1000212.
- Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., and Yasuda, J. (2007). Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J Virol* **81**(9), 4895-9.
- van Regenmortel, M. H., Mayo, M. A., Fauquet, C. M., and Maniloff, J. (2000). Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch Virol* **145**(10), 2227-32.
- Villinger, F., Rollin, P. E., Brar, S. S., Chikkala, N. F., Winter, J., Sundstrom, J. B., Zaki, S. R., Swanepoel, R., Ansari, A. A., and Peters, C. J. (1999). Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. *J Infect Dis* **179** Suppl 1, S188-91.
- Volchkov, V. E., Becker, S., Volchkova, V. A., Ternovoj, V. A., Kotov, A. N., Netesov, S. V., and Klenk, H. D. (1995). GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology* **214**(2), 421-30.
- Volchkov, V. E., Chepurnov, A. A., Volchkova, V. A., Ternovoj, V. A., and Klenk, H. D. (2000a). Molecular characterization of guinea pig-adapted variants of Ebola virus. *Virology* **277**(1), 147-55.
- Volchkov, V. E., Feldmann, H., Volchkova, V. A., and Klenk, H. D. (1998). Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(10), 5762-7.

- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Chepurnov, A. A., Blinov, V. M., Dolnik, O., Netesov, S. V., and Feldmann, H. (1999). Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol* **80** (Pt 2), 355-62.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Muhlberger, 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**(5510), 1965-9.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Stroher, U., Becker, S., Dolnik, O., Cieplik, M., Garten, W., Klenk, H. D., and Feldmann, H. (2000b). Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology* **268**(1), 1-6.
- Voß, D. (2007). Glykosylierung und intrazellulärer Transport des SARS-Coronavirus Membranproteins. *Dissertation*.
- Wagner, R., Herwig, A., Azzouz, N., and Klenk, H. D. (2005). Acylation-mediated membrane anchoring of avian influenza virus hemagglutinin is essential for fusion pore formation and virus infectivity. *J Virol* **79**(10), 6449-58.
- Wahl-Jensen, V. M., Afanasieva, T. A., Seebach, J., Stroher, U., Feldmann, H., and Schnittler, H. J. (2005). Effects of Ebola virus glycoproteins on endothelial cell activation and barrier function. *J Virol* **79**(16), 10442-50.
- Wang, D., Hevey, M., Juompan, L. Y., Trubey, C. M., Raja, N. U., Deitz, S. B., Woraratanadharm, J., Luo, M., Yu, H., Swain, B. M., Moore, K. M., and Dong, J. Y. (2006a). Complex adenovirus-vectored vaccine protects guinea pigs from three strains of Marburg virus challenges. *Virology* **353**(2), 324-32.
- Wang, D., Raja, N. U., Trubey, C. M., Juompan, L. Y., Luo, M., Woraratanadharm, J., Deitz, S. B., Yu, H., Swain, B. M., Moore, K. M., Pratt, W. D., Hart, M. K., and Dong, J. Y. (2006b). Development of a cAdVax-based bivalent ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus. *J Virol* **80**(6), 2738-46.
- Waning, D. L., Russell, C. J., Jardetzky, T. S., and Lamb, R. A. (2004). Activation of a paramyxovirus fusion protein is modulated by inside-out signaling from the cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(25), 9217-22.
- Waning, D. L., Schmitt, A. P., Leser, G. P., and Lamb, R. A. (2002). Roles for the cytoplasmic tails of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in budding of the paramyxovirus simian virus 5. *J Virol* **76**(18), 9284-97.
- Warfield, K. L., Swenson, D. L., Negley, D. L., Schmaljohn, A. L., Aman, M. J., and Bavari, S. (2004). Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *Vaccine* **22**(25-26), 3495-502.
- Warfield, K. L., Swenson, D. L., Olinger, G. G., Kalina, W. V., Aman, M. J., and Bavari, S. (2007). Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *J Infect Dis* **196** Suppl 2, S430-7.
- Watanabe, S., Takada, A., Watanabe, T., Ito, H., Kida, H., and Kawaoka, Y. (2000). Functional importance of the coiled-coil of the Ebola virus glycoprotein. *J Virol* **74**(21), 10194-201.
- Watanabe, S., Watanabe, T., Noda, T., Takada, A., Feldmann, H., Jasenosky, L. D., and Kawaoka, Y. (2004). Production of novel ebola virus-like particles from cDNAs: an alternative to ebola virus generation by reverse genetics. *J Virol* **78**(2), 999-1005.
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D., and Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**(6929), 307-12.
- Weik, M., Enterlein, S., Schlenz, K., and Muhlberger, E. (2005). The Ebola virus genomic replication promoter is bipartite and follows the rule of six. *J Virol* **79**(16), 10660-71.
- Weik, M., Modrof, J., Klenk, H. D., Becker, S., and Muhlberger, E. (2002). Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation. *J Virol* **76**(17), 8532-9.
- Weissenhorn, W., Calder, L. J., Wharton, S. A., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1998a). The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus

- glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11), 6032-6.
- Weissenhorn, W., Carfi, A., Lee, K. H., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1998b). Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell* **2**(5), 605-16.
- Wenigenrath, J. (2008). Etablierung eines infektiösen Minigenomsystems für Marburg Virus basierend auf Virus-ähnlichen Partikeln. *Dissertation*.
- Whittaker, G., Bui, M., and Helenius, A. (1996). The role of nuclear import and export in influenza virus infection. *Trends Cell Biol* **6**(2), 67-71.
- WHO (1978). Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team. *Bull World Health Organ* **56**(2), 247-70.
- WHO (1992). Viral haemorrhagic fever in imported monkeys. *Wkly Epidemiol Rec.* **67**(19), 142-3.
- WHO (1996). Ebola-Reston virus infection among quarantined nonhuman primates--Texas, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **45**(15), 314-6.
- WHO (2001). Outbreak of Ebola haemorrhagic fever, Uganda, August 2000-January 2001. *Wkly Epidemiol Rec.* **76**(6), 41-6.
- WHO (2003a). Outbreaks of Ebola haemorrhagic fever, Congo and Gabon, October 2001-July 2002. *Wkly Epidemiol Rec.* **78**(26), 223-8.
- WHO (2003b). Outbreak(s) of Ebola haemorrhagic fever in the Republic of the Congo, January-April 2003. *Wkly Epidemiol Rec.* **78**(33), 285-9.
- WHO (2004a). Ebola haemorrhagic fever in the Republic of the Congo - update 6.
- WHO (2004b). WHO announces end of Ebola outbreak in southern Sudan.
- WHO (2005). Ebola haemorrhagic fever in the Republic of the Congo - update 2.
- WHO (2007). Outbreak of Marburg haemorrhagic fever: Uganda, June-August 2007. *Wkly Epidemiol Rec.* **82**(43), 381-4.
- WHO (2008). Case of Marburg Haemorrhagic Fever imported into the Netherlands from Uganda.
- WHO (2009a). End of Ebola outbreak in the Democratic Republic of the Congo.
- WHO (2009b). Outbreak news. Ebola Reston in pigs and humans, Philippines. *Wkly Epidemiol Rec.* **84**(7), 49-50.
- Wild, T. F., Malvoisin, E., and Buckland, R. (1991). Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol* **72** (Pt 2), 439-42.
- Will, C., Muhlberger, 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**(3), 1203-10.
- Yamayoshi, S., Noda, T., Ebihara, H., Goto, H., Morikawa, Y., Lukashevich, I. S., Neumann, G., Feldmann, H., and Kawaoka, Y. (2008). Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe* **3**(3), 168-77.
- Yang, X., Kurteva, S., Ren, X., Lee, S., and Sodroski, J. (2005). Stoichiometry of envelope glycoprotein trimers in the entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **79**(19), 12132-47.
- Zaki, S. R., Peters, C.J. (1997). Viral Haemorrhagic Fever. *Diagnostic Pathology of Infectious Diseases* **Appleton and Lange, Stanford, USA**, 347-364.
- Zhang, J., and Lamb, R. A. (1996). Characterization of the membrane association of the influenza virus matrix protein in living cells. *Virology* **225**(2), 255-66.

8 Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen. Die Abkürzungen der chemischen Substanzen wurden im Materialteil aufgeführt.

α	anti
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Adaptorprotein
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSL1/ 4	Biologische Sicherheitsstufe L1/ 4
CD	Cytoplasmatische Domäne
CD (in CD80)	„cluster of differentiation“
CDC	Center for Disease Control (Atlanta/USA)
cDNA	„complementary DNA“ = komplementäre DNA
CIP	„calf intestinal phosphatase“
COP	„coat protein“
C-Terminus	Carboxyterminus
d (bei dH ₂ O)	deionisiert
DC-SIGN	„dendritic cell specific ICAM-3-grabbing non- integrin“
ddNTP	2'3' -Didesoxynukleosidtriphosphat
def	deficient
DIC	„disseminated intravasal coagulation“
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2' -Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EBOV	Ebolavirus
ED	Ektodomäne
EM	Elektronenmikroskopie
Endo H	Endoglykosidase H
env	„envelope protein“ = Oberflächenprotein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	„endosomal sorting complexes required for transport“
F	Fusionsprotein
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat Isomer 1
G	Glykoprotein
GGA	„ golgi localized γ -ear containing, ARF-binding protein“
GP	Glykoprotein

GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
HDVrib	Hepatitis Delta Virus Ribozymschnittstelle
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
hMGL	„human macrophage galactose- and acetylgalactosamine-specific C-type lectin“
HN	Hämagglutinin-Neuraminidase
HR	„heptad repeat“
HRP	„horse radish peroxidase“
IF	Immunfluoreszenz
IFL	„internal fusion loop“
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IRF-3	„interferon regulatory factor 3“
iVLP	„infectious virus-like particle“ = infektiöser VLP
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L-Protein	Large-Protein (Polymerase)
LSECTin	„lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin“
Luc	Luziferase
MARV	Marburgvirus
min	Minuten
MLD	„mucin-like domain“ = Mucin-ähnliche Domäne
Mock	Scheininfection
mRNA	messenger RNA
MVB	„multi vesicular bodies“ = multivesikuläre Strukturen
NA	Neuraminidase
Nedd4	„neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4“
NP	Nukleoprotein
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“ = offener Leserahmen
P0/ P1	Passage 0/ Passage 1
p.t.	„post transfection“ = nach Transfektion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKR	Proteinkinase R
PM	Plasmamembran
PNGase F	Peptid N-Glykosidase F
POD	Peroxidase

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBD	Rezeptor-bindende Domäne
RKI	Robert-Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rNAPc2	„recombinant nematode anticoagulant protein c2“
RNP-Komplex	Ribonukleoproteinkomplex
rPCR	Rekombinante Polymerase-Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
scr	„scrambled“ = durchmischt
sec	Sekunden
SIV	„Simian Immundeficiency Virus“
SNARE	„soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor“
STAT1	„signal transducers and activator of transcription 1“
SV5	„Simian Virus 5“
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
TNF α	„tumor necrosis factor α “
Tsg101	„tumor susceptibility gene 101“
Tyros3	Tyrosinkinase 3
U	„unit“ = Einheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volume per volume
VLP	„virus-like particles“ = virusähnliche Partikel
VP	Virusprotein
VPS4	„vacuolar sorting protein 4“
vRNA	virale RNA
VSV	Vesikulärer Stomatitis Virus
w/v	weight per volume
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation
WT/wt	Wildtyp
λ	Lambda = Wellenlänge

Abkürzungen der kanonischen Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asp	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Morphologie des Marburgvirus	8
Abbildung 2	Genomstruktur des Marburgvirus	9
Abbildung 3	Aufbau des MARV Glykoproteins	13
Abbildung 4	Der filovirale Replikationszyklus	18
Abbildung 5	Das filovirale Minigenom-System	20
Abbildung 6	Schematische Übersicht über das MARV iVLP-System	21
Abbildung 7	Unterscheidung MARV-spezifischer sphärischer und filamentöser Partikel	23
Abbildung 8	Fusion von zellulärer und viraler Membran vermittelt durch MARV GP	25
Abbildung 9	Prinzip einer PCR	43
Abbildung 10	Prinzip der rekombinanten PCR	45
Abbildung 11	Herstellung eines Nycodenzstufengradienten	60
Abbildung 12	Einfluss der cytoplasmatischen Domäne des MARV GP auf dessen intrazelluläre Verteilung und posttranslationale Modifikationen	74
Abbildung 13	Immunfluoreszenzanalyse der Coexpression von MARV VP40 und MARV GP bzw. GP Δ CD	76
Abbildung 14	Einbau von MARV GP Δ CD in iVLPs	77
Abbildung 15	Oligomerisierung von in iVLPs eingebauten MARV GP Δ CD	79
Abbildung 16	N- und O-Glykosylierungsmuster von in iVLPs integrierten MARV GP bzw. GP Δ CD	81
Abbildung 17	Einfluss von Mutationen in MARV GP auf die Infektiosität von iVLPs	84
Abbildung 18	N- und O-Glykosylierungsmuster von MARV GP Δ MLD	87
Abbildung 19	Einfluss der Mucin-ähnlichen Domäne des MARV GP auf den Einbau des GP in iVLPs und deren Infektiosität	89
Abbildung 20	Etablierung eines Zell-Zell Fusionsassays	91
Abbildung 21	Etablierung eines Assays zur Untersuchung der Aufnahme von VLPs in HEK293-Zellen	94

Abbildung 22	Analyse der Integration von VP30-Luc in VLPs	96
Abbildung 23	Einfluss der cytoplasmatischen Domäne von MARV GP auf die Aufnahme von VLPs in HEK293-Zellen	99
Abbildung 24	Einfluss der Acylierung des MARV GP auf die Infektiosität von iVLPs	103
Abbildung 25	Einfluss der cytoplasmatischen Domäne des EBOV GP auf die Infektiosität von iVLPs	105
Tabelle 1	Taxonomie der Filoviren	1
Tabelle 2	Gemeldete Fälle und Ausbrüche von humanen Marburg- und Ebolavirus Infektionen	2
Tabelle 3	Für Sequenzierungen und PCR verwendete Oligonukleotide	38
Tabelle 4	Für Klonierungen verwendete Matrizen-DNA und Oligonukleotide	40

Lebenslauf und Ausbildungsgang

Persönliche Daten

Eva-Maria Mittler

Barfüßer Tor 16

35037 Marburg

*19. Mai 1981 in Marburg/Lahn

Hochschulstudium

- | | |
|-----------------------|--|
| Nov. 2005 - Juni 2009 | Promotion am Fachbereich für Medizin, Institut für Virologie, Philipps-Universität, Marburg/Lahn in Kooperation mit dem Zentrum für biologische Sicherheit (ZBS), Robert-Koch Institut, Berlin
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Stephan Becker
Thema: „Funktionelle Charakterisierung der cytoplasmatischen Domäne des Marburgvirus Oberflächenproteins GP “ |
| Nov. 2004 - Aug. 2005 | Diplomarbeit am Fachbereich für Medizin, Institut für Virologie, Philipps-Universität, Marburg/Lahn
Arbeitsgruppe: PD Dr. Stephan Becker
Thema: „Identifizierung der Transmembrandomäne des Marburgvirus Oberflächenproteins als endosomales Sortierungssignal“ |
| Okt. 2000 - Aug. 2005 | Studium am Fachbereich für Biologie der Philipps-Universität, Marburg/Lahn
Schwerpunkte des Hauptstudiums: <ul style="list-style-type: none"> • Virologie • Parasitologie • Mikrobiologie |

Schulische Ausbildung

- | | |
|-----------------------|--|
| Aug. 1998 - Juni 2000 | Gymnasiale Oberstufe der Alfred-Wegener-Gesamtschule, Kirchhain
Abschluss: Hochschulreife (Durchschnittsnote 1,7) |
| Aug. 1991 - Juni 1998 | Alfred-Wegener-Gesamtschule, Kirchhain |

Marburg/Lahn, den 30. Juni 2009

.....

Veröffentlichungen, Vorträge, Posterpräsentationen

Veröffentlichungen

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurde folgende Publikation erstellt:

Role of the transmembrane domain of marburg virus surface protein GP in assembly of the viral envelope.

Mittler, E., Kolesnikova, L., Strecker, T., Garten, W., Becker, S. (2007) *J Virol.* **81**(8), 3942-8.

Weitere Publikationen während der Dissertation:

Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus.

Kolesnikova, L., Strecker, T., Morita, E., Zielecki, F., Mittler, E., Crump, C., Becker, S. (2009) *J Virol.* **83**(5), 2327-37.

Vorträge

Infectivity of Marburg virus iVLPs is modulated by the cytoplasmic domain of its surface protein GP.

Mittler, E.^a, Wenigenrath, J., Kolesnikova, L., Becker S.

- 19th Annual Meeting of the Society for Virology, Leipzig, März 2009

The use of Virus-like particles to investigate infection and budding of Marburg virus.

Mittler, E.^a, Kolesnikova, L.^a, Becker, S.

- Internes Seminar des SFB535 (Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern), Gießen, November 2008

Functional analysis of the Marburg virus GP cytoplasmic domain.

Mittler, E.^a, Kolesnikova, L., Wenigenrath, J., Becker, S.

- 14. International Congress of Virology, Istanbul (Türkei), August 2008

Marburg virus budding.

Kolesnikova, L., Mittler, E., Ryabchikova, E., Shestopalov, A., Becker, S.^a

- Negative Strand RNA Viruses Workshop, Evanston, IL (USA), September 2007

Identification of the transmembrane domain of Marburg virus GP as an endosomal sorting signal.

Mittler, E.^a, Kolesnikova, L., Becker, S.

- 16th Annual Meeting of the Society for Virology, München, März 2006

Identification of the transmembrane domain of Marburg virus GP as an endosomal sorting signal.

Mittler, E.^a, Kolesnikova, L., Becker, S.

- Internes Seminar des SFB535 (Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern), Gießen, Februar 2006

Poster

Characterization of infectivity-reduced Marburg virus-like particles.

Mittler, E.^a, Wenigenrath, J., Kolesnikova, L., Becker, S.

- 18th Annual Meeting of the Society for Virology, Heidelberg, März 2008

Influence of Marburg virus glycoprotein cytoplasmic tail on infectivity of virus like particles.

Mittler, E.^a, Wenigenrath, J., Kolesnikova, L., Becker, S.

- 3th European Meeting of Virology, Nürnberg, September 2007

Identification of the transmembrane domain of Marburg virus glycoprotein as an endosomal sorting signal.

Mittler, E., Kolesnikova, L.^a, Becker, S.

- EMBO Workshop on Cell Membrane Organization and Dynamics, Bilbao (Spanien), Juni 2006

^a präsentierender Autor

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**„Funktionelle Charakterisierung der cytoplasmatischen Domäne des
Marburgvirus Oberflächenproteins GP“**

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

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

Marburg/Lahn, den 30. Juni 2009

.....

Danksagung

Für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stephan Becker bedanken. Er trug durch wertvolle Anregungen, neue Ideen und aufschlussreiche Diskussionen maßgeblich zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit bei. Auch in schwierigen Zeiten während der Anfertigung dieser Arbeit hat er mich bestärkt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach für die Betreuung meiner Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Marburg bedanken. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buckel, dass sie als weitere Mitglieder der Prüfungskommission zur Verfügung stehen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Becker am Institut für Virologie in Marburg und am Zentrum für Biologische Sicherheit (ZBS5) am Robert Koch-Institut in Berlin. Sie standen mir jederzeit mit Ratschlägen in fachlichen Fragen, als auch ganz besonders als seelische Unterstützung zur Seite: Dirk Becker, Dr. Olga Dolnik, Dr. Allison Groseth, Dr. Bettina Hartlieb, Astrid Herwig, Dr. Thomas Hoenen, Stephanie Jung, Dr. Larissa Kolesnikova, Katharina Kowalski, Dr. Verena Krähling, Angelika Lander, Dr. Peggy Möller, Gordian Schudt, Dr. Hosam Shams-Eldin, Lea Stevermann, Ulla Thiesen, Svenja Wolff, Florian Zielecki, allen Praktikantinnen und Praktikanten...

und natürlich meine „Mitdoktoranden“ und Frontforscher Nadine Biedenkopf, Dr. Daniel Voß und Dr. Jörg Wenigenrath!

Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Robert Koch-Instituts in Berlin, sowie des Instituts für Virologie in Marburg bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die jederzeit erwiesene Hilfsbereitschaft.

Vielen lieben Dank an meine Eltern, Geschwister und Freunde, die mir immer zur Seite gestanden, mich unterstützt und somit natürlich auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danke, Danke, Danke!