

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie
Institut für Virologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Die Rolle der Homooligomerisierung des Polymerasekofaktors VP35 im Vermehrungszyklus des Marburg-Virus



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

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Peggy Möller
aus Ilmenau

Marburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 03. Juli 2006.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Herr Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk

1. Korreferent: Frau Prof. Dr. Monika Löffler

2. Korreferent: Herr Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Taxonomie und Epidemiologie der Filoviren	1
1.2 Klinik und Pathogenese der Marburg-Virus-Infektion	4
1.3 Morphologie des Marburg-Virus	6
1.4 Genomaufbau des Marburg-Virus	7
1.5 Proteine des Marburg-Virus	8
1.6 Replikationszyklus des Marburg-Virus	11
1.7 Interaktionen der Nukleokapsidproteine des Marburg-Virus	12
1.8 Coiled-Coil-Strukturen	13
1.9 Fragestellung	13
2 Material	15
2.1 Geräte	15
2.2 Chemikalien	16
2.3 Verbrauchsmaterialien	18
2.4 Kits	19
2.5 Puffer und Lösungen	20
2.5.1 Puffer	20
2.5.2 Lösungen	24
2.6 Wachstumsmedien	24
2.6.1 Wachstumsmedien für Bakterien	24
2.6.2 Wachstumsmedien für Säugerzellen	25
2.7 Nukleinsäuren und Nukleotide	25
2.7.1 Nukleinsäuren	25
2.7.2 Nukleotide	26
2.7.3 DNA-Oligonukleotide	26
2.8 Vektoren und rekombinante Plasmide	27

2.9	Proteine	29
2.9.1	Enzyme	29
2.9.2	Antikörper und Peptide	29
2.9.3	Proteinmarker	29
2.10	Radioaktiv markierte Substanzen	30
2.11	Zellen und Viren	30
2.11.1	Prokaryotische Zellen	30
2.11.2	Eukaryotische Zellen	30
2.11.3	Viren	30
3	Methoden	31
3.1	Molekularbiologische Methoden	31
3.1.1	Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Ketten-Reaktion	31
3.1.2	Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA	33
3.1.3	Anlagerung komplementärer Oligonukleotide	34
3.1.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	34
3.1.4.1	Analytische DNA-Agarosegele	35
3.1.4.2	Präparative DNA-Agarosegele	35
3.1.4.3	Formaldehyd-RNA-Agarosegele	35
3.1.5	Isolierung von Nukleinsäuren	36
3.1.5.1	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	36
3.1.5.2	Isolierung replizierter RNA aus transfizierten Huh-T7-Zellen	36
3.1.6	Verdau von Nukleinsäuren	36
3.1.6.1	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukelasen	36
3.1.6.2	Verdau von RNA mit Mikrokokken-Nuklease	37
3.1.7	Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA	37
3.1.8	Reinigung von Nukleinsäuren	38
3.1.8.1	Reinigung von DNA-Fragmenten	38

3.1.8.2	Ethanolfällung von DNA-Fragmenten	38
3.1.8.3	Reinigung und Fällung von RNA-Fragmenten	39
3.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren	39
3.1.10	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	40
3.1.11	Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterien	40
3.1.12	Plasmidpräparation kleinen Maßstabes	40
3.1.13	Plasmidpräparation großen Maßstabes	40
3.1.14	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren	41
3.1.15	Sequenzanalyse mit dem Kapillarsequenzier MegaBASE™ 500	41
3.2.	Zellbiologische Methoden	42
3.2.1	Kultivierung von Vero-, Huh7- und Huh-T7-Zellen	42
3.2.2	Transfektion von Huh7-Zellen mit Lipofectamine Plus™	42
3.2.3	Marburg-Virus-spezifisches Replikations- und Transkriptionssystem	43
3.2.4	Anzucht und Vermehrung von Marburg-Virus	45
3.3	Biochemische und immunologische Methoden	45
3.3.1	Radioaktive Markierung und Lyse von Huh7-Zellen	45
3.3.2	Vernetzung von Proteinen	46
3.3.3	CAT-Reportergenassay	46
3.3.4	Elektrotransfer von RNA (Northern Blot)	47
3.3.5	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)	48
3.3.6	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	49
3.3.7	In vitro Translation	50
3.3.8	Immunpräzipitation	50
3.3.9	Elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung von Proteinen	52
3.3.9.1	SDS-PAGE	52
3.3.9.2	Autoradiographie und Bio-Imager-Analyse	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Homooligomerisierung des Marburg-Virus VP35	54

4.1.1	Homooligomerisierung des Marburg-Virus VP35 in Huh7-Zellen	54
4.1.2	Lokalisation der Homooligomerisierungsdomäne des VP35	55
4.1.2.1	Einfluss des N-Terminus auf die Homooligomerisierung des VP35	56
4.1.3	Charakterisierung der Homooligomerisierungsdomäne des VP35	57
4.1.3.1	In silico-Mutationsanalysen des Coiled-Coil-Motivs des VP35	57
4.1.3.2	Interaktionsstudien der VP35-Substitutionsmutanten	58
4.1.3.3	Übertragung der Coiled-Coil-Domäne des Marburg-Virus VP35 auf ein monomeres Reporterprotein	59
4.2	Funktionelle Charakterisierung der Homooligomerisierung des Marburg-Virus VP35	62
4.2.1	Funktionelle Untersuchungen der VP35-Substitutionsmutanten	62
4.2.1.1	Titration der VP35-Substitutionsmutanten	62
4.2.1.2	Analyse der Replikations- und Transkriptionsaktivität der VP35-Substitutionsmutanten	64
4.3.	Interaktion der Marburg-Virus Nukleokapsidproteine VP35 und L	66
4.3.1	Lokalisation der L-Interaktionsdomäne auf dem VP35	66
4.3.1.1	Einfluss des N-Terminus des VP35 auf die Interaktion mit dem L-Protein	67
4.3.2	Einfluss der Homooligomerisierung des VP35 auf die Komplexbildung mit dem L-Protein	67
4.4	Hemmung der Marburg-Virus-Transkription durch gemischte VP35-Oligomere	69
4.5	Interaktion der Marburg-Virus Nukleokapsidproteine VP35 und NP	72
4.5.1	Einfluss der Homooligomerisierung des VP35 auf die Interaktion mit NP	72
4.5.1.1	Immunfluoreszenzanalyse der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutanten nach Einzel- und Koexpression mit dem NP	72
4.5.1.2	Immunpräzipitationsanalyse des VP35 _{Flag} und der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutanten L90/104A _{Flag} nach Koexpression mit dem NP	74

4.5.2	Lokalisation der NP-Interaktionsdomäne auf dem VP35	76
4.5.2.1	Einfluss des N-Terminus des VP35 auf die Struktur der vom NP-induzierten intrazytoplasmatischen Einschlusskörper	77
4.5.3	Einfluss der Coiled-Coil-Struktur des VP35 auf die Ausbildung der vom NP-induzierten intrazytoplasmatischen Einschlusskörper	78
4.5.3.1	Koimmunfluoreszenzanalyse der NP-Mutante NP Δ C1 nach Koexpression mit dem VP35 _{Flag}	79
4.5.3.2	Koimmunfluoreszenzanalyse der NP-Mutante NP Δ C1 nach Koexpression mit der VP35-Substitutionsmutante L90/104A _{Flag}	80
4.6	Stöchiometrie der Marburg-Virus VP35-Homooligomere	82
4.6.1	Stöchiometrie des VP35 im Marburg-Virus-Partikel	82
4.6.2	Stöchiometrie des VP35 nach rekombinanter Expression	82
5	Diskussion	86
6	Zusammenfassung	96
7	Literaturverzeichnis	97
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	108
9	Abkürzungsverzeichnis	111
10	Veröffentlichungen, Vorträge und Posterpräsentationen	113
11	Curriculum Vitae	117
12	Verzeichnis der akademischen Lehrer	118
13	Danksagung	119
14	Ehrenwörtliche Erklärung	120

1 Einleitung

1.1 Taxonomie und Epidemiologie der Filoviren

Das Marburg-Virus (MARV) bildet gemeinsam mit dem Ebola-Virus (EBOV) die Familie der *Filoviridae*. Diese hochpathogenen Erreger rufen sowohl beim Menschen als auch bei Primaten schwere fieberhafte, hämorrhagische Erkrankungen hervor, die mit hohen Letalitätsraten einhergehen. Aufgrund ähnlicher serologischer, biochemischer und molekularer Eigenschaften und der fadenförmigen Gestalt wurden MARV und EBOV zur Familie der *Filoviridae*¹ zusammengefasst (Kiley et al., 1982).

Die *Filoviridae* gehören mit den *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* und *Bornaviridae* zur Ordnung der Mononegavirales (Abb. 1). Sequenzanalysen haben gezeigt, dass die *Filoviridae* den *Paramyxoviridae* phylogenetisch am nächsten stehen (Mühlberger et al., 1992; Sanchez et al., 1992).

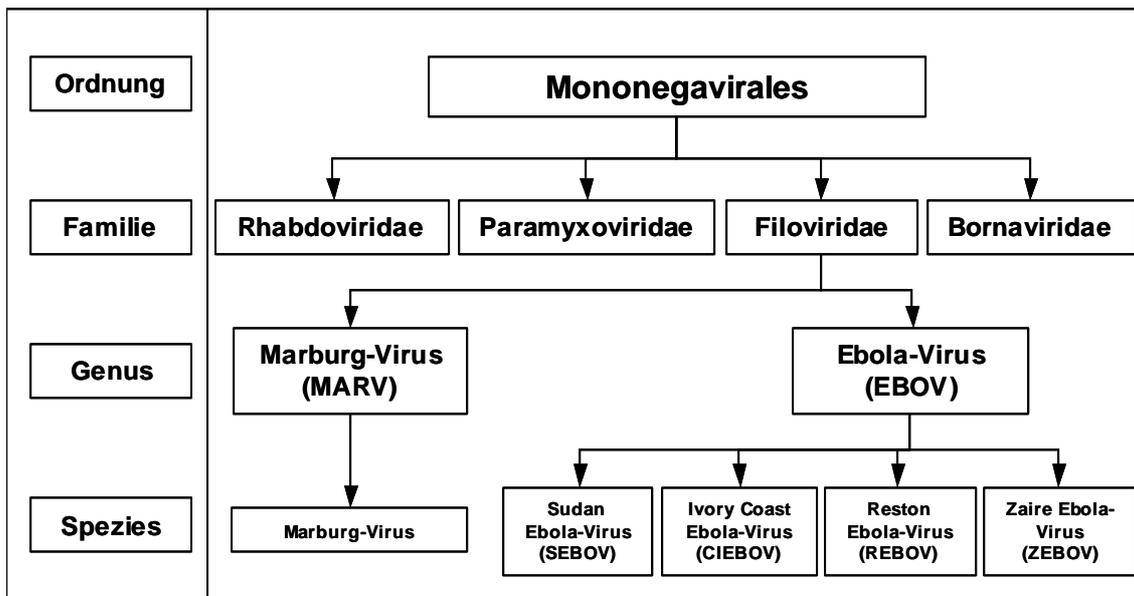


Abbildung 1: Taxonomie der Filoviren.

In Anlehnung an van Regenmortel et al. (2000), ICTVdB Management (2003)

Ausbrüche von Filoviren wurden erstmals 1967 in Marburg, Frankfurt am Main und Belgrad beobachtet (Siegert et al., 1967). Bei den erkrankten Personen handelte es sich hauptsächlich um Laborarbeiter und Tierpfleger, die Kontakt mit Blut oder Organen von aus Uganda importierten grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) hatten. Insgesamt wurden 32 Krankheitsfälle registriert. Sieben von 26 primärinfizierten Personen verstarben, wobei die 6 aufgetretenen Sekundärinfektionen durch einen wesentlich milderen Krankheitsverlauf gekennzeichnet waren (Martini et al., 1968a, Slenczka 1999). Das Virus wurde nach der Stadt Marburg benannt, da es hier isoliert

¹ lat.: filum = Faden

und morphologisch charakterisiert wurde (Siegert et al., 1968). Tabelle 1 zeigt alle seit 1967 bekannten Filovirusinfektionen. Nach 1967 wurden zunächst vereinzelte MARV-Fälle in Zimbabwe, Südafrika (1975) und Kenia (1980, 1987) dokumentiert (Gear et al., 1975; Smith et al., 1982; Johnson et al., 1996).

Virus	Genus	Jahr	Ort	humane Krankheitsfälle (Todesfälle)	Isolat
Marburg		1967	Deutschland / Jugoslawien	32 (7)	Rataycak / Popp
		1975	Zimbabwe	3 (1)	Ozolin
		1980	Kenia	2 (1)	Musoke
		1987	Kenia	1 (1)	Ravn
		1998-2000	Republik Kongo	154 (128)	?
		2004-2005	Republik Angola	374 (329)	Angola
Ebola	Sudan	1976	Sudan	284 (141)	Boniface
	Zaire	1976	Zaire	318 (280)	Mayinga
	Zaire	1977	Zaire	1 (1)	Bonduni
	Sudan	1979	Sudan	34 (22)	Maleo
	Reston	1989	USA	4 (0)	Philippines
	Reston	1992	Philippinen	0	Philippines
	Reston	1992	Italien	0	Siena
	Zaire	1994	Gabun	49 (29)	Gabon
	Ivory Coast	1994	Elfenbeinküste	1 (0)	Cote d'Ivoire
	Zaire	1995	Zaire	315 (243)	Kikwit
	Zaire	1996	Gabun	31 (21)	Gabon
	Zaire	1996	Gabun	60 (45)	Gabon
	Reston	1996	USA	0	Pennsylvania
	Sudan	2000-2001	Uganda	425 (224)	?
	Zaire	2001-2	Gabun/Kongo	122 (110)	?
	Zaire	2003	Republik Kongo	143 (128)	?
	Zaire	2003-2004	Republik Kongo	35 (29)	?
	Sudan	2004	Süd-Sudan	25 (6)	?
	Zaire	2005	Republik Kongo	12 (9)	?

Tabelle 1: Ausbrüche von Filovirusinfektionen.

In Anlehnung an CDC, 1996; Feldmann et al., 1996a; WHO 1978a, 1978b, 1992, 1996, 1997, 1999, 2000, 2001, 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 2005a, 2005b.

Seit Ende 1998 wurde aus Durba in der Demokratischen Republik Kongo (ehemals Zaire) wiederholt von durch MARV verursachten hämorrhagischen Fiebererkrankungen berichtet (Bertherat et al., 1999; WHO, 1999). Jedoch schien die Erkrankung, die in der Bevölkerung unter dem Namen Durba disease bekannt ist, schon längere Zeit in dieser Region endemisch zu sein, wobei die dokumentierten Fälle auf den Aufenthalt der infizierten Personen in einer nahe gelegenen Goldmine zurückzuführen waren. Die bisher größte durch das MARV verursachte Epidemie mit einer Mortalitätsrate von 88 Prozent ereignete sich von November 2004 bis Juli 2005 in der Provinz Uige der Republik Angola, wobei von 374 infizierten Menschen 329 verstarben (WHO, 2005a).

Das EBOV wurde erstmals 1976 anlässlich zweier annähernd zeitgleicher, aber voneinander unabhängiger Ausbrüche fieberhafter Erkrankungen in Zaire und im Sudan beschrieben. Das Virus wurde nach einem Fluss, der sich in der Nähe der Epidemiegebiete befindet, benannt (Johnson et al., 1977). Die isolierten Erreger konnten in zwei unterschiedliche Subtypen (Zaire und Sudan) eingeteilt werden. Mehr als 600 Menschen wurden infiziert und die Mortalitätsraten lagen in Zaire bei 88 Prozent und im Sudan bei 53 Prozent. Ähnlich dem MARV traten nach 1976 eher kleinere Episoden von EBOV-Infektionen auf. Anfang 1995 kam es in Kikwit (Zaire) durch den EBOV-Subtyp Zaire zu einer bedeutenden Epidemie von hämorrhagischen Fiebern, bei der von 315 infizierten Menschen 244 starben (CDC, 1995; Khan et al., 1999; Sanchez et al., 1995). Im Jahre 1989 erkrankten in Reston (Virginia/USA) eine Reihe von Cynomolgus-Affen (*Macaca fascicularis*), die von den Philippinen in die USA importiert worden waren, an einem hämorrhagischen Fieber. Im Zusammenhang mit dieser Epidemie wurde der EBOV-Subtyp Reston entdeckt, der für Affen hochpathogen ist (Jahrling et al., 1990).

1994 erkrankte eine Wissenschaftlerin bei der Untersuchung eines toten Schimpansen an einem schweren hämorrhagischen Fieber. Das als Krankheitserreger isolierte Virus wurde als ein weiterer EBOV-Subtyp Ivory Coast klassifiziert (Formenty et al., 1999; Le Guenno et al., 1999). Ende 2000 ereignete sich ein EBOV-Ausbruch im Gulu-Distrikt im Norden Ugandas. Diese Epidemie wurde erstmals seit 1979 wieder durch den EBOV-Subtyp Sudan verursacht und forderte von 425 infizierten Menschen 224 Todesopfer (CDC, 2001).

Das natürliche Reservoir von Filoviren ist trotz ausgedehnter Untersuchungen noch nicht identifiziert. Bei der Verbreitung filoviraler Infektionen spielen Affen als Zwischenwirte eine wichtige Rolle, können aber aufgrund der für sie außerordentlich hohen Pathogenität der Viren als natürliche Wirte ausgeschlossen werden. Experimentell infizierte Affen verstarben ausnahmslos an der Infektion (Fisher-Hoch and McCormick, 1999; Fisher-Hoch et al., 1992; Ryabchikova et al., 1999; Simpson,

1977). Fledermäuse werden als mögliche Kandidaten in Betracht gezogen, da sie das Virus nach Infektion mit dem Kot ausscheiden, jedoch keine Anzeichen einer Erkrankung aufweisen (Swanepoel et al., 1996). Asymptomatische EBOV-Infektionen konnten bei drei verschiedenen Fledermausspezies nachgewiesen werden, die möglicherweise als Reservoir in Frage kommen, da diese von der in Endemiegebieten lebenden Bevölkerung verzehrt werden (Leroy et al., 2005). Des Weiteren können Arthropoden nicht ausgeschlossen werden, da gezeigt werden konnte, dass MARV in Moskitos der Spezies *Aedes aegypti* mehrere Wochen persistieren kann (Kunz et al., 1968; Monath et al., 1999). Allerdings scheint dieser Übertragungsweg auf Grund des eher seltenen Auftretens filoviraler Infektionen als unwahrscheinlich.

Eine Vielzahl von serologischen Studien belegte das endemische Vorkommen von Filoviren im zentralafrikanischen Raum. Ausgangspunkt der meisten bekannt gewordenen Ausbrüche waren die Länder des sogenannten Ebola-Gürtels (Sudan, Zaire, Kenia und Uganda), die das Zentrum filoviraler Aktivität zu sein scheinen. Etwa 10 Prozent der untersuchten Personen hatten Filovirus-spezifische Antikörper, was darauf hindeutet, dass Filovirusinfektionen ohne klinische Symptome auftreten und somit unbemerkt bleiben könnten (Slenczka et al., 1984; Hughes et al., 1986). Untersuchungen zum EBOV-Ausbruch 1996 in Gabun haben gezeigt, dass tatsächlich Erkrankungen mit asymptomatischen Verläufen vorkommen können (Baize et al., 1999; Leroy et al., 2000). In den USA, Deutschland und auf den Philippinen konnten Antikörper bei Menschen, die in keinem Zusammenhang mit filoviralen Infektionen standen, nachgewiesen werden. Entweder kursieren weltweit Filoviren geringer Pathogenität oder es handelt sich um serologische Kreuzreaktionen mit anderen Vertretern der Mononegavirales (Becker et al., 1992).

Filoviren gelangen über kleine Haut- und Schleimhautläsionen in den Körper und werden durch Kontakt mit infizierten Personen und deren Ausscheidungsprodukten wie Blut, Speichel und Sperma von Mensch zu Mensch übertragen (Simpson et al., 1977). Für das MARV konnte experimentell eine Übertragung durch Aerosole gezeigt werden, die allerdings unter natürlichen Bedingungen als unwahrscheinlich gilt (Pokhodiaev et al., 1991). Das Ausmaß der 1989 durch den EBOV-Subtyp Reston verursachten Epidemie bei Affen ist möglicherweise zum Teil auf Tröpfchen- und Aerosolinfektionen zurückzuführen. Eine aerogene Infektionsübertragung wurde beim Menschen jedoch nicht nachgewiesen (Jaax et al., 1995; Johnson et al., 1995).

1.2 Klinik und Pathogenese der Marburg-Virus-Infektion

MARV verursacht beim Menschen und bei nichtmenschlichen Primaten ein schweres hämorrhagisches Fieber. Die Erkrankung beginnt beim Menschen abrupt nach einer Inkubationszeit von fünf bis neun Tagen mit schwerem Krankheitsgefühl, hohem

Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen. Im weiteren Verlauf treten Übelkeit, Erbrechen, abdominale Schmerzen sowie wässrige, nichtblutige Durchfälle auf (Martini et al., 1968a). Zum Teil kommt es schon im Anfangsstadium zu neurologischen Begleitsymptomen, wie Verwirrheitszuständen und Bewusstseinstörungen bis hin zur Bewusstlosigkeit. Am Ende der ersten Krankheitswoche entwickelt sich ein charakteristisches makulopapulöses Exanthem, welches im weiteren Krankheitsverlauf eine Hautschuppung zur Folge hat. Ferner werden Lymphknotenschwellungen und Konjunktividen beobachtet. Charakteristisch für diese Infektionskrankheit ist eine extreme Thrombopenie, die symptomatisch mit hämorrhagischen Diathesen, Blutungen des Zahnfleisches, der Nase, des Gaumens und des gesamten Gastrointestinaltraktes einhergeht. Der Tod tritt ein bis zwei Wochen nach Krankheitsbeginn ein und ist durch schwere Hämorrhagien, Verbrauchskoagulopathie, hypovolämischen Schock und Multiorganversagen gekennzeichnet. Die Letalitätsrate der Epidemie von 1967 betrug 25 Prozent und reichte bei dem erst kürzlich beendeten Ausbruch in der Republik Angola bis zu 88 Prozent (WHO, 2005a). Da in den Entwicklungsländern eine intensivmedizinische Betreuung nicht möglich ist, liegt hier die Letalitätsrate wesentlich höher. Bei Überlebenden beträgt die Dauer der Erkrankung bei unkompliziertem Verlauf zwischen 12 und 22 Tagen (Martini et al., 1968a; Stille and Böhme, 1971). Die Rekonvaleszenzzeit dauert fünf Wochen und länger, und ist durch Erschöpfung, Gewichtsverlust und Amnesie bezüglich der akuten Krankheitsphase gekennzeichnet. Das MARV kann bis zu drei Monaten nach der Infektion in der Samenflüssigkeit nachgewiesen werden (Martini et al., 1968b).

Die Zellen des monozytären phagozytischen Systems (MPS) stellen vermutlich die primären Zellen der Virusinfektion dar. Die Ausbreitung im infizierten Organismus erfolgt durch infizierte Monozyten und Makrophagen über die Lymphe und das Blutgefäßsystem (Feldmann et al., 1996b; Ryabchikova et al., 1996; Ströher et al., 2001). Histopathologisch sind ausgeprägte Organnekrosen charakteristisch. Im frühen Stadium der Infektion sind vor allem Lymphknoten, Milz und Leber betroffen (Feldmann, et al., 1996b; Peters et al., 1996). Später weitet sich der Befall auf Nieren und Lunge aus (Martini et al., 1971; Rippey et al., 1984; Zaki and Peters, 1997). Die Ursache für das Auftreten von Hämorrhagien und des Schocksyndroms scheint die vaskuläre Instabilität des Endothels zu sein. Infizierte Makrophagen schütten unter anderem vermehrt den Tumornekrosefaktor α (TNF α), einen Mediator der Schocksymptomatik, aus (Ströher et al., 2001). Die Freisetzung der Zytokine führt vermutlich zur Erhöhung der Permeabilität der Endothelzellen, ohne dass diese direkt infiziert sein müssen (Schnittler et al., 1993; Strieter et al., 1993; Feldmann et al., 1996b). Ablagerungen von Fibrin und Fibrinspaltprodukten in den Nierentubuli deuten auf eine

generelle Störung der Blutgerinnung hin (Martini et al., 1971). Eine Verzögerung bzw. das Ausbleiben der humoralen Immunantwort auf eine MARV-Infektion ist möglicherweise auf die massive Infektion der Zellen des MPS sowie eine Lymphozytendepletion zurückzuführen (Ksiazek et al., 1999).

Eine spezifische Therapie gegen eine MARV-Infektion existiert derzeit nicht. Die Behandlung erfolgt, sofern möglich, symptombezogen, wobei eine intensivmedizinische Therapie des hämorrhagischen Schocks und der Verbrauchskoagulopathie im Vordergrund stehen. Der Einsatz von Rekonvaleszentenblut oder –plasma im Frühstadium schien eine positive therapeutische Wirkung auf den Krankheitsverlauf zu haben (Mupapa et al., 1999). Die Verabreichung von Inhibitoren der S-Adenosylhomocystein-Hydrolase führte zu einem therapeutischen Effekt bei EBOV-Infektionen im Tierversuch (Bray et al., 2000; Bray et al., 2002; Huggins et al., 1999). Ferner zeigten EBOV-infizierte Makaken eine gute Reaktion auf die Gabe von einem rekombinanten Inhibitor des Gewebefaktors VIIa (rNAPc2). Die Anzahl der überlebenden Tiere stieg von null auf 33 Prozent (Geisbert et al., 2003). Eine Impfung ist zurzeit nicht verfügbar, allerdings konnten sowohl für das MARV als auch für das EBOV erste Erfolge mit neu entwickelten Impfstoffen im Tiermodell erzielt werden. Die Verwendung von DNA-Vakzinen, rekombinanten Adenoviren oder Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) konnte im Tiermodell einen Schutz vor MARV- und EBOV-Infektionen erzeugen (Baize et al., 2001; Sullivan et al., 2000; Swenson et al., 2004; Warfield et al., 2004). Ein viel versprechender Ansatz war die Anwendung einer rekombinanten attenuierten Vakzine, deren Herstellung auf der Grundlage von replikationsfähigen vesikulären Stomatitis-Virus-Vektoren, die das Glykoprotein des MARV oder EBOV exprimieren, beruht (Garbutt et al., 2004). Eine einzelne intramuskuläre Injektion löste in Affen (*Macaca fascicularis*) eine Immunantwort aus und hatte einen vollständigen Schutz bei einer Infektion mit MARV oder EBOV zur Folge (Jones et al., 2005).

1.3 Morphologie des Marburg-Virus

Die Virionen des MARV sind umhüllte filamentöse Partikel mit einer extrem pleomorphen Gestalt. Sie treten sowohl in langgestreckten und verzweigten als auch in zirkulären und gebogenen Formen auf. Die durchschnittliche Länge des MARV beträgt ein Mikrometer, die im Gegensatz zu einem einheitlichen Durchmesser von 80 nm stark variiert (Feldmann and Kiley, 1999; Feldmann et al., 1993). In Abbildung 2 sind der schematische Aufbau (A) und eine elektronenmikroskopische Aufnahme (B) eines MARV-Partikels dargestellt. Die Virionen sind aus sieben Strukturproteinen aufgebaut. Das einzige viruskodierte Oberflächenprotein GP ist als Homotrimer in die Hüllmembran, die von der Plasmamembran der Wirtszelle abstammt, inseriert (Feldmann et al., 1991). Im Inneren des Virus befindet sich der helikale Nukleokapsid-

komplex, der aus den Nukleokapsidproteinen NP, VP35, VP30 und L sowie dem viralen RNA-Genom zusammengesetzt ist. Die Verbindung des Nukleokapsidkomplexes mit der Hüllmembran wird über die Matrixproteine VP40 und VP24 hergestellt (Bamberg et al., 2005; Becker et al., 1998; Kiley et al., 1988; Kolesnikova et al., 2002).

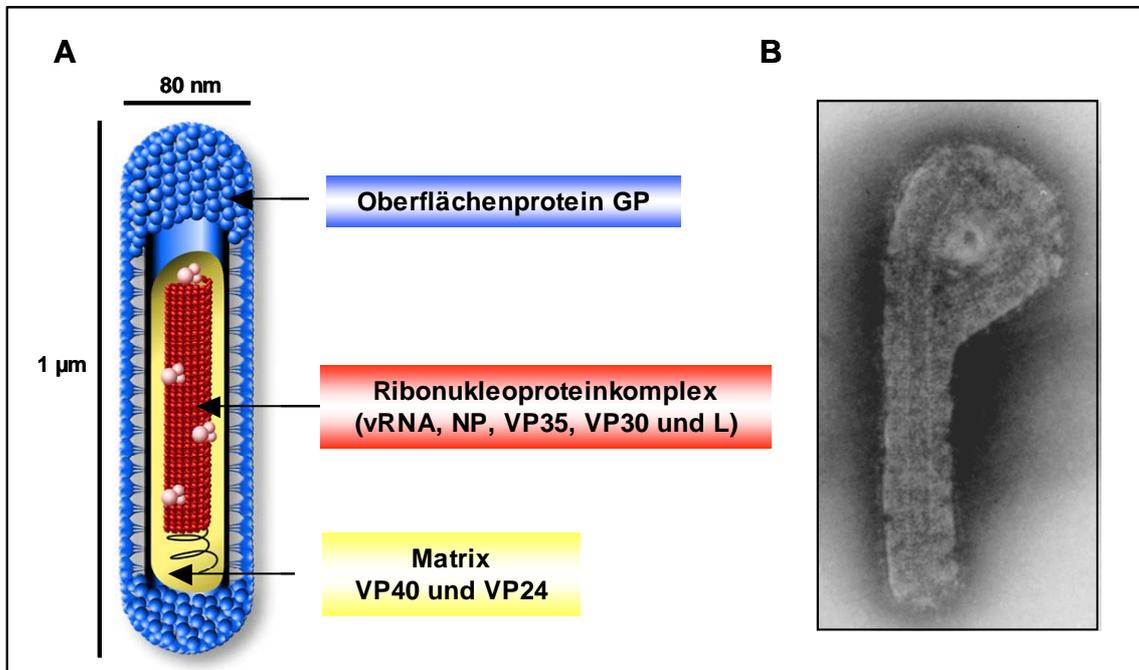


Abbildung 2: Struktur des Marburg-Virus.

A: Schematische Darstellung eines MARV-Partikels. **B:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des MARV, Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure. Vergrößerung: 50000fach. Zur Verfügung gestellt von Dr. Larissa Kolesnikova

1.4 Genomaufbau des Marburg-Virus

Das MARV besitzt ein einzelsträngiges, nicht segmentiertes RNA-Genom negativer Polarität mit einer Länge von 19,1 Kilobasen. Die genomische RNA ist nicht infektiös und kodiert für sieben Strukturproteine (Abb 3.). An den Enden des Genoms befinden sich der 3'-Leader und der 5'-Trailer. Dabei handelt es sich um nicht transkribierte Sequenzen, deren Enden zueinander komplementär sind und vermutlich stabile Sekundärstrukturen ausbilden können. In diesen Bereichen des Genoms befinden sich die Signale für den Replikationsstart und für die Verpackung der RNA (Mavrakis et al., 2002; Mühlberger et al., 1998). Die offenen Leserahmen (ORF) der linear angeordneten Gene sind von langen, nicht kodierenden, hochkonservierten Sequenzen flankiert, die nicht transkribiert werden und die Signale für den Transkriptionsstart und -stopp enthalten (Mühlberger et al., 1996; 1998; Weik et al., 2005). Die Gene sind von kurzen nicht transkribierten, intergenischen Regionen separiert oder überlappen wie zwischen dem VP30 und dem VP24 (Feldmann et al., 1992).

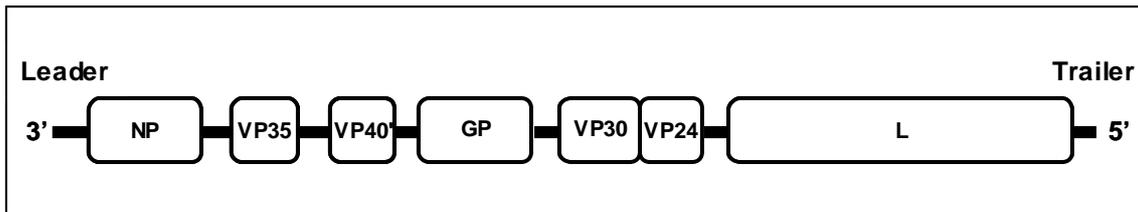


Abbildung 3: Genomstruktur des Marburg-Virus.

Ausgehend vom 3'-Leader werden auf der genomischen RNA die Proteine NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24 und L kodiert, gefolgt von dem 5'-Trailer. Zwischen den einzelnen Genen befinden sich nicht transkribierte intergenische Sequenzen, die zwischen VP30 und VP24 überlappen.

1.5 Proteine des Marburg-Virus

NP Das mengenmäßig am stärksten vertretene Nukleoprotein (NP) ist die Hauptkomponente des Nukleokapsidkomplexes. Es ist mit einer Länge von 695 Aminosäuren das Produkt des ersten Gens. Das NP enkapsidiert die virale RNA und spielt eine zentrale Rolle bei der Virusreplikation (Becker et al., 1998; Kolesnikova et al., 2000; Mavrakis et al., 2002). Es besteht aus einem hydrophoben N-Terminus und einer hydrophilen C-terminalen Domäne. Der N-Terminus zeigt Sequenzhomologien zu den Nukleoproteinen der anderen Vertreter der Mononegavirales, wobei der saure C-Terminus hochvariabel ist (Longhi et al., 2003; Sanchez et al., 1992). Das NP zeigt an Serin- und Threoninresten der C-terminalen Domäne eine starke Phosphorylierung, die entscheidend für die Regulation der Funktion des NP während der Transkription ist (Di Carlo, 2004; Löffering et al., 1999). In infizierten Zellen liegt das NP in einer phosphorylierten (94 kDa) und in einer nicht phosphorylierten (92 kDa) Form vor, wobei nur die phosphorylierte Form in die Virionen eingebaut wird (Becker et al., 1994).

VP35 Das VP35 (36 kDa) ist 329 Aminosäuren lang und wird durch das zweite Gen des MARV-Genoms kodiert. Es fungiert als Kofaktor der RNA-abhängigen RNA-Polymerase und spielt somit eine essentielle Rolle bei der Transkription und Replikation der viralen RNA. Trotz seiner vergleichsweise schwachen Phosphorylierung bildet das VP35 das funktionelle Analogon zu den Phospho(P)-Proteinen der *Rhabdo-* und *Paramyxoviridae* (Mühlberger et al., 1998; 1999). Des Weiteren fungiert das VP35 als Typ I Interferonantagonist und ist somit in der Lage, die unspezifischen zellulären Abwehrmechanismen gegen eine Virusinfektion abzuschwächen (Basler et al., 2000; 2003; persönliche Mitteilung).

VP40 Das Matrixprotein VP40 (38 kDa) besteht aus 303 Aminosäuren und ist neben dem NP das mengenmäßig am stärksten vertretene Protein. Es befindet sich im Virion zwischen dem Nukleokapsid und der Virushülle (Becker et al., 1998; Elliot et al., 1985; Kolesnikova et al., 2002). Das VP40 bindet sehr effizient an zelluläre Membranen und

zeigt die Eigenschaften eines peripheren Membranproteins (Kolesnikova et al., 2002; Ruigrok et al., 2000). Im Gegensatz dazu scheint nur ein geringer Anteil des VP40 mit den Nukleokapsiden zu assoziieren (Geisbert et al., 1995; Kolesnikova et al., 2002). Mittels Röntgenkristallographie konnte für die Struktur des EBOV-VP40 gezeigt werden, dass der C-Terminus über hydrophobe Bereiche verfügt, die für die Membranbindung notwendig sind (Dessen et al., 2000a; 2000b). Ultrastruktur- und Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass das MARV VP40 mit internen Membranen des späten endosomalen Kompartiments (multivesicular bodies, MVB) interagiert (Kolesnikova et al., 2002; 2004). Des Weiteren ist das VP40 nach solitärer Expression in der Lage, seine eigene Freisetzung in Form von Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) zu induzieren (Kolesnikova et al., 2004; Swenson et al., 2004; Timmins et al., 2001). Für das VP40 des EBOV konnte gezeigt werden, dass ein prolinreiches Motiv, eine so genannte Late-Domäne, innerhalb des N-Terminus für diesen Prozess essentiell ist. Das MARV VP40 besitzt ebenfalls ein Motiv für eine Late-Domäne im N-Terminus, dessen Funktion allerdings noch nicht geklärt ist. Möglicherweise dienen diese Late-Domänen zur Interaktion mit zellulären Proteinen, wie Tsg101 oder der Ubiquitin-Ligase Nedd4, die bei der Sortierung von Proteinen sowie der Abschnürung von Vesikeln in die MBV eine Rolle spielen (Harty et al., 1999; Licata et al., 2003; Martin-Serrano et al., 2004; Timmins et al., 2003). Diese Eigenschaften sowie die Genomlokalisierung weisen darauf hin, dass das VP40 das Äquivalent zu den Matrix-Proteinen der anderen Vertreter der Mononegavirales ist.

GP Das virale Glykoprotein GP (220 kDa) ist als einziges Oberflächenprotein in Form eines Homotrimers in die Virushülle des MARV eingelagert (Feldmann et al., 1991). Es hat eine Länge von 695 Aminosäuren und gehört zur Klasse der Typ I Membranproteine (Will et al., 1993). Das GP gliedert sich in eine N-terminale luminal Domäne (643 AS), eine Transmembrandomäne (29 AS) und eine C-terminal gelegene zytoplasmatische Domäne (11 AS). Während das EBOV-GP durch einen kotranskriptionalen RNA-Editing-Mechanismus exprimiert wird, wird das MARV-GP von einem durchgängigen Leserahmen kodiert (Sanchez et al., 1996; Volchkov et al., 1995). Der N-Terminus fungiert als Signalpeptid und wird nach Expression und Translokation in das endoplasmatische Retikulum abgespalten (Will et al., 1993). Neben einer starken N- und O-Glykosylierung wird das GP durch Acylierung und Phosphorylierung posttranslational modifiziert (Feldmann et al., 1991; Funke et al., 1995; Geyer et al., 1992; Sängler et al., 2002). Eine weitere Modifikation des GP ist die proteolytische Aktivierung durch die zelluläre Prohormonkonvertase Furin im trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Furin spaltet das 220 kDa große GP in zwei über Disulfidbrücken miteinander

verbundene Untereinheiten GP₁ (170 kDa) und GP₂ (40 kDa), wobei das GP₂ den Membrananker trägt (Volchkov et al., 2000a).

VP30 Das VP30 (33 kDa) ist ein stark phosphoryliertes Protein und gehört neben dem NP, VP35 und dem L zum Nukleokapsidkomplex (Becker et al., 1998; Mühlberger et al., 1998; Modrof et al., 2001). Innerhalb der Ordnung der Mononegavirales besitzen nur noch die Pneumovirinae ein viertes Nukleokapsidprotein. Allerdings wird dieses M2-Protein aufgrund einer anderen Position seines Gens nicht als Homolog zum VP30 betrachtet (Collins et al., 1996; Garcia et al., 1993; Huang et al., 1985). Die Funktionen des MARV VP30 sind bislang nicht bekannt. Obwohl es für die Replikation und Transkription in einem artifizialen Minigenomsystem nicht notwendig ist, scheint das MARV VP30 einen Einfluss auf diese Prozesse zu haben. Das Abschalten des MARV VP30 mittels RNA Interferenz hatte eine Reduktion der Proteinlevel aller anderen viralen Proteine zur Folge (Fowler et al., 2005). Im Falle des EBOV fungiert das VP30 als Transkriptionsaktivator und ist in die Strukturgebung des Nukleokapsidkomplexes involviert (Modrof et al., 2003; Mühlberger et al., 1999; Weik et al., 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass das EBOV VP30 ein Zinkfingermotiv besitzt, dessen Intaktheit für die transkriptionsaktivierende Funktion des Proteins notwendig ist (Modrof et al., 2003). Die Phosphorylierung des VP30 stellt ein wichtiges regulatorisches Element in Bezug auf die Wirkungsweise des Proteins während der Vermehrung des EBOV dar (Modrof et al., 2002, 2003).

VP24 Das VP24 (24 kDa) ist mit einer Länge von 253 Aminosäuren als weiteres Matrixprotein zwischen dem Nukleokapsidkomplex und der Virushülle lokalisiert (Elliott et al., 1985). Da kein anderer Vertreter dieses Protein besitzt, stellt das VP24 innerhalb der Ordnung der Mononegavirales eine Besonderheit dar. Das VP24 ist in der Lage, mit der zytoplasmatischen Domäne des GP und negativ geladenen Membranen zu interagieren (Sänger et al., 1998; Bamberg, 2000). Es wird in die vom VP40 gebildeten Virus-ähnlichen Partikel (VLPs) rekrutiert und scheint die Inkorporation des GP in diese VLPs zu beeinflussen. Ferner scheint das VP24 des MARV als auch des EBOV für den Aufbau der Nukleokapside eine Bedeutung zu haben. (Bamberg et al., 2005; Huang et al., 2002). Durch das Abschalten des VP24 mittels RNA Interferenz konnte gezeigt werden, dass es keine Rolle bei der viralen Transkription und Replikation spielt, jedoch für den Zusammenbau reifer Virionen notwendig ist. Auf Grund dieser Ergebnisse wird postuliert, dass das VP24 eine wichtige Rolle bei der Morphogenese reifer Virionen spielt. Die Assoziation mit dem NP deutet auf eine Beteiligung an der Reifung der Nukleokapside sowie deren Transport zur Plasmamembran hin (Bamberg et al., 2005). Des Weiteren wird der Einfluss des EBOV VP24 als Pathogenitätsfaktor hinsichtlich

der Adaptation und Veränderungen in der Virulenz diskutiert (Volchkov et al., 2000b). Es wird vermutet, dass das EBOV-VP24 die Interferon (IFN) β -vermittelte Induktion von IFN-responsiven Genen inhibieren kann und somit in die Signalkaskade der IFN-Antwort bei Virusinfektionen eingreift (Basler and Palese, 2003).

L Das L-Protein ist mengenmäßig am wenigsten im Nukleokapsid vertreten und ist mit einem Molekulargewicht von 220 kDa sowie einer Länge von 2331 Aminosäuren das größte Protein des MARV. Es repräsentiert den katalytischen Teil der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Mühlberger et al., 1992; 1998). Im Vergleich mit den anderen Vertretern der Mononegavirales, insbesondere der Familie der *Paramyxoviridae*, sind drei hochkonservierte Bereiche charakteristisch, die vermutlich mit den enzymatischen Funktionen korrelieren (Mühlberger et al., 1992; Poch et al., 1990; Volchkov et al., 1999).

1.6 Replikationszyklus des Marburg-Virus

Der Replikationszyklus des MARV beginnt mit dem Eintritt des Virus in die Zielzelle, der über das Oberflächenprotein GP vermittelt wird. Filoviren können eine Vielzahl von menschlichen Zelltypen infizieren und verwenden dabei höchstwahrscheinlich verschiedene Rezeptormoleküle (Becker et al., 1995; Ito et al., 2001; Schnittler et al., 1993; Ströher et al., 2001; Wool-Lewis and Bates, 1998; Yang et al., 2000). Als möglicher Rezeptorkandidat für Hepatozyten wurde der Asialoglykoproteinrezeptor (ASGP-R) identifiziert (Becker et al., 1995). Der ubiquitär vorkommende Folatrezeptor alpha (FR-alpha) wurde als Kofaktor für den Eintritt von EBOV in die Zelle beschrieben (Chan et al., 2001). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser beim Eintritt in primäre Zelllinien offensichtlich keine Rolle spielt (Simmons et al., 2003a; Sinn et al., 2003). Die C-Typ Lektine DC-SIGN, DC-SIGNR, hMGL und LSECtin, die unter anderem auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden, wurden als mögliche Kofaktoren für den Eintritt von Filoviren beschrieben (Gramberg et al., 2005; Lin et al., 2003; Marzi et al., 2004; Simmons et al., 2003b; Takada et al., 2004). Die Aufnahme der Viren erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose (Empig and Goldsmith, 2002; Mar'iankova et al., 1993). Nach Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran kommt es zur Freisetzung der Nukleokapside in das Zytoplasma der Zelle, wo die Transkription und die Replikation der viralen RNA stattfinden. Das EBOV benötigt für die Transkription und Replikation alle vier Nukleokapsidproteine, während für das MARV die Nukleokapsidproteine NP, VP35 und L ausreichend sind (Mühlberger et al., 1998; 1999). Zunächst werden monocistronische, polyadenylierte, nichtenkapsidierte mRNAs der einzelnen Strukturproteine synthetisiert (Feldmann et al., 1992; Mühlberger et al., 1996; Sanchez et al., 1993).

Diese Transkripte enthalten lange, nichttranslatierte Bereiche, die regulatorische Funktionen bei der Proteinsynthese ausüben (Mühlberger et al., 1996; Weik et al., 2002). Die synthetisierten viralen mRNAs werden vom zellulären Proteinsyntheseparat translatiert, wobei die entstehenden Proteine posttranslational modifiziert werden. Welcher molekulare Mechanismus für die Umstellung von Transkription auf Replikation verantwortlich ist, ist bislang nicht bekannt. Bei der Replikation wird die genomische RNA zunächst in antigenomische RNA umgeschrieben, die wiederum als Matrize für die Synthese neuer viraler Genome dient. Sowohl das Genom als auch das Antigenom liegen in enkapsidierter Form vor. Die genomische RNA wird durch die Nukleokapsidproteine zu Nukleokapsidkomplexen verpackt, die etwa zehn Stunden nach Infektion in typischen intrazytoplasmatischen Einschlusskörpern erscheinen und vermutlich deren Syntheseorte darstellen (Kolesnikova et al., 2000). Die neu synthetisierten Nukleokapsidkomplexe werden zur Zelloberfläche transportiert und treten über die Matrixproteine in Kontakt zu dem in der Plasmamembran eingelagerten GP. Die Freisetzung von MARV-Partikeln erfolgt etwa 22 Stunden nach Infektion.

1.7 Interaktionen der Nukleokapsidproteine des Marburg-Virus

Die Nukleokapsidproteine NP, VP35, VP30 und L sind als strukturelle Komponenten am Aufbau des Nukleokapsids beteiligt. Ferner sind sie in verschiedene Proteinkomplexe involviert, über deren Funktionen bisher wenig bekannt ist. Mit Hilfe eines artifiziellen Transkriptions- und Replikationssystems konnte gezeigt werden, dass die Nukleokapsidproteine NP, VP35 und L für die Transkription und Replikation der viralen RNA des MARV notwendig und ausreichend sind (Mühlberger et al., 1998). Da die Nukleokapsidproteine somit strukturelle und funktionelle Aufgaben erfüllen, wird vermutet, dass die Ausbildung der unterschiedlichen Proteinkomplexe eine wichtige Rolle für die Regulation der Transkription und Replikation spielt.

Die zentrale Komponente bei den Interaktionen der Nukleokapsidproteine ist das NP. Es ist in der Lage, mit sich selbst zu interagieren und Nukleokapsid-ähnliche helikale Strukturen auszubilden, die die Grundgerüste neuer Nukleokapside repräsentieren (Di Carlo, 2004; Kolesnikova et al., 2000). Neben der Homooligomerisierung des NP konnten eine Reihe weiterer Interaktionen der Nukleokapsidproteine gezeigt werden. Das NP interagiert sowohl mit dem VP35 als auch mit dem VP30 (Becker et al., 1998; Modrof et al., 2001). Des Weiteren wurden trimere Komplexe aus NP, VP35 und L identifiziert, wobei das VP35 als Brücke zwischen dem NP und L agiert. Eine direkte Interaktion von NP und L wurde nicht nachgewiesen (Becker et al., 1998). In Anlehnung an die anderen Vertreter der Ordnung der Mononegavirales handelt es sich bei dem Proteinkomplex aus VP35 und L um die aktive RNA-abhängige RNA-Polymerase des MARV (Banerjee and Barik, 1992; Horikami et al., 1992; Mühlberger

et al., 1992; 1998; 1999; Parks, 1994; Walker et al., 2000). Das VP35 ist über eine Coiled-Coil-Struktur in der Lage, mit sich selbst zu interagieren (Möller, 2002).

1.8 Coiled-Coil-Strukturen

Coiled-Coil-Strukturen gehören in der Natur zu den am weitesten verbreiteten Interaktionsdomänen und sind, trotz ihrer einfach strukturierten Interaktionsoberfläche, in der Lage, höchst spezifische Wechselwirkungen zu vermitteln. Coiled-Coil-Strukturen bestehen aus zwei oder mehr amphiphatischen α -Helices, die umeinander gewunden sind und somit eine so genannte Superhelix formen. Sie kommen in den verschiedensten Proteinkomplexen vor und sind an der Ausbildung von Homo- und Heterooligomeren beteiligt. Die Anordnung kann dabei in paralleler oder antiparalleler Form erfolgen. Charakteristisch für die Aminosäuresequenz eines Coiled-Coil-Motivs ist die Wiederholung eines konservierten Musters von sieben Resten (a-b-c-d-e-f-g)_n. An erster (a) und vierter (d) Position befinden sich in der Regel hydrophobe Aminosäuren, die die Interaktionsfläche zwischen den Helices ausbilden. Die restlichen Aminosäuren sind vorwiegend polarer oder geladener Natur und tragen durch intra- bzw. intermolekulare Wechselwirkungen zur Stabilität der ausgebildeten Proteinkomplexe bei (Burkhardt et al., 2001; Mason and Arndt, 2004).

1.9 Fragestellung

Die bisher identifizierten Proteinkomplexe der Nukleokapsidproteine haben eine strukturelle Bedeutung bei der Virusmorphogenese. Andererseits dienen sie als Funktionseinheiten bei der Replikation und Transkription der viralen RNA des MARV (Becker et al., 1998; Mühlberger et al., 1998; 1999). Es wird angenommen, dass die viralen Proteine durch die Interaktion mit unterschiedlichen Partnerproteinen auch verschiedene Funktionen wahrnehmen können.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung des Polymerasekofaktors VP35 des MARV. Ziel dieser Arbeit war es, die verschiedenen Proteinkomplexe, in die das MARV VP35 involviert ist, hinsichtlich ihrer Funktion für die virale RNA-Synthese und die Assemblierung des Nukleokapsidkomplexes zu untersuchen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das VP35 in vitro in der Lage ist, Homooligomere auszubilden. Ferner schien für diese Komplexbildung eine vorhergesagte Coiled-Coil-Struktur im N-Terminus des Proteins notwendig zu sein (Möller et al., 2002). Im Mittelpunkt stand zunächst die genaue Charakterisierung der Coiled-Coil-Domäne. Mit Hilfe von Mutationsanalysen sollten in diesem Zusammenhang die potentiellen Aminosäuren, die für die Ausbildung und die Stabilität der Coiled-Coil-Struktur und somit für die Homooligomerisierung des VP35 verantwortlich sind, identifiziert werden. Des

Weiteren sollte geklärt werden, ob die Homooligomerisierung des VP35 einen Einfluss auf die Interaktion mit dem L-Protein hat. Dieser Komplex repräsentiert die funktionelle RNA-abhängige RNA-Polymerase des MARV. Da das VP35 eine strukturelle Komponente des Nukleokapsidkomplexes ist, bestand ferner die Frage, welche Bedeutung die Homooligomerisierung des VP35 auf die Interaktion mit dem NP hat. Abschließend sollte die Stöchiometrie der VP35-Homooligomere betrachtet werden. Es wird erwartet, dass diese Untersuchungen zu wesentlichen Einsichten in die Regulation von viraler RNA-Synthese und der Morphogenese des Nukleokapsidkomplexes führen.

2 Material

2.1 Geräte

Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode
Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Osterode
Bio-Imager Analyzer BAS-1000	Fuji, Kanagawa (Japan)
Branson Sonifier 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Brutschrank 6000	Heraeus Instruments, Hanau
Eppendorf Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Reference® Pipetten (0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge 5145	Eppendorf, Hamburg
Fastblot B34	Biometra, Göttingen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Geiger-Müller-Zähler	Berthold, Wildbad
GelDoc 2000	Biorad, Richmond (USA)
Genequant II DNA / RNA Calculator	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Horizontalschüttler HS 250 Basis	IKA Labortechnik, Staufen
J2 21 Zentrifuge	Beckmann, Palo Alto (USA)
Keutz®-Gel-Trocken-Rahmen	von Keutz, Reiskirchen
Keutz®-Minigelkammer	von Keutz, Reiskirchen
Kippschüttler	von Keutz, Reiskirchen
Krups Vakupack plus	Krups, Solingen
Liquid Scintillation System LS1801	Beckmann, Palo Alto (USA)
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCO	IKA Labortechnik, Staufen
Maxi 14 Hybridisierungsöfen	HYBAID, Heidelberg
MegaBACE™ 1000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Metallblockthermostat TCS	Lab Tech Barkey, Bielefeld
Microcomputer Electrophoresis, Power Supply Consort	von Keutz, Reiskirchen
Mikroskop Milovert	Will, Wetzlar
Mikrowellengerät	Bosch
Minifuge RF	Heraeus Sepatech, Osterode

Optimax® 2010	Protec Medizintechnik, Oberstenfeld
pH-Meter CG 832	Schott Laborgeräte
Pipetus® Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Primus Thermocycler	MWG Biotech AG, Ebersberg
Protean II Gelkammer	Biorad, Richmond (USA)
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments, Hanau
Spot Kamera, Version 3.1.2	Diagnostic Instruments, Michigan (USA)
Überkopftrotierer	Heidolph Instruments, Schwabach
UV-Schirm 302 nm	Bachofer, Reutlingen
Vakuum-Blotter TransDNA Express™	Qbiogene, Heidelberg
Vakuum-Geltrockner	von Keutz, Reiskirchen
Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac)	von Keutz, Reiskirchen
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	mwg lauda MT

2.2 Chemikalien

Aceton	Merck Eurolab, Darmstadt
Agarose, ultrarein	BRL, Neu-Isenburg
Agarose, NA	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Alconox	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
6-Amino-n-Caprinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumchlorid	Merck Eurolab, Darmstadt
Ammoniumhydrogenkarbonat	Merck Eurolab, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Richmond (USA)
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg
Anti-Flag M2 Agarose Affinity Gel	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit (USA)
Blockierungsreagenz	Roche, Mannheim
Borsäure	Merck Eurolab, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau (BPB)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl₂)	Merck Eurolab, Darmstadt
Chloroform	J. T. Baker, Deventer (NL)
DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Deconex	Bohrer Chemie, Zuchwill (Schweiz)

Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dextranblau	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Eurolab, Darmstadt
Dinatriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck Eurolab, Darmstadt
Dinatriummethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck Eurolab, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Biorad, Richmond (USA)
Essigsäure (HAc)	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethanol (abs.) EtOH	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Ethylacetat	Merck Eurolab, Darmstadt
Ethylene Glycol Bis [succinimidylsuccinate] (EGS)	Pierce, Rockford (USA)
Ficoll Typ 400	Pharmacia LKB, Freiburg
Fluoprep	bioMérieux, Nürtingen
Formaldehyd min 37 %	Merck Eurolab, Darmstadt
Formamid	BRL, Neu-Isenburg
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Geneticin (50 mg/ml)	Gibco BRL, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM (100×)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerol	BRL, Neu-Isenburg
Glycin	Riedel-de-Haën, Seelze
Glykogen (20 mg/ml)	Roche, Mannheim
Harnstoff (ultrarein)	BRL, Neu-Isenburg
Hefeextrakt	Merck Eurolab, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck Eurolab, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck Eurolab, Darmstadt
Lipofectamine™ Plus	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ × 6H ₂ O)	Merck Eurolab, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck Eurolab, Darmstadt

Maleinsäure	Merck Eurolab, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol (MeOH)	Riedel-de-Haën, Seelze
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat (NaOAc)	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	J.T. Baker B.V., Deventer (Holland)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck Eurolab, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Eurolab, Darmstadt
N(onidet)P40	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Eurolab, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco BRL, Karlsruhe
Pepton	Merck Eurolab, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Plus TM -Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Polyacrylamid-Lösung (29:1)	Biorad, Richmond (USA)
Polyvinylpyrrolidon PVP360	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
rotiphorese[®] Gel 30	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck Eurolab, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck Eurolab, Darmstadt
Sephadex [®] G-50 Superfine	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Tetracyclin	Serva, Heidelberg
N, N, N', N', - Tetramethylethylethylendiamin (TEMED)	Biorad, Richmond (USA)
Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Base)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol FF (XC)	Serva, Heidelberg

2.3 Verbrauchsmaterialien

6 well-Zellkulturplatten	Greiner, Nürtingen
75 cm ² Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge (USA)

175 cm ² Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge (USA)
Bio-Image Screen: Imaging plate 2040S	Fuji, Kanagawa (Japan)
Blottingpapier GB 002 (Whatman 3MM)	Whatman, New Jersey (USA)
Gefrierfolie	Krupps, Solingen
Gewebekulturröhrchen (Polystyrol)	Greiner, Nürtingen
Immobilon™ P, PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Kapillarspitzen 200 µl	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
Multiscreen-Platten	Millipore, Eschborn
Nylon membrane, positively charged	Roche, Mannheim
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Neenah (USA)
PCR-tubes, 0,2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Pipetten 2 + 10 ml, Cellstar® bio-one	Greiner, Nürtingen
Pipetten 5 ml, serological pipette	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, oberflächenoptimiert	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Polypropylen-Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner, Solingen
Reaktionsgefäße 1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Präzisions-Küvetten aus Quarzglas	Hellma, Müllheim
Röntgenfilme (Biomax™ MR)	Kodak, Rochester (USA)
Skalpell	PfM AG, Köln
Zellschaber, greiner bio-one	Greiner, Nürtingen

2.4 Kits

CDP-Star	Roche, Mannheim
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen
DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal Ultra® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford (USA)

TNT [®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kit	Promega GmbH, Mannheim
Z-Competent E.coli Transformation Kit [™] and Buffer Set	Zymo Research, Orange (USA)

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Puffer

Annealing-Puffer	1 M 100 mM 160 mM	Tris/HCl (pH 7,5) MgCl ₂ DTT
Blockierungspuffer für Immunfluoreszenzanalysen	2 % 5 % 0,2 % 0,05 % in	BSA Glycerol Tween 20 NaN ₃ PBS _{def}
Blockierungsreagenz für Northern Blot-Analysen	2 % in	Blockierungsreagenz Chemolumineszenzpuffer I
Blockierungspuffer für Western Blot-Analysen	10 g <i>ad</i> 100 ml	Magermilchpulver PBS _{def}
Chemolumineszenzpuffer I (pH 7,5)	0,1 M 150 mM	Maleinsäure NaCl
Chemolumineszenzpuffer II (pH 9,5)	100 mM 100 mM 50 mM	Tris NaCl MgCl ₂
DC-Laufpuffer	95 ml 5 ml	Chloroform Methanol
6x DNA-Probenpuffer	0,25 % 40 % 10 %	Bromphenolblau Saccharose Glycerol

FA-Agarosegel-Auftragspuffer	2 μ l	H ₂ O
	1 μ l	5x FA-Laufpuffer
	1,75 μ l	37 % Formaldehyd
	5 μ l	Formamid
5x FA-Laufpuffer	100 mM	MOPS, pH 7,0 (zuerst einstellen)
	40 mM	NaOAc, pH 7,0
	0,5 mM	EDTA
Glycin-Puffer, sauer	100 mM	Glycin, pH 2,5
	in	PBS _{def}
HEPES-Puffer	50 mM	HEPES
	100 mM	NaCl
	1 mM	β -Mercaptoethanol
	1 %	NP40
KoIP-Puffer (Koimmunpräzipitations-Puffer)	20 mM	Tris/HCl, pH 7,6
	100 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1 %	NP40
	1 mM	PMSF
	1 mM	DTT
Mikrokokken-Nuclease(MCN)- Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	10 mM	NaCl
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	CaCl ₂
	5 %	Triton X-100
	0,3 %	Desoxycholat
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

10× Proteingellaufpuffer	10 g	SDS
	30 g	Tris-Base
	250 g	Glycin
	<i>ad</i> 1 l	dH ₂ O
<hr/>		
4× Proteinprobenpuffer	10 ml	Glycerin
	10 ml	β-Mercaptoethanol
	15 ml	40 % SDS
	12,5 ml	3 M Tris-Base
	1,25 ml	gesättigte BPB-Lösung in dH ₂ O
	<i>ad</i> 50 ml	dH ₂ O
<hr/>		
4× Probenpuffer für Sequenzgele	500 µl	deionisiertes Formamid
	100 µl	25 mM EDTA, pH 8,0
	50 mg/ml	Dextranblau
<hr/>		
RNA-Farbpuffer	50 %	Glycerol
	1 mM	EDTA
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
<hr/>		
RNA-Waschpuffer	0,1 %	SDS
	0,1x	SSC
<hr/>		
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	2,52 ml	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
	0,1 ml	10 % SDS
<hr/>		
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 M Tris/HCl, pH 8,8
	0,1 ml	10 % SDS
<hr/>		
Sequenzier-Probenpuffer	1 %	Dextranblau
	5 mM	EDTA, pH 8,0
	80 %	Formamid
<hr/>		

50× TAE, pH 8,0	242 g	Tris-Base
	57,1 g	Essigsäure
	100 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	<i>ad</i> 1 l	dH ₂ O
10× TBE, pH 8,0	108 g	Tris-Base
	55 g	Borsäure
	40 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	<i>ad</i> 1 l	dH ₂ O
Transferpuffer, alkalisch	3 M	NaCl
	8 mM	NaOH
Tris/KCl-Puffer	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	150 mM	KCl
	0,1 %	NP40
	3 %	BSA
Western Blot-Antikörper- Verdünnungspuffer	1 %	Magermilchpulver
	0,1 %	Tween 20
	in	PBS _{def}
Western Blot-Anodenpuffer I	36,34 g	Tris-Base
	200 ml	Ethanol
	<i>ad</i> 1 l	dH ₂ O
Western Blot-Anodenpuffer II	3,04 g	Tris-Base
	200 ml	Ethanol
	<i>ad</i> 1 l	dH ₂ O
Western Blot-Kathodenpuffer	5,25 g	6-Amino-N-Caprinsäure
	3,03 g	Tris-Base
	200 ml	Ethanol
	<i>ad</i> 1 l	dH ₂ O

2.5.2 Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	100 mg <i>ad</i> 1 ml	Ampicillin dH ₂ O
50x Denhardts Lösung	2,5 % 2,5 % 2,5 %	Ficoll Typ 400 Polyvinylpyrolidon PVP360 BSA
Fixierer/Entfärber für Proteingele	300 ml 100 ml 600 ml	Ethanol Essigsäure dH ₂ O
Hybridisierungslösung nach Collins	30 ml 10 ml 1 ml	20x SSC 50x Denhardts Lösung 10 % SDS
100 mM PMSF	360 mg <i>ad</i> 21 ml	PMSF Isopropanol
10 % SDS	100 g <i>ad</i> 1 l	SDS H ₂ O
20x SSC (pH 7,0)	3 M 0,3 M	NaCl Na ₃ Citrat-Dihydrat

2.6 Wachstumsmedien

2.6.1 Wachstumsmedien für Bakterien

LB-Agar (1,5 %)	3,75 g <i>ad</i> 250 ml	Bacto-Agar LB-Medium
LB-Medium	10 g 5 g 10 g <i>ad</i> 1 l	NaCl Hefeextrakt Pepton dH ₂ O

SOB-Medium	20 g	Pepton
	5 g	Hefeextract
	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

2.6.2 Wachstumsmedien für Säugerzellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Methionin und Cystein	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe

DMEM(+++)	500 ml	DMEM
	50 ml	FCS (Fetales Kälberserum)
	5 ml	L-Glutamin 200 mM (100x)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml

DMEM(++)	500 ml	DMEM
	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)

2.7 Nukleinsäuren und Nukleotide

2.7.1 Nukleinsäuren

DNA Größenmarker III (λ -DNA EcoRI, HindIII verdaut)	Roche, Mannheim
1 kB DNA Ladder, 500 – 1002 bp	New England Biolabs, Frankfurt
100 bp DNA Ladder, 100 – 1517 bp	New England Biolabs, Frankfurt
MassRuler™ DNA-ladder High range	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Herring Sperm DNA, Sonicated	Promega, Mannheim

2.7.2 Nukleotide

dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat	10 mM Eurogentec, Köln
dCTP	2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat	10 mM Eurogentec, Köln
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat	10 mM Eurogentec, Köln
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat	10 mM Eurogentec, Köln

2.7.3 DNA-Oligonukleotide

MARV-spezifische Vorwärtsprimer		
Nr.	Name	Sequenz
787	FlagFVP35	CTA GTA TGG ACT ACA AGG ACG ACG ATG ACA AGG
797	FlagEcoFVP35	<u>AAT TCA</u> TGG ACT ACA AGG ACG ACG ATG ACA AGC CC
814	VP35Flag246EcoF	<u>AAT TCA</u> TGG ACT ACA AGG ACG ACG ATG ACA AGC C
917	M.35f220	GAG <u>GGA TCC</u> ACA ATG CAT CTA CCC GCC AAC AAC ACT
919	M.35f120	GAC <u>GGA TTC</u> ACA ATG ATT TCC AAG GGG ATG TCA GAA
921	M.35f220d99	CAT CTA CCC GGC AAC AAC ACT
923	M.35f120d49	ATT TCC AAG GGG ATG TCA GAA
1118	M35fEcoRI	CGG <u>GAT CCA</u> CCA TGG ACT ACA AGG ACG ACG ATG ACA AGG CAG AAT TAT CAA CGC GTT AC
1120	E30fBamHIdATG	CGG <u>GAT CCA</u> CCA TGG CTT ACC CTT ACC CTT ATG ATG TGC CGG ATT ATG CCG CAG AAT TAT CAA CGC GTT AC
1227	M35faa70EcoRI	CGG <u>GAT CCA</u> CCA TGG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGG CAG AAT TAT CAA GCC GTT AC
1248	M35L90Af	CAT TCA AAG CAC TGC AAG CGA AGT AAC AAC
1250	M35L104Af	GAG CGG CAA GCA CAT GAG ATT ACC CC
MARV-spezifische Rückwärtsprimer		
788	FlagRVP35	GAT CCC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG TCC ATA
798	FlagEcoRVP35	CGG <u>GGG CTT</u> GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC CAT G
815	VP35Flag246EcR	CCG <u>GGG CTT</u> GTC ACT GTC GTC CTT GTA GTC CAT G
918	M.35r329	TGA <u>CTC GAG</u> TTA GAT TTT AAG GGC CCG TGT TTC
920	M.35r220	TGA <u>CTC GAG</u> TTA ATG GGT AAA CAA TAA AAG GGC
922	M.35r120d99	AAT TGC TTC CAG TGT CCT TCC
924	M.35r70d49	TCT CTT CAC GAT CAG TTG GTC
1119	M35-150rBamHI	CGG <u>GAT CCG</u> GCA TCA AAG GCA GCA GCT GG
1232	FusM35aa120r	AAT TGC TTC CAG TGT CCT TCC
1242	FusM35aa109r	TGG GGT AAT CTC ATG TAA TTG CCG

1249	M35L90Ar	GTT GTT ACT TCG CTT GCA GTG CTT TGA ATG
1251	M35L104Ar	GGG GTA ATC TCA TGT GCT TGC CGC TC
1407	M35r122	TGA <u>CTC GAG</u> TTA CTT GGA AAT TGC TTC CAG TGT
EBOV-spezifische Vorwärtsprimer		
1231	FusE30f	GAA GCT TGA TAT GAG AGA GGA
EBOV-spezifische Rückwärtsprimer		
409	EBO 30 flag C term. rev.	AGA <u>CTC GAG</u> TTA CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC AGG GGT ACC CTC ATC AGA CCA TG
434	EBO 30 C term + Xho I rev	AGA <u>CTC GAG</u> TTA AGG GGT ACC CTC ATC AGA CC
Vektorspezifische Primer		
125	pTM1-F	ATT GTA TGG GAT CTG ATC TGG
174	pTM1-R	GCC AAC TCA GCT TCC TTT CGG

Tabelle 2: Eingesetzte DNA-Oligonukleotide. Die Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen und Nukleotidaustausche durch Fett-Druck hervorgehoben. Die Primer #125, #174, #409 und #434 wurden von Dr. M. Krause am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg synthetisiert. Die übrigen Primer wurden von der Firma MWG Biotech in München hergestellt.

2.8 Vektoren und rekombinante Plasmide

pTM1	B. Moss, NIH, Bethesda (USA)
pTM1-VP35	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-VP35 ₁₋₂₇₈	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-VP35 ₁₋₂₄₆	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-VP35 ₁₋₁₂₂	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-VP35 _{152-329Flag}	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-NP	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-NP Δ C1	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-L	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-L _{1-530Flag} (pTM1-L _{Flag})	Institut für Virologie, Marburg
Minigenom 3M5M	Institut für Virologie, Marburg
pTM1-EVP30 _{2LA}	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS-T7	Y. Kawaoka, Wisconsin (USA)

kloniertes Plasmid	Matrizen-DNA	Oligonukleotide	Klonierungsstrategie
pTM1-VP35 _{Flag}	pTM1-VP35	#797/#798	PA + RL
pTM1-VP35 _{1-278Flag}	pTM1-VP35	#787/#788	PA + RL
pTM1-VP35 _{1-246Flag}	pTM1-VP35	#814/#815	PA + RL
pTM1-VP35 _{1-122Flag}	pTM1-VP35	#787/#788	PA + RL
pTM1-VP35 ₇₀₋₃₂₉	pTM1-VP35	#1227/#918	PCR + RL
pTM1-VP35 ₂₂₀₋₃₂₉	pTM1-VP35	#917/#918	PCR + RL
pTM1-VP35 ₁₂₀₋₂₂₀	pTM1-VP35	#919/#920	PCR + RL
pTM1-VP35 _{Δ71-119}	pTM1-VP35	#923/#924	IPCR + RL
pTM1-VP35 _{Δ71-119Flag}	pTM1-VP35 _{Flag}	#923/#924	IPCR + RL
pTM1-VP35 _{Δ121-219}	pTM1-VP35	#921/#922	IPCR + RL
pTM1-VP35 _{Δ121-219Flag}	pTM1-VP35 _{Flag}	#921/#922	IPCR + RL
pTM1-VP35L90A	pTM1-VP35	#1248/#1249	OM + RL
pTM1-VP35L90A _{Flag}	pTM1-VP35 _{Flag}	#1248/#1249	OM + RL
pTM1-VP35L104A	pTM1-VP35	#1250/#1251	OM + RL
pTM1-VP35L104A _{Flag}	pTM1-VP35 _{Flag}	#1250/#1251	OM + RL
pTM1-VP35L90/104A	pTM1-VP35L90A	#1250/#1251	OM + RL
pTM1VP35L90/104A _{Flag}	pTM1-VP35L90A _{Flag}	#1250/#1251	OM + RL
pTM1-VP35 _{1-122mut}	pTM1-VP35L90/104A	#1118/#1407	PCR + RL
pTM1-VP35 _{1-122mutFlag}	pTM1-VP35L90/104A _{Flag}	#1118/#1407	PCR + RL
pTM1-VP35-1-150 _{rep}	pTM1-VP35 pTM1-EVP30 _{2LA}	#1118/#1119 #1120/#434	PCR + RL
pTM1-VP35-1-150 _{repFlag}	pTM1-VP35 pTM1-EVP30 _{2LAFlag}	#1118/#1119 #1120/#409	PCR + RL
pTM1-VP35-70-150 _{rep}	pTM1-VP35-1-150 _{rep}	#1227/#434	PCR + RL
pTM1-VP35-70-150 _{repFlag}	pTM1-VP35-1-150 _{repFlag}	#1227/#409	PCR + RL
pTM1-VP35-70-120 _{rep}	pTM1-VP35-70-150 _{rep}	#1231/#1232	PCR + RL
pTM1-VP35-70-120 _{repFlag}	pTM1-VP35-70-150 _{repFlag}	#1231/#1232	PCR + RL
pTM1-VP35-70-110 _{rep}	pTM1-VP35-70-120 _{rep}	#1231/#1242	PCR + RL
pTM1-VP35-70-110 _{repFlag}	pTM1-VP35-70-120 _{repFlag}	#1231/#1242	PCR + RL
pTM1-VP35-70-110 _{mutrep}	pTM1-VP35-70-110 _{rep}	#1231/#1242	PCR + RL
pTM1-VP35-70-110 _{mutrepFlag}	pTM1-VP35-70-110 _{repFlag}	#1248/#1249 #1250/#1251	OM + RL

Tabelle 3: Für Klonierungen verwendete DNA-Matrizen und Oligonukleotide.

Die Bezeichnung der Oligonukleotide erfolgte mit der internen Labornummer (#), deren genaue Bezeichnung und Sequenzen unter 2.7.3 verzeichnet sind. PA: Primer Annealing (3.1.3), PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion (3.1.1), RL: Restriktionsverdau (3.1.6.1) mit anschließender Ligation (3.1.9); OM: Ortsgerichtete Mutagenese (3.1.2).

2.9 Proteine**2.9.1 Enzyme**

Alkalische Phosphatase,	New England Biolabs, Frankfurt
Calf Intestinal Phosphatase (CIP) (10 U/μl)	
PfuTurbo™ DNA-Polymerase (2.5 U/μl)	Stratagene, Heidelberg
Mikrokokken-Nuklease (100 – 300 U/μl)	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
SAWADY PWO DNA-Polymerase (1U/μl)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt
RNase A	Qiagen, Hilden
T4 DNA Ligase (4 U / μl)	New England Biolabs, Frankfurt
Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.9.2 Antikörper und Peptide

α-Flag® M2 monoklonaler AK	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α-Flag® polyklonaler AK vom Kaninchen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α MARV-NC, Kaninchen (1 M NaCl, 11.06.1996)	Institut für Virologie, Marburg
α MARV-NP 2B10, Maus, monoklonal	Institut für Virologie, Marburg
α MARV-VP35/2, Meerschweinchen (16.04.1998)	Institut für Virologie, Marburg
α EBOV-VP30 Antiserum, rabbit 52/1 3. BE	Institut für Virologie, Marburg
α Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	Roche, Mannheim
Ziege α Maus FITC-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege α Kaninchen, Rhodamin-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege α Maus, POD	DAKO-Diagnostika, Hamburg
Ziege α Meerschweinchen, POD	DAKO-Diagnostika, Hamburg
Flag® Peptide	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.9.3 Proteinmarker

Rainbow™ Protein Molecular Weight Marker 14,3 - 200 kDa	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
--	---

2.10 Radioaktiv markierte Substanzen

[¹⁴C] RainbowTM Protein Molecular Weight Marker Amersham Pharmacia Biotech,
14,3 - 200 kDa Freiburg

[¹⁴C]-Chloramphenicol (25 µCi)

[³⁵S]PromixTM Cell Labelling Mix (7,5 mCi)

2.11 Zellen und Viren

2.11.1 Prokaryotische Zellen

E. coli Stamm XL1-Blue Stratagene, Heidelberg

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qΔM15 Tn10
(Tet^r)]

2.11.2 Eukaryotische Zellen

Huh7-Zellen humane Hepatomazelllinie

Huh-T7-Zellen humane Hepatomazelllinie mit konstitutiver
Expression der T7-RNA-Polymerase
(V. Gauss-Müller, Lübeck)

Vero-Zellen Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze

2.11.3 Viren

Marburg-Virus (MARV-Musoke) Institut für Virologie, Marburg

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Ketten-Reaktion

Mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* vervielfältigt werden. Für jede Reaktion verwendet man zwei verschiedene Primer, die an jeweils einen DNA-Strang binden und die Zielsequenz einrahmen. Der Vorwärts-Primer und der Rückwärts-Primer bestehen aus 15 bis 25 Nukleotiden, die das 5'- und das 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments definieren. Entsprechend der Klonierungsstrategie können die Primer im 5'-Bereich zusätzliche Sequenzen für Schnittstellen von Restriktionsenzymen enthalten (Abb. 4).

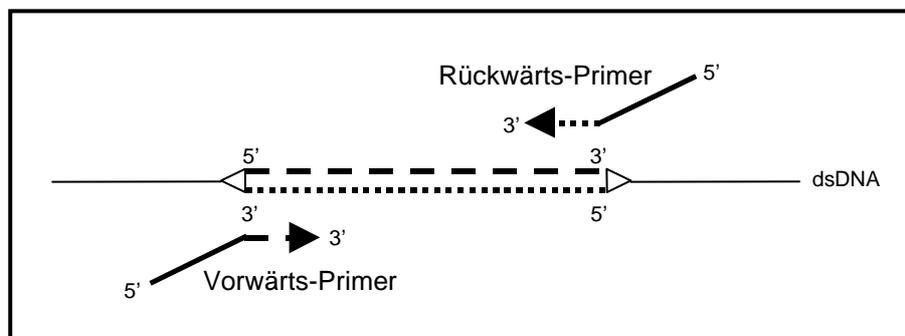


Abbildung 4: Prinzip einer PCR.

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

Ein Reaktionszyklus besteht aus drei verschiedenen Temperaturstufen. Zuerst wird die doppelsträngige DNA-Matrize durch Erhitzen in ihre Einzelstränge (Denaturierung) überführt. Anschließend wird der Reaktionsansatz auf eine durch die Basensequenz der Primer festgelegte Temperatur abgekühlt, damit diese an die komplementären Sequenzabschnitte der einzelsträngigen DNA-Matrize (Annealing) binden können. Nach Hybridisierung der Primer erfolgt ausgehend vom 3'-Ende des jeweiligen Primers die Synthese des Doppelstranges (Extension). Hierzu wird die Temperatur auf das Aktivitätsoptimum der hitzestabilen Pwo DNA Polymerase erhöht, die neben ihrer 5'-3'-Polymeraseaktivität über eine Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonukleaseaktivität) verfügt. Der Reaktionszyklus wird mehrfach wiederholt, wobei die zu amplifizierende DNA im Reaktionsgemisch exponentiell angereichert wird. Im Anschluss an die PCR werden 10 µl des Reaktionsansatzes auf einem analytischen DNA-Agarosegel (3.1.4.1) überprüft. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden über ein präparatives DNA-Agarosegel (3.1.4.2) aufgetrennt und durch Gelextraktion (3.1.5.1) gereinigt.

Reaktionsansatz:	10 ng	DNA
	300 nM	Vorwärts-Primer
	300 nM	Rückwärts-Primer
	je 1 μ l	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	10 μ l	10x PCR Puffer (20 mM MgSO ₄)
	ad 99,5 μ l	dH ₂ O
	0,5 μ l	Pwo DNA Polymerase (1 U/ μ l)

Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	2 min
Denaturierung	20	95 °C	2 min
Annealing		50 – 60 °C	1 min
Synthese		72 °C	1 min + 5 sec pro Zyklus
Ende der Synthese	1	4 °C	∞

Die Einführung von verschiedenen großen Deletionen in das Zielgen erfolgt mittels PCR und anschließendem DpnI-Verdau (Imai et al., 1991). Die Primer bestehen aus 21 Nukleotiden komplementär zu ihrer Zielsequenz. Nach Denaturierung der DNA-Matrize und Hybridisierung der Primer lesen diese in entgegengesetzter Richtung aus dem Gen hinaus (Abb. 5). Mittels der PfuTurbo[®] DNA Polymerase wird neben dem

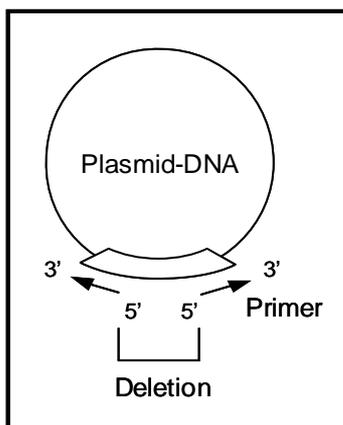


Abbildung 5: Einführung von Deletionen mittels PCR.

Die PCR-vermittelte Deletion bestimmter DNA-Sequenzen erfolgt mit Primern, die von der Polymerase in entgegengesetzter Richtung verlängert werden.

gewünschten DNA-Fragment das gesamte Rückgrat des Vektors in 16 Zyklen amplifiziert. Im Anschluss an die PCR wird der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C mit 1 μ l DpnI verdaut (3.1.6.1). Die in vitro entstandene mutierte DNA ist im Gegensatz zur bakteriell replizierten DNA nicht methyliert. Die Restriktionsendonuklease DpnI besitzt die Fähigkeit, ausschließlich methylierte DNA zu schneiden und zerstört somit die ursprünglich eingesetzte Plasmid-DNA. Die DNA wird über ein präparatives DNA-Agarosegel (3.1.4.2) aufgetrennt und mittels Gelextraktion (3.1.5.1) gereinigt. Die resultierende deletierte DNA wird nach Religation (3.1.9) in Z-kompetente E.coli XL1-Blue-Zellen transformiert (3.1.10).

Reaktionsansatz:	10 ng	DNA
	100 nM	Vorwärts-Primer
	100 nM	Rückwärts-Primer
	je 1 μ l	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	5 μ l	10x PCR Puffer
	ad 49 μ l	dH ₂ O
	1 μ l	PfuTurbo [®] DNA Polymerase (2.5 U/ μ)

Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	30 sec
Denaturierung	16	95 °C	30 sec
Annealing		55 °C	1 min
Synthese		68 °C	2 min/kb
			Plasmidlänge
Ende der Synthese	1	4 °C	∞

3.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Punktmutationen, Deletionen und Insertionen können mittels in vitro Mutagenese in Plasmid-DNA eingebracht werden. Diese Methode basiert auf einer PCR mit spezifischen, zueinander komplementären Primern, die die gewünschte Mutation enthalten. Die Amplifikation erfolgt mit Hilfe der rekombinanten PfuTurbo[®] DNA Polymerase. Anschließend wird der Ansatz mit 1 μ l der Restriktionsendonuklease DpnI versetzt und für drei Stunden bei 37 °C inkubiert (3.1.7.1). Die methylierte Ausgangs-DNA wird somit verdaut und die neu synthetisierten, nicht methylierten Amplifikate, die die Mutation tragen, bleiben intakt. 10 μ l dieses Ansatzes werden direkt in Z-kompetente XL1-Blue-Zellen transformiert (3.1.6).

Reaktionsansatz:	50 ng	DNA
	100 nM	Vorwärts-Primer
	100 nM	Rückwärts-Primer
	je 1 μ l	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	10 μ l	10x PCR Puffer (20 mM MgSO ₄)
	ad 99,5 μ l	dH ₂ O
	1 μ l	PfuTurbo [®] DNA Polymerase (2.5 U/ μ l)

Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	30 sec
Denaturierung	16	95 °C	30 sec
Annealing		55 °C	1 min
Synthese		68 °C	2 min/kb
			Plasmidlänge
Ende der Synthese	1	4 °C	∞

Zur Kontrolle werden 10 µl des PCR-Ansatzes über ein analytisches Agarosegel (3.1.4.1) analysiert.

3.1.3 Anlagerung komplementärer Oligonukleotide

Zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide werden zu kurzen doppelsträngigen DNA-Fragmenten hybridisiert (Primer Annealing). Mittels flankierender Restriktionschnittstellen werden die annealten Primer in einen zuvor entsprechend verdauten Vektor einligiert (3.1.6.1, 3.1.9).

Reaktionsansatz:

22 µl	30 µM Oligonukleotid (+)-Orientierung
22 µl	30 µM Oligonukleotid (-)-Orientierung
8 µl	Annealing-Puffer
4 µl	dH ₂ O

Der Reaktionsansatz wird zunächst für eine Minute bei 95 °C inkubiert. Die Oligonukleotidanlagerung findet für 20 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C statt. Nach einer anschließenden 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) werden die hybridisierten doppelsträngigen DNA-Fragmente mittels Ethanol-fällung (3.1.8.2) aufgereinigt.

3.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen entsprechend ihrer Molekülgröße im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Unter Verwendung des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid und von UV-Licht werden die Nukleinsäurefragmente sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach einer PCR oder nach enzymatischen Reaktionen werden analytische DNA-Agarosegele verwendet, wogegen präparative DNA-Agarosegele zur Reinigung von Nukleinsäuren eingesetzt werden. Sie unterscheiden sich im Reinheitsgrad der Agarose, dem Laufpuffer und dem einzusetzenden Probenvolumen.

Um RNA-Fragmente verschiedener Größe für eine Northern Blot-Analyse (3.3.4) aufzutrennen, werden denaturierende Formaldehyd-RNA-Agarosegele benutzt.

3.1.4.1 Analytische DNA-Agarosegele

Agarosegel: 1 % (w/v) Agarose, ultrarein in 1x TBE-Puffer gelöst
Laufpuffer: 1x TBE-Puffer, pH 8,0

Die Agarose wird durch Erhitzen in TBE-Puffer gelöst und anschließend in eine entsprechende Gelkammer gegossen. Zur Charakterisierung der Größe der zu analysierenden DNA werden je 1 µl DNA-Längenstandard (2.7.1) mit den zu untersuchenden Proben auf dem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA und die Marker werden vor dem Auftragen mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Dieser Auftragspuffer erhöht die Dichte der DNA-Probe und erleichtert somit das Beladen der Geltaschen. Der enthaltene Farbstoff Bromphenolblau liefert einen Anhaltspunkt für die Wanderung der DNA. Die Elektrophorese erfolgt bei 40 bis 80 mA. Anschließend wird das Gel für 20 bis 30 Minuten in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert. Mit Hilfe eines Geldokumentationssystems GelDoc2000 und UV-Beleuchtung mit Wellenlängen von 302 nm werden die DNA-Banden visualisiert.

3.1.4.2 Präparative DNA-Agarosegele

Agarosegel: 1 % (w/v) Agarose NA in 1x TAE-Puffer gelöst
Laufpuffer: 1x TAE-Puffer, pH 8,0

Die Aufbau- und Elektrophoresebedingungen entsprechen denen analytischer DNA-Agarosegele (3.1.4.1). Nach Anfärbung der DNA in Ethidiumbromidlösung werden die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell auf einem UV-Schirm ausgeschnitten. Die DNA wird anschließend mit dem QIAquick™ Gel Extraction Kit aus dem Gel isoliert (3.1.5.1).

3.1.4.3 Formaldehyd-RNA-Agarosegele

Agarosegel: 1,5 % (w/v) Agarose, ultrarein
23 ml dH₂O
6 ml 5x FA-Laufpuffer
1 ml 37 % Formaldehyd
Laufpuffer: 1x FA-Laufpuffer

Die Agarose wird zunächst mit dH₂O und 5x Formaldehyd(FA)-Puffer versetzt und aufgekocht. Das Formaldehyd wird erst nach Abkühlen der Lösung auf 60 °C unter

dem Abzug zugegeben. Die Elektrophorese wird zu Beginn bei einer Spannung von 50 V durchgeführt und im weiteren Verlauf auf 90 V erhöht, bis die Bromphenolblau-bande einen Zentimeter vor dem Gelende angekommen ist.

3.1.5 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.5.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus präparativen DNA-Agarosegelen erfolgt mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung. Die DNA wird nach Reinigung über eine Säulenmatrix in 30 µl dH₂O eluiert. Ein Zehntel des Eluats wird zur Kontrolle der Präparation auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt (3.1.4.1).

3.1.5.2 Isolierung replizierter RNA aus transfizierten Huh-T7-Zellen

Die Isolierung von replizierter RNA aus Huh-T7-Zellen zur Durchführung einer Northern Blot-Analyse (3.3.4) erfolgt 40 Stunden nach Transfektion (3.2.3). Die Huh-T7-Zellen werden zunächst zweimal mit kaltem PBS_{def} gewaschen, in einem Volumen von 500 µl PBS_{def} abgekratzt und in 1,5 ml-Schraubröhrchen überführt. Nach einer sechsminütigen Zentrifugation bei 8000 Upm bei 4 °C werden die pelletierten Zellen in 200 µl Mikrokokken-Nuklease(MCN)-Puffer aufgenommen und achtmal mit Hilfe einer 1 ml-Spritze und einer violetten Kanüle (24 GA1 0.55 x 25 mm) geschert. Die anschließende Beschallung der Huh-T7-Zellen erfolgt mit 40 der längsten Impulse im Branson Sonifier 450 bei 4 °C. Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen werden mittels einer fünfminütigen Zentrifugation bei 2500 Upm entfernt. Die Überstände werden einem MCN-Verdau (3.1.6.2) unterzogen. Im Anschluss erfolgt die Fällung und Reinigung (3.1.8.3) der replizierten RNA.

3.1.6 Verdau von Nukleinsäuren

3.1.6.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA-Moleküle können mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungsstellen gespalten werden. Sie werden sowohl für die Herstellung von zur Klonierung verwendeten DNA-Fragmenten als auch zur Identifizierung entstandener Klonierungsprodukte eingesetzt. Die zu analysierende DNA wird mit dem gewünschten Enzym unter definierten Pufferbedingungen inkubiert. Der Restriktionsansatz wird, je nach verwendetem Enzym, mit BSA (100 µg/ml) komplementiert und beim jeweiligen Temperaturoptimum für zwei bis 16 Stunden inkubiert.

Ansatz für analytischen Verdau:	0,1 – 0,5 µg	DNA
	1 µl	10x Puffer nach Herstellerangaben
	(1 µl	10 % BSA, falls notwendig)
	0,3 µl	Restriktionsendonuklease
		(bei Doppelverdau je 0,15 µl)
	<i>ad</i> 10 µl	dH ₂ O
Ansatz für präparativen Verdau:	3 – 5 µg	DNA
	5 µl	10x Puffer nach Herstellerangaben
	(5 µl	10 % BSA, falls notwendig)
	3 µl	Restriktionsendonuklease
		(bei Doppelverdau je 1,5 µl)
	<i>ad</i> 50 µl	dH ₂ O

Die DNA kann gleichzeitig mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten werden, sofern diese hinsichtlich der Temperatur- und Reaktionsbedingungen kompatibel sind. Andernfalls wird die DNA nacheinander mit den gewünschten Enzymen verdaut. Um für weitere Reaktionen störende Enzym- und Pufferrückstände sowie Fragmente vom 5'- und 3'-Ende zu entfernen, wird der Restriktionsansatz mit dem QIAquick® PCR Purification Kit gereinigt (3.1.8.1). Die entstandenen Restriktionsfragmente haben aufgrund der Lage der Spaltstellen eine definierte Länge und können mit einem analytischen DNA-Agarosegel (3.1.4.1) überprüft werden. Für eine weitere Verwendung muss die DNA nach dem Verdau entweder mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (3.1.8.1) oder über ein präparatives Agarosegel (3.1.4.2) mit anschließender Gelextraktion (3.1.5.1) aufgereinigt werden.

3.1.6.2 Verdau von RNA mit Mikrokokken-Nuklease

Replizierte MARV-Minigenom-spezifische RNA ist durch die Enkapsidierung mit dem NP resistent gegen Nukleasebehandlung und kann durch einen Verdau mit MCN von anderen nicht geschützten RNAs getrennt werden. Nach Zugabe von 15 Units MCN werden die Überstände der Huh-T7-Zellen (3.2.3) 70 Minuten bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Reinigung und Fällung (3.1.8.3) der zu analysierenden RNA.

3.1.7 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Um die Religation geschnittener Vektoren zu verhindern, werden die 5'-Phosphatgruppen der verdauten Plasmide durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP) entfernt. Die CIP ist in den meisten 10x Restriktionspuffern aktiv und kann, sofern die Inkubationstemperatur bei 37 °C liegt,

einfach zum präparativen Restriktionsansatz hinzu gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert werden. Die Inaktivierung der CIP erfolgt für zehn Minuten bei 72 °C durch Zugabe von 0,5 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0). Um für die Ligation störende Substanzen zu entfernen, wird die DNA anschließend mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (3.1.8.1) gereinigt.

3.1.8 Reinigung von Nukleinsäuren

Saubere Nukleinsäurepräparationen bilden die Voraussetzung für molekularbiologische Experimente. Verunreinigungen wie Phenol, Chloroform, Ethanol, EDTA, Salze Detergenzien oder Proteine haben einen negativen Einfluss auf nachfolgende biochemische Reaktionen und müssen demzufolge entfernt werden.

3.1.8.1 Reinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Ansätze enthalten nach der Amplifikation von DNA-Fragmenten (3.1.1) noch Primer und Nukleotide. Ebenso befinden sich nach dem Verdau von DNA (3.1.6.1) Fragmente vom 5'- und 3'-Ende sowie störende Salze im Restriktionsansatz. Diese Bestandteile werden mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits entsprechend dem beiliegenden Handbuch entfernt. Die DNA adsorbiert an eine Säulenmatrix, wird durch Waschen von Verunreinigungen befreit und schließlich in einer entsprechenden Menge dH₂O (30 bis 50 µl) eluiert.

3.1.8.2 Ethanolfällung von DNA-Fragmenten

Mittels Ethanolpräzipitation können Nukleinsäuren gereinigt und konzentriert werden. Die DNA bildet in Gegenwart von Natriumacetat in 100 %igem Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 14.000 UpM pelletiert wird. Dem Fällungsansatz kann optional der Carrier Glykogen zugesetzt werden. Dieses Trägermaterial wird ebenfalls durch Ethanol präzipitiert und fällt so sehr geringe DNA-Mengen mit aus. Zur Entfernung mitgefällter Salze wird das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Im Anschluss an eine 15-minütige Zentrifugation bei 14.000 UpM wird das DNA-Pellet bei RT getrocknet und in einer adäquaten Menge dH₂O gelöst.

Ansatz:	x µl	DNA-Lösung
	(1 µl	Glykogen, 20 mg/ml)
	x/10 µl	3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2
	ad 2,5fache des Ausgangsvolumens 100 % Ethanol	

3.1.8.3 Reinigung und Fällung von RNA-Fragmenten

RNA aus den mit MCN verdauten Zelllysaten von Huh-T7-Zellen (3.1.6.2) wird mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Kits entsprechend dem beiliegenden Handbuch aufgereinigt und in 200 µl dH₂O eluiert. Die Fällung der RNA wird wie folgt über Nacht bei -20 °C durchgeführt.

Ansatz:	200 µl	RNA-Lösung
	1 µl	Glykogen, 20 mg/ml
	20 µl	3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2
	ad 2,5fache des Ausgangsvolumens 100 % Ethanol	

Im Anschluss wird die präzipitierte RNA mittels einer 30-minütigen Zentrifugation (4 °C) bei 14.000 UpM pelletiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Im Anschluss an eine 15-minütige Zentrifugation bei 14.000 UpM wird das RNA-Pellet bei RT getrocknet und zur Analyse auf einem Formaldehyd-RNA-Agarosegel (3.1.4.3) in 10 µl Formaldehyd-Auftragspuffer aufgenommen, 15 Minuten bei 65 °C denaturiert und nach weiteren fünf Minuten auf Eis mit 2 µl RNA-Farbpuffer versetzt.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren

Mit Hilfe einer DNA Ligase, die die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen freien 5'-Phosphatgruppen eines DNA-Stranges mit den freien 3'-OH-Gruppen eines anderen Stranges katalysiert, können verschiedene DNA-Moleküle miteinander verknüpft werden. Mittels PCR synthetisierte und mit Restriktionsenzymen verdaute DNA-Fragmente (3.1.1, 3.1.6.1) oder hybridisierte Primer (3.1.3) werden so in zuvor entsprechend geschnittene Vektoren einligiert (3.1.6.1).

Ansatz:	20 – 200 ng	verdaute, gereinigte Insert-DNA
	25 – 50 ng	linearisierte, gereinigte Vektor-DNA
	1 µl	10x Ligationspuffer mit rATP
	0,5 µl	T4 DNA Ligase (4 U/µl)
	ad 15 µl	dH ₂ O

Zur Abschätzung des Verhältnisses von religierten Plasmiden zu Plasmiden mit Insertionen wird eine Religationskontrolle mitgeführt, in der das zu klonierende DNA-Fragment durch dH₂O ersetzt wird. Als Ligationskontrolle wird ein nur mit einem Restriktionsenzym linearisiertes, nicht dephosphoryliertes Plasmid eingesetzt. Die

Ligationsansätze werden für eine Stunde bei RT inkubiert und im Anschluss vollständig in Z-kompetente XL1-Blue-Zellen transformiert (3.1.10).

3.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Rekombinante Plasmide werden zur Vermehrung in Bakterienzellen eingeführt. Zur Aufnahme fremder Plasmid-DNA müssen die Zellen zunächst kompetent gemacht werden. Die Bakterien der Wahl werden mit dem Z-Competent E.coli Transformation Kit™ and Buffer Set entsprechend dem beiliegenden Protokoll behandelt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Vor einer Transformation werden die Z-kompetenten E.coli-Zellen aufgetaut und transformiert, indem 100 μl Zellsuspension mit der DNA-Lösung (15 μl Ligationsansatz, 10 bis 20 ng Plasmid-DNA) vermischt und für eine Stunde auf Eis inkubiert werden.

3.1.11 Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterien

Plasmid-DNA kann in Bakterien durch Antibiotika-Selektion vermehrt werden. Die transformierten Bakterienzellen (20 bis 100 μl) werden auf ampicillinhaltige (100 $\mu\text{g/ml}$) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewünschten Plasmide, die ein Ampicillinresistenzgen tragen, befähigen die Bakterien, auf dem Selektionsmedium zu wachsen.

3.1.12 Plasmidpräparationen kleinen Maßstabes

Mit dem E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I werden Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab nach dem beiliegenden Protokoll hergestellt. Zur Isolierung von Plasmid-DNA werden einzeln gewachsene Bakterienkolonien gepickt und jeweils in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) über Nacht auf einem Schüttler bei 37 °C angezogen. 1,5 ml der Bakteriensuspension werden pelletiert, lysiert und auf eine HiBind®-Miniprep-Säule geladen. Die Plasmid-DNA bindet an die in der Säule enthaltene Silikamembran, wird durch Waschen von Verunreinigen befreit und nach Trocknen der Säule in 50 μl dH_2O eluiert. Zur Überprüfung, ob die Bakterien das gewünschte Plasmid aufgenommen haben und ob die Insertion in richtiger Orientierung vorhanden ist, werden 2 bis 5 μl des gewonnenen Eluats mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (3.1.6.1) und auf einem analytischen DNA-Agarosegel aufgetrennt (3.1.4.1).

3.1.13 Plasmidpräparationen großen Maßstabes

Auf der Basis eines positiven Bakterienklons wird unter Verwendung des QIAfilter® Plasmid Maxi bzw. des HiSpeed Plasmid Maxi Kits eine Plasmidpräparation großen Maßstabes angefertigt. Zur Anzucht werden 100 ml ampicillinhaltiges (100 $\mu\text{g/ml}$) LB-Medium mit 100 μl einer Bakterienkultur des gewünschten Klons inokuliert und bei

37 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Anwendungen basieren auf einer alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Sambrook et al., 1989) mit anschließender Adsorption der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Matrix. Nach mehrmaligem Waschen wird die DNA in 500 µl dH₂O aufgenommen. Mit Hilfe eines Photometers wird die Konzentration der Plasmidpräparation auf 1 µg/µl eingestellt.

3.1.14 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen werden durch UV-Messung in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Optische Dichte der Lösung bei 260 nm (OD_{260}) ist direkt proportional zu ihrem Nukleinsäuregehalt. Um die Extinktionen im linearen Bereich (0,1 bis 0,8) zu erhalten, werden die Proben 1:100 in dH₂O verdünnt. Für doppelsträngige Plasmid-DNA entspricht eine Absorption von eins einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung lässt sich durch die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm abschätzen. Reine Lösungen besitzen einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,8. Durch Kontaminationen wie Proteine ergeben sich wesentlich kleinerer Werte, wobei Verunreinigungen durch Phenol oder RNA in einem deutlich höheren Quotienten resultieren.

3.1.15 Sequenzanalyse mit dem Kapillarsequenzierer MegaBASE™ 500

Das Prinzip dieser Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger und Coulson (Sanger and Coulson, 1975). Bei der hier verwendeten Modifikation der Methode wird die zu sequenzierende DNA mittels PCR synthetisiert.

Reaktionsansatz:	1 µl	DNA (100 – 200 ng/µl)
	1 µl	Primer (10 pmol)
	4 µl	Ter-Mix
	<hr/>	<hr/>
	ad 20 µl	dH ₂ O

Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	3 min
Denaturierung	35	95 °C	1 min
Annealing		50 °C	15 sec
Synthese		60 °C	2 min
Ende der Synthese	1	4 °C	∞

Neben den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP und dTTP werden unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs)

ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP eingesetzt, die nach Einbau den Abbruch der Elongation verursachen. Der Ter-Mix enthält neben einem Gemisch aus markierten Nucleotiden (DYEnamic™ ET dye terminators) eine sequenzspezifische Polymerase (Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase). Die Proben werden im Anschluss an die PCR mit Hilfe von Sephadex®G-50 Superfine in 96-well Multiscreen-Platten über mehrere Zentrifugations- und Waschschrte aufgereinigt. Die Sequenzierung erfolgt mit dem Kapillarsequenzierer MegaBACE™ 500, der fluoreszenzmarkierte DNA automatisch analysiert und mittels einer speziellen Software auswertet.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Vero-, Huh7- und Huh-T7-Zellen

Huh7- und Huh-T7-Zellen sind humane Hepatomazelllinien, wobei die letztere die T7-RNA-Polymerase konstitutiv exprimiert. Bei Vero-Zellen handelt es sich um Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze. Diese permanenten Zelllinien werden in 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Als Wachstumsmedium wird DMEM(+++) verwendet. Für die Huh-T7-Zellen ist die Zugabe von Genitacin (1 mg/ml) nötig. Die Passage der Zellen erfolgt unter einer Sicherheitswerkbank im Abstand von drei bis vier Tagen. Der konfluente Zellrasen wird zweimal mit 10 ml PBS_{def} gewaschen und anschließend zum Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche mit 2 ml Trypsin/ EDTA für etwa eine Minute bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 9 ml DMEM(+++) wird die Trypsin-Reaktion abgestoppt. Die abgelösten Zellen werden durch mehr-maliges Pipettieren resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturflaschen oder -platten ausgesät.

3.2.2 Transfektion von Huh7-Zellen mit Lipofectamine Plus™

Um DNA in Zellen einzubringen, wird deren negative Ladung durch Komplexbildung mit kationischen Lipiden maskiert. In dieser Form können sich die DNA-Lipidkomplexe an die Zellmembran anlagern und diese passieren. Die Huh7-Zellen werden einen Tag vor Transfektion in 6 well-Zellkulturplatten umgesetzt, so dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Dichte von 70 Prozent aufweisen. Für Immunfluoreszenzanalysen werden die Huh7-Zellen auf runden Deckgläschen (12 mm) in 6 well-Zellkulturplatten ausgesät. Die DNA-Transfektion der Zellen wird unter Verwendung von Lipofectamine Plus™ durchgeführt, welches mit der DNA spontan Lipid-DNA-Komplexe bildet. Im artifiziiellen Replikations- und Transkriptionssystem ist ein Verhältnis von 1:5 der für die Nucleokapsidproteine kodierenden Plasmide pTM1-NP und pTM1-VP35 essentiell (Mühlberger et al., 1998). Die transfizierten Plasmidmengen betragen dementsprechend für das pTM1-NP 100 ng und für das pTM1-VP35 500 ng. NP- bzw. VP35-

Mutanten werden in äquivalenten Mengen eingesetzt. Bei Einzelexpressionen wird die Gesamtplasmidmenge durch die Zugabe von Leervektor pTM1 komplementiert. Die zu exprimierenden Gene stehen in pTM1-Vektoren unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Die Bereitstellung der T7-RNA-Polymerase in Huh7-Zellen, die unter der Kontrolle des eukaryotischen β -chicken-fibroblast-Promotors (Niwa et al., 1991) exprimiert wird, erfolgt durch die Kotransfektion von je 500 ng des Plasmides pCAGGS-T7 (Neumann et al., 2002). Vorbereitend werden zwei verschiedene Ansätze (A und B) in Dnase- und Rnase-freien Polystyrolröhrchen entsprechend den Empfehlungen des Herstellers pipettiert.

Pro well einer 6-well Zellkulturplatte:

A:	4 μ l Lipofectamine Plus™	B:	1,1 – 1,5 μ g DNA
	100 μ l DMEM(+Q)		100 μ l DMEM(+Q)
			6 μ l Plus-Reagenz™

Nach einer 15-minütigen Inkubation der Ansätze A und B bei RT werden diese vereint, 30 Sekunden gemischt und nochmals für 15 Minuten bei RT inkubiert. Währenddessen wird das FCS-haltige Wachstumsmedium von den Huh7-Zellen abgenommen, und die zu transfizierenden Zellen werden einmal mit vorgewärmtem DMEM(+Q) gewaschen. Anschließend werden pro well einer 6 well-Zellkulturplatte 800 μ l DMEM(+Q) vorgelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Transfektionsgemische zugesetzt, so dass das Transfektionsvolumen 1 ml beträgt. Die Transfektion erfolgt über Nacht, wobei nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bei 37 °C (5 % CO₂) im Brutschrank 1ml DMEM(+++) pro well hinzu gegeben wird. Zur Durchführung einer Immunpräzipitationsanalyse werden die transfizierten Huh7-Zellen radioaktiv mit [³⁵S]Promix Cell-labelling Mix markiert und lysiert (3.3.1) oder direkt für eine Immunfluoreszenzanalyse (3.3.6) verwendet.

3.2.3 MARV-spezifisches Replikations- und Transkriptionssystem

In der Arbeitsgruppe wurde ein artifizielles MARV-spezifisches Replikations- und Transkriptionssystem entwickelt (Mühlberger et al., 1998). Dieses reverse Genetik-System basiert auf dem Plasmid 3M5M, welches für ein MARV-spezifisches RNA-Minigenom unter der Kontrolle eines T7-Promotors kodiert. Es besteht aus einem Reporter gen (Chloramphenicol-Acetyltransferase, CAT), das in negativer Orientierung vorliegt und von den 3'- und 5'-Enden des MARV-Genoms flankiert ist. Diese Regionen enthalten alle für die Transkription und Replikation notwendigen cis-aktiven Signale. Dieses Konstrukt wird gleichzeitig mit Plasmiden transfiziert, die unter der Kontrolle des

T7-Promotors stehen und für die MARV-Nukleokapsidproteine NP, VP35 und L kodieren. Die Expression der Nukleokapsidproteine in Huh-T7-Zellen führt zur Transkription und Replikation des Minigenoms, wobei ein CAT-Transkript entsteht, welches durch die zelluläre Translationsmaschinerie synthetisiert wird. Die CAT-Aktivität (3.3.3) repräsentiert in diesem System die MARV-spezifische Transkription, wobei der Nachweis von replizierter RNA mit Hilfe einer Northern Blot-Analyse (3.3.4) erfolgt.

Huh-T7-Zellen werden einen Tag vor Transfektion in 6 well-Zellkulturplatten ausgesät, so dass diese zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 70 Prozent aufweisen. Eine Stunde vor Beginn der Transfektion werden die zu transfizierenden Huh-T7-Zellen zweimal mit DMEM(+Q) gewaschen. Anschließend werden pro 6 well 1 ml DMEM(+Q) zugegeben, worauf eine einstündige Inkubation bei 37 °C (5 % CO₂) im Brutschrank erfolgt. In diesem Zeitraum werden die Transfektionsansätze (A und B) in Dnase- und Rnase-freien Polystyrolröhrchen entsprechend den Empfehlungen des Herstellers vorbereitet.

Pro well einer 6 well-Zellkulturplatte:

A:	3 – 7 µl DNA	B:	9 – 21 µl FuGENE 6
	200 µl DMEM(+Q)		800 µl DMEM(+Q)

Die Standardkomponenten des MARV-Replikations- und Transkriptionssystems setzen sich aus folgenden Plasmiden zusammen:

100 ng	pTM1-NP
500 ng	pTM1-VP35
1 µg	pTM1-L
1 µg	3M5M
500 ng	pCAGGS-T7

Die Mengen an pTM1-VP35 werden gegebenenfalls variiert oder durch ein Plasmid für eine VP35-Mutante ersetzt. Die T7-RNA-Polymerase wird zum einen durch Verwendung von konstitutiv exprimierenden Huh-T7-Zellen sowie durch die Kotransfektion des Plasmides pCAGGS-T7 bereitgestellt (Enterlein, 2005). Die Transfektionsansätze werden vereint, für 20 Minuten bei RT inkubiert und anschließend auf die Huh-T7-Zellen gegeben. 15 Stunden nach Transfektion wird das Transfektionsmedium abgenommen, und die Zellen werden nach zweimaligem Waschen mit 2 ml

DMEM(+++) versehen. Nach einer Gesamtinkubationszeit von 40 Stunden werden die Zellen geerntet und für einen CAT-Reportergenassay (3.3.3) oder eine Northern Blot-Analyse (3.3.4) verwendet.

3.2.4 Anzucht und Vermehrung von MARV

Kultivierte und zu 80 Prozent konfluente Vero-Zellen werden in 175 cm² Zellkulturflaschen mit MARV-Musoke und einer multiplicity of infection (moi) von 0,01 infiziert. Die Zellen werden mit 10 ml einer entsprechenden Virusverdünnung inokuliert und für eine Stunde bei 37 °C (5 % CO₂) im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss werden 30 ml DMEM(++) und FCS mit einer Endkonzentration von 2 % zugegeben und bis zum Auftreten eines zytopathischen Effekts bei 37 °C (5 % CO₂) im Brutschrank aufbewahrt. Sieben bis acht Tage nach Infektion werden die Überstände geerntet. Die Viren werden, wie bei Funke et al. (1995) beschrieben, aufgereinigt. Um außerhalb eines Labors der Sicherheitsstufe 4 mit MARV-Präparationen arbeiten zu können, werden diese mittels γ -Bestrahlung oder durch die Zugabe von SDS mit einer (Endkonzentration: 1 %) und zehnminütiges Kochen inaktiviert.

3.3 Biochemische und immunologische Methoden

3.3.1 Radioaktive Markierung und Lyse von Huh7-Zellen

Mit Hilfe des [³⁵S]Promix Cell-labelling Mix werden transfizierte Huh7-Zellen (3.2.2) radioaktiv markiert. 12 Stunden nach der Transfektion wird das Medium abgenommen. Die Huh7-Zellen werden einmal mit DMEM ohne Methionin und Cystein gewaschen, mit 1 ml desselben Mediums versetzt und für eine Stunde bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert. Im Anschluss wird das Medium entfernt und durch 1 ml DMEM(+Q) mit 5 μ l [³⁵S]Promix Cell-labelling Mix ersetzt. Nach einer zweistündigen Markierung bei 37 °C wird der Überstand verworfen, und die Zellen werden zweimal mit kaltem PBS_{def} gewaschen. Die markierten Huh7-Zellen werden in 500 μ l KoIP-Puffer abgekratzt und durch eine zweiminütige Beschallung mit den längsten Impulsen im Branson Sonifier 450 bei 4 °C aufgeschlossen. Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen werden mittels einer zehnminütigen Zentrifugation bei 10.000 UpM entfernt. Die Überstände werden in neue Reaktionsgefäße überführt und für eine Immunpräzipitationsanalyse (3.3.8) verwendet.

3.3.2 Vernetzung von Proteinen

Die zu vernetzenden mit einem Flag-Epitop markierten Proteine werden mit Hilfe des T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems in vitro translatiert (3.3.7) und mit Hilfe einer speziellen Anti-Flag M2-Agarose in 1 ml Hapes-Puffer für drei Stunden auf dem Überkoprotierer (ÜKR) präzipitiert. Nach dreimaligem Waschen des Agarose-

pellets mit je 800 µl Hepes-Puffer wird dieses in 200 µl Hepes-Puffer resuspendiert und mit 20 µl eines Flag-Peptides in einer Endkonzentration von 300 µg/ml versetzt. Die Elution der gekoppelten Flag-markierten Proteine erfolgt für drei Stunden bei 4 °C auf dem ÜKR. Die Ansätze werden im Anschluss für zwei Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Je 20 µl der Überstände werden mit verschiedenen Konzentrationen von Glutaraldehyd (0,5; 1; 5; 10; 20 mM in H₂O) oder EGS (0,1; 0,5; 1; 2; 5 mM in DMSO) für 30 Minuten bei RT vernetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 µl 1 M Tris (pH 8,5) und einer Inkubation von fünf Minuten abgestoppt. Die Proben werden mit 4x Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE (3.3.9.1) aufgetrennt und mit dem Bio-Imager Analyzer ausgewertet (3.3.9.2).

3.3.3 CAT-Reportergenassay

Zur Durchführung einer Reporteranalyse werden Huh-T7-Zellen 40 Stunden nach der Transfektion (3.2.3) zunächst zweimal mit eiskaltem PBS_{def} gewaschen und für 15 Minuten in 150 µl 1x Reporter-Lysis-Puffer auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Zelldebris und Zelllysate werden im Anschluss abgeschabt, in Reaktionsgefäße überführt und für 30 Sekunden gemischt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 10.000 UpM werden die Zelllysate für die Bestimmung der CAT-Aktivität oder eine Western Blot-Analyse verwendet (3.3.5).

Im MARV-Transkriptionssystem (3.2.3) wird MARV-spezifische Transkription über die gebildete CAT-Aktivität detektiert. Die CAT katalysiert die Übertragung von Acetyl-Gruppen des Donors Acetyl-Coenzym A auf den Akzeptor Chloramphenicol. Es entstehen die Produkte 1'-Acetylchloramphenicol, 3'-Acetylchloramphenicol und 1',3'-Acetylchloramphenicol, die in ihrem Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie (DC) unterschieden werden können.

Ansatz:	0,2 – 4 µl	Zelllysate
	150 µl	250 mM Tris/HCl (pH 7,5)
	1 µl	Acetyl-Coenzym A (70 mg/ml)
	2 µl	[¹⁴ C]-Chloramphenicol (25 µCi/ml)

Die Katalyse des Ansatzes bei 37 °C wird nach drei Stunden durch Zugabe von 750 µl Ethylacetat gestoppt. Nach kräftigem Mischen und einer zweiminütigen Zentrifugation bei 10.000 UpM wird die obere organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Vakuumverdampfer vollständig eingedampft. Das dabei entstehende Pellet wird in 10 µl Ethylacetat aufgenommen und auf eine mit Kieselgel beschichtete DC-Platte aufgetropft. Die Platte wird in eine abgeschlossene Kammer in DC-

Laufpuffer gestellt bis die Lauffront den oberen Rand erreicht. Die Auswertung erfolgt über die Exposition der DC-Platte mit einer Bio-Imagingplatte sowie dem Bio-Imager Analyzer (3.3.9.2).

3.3.4 Elektrotransfer von RNA (Northern Blot)

Die MCN-resistente RNA wird mit Hilfe eines Formaldehyd-RNA-Agarosegels (3.1.4.3) aufgetrennt und mit einem Vakuum-Blotter auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Diese wird vorher kurz mit Methanol benetzt und anschließend in alkalischem Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgt für 90 Minuten bei 50 mbar. Im Anschluss wird die Membran für zehn Minuten in 200 mM Phosphatpuffer neutralisiert und für zwei Minuten auf einem UV-Schirm fixiert.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Prähybridisierung dient zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen. 19 ml einer vorgewärmten Hybridisierungslösung nach Collins (Grosfeld et al., 1995) werden mit 1 ml Heringsspermien-DNA versetzt und zusammen mit der Blotmembran bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen unter Rotation inkubiert. Nach drei bis sechs Stunden werden 16 ml der Hybridisierungslösung entnommen. Zu den verbleibenden 3 ml werden 3-10 µl einer DIG-markierten Sonde (Enterlein, 2005) zugegeben, die zuvor drei Minuten bei 95 °C denaturiert und für drei Minuten auf Eis inkubiert wird. Die Hybridisierung wird für eine Inkubationszeit von mindestens 12 Stunden bei 65 °C fortgesetzt.

Detektion

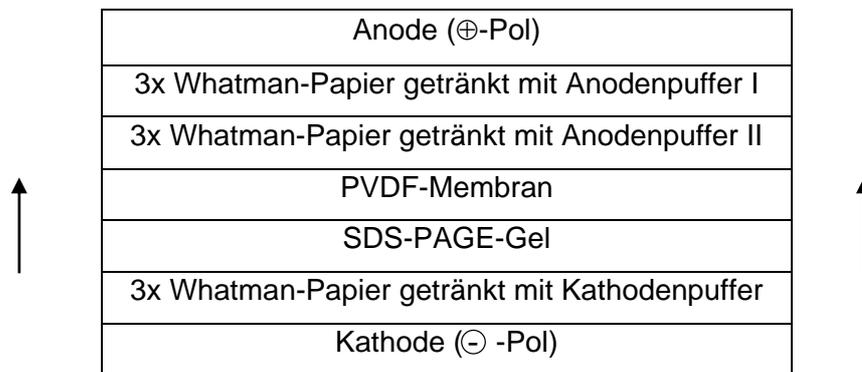
Nach der Hybridisierung wird die Membran für fünf Minuten bei RT in RNA-Waschpuffer geschwenkt und anschließend für zwei Stunden in frischem RNA-Waschpuffer bei 65 °C im Hybridisierungssofen gewaschen. Um Rückstände wie SDS und SSC zu entfernen, wird die Blotmembran zunächst für fünf Minuten in Chemolumineszenz-Puffer I geschwenkt und für eine Stunde in 60 ml Chemolumineszenz-Puffer I mit 2 % RNA-Blockingreagenz auf dem Schüttler inkubiert.

Zur Detektion wird die Membran mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 für 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler behandelt. Nicht gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen für je fünf Minuten in Chemolumineszenz-Puffer I mit 0,3 % Tween 20 entfernt. Die Blotmembran wird für weitere fünf Minuten in Chemolumineszenz-Puffer II äquilibriert und fünf Minuten mit einer CDP-Star-Lösung in einer Verdünnung von 1:200 in Chemolumineszenz-Puffer II inkubiert. Nach Entfernung von überschüssigem Reagenz wird die Membran in eine Folie eingeschweißt. Die Position der DIG-markierten RNA/Sonden-Hybride kann

durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert werden, dessen Entwicklung mit dem Optimax 2010 erfolgt (3.3.9.2).

3.3.5 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Der Western Blot ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen innerhalb eines Proteingemisches. Dabei werden die Proteine irreversibel von einer SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Zur Durchführung eines Semi-Dry-Blots (Kyhse-Andersen, 1984) werden je drei Blatt Whatman-Papier (6 x 9 cm) mit Anodenpuffer I, Anodenpuffer II oder Kathodenpuffer befeuchtet. Eine ebenso große PVDF-Membran wird zunächst kurz mit Methanol benetzt, in dH₂O getränkt und anschließend in Anodenpuffer II äquilibriert. Der Western Blot in einer Fastblot-Apparatur (Biometra) zeigt folgenden Aufbau:



Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten des Blots werden durch vorsichtiges Überrollen mit einer Glaspipette entfernt. Die Übertragung der Proteine erfolgt für 90 Minuten bei 0,8 mA/cm². Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wird die Membran nach dem Elektrotransfer über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer inkubiert. Im Anschluss wird die Membran dreimal zehn Minuten in PBS_{def}/0,1 % Tween 20 gewaschen und für eine Stunde mit einem spezifischen Erstantikörper bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten von je zehn Minuten in PBS_{def}/0,1 % Tween 20 wird die Membran für eine Stunde mit einem POD-gekoppelten Zweitantikörper behandelt und im Anschluss erneut zweimal je zehn Minuten in PBS_{def}/0,1 % Tween 20 sowie viermal zehn Minuten mit PBS_{def} gewaschen. Die Detektion des POD-gekoppelten Zweitantikörpers erfolgt durch Chemilumineszenz. Die Membran wird auf eine Folie gelegt und mit einem Gemisch aus SuperSignal[®] und Luminol/Enhancer-Lösung für fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach Entfernung von Luftblasen und überschüssigem Detektionsreagenz wird die Membran in Folie eingeschweißt. Die anschließende Exposition auf einem Röntgenfilm sowie dessen

Entwicklung erfolgt mit Hilfe des Optimax 2010 in der Dunkelkammer. Folgende Antikörperverdünnungen werden in dieser Arbeit für Western Blot-Analysen verwendet:

α MARV-NP 2B10, Maus, monoklonal	1:1000
α MARV-VP35/2, Meerschweinchen (16.04.1998)	1:5000
Ziege α Maus, POD	1:40.000
Ziege α Meerschweinchen, POD	1:25.000

3.3.6 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Mittels Immunfluoreszenzanalyse können virale Proteine intrazellulär lokalisiert werden. Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz wird auch als sogenannte Sandwich-Technik bezeichnet, da die mit dem ersten Antikörper entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem zweiten fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen werden. Nach der Transfektion von Huh7-Zellen (3.2.2) werden diese zunächst zweimal mit kaltem PBS_{def} gewaschen und mit 3 %igem Paraformaldehyd in PBS_{def} für 15 Minuten bei RT fixiert. Das Fixierungsmittel wird durch zweimaliges Waschen mit PBS_{def} entfernt und durch eine zehnmütige Behandlung mit einer 0,1 M Glycin-Lösung neutralisiert. Um das Zellinnere der Antikörperbehandlung zugänglich zu machen, werden die Zellen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS_{def} für zehn Minuten bei RT permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS_{def} werden die Zellen mit Blockierungspuffer für mindestens zehn Minuten überschichtet. Die fixierten und permeabilisierten Zellen werden mit dem ersten antigenspezifischen Antikörper für eine Stunde in einer dunklen und feuchten Kammer inkubiert. 20 μ l des verdünnten Antikörpers werden auf Parafilm gegeben und das Deckglas mit der zellbewachsenen Seite darauf gelegt. Sowohl die Verdünnungen der Primär- als auch der Sekundärantikörper werden in Blockierungspuffer angesetzt. Um ungebundene Primärantikörper zu entfernen, werden die Deckgläser dreimal mit PBS_{def} gewaschen und anschließend mit einem Zweitantikörper für eine Stunde in einer dunklen und feuchten Kammer behandelt. Der Zweitantikörper ist spezifisch gegen den ersten Antikörper gerichtet und durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der durch das UV-Licht des Fluoreszenzmikroskopes angeregt wird. Die Deckgläser werden anschließend dreimal mit PBS_{def} gewaschen, kurz in dH₂O gespült und mit Fluoprep auf einem Objektträger eingedeckt. Nach dem Trocknen der Eindeckflüssigkeit können die gefärbten Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Verdünnungsverhältnisse der verwendeten Antikörper:

α -Flag [®] polyklonaler AK vom Kaninchen	1:200
α -MARV-NP monoklonaler AK 2B10 von der Maus	1:25
Ziege α Kaninchen, Rhodamin-gekoppelt	1:200
Ziege α Maus FITC-gekoppelt	1:200
DAPI	1:10.000

3.3.7 In vitro Translation

Unter Verwendung von Plasmid-DNA und des TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/ Translation Kits können [³⁵S]-markierte Proteine im zellfreien System synthetisiert werden. Sofern dem zu exprimierenden Gen ein T7-Promotor vorgeschaltet ist, vermitteln das im TNT[®] T7 Quick Master Mix enthaltene Kaninchen-Retikulozytenlysat sowie die T7-RNA-Polymerase sowohl die Transkription als auch die Translation.

Ansatz:

2 μ g	Plasmid-DNA mit T7-Promotor
40 μ l	TNT [®] T7 Quick Master Mix
2 μ l	[³⁵ S]Promix Cell-labelling Mix
ad 50 μ l	nukleasefreies dH ₂ O

Um Interaktionsstudien viraler Proteine durchzuführen, werden je 1 μ g Plasmid-DNA zweier möglicher Bindungspartner in einem Ansatz kotranslatiert. Um die DNA-Mengen gleich zu halten, wird bei Translation von nur einem Protein der Translationsansatz durch 1 μ g des Vektors pTM1 komplementiert. Die Reaktionsansätze werden auf Eis pipettiert und für 60 bis 90 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die radioaktiv markierten Proteine werden mittels SDS-PAGE (3.3.9.1) aufgetrennt und mit dem Bio-Imager (3.3.9.2) analysiert.

3.3.8 Immunpräzipitation

Mittels Immunpräzipitation oder Koimmunpräzipitation werden Proteine durch die Kopplung von Antigen-Antikörper-Komplexen an Protein-A-Sepharose gefällt.

Äquilibrierung von Protein-A-Sepharose

250 mg Protein-A-Sepharose werden in 4 ml Tris/KCl- oder KoIP-Puffer aufgenommen, gut gemischt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die gequollene Sepharose wird anschließend eine Minute bei 5000 UpM pelletiert und dreimal mit je 1 ml Tris/KCl-

oder KoIP-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird die Protein-A-Sepharose in einem Volumenteil (VT) Tris/KCl- bzw. KoIP-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Präadsorption

5 µl in vitro Translat (3.3.7) werden zunächst in 500 µl Tris/KCl-Puffer aufgenommen und für 30 Minuten bei 4 °C und 14.000 UpM zentrifugiert. Um den Hintergrund an unspezifischen Proteinen möglichst gering zu halten, werden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 20 µl Protein-A-Sepharose versetzt. Zur Durchführung einer Immunpräzipitationsanalyse aus Huh7-Zellen werden die Zelllysate (3.2.2, 3.3.1) ebenfalls mit 20 µl Protein-A-Sepharose versehen. Die Präinkubation erfolgt bei 4 °C für eine Stunde auf dem ÜKR. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 10.000 UpM werden die Überstände wiederum in neue Reaktionsgefäße überführt.

Spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion

Die Überstände werden bei 4 °C für 1,5 Stunden mit dem/den spezifischen Antikörper(n) auf dem ÜKR inkubiert.

Verdünnungsverhältnisse der verwendeten Antikörper:

α-Flag® M2 monoklonaler AK	1:500
α MARV-VP35/2, Meerschweinchen (16.04.1998)	1:1000
α NC/1 M NaCl (11.09.96)	1:500
α EBOV-VP30 Antiserum, rabbit 52/1 3. BE	1:2500

Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe durch Kopplung an Protein-A-Sepharose

Die Ansätze werden nach Zugabe von 20 µl Protein-A-Sepharose bei 4 °C für 1,5 Stunden auf dem ÜKR inkubiert. Die an Protein-A-Sepharose gebundenen Immunkomplexe werden für zwei Minuten bei 3.000 UpM abzentrifugiert. Nach Absaugen der Überstände werden die Sedimente viermal mit 800 µl Tris/KCl-Puffer gewaschen, wobei für den letzten Waschschrift ein Tris/KCl-Puffer ohne BSA verwendet wird. Die Immunpräzipitate aus Huh7-Zellen werden entsprechend mit KoIP-Puffer gewaschen. Die verbleibenden Protein-A-Sepharose-Pellets werden mit 20 µl 4x Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C aufgekocht. Die Analyse der Immunpräzipitate erfolgt mittels SDS-PAGE (3.3.9.1) und dem Bio-Imager Analyzer (3.3.9.2).

3.3.9 Elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung von Proteinen

3.3.9.1 SDS-PAGE

SDS (Natriumdodecylsulfat) überdeckt die Eigenladung von Proteinen, so dass negativ geladene SDS-Protein-Komplexe proportional zum Molekulargewicht entstehen. Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) können Proteine über diese unterschiedlichen negativen Ladungen aufgetrennt werden. Das Gelsystem besteht aus einem 4%igen Sammelgel und einem Trenngel, dessen Prozentigkeit von der Größe der aufzutrennenden Proteine abhängt.

	Sammelgel:		Trenngel:	
	4 %	10 %	12 %	15 %
dH ₂ O	1,4 ml	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml
30 % Polyacrylamid-Lösung (rotiphorese® Gel 30)	0,33 ml	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml
PAGE-Sammelgelpuffer	0,27 ml	-	-	-
PAGE-Trenngelpuffer	-	1,35 ml	1,35 ml	1,35 ml
10 % APS	0,02 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

Die aufzutrennenden Proteingemische werden mit 4x Proteinprobenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Das aufzutragende Probenvolumen beträgt 20 µl pro Geltasche. Durch das Mitführen von Proteinmarkern (2.9.3) lassen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln. Die Gelelektrophorese erfolgt in einer Keutz®-Minigelkammer mit Proteingellaufpuffer bei 25 mA pro Gel. Im Anschluss werden die SDS-Gele auf dem Schüttler in Fixierer/Entfärber-Lösung inkubiert, kurz in Wasser gespült, für 30 Minuten auf Whatmann-Papier mit Hilfe eines Vakuum-Geltrockners getrocknet und durch Autoradiographie oder mit dem Bio-Imager analysiert (3.3.9.2).

3.3.9.2 Autoradiographie und Bio-Imager-Analyse

Radioaktiv markierte Proteine werden nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE (3.3.9.1) durch Autoradiographie oder mit dem Bio-Imager Analyzer BAS-1000 sichtbar gemacht. Die markierten Proteinbanden werden durch Exposition eines Röntgenfilms bzw. durch Exposition einer Bio-Imagingplatte nachgewiesen. Die radioaktive Strahlung der markierten Proteine versetzt Elektronen in der Bio-Imagingplatte in einen

angeregten Zustand. Durch das Abtasten mit einem Helium-Neon-Laser werden die Elektronen erneut angeregt, fallen dann in ihren ursprünglichen Energiezustand zurück und emittieren dabei Licht. Die Daten werden für den Computer digitalisiert und über das Computerprogramm TINA 2.0 analysiert. Auf dem Röntgenfilm erscheinen die markierten Proteine nach dessen Entwicklung als dunkle Banden. Die Expositionszeit variiert zwischen 30 Minuten und mehreren Tagen.

4 Ergebnisse

Zielstellung dieser Arbeit war es, die Homooligomerisierung des MARV VP35 zu charakterisieren sowie deren Funktion hinsichtlich der viralen RNA-Synthese und der Morphogenese des Nukleokapsidkomplexes zu untersuchen. Ferner sollte die Stöchiometrie der VP35-Homooligomere ermittelt werden.

4.1 Homooligomerisierung des Marburg-Virus VP35

Das MARV VP35 ist Bestandteil des Nukleokapsidkomplexes und in die Ausbildung verschiedener Protein-Protein-Komplexe mit den Nukleokapsidproteinen NP und L involviert (Becker et al., 1998). Außerdem konnte in einem in vitro System gezeigt werden, dass das VP35 in der Lage ist, mit sich selbst zu interagieren (Möller, 2000).

4.1.1 Homooligomerisierung des VP35 in Huh7-Zellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch intrazellulär eine Interaktion des VP35 mit sich selbst zu beobachten ist. Zur T7-gestützten Expression der Proteine VP35_{Flag} und VP35 wurden die Plasmide pTM1-VP35_{Flag} und pTM1-VP35 entweder einzeln oder gemeinsam in Huh7-Zellen transfiziert (3.2.2). 15 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen metabolisch mit [³⁵S]Promix Cell-labelling Mix markiert, lysiert (3.3.1) und mit Protein-A-Sepharose vorinkubiert. Zum Nachweis einer möglichen Interaktion wurden die Ansätze mit einem gegen das Flag-Epitop gerichteten Antikörper (α -Flag M2 AK) behandelt. Die Koimmunpräzipitate (3.3.8) wurden mittels SDS-PAGE (3.3.9.1) aufgetrennt und die getrockneten Gele mit dem Bio-Imager sowie dem Computerprogramm TINA 2.0 (3.3.9.2) ausgewertet.

Die Verwendung einer Flag-markierten Form des VP35 (VP35_{Flag}) mit einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa ermöglichte die Unterscheidung zum Wildtyp-VP35 (36 kDa) und bildete somit die Voraussetzung für eine Koimmunpräzipitationsanalyse. Abbildung 6 zeigt, dass das Flag-markierte VP35 (VP35_{Flag}) sowohl mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen α -Flag M2 AK (Spur 3) als auch mit einem α -NC AK (Spur 4) präzipitiert werden konnte. Das VP35 ließ sich nur mit dem α -NC AK präzipitieren (Spur 5) und zeigte keine Kreuzreaktion mit dem ebenfalls verwendeten α -Flag M2 AK (Spur 6). Wie in Spur 1 zu sehen ist, wurde nach Behandlung des Koexpressionsansatzes mit dem α -Flag M2 AK das VP35 durch das VP35_{Flag} spezifisch mitgefällt. Spur 2 zeigt zur Kontrolle die Präzipitation mit dem α -NC AK, welcher beide Proteine detektierte. Das VP35 des MARV ist somit in der Lage, sowohl in vitro als auch in vivo, mit sich selbst zu interagieren (Möller et al., 2005).

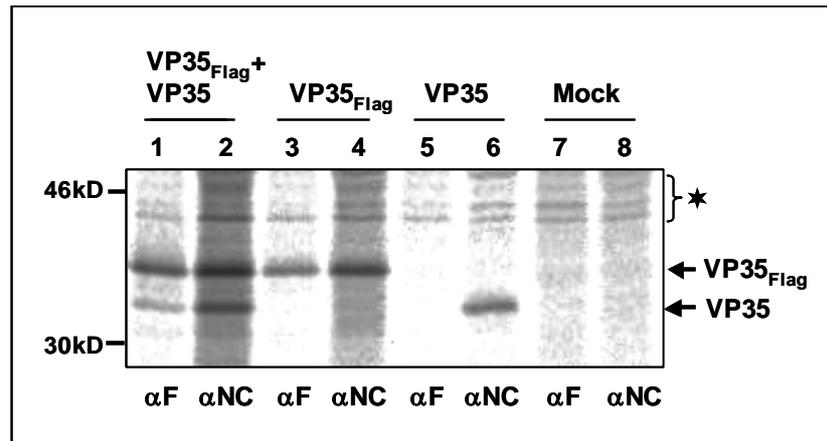


Abbildung 6: Immunpräzitationsanalyse von VP35_{Flag} und VP35 nach Einzel- und Koexpression aus Huh7-Zellen. Zur Expression der Proteine VP35_{Flag} und VP35 wurden die Plasmide pTM1-VP35_{Flag} bzw. pTM1-VP35 in subkonfluente Huh7-Zellen einzeln oder kotransfiziert. Zusätzlich wurde zur Expression der T7-RNA-Polymerase das Plasmid pCAGGS-T7 kotransfiziert. 15 h nach Transfektion wurden die Zellen radioaktiv markiert und lysiert. Anschließend wurde unter Verwendung eines α -Flag M2 AK und eines α -NC Antiserums eine Koimmunpräzitationsanalyse durchgeführt. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Bio-Imager ausgewertet. Die koexprimierten Proteine sind oberhalb und die zur Detektion verwendeten AK unterhalb der Abbildung gezeigt. Rechtsseitig sind die Positionen der untersuchten Proteine dargestellt. Bei den mit (*) gekennzeichneten Banden handelt es sich um unspezifische zelluläre Proteine.

4.1.2 Lokalisation der Homooligomerisierungsdomäne des VP35

Durch eigene Vorarbeiten konnte die für die Homooligomerisierung des MARV VP35 verantwortliche Domäne näher eingegrenzt werden (Möller, 2002).

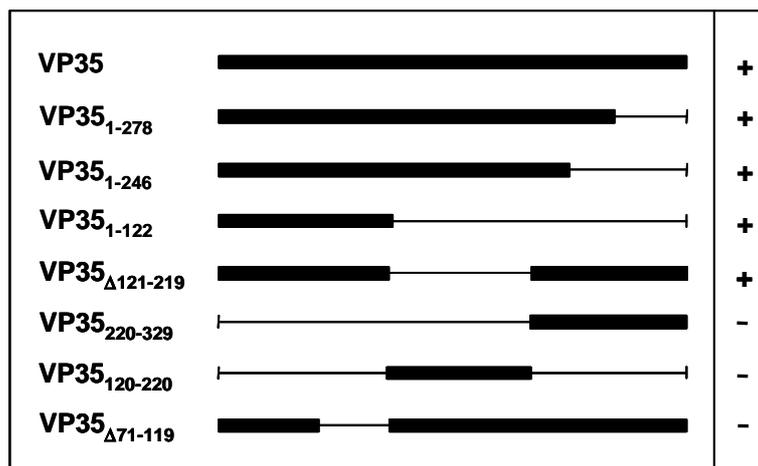


Abbildung 7: Schematische Darstellung des VP35 und der untersuchten VP35-Deletionsmutanten. VP35_{Flag} wurde zusammen mit den entsprechenden VP35-Deletionsmutanten in vitro translatiert und anschließend mittels Koimmunpräzitation analysiert. Für die mit (+) gekennzeichneten VP35-Deletionsmutanten konnte eine Interaktion mit VP35_{Flag} detektiert werden. Die mit (-) gekennzeichneten VP35-Deletionsmutanten waren nicht in der Lage, mit VP35_{Flag} zu interagieren.

Koimmunpräzitationsanalysen der in Abbildung 7 dargestellten VP35-Deletionsmutanten haben gezeigt, dass sich die Homooligomerisierungsdomäne des MARV VP35 auf dem N-Terminus des Proteins befindet.

Nach Deletion der Aminosäuren 71 bis 119 (VP35 $_{\Delta 71-119}$) konnte keine Kopräzitation mit dem VP35_{Flag} nachgewiesen werden. Innerhalb dieses Bereiches befinden sich Aminosäuresequenzen, die nach Computervorhersage Coiled-Coil-Strukturen ausbilden können und vermutlich für die Interaktion des MARV VP35 mit sich selbst verantwortlich sind (Möller et al, 2005).

4.1.2.1 Einfluss des N-Terminus auf die Homooligomerisierung des VP35

Es sollte nun geklärt werden, ob neben der Coiled-Coil-Struktur ein intakter N-Terminus für die Homooligomerisierung des MARV VP35 notwendig ist. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden die N-terminal an das Coiled-Coil-Motiv grenzenden Aminosäuren 1 bis 69 deletiert. Die Expression der daraus resultierenden VP35-Deletionsmutante VP35₇₀₋₃₂₉ zusammen mit dem volle Länge Interaktionspartner VP35_{Flag} erfolgte in vitro unter Verwendung des TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kits (3.3.7). Die anschließend durchgeführte Koimmunpräzitationsanalyse (3.3.8) ist in Abbildung 8 dargestellt. Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten VP35-Mutanten wurden nach Einzelexpression mit den eingesetzten Antikörpern auf eventuell bestehende Kreuzreaktionen getestet und ergaben keine Unspezifitäten (Daten nicht gezeigt).

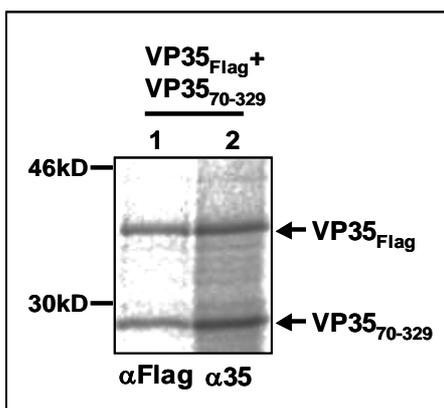


Abbildung 8: Koimmunpräzitationsanalyse von VP35_{Flag} und der VP35-Deletionsmutante VP35₇₀₋₃₂₉. VP35_{Flag} und die VP35-Deletionsmutante VP35₇₀₋₃₂₉ wurden mit Hilfe des TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems in vitro koexprimiert. Zur Koimmunpräzitationsanalyse wurden ein α -Flag M2 AK und ein α -VP35 AK verwendet. Die Analyse der Präzipitate erfolgte über SDS-PAGE und Bio-Imager. Die koexprimierten Proteine sind oberhalb und die zur Detektion verwendeten AK unterhalb der Abbildung gezeigt. Rechtsseitig sind die Positionen der untersuchten Proteine dargestellt.

Die VP35-Deletionsmutante VP35₇₀₋₃₂₉ kosedimentierte bei Präzitation des VP35_{Flag} mit dem α -Flag M2 AK (Spur 1). Zur Expressionskontrolle diente die Fällung des Ansatzes mit einem α -VP35 AK, der sowohl das volle Länge VP35_{Flag} als auch die VP35-Deletionsmutante VP35₇₀₋₃₂₉ erkannte (Spur 2). Dieses Ergebnis verstärkte die Annahme, dass die, durch Computeranalyse identifizierte, Coiled-Coil-Struktur die Homooligomerisierungsdomäne des MARV VP35 repräsentiert.

Abbildung 9: Graphische Darstellung der potentiellen Coiled-Coil-Domäne und der Computeranalyse der Aminosäuresequenzen des VP35 und der VP35-Substitutionsmutanten mit dem Programm COILS 2.2. Oben: Aminosäuresequenz des VP35 im Bereich 70 bis 120. Hydrophobe Aminosäuren in der Sequenz des VP35 an den Positionen a und d im Bereich der putativen Coiled-Coil-Domäne wurden unterstrichen und durch Fettdruck hervorgehoben. (A-D) Ergebnis der Coiled-Coil-Analyse. Die Wahrscheinlichkeiten für die Ausbildung einer Coiled-Coil-Struktur sind auf der X-Achse und die dafür entsprechenden Aminosäurebereiche auf der Y-Achse aufgetragen. (A) Analyse der Aminosäuresequenz des Wildtyp-VP35. (B) L90A. (C) L104A. (D) L90/104A.

Wie bereits beschrieben wurde, konnte für den Bereich der Aminosäuren 70 bis 120 des MARV VP35, dessen Sequenz mit der heptameren Periodizität exemplarisch gezeigt ist, die Ausbildung einer Coiled-Coil-Struktur vorhergesagt werden (Abb. 9A). Es wurden verschiedene Aminosäureaustausche gegen Alanin an den Positionen a und d vorgenommen und mittels Computeranalyse geprüft. Nach Substitution der Leucine an Position 90 (L90A) oder 104 (L104A) zu Alanin verminderte sich die Wahrscheinlichkeit zur Anordnung einer Coiled-Coil-Struktur um etwa 50 Prozent (Abb. 9B und 9C). Der Austausch beider Leucine zu Alanin (L90/104A) erwies sich als besonders kritisch und schien einen starken Einfluss auf die Ausbildung der Coiled-Coil-Struktur zu haben (Abb. 9D).

4.1.3.2 Interaktionsstudien der VP35-Substitutionsmutanten

Die durch die Computer-gestützte Analyse gewonnenen Daten (4.1.3.1) sollten im Folgenden experimentell verifiziert werden. Mittels ortsgerichteter Mutagenese (3.1.2) wurden die Aminosäuren Leucin 90 oder/und Leucin 104 durch Alanin ersetzt. Auf der Grundlage der Konstrukte pTM1-VP35_{Flag} und pTM1-VP35 wurden folgende Plasmidpaare hergestellt: pTM1-VP35L90A_{Flag} und pTM1-VP35L90A, pTM1-VP35L104A_{Flag} und pTM1-VP35L104A sowie pTM1-VP35L90/104A_{Flag} und pTM1-VP35L90/104A. Ausgehend von diesen Konstrukten wurden die VP35-Substitutionsmutanten zusammen mit deren Flag-markierten Varianten *in vitro* translatiert und metabolisch mit [³⁵S]Promix Cell-labelling Mix markiert (3.3.1). Die anschließend durchgeführte Koimmunpräzipitationsanalyse (3.3.7) ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Laufunterschiede der VP35-Substitutionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp-VP35 sind möglicherweise auf eine veränderte Bindung von SDS zurückzuführen. Wie in einigen Spuren zu erkennen ist, traten neben den erwarteten Proteinen Abbaubanden verschiedener Größen auf, die möglicherweise aus der Verwendung des TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kits resultieren. Da die Ribosomen in diesem *in vitro* System auch interne Translationsstarts erkennen, kommt es zusätzlich zur Expression kleinerer Proteine. So entspricht das Molekulargewicht der auftretenden Proteine der Größe, die zu erwarten wäre, wenn ein internes AUG als Startkodon benutzt wird.

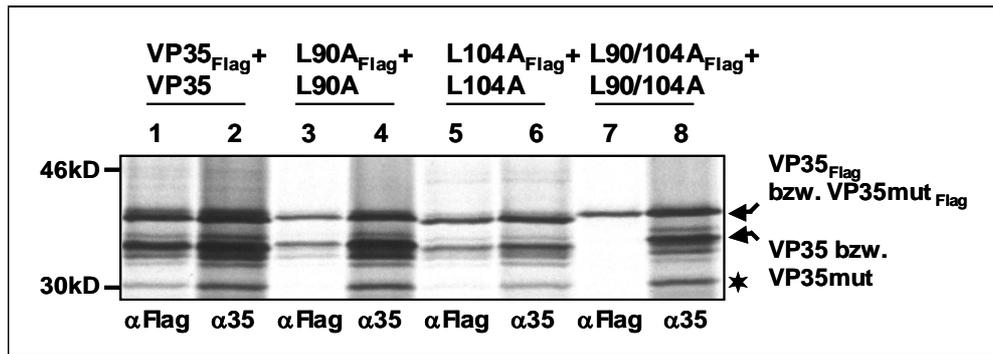


Abbildung 10: Koimmunpräzitationsanalyse von VP35 und den VP35-Substitutionsmutanten. Das VP35_{Flag} und das VP35 sowie die VP35-Substitutionsmutanten L90A_{Flag} und L90A, L104A_{Flag} und L104A bzw. L90/104A_{Flag} und L90/104A wurden zusammen mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kit synthetisiert. Anschließend wurden die Translationsansätze mit dem α-Flag M2 AK oder dem α-VP35 AK gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Bio-Imager ausgewertet. Die koexprimierten Proteine sind oberhalb und die zur Detektion verwendeten AK unterhalb der Abbildung gezeigt. Rechtsseitig sind die Positionen der untersuchten Proteine dargestellt. VP35mut steht zusammenfassend für die jeweiligen VP35-Substitutionsmutanten. Die mit (*) gekennzeichneten Proteine resultieren aus der Verwendung des in vitro Expressionsystems.

Das Wildtyp-VP35 sowie die VP35-Substitutionsmutanten L90A und L104A kosedimentierten bei Präzipitation des VP35_{Flag} bzw. des L90A_{Flag} oder L104A_{Flag} mit dem α-Flag M2 AK (Spur 1, 3 und 5). In den Spuren 2, 4 und 6 ist die Fällung der entsprechenden Ansätze mit dem α-VP35 AK zu sehen. In Spur 7 ist die Koimmunpräzitationsanalyse der VP35-Substitutionsmutante L90/104A_{Flag} mit dem L90/104A dargestellt, welches bei Fällung mit dem α-Flag M2 AK nicht mitgerissen wurde. Durch die Expressionskontrolle konnte gezeigt werden, dass die nicht markierte Variante L90/104A im Ansatz vorhanden war (Spur 8). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Interaktion des MARV VP35 mit sich selbst über eine Coiled-Coil-Struktur innerhalb des N-Terminus des Proteins vermittelt wird. Die Substitution beider Leucine an Position 90 und 104 führte zu einer Destabilisierung dieser Struktur und verhinderte somit die Homooligomerisierung des Proteins (Möller et al., 2005).

4.1.3.3 Übertragung der Coiled-Coil-Domäne des Marburg-Virus VP35 auf ein monomeres Reporterprotein

Es war nun von Interesse, ob die identifizierte Coiled-Coil-Domäne des MARV VP35 ausreicht, um dessen Homooligomerisierung zu vermitteln. Hierzu wurden verschieden lange N-terminale Fragmente des MARV VP35, die die Coiled-Coil-Domäne beinhalteten, an ein monomeres Reporterprotein (rep) bzw. an eine Flag-markierte Variante (rep_{Flag}) fusioniert. Mittels Koimmunpräzipitation wurde untersucht, ob die VP35-Fragmente die Interaktion des Reporterproteins vermitteln konnten. Als Reporterprotein (rep) wurde eine Mutante des EBOV VP30 (VP30_{L100/102A}) gewählt, die

nicht in der Lage war, Homooligomere auszubilden (Hartlieb et al., 2003). In Abbildung 11A sind die Fusionsmutanten, die ebenfalls in einer Flag-markierten Variante hergestellt wurden, dargestellt. Die Konstrukte wurden *in vitro* translatiert und mittels Koimmunpräzipitation (3.3.7, 3.3.8) analysiert. Durch die Fusion der N-terminalen Aminosäuren 1 bis 150 des MARV VP35 konnte die Interaktion des monomeren Reporterproteins vermittelt werden. Zur weiteren Charakterisierung wurden zwei Fusionsmutanten, die über die Aminosäuren 70 bis 150 bzw. 70 bis 120 des MARV VP35 verfügten, eingesetzt. Beide waren in der Lage, mit der entsprechenden Flag-markierten Version nach Koexpression zu interagieren. Zur weiteren Eingrenzung wurde die Coiled-Coil-Domäne gekürzt und eine Fusionsmutante, die die Aminosäuren 70 bis 110 (70-110-rep) enthielt, konstruiert und *in vitro* translatiert (3.3.7). Die im Anschluss durchgeführte Koimmunpräzipitationsanalyse (3.3.8) ist in Abbildung 11B dargestellt. In Spur 1 ist zur Kontrolle die Präzipitation des monomeren Reporterproteins rep_{Flag} mit dem α -Flag M2 AK gezeigt, wobei die nicht markierte Form (rep) nicht mitgefällt werden konnte. Dass beide Varianten im Ansatz vorhanden waren, wurde durch die Fällung mit einem α -VP30 Antiserum bestätigt, welches beide Proteine spezifisch erkannte (Spur 2). Im Gegensatz dazu konnte durch das Anhängen der Coiled-Coil-Domäne des MARV VP35 die Interaktion des Reporterproteins vermittelt werden (Spur 3 und 4).

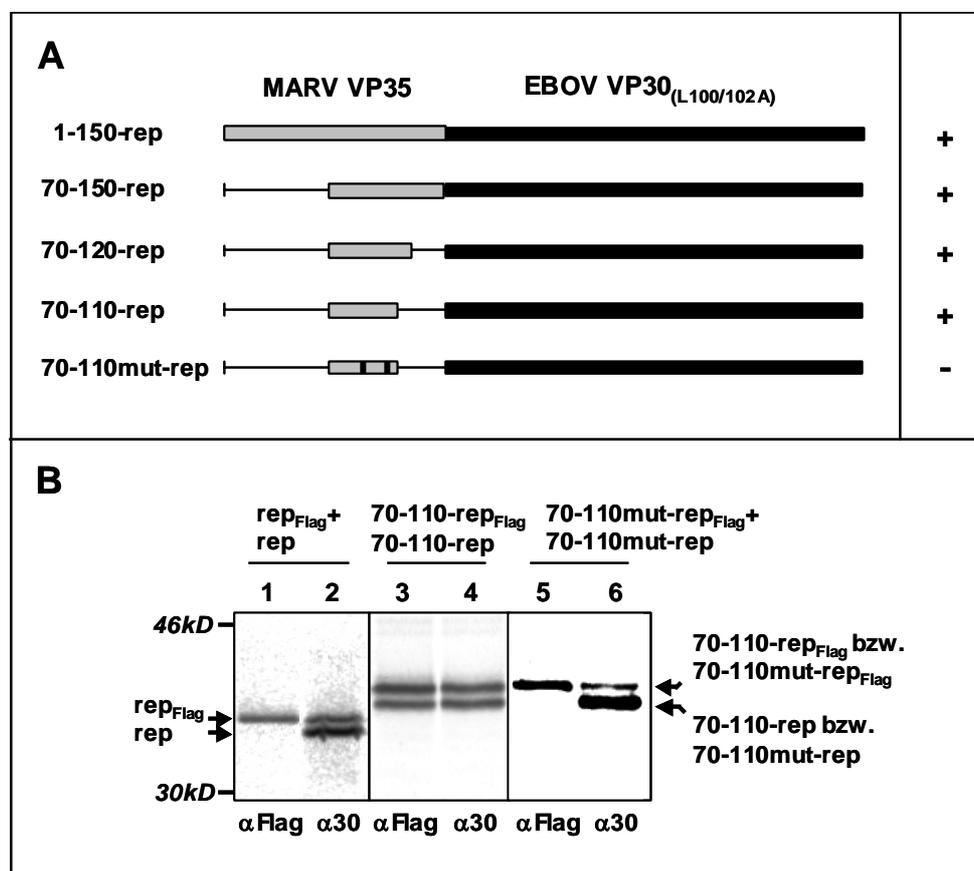


Abb. 11: Übertragung der MARV VP35 Coiled-Coil-Domäne auf ein monomeres Reporterprotein. (A) Schematische Darstellung der mittels Koimmunpräzipitationsanalyse untersuchten Fusionsmutanten und deren Fähigkeit zur Interaktion mit den entsprechenden Flag-markierten Interaktionspartnern. Für die mit (+) gekennzeichneten Fusionsmutanten konnte eine Interaktion nachgewiesen werden. Die mit (-) gekennzeichneten Fusionsmutanten waren nicht in der Lage, zu interagieren. (B) Die Fusionsmutanten 70-110-rep und 70-110mut-rep sowie das unveränderte Reporterprotein wurden zusammen mit ihren Flag-markierten Versionen *in vitro* synthetisiert und mittels Koimmunpräzipitationsanalyse untersucht. Die Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Bio-Imager ausgewertet. Die koexprimierten Proteine sind oberhalb und die zum Nachweis verwendeten AK unterhalb der Abbildung gezeigt. Linksseitig sind die Positionen des mitgeführten Größenmarkers sowie das Flag- bzw. das nicht markierte Reporterprotein angezeigt. Auf der rechten Seite sind die Positionen der untersuchten Fusionsmutanten dargestellt.

Diese Daten zeigen, dass die Aminosäuren 70 bis 110 ausreichend waren, um die Interaktion des Reporterproteins zu vermitteln (Möller et al., 2005). Unterstützt wurde diese Beobachtung durch die Untersuchung einer Fusionsmutante 70-110mut-rep, in der die für die Coiled-Coil-Struktur kritischen Leucine 90 und 104 zu Alanin ausgetauscht wurden. Nach Koexpression mit dem Flag-markierten Interaktionspartner (70-110mut-rep_{Flag}) und Fällung mit dem α -Flag M2 AK konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (Spur 5 und 6).

4.2 Funktionelle Charakterisierung der Homooligomerisierung des Marburg-Virus VP35

Im weiteren Verlauf sollte geklärt werden, ob die Homooligomerisierung des MARV VP35 einen Einfluss auf die Replikation und Transkription der viralen RNA hat.

4.2.1 Funktionelle Untersuchungen der VP35-Substitutionsmutanten

Um diese Fragestellung zu untersuchen, sollten die unter 4.1.3.2 hergestellten volle Länge VP35-Substitutionsmutanten in einem artifiziellen Transkriptions- und Replikationssystem (Mühlberger et al., 1998; 1999) getestet werden. Dieses reverse Genetik-System basiert auf der simultanen T7-gestützten Expression der Nukleokapsidproteine (NP, VP35 und L) und eines MARV-spezifischen Minigenoms. Die T7-RNA-Polymerase wird durch die Verwendung von konstitutiv exprimierenden Huh-T7-Zellen sowie durch die Kotransfektion eines entsprechenden Plasmides (pCAGGS-T7) bereitgestellt (Enterlein, 2005). Das künstliche Minigenom fungiert als Matrize für den Replikations- bzw. Transkriptionskomplex und besteht aus einem Reporterogen (Chloramphenicol-Acetyltransferase; CAT), welches von den cis-aktiven Signalen des MARV-Genoms flankiert ist. Die Transkription des Minigenoms erfolgt durch den sich konstituierenden Nukleokapsidkomplex. Die virale mRNA wird vom zellulären Proteinsyntheseapparat translatiert und führt zur Expression des Reporterproteins, dessen Aktivität mit Hilfe eines CAT-Assays detektiert wird (3.3.3). Im Gegensatz zu transkribierter RNA wird replizierte RNA während der Synthese durch das Nukleoprotein NP verpackt und ist somit resistent gegenüber Nukleasen. Der Nachweis neu synthetisierter und enkapsidierter RNA erfolgt über einen Nuklease-Verdau mit anschließender Northern Blot-Analyse (3.3.4; Mühlberger et al, 1998).

4.2.1.1 Titration der VP35-Substitutionsmutanten

Um für die funktionelle Analyse äquivalente Bedingungen zu gewährleisten, sollten die zu transfizierenden Plasmid-DNA-Mengen der VP35-Substitutionsmutanten zunächst in einem Vorexperiment titriert werden. Huh-T7-Zellen wurden mit den Plasmiden, die für die T7-RNA-Polymerase, das MARV-spezifische Minigenom und die Nukleokapsidproteine NP und L kodieren, transfiziert (3.2.3). Für die Synthese des Wildtyp-VP35 sowie der VP35-Substitutionsmutanten L90A und L104A wurden 0,25; 0,5; 0,75 und 1 µg Plasmid-DNA transfiziert. Auf Grund einer schlechteren Expression wurden für die VP35-Substitutionsmutante VP35L90/104A Plasmid-DNA-Mengen von 0,5; 1; 1,5 und 2 µg eingesetzt (Abb. 13). 40 Stunden nach Transfektion wurden die Zellysate für eine CAT-Aktivitätsbestimmung verwendet (3.3.3), und die Überprüfung der

Expression des VP35 bzw. der VP35-Substitutionsmutanten erfolgte mittels Western Blot-Analyse der Zelllysate (3.3.5).

Die Ergebnisse der Titration der jeweiligen VP35-Konstrukte sind in Abbildung 12E graphisch dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp-VP35 (Abb. 12A) zeigten die VP35-Substitutionsmutanten L90A (Abb. 12B) und L104A (Abb. 12C) eine leichte Reduktion bezüglich der CAT-Aktivität, wogegen bei Einsatz der VP35-Substitutionsmutante L90/104 keine Transkriptionsaktivität festgestellt werden konnte (Abb. 13D).

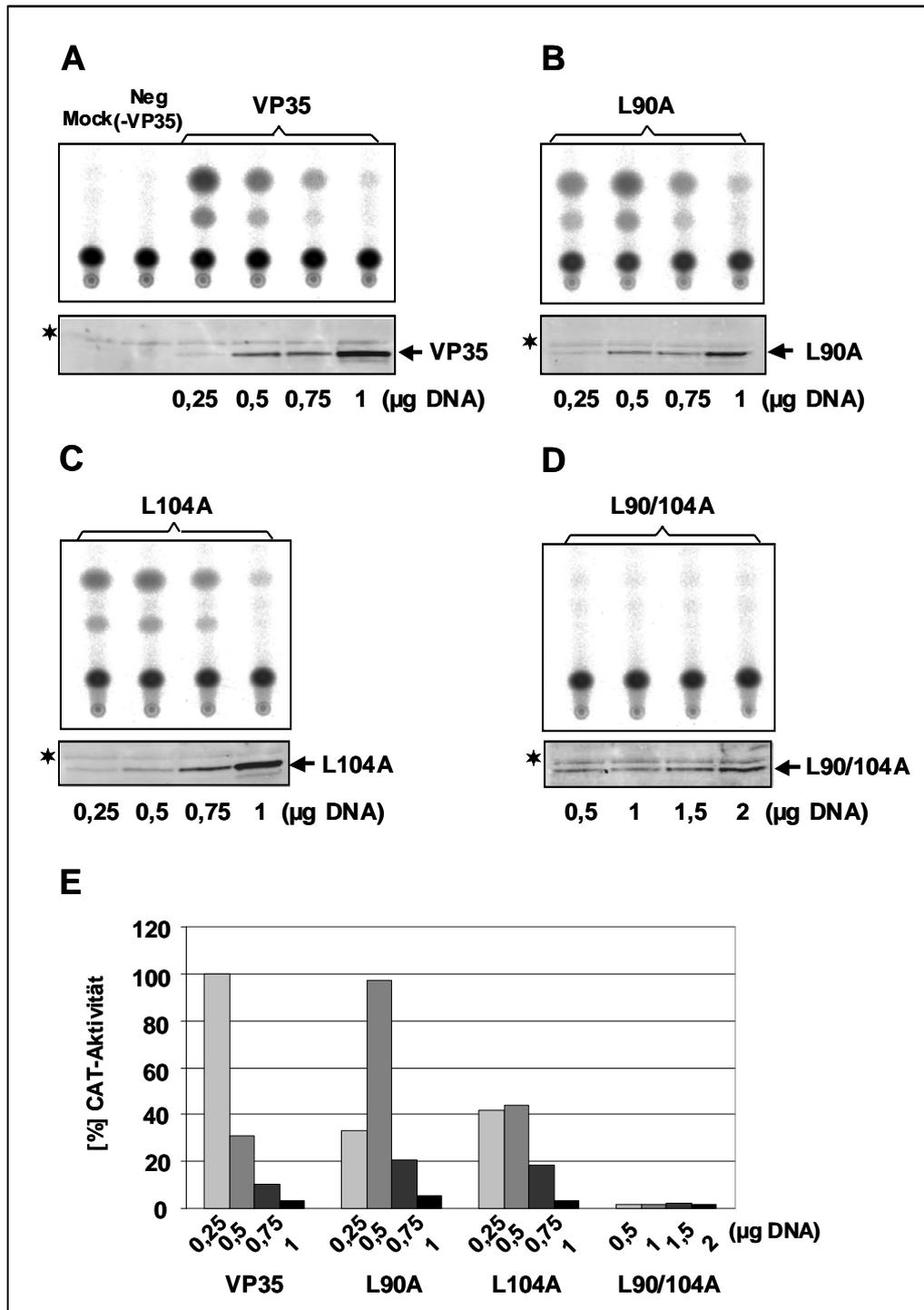


Abbildung 12: Titration von VP35 und der VP35-Substitutionsmutanten in dem MARV-spezifischen Minigenomsystem. Huh-T7-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für das MARV-spezifische Minigenom, NP und L kodieren. Außerdem wurden verschiedene Mengen an Plasmiden kotransfiziert, die entweder für das Wildtyp-VP35 oder für eine der VP35-Substitutionsmutanten kodieren. 40 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und ein CAT-Reporterassay durchgeführt. Die Proben wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit dem Bio-Imager ausgewertet. Die Western Blot-Analyse zur Kontrolle der Expression von VP35 sowie der VP35-Substitutionsmutanten wurde mit einem α -VP35 AK und einem sekundären POD-gekoppelten α -Meerschweinchen AK durchgeführt. Bei den mit (*) gekennzeichneten Banden handelt es sich um unspezifische zelluläre Proteine. (A) Wildtyp-VP35. (B) L90A. (C) L104A. (D) L90/104A. (E) Graphische Zusammenfassung der Titrations von VP35, L90A, L104A und L90/104A.

4.2.1.2 Analyse der Replikations- und Transkriptionsaktivität der VP35-Substitutionsmutanten

Im Folgenden sollten die unter 4.2.1.1 beschriebenen VP35-Substitutionsmutanten auf ihre Fähigkeit, die virale Replikation zu unterstützen, analysiert werden. Subkonfluente Huh-T7-Zellen wurden mit den MARV-spezifischen Expressionsplasmiden und dem Minigenomvektor transfiziert (3.2.3). Zur Expression des Wildtyp-VP35 sowie der VP35-Substitutionsmutanten L90A und L104A kamen je 0,25 μ g und für die VP35-Substitutionsmutante L90/104A 1,5 μ g Plasmid-DNA zum Einsatz. 40 Stunden nach Transfektion wurde das Zelllysate eines Ansatzes für die Durchführung des CAT-Assays (3.3.3) sowie für eine Western Blot-Analyse (3.3.5) verwendet. Der zweite Ansatz diente zur Untersuchung replizierter RNA mittels Northern Blot (3.3.4). Die Ergebnisse der gewonnenen Daten sind in Abbildung 13 dargestellt. Analog zu den Beobachtungen unter 4.2.1.1 zeigten die VP35-Substitutionsmutanten L90A oder L104A einen leichten Rückgang in der Transkriptionsaktivität. Verglichen mit dem Wildtyp-VP35 konnte für die VP35-Substitutionsmutante L90/104A keine CAT-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 13A). Bei Analyse der replizierten RNA war ein ähnliches Muster erkennbar (Abb. 13B). Während die VP35-Substitutionsmutanten L90A und L104A die Replikationseffizienz leicht hemmten, konnte im Falle der VP35-Substitutionsmutante L90/104A keine replizierte RNA nachgewiesen werden (Abb. 13B). Die Expression des Wildtyp-VP35 sowie der VP35-Substitutionsmutanten wurde mittels Western Blot-Analyse (3.3.5) überprüft. Ferner konnte in allen Ansätzen die gleiche Menge an NP detektiert werden (Abb. 13C). Die fehlende Transkriptions- und Replikationsaktivität bei Einsatz der VP35-Substitutionsmutante L90/104A, die nicht mehr in der Lage war, mit sich selbst zu interagieren, deutet darauf hin, dass die Homooligomerisierung essentiell für die Funktion des MARV VP35 während der viralen RNA-Synthese ist (Möller et al., 2005).

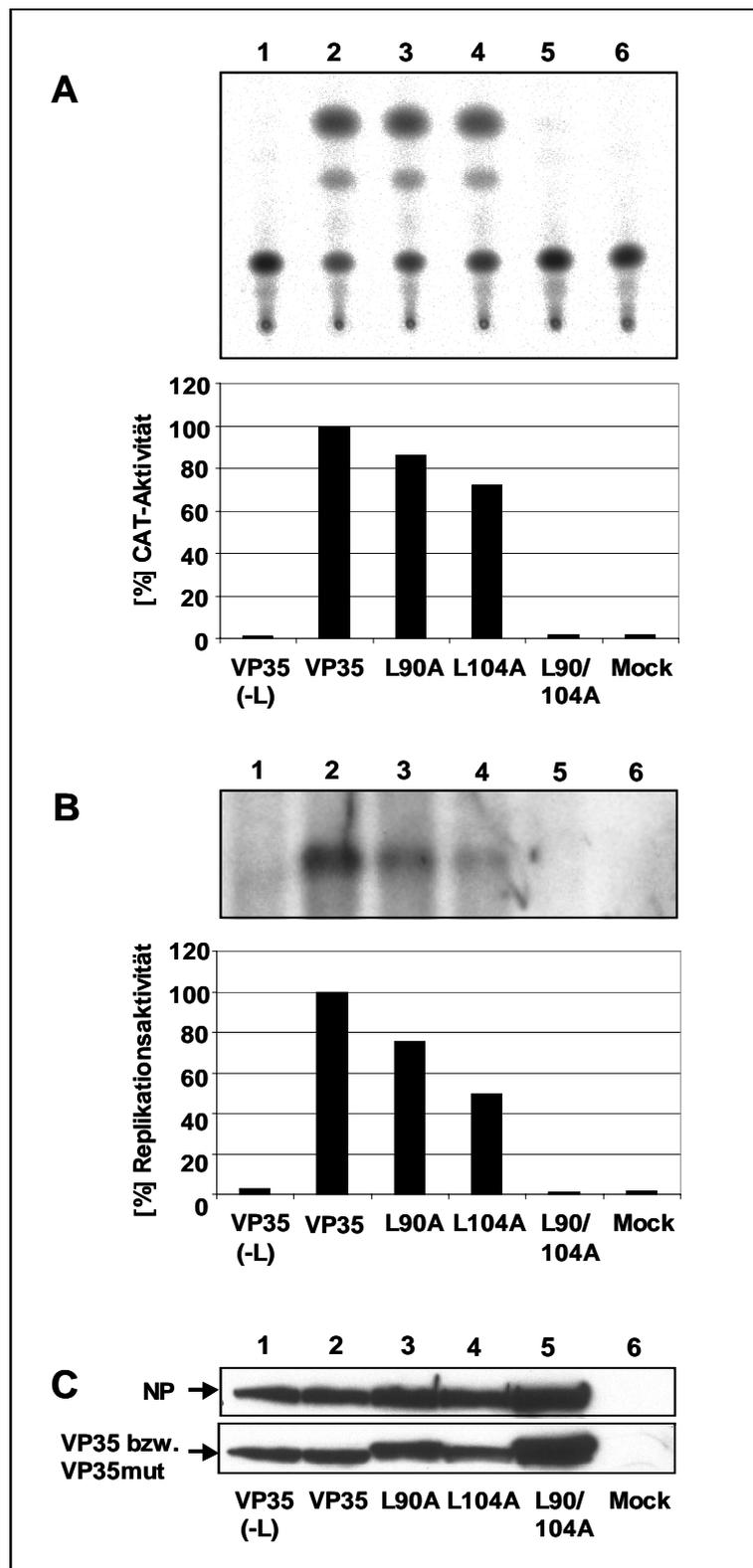


Abbildung 13: Analyse der Transkriptions- und Replikationsaktivität des VP35 sowie der VP35-Substitutionsmutanten. (A) CAT-Assay: Huh-T7-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für das MARV-spezifische Minigenom, NP, L, VP35 oder die VP35-Substitutionsmutanten kodieren. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen lysiert und ein CAT-Reporterassay durchgeführt. Die Proben wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit dem Bio-Imager ausgewertet. Die CAT-Aktivität wurde mit der Software TINA 2.0 quantifiziert und graphisch dargestellt. Gezeigt sind die Werte die mit der VP35-Substitutionsmutanten im Vergleich zum VP35.

(B) Northern Blot: Nach Transfektion von Huh-T7-Zellen, wie unter (A) beschrieben, wurden die Zelllysate einem Nuklease-Verdau unterzogen und anschließend mittels Northern Blot analysiert. Die Menge an replizierter RNA wurde mit Hilfe der Software TINA 2.0 bestimmt und graphisch dargestellt. (C) Western Blot: Das NP wurde durch einen monoklonalen α -NP AK und einen sekundären POD-gekoppelten α -Maus AK detektiert. Die Expression des Wildtyp-VP35 sowie der VP35-Substitutionsmutanten wurde durch einen α -VP35 AK und einen sekundären POD-gekoppelten α -Meerschweinchen AK nachgewiesen.

4.3 Interaktion der Marburg-Virus Nukleokapsidproteine VP35 und L

Der Proteinkomplex aus den Nukleokapsidproteinen VP35 und L repräsentiert die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase des MARV. Das L-Protein stellt den katalytischen Teil dar, und das VP35 fungiert als Kofaktor, wobei dessen Funktion unter anderem darin besteht, das L-Protein an das Nukleokapsid heran zu führen (Mühlberger et al., 1992; 1998).

4.3.1 Lokalisation der L-Interaktionsdomäne auf dem VP35

Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Bindungsdomäne für das VP35 innerhalb der ersten 530 N-terminalen Aminosäuren des L-Proteins befindet (Becker et al., 1998). Zur Identifikation der Bindungsstelle des L-Proteins auf dem VP35 wurde daher anstelle des volle Länge L-Proteins eine C-terminal verkürzte Deletionsmutante verwendet, die für die 530 N-terminalen Aminosäuren des L-Proteins kodiert und mit einem Flag-Epitop (L_{Flag}) versehen ist. Mit Hilfe von Koimmunpräzipitationsanalysen der in Abbildung 14 dargestellten VP35-Deletionsmutanten konnte, durch eigene Vorarbeiten, die L-Bindungsstelle auf den C-Terminus des VP35 eingegrenzt werden (Möller, 2002).

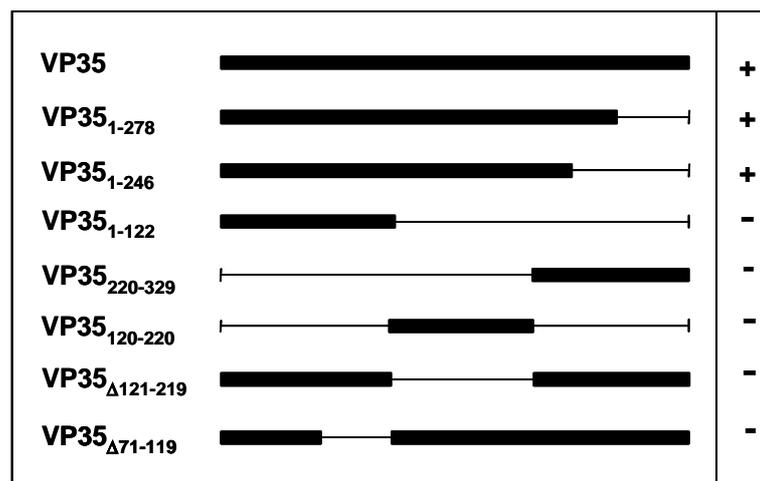


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Interaktion von L_{Flag} und VP35 und der untersuchten VP35-Deletionsmutanten. L_{Flag} wurde zusammen mit den entsprechenden VP35-Deletionsmutanten in vitro translatiert und anschließend mittels Koimmunpräzipitation analysiert. Für die mit (+) gekennzeichneten VP35-Deletionsmutanten konnte eine Interaktion mit dem L_{Flag} detektiert werden. Die mit (-) gekennzeichneten VP35-Deletionsmutanten waren nicht in der Lage, mit dem L_{Flag} zu interagieren.

Ferner schien die Homooligomerisierung des MARV VP35 für die Bindung des L-Proteins erforderlich zu sein (Möller et al., 2005).

4.3.1.1 Einfluss des N-Terminus des VP35 auf die Interaktion mit dem L-Protein

Die bisherige Untersuchung der VP35-Deletionsmutanten (4.3.1) lieferte keine Hinweise inwieweit der N-Terminus des MARV VP35 einen Einfluss auf die Interaktion mit dem L-Protein hat. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die VP35-Deletionsmutante VP35₇₀₋₃₂₉, die ein intaktes Coiled-Coil-Motiv besitzt, zusammen mit dem L_{Flag} in vitro koexprimiert (3.3.7) und mittels Koimmunpräzitationsanalyse untersucht (3.3.8; Abb. 15).

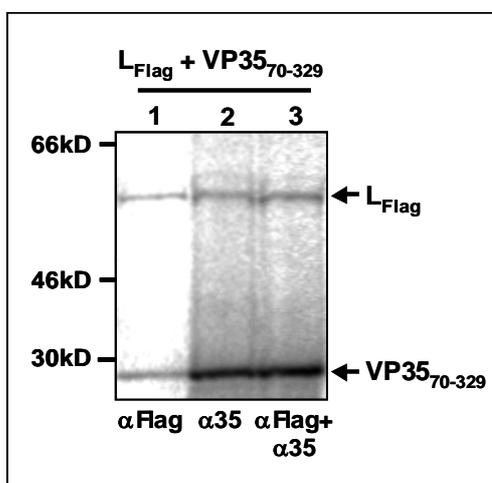


Abbildung 15: Koimmunpräzitationsanalyse von L_{Flag} und der VP35-Deletionsmutante VP35₇₀₋₃₂₉. L_{Flag} sowie die VP35-Deletionsmutante VP35₇₀₋₃₂₉ wurden mit Hilfe des TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems in vitro koexprimiert. Zur Koimmunpräzitationsanalyse wurden ein α -Flag M2 AK und/oder ein α -VP35 AK verwendet. Die Analyse der Präzitate erfolgte über SDS-PAGE und Bio-Imager. Die koexprimierten Proteine sind oberhalb und die zur Detektion verwendeten AK unterhalb der Abbildung gezeigt. Rechtsseitig sind die Positionen der untersuchten Proteine dargestellt.

Die VP35-Deletionsmutante VP35₇₀₋₃₂₉ kosedimentierte bei Präzitation des L_{Flag} mit dem α -Flag M2 AK (Spur 1). In umgekehrter Weise konnte das L_{Flag} durch die Fällung der VP35-Deletionsmutante VP35₇₀₋₃₂₉ mit einem α -VP35 AK kopräzitiert werden (Spur 2). Zur Kontrolle wurde zusätzlich mit dem α -Flag M2 AK und dem α -VP35 AK gefällt (Spur 3). Dieses Ergebnis legt nahe, dass der N-Terminus außerhalb der Coiled-Coil-Domäne des MARV VP35 keinen Einfluss auf die Interaktion mit dem L-Protein hat (Möller et al., 2005).

4.3.2 Einfluss der Homooligomerisierung des VP35 auf die Komplexbildung mit dem L-Protein

Im weiteren Verlauf sollte durch die Verwendung der volle Länge VP35-Substitutionsmutanten untersucht werden, ob die Homooligomerisierung des MARV VP35 für die Interaktion mit dem L-Protein notwendig ist. Die nicht markierten VP35-Substitutionsmutanten (L90A, L104A bzw. L90/104A) wurden zusammen mit dem L_{Flag} in vitro translatiert und radioaktiv markiert (3.3.7). Die im Anschluss durchgeführte Koimmunpräzitationsanalyse (3.3.8) ist in Abbildung 16 dargestellt.

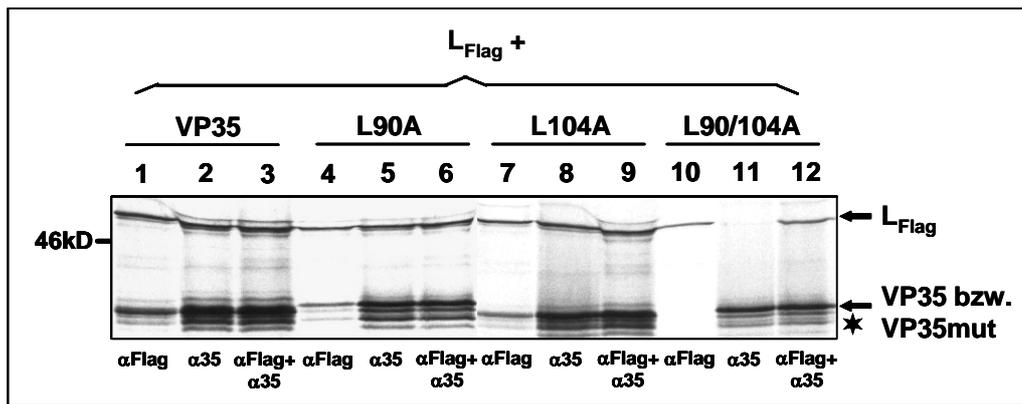


Abbildung 16: Koimmunpräzipitationsanalyse von L_{Flag} mit VP35 bzw. der VP35-Substitutionsmutanten. Das L_{Flag} und das VP35 sowie die VP35-Substitutionsmutanten L90A, L104A bzw. L90/104A wurden zusammen mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kit synthetisiert. Anschließend erfolgte die Fällung der Translationsansätze mit dem α -Flag M2 AK oder/und dem α -VP35 AK. Die Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Bio-Imager analysiert. Die koexprimierten Proteine sind oberhalb und die zur Detektion verwendeten AK unterhalb der Abbildung gezeigt. Rechtsseitig sind die Positionen der untersuchten Proteine dargestellt. VP35mut steht zusammenfassend für die jeweiligen VP35-Substitutionsmutanten. Die mit (*) gekennzeichneten Proteine resultieren aus der Verwendung des in vitro Expressionsystems.

Die Spuren 1 bis 3 zeigen die Koimmunpräzipitationsanalyse des L_{Flag} mit dem Wildtyp-VP35. Nach Fällung mit dem α -Flag M2 AK wurde das VP35 mit dem L_{Flag} mitgerissen (Spur 1). Wie in Spur 2 zu sehen ist, war es ebenfalls möglich, die Interaktion zwischen dem VP35 und dem L_{Flag} über die Verwendung des α -VP35 AK nachzuweisen. Zur Kontrolle der Expression wurde mit dem α -Flag M2 AK und dem α -VP35 AK gefällt (Spur 3). In den Spuren 4 und 7 ist gezeigt, dass die VP35-Substitutionsmutanten L90A bzw. L104A ebenfalls mit Hilfe des α -Flag M2 AK kopräzipitiert wurden. Ferner konnte das L_{Flag} auf umgekehrte Weise durch Präzipitation der VP35-Substitutionsmutanten L90A bzw. L104A mit dem α -VP35 AK mitgerissen werden (Spur 5 und 8). Im Gegensatz dazu konnte zwischen dem L_{Flag} und der VP35-Substitutionsmutante L90/104A, die keine Homooligomere ausbildet, keine Interaktion nachgewiesen werden (Spuren 10 und 11). Die Expression beider Proteine wurde durch die Präzipitation mit dem α -Flag M2 AK und dem α -VP35 AK überprüft (Spur 12). Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Homooligomerisierung des MARV VP35 die Voraussetzung für die Interaktion mit dem L-Protein bildet (Möller et al., 2005).

4.4 Hemmung der Marburg-Virus-Transkription durch gemischte VP35-Oligomere

Aus den bisherigen Untersuchungen ergab sich die folgende Hypothese: Zum einen ist die Homooligomerisierung des MARV VP35 für die Interaktion mit dem L-Protein und somit für die Funktionalität des Polymerasekomplexes essentiell. Andererseits befindet sich die eigentliche L-Bindungsstelle auf dem C-Terminus des MARV VP35. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde der in Abbildung 17A dargestellte experimentelle Ansatz gewählt.

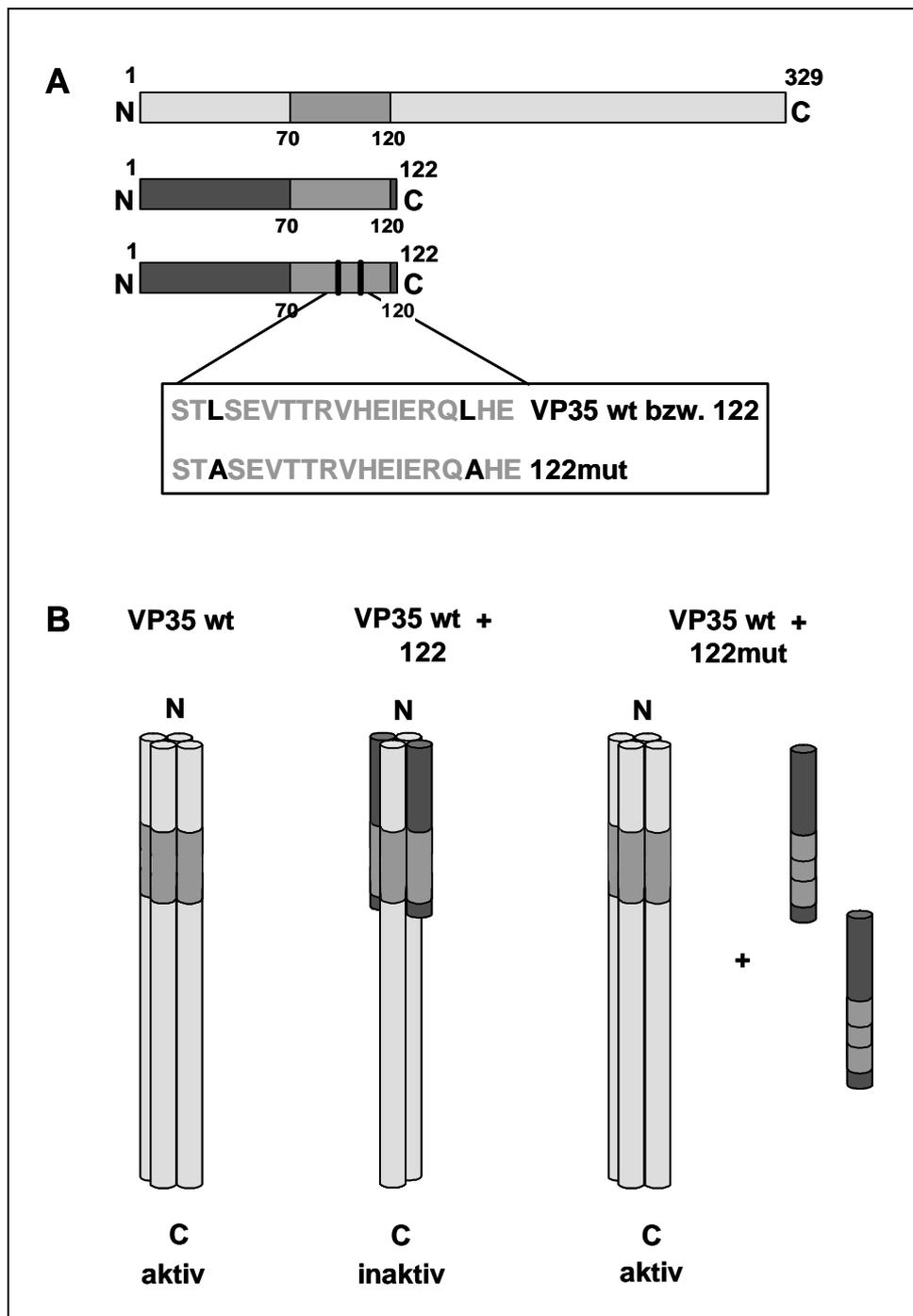


Abbildung 17: Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur Hemmung der MARV-Transkription durch gemischte VP35-Oligomere.

(A) Darstellung des Wildtyp-VP35 und der eingesetzten VP35-Deletionsmutanten VP35₁₋₁₂₂ sowie VP35_{1-122mut}. (B) Experimenteller Ansatz bezüglich der Funktionalität der ausgebildeten gemischten VP35-Oligomere.

Zur Herstellung gemischter VP35-Oligomere sollte neben dem Wildtyp-VP35 eine Deletionsmutante VP35₁₋₁₂₂ eingesetzt werden. Diese kodiert für den N-Terminus des Proteins, der die Homooligomerisierungsdomäne beinhaltet und somit in der Lage ist, mit dem Wildtyp-VP35 zu interagieren. Sollte die Homooligomerisierung des MARV VP35 und demzufolge eine entsprechende Anzahl intakter C-Termini entscheidend für die Interaktion mit dem L-Protein sein, müsste ein gemischtes VP35-Oligomer, welches keine korrekt oligomerisierten C-Termini enthält, in der Komplexbildung mit dem L-Protein eingeschränkt sein. Darauf aufbauend müsste die Rekrutierung des L-Proteins an die enkapsidierte RNA gehemmt und die Aktivität der Polymerase herunter reguliert sein. Zur Kontrolle sollte eine VP35-Deletionsmutante VP35_{1-122mut} dienen, die auf Grund der Substitution der Leucine 90 und 104 zu Alanin, nicht mehr in der Lage ist, zu oligomerisieren. Die Ausbildung gemischter VP35-Oligomere wäre in diesem Falle nicht möglich, und die Transkriptionsaktivierung im Minigenomsystem sollte vergleichbar mit dem Wildtyp-VP35 sein.

Zur Überprüfung dieser Theorie wurden subkonfluente Huh-T7-Zellen mit den Plasmiden, die für die T7-RNA-Polymerase, das MARV-spezifische Minigenom sowie die Nukleokapsidproteine NP, VP35 und L kodieren, transfiziert (3.2.3). Des Weiteren wurden die Plasmide, die für die VP35-Deletionsmutanten VP35₁₋₁₂₂ bzw. VP35_{1-122mut} kodieren in steigenden Konzentrationen kotransfiziert. 40 Stunden nach Transfektion erfolgte die Lyse der transfizierten Huh-T7-Zellen (3.2.3) und die Durchführung einer CAT-Aktivitätsbestimmung (3.3.3). Die Expression der Nukleokapsidproteine wurde mittels Western Blot-Analyse der Zelllysate überprüft (3.3.5). In Spur 3 der Abbildung 18A ist die Reporteranalyse der Probe dargestellt, die den Wildtyp-VP35 exprimiert. Im Vergleich dazu war bei Austausch des Wildtyp-VP35 durch die VP35-Substitutionsmutanten VP35₁₋₁₂₂ (Spur 4) bzw. VP35_{1-122mut} (Spur 5) keine CAT-Aktivität messbar. Die Spuren 6 bis 8 zeigen den Einfluss von steigenden Konzentrationen der VP35-Deletionsmutante VP35₁₋₁₂₂ auf die Reporteraktivität. Wie aus der quantitativen Darstellung (Abb. 18B) ersichtlich ist, nahm die Transkriptionsaktivität in Gegenwart der höchsten Menge der VP35-Deletionsmutante VP35₁₋₁₂₂ auf fünf Prozent ab. Die funktionell inaktive, aber zur Oligomerisierung fähige VP35-Deletionsmutante VP35₁₋₁₂₂ verursachte somit einen dominant-negativen Effekt. Hingegen blieb die Transkriptionsaktivität durch Zugabe der VP35-Deletionsmutante VP35_{1-122mut} (Abb. 18A, Spur 9-11) vergleichbar mit dem Wildtyp-Level. Western Blot-Analysen der Zelllysate bestätigten, dass die Menge an NP und Wildtyp-VP35 in allen Ansätzen konstant war (Abb. 18C).

Entsprechend der steigenden Konzentrationen an Plasmid-DNA zur Expression der VP35-Deletionsmutanten VP35₁₋₁₂₂ und VP35_{1-122mut} konnte eine zunehmende Menge an beiden Mutanten nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen bestätigen die Annahme, dass die Homooligomerisierung des MARV des VP35 essentiell für seine Funktion im MARV-Polymerasekomplex ist (Möller et al., 2005).

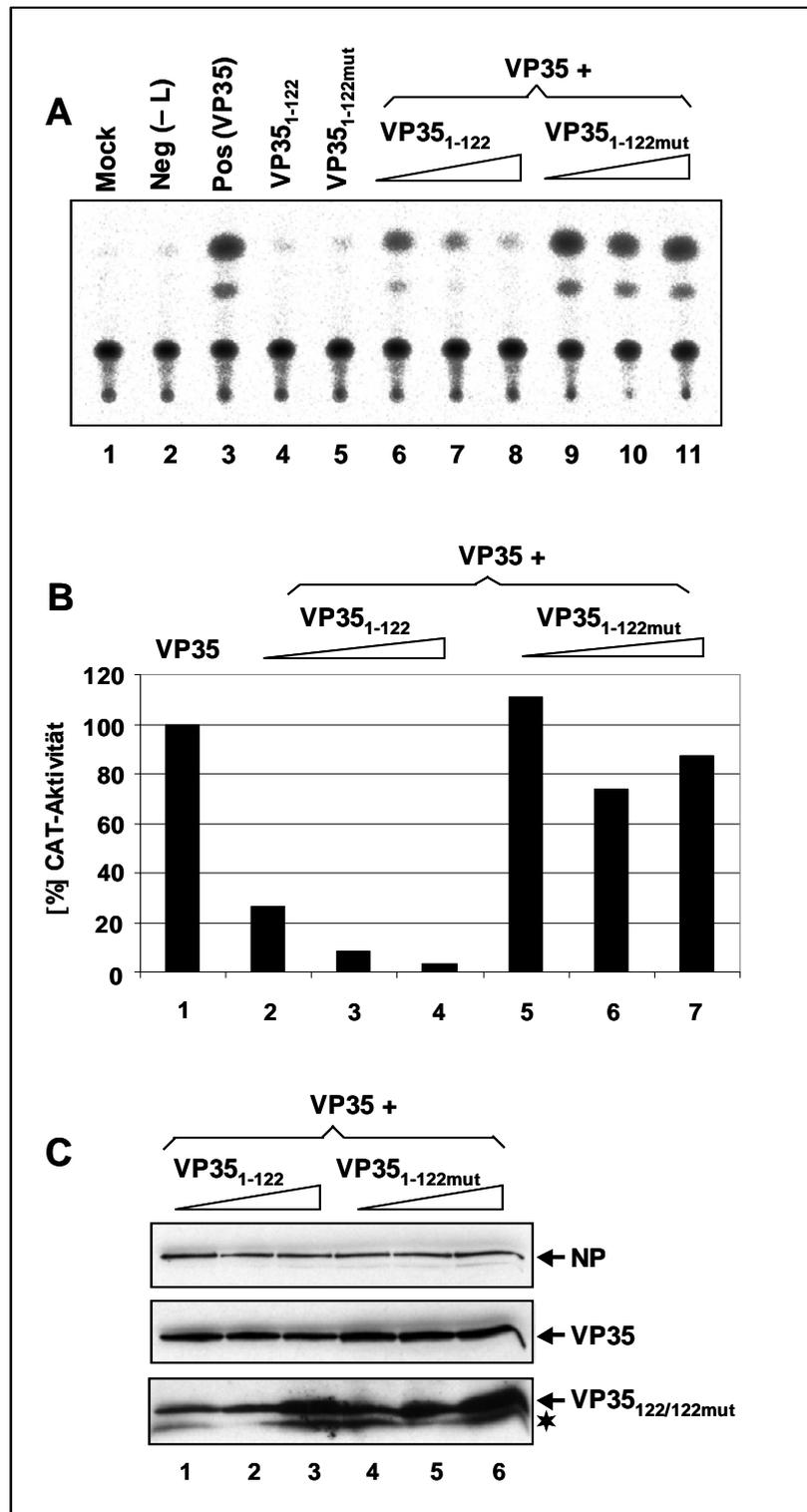


Abbildung 18: Analyse der Hemmung der MARV-spezifischen Transkriptionsaktivität durch Ausbildung gemischter VP35-Oligomere. (A) CAT-Assay: Huh-T7-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für das MARV-spezifische Minigenom, NP, L, VP35 oder die VP35-Deletionsmutanten VP35₁₋₁₂₂ oder VP35_{1-122mut} kodieren. Des Weiteren wurden neben gleich bleibenden Mengen an Wildtyp-VP35 die VP35-Deletionsmutanten VP35₁₋₁₂₂ oder VP35_{1-122mut} in steigenden Konzentrationen kotransfiziert. Im Anschluss an die Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen und die Durchführung des CAT-Reporterassay. Die Proben wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mit dem Bio-Imager ausgewertet. (B) Die CAT-Aktivität wurde mit der Software TINA 2.0 quantifiziert und graphisch dargestellt (% der durch das VP35 unterstützten Transkriptionsaktivität). (C) Western Blot: Die Detektion des NP erfolgte mit einem monoklonalen α -NP AK und einem sekundären POD-gekoppelten α -Maus AK. Die Expression des Wildtyp-VP35 sowie der VP35-Deletionsmutanten wurde durch einen α -VP35 AK und einen sekundären POD-gekoppelten α -Meerschweinchen AK nachgewiesen.

4.5 Interaktion der Marburg-Virus Nukleokapsidproteine

VP35 und NP

Eine zentrale Rolle bei den Interaktionen der Nukleokapsidproteine spielt das mit sich selbst interagierende NP, das Hauptnukleokapsidprotein, welches bei Einzelexpression in der Lage ist, Nukleokapsid-ähnliche helikale Strukturen auszubilden (Kolesnikova et al., 2000, Mavrakis et al., 2002). Es wird davon ausgegangen, dass die Bildung dieser helikalen Strukturen den ersten Schritt im Zusammenbau des Nukleokapsidkomplexes darstellt. Da das VP35 an das NP bindet (Becker et al., 1998) und wesentlich an der Bildung des Nukleokapsidkomplexes und somit an der Morphogenese neuer Viren beteiligt ist, war es von Interesse, diese Interaktion näher zu charakterisieren.

4.5.1 Einfluss der Homooligomerisierung des VP35 auf die Interaktion mit dem NP

Die Homooligomerisierung des MARV VP35 ist essentiell für die Interaktion mit dem L-Protein und somit für die Replikation und Transkription der viralen RNA (Möller et al., 2005). Darauf aufbauend sollte untersucht werden, ob die Homooligomerisierung des MARV VP35 für die Komplexbildung mit dem NP von Bedeutung ist.

4.5.1.1 Immunfluoreszenzanalyse der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutanten nach Einzel- und Koexpression mit dem NP

Im Folgenden sollte die intrazelluläre Verteilung der mit einem Flag-Epitop versehenen VP35-Substitutionsmutanten nach Einzelexpression sowie nach Koexpression mit dem NP durch eine Immunfluoreszenzanalyse betrachtet werden. Für die Einzelexpression wurden subkonfluente Huh7-Zellen mit den Plasmiden pTM1-NP, pTM1-VP35_{Flag}, pTM1-VP35L90A_{Flag}, pTM1-VP35L104A_{Flag} sowie pTM1-VP35L90/104A_{Flag} transfiziert (3.2.2). Für die Interaktionsstudien wurden diese Plasmide gemeinsam mit dem für das NP kodierende Plasmid pTM1-NP transfiziert. Die T7-RNA-Polymerase wurde durch Kotransfektion des Konstruktes pCAGGS-T7 bereitgestellt. 12 Stunden nach Trans-

fektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt (3.3.6). In Abbildung 19 ist die Darstellung des NP mit einem monoklonalen α -NP AK und einem FITC-gekoppelten α -Maus AK gezeigt. Das NP besitzt die Fähigkeit zur Selbstaggregation, was intrazellulär zur Ausbildung von typischen Einschlusskörperchen führte.

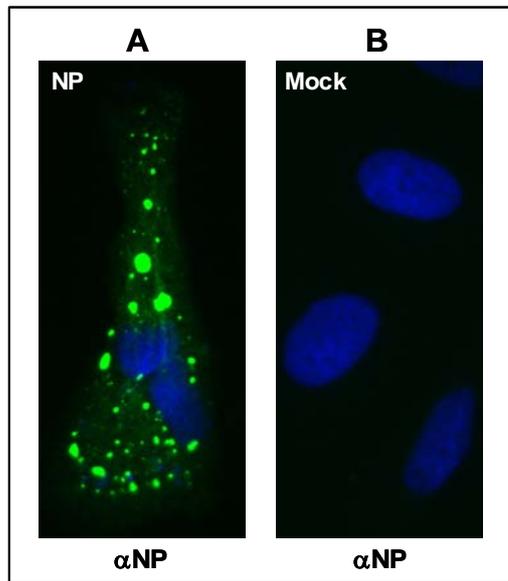


Abbildung 19: Immunfluoreszenzanalyse der Einzelexpression von NP. Zur Expression des NP wurden subkonfluente Huh7-Zellen mit dem Plasmid pTM1-NP transfiziert. 12h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen α -NP AK und einem FITC-gekoppelten α -Maus AK gefärbt. (A) NP-exprimierende Huh7-Zellen. (B) Mock.

In Abbildung 20 ist die Expression des VP35_{Flag} sowie der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutanten nach Einzelexpression dargestellt. Die Anfärbung erfolgte mit Hilfe eines gegen das Flag-Epitop gerichteten polyklonalen α -Flag-AK und eines Rhodamin-gekoppelten α -Kaninchen AK. Da für alle folgenden Immunfluoreszenzanalysen die gleichen Antikörper zum Einsatz kamen, ist die Behandlung der Mock-Zellen in der Abbildung 20 exemplarisch unter E1 und E2 dargestellt. Im Gegensatz zur Verteilung des NP, zeigten das VP35_{Flag} (A1) sowie die VP35-Substitutionsmutanten (B1-D1) ein homogenes Erscheinungsbild. Zur Analyse der koexprimierten Proteine wurden die Huh7-Zellen gleichzeitig mit einem monoklonalen α -NP AK und einem polyklonalen α -Flag AK behandelt. Als sekundäre Antikörper wurden dementsprechend ein FITC-gekoppelter α -Maus und ein Rhodamin-gekoppelter α -Kaninchen AK verwendet. Die Koexpression von NP und VP35_{Flag} führte zu einer Relokalisation des VP35_{Flag} in die vom NP gebildeten Einschlusskörper (A2 und A3). Diese Kolokalisation war vor allem in der Überlagerung beider Signale sichtbar (A4). Ebenso zeigten die VP35-Substitutionsmutanten L90A_{Flag} (B2-B4), L104A_{Flag} (C2-C4) und L90/104A_{Flag} (D2-D4) in Gegenwart von NP keine homogene Verteilung, sondern waren nun in den NP-induzierten Einschlusskörpern zu finden. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das MARV VP35 sowohl als Monomer als auch als Homooligomer in der Lage ist, mit dem NP zu interagieren (Möller et al., 2005).

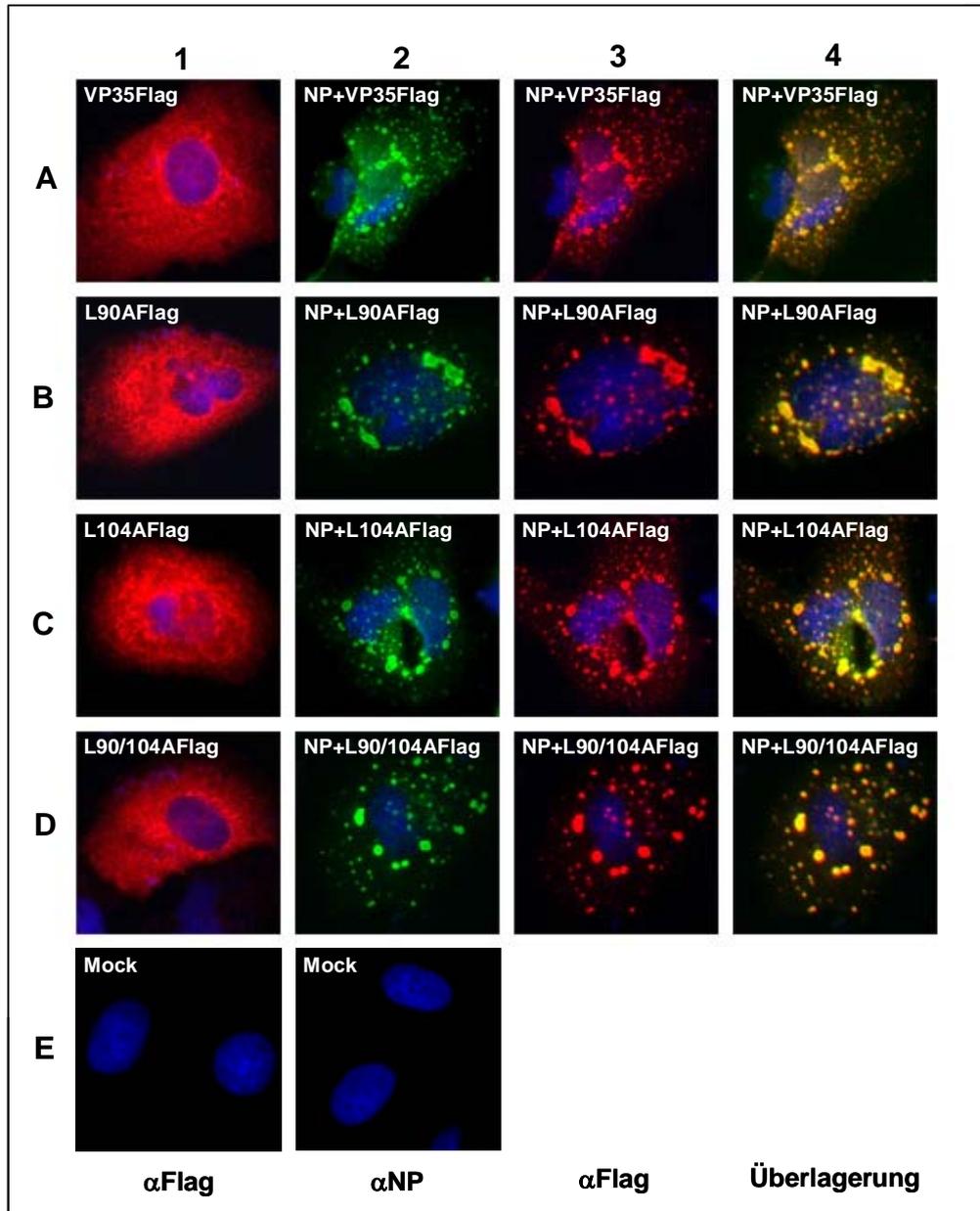


Abbildung 20: Immunfluoreszenzanalyse des VP35_{Flag} und der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutanten nach Einzel- und Koexpression mit NP. Subkonfluente Huh7-Zellen wurden mit den Plasmiden pTM1-VP35_{Flag}, pTM1-VP35L90A_{Flag}, pTM1-VP35L104A_{Flag}, bzw. pTM1-VP35L90/104A_{Flag} entweder einzeln oder zusammen mit dem NP-exprimierenden Plasmid pTM1-NP transfiziert. 12h nach Infektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. (A1-D1) Einzelexpression von VP35_{Flag}, L90A_{Flag}, L104A_{Flag} und L90/104A_{Flag}; Färbung mit einem polyklonalen α-Flag AK und einem Rhodamin-gekoppelten α-Kaninchen AK. (A2-A4) Koexpression von NP und VP35_{Flag}. (B2-B4) Koexpression von NP und L90A_{Flag}. (C2-C4) Koexpression von NP und L104A_{Flag}. (D2-D4) Koexpression von NP und L90/104A_{Flag}. (E) Mock; Färbung mit einem monoklonalen α-NP AK und einem polyklonalen α-Flag AK sowie einem FITC-gekoppelten α-Maus und einem Rhodamin-gekoppelten α-Kaninchen AK.

Abbildung 21: Koimmunpräzipitationsanalyse von NP und VP35_{Flag} sowie der VP35-Substitutionsmutante L90/104A_{Flag} nach Kotransfektion aus Huh7-Zellen. Zur Koexpression der Proteine VP35_{Flag} und L90/104A_{Flag} wurden die Plasmide pTM1-VP35_{Flag} bzw. pTM1-VP35L90/104A_{Flag} zusammen mit dem NP-exprimierenden Plasmid pTM1-NP in subkonfluente Huh7-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde zur Expression der T7-RNA-Polymerase das Plasmid pCAGGS-T7 kontransfiziert. 15 h nach Transfektion wurden die Zellen radioaktiv markiert und lysiert. Anschließend erfolgte unter Verwendung eines α -Flag M2 AK und eines α -NC Antiserums die Durchführung einer Koimmunpräzipitationsanalyse. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Bio-Imager ausgewertet. Die koexprimierten Proteine sind oberhalb und die zur Detektion verwendeten AK unterhalb der Abbildung gezeigt. Rechtsseitig sind die Positionen der untersuchten Proteine dargestellt. Bei den mit (*) gekennzeichneten Banden handelt es sich um unspezifische zelluläre Proteine.

In Spur 2 ist zur Kontrolle die Fällung des Ansatzes mit dem α -NC AK, der sowohl das VP35_{Flag} als auch das NP erkannte, dargestellt. Das NP zeigte nach Einzelexpression keine Kreuzreaktion mit dem α -Flag M2 AK (Spur 3), konnte allerdings erwartungsgemäß mit dem α -NC AK nachgewiesen werden. Nach der Behandlung von Mock-Zellen mit den zur Präzipitation verwendeten AK traten keine Unspezifitäten auf (Spur 5 und 6). Wie in Spur 7 zu sehen ist, wurde nach Fällung des Koexpressionsansatzes mit dem α -Flag M2 AK das NP durch die VP35-Substitutionsmutante L90/104A_{Flag} kopräzipitiert. Beide Proteine konnten mit dem α -NC AK detektiert werden (Spur 8). Diese Beobachtungen bestätigen die durch die Immunfluoreszenzanalyse gewonnenen Daten, dass die Homooligomerisierung des MARV VP35, für die Interaktion mit dem NP nicht notwendig zu sein scheint (Möller et al., 2005).

4.5.2 Lokalisation der NP-Interaktionsdomäne auf dem VP35

Durch die Analyse verschiedener Flag-markierter VP35-Deletionsmutanten (Möller, 2002) konnte die Bindungsstelle des NP auf dem VP35 weitest gehend eingegrenzt werden. Abbildung 22 zeigt ein Set verschiedener mit einem Flag-Epitop versehener VP35-Deletionsmutanten, die für den N- und/oder C-Terminus des Proteins kodieren. Nach Koexpression mit dem NP wurden diese Mutanten mittels Koimmunfluoreszenzanalyse (3.3.8) auf ihre Interaktionsfähigkeit hin untersucht (Daten nicht gezeigt).

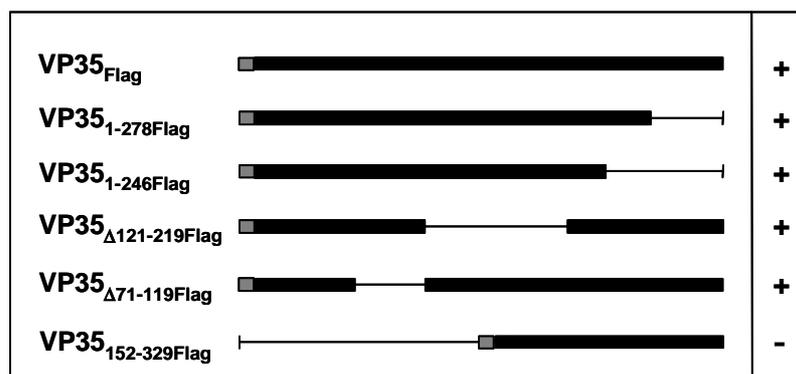


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Interaktion von NP und VP35_{Flag} und der untersuchten Flag-markierten VP35-Deletionsmutanten. NP wurde zusammen mit den entsprechenden VP35-Deletionsmutanten in Huh7-Zellen kotransfiziert und anschließend mittels Koimmunfluoreszenzanalyse untersucht. Für die mit (+) gekennzeichneten VP35-Deletionsmutanten konnte eine Interaktion mit dem NP detektiert werden. Die mit (-) gekennzeichneten VP35-Deletionsmutanten waren nicht in der Lage, mit dem NP zu interagieren.

Die C-terminal verkürzten VP35-Deletionsmutanten VP35_{1-278Flag} und VP35_{1-246Flag} wurden nach Koexpression durch das NP in die intrazytoplasmatischen Einschlusskörper rekrutiert. Auch die internen VP35-Deletionsmutanten VP35_{Δ121-129Flag} und VP35_{Δ71-119Flag} erschienen nach Koexpression mit dem NP in den Einschlusskörperchen. Die N-terminal verkürzte VP35-Deletionsmutante VP35_{152-329Flag} hingegen war homogen verteilt und konnte nicht mit dem NP kolokalisieren. Diese Daten wiesen darauf hin, dass sich auf dem N-Terminus des MARV VP35 eine potentielle Bindungsstelle für das NP befindet.

4.5.2.1 Einfluss des N-Terminus des VP35 auf die Struktur der vom NP-induzierten intrazytoplasmatischen Einschlusskörper

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass die Interaktion von NP und VP35 eine Veränderung der Struktur der vom NP gebildeten Helices bewirkt (Kolesnikova, mündl. Mitteilung). Um die Rolle des N-Terminus des MARV VP35 auf die Interaktion mit dem NP näher zu charakterisieren, sollte im weiteren Verlauf eine C-terminal verkürzte und Flag-markierte VP35-Deletionsmutante (VP35_{1-122Flag}) in Gegenwart von NP untersucht werden. Die Plasmide pTM1-NP und pTM1-VP35_{1-122Flag} wurden in subkonfluente Huh7-Zellen kotransfiziert (3.3.6). Zur Synthese der T7-RNA-Polymerase wurde das Konstrukt pCAGGS-T7 zugesetzt. 12 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Anfärbung des NP erfolgte mit einem monoklonalen α -NP AK, die der VP35-Deletionsmutante VP35_{1-122Flag} mit einem polyklonalen α -Flag AK. Als sekundäre Antikörper wurden ein FITC-gekoppelter α -Maus bzw. ein Rhodamin-gekoppelter α -Kaninchen AK verwendet (3.3.6).

Die durchgeführte Immunfluoreszenzanalyse ist in Abbildung 23 dargestellt. Die VP35-Deletionsmutante VP35_{1-122Flag} blieb sowohl nach Einzelexpression als auch in Anwesenheit des NP homogen im Zytoplasma verteilt (A und B). Diese Beobachtung deutete zunächst darauf hin, dass diese Mutante nicht mehr mit dem NP interagiert. Betrachtet man allerdings das NP, so war dieses ebenfalls homogen verteilt (C). Das VP35_{1-122Flag} war somit vermutlich in der Lage, das NP zu binden, verhinderte jedoch die Bildung der typischen intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen (D).

Dieses Ergebnis verstärkte zum einen die Annahme, dass der N-Terminus des MARV VP35 eine wichtige Rolle für die Interaktion mit dem NP spielt. Zum anderen scheint

das VP35 wesentlich an der Bildung des Nukleokapsids beteiligt zu sein, da der isolierte N-Terminus des Proteins die Ausbildung der vom NP-induzierten intrazellulären Einschlusskörper verhindern konnte.

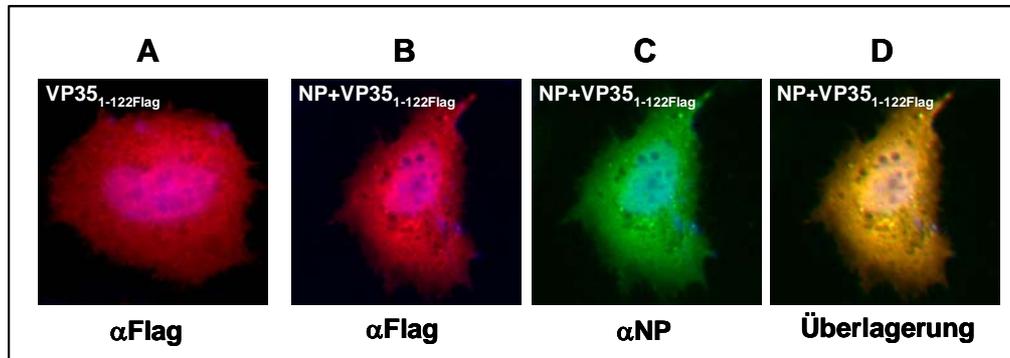


Abbildung 23: Koimmunfluoreszenzanalyse der VP35-Deletionsmutante VP35_{1-122Flag} nach Einzel- und Koexpression mit NP. Subkonfluente Huh7-Zellen wurden mit dem Plasmid pTM1-VP35_{1-122Flag} entweder einzeln oder zusammen mit dem NP-exprimierenden Plasmid pTM1-NP transfiziert. 12h nach Infektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. (A) Einzelexpression von VP35_{1-122Flag}; Färbung mit einem polyklonalen α-Flag AK und einem Rhodamin-gekoppelten α-Kaninchen AK. (B-D) Koexpression von NP und VP35_{1-122Flag}; Färbung mit einem monoklonalen α-NP AK und einem polyklonalen α-Flag AK sowie einem FITC-gekoppelten α-Maus und einem Rhodamin-gekoppelten α-Kaninchen AK.

Ferner lassen diese Daten eine weitere NP-Bindungsstelle auf dem C-Terminus des VP35 vermuten. Da die interne VP35-Deletionsmutante VP35_{Δ121-129Flag} (4.5.2), die für den N- und den C-Terminus des Proteins kodiert, mit dem NP kolokalisieren konnte, scheint der C-Terminus des VP35 die Ausbildung der intrazytoplasmatischen Einschlusskörper zu induzieren.

4.5.3 Einfluss der Coiled-Coil-Struktur des VP35 auf die Ausbildung der vom NP-induzierten intrazytoplasmatischen Einschlusskörper

Durch die Analyse der Aminosäuresequenz des MARV NP mit Hilfe des Computerprogrammes COILS 2.2 (Lupas, 1996; Lupas et al., 1991) konnten zwei potentielle Coiled-Coil-Domänen in der Mitte Proteins vorhergesagt werden. Diese sind im Bereich der Aminosäuren 320 bis 348 (NPC1) sowie zwischen den Aminosäuren 370 bis 400 (NPC2) lokalisiert. Mittels Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass das erste Coiled-Coil-Motiv eine entscheidende Rolle für die Homooligomerisierung des NP spielt (Di Carlo, 2004). Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die Integrität der Coiled-Coil-Motive des NP und des VP35 wichtig für deren Komplexbildung und somit für die Ausbildung der vom NP-induzierten Einschlusskörper sowie für die Struktur des Nukleokapsidkomplexes ist.

4.5.3.1 Koimmunfluoreszenzanalyse der NP-Mutante NP Δ C1 nach Koexpression mit dem VP35_{Flag}

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden eine NP-Deletionsmutante NP Δ C1, die nicht mehr über das erste Coiled-Coil-Motiv von Aminosäure 320 bis 348 verfügte (Di Carlo, 2004) und ein Flag-markiertes VP35 (VP35_{Flag}) sowohl nach Einzel- als auch nach Koexpression analysiert. Die entsprechenden Plasmide wurden zusammen mit dem Konstrukt, welches für die T7-RNA-Polymerase kodiert, in subkonfluente Huh7-Zellen transfiziert (3.2.2). 12 Stunden nach Transfektion erfolgte die Immunfluoreszenzanalyse der fixierten und permeabilisierten Zellen (3.3.6).

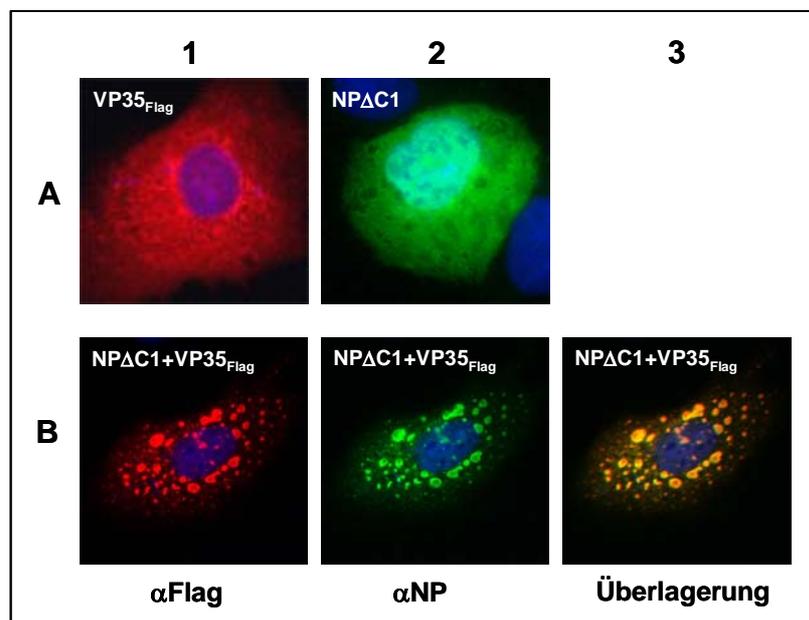


Abbildung 24: Koimmunfluoreszenzanalyse der NP-Deletionsmutante NP Δ C1 sowie des VP35_{Flag} nach Einzel- und Koexpression. Die Plasmide pTM1-NP Δ C1 und pTM1-VP35_{Flag} wurden entweder einzeln oder zusammen in subkonfluente Huh7-Zellen transfiziert. 12h nach Infektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Anfärbung der exprimierten Proteine erfolgte mit einem monoklonalen α -NP AK und einem polyklonalen α -Flag AK sowie einem FITC-gekoppelten α -Maus bzw. einem Rhodamin-gekoppelten α -Kaninchen AK. (A1 und B1) VP35_{Flag} nach Einzel- und Koexpression mit NP Δ C1. (A2 und B2) NP Δ C1 nach Einzel- und Koexpression mit VP35_{Flag}. (B3) Überlagerung von B1 und B2.

Wie bereits unter 4.5.1.1 dargestellt wurde, zeigte das VP35_{Flag} nach Einzelexpression eine homogene Verteilung im Zytoplasma der Zelle (Abb. 24, A1). Überraschenderweise verlor die singular exprimierte NP-Deletionsmutante NP Δ C1 durch die Deletion der ersten potentiellen Coiled-Coil-Domäne die Fähigkeit zur Induktion der intrazytoplasmatischen Einschlusskörper (A2). Nach Koexpression beider Proteine erschien das NP wieder in Form von Einschlusskörperchen (B2). Das VP35_{Flag} kolokalisierte mit der NP-Deletionsmutante NP Δ C1 in den Einschlusskörpern (B1), was durch die Überlagerung beider Signale deutlich zu sehen ist (B3). Diese Daten lassen

vermuten, dass das VP35 bestimmte Funktionen des NP bei der Morphogenese des Nukleokapsidkomplexes ersetzen kann.

4.5.3.2 Koimmunfluoreszenzanalyse der NP-Mutante NP Δ C1 nach Koexpression mit der VP35-Substitutionsmutante L90/104A_{Flag}

Es war nun von Interesse, ob die VP35-Substitutionsmutante L90/104A_{Flag}, die keine Homooligomere bildet, nach Koexpression mit der NP-Deletionsmutante NP Δ C1 ein ähnliches Phänomen verursacht. Analog zu 4.5.3.1 wurden subkonfluente Huh7-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden kotransfiziert und nach Fixierung sowie Permeabilisierung mittels Immunfluoreszenz analysiert (3.3.6). Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, konnte durch den Verlust der Coiled-Coil-Struktur des MARV VP35 die Ausbildung der Einschlusskörper nicht induziert werden. Sowohl die NP-Deletionsmutante NP Δ C1 als auch die VP35-Substitutionsmutante L90/104A_{Flag} zeigten ein homogenes Erscheinungsbild (A1 bis A3).

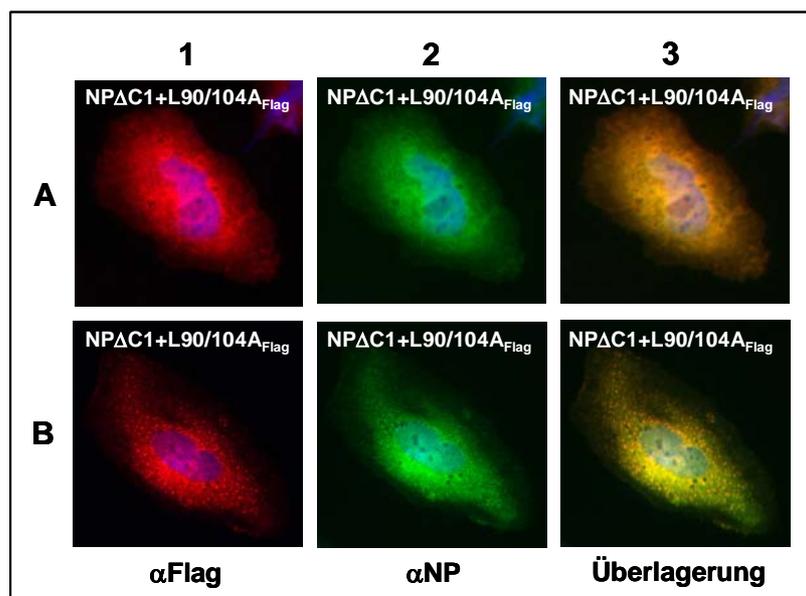


Abbildung 25: Koimmunfluoreszenzanalyse der NP-Deletionsmutante NP Δ C1 nach Koexpression mit der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutante L90/104A_{Flag}. Die Plasmide pTM1-NP Δ C1 und pTM1-VP35L90/104A_{Flag} wurden zusammen in subkonfluente Huh7-Zellen transfiziert. 12h nach Transfektion erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Zur Anfärbung der exprimierten Proteine wurden ein monoklonaler α -NP AK und ein polyklonaler α -Flag AK sowie ein FITC-gekoppelter α -Maus bzw. ein Rhodamin-gekoppelter α -Kaninchen AK verwendet. (A und B) Koexpression von NP Δ C1 und L90/104A_{Flag}.

Da die Kolokalisation der Proteine in den intrazellulären Einschlusskörpern als Indikator für eine bestehende Bindung gewertet wird, blieb nach diesem Ergebnis jedoch unklar, ob eine Interaktion zwischen beiden Proteinen besteht. Allerdings konnte neben der homogenen Lokalisation der NP-Deletionsmutante NP Δ C1 und der VP35-Substitutionsmutante L90/104A_{Flag} nach Koexpression ein weiterer Phänotyp

beobachtet werden. Wie unter B1 und B2 zu erkennen ist, traten neben einer homogenen Verteilung kleine über das gesamte Zytoplasma der Zelle verstreute punktförmige Aggregate auf, in denen sich beide Fluoreszenzsignale überlagerten (B3). Hinsichtlich der Morphologie unterscheiden sich die detektierten Aggregate allerdings wesentlich von den eher perinukleär lokalisierten Einschlusskörpern, die nach Expression des Wildtyp-NP auftreten. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass intakte Coiled-Coil-Motive des NP und des VP35 eine wichtige Rolle für die Struktur der Einschlusskörper und wahrscheinlich bei der Morphogenese des Nukleokapsidkomplexes spielen.

4.6 Stöchiometrie der Marburg-Virus VP35-Homooligomere

Abschließend sollte die Stöchiometrie des VP35 sowohl im MARV-Partikel als auch nach rekombinanter Expression des Proteins betrachtet werden.

4.6.1 Stöchiometrie des VP35 im Marburg-Virus-Partikel

Um die Stöchiometrie des VP35 zu charakterisieren, sollte zunächst eine durch γ -Bestrahlung inaktivierte MARV-Probe unter nativen Bedingungen untersucht werden. Ein Mikroliter der MARV-Präparation (3.2.4) wurde über Polyacrylamidgelelektrophorese (3.3.9.1) aufgetrennt und mittels Western Blot (3.3.5) analysiert. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, traten neben dem monomeren VP35 ($M_{G_{\text{theor.}}}$: 36 kD) auch höher molekulare Formen auf, die andeuten, dass das VP35 im MARV-Partikel sowohl als Monomer als auch als Multimer eingebaut ist.

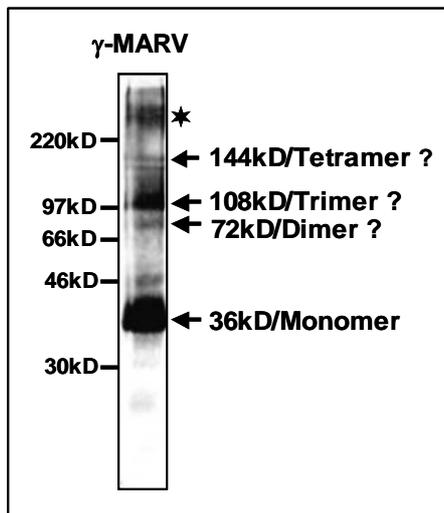


Abbildung 26: Analyse des Oligomerisierungsgrades des VP35 im MARV-Partikel. Ein Mikroliter einer γ -bestrahlten MARV-Präparation wurde über Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion des VP35 wurde ein α -VP35 AK und ein sekundärer POD-gekoppelter α -Meerschweinchen AK verwendet. Linksseitig sind die Positionen des mit geführten Größenmarkers dargestellt. Auf der rechten Seite sind die Positionen der möglichen Homooligomere aufgeführt.

Da es sich bei den höheren Formen allerdings um VP35 handeln könnte, welches mit anderen viralen Proteinen interagiert, konnte keine eindeutige Aussage über die Stöchiometrie des MARV VP35 gemacht werden. Auf diesem Grunde sollten die folgenden Untersuchungen zur Stöchiometrie des VP35-Homooligomers nach rekombinanter Expression des Proteins erfolgen.

4.6.2 Stöchiometrie des VP35 nach rekombinanter Expression

Zur genauen Analyse der Stöchiometrie des VP35-Homooligomers wurde die VP35-Deletionsmutante VP35₁₋₁₂₂Flag verwendet, die das für die Homooligomerisierung essentielle Coiled-Coil-Motiv enthielt. Als Negativkontrolle wurde die VP35-Deletionsmutante VP35₁₋₁₂₂mutFlag untersucht, deren Coiled-Coil-Struktur auf Grund der Substitution der Leucine 90 und 104 zerstört war. Beide VP35-Deletionsmutanten wurden in vitro translatiert und metabolisch mit [³⁵S]Promix Cell-labelling Mix markiert

(3.3.7). Die exprimierten VP35-Deletionsmutanten wurden über die Kopplung des Flag-Epitops an eine spezielle Anti-Flag M2-Agarose aus dem Translationsansatz präzipitiert. Die auf diese Weise selektionierten Flag-markierten VP35-Deletionsmutanten wurden mit Hilfe eines Flag-Peptides von der Anti-Flag M2-Agarose eluiert. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit den chemischen Quervernetzungs-Reagenzien Glutaraldehyd und EGS, die durch die Ausbildung von kovalenten Bindungen die einzelnen Monomere eines Oligomers kovalent verknüpfen können (3.3.2). Die so stabilisierten Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE (3.3.9.1) aufgetrennt und mit dem Bio-Imager sowie dem Computerprogramm TINA 2.0 (3.3.9.2) ausgewertet. In Abbildung 27 ist die Vernetzung (3.3.2) der VP35-Deletionsmutante VP35_{1-122Flag} mit Glutaraldehyd (A) und EGS (B) dargestellt.

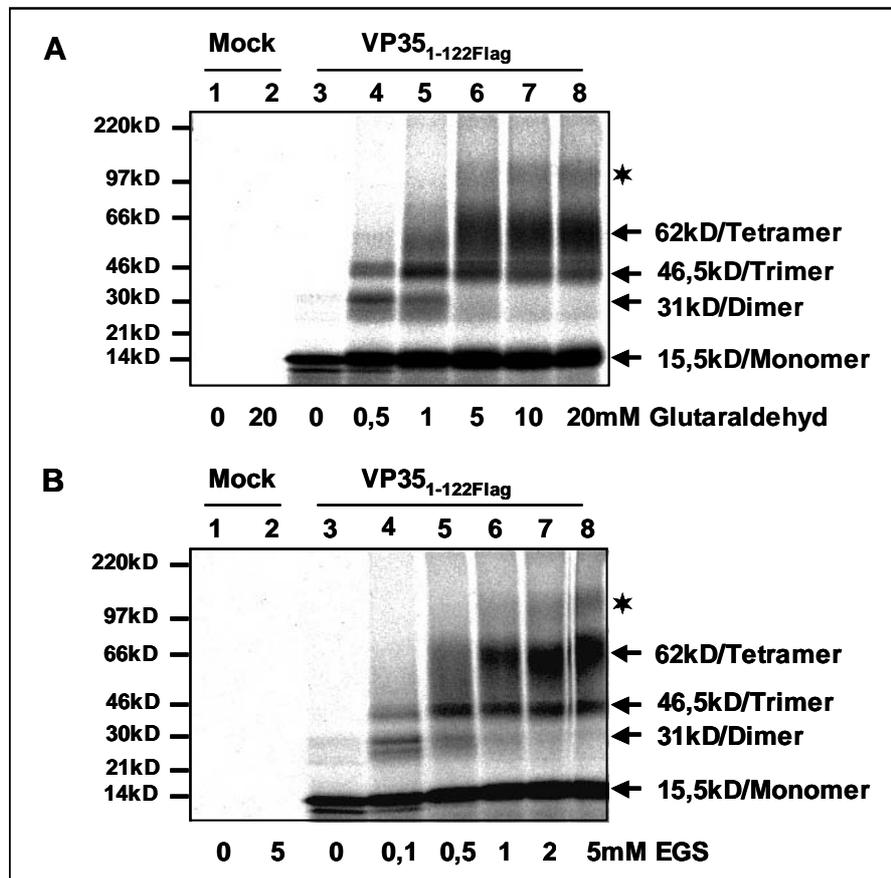


Abbildung 27: Analyse des Oligomerisierungsgrades der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutante VP35_{1-122Flag} nach rekombinanter Expression und Quervernetzung. Die VP35-Substitutionsmutante VP35_{1-122Flag} wurde mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kit synthetisiert und anschließend mittels Anti-Flag M2-Agarose präzipitiert. Nach Elution mit Hilfe eines Flag-Peptides erfolgte die Inkubation mit den Cross-Linkern Glutaraldehyd und EGS. Die vernetzten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Bio-Imager analysiert. Die verwendeten Konzentrationen der Cross-Linker sind unterhalb und die Positionen der Homooligomere rechtsseitig dargestellt.

Während in Abwesenheit der Vernetzungsreagenzien lediglich Monomere ($MG_{\text{theor.}}$: 15,5 kD; Abb. 22, A und B, Spur 3) detektiert wurden, konnten nach Zugabe der quervernetzenden Agenzien zusätzliche Banden mit den erwarteten Molekulargewichten von Dimeren ($MG_{\text{theor.}}$: 31 kD), Trimeren ($MG_{\text{theor.}}$: 46,5 kD) und Tetrameren ($MG_{\text{theor.}}$: 62 kD) beobachtet werden. In den Spuren 7 und 8 wurden weitere Banden detektiert, wobei es sich möglicherweise um hochmolekulare Addukte handelt, die bei hohen Konzentrationen der verwendeten Vernetzungsreagenzien entstehen können. Die optimale Konzentration lag für Glutaraldehyd bei 5 mM und für EGS bei 1 mM (Abb. 27, A und B, Spur 6).

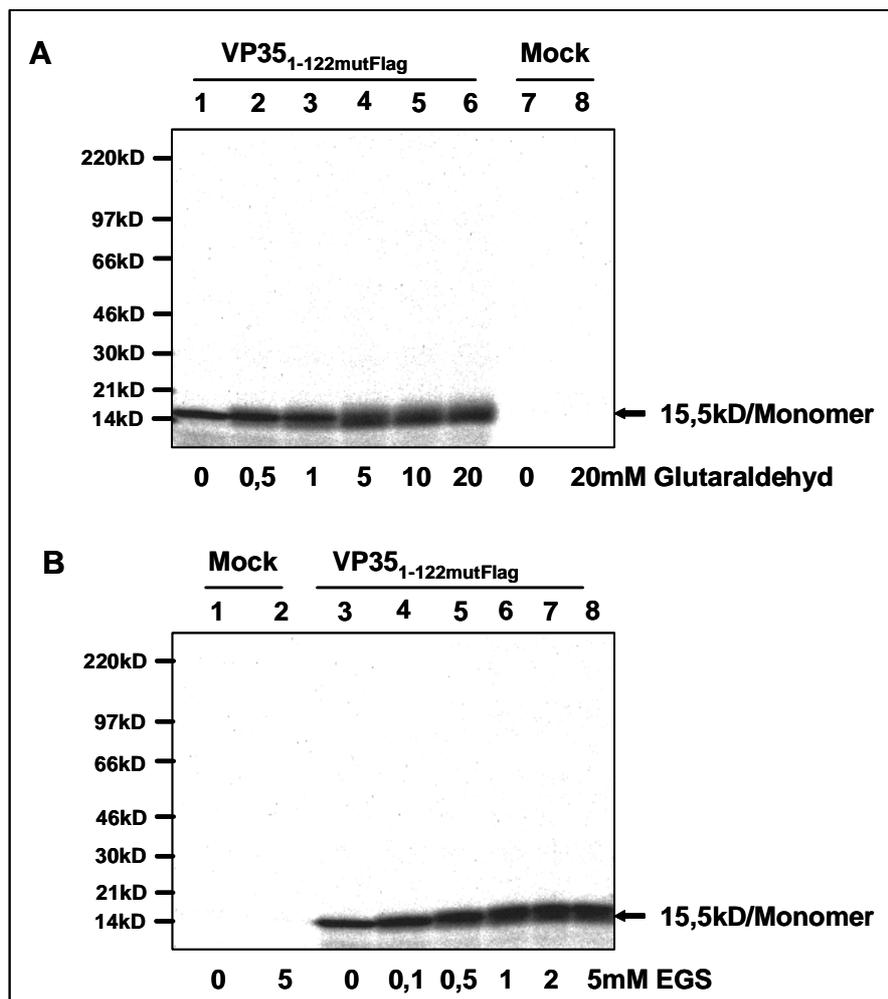


Abbildung 28: Analyse des Oligomerisierungsgrades der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutante VP35_{1-122mutFlag} nach rekombinanter Expression und Quervernetzung. Die VP35-Substitutionsmutante VP35_{1-122mutFlag} wurde mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kit synthetisiert und anschließend mittels Anti-Flag M2-Agarose präzipitiert. Nach Elution mit Hilfe eines Flag-Peptides erfolgte die Inkubation mit den Cross-Linkern Glutaraldehyd und EGS. Die vernetzten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Bio-Imager analysiert. Die verwendeten Konzentrationen der Cross-Linker sind unterhalb und die Position des Monomers rechtsseitig dargestellt.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, konnten nach Vernetzung der VP35-Deletionsmutante VP35_{1-122mutFlag} erwartungsgemäß keine oligomeren Formen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das VP35 des MARV in Form von Mono-, Di-, Tri- und Tetrameren vorliegen kann. Ferner konnte durch diese Versuche bestätigt werden, dass die Coiled-Coil-Struktur im N-terminalen Bereich des MARV VP35 die Homooligomerisierung des Proteins vermittelt.

5 Diskussion

Mit Hilfe eines artifiziellen Replikations- und Transkriptionssystems (Mühlberger et al., 1998) ist es in den vergangenen Jahren gelungen, grundsätzliche Aspekte der Molekularbiologie des MARV aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, dass drei der vier Nukleokapsidproteine (NP, VP35 und L) sowohl notwendig als auch ausreichend für die Replikation und Transkription der viralen RNA des MARV sind (Mühlberger et al., 1998). Das vierte Nukleokapsidprotein VP30 scheint zusätzlich einen Einfluss auf die Replikation und Transkription der viralen RNA zu haben, da das Abschalten des VP30 mittels RNA Interferenz eine Reduktion der Proteinlevel aller anderen viralen Proteine zur Folge hatte (Fowler et al., 2005). Die Nukleokapsidproteine sind jeweils in unterschiedliche Proteinkomplexe involviert, deren Funktion bislang nicht bekannt ist. Da diese Proteine zugleich strukturelle und funktionelle Aufgaben besitzen, wird vermutet, dass die Ausbildung verschiedener Proteinkomplexe für die Regulation von Replikation und Transkription sowie den Aufbau des Nukleokapsidkomplexes notwendig ist. Ziel dieser Arbeit war es, die Homooligomerisierung des MARV VP35 bezüglich seiner Funktion für die Synthese der viralen RNA und für die Morphogenese des Nukleokapsidkomplexes zu untersuchen.

Homooligomerisierung des Marburg-Virus VP35

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass das VP35 des MARV in der Lage war, Homooligomere auszubilden. Bedingung für die Homooligomerisierung des VP35 war die Anwesenheit eines durch Computeranalyse vorhergesagten Coiled-Coil-Motivs im N-terminalen Bereich des Proteins. Die Substitution der Leucinreste an Position 90 und 104 zu Alanin führte zu einer Destabilisierung der Coiled-Coil-Struktur und somit zum vollständigen Verlust der Homooligomerisierung des MARV VP35 (Möller, 2002; Möller et al., 2005). Für das VP35 des EBOV, dem zweiten Vertreter der Familie der *Filoviridae*, konnte ebenfalls im N-terminalen Bereich des Proteins eine Coiled-Coil-Domäne identifiziert werden. Äquivalent zum MARV VP35 wurde durch die Substitution kritischer Aminosäuren im Bereich des Coiled-Coil-Motivs die Homooligomerisierung des EBOV VP35 unterbunden (Reid et al., 2005; Schinkel, 2005). Coiled-Coils sind hoch flexible Proteinstrukturen, die für eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind (Burkhard et al., 2001; Mason and Arndt, 2004). Durch die Übertragung der Coiled-Coil-Struktur des MARV VP35 auf ein monomeres Reporterprotein (Hartlieb et al., 2003) konnte dessen Interaktion vermittelt werden (Möller et al., 2005). Diese Daten weisen darauf hin, dass eine Coiled-Coil-Struktur innerhalb des N-Terminus des VP35 der Filoviren das entscheidende Element für die Ausbildung der homooligomeren Formen darstellt.

Coiled-Coil-Strukturen als Module zur Vermittlung der Homooligomerisierung der Polymerasekofaktoren der Mononegavirales

Obwohl das VP35 der Filoviren vergleichsweise schwach phosphoryliert ist, repräsentiert es das funktionelle Analogon zu den Phospho(P)-Proteinen der anderen Viren der Ordnung der Mononegavirales (Becker and Mühlberger, 1999). Die meisten der für die Homooligomerisierung der P-Proteine verantwortlichen Domänen beinhalten ein Coiled-Coil-Motiv, das allerdings an unterschiedlichen Stellen der entsprechenden P-Proteine lokalisiert ist (Curran et al., 1995a). Für die Vesikuloviren, die zur Familie der *Rhabdoviridae* gehören, konnten die jeweiligen Oligomerisierungsdomänen auf die N-Termini der P-Proteine eingegrenzt werden (Curran et al., 1995a; Raha et al., 2000). Bezüglich der P-Proteine der Familie der *Paramyxoviridae* befinden sich die Coiled-Coil-Strukturen vorwiegend im C-terminalen Bereich (Asenjo and Villanueva, 2000; Choudhary et al., 2002; Curran et al., 1995a; De et al., 2000; Harty and Palese, 1995; Khattar et al., 2001; Llorente et al., 2006; Nishio et al., 1997; Rahaman et al., 2004; Shaji and Shaila, 1999; Tarbouriech et al., 2000a; b).

Die *Bornaviridae* bilden eine eigene Familie innerhalb der Ordnung der Mononegavirales. Sie unterscheiden sich zum einen durch ihre Replikation im Kern der infizierten Zelle und zum anderen durch die Nutzung des zellulären Splicing-Apparates von den anderen Mitgliedern der Ordnung der Mononegavirales. Überdies konnte eine Homooligomerisierung des Borna-Virus P-Proteins gezeigt werden, die allerdings nicht über eine Coiled-Coil-Struktur vermittelt wird (Schneider et al., 2004; Schwemmler et al., 1998).

Mit einigen Ausnahmen (Curran et al., 1995a; Raha et al., 2000; Schwemmler et al., 1998) scheint die Homooligomerisierung der P-Proteine bzw. des VP35 über Coiled-Coil-Strukturen, die vorwiegend im N-terminalen Bereich der analysierten Proteine zu finden sind, aber auch C-terminal vorkommen, eine allgemeine Eigenschaft innerhalb der Ordnung Mononegavirales zu sein. Interessanterweise ist die Sequenzhomologie der P-Proteine und des VP35 relativ gering. Obwohl die Homooligomerisierung der P-Proteine bzw. des VP35 für deren Funktion essentiell ist, scheint die Lokalisation der für die Homooligomerisierung verantwortlichen Module keine Rolle zu spielen (Curran, 1996; 1998; Gao et al., 1996; Gigant et al., 2000).

Einfluss der Homooligomerisierung des VP35 auf die Replikation und Transkription der viralen RNA des Marburg-Virus

Die Komplexe aus VP35 und dem L-Protein der Familie der *Filoviridae* sowie aus den P- und L-Proteinen der *Rhabdo-*, *Paramyxo-*, und *Bornaviridae* fungieren als RNA-abhängige RNA-Polymerasen. Das L-Protein verkörpert hierbei die katalytische

Untereinheit, während das VP35 bzw. die P-Proteine die Polymeraseko-faktoren repräsentieren (Banerjee and Barik, 1992; Horikami et al., 1992; Mühlberger et al., 1992; 1998; 1999; Parks, 1994; Walker et al., 2000). Nach Austausch der zwei kritischen Leucinreste innerhalb der Coiled-Coil-Domäne des MARV VP35 konnten auf Grund einer zerstörten Coiled-Coil-Struktur keine Homooligomere ausgebildet werden. Das monomere VP35 konnte weder Replikation noch Transkription unterstützen. (Möller et al., 2005). Bei vergleichbaren Untersuchungen zur Funktion der Homooligomerisierung des EBOV VP35 wurde festgestellt, dass diese ebenfalls für die Transkription der viralen RNA notwendig ist (Schinkel, 2005). Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass ausschließlich homooligomeres VP35 in der Lage war, mit dem L-Protein zu interagieren. Zusammenfassend bildet somit eine intakte Coiled-Coil-Struktur im N-terminalen Bereich des VP35 der *Filoviridae* die Grundlage für die Homooligomerisierung des Proteins, die wiederum ausschlaggebend für die Interaktion mit dem L-Protein und somit für die Ausbildung eines funktionellen Polymerasekomplexes ist.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Funktionsanalyse des P-Proteins des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) aus der Familie der *Rhabdoviridae* gemacht. Wie im Falle des VP35 der Filoviren konnte das VSV P-Protein lediglich in seiner homooligomeren Form mit der katalytischen Untereinheit des Polymerasekomplexes interagieren und somit die Replikation und Transkription der viralen RNA vermitteln (Das et al., 2005; Gao et al., 1996; Gupta et al., 2003). Eine andere Situation konnte für die P-Proteine einiger Mitglieder der Familie der *Paramyxoviridae* beobachtet werden. Sowohl das P-Protein des Rinderpest-Virus (RPV) als auch des humanen Parainfluenzavirus (hPIV) Typ 3 waren in der Lage, in ihrer monomeren Form mit dem L-Protein zu interagieren. Entscheidend war jedoch, dass ausschließlich die homooligomeren P-Proteine im Komplex mit den L-Proteinen die Vermehrung der viralen RNA bewerkstelligen konnten (Choudhary et al., 2002; Curran, 1996; 1998; Rahaman et al., 2004).

Für die Vertreter der *Bornaviridae*, die vierte Familie innerhalb der Ordnung Mononegavirales, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Homooligomerisierung des P-Proteins essentiell für dessen Funktion während der Synthese der viralen RNA ist, obwohl auch hier das monomere P-Protein die Fähigkeit besaß, mit dem L-Protein zu interagieren (Schneider et al., 2004). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Homooligomerisierung des VP35 sowie der P-Proteine der Viren der Ordnung Mononegavirales wichtig für die Funktionalität der entsprechenden Polymerasekomplexe im Vermehrungsprozess der viralen RNA ist.

Eine Hypothese zur Notwendigkeit der homooligomeren Formen der Polymerasekofaktoren besagt, dass die funktionellen Polymerasekomplexe über die N(NP)/RNA-Matrize hinweg rollen, wobei die einzelnen Untereinheiten der VP35- bzw. P-Homooligomere nacheinander mit dem N(NP)/RNA-Template in Interaktion treten. Die daraus resultierende Fortbewegung des Polymerasekomplexes an der N(NP)/RNA-Matrize entlang ermöglicht das Ablesen des Templates, die mRNA-Synthese als auch die Replikation der viralen RNA. In Anwesenheit des monomeren P-Proteins wäre diese Bewegung nicht möglich (Curran, 1998; Kolakofsky et al., 2004; Mellon and Emerson, 1978).

Neben der Homooligomerisierung des VP35 konnte des Weiteren gezeigt werden, dass der C-Terminus des Proteins eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit dem L-Protein spielt. Innerhalb dieses Bereiches ist die eigentliche Bindungsdomäne für das L-Protein lokalisiert (Möller et al., 2005). Für die Vertreter der Familie der *Paramyxoviridae* konnten die Interaktionsdomänen für die L-Proteine ebenfalls auf die C-Termini der zugehörigen P-Proteine eingegrenzt werden (Bousse et al., 2001; Curran et al., 1994; De et al., 2000; Khattar et al., 2001; Nishio et al., 2000; Smallwood et al., 1994; Tuckis et al., 2002). Innerhalb der Familie der *Rhabdoviridae* befinden sich die L-Bindungsstellen in den N-terminalen Bereichen der entsprechenden P-Proteine (Chenik et al., 1998; Emerson and Schubert, 1987; Paul et al., 1988; Takacs et al., 1995).

In den bisher untersuchten Fällen war eine räumliche Nähe der Homooligomerisierungsdomänen und der L-Bindungsstellen auf dem VP35 bzw. den P-Proteinen erkennbar, die jedoch nicht direkt überlappen. Diese Beobachtungen bildeten die experimentelle Grundlage, um die Transkription der viralen RNA des MARV zu unterbinden. Der Einsatz von dominant-negativen VP35-Deletionsmutanten, die noch in der Lage waren, zu oligomerisieren, allerdings nicht über eine intakte C-terminale L-Bindungsstelle verfügten, führte zur Blockade der viralen RNA-Synthese (Möller et al., 2005). Ähnliche Untersuchungen wurden für das P-Protein des zur Familie der *Paramyxoviridae* gehörenden RPV durchgeführt. Die Coiled-Coil-Struktur allein war nicht in der Lage, mit dem L-Protein zu interagieren (Chattopadhyay and Shaila, 2004). Allerdings verursachte im Minigenomsystem (Raha et al., 2004) die Ausbildung von gemischten Oligomeren einen dominant-negativen Effekt auf die Transkription und Replikation der viralen RNA (Rahaman et al., 2004). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein intakter Polymerasekomplex aus homooligomeren funktionellen P- bzw. VP35-Molekülen und dem L Protein bestehen muss. Darüber hinaus muss für die Funktionalität der Polymerasekomplexe eine intakte Bindung über die C-Termini des VP35 bzw. über die entsprechenden Domänen auf den P-Proteinen mit der

katalytischen Untereinheit gewährleistet sein. Auf Grund der Tatsache, dass Coiled-Coils als strukturelle Komponenten in eine Reihe von wichtigen Protein-Protein-Interaktionen involviert sind, scheint die Homooligomerisierung des VP35 ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung eines Therapeutikums gegen eine MARV-Infektion zu sein.

Einfluss der Homooligomerisierung des Marburg-Virus VP35 auf die Interaktion mit dem NP

Das Nukleoprotein N bzw. NP ist die Hauptkomponente der Nukleokapsidkomplexe von den Viren der Ordnung Mononegavirales. Das mit sich selbst interagierende N oder NP induziert die Ausbildung so genannter intrazytoplasmatischer Einschlusskörper, die mikroskopisch deutlich erkennbar sind. Diese Einschlusskörper sind in infizierten Zellen zu beobachten und werden als Bildungszentren neuer Nukleokapside sowie Orte der Replikation betrachtet (Becker et al., 1998; Bhella et al., 2002; Buchholz et al., 1993; Fooks et al., 1993; Iseni et al., 1998; Karlin et al., 2003; Spehner et al., 1991). Das NP des MARV ist in der Lage nach rekombinanter Einzelexpression, Nukleokapsid-ähnliche Strukturen auszubilden, die dem Grundgerüst der Nukleokapside sehr ähnlich sind. Es wird davon ausgegangen, dass die Bildung dieser helikalen Strukturen den ersten Schritt im Zusammenbau des Nukleokapsidkomplexes darstellt (Kolesnikova et al., 2000, Mavrakis, 2002).

Das NP des MARV ist außerdem in der Lage, mit dem VP35 zu interagieren. Mittels Immunfluoreszenzanalysen konnte beobachtet werden, dass das ansonsten homogen verteilte VP35 nach Koexpression mit dem NP in die vom NP-induzierten intrazytoplasmatischen Einschlusskörper rekrutiert wurde. Diese Interaktion könnte über eine direkte Bindung an das NP, aber auch über eine weitere unbekannte Komponente vermittelt werden. Da jedoch eine Interaktion zwischen dem NP und VP35 mittels Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden konnte, wird davon ausgegangen, dass die Rekrutierung des VP35 in die Einschlusskörper durch eine direkte Bindung an das NP zustande kam (Becker et al., 1998; Möller et al., 2005). Für die Interaktion mit dem NP war die Homooligomerisierung des MARV VP35 nicht notwendig. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass verschiedene stöchiometrische Formen des VP35 die Funktion des Proteins innerhalb der Proteinkomplexe mit den anderen Nukleokapsidproteinen regulieren könnte (Möller et al., 2005).

Vergleichbare Beobachtungen konnten für die P-Proteine der Viren der Familie der *Rhabdoviridae* gemacht werden (Green et al., 2000; Mavrakis et al., 2004). Kontroverse Daten ergaben sich für die P-Proteine der Familie der *Paramyxoviridae*. Das P-Protein des hPIV Typ 3 scheint in seiner monomeren Form ebenfalls in der Lage zu sein, mit dem Nukleoprotein zu interagieren (Choudhary et al., 2002). Für die P-

Proteine des RPV sowie des Sendai-Virus konnte jedoch gezeigt werden, dass deren Homooligomerisierung wichtig für die Komplexbildung mit dem N bzw. NP zu sein scheint (Shaji and Shaila, 1999; Tuckis et al., 2002). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Lokalisation der Interaktionsdomänen auf den P-Proteinen zwischen den *Rhabdo-* und *Paramyxoviridae* sein. Ferner variieren die P-Proteine innerhalb der Ordnung der Mononegavirales von 250 bis 600 Aminosäuren erheblich in ihrer Größe, was zum Teil zu Überlappungen und somit zu einer Abhängigkeit der Interaktionsdomänen führen könnte.

Einfluss des VP35 auf die Ausbildung der Einschlusskörper und die Morphogenese des Nukleokapsidkomplexes des Marburg-Virus

Durch die Komplexbildung des VP35 mit dem NP scheint das VP35 wesentlich an der Entstehung des Nukleokapsidkomplexes und somit an der Morphogenese neuer Nachkommenviren beteiligt zu sein. Die für das NP verantwortlichen Bindungsstellen befinden sich sowohl auf dem N- als auch auf dem C-Terminus des VP35 (Möller, 2002). Wie bei anderen Vertretern der Mononegavirales konnte auch hier die Existenz von zwei verschiedenen Bindungsstellen nachgewiesen werden, die in den meisten Fällen ebenfalls auf dem N- und dem C-Terminus lokalisiert sind (Chenik et al., 1994; Fu et al., 1994; Garcia-Barreno et al., 1996; Green et al., 2000; Harty and Palese, 1995; Khattar et al., 2001; Liston et al., 1997; Mallipeddi et al., 1996; Nishio et al., 1996; 1999; Ryan et al., 1991; Ryan and Portner, 1990; Takacs et al., 1993). Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Interaktion von NP und VP35 eine Veränderung der Struktur der vom NP gebildeten helikalen Strukturen bewirkt (Kolesnikova, persönliche Mitteilung). Dafür spricht auch, dass eine VP35-Deletionsmutante, die ausschließlich den N-Terminus des Proteins umfasste, die Ausbildung der vom NP-induzierten Einschlusskörper verhinderte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der N-Terminus des VP35 ausreichend ist, um mit dem NP zu interagieren. Andererseits scheint die C-terminale NP-Bindungsstelle des VP35 in Anwesenheit beider Proteine eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung der Struktur der Einschlusskörper zu haben.

Das Nukleoprotein N bzw. NP der Viren der Mononegavirales tritt in zwei verschiedenen Formen auf. Zum einen liegt das selbst aggregierte N bzw. NP, wie bereits beschrieben, in der Gestalt von Nukleokapsidstrukturen in den Einschlusskörpern vor. Ferner erscheint das N bzw. NP in einer löslichen Variante, die als N₀ bzw. NP₀ bezeichnet wird (Curran et al 1995b). Für die P-Proteine der Vertreter der Mononegavirales ist bekannt, dass diese in der Lage sind, sowohl mit dem löslichen N₀ bzw. NP₀ als auch mit dem Nukleokapsid-assoziierten N bzw. NP interagieren zu können. Das einzelsträngige RNA-Genom der Viren der Mononegavirales, welches

vollständig durch das Nukleoprotein verpackt ist, dient als Matrize für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase. Es wird davon ausgegangen, dass das N₀ bzw. NP₀ durch die Interaktion mit dem entsprechenden P-Proteinen in Lösung gehalten wird und so eine Bindung an unspezifische zelluläre RNA verhindert werden kann (Curran et al., 1995b, Huber et al., 1991; Spehner et al., 1997). Des Weiteren dienen die N₀- bzw. NP₀-P-Komplexe als Substrate für die Verpackung der genomischen RNA, indem die P-Proteine abdissoziieren, sobald das NP an die nackte RNA gebunden hat (Cevik et al., 2004). Möglicherweise hat der N-Terminus des MARV VP35 einen entscheidenden Einfluss darauf, das NP in Lösung zu halten.

Ähnliche Beobachtungen konnten bereits für andere Vertreter der Mononegavirales gemacht werden. So fungiert der N-Terminus des Sendai-Virus P-Proteins als Chaperon für das NP, welches während der Replikation des Genoms zum Verpacken der nackten RNA zur Verfügung gestellt wird (Curran et al., 1995b). Für das P-Protein des Rabies-Virus, einem Vertreter der Familie der *Rhabdoviridae*, konnte gezeigt werden, dass das Nukleoprotein und das P-Protein zum einen nach unabhängiger und zum anderen nach simultaner Expression die Fähigkeit besitzen, miteinander zu interagieren. Die dafür verantwortlichen N-Bindungsstellen befinden sich sowohl auf dem N- als auch auf dem C-Terminus des P-Proteins. Allerdings war eine Deletionsmutante, die nur den N-Terminus des P-Proteins umfasste, nur nach Koexpression mit dem N-Protein in der Lage, mit diesem in Interaktion zu treten. Möglicherweise simulieren diese Untersuchungen die Situation in vivo, wobei die neu synthetisierten N-Termini des N- und des P-Proteins aneinander binden, und das N-Protein somit zunächst in Lösung gehalten werden kann (Fu et al., 1994).

Wie für das MARV VP35 gezeigt werden konnte, scheint auch im Falle des hPIV Typ 2 die C-terminale N-Bindungsstelle des P-Proteins einen wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung der intrazytoplasmatischen Einschlusskörper zu haben (Nishio et al., 1996). Die Vorstellungen gehen auch hier in die Richtung, dass in der frühen Phase des Vermehrungszyklus die N-Termini der Nukleoproteine mit denen der P-Proteine interagieren, um das N bzw. NP somit zunächst in Lösung zu halten. Während der Replikation der genomischen RNA könnte diese mit der N-terminalen N- bzw. NP-Bindungsstelle auf dem P-Protein konkurrieren, was eine Abdissoziation des P-Proteins zur Folge hätte (Hudson et al., 1986).

Nach der Verpackung replizierter genomischer RNA, könnte das N bzw. NP mit dem C-Terminus der P-Proteine bzw. des VP35 in Interaktion treten und so die Morphogenese der Nukleokapsidkomplexe bzw. neuer Viren initiieren (Fu et al., 1994; Hudson et al., 1986): Diese Beobachtungen legen nahe, dass die verschiedenen N- bzw. NP-Bindungsstellen der P-Proteine in unterschiedliche und zeitlich versetzte Interaktionen

involviert sein könnten. Würden die P-Proteine nicht über ihren C-Terminus mit dem Nukleoprotein interagieren, so wäre eine Rekrutierung der P-Proteine in neue Nukleokapsid-komplexe eher unwahrscheinlich (Fu et al., 1994).

Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Homooligomerisierung des MARV VP35 keine Rolle bei der Komplexbildung mit dem NP spielt, scheinen die Coiled-Coil-Strukturen beider Proteine, jedoch in einer gewissen Abhängigkeit zu stehen. Das NP verfügt über zwei Coiled-Coil-Strukturen, wobei die erste ausschlaggebend für die Homooligomerisierung des Proteins zu sein scheint, da nach Deletion dieser Domäne, das NP nicht mehr in der Lage war, in den typischen Einschlusskörpern zu assemblieren (Di Carlo, 2005). Überraschenderweise wurde durch die Koexpression mit VP35 die NP-Mutante so moduliert, dass die Ausbildung der intrazytoplasmatischen Einschlusskörper rekonstituiert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte eine VP35-Substitutionsmutante mit einem zerstörten Coiled-Coil-Motiv die Morphologie der Einschlusskörper nicht wieder herstellen. Beide Proteine blieben homogen verteilt, und es gab auf Grund des Verlustes der intrazytoplasmatischen Einschlusskörper keine Indikation einer Interaktion. Da aber zusätzlich ein zweiter Phänotyp auftrat, in denen beide Proteine in kleinen, über das gesamte Zytoplasma verteilten Aggregaten kolokalisierten, wird davon ausgegangen, dass das NP und das VP35 ebenfalls in ihren monomeren Formen miteinander interagieren. Diese Untersuchungen in Bezug auf die Interaktion von NP und VP35 legen nahe, dass für die Ausbildung der intrazytoplasmatischen Einschlusskörper, die die Reife- und Morphogenesezentren neuer Nukleokapsidkomplexe repräsentieren, in beiden Proteinen intakte Coiled-Coil-Strukturen vorhanden sein müssen. Ferner lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die niedermolekularen Formen beider Proteine miteinander interagieren können und als intermediäre Komplexe zusätzlich andere, bislang unbekannte Funktionen während der Replikation des MARV wahrnehmen können.

Stöchiometrie der Homooligomere des Marburg-Virus VP35

Über den exakten Oligomerisierungsstatus der P-Proteine der Viren der Ordnung der Mononegavirales wird seit längerem kontrovers diskutiert. In einer Reihe von Untersuchungen von den Vertretern der Familie der *Rhabdoviridae* bis hin zu den *Paramyxoviridae* wurden die P-Proteine als Mono-, Di-, Tri- bzw. Tetramere nachgewiesen (Chattopadhyay et al., 1997; Gao et al., 1996; Gao and Lenard, 1995; Rahaman et al., 2004; Tabouriech et al., 2000a; b). Für das P-Protein des RPV wurde ein tetramerer Oligomerisierungsstatus gezeigt (Rahaman et al., 2004). Obwohl in früheren Arbeiten angedeutet wurde, dass das Sendai-Virus P-Protein als Trimer vorliegt, konnte mit Hilfe neuerer kristallographischer Analysen ebenfalls ein Tetramer identifiziert werden (Tabouriech et al., 2000a; b). Obgleich die P-Proteine der Familie

der *Rhabdoviridae* als Trimere nachgewiesen wurden, konnte eine Tetramerisierung nicht ausgeschlossen werden (Gao et al., 1996; Gao and Lenard, 1995; Gigant et al., 2000). Tetramere konnten in dieser Arbeit ebenfalls für das VP35 nachgewiesen werden. Diese Daten lassen darauf schließen, dass sowohl die P-Proteine als auch das VP35 als Tetramere vorkommen können.

Multifunktionalität des VP35 des Marburg-Virus

Zusammenfassend repräsentiert das VP35 eine zentrale Komponente im Vermehrungszyklus des MARV, wobei es durch die Interaktion mit den anderen Nukleokapsidproteinen des MARV verschiedene Funktionen ausüben kann. Zum einen konnte gezeigt werden, dass das VP35 in der Lage ist, Homooligomere auszubilden. Diese homooligomeren Formen des VP35 sind notwendig für die Interaktion mit dem L-Protein, welches die katalytische Untereinheit des MARV-Polymerasekomplexes verkörpert. Die Homooligomerisierung des VP35 ist somit essentiell für die Synthese der viralen RNA. Zum anderen war die Homooligomerisierung des VP35 für die Komplexbildung mit dem NP nicht notwendig (Möller et al., 2005).

Die Morphogenese von Nachkommenviren beginnt mit der Assemblierung neuer Nukleokapsidkomplexe, die in zwei Schritten erfolgt. Zunächst wird die neu synthetisierte genomische RNA durch das NP verpackt. Bis zu diesem Prozess wird das NP wahrscheinlich durch die Ausbildung eines NP₀-VP35-Komplexes in Lösung gehalten, wobei dafür der N-Terminus des VP35 eine wesentliche Rolle zu spielen scheint. Ob das VP35 innerhalb dieses Komplexes als Homooligomer vorliegt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Nach der Verpackung der viralen RNA wird die Ausbildung reifer Nukleokapsidkomplexe durch die Anlagerung der Nukleokapsidproteine VP35, L, und VP30 vervollständigt. Die Interaktion des VP35 mit Nukleokapsid-assoziiertem NP wird dabei möglicherweise durch den C-Terminus des VP35 geregelt. Sowohl bei der Homooligomerisierung des NP als auch des VP35 spielen vorhergesagte Coiled-Coil-Strukturen eine entscheidende Rolle.

Das VP35 ist nicht nur wichtig für die Vermehrung der viralen RNA und die Morphogenese neuer Nukleokapsidkomplexe, sondern fungiert im Rahmen einer MARV-Infektion als Typ I Interferonantagonist und schwächt somit die unspezifischen zellulären Abwehrmechanismen gegen eine Virusinfektion (Basler et al., 2000; 2003; persönliche Mitteilung). Für das VP35 des EBOV konnte gezeigt werden, dass dieses für die Inhibition der Interferonsignalkaskade als Homooligomer vorliegen muss (Reid et al., 2005). Das MARV enthält mit 19,1 Kilobasen eine sehr beschränkte genetische Information, die lediglich für sieben Proteine kodiert. Damit sich die Viren in der infizierten Zelle erfolgreich vermehren können, muss diese genetische Information optimal genutzt werden. Durch die Interaktion mit unterschiedlichen Partnern können

von den einzelnen viralen Proteinen möglicherweise mehrere Funktionen ausgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das MARV VP35 in verschiedenen homooligomeren Formen an der Ausbildung von diversen Protein-Protein-Komplexen mit den anderen Nukleokapsidproteinen beteiligt ist und somit verschiedene Funktionen im Vermehrungszyklus des MARV wahrnehmen kann.

6 Zusammenfassung

Das Marburg-Virus verursacht eine fieberhafte hämorrhagische Erkrankung bei menschlichen und nichtmenschlichen Primaten, die mit hohen Letalitätsraten einhergeht. Taxonomisch bildet das Marburg-Virus (MARV) zusammen mit dem Ebola-Virus (EBOV) die Familie der *Filoviridae*. Die Virionen sind aus einem Nukleokapsidkomplex, der über eine Proteinmatrix mit der Virushülle verbunden ist, aufgebaut. Der Nukleokapsidkomplex besteht aus der viralen RNA sowie den vier Nukleokapsidproteinen NP, VP35, VP30 und L, die untereinander durch verschiedene Protein-Protein-Interaktionen verbunden sind. Der Komplex aus VP35 und dem L-Protein fungiert als virale RNA-abhängige RNA Polymerase, wobei L den katalytischen Teil des Enzyms darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Homooligomerisierung des Polymerasekofaktors VP35 des MARV hinsichtlich ihrer Funktion für die Synthese der viralen RNA und die Morphogenese neuer Nukleokapsidkomplexe sowie die Interaktion des VP35 mit dem NP untersucht.

Die Homooligomerisierung des MARV VP35 wird über eine Coiled-Coil-Struktur im N-Terminus des Proteins vermittelt, die im Bereich der Aminosäuren 70 bis 120 lokalisiert ist. Zwei Leucinreste an den Positionen 90 und 104 waren ausschlaggebend für die Stabilität der Coiled-Coil-Struktur und somit für die Homooligomerisierung des VP35. Ferner konnte gezeigt werden, dass das Coiled-Coil-Motiv des VP35 ausreichend war, um die Protein-Protein-Interaktion zu vermitteln. Die Homooligomerisierung des VP35 bildete die Voraussetzung für die Interaktion mit dem L-Protein und die Ausbildung eines funktionellen Polymerasekomplexes. Im Gegensatz dazu schien die Homooligomerisierung des VP35 für die Bindung an das NP, der strukturgebenden Komponente des Nukleokapsidkomplexes, nicht notwendig zu sein. Über die Interaktion des NP mit dem N-Terminus des VP35 könnte das NP durch das VP35 in Lösung gehalten und während der Replikation der viralen RNA als Substrat für deren Verpackung zur Verfügung gestellt werden. Eine weitere NP-Bindungsstelle auf dem C-Terminus des VP35 scheint eine wichtige Rolle beim Zusammenbau neuer Nukleokapsidkomplexe zu spielen. Die Integrität der Coiled-Coil-Strukturen des VP35 und des NP hatte einen wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung und die Struktur der intrazytoplasmatischen Einschlusskörper, die die Reifezentren neuer Nukleokapsidkomplexe darstellen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Homooligomerisierung des MARV VP35 essentiell für dessen Interaktion mit dem L und für die virale Transkription und Replikation ist. Für die direkte Interaktion von VP35 mit NP scheint die Homooligomerisierung des VP35 keine Rolle zu spielen. Es zeichnet sich allerdings ab, dass für die Entstehung von funktionellen Nukleokapsiden die Homooligomerisierung des VP35 notwendig ist.

7 Literaturverzeichnis

1. **Asenjo, A., and N. Villanueva.** 2000. Regulated but not constitutive human respiratory syncytial virus (HRSV) P protein phosphorylation is essential for oligomerization. *FEBS Lett* **467**:279-84.
2. **Baize, S., E. M. Leroy, M. C. Georges-Courbot, M. Capron, J. Lansoud-Soukate, P. Debre, S. P. Fisher-Hoch, J. B. McCormick, and A. J. Georges.** 1999. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med* **5**:423-6.
3. **Baize, S., P. Marianneau, M. C. Georges-Courbot, and V. Deubel.** 2001. Recent advances in vaccines against viral haemorrhagic fevers. *Curr Opin Infect Dis* **14**:513-8.
4. **Bamberg, S.** 2000. Interaktion des Marburg-Virus VP24 mit dem Oberflächenprotein GP und anionischen Membranstrukturen. Diplomarbeit. Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg.
5. **Bamberg, S., L. Kolesnikova, P. Möller, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2005. VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles. *J Virol* **79**:13421-33.
6. **Banerjee, A. K., and S. Barik.** 1992. Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. *Virology* **188**:417-28.
7. **Basler, C. F., X. Wang, E. Mühlberger, V. Volchkov, J. Paragas, H. D. Klenk, A. Garcia-Sastre, and P. Palese.** 2000. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12289-94.
8. **Basler, C. F., and P. Palese.** 2003. Modulation of Innate Immunity by Filoviruses. In: *Ebola and Marburg Viruses: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Bioscience:305-50.
9. **Basler, C. F., A. Mikulasova, L. Martinez-Sobrido, J. Paragas, E. Mühlberger, M. Bray, H. D. Klenk, P. Palese, and A. Garcia-Sastre.** 2003. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **77**:7945-56.
10. **Becker, S., H. Feldmann, C. Will, and W. Slenczka.** 1992. Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide? *Med Microbiol Immunol* **181**:43-55.
11. **Becker, S., S. Huppertz, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1994. The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated. *J Gen Virol* **75**:809-18.
12. **Becker, S., M. Spiess, and H. D. Klenk.** 1995. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol* **76**:393-9.
13. **Becker, S., C. Rinne, U. Hofsäss, H.-D. Klenk, and E. Mühlberger.** 1998. Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology* **249**:406-17.
14. **Becker, S., and E. Mühlberger.** 1999. Co- and posttranslational modifications and functions of Marburg virus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**:23-34.
15. **Bertherat, E., Talarmin, A., 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**:201-4.
16. **Bhella, D., A. Ralph, L. B. Murphy, and R. P. Yeo.** 2002. Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae. *J Gen Virol* **83**:1831-9.
17. **Bousse, T., T. Takimoto, T. Matrosovich, and A. Portner.** 2001. Two regions of the P protein are required to be active with the L protein for human parainfluenza virus type 1 RNA polymerase activity. *Virology* **283**:306-14.
18. **Bray, M., J. Driscoll, and J. W. Huggins.** 2000. Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral Res* **45**:135-47.
19. **Bray, M., J. L. Raymond, T. Geisbert, and R. O. Baker.** 2002. 3-deazaneplanocin A induces massively increased interferon-alpha production in Ebola virus-infected mice. *Antiviral Res* **55**:151-9.
20. **Buchholz, C. J., D. Spehner, R. Drillien, W. J. Neubert, and H. E. Homann.** 1993. The conserved N-terminal region of Sendai virus nucleocapsid protein NP is required for nucleocapsid assembly. *J Virol* **67**:5803-12.
21. **Burkhard, P., J. Stetefeld, and S. V. Strelkov.** 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* **11**:82-8.
22. **CDC, C. f. D. C. a. P.** 1995. Outbreak of Ebola Viral Hemorrhagic Fever - Zaire, 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **44**:341-2.
23. **CDC, C. f. D. C. a. P.** 1996. Ebola-Reston virus infection among quarantined nonhuman primates--Texas, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **45**:314-6.

24. **CDC, C. f. D. C. a. P.** 2001. Outbreak of Ebola hemorrhagic fever in Uganda, August 2000 - January 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **50**:73-7.
25. **Cevik, B., J. Kaesberg, S. Smallwood, J. A. Feller, and S. A. Moyer.** 2004. Mapping the phosphoprotein binding site on Sendai virus NP protein assembled into nucleocapsids. *Virology* **325**:216-24.
26. **Chan, S. Y., C. J. Empig, F. J. Welte, R. F. Speck, A. Schmaljohn, J. F. Kreisberg, and M. A. Goldsmith.** 2001. Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell* **106**:117-26.
27. **Chattopadhyay, D., and T. Raha.** 1997. Single serine phosphorylation within the acidic domain of Chandipura virus P protein regulates the transcription in vitro. *Virology* **239**:11-9.
28. **Chattopadhyay, A., and M. S. Shaila.** 2004. Rinderpest virus RNA polymerase subunits: mapping of mutual interacting domains on the large protein L and phosphoprotein p. *Virus Genes* **28**:169-78.
29. **Chenik, M., K. Chebli, Y. Gaudin, and D. Blondel.** 1994. In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein. *J Gen Virol* **75**:2889-96.
30. **Chenik, M., M. Schnell, K. K. Conzelmann, and D. Blondel.** 1998. Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein. *J Virol* **72**:1925-30.
31. **Choudhary, S. K., A. G. Malur, Y. Huo, B. P. De, and A. K. Banerjee.** 2002. Characterization of the oligomerization domain of the phosphoprotein of human parainfluenza virus type 3. *Virology* **302**:373-82.
32. **Collins, P. L., M. G. Hill, J. Cristina, and H. Grosfeld.** 1996. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:81-5.
33. **Curran, J., T. Pelet, and D. Kolakofsky.** 1994. An acidic activation-like domain of the Sendai virus P protein is required for RNA synthesis and encapsidation. *Virology* **202**:875-84.
34. **Curran, J., R. Boeck, N. Lin-Marq, A. Lupas, and D. Kolakofsky.** 1995a. Paramyxovirus phosphoproteins form homotrimers as determined by an epitope dilution assay, via predicted coiled coils. *Virology* **214**:139-49. 34.
35. **Curran, J., J. B. Marq, and D. Kolakofsky.** 1995b. An N-terminal domain of the Sendai paramyxovirus P protein acts as a chaperone for the NP protein during the nascent chain assembly step of genome replication. *J Virol* **69**:849-55.
36. **Curran, J.** 1996. Reexamination of the Sendai virus P protein domains required for RNA synthesis: a possible supplemental role for the P protein. *Virology* **221**:130-40.
37. **Curran, J.** 1998. A role for the Sendai virus P protein trimer in RNA synthesis. *J Virol* **72**:4274-80.
38. **Das, S. C., and A. K. Pattnaik.** 2005. Role of the hypervariable hinge region of phosphoprotein P of vesicular stomatitis virus in viral RNA synthesis and assembly of infectious virus particles. *J Virol* **79**:8101-12.
39. **De, B. P., M. A. Hoffman, S. Choudhary, C. C. Huntley, and A. K. Banerjee.** 2000. Role of NH(2)- and COOH-terminal domains of the P protein of human parainfluenza virus type 3 in transcription and replication. *J Virol* **74**:5886-95.
40. **Dessen, A., E. Forest, V. Volchkov, O. Dolnik, H. D. Klenk, and W. Weissenhorn.** 2000a. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the matrix protein from Ebola virus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56 (Pt 6)**:758-60.
41. **Dessen, A., V. Volchkov, O. Dolnik, H. D. Klenk, and W. Weissenhorn.** 2000b. Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *Embo J* **19**:4228-36.
42. **Di Carlo, A.** 2004. Charakterisierung von Oligomerisierungsdomänen des Marburg-Virus Nukleoprotein und deren funktionelle Bedeutung. Dissertation. Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg.
43. **Elliott, L. H., M. P. Kiley, and J. B. McCormick.** 1985. Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* **147**:169-76.
44. **Emerson, S. U., and M. Schubert.** 1987. Location of the binding domains for the RNA polymerase L and the ribonucleocapsid template within different halves of the NS phosphoprotein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:5655-9.
45. **Empig, C. J., and M. A. Goldsmith.** 2002. Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *J Virol* **76**:5266-70.
46. **Enterlein, S.** 2005. Untersuchungen zur Replikation und Transkription von Marburg- und Ebolavirus. Dissertation. Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg.

47. **Feldmann, H., C. Will, M. Schikore, W. Slenczka, and H. D. Klenk.** 1991. Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. *Virology* **182**:353-6.
48. **Feldmann, H., E. Mühlberger, A. Randolph, C. Will, M. P. Kiley, A. Sanchez, and H. D. Klenk.** 1992. Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Res* **24**:1-19.
49. **Feldmann, H., H. D. Klenk, and A. Sanchez.** 1993. Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch Virol Suppl* **7**:81-100.
50. **Feldmann, H., W. Slenczka, and H. D. Klenk.** 1996a. Emerging and reemerging of filoviruses. *Arch Virol Suppl* **11**:77-100.
51. **Feldmann, H., H. Bugany, F. Mahner, H. D. Klenk, D. Drenckhahn, and H. J. Schnittler.** 1996b. Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol* **70**:2208-14.
52. **Feldmann, H., and M. P. Kiley.** 1999. Classification, structure, and replication of filoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**:1-21.
53. **Fisher-Hoch, S. P., G. I. Perez-Orozco, E. L. Jackson, L. M. Hermann, and B. G. Brown.** 1992. Filovirus clearance in non-human primates. *Lancet* **340**:451-3.
54. **Fisher-Hoch, S. P., and J. B. McCormick.** 1999. Experimental filovirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**:117-43.
55. **Fooks, A. R., J. R. Stephenson, A. Warnes, A. B. Dowsett, B. K. Rima, and G. W. Wilkinson.** 1993. Measles virus nucleocapsid protein expressed in insect cells assembles into nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol* **74 (Pt 7)**:1439-44.
56. **Formenty, P., C. Hatz, B. Le Guenno, A. Stoll, P. Rogenmoser, and A. Widmer.** 1999. Human infection due to Ebola virus, subtype Cote d'Ivoire: clinical and biologic presentation. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S48-53.
57. **Fowler, T., S. Bamberg, P. Möller, H. D. Klenk, T. F. Meyer, S. Becker, and T. Rudel.** 2005. Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNA interference. *J Gen Virol* **86**:1181-8.
58. **Fu, Z. F., Y. Zheng, W. H. Wunner, H. Koprowski, and B. Dietzschold.** 1994. Both the N- and the C-terminal domains of the nominal phosphoprotein of rabies virus are involved in binding to the nucleoprotein. *Virology* **200**:590-7.
59. **Funke, C., S. Becker, H. Dartsch, H. D. Klenk, and E. Mühlberger.** 1995. Acylation of the Marburg virus glycoprotein. *Virology* **208**:289-97.
60. **Gao, Y., and J. Lenard.** 1995. Cooperative binding of multimeric phosphoprotein (P) of vesicular stomatitis virus to polymerase (L) and template: pathways of assembly. *J Virol* **69**:7718-23.
61. **Gao, Y., N. J. Greenfield, D. Z. Cleverley, and J. Lenard.** 1996. The transcriptional form of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus is a trimer: structure and stability. *Biochemistry* **35**:14569-73.
62. **Garbutt, M., R. Liebscher, V. Wahl-Jensen, S. Jones, P. Möller, R. Wagner, V. Volchkov, H. D. Klenk, H. Feldmann, and U. Ströher.** 2004. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J Virol* **78**:5458-65.
63. **Garcia, J., B. Garcia-Barreno, A. Vivo, and J. A. Melero.** 1993. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* **195**:243-7.
64. **Garcia-Barreno, B., T. Delgado, and J. A. Melero.** 1996. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol* **70**:801-8.
65. **Gear, J. S., G. A. Cassel, A. J. Gear, B. Trappler, L. Clausen, A. M. Meyers, M. C. Kew, T. H. Bothwell, R. Sher, G. B. Miller, J. Schneider, H. J. Koornhof, E. D. Gomperts, M. Isaacson, and J. H. Gear.** 1975. Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br Med J* **4**:489-93.
66. **Geisbert, T. W., and P. B. Jahrling.** 1995. Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res* **39**:129-50.
67. **Geisbert, T. W., L. E. Hensley, P. B. Jahrling, T. Larsen, J. B. Geisbert, J. Paragas, H. A. Young, T. M. Fredeking, W. E. Rote, and G. P. Vlasuk.** 2003. Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys. *Lancet* **362**:1953-8.

68. **Geyer, H., C. Will, H. Feldmann, H. D. Klenk, and R. Geyer.** 1992. Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein. *Glycobiology* **2**:299-312.
69. **Gigant, B., F. Iseni, Y. Gaudin, M. Knossow, and D. Blondel.** 2000. Neither phosphorylation nor the amino-terminal part of rabies virus phosphoprotein is required for its oligomerization. *J Gen Virol* **81**:1757-61.
70. **Gramberg, T., H. Hofmann, P. Möller, P. F. Lalor, A. Marzi, M. Geier, M. Krumbiegel, T. Winkler, F. Kirchhoff, D. H. Adams, S. Becker, J. Munch, and S. Pöhlmann.** 2005. LSECtin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology* **340**:224-36.
71. **Green, T. J., S. Macpherson, S. Qiu, J. Lebowitz, G. W. Wertz, and M. Luo.** 2000. Study of the assembly of vesicular stomatitis virus N protein: role of the P protein. *J Virol* **74**:9515-24.
72. **Grosfeld, H., M. G. Hill, and P. L. Collins.** 1995. RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J Virol* **69**:5677-86.
73. **Gupta, A. K., D. Shaji, and A. K. Banerjee.** 2003. Identification of a novel tripartite complex involved in replication of vesicular stomatitis virus genome RNA. *J Virol* **77**:732-8.
74. **Hartlieb, B., J. Modrof, E. Mühlberger, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2003. Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide. *J Biol Chem* **278**:41830-6.
75. **Harty, R. N., and P. Palese.** 1995. Measles virus phosphoprotein (P) requires the NH₂- and COOH-terminal domains for interactions with the nucleoprotein (N) but only the COOH terminus for interactions with itself. *J Gen Virol* **76**:2863-7.
76. **Harty, R. N., J. Paragas, M. Sudol, and P. Palese.** 1999. A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding. *J Virol* **73**:2921-9.
77. **Horikami, S. M., J. Curran, D. Kolakofsky, and S. A. Moyer.** 1992. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol* **66**:4901-8.
78. **Huang, Y. T., P. L. Collins, and G. W. Wertz.** 1985. Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Res* **2**:157-73.
79. **Huang, Y., L. Xu, Y. Sun, and G. J. Nabel.** 2002. The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Mol Cell* **10**:307-16.
80. **Huber, M., R. Cattaneo, P. Spielhofer, C. Orvell, E. Norrby, M. Messerli, J. C. Perriard, and M. A. Billeter.** 1991. Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology* **185**:299-308.
81. **Hudson, L. D., C. Condra, and R. A. Lazzarini.** 1986. Cloning and expression of a viral phosphoprotein: structure suggests vesicular stomatitis virus NS may function by mimicking an RNA template. *J Gen Virol* **67 (Pt 8)**:1571-9.
82. **Huggins, J., Z. X. Zhang, and M. Bray.** 1999. Antiviral drug therapy of filovirus infections: S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors inhibit Ebola virus in vitro and in a lethal mouse model. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S240-7.
83. **Hughes, J. H., D. R. Mann, and V. V. Hamparin.** 1986. Viral isolation versus immune staining of infected cell cultures for the laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. *J Clin Microbiol* **24**:487-9.
84. **ICTVdB - The Universal Virus Database, Version 3 (Büchen-Osmond, C., ed.)** 2003. 01. Mononegavirales. *ICTVdB Management*, The Earth Institute, Biosphere 2 Center, Columbia University, Oracle, USA
85. **Imai, Y., Y. Matsushima, T. Sugimura, and M. Terada.** 1991. A simple and rapid method for generating a deletion by PCR. *Nucleic Acids Res* **19**:2785.
86. **Iseni, F., A. Barge, F. Baudin, D. Blondel, and R. W. Ruigrok.** 1998. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol* **79**:2909-19.
87. **Ito, H., S. Watanabe, A. Takada, and Y. Kawaoka.** 2001. Ebola virus glycoprotein: proteolytic processing, acylation, cell tropism, and detection of neutralizing antibodies. *Journal of Virology* **75**:1576-80.

88. **Jaax, N., P. Jahrling, T. Geisbert, J. Geisbert, K. Steele, K. McKee, D. Nagley, E. Johnson, G. Jaax, and C. Peters.** 1995. Transmission of Ebola virus (Zaire strain) to uninfected control monkeys in a biocontainment laboratory. *Lancet* **346**:1669-71.
89. **Jahrling, P. B., T. W. Geisbert, D. W. Dalgard, E. D. Johnson, T. G. Ksiazek, W. C. Hall, and C. J. Peters.** 1990. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet* **335**:502-5.
90. **Johnson, K. M., J. V. Lange, P. A. Webb, and F. A. Murphy.** 1977. Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* **1**:569-71.
91. **Johnson, E., N. Jaax, J. White, and P. Jahrling.** 1995. Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *Int J Exp Pathol* **76**:227-36.
92. **Johnson, E. D., B. K. Johnson, D. Silverstein, P. Tukei, T. W. Geisbert, A. N. Sanchez, and P. B. Jahrling.** 1996. Characterization of a new Marburg virus isolated from a 1987 fatal case in Kenya. *Arch Virol Suppl* **11**:101-14.
93. **Jones, S. M., H. Feldmann, U. Ströher, J. B. Geisbert, L. Fernando, A. Grolla, H. D. Klenk, N. J. Sullivan, V. E. Volchkov, E. A. Fritz, K. M. Daddario, L. E. Hensley, P. B. Jahrling, and T. W. Geisbert.** 2005. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* **11**:786-90.
94. **Karlin, D., F. Ferron, B. Canard, and S. Longhi.** 2003. Structural disorder and modular organization in Paramyxovirinae N and P. *J Gen Virol* **84**:3239-52.
95. **Khan, A. S., F. K. Tshioko, D. L. Heymann, B. Le Guenno, P. Nabeth, B. Kerstiens, Y. Flerackers, P. H. Kilmarx, G. R. Rodier, O. Nkuku, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. R. Zaki, R. Swanepoel, O. Tomori, S. T. Nichol, C. J. Peters, J. J. Muyembe-Tamfum, and T. G. Ksiazek.** 1999. The reemergence of Ebola hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Commission de Lutte contre les Epidemies a Kikwit. J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S76-86.
96. **Khattar, S. K., A. S. Yunus, and S. K. Samal.** 2001. Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P and P-L interactions using a minigenome system. *J Gen Virol* **82**:775-9.
97. **Kiley, M. P., E. T. Bowen, G. A. Eddy, M. Isaacson, K. M. Johnson, J. B. McCormick, F. A. Murphy, S. R. Pattyn, D. Peters, O. W. Prozesky, R. L. Regnery, D. I. Simpson, W. Slenczka, P. Sureau, G. van der Groen, P. A. Webb, and H. Wulff.** 1982. Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? *Intervirology* **18**:24-32.
98. **Kiley, M. P., N. J. Cox, L. H. Elliott, A. Sanchez, R. DeFries, M. J. Buchmeier, D. D. Richman, and J. B. McCormick.** 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.
99. **Kolakofsky, D., P. Le Mercier, F. Iseni, and D. Garcin.** 2004. Viral RNA polymerase scanning and the gymnastics of Sendai virus RNA synthesis. *Virology* **318**:463-73.
100. **Kolesnikova, L., E. Mühlberger, E. Ryabchikova, and S. Becker.** 2000. Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *J Virol* **74**:3899-904.
101. **Kolesnikova, L., H. Bugany, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2002. VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment. *J Virol* **76**:1825-38.
102. **Kolesnikova, L., S. Bamberg, B. Berghöfer, and S. Becker.** 2004. The matrix protein of Marburg virus is transported to the plasma membrane along cellular membranes: exploiting the retrograde late endosomal pathway. *J Virol* **78**:2382-93.
103. **Ksiazek, T. G., P. E. Rollin, A. J. Williams, D. S. Bressler, M. L. Martin, R. Swanepoel, F. J. Burt, P. A. Leman, A. S. Khan, A. K. Rowe, R. Mukunu, A. Sanchez, and C. J. Peters.** 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. *Journal of Infectious Diseases* **179 Suppl 1**:S177-87.
104. **Kunz, C., H. Hofmann, and H. Aspöck.** 1968. Propagation of "Marburg virus" (Vervet monkey disease agent) in *Aedes aegypti*. *Zentralbl Bakteriol [Orig]* **208**:347-9.
105. **Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**:203-9.
106. **Le Guenno, B., P. Formenty, and C. Boesch.** 1999. Ebola virus outbreaks in the Ivory Coast and Liberia, 1994-1995. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**:77-84.

107. **Leroy, E. M., S. Baize, V. E. Volchkov, S. P. Fisher-Hoch, M. C. Georges-Courbot, J. Lansoud-Soukate, M. Capron, P. Debre, J. B. McCormick, and A. J. Georges.** 2000. Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet* **355**:2210-5.
108. **Llorente, M. T., B. García-Barreno, M. Calero, E. Camafeita, J. A. López, S. Longhi, F. Ferrón, P. F. Varela, and J. A. Melero.** 2006. Structural analysis of the human respiratory syncytial virus phosphoprotein: characterization of an α -helical domain involved in oligomerization. *J. Gen. Virol.* **87**:159-69.
109. **Leroy, E. M., B. Kumulungui, X. Pourrut, P. Rouquet, A. Hassanin, P. Yaba, A. Delicat, J. T. Paweska, J. P. Gonzalez, and R. Swanepoel.** 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* **438**:575-6.
110. **Licata, J. M., M. Simpson-Holley, N. T. Wright, Z. Han, J. Paragas, and R. N. Harty.** 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**:1812-9.
111. **Lin, G., G. Simmons, S. Pohlmann, F. Baribaud, H. Ni, G. J. Leslie, B. S. Haggarty, P. Bates, D. Weissman, J. A. Hoxie, and R. W. Doms.** 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**:1337-46.
112. **Liston, P., R. Batal, C. DiFlumeri, and D. J. Briedis.** 1997. Protein interaction domains of the measles virus nucleocapsid protein (NP). *Arch Virol* **142**:305-21.
113. **Longhi, S., V. Receveur-Brechot, D. Karlin, K. Johansson, H. Darbon, D. Bhella, R. Yeo, S. Finet, and B. Canard.** 2003. The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J Biol Chem* **278**:18638-48.
114. **Lötfering, B., M. E. T. Tamura, H. D. Klenk, and S. Becker.** 1999. The nucleoprotein of Marburg virus is target for multiple cellular kinases. *Virology* **255**:50-62.
115. **Lupas, A., M. Van Dyke, and J. Stock.** 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**:1162-4.
116. **Lupas, A.** 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci* **21**:375-82.
117. **Mallipeddi, S. K., B. Lupiani, and S. K. Samal.** 1996. Mapping the domains on the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus required for N-P interaction using a two-hybrid system. *J Gen Virol* **77**:1019-23.
118. **Mar'iankova, R. F., S. E. Glushakova, E. V. Pyzhik, and I. S. Lukashevich.** 1993. The penetration of the Marburg virus into eukaryotic cells. *Vopr Virusol* **38**:74-6.
119. **Martini, G. A., H. G. Knauff, H. A. Schmidt, G. Mayer, and G. Baltzer.** 1968a. A hitherto unknown infectious disease contracted from monkeys. "Marburg-virus" disease. *Ger Med Mon* **13**:457-70.
120. **Martini, G. A., and H. A. Schmidt.** 1968b. Spermatogenic transmission of the "Marburg virus". (Causes of "Marburg simian disease"). *Klin Wochenschr* **46**:398-400.
121. **Martini, G. A.** 1971. Marburg Virus Disease, Clinical Syndrome. In: *Marburg Virus Disease* (Martini, G. A. and Siegert, R., eds.). 1st ed. Springer Verlag, New York, USA:1-230.
122. **Martin-Serrano, J., D. Perez-Caballero, and P. D. Bieniasz.** 2004. Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J Virol* **78**:5554-63.
123. **Marzi, A., T. Gramberg, G. Simmons, P. Möller, A. J. Rennekamp, M. Krumbiegel, M. Geier, J. Eisemann, N. Turza, B. Saunier, A. Steinkasserer, S. Becker, P. Bates, H. Hofmann, and S. Pohlmann.** 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**:12090-5.
124. **Mason, J. M., and K. M. Arndt.** 2004. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem* **5**:170-6.
125. **Mavrakis, M., L. Kolesnikova, G. Schoehn, S. Becker, and R. W. Ruigrok.** 2002. Morphology of Marburg virus NP-RNA. *Virology* **296**:300-7.
126. **Mavrakis, M., F. Iseni, C. Mazza, G. Schoehn, C. Ebel, M. Gentzel, T. Franz, and R. W. Ruigrok.** 2003. Isolation and characterisation of the rabies virus N degrees-P complex produced in insect cells. *Virology* **305**:406-14.
127. **Mavrakis, M., A. A. McCarthy, S. Roche, D. Blondel, and R. W. Ruigrok.** 2004. Structure and function of the C-terminal domain of the polymerase cofactor of rabies virus. *J Mol Biol* **343**:819-31.

128. **Mellon, M. G., and S. U. Emerson.** 1978. Rebinding of transcriptase components (L and NS proteins) to the nucleocapsid template of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **27**:560-7.
129. **Modrof, J., C. Möritz, L. Kolesnikova, T. Konakova, B. Hartlieb, A. Randolph, E. Mühlberger, and S. Becker.** 2001. Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. *Virology* **287**:171-82.
130. **Modrof, J., E. Mühlberger, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2002. Phosphorylation of VP30 impairs ebola virus transcription. *J Biol Chem* **277**:33099-104.
131. **Modrof, J., S. Becker, and E. Mühlberger.** 2003. Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein. *J Virol* **77**:3334-8.
132. **Möller, P.** 2002. Charakterisierung von Interaktionsdomänen auf dem Marburg-Virus VP35. Diplomarbeit. Institut für Virologie. Philipps-Universität Marburg.
133. **Möller, P., N. Pariente, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2005. Homo-Oligomerization of Marburgvirus VP35 Is Essential for Its Function in Replication and Transcription. *J Virol* **79**:14876-86.
134. **Monath, T. P.** 1999. Ecology of Marburg and Ebola viruses: speculations and directions for future research. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S127-38.
135. **Mühlberger, E., A. Sanchez, A. Randolph, C. Will, M. P. Kiley, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1992. The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses. *Virology* **187**:534-47.
136. **Mühlberger, E., S. Trommer, C. Funke, V. Volchkov, H. D. Klenk, and S. Becker.** 1996. Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Virology* **223**:376-80.
137. **Mühlberger, E., B. Lötfering, H.-D. Klenk, and S. Becker.** 1998. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J Virol* **72**:8756-64.
138. **Mühlberger, E., M. Weik, V. E. Volchkov, H.-D. Klenk, and S. Becker.** 1999. Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J Virol* **73**:2333-42.
139. **Mupapa, K., M. Massamba, K. Kibadi, K. Kuvula, A. Bwaka, M. Kipasa, R. Colebunders, and J. J. Muyembe-Tamfum.** 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.
140. **Neumann, G., H. Feldmann, S. Watanabe, I. Lukashevich, and Y. Kawaoka.** 2002. Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol* **76**:406-10.
141. **Nishio, M., M. Tsurudome, M. Kawano, N. Watanabe, S. Ohgimoto, M. Ito, H. Komada, and Y. Ito.** 1996. Interaction between nucleocapsid protein (NP) and phosphoprotein (P) of human parainfluenza virus type 2: one of the two NP binding sites on P is essential for granule formation. *J Gen Virol* **77**:2457-63.
142. **Nishio, M., M. Tsurudome, M. Ito, N. Watanabe, M. Kawano, H. Komada, and Y. Ito.** 1997. Human parainfluenza virus type 2 phosphoprotein: mapping of monoclonal antibody epitopes and location of the multimerization domain. *J Gen Virol* **78**:1303-8.
143. **Nishio, M., M. Tsurudome, M. Ito, M. Kawano, S. Kusagawa, H. Komada, and Y. Ito.** 1999. Mapping of domains on the human parainfluenza virus type 2 nucleocapsid protein (NP) required for NP-phosphoprotein or NP-NP interaction. *J Gen Virol* **80**:2017-22.
144. **Nishio, M., M. Tsurudome, M. Ito, and Y. Ito.** 2000. Mapping of domains on the human parainfluenza type 2 virus P and NP proteins that are involved in the interaction with the L protein. *Virology* **273**:241-7.
145. **Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki.** 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**:193-9.
146. **Parks, G. D.** 1994. Mapping of a region of the paramyxovirus L protein required for the formation of a stable complex with the viral phosphoprotein P. *J Virol* **68**:4862-72.
147. **Paul, P. R., D. Chattopadhyay, and A. K. Banerjee.** 1988. The functional domains of the phosphoprotein (NS) of vesicular stomatitis virus (Indiana serotype). *Virology* **166**:350-7.
148. **Peters, C. J.** 1996. Emerging infections--Ebola and other filoviruses. *West J Med* **164**:36-8.

149. **Poch, O., B. M. Blumberg, L. Bougueleret, and N. Tordo.** 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.
150. **Pokhodiaev, V. A., N. I. Gonchar, and V. A. Pshenichnov.** 1991. An experimental study of the contact transmission of the Marburg virus. *Vopr Virusol* **36**:506-8.
151. **Raha, T., E. Samal, A. Majumdar, S. Basak, D. Chattopadhyay, and D. J. Chattopadhyay.** 2000. N-terminal region of P protein of Chandipura virus is responsible for phosphorylation-mediated homodimerization. *Protein Eng* **13**:437-44.
152. **Rahaman, A., N. Srinivasan, N. Shamala, and M. S. Shaila.** 2004. Phosphoprotein of the rinderpest virus forms a tetramer through a coiled coil region important for biological function. A structural insight. *J Biol Chem* **279**:23606-14.
153. **Reid, S. P., W. B. Cardenas, and C. F. Basler.** 2005. Homo-oligomerization facilitates the interferon-antagonist activity of the ebolavirus VP35 protein. *Virology* **341**:179-89.
154. **Rippey, J. J., N. J. Schepers, and J. H. Gear.** 1984. The pathology of Marburg virus disease. *S Afr Med J* **66**:50-4.
155. **Ruigrok, R. W., G. Schoehn, A. Dessen, E. Forest, V. Volchkov, O. Dolnik, H. D. Klenk, and W. Weissenhorn.** 2000. Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J Mol Biol* **300**:103-12.
156. **Ryabchikova, E., L. Kolesnikova, M. Smolina, V. Tkachev, L. Pereboeva, S. Baranova, A. Grazhdantseva, and Y. Rassadkin.** 1996. Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. *Arch Virol* **141**:909-21.
157. **Ryabchikova, E. I., L. V. Kolesnikova, and S. V. Netesov.** 1999. Animal pathology of filoviral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**:145-73.
158. **Ryan, K. W., and A. Portner.** 1990. Separate domains of Sendai virus P protein are required for binding to viral nucleocapsids. *Virology* **174**:515-21.
159. **Ryan, K. W., E. M. Morgan, and A. Portner.** 1991. Two noncontiguous regions of Sendai virus P protein combine to form a single nucleocapsid binding domain. *Virology* **180**:126-34.
160. **Sambrook A., E. F. Fritsch, and A. K. Maniatis.** 1989 *Molecular cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
161. **Sanchez, A., M. P. Kiley, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 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**:347-57.
162. **Sanchez, A., M. P. Kiley, B. P. Holloway, and D. D. Auperin.** 1993. Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res* **29**:215-40.
163. **Sanchez, A., T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, C. J. Peters, S. T. Nichol, A. S. Khan, and B. W. Mahy.** 1995. Reemergence of Ebola virus in Africa. *Emerg Infect Dis* **1**:96-7.
164. **Sanchez, A., S. G. Trappier, B. W. Mahy, C. J. Peters, and S. T. Nichol.** 1996. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3602-7.
165. **Sänger, C., E. Mühlberger, H. D. Klenk, and S. Becker.** 1998. Untersuchungen zur Interaktion des Marburg-Virus GP mit den Matrixproteinen VP24 und VP40. Poster. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Regensburg.
166. **Sänger, C., E. Mühlberger, B. Lötfering, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2002. The Marburg virus surface protein GP is phosphorylated at its ectodomain. *Virology* **295**:20-9.
167. **Schinkel, S.** 2005. Die Homooligomerisierung es Ebola-Virus VP35 und deren Einfluss auf Transkription/Replikation und Interaktion mit dem Nukleokapsid. Diplomarbeit. Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg.
168. **Schneider, U., K. Blechschmidt, M. Schwemmler, and P. Staeheli.** 2004. Overlap of interaction domains indicates a central role of the P protein in assembly and regulation of the Borna disease virus polymerase complex. *J Biol Chem*.
169. **Schnittler, H. J., F. Mahner, D. Drenckhahn, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1993. Replication of Marburg virus in human endothelial cells. A possible mechanism for the development of viral hemorrhagic disease. *J Clin Invest* **91**:1301-9.
170. **Schwemmler, M., M. Salvatore, L. Shi, J. Richt, C. H. Lee, and W. I. Lipkin.** 1998. Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J Biol Chem* **273**:9007-12.
171. **Shaji, D., and M. S. Shaila.** 1999. Domains of Rinderpest virus phosphoprotein involved in interaction with itself and the nucleocapsid protein. *Virology* **258**:415-24.

172. **Siegert, R., H. L. Shu, W. Slenczka, D. Peters, and G. Müller.** 1967. On the etiology of an unknown human infection originating from monkeys. *Dtsch Med Wochenschr* **92**:2341-3.
173. **Siegert, R., H. L. Shu, and W. Slenczka.** 1968. Isolierung und Identifizierung des "Marburg-Virus". *Dtsch Med Wochenschr* **93**:604-12.
174. **Simmons, G., A. J. Rennekamp, N. Chai, L. H. Vandenberghe, J. L. Riley, and P. Bates.** 2003a. Folate receptor alpha and caveolae are not required for Ebola virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* **77**:13433-8.
175. **Simmons, G., J. D. Reeves, C. C. Grogan, L. H. Vandenberghe, F. Baribaud, J. C. Whitbeck, E. Burke, M. J. Buchmeier, E. J. Soilleux, J. L. Riley, R. W. Doms, P. Bates, and S. Pöhlmann.** 2003b. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* **305**:115-23.
176. **Simpson, D. I.** 1977. Marburg fever. *Nurs Mirror* **144**:13-5.
177. **Sinn, P. L., M. A. Hickey, P. D. Staber, D. E. Dylla, S. A. Jeffers, B. L. Davidson, D. A. Sanders, and P. B. McCray, Jr.** 2003. Lentivirus vectors pseudotyped with filoviral envelope glycoproteins transduce airway epithelia from the apical surface independently of folate receptor alpha. *J Virol* **77**:5902-10.
178. **Slenczka, W., M. Rietschel, C. Hoffmann, and W. Sixl.** 1984. Seroepidemiologische Untersuchungen über das Vorkommen von Antikörpern gegen Marburg- und Ebola-Virus in Afrika. *Mitt. Oesterr. Ges. Tropenmed. Parasit.* **6**:53-60.
179. **Slenczka, W. G.** 1999. The Marburg virus outbreak of 1967 and subsequent episodes. *Curr Top Microbiol Immunol* **235**:49-75.
180. **Smallwood, S., K. W. Ryan, and S. A. Moyer.** 1994. Deletion analysis defines a carboxyl-proximal region of Sendai virus P protein that binds to the polymerase L protein. *Virology* **202**:154-63.
181. **Smith, D. H., B. K. Johnson, M. Isaacson, R. Swanapoel, K. M. Johnson, M. Killey, A. Bagshawe, T. Siongok, and W. K. Keruga.** 1982. Marburg-virus disease in Kenya. *Lancet* **1**:816-20.
182. **Spehner, D., A. Kirn, and R. Drillien.** 1991. Assembly of nucleocapsidlike structures in animal cells infected with a vaccinia virus recombinant encoding the measles virus nucleoprotein. *J Virol* **65**:6296-300.
183. **Spehner, D., R. Drillien, and P. M. Howley.** 1997. The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. *Virology* **232**:260-8.
184. **Stille, W., and E. Böhme.** 1971. Clinical Course and Prognosis of Marburg Virus ("Green Monkey") Disease. In: *Marburg Virus Disease* (Martini, G. A. and Siegert, R., eds.). 1st ed. Springer Verlag, New York, USA:10-18.
185. **Strieter, R. M., S. L. Kunkel, and R. C. Bone.** 1993. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med* **21**:S447-63.
186. **Ströher, U., E. West, H. Bugany, H. D. Klenk, H. J. Schnittler, and H. Feldmann.** 2001. Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses. *J Virol* **75**:11025-33.
187. **Sullivan, N. J., A. Sanchez, P. E. Rollin, Z. Y. Yang, and G. J. Nabel.** 2000. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* **408**:605-9.
188. **Swanapoel, R., P. A. Leman, F. J. Burt, N. A. Zachariades, L. E. Braack, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, S. R. Zaki, and C. J. Peters.** 1996. Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg Infect Dis* **2**:321-5.
189. **Swenson, D. L., K. L. Warfield, K. Kuehl, T. Larsen, M. C. Hevey, A. Schmaljohn, S. Bavari, and M. J. Aman.** 2004. Generation of Marburg virus-like particles by co-expression of glycoprotein and matrix protein. *FEMS Immunol Med Microbiol* **40**:27-31.
190. **Takacs, A. M., T. Das, and A. K. Banerjee.** 1993. Mapping of interacting domains between the nucleocapsid protein and the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus by using a two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:10375-9.
191. **Takacs, A. M., and A. K. Banerjee.** 1995. Efficient interaction of the vesicular stomatitis virus P protein with the L protein or the N protein in cells expressing the recombinant proteins. *Virology* **208**:821-6.
192. **Takada, A., K. Fujioka, M. Tsuiji, A. Morikawa, N. Higashi, H. Ebihara, D. Kobasa, H. Feldmann, T. Irimura, and Y. Kawaoka.** 2004. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol* **78**:2943-7.

193. **Tarbouriech, N., J. Curran, R. W. Ruigrok, and W. P. Burmeister.** 2000a. Tetrameric coiled coil domain of Sendai virus phosphoprotein. *Nat Struct Biol* **7**:777-81.
194. **Tarbouriech, N., J. Curran, C. Ebel, R. W. Ruigrok, and W. P. Burmeister.** 2000b. On the domain structure and the polymerization state of the sendai virus P protein. *Virology* **266**:99-109.
195. **Timmins, J., S. Scianimanico, G. Schoehn, and W. Weissenhorn.** 2001. Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40. *Virology* **283**:1-6.
196. **Timmins, J., G. Schoehn, S. Ricard-Blum, S. Scianimanico, T. Vernet, R. W. Ruigrok, and W. Weissenhorn.** 2003. Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol* **326**:493-502.
197. **Tuckis, J., S. Smallwood, J. A. Feller, and S. A. Moyer.** 2002. The C-terminal 88 amino acids of the Sendai virus P protein have multiple functions separable by mutation. *J Virol* **76**:68-77.
198. **van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet,, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner.** 2000. *Virus Taxonomy*, VIIth report of the ICTV. Academic Press, San Diego, USA
199. **Volchkov, V. E., S. Becker, V. A. Volchkova, V. A. Ternovoj, A. N. Kotov, S. V. Netesov, and H. D. Klenk.** 1995. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology* **214**:421-30.
200. **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, A. A. Chepurnov, V. M. Blinov, O. Dolnik, S. V. Netesov, and H. Feldmann.** 1999. Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol* **80 (Pt 2)**:355-62.
201. **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, U. Ströher, S. Becker, O. Dolnik, M. Cieplik, W. Garten, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 2000a. Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology* **268**:1-6.
202. **Volchkov, V. E., A. A. Chepurnov, V. A. Volchkova, V. A. Ternovoj, and H. D. Klenk.** 2000b. Molecular characterization of guinea pig-adapted variants of Ebola virus. *Virology* **277**:147-55.
203. **Walker, M. P., I. Jordan, T. Briese, N. Fischer, and W. I. Lipkin.** 2000. Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J Virol* **74**:4425-8.
204. **Warfield, K. L., D. L. Swenson, D. L. Negley, A. L. Schmaljohn, M. J. Aman, and S. Bavari.** 2004. Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *Vaccine* **22**:3495-502.
205. **Weik, M., J. Modrof, H. D. Klenk, S. Becker, and E. Mühlberger.** 2002. Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation. *J Virol* **76**:8532-9.
206. **Weik, M., S. Enterlein, K. Schlenz, and E. Mühlberger.** 2005. The Ebola virus genomic replication promoter is bipartite and follows the rule of six. *J Virol* **79**:10660-71.
207. **WHO.** 1978a. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. *Bull World Health Organ.* **56**:247-70.
208. **WHO.** 1978b. Ebola Hemorrhagic Fever in Zaire. *Bull World Health Organ.* **56**:271-93.
209. **WHO.** 1992. Viral Hemorrhagic Fever in Imported Monkeys. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **67**:142-43.
210. **WHO.** 1996. Outbreak of Ebola haemorrhagic fever in Gabon. *Commun Dis Rep CDR Wkly* **6**:75, 78.
211. **WHO.** 1997. Ebola haemorrhagic fever. A summary of the outbreak in Gabon. *Wkly Epidemiol Rec* **72**:7-8.
212. **WHO.** 1999. Marburg fever, Democratic Republic of the Congo. *Wkly Epidemiol Rec* **74**:145.
213. **WHO.** 2000. Outbreak News. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **75**(50), 409
209. **WHO.** 2001. Outbreak of Ebola haemorrhagic fever, Uganda, August 2000-January 2001. *Wkly Epidemiol Rec* **76**:41-6.
214. **WHO.** 2003a. Outbreak(s) of Ebola haemorrhagic fever, Congo and Gabon, October 2001-July 2002. *Wkly Epidemiol Rec.* **78**:223-8.
215. **WHO.** 2003b. Outbreak(s) of Ebola Haemorrhagic Fever in the Republic of the Congo, January - April 2003. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **78** (No. 33), 285-9
216. **WHO.** 2004a. Ebola Haemorrhagic Fever in the Republic of the Congo - update 6. http://www.who.int/csr/don/2004_01_06/en/.
217. **WHO.** 2004b. Outbreak of Ebola Haemorrhagic Fever Yambio, south Sudan, April - June 2004. *Wkly. Epidemiol. Rec. (WER)* **80** (No. 43), 369-76
218. **WHO.** 2005a. Marburg haemorrhagic fever, in Angola – update. 2005. *Wkly. Epidemiol.*

- Rec. (WER) 80 (No. 35), 297-304
219. **WHO.** 2005b. Ebola haemorrhagic fever in the Republic of the Congo - update 2. http://www.who.int/csr/don/2005_06_16/en/.
220. **Will, C., E. Mühlberger, D. Linder, W. Slenczka, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1993. Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein. *J Virol* **67**:1203-10.
221. **Wool-Lewis, R. J., and P. Bates.** 1998. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J Virol* **72**:3155-60.
222. **Yang, Z. Y., H. J. Duckers, N. J. Sullivan, A. Sanchez, E. G. Nabel, and G. J. Nabel.** 2000. Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat Med* **6**:886-9.
223. **Zaki, S. R., and C. J. Peters.** 1997. Viral Hemorrhagic Fever. In: *Diagnostic Pathology of Infectious Diseases* (Connor, D. H., Chandler, F. W., Schwartz, D. A., Manz, H. J., Lack, E. E., eds.). Appleton and Lange, Stamford, USA:347-64.

8 **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

Abbildungen:

Abbildung 1	Taxonomie der Filoviren.	1
Abbildung 2	Struktur des Marburg-Virus.	7
Abbildung 3	Genomstruktur des Marburg-Virus.	8
Abbildung 4	Prinzip einer PCR.	31
Abbildung 5	Einführung von Deletionen mittels PCR.	32
Abbildung 6	Immunpräzipitationsanalyse des VP35 _{Flag} und VP35 nach Einzel- und Koexpression aus Huh7-Zellen.	55
Abbildung 7	Schematische Darstellung des VP35 und der untersuchten VP35-Deletionsmutanten.	55
Abbildung 8	Koimmunpräzipitationsanalyse von VP35 _{Flag} und der VP35-Deletionsmutante VP35 ₇₀₋₃₂₉ .	56
Abbildung 9	Graphische Darstellung der potentiellen Coiled-Coil-Domäne und der Computeranalyse der Aminosäuresequenzen des VP35 und der VP35-Substitutionsmutanten mit dem Programm COILS 2.2.	57
Abbildung 10	Koimmunpräzipitationsanalyse von VP35 und den VP35-Substitutionsmutanten.	59
Abbildung 11	Übertragung der MARV VP35 Coiled-Coil-Domäne auf ein monomeres Reporterprotein.	60
Abbildung 12	Titration von VP35 und der VP35-Substitutionsmutanten in dem MARV-spezifischen Minigenomsystem.	63
Abbildung 13	Analyse der Transkriptions- und Replikationsaktivität des VP35 sowie der VP35-Substitutionsmutanten.	65
Abbildung 14	Schematische Darstellung der Interaktion von L _{Flag} und VP35 und der untersuchten VP35-Deletionsmutanten.	66
Abbildung 15	Koimmunpräzipitationsanalyse von L _{Flag} und der VP35-Deletionsmutante VP35 ₇₀₋₃₂₉ .	67

Abbildung 16	Koimmunpräzipitationsanalyse von L _{Flag} mit VP35 bzw. der VP35-Substitutionsmutanten.	68
Abbildung 17	Schematische Darstellung des experimentellen Ansatzes zur Hemmung der MARV-Transkription durch gemischte VP35-Oligomere.	69
Abbildung 18	Analyse der Hemmung der MARV-spezifischen Transkriptionsaktivität durch Ausbildung gemischter VP35-Oligomere.	71
Abbildung 19	Immunfluoreszenzanalyse der Einzelexpression von NP.	73
Abbildung 20	Immunfluoreszenzanalyse des VP35 _{Flag} und der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutanten nach Einzel- und Koexpression mit NP.	74
Abbildung 21	Koimmunpräzipitationsanalyse von NP und VP35 _{Flag} sowie der VP35-Substitutionsmutante L90/104A _{Flag} nach Kotransfektion aus Huh7-Zellen.	75
Abbildung 22	Schematische Darstellung der Interaktion von NP und VP35 _{Flag} und der untersuchten Flag-markierten VP35-Deletionsmutanten.	76
Abbildung 23	Koimmunfluoreszenzanalyse der VP35-Deletionsmutante VP35 _{1-122Flag} nach Einzel- und Koexpression mit NP.	78
Abbildung 24	Koimmunfluoreszenzanalyse der NP-Deletionsmutante NP Δ C1 sowie des VP35 _{Flag} nach Einzel- und Koexpression.	79
Abbildung 25	Koimmunfluoreszenzanalyse der NP-Deletionsmutante NP Δ C1 nach Koexpression mit der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutante L90/104A _{Flag} .	80
Abbildung 26	Analyse des Oligomerisierungsgrades des VP35 im MARV-Partikel.	82
Abbildung 27	Analyse des Oligomerisierungsgrades der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutante VP35 _{1-122Flag} nach rekombinanter Expression und Quervernetzung.	83
Abbildung 28	Analyse des Oligomerisierungsgrades der Flag-markierten VP35-Substitutionsmutante VP35 _{1-122mutFlag} nach rekombinanter Expression und Quervernetzung.	84

Tabellen:

Tabelle 1	Ausbrüche von Filovirusinfektionen.	2
Tabelle 2	Eingesetzte DNA-Oligonukleotide.	26
Tabelle 3	Für Klonierungen verwendete Matrizen und Oligonukleotide.	28

9 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
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ASGP-R	Asialoglykoproteinrezeptor
bp	Basenpaare
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CDC	Centers for Disease Control (Atlanta/USA)
CEBOV	Ivory Coast Ebola-Virus
C-Terminus	Carboxyterminus
d (bei dH ₂ O)	deionisiert
ddNTP	2'3' -Didesoxynukleosidtriphosphat
def	deficient
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2' -Desoxynukleosidtriphosphat
DC-SIGN	"dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin"
DC-SIGNR	"dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin related protein"
EBOV	Ebola-Virus
FCS	fetales Kälberserum
FR-alpha	Folatreszeptor alpha
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat Isomer 1
GP	Glykoprotein
h	Stunden
hMGL	"human macrophage galactose- and N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin"
hPIV	humanes Parainfluenzavirus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFN	Interferon
ISRE	"interferon-stimulated response element"
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KoIP	Koimmunpräzipitation
L-Protein	Large-Protein (Polymerase)
LSEctin	"liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin"

MARV	Marburg-Virus
min	Minuten
MG	Molekulargewicht
Mock	Scheinfektion
moi	“multiplicity of infection“
MPS	monozytäres phagozytisches System
mRNA	messenger RNA
MVB	“multi vesicular bodies“ = multivesikuläre Strukturen
N/NP	Nukleoprotein
N ₀ /NP ₀	lösliches Nukleoprotein
Nedd4	“neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4“
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
P	Phosphoprotein
POD	Peroxidase
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Q	L-Glutamin
RNA	Ribonukleinsäure
rNAPc2	“recombinant nematode anticoagulant protein c2“
REBOV	Reston Ebola-Virus
RSV	respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
SEBOV	Sudan Ebola-Virus
sec	Sekunden
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TSG101	“tumor susceptibilty gene101“
U	“unit“ = Einheit
ÜKR	Überkopftierier
UpM	Umdrehungen pro Minute
VLP	“virus-like particles“ = Virus-ähnliche Partikel
VP	Virusprotein
vRNA	virale RNA
VSV	vesikuläres Stomatitis-Virus
VT	Volumenteil
WHO	World Health Organisation
w/v	weight per volume
ZEBOV	Zaire Ebola-Virus

10 Veröffentlichungen, Vorträge und Posterpräsentationen

Veröffentlichungen

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Publikationen erstellt:

Homo-Oligomerization of Marburgvirus VP35 is essential for its function in replication and transcription

Möller, P., N. Pariente, H. D. Klenk, and S. Becker
J Virol. 2005 Dec; 79(23): 14876-86

Weitere Publikationen während der Dissertation:

Effect of the zinc finger antiviral protein on filovirus replication

Müller, S.^a, P. Möller^a, M. J. Bick, S. Becker, S. Günther, and B. M. Kümmerer
^a both authors contributed equally to this work
(in Vorbereitung)

VP24 of Marburg virus influences the formation of infectious particles

Bamberg, S., L. Kolesnikova, P. Möller, H. D. Klenk, and S. Becker
J Virol. 2005 Nov; 79(21): 13421-33

LSEctin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus

Gramberg, S., H. Hofmann, P. Möller, P. F. Lalor, A. Marzi, M. Geier, M. Krumbiegel., T. Winkler, F. Kirchhoff., D. H. Adams., S. Becker, J. Münch, and S. Pöhlmann
Virology 2005 Sep; 43(2): 224-236

Inhibition of Marburgvirus Protein Expression and Viral Release by RNAi

Fowler, T.^a, S. Bamberg^a, P. Möller, T. F. Meyer, S. Becker, and T. Rudel
^a both authors contributed equally to this work
J Gen Virol. 2005 Apr; 86(6): 1181-8

DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus

Marzi, A.^a, Gramberg, T.^a, Simmons, G.^a, P. Möller, A. J. Rennekamp, M. Krumbiegel, M. Geier, J. Eisemann, N. Turza, B. Saunier, A. Steinkasserer, S. Becker, P. Bates, H. Hofmann, and S. Pöhlmann
J Virol. 2004 Nov;78(21):12090-5
^a authors contributed equally to this work

Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses

Garbutt, M., R. Liebscher, V. Wahl-Jensen, S. Jones, **P. Möller**, R. Wagner, V. Volchkov, H. D. Klenk, H. Feldmann, and U. Ströher
J Virol. 2004 May;78(10):5458-65

Production of monoclonal antibodies and development of an antigen capture ELISA directed against the envelope glycoprotein of Ebola virus

Lucht, A., R. Grunow, C. Otterbein, **P. Möller**, H. Feldmann, and S. Becker
Med Microbiol Immunol (Berl). 2004 Nov;193(4):181-7

Development, characterization and use of monoclonal VP40 antibodies for the detection of Ebola virus

Lucht, A., R. Grunow, **P. Möller**, H. Feldmann, and S. Becker
J Virol Methods. 2003 Jul;111(1):21-8

Vorträge:

Marburg-Virus-Ausbruch in Angola, 2005 – Ein Erfahrungsbericht

Möller P.^b

- Virologisch-Parasitologisches Seminar, Institut für Virologie Marburg, 2005

VP24 of Marburg Virus is essential for particle formation

Bamberg S. , L. Kolesnikova, **P. Möller**, H. D. Klenk, and S. Becker^b

- International Union of Microbiological Sciences (IUMS), Virology Division, 2005

VP24 of Marburg Virus is essential for particle formation

Bamberg S.^b, L. Kolesnikova, **P. Möller**, H. D. Klenk, and S. Becker

- Annual Meeting of the German Society of Virology, Hannover, Germany, 2005

LSECtin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus

Gramberg T.^b, H. Hofmann, **P. Möller**, A. Marzi, M. Geier, M. Krumbiegel, T. Winkler, F. Kirchhoff, S. Becker, J. Münch, and S. Pöhlmann

- Annual Meeting of the German Society of Virology, Hannover, Germany, 2005

Homo-Oligomerization of the polymerase cofactor VP35 is essential for transcription and replication of Marburg viral RNA

Möller P., N. Pariente, and S. Becker^b

- Workshop on Replication and Cell Biology of Negative Strand Viruses, Evanston, USA, 2004

Homo-Oligomerization of the polymerase cofactor VP35 is essential for transcription and replication of Marburg viral RNA

Möller P.^b, N. Pariente, and S. Becker

- Annual Meeting of the German Society of Virology, Tübingen, Germany, 2004

Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNAi

Bamberg S.^b, T. Fowler, S. Becker, P. Möller, T. F. Meyer, and T. Rudel

- Annual Meeting of the German Society of Virology, Tübingen, Germany, 2004

Functional Characterization of the Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins

Möller P.^b, H. D. Klenk, and S. Becker

- SFB 593 convention, Hirschegg, Austria, 2004

Characterization of interaction domains on the Marburg virus nucleocapsid protein VP35

Möller P., C. Rinne, U. Hofsäss, E. Mühlberger, and S. Becker^b

- Annual Meeting of the German Society of Virology, Erlangen, Germany, 2002

Filovirus-antibodies in autochthonous populations with and without contact to bats in the Republic of Guinea

ter Meulen J.,^b K. Koulemou, L. Koivogu, H. Feldmann, P. Möller, and S. Becker

- 23rd African Health Sciences Congress, Makerere University, Kampala, Uganda, 2002

Development of an antigen capture Elisa for Ebola virus

Lucht A.^b, C. Bartling, P. Möller, H. Feldmann, S. Becker, and R. Grunow

- ConVir – European Conference on Viral Diseases, Munich, Germany, 2002

Posterpräsentationen:

Homo-Oligomerization of the polymerase cofactor VP35 is essential for transcription and replication of Marburg viral RNA but not for interaction with the nucleoprotein

- International Union of Microbiological Sciences (IUMS), virology Division, San Francisco, USA, 2005
- SFB 593: International Symposium on Mechanisms of Cellular Compartmentalization, Marburg, Germany, 2005
- Annual Meeting of the German Society of Virology, Hannover, Germany, 2005

Employment of RNAi to Reduce Marburg Virus Replication

Fowler T., S. Bamberg, **P. Möller**, T. F. Meyer, S. Becker, and T. Rudel

- ASM Biodefense Meeting, März 2004, Baltimore, USA

Functional Characterization of the Oligomerization Domain of the Marburg virus nucleocapsid protein VP35

Möller P., N. Pariente, and S. Becker

- Twelfth International Conference on Negative Strand Viruses, Pisa, Italy, 2003

Production of monoclonal antibodies to Ebola-Zaire virus

Lucht A., C. Otterbein, P. Möller, H. Feldmann, S. Becker and R. Grunow

- Symposium on Marburg and Ebola viruses, Marburg, Germany, 2000

^a authors contributed equally to this work

^b presenting author

11 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Peggy Möller
Anschrift: Am Kupfergraben 3, 35037 Marburg
Geburtsdatum: 27.01.1975
Geburtsort: Ilmenau

Schulbildung

09/1981 – 08/1991 Polytechnische Oberschule Ilmenau
09/1991 – 08/1993 Staatliches Gymnasium „Am Lindenberg“ Ilmenau

Berufsausbildung

09/1993 – 06/1996 Medizinische Fachschule Erfurt,
Ausbildung zur medizinisch-technischen
Laboratoriumsassistentin

Berufstätigkeit

07/1996 – 09/1996 Pathologisches Institut am St. Johannisstift Paderborn,
Anstellung als medizinisch-technische
Laboratoriumsassistentin

Hochschulausbildung

10/1996 – 01/2002 Studium der Humanbiologie, Philipps-Universität Marburg
Hauptfach: Virologie
Nebenfächer: Molekularbiologie, Immunologie
10/1998 Vordiplom (Note: gut)
12/2000 Diplom-Prüfung (Note: sehr gut)
01/2001 – 01/2002 Diplomarbeit am Institut für Virologie,
Philipps-Universität Marburg
Thema: „Charakterisierung von Interaktionsdomänen auf
dem Marburg-Virus VP35“ (Note: sehr gut)
03/2002 – 12/2005 Promotion am Institut für Virologie,
Philipps-Universität Marburg
Thema: „Die Rolle der Homooligomerisierung des
Polymerasekofaktors VP35 im Vermehrungszyklus
des Marburg-Virus“

Marburg, den 20.12.05

(Peggy Möller)

12 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Aurich, Becker, Besedovsky, Bestgen, Daut, Dobbelstein, Elsässer, Feuser, Fruhstorfer, Garten, Grzeschik, Gudermann, Habermehl, Hartmann, Heeg, Jungclas, Kaiser, Kern, Kirchner, Klenk, Koch, Körle, Koolman, Lammel, Lang, Lill, Löffler, Lührmann, Maisner, Melsheimer, Mühlberger, Müller, Neumann, Niessing, Radsak, Renkavitz-Pohl, Röhm, Schäfer, Schulz, Schwee, Seifart, Seitz, von Löw, Tampe, Vedder, Voigt, Westermann.

13 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk vom Institut für Virologie, dass er mir dieses interessante und vielseitige Thema zur selbstständigen Bearbeitung überlassen hat.

Für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bedanke ich mich besonders bei Herrn PD. Dr. Stephan Becker, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und durch wertvolle Anregungen und Diskussionen einen erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit ermöglichte.

Außerdem danke ich dem Hessischen Ministerium für Wissenschaft und Kunst und der Philipps-Universität Marburg für die Förderung meiner Arbeit durch ein Promotionsstipendium für besonders qualifizierte wissenschaftliche Nachwuchskräfte.

Mein besonderer Dank gilt den Kollegen aus dem Labor G23: Dr. Sandra Bamberg, Angelika Lander, Dr. Larissa Kolesnikova, Dr. Andrea Di Carlo, Daniel Voß, Bettina Hartlieb, Thomas Hoenen, Eva Mittler, Jörg Wenigenrath, Stefanie Schinkel sowie allen Praktikanten, die gemeinsam zu einer hervorragend kollegialen und fruchtbaren Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Bei Dr. Nonia Pariente bedanke ich mich für die erfolgreiche Mitarbeit an meinem Projekt.

Dr. Rüttger Ebdndt, der leider verstorben ist, danke ich für seine unermüdliche Hilfe und Unterstützung in Sachen Computer.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für Virologie, vor allem Frau PD Dr. Elke Mühlberger, Michael Schümann und Constanze Möritz, danke ich für eine sehr gute Zusammenarbeit und ein angenehmes Betriebsklima.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Georg und Luise Möller. Für ihre Liebe, ihr Vertrauen und die großzügige materielle sowie ideelle Unterstützung während meines gesamten Ausbildungsweges möchte ich mich an dieser Stelle von ganzem Herzen bedanken. Sie haben mich fortwährend bestärkt und sind immer für mich da.

Insbesondere bedanke ich mich bei Mario Kühn, der mir in allen Situationen und Entscheidungen den Rücken stärkt und mich stets in meinem Fortkommen unterstützt.

14 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**„Die Rolle der Homooligomerisierung des Polymerasekofaktors VP35
im Vermehrungszyklus des Marburg-Virus“**

im Medizinischen Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk mit Unterstützung durch PD Dr. Stephan Becker ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

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

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht (Kapitel 10).

Marburg, den 20.12.05

(Peggy Möller)