

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie

Klinikum der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk

Institut für Virologie

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

**Freisetzung des Membranglykoproteins des Ebolavirus
durch die zelluläre Protease TACE**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Olga Dolnik

aus Datschitz

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
Der Philipps-Universität Marburg am 21.1.03

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

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

Korreferent: PD M. Schrader

I.	EINLEITUNG.....	1
I.1	Taxonomie.....	1
I.2	Epidemiologie.....	1
I.2.1	Transmission und Reservoir.....	3
I.3	Klinik und Pathogenese.....	3
I.4	Molekularbiologie.....	5
I.4.1	Morphologie.....	5
I.4.2	Genomorganisation.....	6
I.4.3	EBOV Replikationszyklus.....	7
I.4.4	Virale Proteine.....	9
I.5	Fragestellung.....	15
II.	MATERIAL.....	17
II.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	17
II.2	Bakterien, Viren und Eukaryontenzellen.....	19
II.3	Plasmide.....	20
II.4	Enzyme.....	21
II.5	Proteaseinhibitoren.....	21
II.6	Radioaktive Substanzen.....	22
II.7	Oligonukleotide.....	22
II.8	Antikörper.....	24
II.9	Medien und Puffer.....	24
II.10	Kits.....	26
III.	METHODEN.....	28
III.1	Molekularbiologische Methoden.....	28
III.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction).....	28
III.1.2	Ortsgerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese von DNA.....	29
III.1.3	Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA.....	30
III.1.4	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxipräparation).....	30
III.1.5	Ethanol-Fällung von DNA unter Standardbedingungen.....	31
III.1.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel.....	31
III.1.7	Enzymatische Sequenzierung von DNA (ABI PRISM 377 DNA Sequencer). ..	31

III.1.8	Isolierung genomischer Vaccinavirus-DNA aus infizierten Zellen.....	32
III.1.9	Anti-Sense-Technik.....	33
III.2	Zellbiologische Methoden.....	33
III.2.1	Zellkultur-Technik.....	33
III.2.2	Liposomen vermittelte Transfektion von DNA.....	34
III.2.3	Herstellung rekombinanter Vacciniaviren.....	35
III.2.3.1	Selektion rekombinanter Vacciniaviren (Plaque-Test).....	35
III.2.3.2	Vaccinavirus-Stock.....	36
III.2.4	Expression von EBOV GP mit Hilfe rekombinanter Vacciniaviren.....	36
III.2.5	Metabolische Pulse-Chase-Markierung.....	37
III.2.6	Immunpräzipitation.....	37
III.2.7	Infektion von Zellkulturen mit Ebolavirus Subtyp Zaire (Stamm Mayinga)....	38
III.2.8	Markierung von Oberflächenproteinen mit Sulfo-NHS-Biotin.....	38
III.2.9	Deglykosylierung von Glykoproteinen.....	39
III.2.10	Inhibition der GP _{1/2Δ} Freisetzung durch Protease-Inhibitoren.....	39
III.2.11	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (Sedimentationsanalyse).....	40
III.3	Proteinanalytische Methoden.....	40
III.3.1	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE).....	40
III.3.2	Western Blot und Immunodetektion von Proteinen.....	41
III.3.3	Colloidal Coomassie-Brilliantbalu-G250 Färbung (CCB-G250).....	42
III.3.4	Silberfärbung von Proteinen.....	42
III.3.5	Fixierung und Fluorographie.....	42
III.3.6	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen durch Matrix- unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS).....	43
III.4	Chromatographische Proteinreinigung.....	43
III.4.1	Reinigung von Immunglobulinen mit Protein A Sepharose.....	43
III.4.2	Herstellung einer spezifischen Affinitäts-Säule.....	44
III.4.3	Affinitätschromatographische Reinigung von EBOV GP _{1/2Δ}	45
III.4.4	Reinigung von EBOV GP _{1/2Δ} mittels Wheat Germ Lectin Agarose.....	45

IV. ERGEBNISSE.....	46
IV.1 Freisetzung von EBOV GP in den Überstand von Zellkulturen.....	46
IV.2 GP _{1/2Δ} wird von Ebolavirus-infizierten Zellen in Kulturmedien freigesetzt.....	50
IV.3 Determination des Glykosylierungsmusters von EBOV GP ₂	51
IV.3.1 Ebolavirus GP ₂ besitzt an Position Asn ₅₆₃ mannosereiche und an Position Asn ₆₁₈ komplexe Glykanketten.....	51
IV.3.2 GP ₂ und GP _{2Δ} besitzen identische Glykosylierungsmuster.....	54
IV.4 Kinetik der GP _{1/2Δ} Freisetzung.....	56
IV.4.1 Pulse-Chase Experiment.....	56
IV.4.2 GP _{1/2Δ} -Komplexe werden von der Zelloberfläche freigesetzt.....	58
IV.5 GP _{1/2Δ} -Komplexe besitzen die gleiche Oligomere-Struktur wie GP _{1/2}	60
IV.6 Charakterisierung des GP _{1/2Δ} Spaltungsbereichs.....	62
IV.6.1 GP ₂ -Deletionsmutanten grenzen die Spaltungsregion auf Val ₆₃₀ bis Asp ₆₄₀ ein.....	62
IV.6.2 Aminosäuremutationen im GP ₂ beeinflussen die GP _{1/2Δ} -Freisetzung.....	64
IV.7 Reinigung von GP _{1/2Δ} aus Überständen EBOV infizierter Vero E6 Zellen mittels Affinitätschromatographie.....	67
IV.8 Bestimmung der Spaltstelle von GP _{2Δ} über die Molekularmasse.....	69
IV.9 Die GP _{1/2Δ} Freisetzung wird durch Proteaseinhibitoren inhibiert.....	72
IV.10 Überexpression von TACE (ADAM 17) führt zur verstärkten Freisetzung von Ebolavirus GP _{1/2Δ}	76
IV.11 Expression und Freisetzung von EBOV GP in TACE defizienten Mausfibroblasten.....	77
IV.12 TACE spezifische Anti-Sense-Oligonukleotide inhibieren die GP _{1/2Δ} Freisetzung.....	79
V. DISKUSSION.....	81
VI. ZUSAMMENFASSUNG.....	93
VII. LITERATURVERZEICHNIS.....	94
VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	109

I. EINLEITUNG

I.1 Taxonomie

Das Ebolavirus (EBOV) gehört zusammen mit dem Marburgvirus (MBGV) in die Virusfamilie der Filoviridae, die mit den Familien der Rhabdoviridae, Paramyxoviridae und Bornaviridae die Ordnung der Mononegavirales bilden. Den Viren dieser Ordnung ist als namensgebende Eigenschaft und Charakteristikum das einzelsträngige, nichtsegmentierte RNA-Genom mit negativer Polarität gemeinsam. Auf Grund morphologischer, genetischer und biologischer Kriterien wurden die Filoviren in die beiden Genera Ebola und Marburg Virus eingeteilt. Der Genus Ebola Virus wurde weiter in die vier Spezies Zaire, Sudan, Reston und Ivory Coast gegliedert (Netesov et al., 2000).

Mononegavirales:

- Paramyxoviridae

- Rhabdoviridae

- Bornaviridae

Filoviridae:

 - Marburg Virus**

 - Ebola Virus:** Zaire

 - Sudan

 - Ivory Coast

 - Reston

I.2 Epidemiologie

Das MBGV, benannt nach dem Ort der Erstisolierung, wurde als erster Vertreter der Filoviren 1967 aus Blut und Gewebeproben Infizierter isoliert. Hierbei handelte es sich um Tierpfleger, die Kontakt zu grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) hatten und um sekundär infiziertes Krankenhauspersonal. Dieser Personenkreis erkrankte an hämorrhagischem Fieber (HF) mit einer Letalitätsrate von 22%. An HF Erkrankte wurden zur gleichen Zeit auch aus dem ehemaligen Jugoslawien gemeldet. Sie hatten ebenfalls Kontakt zu afrikanischen grünen Meerkatzen, die aus Uganda stammen und wie in Marburg als Infektionsquelle identifiziert wurden (Siegert et al., 1967; Slenczka et al., 1999). In den Folgejahren wurde von sporadisch auftretenden MBGV-Infektionen aus Süd-Afrika, Simbabwe und Kenia mit Mortalitätsraten von 30-35% berichtet (Gear et al., 1975; Smith et al., 1982). Ein größerer Ausbruch von MBGV-HF mit über 100

Fällen wurde 1999 aus der Demokratischen Republik Kongo gemeldet (WHO, 1999a; 1999b).

Durch EBOV verursachtes HF wurde erstmals 1976 im südlichen Sudan und im nördlichen Zaire beobachtet (Richman et al., 1983; Peters and Khan, 1999). Obwohl die beiden Ausbrüche gleichzeitig aufgetreten sind, handelte es sich um zwei biologisch unterschiedliche Subtypen eines neuen Filovirus. Insgesamt wurden 550 Fälle mit einer Letalität von 53% bei EBOV Sudan und 88% bei EBOV Zaire gezählt. Das EBOV wurde nach dem Ebola Fluß in Zaire benannt, an dem das Hospital von Yambuku liegt, in das die ersten Erkrankten eingeliefert wurden und in dem es durch unzureichende Hygiene zu einer massiven Ausbreitung der Infektion vor allem beim medizinischen Personal kam. Die bislang außerhalb Afrikas aufgetretenen Fälle von Ebola wurden von einem dritten Subtyp, Reston, verursacht. Es waren ausnahmslos Affen (*Macaca fascicularis*) betroffen, die von den Philippinen in die Vereinigten Staaten [1989, Reston/Virginia (Jahrling et al., 1990); 1996, Texas (CDC, 1996)] und nach Italien [1992, Siena (WHO, 1992)] importiert worden waren. Das Virus konnte aus infizierten Tieren sowohl auf den Philippinen als auch in Italien und in den USA isoliert werden (Hayes et al., 1992). Bei fünf der betreuenden Tierpfleger konnte Serokonversion nachgewiesen werden. Da alle menschlichen Infektionen asymptomatisch verliefen, wird EBOV-Reston als humanapathogener Vertreter der Filoviren betrachtet (Peters et al., 1993). Ein weiterer EBOV Subtyp, Ivory Coast, konnte 1994 aus der Blutprobe einer Patientin isoliert werden, die sich an der Elfenbeinküste während der Autopsie eines Schimpansen infiziert hatte (LeGueno et al., 1995). In Zaire wurde 1995 in der Stadt Kikwit eine schwere Epidemie von HF mit 315 Fällen gemeldet, von denen 244 (77%) verstarben (WHO, 1995a). Hierbei wurde EBOV Zaire als verursachendes Agens identifiziert (Sanchez et al., 1996). Drei weitere unabhängige Ausbrüche von HF wurden durch den gleichen EBOV Subtyp zwischen 1994 und 1997 im Nordosten von Gabon verursacht (Volchkov et al., 1997). Auch EBOV Sudan verursachte erneut eine Epidemie im August 2000, diesmal im Distrikt Gulu im Norden Ugandas. Dieser Ausbruch wurde im Februar 2001 für beendet erklärt. Die Letalität betrug mit 244 Toten von insgesamt 428 Fällen 53% (WHO, 2001). Der letzte Ausbruch von HF verursacht durch das EBOV wird seit Dezember 2001 aus der Provinz Ogooué Ivindo in Gabon gemeldet.

I.2.1 Transmission und Reservoir

Bei der Filovirusinfektion wird im allgemeinen von einer Zoonose ausgegangen, bei der die Infektion von dem nicht-humanen Wirt auf einzelne menschliche Individuen übertragen wird. Sekundäre und nachfolgende Infektionen beim Menschen erfolgen durch engen physischen Kontakt mit Infizierten und deren Ausscheidungsprodukten. Hierbei stellen nosokomiale Infektionen, bedingt durch unzureichende Hygiene, ein besonderes Problem dar (Baron et al., 1983; Peters et al., 1991). Neonatale Übertragung wurde beim Ausbruch in Zaire 1976 berichtet (Breman et al., 1978). Die Übertragung durch Tröpfchen und Aerosole wird kontrovers diskutiert. Das Ausmaß des EBOV-Reston-Ausbruchs im Jahre 1989 wird zum Teil auf Aerosolübertragung zurückgeführt. Aerosolübertragung konnte auch bei experimentell infizierten Affen bestätigt werden (Jahrling et al., 1996). Epidemiologische Daten, die im Zusammenhang mit den großen Ausbrüchen erhoben wurden, deuten allerdings auf eine eher untergeordnete Rolle der aerogenen Infektionsübertragung beim Menschen hin.

Trotz teilweise ausgedehnter Untersuchungen bleibt das natürliche Reservoir von EBOV bislang verborgen. Die These, daß nicht-humane Primaten das natürliche Reservoir darstellen, geht auf die MBGV-Infektionen von 1967, die EBOV-Reston-Ausbrüche, sowie den Fall von der Elfenbeinküste zurück, die im direkten Zusammenhang mit infizierten Affen standen. Die Tatsache, daß die Pathogenität für nicht-humane Primaten außerordentlich hoch ist, widerspricht allerdings dieser These. Bei anderen viralen HF, die zum Beispiel durch Lassa- oder Hantavirus verursacht werden, wird das Überleben der Erreger durch persistent infizierte Nager gesichert. Die These einer chronischen Infektion eines Vertebraten oder Nicht-Vertebraten wird auch für das Überleben der Filoviren in der Natur favorisiert (Peters et al., 1994). Diese Theorie wird durch Daten über asymptomatische EBOV-Infektionen von Fledermäusen unterstützt (Swanepoel et al., 1996). Neuere Daten berichten sogar über den Nachweis von EBOV-RNA mittels RT-PCR Technik aus Organen kleiner Nagetiere aus der Zentralafrikanischen Republik (Morvan et al., 1999).

I.3 Klinik und Pathogenese

Die grippeähnlichen Symptome am Krankheitsbeginn einer EBOV-Infektion wie Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen, Übelkeit, Abgeschlagenheit und Schüttelfrost treten nach einer Inkubationszeit von 2-10 Tagen auf. Später folgen abdominale Schmerzen, Halsschmerzen, Husten, Erbrechen, Durchfall und ein charakteristisches

makulopapuläres Exanthem sowie Enanthem. Die Hämorrhagien und das Schocksyndrom sind die pathognomonischen Symptome der Erkrankung. Es kommt zu Blutungen im Gastrointestinaltrakt, im Rachenbereich und in den Konjunktiven. Die Letalität ist subtypabhängig und variiert zwischen 53% und 88%. Der Tod tritt meistens zwischen dem 6. und 16. Tag nach Symptombeginn ein und ist mit einem hypovolämischen Schock und teilweise schweren Hämorrhagien assoziiert. Die Rekonvaleszenzphase verläuft langsam und wird unter anderem von Encephalomyelitis, Hepatitis, Gewichtsverlust und Amnesie begleitet (Sureau, 1989).

Tödlich verlaufende Infektionen von Filoviren stehen meist im Zusammenhang mit generalisierten und makroskopisch sichtbaren Hämorrhagien. Histologisch findet man vor allem herdförmige Nekrosen in Leber und lymphatischen Organen, aber auch in Nieren, Testes und Ovarien (Ryabchikova et al., 1994a, 1994b). Mikroskopisch lassen sich zudem Zerstörungen in den parafollikulären Regionen von Lymphknoten und Milz mit massiver Destruktion antigenpräsentierender dendritischer Zellen nachweisen. Post mortem lassen sich kaum monozytäre Infiltrationen an Stellen von Parenchymnekrosen nachweisen. All dies weist auf einen Defekt der zellulären Immunantwort (Ryabchikova et al., 1996; Zaki and Peters 1997). Während der Infektion wird eine Aktivierung des Gerinnungssystems und intravaskuläre Thrombenbildung beschrieben. Das Auftreten einer disseminierten intravaskulären Koagulopathie (DIC), wie sie für experimentell infizierte Primaten (Makaken) diskutiert wurde, ist beim Menschen nicht eindeutig belegt (Jahrling et al., 1996).

Zirkulierende Monozyten bzw. Makrophagen, in denen EBOV-Replikation nachgewiesen werden konnte, scheinen das primäre Ziel der frühen Infektionsphase zu sein (Gupta et al., 2001; Ströher et al., 2001). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß die infizierten Monozyten für die Freisetzung verschiedener Zytokine verantwortlich sind. Es wird vermutet, daß eine Virus-induzierte, Mediator-vermittelte, vaskuläre Instabilität entsteht, die als Ursache des Schocksyndroms diskutiert wird (Schnittler et al., 1993). Die späte lytische Virusvermehrung in den Endothelzellen führt letztendlich zur Zerstörung des Endothels und damit zu Hämorrhagien. Die während der Infektion auftretende Immunsuppression wird auf die Zerstörung der immunkompetenten Zellen in den parafollikulären Regionen von Lymphknoten und Milz, sowie auf die lytische Replikation in Zellen des monozytären phagozytotischen Systems zurückgeführt. Die kürzlich beschriebene EBOV-induzierte Apoptose peripherer Lymphozyten steht hierbei wohl im direkten Zusammenhang (Baize et al., 1999; Geisbert et al., 2000). Die

Hochregulierung der TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing-ligand) Expression, eines TNF-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden in Monozyten und dendritischen Zellen, wurde kürzlich als ein Schlüsselfaktor für die Apoptose-Induktion in Lymphozyten beschrieben (Hensley et al., 2002).

I.4 Molekularbiologie

I.4.1 Morphologie

Die filamentösen Viruspartikel, nach deren Form die Namengebung erfolgte, können sowohl linear als auch verzweigt, zirkulär, U- und 6-förmig vorliegen (Abb.I.1). Der Durchmesser beträgt etwa 80nm, wobei die Länge sehr stark variiert. Im Durchschnitt liegt die Länge der infektiösen Partikel von MBGV und EBOV bei 665-790nm bzw. 805-970nm. Die Virionen bestehen aus einem helikalen Ribonukleoproteinkomplex (RNP), der die genomische RNA negativer Polarität und die vier viralen Proteine, Nukleoprotein NP, virales Strukturprotein VP30, VP35 und RNA-abhängige RNA-Polymerase L, enthält.

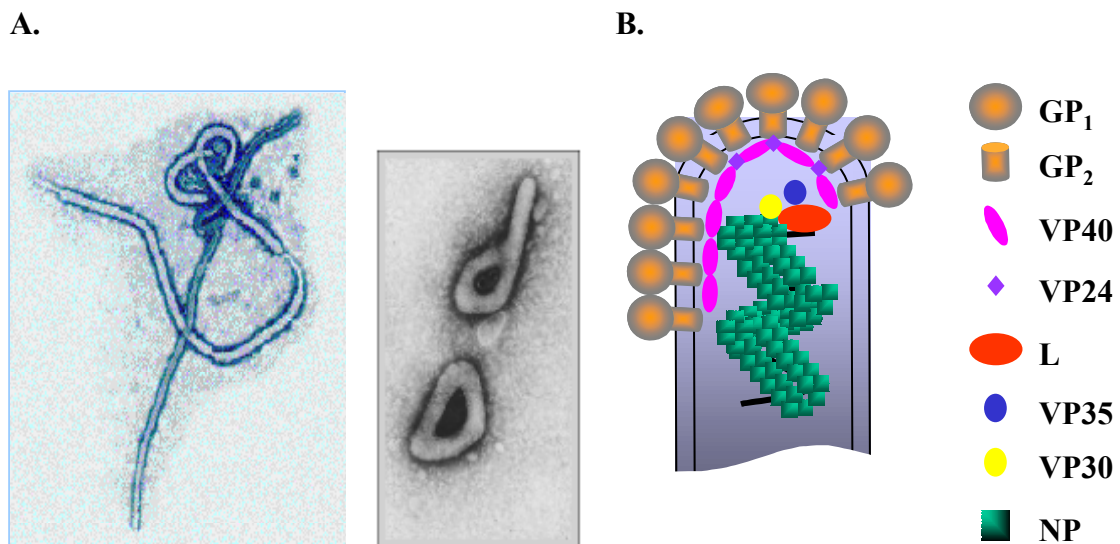


Abb.I.1: EBOV Struktur. Elektronenmikroskopische Darstellungen von EBOV Partikeln (A). Es sind die typischen linearen, 6-förmigen und zirkulären Formen der Virionen dargestellt. Schematische Darstellung eines Viruspartikels (B). Dargestellt ist die virale RNA, assoziiert mit dem Nukleokapsidprotein NP, viralen Proteinen VP30 und VP35, sowie der viralen Polymerase L. Mit der Virusmembran assoziiert liegen die viralen Proteine VP40 und VP24, sowie das Glykoprotein GP, bestehend aus den Untereinheit GP₁ und GP₂, vor.

Das RNP ist von einer Lipidmembran, die von der Plasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist, umhüllt. Elektronenmikroskopisch lassen sich globuläre Strukturen von 7nm Durchmesser auf der Virushülle erkennen, die vom viralen Glykoprotein (GP) gebildet werden (Geisbert and Jahrling, 1995). Die beiden viralen Strukturproteine VP24 und VP40 liegen membranassoziiert unterhalb der viralen Membran vor und stellen somit die Matrixproteine dar.

I.4.2 Genomorganisation

Das einzelsträngige, nichtsegmentierte RNA-Genom der Filoviren ist mit seiner Länge von 18,9kb für EBOV und 19,1kb für MBGV das längste der Mononegavirales (Feldmann et al., 1992; Sanchez et al., 1993; Bukreyev et al., 1995; Volchkov et al., 1999). Die virale RNA negativer Polarität ist nicht polyadenyliert und nicht infektiös (Kiley et al., 1982; Feldmann et al., 1992). Die Gene für die sieben viralen Strukturproteine sind in linearer Reihenfolge angeordnet: 3'leader-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-trailer-5' (Abb.I.2). Diese charakteristische Genanordnung (3'leader-Nukleoprotein-Phosphoprotein-Matrixprotein-Glykoprotein-Polymerase-trailer 5') trifft im Wesentlichen für alle Vertreter der Mononegavirales zu (Feldmann et al., 1992; Sanchez et al., 1993). Einige der Gene sind durch intergenische Sequenzen getrennt, wogegen andere an charakteristischen Positionen überlappen (z.B. VP35/VP40; GP/VP30 und VP24/L bei EBOV Subtyp Zaire). An den Initiations- und Terminationsstellen der Transkription finden sich Sequenzfolgen, die bei allen Genen der Filoviren das hoch konservierte Pentanukleotid 3'-UAAUU-5' enthalten (Sanchez et al., 1993; Feldmann et al., 1993). Dieses liegt in der Regel innerhalb einer nicht kodierenden Region, die in der Lage ist, Sekundärstrukturen auszubilden, und somit vermutlich eine wichtige Rolle bei der Transkription und Translation übernimmt, indem sie die transkribierten m-RNA's oder deren Bindung an Ribosomen stabilisiert (Mühlberger et al., 1996). An dem 3'-leader und 5'-trailer des Genoms befinden sich konservierte Sequenzen, die teilweise zueinander komplementär sind, so wie sie auch für die Paramyxoviren und Rhabdoviren beschrieben sind (Regnery et al., 1980; Kiley, et al., 1986; Feldmann et al., 1992; Sanchez et al., 1993; Volchkov et al., 1993; Bukreyev et al., 1995 und Mühlberger et al., 1996).

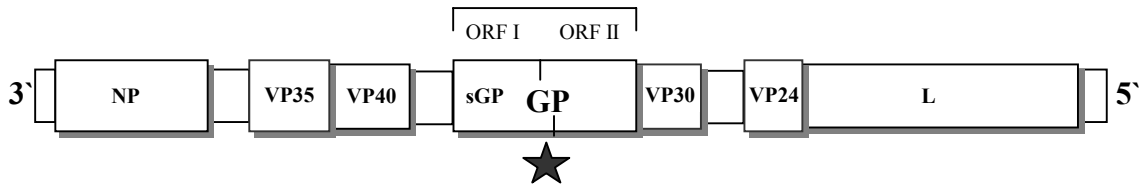


Abb.I.2 Genomaufbau des EBOV. EBOV besitzt ein einzelsträngiges, nichtsegmentiertes RNA-Genom negativer Polarität. Die Anordnung der Gene ist schematisch dargestellt. Der Stern kennzeichnet die Lokalisation einer editing Stelle. NP, Nukleoprotein; GP, Glykoprotein; L, Polymerase; virale Strukturproteine VP24, VP30, VP35 und VP40; sGP, small glycoprotein; ORF, offener Leserahmen.

I.4.3 EBOV Replikationszyklus

Die Transkription und Replikation der Filoviren findet im Zytoplasma der infizierten Zellen statt. In Analogie zu anderen Mononegavirales wird vermutet, daß die Transkription am 3'-Ende des Genoms mit der Synthese einer kurzen leader-Sequenz beginnt, obwohl die Existenz dieser kurzen subgenomischen RNA's bei den Filoviren bislang experimentell nicht gezeigt werden konnte. Die 7 Gene werden dann sukzessive in monocistronische, polyadenylierte mRNA's transkribiert. Der Mechanismus, welcher von der Transkription auf Replikation umschaltet, ist nicht bekannt. Es scheint aber, wie für andere Mononegavirales vermutet wird, die Konzentration an neusynthetisiertem NP eine entscheidende Rolle zu spielen (Kolakofsky and Blumberg, 1982). In Analogie zu anderen Mononegavirales wird von der viralen Polymerase zuerst ein Positivstrang-Genom synthetisiert, das in enkapsidierter Form als Matrize für die Synthese neuer vRNA Moleküle dient. Das Virus-Assembly findet wahrscheinlich statt, sobald ausreichende Mengen an Nukleokapsiden und Hüllproteinen gebildet worden sind.

Die Transkription des EBOV GP Gens stellt eine Besonderheit dar. Für das Transmembran-GP gibt es auf der genomischen Ebene keinen zusammenhängenden offenen Leserahmen, statt dessen existieren hier zwei überlappende Leserahmen ORF I und ORF II (Abb.I.2). Das primäre Translationsprodukt ist sGP, das von ORF I kodiert wird. Die Expression des Transmembran-GP wird erst nach einem co-transkriptionellen RNA-Editing möglich. Hierbei kommt es durch die Addition eines zusätzlichen Adenosinrestes bei der Transkription zur Vereinigung der beiden ORF's (Abb.I.3). Das Editing findet an einer für diesen Mechanismus charakteristischen Stelle im Genom statt

(Nukleotide 1019-1025) und erfolgt abhängig von der Sequenz in etwa 20% der mRNA's (Volchkov et al., 1995; Sanchez et al., 1996).

Die Transkription und Replikation der Filoviren wird seit kurzem mit Hilfe eines artifiziellen Replikationssystems (Minigenomsystem) untersucht (Mühlberger et al., 1998; Calain et al., 1999). Hierbei konnte gezeigt werden, daß die Nucleocapsidproteine NP, VP35 und L für die Replikation von MBGV und EBOV ausreichend sind. Die Transkription der EBOV Minigenome war dagegen von der Anwesenheit des vierten Nucleocapsidproteins VP30 abhängig. Die Etablierung eines reversen Systems im letzten Jahr, mit dessen Hilfe infektiöse Viren vollständig aus c-DNA hergestellt werden können, eröffnet ganz neue Möglichkeiten der genetischen Manipulation, die zur Untersuchung des viralen Replikationszyklus eingesetzt werden können (Volchkov et al., 2001).

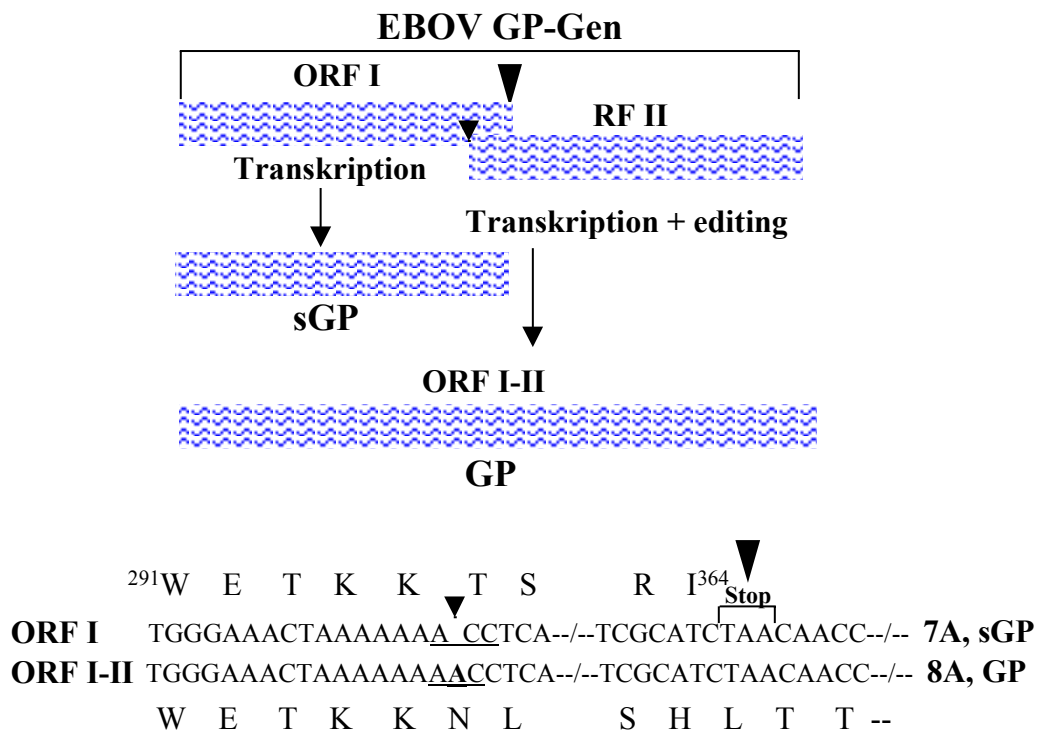


Abb.I.3 Expressionsmechanismus der EBOV Glykoproteine. Das EBOV GP Gen enthält zwei Leserahmen. Der erste ORF I kodiert für das Nichtstruktur-Glykoprotein sGP mit 364 Aminosäuren (Stopcodon an Position 365, großes Dreieck). Die Expression des Transmembran-Glykoproteins GP wird erst durch das co-transkriptionelle RNA-Editing ermöglicht. Ein Adenosin (fett hervorgehoben) wird an Nukleotidposition 1026 (kleines Dreieck) eingefügt, wodurch der erste offene Leserahmen ORF I und der durch die Verschiebung entstandene Leserahmen RF II zu einem gemeinsamen offenen Leserahmen ORF I-II vereinigt werden. Die Nukleotidsequenz der Editing Stelle ist unterstrichen.

I.4.4 Virale Proteine

Nukleoprotein (NP)

Das NP wird vom 1. Gen der genomischen RNA kodiert und enkapsidiert die virale RNA. Es besteht aus 739 Aminosäuren, und das abgeleitete Molekulargewicht beträgt 83kD. In der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verläuft das EBOV-NP auf Grund des hohen Phosphorylierungsgrades auf der Höhe von 105kD. Der N-terminale Bereich des NP ist sehr hydrophob und trägt mehrere Cysteinreste (Eliot et al., 1985), die für den Strukturhalt wichtig zu sein scheinen. Dieser Bereich und eine weitere Region in der Mitte der EBOV NP Sequenz zeigen Homologien mit den entsprechenden Regionen der Nukleoproteine von Paramyxoviren (Morgan, 1991). Der sehr hydrophile und weniger konservierte C-terminale Bereich trägt viele Prolin-Reste und ist negativ geladen. Möglicherweise finden hier die Interaktionen mit VP30 und VP35 statt, die durch indirekte Immunfluoreszenz demonstriert wurden (Becker et al., 1998; Modrof et al, 2001).

Virales Strukturprotein VP35

VP35 wird vom 2. Gen kodiert und ist bei EBOV 340 Aminosäuren lang. Die Assoziation von VP35 mit dem RNP ist gegenüber der von NP und VP30 wesentlich schwächer. VP35 verbindet wahrscheinlich NP und die virale Polymerase L zu einem Komplex (Becker et al., 1998). Trotz nicht gesicherter Phosphorylierung und fehlender Sequenzhomologie wird VP35 auf Grund seiner Lage im Genom und der RNP-Assoziation als funktionelles Analogon zum P-Protein der Paramyxo- und Rhabdoviren angesehen (Eliott et al., 1985, 1993; Sanchez et al., 1993; Bukreyev et al., 1993a). Neueste Untersuchungen mit VP35 konnten zeigen, daß VP35 in der Lage ist, in EBOV-infizierten Zellen die Induktion der Typ I Interferone zu inhibieren, womit VP35 die Funktion eines Virulenzfaktors zukommen würde (Basler et al., 2000).

Virales Strukturprotein VP40

Das VP40 wird vom 3. Gen kodiert und ist 326 Aminosäuren lang (Eliott et al., 1985; Sanchez et al., 1993). VP40 ist nicht RNP assoziiert, sondern membranassoziiert und kann aus Viruspartikeln durch Behandlung mit nichtionischen Detergenzien herausgelöst werden (Kiley et al., 1988). Die Lage des kodierenden Gens innerhalb des Genoms, die große Menge dieses Proteins im Virion und der überwiegend hydrophobe Charakter sprechen für die Analogie zum Matrixprotein anderer Mononegavirales

(Eliott et al., 1993; Kiley et al., 1988; Bukreyev et al., 1993a). Kristallographisch konnte gezeigt werden, daß VP40 im Gegensatz zu anderen Matrixproteinen aus zwei einzigartig gefalteten Domänen besteht, die über eine flexible Region verbunden sind (Dessen et al., 2000). Die Oligomerisierung zu Hexameren wird durch den N-terminalen Bereich von VP40 vermittelt, wobei der C-Terminus wichtig für die Membranassoziation ist (Ruigrok et al., 2000). Interaktionen von EBOV VP40 sowie auch den Gag und M Proteinen von Retro- bzw. Rhabdoviren mit zellulären Proteinen konnten gezeigt werden. Hierbei handelt es sich um Interaktionen mit den WW-Domänen von Ubiquitinligasen oder Ubiquitinkonjugase-ähnlichen Proteinen über ein Prolin-reiches Motiv (PPEY) (Garnier et al., 1996; Harty et al., 1999; 2000; Marti-Serrano et al., 2001). Bei WW-Domänen handelt es sich um hydrophobe Bereiche innerhalb vieler zellulärer Proteine, die spezifische Sequenzmotive wie PPXY erkennen, und Protein-Protein Interaktionen in der Zelle vermitteln (Sudol et al., 1996). Das Ubiquitinkonjugase-ähnliche Protein Tsg101, rekrutiert Proteine in sogenannte „multi-vesicular body“ (MVB), in denen eine Vesikelbildung stattfindet ähnlich dem viralen Budding (Bishop & Woodman, 2001; Katzmann et al., 2001; Kolesnikova et al., 2002). Es wird vermutet, daß VP40 über MVB's an die Plasmamembran gelangt.

Virales Strukturprotein VP30

Das VP30 wird vom 5. Gen kodiert und ist mit dem RNP assoziiert. Es hat eine Länge von 260 Aminosäuren und stellt ein weiteres Phosphoprotein dar, einzigartig für die Filoviren innerhalb der Mononegavirales (Eliott et al., 1993). Es ist in der Lage RNA und das NP zu binden. Die verfügbaren Daten postulieren eine Funktion bei der Enkapsidierung der viralen RNA, vermittelt durch die Bindung an NP und die RNA (Bukreyev et al., 1995; Becker et al., 1998). Eine zusätzliche wichtige Funktion, die für das VP30 des EBOV diskutiert wird, liegt in der Transkriptionsinitiation (Mühlberger et al., 1998, 1999).

Virales Strukturprotein VP24

Das 6. Gen kodiert für das VP24, das 251 Aminosäuren groß ist. Es handelt sich um ein membranassoziiertes Protein, das anders als VP40 unter isotonischen Bedingungen nicht vollständig vom RNP getrennt werden kann. Dem VP24 wird die Funktion eines zweiten Matrixproteins, das wahrscheinlich an den zytoplasmatischen Teil des GP bindet, zugesprochen (Eliott et al., 1985; Sanchez et al., 1993). Kürzlich wurde auf

Sequenzunterschiede des VP24 von EBOV Wildtyp (Subtyp Zaire) und einer für Meerschweinchen und Affen hoch pathogenen Variante hingewiesen. Die gefundenen Mutationen könnten für die Adaptation an das Meerschweinchen verantwortlich sein (Volchkov et al., 2000).

Polymerase (L-Protein)

Das L-Protein wird als 7. Strukturprotein am 5'-Ende des Genoms kodiert. Aufgrund seiner Größe (2212 Aminosäuren für EBOV Isolat Mayinga, Subtyp Zaire), der Lage im Genom, sowie konservierter Bereiche und Motive, die für andere L-Proteine der Mononegavirales beschrieben wurden, liegt es nahe, daß es sich hierbei um die RNA-abhängige RNA-Polymerase handelt (Mühlberger et al., 1992; Volchkov et al., 1999). Sequenzvergleiche mit den L-Proteinen anderer Mononegavirales ergaben 3 konservierte Polymerasemotive A-C. Das A-Motiv enthält RNA-bindende Elemente. Das hoch konservierte Peptidmotiv -GDNQ- am C-terminalen Ende des B-Motivs, das durch hydrophobe Aminosäuren flankiert ist, könnte die funktionelle Domäne des Proteins darstellen, was für verwandte Polymerasen bereits bestätigt werden konnte (Barik et al., 1990).

Nichtstrukturprotein sGP

Bei EBOV wurde bislang das einzige Nichtstrukturprotein der Filoviren beschrieben (Volchkov et al., 1995; Sanchez et al., 1996). sGP ist das nicht editierte Translationsprodukt des GP Gens. Die 295 N-terminalen Aminosäuren des sGP stimmen mit denen des strukturellen GP überein, wohingegen die 69 carboxyterminalen Aminosäuren sGP-spezifisch sind und viele geladene Reste sowie drei konservierte Cysteine enthalten. sGP ist N-glykosyliert und sialyliert. Der Golgi-spezifische Vorläufer pre-sGP wird durch die subtilisinähnliche Proproteinkonvertase Furin in das prozessierte sGP und das Deltapeptid (Δ -Peptid) gespalten (Volchkova et al., 1999). Anschließend wird sGP von den Zellen als antiparalleles Homodimer in großen Mengen sezerniert (Volchkova et al., 1998). Auch das Δ -Peptid wird sezerniert, wobei dieses im Gegensatz zu sGP O-glykosyliert ist, aber auch Sialinsäurereste trägt. Die Funktionen der beiden sezernierten Glykoproteine sind bislang nicht geklärt, es werden aber immunmodulatorische Funktionen mit Bedeutung für die Viruspathogenese diskutiert (Yang et al., 1998; Muriyama et al., 1999). In diesem Zusammenhang ist die

Beobachtung von Interesse, daß sGP auch im Serum EBOV-infizierter Patienten in großen Mengen nachgewiesen werden konnte (Sanchez et al., 1996).

Glykoprotein GP

Das GP ist das einzige glykosylierte Strukturprotein und wird vom 4. Gen als Typ I Transmembranprotein (Abb.I.4) kodiert (Volchkov et al., 1992; Sanchez et al., 1993). Die Expression erfolgt über transkriptionelles RNA-Editing, wodurch die beiden ORF's des GP Gens miteinander verbunden werden (Volchkov et al., 1992, 1995). GP ist 676 Aminosäuren lang, wobei sich am N- und C-terminalen Ende hoch-konservierte hydrophobe Sequenzen befinden, die das Signalpeptid und den Transmembrananker bilden. Weiter besteht das GP aus der variablen und hydrophilen Mittelregion, in der die meisten Glykosylierungsstellen liegen, und der kurzen zytoplasmatischen Region. Die meisten hoch-konservierten Cysteinreste befinden sich am C-Terminus. Insgesamt zeigt der C-terminale Bereich große strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Rous-Sarkom-Virus Glykoprotein, vor allem die Transmembranregion und die potentielle Fusionspeptidsequenz (Volchkov et al., 1992; Gallaher et al., 1996).

Der hohe Kohlenhydratanteil des GP macht etwa 50% des Molekulargewichts aus (Volchkov et al., 1993). Hierbei handelt sich um mannosereiche, hybride, sowie komplexe N-glykosidisch und O-glykosidisch gebundene Glykane (Geyer et al., 1992). Die terminalen Sialinsäuren der Oligosacharide variieren je nach Isolat und Zelltyp (Feldmann et al., 1991, 1994).

Der Reifungsprozess von GP beinhaltet die Prozessierung eines Endo H-sensitiven endoplasmatischen Vorläufers $preGP_{er}$ in einen Endo H-resistenten Golgi-spezifischen Vorläufer $preGP$. Die Oligomerisierung des GP zu Trimeren findet bereits im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt (Feldmann et al. 1991; Sanchez et al., 1998). Im Golgi-Apparat wird $preGP$ dann durch die subtilisinähnliche Protease Furin in die Untereinheiten GP_1 (140kD) und GP_2 (26kD) proteolytisch gespalten (Volchkov et al., 1998a). Die Spaltprodukte sind über eine Disulfidbrücke verbunden und bilden den reifen $GP_{1/2}$ -Komplex. Die so prozessierten GP Komplexe werden in die Virusmembran eingebaut und bilden die Spikes auf der Oberfläche der Virionen. Die Lage der Cysteinreste, die an der intermolekularen Brückenbindung beteiligt sind, ist in Abb.I.4 dargestellt (Volchkov et al., 1998b).

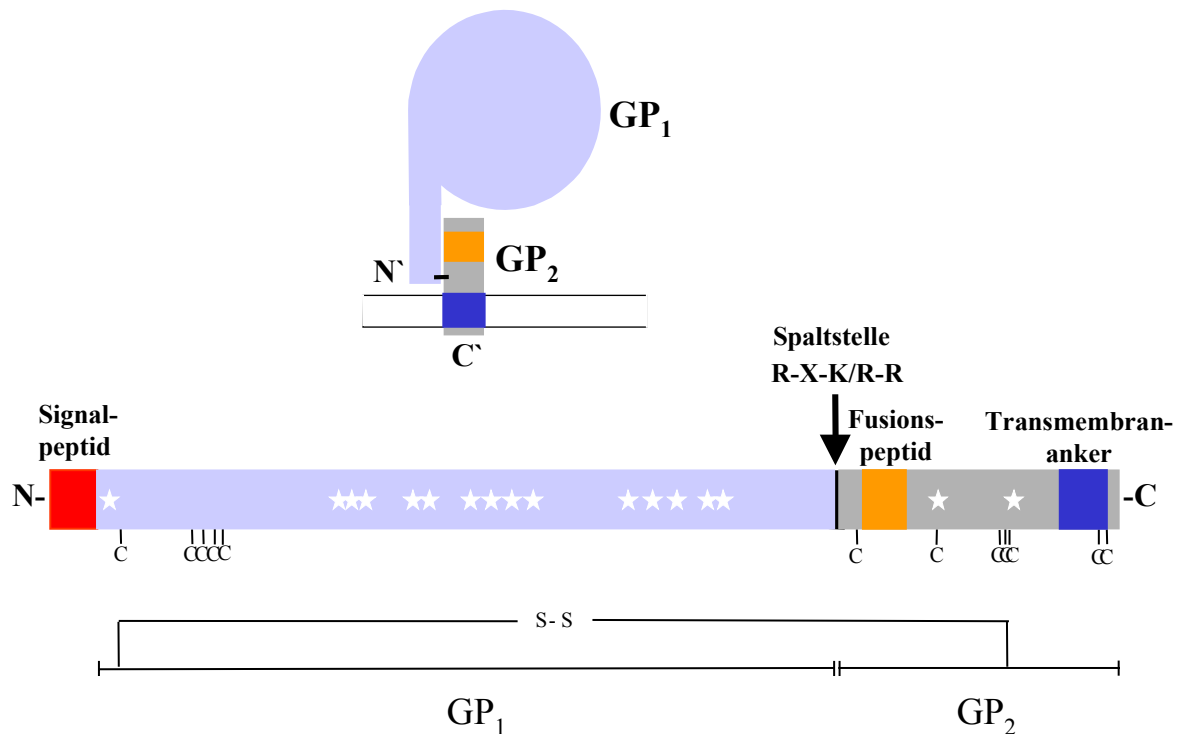


Abb.I.4 Struktur des EBOV GP. Oben dargestellt ist die monomere Struktur von membranständigem GP. Im unteren Bild sind die einzelnen Strukturelemente von GP dargestellt: N-terminales Signalpeptid (rot), C-terminaler Transmembrananker (blau) und das Fusionspeptid (orange). Die GP₁ Untereinheit ist in lila und die GP₂ Untereinheit grau unterlegt. Die Sterne stehen für N-Glykosylierungsstellen, C für Cysteine und S-S für die intermolekulare Disulfidbrücke. Mit einem Pfeil ist die Furin-Spaltstelle dargestellt. Eine Ausnahme ist hier der Subtyp Reston mit dem Spaltmotiv K-X-K/R-R.

Die Tatsache, daß GP das einzige Oberflächen-Protein der Virionen ist, und Untersuchungen an infektiösen GP Pseudotypen von VSV und Retroviren deuten auf seine Funktion bei der Rezeptorbindung und der anschließenden Fusion zwischen Virus- und Zellmembran hin (Takada et al., 1997; Wool-Lewis and Bates, 1998). Kürzlich konnte mit Hilfe retroviraler Pseudotypen der Folatrezeptor α als zellulärer Ko-Faktor identifiziert werden, der durch die Bindung an GP den Viruseintritt in die Zellen vermittelt (Chan et al., 2001). Die Bedeutung der GP-Spaltung für die Fusionsaktivität und den Infektionszyklus ist noch ungeklärt. Für die Obflächenglykoproteine der Orthomyxoviren, Retroviren und Paramyxoviren konnte gezeigt werden, daß das Spaltmotiv R-X-K/R-R nicht nur hoch-konserviert ist, sondern daß die Spaltung für die Infektiosität essentiell ist. Obwohl auch bei allen Filoviren das

Spaltmotiv konserviert ist, konnte hier noch nicht bewiesen werden, daß die Spaltung von Bedeutung für den Infektionsprozess ist. Mit Hilfe von GP Pseudotypen, sowie rekombinant hergestelltem EBOV wurde im Gegenteil gezeigt, daß auch ungespaltenes GP Infektiosität vermittelt (Neumann et al., 2002). Da jedoch diese Experimente in Zellkultur durchgeführt wurden, bleibt die Frage offen, ob die Infektiosität dieser Viren im Tiermodell ebenfalls erhalten bleibt und welche Rolle der Spaltbarkeit von GP unter diesen Bedingungen zukommt.

Das EBOV GP wird nicht nur in Virionen eingebaut, sondern auch in Membranvesikel, die von der Zelloberfläche als Virosomen abgeschnürt werden (Volchkov et al., 1998a). Morphologisch ist das GP in diesen Partikeln von Filovirus-Spikes nicht zu unterscheiden. Interessanterweise wurde im Überstand von Zellen auch die GP₁-Untereinheit in löslicher Form gefunden.

Immunsuppressive Effekte, die dem GP zugesprochen werden, sind auf eine 26 Aminosäuren lange Regionen zurückgeführt worden, die auf der GP Ektodomäne nahe dem Transmembrananker liegt und signifikante Homologie zu einer immunsuppressiven Domäne von Glykoproteinen onkogener Retroviren besitzt (Volchkov et al., 1992, 1993; Bukreyev et al., 1993b; Cianciolo et al., 1985; Kadota et al., 1991). Bislang ist aber unklar, ob diese Domäne eine Rolle in der Viruspathogenität spielt. Eine direkt durch das GP ausgelöste Cytopathogenität verschiedener Zelltypen, unter anderem auch von Endothelzellen, konnte jedoch bereits demonstriert werden (Chan et al., 2000; Yang et al., 2000; Simmons et al., 2002). Dieser Effekt wurde von Yang et al. (2000) mit einer Mucin-reichen Domäne innerhalb der GP₁-Untereinheit assoziiert. Hierbei wird die Hypothese diskutiert, daß Interaktionen dieser hochglycosylierten Domäne mit Adhäsionsmolekülen und Integrinen die Oberflächenexpression dieser Proteine herunterreguliert, und die Zellen ihre Integrität verlieren. Chan et al. (2000) führt die Cytopathogenität auf die membranverankerte GP₂-Untereinheit zurück. Hierbei wird ein modulatorischer Einfluß von GP auf eine phosphorylierungs-abhängige intrazelluläre Signalkaskade als Ursache für die Cytopathogenität diskutiert. Somit könnte dem GP eine wichtige Bedeutung bei der Viruspathogenese zukommen.

I.5 Fragestellung

Als einzigem auf der Virusoberfläche exponiertem Glykoprotein kommen dem GP viele wichtige Funktionen während dem Replikationszyklus zu. Hierzu gehört das Attachment an die Wirtszellen über spezifische Rezeptoren, die anschließende Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran und das Virusentry. Die exponierte Lage des GP deutet auf seine Rolle als Hauptimmunogen hin, obwohl während der EBOV-Infektion erst spät und niedrige Titer von GP-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die direkte Cytopathogenität von GP weist auf die wichtige Bedeutung für die Viruspathogenese hin. Zudem wurde für das EBOV GP eine lösliche Form beschrieben (Volchkov et al., 1998a), sodaß es von großem Interesse ist, die Charakteristika und Funktionen, sowie den Freisetzungsmechanismus dieser GP Form zu klären.

Virale Glykoproteine, die in der Regel als membranverankerte Proteine vorliegen, wurden bereits früher auch in einer löslichen Form beobachtet. Dies gilt für die Glykoproteine, gp55 von SFFV („Friend Spleen Focus-Forming Virus“), GP von Rabiesvirus und Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), G von Respiratorischem Syncytialvirus (RSV), sowie H von Masernvirus (Gliniak et al., 1989; Morimoto et al., 1993; Grünberg et al., 1991; Malvoisin et al., 1994; Roberts et al., 1994). In keinem dieser Fälle konnte der für die Generierung der löslichen Form verantwortliche Mechanismus eindeutig geklärt werden. Für das VSV und RSV G-Protein werden lösliche Formen bereits im ER beschrieben. Beim RSV G-Protein handelt es sich um ein Typ-II Transmembranprotein, so daß bei der Synthese der löslichen Form von der Translation alternativer Initiationscodons mit anschließender Spaltung durch Signalpeptidasen ausgegangen wird. Das VSV G-Protein ist ein Typ-I Transmembranprotein. Die lösliche Form konnte sogar ohne Anwesenheit von mikrosomalen Membranen in vitro synthetisiert werden, so daß hier eine vorzeitige Termination der Translation postuliert wird. Für das Masernvirus H wird eine proteolytische Spaltung, die den Transmembrananker abspaltet und das Glykoprotein so in eine lösliche Form überführt, als möglicher Mechanismus diskutiert. Weder eine virale noch eine zelluläre Protease sind allerdings in diesem Zusammenhang beschrieben worden.

Im Gegensatz hierzu sind bereits zelluläre Proteasen identifiziert worden, die zelluläre Transmembranproteine in eine lösliche Form prozessieren (Werb and Yan, 1998; Yamamoto et al., 1999). Hierzu gehören strukturell und funktionell unterschiedliche Proteine, wie membrangebundene Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, Cytokin-

Vorläufer und Cytokinrezeptoren, membrangebundene Enzyme und Adhensionsmoleküle, die interzelluläre Interaktionen ausführen. Auf Grund der biologischen Bedeutung dieser Protein-Prozessierung für viele physiologische und pathologische Prozesse stellt sich die Frage, ob auch virale Oberflächenproteine wie das EBOV GP dieser Prozessierung unterzogen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die lösliche GP Form durch proteolytische Aktivität zellulärer Proteasen generiert wird. Die lösliche GP Form sollte zunächst weiter biochemisch charakterisiert werden. Mit Hilfe von Pulse-Chase-Experimenten sollte die Freisetzungskinetik analysiert und das zelluläre Kompartiment identifiziert werden, in dem die lösliche GP Form entsteht. Die lösliche GP Form sollte aus Kulturüberständen gereinigt werden und für die Bestimmung der Spaltstelle eingesetzt werden. Weiterhin sollten GP-Mutanten zur Lokalisation und Charakterisierung eines eventuellen Spaltemotivs herangezogen werden. Mit Hilfe von Protease-Inhibitoren sollte die verantwortliche Protease charakterisiert und identifiziert werden.

II.MATERIAL

II.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	BioRad, München
Agarose NA	Amersham Pharmacia, Freiburg
Agarose, Sea Plaque (LMP)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Agarose, Wheat Germ Lectin	Amersham Pharmacia, Freiburg
ϵ -Aminocaprinsäure	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumsulfat	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat, APS	Serva, Heidelberg
Ampicillin (Na-Salz)	Serva, Heidelberg
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
r-ATP (10mM)	Roche, Mannheim
Bactoagar	Difco, USA
Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck, Darmstadt
Centricon, Centriplus Konzentratoren	Millipore (Amicon), Bedford
Centri-Sep Säulen	Princeton Separations, Adelphia; USA
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck, Darmstadt
Coomassie®Plus Protein Assay Reagent	Pierce, Bonn
Dimethylformamid	Sigma, Taufkirchen
Dimethylpimelimidate (DMP)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
DNS-Längenstandard III, V, VI	Roche, Mannheim
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	Merck, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Film Biomax™ MR;	Kodak, Rochester; USA
T _{MAX} SW, ASA 3200;	Kodak, Rochester; USA
RSX 100	Agfa-Gevaert AG, Leverkusen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Linz; Austria
Formamid	Sigma, Taufkirchen
Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (100x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Bio Rad, München
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine- N'-[2-ethanesulfanic acid])	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Jodacetamid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
LipofectAMINE™ 2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectin® Reagent	Gibco BRL, Karlsruhe
Long Ranger™ Gel Solution	FMC Bio Products, Rockland; USA
Magermilchpulver, instant	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
N-Acetyl-D-Glucosamin	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-Citrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Desoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nonidet P 40 (NP40)	LKB-Produkte AB, Schweden
Ortho-Phosphorsäure 85%	Fluka, Buchs; Schweiz
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Pepton	Merck, Darmstadt

Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol	Gibco BRL, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglykol (PEG)	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Sepharose CL-B4	Sigma, Taufkirchen
PVDF Membran Immobilon-P	Millipore, Bedford
Rainbow Protein Marker (RNP 755, 756)	Amersham, Freiburg
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Serva, Heidelberg
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Streptavidin-Peroxidase-Komplex	Amersham, Freiburg
Sulfo-NHS-Biotin	Calbiochem, Schwalbach
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin)	BioRad, München
Tetracyclin	Serva, Heidelberg
Triethylamin	Fluka, Neu Ulm
Tris Base (Trishydroxymethyl-Aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Tris-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Tween 20	Serva, Heidelberg
X-Gal	Sigma, Taufkirchen

II.2 Bakterien, Viren und Eukaryontenzellen

Bakterien:

- Escherichia coli, Stamm XL-1 Blue

recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17
supE44 relA1 lac[F' proAB
lacqZΔM15 Tn10 (Tetr)]c; Sratagene,
Heidelberg

Viren:

- Vacciniavirus, Wildtyp Stamm WR

Moss B, National Institutes of
Health, Bethesda, MD USA

-
- Vacciniavirus, rekombinant vSCGP8 (Volchkov et al., 1995)
EBOV GP
 - Vacciniavirus, rekombinant (vTF7-3) Moss B, National Institutes of Health
Bethesda, MD (Fuerst et al, 1986)
 - EBOV Subtyp Zaire, Isolat Mayinga Centers for Disease Control and
Prevention Atlanta, GA

Eukaryontenzellen:

- CV-1 Zellen Affen (*cercopithecus aethiops*)
Nierenfibroblasten, ATCC CCL 70
- EC-2 Zellen Transformierte Fibroblasten aus
TACE^{ΔZn/ΔZn} Mäusen erhalten von
Roy Black, Immunex (Reddy et al.,
2000)
- HeLa-Zellen Zellen eines humanen Cervix-
carcinoms (epitheloid); ATCC CCL-2
- HuTK⁽⁻⁾ 143B Zellen Humane Osteosarkomfibroblasten
ATCC CRL-8303
- RK-13 Zellen Kaninchen (*oryctolagus cuniculus*)
Nierenepithelzellen, ATCC CCL-37
- Vero E6 Zellen Affen (*cercopithecus aethiops*)
Nierenepithelzellen, ATCC CRL
1586
- 293 Zellen Humane Nierenepithelzellen, ATCC
CRL-1573

II.3 Plasmide

- pGEM-mGP8 ORF des EBOV GP einkloniert in
pGEM3Zf(+) über BamHI und
HindIII (Volchkov et al., 1995)
- pSC-mGP8 ORF des EBOV GP einkloniert in
pSC11 über SmaI (Volchkov et al.,
1995)

pGEM-ΔTm	Stopcodon an Position 651 des EBOV GP in pGEM-mGP8 eingeführt (Volchkov et al., 1998a)
pcDNA3-mGP8	ORF des EBOV GP in pcDNA3 über BamHI und EcoRI inkloniert, erhalten von Dr. Viktor Volchkov
pcDNA3 MuTACE FL	ORF des TACE der Maus kloniert in pcDNA3 über Kpn und NotI, erhalten von Roy Black (Reddy et al., 2000)

II.4 Enzyme

Endo H	New England Biolabs, Frankfurt
Expand TM High Fidelity Enzyme Mix	Roche, Mannheim
PNGase F	New England Biolabs, Frankfurt
Pwo-Polymerase (5U/μl)	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA (1x)	Gibco BRL, Karlsruhe

Die entsprechenden Reaktionspuffer sowie Nukleotide für die Polymerase wurden von den Firmen mit den Enzymen geliefert.

II.5 Proteaseinhibitoren

alpha ₁ -Antichymotrypsin	Sigma, Taufkirchen
BB2516 (Marimastat)	Calbiochem, Bad Soden
CGS 27023	erhalten von H. Cooper Eckhardt, Novartis Pharmaceuticals
GM 6001 (Galardin)	Calbiochem, Bad Soden
MMP-2 Inhibitor I	Calbiochem, Bad Soden
MMP-3 Inhibitor II	Calbiochem, Bad Soden
MMP-8 Inhibitor I	Calbiochem, Bad Soden
1,10-Phenanthroline	Sigma, Taufkirchen
Phosphoramidon	Sigma, Taufkirchen
TAPI-I	Peptides International, Louisville
TIMP-1 (Human Neutrophil Granulocyte)	Calbiochem, Bad Soden
TIMP-2 (Human)	Calbiochem, Bad Soden

TIMP-3 (Human)	Chemicon International, Hofheim
TIMP-4 (Human)	Chemicon International, Hofheim

II.6 Radioaktive Substanzen

L-[³⁵ S]-Cystein, 10mCi/ml	Amersham, Karlsruhe
[¹⁴ C] methylated protein molecular weight marker (250µl, 1µCi)	Amersham, Karlsruhe

II.7 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-ARK (Darmstadt) synthetisiert. Unterstrichene Nukleotide weisen auf Veränderungen der Nukleotidsequenz hin.

Oligonukleotide für PCR-Amplifikation und Sequenzierung von EBOV GP :

Nomenklatur	Sequenz in 5'-3'-Richtung
pr8211R	GAATCACATTGGCTATGTTTAAAGC
pr7192F	CAACAGCACCCATAATACACCCG
pr7294R	TCGTGGCAGAGGGAGTGT
pr6716R	AGTACTCTGTCTCATTGGTTC
pr6990R	CGGACTCTGACCACTGAT
pr6273R	CGTCAGTTGCCACTCCATTCC

Oligonukleotide für die Mutagenese von EBOV GP:

Primer für Glykosylierungsmutanten

EBOV618N/TF	GATTGGACCAAG <u>ACA</u> ATAACAGACAAAA
EBOV618N/TR	CAATTTTGTCTGTTAT <u>TG</u> ICTTGGTCCAAT
EBOV563N/TR	CTTGAGTCGTCTCT <u>GT</u> GGCCAGCTGTCTC
EBOV563N/TF	GAGACAGCTGGCC <u>CAC</u> AGAGACGACTCAAG

Primer für Deletionsmutanten

EBOVGPS _{stop} 641F	GACCAGGGGGACT <u>A</u> AATAGAAATTGGTGGAC
EBOVGPS _{stop} 641R	GTCCACCAATT <u>CT</u> ATTAGTCCCCCTGGTC
EBOVGPS _{stop} 631F	GATTATTCATGATTTTT <u>TA</u> ATAGAAAACCCTTC
EBOVGPS _{stop} 631R	GAAGGGTTTT <u>CT</u> ATTA ³ AAAATCATGAATAATC

Primer für Aminosäure-Austauschmutanten

632D/VF	GATTTTGT <u>TG</u> TAAACCCTTCCGGACC
632D/VR	GGTCCGGAAGGGTTTT <u>TA</u> ACAACAAAATC
633K/VF	GATTTTGT <u>TG</u> TATGTTACCCTTCCGGAC
633K/VR	GTCCGGAAGGGT <u>TA</u> CATCAACAAAATC

633K/RF	CATGATTTTGTGATAG <u>A</u> ACCCTTCCGGAC
633K/RR	GTCCGGAAGGGTTCTATCAACAAAATCATG
634T/IF	GATTTTGTGATAAAA <u>T</u> CCTTCCGGACCAG
634T/IR	CTGGTCCGGAAGGATTTT <u>A</u> TCAACAAAATC
635L/VF	GTTGATAAAAACCGT <u>T</u> CCGGACCAGGGG
635L/VR	CCCCTGGTCCGGAAC <u>G</u> GTTTTATCAAC
636P/AF	GATAAAACCCTT <u>G</u> CGGACCAGGGGGAC
636P/AR	GTCCCCCTGGTCCG <u>C</u> AAGGGTTTTATC
637D/VF	GATAAAACCCTTCCGGT <u>C</u> CAGGGGGAC
637D/VR	GTCCCCCTGG <u>A</u> CCGGAAGGGTTTTATC
637D/LF	GATAAAACCCTTCCG <u>C</u> TCCAGGGGGAC
637D/LR	GTCCCCCTGGAG <u>C</u> GGAAGGGTTTTATC
637D/EF	GATAAAACCCTTCCGG <u>A</u> GACAGGGGGAC
637D/ER	GTCCCCCTGCT <u>C</u> CGGAAGGGTTTTATC
638Q/VF	CCCTTCCGGAC <u>G</u> TGGGGGACAATGAC
638Q/VR	GTGATTGTCCCC <u>A</u> CGTCCGGAAGGG
639G/VF	CTTCCGGACCAGG <u>T</u> GGACAATGACAATTG
639G/VR	CAATTGTCATTGTCC <u>A</u> CCTGGTCCGGAAG
640D/VF	GGACCAGGGGGT <u>T</u> AATGACAATTGGTG
640D/VR	CACCAATTGTCATT <u>A</u> ACCCCCTGGTCC
641N/AF	CCAGGGGGAC <u>G</u> CTGACAATTGGTGG
641N/AR	CCACCAATTGTCAG <u>C</u> GTCCCCCTGG
642D/VF	CAGGGGGACAATG <u>T</u> CAATTGGTGGAC
642D/VR	GTCCACCAATTG <u>A</u> CATTGTCCCCCTG
643N/AF	GGGGACAATGAC <u>G</u> CTTGGTGGACAG
643N/AR	CTGTCCACCAAG <u>C</u> GTTCATTGTCCCC
del634-640F	GATTTTGTGATAAAA- <u>A</u> ATGACAATTGGTGG
del634-640R	CCACCAATTGTCATT- <u>T</u> TTATCAACAAAATC

Anti-Sense-Oligonukleotide:

Die Anti-Sense-Oligonukleotide gerichtet gegen die m-RNA-Sequenz des humanen TACE wurden als Phosphorothioate mit einer 2'-O-Methyl Gruppe (in fett gedruckte Nukleotide) an je 5 Basen am 5'- und 3'-Ende synthetisiert. Unterstrichene Oligonukleotide weisen auf eine veränderte Nukleotidsequenz hin.

AS2-17	TCAGCATTTCGACGTTACTG
AS4-17	CCCTAGTCAGTGCTGTTATC
AS5-17	CCTACTGTACAGGGCTTTCC
AS2M-17	TCAGCTTCTCA<u>A</u>CATTACTG
AS4M-17	CCCTAGT<u>G</u>ATT<u>T</u>CAGTTATC

II.8 Antikörper

Primärantikörper und Antiseren:

Anti-EBOV (Pferdeserum II)	Dr. Borisevich, Sergiev Possad, Russland
Anti-GP ₁ Monoklonaler Antikörper (Human IgG1, KZ52)	erhalten von Dr.Dennis Burton (Maruyama et al., 1999)
Anti-GP ₂ (Kaninchenserum VI)	Arbeitsgruppe Viktor Volchkov

Sekundärantikörper:

Kaninchen-Anti-Pferd-IgG	Sigma, Taufkirchen
Kaninchen-anti-Pferd-Ig, HRP-gekoplt.	Sigma, Taufkirchen
Ziege-anti-Kaninchen-Ig, HRP-gekoplt.	Dako, Hamburg

II.9 Medien und Puffer

Medien für Bakterienkultur:

LB-Medium:	Bacto-Pepton	10g
	Hefeextrakt	5g
	NaCl	10g
	ad 1l mit a. bidest	
2YT-Medium:	Bacto-Pepton	16g
	Hefeextrakt	10g
	NaCl	5g
	ad 1l mit a. bidest	

Agarplatten: LB- oder 2YT-Medium mit 1,5% Bactoager versetzt

Medien für Zellkultur:

Dulbecco`s Mod.Eagle Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
DMEM/NUT-MIX.F-12 mit Gluamax-I (1:1)	Gibco BRL, Karlsruhe
DMEM ohne Methionin und Cystein	ICN Biomedicals, Aurora USA
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma, Taufkirchen

Puffer:

Anodenpuffer 1:	Tris Base Ethanol in a. bidest.	0,3M (36,34g/l) 20%
Anodenpuffer 2:	Tris Base Ethanol in a. bidest.	25mM (3,3g/l) 20%
Blocking Solution:	BSA Tween 20 in PBS ^{def}	2% 0,2%
Coomassie G-250: (Färbelösung)	Methanol Ammoniumsulfat H ₃ PO ₄ 85% CBB-G250 in a. bidest.	34% 17% 2% 0,66g/l
Co-IP-Puffer:	Tris/HCl NaCl EDTA BSA Na-Desoxycholat NP40 Jodacetamid PMSF in a. bidest.	20mM 100mM 5mM 0,5% 0,4% 1% 25mM 1mM
Formamid/EDTA- Probenpuffer:	Formamid EDTA 25mM pH 8,0	5 (VT) 1 (VT)
Kathodenpuffer:	Tris/HCl ϵ -Aminocaprinsäure Ethanol in a. bidest.	25mM (3,3g/l) 40mM (5,25g/l) 20%
Lösung 2: (CCB-G250 Färbung)	Methanol Ammoniumsulfat H ₃ PO ₄	34% 17% 2%
PBS ^{def} -Puffer:	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ MgCl ₂ KH ₂ PO ₄ CaCl ₂ ad 1l a. bidest.	8,0g 0,2g 1,15g 0,1g 0,2g 0,13g

10x Proteingel- Laufpuffer:	Tris Base Glycin SDS ad 1l a. bidest.	30g 144g 10g
10x Probenpuffer: (DNA, Agarosegel)	Bromphenolblau Xylencyanol FF Glycerol in a. bidest.	0,5% 0,5% 50%
TAE (50x):	Tris Base Eisessig EDTA (pH 8,0) ad 1l a. bidest.	242g 57,1ml 100ml
4x Probenpuffer: (Proteingel)	SDS Glycerin β -Mercaptoethanol in a. bidest.	8% 40% 20%
TE-Puffer:	Tris/HCl pH 8,0 EDTA in a. bidest.	10mM 1mM
TNE-Puffer:	Tris/HCl pH 7,6 NaCl EDTA in a. bidest.	10mM 150mM 3mM
TSS-Puffer:	LB-Medium MgCl ₂ DMSO Polyethylenglycol in a. bidest.	85% 50mM 5% 10%

10. Kits

QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN-tip 500 Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep 8 Plasmid Kit	Qiagen, Düsseldorf
Expand TM High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Ready Reaction DeyDeoxy Terminator	Perkin Elmer, Langen
AmpliTaQFS Kit	
ECL western blotting detektion reagents	Pierce, Bonn

Quick-change mutagenesis Kit

Stratagene, Niederlande

SilverQuestTM Silver Staining Kit

Invitrogen, Niederlande

III. METHODEN

III.1 Molekularbiologische Methoden

III.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR: polymerase chain reaction)

Die Polymerasekettenreaktion dient der selektiven Amplifikation von DNA-Sequenzen. Dabei wird an einer Matrizen-Doppelstrang-DNA durch zwei Oligonukleotide (forward und reverse Primer), die zu jeweils einem der beiden Stränge komplementär sind, neue Matrizen-DNA für das jeweils am Gegenstrang hybridisierte Oligonukleotid enzymatisch synthetisiert. Durch Wiederholung eines Zyklus, bestehend aus einem Denaturierungs-, einem Hybridisierungs- und einem Syntheseschritt, kommt es zur exponentiellen Amplifikation des zwischen den Oligonukleotiden gelegenen DNA-Abschnitts. Entscheidend für die PCR ist die Hitzestabilität der verwendeten DNA-Polymerase. Diese wird aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) isoliert und übersteht die extremen Denaturierungstemperaturen von 95°C ohne größeren Aktivitätsverlust.

In dieser Arbeit wurden das ExpandTM High Fidelity PCR-System (Roche, Mannheim), sowie ein programmierbarer Heizblock (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) verwendet. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe des PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers von Primern, Nukleotiden und Enzymen gereinigt.

Reaktionsansatz: Komponenten	Volumen	Endkonzentration
Mastermix 1: dNTP-Mix (je 10mM)	1µl	200µM
forward Primer (10pmol/µl)	1,5µl	300nM
reverse Primer (10pmol/µl)	1,5µl	300nM
DNA-Matrize (100ng/µl)	1µl	100ng/50µl
dH ₂ O	ad 25µl	
Mastermix 2: 10x PCR-Puffer mit	5µl	1,5mM MgCl ₂
15mM MgCl ₂		
Expand TM High Fidelity	0,75µl	2,6U/50µl
PCR System Enzym-Mix		
dH ₂ O	ad 25µl	

25µl Mastermix 1 und 25µl Mastermix 2 werden gemischt und nach folgenden Parametern im Thermozykler inkubiert:

Zyklusparameter:	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Denaturierung der DNA-Matrize	95°C	2min	1x
Denaturierung	95°C	30sec	} 25-35x
Primeranlagerung	50-70°C	30sec	
DNA-Synthese	72°C	1-2min	
Auffüllsynthese	72°C	7min	1x

III.1.2 Ortsgerichtete *in vitro*-Mutagenese von DNA

Die ortsgerechte *in vitro*-Mutagenese von DNA beruht auf einer Oligonukleotid-vermittelten PCR, die mit Hilfe des Quick Change Mutagenese Systems (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt wurde. Hierbei enthalten die verwendeten Oligonukleotide, die komplementär zueinander sind, die gewünschte Mutation und können so zur Insertion, Deletion oder zum Nukleotidaustausch an entsprechender Position eingesetzt werden. Zur Amplifikation wird die rekombinante PfuTurbo™-DNA-Polymerase eingesetzt (Stratagene, Heidelberg). Die anschließende Selektion der mutierten DNA beruht auf der Eigenschaft der Restriktionsendonuklease *DpnI* ausschließlich methylierte DNA zu schneiden. Die *in vitro* synthetisierte, mutierte DNA ist im Gegensatz zur bakteriell replizierten DNA nicht methyliert. Nur die Matrizen-Plasmid-DNA wird verdaut und die mutagenisierte DNA kann in Bakterienzellen transformiert werden (III.1.3).

PCR-Ansatz:

10x Reaktionspuffer	5µl
dNTP-Mix	1µl
Plasmid-DNA	20ng
forward Primer	125ng
reverse Primer	125ng
Pfu DNA-Polymerase (2,5U/µl)	1µl
dH ₂ O	ad 50µl

Zyklusparameter für die Quick Change

Mutagenese-PCR:

1x	95°C	30sec
} 18x	95°C	30sec
	55°C	1min
	68°C	2min/kb
		Plasmid-DNA

Nach der PCR-Reaktion wurde pro Ansatz 1µl *DpnI* (10U/µl) hinzugefügt und die Matrizen-DNA 1h bei 37°C verdaut.

III.1.3 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Bakterienzellen, wie die hier eingesetzten *Escherichia coli* (*E.coli*) können nach Inkubation mit geeigneten Chemikalien (z.B. CaCl_2 oder DMSO) fremde DNA aufnehmen (Chung. et al., 1989). In die so vorbehandelten Zellen (kompetente Zellen) kann die DNA mit der Hitzeschock-Methode eingebracht werden.

Hierzu wurden 5ml LB-Medium mit einer Kolonie *E.coli* XL-1Blue angeimpft und über Nacht (Ü/N) bei 37°C geschüttelt. Eine 30ml Kultur wurde dann mit 300µl der Ü/N-Kultur inokuliert und bis zu einer optischen Dichte von ~0,6 bei 37°C weiter wachsen gelassen. Die Zellen wurden anschließend 20min auf Eis gekühlt und 10min bei 1200xg und 4°C pelletiert. Die Zellen wurden dann in 4ml TSS-Puffer (Kap. II.9) resuspendiert und mindestens 15min auf Eis inkubiert. Hiernach sind die Zellen Transformationskompetent. Für die Transformation wurden 200µl der kompetenten Zellen mit 10µl des Mutagenese PCR-Ansatzes (Kap.III.1.2) oder Ligationsansatzes (bis zu 200ng DNA) gemischt und 30min bei 4°C inkubiert. Die Hitzeschockbehandlung erfolgte für 90sec bei 42°C im Wasserbad. Nach einer kurzen Inkubation von 2min auf Eis wurde 1ml LB-Medium ohne Antibiotika zum Transformationsansatz gegeben und dieser 1h bei 37°C zur Resistenzausbildung inkubiert. Die Zellen wurden dann für 5min bei 3000rpm pelletiert, in 150µl Medium aufgenommen und 50-100µl auf eine antibiotikahaltige Agarplatte ausgestrichen und 12-16h bei 37°C selektiert.

III.1.4 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxipräparation)

Die Plasmid-DNA Präparation beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) von Bakterien und der Adsorption von DNA an Silikamembranen (QIAprep 8 Plasmidkit) oder Anionenaustauschersäulen (QIAGEN-Maxi Plasmidkit) in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen (Vogelstein and Gillespie, 1979).

Für die Minipräparation wurden 5ml LB-Medium unter Zusatz entsprechender Antibiotika mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C für 7-16h geschüttelt. Für die Maxipräparation wurden zwei Vorkulturen vorgeschaltet. Eine 5ml-Kultur wurde ohne schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert und mit dieser eine "über Tag Kultur" 1:100 angeimpft. Die 200ml Kultur für die Maxipräparation wurde wiederum aus der "über Tag Kultur" 1:100 angeimpft und für 12-16h inkubiert. Die DNA wurde nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) isoliert und Ethanol gefällt (Kap.III.1.5). Die zu erwartenden DNA-Mengen bei Verwendung von "high-copy"-Plasmiden betragen für die Minipräparation 20µg (5ml-Kultur) und für die

Maxipräparation 200-500µg (200ml-Kultur). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt ($OD_{260nm}=1$ entspricht 50µg/ml DNA).

III.1.5 Ethanol-Fällung von DNA unter Standardbedingungen

Das Volumen einer DNA-Lösung wird auf 1/10 VT mit 3M Natriumacetat und 3 VT mit absolutem Ethanol eingestellt. Die Fällung erfolgt bei -20°C für mindestens 30min. Danach wird die DNA hochtourig pelletiert und zugunsten höherer Reinheit wiederholt gefällt oder mit 700µl 70%igen Ethanol zur Entfernung von Salzen gewaschen. Die DNA wird anschließend Luft oder unter Vakuum getrocknet und in a. bidest., 10mM Tris/HCl pH 8,0 oder in Formamid/EDTA Probenpuffer (für Sequenzierung) aufgenommen.

III.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

DNA-Fragmente wurden in Flachbettagarosegelen, bestehend aus 1-2% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer (2% < 500nt, 1% > 500nt) unter einer Spannung von 13V/cm aufgetrennt. Die Proben wurden mit Probenpuffer (Kap.II.9) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (5µgEtBr/ml) 15-30min gefärbt und die DNA unter UV-Licht bei 300-365nm sichtbar gemacht (fluoreszierend bei 590nm).

III.1.7 Enzymatische Sequenzierung von DNA (ABI PRISM 377 DNA Sequencer)

Das hier angewandte Prinzip basiert auf der Didesoxymethode (Kettenabbruchmethode) von Sanger (Sanger et al., 1977). Die enzymatische Synthese von DNA *in vitro* mittels der AmpliTaq-DNA-Polymerase,FS wurde mit Hilfe des ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Ready Reaction Kit der Fa. Perkin Elmer durchgeführt. Die hier automatisierte DNA Sequenzierung benutzt fluoreszenzfarbstoffmarkierte ddNTPs, so daß die Sequenzierung in einem Ansatz durchgeführt werden kann. Nach der Sequenzierreaktion werden die DNA-Fragmente über Centri Sep Säulchen gereinigt. Die Reinigung basiert auf dem Prinzip eines Molekularsiebs, bei dem kleinere Moleküle wie Nukleotide und Primer in der Matrix zurückgehalten werden. Die Proben werden dann in einer Speed-Vac eingetrocknet, in 4µl Formamid/EDTA-Puffer aufgenommen und nach einem Denaturierungsschritt von 2min bei 95°C in einem 5%igen Harnstoff-Acrylamidgel aufgetrennt.

Reaktionsansatz:	2µl	Premix: (- A, C-, G-, T- Dye Terminator - dGTP, dATP, dCTP, dTTP - Tris-HCl (pH 9,0), MgCl ₂ - hitzestabile Pyrophosphatase - AmpliTaq DNA Polymerase, FS)
	10pmol	Primer
	50ng	ds DNA
	ad 10µl	a. bidest.

Zyklusparameter:	Temperatur	Zeitdauer	Zykluszahl
Denaturierung der DNA-Matrize	95°C	2min	1x
Denaturierung	95°C	10sec	} 25x
Primeranlagerung (annealing)	50°C	5sec	
DNA-Synthese (elongation)	60°C	4min	
Nach dem letzten Zyklus	4°C	∞	

III.1.8 Isolierung genomischer Vaccinavirus-DNA aus infizierten Zellen

Die gesamte DNA aus Vaccinavirus-infizierten Zellen sollte präpariert werden, um die hergestellten GP rekombinanten Vaccinavirus Mutanten auf die tatsächlich gesetzte Mutation durch Sequenzierung zu überprüfen. Hierzu wurden infizierte Zellen (25cm²-Schale) nach dreimaligen Frieren-Tauen mit 2% SDS und 2% β-Mercaptoethanol 20min bei 37°C lysiert. Die DNA wurde mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v von Gibco) dreimal durch Phasentrennung extrahiert. Anschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase unter Standardbedingungen gefällt und in 100µl a. bidest. aufgenommen. Mit EBOV GP-spezifischen Primerpaaren (pr7192F und pr8211R; Kap.II.7) wurde dann ein ~1000bp DNA-Fragment mittels PCR an Hand der isolierten Matrizen-DNA amplifiziert. Das DNA-Fragment wurde dann mit Hilfe des QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und die gesetzte Mutation durch Sequenzierung bestätigt.

III.1.9 Anti-Sense-Technik

Zur spezifischen Inhibition der Translation und dem Ausschalten von funktionellen Gen-Produkten wurden Anti-Sense-Oligonukleotide (ASO) eingesetzt. Es wurden 19-21 Basen lange Oligonukleotide kreiert, die an humane TACE-17 mRNA in drei verschiedenen Bereichen hybridisieren (AS2-17, AS4-17 und AS5-17; Sequenzen Kap.II.7). Die ASO wurden zur Erhöhung der Nukleaseresistenz als Phosphorothioate synthetisiert (Bennett et al., 1992). Zusätzlich wurden die ASO am 5'- und 3'-Ende mit je fünf 2'-O-Methylgruppen modifiziert, so daß in der Mitte ein Bereich von 10 Basenpaaren verblieb, zugänglich für den RNase H Angriff (Dean et al., 1994). Für die 2'-O-Methyl Modifikation von ASO wurde eine höhere Bindungsaffinität an die Ziel RNA und eine höhere Nukleaseresistenz beschrieben (McKay et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten ASO wurden von der Fa. Sigma-ARK synthetisiert und gereinigt. In die Zellen wurden die ASO mittels Lipofectation (Lipofectin, Gibco) eingebracht. Der Einfluß der ASO auf die GP Freisetzung wurde nach Immunpräzipitation der freigesetzten GP_{1/2Δ}-Komplexe aus dem Zellüberstand und Quantifizierung der Proteinbanden ausgewertet.

III.2 Zellbiologische Methoden

III.2.1 Zellkultur-Technik

Zur Expression von EBOV GP wurden in dieser Arbeit HeLa, RK-13, Vero E6, Mausfibroblasten EC-2 und 293 Zellen verwendet. Zur Herstellung von rekombinanten Vaccinia-Viren wurden zusätzlich CV-1 und HuTK⁽⁻⁾143B Zellen eingesetzt. Alle Zellen wurden in 250ml-Kulturflaschen (Greiner) bei 37°C und mit 5% CO₂ begast kultiviert. Als Kulturmedium wurde 1xDMEM (für EC-2 Zellen 1xDMEM/NUT.F-12 mit Glutamax-I) mit 10% FCS verwendet. Zur Passagierung wurden die Zellen einmal mit PBS^{def} gewaschen, 3min bei 37°C mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert (293 und EC-2 Zellen nur kurz geschwenkt) und anschließend in Kulturmedium suspendiert. Die Zellen wurden so in einer 1:5 bis 1:10 Verdünnung zweimal bis dreimal die Woche passagiert.

Zur längeren Aufbewahrung von Zellen wurden diese in Anwesenheit von 10% DMSO in flüssigem Stickstoff bei -180°C eingefroren. Eine fast konfluent bewachsene 250ml-Kulturflasche wurde trypsiniert, die Zellen pelletiert (800 rpm, 4°C für 5min) und in

2ml Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in zwei Einfrierröhrchen gefüllt und vor der Lagerung im Stickstofftank zunächst über Nacht bei -80°C in einer Einfrierbox, gefüllt mit Isopropanol eingefroren.

Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurden diese zunächst im 37°C Wasserbad aufgetaut, die Zellsuspension in 10ml Kulturmedium mit 10% FCS pipettiert, die Zellen bei 800 rpm, 4°C für 5min pelletiert und anschließend im Kulturmedium mit 10% FCS resuspendiert.

III.2.2 Liposomen-vermittelte Transfektion von DNA

Rekombinante Expressionsplasmide wurden in dieser Arbeit mit den Transfektionsreagenzien Lipofectin oder LipofectAmine 2000 der Fa. Gibco in die Eukaryontenzellen transfiziert. Die Transfektion mit beiden Reagenzien basiert auf dem Prinzip der Liposomen-vermittelten Transfektion von DNA. Die spontane Interaktion von Lipofectin/LipofectAmine 2000 mit der Plasmid-DNA führt zur Ausbildung von Liposomen-DNA-Komplexen. Die Fusion der Komplexe mit der Zellmembran führt zu einer effizienten Aufnahme und Expression in den Zellen (Felgner et al., 1987).

HeLa, 293, CV-1 oder EC-2 Zellen wurden zu einer Konfluenz von 50-90% kultiviert und zweimal mit 1xDMEM ohne FCS gewaschen.

Transfektionsansätze (6-Well-Platte):

Lipofectin: A. $10\mu\text{l}$ Lipofectin (1mg/ml) in $500\mu\text{l}$ 1xDMEM 1min vortexen und 30-45min bei RT inkubieren.

B. $3\mu\text{g}$ Plasmid-DNA in $500\mu\text{l}$ 1xDMEM

Lösung A. und B. mischen, vortexen und 10min bei RT inkubieren. Dann auf die gewaschenen Zellen geben. Nach 7-12h wird der Transfektionsansatz abgenommen und die Zellen mit 1xDMEM mit 2% FCS weiter 12-24 Stunden inkubiert.

LipofectAmine 2000: A. $3\mu\text{g}$ Plasmid-DNA in $200\mu\text{l}$ 1xDMEM 5min bei RT inkubieren

B. $8\mu\text{l}$ LipofectAmine 2000 in $200\mu\text{l}$ 1xDMEM vortexen und 5min RT inkubieren.

Lösung A. und B. mischen, vortexen und 20min bei RT inkubieren. Transfektionsansatz auf die gewaschenen Zellen geben und 15min auf einem Kipp-Schüttler bei 37°C

inkubieren, dann 2ml 1xDMEM mit 2% FCS zugeben. Zellen werden weiter 18-24h inkubiert.

III.2.3 Herstellung rekombinanter Vacciniaviren

Die Herstellung rekombinanter Vacciniaviren basiert auf homologer Rekombination. Diese wird zwischen den flankierenden Regionen des Thymidin-Kinase (TK) Gens im rekombinanten Plasmid und der homologen Region in der viralen DNA (Wildtyp Vacciniavirus WR-Stamm) vermittelt (Chakrabarti et al., 1985). Die Expressionskassette des zu exprimierenden Gens wird durch rekombinierende Segmente des Vaccinia TK Gens flankiert. Somit resultiert die Rekombination in einer Inaktivierung des viralen TK Gens, was aber keinen negativen Einfluß auf die Virusreplikation hat. Rekombinante Viren mit dem TK⁻ Phentyp können von Wildtyp Viren durch die Infektion von TK⁻ Zellen (HuTK⁽⁻⁾143B) in Anwesenheit von 5-Bromdeoxyuridine (5-BrdU) selektiert werden. Erst die Phosphorylierung von 5-BrdU durch die TK, führt zu einem letalen Einbau in das Vaccinia-Wildtyp Genom, so daß nur rekombinante Viren replizieren können. Die Ko-expression des *Escherichia coli* lacZ Proteins erlaubt eine Selektion rekombinanter Virusplaques durch eine enzymatische Umsetzung von Xgal in einen Indigofarbstoff.

Zur Herstellung rekombinanter Vacciniaviren, die das EBOV GP exprimieren, wurden CV-1 Zellen (50-70% konfluent) zunächst mit 1xDMEM gewaschen und mit Wildtyp Vacciniavirus (WR-Stamm; MOI 0,02 pfu/Zelle) infiziert (Lefkowitz et al., 1990). Anschließend wurden die Zellen (21cm² Schalen) mit 5-9µg des pSC-mGP8 Plasmids transfiziert (Lipofectin Transfektion Kap.III.2.2) und 2-3 Tage inkubiert (Felgner et al., 1987). Rekombinante Viren wurden dann zuerst in HuTK⁽⁻⁾143B Zellen selektiert und anschließend zweimal in CV-1 Zellen Plaque gereinigt (Kap.III.2.3.1). Die gereinigten Viren wurden dann zu Virus-Stocks herangezogen und auf CV-1 Zellen titriert (Kap.III.2.3.2).

III.2.3.1 Selektion rekombinanter Vacciniaviren (Plaque-Test)

Die mit Wildtyp Vacciniavirus infizierten und pSC-mGP8 transfizierten CV-1 Zellen wurden nach 2-3 Tagen eingesammelt, bei 1500 rpm 5 min pelletiert, in 1ml 1xDMEM resuspendiert und durch dreimaliges Frieren-Tauen lysiert. Zur Selektion der rekombinanten Viren wurden TK⁻ Zellen (80-90% konfluent in 21cm² Schalen) mit Verdünnungen (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ und 10⁻⁴) des CV-1-Lysats infiziert. Das Inokulum

wurde entfernt und die Zellen mit 3ml 1% LMP-Agarose in 1xDMEM und 50µg/ml BrdU überschichtet. Nach einer Inkubation von 2-3 Tagen bei 37°C und 5% CO₂ entwickeln sich einzelne Virus-Plaques. Danach wurden die Zellen mit weiteren 3ml 1% LMP-Agarose in 1xDMEM und 400µg/ml Xgal (Stocklösung 4% Xgal in Dimethylformamid) überschichtet. Nach etwa 10h wurden die gefärbten Plaques entnommen und in 500µl 1xDMEM resuspendiert und durch dreimaliges Frieren-Tauen Zellen lysiert. Zwei weitere Plaquereinigungsrounden wurden wie beschrieben auf CV-1 Zellen durchgeführt. Der Plaque-Test wurde auch zur Bestimmung der Virus-Titer verwendet. Hierzu wurden höhere Verdünnungen wie 10⁻³ bis 10⁻¹⁰ ausgetestet.

III.2.3.2 Vacciniavirus-Stock

Zur Herstellung eines Vacciniavirus-Stocks wurden CV-1 Zellen zu einer Dichte von 40-50% kultiviert. Die Zellen wurden dann einmal mit 1xDMEM ohne FCS gewaschen und mit einer niedrigen MOI von 2 x 10⁻² pfu/Zelle 1h bei 37°C infiziert. Das Inokulum wurde entfernt und die Zellen 2-3 Tage mit 1xDMEM und 0,5% FCS inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet, pelletiert und in einem entsprechenden Volumen aufgenommen. Das Zellysate wurde nach dreimaligem Frieren-Tauen aliquotiert und mit Hilfe des Plaque-Tests der Virus-Titer bestimmt.

III.2.4 Expression von EBOV GP mit Hilfe rekombinanter Vacciniaviren

Rekombinante Vacciniaviren wurden eingesetzt um das EBOV Wildtyp- und Mutantengp in Zellen zu exprimieren. RK-13 oder 293 Zellen wurden hierzu mit einer MOI von 10 pfu/Zelle 1h bei 37°C auf einem Kipp-Schüttler infiziert. Das Inokulum wurde abgenommen und die Zellen im 1xDMEM ohne FCS für 6-12h inkubiert. Die Zellen wurden dann einem Puls-Chase-Experiment unterzogen oder Oberflächen-biotinyliert. EBOV GP wurde anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper immunpräzipitiert und in der SDS-PAGE analysiert.

Für eine transiente Expression von EBOV GP wurde hier auch das vTF7-3-System (Lefkowitz et al., 1990) benutzt. HeLa Zellen wurden zunächst mit dem rekombinanten Vacciniavirus vTF7-3 (erhalten von Moss B., National Institute of Health Bethesda, MD) zur Expression der T7-RNA-Polymerase mit einer MOI von 10 pfu/Zelle 1h bei 37°C infiziert. Anschließend folgte dann die Transfektion mit Plasmiden, die das GP Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors tragen (Kap.III.2.2). Die Zellen und

Kulturmedium wurden 16-18h nach Transfektion eingesammelt und GP im Western Blot detektiert (Kap.III.3.2).

III.2.5 Metabolische Pulse-Chase-Markierung

Mit Hilfe der Pulse-Chase-Markierung können Modifikationen und Prozessierungsschritte von Proteinen untersucht werden. Diese Methode wurde hier zur Untersuchung der proteolytischen Prozessierung von EBOV GP_{1/2} zu GP_{1/2Δ} (shedding) eingesetzt. Zellen (RK-13, 293 oder EC-2) wurden mit rekombinanten Vacciniaviren infiziert (Kap.III.2.4) oder mit Expressionsplasmiden transfiziert (Kap.III.2.2). Nach 7-10h Infektion oder 16-24h Transfektion wurden die Zellen mit serumfreien 1xDMEM-Mangelmedium ohne Methionin und Cystein gewaschen und für 1h zum Aushungern inkubiert. Die Markierung (Pulse) erfolgte mit 100µCi/ml [³⁵S]-Cystein (Amersham, Karlsruhe) für 30min bei 37°C. Anschließend wurde das Markierungsmedium abgenommen und für variable Zeiträume durch 1xDMEM (Chase) ersetzt. Das Medium wurde abgenommen, von abgestorbenen Zellen durch eine niedertourige Zentrifugation (2000rpm, 5min bei 4°C) befreit und mit 50nMol PMSF versetzt bei 4°C bis zur Immunpräzipitation aufbewahrt. Die Zellen wurden im Co-IP-Puffer lysiert (mindestens 1h 4°C) und ebenfalls bei 4°C bis zur Immunpräzipitation gelagert.

III.2.6 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde zur spezifischen Detektion und Quantifizierung von EBPV GP in Zellysaten und Kulturüberständen eingesetzt. Die Immunkomplexe aus GP-spezifischen Antikörpern und Antigen wurden hierbei durch Protein A-Sepharose oder durch gekoppelte Sekundärantikörper gefällt. Die verwendeten Antikörper sind in Kap.II.8 aufgeführt.

Zur Entfernung ausgefallener Proteine wurden die Zellysate und Medium zunächst bei 4°C und 14.000 rpm für 20min zentrifugiert. Unspezifische Bindungen wurden durch eine Präinkubation mit Protein A-Sepharose (50µl 50% v/v in Co-IP-Puffer auf 1ml Probe) für 1h bei 4°C und anschließende Zentrifugation bei 4°C und 14.000 rpm für 20min minimiert. Die so vorbereiteten Proben wurden mit GP-spezifischen Antikörpern in einer Verdünnung von 1:600 bei 4°C für 4-12h inkubiert. Zur Präzipitation der Immunkomplexe wurde Protein A-Sepharose oder Kaninchen-Anti-Pferd-Antikörper gekoppelt an Protein A-Sepharose zugegeben und 1h bei 4°C inkubiert. Die Präzipitate wurden dann dreimal mit Co-IP/TNE-Puffer (1:1) gewaschen, in 50mM Tris/HCl pH

6,8 mit 2% SDS aufgenommen und 10min bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden anschließend in der SDS-PAGE analysiert (Kap.III.3.1).

III.2.7 Infektion von Zellkulturen mit Ebolavirus Subtyp Zaire (Stamm Mayinga)

Alle Arbeiten mit Ebolavirus unterliegen der höchsten biologischen Sicherheitsstufe und wurden im Hochsicherheitslabor (L4) des Instituts für Virologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Vero E6 Zellen wurden zu einer Dichte von 60-80% kultiviert und vor der Infektion mit Ebolavirus zweimal mit 1xDMEM ohne FCS gewaschen. Die Infektion mit Ebolavirus Mayinga (Subtyp Zaire) erfolgte mit einer MOI von 10^{-2} pfu/Zelle für 1h bei 37°C. Anschließend wurde das Inokulum entfernt und die Zellen mit 1xDMEM mit 2% FCS für 5 bis 7 Tage bei 37°C inkubiert. Der zytopathische Effekt (CPE) sollte dann mindestens bei 50% der Zellen zu beobachten sein. Das Kulturmedium wurde dann abgenommen und abgelöste Zellen durch eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 5min entfernt.

Virus wurde durch eine Ultrazentrifugation bei 25.000 rpm und 4°C für 1h (Beckmann SW 28) aus dem Überstand pelletiert. Ein Aliquot des virusfreien Überstand wurde mit 1% SDS versetzt, 10min aufgekocht und in der SDS-PAGE analysiert. Der virusfreie Überstand von Vero E6 Zellen wurde bis zur Isolierung und Aufreinigung der löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexe bei 4°C aufbewahrt (Kap.III.4).

III.2.8 Markierung von Oberflächenproteinen mit Sulfo-NHS-Biotin

Die Abspaltung der GP_{1/2Δ}-Komplexe von der Zelloberfläche wurde mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung untersucht. Hierzu wurden GP-exprimierende RK-13 Zellen mit Biotin markiert und anschließend für verschiedene Zeiten bei 37°C inkubiert, um die Spaltung der markierten Proteine von der Zelloberfläche zu ermöglichen. Die in das Medium abgespaltenen Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE im Westernblot analysiert.

RK-13 Zellen wurden zu einer Dichte von 80% kultiviert und mit rekombinantem Vacciniavirus zur Expression von EBOV GP infiziert (Kap.III.2.4). Die Zellen wurden 10-12h nach Infektion 3x mit eiskaltem PBS⁺⁺ auf Eis gewaschen und 2x 20min lang bei 4°C mit Sulfo-NHS-Biotin (2mg/ml PBS⁺⁺) biotinyliert. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C 1x mit 100mM Glyzin in PBS⁺⁺ und 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen, um überschüssiges Biotin komplett zu entfernen.

Die Zellen wurden nach der Biotinylierung mit 1x DMEM für verschiedene Zeitintervalle weiter bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde das Kulturmedium abgenommen, durch eine niedertourige Zentrifugation (2000 rpm bei 4°C für 5min) von abgelösten Zellen befreit und die Zellen im Co-IP-Puffer lysiert. Medium und Zellysat wurden dann mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert (Kap.III.2.6), in der SDS-PAGE aufgetrennt und biotinylierte Proteine im Western Blot mit Streptavidin-Peroxidase detektiert (Kap.III.3.2). Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mit der Bioimager PC-BAS Software von Ray Test.

III.2.9 Deglykosylierung von Glykoproteinen

Ausgangsmaterial für die Analyse waren GP aus Viruspartikeln, rekombinant exprimiertes GP aus transfizierten Zellen, sowie GP aus den Kulturüberständen infizierter und transfizierter Zellen. Die Proben wurden nach Angaben des Herstellers (BioLabs) für die entsprechende Glykosidase behandelt. Nach der Deglykosylierung wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit GP-spezifischen Antikörpern analysiert (Kap.III.3.1-2).

Deglykosylierung mit N-Glykosidase F (PNGase F):

Durch den Verdau mit PNGase F werden alle N-glykosidisch gebundenen Glykane (mannosereiche, hybride und komplexe) entfernt. Die Glykoproteine wurden zunächst in Anwesenheit von 0,5% SDS und 1% β -Mercaptoethanol bei 99°C 10min lang denaturiert. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit 2500U PNGase F (BioLabs, Frankfurt) in 50mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) mit 1% NP-40 bei 37°C für 12h.

Deglykosylierung mit Endo H:

Endo H entfernt ausschließlich mannosereiche Glykane, die N-glykosidisch an Proteine gebunden sind. Nach der Denaturierung der Glykoproteine mit 0,5% SDS und 1% β -Mercaptoethanol bei 99°C für 10min folgte die Inkubation mit 1000U Endo H (BioLabs, Frankfurt) in 50mM Natriumcitrat-Puffer (pH 5,5) bei 37°C für 2h.

III.2.10 Inhibition der GP_{1/2Δ} Freisetzung durch Protease-Inhibitoren

Der Einfluß unterschiedlicher Protease-Inhibitoren auf die Freisetzung der löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexe wurde im folgenden experimentellen Ansatz untersucht. RK-13 oder 293 Zellen wurden zur Expression des EBOV GP mit rekombinantem Vacciniavirus

infiziert (Kap.III.2.4) und 7h nach Infektion metabolisch mit [³⁵S]-Cystein markiert (Kap.III.2.5). Um korrekte Prozessierung und Transport des GP zur Zelloberfläche zu gewährleisten wurde ein Chaseperiode von 2h mit 1x DMEM angeschlossen. Die getesteten Protease-Inhibitoren (Kap.II.5) wurden dann in verschiedenen Konzentrationen (Kap.IV.9) in 1x DMEM angesetzt und auf die Zellen gegeben. Zellen und Kulturüberstand wurden nach 10-12h Inkubation bei 37°C getrennt eingesammelt. Die Proben wurden mit GP-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und in der SDS-PAGE analysiert. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte am Bioimager mit der PC-BAS Software (RayTest).

III.2.11 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (Sedimentationsanalyse)

Die Sedimentationsanalyse nach Sanderson et al., 1992 wurde hier als Standardmethode zur Unterscheidung der membranassoziierten und löslichen GP-Formen eingesetzt. Das Prinzip basiert auf einer schnelleren Sedimentation membrangebundener Proteine gegenüber löslichen Formen auf Grund des Sedimentationskoeffizienten. Hierzu wurden RK-13 Zellen mit rekombinantem Vacciniavirus infiziert (Kap.III.2.4) und metabolisch markiert (Kap.III.2.5). Nach 12h Chase wurden die Kulturüberstände zuerst niedertourig zur Entfernung abgestorbener Zellen bei 2000rpm und 4°C 10min lang zentrifugiert. Aliquots (500-800µl) wurden dann auf einen linearen 10%-40% igen Saccharosegradienten (w/w in 1x DMEM) geladen und bis zum Gleichgewicht in einem Beckmann SW60 Rotor bei 36.000 rpm und 4°C 19h lang zentrifugiert. Fraktionen wurden von unten nach oben gesammelt, mit GP-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert (Kap.III.2.6) und der SDS-PAGE Analyse zugeführt.

III.3 Proteinanalytische Methoden

III.3.1 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) wurden Proteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Systems mit einem Sammel- (4,5% Acrylamid) und einem Trenngel (8, 12 oder 15% Acrylamid) aufgetrennt. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben mit 2% SDS und 5% Mercaptoethanol 5min lang auf 95°C erhitzt oder 10min lang bei 37°C ohne β-Mercaptoethanol inkubiert. Die Proteine wurden dann unter einer Spannung von maximal 100V aufgetrennt. Die

genauen Zusammensetzungen der verwendeten Proben- und Laufpuffer sowie der Gel-Lösungen sind in Kap.II.9 aufgeführt. Gefärbte Markerproteine (Rainbow Marker RPN 756 und 755; Amersham, Karlsruhe) wurden parallel zum Größenvergleich mitgeführt. Im Gel können die Proteine schließlich durch Färbung mit Coomassie-Blau (Kap.III.3.3), durch Silberfärbung (Kap.III.3.4) oder nach radioaktiver Markierung der Proteine durch Fluorographie (Kap.III.3.5) dargestellt werden. Als weitere Methode zur Analyse der aufgetrennten Proteine wurde der Western Blot eingesetzt (Kap.III.3.2).

III.3.2 Western Blot und Immunodetektion von Proteinen

Für den Transfer der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (ImmobilonTM-P, Millipore, Bedford) wurde die „Semi-Dry-Blot“ Technik verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Transferpuffer (Kathodenpuffer, Anodenpuffer I und II) ist in Kap.II.9 angegeben. Der Blot wird von der Kathodenelektrode wie folgt aufgebaut: 3 Blatt Kathodenpuffer-getränktes Whatmanfilterpapier, Kathodenpuffer gewaschenes Gel, Methanol hydratisierte PVDF Membran, 3 Blatt Anodenpuffer II und 3 Blatt Anodenpuffer I getränktes Whatmanfilterpapier. Der Proteintransfer wurde bei RT und konstanter Stromstärke von 0,8mA/cm² für 1h durchgeführt. Die auf diese Weise immobilisierten Proteine wurden indirekt mittels spezifischer Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper durch eine Enzymreaktion nachgewiesen. Zur Absättigung freier Bindungen wurde die Membran mit 10% Milchpulver in PBS^{def} 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Absättigung wurde die Membran zunächst 3 x 10min mit PBS^{def}/0,1% Tween-20 gewaschen. Die Inkubation mit GP-spezifischen Antikörpern erfolgte in einer 1:1000 (Kaninchen-Anti-GP₂) oder 1:3000 (Pferd-Anti-EBOV) Verdünnung im Waschpuffer mit 1% Milchpulver 1h lang bei RT. Die Membran wurde anschließend 3x 10min lang gewaschen und mit den HRP-gekoppelten Ziege-Anti-Kaninchen oder Kaninchen-Anti-Pferd Sekundärantikörpern (1:50000 in Waschpuffer mit 1% Milchpulver) 1h lang bei RT inkubiert. Bei biotinylierten Proteinen wurde eine Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter Peroxidase (Amersham, Karlsruhe) in einer 1:2000 Verdünnung durchgeführt. Die Detektion erfolgte über das System der verstärkten Chemolumineszenz (Super Signal^R West Dura Extended, Amersham, Karlsruhe).

III.3.3 Colloidal Coomassie-Brilliantblau-G250 Färbung (CCB-G250)

Die CCB-G250 Färbung von Proteinen ist 5x sensitiver als die Standardfärbung mit Coomassie R250 (bereits 10ng Protein können gefärbt werden). Ein weiterer Vorteil liegt in der einfachen Entfärbung des Hintergrunds mit Wasser. Die Proteine wurden nach der Gelelektrophorese 1h fixiert (Fixierlösung: 50% Ethanol, 2% H₃PO₄ in H₂O). Nach der Fixierung wurden die Gele 1h in Lösung 2 (Kap.II.9) auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proteine 3-12h auf dem Schüttler in der Färbelösung (Kap.II.9) gefärbt. Die Färbedauer kann dann bis zu 4 Tagen ohne schütteln ausgedehnt werden. Der Hintergrund wurde mit Wasser oder Lösung 2 entfärbt. Die Gele wurden dann entweder in Zellophan bei RT getrocknet oder eingeschweißt bei 4°C gelagert. Proteinbanden aus präparativen Gelen wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in einem Eppendorf-Cup mit etwas Wasser bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

III.3.4 Silberfärbung von Proteinen

Die auf photochemischen Techniken basierende Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode, die eine Detektion von Nanogramm-Mengen Protein oder DNA durch Bildung eines Silbersalzpräzipitats ermöglicht. Die Detektionsgrenze des in dieser Arbeit verwendeten SilverQuestTM Silver Stainig Kit's (Invitrogen, Groningen) liegt bei 0,3ng Protein. Die Färbung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Gele zwischen Zellophan bei RT über Nacht getrocknet.

III.3.5 Fixierung und Fluorographie

Radioaktiv markierte Proteine können nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel durch Fluorographie sichtbar gemacht werden. Dazu wurden Gele für 20min in 10% Essigsäure/30% Ethanol fixiert, kurz gewässert und auf angefeuchtetes Whatman-Filterpapier aufgezogen unter Vakuum getrocknet. In einer lichtdichten Kassette wurde entweder ein Röntgenfilm (BIOMAX MR, Kodak) oder eine Phosphoimagerplatte (Bas-MP, Fuji Film) aufgelegt. Die Auswertung der Phosphoimagerplatte erfolgte am Bioimager (Bas 2000, RayTest) und die Intensität der Banden wurde mit Hilfe der PC BAS Software (RayTest) quantifiziert.

III.3.6 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen durch Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS).

Für die Massenspektrometrie wird das zu untersuchende Protein in 1.000 bis 10.000 fachem molarem Überschuss mit einer geeigneten, bei der verwendeten Laserwellenlänge absorbierenden Matrix gemischt und auf einen metallischen Probenhalter aufgetropft. Durch Verdunstung kommt es zur Kokristallisation von Matrix und Protein. Im Hochvakuum der Ionenquelle des Massenspektrometers wird die kristalline Oberfläche einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung ausgesetzt. Neben den Matrixmolekülen werden dabei auch Proteinmoleküle in die Gasphase freigesetzt, die Matrix spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Ionisation der Probenmoleküle. Durch die Erzeugung eines elektrostatischen Feldes werden die Ionen beschleunigt und ihre Flugzeit bis zum Detektor (daher MALDI-TOF = time of flight) bestimmt. Die jeweilige Masse läßt sich aus der gemessenen Flugzeit ermitteln, wobei die Kalibrierung über Referenzsubstanzen mit bekannten Massen erfolgt.

Die Messungen wurden am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Arbeitsgruppe Prof. R. Thauer, von J. Kahnt durchgeführt. Für die zu messende Proteinlösung ist es essentiell, daß diese eine niedrige Salzkonzentration und kein Detergenz enthält. Als Matrix wurde das kleine organische Molekül Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) verwendet, von dem eine gesättigte Lösung in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) und 67% Acetonitril angesetzt wurde. Matrixlösung und Proteinlösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, und auf eine Goldplatte aufgetropft. Nach Trocknen wurden die entstandenen Kokristalle für die Massenspektrometrie eingesetzt.

III.4 Chromatographische Proteinreinigung

III.4.1 Reinigung von Immunglobulinen mit Protein A Sepharose.

Protein A ist ein bakterielles Polypeptid, das in der Lage ist, mindestens an zwei Stellen in der konstanten Region der schweren Kette (Fc-Teil) von Immunglobulinen (Ig) zu binden. Somit können sich hochaffine, multimere Komplexe ausbilden, die zur Isolierung von Ig aus einem Immenserum eingesetzt werden können. Zur Reinigung mit Protein A eignen sich besonders Seren von Menschen, Kaninchen und Schweinen. In der vorliegenden Arbeit wurden Immunglobuline aus einem Kaninchen-Anti-EBOV

GP₂ Immuneserum gereinigt, um diese anschließend für die Herstellung einer GP₂-spezifischen Affinitätsäule einzusetzen (Kap.III.4.2).

Das Immuneserum wurde vor dem Lauf 30min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert um feste Rückstände zu entfernen. Das Serum wurde vor der Chromatographie auf einer ÄKTA FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia, Karlsruhe) mit 10mM Tris/HCl pH 7,5 1:1 verdünnt. Das so vorbereitete Immuneserum wurde mit einer Flußrate von 1ml/min dreimal auf eine vorgewaschene 5ml HiTrap rProtein A Säule von Pharmacia bei RT geladen. Die Säule wurde dann mit 5 Säulenvolumen Waschpuffer (10mM Tris/HCl pH 7,5) gewaschen und die Immunglobuline mit 100mM Na-Citrat-Puffer, pH 3,0 in 1ml Fraktionen eluiert. Die Fraktionen wurden mit 0,5M Na₂HPO₄ pH 9,0 auf pH 7,5 eingestellt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit dem Coomassie Plus Reagenz (Pierce, Bonn) bestimmt. Die zu erwartende Immunglobulinmenge von 5mg/ml Serum wurde mit diesem Verfahren erreicht.

III.4.2 Herstellung einer spezifischen Affinitäts-Säule

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine GP₂ spezifische Affinitäts-Säule zur Reinigung der löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexe hergestellt (Kap.III.4.3). Hierzu wurden die gereinigten Immunglobuline (Kap.III.4.1) aus einem Kaninchen-Immuneserum kovalent an Protein A Sepharose gekoppelt. Hierfür wurde das Quervernetzungs-Reagenz Dimethylpimelimidat (DMP) eingesetzt. DMP ist besonders gut geeignet, da es die Gesamtladung der Antikörper nicht beeinflusst und somit die Reaktivität nicht vermindert. Protein A Sepharose (CL-B4, Sigma, Taufkirchen) konnte über Nacht in PBS^{def} bei 4°C quellen und wurde anschließend 2 x mit PBS^{def} gewaschen. Zur Bindung der Immunglobuline wurde die Sepharose mit 15mg Ig/ml 2h lang bei RT rotierend inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 100mM Natrium-Borat-Puffer pH 9,0 entfernt. Eine 20mM DMP Lösung in 100mM Natrium-Borat-Puffer, pH 9,0 wurde im vierfachen Überschuß zum Sepharosevolumen zugegeben und 90min lang bei RT rotierend inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Sepharose mit 20mM Tris/HCl, pH 8,0 einmal gewaschen und 90min lang bei RT rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit PBS^{def} gewaschen und in eine leere Säule (Pharmacia, Karlsruhe) gepackt. Die Säule wurde dann bei 4°C in 0,01% Na-Azide in PBS^{def} aufbewahrt.

III.4.3 Affinitätschromatographische Reinigung von EBOV GP_{1/2Δ}

Für die affinitätschromatographische Reinigung von EBOV GP_{1/2Δ} aus Überständen von Ebolavirus-infizierten Vero E6 Zellen wurde die anti-GP₂-spezifische Säule eingesetzt. Das Prinzip basiert auf der spezifische Bindung von löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexen über die anti-GP₂-spezifischen Antikörper an die Säule. Durch einen pH-Shift wurden die lösliche Komplexe von der Säule eluiert. Die Kulturüberstände von Vero E6 Zellen wurden 8 Tage nach Infektion durch Ultrazentrifugation von Virus befreit, zur gewaschenen anti-GP₂-Sepharose (Waschpuffer: 10mM Tris/HCl pH 7,5) gegeben und rotierend bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Sepharose wurde nach der Bindung wieder in eine Säule gepackt und mit dem 5-fachen Säulenvolumen Waschpuffer bei RT gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 100mM Natrium-Citrat-Puffer, pH 3,0 in 2ml Fraktionen. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend mit 400µl 1M Tris/HCl, pH 9,0 auf pH 7,5 eingestellt und im Western Blot analysiert. Zur weiteren Konzentrierung und Aufreinigung der Glykoproteine wurde Wheat Germ Lectin Agarose (Amersham Pharmacia, Karlsruhe) eingesetzt.

III.4.4 Reinigung von EBOV GP_{1/2Δ} mittels Wheat Germ Lectin Agarose

Wheat Germ Lectin Agarose bindet N-glykosidisch gebundene Glykane und ist daher zur Reinigung von Glykoproteinen geeignet. Die Reinigung kann in Anwesenheit von Detergenzien wie NP-40 oder Desoxycholat durchgeführt werden. Die Agarose wurde vor der Inkubation mit der Proteinlösung zunächst mit dem 5-fachen Säulenvolumen Waschpuffer (50mM Tris/HCl, pH 8,0, 10mM N-Acetylglucosamin (NAG)) bei RT gewaschen. Es wurden 8 Agarosevolumen Proteinlösung zugegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Nach der Bindung der Glykoproteine wurde die Agarose wieder in die Säule gepackt und unspezifisch gebundene Proteine mit dem 5-fachen Säulenvolumen Waschpuffer entfernt. Die Glykoproteine wurden dann mit 300mM NAG in 50mM Tris/HCl, pH 8,0 in 2,5ml Fraktionen eluiert. Die Fraktionen wurden im Western Blot analysiert. Zur weiteren Konzentrierung und Entsalzung der Proben wurden Centriplus und Centricon Konzentratoren (Millipore, Bedford) eingesetzt.

IV. ERGEBNISSE

IV.1 Freisetzung von EBOV GP in den Überstand von Zellkulturen

EBOV GP wird von infizierten und transfizierten Zellen in mehreren Formen in den Kulturüberstand ausgeschieden. Hierbei handelt es sich einmal um GP, das in Viruspartikel oder in Membranvesikel inseriert ist. Zum anderen konnte aber auch GP₁ in löslicher Form nachgewiesen werden (Volchkov et al., 1998b). Da das in diesen früheren Versuchen verwendete Antiserum GP₁-spezifisch war, blieb unklar, ob GP₁ in der Tat in freier Form oder als Komplex mit GP₂ vorlag. Nachdem uns nun ein GP₂-spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, war die Lösung dieses Problems in den Bereich des Möglichen gerückt. Zur Untersuchung der in Kulturüberstände freigesetzten GP Formen wurde GP zunächst in RK-13 Zellen mittels rekombinanter Vacciniaviren exprimiert (Kap.II.2.4).

RK-13 Zellen wurden 6-8h nach Infektion mit rekombinantem Vacciniavirus (vSCGP8) 30min lang metabolisch mit [³⁵S]-Cystein markiert und anschließend einem Chase von 8h unterzogen. Anschließend wurden Zellen und Medium getrennt gesammelt. Das Medium wurde zunächst niedertourig zentrifugiert, um Zellen abzutrennen. Zur Trennung von Membranvesikeln und löslichen Molekülen wurde eine Ultrazentrifugation bei 25.000 rpm und 4°C angeschlossen. GP wurde aus Zellysat, Medium, Überstand und Pellet mit GP-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Wie in Abb.IV.1.A dargestellt, sind nach SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen beide GP-Untereinheiten im Zellysat nach Immunpräzipitation mit EBOV-spezifischen Immunglobulinen zu detektieren (Volchkov et al., 1998a). Im Medium wurde neben GP₁ und GP₂ eine weitere GP₂-spezifische Bande GP_{2Δ} mit einer höheren elektrophoretischen Mobilität nachgewiesen. Durch die Ultrazentrifugation des Mediums konnten GP₂ und GP_{2Δ} getrennt werden. Im Pellet, das aus Membranvesikeln besteht, die von der Zelloberfläche abgeschnürt werden, war neben GP₁ nur GP₂ nachweisbar, wie bereits von Volchkov et al. 1998a gezeigt wurde. Im Überstand wurden GP_{2Δ} und GP₁ nachgewiesen, die zusammen eine weitere bislang nicht beschriebene lösliche Form des EBOV GP (GP_{1/2Δ}) darstellen. Diese Beobachtungen sprechen für eine proteolytische Spaltung innerhalb der GP₂-Untereinheit, die die Freisetzung der löslichen GP Ektodomäne zur Folge hatte.

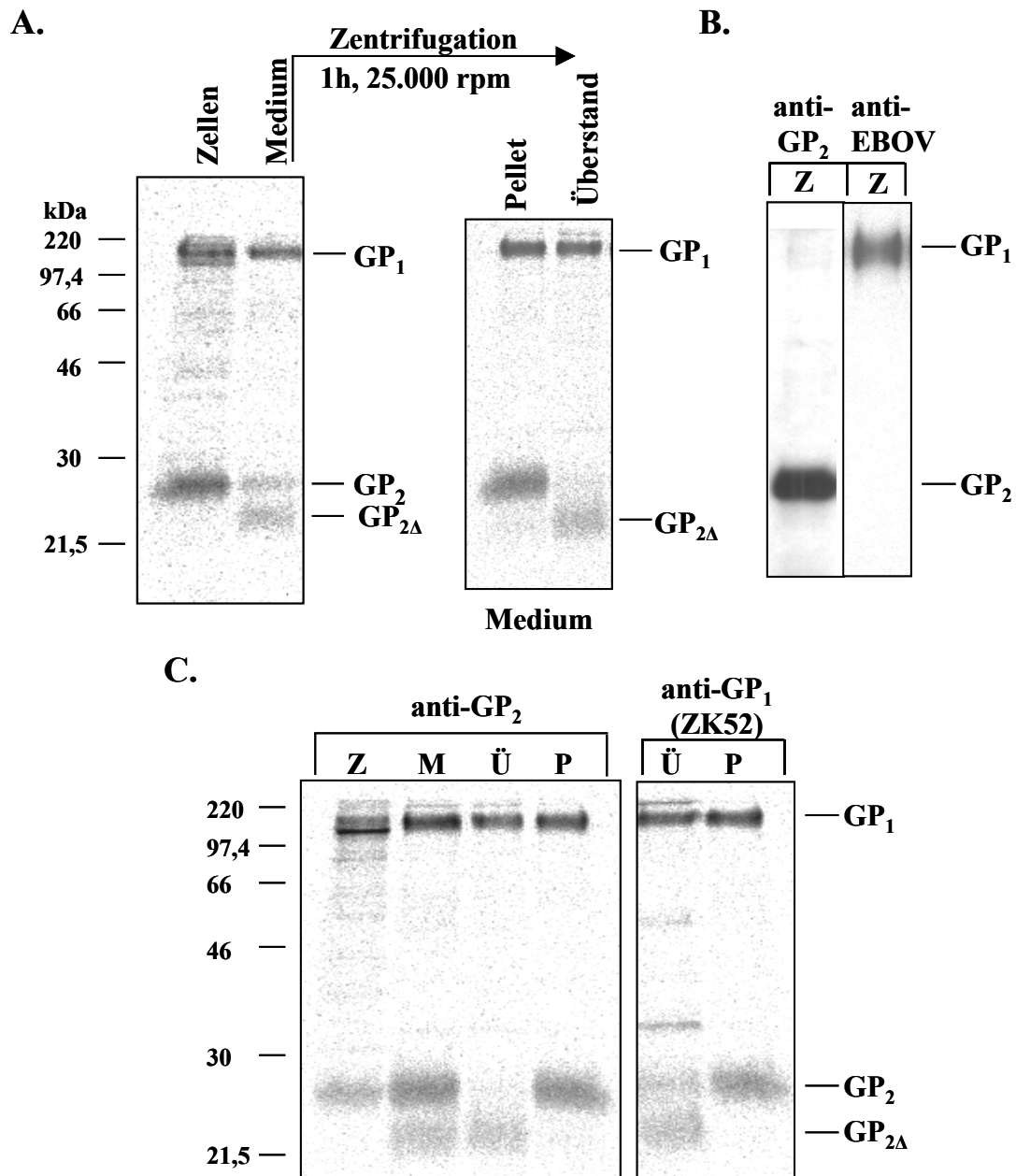


Abb.IV.1A-C Detektion von GP_{1/2Δ} in Zellkulturüberständen. RK-13 Zellen wurden mit rekombinantem Vacciniavirus zur Expression des EBOV GP infiziert. Die Zellen wurden 6h p.i. mit [³⁵S]-Cystein 30min metabolisch markiert. Das Kulturmedium wurde nach 8h Chase durch eine niedertourige Zentrifugation von Zellen befreit. Anschließend wurde das Medium 1h bei 25.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden getrennt gesammelt. Die Zellen wurden im Co-IP-Puffer lysiert. Das EBOV GP wurde aus Zellysate (Z), Medium (M), Überstand (Ü) und Pellet (P) mit EBOV-spezifischen Antikörpern (A.: Pferd-Anti-EBOV; C.: Kaninchen-Anti-GP₂ links, KZ52 Monoklonal-Human-Anti-GP₁ rechts) immunpräzipitiert und in einem 15% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Im Bild **B.** ist ein Immunoblot mit Kaninchen-anti-GP₂ und Pferd-anti-EBOV Serum gefärbt für das Zellysate dargestellt.

Die Abb.IV.1.B, C zeigen, daß der anti-GP₂ spezifische Antikörper im Immunoblot nur GP₂ erkennt und die anti-EBOV Immunoglobuline nur die GP₁-Untereinheit. Aus dem Überstand konnten allerdings beide Antikörper den löslichen GP_{1/2Δ}-Komplex spezifisch präzipitieren. Lösliche GP_{1/2Δ}-Komplexe konnten auch mit dem neutralisierenden monoklonalen Antikörper KZ52 präzipitiert werden, der spezifisch GP₁ erkennt. Die Interaktion mit Virus-neutralisierenden Antikörpern, die dann nicht mehr zur Virusneutralisation zur Verfügung stehen würden, könnte eine mögliche Köder-Funktion des löslichen GP erklären.

Für die Charakterisierung der freigesetzten GP-Formen wurde eine Sedimentation im linearen Saccharosegradienten durchgeführt. Für ein Typ I Transmembranprotein ist ein Einwandern entsprechend des höheren Sedimentationskoeffizienten in den Gradienten zu erwarten, wobei lösliche Moleküle aufgrund eines niedrigen Sedimentationskoeffizienten nur sehr langsam in den Gradienten einwandern und vorwiegend am Auftragungsort verbleiben.

Um die Eigenschaften der EBOV GP-Komplexe, die in Kulturüberstände freigesetzt werden, zu bestimmen, wurden GP exprimierende RK-13 und HeLa Zellen metabolisch markiert und das Medium nach 12h Chase gesammelt. Anschließend wurde das Medium auf einen linearen 10-40%igen Saccharosegradienten geladen und eine Gleichgewichtszentrifugation durchgeführt. Das GP wurde dann aus den gesammelten Gradienten-Fractionen mit EBOV-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Die membranverankerten GP_{1/2}-Komplexe aus RK-13 wurden vorwiegend in Fraktionen 4 - 6 detektiert, bei HeLa Zellen in Fraktion 2 - 4 (Abb.IV.2.A; B). Die unterschiedliche Glykosylierung von GP oder die unterschiedliche Membranzusammensetzung in den beiden Zelllinien führte hierbei vermutlich zu dem unterschiedlichen Einwandern in den Gradienten. In den Fraktionen 7 bis 9 lassen sich die löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexe detektieren.

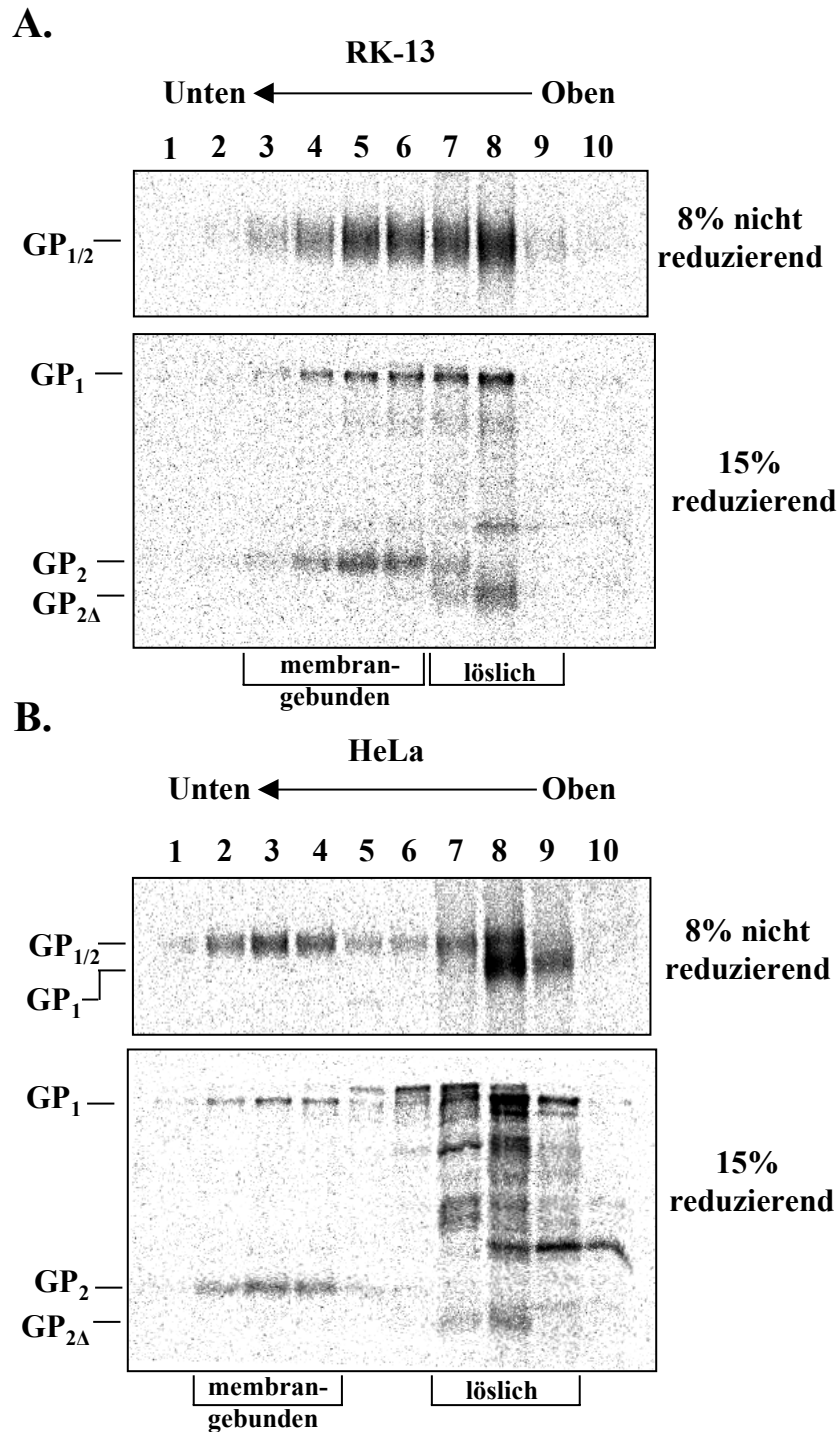


Abb.IV.2A-B Untersuchung von GP_{1/2} und GP_{1/2Δ} im linearen Saccharosegradienten (Gleichgewichtszentrifugation). RK-13 (A.) und HeLa (B.) Zellen wurden mit rekombinantem Vacciniavirus zur Expression von GP infiziert und metabolisch markiert. Kulturmedien wurden nach 12h Chase abgenommen, auf einen linearen 10-40%igen (w/w) Saccharosegradienten geladen und einer Gleichgewichtszentrifugation bei 36.000 rpm und 4°C für 19h unterzogen. Fraktionen 1 bis 10 wurden dann von unten nach oben gesammelt und mit EBOV-spezifischen Antikörpern (Pferd-Anti-EBOV) immunpräzipitiert. Es folgte dann die Auftrennung in einem nicht reduzierenden 8%igen und einem reduzierendem 15%igen SDS-PAGE.

In HeLa Zellen findet sich, wie unter nicht reduzierenden Bedingungen nachweisbar, in der löslichen Fraktion zusätzlich lösliches GP₁, was in RK-13 Überständen nicht detektiert werden konnte (Abb.IV.2.B). Das Vorkommen von löslichem GP₁ in Kulturüberständen von HeLa Zellen wurde bereits von Volchkov et al. (1998b) beschrieben. Diese Beobachtung könnte zusammen mit den hier erhaltenen Daten über das Vorkommen löslicher GP_{1/2Δ}-Komplexe dahin gedeutet werden, daß lösliches GP₁ im Überstand von HeLa Zellen aus löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexen entsteht. Hierbei wäre es vorstellbar, daß durch die fehlende Disulfidbrücke in GP_{1/2}-Komplexen und eine erniedrigte Stabilität der löslichen Komplexe das Freiwerden von GP₁-Untereinheiten begünstigt wird.

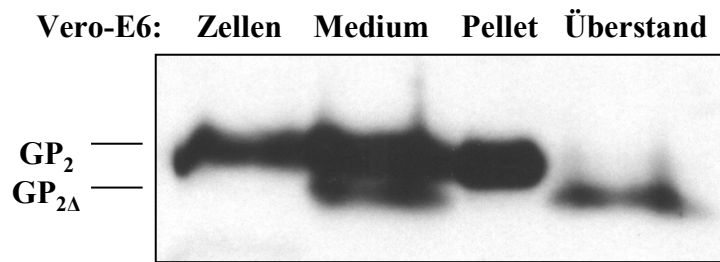
IV.2 GP_{1/2Δ} wird von Ebolavirus-infizierten Zellen in Kulturmedien freigesetzt

Ähnlich wie im rekombinanten System wurde die Freisetzung von löslichem GP_{1/2Δ} auch bei Ebolavirus-infizierten Zellen festgestellt. Lösliches GP₁ im Kulturmedium von EBOV infizierten Zellen wurde bereits von Volchkov et al., 1998b mit Hilfe von anti-EBOV Antikörpern, die spezifisch nur das GP₁ erkennen, gezeigt. Die Anwesenheit von GP₂ im Medium konnte somit nicht nachgewiesen werden. Der nun zur Verfügung stehende anti-GP₂ Antikörper sollte hier eingesetzt werden, um zu klären, welche GP Formen während der EBOV Infektion in das Kulturmedium freigesetzt werden.

Zunächst wurde die Freisetzung aus Ebolavirus-infizierten Vero E6 Zellen untersucht. Das Kulturmedium wurde 5 Tage nach Infektion abgenommen und Virus nach Abtrennung von abgestorbenen Zellen durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Zellen, Medium, Viruspellet und Überstand nach Ultrazentrifugation wurden im 12%igen SDS-PAG unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und im Western Blot mit einem Kaninchen-Anti-GP₂ Antiserum auf die Anwesenheit von GP₂ und GP_{2Δ} untersucht. Die Abb.IV.3A zeigt deutlich lösliches GP_{2Δ} im Medium und nach Ultrazentrifugation im Überstand. Damit wurde gezeigt, daß auch während der Ebolavirus-Infektion lösliche GP_{1/2Δ}-Komplexe in das Kulturmedium freigesetzt werden.

Schließlich sollte im Folgenden geklärt werden, ob die löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexe Zell-spezifisch freigesetzt werden. Hierzu wurde die GP-Freisetzung während der EBOV Infektion weiterer Zell-Spezies, wie HeLa (human) und RK-13 (Kaninchen), untersucht. Wie in Abb.IV.3B dargestellt, konnte lösliches GP_{2Δ} im Medium von allen drei getesteten Zelllinien detektiert werden.

A.



B.



Abb.IV.3A-B GP_{1/2Δ} Freisetzung aus Ebolavirus-infizierten Zellen. Vero E6, HeLa und RK-13 Zellen wurden mit Ebolavirus Subtyp Zaire infiziert und 5Tage später die Kulturmedien abgenommen. Viren wurden aus den Medien pelletiert (1h, 25.000 rpm und 4°C) und vom Überstand getrennt. **A.** Zellysat, Medium, Pellet und Überstand von Vero-E6 sowie **B.** Medien von Vero-E6, HeLa und RK-13 Zellen wurden im 12%igen SDS-PAGE aufgetrennt und GP₂ mit einem Kaninchen-Anti-GP₂ spezifischen Serum im Western Blot detektiert.

IV.3 Determiation des Glykosylierungsmusters von EBOV GP₂

IV.3.1 Ebolavirus GP₂ besitzt an Position Asn₅₆₃ mannosereiche und an Position Asn₆₁₈ komplexe Glykanketten

Das Ebolavirus GP₂ besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn₅₆₃ und Asn₆₁₈ (Abb.IV.4A). Ein direkter Nachweis, daß diese Stellen tatsächlich erkannt und glykosyliert werden, fehlte jedoch. Glykosidase-Untersuchungen des Wildtyp GP₂ zeigten im Gegensatz zu GP₁, daß zwei unterschiedliche N-Glykantypen vorhanden sein müssen, da Sensitivität gegenüber Endo H und PNGase F festgestellt wurde (Abb.IV.4B). Da es im GP₂ nur zwei N-Glykosylierungsstellen gibt, ließ sich daraus schließen, daß eine der Stellen mannosereiche Zuckerketten trägt, wobei die andere komplex verzuckert sein muß. Zur genauen Bestimmung der N-Glykosylierung an Position Asn₅₆₃ und Asn₆₁₈ wurden rekombinante Vacciniavirusmutanten GP 563N/T und GP 618N/T mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese (Kap.III.1.2) hergestellt. Die N-Glykosylierungsmotive NET und NIT (Asn-X-Ser/Thr) wurden durch den Austausch

von Asn nach Thr jeweils entfernt (TET, TIT). Die Mutationen wurden durch Sequenzierung der Virus-DNA bestätigt.

Die Glykosylierungsmutanten konnten so wie Wildtyp GP in RK-13 Zellen exprimiert und mit [³⁵S]-Cystein markiert werden. Die Glykoproteine wurden dann aus den Zellysaten mit EBOV-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Zur Unterscheidung der angehängten Glykantypen wurde eine Behandlung mit Endo H bzw. PNGase F durchgeführt.

Wie in Abb.IV.4B dargestellt, zeigte die Mutante GP 618N/T Sensitivität gegenüber Endo H, wobei die PNGase F Behandlung keine weitere Mobilitätsveränderung für GP₂ bewirkte. Somit war direkt gezeigt, daß an Position Asn₅₆₃ mannosereiche N-Glykane gebunden sind. Die Mutante GP 563N/T war dagegen Endo H resistent, aber gegenüber PNGase F sensitiv. Dies demonstrierte, daß an Position Asn₆₁₈ komplexe N-Glykane gebunden sind. Die Mutanten bestätigten somit die zunächst für Wildtyp GP₂ beobachtete Sensitivität gegenüber Endo H und PNGase F, die auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen N-Glykantypen in der GP₂-Untereinheit hindeutete.

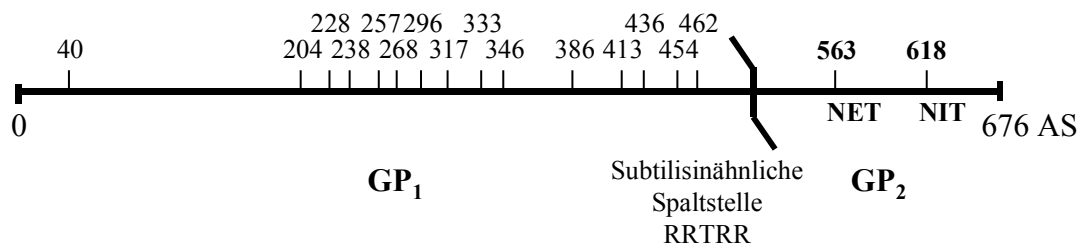


Abb.IV.4A EBOV GP N-Glykosylierungsstellen. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen (Asn-X-Ser/Thr) sind als senkrechte Striche im GP₁ und GP₂ dargestellt und durch die Aminosäureposition des Asparagins markiert. Für das GP₂ sind die beiden N-Glykosylierungsmotive NET und NIT an Position Asn₅₆₃ und Asn₆₁₈ markiert. Die subtilisinähnliche Spaltstelle mit dem Spaltmotiv RRTRR ist ebenfalls angegeben.

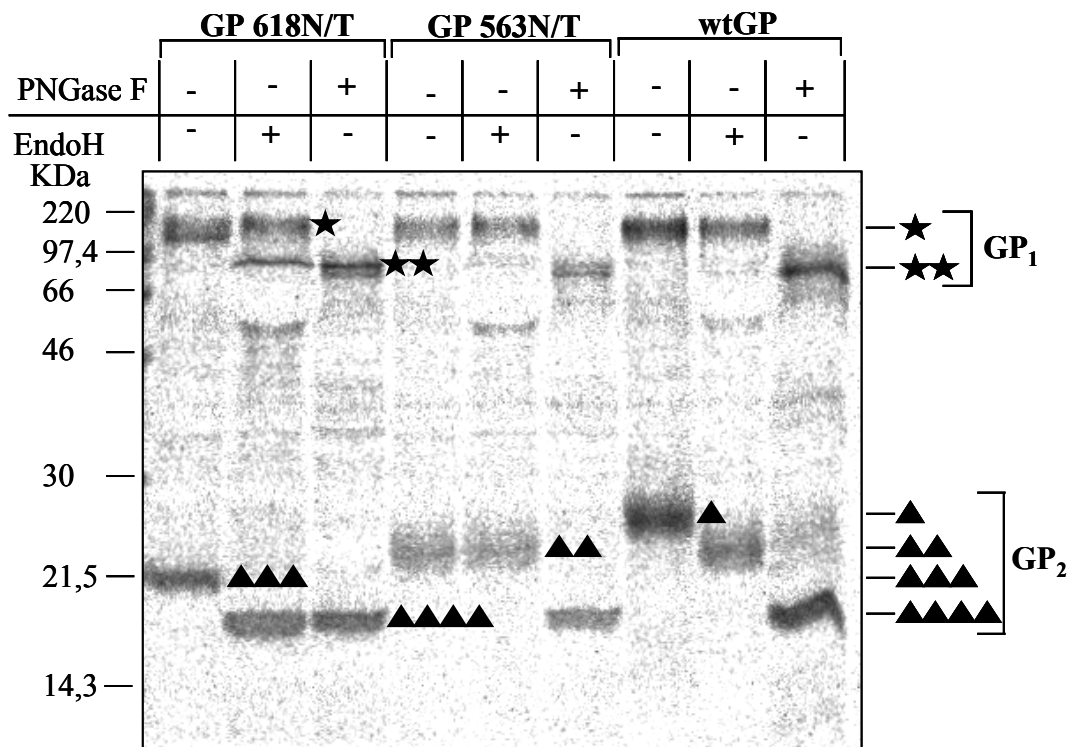


Abb.IV.4B N-Glykosylierung von EBOV GP₂ in Zellen. Die Glykosylierungsmutanten GP 618N/T und GP 563N/T mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch von Asn nach Thr sowie wtGP wurden mit Hilfe rekombinanter Vacciniaviren in RK-13 Zellen exprimiert und metabolisch markiert. Es folgte eine Immunpräzipitation mit GP-spezifischen Antikörpern (Pferd-Anti-EBOV) aus den Zellysaten. Wie dargestellt wurden die Proteine mit Endo H oder PNGase F behandelt und in einer 15%igen SDS-PAGE reduzierend aufgetrennt. Die Proteinbanden sind mit Symbolen gekennzeichnet: ein Stern steht für GP₁ unbehandelt; 2 Sterne für deglykosyliertes GP₁ (+PNGase F); ein Dreieck für Wildtyp (wt) GP₂ unbehandelt; 2 Dreiecke für GP₂ ohne mannosereiche N-Glykane (wtGP₂ +Endo H; GP₂ 563N/T +/- Endo H); 3 Dreiecke für GP₂ ohne komplexe N-Glykane (GP₂ 618N/T unbehandelt); 4 Dreiecke für deglykosyliertes GP₂ (wtGP₂ +PNGase F; GP₂ 618N/T +Endo H oder PNGase F; GP₂ 563N/T +PNGase F).

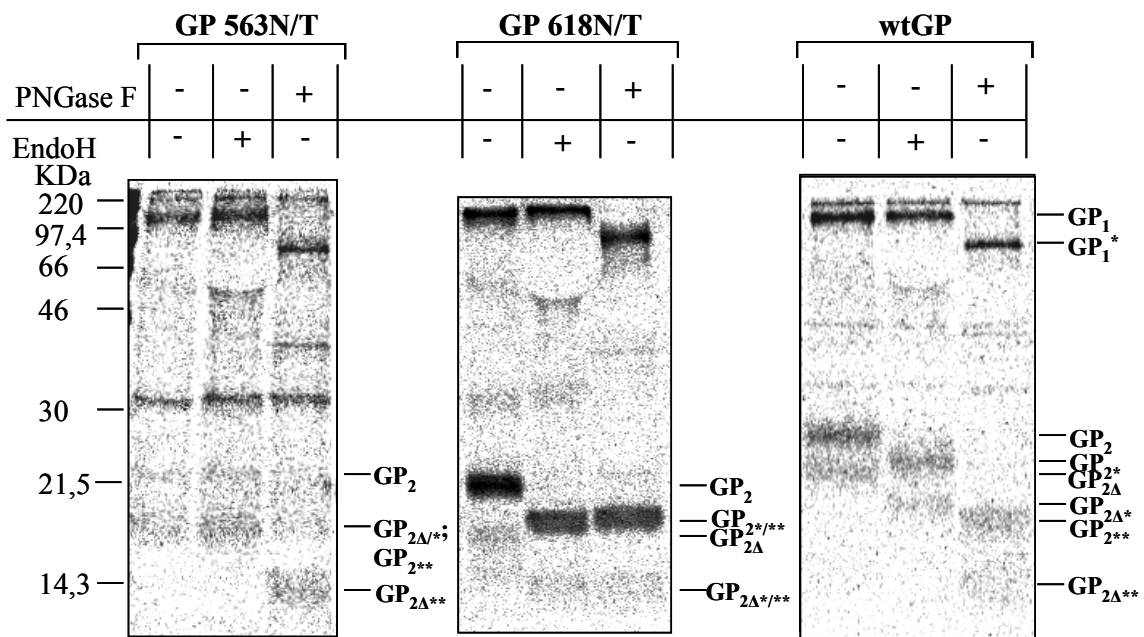
IV.3.2 GP₂ und GP_{2Δ} besitzen identische Glykosylierungsmuster

Im folgenden wurden die Glykosylierungsmuster von membrangebundenem GP₂ und freigesetztem GP_{2Δ} miteinander verglichen, um ein unterschiedliches Laufverhalten in der SDS-PAGE aufgrund unterschiedlicher Glykosylierung auszuschließen. Hierzu wurde eine Glykosidase-Behandlung mit Endo H und PNGase F an markierten und immunpräzipitierten GP_{1/2} und GP_{1/2Δ} aus dem Medium so wie für das zelluläre GP beschrieben durchgeführt (IV.2.1).

In Abb.IV.5A sind die Laufhöhen von wtGP und die der GP Glykosylierungsmutanten aus dem Medium mit und ohne Glykosidase-Behandlung dargestellt. Sowohl wtGP₂ als auch wtGP_{2Δ} sind gleichermaßen Endo H und PNGase F sensitiv, was auf identische Glykosylierungsmuster der beiden GP₂ Formen zurückzuführen war. Die Glykosylierungsmutanten wurden wie der Wildtyp in das Medium freigesetzt. In Analogie zu GP₂ zeigte freigesetztes GP_{2Δ} Sensitivität gegenüber Endo H und PNGase F bei der GP 618N/T Mutante sowie ausschließlich PNGase F Sensitivität bei der GP 563N/T Mutante. Hierdurch wurde direkt gezeigt, daß membranverankertes GP₂ das gleiche Glykosylierungsmuster wie freigesetztes GP_{2Δ} besitzt. Diese Ergebnisse unterstützten also die Hypothese einer proteolytischen Spaltung in der GP₂-Untereinheit, durch die lösliche GP_{1/2Δ}-Komplexe generiert werden. Die Region der Spaltung konnte auf Grund dieser Ergebnisse auf den Bereich zwischen der C-terminalen N-Glykosylierungsstelle Thr₆₂₀ und dem N-terminalen Ende des Transmembranankers Trp₆₅₀ eingegrenzt werden.

Der Glykosylierungsstatus von viralem GP₂ und löslichem GP_{1/2Δ} wurde ebenfalls untersucht, um unterschiedliche Glykosylierungsformen auszuschließen. Viruspellet, Medium und Überstand nach Ultrazentrifugation von EBOV-infizierten Vero E6 Zellen wurden mit Endo H oder PNGase F behandelt, in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Kaninchen-Anti-GP₂-Serum detektiert. Das in Abb.IV.5B dargestellte Ergebnis deckt sich mit den Daten aus dem rekombinanten Vacciniavirus-System. Virales GP₂ als auch lösliches GP_{2Δ} waren gleichermaßen Endo H und PNGase F sensitiv.

A.



B.

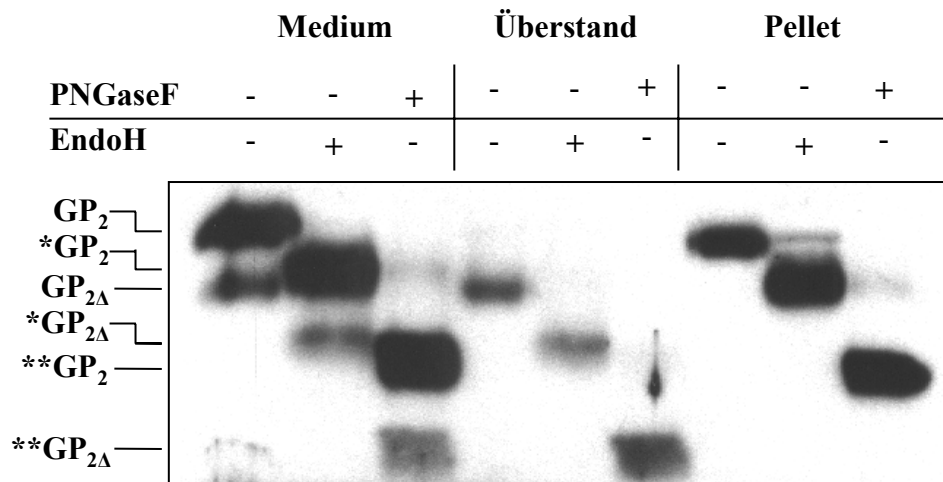


Abb.IV.5A-B N-Glykosylierung von GP_{2Δ} im Medium. Wildtyp GP und die GP Glykosylierungsmutanten (GP 563N/T und GP 618N/T) wurden wie in Abb.IV.4B beschrieben exprimiert. Nach metabolischer Markierung wurden die freigesetzten Proteine aus den Kulturmedien immunpräzipitiert. Kulturmedium von EBOV-infizierten Vero E6 Zellen wurde 5 Tage nach Infektion gesammelt und Virus pelletiert (Pellet). Die markierten Präzipitate aus der Vacciniavirus-Expression (A.) sowie Medium, Pellet und Überstand aus der EBOV Infektion (B.) wurden dann entweder mit Endo H oder PNGase F behandelt (+) (unbehandelt -) und im 15%igen SDS-PAG reduzierend aufgetrennt. GP₂ und GP_{2Δ}, die nach Endo H- oder PNGase F Behandlung erhalten wurden, sind mit einem bzw. zwei Sternen markiert. Für die GP₂ Mutante 563N/T läuft das GP₂ nach PNGase F Behandlung auf der gleichen Höhe wie unbehandeltes GP_{2Δ} und GP_{2Δ} nach Endo H Behandlung.

IV.4 Kinetik der GP_{1/2Δ} Freisetzung

IV.4.1 Pulse-Chase Experiment

Um bestimmen zu können, ob GP_{1/2} in GP_{1/2Δ} bereits intrazellulär oder erst an der Zelloberfläche gespalten wird wurde ein Pulse-Chase Experiment durchgeführt. GP exprimierende RK-13 Zellen wurden hierfür metabolisch mit [³⁵S]-Cystein markiert und anschließend variablen Chase-Zeiten unterzogen. Die Kulturüberstände und Zellen wurden dann getrennt gesammelt, mit GP-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt.

In Abb.IV.6A ist die GP Prozessierung von preGP_{er} (0min Chase) zu GP₁ und GP₂ (30-360min Chase) in Zellen dargestellt. Nach 30min Chase werden die ersten preGP_{er} Vorläufer bereits im Golgi zu GP_{1/2} gespalten. Etwa 240min nach Puls sind alle markierten perGP_{er} Vorläufer zu reifen GP_{1/2}-Komplexen prozessiert worden. GP_{2Δ} konnte intrazellulär nicht nachgewiesen werden.

Wie in Abb.IV.6B zu sehen lassen sich GP_{1/2Δ}-Komplexe nach etwa 90min Chase im Medium nachweisen. Etwas verzögert lassen sich auch membranassoziierte GP_{1/2}-Komplexe im Medium nachweisen. Eine kontinuierliche Zunahme der löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexe im Medium wurde bis 360min nach Pulse beobachtet.

Die Tatsache, daß keine GP_{1/2Δ}-Komplexe intrazellulär detektiert wurden, dafür aber nach etwa 90min Chase im Medium ließ die Vermutung zu, daß lösliche GP_{1/2Δ}-Komplexe an der Zelloberfläche abgespalten wurden. Intrazellulär sind nach 90min Chase die meisten ER-Vorläufer (preGP_{er}) zu reifen GP_{1/2}-Komplexen prozessiert und vermutlich auch an die Zelloberfläche transportiert worden, von wo sie durch eine proteolytische Spaltung als lösliche GP_{1/2Δ}-Komplexe freigesetzt werden können.

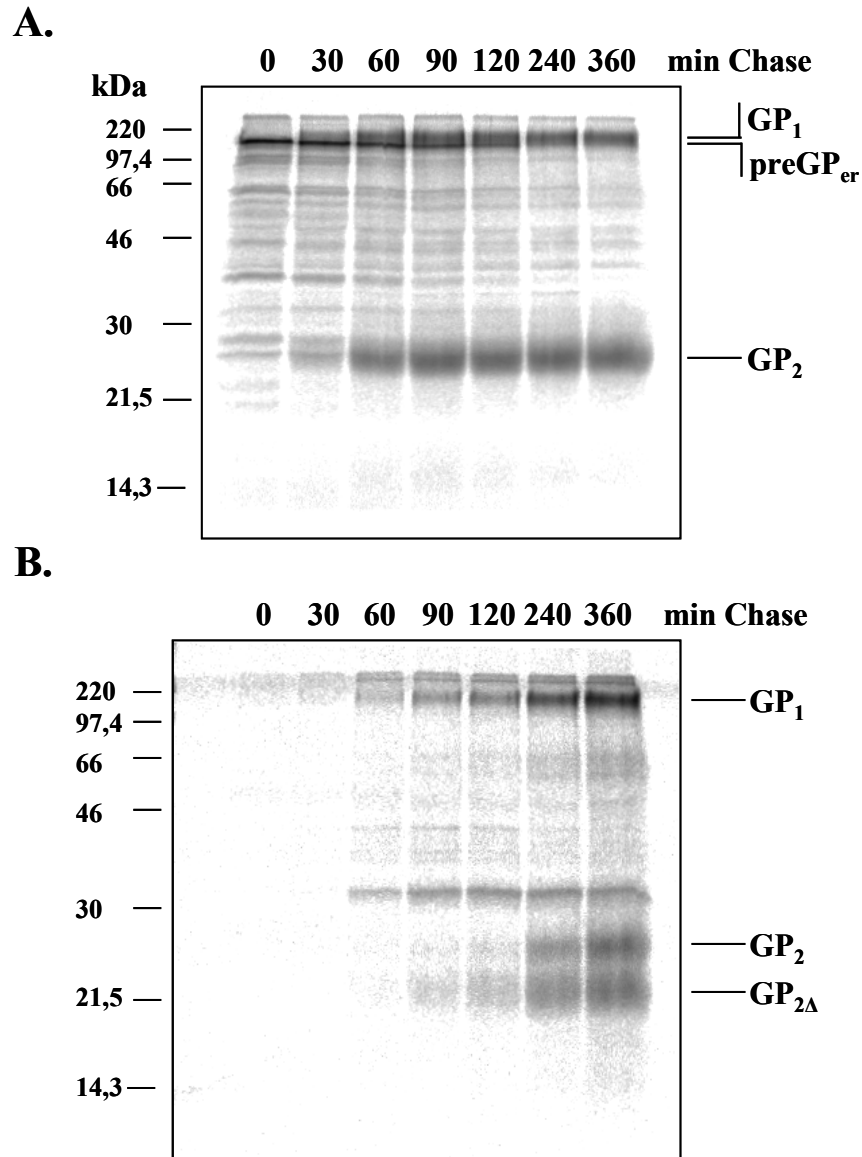


Abb.IV.6A-B Pulse-Chase-Kinetik der GP_{1/2Δ}-Freisetzung. RK-13 Zellen wurden mit EBOV GP rekombinantem Vacciniavirus infiziert und 7h nach Infektion metabolisch mit [³⁵S]-Cystein für 30min markiert. Anschließend wurden die Zellen wie im Bild angegeben den unterschiedlichen Chase-Zeiten (0-360min) mit 1x DMEM unterzogen. Medium (**B.**) und Zellen (**A.**) wurden getrennt gesammelt und mit einem GP-spezifischen Pferd-Anti-EBOV Antikörper immunpräzipitiert. Die Proteine wurden dann in einem 15%igen SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der endoplasmatische Vorläufer ist als preGP_{er} bezeichnet.

IV.4.2 GP_{1/2Δ}-Komplexe werden von der Zelloberfläche freigesetzt

Aufgrund der Beobachtung des Pulse-Chase Experiments, daß kein lösliches GP_{1/2Δ} in den Zellen detektiert werden konnte, wurde eine Spaltung von der Zelloberfläche vermutet. Um direkt zu zeigen, daß die löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexe tatsächlich von der Zelloberfläche abgespalten werden, wurde eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt. Hierbei wurden selektiv bei 4°C nur die Oberflächenproteine mit Biotin markiert. Die von der Zelloberfläche freigesetzten und Biotin markierten Proteine können dann nach entsprechenden Chase-Zeiten in Zellkulturüberständen detektiert werden.

Hierzu wurden GP exprimierende Zellen auf 4°C gekühlt und bei 4°C mit Biotin markiert, sodaß die Endozytose ausgeschlossen werden konnte. Anschließend wurden die biotinylierten Zellen für entsprechende Chase Zeiten bei 37°C inkubiert. Die abgespaltenen GP-Moleküle wurde dann mit GP-spezifischen Antikörpern aus den Medien immunpräzipitiert. In Abb.IV.7A ist das an der Zelloberfläche detektierbare GP und parallel dazu das lösliche von der Zelloberfläche freigesetzte GP dargestellt. Bereits nach 1-2h Chase kann lösliches GP_{1/2Δ} im Kulturüberstand detektiert werden. Nach 4h Chase ist ein Maximum der Freisetzung erreicht, da keine weitere Zunahme zu beobachten ist. Da sich biotinyliertes GP₂ mit Streptavidin nur sehr schlecht darstellen läßt, ist nur die GP₁-Untereinheit der GP_{1/2}-Komplexe dargestellt. Eine Quantifizierung der biotinylierten GP₁-Banden ist in Abb.IV.7B dargestellt. Die Menge der in das Medium freigesetzten GP Moleküle betrug hierbei bis zu 18% der an der Zelloberfläche markierten Moleküle.

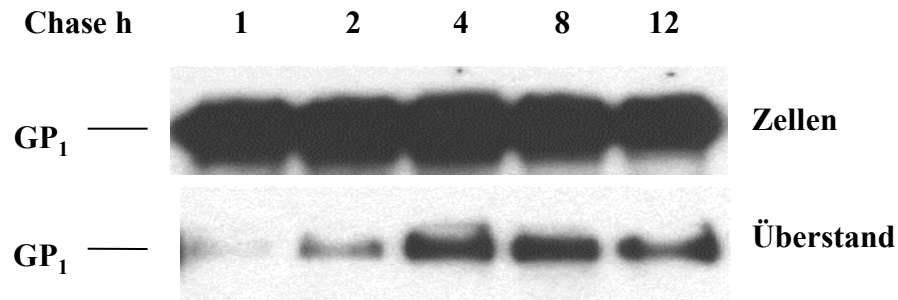
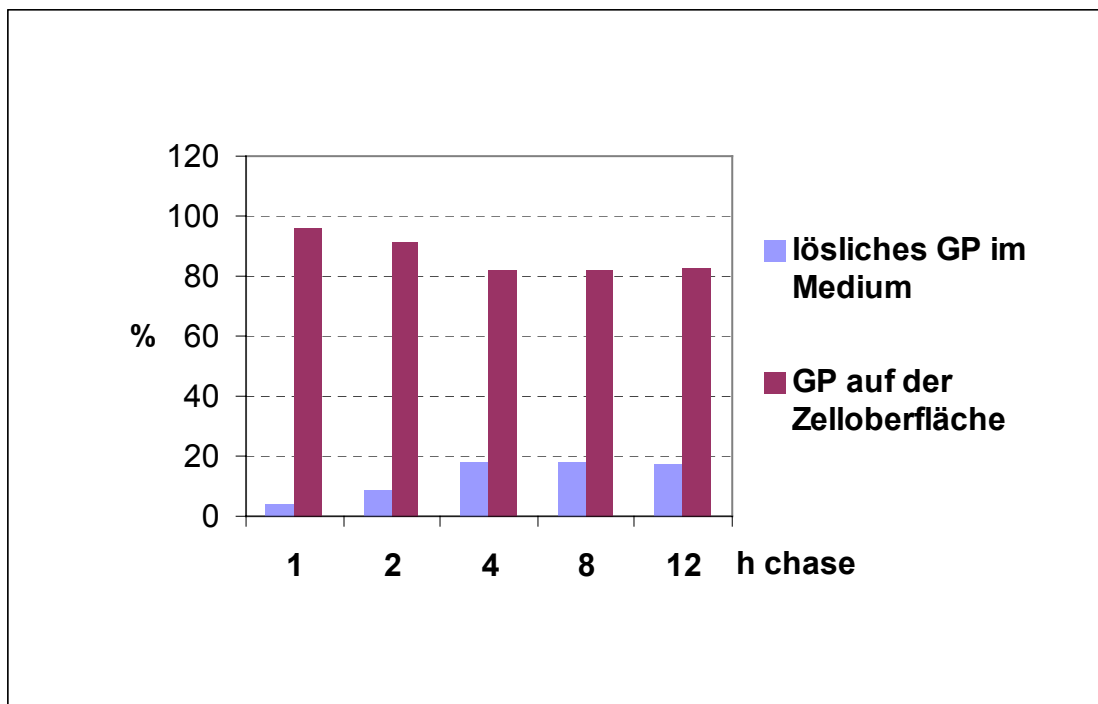
A.**B.**

Abb.IV.7A-B GP_{1/2Δ} Freisetzung von der Zelloberfläche. GP exprimierende RK-13 Zellen wurden 10h nach Infektion mit rekombinantem Vacciniavirus mit Biotin-NHS (2mg/ml) zweimal 20min lang bei 4°C biotinyliert. Ungebundenes Biotin wurde mit 100mM Glycin in PBS abgesättigt und Zellen dann, wie in der Abbildung angegeben, unterschiedlichen Chase-Zeiten mit 1xDMEM ausgesetzt. Das Medium wurde anschließend von Zellen befreit und einer Ultrazentrifugation zur Entfernung von Membranvesikeln unterzogen, sodaß im folgenden nur lösliche GP Moleküle untersucht wurden. Medium und Zellysate wurden mit GP-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert (Pferd-Anti-EBOV) und die präzipitierten Proteine im 12%igen SDS-PAG aufgetrennt. Die biotinylierten Proteine wurden im Westernblot mit Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen (**A.**). Die Intensität der Proteinbanden wurde mit der PCBAS-Bioimager Software von Fuji quantifiziert, wobei die Gesamtmenge an biotinyliertem GP an der Zelloberfläche und im Überstand gleich 100% gesetzt wurde (**B.**).

IV.5 GP_{1/2Δ}-Komplexe besitzen die gleiche Oligomeren-Struktur wie GP_{1/2}

Für das Filovirus GP konnte gezeigt werden, daß es als Trimer in der Membran verankert vorliegt (Feldmann et al., 1991; Sanchez et al, 1998). Hier sollte mit Hilfe linearer Saccharose-Gradienten geklärt werden, ob die löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexe, die von der Zelloberfläche freigesetzt werden, ebenfalls eine trimere Organisation besitzen. In linearen Saccharosegradienten wandern Moleküle entsprechend dem Sedimentationskoeffizienten ein, der abhängig von der Masse und der Größe ist. Demnach wandern trimere Moleküle schneller in den Gradienten ein als Dimere oder Monomere und können so in unterschiedlichen Gradientenfraktionen detektiert werden (Abb.IV.8). Zur Untersuchung der oligomeren Struktur wurde EBOV 6 Tage nach Infektion von Vero E6 Zellen aus dem Kulturmedium über ein 20% Saccharosekissen pelletiert. Anschließend wurde das Viruspellet in 1% NP40 PBS^{def} resuspendiert um die Virusmembran aufzulösen, sodaß GP auf Grund seiner Masse in den Gradienten einwandern kann. Das resuspendierte Viruspellet sowie der Überstand wurden auf lineare Saccharosegradienten von 5%-25% w/w geladen und zum Gleichgewicht zentrifugiert.

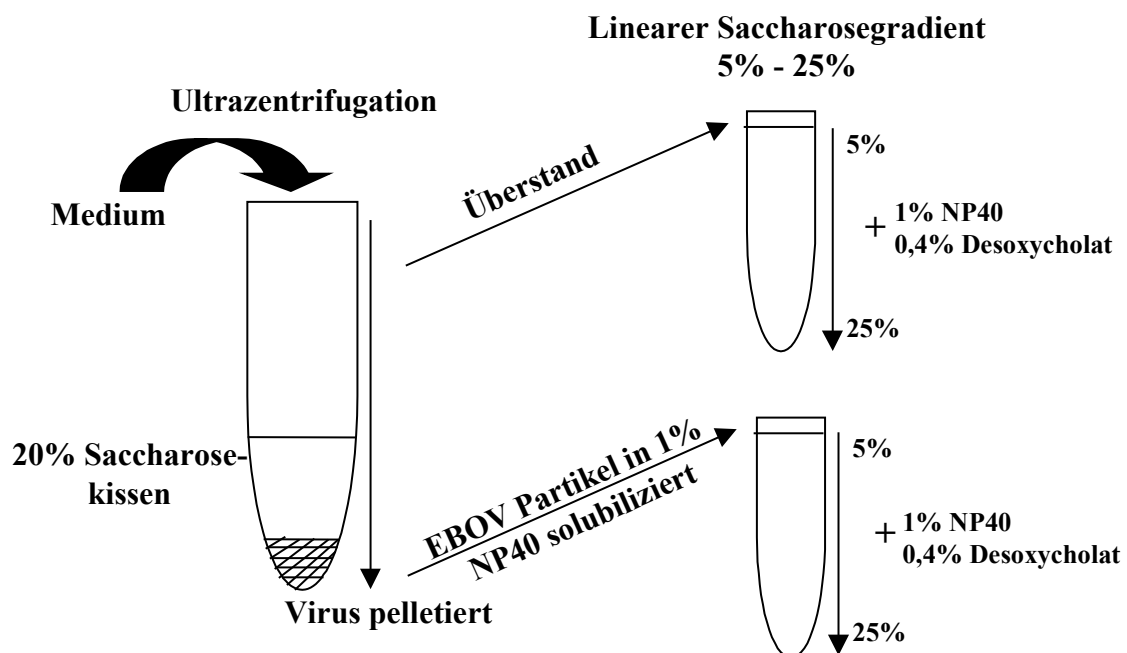


Abb.IV.8 Schematische Darstellung zur Untersuchung der Oligomerisation von Proteinen.

Zur Untersuchung der Oligomerisation von viralem GP wurde zunächst Virus über ein 20% Saccharosekissen (in TNE-Puffer) pelletiert und anschließend in 1% NP40 (in PBS^{def}) resuspendiert und auf einen linearen Saccharosegradienten von 5%-25% w/w in Co-IP-Puffer (1% NP40 und 0,4% Desoxycholat) geladen. Der Überstand mit löslichen Molekülen wurde unbehandelt geladen.

Wie in Abb.IV.9 dargestellt wurden die Gradienten in 15 Fraktionen gesammelt, und GP nach Auftrennung in der SDS-PAGE mit Anti-GP₂-Antikörpern detektiert. Das virale GP₂ ist hierbei wie erwartet in den Gradienten eingewandert und konnte vorwiegend in Fraktionen 6 und 7 detektiert werden. Lösliches GP_{2Δ} aus dem Überstand wurde in zwei Bereichen detektiert. Ebenfalls in Fraktionen 6 und 7, aber auch in Fraktionen 10 bis 12. GP₂ wurde auch im Überstand in Fraktion 5 bis 7 gefunden, da nach der Ultrazentrifugation des Mediums eine kleine Restmenge an Viruspartikeln im Überstand verbleibt. Die GP Formen, die in Fraktion 6 und 7 detektiert wurden, stellen Trimere dar, da nur diese in Viruspartikeln inseriert werden. Da auch lösliche GP_{1/2Δ}-Komplexe aus dem Überstand in diesen Fraktionen detektiert wurden, ist davon auszugehen, daß es sich bei diesen ebenfalls um Trimere handelt. Auf Grund der Detektion von GP_{2Δ} in Fraktionen 10 bis 12 ist jedoch von einer geringeren Stabilität dieser löslichen Trimere auszugehen, die dann als Di- oder Monomere detektiert werden.

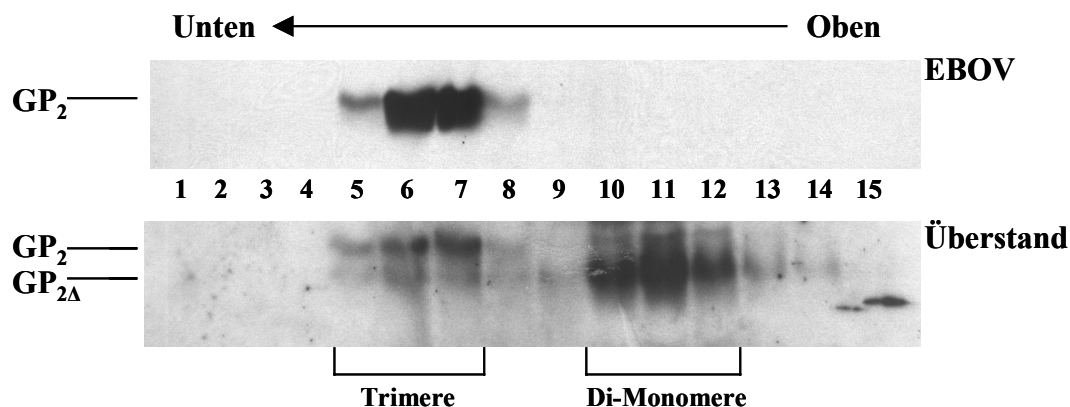


Abb.IV.9 EBOV GP Oligomerisation. Kulturmedium von Vero E6 Zellen wurde 6 Tage nach Infektion über ein 20% Saccharosekissen 1h bei 4°C und 25.000 rpm zentrifugiert. Das Viruspellet (EBOV) wurde dann in 1% NP40 resuspendiert und auf einen linearen Saccharosegradienten von 5%-25% in Co-IP-Puffer geladen. Der Überstand wurde unbehandelt geladen und beide Gradienten für 19h bei 10°C und 40.000 rpm zentrifugiert. Die Gradienten wurde dann von unten nach oben in 15 Fraktionen gesammelt. Diese wurden in einem 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt geblotet und mit einem Anti-GP₂ spezifischen Antikörper gefärbt. Die Massen der Markerproteine sind in kDa angegeben. Die Laufhöhen von GP₂ und GP_{2Δ} sind markiert.

IV.6 Charakterisierung des GP_{1/2} Spaltungsbereichs

IV.6.1 GP₂-Deletionsmutanten grenzen die Spaltungsregion auf Val₆₃₀ bis Asp₆₄₀ ein

Zur Identifizierung des Spaltbereichs wurden GP-Deletionsmutanten eingesetzt. Eine GP Mutante, die keinen Transmembrananker besitzt (GP Δ TM) und in das Kulturmedium sezerniert wird, stand bereits zur Verfügung (Volchkov et al., 1998b). Zur Eingrenzung der Spaltstelle wurden weitere GP Deletionsmutanten hergestellt, die ebenfalls keinen Transmembrananker mehr tragen und zusätzliche Deletionen von 10 bzw. 20 Aminosäuren besitzen, sodaß diese ebenfalls in das Medium sezerniert wurden (Abb.IV.10). Ein Vergleich der Laufhöhen der GP₂-Untereinheiten der Deletionsmutanten mit dem Wildtyp in der SDS-PAGE sollte den Spaltbereich auf einen Bereich von 10 Aminosäuren eingrenzen.

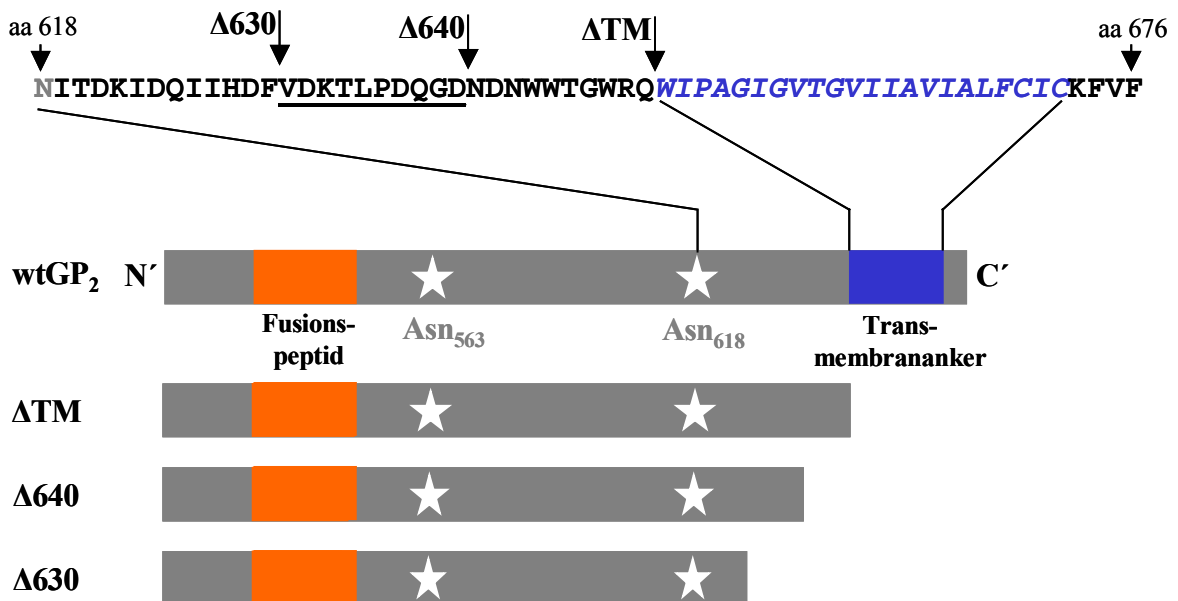


Abb.IV.10 Schema der GP₂-Deletionsmutanten. Dargestellt ist die Struktur von GP₂ Wildtyp und Deletionsmutanten Δ TM, Δ 640 und Δ 630. Die Positionen der beiden Glykosylierungsstellen sind durch Sterne gekennzeichnet. Die Aminosäuresequenz zwischen Asn₆₁₈ und Phe₆₇₆ ist im Einbuchstaben-Code angegeben. Der durch die Deletionsmutanten Δ 630 und Δ 640 eingegrenzte Spaltbereich ist unterstrichen.

Hierbei wurden jeweils Stopcodons an Positionen 641 und 631 in die GP₂-Sequenz im GP-Expressionsplasmid pGEMmGP8 eingefügt (Primerpaare: EBOVGPS_{Stop641F} und EBOVGPS_{Stop641R}; EBOVGPS_{Stop631F} und EBOVGPS_{Stop631R}). Die Deletionsmutanten wurden mittels des vTF7-3 Systems (Kap.III.2.4) transient in HeLa Zellen exprimiert. Die Deletionsmutanten $\Delta 630$ und $\Delta 640$ wurden wie die ΔTM Mutante exprimiert und in das Kulturmedium sezerniert. Eine Detektion der beiden Mutanten im Westernblot mit dem anti-GP₂ Antikörper war nur nach Deglykosylierung mit PNGase F effizient möglich. Der Vergleich der Laufhöhen von GP₂ $\Delta 630$ und $\Delta 640$, sowie ΔTM mit wtGP₂ nach PNGase F Behandlung ist in Abb.IV.11 dargestellt. Eine Korrelation zwischen der Größe der Moleküle und der Laufhöhe war deutlich zu erkennen, so daß ein Größenvergleich auf diese Weise möglich war. Hierbei hatte sich gezeigt, daß GP_{2 Δ} zwischen den beiden Deletionsmutanten $\Delta 640$ und $\Delta 630$ verläuft. Dieser Beobachtung nach müßte GP_{2 Δ} kleiner als GP₂ $\Delta 640$ und größer als $\Delta 630$ sein. Diese Daten ließen also eine weitere Eingrenzung der Spaltungsregion auf die Aminosäuren Val₆₃₀ bis Asp₆₄₀ zu.

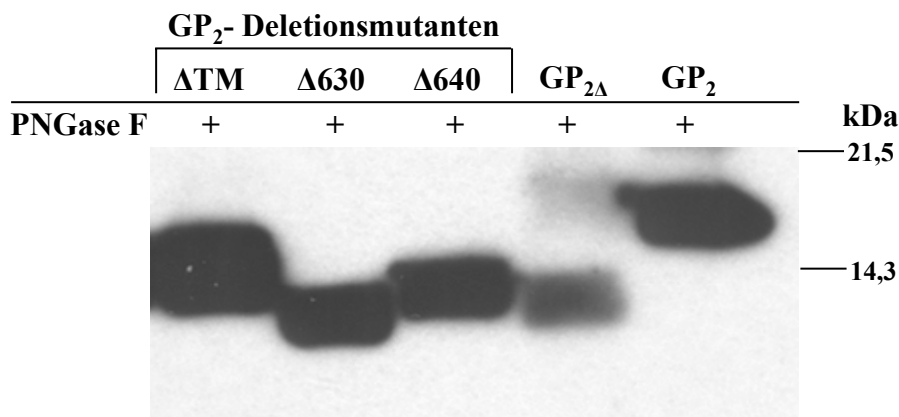


Abb.IV.11 Elektrophoretisches Laufverhalten der GP₂-Deletionsmutanten. HeLa Zellen wurden mit der T7-Vacciniavirus-Rekombinanten infiziert und anschließend zur Expression der GP₂-Deletionsmutanten $\Delta 630$, $\Delta 640$ und ΔTM mit entsprechenden pGEM Expressionsplasmiden transfiziert. Kulturüberstände wurden 16h nach Transfektion abgenommen und einer PNGase F Behandlung unterzogen. Parallel wurden HeLa Zellen mit Ebolavirus Subtyp Zaire infiziert (MOI 10PfU/Zelle). Nach 5 Tagen wurden die Kulturmedien abgenommen, das Virus pelletiert (GP₂) und der Überstand (GP_{2 Δ}) abgetrennt. Viruspellet und Überstand wurden ebenfalls PNGase F behandelt. Alle Proben wurden im 15%igen SDS-PAG unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und GP₂ im Westernblot mit einem Kaninchen-Anti-GP₂ Serum detektiert.

IV.IV.6.2 Aminosäuremutationen im GP₂ beeinflussen die GP_{1/2Δ}-Freisetzung

Zur Charakterisierung der GP₂ Spaltstelle bzw. eines eventuellen Spaltmotivs der zuständigen Protease wurden rekombinante Vacciniaviren (Kap.III.2.3) mit jeweils einem Aminosäureaustausch eingesetzt. Es wurden die Aminosäuren aus der eingegrenzten Spaltungsregion Asp₆₃₂ bis Asp₆₄₀ ausgetauscht (Tab.IV.I). Die Mutationen wurden mittels ortstgerichteter Mutagenese des pSC-mGP8 Plasmids (Volchkov et al., 1995) durch Einsatz entsprechender Mutagenese-Primer (Kap.II.7) gesetzt und durch Sequenzierung bestätigt. Alle rekombinanten Vacciniavirus Mutanten konnten hergestellt und durch Sequenzierung der viralen DNA bestätigt werden. RK-13 Zellen wurden mit den rekombinanten Vacciniaviren infiziert, metabolisch markiert und einem Chase von 12h ausgesetzt. Die in Tab.IV.I aufgeführten Mutanten exprimierten korrekt prozessiertes GP, auch wenn die Expressionsrate zum Teil unterschiedlich war. Aus diesem Grund wurde die Quantifizierung der Freisetzung im Verhältnis zum zellulär exprimierten GP durchgeführt.

Abb.IV.12A zeigt exemplarisch die zellulär exprimierten und in das Medium freigesetzten GP Mengen für Wildtyp GP und die Mutanten 632D/V, 633K/V, 634T/I, 635L/V, 636P/A und 637D/L. Wie in Abb.IV.12B dargestellt, war die Freisetzung bei einigen Mutanten im Wesentlichen unverändert (632D/V; 633K/V,R; 637D/E; 638Q/V; 640D/V; 641N/A; 642D/V; 643N/A). Dagegen war die Freisetzung bei den Mutanten 634T/I, 635L/V, 636P/A und 639G/V um mindestens 30-50% gegenüber dem Wildtyp vermindert, was auf eine Beteiligung der ausgetauschten Aminosäuren bei der Erkennung durch die zuständige Protease spricht. Mutationen an Position Asp₆₃₇ (Mutanten 637D/V und 637D/L) haben zu einer gegenüber dem Wildtyp gesteigerten Freisetzung geführt. Eine weitere Deletionsmutante del634-640, bei der die Spaltungsregion deletiert wurde, konnte noch etwa bis zu 50% gespalten werden. Bei der Mutante 637D/V wurde durch die Mutagenese eine Aminosäuren-Sequenz (..LPVQ..) in das GP₂ eingeführt, die im IL-6-Rezeptor (SLPVQ*DSSSV) gespalten wird. Hierbei wurde eine Beteiligung von TACE („TNF- α -Converting-Enzyme“) beschrieben (Althoff et al., 2000). Somit konnte auch hier eine mögliche Beteiligung von TACE an der GP Spaltung abgeleitet werden.

Tab.IV.I Nomenklatur der GP₂ Aminosäureaustauschmutanten. Die Aminosäuren (AS) sind im Einbuchstaben-Code aufgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Mutante	AS-Position in wt GP ₂	AS-Austausch	Freisetzung in % bezogen auf wtGP
wt GP	-	-	100
632D/V	D ₆₃₂	V	102
633K/V	K ₆₃₃	V	109
633K/R	K ₆₃₃	R	87
634T/I	T ₆₃₄	I	47
635L/V	L ₆₃₅	V	39
636P/A	P ₆₃₆	A	40
637D/V	D ₆₃₇	V	280
637D/L	D ₆₃₇	L	360
637D/E	D ₆₃₇	E	102
638Q/V	Q ₆₃₈	V	107
639G/V	G ₆₃₉	V	64
640D/V	D ₆₄₀	V	94
641N/A	N ₆₄₁	A	106
642D/V	D ₆₄₂	V	87
643N/A	N ₆₄₃	A	101
del634-640	T ₆₃₄ - D ₆₄₀	Deletion	46

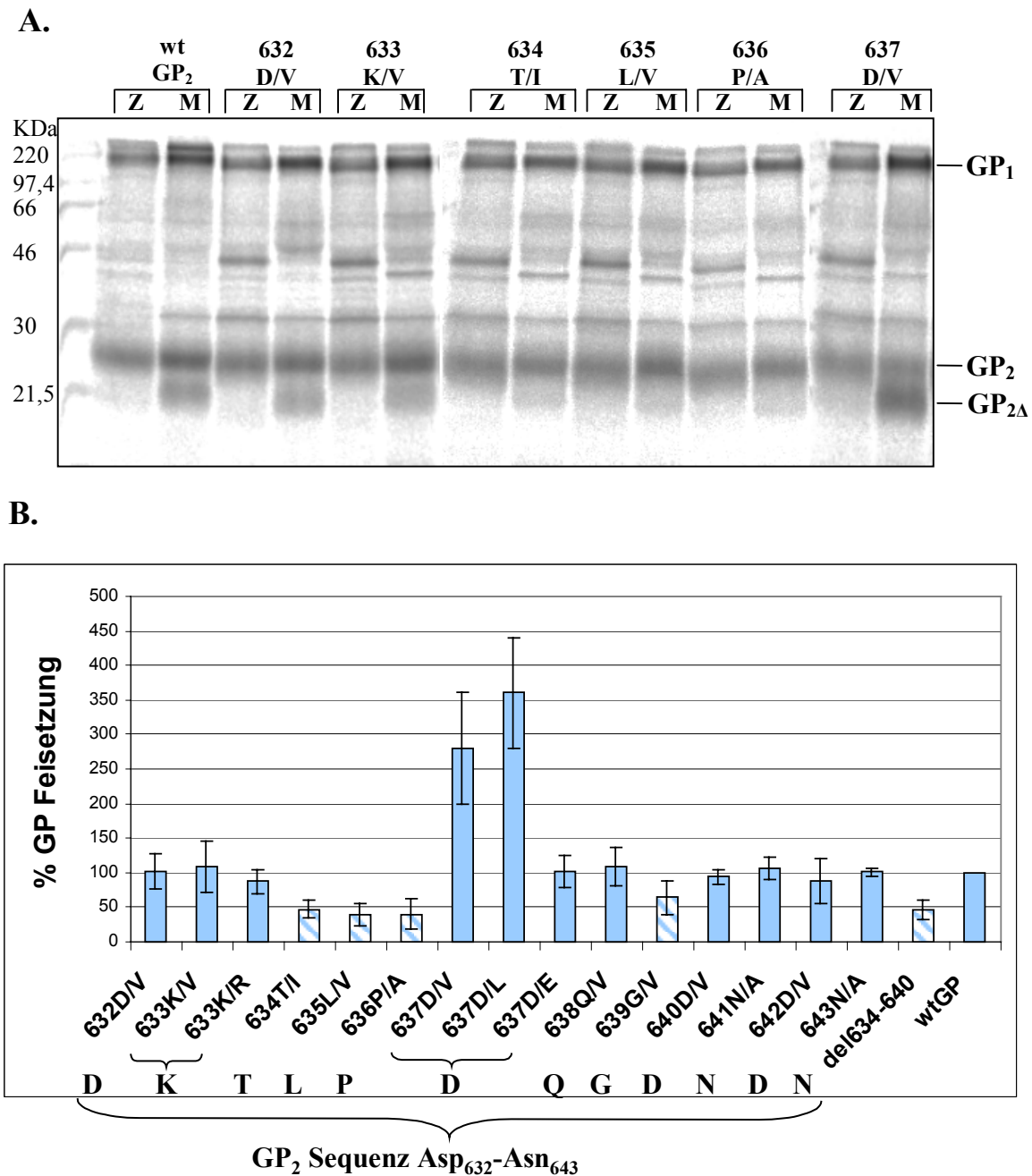
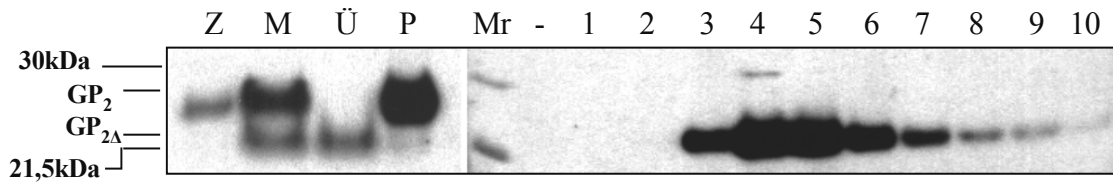
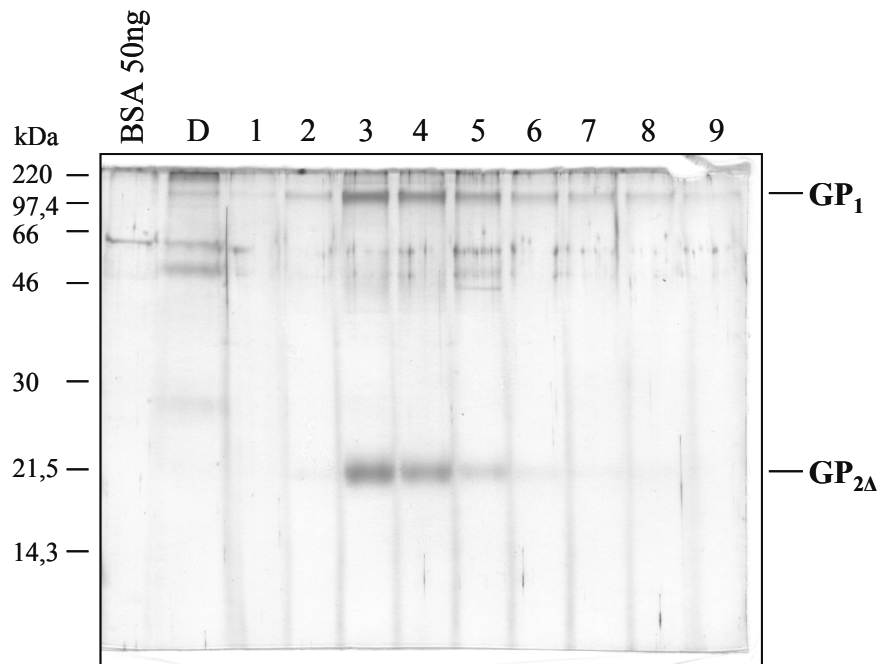


Abb.IV.12A-B Einfluß von Aminosäureaustauschmutationen auf die GP_{1/2Δ}-Freisetzung. RK-13 Zellen wurden mit den rekombinanten Vacciniaviren infiziert und 10h nach Infektion mit [³⁵S]-Cystein markiert. Nach einem Chase von 12h wurde das Kulturmedium abgenommen und Zellen im Co-IP-Puffer aufgenommen. Die Zellysate und Medium wurden mit GP-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und die Proteine in einem 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt (A.). Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit dem Bioimager von Fuji. Die Freisetzung des wtGP wurde gleich 100% gesetzt und für die Mutanten unter Berücksichtigung der zellulären Expressionsrate (durch entsprechenden Korrekturfaktor abgeglichen) berechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (B.).

IV.7 Reinigung von GP_{1/2Δ} aus Überständen EBOV-infizierter Vero E6 Zellen mittels Affinitätschromatographie

Das C-terminale Spaltfragment von GP₂, das nach der Freisetzung von GP_{1/2Δ} in der Zellmembran verbleibt, konnte nicht detektiert werden. Somit konnte die Spaltsstelle nicht über eine N-terminale Sequenzierung dieses Fragments bestimmt werden. Um die Spaltsstelle dennoch bestimmen zu können, wurde lösliches GP_{1/2Δ} aus den Überständen Ebolavirus-infizierter Vero E6 Zellen aufgereinigt. Hierzu wurde zunächst eine GP₂-spezifische Matrix hergestellt (Kap.III.4.2). Hierfür wurden Antikörper aus einem Anti-GP₂-Kaninchenserum mit Protein-A Sepharose aufgereinigt (Kap.III.4.1). Diese wurden anschließend kovalent mit DMP (Dimethylpimelimidate) an Protein-A Sepharose gebunden. Die so hergestellte Anti-GP₂-Matrix wurde für die spezifische affinitätschromatographische Reinigung von GP_{1/2Δ} eingesetzt (Kap.III.4.3). Für den zweiten Reinigungsschritt wurde die hohe Glykosylierung von GP ausgenutzt. Es wurde Wheat-Germ-Lectin-Agarose von Pharmacia eingesetzt die N-glykosidisch gebundene Glykane sowie Glykane vom Mucin-Typ bindet (Kap.III.4.4). Beide Glykantypen sind für das GP beschrieben (Geyer et al., 1992).

Für eine Reinigung wurden Vero E6 Zellen (5 162cm² Flaschen) mit EBOV infiziert (MOI=2 x 10⁻³ PfU/Zelle). Das Kulturmedium (150ml) wurde 7 Tage nach Infektion abgenommen und Virus pelletiert. Der virusfreie Überstand wurde dann mit 10ml Anti-GP₂-Sepharose über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Elution des gebundenen GP erfolgte in 15 2ml-Fractionen. In Abb.IV.13A sind die Fractionen 1 bis 10, so wie das Ausgangsmaterial (Zellen, Medium, Überstand und Pellet) nach Auftrennung in der SDS-PAGE und Detektion mit dem Anti-GP₂ Antikörper dargestellt. Die Fractionen 1 bis 10 wurden vereinigt, mit 5ml Wheat-Germ-Lektin-Agarose versetzt und mit 50mM Tris/HCl pH 8,0/10mM N-Acetylglucosamin (NAGA) auf ein Volumen von 50ml eingestellt. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Die Elution erfolgte in 2,5ml Fractionen mit 300mM NAGA. In Abb.IV.13B sind die Elutionsfractionen 1 bis 9 von der Lektinagarose, der ungebundene Durchlauf und 50ng BSA nach einer Silberfärbung dargestellt. GP₁ mit etwa 140 kDa und GP_{2Δ} mit etwa 22kDa sind deutlich gefärbt. Die geschätzte Ausbeute betrug etwa 50-100µg.

A.**B.****Abb.IV.13 Reinigung von GP_{1/2Δ} aus Überständen Ebolavirus-infizierter Vero E6 Zellen.**

A. GP₂-spezifische Affinitätschromatographie: Vero E6 Zellen wurden mit Ebolavirus, Subtyp Zaire, infiziert, das Kulturmedium 7 Tage später abgenommen und Virus pelletiert. Der Überstand wurde dann über Nacht mit der Anti-GP₂-Matrix bei 4°C rotierend inkubiert. Die Matrix wurde gewaschen (10mM Tris/HCl pH 7,5) und GP_{1/2Δ} in Fraktionen durch pH-Shift eluiert (100mM Na-Citrat pH 3,0). Fraktionen 1-10 sowie Zelleyat (Z), Medium (M), Überstand (Ü) und Viruspellet (P) wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit Anti-GP₂ Antikörpern auf die Anwesenheit von GP₂ untersucht. **B.** Reinigung mit Lektin-Agarose: Die Fraktionen 3-10 aus A. wurden vereinigt und über Nacht mit Wheat-Germ-Lectin-Agarose bei 4°C inkubiert. Die Agarose wurde gewaschen und anschließend in 2,5ml Fraktionen mit 300mM N-Acetylglucosamin eluiert. Je Fraktion sowie vom ungebundenem Durchlauf (D) wurden 15µl im 15%igen SDS-PAG unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit dem SilverQuest Silver Staining Kit von Invitrogen gefärbt. Zur Proteinmengen-Abschätzung wurden 50ng BSA aufgetragen (**B.**).

IV.8 Bestimmung der Spaltstelle von GP_{2Δ} über die Molekularmasse

Nachdem es gelungen war, lösliches GP_{1/2Δ} aus dem Überstand von EBOV-infizierten Zellen aufzureinigen, wurde dieses Material zur Bestimmung der Molekularmasse von GP_{2Δ} eingesetzt, um anschließend auf die Spaltstelle rückschließen zu können. Das lösliche GP_{1/2Δ} wurde nach der Reinigung mit Lektin-Agarose (Kap.III.4.4) konzentriert und im Anschluß einer PNGase F Behandlung unterzogen, um die beiden Zuckerketten an Position Asn₅₆₃ und Asn₆₁₈ zu entfernen. Zur Trennung von GP₁ und GP_{2Δ}, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind, wurde die Probe mit 10mM DTT 1h bei 50°C reduziert. Zur Alkylierung der Cysteine wurde die Probe mit 50mM Jodacetamid 30min lang bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit Hilfe von Centricon 30 Konzentratoren in 10mM Triäthylamin pH 7,6 umgepuffert. Die Massenbestimmung von GP_{2Δ} erfolgte über die MALDI- Massenspektrometrie (Kap.III.3.6). Die Messung wurden am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Arbeitsgruppe Prof. R. Thauer, von J. Kahnt durchgeführt.

In Abb.IV.14 ist eine Silberfärbung und ein Anti-GP₂ gefärbter Blot der mit PNGase F behandelten und alkylierten Probe, wie diese für die MALDI-Massenspektrometrie eingesetzt wurde, dargestellt. GP_{2Δ} verläuft etwa auf der Höhe der Proteinmarkerbande von 14,3 kD wie bereits in den Glykosylierungs-Untersuchungen gezeigt (Kap.IV.3.2). Im Silbergel ist bei etwa 35 kD PNGase F zu sehen, außerdem erkennt man einige schneller laufende Degradationsbanden. Unterhalb der Proteinmarkerbande von 97,4 kD ist GP₁ zu sehen. Im Immunoblot ist deutlich eine GP₂-spezifische Bande auf der Höhe der Markerbande von 14,3 kD zu sehen.

Das MALDI-Massenspektrum dieser Probe ist in Abb.IV.15 dargestellt. In dem Messbereich von 5.000 bis 60.000 wurden vier Signale gemessen. Signale mit der Masse von 35.157 und 17.606 sind PNGase F zuzuordnen. Die Masse von 18.516 kann nur einer Verunreinigung zugeordnet werden. Demnach ist das Signal von 15.551 GP_{2Δ} zuzuordnen. Von dieser gemessenen Masse muß die Masse von 215 subtrahiert werden. Sie entspricht den fünf Carboxyamidomethylgruppen (CAM), die durch die Alkylierung der Cysteinreste hinzugekommen sind. Somit ergibt sich für das GP_{2Δ} eine Masse von 15.336 Da. Dies entspricht einem GP₂-Fragment, dessen C-terminales Ende von Asp₆₃₇ gebildet wird und somit innerhalb des bereits eingegrenzten Spaltbereichs von Val₆₃₁ bis Asp₆₄₀ liegt. Bei einer theoretisch errechneten Masse von 15.332 Da liegt das Messergebnis unter der Fehlertoleranzgrenze von 0,1-0,5%.

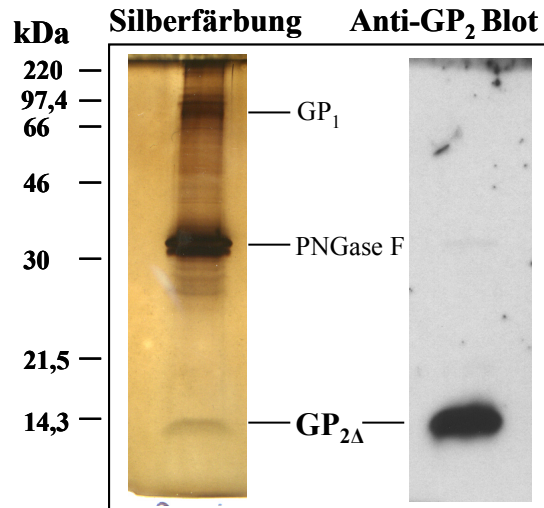
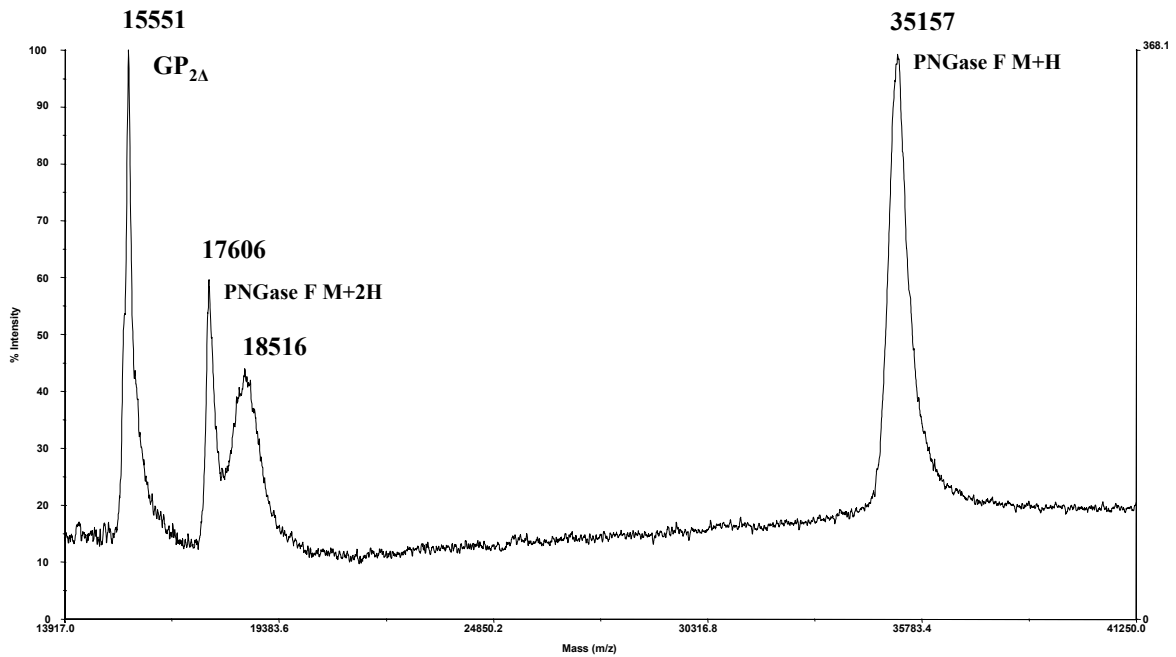


Abb.IV.14 Gereinigte GP_{1/2Δ}-Probe nach PNGase F Behandlung und Alkylierung. Lektin-Agarose gereinigtes GP_{1/2Δ} (Kap.IV.7) wurde auf ein Volumen von 200μl mit Centriplus 50 Konzentratoren ankonzentriert. Es folgte die Behandlung mit 30.000 U PNGase F für 46h bei 37°C. Anschließend wurde die Probe mit 10mM DTT und 0,1% SDS 1h bei 50°C reduziert. Die Alkylierung der Cysteinreste erfolgte mit 50mM Jodacetamid für 30min bei RT im Dunkeln. Die Probe wurde dann mit Centricon 30 Konzentratoren in 10mM Triäthylamin pH 7,6 umgepuffert und konzentriert. Je 1μl der Probe wurden in einem 15% SDS-PAG nicht reduzierend aufgetrennt. Ein Gel wurde mit dem Silberquest Kit gefärbt und das andere im Immunoblot mit Anti-GP₂ Antikörpern detektiert.



MALDI: 15.551 - 215 (5 x 43; CAM) 15.336

GP₂-Sequenz

C-terminale Aminosäure	Theoretische Masse
...V ₆₃₁	14.662
...D ₆₃₂	14.777
...K ₆₃₃	14.906
...T ₆₃₄	15.007
...L ₆₃₅	15.120
...P ₆₃₆	15.217
... D ₆₃₇	15.332
...Q ₆₃₈	15.460
...G ₆₃₉	15.517
...D ₆₄₀	15.632

EAIVNAQPK	CNPNLHYWTT	QDEGAAIGLA	WIPYFGPAAE
GIVIEGLMHN	QDGLICGLRQ	LANETTQALQ	LFLRATTELK
TFSILNRKAI	DPLLQRWGGT	CHILGPDCCI	EPHDWTKNIT
DKIDQIHDF	VDKTL P ↓QGD	NDNWWTGWRQ	
WIPAGIGVTG	VIIAVIALFC	IC	KFVF

Abb.IV.15 Bestimmung der GP_{2Δ} Spaltstelle über die Molekularmasse (MALDI-MS). Die Probe für die MALDI-MS wurde wie in Abb.IV.14 angegeben vorbereitet und mit der Matrixlösung (gesättigte Sinapinsäure Lösung in 0,1% TFA und 67 % Acetonitril) 1:1 gemischt. Anschließend wurde die Probe auf eine Trägerplatte aufgetropft und nach Antrocknen gemessen (Voyager-DE RP System). Das erhaltene Spektrum ist oben dargestellt. Auf der X-Achse sind die Massen als Masse/Ladungsverhältnis (m/z) und auf der Y-Achse die Intensität aufgetragen. M+H steht für einfach protoniertes Protein, M+2H für zweifach protoniertes. CAM steht für Carboxyamidomethylgruppe. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die theoretische Masse (15.332), die der gemessenen (15.336) am nächsten liegt, ist fett hervorgehoben. In der GP₂-Sequenz ist die C-terminale Aminosäure von GP_{2Δ} rot markiert und die Spaltstelle durch einen Pfeil angedeutet. Blau dargestellt ist der Transmembrananker.

IV.9 Die GP_{1/2Δ} Freisetzung wird durch Proteaseinhibitoren inhibiert

Die Freisetzung von GP an der Zelloberfläche sowie die Abwesenheit eines spezifischen Spaltemotivs, haben auf eine Spaltung durch zelluläre Proteasen hingedeutet, die in die Gruppe der Sekretasen oder Sheddasen gehören und Transmembranproteine in eine lösliche Form spalten. Im Hinblick auf die Identifizierung der zuständigen Proteasen wurde ein Inhibitorprofil erstellt. Die Proteasegruppe der Sheddasen bzw. Sekretasen gehört in die Familie der Zink-abhängigen Metalloproteasen (Hooper et al., 1997). Aus diesem Grunde wurde zunächst die Abhängigkeit der Spaltung von Zn²⁺ Ionen untersucht, und der Einfluß verschiedener Metalloprotease-Inhibitoren getestet. In Tab.IV.2 sind alle getesteten Inhibitoren aufgeführt.

Tab.IV.2 Einfluß von Proteaseinhibitoren auf die GP_{1/2Δ} Freisetzung. Tabellarische Übersicht über den Einfluß getesteter Proteaseinhibitoren auf die GP Freisetzung in RK-13 und 293 Zellen. Die Herkunft der aufgeführten Inhibitoren ist in Kap.II.5 aufgelistet. Die in Klammern angegebenen Konzentrationen haben eine Inhibition (+) von mindestens 50% oder keine Inhibition (-) mit ≤20% gezeigt. Mit +/- eingestufte Inhibition war für den angegebenen Konzentrationsbereich nicht konzentrationsabhängig.

Inhibitor	Inhibition der GP Freisetzung
TAPI-I (50µM)	+
1,10-Phenanthrolin (1mM)	+
EDTA (5mM)	-
EGTA (5mM)	-
Phosporamidon (500nM-20µ)	+/-
α-1-Antichymotrypsin (4µM)	-
Captopril (10µM)	-
BB2516 (500nM)	+
GM 6001 (5µM)	+
TIMP-1, 2 und 4 (200nM)	-
TIMP-3 (100nM-400nM)	+/-
MMP-2 Inhibitor I (100µM)	-
MMP-3 Inhibitor II (50µM)	+
MMP-8 Inhibitor I (5µM)	+
CGS-27023A (25µM)	+

Der Einfluß der Inhibitoren wurden in RK-13 und 293 Zellen untersucht. GP exprimierende Zellen wurden metabolisch markiert und zunächst einem Chase von 1,5h ausgesetzt, um eine korrekte Prozessierung und Transport von GP an die Plasmamembran zu gewährleisten. Es folgte ein Mediumwechsel mit dem entsprechenden Inhibitor und weitere Inkubation. Freigesetztes GP wurde aus dem Medium mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und nach Auftrennung in der SDS-PAGE quantifiziert. Bereits mit 50µM TAPI-I wurde eine Inhibition der GP Freisetzung um 70% erreicht (Abb.IV.17). Bei TAPI-I handelt es sich um einen Inhibitor mit einem breiten Wirkungsspektrum, der auf Hydroxamat basiert und verschiedene Metalloproteasen wie z.B. Kollagenasen oder Matrixmetalloproteasen (MMP's) inhibiert. Ein weiterer unspezifischer Inhibitor, das 1,10-Phenanthrolin, ein Chelator, der divalente Kationen komplexiert, inhibierte die Freisetzung in 1mM Konzentration um etwa 70%. Durch Zugabe von 1mM Zn^{2+} konnte die Inhibition teilweise wieder aufgehoben werden (Abb.IV.16). Dies bestätigte, daß die beteiligte Protease eine Zink-abhängige Metalloprotease ist. Dagegen konnte keine Inhibition mit den Kationen-Chelatoren EDTA und EGTA nachgewiesen werden. Phosphoramidon, ebenfalls ein relativ unspezifischer Inhibitor der Metalloproteinasen, zeigte zwar eine Inhibition von 40%, diese war aber konzentrationsunabhängig (Abb.IV.17).

Eine weitaus spezifischere Inhibition konnte mit den Inhibitoren GM6001 und BB2516 beobachtet werden. Hier konnte eine Inhibition von 70% bei einer Konzentration von 5µM erreicht werden (exemplarisch für GM6001 in Abb.IV.16). Beide Inhibitoren, bei denen es sich wiederum um Hydroxamatderivate handelt, hemmen nicht nur MMP's, sondern auch die Freisetzung von TNF- α (Glaser et al., 1999; Solorzano et al., 1997). TNF- α wird durch die Metalloprotease TACE (TNF- α -Converting-Enzyme), einen Vertreter der Adamalysine (ADAM, A-Disintegrin-And-Metalloprotease) freigesetzt. Die Substanz CGS-27023A ebenfalls ein Hydroxamat-Abkömmling, ist ein spezifischer Inhibitor von ADAM 9, einem anderen Vertreter der Adamalysine. Auch dieser inhibierte bei einer 25µM Konzentration die GP Freisetzung um 60%. Spezifische MMP-Inhibitoren wie MMP-3 Inhibitor II und MMP-8 Inhibitor I zeigten ebenfalls eine effektive Inhibition der GP Freisetzung (exemplarisch für MMP-8 Inhibitor I siehe Abb.IV.16).

In Anwesenheit von α -1-Antichymotrypsin, einem Inhibitor des Cathepsin G, sowie von Captopril, einem Inhibitor des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE), konnte keine Inhibition der Freisetzung detektiert werden. Natürlich vorkommende Inhibitoren

der MMP's, die „Tissue Inhibitors of Metalloproteinases“ (TIMP) haben ebenfalls keinen Effekt auf die GP Freisetzung gezeigt, sodaß die Beteiligung einer Matrixmetalloprotease unwahrscheinlich ist. Nur für TIMP-3 konnte eine konzentrationsunabhängige Inhibition von 20-30% beobachtet werden. In Abb.IV.17 ist eine Übersicht über die Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition auf die GP_{1/2Δ} Freisetzung durch die Proteaseinhibitoren dargestellt. Das Inhibitorprofil der für die GP Freisetzung zuständigen Protease entspricht demjenigen einer Zink-abhängigen Metalloprotease, um die es sich bei den Sheddasen handelt.

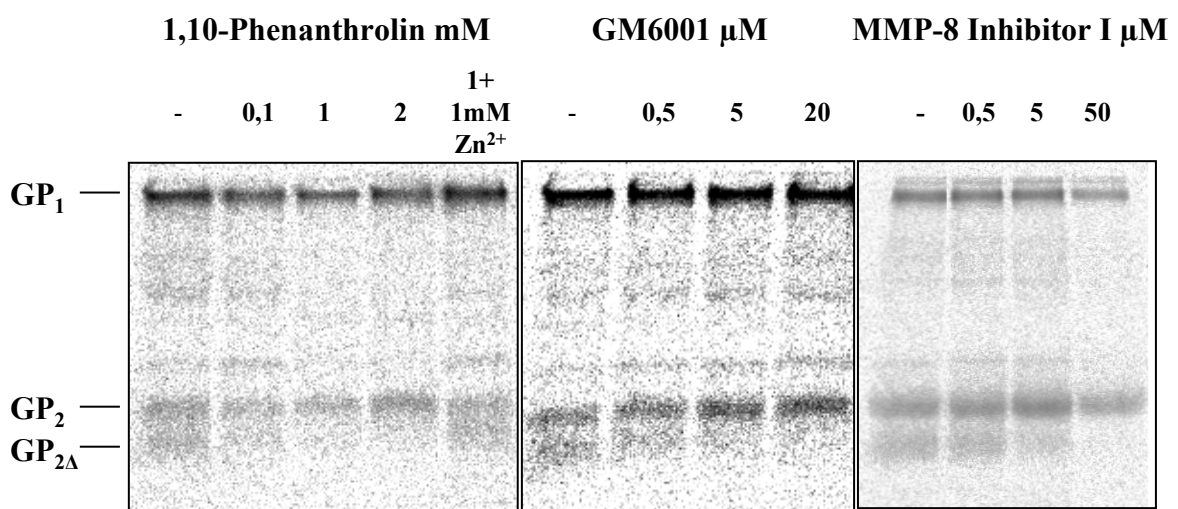


Abb.IV.16 Inhibition der GP_{1/2Δ} Freisetzung durch 1,10-Phenanthrolin, GM6001 und MMP-8 Inhibitor I. RK-13 Zellen wurden mit rekombinalem Vacciniavirus zur Expression von wtGP infiziert. Nach 7h wurden die Zellen metabolisch mit [³⁵S]-Cystein markiert und einem Chase von 2h unterzogen (in dieser Zeit sollte GP bis zur Zelloberfläche korrekt prozessiert werden). Dann folgte ein Mediumwechsel mit dem entsprechenden Inhibitor in der angegebenen Konzentration und ein weiterer Chase von 8h. Der Ansatz mit Zn²⁺ wurde zur Gewährleistung der Löslichkeit mit einem phosphatfreien Minimalmedium (Sigma) angesetzt. Zinkchlorid (ZnCl₂) wurde als 10mM Stammlösung in 50mM HEPES-Puffer angesetzt. Medium und Zellen wurden getrennt gesammelt und mit GP-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden mit dem Bio-Imager-System quantifiziert.

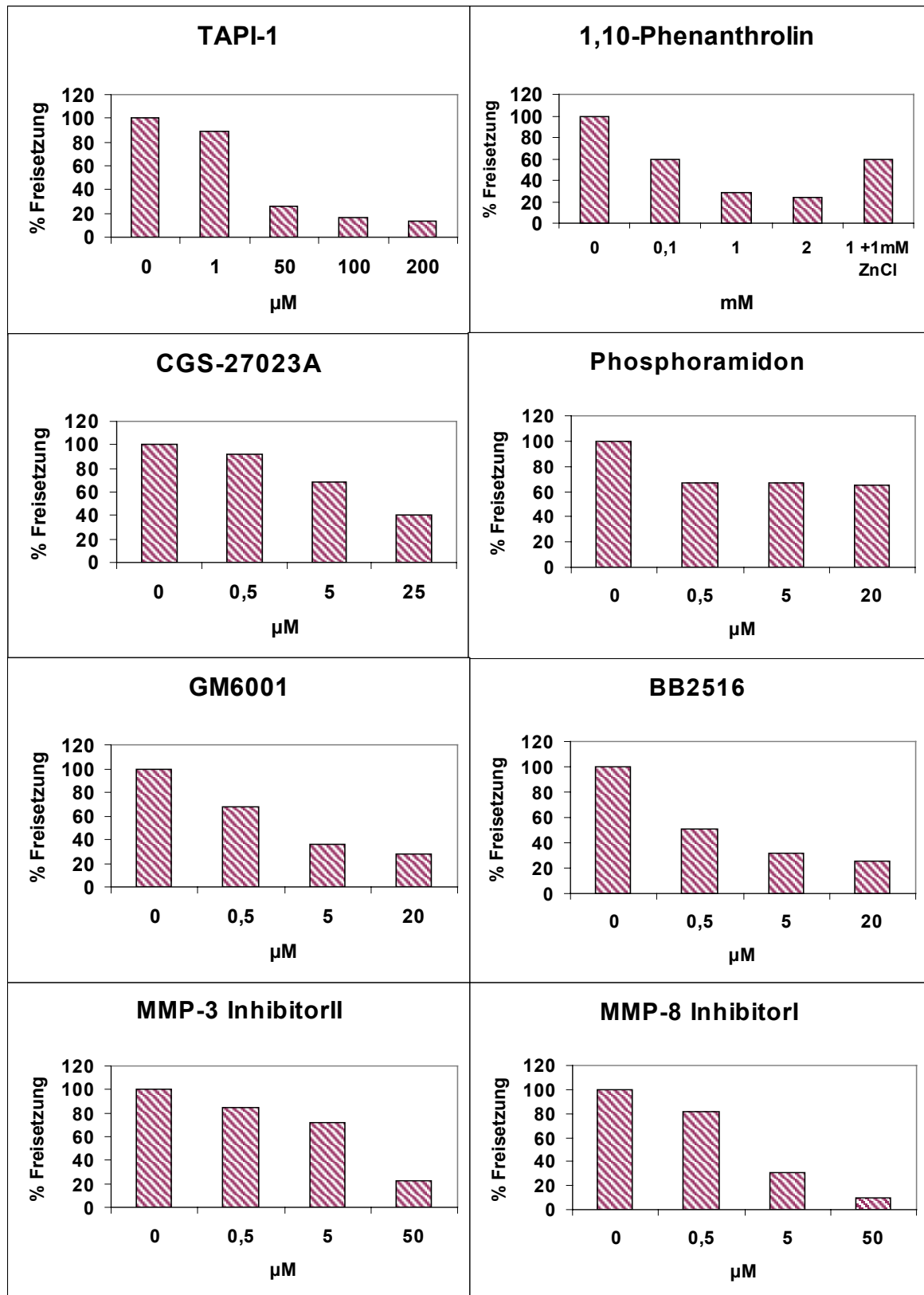


Abb.IV.17 Konzentrationsabhängige Inhibition der GP_{1/2Δ} Freisetzung. Graphische Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Inhibitoren auf die GP_{1/2Δ} Freisetzung. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abb.IV.16 beschrieben. Für 1,10-Phenanthrolin konnte durch äquivalente Mengenzugabe von Zinkchlorid (ZnCl₂) der inhibitorische Effekt wieder teilweise aufgehoben werden.

IV.10 Überexpression von TACE (ADAM 17) führt zur verstärkten Freisetzung von Ebolavirus GP_{1/2Δ}

Die für das Shedding von TNF- α zuständige Protease TACE (TNF- α -converting-enzyme) gilt als die am besten untersuchte Sheddase (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). TACE spielt wahrscheinlich auch beim Shedding weiterer Transmembranproteine wie p75 TNFR, TGF- α , L-Selektin und APP eine wichtige Rolle (Peschon et al., 1998). Das Enzym gehört in die Familie der Adamalysine der Metzinkin-Metalloproteasen und wird daher auch als ADAM 17 bezeichnet. Das Shedding von TNF- α und wie hier gezeigt auch von EBOV GP, wird durch die Hydroxamat-Derivate GM600 und BB2516 inhibiert. In der Mutagenesestudie konnte zudem gezeigt werden, daß das Einbringen einer IL-6-Rezeptor-spezifischen Sequenz, die durch TACE gespalten wird, in das EBOV GP₂, zur verstärkten GP Freisetzung führt. Auf Grund dieser Daten lag es nahe, die Beteiligung von TACE an der GP Freisetzung abzuklären. Der Effekt einer Überexpression von TACE auf die GP_{1/2Δ} Freisetzung wurde hier untersucht.

Mit Hilfe eines Expressionsplasmids für TACE der Maus (Black et al., 2000) wurde TACE in 293 Zellen zusammen mit EBOV GP überexprimiert. Die Expression von murinem TACE konnte mit Hilfe eines spezifischen Primerpaares in der PCR nachgewiesen werden. Hierbei wurden die Zellen mit GP-Expressionsplasmid (pcDNA3-mGP8) transfiziert oder mit GP und TACE c-DNA co-transfiziert. Nach 24-36h wurden die Zellen metabolisch markiert und einem Chase von 8h ausgesetzt. GP wurde aus Zellen und Medium immunpräzipitiert, danach im SDS-PAG aufgetrennt und quantifiziert. Hierbei konnte gezeigt werden, daß die Freisetzung von GP_{1/2Δ} durch die Überexpression von TACE um das Doppelte verstärkt wurde (Abb.IV.18). Diese Beobachtung ließ den Schluß zu, daß TACE bei der Freisetzung von GP_{1/2Δ} eine Rolle spielt.

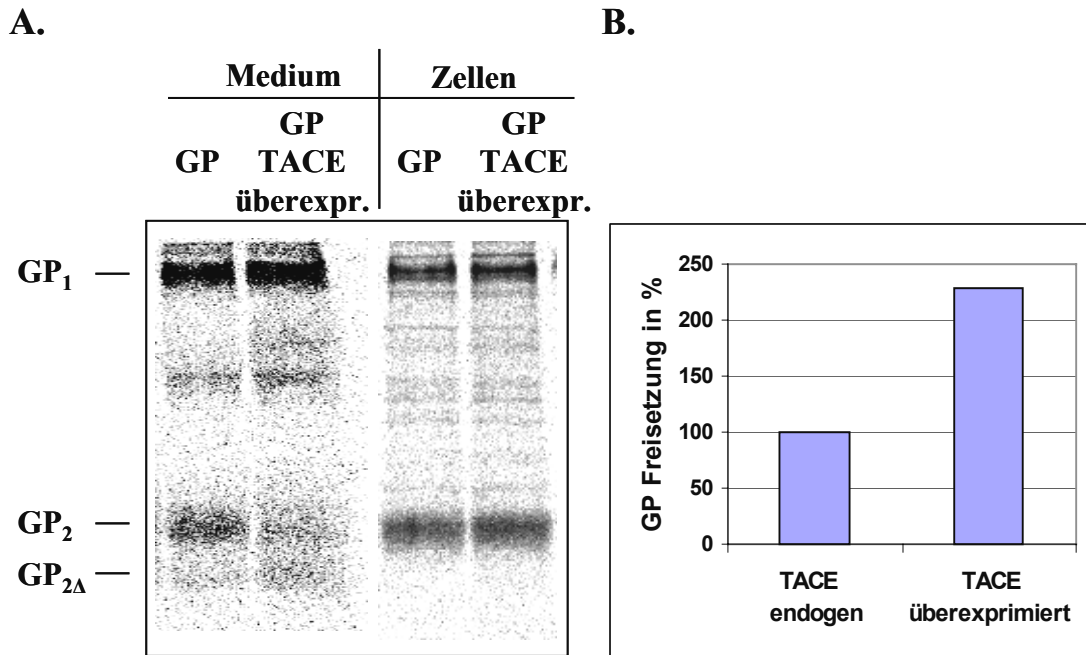


Abb.IV.18 Überexpression von TACE führt zur verstärkten Freisetzung von GP_{1/2Δ}. 293 Zellen wurden entweder mit GP-Expressionsplasmid (pcDNA3-mGP8) oder mit GP und TACE (pcDNA-3MuTACE) co-transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectin. Der Transfektionsansatz wurde nach 8h abgenommen und durch Kulturmedium (2,5% FCS) ersetzt. Nach 36h wurden die Zellen metabolisch mit [³⁵S]-Cystein markiert und einem Chase von 8h unterzogen. Medium und Zellen wurden mit GP-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und die Proteine im 15% SDS-PAG reduzierend aufgetrennt (A.). Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit dem Bio-Imager-System. Die Expressionsrate von GP wurde hierbei mit berücksichtigt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt gemittelte Werte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten (B.).

IV.11 Expression und Freisetzung von EBOV GP in TACE defizienten Mausfibroblasten

Für den eindeutigen Beweis, daß TACE an der Freisetzung von GP_{1/2Δ} beteiligt ist, wurden TACE Δ Zn/ Δ Zn Mausfibroblasten (EC-2 Zellen) herangezogen. Es handelt sich um eine transformierte Fibroblastenlinie aus Mäusen, die homozygot eine Deletion in der Zink-bindenden Domäne von TACE tragen und somit ein katalytisch inaktives TACE besitzen (Peschon et al., 1998; Reddy et al., 2000). Die EC-2 Zellen wurden mit GP transient transfiziert oder mit GP und funktionellem TACE co-transfiziert. Die Zellen wurden metabolisch mit ³⁵S-Cystein markiert und anschließend einem Chase von 5h unterzogen. Aus den erhaltenen Zellysaten und dem Kulturmedium wurde GP mit

spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Wie in Abb.IV.19 zu sehen, wurde GP in den EC-2 Zellen exprimiert und proteolytisch prozessiert. Dagegen war die Freisetzung von GP_{1/2Δ} kaum nachzuweisen. Die Co-Transfektion von katalytisch aktivem TACE führte gegenüber der nicht transfizierten Probe zu einer deutlich gesteigerten Freisetzung von GP_{1/2Δ}. Somit war deutlich gezeigt, daß TACE am Shedding des EBOV GP_{1/2Δ} beteiligt ist.

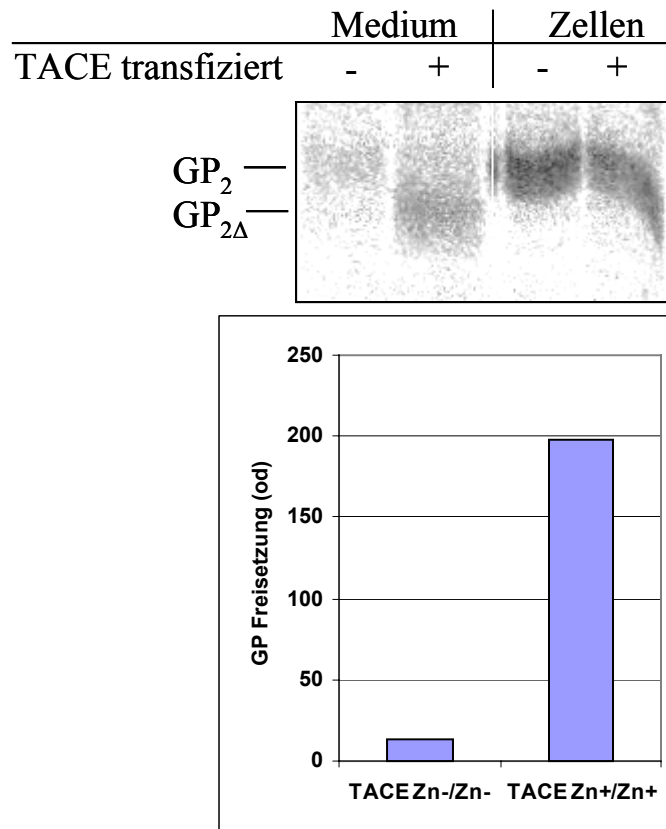


Abb.IV.19 Freisetzung von GP_{1/2Δ} in EC-2 Zellen. EC-2 Zellen (TACE Zn-/Zn-) wurden entweder mit wtGP oder mit TACE und wtGP (TACE Zn+/Zn+) Expressionsplamiden und LipofectAmin 2000 transfiziert. Die Zellen wurden 18h nach Transfektion metabolisch markiert und einem Chase von 5h unterzogen. GP wurde aus Zellysaten und Medium mit spezifischen Antikörpern (Pferd-Anti-EBOV) immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend in einem 15%igen SDS-PAG aufgetrennt und die GP_{2Δ} bzw. GP₂ Proteinbanden mit dem Bio-Imager-System quantifiziert. Graphisch dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Expressionsraten der Zellen wurden bei der Berechnung mit einbezogen.

IV.12 TACE spezifische Anti-Sense-Oligonukleotide inhibieren die GP_{1/2Δ} Freisetzung

Die Überexpression von TACE in 293 Zellen sowie Experimente mit TACE defizienten Zellen haben die Beteiligung von TACE an der GP Freisetzung demonstriert. Zur gezielten Inhibition der TACE Aktivität wurden im folgenden TACE-spezifische Anti-Sense-Oligonukleotide (ASO) eingesetzt. Das Prinzip beruht hierbei auf der sequenzspezifischen Bindung von ASO an die m-RNA des zu inhibierenden Genprodukts und den anschließenden Abbau der RNA-DNA-Hybride durch RNAase H (Dean et al., 1994; Abb.IV.20).

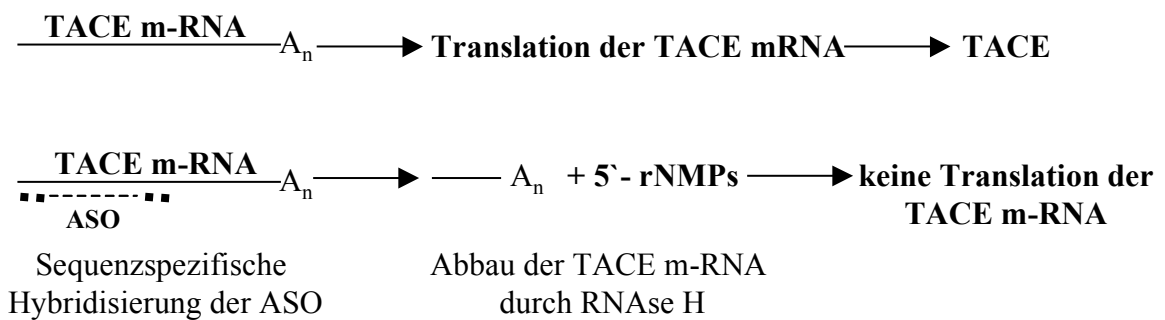


Abb. IV.20 Sequenzspezifische Degradation von RNA durch RNase H. Die sequenzspezifischen ASO binden an die mRNA, so daß RNA-DNA-Hybride entstehen. RNase H baut spezifisch den RNA Anteil der RNA-DNA-Hybride in einzelne 5'-Monophosphatribonucleotide (5'-rNMPs) ab.

In der vorliegenden Arbeit wurden 20mer Phosphorothioat-Oligonukleotide (PTO) mit je 5 2-O-Methyl-modifizierten Basen am 3'- und 5'-Ende verwendet. Für PTO wird eine höhere Stabilität gegenüber Nukleasen beschrieben (Bennett et al., 1993). Die Bindungsaffinität der Hybridoligonukleotide an die mRNA wurde durch die 2-O-Methyl-Modifikation erhöht (McKay et al., 1999). Es wurden ASO für drei unterschiedliche Sequenzbereiche von TACE konstruiert (Kap.II.7). Unmittelbar am 3'-Ende der kodierenden Region (bp 940-960; ASO: AS2-17; ASO2), in der 3'-nichttranslatierten Region (bp 1609-1627; ASO: AS4-17; ASO4) und im Bereich bp 691-710 (ASO: AS5-17; ASO5). Für die ASO2 Sequenz konnte eine Inhibition der TNF- α und L-Selektin Freisetzung bereits gezeigt werden (Condon et al., 2001). Als Kontrolle wurden zwei entsprechende ASO mit je 4 ungepaarten Basen konstruiert

(AS2M-17 und AS4M-17). Die ASO wurden durch Lipofectation in die Zellen eingebracht und der Einfluß auf die GP_{1/2Δ} Freisetzung untersucht. Wie in Abb.IV.21 dargestellt, zeigten die ASO2 und 4 eine Inhibition von 30-50% der GP_{1/2Δ} Freisetzung. Die Kontroll-ASO haben kein Effekt auf die Freisetzung gezeigt. Auch dieses Ergebnis spricht für die Beteiligung von TACE an der GP_{1/2Δ} Freisetzung als Haupt-Sheddase.

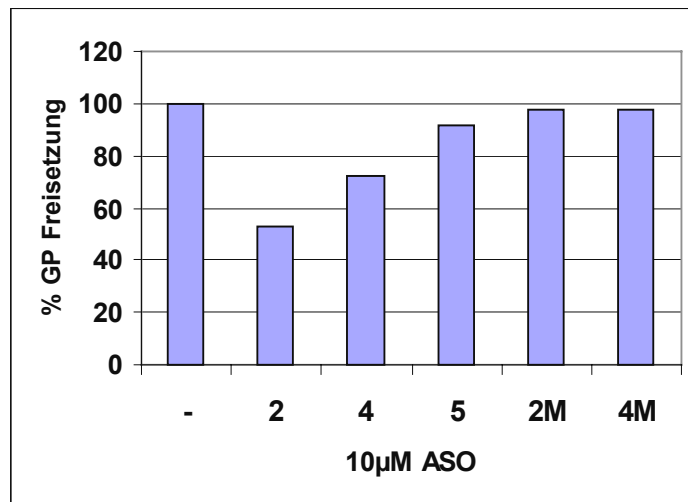
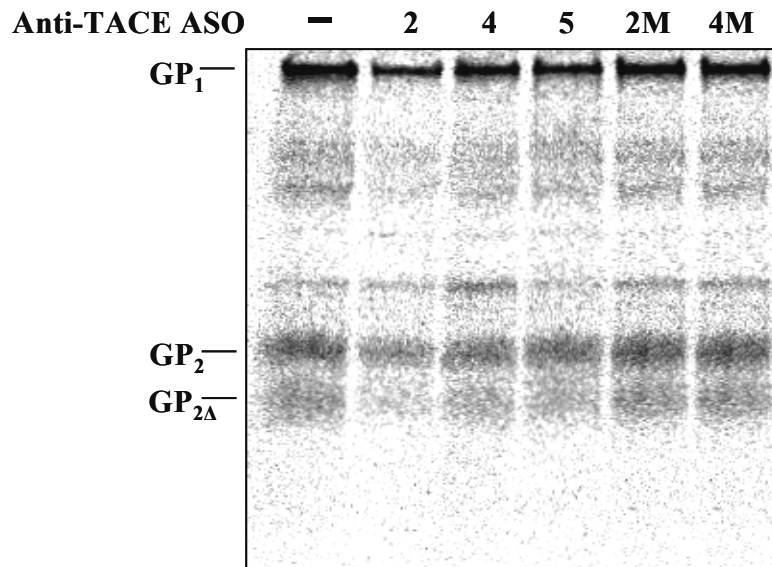


Abb.IV.21 TACE-spezifische ASO inhibieren die GP_{1/2Δ} Freisetzung. Humane 293 Zellen wurden mit GP rekombinanten Vacciniavirus infiziert und mit den TACE-spezifischen ASO (ASO2, ASO4, ASO5, ASO2M und ASO4M) transfiziert. Die Zellen wurden 7h nach Transfektion metabolisch mit [³⁵S]-Cystein markiert und einem Chase von 10h unterzogen. Medium und Zellen wurden mit GP-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und Proteine in einem 15%igen SDS-PAG aufgetrennt. Dargestellt ist die Freisetzung von GP_{1/2Δ} in das Medium und eine graphische Quantifizierung (Bio-Imager-System). Die Werte im Diagramm stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die GP-Expressionsrate wurde durch die ASO nicht beeinträchtigt.

V. DISKUSSION

Das EBOV GP ist ein Typ I Transmembranglykoprotein, das aus den beiden Untereinheit GP₁ und GP₂ besteht, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Die GP₂-Untereinheit trägt die Transmembranregion, über die das GP in der Zellmembran verankert ist. Volchkov et al. haben zeigen können, daß das GP in Membranvesikel inseriert in Kulturüberstände freigesetzt wird (Volchkov et al., 1998b). Neben dieser Form wurde in den Kulturüberständen von HeLa-Zellen eine lösliche Form von GP detektiert. Die Detektion erfolgte hierbei mit einem Anti-EBOV Antikörper, der nur die GP₁-Untereinheit erkennt. Eine veränderte Konformation von GP₁, die die Ausbildung der Disulfidbrücke zu GP₂ verhindert, wurde als mögliche Ursache der Freisetzung diskutiert. Der Entstehungsmechanismus der löslichen Ektodomäne war jedoch unklar geblieben. Einer der Gründe dafür lag darin, daß zu diesem Zeitpunkt kein spezifischer Antikörper zum Nachweis von GP₂ zur Verfügung stand.

Auch für andere virale Glykoproteine, wie die G Proteine von Rabiesvirus, VSV und RSV (Morimoto et al., 1993; Grünberg et al., 1991; Roberts et al., 1994), sowie das H Protein von Masernvirus (Malvoisin et al., 1994) wurden lösliche Formen beschrieben, die in Zellkulturüberständen zu finden waren. Über den Mechanismus, der für die Entstehung der löslichen Formen dieser viralen Glykoproteine verantwortlich ist, konnte allerdings nur spekuliert werden. Auf Grund der Anwesenheit von löslichem VSV G_s (G_s ist ein Typ-I Transmembranprotein) bereits im ER, sowie von Synthesestudien in vitro wurde vermutet, daß das Entstehen der löslichen Form durch vorzeitige Termination der Translation zustande kommt (Grünberg et al., 1991; Graeve et al., 1986). Beim RSV G-Protein handelt es sich um ein Typ-II Transmembranprotein, so daß bei der Synthese der löslichen Form von der Translation alternativer Initiationscodons ausgegangen wird. Da kein lösliches G_s des Rabiesvirus sowie kein lösliches H-Protein des Masernvirus in Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde eine proteolytische Spaltung von der Zelloberfläche vorgeschlagen (Morimoto et al., 1993; Malvoisin et al., 1994). Eine zelluläre Protease, die für diese Spaltung zuständig wäre, ist bislang nicht beschrieben worden. Die Funktionen und Bedeutungen dieser löslichen Glykoprotein-Ektodomänen insbesondere für die Viruspathogenese sind ebenfalls noch nicht untersucht worden.

Im Gegensatz hierzu gibt es recht klare Vorstellungen über die proteolytische Spaltung vieler zellulärer Transmembranproteine an der Zelloberfläche („shedding“). Auch ist bei

diesen Proteinen vieles über die biologische Bedeutung der Freisetzung bekannt. Zum Beispiel scheint das Shedding von TGF α eine entscheidende Funktion in der Entwicklungsbiologie zu haben (Pechon et al., 1998). Das Shedding von membrangebundenen Cytokinen, Cytokin-Rezeptoren und Adhensionsmolekülen hat eine wichtige regulatorische Bedeutung bei der Immunabwehr (Yamamoto et al., 1999; Garton et al., 2001). Es ist deswegen von großem Interesse, genaue Kenntnisse über das Shedding viraler Oberflächenglykoproteine zu bekommen.

GP_{1/2 Δ} ist die lösliche Form von GP

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Freisetzungsmechanismus der Ektodomäne des EBOV GP aufgeklärt. Zunächst wurde hierzu die Struktur der löslichen Form von GP charakterisiert. Die GP-Freisetzung wurde in Zellen, die mit recombinantem Vacciniavirus oder mit Ebolavirus infiziert waren, untersucht. In beiden Fällen konnten die GP₁- und GP₂-Untereinheiten sowie eine GP_{2 Δ} Untereinheit höherer elektrophoretischer Mobilität im Medium der GP-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Der Größenunterschied von GP_{2 Δ} zu GP₂ betrug etwa 3-4 kDa. Durch Ultrazentrifugation und durch den Einsatz linearer Saccharosegradienten konnten die GP₂ und GP_{2 Δ} Untereinheiten in unterschiedliche Fraktionen getrennt werden (Abb. IV.1, 2 und 3). Die GP₂-Untereinheit konnte membranassoziiert detektiert werden, während GP_{2 Δ} im Überstand in löslicher Form detektiert werden konnte. Da GP₁ sowohl in membranassoziierten als auch in löslichen Fraktionen detektiert wurde, konnte davon ausgegangen werden, daß EBOV GP in die Kulturüberstände in zwei Formen freigesetzt wird. Dabei handelt es sich einmal um die bereits beschriebene membranassoziierte Form der GP_{1/2}-Komplexe und zum anderen um die hier erstmalig beschriebene lösliche Form der GP_{1/2 Δ} -Komplexe. Die Beobachtung, daß lösliche GP_{1/2 Δ} -Komplexe, die während der Infektion mit Ebolavirus freigesetzt werden, auch durch monoklonale, neutralisierende Antikörper erkannt werden, sprach für eine biologische Signifikanz der Freisetzung. Hierbei könnte lösliches GP eine Köder-Eigenschaft (decoy) ausüben, indem es mit neutralisierenden Antikörpern interagiert und somit eine effiziente Viruseliminierung verhindert.

Die Vorstellung, daß lösliches GP_{1/2 Δ} durch eine proteolytische Spaltung innerhalb der GP₂-Untereinheit generiert wird, sodaß der Transmembrananker entfernt und die Ektodomäne freigesetzt wird, wurde durch die Pulse-Chase Kinetik unterstützt (Abb. IV.6A-B). Intrazellulär wurde hierbei wie bei Volchkov et al. (1998a) beschrieben

zuerst der ungespaltene ER- Vorläufer preGP_{er} bereits nach 30min Pulse detektiert. Mit ansteigenden Chase-Zeiten (ab 30min Chase) konnte die Prozessierung in die beiden Untereinheiten GP_1 und GP_2 detektiert werden. Eine verkürzte Form der GP_2 -Untereinheit konnte intrazellulär nicht detektiert werden. Parallel hierzu wurde ab 90min Chase $\text{GP}_{2\Delta}$ und GP_1 sowie etwas verzögert auch GP_2 im Kulturüberstand nachgewiesen. Auf Grund der Beobachtung, daß $\text{GP}_{2\Delta}$ intrazellulär nicht nachweisbar ist, sondern erst nach einer 90minütigen Chase-Periode im Medium gefunden wird, konnte eine proteolytische Spaltung an der Zelloberfläche postuliert werden. Diese konnte dann mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung direkt nachgewiesen werden (Abb.IV.7). Hierbei konnte direkt demonstriert werden, daß die löslichen $\text{GP}_{1/2\Delta}$ -Komplexe bereits 1h nach der Biotin-Markierung im Medium erscheinen. Mit der Zeit stieg die freigesetzte Menge an $\text{GP}_{1/2\Delta}$ -Komplexen im Medium an und erreichte nach 4h ein Maximum. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß lösliche $\text{GP}_{1/2\Delta}$ -Komplexe an der Zelloberfläche durch eine zelluläre Protease freigesetzt werden (Abb.V.1). Untersuchungen zur Oligomerisierung von GP haben zeigen können, daß die freigesetzten $\text{GP}_{1/2\Delta}$ -Komplexe wie die Membran-verankerten $\text{GP}_{1/2}$ -Komplexe Trimere sind (Abb.IV.9).

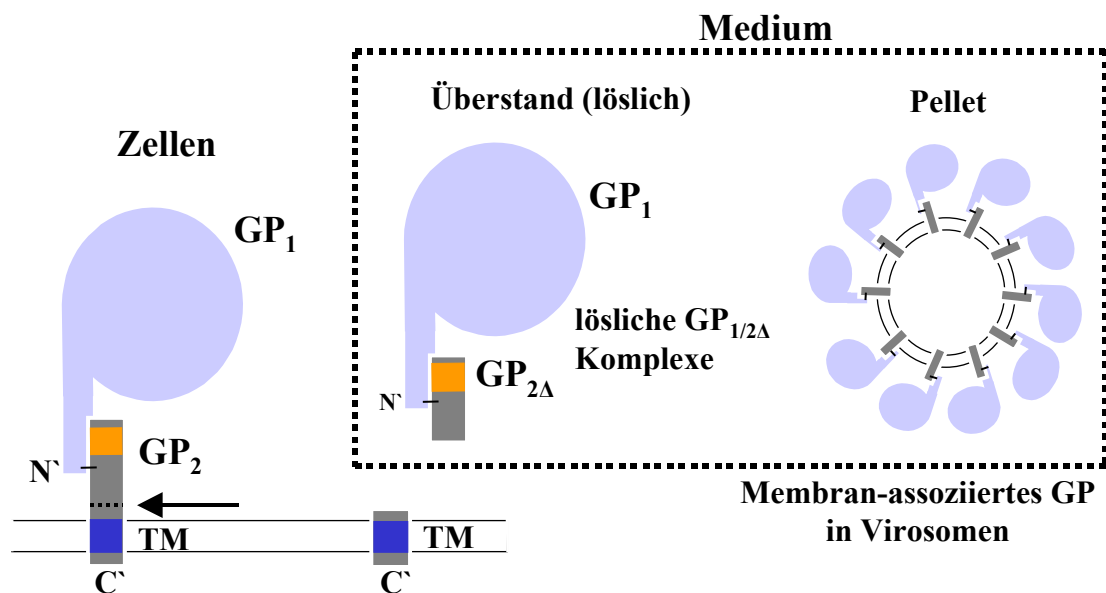


Abb.V.1 Schematische Darstellung der $\text{GP}_{1/2\Delta}$ Freisetzung an der Zelloberfläche. Links ist membranverankertes GP mit den beiden Untereinheiten GP_1 und GP_2 dargestellt. TM steht für die Transmembran-Region, und der Pfeil deutet auf die gestrichelt dargestellte Spaltstelle. Im Medium findet man neben den löslichen $\text{GP}_{1/2\Delta}$ -Komplexen auch Virosomen mit membrangebundenem $\text{GP}_{1/2}$.

Diese Trimere zeigen aber eine geringere Stabilität, sodaß auch Monomere Formen in linearen Saccharosegradienten detektiert wurden. Die Transmembran-Domäne scheint also für die Stabilität der GP Oligomere von Bedeutung zu sein.

Die Spaltung erfolgt an Asp₆₃₇

Auf Grund des Größenunterschieds von GP_{2Δ} zu GP₂ von etwa 3-4 kDa konnte man vermuten, daß die Spaltstelle 30-40 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt liegt. Zur weiteren Eingrenzung der Spaltstelle wurden Untersuchungen der Glykosylierung von GP₂ und GP_{2Δ} durchgeführt. Es konnte durch den Einsatz von Glykosylierungsmutanten und anschließende Behandlung mit Glykosidasen gezeigt werden, daß die potentiellen Glykosylierungsstellen von GP₂ an den Aminosäurepositionen Asn₅₆₃ und Asn₆₁₈ in der Tat Kohlenhydratseitenketten besitzen. Hierbei hatte sich herausgestellt, daß an Position Asn₅₆₃ Glykane vom mannosereichen Typ und an Position Asn₆₁₈ komplexe Glykane N-glykosidisch gebunden sind (Abb.IV.4B). Das Glykosylierungsmuster von GP_{2Δ} entsprach demjenigen von GP₂ aus Zellen oder Viruspartikeln. Diese Daten sprechen also dafür, daß prozessierte GP_{1/2}-Komplexe an der Zelloberfläche in einem Bereich C-terminal von Asn₆₁₈ abgespalten werden (Abb.IV.5). Da die Glykosylierungsmutanten keinen Unterschied in der GP_{1/2Δ} Freisetzung zeigten, kann man vermuten, daß die Glykosylierung keinen Einfluß auf die Spaltung hat. Hierbei besteht ein Unterschied zum H-Protein von Masernvirus, das nur in einer Endo H-resistenten Form in Kulturüberständen detektiert werden konnte, obwohl auf der Zelloberfläche neben der Endo H-resistenten Form eine Endo H-sensitive Form existiert (Malvoisin et al., 1994). Eine weitere Eingrenzung der Spaltstelle erfolgte durch den Einsatz von Deletionsmutanten, die auf ihr Laufverhalten in der SDS-PAGE nach PNGase F-Behandlung untersucht wurden. Hierbei wurden die Laufhöhen der Mutante ΔTM, bei der die Transmembranregion deletiert wurde, und der Mutanten Δ640 sowie Δ630, bei denen zusätzlich 10 bzw. 20 Aminosäuren deletiert wurden, miteinander verglichen (Abb.IV.11). Die Laufhöhe von Wildtyp GP_{2Δ} lag zwischen denjenigen der Deletionsmutanten Δ640 und Δ630. Somit konnte die Spaltstelle auf den Bereich zwischen den Aminosäuren Val₆₃₁ bis Asp₆₄₀ weiter eingegrenzt werden (Abb.V.2). Die genaue Bestimmung der Spaltstelle konnte an Hand der Molekularmasse von GP_{2Δ} vorgenommen werden. Hierzu wurde GP_{1/2Δ} aus den Überständen EBOV infizierter Vero E6 Zellen über eine Affinitätschromatographie und Lektin-Agarose gereinigt (Abb.IV.13). Nach der Deglykosylierung durch PNGase F, Reduktion und Alkylierung

der Cysteine, konnte im Silbergel eine distinkte Bande auf der Höhe von etwa 14,5 kD als GP_{2Δ} im Immunoblot identifiziert werden. Die Probe wurde anschließend im MALDI-TOF gemessen (Abb.IV.14, 15). Die Masse von 35.157 entspricht der von einfach protonierter PNGase F. Die Masse von 17.617 entspricht genau der halben Masse von PNGase F, die auf Grund doppelter Protonierung doppelt so schnell fliegt. Ein weiteres Signal mit der Masse von 18.515 konnte nur von einer Verunreinigung stammen, da dieses außerhalb des für die GP_{2Δ}-Ektodomäne zu erwartenden Größenbereichs von 14.877 bis 15.838 lag. Die Masse von 15.551 liegt in dem zu erwartenden Größenbereich. Von dieser Masse sind die fünf Carboxyamidomethylgruppen, die bei der Alkylierung der Cysteine angehängt wurden, abzuziehen, sodaß sich eine Masse von 15.336 ergab. Diese entspricht bis auf vier Da (Fehlerquote von 0,026%) einem GP₂-Fragment von 15.332 Da, dessen C-terminales Ende von Asp₆₃₇ gebildet wird. Somit konnte gezeigt werden, daß die Spaltstelle von GP_{2Δ} an der Position Asp₆₃₇ liegt (Abb.V.2).

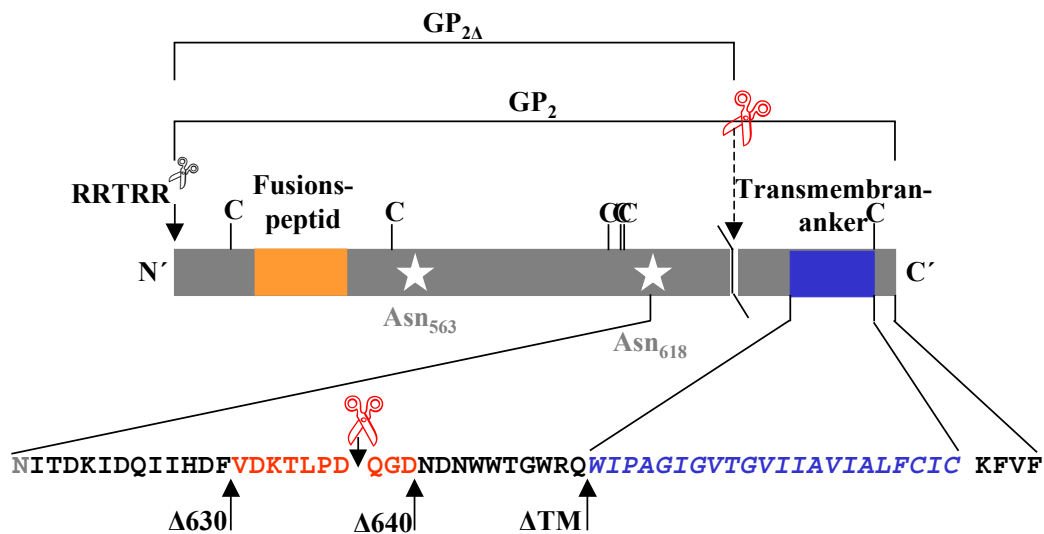


Abb.V.2 Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung von GP₂ zu GP_{2Δ}. Dargestellt ist in Orange das Fusionspeptid und in Blau die Transmembranregion (Sequenz kursiv). Die weißen Sterne stehen für die Glykosylierungsstellen. Cysteinreste sind durch C gekennzeichnet. In Rot hervorgehoben sind Aminosäuren der durch die Deletionsmutanten eingegrenzten Spaltungsregion. Die schwarze Schere zeigt die Furinspaltstelle mit dem Konsensusmotiv RRTRR. Die roten Scheren zeigen die Spaltstelle der Sekretase. Weiter sind die C-terminalen Enden der drei Deletionsmutanten ΔTM, Δ640 und Δ630 eingezeichnet.

Mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese wurden dann die Aminosäuren aus dem durch die Deletionsmutanten eingegrenztem Spaltungsbereich einzeln ausgetauscht. Sodann wurde der Einfluß dieser Mutationen auf die GP_{1/2Δ} Freisetzung untersucht. Die Mutanten 634T/I, 635L/V, 636P/A und 639G/V zeigten gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte Freisetzung von bis zu 60%, was für eine Beteiligung an der Erkennung der Spaltstelle durch die verantwortliche Protease spricht. Mutationen außerhalb des Bereiches Trp₆₃₄ und Gly₆₃₉ zeigten keinen Einfluß auf die Freisetzung. Ein interessantes Ergebnis zeigten die Mutanten 637D/V und 637D/L. Beide Mutanten zeigten eine um das 3 bis 4 fache verstärkte Freisetzung (Abb.IV.12). Hierbei wurde bei der Mutante 637D/V von einer Verstärkung durch das Einführen einer IL-6 Rezeptor-spezifischen Sequenz, die von TACE (TNF- α -Converting Enzyme) gespalten wird, ausgegangen (Müllberg et al., 1994). Die Mutante 637D/L zeigte ebenfalls eine verstärkte Freisetzung wobei die Mutante 637D/E eine gegenüber dem Wildtyp unveränderte Freisetzung zeigte, sodaß davon ausgegangen werden konnte, daß die negative Ladung an der Position 637 für die Spaltungseffizienz von Bedeutung ist. Eine ungeladene Aminosäure an dieser Position ergibt demnach ein besseres Substrat und steigert die Spaltungseffizienz. Wo genau die Mutanten 637D/V, 637D/L und 637D/E gespalten werden, kann nur vermutet werden. Es wäre vorstellbar, daß die Mutanten 637D/V und 637D/L an der Position Q₆₃₈ gespalten werden, wie dies beim IL-6 Rezeptor der Fall ist (Abb.V.5). Die Mutante 637D/E würde dann wie der Wildtyp an Position 637 mit geringerer Effizienz gespalten werden. Diese Beobachtung steht mit der Vorstellung im Einklang, daß nur ein Teil der GP Moleküle von der Zelloberfläche abgespalten wird, sodaß noch ausreichend GP für die Virusreifung zur Verfügung steht.

Das Spaltenzym ist die Metalloprotease TACE

Obwohl es kein einheitliches Spalt-Motiv für das Shedding von löslichen Ektodomänen zellulärer Transmembranproteine gibt, weist dieses eine Reihe von Charakteristika auf, die auf einen gemeinsamen Mechanismus hindeuten. Diese Charakteristika beinhalten die Verstärkung des Shedding durch Phorbol-Ester, die proteolytische Spaltung der Ektodomäne nahe am Transmembrananker, sowie die Sensitivität gegenüber Hydroxamat-Derivaten (Hooper et al., 1997; Müllberg et al., 2000). Hydroxamat-Derivate sind Inhibitoren Zink-abhängiger Metalloproteasen, bei denen die Zinkine und die Metzinkine unterschieden werden. Zu den Metzinkinen gehören die Astacine, Serralsine, Adamalsine und die Matrixmetalloproteasen (Abb.V.3).

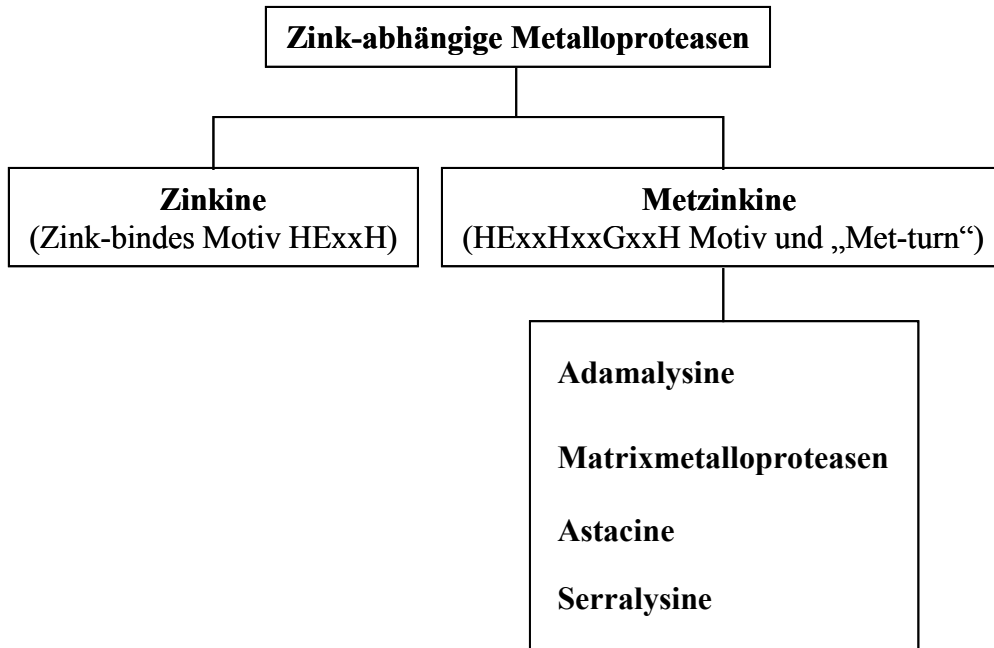


Abb.V.3. Zink-abhängige Metalloproteasen. Charakteristische Sequenzelemente wie das Motiv HexxHxxGxxH und ein Methionin („Met-turn“) bilden zusammen mit dem katalytischen Zink-Ion das aktive Zentrum der Metzinkine (Bode et al., 1993). Die Zinkine besitzen ein einfacheres katalytisches Motiv HexxH.

Bei den Astacinen handelt es sich um große oligomere Proteasen wie z.B. Meprin A und B, die Wachstumsfaktoren und Polypeptide spalten (Bond et al., 1995). Die Serralysine sind bakterielle Proteasen, die von Serratia, Erwinia und Pseudomonas freigesetzt werden (Baumann et al., 1993). Adamalysine oder auch ADAM's (A-Disintegrin-AND-Metalloprotease) besitzen eine Disintegrin- und eine Metalloprotease-Domäne, so daß diese Proteine sowohl Adhäsions- und Fusions- als auch proteolytische Aktivität aufweisen können (Killar et al., 1999). Die Matrixmetalloproteasen (MMP's) sind für den regulierten Ab- und Umbau der Extrazellulärmatrix verantwortlich (Nagase et al., 1996). In der Superfamilie der Metzinkine wurde die Beteiligung der ADAM's und der MMP's am Shedding zellulärer Transmembranproteine gezeigt. Die für das Shedding verantwortlichen Proteasen werden in der Literatur als Sheddasen, Sekretasen oder auch Convertasen bezeichnet (Hooper et al., 1997). Eine Einteilung der Sekretasen in α , β und γ erfolgte im Zusammenhang mit der Spaltung des Amyloid-Vorläufer Proteins (APP) (Abb.V.4). Die α -Sekretase spaltet APP (Typ-I Transmembranprotein) in der Ektodomäne nahe dem Transmembrananker und generiert unter physiologischen Bedingungen das N-

terminale, lösliche sAPP α , das in den Extrazellularraum sezerniert wird. Die α -Sekretase ist eine Zink-abhängige Metalloprotease. Bei zwei Vertretern aus der Familie der Adamalysine ADAM10 und ADAM 17 (TACE) konnte α -Sekretase-Aktivität nachgewiesen werden. Für beide Enzyme konnte die Prozessierung von APP zu sAPP α gezeigt werden (Buxbaum et al., 1998; Lammich et al., 1999). Die β - und γ -Sekretasen sind für die Entstehung des β -Amyloids (A β) verantwortlich, das zu Amyloid-Plaques aggregiert und in Gehirnen von Alzheimer-Erkrankten zu finden ist. Beide Sekretasen sind Aspartat-Proteasen mit dem charakteristischen Motiv D(S/T)G im aktivem Zentrum. Die β -Sekretase spaltet APP N-terminal von der α -Sekretase Spaltstelle und setzt das lösliche N-terminale sAPP β frei (Yan et al., 1999). Anschließend spaltet die γ -Sekretase das membranverankerte C-terminale Fragment innerhalb der Transmembrandomäne, und setzt das A β frei (Kimberly et al., 2000). Das C-terminale Spaltfragment des EBOV GP, das durch das Shedding generiert wird und ebenfalls membranverankert vorliegt, konnte nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung, warum dieses Spaltfragment nicht detektiert werden konnte, wäre eine weitere Spaltung durch die γ -Sekretase.

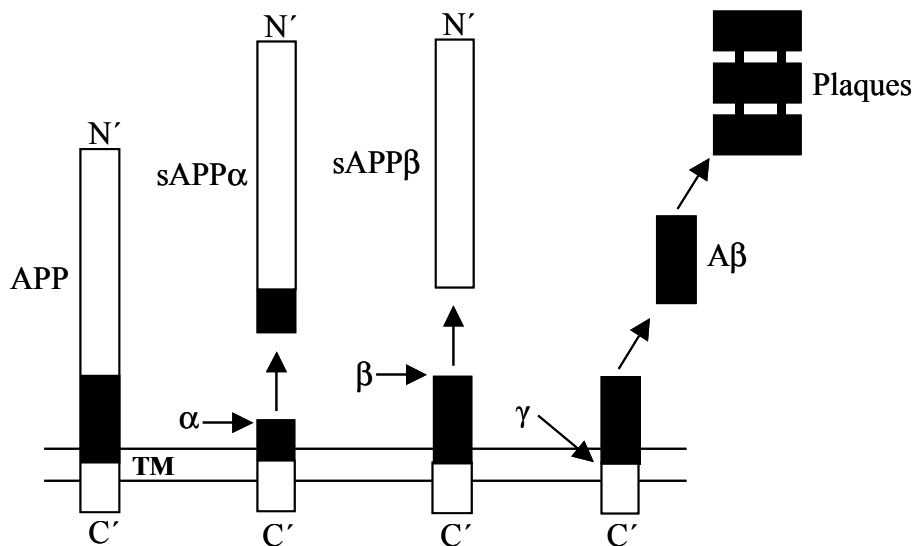


Abb.V.4. Spaltung des APP durch α -, β - und γ -Sekretase. Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung von APP (Amyloid-Vorläufer Protein) durch die α -, β - und γ -Sekretase. Das aminoternale Ende ist durch N' und das carboxyterminale durch C' gekennzeichnet. TM steht für die Transmembranregion. Durch die α -Sekretase Aktivität entsteht das lösliche sAPP α . Durch die Aktivität der β -Sekretase entsteht zunächst das lösliche sAPP β . Die anschließende Spaltung des C-terminalen Fragments durch die γ -Sekretase führt zur Freisetzung das β -Amyloid (A β), das dann zu Amyloid-Plaques aggregiert.

Um zu prüfen, ob auch die für die Freisetzung des EBOV GP zuständige Protease zu den Zink-abhängigen Metalloproteasen gehört, wurden diverse Proteaseinhibitoren eingesetzt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war ein für die Sheddase typisches Inhibitorprofil. Die Hemmung durch den Chelator 1,10-Phenanthrolin konnte durch Zn^{2+} Ionen zum Teil aufgehoben werden. Diese Beobachtung war ein Hinweis dafür, daß es sich um eine Zink-abhängige Metalloprotease handelte. Die auf Hydroxamat basierenden Inhibitoren TAPI-I, BB2516, GM 6001 und CGS-27023A sowie die Matrix-Metalloprotease-Inhibitoren MMP-3 Inhibitor II und MMP-8 Inhibitor I zeigten eine effiziente Inhibition der $GP_{1/2\Delta}$ Freisetzung (Abb.IV.16, 17). Da aber die natürlich vorkommenden Inhibitoren der Matrix-Metalloproteasen TIMP's (Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteases) keinen Einfluß auf die Freisetzung zeigten, konnte davon ausgegangen werden, daß die zuständige Protease keine Matrix-Metalloprotease ist, sondern eine andere Protease aus der Superfamilie der Metzinkine. Einen weiteren Hinweis lieferten die Inhibitoren BB2516 und GM 6001, für die eine Inhibition der TNF- α Freisetzung beschrieben wurde (Glaser et al., 1997; Solorzano et al., 1999). Die für das Shedding von TNF- α zuständige Protease (TNF- α - converting-enzyme, TACE) gehört in die Familie der Adamalysine und ist somit ein Vertreter aus der Superfamilie der Metzinkine.

Die Beteiligung von TACE an der Spaltung weiterer zellulärer Transmembranproteine in eine lösliche Form konnte gezeigt werden. Hierzu gehören neben dem IL-6 Rezeptor die TNF-Rezeptoren p55 und p75, TGF- α , L-Selektin, IL-1R-II und APP (Pechon et al., 1998, Reddy et al., 2000; Althoff et al., 2000). Es handelt sich hierbei um strukturell und funktionell unterschiedliche Proteine, so daß postuliert wurde, daß TACE eine allgemeine Sheddase-Funktion besitzt (Althoff, et al. 2001). Die Spaltung durch TACE erfordert anscheinend keine spezifische Konsensus-Sequenz (Abb.V.5). Die meisten bekannten Substrate werden zwischen zwei hydrophoben Aminosäure gespalten, wobei es jedoch Ausnahmen gibt (Abb.V.5). Die Juxtamembranregion, in der das Shedding zwischen der Transmembranregion und der proximalen Extrazellulär-Domäne erfolgt, zeigt in keinem Fall eine geordnete Sekundärstruktur. Die strukturelle Verfügbarkeit einer spaltbaren Sequenz innerhalb der Juxtamembranregion wird hier als Voraussetzung für das Shedding angesehen. (Ehlers et al., 1996; Arribas et al., 1997; Althof et al., 2000; 2001).

Protein	Spaltstelle	Entfernung zum Transmembrananker
TNF- α (1.)	PLAQA ↓ VRSSS	20 AS
TNF-R-p55 (2.)	QIEN ↓ VKGT	10 AS
TGF- α (3.)	ADLLA ↓ VVAAS	9 AS
L-Selektin (4.)	KLDK ↓ SFSM	11 AS
APP (5.)	VHHQK ↓ LVFFA	12 AS
IL-6-R (6.)	SLPVQ ↓ DSSSV	8 AS
EBOV GP ₂	KTLPD ↓ QGDND	13 AS

Abb.V.5. TACE Spaltstellen. Aufgeführt sind die Spaltstellen von TACE in unterschiedlichen Substraten. Die Spaltstellen wurden durch Sequenzierung von gereinigten Spaltfragmenten oder durch in vitro Spaltung von synthetischen Peptiden bestimmt. Zum Vergleich ist die in dieser Arbeit identifizierte Spaltstelle von EBOV GP₂ angegeben. AS steht für Aminosäure. (1.) Kriegler et al., 1988; Black et al., 1997; (2.) Gullberg et al., 1992; Dri et al., 2000; (3.) Wong et al., 1989; Peschon et al., 1998; (4.) Kahn et al., 1994; Peschon et al., 1998; (5.) Esch et al., 1990; Buxbaum et al., 1998; (6.) Müllberg et al., 1994; Althoff et al., 2000

Da außer dem Inhibitorprofil auch die Charakterisierung der Spaltstelle durch die Mutationsanalyse Hinweise auf eine Beteiligung von TACE lieferte, sollte nun direkt geprüft werden, ob diese Protease für die Spaltung von EBOV GP verantwortlich ist. Hierbei wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt. Im ersten wurde TACE in Zellen überexprimiert und GP coexprimiert. Hierdurch konnte die Freisetzung von GP_{1/2 Δ} verdoppelt werden, was ein erster Hinweis auf eine Beteiligung von TACE am GP_{1/2 Δ} Shedding darstellte (Abb.IV.18). Im zweiten Ansatz wurde durch den Einsatz spezifischer Antisensoligonukleotide (ASO) die Aktivität von TACE inhibiert und die Freisetzung von GP_{1/2 Δ} untersucht. Zwei der drei getesteten ASO konnten die Freisetzung von GP_{1/2 Δ} um 30-40% inhibieren (Abb.IV.21). Die beiden Kontroll-ASO zeigten keinen Einfluß auf die GP_{1/2 Δ} -Freisetzung, sodaß hier von einer spezifischen Inhibition von TACE ausgegangen werden kann. Eine komplette Inhibition der Freisetzung könnte einmal durch nicht ausreichende Transfektionseffizienz oder durch eine lange Halbwertszeit von TACE in intrazellulären Pools erklärt werden.

Einen eindeutigen Beweis für die Beteiligung von TACE an der GP_{1/2Δ} Freisetzung lieferten Experimente mit TACE-defizienten Mausfibroblasten. Hierbei handelt es sich um transformierte Fibroblasten, die homozygot eine Deletion in der Zink-bindenden Domäne von TACE tragen und somit ein katalytisch inaktives TACE besitzen (Peschon et al., 1998; Reddy et al., 2000). GP_{1/2Δ} wurde in diesen Zellen nur in marginalen Mengen freigesetzt. Erst nach Rekonstitution der TACE-Aktivität durch Cotransfektion von TACE cDNA wurden signifikante Mengen an GP_{1/2Δ} gebildet (Abb.IV.19).

Die Beteiligung weiterer Proteasen außer TACE an der GP_{1/2Δ} Spaltung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Hierbei stellen weitere Vertreter der ADAM Familie sowie Matrixmetalloproteasen potentielle Kandidaten dar. Neben TACE ist auch für ADAM 9 und 10 eine α -Sekretaseaktivität beschrieben worden (Roghani et al., 1999; Rosendahl et al., 1997). Die Spaltung von TNF- α durch MMP-1, 3 und 7 wurde ebenfalls beschrieben (Gearing et al., 1994). Die strukturelle Ähnlichkeit in der Metalloprotease-Domäne ist wohl auch der Grund, warum für ADAM's als auch für MMP's teilweise die gleichen Inhibitoren eine Wirkung zeigen (Stone et al., 1999).

Das Fehlen von neutralisierenden Antikörpern während einer EBOV-Infektion könnte auf eine Ködereigenschaft des löslichen GP zurückzuführen sein. Hierbei würden die Antikörper durch die löslichen GP_{1/2Δ}-Komplexe abgefangen werden, und nicht mehr zur Virus-Neutralisation zur Verfügung stehen. Die Erkennung des löslichen GP durch neutralisierende Antikörper konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. EBOV-neutralisierende Antikörper, die vor allem gegen das GP gerichtet sind, konnten mit Hilfe einer Phagen-Display-Bibliothek rekombinant hergestellt und im Tierversuch erfolgreich getestet werden (Parren et al., 2000; Wilson et al., 2000). Eine der neuesten Arbeiten demonstriert im Tiermodell den Schutz vor letaler EBOV Infektion durch passive Immunisierung mit neutralisierenden Antikörpern trotz einer relativ starken Virämie (Parren et al., 2002). Hierbei wird ein protektiver Mechanismus der neutralisierenden Antikörper, der über eine Reduktion der Virämie durch Virusneutralisation hinausgeht, vorgeschlagen. Dabei wird die Möglichkeit diskutiert, daß die Antikörper an infizierte Zellen binden, sodaß diese Zellen eliminiert werden können und eine massive Gewebeerstörung durch das Virus verhindert wird. Obwohl die Beteiligung von löslichem GP an der Pathogenese bislang unbekannt ist, ist es vorstellbar, daß es sich um einen Pathogenitäts-Faktor handelt.

Mehrere der in löslicher Form freigesetzten zellulären Transmembranproteine haben eine wichtige immunologische Bedeutung. Der lösliche IL-6 Rezeptor (IL-6R) ist in der

Lage, IL-6 zu binden, kann aber nur im Komplex mit einem 130-kDa Protein (gp130) Signaltransduktion vermitteln. Somit vermittelt der lösliche IL-6R-IL-6-Komplex über die Bindung an gp130 Signaltransduktion auch in Zellen, die kein IL-6 binden können (Müllberg et al., 1994).

Weitere Moleküle, die in die Signalvermittlung der Apoptose eingreifen, wie der Fas-Ligand, TNFR1 und TNFR2 (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 und 2) sowie CD30 wurden ebenfalls in einer löslichen Form beschrieben. In diesem Zusammenhang ist auch eine weitere mögliche Funktion des löslichen EBOV GP zu vermuten. Die Apoptose von Lymphozyten spielt für die EBOV Pathogenese ebenfalls eine wichtige Rolle. Letal verlaufende EBOV Infektionen gehen in der Regel mit einer massiven Virämie einher, die auf eine ineffektive Immunantwort zurückzuführen ist. Neueste Arbeiten haben eine mögliche Beteiligung der TNF-Rezeptor-Superfamilie bei der Apoptose der Lymphozyten während EBOV Infektion gezeigt. Hierbei wurde die Expression vom „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) auf EBOV infizierten Monozyten auch ohne Virusreplikation beschrieben (Hensley et al. 2002). Lösliches GP könnte in diesem Zusammenhang ein wichtiger Faktor sein, der Lymphozyten für eine TRAIL induzierte Apoptose ohne direkte Virusreplikation sensibilisiert. Interaktion von löslichem GP mit weiteren zellulären Rezeptoren vor allem an Makrophagen und Monozyten, die eine Induktion von Cytokinen oder anderen wichtigen Effektormolekülen auslösen, sind vorstellbar.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ebolavirus Glykoprotein (EBOV GP) ist ein Typ I Transmembranprotein, das aus den Untereinheiten GP₁ und GP₂ besteht, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die GP₂ Untereinheit trägt die Transmembranregion, über die das GP in der Zellmembran verankert vorliegt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig eine lösliche Form des Glykoproteins (GP_{1/2Δ}) identifiziert, charakterisiert und der Freisetzungsmechanismus aufgeklärt.

In Pulse-Chase-Experimenten und mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung konnte demonstriert werden, daß GP_{1/2Δ} von der Zelloberfläche proteolytisch freigesetzt wird, ein Prozeß der auch als „Shedding“ bezeichnet wird. In Oligomerisierungs-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es sich um prozessiertes GP, das als Trimer vorliegt, handelt. An isoliertem GP_{1/2Δ} konnte über die Bestimmung der Molekularmasse von 15.336 Da durch MALDI-MS die Spaltstelle an Position Asp₆₃₇ identifiziert werden.

Mit Hilfe von Proteaseinhibitoren konnte die für das GP_{1/2Δ}-Shedding zuständige Protease (Sekretase) als Zink-abhängige Metalloprotease charakterisiert werden. Hierbei konnte Sensitivität gegenüber TAPI-I, BB2516, GM6001 und 1,10-Phenanthrolin demonstriert werden. Die Beteiligung von TACE (TNF- α -convertierendes Enzym), einer α -Sekretase, an dem GP-Shedding konnte hier mit Hilfe von TACE-defizienten Mausfibroblasten gezeigt werden. Nach Cotransfektion mit TACE-cDNA konnte GP-Shedding in diesen Zellen nachgewiesen werden. Durch den Einsatz von TACE-spezifischen Anti-Sense-Oligonukleotiden konnte die GP_{1/2Δ}-Freisetzung inhibiert werden. Somit konnte hier das erste mal gezeigt werden, daß ein virales Oberflächenprotein durch eine zelluläre Protease in eine lösliche Form prozessiert wird. Weiter konnte gezeigt werden, daß lösliches GP seine Antigenität erhält und durch neutralisierende Antikörper erkannt wird. Auf Grund dieser Beobachtung kann hier eine Köder-Funktion des löslichen GP vorgeschlagen werden.

LITERATUR

- Althoff, K., Reddy, P., Voltz, N., Rose-John, S., Müllberg, J. (2000) Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor α . Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 267, 2642-2631
- Althoff, K., Müllberg, J., Aasland, D., Voltz, N., Kallen, K.-J., Grötzinger, J., Rose-Hohn, S. (2001). Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins. *Biochem. J.* 353, 663-672
- Baize, S., Leroy, E. M., Georges-Courbot, M. C., Capron, M., Lansound-Soukate, J., Debre, P., Fischer-Hoch, S. P., McCormik, J. B. and Georges, A. J. (1999). Defective humoral response and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat. Med.* 5, 423-426
- Barik, S., Rud, E. W., Luk, D., Banerjee, A. K. and Kang, C. Y. (1990). Nukleotide sequence analysis of the L gene of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype): identification of conserved domains in L proteins of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology* 175, 332-337
- Baron, R. C., McCormik, J. B., Zubeir, O. A. (1983). Ebola Virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull WHO* 61, 997-1003
- Basler, C. F., Wang, X., Mühöberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H.-D., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2000). The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *PNAS* 97 (22), 12289-12294
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K. M., McKay, D. B. (1993) Three-dimensional X-ray crystallographic structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J* 12, 3357-3364
- Becker, S., Rinne, C., Hofsass, U., Klenk, H.-D., Mühlberger, E. (1998). Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology* 249, 406-417
- Bennett, C. F., Chiang, M. Y., Chan, H., Shoemaker, J. E., Mirabelli, C. K. (1992) Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol. Pharmacol.* 41(6), 1023-1033.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 7, 1707-1715
- Bishop, N. and Woodman, P. (2001) TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 11735-11742

- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Cstner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., Cerretti, D. P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385, 729-733
- Bond, J. S., Beynon, R. J. (1995) The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci* 4 (7), 1247-1261
- Breman, J. G., Piot, P., Johnson, K. M., White, M. K., Mbuyi, M., Sureau, P., Heymann, D. L., van Nieuwenhove, S., McCormik, J. B., Ruppol, J. P., Kintoki, V., Isaäcson, M., van der Groen, G., Webb, P. A. and Ngvete, K. (1978). The epidemiology of Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. In "Ebola virus hemorrhagic fever" (S. R. Pattyn, ed.), 1st End., pp 125-127. Amsterdam, Elsevier / North-Holland
- Bukreyev, A. A., Volchkov, V. E., Blinov, V. M. and Netesov, S. V. (1993a). The VP35 and VP40 proteins of filoviruses. Homology between Marburg and Ebola viruses. *FEBS Lett.* 322, 41-46
- Bukreyev, A. A., Volchkov, V. E., Blinov, V. M. and Netesov, S. V. (1993b). The GP protein of Marburg virus contains the region similar to the immunosuppressive domain of oncogenic retroviruses P15 proteins. *FEBS Lett.* 323, 183-187
- Bukreyev, A. A., Volchkov, V. E., Blinov, V. M. and Netesov, S. V. (1995). The nucleotide sequence of the Popp (1967) strain of Marburg virus: a comparison with the Musoke (1980) strain. *Arch. Virol.* 140, 1589-1600
- Buxbaum, J. D., Liu, K.-N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., Black, R. A. (1998) Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem* 273 (43), 27765-27767
- Calain, P., Monroe, M. C. and Nichol, S. T. (1999). Ebola virus defective interfering particles and persistent infection. *Virology* 262, 114-128
- CDC (1996). Ebola-Reston virus infection among quarantined nonhuman primates – Texas, 1996. *MMWR* 45 (15), 314-316
- Chakrabatin, S., Brechling, K. and Moss, B. (1985). Vaccinia virus expression vector: Coexpression of β -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3403-3409

- Chan, S. Y., Ma M. C. and Goldsmith, M. A. (2000) Differential induction of cellular detachment by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses. *J. Gen. Virol.* 81, 2155-2159
- Chan, S. Y., Empig, C. J., Welte, F. J., Speck, R. F., Schmaljohn, A., Kreisberg, J. F., Goldsmith, M. A. (2001) Folate Receptor- α is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell* 106, 117-126
- Chung, C. T. Niemela, S. L. and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *PNAS* 86, 2172-2175
- Cianciolo, G. J., Copeland, T. J., Oroszlan, S. and Snyderman, R. (1985). Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope protein. *Science* 230, 435-455
- Dean, N. M., McKay, R., Condon, T. P. and Bennett, C. F. (1994) Inhibition of protein kinase C- α expression in human A549 cells by antisense oligonucleotides inhibits induction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA by phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 269, 16416-16424
- Dessen, A., Forest, E., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H.-D. and Weissenhorn, W. (2000). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the matrix protein from Ebola virus. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 56, 758-760
- Dri, P., Gasparini, C., Menegazzi, R., Cramer, R., Albéri, L., Presani, G., Garbisa, S., Patriarca, P. (2000) TNF-induced shedding of TNF receptors in human polymorphonuclear leukocytes: Role of the 55-kDa TNF receptor and involvement of a membrane bound and non-matrix metalloproteinase. *J. Immunol* 165, 2165-2172
- Elliott, L. H., Kiley, M. P. and McCormik, J. B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* 147, 169-176
- Elliott, L. H., Sanchez, A., Holloway, B. P., Kiley, M. P. and McCormik, J. B. (1993). Ebola protein analysis for the determination of genetic organization. *Arch. Virol.* 133, 423-436
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Cullwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124
- Esler, W. P., Wolfe, M. S. (2001). A Portrait of Alzheimer Secretases-New Features and Familiar Faces. *Science* 293, 1449-1454

- Feldmann, H., Will, C., Schikore, M., Slenczka, W. and Klenk, H.-D. (1991). Glycosilation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. *Virology* 182, 353-356
- Feldmann, H., Mühlberger, E., Randolph, A., Will, C., Kiley, M. P., Sanchez, A. and Klenk, H.-D. (1992). Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene, order and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Research* 24, 1-19
- Feldmann, H., Klenk, H.-D. and Sanchez, A. (1993). Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch. Virol. (Suppl.)* 7, 81-100
- Feldmann, H., Nichol, S. T., Klenk, H.-D., Peters, C. J. and Sanchez, A. (1994). Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein. *Virology* 199, 469-473
- Felgner, P. L., Gadeck, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Nortrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M. (1987). Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *PNAS* 84, 7413-7417
- Gallaher, W. R. (1996). Similar structural models of the transmembrane proteins of Ebola and avian sarcoma viruses. *Cell (Letter)* 85, 477-478
- Garton, K. J., Gough, P. J., Blobel, C. P., Murphy, G., Greaves, D. R., Dempsey, P. J., Raines, E. W. (2001) Tumor necrosis factor- α -converting Enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J. Biol. Chem.* 276, 37993-38001
- Gear, J. S., Cassel, G. A., Gear, A. J., Trappler, B., Clausen, L., Meyers, A. M., Kew, M. C., Bothwell, T. H., Sher, R., Miller, G. B., Schneider, J., Koornhof, H. J., Gomperts, E. D., Isaacson, M., Gear, J. H. (1975) Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br. Med. J.* 4(5995), 489-493
- Gearing, A. J. H., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., Leber, T. M., Mangan, M., Miller, K., Nayee, P., Owen, K., Patel, S., Thomson, W., Wells, G., Wood, L. M., Woolley, K. (1994) Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* 370, 555-557
- Garnier, L., Wills, J. W., Verderamer, M. F., Sudol, M. (1996). WW domains and retrovirus budding. *Nature* 38, 744-745
- Geisbert, T. W. and Jahrling, P. B. (1995). Differentiation of Filoviruses by electron microscopy. *Virus Research* 39, 129-150

- Geisbert, T. W., Hensley, L. E., Gibbo, T. R., Steele, K. E., Jaax, N. K. and Jahrling, P. B. (2000). Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses. *Lab. Invest.* 80, 171-186
- Geyer, H., Will, C., Feldmann, H., Klenk, H.-D. and Geyer, R. (1992). Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein. *Glycobiology* 2, 299-312
- Glaser, K. B., Pease, L., Li, J., Morgan, D. W. (1999). Enhancement of the surface expression of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) but not the p55 TNFalpha receptor in the THP-1 monocytic cell line by matrix metalloprotease inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 57(3), 291-302.
- Gliniak, B. and Kabat, D. (1989). Leukemogenic membrane glycoprotein encoded by Friend Spleen Focus-forming virus: Transport to cell surface and shedding are controlled by ddisulfide-bonded dimerization and by cleavage of a hydrophobic membrane anchor. *J. Virol.* 63 (9), 3561-3568
- Graeve, L., Garreis-Wabnitz, C., Zauke, M., Breindl, M., Kruppa, J. (1986). The soluble glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus is formed during or shortly after the translation process. *J. Virol.* 57 (3), 968-975
- Grünberg, J., Kruppa, A., Paschen, P. and Kruppa, J. (1991). Intracellular formation of two soluble glycoproteins in BHK cells infected with Vesicular Stomatitis virus serotype New Jersey. *Virology* 180, 678-686
- Gullberg, U., Lantz, M., Lindvall, L., Olsson, I., Himmler, A. (1992) Involvement of an Asn/Val cleavage site in the production of a soluble form from of human tumor necrosis factor (TNF) receptor: site directed mutagenesis of a putative cleavage site in the p55 TNF receptor chain. *Eur. J. Cell Biol.* 58, 307-312
- Gupta, M., Mahanty, S., Ahmed, R. and Rollin, P. E. (2001). Monocyte-driven human macrophages and peripheral blood mononuclear cells infected with Ebola Virus secrete MIP-1 α and TNF- α and inhibit poly-IC-induced IFN- α in vitro. *Virology* 284, 20-25
- Harty, R. N., Paragas, J., Sudol, M. and Palese, P. (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 (4), 2921-2929

- Harty, R. N., Brown, M. E., Wang, G., Huibregste, J. and Hayes, F. P. (2000). A PPXY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: Implications for filovirus budding. *PNAS* 97 (25), 13871-13876
- Hayes, C. G., Burans, J. P., Ksiazek, T. G., Del Rosario, R. A., Miranda, M. E. G., Monaloto, C. R., Barrientos, A. B., Robles, C. G., Dayrit, M. M., Peters, C. J. (1992). Outbreak of fatal illness among captive macaques in the Philippines caused by Ebola-related filovirus. *An. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 664-671
- Hensley, L. E., Young, H. A., Jahrling, P. B., Geisbert, T. G. (2002) Proinflammatory response during Ebola virus infection of primate models: possible involvement of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunol Letters* 80, 169-179
- Hooper, N. M., Karran, E. H. and Turner, A. J. (1997) Membrane protein secretases. *Biochem. J.* 321, 265-279
- Jahrling, P. B., Geisbert, T. W., Dalgard, D. W., Johnson, E. D., Ksiazek, T. G., Hall, W. C., Peters, C. J. (1990). Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet* 335, 502-505
- Jahrling, P. B., Geisbert, T. W., Jaax, N. K., Hanes, M. A., Ksiazek, T. G. and Peters, C. J. (1996). Experimental infection of cynomolgus macaques with Ebola-Reston filoviruses from the 1989-1990 U.S. epizootic. *Arch. Virol.* (Suppl.) 11, 115-134
- Kahn, J., Ingraham, R. H., Shirley, F., Migaki, G. I., Kishimoto, T. K. (1994) Membrane proximal cleavage of L-selectine: identification of the cleavage site and a 6 kD transmembrane peptide fragment of L-selectine. *J Cell Biol.* 125, 461-470
- Katzmann, D. J., Babst, M. and Emr, S. D. (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145-155
- Kiley, M. P., Wilusz, J., McCormik, J. B. and Keene, J. D. (1986). Conservation of the 3' terminal nucleotide sequence of Ebola and Marburg virus. *Virology* 149, 251-254
- Kiley, M. P., Cox, N. J., Elliott, L. H., Sanchez, A., DeFries, R., Buchmeier, M. J., Richman, D. and McCormick, J. B. (1988). Physicochemical properties of Marburg virus: evidence for three distinct virus strains and their relationship to Ebola virus. *J. Gen. Virol.* 69, 1957-1967

- Kiley, M. P., Bowen, E. T. W., Eddy, G. A., Isaacson, M., Johnson, K. M., McCormik, J. B., Murphy, F. A., Pattyn, S. R., Peters, D., Prozesky, O. W., Regnery, R. L., Simpson, D. I. H., Slenczka, W., Sureau, P., van der Groen, G., Webb, P. A., Wulff, H. (1982). Filovoridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? *Intervirology* 18, 24-32
- Killar, L., White, J., Black, R., Peschon, J. (1999) Adamalysins. A family of metzincins including TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Ann N Y Acad Sci* 878, 442-452
- Kimberly, W. T., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J. (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J. Biol. Chem.* 275 (5) 3173-3178
- Kodato, J., Coancio, G. J. and Snyderman, R. (1991). A synthetic peptide homologous to retroviral transmembrane envelope proteins depress protein kinase C mediated lymphocyte proliferation and directly inactivated protein kinase C: a potential mechanism for immunosuppression. *Microbiol. Immunol.* 35, 443-459
- Kolakofsky, R. E., Blumberg, B. M. (1982). A model for the control of non-segmented negative strand virus genome replication. In Mahy B. W. J., Minson A. C., Darby G. K. (ed.), Virus persistence symposium 33. Society for General Microbiology Ltd. Cambridge University Press, pp 203-213
- Kolesnikova, L., Bugany, H., Klenk, H.-D., Becker, S. (2002). VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment. *J. Virol* 76 (4), 1825-1838
- Kriegler, M., Perez, C., De Fay, K., Albert, I., Lu, S. D. (1988) A novel form of TNF/cachetin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53, 45-53
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasikonowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F. (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *PNAS* 96, 3922-3927
- Lefkowitz, E. J., Pattnaik, A. K. and Ball, L. A. (1990). Complementation of a vesicular stomatitis virus glycoprotein G mutant with wild type protein expressed from either a bovine papilloma virus or a vaccinia virus vector system. *Virology* 178, 73-83

- LeGueno, B., Formentry, P., Wyers, M., Gounon, P., Walker, F. and Boesch, C. (1995). Isolation and partial characterization of a new strain of Ebola virus. *Lancet* 345, 1271-1274
- Malvoisin, E. and Wild, F. (1994). Characterization of a secreted form of measles virus haemagglutinin expressed from a vaccinia virus recombinant. *J. Gen. Virol* 75, 3603-3609
- Martin-Serrano, J., Zang, T., Bieniasz, P. D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* 7(12), 1313-1319
- Maruyama, T., Rodriguez, L. L., Jahrling, P. B., Sanchez, A., Khan, A. S., Nichol, S. T., Petres, C. J., Parren, P. W. and Burto, D. R. (1999). Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection. *J. Virol.* 73, 6024-6030
- McKay, R., Miraglia, L., Cummins, L., Owens, S., Sasmor, H. and Dean, N. M. (1999) Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitors of human PKC- α expression. *J. Biol. Chem.* 274 (3), 1715-1722
- Modrof, J., Moritz, C., Kolesnikova, L., Konakova, T., Hartlieb, B., Randolph, A., Mühlberger, E., Becker, S. (2001). Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. *Virology* 287, 171-182
- Mohler, K. M., Sleath, P. R., Fitzner, J. N., Cerretti, D. P., Alderson, M., Kerwar, S. S., Torrance, D. S., Otten-Evans, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K., Kronheim, S. R., Petersen, M., Gerhart, M., Kozlosky, C. J. March, C. J., Black, R. A. (1994) Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumor necrosis factor processing. *Nature* 370, 218-220
- Morgan, E. M. (1991). Evolutionary relationships of paramyxoviruses nucleocapsid associated proteins. In "The Paramyxoviruses" (D.W. Kingsburg, ed.), pp 163-179. Plenum Press, New York
- Morimoto, K., Iwatani, Y. and Kawai, A. (1993). Shedding of Gs protein (a soluble form of the viral glycoprotein) by the Rabies virus-infected BHK-21 cells. *Virology* 195, 541-549

- Morvan, J. M., Deubel, V., Gounon, P., Nakoune, E., Barriere, P., Murrin, S., Perpete, O., Selekon, B., Coudrier, D., Gautier-Hion, A., Colyn, M. and Volchkov, V. (1999). Identification of Ebola virus sequences present as RNA or DNA in organs of terrestrial small mammals of the Central African Republic. *Microbes. Infect.* 1, 1193-201
- Müllberg, J., Oberthür, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P. C., Rose-John, S. (1994). The soluble Human IL-6 receptor: Mutational Characterization of the proteolytic cleavage site. *J. Immunol.* 152, 4958-4968
- Mühlberger, E., Sanchez, A., Randolph, A., Will, C., Kiley, M. P., Klenk, H.-D. and Feldmann, H. (1992). The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses. *Virology* 187, 534-547
- Mühlberger, E., Trommer, S., Funke, C., Volchkov, V. E., Klenk, H.-D. and Becker, S. (1996). Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Virology* 223, 376-380
- Mühlberger, E., Lotfering, B., Klenk, H.-D. and Becker, S. (1998). Three of the four nucleoproteins of Marburg virus, NP, VP35 and L are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific minigenomes. *J. Virol.* 72, 8756-8764
- Mühlberger, E., Weik, M., Volchkov, V. E., Klenk, H.-D. and Becker, S. (1999) Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg and Ebola virus by using artificial replication systems. *J. Virol.* 73, 2333-2342
- Nagase, H. (1996) Matrix Metalloproteinases *In* Zinc Metalloproteinases in Health and Disease, Hooper, N. M., ed, Taylor and Francis, London pp 153-204
- Netesv, S. V., Feldmann, H., Jahrling, P. B., Klenk, H.-D., Sanchez, A. (2000) *In* Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (book). M.H.V. van Regenmortel, 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, R.B. Wickner. Virus Taxonomy, VIIth report of the ICTV. Academic Press, SanDiego, Part Three Description of Virus Taxa, p 539-548
- Neumann, G., Feldmann, H., Wantanabe, S., Lukahevich, I., Kawaoka, Y. (2002) Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J. Virol.* 76, 406-410

- Parren, P. W., Poignard, P., Ditzel, H. J., Williamson, R. A. and Burton, D. R. (2000). Antibodies in human infectious disease. *Immunol. Res.* 21, 265-278
- Parren, P. W., Geisbert, T. W., Maruyama, T., Jahrling, P. B., Burton, D. R. (2002). Pre- and Postexposure Prophylaxis of Ebola Virus Infection in an Animal Model by Passive Transfer of a Neutralizing Human Antibody. *J. Virol.* 76, (2) 6408-6412
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., Black, R. A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282, 1281-1284
- Peters, C. J., Johnson, E. D. and McKee, K. T. (1991). Filoviruses and management and viral haemorrhagic fevers. In "Textbook of human virology" (R. B. Belshe, ed.), pp 699-712, Mosby Year Book, St Louis.
- Peters, C. J., Johnson, E. D., Jahrling, P. B., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., White, J., Hall, W., Trotter, R., Jaax, N. (1993) Filovirus. In "Emerging viruses" (S. S. Morse, ed), pp 159-175. Oxford University Press.
- Peters, C. J., Sanchez, A., Feldmann, H., Rollin, P. E., Nichol, S. T. and Ksiazek, T. G. (1994). Filoviruses as emerging pathogens. *Seminars in Virology* 5, 147-154
- Peters, C. and Khan, A. S. (1999). Filovirus diseases, pp 85-95. In H.-D. Klenk (ed.), Marburg and Ebola viruses; Curr. Top. Microbiol. 235; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J., Black, R. A. (2000) Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 275 (19), 14608-14614
- Regnery, R. L., Johnson, K. M. and Kiley, M. P. (1980). Virion nucleic acid of Ebola virus. *J. Virol.* 36, 465-469
- Richman, D. D., Cleveland, P. H., McCormick, J. B. and Johnson, K. M. (1983). Antigenic analysis of strains of Ebola viruses: identification of two Ebola virus subtypes. *J. Infect. Dis.* 147, 268-271
- Roberts, S. R., Lichtenstein, D., Ball, L. A. and Wertz, G. W. (1994). The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J. Virol.* 68 (7), 4538-4546

- Roghani, M., Becherer, J. D., Moss, M. L., Atherton, R. E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R. K., Weskamp, G., Tempst, P., Blobel, C. P. (1999) Metalloprotease-disintegrin MDC9: Intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 274, (6) 3531-3540
- Rosendahl, M. S., Ko S. C., Long, D. L., Brewer, M. T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S. M., Moreland, J., Meyers, M. A., Kohn, T., Lyons, D., Lichenstein, H. S. (1997) Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J. Biol. Chem.* 272 (39), 24588-24593
- Ruigrok, R. W., Schoehn, G., Dessem, A., Forest, E., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H.-D. and Weissenhorn, W. (2000). Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J. Mol. Biol.* 300, 103-112
- Ryabchikova, E. I., Kolesnikova, L. V., Tkachev, V. K., Pereboeva, L. A., Baranova, S. G. and Rassadkin, J. N. (1994a). Ebola infection in four monkey species. Ninth International Conference on Negative Strands RNA Viruses, p 164. Estoril, Portugal
- Ryabchikova, E. I., Vorontsova, L. A., Skripchenko, A. A., Shestopalov, A. M. and Sandakchiev, L. S. (1994b). The peculiarities of internal organs damage in experimental animal infected with Marburg disease virus. *Bull. exp. Biol. Med.* 4, 430-434
- Ryabchikova, E. I., Kolesnikova, L., Smolina, M., Tkachev, V., Pereboeva, L., Baranova, S., Grazhdantseva, A., Rassadkin, Y. (1996). Ebola virus infection in guinea pigs: Presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. *Arch. Virol.* 141, 909-921
- Sanchez, A., Kiley, M. P., Holloway, B. P. and Auperin, D. D. (1993). Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Research* 29, 215-240
- Sanchez, A., Feldmann, H. (1996). Detection of Marburg and Ebola virus infections by polymerase chain reaction assay. In "Frontiers in Virology-Diagnosis of Human viruses by Polymerase Chain Reaction Technology" (Y. Becker and G. Darai, eds.), 2nd Ed., pp. 411-418. Springer-Verlag. New York

- Sanchez, A., Yang, Z. Y., Xu, L., Nabel, G.J., Crews, T. and Peters, C. J. (1998). Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J. Virol.* 72, 6442-6447
- Sanderson, C. M., McQueen, N. L., Nayak, D. P. (1992). Sendai virus assembly: M protein binds to viral glycoproteins in transit through the secretory pathway. *J. Virol.* 67, 651-663
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74, 5463-5467
- Schnittler, H. J., Mahner, F., Drenckhahn, D., Klenk, H.-D. and Felmann, H. (1993). Replikation of Marburg virus in human endothelial cells. A possible mechanism for the development of viral hemorrhagic disease. *J. Clin. Invest.* 91, 130-1309
- Siegert, R., Shu, H. L., Slenczka, W., Peters, D. and Müller, G. (1967). Detection of the so-called green monkey agent. proc. IV Congreso Latinamericano de Mikrobiologia, Lima, Peru, Nov. 26-Dec 2.
- Simmons, G., Wool-Lewis, R. J., Baribaud, F., Netter, R. C., Bates, P. (2001) Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence. *J. Virol.* 76, 2518-2528
- Slenczka, W. G. (1999). The Marburg virus outbreak of 1967 and subsequent episodes, pp 49-75. In H.-D. Klenk (ed.), Marburg and Ebola viruses, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 235, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Smith, D. H., Johnson, B. K., Isaacson, M., Swanapoel, R., Johnson, K. M., Killey, M., Bagshawe, A., Siongok, T., Keruga, W. K. (1982) Marburg-virus disease in Kenya. *Lancet.* 1 (8276), 816-820
- Solorzano, C. C., Ksontini, R., Pruitt, J. H., Auffenberg, T., Tannahill, C., Galardy, R. E., Schultz, G. P., MacKay, S. L., Copeland, E. M. 3rd, Moldawer, L. L. (1997). A matrix metalloproteinase inhibitor prevents processing of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and abrogates endotoxin-induced lethality. *Shock* 7 (6), 427-431
- Stone, A. L., Kroeger, M., Sang, Q. X. A. (1999) Structure – Function analysis of the ADAM family of disintegrin- like and metalloproteinase-containing proteins (Review) *J. Prot. Chem.* 18 (4), 447-465
- Ströher, U., West, E., Bugany, H., Klenk, H.-D., Schnittler, H.-J. and Feldmann, H. (2001). Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola Viruses. *J. Virol.* 75 (22), 11025-11033

- Sudol, M. (1996). The WW module competes with SH3 domain? *Trends Biochem Sci* 21 (5), 161-163
- Sureau, P. H. (1989). Firsthand clinical observations of hemorrhagic manifestation in Ebola hemorrhagic fever in Zaire. *Rev. Infect. Dis.* 11, 790-793
- Swanepoel, R., Leman, P. A., Burt, F. J., Zachariades, N. A., Braack, L. E., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Zaki, S. R. and Peters, C. J. (1996). Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 321-325
- Takada, A., Robison, C., Goto, H., Sanchez, A., Murti, K. G., Whitt, M. A. and Kawaoka, Y. (1997). A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *PNAS* 94, 14764-14769
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *PNAS* 76, 615-619
- Volchkov, V. E., Blinov, V. M. and Netesov, S. V. (1992). The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive like domain similar to oncogenic retrovirus. *FEBS Lett.* 305, 181-184
- Volchkov, V. E., Blinov, V. M., Kotov, A. N., Chepurinov, A. A. and Netesov, S. V. (1993). The full-length nucleotide sequence of the Ebola virus. IXth International Congress of Virology, Glasgow, Scotland, p 52-2
- Volchkov, V. E., Becker, S., Volchkova, V. A., Ternovoj, V. A., Kotov, A. N., Netesov, S. V. and Klenk, H.-D. (1995). GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology* 214, 421-430
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Eckel, C., Klenk, H.-D., Bouloy, M., LeGuenno, B. and Feldmann, H. (1997). Emerging of subtype Zaire Ebola virus in Gabon. *Virology* 232, 139-144
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Chepurinov, A. A., Blinov, V. M., Dolnik, O., Netesov, S. V. and Feldmann, H. (1999). Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J. Gen. Virol.* 80, 355-362.
- Volchkov, V. E., Feldmann, H., Volchkova, V. A. and Klenk, H.-D. (1998a). Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *PNAS* 95, 5762-5767
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Slenczka, W., Klenk, H.-D. and Feldmann, H. (1998b). Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection. *Virology* 245, 110-119

- Volchkov, V. E., Cheprunov, A. A., Volchkova, V. A., Ternovoj, V. A. and Klenk, H.-D. (2000). Molecular characterization of guinea pig-adapted Ebola virus variants. *Virology* 277, 147-155
- Volchkova, V. A., Feldmann, H., Klenk, H.-D. and Volchkov, V. E. (1998). The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer. *Virology* 250, 408-414
- Volchkova, V. A., Klenk, H.-D. and Volchkov, v. E. (1999). Delta-Peptide is the carboxy-terminal fragment of the nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus. *Virology* 265, 164-171
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Mühlberger, E., Kolesnikova, L. V., Weik, M., Dolnik, O., Klenk, H.-D. (2001) Recovery of infectious Ebola virus from complementary DAN: RNA Editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* 291, 1965-1969
- Werb, Z. and Yang, Y. (1998) A cellular striptease act. *Science* 282, 1279-1280
- WHO (1992). Viral hemorrhagic fever in imported monkeys. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 67, 42-143
- WHO (1995a). Ebola hemorrhagic fever . *Wkl. Epidemiol. Rec.* 70, 241-248
- WHO (1999a). Marburg fever, Democratic Republic of the Congo. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 74, 145
- WHO (1999b). Viral hemorrhagic fever / Marburg, Democratic republic of the Congo. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 74, 157-158
- WHO (2001). Outbreak of Ebola haemorrhagic fever, Uganda, August 2000 – January 2001. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 76, 41-48
- Wilson, J. A., Hevey, M., Bakken, R., Guest, S., Bray, M., Schmaljohn, A. L. and Hart, M. K. (2000). Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science* 287, 1664-1666
- Wong, S. T., Winchell, L. F., McCune, B. K., Earp, H. S., Teixido, J., Massague, J., Herman, B., Lee, D. C. (1989) The TGF-alpha precursor expressed on the cell surface binds to the EGF receptor on adjacent cells, leading to signal transduction. *Cell* 56, 495-506
- Wool-Levis, R. J. and Bates, P. (1999). Endoproteolytic processing of the Ebola virus envelope glycoprotein: cleavage is not required for function. *J. Virol.* 73, 1419-1426

- Yamamoto, S., Higuchi, Y., Yoshiyama, K., Shimizu, E., Ktaoka, M., Hijiya, N., Matsuura, K. (1999). ADAM family proteins in the immune system. *Immunol. Today* 20 (6), 278-284
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashler, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L., Gurney, M. E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature* 402, 533-537
- Yang, Z., Delgado, R., Xu, L., Todd, R. F., Nabek, E. G., Sanchez, A. and Nabel, G. J. (1998). Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science* 279, 1034-1036
- Yang, Z.-Y., Duckers, H. J., Sullivan, N. J., Sanchez, A., Nabel, E., Nabel, G. J. (2000) Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nature Medicine* 8, 886-889
- Zaki, S. R., Peters, C. J. (1997). Viral hemorrhagic fevers. In "The Pathology of infectious Diseases" (D. H. Connor, F. W. Chnadler, D. A. Schwartz, H. J. Manz, E. E. Lack, Eds.). Chap. 37, pp 347-364. Appleton and Lange, Norwalk, CT.

IX. ABKÜRZUNGEN

AA	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
a. bidest.	<i>aqua bidestillata</i>
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Ci	Curie
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i> , alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
C-terminal	carboxyterminal
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
def	deficient
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreitol
EBOV	Ebolavirus
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GP	Glykoprotein
h	Stunde
H	Hämagglutinin
HeLa	Zelllinie eines humanen Cervixcarzinoms (Henrietta Lacks)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
ICTV	Internationales Komitee zur Taxonomie von Viren
Ig G	Immunglobulin G

Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kD	Kilo-Dalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertoni Medium
LMP	<i>low melting point</i>
m	Milli-
M	mol/l (molar)
μ	Mikro-
mA	Milliamper
MBGV	Marburgvirus
min	Minuten
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	messenger RNA
n	Nano-
NaAc	Natriumacetat
Nm	Nanometer
NNS RNA Viren	nichtsegmentierte, Negativstrang-RNA-Viren
NP	Nukleoprotein
NP40	Nonidet P40
Ns-Protein	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leseramen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P-Protein	Phosphoprotein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pfu	<i>plaque forming unit</i> , Plaque bildende Einheit
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (-log(c[H ⁺]))
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
r-ATP	Ribonukleotid –Adenosintriphosphat
RF	<i>reading frame</i> , Leserahmen
RNA	Ribonukleinsäure
rmp	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
S	Schwefel
sec	Sekunde
SFFV	<i>spleen focus-forming virus</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat
sGP	<i>small glycoprotein</i>
s.o.	siehe oben
ss	einzelsträngig
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Natriumacetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumor necrose factor alpha
TRIAL	
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>Transformation and storage solution</i>
U	unit, Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP	virales Strukturprotein
vRNA	virale Ribonukleinsäure
VSV	Vesikuläres-Stomatitis-Virus
VT	Volumenteil
v/v	Volumen pro Volumen (in Prozent)
WHO	<i>World Health Organization</i>
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (in Prozent)
w/w	Gewicht pro Gewicht (in Prozent)

Abkürzungen der Aminosäuren:

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

A. Veröffentlichungen:

Volchkov, V.E., Volchkova, V. A., Chepurnov, A., Blinov, V. M., Dolnik, O., Netesov, V. E., Feldmann, H. (1998) Characterization of the L gene and 5'-trailer region of Ebola virus. *J. Gen. Virol.* 80, 355-362.

Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Ströher, U., Becker, S., Dolnik, O., Cieplik, M., Garten, W., Klenk, H.-D., Feldmann, H. (2000) Proteolytic Processing of Marburg Virus Glycoprotein. *Virol* 268, 1-6

Ruigrok, R. W., Schoehn, G., Dessem, A., Forest, E., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H.-D. and Weissenhorn, W. (2000). Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J. Mol. Biol.* 300, 103-112

Dessen, A., Forest, E., Volchkov, V, Dolnik, O., Klenk, H.-D. and Weissenhorn, W. (2000). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the matrix protein from Ebola virus. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 56, 758-760

Dessen, A., Volchkov, V. E., Dolnik, O., Klenk, H.-D., Weissenhorn, W. (2000) Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *EMBO J* 19 (16), 4228-4236

Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Mühlberger, E., Kolesnikova, L. V., Weik, M., Dolnik, O., Klenk, H.-D. (2001) Recovery of infectious Ebola virus from complementary DAN: RNA Editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* 291, 1965-1969

Dolnik, O., Volchkova, V. A., Garten, W., Becker, S., Kahnt, J., Ströher, U., Klenk, H.-D., Volchkov, V. E. Shedding of Ebola Virus Glycoprotein Ectodomain by TNF- α -Converting Enzyme TACE. In Press

B. Präsentationen:

Dolnik, O., Feldmann, H., Volchkova, V. A., Klenk H.-D., Volchkov, V. E. (1998). Untersuchungen zur Membranassoziation von VP40 des Ebolavirus. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 1998 in Regensburg; 148 (Abstract)

Dolnik, O., Feldmann, H., Volchkova, V. A., Klenk, H.-D., Volchkov, V. E. (1998). Membrane association of the Ebola virus structural protein VP40. German-Japanese Symposium; Viral and host factors as determinants of virus pathogenicity; May 11-14, 1998 Marburg

Dolnik, O., Feldmann, H., Klenk, H.-D., Volchkov, V. E. (1999) Membrane association of Ebola virus proteins. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Bremen. 2P 20

Dolnik, O., Klenk, H.-D., Volchkova, V. A., Volchkov, V. E. (2000) Shedding of the Ebola virus glycoprotein from the cell surface. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2000 in Wien. 6 P12

Dolnik, O., Klenk, H.-D., Volchkova, V. A. and Volchkov, V. E. (2000) Shedding of the Ebola virus glycoprotein from the cell surface. 11th International conference on negative strand viruses in Quebec, Kanada. 178 (Abstract)

Dolnik, O., Klenk, H.-D., Volchkova, V. A. and Volchkov, V. E. (2000) Shedding of the Ebola virus glycoprotein from the cell surface. Symposium on Marburg and Ebola viruses in Marburg. P 48 Abstract 2

Dolnik, O., Klenk, H.-D., Volchkova, V. A. and Volchkov, V. E. (2002) Involvement of TNF- α -converting enzyme TACE in Ebola virus glycoprotein ectodomain shedding. Fourth Workshop on intracellular Transport and maturation of proteins in Marburg. p 19 (Abstract)

Dolnik, O., Klenk, H.-D., Volchkova, V. A. and Volchkov, V. E. (2002) Involvement of TNF- α -converting enzyme TACE in Ebola virus glycoprotein ectodomain shedding. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Erlangen. p 237 (Abstract)

Dolnik, O., Klenk, H.-D., Volchkova, V. A. and Volchkov, V. E. (2002) Involvement of TNF- α -converting enzyme TACE in Ebola virus glycoprotein ectodomain shedding. XIIth International Congress of Virology in Paris. V-365 (Abstract)

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Olga Dolnik
Geburtsdatum	07.02.1970
Geburtsort	Datschitz (Tschechische Republik)
Familienstand	ledig
Eltern	Oldrich und Maria Dolnik geb. Danhel
Geschwister	Peter Dolnik geboren am 01.01.1972

Schulbildung

Sept.1976 - Juni.1983	Volksschule in Teltsch (Tschechische Republik)
Sept.1983 - Nov.1983	Hauptschule in Traisen (Österreich)
Dez.1983 - Mai 1990	Gymnasium der Internationalen Gesamtschule in Heidelberg (IGH)
Mai 1990	Abitur am Gymnasium der IGH

Berufsausbildung

Apr.1991 - Mär.1993	Lehranstalt für MTA an der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg
März 1993	Staatsexamen zur MTA

Hochschulausbildung

Okt.1993 - Jul.1998	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg, Hauptfach Virologie
Sep.1997 – Jul.1998	Diplomarbeit am Institut für Virologie an der Philipps-Universität in Marburg bei PH Dr.H.Feldmann und Dr.V.Volchkov zum Thema:“Molekulare Interaktionen von VP40 mit zellulären Membranen und anderen viralen Proteinen des Ebolavirus“
Juli 1998	Diplom im Fach Humanbiologie
Sep.1998 - Sep.2002	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. H.-D. Klenk

Berufliche Tätigkeit

Apr.1993 - Sept.1993	Tätig als MTA im Labor Dr. Limbach und Kollegen in der Abteilung für Hepatitis- und HIV-Diagnostik
Seit Sep.1998	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Aurich, Beato, Becker, Brandis-Heep, Buckel, Elbel, Elsässer, Feldmann, Feuser, Frenking, Fruhstorfer, Garten, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Herrler, Kern, Klenk, Knöller, Koolmann, Löffler, Lührmann, Müller, Niessing, Perst, Risau, Röhm, Schäfer, Seitz, J., Seitz, K.-A., Slenczka, Steininger, Steinmetz, Suske, Thauer, von Löw, Voigt, Waßmuth

Auf diesem Wege möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk für die Überlassung des Dissertationsthemas, sein stetes Interesse, seine fortwährende Unterstützung sowie Diskussionsbereitschaft während meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. V. Volchkov für die gute Zusammenarbeit, seine wertvollen Anregungen und wissenschaftliche Förderung.

Herrn Dr. S. Becker für seine Mühe und Hilfsbereitschaft, die er sich bei meinem Einlernen im S4-Labor gemacht hatte.

Herren Prof. Dr. W. Garten für hilfreiche Anregung bei der Massenbestimmung.

Herrn Hanno Scheffczik für seinen Einsatz und Unterstützung an der FPLC.

Herrn Jörg Kant für seinen Hilfe bei der MALDI-TOF Messung.

Frau Carina Laukel für die zuverlässige Zellkulturhaltung und ein besonders gutes Laborklima.

Frau Ina Kraus und Simone Kiermayer für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern des Instituts für die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre sowie bei allen, die mir mit Rat und Tat bei der Lösung anfallender Probleme geholfen haben.

Besonders herzlich danke ich meinen Eltern für Ihre stete Unterstützung und Förderung.

Ein besonders liebes Dankeschön gilt meinem Partner und Weggefährten Bernd Hildebrand.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich,
daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg
zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Freisetzung des Membranglykoproteins des Ebolavirus durch die zelluläre Protease TACE

am Medizinischen Zentrum für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
mit Medizinal-Untersuchungsamt der Philipps-Universität Marburg,
Abteilung Virologie, unter Leitung von Prof. Dr. H.-D. Klenk
mit Unterstützung von

Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk und Herrn Prof. Dr. V. E. Volchkov
selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation
aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

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

Marburg, 26. September 2002

Olga Dolnik