

Molekularbiologische Untersuchungen der Ebola-Viren Zaire und Reston mit Hilfe reverser Genetik

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Yannik Boehmann
aus Straßburg, Frankreich

Marburg/Lahn 2003

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

Erstgutachter _____
Zweitgutachter _____
Tag der mündlichen Prüfung am _____

1. Einleitung	1
1.1 Das Ebola Virus (EBOV)	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Natürliches Reservoir	4
1.1.4 Übertragung	5
1.1.5 Klinischer Verlauf der Erkrankung	5
1.1.6 Therapie und Prophylaxe	6
1.2 Molekularbiologie	7
1.2.1 Morphologie des Virions	7
1.2.2 Genomstruktur	7
1.2.3 Proteine	9
1.2.3.1 Nukleokapsidproteine	9
1.2.3.2 Matrixprotein	10
1.2.3.3 Membranproteine	10
1.2.4 Transkription und Replikation	12
1.3 Inaktivierung	12
1.4 Das Ebolavirus-Reston	13
1.5 Reverse Genetik und spezifisches EBOV Minigenomsystem	13
1.6 Problemstellung dieser Arbeit	15
2. Methoden	17
2.1 Extraktion und Reinigung von DNA	17
2.1.1 Chloroform/Phenol-Extraktion	17
2.1.2 Ethanol-Fällung von DNA	17
2.1.3 Reinigung von DNA-Fragmenten >100bp	17
2.1.4 Präparatives Gel	17
2.2 Analyse von DNA	18
2.2.1 Quantitative DNA-Bestimmung	18
2.2.2 Analytisches Gel	18
2.2.3 Automatische Sequenzierung von DNA mit ABI Prism™	18
2.3 Vervielfältigung von DNA	19
2.3.1 Amplifikation spezifische DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	19
2.3.2 Plasmidgewinnung aus Bakterien	20
2.3.2.1 Miniprep	20

2.3.2.2	Maxiprep.....	21
2.4	Modifikation und Klonierung von DNA.....	21
2.4.1	Ortsgerichtete in vitro Mutagenese bis zu 5 Nukleotiden.....	21
2.4.2	Ortsgerichtete in vitro Mutagenese von mehr als 5 Nukleotiden.....	22
2.4.3	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen.....	22
2.4.3.1	Präparativer Verdau.....	22
2.4.3.2	Analytischer Verdau.....	23
2.4.4	Dephosphorylierung von DNA.....	23
2.4.5	Ligation von DNA-Fragmenten in vektorielle DNA.....	23
2.4.6	Klonierung mit Hilfe des Topo TA Cloning® Kit.....	24
2.5	Extraktion und Isolierung von RNA.....	24
2.5.1	Extraktion von RNA.....	24
2.5.2	Isolierung von RNA.....	25
2.5.2.1	Isolierung von transkribierter mRNA.....	25
2.5.2.2	Isolierung von replizierter RNA.....	26
2.6	Analyse von RNA.....	26
2.6.1	Quantifizierung von RNA.....	26
2.6.2	Agarose-Elektrophorese von RNA.....	26
2.6.3	Northen-Blot-Analyse von RNA.....	27
2.6.4	Prähybridisierung und Hybridisierung von membrangebundenen RNA.....	27
2.6.5	Nachweis von membrangebundene RNAs durch DIG-markierten RNA-Sonden.....	28
2.7	Modifikation von RNA.....	28
2.7.1	Reversetranskription von RNA (RT-PCR).....	28
2.7.2	Herstellung einer DIG markierten RNA-Sonde.....	29
2.7.3	RNA-Ligation.....	30
2.7.4	RACE.....	30
2.7.4.1	5'RACE.....	31
2.7.4.2	3'RACE.....	31
2.8	Transfektion von eukariontische Zellen mit Plasmid-DNA.....	33
2.8.1	Transfektion von Hela-Zellen mit Lipofektin®-Reagenz.....	33
2.8.2	Transfektion von HUH-T7-Zellen bzw. BSR-T7/5-Zellen mit Fugene®.....	33
2.9	Transformation von Bakterien.....	34
2.9.1	Transformation von Z-kompetenten Bakterien.....	34
2.9.2	Hitzeschocktransformation von Bakterien.....	34

2.10	Infektion von HeLa-Zellen mit dem MVA-T7-Virus	35
2.11	Herstellung von Z-kompetenten Bakterien	35
2.12	Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität (CAT)	35
2.13	Immunfluoreszenz	36
3.	Material	38
3.1	Molekularbiologie	38
3.1.1	Plasmide	38
3.1.2	Nukleinsäuren	38
3.1.3	Oligonukleotide	38
3.1.4	Enzyme	44
3.1.4.1	Restriktionsendonukleasen	44
3.1.4.2	Sonstige Enzyme	45
3.2	Kits	45
3.3	Zellmaterial	46
3.3.1	Zellen	46
3.3.1.1	Prokaryonten	46
3.3.1.2	Eukaryonten	46
3.3.2	Nährmedien	46
3.3.2.1	Nährmedien für Bakterien	46
3.3.2.2	Nährmedien für Säugerzelllinien	47
3.4	Viren	47
3.5	Antikörper	47
3.6	Radioaktivität	47
3.7	Chemikalien	47
3.8	Lösungen	50
3.9	Puffer	51
3.10	Geräte	53
3.11	Verbrauchsmaterialien	54
4.	Ergebnisse	55
4.1	Sequenzierung des EBOV-Reston-Pennsylvania Genoms	55
4.1.1	5'RACE zur Bestimmung des exakten 5'-Endes des Genoms des	

	EBOV-Reston.....	56
4.1.2	Bestimmung der exakten Sequenz der Leader-Region des EBOV-Reston Genoms.....	57
4.2	Vergleich des EBOV-Reston-Genom mit den Genomen von EBOV-Zaire und MBGV.....	58
4.2.1	Nukleinsäure Vergleich.....	58
4.2.2	Aminosäure Vergleich.....	59
4.2.3	Vergleich der Leader- und der Trailer-Region.....	59
4.2.4	Vergleich der Transkriptionsstartsignale.....	62
4.2.5	Vergleich der Transkriptionsstoppsignale.....	62
4.2.6	Vergleich der intergenischen Regionen.....	63
4.3	Klonierung der Nukleokapsidproteingene des EBOV-Reston.....	64
4.3.1	Klonierung des NP-Gens.....	64
4.3.2	Klonierung des VP35-und VP30-Gens.....	65
4.3.3	Klonierung des L-Gens.....	67
4.4	Klonierung des EBOV-Reston-spezifischen Minigenoms.....	68
4.5	Etablierung eines EBOV-Reston-spezifischen Minigenomsystems...70	
4.6	Titration der EBOV-Reston-spezifischen Nukleokapsid- Proteingene.....	71
4.6.1	Titration des NP-Proteins des EBOV-Reston.....	71
4.6.2	Titration des VP35-Proteins des EBOV-Reston.....	72
4.6.3	Titration des VP30-Proteins des EBOV-Reston.....	73
4.6.4	Titration des L-Proteins des EBOV-Reston.....	74
4.6.5	Titration der EBOV-Reston-spezifischen Minigenome.....	75
4.7	Zusammensetzung des Polymerasenkompleses des EBOV-Reston.....	76
4.8	Transkription des EBOV-Reston-spezifischen Minigenoms.....	77
4.9	Austausch der Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Reston, EBOV-Zaire und MBGV.....	78
4.9.1	Verwendung von EBOV-Reston Proteinen im EBOV-Zaire- Spezifischen Replikationssystem.....	79
4.9.2	Verwendung von EBOV-Zaire Proteinen im EBOV-Reston- Spezifischen Replikationssystem.....	80
4.9.3	Verwendung von EBOV-Reston Proteinen im MBGV-Spezifischen Replikationssystem.....	82
4.10	Untersuchung EBOV-Zaire und-Reston chimärer Minigenome.....	83
4.10.1	Klonierung der chimären Minigenome.....	83
4.10.2	Transkription und Replikation der chimären Minigenome.....	83

4.11	Untersuchung über die zelluläre Kolokalisierung von EBOV-Zaire VP35 und EBOV-Reston L	85
4.12	Untersuchung regulatorischer Elemente auf dem EBOV-Zaire-Genom	90
4.12.1	Herstellung von VP24-Stoppsignal Mutanten.....	90
4.12.2	Transkription der VP24-Stoppsignal Mutanten.....	92
4.12.3	Bestimmung des verwendeten Stoppsignals.....	93
4.13	Untersuchung zur Spezifität der Transkriptionssignale	94
4.13.1	Klonierung Chimärer bicistronischer Minigenome.....	96
4.13.2	Replikation und Transkription des Chimären Minigenoms.....	97
4.14	Untersuchung der intergenischen Regionen des EBOV-Zaire	100
4.14.1	Untersuchung der EBOV-Zaire NP/VP35 intergenischen Region.....	101
4.14.2	Untersuchung der EBOV-Zaire VP35/VP40 intergenische Region.....	103
5.	Diskussion	108
5.1	Sequenzierung des EBOV-Reston-Genoms und Vergleich mit EBOV-Zaire und MBGV	108
5.2	Etablierung eines EBOV-Reston spezifischen Minigenom-Systems	109
5.2.1	Austausch der Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Reston, EBOV-Zaire und MBGV.....	111
5.2.2	Untersuchung chimärer Minigenome von EBOV-Zaire und-Reston.....	112
5.3	Bestimmung des verwendeten VP24-Transkriptionsstoppsignals	113
5.4	Spezifität der Transkriptionssignale von MBGV	114
5.5	Untersuchung der intergenischen Regionen von EBOV-Zaire	116
6.	Zusammenfassung	119
7.	Literaturverzeichnis	121
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	128
9.	Abkürzungsverzeichnis	131
10.	Anhang	132
	Präsentation der Arbeit auf Kongressen und Tagungen	
	Veröffentlichungen in Vorbereitung	
	Danksagung	

1. Einleitung

1.1 Das Ebola-Virus

1.1.1 Taxonomie

Ebola- und Marburg-Viren besitzen eine fadenförmige Gestalt und bilden die Familie der Filoviridae. Aufgrund des negativ orientierten einzelsträngigen RNA-Genoms gehören sie, wie die Paramyxoviridae, Rhabdoviridae und Bornaviridae, zur Ordnung der Mononegavirales. Die Filoviridae werden aufgrund ihrer Pathogenität, Antigenität, Morphologie und Genetik in zwei Gruppen, Marburg- (MBGV) und Ebola-Viren (EBOV) eingeteilt. Nur das Genus EBOV wird in vier weitere Spezies, Zaire, Sudan, Elfenbeinküste und Reston eingeteilt (van Regenmortel, 2000).

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

1.1.2 Epidemiologie

Das EBOV ist ein gutes Beispiel für ein sog. „Emerging Virus“. Diese Viren sind durch ihr erstmaliges Auftreten in den letzten 30-40 Jahren und ihre pathogenen Eigenschaften gekennzeichnet. Beispiele dafür sind u.a. das Marburg-, Lassa-, Hanta- und Nipahvirus. Der erste EBOV-Ausbruch trat 1976 auf. Das Virus wurde nach dem Fluss Ebola im Norden der Demokratischen Republik Kongo in der Nähe des Ausbruchsortes benannt. Dort befindet sich das Krankenhaus von Yambuku, wo die ersten Patienten eingeliefert wurden und es wegen mangelnder Hygiene zu einer massiven Ausbreitung des Virus kam. Bis heute wurden in sechs afrikanischen Ländern Fälle bestätigt (Elfenbeinküste, Gabun, Demokratische Republik Kongo (ehemalig Zaire), Sudan, Republik Kongo und Uganda) (Abb.1). Im Jahr 1976 kam es zeitgleich zu zwei Ausbrüchen eines viralen hämorrhagischen Fiebers, das durch zwei verschiedene Subtypen des EBOV-Virus in Yambuku, Nordzaire und in Nzara, Südsudan verursacht wurde (Peters & Khan, 1999). Der Subtyp EBOV-Zaire hat eine Todesrate von 88%, während der Subtyp EBOV-Sudan

eine Todesrate von 53% zeigt (CDC, Sanchez et al., 1995). Seit 1976 ereigneten sich 15 weitere EBOV-Ausbrüche mit unterschiedlich hoher Letalität (CDC, 2002). Beispiele sind die schweren Ausbrüche in Kikwit (Demokratische Republik Kongo) im Jahr 1995 mit einer Letalität von 81% (315 Infizierte) oder in Gulu, Masindi und Mbarara (Uganda) im Jahre 2000 mit einer Letalität von 53% (425 Infizierte) (CDC, 2002; Feldmann et al., 1996; Sanchez et al., 1996). Kleinere Ausbrüche mit jeweils 44, 37 und 60 Infizierten traten in Gabun zwischen 1994 und 1996 auf (Volchkov et al., 1997). Im Jahre 2002 wurde erneut ein EBOV-Ausbruch aus Gabun und aus der Demokratischen Republik Kongo gemeldet (WHO 2002; CDC, 2002). Seit der Entdeckung des EBOV wurden etwa 1500 Fälle und davon mehr als 1000 Todesfälle dokumentiert. 1989 trat erstmals außerhalb Afrikas ein EBOV-Ausbruch auf, und so wurde eine dritte Spezies, das EBOV-Reston, isoliert (1.3). Der ursprünglich asiatische Stamm rief keine Erkrankung beim Menschen hervor. 1994 konnte ein weiterer EBOV-Subtyp, Ivory Coast, in der Elfenbeinküste aus dem Blut einer Laborangestellten, die sich während einer Schimpansenautopsie infizierte, isoliert werden (Legueno et al., 1995; Formenty et al., 1999). Unter natürlichen Bedingungen tritt EBOV außerhalb Afrikas und den Philippinen nicht auf.

EBOV sind dem 1967 in Marburg entdeckten MBGV morphologisch sehr ähnlich (Martini & Siegert, 1971). Die ersten MBGV-Ausbrüche ereigneten sich zeitgleich in Marburg, Frankfurt, Deutschland (Abb.1) und in Belgrad, Serbien (Abb.1) (Siegert et al., 1967; Slenczka et al., 1999) und das Virus wurde nach dem Ort der Erstisolierung benannt. In Marburg infizierten sich Angestellte eines Pharmakonzerns an Labortieren aus Uganda. Die Letalität lag bei 22%. Die Übertragung des Virus erfolgte durch grüne Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*). 1975 gab es in Südafrika einen Ausbruch, ebenfalls 1980 und 1987 in Kenia mit jeweils 1 bis 3 Infizierten (Gear et al., 1975; Smith et al., 1982). 1998 infizierten sich 75 Personen mit MBGV in der Demokratischen Republik Kongo (Abb.1). Die Letalität betrug 83%. Filovirus-Ausbrüche seit 1967 sind in Tab. 2 aufgelistet.

Filoviren können nach ihrer Pathogenität für den Menschen und ihrer weltweiten Verbreitung in zwei Gruppen eingeteilt werden (Tab. 1): die afrikanische Gruppe, die für die Menschen und Primaten hoch pathogen ist und die asiatische Gruppe mit einem einzigen Vertreter, dem EBOV-Reston, welches für Menschen wahrscheinlich nicht pathogen ist jedoch für den Primaten (CDC, 1990a; CDC, 1990b; Miranda et al., 1999).

AFRIKANISCHE GRUPPE

ASIATISCHE GRUPPE

MBGV

EBOV Zaire

Sudan

Ivory Coast

EBOV Reston

Menschen

sehr pathogen

Primaten

sehr pathogen

Menschen

nicht pathogen

Primaten

sehr pathogen

Tabelle 1: Einteilung der Filoviren nach ihrem Auftreten und ihrer Pathogenität.

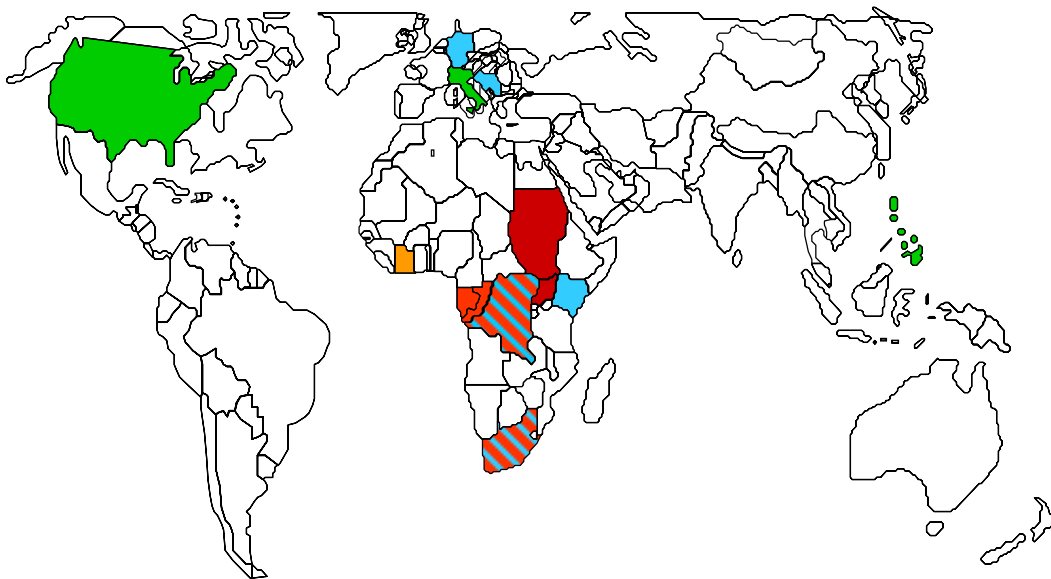


Abbildung 1: Filovirus Ausbrüche seit 1967

- EBOV-Zaire
- -Sudan
- -Elfenbeinküste
- -Reston
- MBGV
- EBOV-Zaire und MBGV

Laborinfektionen wurden hier nicht eingezeichnet.

Jahr	Virus	Land des Ausbruchs	Ursprungsland	Anzahl der Infizierten	Letalitätsrate
1967	MBGV	Deutschland Serbien	Uganda	32	22%
1975	MBGV	Südafrika	Zimbabwe	3	33%
1976	EBOV-Zaire	DR Kongo		318	88%
1976	EBOV-Sudan	Sudan		284	53%
1976*	EBOV-Sudan	England	Sudan	1	0%
1979	EBOV-Sudan	Sudan		34	65%
1980	MBGV	Kenia		2	50%
1987	MBGV	Kenia		1	100%
1988*	MBGV	Russland	unbekannt	1	100%
1989	EBOV-Reston	USA	Philippinen	0	0%
1990	EBOV-Reston	USA	Philippinen	0	0%
1990*	MBGV	Russland	unbekannt	1	0%
1992	EBOV-Reston	Italien	Philippinen	0	0%
1994	EBOV-Zaire	Gabun		44	63%
1994	EBOV-Ivory Coast	Elfenbeinküste		1	0%
1995	EBOV-Zaire	DR Kongo		315	81%
1996	EBOV-Zaire	Gabun		37	57%
1996	EBOV-Zaire	Gabun		60	75%
1996	EBOV-Zaire	Südafrika	Gabun	2	50%
1996	EBOV-Reston	USA	Philippinen	0	0%
1996	EBOV-Reston	Philippinen		0	0%
1998-2000	MBGV	DR Kongo		75	83%
2000-2001	EBOV-Sudan	Uganda		425	53%
2002	EBOV-Zaire	Rep. Kongo, Gabun		97	71%
unbekannt*	EBOV-Zaire?	Russland	unbekannt	1	100%

Tabelle 2: Filovirus-Ausbrüche.

Die Daten über die MBGV-Ausbrüche wurden folgenden Quellen entnommen: (Muyembem-Tamfum, et al., 2001; Slenczka, 1999). Als Quelle für die EBOV-Ausbrüche wurde die homepage des CDC verwendet (Disease information, viral hemorrhagic fevers: fact sheets about Ebola hemorrhagic fever). Die mit * gekennzeichneten Zeilen beziehen sich auf Laborinfektionen (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Elke Mühlberger).

1.1.3 Natürliches Reservoir

Das natürliche Reservoir für EBOV-Zaire, -Sudan und -Ivory Coast scheint im Regenwald in Afrika befindlich zu sein, ist aber immer noch nicht identifiziert worden. Verschiedene Hypothesen wurden entwickelt, um den natürlichen Wirt des EBOV zu identifizieren. Affen sind zwar bei der Verbreitung des EBOV beteiligt, können aber das Erregerreservoir nicht bilden, da experimentell infizierte Affen ausnahmslos an der Infektion sterben (Fisher Hoch et al., 1992; Fisher Hoch & McCormick, 1999;

Ryabchikova et al., 1999). Eine weitere Hypothese war, dass ein pflanzliches Virus die Ursache der Infektion bei Vertebraten sein könnte (WHO, Fact Sheet N° 103, 2000). Durch Laboruntersuchungen wurde gezeigt, dass mit EBOV infizierte Fledermäuse das Virus mit dem Kot ausscheiden, jedoch keine Anzeichen für eine Erkrankung aufweisen (Swanepoel et al., 1996). Dadurch wird die Vermutung wahrscheinlicher, dass dieses Säugetier eine Rolle bei der Übertragung der Filoviren im Tropenwald spielen könnte.

1.1.4 Übertragung

Filoviren werden durch ungeschützten Kontakt mit Blut oder Körperflüssigkeit infizierter Menschen und Affen übertragen. Während der verschiedenen Epidemien gerieten auch Ärzte und Pflegepersonal in eine große Gefahr, da die Viren durch medizinische Geräte und körperliche Pflege übertragen werden können, wenn ohne ausreichende Schutzmaßnahmen gearbeitet wird. So stellen nosokomiale Infektionen durch Mangel an Hygiene einen der wichtigsten Wege bei der Verbreitung der Erkrankung dar (Baron et al., 1983; Jaax et al., 1995; C.D.C. 2002). Eine Übertragung durch Aerosole ist neben den oben genannten Transmissionswegen nicht völlig auszuschließen. Experimentell wurde es mit Affen im Labor bestätigt (Jahrling et al., 1996; Roels et al., 1999).

1.1.5 Klinischer Verlauf der Erkrankung

Infektionen mit EBOV sind akut. Man findet keine „Carrier“ Stadien (Virussträger). Schweres hämorrhagisches Fieber beim Menschen und nicht-humanen Primaten ist in der Regel die Folge einer Infektion. Die Inkubation beträgt 2 bis 21 Tage (WHO Fact Sheet N° 103, 2000). Der Beginn der Krankheit ist abrupt und charakterisiert durch hohes Fieber, grippeähnliche Symptome, wie zum Beispiel Kopf- und Glieder-schmerzen, Müdigkeit, Erbrechen, Abdominalschmerzen und Durchfall. Halsschmerzen mit Schluckbeschwerden treten ebenfalls auf (Baron et al., 1983; Bwaka et al., 1999; Ndambi et al., 1999). Eine auffallende Apathie sowie ein Exanthem in 50% der Fälle wurden beschrieben. Auch neurologische Symptome (Koma, Delirium) lassen sich beobachten. Schwere Hämorrhagien im Gastrointestinaltrakt, im Rachenbereich und in den Konjunktiven treten in 70-80% der Fälle auf (Peters & Khan, 1999). In der terminalen Phase führen ein unkontrollierbares Multiorganversagen, die schweren Hämorrhagien und ein hypovolemischer Schock zum Tod (in der Regel 5-9 Tage nach dem Auftreten der ersten Symptome). Je nach Subtyp variiert die Letalität zwischen 53% (EBOV-Sudan) und 88% (EBOV-Zaire). Eine spezifische Immunantwort bei Patienten mit letalem Krankheitsverlauf ist nur schwach ausgeprägt, und antivirale IgG sind, bis

zum Zeitpunkt des Todes, nicht nachweisbar (Baize et al., 1999; Ksiazek et al., 1999). Diese Immunsuppression resultiert wahrscheinlich aus einem Zusammenspiel zwischen fehlerhafter Chemokinausschüttung, Versagen von lymphatischen Organen und Blockierung der Interferonantwort (Harcourt et al., 1998; Basler et al., 2000). Die gesamte Krankheit dauert bei Überlebenden 12-22 Tage. IgM- und IgG-Antikörper sind bei überlebenden Patienten nachweisbar (Leroy et al., 2001). In der Rekonvaleszenzphase wurden Encephalomyelitis und Hepatitis beobachtet (Sureau, 1989).

1.1.6 Therapie und Prophylaxe

Eine spezifische antivirale Therapie sowie eine wirksame Vakzine zur Immunisierung des Menschen gegen das EBOV fehlen immer noch bei der medizinischen Behandlung. Deswegen werden Filoviren als Krankheitserreger der Sicherheitsstufe 4 eingestuft und können nur unter Einhaltung extremer Sicherheitsmaßnahmen erforscht werden.

Die heutige Prävention bei EBOV-Ausbrüchen beruht auf der Isolierung der Patienten, wobei es oft schwierig ist, eine frühzeitige und zuverlässige Diagnose zu stellen. Die Verwendung von Schutzbekleidung, OP-Masken, Handschuhen, Schutzbrillen, Wegwerfmaterial und Sterilisierungsmöglichkeiten verhindern eine Virusübertragung. Die Therapievorsuche basieren zur Zeit auf dem Einsatz von Adenosinanaloga, welche die EBOV-Replikation in Zellkultur inhibieren. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf einer Hemmung der zellulären S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase beruht (Bray et al., 2000). Im Rahmen der Vakzinentwicklung wurde ein passiver Schutz durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen das EBOV-GP in Mäusen erreicht (Wilson et al., 2000; Wilson & Hart, 2001). Mittels einer aktiven Immunisierung gegen das EBOV mit Hilfe von DNA-Vakzinierung, unter Verwendung von GP und NP als Antigen, konnten Mäuse und Meerschweinchen vor einer EBOV-Infektion geschützt werden (Vanderzanden et al., 1998; Xu et al., 1998). Im Jahr 1998 wurden auch Cynomolgus-Affen mit rekombinanten Alphaviren immunisiert, welche die MBGV-Proteine GP und NP exprimierten (Hevey et al., 1998). Schließlich wurde durch eine Kombination von DNA-Immunisierung, wobei die EBOV-spezifischen Proteine GP und NP als Antigene dienten, und einer Infektion mit rekombinanten Adenoviren eine humorale Immunantwort in Cynomolgus-Affen ausgelöst (Sullivan et al., 2000).

1.2 Molekularbiologie

1.2.1 Morphologie des Virions

Die Virionen bilden membranumhüllte Partikel, die meistens filamentös und lang gestreckt sind. Sie können sowohl zirkulär, verzweigt, U- oder 6-förmig vorliegen. Während der Durchmesser einheitlich ca. 80nm beträgt, variiert die Länge bis zu 1400nm mit einem Durchschnittswert von 805nm bei EBOV und 665nm bei MBGV. Die Hüllmembran, die aus der Plasmamembran der Wirtszellen entsteht, enthält das virale Glykoprotein GP (Volchkov et al., 1998) und umgibt das helikale Nukleokapsid (Abb. 2). Zwischen Hülle und Nukleokapsid findet man zwei Matrixproteine, das VP24 und das VP40. Der Nukleokapsidkomplex zeigt einen Durchmesser von ca. 50nm und besteht einerseits aus vier viralen Proteinen, dem Nukleoprotein NP, den Proteinen VP35 und VP30 und der großen Polymerase-Untereinheit L, und andererseits aus dem viralen RNA-Genom. Die vier Proteine werden als Nukleokapsidproteine bezeichnet. Das virale Genom wird vom NP enkapsidiert und ist deswegen vor Nuklease geschützt.

1.2.2 Genomstruktur

Die Virionen enthalten 1,1% Nukleinsäure bezogen auf ihre Gesamtmasse (Feldmann und Kiley, 1999). Das Genom besteht aus einem einzigen negativ orientierten RNA-Molekül von 18,9kb bei EBOV und 19,1kb bei MBGV (Feldmann et al., 1992; Sanchez et al., 1993; Volchkov et al., 1999). Das komplette Genom hat ein Molekulargewicht von ca. $6,3 \cdot 10^3$ kDa (Kiley et al., 1988). Da negativ orientierte RNA-Genome nicht als mRNA verwendet werden können, sind sie nicht infektiös. Nicht transkribierte Sequenzen (NTR) sind am 3'- und am 5'-Ende des Genoms zu finden. Sie sind an ihrem äußersten Ende zueinander komplementär und werden als Leader und Trailer bezeichnet (Abb. 3). Sie finden wahrscheinlich ihre Funktion bei der Initiation der Transkription und der Replikation auf eine ähnliche Weise wie es bei Paramyxo- und Rhabdoviren der Fall ist (Regnery et al., 1980; Kiley et al., 1986; Feldmann et al., 1992; Sanchez et al., 1993; Mühlberger et al., 1996). Zwischen Leader und Trailer sind 7 offene Leserahmen angeordnet, die für die Strukturproteine des EBOV bzw. MBGV kodieren: 3'-Leader-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-Trailer-5' (Abb. 3). Die kodierenden Bereiche werden an ihren Enden von den nichtkodierenden Bereichen umfasst. Jedes Gen ist von hochkonservierten Transkriptionsstart- und -stoppsignalen mit regulatorischen Funktionen flankiert. Bei allen Genen der Filoviren ist das hoch konservierte Pentanukleotid 3'-UAAUU-5' in den Transkriptionssignalen zu finden. Die Gene sind meistens durch kurze intergenische Basenfolgen voneinander getrennt (intergenische

Regionen IR) oder überlappen im Bereich ihrer Start- und Stoppsignale über das hoch konservierte Pentamer.

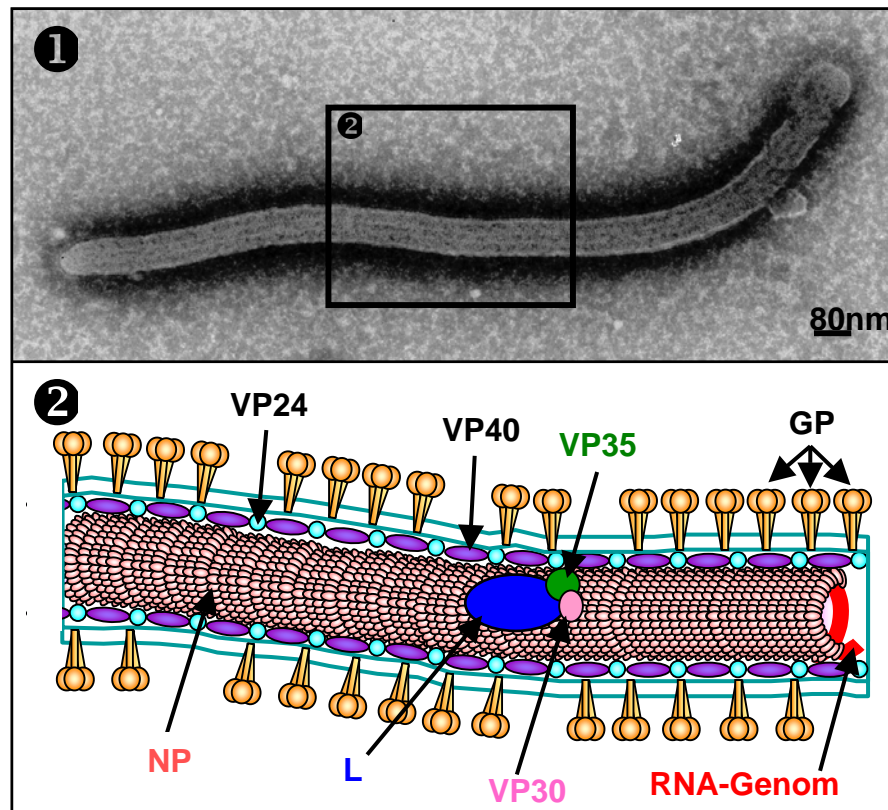


Abbildung 2: Die Struktur des EBOV.

- 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EBOV-Virion in 50000-facher Vergrößerung (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Larissa Kolesnikova).
- 2 Schematischer Aufbau eines EBOV-Virion (zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Michael Weik).

Bei den Genüberlappungen befindet sich das Startsignal der stromabwärts gelegenen Gene vor dem Stoppsignal der stromaufwärts gelegenen Gene. So bildet das Pentamer gleichzeitig das Ende des Startsignals und den Anfang des Stoppsignals. Die Überlappungen sind dreimal bei EBOV-Zaire (VP35/VP40, GP/VP30 und VP24/L) und einmal bei MBGV (VP30/VP24) zu finden (Abb. 3).

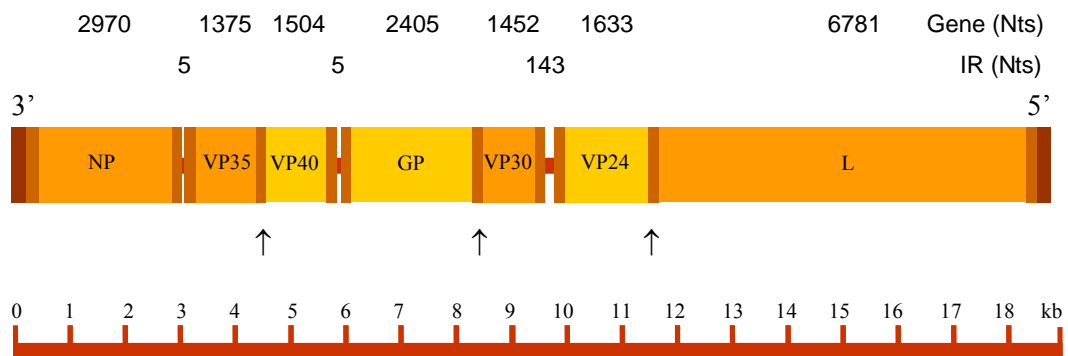


Abbildung 3: Genomorganisation des EBOV-Zaire.
 Das EBOV besitzt ein einzelsträngiges, nichtsegmentiertes RNA-Genom in negativer Orientierung.

- Nucleokapsidproteingene
- Matrix- und Oberflächenproteingene
- Nicht-translatierte Region
- Leader bzw. Trailer
- ↑ Genüberlappung
- IR intergenische Regionen

1.2.3 Proteine

Das Genom der Filoviren kodiert für 7 bzw. 8 verschiedene Proteine, die in 3 Gruppen eingeteilt werden können: Nucleokapsid-, Matrix- und Membranproteine. Die Charakteristika der jeweiligen Proteine sind in Tabelle 3 aufgelistet.

1.2.3.1 Nucleokapsidproteine

Das Nucleokapsid besteht aus einem Komplex von RNA und 4 Proteinen, die sich sowohl durch ihre Funktion als auch durch ihr Molekulargewicht und ihre vorhandene Menge im Virion unterscheiden. In größter Menge liegt das NP vor. Es verpackt das RNA-Genom und ist für die Bildung einer helikalen Struktur verantwortlich (Kolesnikova et al., 2000). Aufgrund der Enkapsidierung ist das Genom vor Nuclease-Verdau geschützt. Das NP ist stark phosphoryliert. Für das NP des MBGV wurde gezeigt, dass es nur im phosphorylierten Zustand im Virion eingebaut wird (Becker et al., 1994). Das VP35 ist an der Transkription und Replikation beteiligt. Es ist homolog zu dem P-Protein von anderen Mitgliedern der Mononegavirales (Mühlberger et al., 1998, Mühlberger et al., 1999). Das VP35 des EBOV ist befähigt, die Typ-1 Interferon-induzierte Immunantwort zu inhibieren. Dadurch wird die unspezifische antivirale Immunantwort von infizierten Zellen unterdrückt (Basler et al., 2000).

Das L-Protein mit einer Länge von 2212 AS ist das am schwächsten exprimierte Protein in infizierten Zellen und stellt die RNA-abhängige RNA-Polymerase dar (Mühlberger et al., 1992). Drei verschiedene Regionen, die laut Computervorhersage auf eine Funktion als RNA-Polymerase hinweisen, liegen vor: ein RNA-bindender Bereich (AS 553-571), ein Bereich, der möglicherweise eine Phosphodiester-Brücke bildet (AS 738-744) und ein ATP-bindendes Motiv (AS 1815-1841) (Volchkov et al., 1999).

Anders als bei den meisten Paramyxo- und Rhabdoviren ist bei den Filoviren ein viertes Nukleokapsidprotein, das VP30, zu finden. Es ist stark phosphoryliert und vergleichbar mit dem M2-1 Protein der Pneumoviren (Paramyxoviridae), die als einzige weitere Vertreter der Ordnung Mononegavirales ebenfalls ein viertes Protein im Nukleokapsidkomplex besitzen (Garcia et al., 1993). VP30 ist ein obligatorischer Transkriptionsaktivator für das EBOV. Im Gegensatz dazu verläuft die Transkription des MBGV VP30-unabhängig (Mühlberger et al., 1998, 1999).

1.2.3.2 Matrixprotein

Das VP40 der Filoviren scheint eine ähnliche Funktion wie das Matrixprotein M der Paramyxo- und Rhabdoviren zu haben (Peters et al., 1996). Es kommt in größerer Menge im Virion vor und liegt in membranassoziierter Form vor (Geisbert & Jahrling 1995; Dessen et al., 2000; Kolesnikova et al., 2002). Es scheint eine wichtige Rolle bei der Entstehung neuer Viren zu spielen, da es wahrscheinlich Nukleokapsid und Plasmamembran verbindet (Ruigrok et al., 2000). Das VP24 ist, als zweites Matrixprotein, nur bei Filoviren zu finden (Elliott et al., 1985). Eine genaue Funktion wurde noch nicht beschrieben. Für MBGV wurde gezeigt, dass das VP24 mit dem zytoplasmatischen Bereich des GP assoziiert (Sänger et al., 2001).

1.2.3.3 Membranproteine

Nur ein Oberflächenprotein, das GP (Tab. 3), ist bei EBOV zu finden. Es wird nach der Translation durch Furin in zwei Untereinheiten, GP1 (140kDa) und GP2 (26kDa), gespalten (Volchkov et al., 1998). Über eine Disulfidbrücke bleiben die beiden Untereinheiten miteinander verbunden. Das GP_{1,2} ist als Trimer in der Virushülle verankert (Sanchez et al., 1998). Adsorption und Endozytose werden über das GP vermittelt. An diesem Prozess sind der zelluläre Folsäure-Rezeptor- α wie auch β 1-Integrin beteiligt (Takada et al., 2000; Chan et al., 2001). Bei der Synthese des GP spielt RNA-Editing eine Rolle. So entsteht ein kleines GP, sGP (364 AS), das zuerst als endoplasmatischer Vorläufer vorkommt und dann in das Δ -Peptid und das reife sGP

gespalten wird (Volchkova et al., 1999; Volchkov 1999). Es wird diskutiert, dass das sGP eine Rolle bei der Abschwächung der spezifischen Immunantwort spielen könnte (Yang et al., 1998).

Protein	Molekulargewicht (kD)		AS-Anzahl		Modifikation	Funktion
	EBOV	MBGV	EBOV	MBGV		
NP	105	95	739	695	phosphoryliert	Nukleokapsidprotein, RNA-Enkapsidierung
VP35	35	32	340	329		Nukleokapsidprotein, Transkriptionskomplex, Replikation, Typ I IFN-Antagonist (nur für EBOV gezeigt)
VP40	38	40	326	303		Matrixprotein
GP	170	170	676	681	N-glycosyliert O-glycosyliert	Oberflächenprotein
sGP	55	-	160	-		
VP30	28	30	260	281	phosphoryliert	Nukleokapsidprotein, EBOV spezifischer Transkriptionsaktivator
VP24	28	28	251	253		Matrixprotein
L	267	267	2212	2331		Nukleokapsidprotein, RNA-abhängige-RNA-Polymerase

Tabelle 3: Überblick über die Eigenschaften und Funktionen der Filovirusproteine.

Die Daten wurden aus H. Feldmann und M. P. Kiley, Classification, structure and replication of filoviruses, Curr Top Microbiol Immunol 235, 1-21 (1999) und aus S. Becker und E. Mühlberger, Structural Proteins of Filoviruses, Curr Top Microbiol Immunol 235, 23-34 (1999) entnommen.

1.2.4 Transkription und Replikation

Filoviren vermehren sich im Zytoplasma der infizierten Zellen (Feldmann und Kiley 1999). Die Details der Vorgänge sind noch nicht bekannt. Es wird aber vermutet, dass sie auf eine ähnliche Weise wie bei den anderen Mononegavirales ablaufen (Kingsbury 1990; Wagner 1990). Als Matrize für Replikation und Transkription wird nur verpackte RNA verwendet. Das enkapsidierte Genom dient dann als Vorlage für die Transkription und so werden polyadenylierte, monocistronische mRNAs gebildet, welche von der zellulären Translationsmaschinerie in Proteine umgesetzt werden. Dabei bindet zuerst der Polymerasekomplex innerhalb des Leaders. Nachdem das erste Transkriptionsstartsignal gefunden wurde, werden die sieben Gene eins nach dem anderen transkribiert. Die Transkriptionsstart- und stoppsignale werden erkannt und die intergenischen Regionen übersprungen. Da die Gene in einer bestimmten Reihenfolge auf dem RNA-Genom angeordnet sind und da mit zunehmender Synthesedauer die Polymerase sehr wahrscheinlich die Matrize verlässt, bildet sich folgender mRNA-Gradient:

NP > VP35 > VP40 > GP > VP30 > VP24 > L

Für die EBOV-spezifische Transkription wird neben NP, VP35 und L auch VP30 benötigt (Mühlberger et al., 1999, Volchkov et al., 2001). Dieses Protein fungiert als Transkriptionsinitiationsfaktor (Weik et al., 2002). Die MBGV-spezifische Transkription benötigt ebenfalls NP, VP35 und L, verläuft aber VP30 unabhängig (Mühlberger et al., 1999).

Die genauen Gründe für das Umschalten von der Transkription zur Replikation sind noch unbekannt. Vermutet wird, dass die Bildung eines vollständigen positiv orientierten Genoms, des Antigenoms, welches als Matrize bei der Replikation dient, erst erfolgt, wenn eine ausreichende Menge an Virusprotein NP zur Enkapsidierung der neu gebildeten RNA-Spezies in den Zellen vorhanden ist (Kolakofsky et al., 1991). Bei der Morphogenese der viralen Partikel lagern sich die Nukleokapside über das Matrixprotein VP40 an Zytoplasmamembranbereiche an, wo GP zu finden ist. Durch Knospung werden die infektiösen Viren von der Oberfläche der Zellen freigesetzt.

1.3 Inaktivierung

Die thermische Inaktivierung (thermal inactivation) liegt bei ca. 60°C nach 30min. Unter in vitro Konditionen ist das Virion relativ stabil, wenn es zwischen 15 und 20°C aufbewahrt wird. Es ist aber sehr empfindlich gegen Säure bei einem pH-Wert von 5 oder in einer alkalischen Umgebung bei einem pH-Wert von 8. Die Virionen sind auch sehr

empfindlich gegenüber einer Behandlung mit Lösungsmitteln, Phenol und Formaldehyd. Die Infektiosität ist nach UV- oder Gammastrahlung reduziert (ICTV 2002).

1.4 Das Ebola-Virus-Reston

EBOV-Reston wurde erstmals 1989 aus philippinischen Affen in Reston (Virginia), Alice (Texas) und Pennsylvania in den Vereinigten Staaten isoliert. Die infizierten Affen, *Macaca fascicularis*, stammten aus der Nähe von Manila und waren von den Philippinen in die USA exportiert worden (Jahrling et al., 1990).

Nach dem Forschungsergebnis des CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) unterscheidet sich EBOV-Reston genetisch und serologisch von den afrikanischen EBOV. Pathogenetisch gesehen verursacht es zwar ein schweres hämorrhagisches Fieber in Affen, scheint aber keine Bedrohung für Menschen zu sein. Einige Laborangestellte, welche mit infizierten Tieren in Kontakt kamen, zeigten danach keine Symptome der Erkrankung, doch konnte eine Antikörperbildung gegen das EBOV-Reston nachgewiesen werden (CDC, 1996). 1990 und 1996 kam es erneut zu einem EBOV-Reston Ausbruch in Virginia und Texas. Es wurden ausnahmslos Affen, *Macaca fascicularis*, infiziert (WHO, 1999). 1992 trat eine EBOV-Reston Episode in Siena, Italien, auf, die sich wiederum auf importierte philippinische Affen zurückführen ließ (WHO, 1992). 1996 wurden infizierte Affen in einem Handelslager auf den Philippinen entdeckt (CDC, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Isolat Pennsylvania des EBOV-Restons verwendet. EBOV-Reston Ausbrüche sind in Tab. 2 aufgelistet.

1.5 Reverse Genetik und spezifisches EBOV Minigenomsystem

Es wurde ein System etabliert, das die Transkription und die Replikation von EBOV und MGBV unter reduzierten Sicherheitsmaßnahmen zu erforschen ermöglicht (Mühlberger et al., 1998, 1999). Reverse Genetik-Systeme wurden schon früher für andere Mononegavirales etabliert (Conzelmann et al., 1996). Das System beruht auf der Infektion von HeLa-Zellen mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus MVA-T7 (Sutter et al., 1995), das das Gen für die T7-RNA-Polymerase (aus dem Phagen T7) kodiert. In den infizierten Zellen werden mittels der zellulären Proteinsynthese-Maschinerie große Mengen der T7-RNA-Polymerase synthetisiert.

In einem zweiten Schritt transfiziert man diese Zellen mit Plasmiden, die die EBOV-spezifischen Nukleokapsidproteingene unter Kontrolle eines T7-RNA-Polymerase-Promotors enthalten. Zur gleichen Zeit wird als Substrat für die Transkription und die

Replikation ein Plasmid, das das EBOV-Minigenom enthält, transfiziert. Unter einem EBOV-Minigenom ist ein Konstrukt zu verstehen, das den EBOV-Leader und die NTR des ersten Gens (NP) sowie die NTR des letzten Gens (L) und den Trailer enthält. Zwischen diesen Funktionseinheiten wurde das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) als Reportergen kloniert. Es können auch Zellen verwendet werden, die die T7-RNA-Polymerase stabil exprimieren, wie z.B. BSR-T7/5 (Derivat der Baby-Hamster-Kidney-Zelllinie) (Buchholz et al., 1999) oder HUH-T7 (humane Hepatozytenzelllinie). Die Effizienz der EBOV-spezifischen Transkription kann entweder über die Bestimmung der CAT-Aktivität determiniert werden oder durch den Nachweis der transkribierten mRNAs über oligo (dT)-Präzipitation und anschließend Northern-Hybridisierung. Der Nachweis der replizierten RNA erfolgt ebenfalls durch Northern-Hybridisierung, wobei die RNA einem S7-Nuklease-Verdau unterzogen wird. Genomische und antigenomische RNA werden durch die NP-Enkapsidierung geschützt, nicht verpackte RNAs werden dagegen abgebaut. Im Jahr 2001 wurde ein System entwickelt, das auf reverser Genetik basiert und ermöglicht, infektiöse EBOV aus cDNA in Zellen herzustellen. Mittels dieser experimentellen Ansätze kann das Virus auf unterschiedliche Aspekte (Vermehrung, Budding, Pathogenität, etc.) untersucht werden (Volchkov et al., 2001; Neumann et al., 2002).

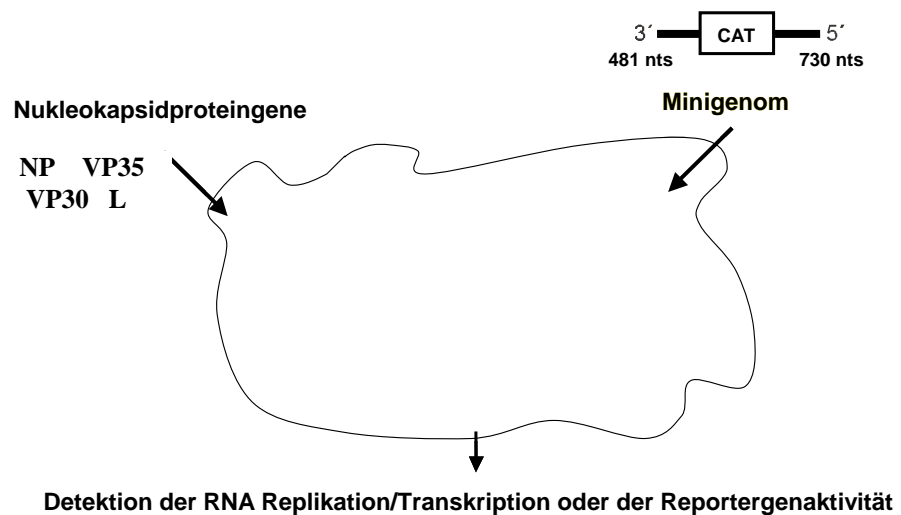


Abbildung 4: Schematische Übersicht über die Funktionsweise des EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystems.

1.6 Problemstellung dieser Arbeit

EBOV-Reston, die einzige asiatische Spezies der Filoviren, wurde bisher nur wenig untersucht. Obwohl noch keine Todesfälle mit EBOV-Reston als Krankheitsursache gemeldet wurden, unterliegt dieses Virus denselben strengen Sicherheitsmaßnahmen wie das hochpathogene EBOV-Zaire. Im Unterschied zum afrikanischen Subtyp EBOV-Zaire und zum MBGV, die ein schweres hämorrhagisches Fieber im Menschen auslösen, scheint der asiatische Subtyp Reston für Menschen nicht pathogen zu sein. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte in einem stark verzögerten Replikationszyklus des EBOV-Reston im Vergleich zu EBOV-Zaire und MBGV zu finden sein. So zeigen mit EBOV-Zaire infizierte Zellen bereits nach zwei Tagen einen starken zytopathischen Effekt, während Zellen, die mit EBOV-Reston infiziert wurden, erst nach acht bis zehn Tagen einen zytopathischen Effekt aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nun vergleichende Untersuchungen zur Transkription und Replikation der beiden EBOV-Subtypen und MBGV durchgeführt werden.

Durch die Herstellung eines reversen genetischen Minigenom-Systems für EBOV-Reston sollen Replikations- und Transkriptionsstudien mit EBOV-Reston unter S1-Bedingungen ermöglicht werden.

Um die für diese Arbeiten nötigen Sequenzinformationen zu erhalten, ist zunächst geplant, das gesamte Genom des EBOV-Reston zu sequenzieren.

Die Nukleokapsidproteingene für NP, VP35, VP30 und L sollen anschließend kloniert und ein EBOV-Reston-spezifisches-Minigenom in negativsträngiger Orientierung hergestellt werden. Mit Hilfe dieser Komponenten soll dann ein Minigenomsystem etabliert werden. Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Transkriptions- und Replikationsmodus der verschiedenen Filoviren herauszufinden, soll ein systematischer Austausch der Nukleokapsidproteingene zwischen dem EBOV-Reston, EBOV-Zaire und dem MBGV durchgeführt werden. Durch die Herstellung chimärer Minigenome, in denen cis-aktive Elemente von EBOV-Reston mit cis-aktiven Elementen von EBOV-Zaire kombiniert werden, soll dann überprüft werden, inwieweit die für Transkription und Replikation relevanten Sequenzabschnitte von dem jeweils anderen Virus-Subtyp toleriert werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit geht es um die Untersuchung regulatorischer Elemente auf dem Genom der EBOV-Zaire und MBGV. Dies betrifft die hochkonservierten Transkriptionsstart- und -stoppsignale sowie die Rolle, die die verschiedenen intergenischen Regionen bei der Transkription spielen.

Eine Besonderheit des EBOV-Zaire-VP24-Gens ist der Besitz von 2 Stoppsignalen, die durch 11 Nukleotid voneinander getrennt sind. Das Ziel dieser Versuchsreihe war es herauszufinden, ob beide Stoppsignale funktionsfähig sind und wenn ja, welches tatsächlich verwendet wird.

Trotz der signifikanten Ähnlichkeiten im Genomaufbau beider Viren werden EBOV-spezifische Minigenome nicht als Substrat für Replikation und Transkription von MBGV-Nukleokapsidproteinen akzeptiert und umgekehrt.

Um herauszufinden, welche Bereiche der Transkriptionsstartsignale für eine virusspezifische Transkription relevant sind, wurden in MBGV-spezifische mono- und bicistronische Minigenome die Transkriptionsstartsignale und intergenischen Regionen durch EBOV-spezifische ausgetauscht.

Zusammengefasst ergeben sich drei zentrale Aufgabenstellungen für diese Arbeit:

1) EBOV-Reston-Pennsylvania Genoms

- a) Sequenzierung
- b) Vergleiche der EBOV-Reston-, EBOV-Zaire- und MBGV-Genome

2) Etablierung des EBOV-Reston-spezifischen Minigenomsystems

- a) Klonierung der Nukleokapsidproteingene und des Minigenoms
- b) Etablierung des EBOV-Reston-spezifischen Minigenomsystems
- c) systematischer Austausch der Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Reston, EBOV-Zaire und MBGV
- d) Herstellung chimärer Minigenome EBOV-Zaire/-Reston

3) Untersuchung regulatorischer Elemente der Filoviren

- a) Bestimmung des verwendeten Stoppsignals des VP24-Gens des EBOV-Zaire
- b) Untersuchung zur Spezifität der Transkriptionssignale von EBOV-Zaire und MBGV
- c) Untersuchung der intergenischen Regionen von EBOV-Zaire

2. Methoden

2.1 Extraktion und Reinigung von DNA

2.1.1 Chloroform/Phenol-Extraktion

Die DNA-haltige Lösung wurde mit destilliertem H₂O auf 400µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) 15s lang mit einem Vortex-Gerät geschüttelt. Anschließend wurde die Probe 1min lang bei der Geschwindigkeit von 14000 UpM zentrifugiert, um die beiden Phasen zu trennen. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-haltige Phase sollte noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert werden und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden.

2.1.2 Ethanol-Fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Volumen 100% EtOH versetzt. Nach einer 15min langen Inkubation im EtOH-Trockeneis-Bad, wurde die Lösung 30min bei 14000UpM (4°C) zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 900µl 70% EtOH gewaschen und wiederum 10min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet 5-10min bei Raumtemperatur getrocknet und in einer entsprechenden Menge dH₂O gelöst.

2.1.3 Reinigung von DNA-Fragmenten >100bp

Das PCR-Purification Kit der Firma Qiagen wurde zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten >100bp verwendet. Die gereinigte DNA wurde in 50µl dH₂O eluiert.

2.1.4 Präparatives Gel

Um die Auftrennung und die Zurückgewinnung bestimmter DNA-Fragmente aus einem DNA-Gemisch, wie z.B. nach PCR oder Retriktionsverdau, zu gewährleisten wurden präparative Agarosegele verwendet. Für die Herstellung der 1-2%igen Gele wurden NA-Agarose (Pharmacia) und 1x TAE-Puffer (Sambrook et al., 1989, S. B23) verwendet. Das Einlaufen der DNA wurde bei einer Stromstärke von 30mA vorgenommen, anschließend wurde die Stromstärke auf 50mA erhöht. Nach einer 20min langen Inkubation des Gels in einer Ethidiumbromid/H₂O-Lösung (1µl/ml) wurde die

gewünschte DNA-Bande auf einem UV-Tisch bei 365nm mit einem Skalpell ausgeschnitten. Danach wurde das DNA-Fragment mittels des Qiaquick Gel Extraktion Kits (Qiagen) zurückgewonnen und in 50µl destilliertem H₂O eluiert. Zur Kontrolle wurden 5µl auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt.

2.2 Analyse von DNA

2.2.1 Quantitative DNA-Bestimmung

Die quantitative DNA-Bestimmung wurde mittels eines Gene Quant II Spektrometers (Pharmacia) UV-spektrometrisch durchgeführt. Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ (OD_{260}) durchgeführt. Eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 50µg/ml für doppelsträngige DNA (dsDNA) bzw. 20µg/ml für einzelsträngige Oligonukleotide (ssDNA). Für dsDNA bzw. ssDNA gelten folgende Gleichungen:

$$OD_{260} * \text{Verdünnung} * 50 = \text{dsDNA-Gehalt in } \mu\text{g/ml.}$$

$$OD_{260} * \text{Verdünnung} * 20 = \text{ssDNA-Gehalt in } \mu\text{g/ml.}$$

2.2.2 Analytisches Gel

Um Restriktionsverdau oder PCR-Produkte zu überprüfen, wurde eine größenabhängige Auftrennung der DNA durchgeführt. Dabei wurden die Proben mit 1:6 Volumen eines 6x Probenpuffers (0,25% Bromphenolblau, 10% Glycerin, 40% Saccharose) versetzt und in einem 1-2%igem Argarosegel in 1x TBE-Puffer (Sambrook et al., 1989, S. B23) bei 50 mA aufgetrennt. Als Laufpuffer diente ein 1x TBE-Puffer. Nach einer 20-minütigen Färbung mit Ethidiumbromid (1µl/ml) wurde das Gel unter UV-Licht (302nm) fotografiert.

2.2.3 Automatische Sequenzierung von DNA mit ABI Prism™

Die Sequenzierung von DNA erfolgte unter Verwendung des ABI Prism Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Perkin Elmer und des ABI Prism 377 DNA-Sequencer (Perkin Elmer). Das Prinzip beruht auf einer DNA-Einzelstrang-Synthese mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern und von Terminator Ready Reaction Mix (TerMix), welcher die nötige Ampli Taq-DNA-Polymerase und die ddNTPs (2'3'-Didesoxynukleotide) enthält. Diese ddNTPs wurden während der DNA-Synthese eingebaut.

Ansatz für eine Sequenzierung PCR:

7µl dsDNA aus Miniprep oder 1µl dsDNA aus Maxiprep (1µg/µl)

1µl Oligonukleotid (5pmol/µl)

2µl TerMix

10µl

Sequenzierungsprogramm:

96°C 30 Sekunden	} 25 Zyklen
50°C 15 Sekunden	
60°C 4min	

Das PCR-Produkt wurde über EtOH-Fällung oder mit Hilfe des Princeton Separations (USA) PCR-Reinigungskits gereinigt und im Vakuumtrockner getrocknet.

Zu der sedimentierten DNA wurden 4µl Auftragspuffer (1% Dextran-Blau, 5mM EDTA, 80% Formamid) zugegeben. Die Probe wurde dann 5min bei 95°C erhitzt und auf Eis gestellt. Aus diesem Sequenzierungsansatz wurden 2µl auf das Sequenzgel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte auf einem Polyacrylamid-Gel von 2,2 mm Dicke und 36 cm Länge. Als Laufpuffer wurde 1xTBE, pH 8, verwendet.

Die Elektrophorese lief 8h, und während dieser Zeit erfasste ein Argon-Laser (400mV) kontinuierlich die Fluoreszenzsignale. Die Basenfolge der sequenzierten DNA wurde nach einer Computeranalyse der Daten in Form eines Elektroferrogramms angezeigt.

Zusammensetzung des Sequenzgels:

21g Harnstoff

8,4ml 30% Polyacrylamidlösung

20ml dH₂O

6ml 10x TBE, pH8

300µl 10% Ammoniumpersulfat

20µl TEMED

2.3 Vervielfältigung von DNA**2.3.1 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde mit zwei spezifischen Oligonukleotiden (3.1.3) und einer temperaturstabilen Polymerase mit „proof reading“ Funktion, z.B. PWO-DNA-Polymerase oder Pfu-Turbo-Polymerase, durchgeführt.

Der Ansatz lautet:

50-500 ng Matrizen DNA
5µl 10x Reaktionspuffer
125 ng Vorwärtsprimer
125 ng Rückwärtsprimer
1µl dNTP Mix (je 25mM)
ad 49µl H₂O

Ein Standard-PCR-Zyklus besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealing-schritt (Bindung der Oligonukleotide) und einem Elongationsschritt (Amplifikation). Zur Verbesserung der PCR wurde ein sogenannter Hotstart durchgeführt, bei welchem der Reaktionsansatz von 49µl zuerst 5min lang auf 99°C erhitzt wurde. Danach wurden die Proben auf 92°C herunter gekühlt, und es wurde 1µl Polymerase zugegeben.

PCR Programm:

99°C 5min
92°C 2min (Zugabe der Polymerase)
95°C 30s
45-65°C 1min
72°C 1min/kb Matrize
72°C 10min
8°C bis zur Entnahme der Probe

} 30-40 Zyklen

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden 5µl (1/10 des Ausgangsvolumens) des PCR-Ansatzes auf ein 1-2%iges Agarosegel aufgetragen und begutachtet.

2.3.2 Plasmidgewinnung aus Bakterien

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden durch Bakterientransformation und Inkubation bei 37°C gewonnen. Je nach Größe des Bakterienansatzes unterscheiden sich die folgenden Methoden: Miniprep (Plasmidpräparation im kleineren Maßstab) und Maxiprep (Plasmidpräparation im größeren Maßstab).

2.3.2.1 Miniprep

Für eine Miniprep wurden 5ml 2YT-Medium (Sambrook et al., 1989, S. A3) mit einem adäquaten Antibiotikum zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien versetzt und mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Das beimpfte Medium wurde

anschließend über Nacht bei einer Temperatur von 37°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Am Morgen des nächsten Tages wurden die Bakterien unter Zuhilfenahme des Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit (Qiagen) lysiert und die Plasmide an die Matrix der im Kit enthaltenen Säulen gekoppelt. Nach verschiedenen Waschungen wurde die gereinigte Plasmid-DNA in 100 µl dH₂O von der Säulenmatrix eluiert.

2.3.2.2 Maxiprep

Um Plasmide in größerer Menge und hoher Reinheit verfügbar zu haben, z.B. für anschließende Klonierungen oder Transfektion in HeLa-Zellen, wurden Maxipreps durchgeführt. Dazu wurden 100ml 2YT-Medium (Sambrook et al., 1989, S. A3) mit einem adäquaten Selektionsantibiotikum versetzt und mit 40 µl einer Bakterien-Übernachtskultur angeimpft. Das angeimpfte Medium wurde anschließend 12-16h bei einer Temperatur von 37°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Durch Verwendung des Qiafilter Plasmid MAXI Kit (Qiagen) wurde die Plasmid-DNA aus der 100ml Übernachtskultur präpariert, gereinigt, gefällt und pelletiert. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde anschließend in 200 µl dH₂O resuspendiert, quantifiziert (2.2.1) und für den weiteren Gebrauch auf eine DNA-Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

2.4 Modifikation und Klonierung von DNA

2.4.1 Ortsgerichtete in vitro Mutagenese bis zu 5 Nukleotiden

Eine gezielte Einführung von Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen von weniger als 5 Nukleotiden in ein Plasmid wurde mit Hilfe des Quick-change-Mutagenese-Systems der Firma Stratagene durchgeführt. Dabei wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide mit der entsprechenden Mutation mit dem zu mutierenden Plasmid in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Bei der PCR-Reaktion lagern sich die mutagenisierenden Oligonukleotide an die parentale Matrizen-DNA an, und es werden mutagenisierte Tochterstränge synthetisiert. Zur Amplifikation wurde die „proofreading“ Pfu-Tulbo™-DNA-Polymerase verwendet. Anschließend wurde die Parental-DNA, welche keine Mutation trägt, mittels DpnI verdaut. Diese Selektion beruht auf der fehlenden Methylierung der Tochterstränge während der PCR-Reaktion gegenüber der bakteriellen Methylierung der eingesetzten Parental-DNA. DpnI verdaut ausschließlich hemimethylierte und vollständig methylierte DNA. So wurde selektiv nur die ursprünglich eingesetzte DNA zerstört. Die neu gebildete DNA mit den gewünschten Mutationen wurde erhalten und zur Transformation verwendet.

Mutagenese Ansatz:

5µl 10x Puffer Pfu-Turbo™-DNA-Polymerase
 4µl dNTP (je 2,5mM)
 40ng Plasmid
 125ng Vorwärtsprimer
 125ng Rückwärtsprimer
 1µl Pfu-Turbo™-DNA-Polymerase (2,5U)
 ad 50µl H₂O

Die PCR wurde in einem Thermocycler Primus der Firma MWG unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C 30s	} 18 Zyklen
95°C 30s	
55°C 1min	
72°C 2 min/kb	

Anschließend wurde der Ansatz drei Stunden lang mit 1µl DpnI verdaut, mittels des Qiaquick PCR Purification Kits (Qiagen) gereinigt und in 50µl dH₂O eluiert. 5-20µl des PCR-Ansatzes wurden zur Transformation von 100µl Z-kompetenten Zellen verwendet.

2.4.2 Ortsgerichtete in vitro Mutagenese von mehr als 5 Nukleotiden

Zum Einfügen größerer Deletionen oder Insertionen in Plasmid-DNA wurde eine Methode angewendet, die der ortsgerichteten Mutagenese (2.4.1) vom Prinzip her sehr ähnlich ist. Im Unterschied dazu wurden Oligonukleotide verwendet, welche am 5'-Ende phosphoryliert sind und die sich nicht überlappen, sondern den zu deletierenden Bereich aussparen oder die Insertion tragen. Ansätze und PCR-Programme gleichen den unter 2.3.1 beschriebenen. Die Behandlung der Proben nach der PCR-Reaktion erfolgte wie unter 2.4.1 beschrieben.

2.4.3 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen**2.4.3.1 Präparativer Verdau**

50µl gelgereinigtes PCR-Fragment bzw. 5µg Plasmid-DNA wurden mit 20-40U Enzym und 5µl 10x Restriktionspuffer versetzt und auf 50µl Gesamtvolumen mit dH₂O aufgefüllt. Je nach Enzym wurden zusätzlich 0,5µl unverdünntes BSA (Rinderserumalbumin, NEB) beigefügt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde 2-16h bei der

vorgegebenen Temperatur inkubiert. Gleichzeitiger Verdau mit zwei Restriktionsenzymen ist möglich, wenn die Puffer- und Reaktionstemperatur-Bedingungen übereinstimmen. Ansonsten wurde ein Reinigungsschritt mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach dem ersten Verdau durchgeführt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde im Anschluss an den Verdau über ein präparatives TAE-Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) zurückgewonnen.

2.4.3.2 Analytischer Verdau

Ca. 200-300ng Plasmid-DNA, z.B. 7µl eines Miniprep-Ansatzes, wurden mit 2U Enzym und 1µl 10x Reaktionspuffer verdaut. Der Reaktionsansatz betrug standardgemäß 10µl. Die Probe wurde bei geeigneter Temperatur 2h inkubiert und anschließend auf einem analytischen TBE-Agarosegel aufgetrennt und begutachtet.

2.4.4 Dephosphorylierung von DNA

Nach Restriktionsverdau einer Vektor-DNA wurde die linearisierte Nukleinsäure mit alkalischer Phosphatase aus Kalbintestinum (Calf Intestinum Phosphatase, CIP) behandelt. So wurden die 5'-Enden dephosphoryliert und eine Religation während eines Ligationsvorgangs verhindert. Da die CIP (NEB) mit den meisten Puffern der Restriktionsendonukleasen (NEB) kompatibel ist, konnten je 2U CIP pro 1µg linearisierter Vektor-DNA direkt zu dem Restriktionsverdau zugegeben und mit diesem 2h bei einer Temperatur von 37°C inkubiert werden. Die Proben wurden anschließend mittels des Qiaquick PCR Purification Kits (Qiagen) gereinigt.

2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten in vektorielle DNA

Ein weiterer Schritt nach dem präparativen Verdau und der CIP-Behandlung des Vektors ist die Ligation einer Insertions-DNA in einen linearisierten Vektor. Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiester-Brücken zwischen freien 5'-Phosphatgruppen und freien 3'-Hydroxylgruppen des Vektors bzw. der Insertions-DNA.

Ligationsansatz:

- 20-50ng linearisierte, gereinigte Vektor-DNA
- 20-200ng verdaute, gereinigte Insertions-DNA
- 1,5µl 10x Ligase-Puffer
- 1,5µl ATP, 10 mM
- 3U T4-DNA-Ligase
- ad 15µl dH₂O

Ein Verhältnis zwischen Vektor und Insertions-DNA von 1:3 bis 1:5 wurde eingesetzt. Die Inkubation betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur. Zur Transformation wurde der vollständige Ligationsansatz verwendet.

2.4.6 Klonierung mit Hilfe des Topo TA Cloning® Kit

Im Rahmen der Klonierung des EBOV-Reston-Genoms wurden die hergestellten RT-PCR-Produkte in den pCR® II-Topo Vektor der Firma Invitrogen (Anhang) unter Verwendung des Topo TA Cloning® Kits kloniert. Der linearisierte Vektor pCR® II-Topo besitzt überhängende Thymidinreste an der Klonierungsstelle, so dass PCR-Produkte eingefügt werden können, die mit einer Taq-Polymerase ohne „proof reading“-Aktivität amplifiziert wurden. Diese PCR-Produkte besitzen überhängende 3'-Adenosinreste und werden deswegen nur unzureichend in einen Vektor mit „stumpfen“ Enden (blunt ends) ligiert.

Zuerst wurden die RT-PCR-Produkte mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt und in 30µl dH₂O eluiert. Davon wurden 6µl auf ein Kontrollgel aufgetragen. Anschließend wurde der Ligationsansatz zusammengesetzt und 30min lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Ligationsansatz:

- 3µl PCR-Produkt
- 1µl Salt Solution (Invitrogen)
- 1µl linearisierte Vektor pCR® II-Topo (Invitrogen)
- 5µl

Anschließend wurden kompetente Bakterien, E. coli Strains TOP10 (Invitrogen) mit 2µl Ligationsansatz transformiert (2.9.2).

2.5 Extraktion und Isolierung von RNA

2.5.1 Extraktion von RNA

Der Überstand aus EBOV-Reston-infizierten Vero-Zellen wurde mit 1 vol. RLT-Puffer (Qiagen) + 1% Mercaptoethanol versetzt. Nach Mischen der Lösung wurde diese mit 100% EtOH im Verhältnis 1,8:1 versetzt. 5,6ml dieses Gemischs wurden nach dem „Animal-Cell“ Protokoll des RNeasy Kits (Qiagen) unter Verwendung von vier Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Die RNA wurde anschließend in insgesamt 400µl RNase-freiem

dH₂O eluiert, mit 1ml 100%igem RNase-freiem EtOH, 40µl 3M Natriumacetat (pH 7,0) und 1µl Glykogen (20µg/µl) gemischt und für mindestens 12h bei –20°C gefällt.

Nach der Fällung wurde die RNA 25min lang zentrifugiert bei 14000UpM und 4°C, anschließend einmal mit 70%igem RNase-freiem EtOH gewaschen und 5min bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde dann in 24µl Rnase-freiem dH₂O eluiert und bei –80°C aufbewahrt.

2.5.2 Isolierung von RNA

Um transkribierte mRNA von replizierter Minigenom- bzw. Antiminigenom-RNA zu unterscheiden, wurden zwei unterschiedliche Isolierungsmethoden verwendet. Replizierte RNA ist durch die Enkapsidierung mit dem Nukleokapsid-Protein resistent gegen Nukleasebehandlung und kann durch einen Verdau mit S7- Mikrokokkennuklease von anderen RNAs getrennt werden.

Transkribierte mRNA ist polyadenyliert und kann über eine Präzipitation mit Oligo(dT)-Zellulose aus einem RNA-Gemisch isoliert werden.

2.5.2.1 Isolierung von transkribierter mRNA

Vorbereitung der Oligo(dT)-Zellulose:

In einem Falcon-Röhrchen wurden 100µg Oligo(dT)-Zellulose in 5ml Binding-Buffer (BB) aufgenommen und 1h auf Eis inkubiert. Danach wurde die gequollene Oligo(dT)-Zellulose bei 2000UpM (4°C) 10min lang zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 2ml BB resuspendiert.

Die Zellen wurden ca. 40h nach der Transfektion zweimal mit kaltem PBS_{def} auf einer Kühlplatte gewaschen und in 500µl kaltem PBS_{def} abgeschabt. Danach wurden die Zellen bei 8000UpM (4°C) 8min lang zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 350µl RLT-Puffer (Qiagen) + Mercaptoethanol resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann mit Hilfe einer Kanüle (Ø 0,55mm) geschert und mit 350µl 70%igem EtOH gemischt. Anschließend wurden die Proben nach dem „Animal-Cell“ Protokoll des RNeasy Kit (Qiagen) behandelt und die RNA in 200µl Rnase-freiem dH₂O eluiert.

Zu der RNA-Lösung wurden dann 200µl 2x Elution Buffer (2x EB) zugegeben, die gesamte Probe 5min lang im Wasserbad gekocht, 3min auf Eis inkubiert und mit 1/10 Volumen 5M NaCl-Lösung gemischt. Den verschiedenen Ansätzen wurden dann 100µl vorgequollene Oligo(dT)-Zellulose zugegeben. Die Ansätze wurden 5min lang auf

Stufe 3 eines Vortex-Gerätes geschüttelt und bei 3000UpM, 4°C, zentrifugiert um die an die Zellulose gebundene mRNA zu pelletieren. Nach drei Waschvorgängen der Pellets mit je 800µl BB (je 15s lang auf dem Vortex schütteln, 2min lang bei einer Geschwindigkeit von 14000UpM, 4°C, zentrifugieren und den Überstand verwerfen) wurde die gebundene mRNA von der Oligo(dT)-Zellulose in 4 Schritten mit je 100µl 70°C warmes 1x Elution Buffer (1x EB) eluiert. Die 400µl mRNA-Lösung wurde dann mit 1ml 100%igem RNase-freiem EtOH, 40µl 3M Natriumacetat (pH 7,0) und 1µl Glykogen (20µg/µl) gemischt und für mindestens 12h bei -20°C gefällt.

2.5.2.2 Isolierung von replizierter RNA

Ca. 40h nach der Transfektion wurden die Zellen zwei mal mit kaltem PBS_{def} auf einer Kühlplatte gewaschen und in 500µl kaltem PBS_{def} abgeschabt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 8min bei 8000UpM (4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200µl S7-MCN-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden einer Ultraschall-Behandlung bei 4°C und 60 Pulsen/min unterworfen. Die Zellsuspension wurde dann mit Hilfe einer Kanüle (Ø 0,55 mm) 10 mal geschert, mit 3U S7-Mikrokokkennuklease gemischt und 1h bei 30°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 700µl RLT-Puffer (Qiagen) + Mercaptoethanol und 500µl 100%igem RNase-freiem EtOH den Proben zugegeben. Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach dem „Animal-Cell“ Protokoll des RNeasy Kits (Qiagen). Die RNA wurde in 200µl RNase-freiem dH₂O eluiert, mit 500µl 100%igem RNase-freiem EtOH, 20µl 3M Natriumacetat (pH 7,0) und 1µl Glykogen (20µg/µl) versetzt und für mindestens 12h bei -20°C gefällt.

2.6 Analyse von RNA

2.6.1 Quantifizierung von RNA

Die quantitative RNA-Bestimmung wurde mit Hilfe eines Gene QuantII UV-Spektrometers (Pharmacia) durchgeführt. Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ (OD₂₆₀) durchgeführt. Eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 40µg/ml RNA. Es gilt folgende Gleichung:

$$\text{OD}_{260} * \text{Verdünnung} * 40 = \text{RNA-Gehalt in } \mu\text{g/ml.}$$

2.6.2 Agarose-Elektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA-Fragmenten erfolgte auf 1,5%igem Formaldehyd-Agarosegelen.

Vorbereitung der Formaldehyd-Agarose-Gele:

In einem Erlmeierkolben wurden 0,45g RNase-freie Agarose in 23,3ml RNase-freiem dH₂O durch Kochen gelöst und mit 6ml 5x FA-Laufpuffer und 1ml 37%iger Formaldehydlösung gemischt. Anschließend wurde die Gellösung in einen Gelschlitten gegossen und unter dem Abzug abgekühlt.

Die transkribierte oder replizierte RNA wurde nach ihrer Fällung bei -20°C 25min lang bei 14000UpM und 4°C zentrifugiert, anschließend einmal mit 70%igem RNase-freiem EtOH gewaschen und 5min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde das Pellet in 10µl FA-Auftragspuffer resuspendiert, 15min bei 65°C denaturiert, 5min auf Eis inkubiert und mit 2µl RNA-Farbpuffer gemischt. Die Proben wurden dann auf ein 1,5%iges Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen. Das Einlaufen der Proben in das Gel erfolgte bei 50V, anschließend wurde die Spannung auf 90V erhöht. Als Laufpuffer wurde 1x FA-Laufpuffer verwendet.

2.6.3 Northern-Blot-Analyse von RNA

Im Anschluß an die Agarosegelelektrophorese wurden die RNA-Fragmente aus dem Formaldehyd-Gel auf eine positiv geladene Nylon-Membran mittels des Vakuum-Blotters TransDNA Express™ übertragen. Die Nylon-Membran wurde zuerst kurz in Methanol getränkt, 10min lang im alkalischen Transferpuffer geschwenkt und auf einem 3mm Whatman-Papier in das Gerät eingebaut. Auf die Nylon-Membran wurden das Formaldehyd-Agarosegel sowie eine abdichtende Plastikfolie appliziert. Der gesamte Blotvorgang dauerte 90min bei einem Saugdruck von 50mBar. Nach dem Transfer der RNAs auf die Membran wurde diese 10min lang in 200mM Phosphatpuffer neutralisiert und 3min auf einem UV-Tisch fixiert.

2.6.4 Prähybridisierung und Hybridisierung von membrangebundener RNA

Vor der Hybridisierung der RNA-haltigen Nylon-Membran wurde eine Prähybridisierung durchgeführt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dabei wurde die Membran in einem Hybridisierungsröhrchen mit 19ml Collins-Hybridisierungslösung und 1ml Lachsspermien-DNA (10min lang bei 95°C erhitzt und anschließend 5min lang auf Eis gekühlt) 6h bei 65°C im Hybridisierungssofen rotiert. Danach wurden 17ml der Collins-Hybridisierungslösung entnommen und 3-5µl der spezifischen DIG-markierten RNA-Hybridisierungssonde (3min lang bei einer Temperatur von 95°C denaturiert und 3min lang auf Eis gekühlt) zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung wurde mindestens 12h bei 65°C im Hybridisierungssofen durchgeführt.

2.6.5 Nachweis von membrangebundenen RNAs durch DIG-markierte RNA-

Sonden

Die Membran wurde nach Ende der Hybridisierung zuerst 5min lang bei Raumtemperatur in SDS/SSC-Waschpuffer auf einem Schüttler geschwenkt, danach in einem mit SDS/SSC-Waschpuffer gefüllten Hybridisierungsröhrchen 2h lang im Hybridisierungsofen bei 65°C rotiert. Im Anschluss wurde die Membran 5min bei Raumtemperatur in Chemilumineszenz-Puffer Nr.1 und weitere 60min in einem Gemisch von 60ml Chemilumineszenz-Puffer Nr.1 und 15ml 10%iger Blockingreagenzlösung inkubiert. Danach wurde ein α -DIG-Antikörper in 40ml dieser Lösung 1:20000 bzw. 1:40000 verdünnt und die Membran 30min lang bei Raumtemperatur in der Antikörperlösung auf dem Schüttler geschwenkt.

Die Membran wurde dann mit Chemilumineszenz-Puffer Nr.1 0,3% Tween20 dreimal je 5min lang, gewaschen und mit Chemilumineszenz-Puffer Nr. 3 5min lang äquilibriert. Anschließend wurde auf den Blot 1ml verdünnte CDP-Star-Lösung (995 μ l Chemilumineszenz-Puffer Nr.3 + 5 μ l CDP-Star) pipettiert, 5min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich die Membran in eine durchsichtige Plastikfolie eingeschweißt. Ein Röntgenfilm wurde darauf exponiert.

2.7 Modifikation von RNA

2.7.1 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)

Um RNA mit Hilfe einer PCR zu vervielfältigen, hybridisiert man ein Oligonukleotid an die RNA-Matrize und mittels einer reversen Transkriptase (RT) wird cDNA synthetisiert. In einen zweiten Schritt dient die cDNA als Matrize für eine PCR. Die RT-PCR wurde zur Klonierung des Genoms von EBOV-Reston mit Hilfe des Qiagen® One Step RT-PCR Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Durch die Verwendung einer Taq-Polymerase war die Klonierung der PCR-Fragment im pCR® II-Topo Vektor möglich.

<u>Qiagen One Step RT-PCR Ansatz:</u>	<u>Qiagen One Step RT-PCR Programm:</u>	
10 μ l 5x Qiagen Reaktionspuffer	45°C 30min	
100pmol Vorwärtsprimer	95°C 15min	
100pmol Rückwärtsprimer	94°C 30s	} 35 Zyklen
2 μ l dNTP Mix (jedes 10mM)	45-65°C 1min	
4 μ l Matrizen RNA (0,05 μ g/ μ l)	72°C 1min/Kb Matrize	
2 μ l Qiagen OneStep Enzym Mix	72°C 10min	
ad 50 μ l H ₂ O	8°C bis zur Entnahme der Probe	

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden 5µl (1/10 des Ausgangsvolumens) des PCR-Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und begutachtet. cDNA-Synthese und PCR wurden bei der Klonierung der Nukleokapsidproteingene des EBOV-Reston getrennt da zur Vermeidung von Mutationen die PWO-DNA-Polymerase mit „proof reading“ Funktion eingesetzt wurde. Für die reverse Transkription wurde das Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit der Firma Qiagen verwendet.

Omniscript™ Reverse Transcriptase Ansatz:

2µl 10x Omniscript™ Reverse Transcriptase Puffer
 2µl dNTP-Mix (je 5mM)
 2µl Oligonukleotide (10µM)
 1µl RNase Inhibitor (10U/µl)
 1µl Omniscript™ Reverse Transcriptase
 5µl Matrize RNA (0,05µg/µl)
 ad 20µl H₂O

Der Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert und anschließend wurde eine PCR mit PWO-Polymerase durchgeführt.

PWO-PCR Ansatz:

PCR Programm:

10µl cDNA	99°C 5min	
10µl 10x Reaktionspuffer	92°C 2min (Zugabe der Polymerase)	
125 ng Vorwärtsprimer	95°C 30s	} 35 Zyklen
125 ng Rückwärtsprimer	45-65°C 1min	
1µl dNTP Mix (je 25mM)	72°C 1min/kb Matrize	
ad 99,5µl H ₂ O	72°C 10min	
	8°C bis zur Entnahme der Probe	

Zur Verbesserung der PCR wurde ein sogenannter Hotstart durchgeführt, bei welchem der Reaktionsansatz von 99,5µl zuerst 5min lang auf 99°C erhitzt wurde. Danach wurden die Proben auf 92°C herunter gekühlt, und es wurden 0,5µl PWO-Polymerase zugegeben. Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden 10µl (1/10 des Ausgangsvolumens) des PCR-Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und begutachtet.

2.7.2 Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde

Mittels des 10x DIG Labelling Mix der Firma Roche wurde eine spezifische RNA-Sonde mit Digoxigenin (DIG) markiert. Dabei kam das Konstrukt BS/-CAT (im Labor

vorhanden) als Vorlage zum Einsatz. Es handelt sich um den Vektor pBlueskript/-CAT, in den das CAT-Gen in negativer Orientierung (bezogen auf den T7-RNA-Polymerase-Promotor) inkloniert wurde, so dass eine DIG-markierte RNA entstand, welche komplementär zur CAT-mRNA war. Vor der in vitro Transkription wurde die Matrizen-DNA mit BamHI linearisiert.

Ansatz für die DIG markierte RNA-Sonde:

13µl linearisiertes Konstrukt BS/-CAT
 2µl DIG Labelling Mix
 2µl 10x Transkriptionspuffer
 1µl RNase-Inhibitor
 2µl T7-RNA-Polymerase
 20µl

Der Ansatz wurde für 3h bei 37°C inkubiert, anschließend 1µl RNase freie DNase zugesetzt und für 30 weitere Minuten bei 37° C gestellt. Mit dem „RNA-Cleanup“ Protokoll des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen wurde schließlich die transkribierte und DIG markierte RNA gereinigt, in 100µl RNase freiem dH₂O eluiert und mit 3µl RNase-Inhibitor versetzt. Zur Aufbewahrung wurde die markierte RNA-Sonde bei -20°C gelagert.

2.7.3 RNA-Ligation

Zur exakten Bestimmung des 3'-Endes des EBOV-Reston-Genoms wurde eine RNA-Ligation mit viraler RNA und T4-RNA-Ligase (Roche) durchgeführt. Bei dieser Reaktion wurde das 3'-Ende des Genoms mit dem 5'-Ende verknüpft. Anschließend wurde mit der ligierten RNA eine RT-PCR durchgeführt. Dabei entstand ein PCR-Produkt, das die Ligationsstelle enthielt. Das PCR-Produkt wurde sequenziert.

Ligationsansatz:

1µl gereinigte EBOV-Reston RNA
 1µl 10x T4-RNA-Ligasepuffer (Roche)
 0,5µl RNase-Inhibitor (40U/µl)
 1µl T4 RNA-Ligase (10U/µl)
 ad 10µl H₂O (Inkubation über Nacht bei 16°C)

2.7.4 RACE

RACE (rapid amplification of cDNA ends) ist eine Methode zur Amplifikation von

Nukleinsäure-Sequenzen ausgehend von einer RNA-Matrize zwischen einem bekannten internen Bereich und einer unbekanntem Sequenz am 5'-oder 3'-Ende der RNA.

2.7.4.1 5'RACE

Dies ist eine Technik, die die Charakterisierung unbekannter Sequenzen am 5'-Ende einer RNA ermöglicht.

Zunächst wird mittels eines Gen-spezifischen Primers (GSP1) eine cDNA mittels RT-PCR synthetisiert. Durch eine terminale Desoxynukleotid-Transferase (TdT) wird ein homopolymerischer Nukleotidschwanz an das 3'-Ende der cDNA angehängt. Anschließend wird eine PCR mit einem zweiten GSP (GSP2) und einem spezifischen Primer für den homopolymerischen Teil durchgeführt, wobei der unbekanntem Bereich zwischen GSP2 und dem 5'-Ende der RNA amplifiziert wird.

Für die reverse Transkription wurde der Primer #985 als GSP1 eingesetzt. Die reverse Transkription wurde unter Verwendung des 5'RACE-Kits der Firma Life Technologies™ durchgeführt.

Der Ansatz der reversen Transkription lautete:

6,5µl DEPC-H₂O
8µl gereinigte virale RNA
5pmol Primer #985
2,5µl 10x PCR-Puffer
2,5µl 25mM MgCl₂
1µl 10mM dNTP-Mix
2,5µl 0,1M DTT
1µl SuperScript II RT
24µl

Der Ansatz wurde für 50min bei 42°C inkubiert.

Das Tailing der cDNA wurde zuerst mit dCTP, in einem weiteren Versuch mit dGTP für 10min bei 37°C durchgeführt. Für die folgende PCR wurden die Primer #986 und #307 verwendet. Anschließend wurde eine Nested-PCR mit den Primern #954 und #307 durchgeführt. Als Matrizen-DNA wurde 1:2, 1:10 oder 1:100 verdünntes PCR-Produkt eingesetzt. Es folgte eine Sequenzierung mit der Primer #954. Ein ausführliches Protokoll ist dem Anhang zu entnehmen.

2.7.4.2 3'RACE

Beim 3'RACE wird der poly (A)-Schwanz der mRNA als Bindungsstelle für einen

poly(T)-Primer benutzt. Eine 75cm²-Zellkulturflasche von Vero-Zellen wurde im Sicherheitslabor mit EBOV-Zaire infiziert. 48 bzw. 72h nach der Infektion wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS_{def} gewaschen, in 7ml PBS_{def} abgekratzt und 10min bei 2000rpm, 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 600µl RLT-Puffer (Qiagen) + 1% Mercaptoethanol resuspendiert. Nach achtmaligem Scheren wurde das Lysat mit 600µl 100% EtOH versetzt und die RNA nach dem „Animal-Cell“ Protokoll des RNeasy Kits (Qiagen) aufgereinigt. Jede RNA-Probe wurde anschließend in 100µl RNase-freiem dH₂O eluiert, mit 250µl 100%igem RNase-freiem EtOH, 10µl 3M Natriumacetat (pH 7,0) und 0,25µl Glykogen (20µg/µl) gemischt und für mindestens 12h bei –20°C gefällt.

Nach der Fällung wurde die RNA 25min lang zentrifugiert bei 14000UpM und 4°C, anschließend einmal mit 70%igem RNase-freiem EtOH gewaschen und 5min bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde dann in 50µl RNase-freiem dH₂O eluiert und bei –80°C aufbewahrt.

Die VP24-genspezifische mRNA wurde durch eine RT-PCR (Taq-Polymerase) mit Hilfe des Qiagen[®] One Step RT-PCR Kits der Firma Qiagen in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Hierzu wurden der VP24-genspezifische Primer #1149 und der oligo-dT Primer (#115) eingesetzt, um das 3'-Ende der VP24-mRNA des EBOV-Zaire zu kartieren. Anschließend wurde eine Nested-PCR mit den Primern #1150 und #115 durchgeführt. Durch die Verwendung einer Taq-Polymerase war die Klonierung des PCR-Fragments in pCR[®] II-Topo Vektor der Firma Invitrogen möglich.

Qiagen One Step RT-PCR Ansatz:

10µl 5x Qiagen Reaktionspuffer
 100pmol Vorwärtsprimer #1149
 100pmol Rückwärtsprimer #115
 2µl dNTP Mix (jedes 10mM)
 5µl zelluläre RNA
 2µl Qiagen OneStep Enzym Mix
 ad 50µl H₂O

Qiagen One Step RT-PCR Programm:

45°C 30min
 95°C 15min
 94°C 1min
 50°C 1min
 72°C 1min
 72°C 10min
 8°C bis zur Entnahme der Probe

} 40 Zyklen

Nested-PCR Ansatz:

5µl 10x Taq-Reaktionspuffer
 100pmol Vorwärtsprimer #1150
 100pmol Rückwärtsprimer #115
 2µl dNTP Mix (jedes 10mM)
 2µl PCR-Produkt
 1µl Taq-Polymerase
 ad 50µl H₂O

Nested-PCR Programm:

94°C 1min
 94°C 1min
 50°C 1min
 72°C 1min
 72°C 10min
 8°C bis zur Entnahme der Probe

} 35 Zyklen

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden 5µl (1/10 des Ausgangsvolumens) des PCR-Ansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und begutachtet.

2.8 Transfektion von eukaryontischen Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transfektionen wurden folgende Mengen an Plasmid-DNA eingesetzt:

EBOV-Zaire:

pTM1/NP	0,5µg
pTM1/VP35	0,5µg
pTM1/VP30	0,1µg
pTM1/L	1,0µg
Minigenom	2,0µg

MBGV:

pTM1/NP	0,1µg
pTM1/VP35	0,5µg
pTM1/VP30	0,1µg
pTM1/L	1,0µg
Minigenom	2,0µg

2.8.1 Transfektion von HeLa-Zellen mit Lipofektin®-Reagenz

HeLa Zellen wurden in 6er-Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von ca. 60% kultiviert und mit MVA-T7 Virus infiziert (2.10). Pro zu transfizierendem Zellkulturschälchen wurde in einem Polystyrol-Röhrchen 1ml DMEM ohne FCS mit 5 µl Lipofektin®-Reagenz gemischt und einer 30minütigen Inkubation bei RT unterzogen. Während der Inkubationszeit wurden Ansätze mit der zu transfizierenden DNA vorbereitet. Dazu wurden pro Zellkulturschälchen je 1ml DMEM ohne FCS mit x µg Plasmid-DNA in einem Polystyrol-Röhrchen gemischt. Nach Ablauf der 30minütigen Inkubationsperiode wurden pro zu transfizierendem Zellkulturschälchen je 1ml des vorbereiteten Lipofektin®-Ansatzes mit 1ml der vorbereiteten DNA-Lösung gemischt und für weitere 15min bei RT belassen. Anschließend wurde je ein 2ml Transfektionsansatz auf ein Zellkulturschälchen mit den 1x mit DMEM gewaschenen (und mit MVA-T7 infizierten) Zellen gegeben. Es folgte eine 12-16stündige Inkubation bei einer Temperatur von 33°C und einer CO₂-Atmosphäre von 5%. Dann wurde das Transfektionsmedium gegen DMEM mit 3% FCS ausgewechselt und die Inkubation der Zellen bei einer Temperatur von 33°C und einem CO₂-Gehalt von 5% für weitere 12-16h fortgesetzt.

2.8.2 Transfektion von HUH-T7-Zellen bzw. BSR-T7/5-Zellen mit Fugene®

HUH-T7-Zellen und BSR-T7/5-Zellen exprimieren die T7-RNA-Polymerase konstitutiv. HUH-T7-Zellen wurden in 6er-Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von 70% bzw. BSR-T7/5-Zellen bis zu einer Dichte von 50% kultiviert. Zuerst wurden die Zellen mit DMEM

ohne Antibiotika und ohne FCS dreimal gewaschen. Anschließend wurde pro Zellkulturschälchen 1ml DMEM ohne Antibiotika und ohne FCS hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Während dieser Zeit wurden pro Zellkulturschälchen zwei Ansätze vorbereitet:

800µl DMEM+ x µg Plasmid-DNA

200µl DMEM+ y µl Fugene[®]-Reagenz

Das Verhältnis von DNA (in µg) zu Fugene[®]-Reagenz (in µl) betrug dabei 1:3.

Die 800µl DMEM/DNA wurden mit den 200µl DMEM/Fugene[®]-Reagenz durch Pipettieren gemischt und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die DNA/Fugene-Ansätze auf das jeweilige Zellkulturschälchen pipettiert und die Zellen für 8h bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Transfektionsmedium durch 2ml 1x DMEM mit Penicillin/Streptomycin und 3% FCS ersetzt. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion geerntet.

2.9 Transformation von Bakterien

2.9.1 Transformation von Z-kompetenten Bakterien

Z-kompetente XL1-Blue Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Pro Ansatz wurden 100µl der Bakterien eingesetzt. Für die Transformation wurden 15µl Ligationsansatz, 5-10µl DpnI-verdaute Mutagenese-PCR-Proben oder 10-100ng gereinigte Plasmide verwendet. Die Ansätze wurden 60min auf Eis inkubiert, anschließend auf einer 2YT-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum wie z. B. Ampicillin (100µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Von den gewachsenen Kolonien konnten dann, zur weiteren Analyse der Plasmide, Minipreps angefertigt werden.

2.9.2 Hitzeschocktransformation von Bakterien

Zur Transformation wurde der E. coli Stamm TOP10 der Firma Invitrogen verwendet. Zunächst wurden 50µl transformationskompetente Bakterien 2min lang auf Eis aufgetaut und mit 2µl pCR[®] II-Topo Vektor-Ligationsansatz (2.4.6) vorsichtig mit der Pipette vermischt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis und ein Hitzeschock bei 42°C für 30s. Dem Transformationsansatz wurden dann 250µl SOC-Medium (Raumtemperatur) zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 1h bei 37°C auf dem Schüttler (200UpM) inkubiert. Während dieser Zeit wurden 2YT-Agarplatten mit Ampicillin (50µg/ml) auf 37°C vorgewärmt und mit 40µl einer X-Gal-Lösung (40mg/ml) ausplattiert. Nach einer 15-minütigen lichtgeschützten Trocknungsphase bei Raumtemperatur wurden 100µl der

transformierten Bakterien auf die Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Positive Kolonien zeigen sich durch eine weiße Farbe, negative Kolonien durch eine dunkelblaue Farbe. Von den positiven gewachsenen Kolonien wurden dann, zur weiteren Analyse der Plasmide, Minipreps angefertigt.

2.10 Infektion von HeLa-Zellen mit dem MVA-T7-Virus

Zur Expression der T7-RNA-Polymerase in HeLa-Zellen wurden diese mit rekombinanten MVA-T7-Virus infiziert. Dazu wurden die Zellen in 6er-Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von 60-70% kultiviert und mit DMEM gewaschen. Anschließend wurden pro Vertiefung 10-100µl MVA-T7-Virus Stammlösung (abhängig vom Virusstock) in DMEM zugegeben.

Die Adsorption erfolgte für 1h bei 37°C auf einem Kippschüttler. Schließlich wurde die Viruslösung entfernt und durch die Transfektionslösung mit Lipofektin®-Reagenz ersetzt.

2.11 Herstellung von Z-kompetenten Bakterien

E. coli Bakterien, z.B. XL1-Blue, wurden mit Hilfe des Transformation Kits der Firma Zymo Research (Orange USA) kompetent gemacht. Zuerst wurden 50ml SOB-Medium (Sambrook et al., 1989; S. A2) mit 0,5ml einer frischen Übernachtskultur inokuliert und horizontal bei Raumtemperatur geschüttelt, bis eine optische Dichte von 0,2 bis 0,4 bei einer Wellenlänge von $\psi = 600\text{nm}$ erreicht wurde. Danach wurde die Bakterienkultur 10min lang auf Eis gestellt und anschließend bei einer Geschwindigkeit von 2500g (4°C) 10min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5ml eiskaltem 1x Wash Buffer (Zymo Research) resuspendiert und wiederum 10min lang bei 2500g (4°C) zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 5ml eiskaltem Competent Buffer (Zymo Research) aufgenommen und in 100µl- bzw. 200µl-Aliquots aufgeteilt. Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

2.12 Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität (CAT)

Im EBOV- bzw. MBGV- Transkriptionssystem (1.5) kann die Transkription über die gebildete CAT-Aktivität bestimmt werden. Die CAT modifiziert durch Mono- und Diacetylierung das Substrat Chloramphenicol. So werden Acetyl-Gruppen des Donors

Acetyl-Coenzym-A auf den Akzeptor Chloramphenicol übertragen und es entstehen folgende Produkte:

1-Acetylchloramphenicol

3-Acetylchloramphenicol

1-3-Diacetylchloramphenicol

Die Menge an CAT-Aktivität ist direkt proportional zu der Menge an modifiziertem Chloramphenicol. Die jeweiligen Produkte wurden über Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt.

36h nach der Transfektion (2.8) wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS_{def} gewaschen und in 150µl 1x Reporter-Lysis-Puffer (Promega) 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß pipetiert, und 2min bei 10000UpM zentrifugiert. Mit dem Zellysate (Überstand) wurde dann der biochemische Nachweis der CAT-Aktivität durchgeführt.

CAT Ansatz:

1-5µl Zellysate

1µl Acetyl-Coenzym-A (70mg/ml in 250mM Tris/HCl, pH 7,5)

2µl ¹⁴C-Chloramphenicol (25µCi/ml)

ad 150µl 250mM Tris/HCl, pH 7,5

Die Inkubation der Proben dauerte 3-15h bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 750µl Ethylacetat gestoppt. Anschließend wurden die Proben 1min lang mit Hilfe eines Vortex-Gerätes gemischt und 2min zentrifugiert bei 10000UpM (Raumtemperatur). Die obere organische Phase wurde entnommen, in ein neues Gefäß pipetiert und im Vakuumverdampfer vollständig eingedampft. Das entstandene Pellet wurde in 10µl Ethylacetat aufgenommen und auf eine kieselgelbeschichtete DC-Glasplatte (Merck) aufgetropft. Die DC-Glasplatte wurde anschließend in eine abgeschlossene DC-Kammer, mit 95ml Dichlormethan und 5ml Methanol als Laufpuffer, gestellt. Schließlich erfolgte die Auswertung über Exposition einer BioImager-Platte (Fuji) auf die DC-Platte und einer sich anschließenden computergestützten Analyse mit dem BioImager Analyser BAS-1000.

2.13 Immunfluoreszenz

Die benötigten HeLa-Zellen wurden hier auf runden Deckgläsern, mit einem Durchmesser von 12mm, in 6er-Zellkulturplatten angezchtet. Die Zelldichte sollte eine Konfluenz von

ca. 50% haben um effizient MVA-T7 Infektion und Plasmidtransfektion durchführen zu können wie es unter 2.10 und 2.8 beschrieben ist.

Nach einer Inkubationszeit von 8h (post Transfektion) wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS_{def} gewaschen und mit 1ml 3,5% Paraformaldehyd (in PBS_{def}) für 5min bei Raumtemperatur überschichtet. Danach wurden die Zellen wiederum dreimal mit PBS_{def} gewaschen und einer Inkubation in 2ml 100mM Glycin 15min lang bei Raumtemperatur unterzogen. Nach zwei weiteren Waschschrten mit PBS_{def} wurden die Zellen mit 1ml 0,1% Triton X100 (in PBS_{def}) überschichtet (15min bei Raumtemperatur) und mit 1ml „blocking buffer“ 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Der erste Antikörper wurde in „blocking buffer“ verdünnt und 25µl davon wurden tropfenförmig auf ein Stück Parafilm pipettiert. Das Deckglas mit der zellbewachsenen Seite nach unten wurde auf den Erstantikörper gelegt und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert.

Verdünnung der Primäantikörper:

Flag-Antikörper	1:200
EBOV monoklonal α-NP IgG	1:20
EBOV monoklonal α-VP35 IgG	1:1000

Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper folgten drei Waschschrte mit PBS_{def} und eine Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper für 1h bei Raumtemperatur.

Verdünnung der Zweitantikörper:

FITC-konjugierten Ziege α-Maus-IgM F(ab') ₂ -Fragment	1:100
Rhodamin-konjugierten Ziege α-Maus-IgG Antikörper	1:100

Der Zellen wurden dreimal mit PBS_{def} gewaschen, und anschließend wurden die Deckgläser in H₂O getaucht. Mit der zellbewachsenen Seite nach unten wurden die Zellen mit Hilfe von Fluoprep (BioMerieux) auf dem Objektträger fixiert. Die Zellen wurden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axioplan, Zeiss) begutachtet und mit einer Digitalkamera (Spot Camera, Version 3.1.2 Diagnostic Instrument) fotografiert.

3. Material

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Plasmide

EBOV-Zaire

- pT/NP_{EBOV-Zaire} (Mühlberger et al., 1999) Marburg
- pT/VP35_{EBOV-Zaire} (Mühlberger et al., 1999) Marburg
- pT/VP30_{EBOV-Zaire} (Mühlberger et al., 1999) Marburg
- pT/L_{EBOV-Zaire} (Mühlberger et al., 1999) Marburg
- Minigenom 3E-5E (Mühlberger et al., 1999) Marburg
- Minigenom 3E-5E_{bici}NP/VP35 (EBOV-Zaire) (Weik et al., 2002; hier als E-bici-1,2 bezeichnet)
- Minigenom 3E-5E_{bici}NP/VP35 (EBOV-Zaire); im Labor vorhanden als BICI 438

MBGV

- pT/NP_{MBGV} (Mühlberger et al., 1998) Marburg
- pT/VP35_{MBGV} (Mühlberger et al., 1998) Marburg
- pT/VP30_{MBGV} (Mühlberger et al., 1998) Marburg
- pT/L_{MBGV} (Mühlberger et al., 1998) Marburg
- Minigenom 3M-5M (Mühlberger et al., 1998) Marburg

3.1.2 Nukleinsäuren

- | | | |
|--|--------------------|---------------|
| - Century RNA-Marker Template | Ambion, Inc. | Austin/ Texas |
| - DNA-Größenmarker III,
λ-DNA EcoRI/HindIII | Roche | Mannheim |
| - GeneRuler™ 50bp DNA-Ladder | MBI Fermentas GmbH | St. Leon-Rot |
| - GeneRuler™ 100bp DNA-Ladder Plus | MBI Fermentas GmbH | St. Leon-Rot |
| - GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder | MBI Fermentas GmbH | St. Leon-Rot |

3.1.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG-Biotech GmbH / Ebersberg bzw. Sigma ARK GmbH / Darmstadt als Lyophilisat bestellt und sind in 5'>3' Richtung dargestellt. Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme (oder Teile davon), welche durch die Oligonukleotide in ein PCR-Fragment eingebracht wurden und eine wichtige Rolle für die Klonierungsstrategie spielen, sind fett und unterstrichen hervorgehoben. Um welche Erkennungsstelle es sich dabei handelt, ist dem Abschnitt 3.1.4.1 zu entnehmen. Degenerierte Oligonukleotide werden mit einem „d“ am Namensanfang gekennzeichnet

und die degenerierten Nukleotide in Klammern und fett dargestellt. Die tatsächliche Bindungsstelle des jeweiligen Primers im Genom des EBOV-Reston ist hinter dem Primernamen in Klammern beigefügt.

Lab.-Nr.	Bezeichnung	Sequenz
#115	Bam-oligo dT	5' -CAGGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
#125	pTM1-F	5' -ATTGTATGGGATCTGATCTGG-3'
#174	pTM1-R	5' -AGCCAACCTCAGCTTCTTTCG-3'
#192	CAT-755	5' -TCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCG-3'
#211	CAT-368/PuuII	5' -GTAATATC <u>CAGCTG</u> AACGGTCTGG-3'
#241	CAT-844/EcoRI	5' -GAC <u>GAATTC</u> GTCTGGCAGAATGCTTAATGAATTAC-3'
#284	EBOV-Leader/RsrII	5' -GGT <u>CGGACCG</u> CGAGGAGGTGGAGATGCCAT GCCGACCCCGGACACAAAAAGAAAGAAG-3'
#286	EBOV-Trailer/ClaI	5' -GAC <u>ATCGAT</u> CCCCGGTTAATACGACTCACTATAG TGGACACACAAAAAGAAATAGA-3'
#300	CAT-347	5' -AGACCGTTCAGCTGGATATTACGGC-3'
#301	CAT-454/EcoRI	5' -CCG <u>GAATTC</u> CGTATGGCAATGAAAG-3'
#307	Oligo-dC/EcoRI	5' -CAG <u>GAATTC</u> CCCCCCCCCCCCCCCC-3'
#339	Andy in	5' -GCTCGCCGAGCCGAACGACC-3'
#340	Andy back	5' -GGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAG-3'
#436	EBO-2728v/BglII	5' -GAT <u>AGATCT</u> GCTAACATTAAGTAGTCAAGGAAC-3'
#437	EBO-3128m/BamHI	5' -GAT <u>GGATCC</u> CCTTGTAGACCAGCTTTTCTTTTA-3'
#442	EBO-11167v/BglII	5' -GAT <u>AGATCT</u> GCTTTCATAATCAGATATATAAGC-3'
#443	EBO-11579m/BamHI	5' -GAT <u>GGATCC</u> TTAATATCAAGAGGAAGAATTTCA-3'
#495	EBO-NP-470F/BamHI	5' -CAGG <u>GGATCC</u> CCATGGATTCTCGTCCTCAGAA A-3'
#496	EBO-NP-2692B/EcoRI	5' -CAG <u>GAATTC</u> CATTCACTGATGATGTTGCAGGATTG C-3'
#565	EBO-VP30v/EcoRI	5' -GAC <u>GAATTC</u> TAAATGGAAGCTTCATATGAGAGA-3'

#566	EBO-VP30m/XhoI	5' -GAC <u>CTCGAG</u> TATATAGTGT TTTTAGTCAGCCTTA-3'
#667	EBOmut11470F	5' -CATTAGATAAGTAGATTAAGATCTAAGCCTGAGGAA GATTAAG-3'
#668	EBOmut11470R	5' -CTTAATCTTCTCAGGCTTAGATCTTAATCTACTTA TCTAATG-3'
#669	EBOmut11495F	5' -GCCTGAGGAAGATTAAGATCTACTGCTTATTGGGTC TTTCCG-3'
#670	EBOmut11495R	5' -CGGAAAGACCCAATAAGCAGTAGATCTTAATCTTCC TCAGGC-3'
#677	Res-35-F/EcoRI/(3060)	5' -GAC <u>GAAATCC</u> GTCTGTAGGCAGGTGTTACTCCA-3'
#678	Res-35-R/XhoI/(1168)	5' -GAC <u>CTCGAG</u> GCCTTGTTAAATAAATCTTGATTCT-3'
#679	Res-30mR/NdeI/(3008)	5' -GAC <u>CATATG</u> CCTTAATTTGTCTAGTCAGGGCTATC-3'
#732	Res-35F-932/(3914)	5' -GGCAAGTCTAGCAGATGGTGACTC-3'
#733	Res-35R-313/(3291)	5' -CGGACTTCCATTTGATCTGGCTTG-3'
#752	Res-35F/402/(3381)	5' -GAGGATACATTAACTATGCTAGTG-3'
#772	dEBO-NP-F/1472/(1466)	5' -AATGTTGG(N)GAACA(N)TATCAACAAC-3'
#773	dEBO-NP-R/957/(951)	5' -AC(N)AC(N)A(N)TTT(N)GG(N)AGGAA(N)AG ACT-3'
#774	dEBO-30-R/8723/(8704)	5' -CA(N)ATGTCTTT(N)GG(N)G(N)(N)GGAGG-3'
#775	EBO-L-F/(13011)	5' -TTAAGTATTTTTATAAAAAGACAG-3'
#776	EBO-L-R/(14756)	5' -AGAGGCTAATAATGTGCGTGTTCCCTTC-3'
#777	Res-GP-F/1989(8013)	5' -GGGATTATTGGAGTTATAATTGCTA-3'
#789	Res-NP-F(301)	5' -GTTCCCCTTTCCGTC AAGTTT-3'
#790	dEBO-L-R/11617(11589)	5' -AACCT(N)GC(N)TC(N)GG(N)TATTG(N)GT-3'
#791	Res-30-F/(8668)	5' -GATGCACTCATAGTTCCTCCGAC-3'
#792	dEBO-L-F/18612(18563)	5' -TT(N)(N)T(N)ATAATTA(N)CATTA(N)T(N)T-3'
#793	dEBO-L-F/13011(12281)	5' -TTAAGTAT(N)TTTATAAAAAGACAG-3'
#794	dEBO-L-R/14756(14700)	5' -AGA(N)GCTA(N)TAATGT(N)C(N)TGTTCCCTTC-3'

#795	Res-NPv/1803(1796)	5' -GATCCTAGAGACTCCAGAGACAC-3'
#796	Res-NPm/2693(1687)	5' -GTGGTTACTGATGGTGCTGCAAG-3'
#805	Res-NP-F/(907)	5' -GCAATTTCTCTCATTGCGAGTC-3'
#806	dEBO-L-F/17277(17240)	5' -CCAAAT(N)ACAGA(N)AT(N)ACAAATCC-3'
#807	Res-30-L-F(11219)	5' -GAAGCATAAGGCAAAACCCAAGTT-3'
#808	Res-30-L-F/310(8976)	5' -GAGGACTCTAAACTTAGAGCTCTT-3'
#809	Res-NP-R(1535)	5' -CTGTCTGAGTTCTCTGGACTCAGC-3'
#810	Res-L-R(13133)	5' -GTGCATAATTCAGGACACTTTTCG-3'
#811	Res-L-F(13226)	5' -TGGACGAACATTTGGGAAGCTAC-3'
#812	dEBO-R/18929(18894)	5' -GGACACACAAAAAGA(N)GAA(N)(N)A(N)(N) TTT-3'
#813	Res-VP30II196F(11490)	5' -GTTCACTTGGTTGCCGTCAGTAT-3'
#816	Res-L-F/(14670)	5' -GGTAAACGTCTCCAAATATTAGG-3'
#823	Res3'-466R/NdeI(466)	5' -GAC <u>CATATG</u> CATATCGACTTCCCCGTGTTTCGAC TTA-3'
#824	ResNP(458)F/EcoRI	5' -GAC <u>GAATTC</u> GTTCGATATGGATCGTGGGACCAGA AGA-3'
#825	ResNP(2741)R/NotI	5' -GAC <u>GCGCCGC</u> ATCGGTCAAGTCTTAAGTGTAT TTAGC-3'
#826	Res30/8481F/EcoRI (8483)	5' -GAC <u>GAATTC</u> ATCCGGATGATGGAGCATTCAGA GAA-3'
#827	Res30-(9401)R/XhoI	5' -GAC <u>CTCGAG</u> TAATTTATTGACTGAGAGCAATCG TGG-3'
#828	dEBO-L-R/17030(16969)	5' -AAG(N)TTGTAATGCAT(N)GA(N)GAGACTA-3'
#829	Res-L-R-S32y8(12883)	5' -CGTTTTATGACGGAGTTGAGTCCC-3'
#830	Res-L-F-33y9(11762)	5' -GCCGATAGACTATTTAGTACC-3'
#831	Res24F-S34.3(4422)	5' -CGGTGTGCAATTGTCAAGAGTTCC-3'
#832	Res24R-S34.3.1(10801)	5' -GGGCGTCAAGCTTGTTGATGAACTGC-3'
#843	Res-L-S-F18y2(16913)	5' -CCTACATCAGCTAAGGTCTATGTTGG-3'

#844	EBO-L-R/(18956)	5' -GGACACACAAAAAGAAGAAATAGATTTATT-3'
#845	Res-L-R-S18y2(16661)	5' -GCTGAGTCTGTATTGCGAGAAGTC-3'
#846	Res-L-F-S17y1(15021)	5' -GGCTCAAATGCTTATGTCTCAGTTGC-3'
#847	Res-VP24-R-S15y2 (10333)	5' -CGAGATTGTATCGGCCTGTGGC-3'
#848	Res-VP24-F-S13y1(9883)	5' -CCTCGTCCGAATCTTCATCAGTTGC-3'
#849	Res-L-F-S29y5(13692)	5' -CTGTGGACGAGTATATCCTGTGC-3'
#850	dEBO-L-R/18634(18585)	5' -A(N)A(N)TAATG(N)TAATTAT(N)A(N)(N)AA-3'
#851	Res-L-F-S21y6(14122)	5' -GTATTGTAGCAGCTTCCATACG-3'
#852	Res-L-R-S17y2(16204)	5' -GCTGTCCGAAGAAACAGTCGAGC-3'
#853	Res-L-F-S18y3(15468)	5' -GCCAGGGATAGCAATATAATTTTCC-3'
#854	dEBO-L-R/18130(18097)	5' -TGTA(N)ATATAAGGTTTGAAC(N)A(N)GAA-3'
#857	Res-L-F-S18y2(16959)	5' -TTCACAGGGATAGTCTCATCCATGC-3'
#858	Res-L-F-S18y2(16748)	5' -GGGAACTGTTCTAACAGAGGGTGAC-3'
#859	dEBO-L-R/17908(17875)	5' -CGACTTTGTGCG(N)G(N)TGATTATAATCA-3'
#860	Res-NP-R/(144)	5' -CCAGGGAAAGTTACAGAATAGCAAAGAGGAG-3'
#861	Res-NP-R/(204)	5' -CACTAGACATACCATGTTGATGGTAATTGG-3'
#936	Res-seq24y7F/F(17278)	5' -GTAATCAAAAATATAATCTACCTTG-3'
#937	Res-seq24y7F/F(17307)	5' -GTTGAAATCATTATGATGGATGCTG-3'
#938	Res-seq24y7F/F(17345)	5' -CTTAAACAGGTCCCAACTCTACCGAGC-3'
#939	Res-seq24y7F/R(17119)	5' -GCCAATGTGTTCAAAAATAATAACC-3'
#952	Res-S20y2-R/(18577)	5' -GGATATGGTGACATCAGATGGG-3'
#953	Res-S23y5-F/(17587)	5' -CGGCCCATCAGACTCACAAGGC-3'
#954	Res-S20y2-F/(17772)	5' -GTGATAATGTAAATTTGATAAC-3'

#955	Res-NP(140)-R	5' -GGAAAGTTACAGAATAGCAAAGAGG-3'
#979	Res-L-F/1951/XmaI (11546)	5' -CTTC <u>CCCCGGG</u> CCATATGGCTACCCAGCATACCCA GTACCC-3'
#980	Res-L-R/4511BamHI (14087)	5' -CGA <u>GGATCC</u> ACGTTCGAAGGCAGTTCCAATACTG GCAAG-3'
#981	Res-L-F/4491/(14076)	5' -GCCTTCGAACGTGCTATATCGGAAACGCGAC-3'
#982	Res-L- R/6636/NruI/(16206)	5' -GTAGGATCC <u>TCGCGAT</u> TGCTGTCCGAAGAAA CAGTCG-3'
#983	Res-L-F/6618/(16203)	5' -GCAATCGCGAGTTTTTTTACAATTTCTTAAAAGC-3'
#984	Res-L-R/8621/BamHI/ (18192)	5' -ATG <u>GGATCC</u> GCTAGCCTATGTGTGATTGGAA TATATTAACC-3'
#985	Res-L-F/(18483)	5' -GGTTTATGAGTTGGTTACACAGTG-3'
#986	Res-L-F/(18570)	5' -CCATATCCAAATGTTGTGCTAGTC-3'
#987	Res-NP-(338)-R	5' -CAATCAAAACAACCCCTTAAACTTGAC-3'
#988	Res-NP-(443)-R	5' -CTTAGTCAAGATGTACGATATTATTG-3'
#1015	ResLeader-F/(2)	5' -GGACACACAAAAAGAAAAAAGG-3'
#1016	ResLeader-R(23)	5' -CCTTTTTTCTTTTTTGTGTGTGC-3'
#1017	ResLeadRibF(2)	5' -GCCATGCCGACCCCGACACACAAAAAGAAAAAAGG-3'
#1018	ResLeadRibR(23)	5' -CCTTTTTTCTTTTTTGTGTGTGCGGGTGGGCATGGC-3'
#1035	Res-TR-F18188/NotI (18192)	5' -TAG <u>GGCGCCGC</u> GTAATAATCATCATAGTATGAGG-3'
#1036	Res-TR-R(18894)/ ClaI/XmaI/SmaI	5' -GACATCGAT <u>CCCCGGG</u> TAAATACGACTCACTATAGGG ACACACAAAAAGGAAAAAATTGGT-3'
#1044	ResLeaRibFbis	5' -GCCATGCCGACCCCGACACACAAAAAGAAAAAAG G-3'
#1045	ResLeaRibRbis(23)	5' -CCTTTTTTCTTTTTTGTGTGTCCGGGGTCGGCATGG C-3'
#1126	Res-lea+/XmaI(1)	5' -GAG <u>CCCCGGG</u> TAAATACGACTCACATAGCCGGAC ACACAAAAAGAAAAAAGGTTT-3'
#1127	Res-trai+/RsrII(18894)	5' -GGT <u>CGGACCG</u> CGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCG ACCCTGGACACACAAAAAGGAAAAA-3'
#1149	EBO-24F/(11002)	5' -CCCTCCTTCATGAGTCCACAC-3'
#1150	EBO-24F/(11037)	5' -CAAGGATCCTCGACACGAATGC-3'

#1192	ResLFlagF1431(11552)	5' -CTTCCCCGGCCATATGGACTACAAGGACGACGATGA CAAGGCTACCCAGCATACCCAGTACCCGGATGC - 3'
#1193	ResL-R1973(12078)	5' -CATGAACAAACCAGGTTGAACGGTTG - 3'
#1213	EBO-NP35mutA1F	5' -CGTTTTATAATTAAGAAAAAAGTCAAGATGAAGA TTAAAACC - 3'
#1214	EBO-NP35mutA1R	5' -GGTTTTAATCTTCATCTTGACTTTTTTCTTAATT ATAAAACG - 3'
#1215	EBO-NP35mutA2F	5' -CGTTTTATAATTAAGAAAAAAGGCCAGATGAAGA TTAAAACC - 3'
#1216	EBO-NP35mutA2R	5' -GGTTTTAATCTTCATCTGGCCTTTTTTCTTAATT ATAAAACG - 3'
#1217	EBO-NP35delBF	5' -CGTTTTATAATTAAGAAAAAATAAGATGAAGA TTAAAACC - 3'
#1218	EBO-NP35delBR	5' -GGTTTTAATCTTCATCTTATTTTTTCTTAATT ATAAAACG - 3'
#1219	EBO-NP35delCF	5' -GATGAAGATTAAAACCTTCATCATCC - 3'
#1220	EBO-NP35delCR	5' -TTTTTCTTAATTATAAAACGATCG - 3'
#1221	EBO-35/40mut1F	5' -GTAACCCAAACCAAAAGTAATCAAATTAAGAAA AACCTACC - 3'
#1222	EBO-35/40mut1R	5' -GGTAGGTTTTTCTTAATTTTGATTACTTTTGGTTT GGGTTAC - 3'
#1223	EBO-35/40mut2F	5' -CCAAAAGTGATGAAGATTAAGTATATCCTACCTCGG CTGAGAGAG - 3'
#1224	EBO-35/40mut2R	5' -CTCTCTCAGCCGAGGTAGGATATACTTAATCTTCAT CACTTTTGG - 3'
#1225	EBO-35/40insF	5' -CTAATATTAAGAAAAACCTACCTCGGCTGAGAGAG - 3'
#1226	EBO-35/40insR	5' -TTAATATTAGTTAATCTTCATCACTTTTGGTTGG G - 3'

3.1.4 Enzyme

3.1.4.1 Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonukleasen und ihre 10-fach konzentrierten Reaktionspuffer wurden von der Firma New England Biolabs, Schwalbach bezogen.

- BamHI 5'-G↓GATCC-3'
- BglIII 5'-A↓GATCT-3'
- BstBI 5'-TT↓CGAA-3'
- ClaI 5'-AT↓CGAT-3'
- EcoRI 5'-G↓AATTC-3'
- NdeI 5'-CA↓TATG-3'
- NotI 5'-GC↓GGCCGC-3'

- NruI 5'-TCG↓CGA-3'
- RsrII 5'-CG↓G^A/TCCG-3'
- SmaI 5'-CCC↓GGG-3'
- XhoI 5'-C↓TCGAG-3'
- XmaI 5'-C↓CCGGG-3'

3.1.4.2 Sonstige Enzyme

- Alkalische Phosphatase (CIP), EC 3.1.3.1	Roche	Mannheim
- T4-DNA-Ligase, EC 6.5.1.1	Stratagene	Heidelberg
- Nuklease S7	Roche	Mannheim
- Ribonuklease Inhibitor (RNasin) (20U/μl)	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
- T4-RNA-Ligase	Roche	Mannheim
- Pwo DNA-Polymerase	Roche	Mannheim
- Pfu-Turbo-DNA-Polymerase	Stratagene	Heidelberg

3.2 Kits

Qiagen, Düsseldorf:

- Omniscript Reverse Transcriptase
- One Step RT-PCR Kit
- Qiafilter Plasmid MAXI Kit
- Qiaprep 8 Plasmid Miniprep Kit (10)
- Qiaquick Gel Extraction Kit
- Qiaprep Spin Plasmid Miniprep Kit (50)
- Qiaquick PCR Purification Kit
- RNeasy Mini Kit

Sonstige:

- 5' RACE System Version 2.0	Life Technologie	Rockville/USA
- 10x DIG Labelling Mix	Roche	Mannheim
- ABI-Prism™ Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer Cetus	Norwalk/USA
- AmpliScribe™ T7 Transcription Kit	Biozym Diagnostik GmbH	Oldendorf
- Pfu _{TURBO} Polymerase	Stratagene	Heidelberg
- Quickchange Mutagenese PCR	Stratagene	Heidelberg
- SuperScriptII™ Reverse Transkriptase	Gibco BRL	Karlsruhe
- TOPO TA Cloning®	Invitrogen	Groningen/ Netherlands
- Z-Competent E. coli Transformation Kit	LabKit	Freiburg

3.3 Zellmaterial

3.3.1 Zellen

3.3.1.1 Prokaryonten

E. coli Stamm XL1Blue

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac
[F' proAB lac f'Z.M15 Tn10(terr)]

Stratagene Heidelberg

E. coli Stamm SCS110

Genotyp: rpsL (Strr) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA
tsx dam dcm supE44 .(lac-proAB) [F' traD36 proAB
lacIqZ.M15]

Stratagene Heidelberg

E. coli Stamm TOP10

Genotyp: F' mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74
recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R)
endA1 nupG

Invitrogen California USA

3.3.1.2 Eukaryonten

Säugerzelllinie HeLa (humane epitheliale Zervixkarzinomzellen)

ATCC Klon CCL-2

Säugerzelllinie BSR-T7/5 (Derivat der Baby-Hamster-Kidney-Zelllinie)

(Buchholz *et al.*, 1999)

Säugerzelllinie Huh T7 (humane Hepatozytenzelllinie)

zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Gauss-Müller, Lübeck

3.3.2 Nährmedien

3.3.2.1 Nährmedien für Bakterien

Alle Nährmedien für Bakterien wurden autoklaviert.

LB-Medium:

10g	Pepton
5g	Hefeextrakt
<u>10g</u>	<u>NaCl</u>
ad 1l	dH ₂ O

2YT-Medium:

16g	Pepton
10g	Hefeextrakt
<u>5g</u>	<u>NaCl</u>
ad 1l	dH ₂ O

2YT-Agar:

<u>3,75g</u>	<u>Bacto-Agar</u>
ad 500ml	2YT-Medium

3.3.2.2 Nährmedien für Säugerzelllinien

- DMEM	GibcoBRL	Eggstein
- Glasgow Medium	GibcoBRL	Eggstein
- L-Glutamin	GibcoBRL	Eggstein
- Penicillin	GibcoBRL	Eggstein
- Streptomycin	GibcoBRL	Eggstein

3.4 Viren

EBOV-Reston Isolat Pennsylvania	im Labor vorhanden
Rekombinantes Vacciniavirus MVA-T7	(Sutter <i>et al.</i> , 1995)

3.5 Antikörper

a-Flag® M2; monoklonaler Maus AK	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
a-Kaninchen FITC-gekoppelter IgG AK vom Esel	Dianova	Hamburg
a-Maus Rhodamin-gekoppelter AK von der Ziege	Dianova,	Hamburg
EBOV-Zaire monoklonal α -NP IgG	Institut für Virologie	
EBOV-Zaire monoklonal α -VP35 IgG	Institut für Virologie	

3.6 Radioaktivität

[14C]-Chloramphenicol, 25 mCi/ml	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH	Freiburg
----------------------------------	---	----------

3.7 Chemikalien

A

Acetyl-Coenzym-A	Roche,	Mannheim
Acrylamid-Lösung (29:1)	Biorad	Richmond/USA
Actinomycin D-Mannitol	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Agarose (ultrarein)	BRL	Neu-Isenburg
Agarose NA	Pharmacia	Freiburg
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad	Richmond/USA
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva	Heidelberg

B

Bacto-Agar	Difco Lab.	Detroit/USA
Borsäure	Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg

C

Calciumchloriddihydrat	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
CDP-Star	Roche	Mannheim
1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimid meto- <i>p</i> -toluensulfonat (CMCT)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen

D

Dekonex	Bohrer Chemie	Zuchwil/Schweiz
Dekontaminationspaste	Isotechnik	Neukirchen
Desoxycholat (DOC)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Diethylpyrocarbon (DEPC)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Dimethylsulfat (DMS)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Merck	Darmstadt
Dinatriummethyldiamintetraacetat (EDTA)	Roth KG	Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Biorad	Richmond/USA

E

Essigsäure	Riedel-de Haën	Seelze
Ethanol (EtOH)	Riedel-de Haën	Seelze
Ethidiumbromid	Roche	Mannheim

F

Ficoll Typ 400	Pharmacia	Freiburg
Fluoprep	BioMerieux	Nürtingen
Formaldehydlösung min 37%	Merck	Darmstadt
Formamid, redestilliert	BRL	Neu-Isenburg
Fugene©	Roche	Mannheim

G

Geneticin 50mg/ml	GibcoBRL	Eggstein
Glycerin	BRL	Neu-Isenburg
Glykogen (20µg/µl)	Roche	Mannheim

H

Harnstoff (HST; ultrarein)	BRL	Neu-Isenburg
Hefeextrakt	Merck	Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan- Sulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen

I

Isoamylalkohol	Merck	Darmstadt
Isopropanol	Merck	Darmstadt

K

Kaliumtetraborat (K ₂ B ₄ O ₇)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Kaliumchlorid	Roth KG	Karlsruhe

L

Lipofektin®-Reagenz	Gibco BRL	Karlsruhe
---------------------	-----------	-----------

M

Magermilchpulver	Töpfer	Dietmannsried
Magnesiumchloridhexahydrat	Merck	Darmstadt
Maleinsäure	Merck	Darmstadt
β-Mercaptoethanol (MercOH)	Serva	Heidelberg
Methanol	Merck	Darmstadt
MiniComplete (Protease-Inhibitor Cockail)	Roche	Mannheim
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen

N

Natriumacetat	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Roth KG	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck	Darmstadt

P

Pepton	Merck	Darmstadt
Phenol	Roth KG	Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche	Mannheim
Polyethylenglycol 8000 (PEG8000)	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon PVP360	Sigma-Aldrich	Deisenhofen

R

Reporter-Lysis-Puffer	Promega GmbH	Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva	Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA), RNasefrei	Ambion	Austin/USA

S

Salzsäure (HCl)	Merck	Darmstadt
-----------------	-------	-----------

T

N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Biorad	Richmond/USA
Trichlormethan (Chloroform)	Merck	Darmstadt
Trinatriumcitratdihydrat	Roth KG	Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	USB	Cleveland/USA
Triton X-100	Serva	Heidelberg
Tween 20	Serva	Heidelberg

X

Xylencyanol FF (XC)	Serva	Heidelberg
---------------------	-------	------------

3.8 Lösungen

<u>Ampicillin:</u>	100mg <u>ad 100ml</u>	Ampicillin dH ₂ O steril filtrieren, aliquotieren bei -20°C lagern
<u>CaCl₂ (0,5M):</u>	73,51g <u>ad 1 l</u>	CaCl ₂ dH ₂ O autoklavieren
<u>DEPC-behandeltes dH₂O:</u>	1000ml <u>1-2ml</u>	dH ₂ O DEPC über Nacht bei Raumtemperatur im Abzug inkubieren autoklavieren
<u>Desoxychololat (10%):</u>	1g <u>ad 10ml</u>	Desoxychololat dH ₂ O
<u>EDTA (0,5M):</u>	146,12g <u>ad 1 l</u>	EDTA dH ₂ O autoklavieren
<u>NaAcetat, pH=7,0 (3M):</u>	246,09g <u>ad 800ml</u> ad 1 l	Natriumacetat dH ₂ O pH mit NaOH auf 7,0 justieren dH ₂ O
<u>NaCl (1M):</u>	58,44g <u>ad 1 l</u>	NaCl dH ₂ O autoklavieren
<u>NaCl (5M):</u>	292,2g <u>ad 1 l</u>	NaCl dH ₂ O autoklavieren

<u>NaOH (1M):</u>	40g 700ml <u>ad 1 l</u>	NaOH-Plätzchen unter Kühlung in dH ₂ O lösen dH ₂ O in Plastikflasche aufbewahren
<u>MgCl₂ (0,5M):</u>	101,65g <u>ad 1 l</u>	MgCl ₂ [6•dH ₂ O] dH ₂ O autoklavieren
<u>SDS (10%):</u>	100g <u>ad 800ml</u> ad 1 l	SDS dH ₂ O auf 68°C erhitzen pH mit HCl auf 7,2 justieren dH ₂ O autoklavieren
<u>Tris, pH=7,5 (1M):</u>	121,14g <u>ad 800ml</u> ad 1 l	Tris dH ₂ O pH mit HCl auf 7,5 justieren dH ₂ O autoklavieren

3.9 Puffer

<u>2x Elution Buffer (2xEB) mRNA:</u>	200µl 40µl 200µl <u>ad 10ml</u>	1M Tris, pH=7,5 0,5 M EDTA-Lösung, pH=8,0 10% SDS-Lösung dH ₂ O
<u>4x Probenpuffer für Sequenzgele:</u>	500µl 100µl	deionisiertes Formamid 25 mM EDTA, pH=8,0 mit 50 mg/ml Dextranblau
<u>5x FA-Laufpuffer:</u>	20,93g 700ml 10ml 13,3ml <u>ad 1 l</u>	MOPS dH ₂ O lösen, pH mit NaOH auf 7,0 justieren 0,5 M EDTA-Lösung, pH=8,0 3M NaAcetat, pH=7,0 dH ₂ O autoklavieren
<u>10x TBE, pH=8,0:</u>	108g 55g 40ml <u>ad 1 l</u>	Tris Borsäure 0,5 M EDTA-Lösung, pH=8,0 dH ₂ O autoklavieren

<u>20x SSC:</u>	292,2g	NaCl
	88,2g	Trinatriumcitratdihydrat
	800ml	dH ₂ O
		pH mit HCl auf 7,0 justieren
	<u>ad 1 l</u>	<u>dH₂O</u>
		autoklavieren
<u>50x Denhardts Lösung:</u>	2,5g	Ficoll (Typ 400)
	2,5g	Polyvinylpyrolidon
	2,5g	BSA
	<u>ad 250ml</u>	<u>dH₂O</u>
		steril filtrieren, aliquotieren
		bei -20°C lagern
<u>50x TAE, pH=8,0:</u>	242g	Tris
	57,1g	Eisessig
	100ml	0,5 M EDTA-Lösung, pH=8,0
	<u>ad 1 l</u>	<u>dH₂O</u>
		autoklavieren
<u>Alkalischer Transfer-Puffer:</u>	60ml	5M NaCl-Lösung
	0,8ml	1M NaOH-Lösung
	<u>ad 100ml</u>	<u>dH₂O</u>
<u>Binding Buffer (BB) mRNA:</u>	500µl	1M Tris, pH=7,5
	100µl	0,5 M EDTA-Lösung, pH=8,0
	500µl	10% SDS-Lösung
	5ml	5M NaCl-Lösung
	<u>ad 50ml</u>	<u>dH₂O</u>
<u>Chemilumineszenz-Puffer 1:</u>	11,67g	Maleinsäure
	8,77g	NaCl
	800ml	dH ₂ O
		pH mit NaOH auf 7,5 justieren
	<u>ad 1 l</u>	<u>dH₂O</u>
		autoklavieren
<u>Chemilumineszenz-Puffer 3:</u>	12,11g	Tris
	5,84g	NaCl
	10,17g	MgCl ₂
	800ml	dH ₂ O
		pH mit HCl auf 9,5 justieren
	<u>ad 1 l</u>	<u>dH₂O</u>
		steril filtrieren
<u>Collins-Hybridisierungslösung:</u> (Grosfeld <i>et al.</i> , 1995)	30ml	20x SSC
	10ml	50x Denhardts Lösung
	1ml	10% SDS
	54ml	dH ₂ O

<u>Elution Buffer (EB) mRNA:</u>	500µl	1M Tris, pH=7,5
	100µl	0,5 M EDTA-Lösung, pH=8,0
	500µl	10% SDS-Lösung ad 50ml dH ₂ O
<u>FA- Auftragspuffer (pro Probe):</u>	2µl	dH ₂ O
	1µl	5x FA-Laufpuffer
	1,75µl	37% Formaldehydlösung
	5µl	Formamid
<u>S7-MCN-Puffer:</u>	9ml	dH ₂ O
	100mg	Triton X-100
	100µl	1M NaCl-Lösung
	100µl	1M Tris, pH=7,5
	30µl	0,5M MgCl ₂ -Lösung
	500µl	10% DOC-Lösung
	200µl	0,5M CaCl ₂ -Lösung
Beim Ansetzen:	+1Tablette	MiniComplete oder
kurz vor Gebrauch:	+1mM	PMSF
<u>SDS / SSC-Waschpuffer:</u>	2,5ml	20x SSC
	5ml	10% SDS
	ad 500ml	dH ₂ O
<u>PBS def.:</u>	8g	NaCl
<u>(Phosphate Buffered Saline deficient)</u>	0,2g	KCl
	1,15g	Na ₂ HPO ₄
	0,2g	KH ₂ HPO ₄
	ad 1l	dH ₂ O
		autoklavieren

3.10 Geräte

ABI Prism™-System 377A DNA Sequencer	Perkin Elmer Cetus	Norwalk/USA
Biofuge 13	Heraeus Sepatech GmbH	Osterode
Bio-Imager Analyzer BAS-1000	Fuji	Kanagawa/Japan
Bio-Image Screen: Imaging plate 2040S; MP	Fuji	Kanagawa/Japan
DNA Thermal Cycler TC1	Perkin Elmer Cetus	Norwalk/USA
Eppendorf-Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg
Eppendorf-Tischzentrifuge 5145	Eppendorf	Hamburg
Horizontalschüttler HS 250-Basis	IKA Labor- technik	Staufen
J2-21 Zentrifuge	Beckmann	Palo Alto/USA
Keutz®-Minigelkammer	von Keutz	Reiskirchen
Liquid Scintillation System LS1801	Beckmann	Palo Alto/USA

Metallblockthermostat TCS	Lab Tech Barkey	Bielefeld
Mikrowellengerät	Bosch	München
Minifuge RF	Heraeus Sepatech GmbH	Osterode
Minifuge T	Heraeus Sepatech GmbH	Osterode
pH-Meter C6832	Schott Geräte GmbH	Mainz
Polaroid MP4 Land Camera	Polaroid	Cambridge USA
Primus Termocycler	MWG-Biotech AG	Ebersberg
QIAvac Manifold 6S	Qiagen	Düsseldorf
Sonifier 450	G. Heinemann	Schwäb.Gmünd
Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg
UV-Schirm 302 nm	Bachofer	Reutlingen
Vakuum-Blotter TransDNA Express™	Qbiogene	Heidelberg
Vakuum-Geltrockner	von Keutz	Reiskirchen
Vortex	Heidolph Instruments	Schwabach

3.11 Verbrauchsmaterialien

Blottingpapier GB 002 (Whatman 3MM)	Schleicher & Schüll	Dassel
CentriSep	Princeton Separation	Adelphia
Einmalentwickler Agfa Rodinal	Agfa-Gevaert	Leverkusen
6x Loading Dye	MBI Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
MiniComplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche	Mannheim
Nylon membrane, positivly charged	Roche	Mannheim
Parafilm	American National Can.	Greenwich/USA
Polaroidfilm 667 Professionel	Polaroid	Cambridge/USA
Polysterol-Röhrchen (10ml) REDCAP	Grainer	Nürtingen
Röntgenfilm BioMax™ MS	Kodak	USA
Silica-DC-Platte	Merck Eurolab GmbH	Darmstadt
Sterilfiltrationsgerät:		
-1l, Nylon-Membran, Poren. = 0,2µm	Nalge Company	Rochester/USA
-0,5l, Nylon-Membran, Poren. = 0,2µm	Nalge Company	Rochester/USA
-100ml, Nylon-Membran, Poren. = 0,2µm	Nalge Company	Rochester/USA
Zellkulturflaschen	Costar	Cambridge/USA
Zellkulturschälchen	Greiner	Nürtingen
6er-Zellkulturplatten	Greiner	Nürtingen

4. Ergebnisse

Die beiden EBOV-Subtypen Zaire und Reston weisen bezüglich ihrer strukturellen Organisation große Ähnlichkeiten auf. Im Unterschied zum afrikanischen Subtyp EBOV-Zaire, der ein schweres hämorrhagisches Fieber im Menschen auslöst, scheint der asiatische Subtyp Reston für Menschen nicht pathogen zu sein. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte in einem stark verzögerten Replikationszyklus des EBOV-Reston im Vergleich zu EBOV-Zaire zu finden sein. So zeigen mit EBOV-Zaire infizierte Zellen bereits nach zwei Tagen einen starken zytopathischen Effekt, während Zellen, die mit EBOV-Reston infiziert wurden, erst nach acht bis zehn Tagen einen zytopathischen Effekt aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun vergleichende Untersuchungen zur Transkription und Replikation der beiden EBOV-Subtypen durchgeführt werden. Da die Genomsequenz des EBOV-Reston zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vorlag, wurde zunächst das Genom sequenziert und mit den vorliegenden Sequenzdaten von EBOV-Zaire und MBGV verglichen. Anschließend wurde ein auf reverser Genetik basierendes Replikations- und Transkriptionssystem für EBOV-Reston etabliert. Mit Hilfe dieses Systems war es möglich, vergleichende Untersuchungen der für Replikation und Transkription nötigen cis- und transaktiven Elemente von EBOV-Reston und –Zaire durchzuführen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden transkriptionsrelevante Signale auf den Genomen von EBOV-Zaire und MBGV charakterisiert.

4.1 Sequenzierung des EBOV-Reston-Pennsylvania Genoms

Zu Beginn dieser Arbeit war nur die Sequenz des Glycoproteingens des EBOV-Reston publiziert. Von Dr. Heinz Feldmann (Canadian Science Centre for Human and Animal Health, Winnipeg Canada) wurde freundlicherweise die Sequenzinformation für das VP35- und VP40-Gen des EBOV-Reston Isolats Reston zur Verfügung gestellt. Die Klonierung und Sequenzierung der fehlenden Sequenzen wurde über RT-PCR anhand der genomischen Sequenz des EBOV-Reston Isolats Pennsylvania durchgeführt. Die 3'- und 5'-Enden des Genoms wurden mit Hilfe von 5'RACE und RNA-Ligation mit anschließender RT-PCR identifiziert. Für die RT-PCR intern gelegener Sequenzabschnitte wurden entweder EBOV-Reston-spezifische Primer eingesetzt, die in bereits bekannten Sequenzbereichen binden konnten, oder aber degenerierte Primer, deren Sequenzabfolge nicht aus dem EBOV-Reston-Genom abgeleitet werden konnte. Für die

Erzeugung der degenerierten Primer wurde ein Sequenzvergleich der bekannten Genome von EBOV-Zaire und MBGV vorgenommen. Dabei wurden kurze Sequenzbereiche gefunden, die eine sehr hohe Homologie aufweisen. Unter der Annahme, dass die entsprechenden Sequenzbereiche auch im EBOV-Reston-Genom konserviert vorlägen, wurden Primer konstruiert, die in ihrer Sequenzabfolge den gefundenen konservierten Bereichen entsprachen. Nichtkonservierte Nukleotide wurden dabei in degenerierter Form eingegeben. In Abbildung 5 ist einer dieser Primer beispielhaft aufgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurde eine Reihe von RT-PCR's unter Verwendung von viraler EBOV-Reston-RNA (Isolats Pennsylvania) und dem One-Step-Kit der Firma Qiagen durchgeführt, und die erhaltene PCR-Banden wurden nach Gel-Reinigung (2.1.4) in den Topo II Vektor der Firma Invitrogen kloniert (2.4.6). Nach der Klonierung wurden die PCR-Fragmente sequenziert und anhand ihrer Überlappungen angeordnet.

Das Genom des EBOV-Reston besteht aus 18891 Nukleotiden. Die 7 Gene werden von einer Leader- und einer Trailer-Region flankiert. Die Gene sind entweder durch intergenische Regionen voneinander separiert oder sie überlappen (Abb. 10).

	5'		3'
	1	10	20 23
Z	TTTTTATAATTATCATTACTTT		
M	TTGCTCATAATTAGCATTAAATAT		
P	TTNNTNATAATTANCATTANTNT		

Abbildung 5: Beispiel für die Auswahl eines degenerierten Primers zur Sequenzierung des EBOV-Reston-Genoms.

Z: EBOV-Zaire

M: MBGV

P: Primer

rot: nicht konservierte Nukleotide

4.1.1 5'RACE zur Bestimmung des exakten 5'-Endes des Genoms des EBOV-Reston

Mit Hilfe der 5'RACE-Methode (2.7.4.1) sollten die letzten unbekannt Nukleotide der Trailer-Region des EBOV-Restons-Genoms bestimmt werden. Dazu wurde das 5'RACE-Kit der Firma Life Technologies verwendet.

Für die reverse Transkription wurde der Primer #985 benutzt. Das Tailing der cDNA wurde mit dGTP und die folgende PCR mit den Primer #986 und #307 durchgeführt. Anschließend wurde eine Nested-PCR mit Primer #954 und #307 und eine Sequenzierung mit Primer #954 vorgenommen.

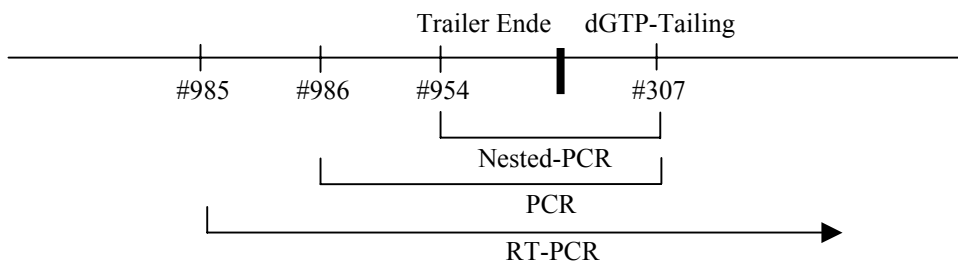


Abbildung 6: Plan der 5'RACE zur Identifizierung des exakten 5'-Endes des EBOV-Reston-Genoms.

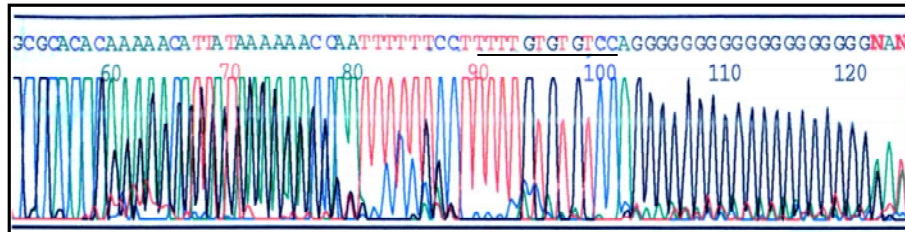


Abbildung 7: Sequenzierung der 5'RACE zur Identifizierung des exakten Endes der EBOV-Reston-Genoms.

Das Genom-Ende ist unterstrichen

4.1.2 Bestimmung der exakten Sequenz der Leader-Region des EBOV-Reston-Genoms

Zur exakten Bestimmung des 3'-Endes des EBOV-Reston-Genoms wurde eine RNA-Ligation (2.7.3) mit gereinigter viraler RNA (2.5.1) durchgeführt. Bei dieser Reaktion wurde das 3'-Ende des Genoms mit dem 5'-Ende verknüpft. Anschließend wurde mit der ligierten RNA eine RT-PCR mit den Primer #985 und #988 durchgeführt. Eine erste und zweite Nested-PCR mit den Primern #986 und #987 bzw. #954 und #955 wurde anschließend durchgeführt. Dabei entstand ein PCR-Produkt, das die Ligationsstelle enthielt. Das PCR-Produkt der beiden Nested-PCR wurde mit dem Primer #955 sequenziert. Aus der Sequenzierung konnten die ersten Nukleotide der Leader-Sequenz des EBOV-Reston-Genoms abgelesen werden.

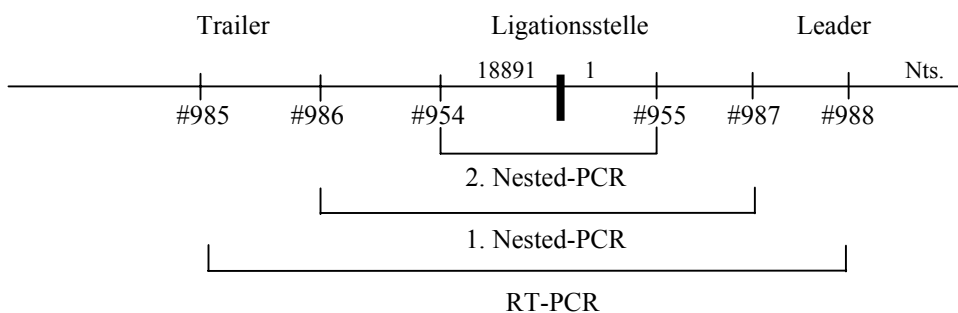


Abbildung 8: Schema der RNA-Ligation und folgenden PCRs zur Identifizierung des exakten 3'-Endes des EBOV-Reston-Genoms.

Nts: Nukleotid

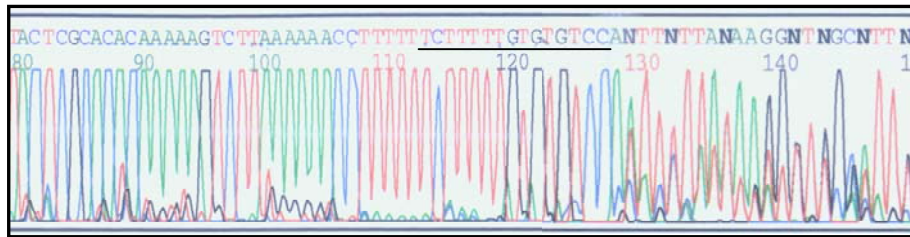


Abbildung 9: Sequenzierung der RNA-Ligation zur Identifizierung des exakten 3'-Endes des EBOV-Reston-Genoms.

Das 3'-Ende des EBOV-Reston-Genoms ist unterstrichen.

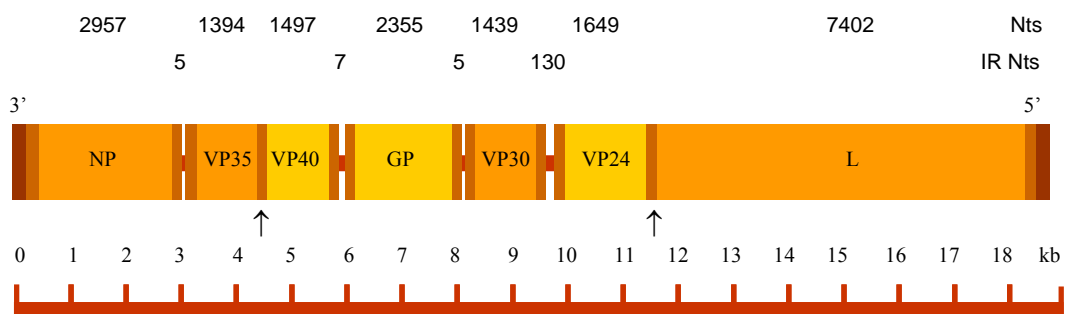


Abbildung 10: Genomorganisation des EBOV-Reston.

- Nukleokapsidproteingene
- Matrixproteingene
- Nicht-translatierte Region
- Leader bzw. Trailer
- ↑ Genüberlappungen
- IR: intergenische Regionen
- Nts: Nukleotidanzahl der Gene bzw. intergenischen Regionen

4.2 Vergleich des EBOV-Reston-Genom mit den Genomen von EBOV-Zaire und MBGV

Nach der Sequenzierung wurde ein systematischer Vergleich der EBOV-Reston-Sequenz mit den EBOV-Zaire- und MBGV-Genomen sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Aminosäure-Ebene durchgeführt.

4.2.1 Nukleinsäure-Vergleich

Mit 18894 Basen hat das EBOV-Reston-Genom eine ähnliche Größe wie die EBOV-Zaire- (18957 Basen) und MBGV-Genome (19108 Basen). Wie auch bei MBGV und EBOV-Zaire sind auf dem EBOV-Reston-Genom sieben Gene vorhanden. Die Reihenfolge der sieben Gene ist konserviert (NP;VP35;VP40;GP;VP30;VP24;L).

EBOV-Reston besitzt zwei Genüberlappungen zwischen dem VP35- und dem VP40-Gen und zwischen dem VP24- und dem L-Gen, und diese sind homolog zu EBOV-Zaire, das

mit drei Genüberlappungen die höchste Anzahl aufweist. Das MBGV besitzt nur eine einzige Genüberlappung und zwar zwischen dem VP30- und dem VP24-Gen. Zwischen VP30 und VP24 befindet sich bei EBOV-Reston und -Zaire die größte intergenische Region mit 130 bzw. 143 Nukleotiden.

Die Nukleotidanzahl der verschiedenen intergenischen Regionen ist aus Abbildung 13 zu entnehmen.

4.2.2 Aminosäure-Vergleich

Auch auf Proteinebene zeigt EBOV-Reston eine größere Verwandtschaft zu EBOV-Zaire als zum MBGV. Die Homologien der Proteine von EBOV-Reston und -Zaire liegen zwischen 49,2% für das GP und 81,4% für VP24. Ein Vergleich mit MBGV zeigt, dass die Homologien nur zwischen 25,5% und 49,1% liegen. Interessanterweise weist das GP die niedrigste Homologie sowohl zwischen EBOV-Reston und -Zaire als auch zwischen EBOV-Reston und MBGV auf, was erklären könnte, dass keine immunologische Kreuzreaktion möglich ist. Deutlich geringer sind die Homologien der Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Reston und MBGV im Vergleich zu EBOV-Zaire. In Tabelle 4 sind die Vergleiche aufgeführt.

Alle Vergleiche und prozentualen Werte wurden mit dem Programm Gap des Programmpakets Husar im Rechenzentrum in Heidelberg berechnet.

4.2.3 Vergleich der Leader- und der Trailer-Region

Leader und Trailer finden ihre Funktion bei der Initiation der Transkription und der Replikation auf eine ähnliche Weise wie es bei Paramyxoviren der Fall ist. Der Leader ist zwischen EBOV-Zaire und -Reston sehr hoch konserviert. Es wurde wiederum ein Vergleich mit dem Programm Gap des Programmpakets Husar durchgeführt. Die Homologien betragen, für die 55 ersten Nukleotiden 87% zwischen EBOV-Zaire und -Reston, 64% zwischen EBOV-Reston und MBGV und 61% zwischen EBOV-Zaire und MBGV.

Der Trailer ist wie der Leader hoch konserviert zwischen EBOV-Zaire und -Reston. Die Homologien betragen 74,5% zwischen EBOV-Zaire und -Reston, 59% zwischen EBOV-Reston und MBGV und 58,2% zwischen EBOV-Zaire und MBGV.

Die Nukleotidhomologien von Leader und Trailer sind in Abbildungen 11 und 12 dargestellt.

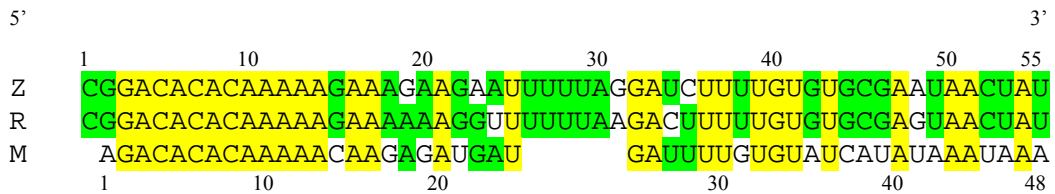


Abbildung 11: Nukleotid-Vergleich zwischen EBOV-Zaire, -Reston und MBGV im Bereich der Leader-Regionen. Die Sequenz ist in (+)-Strang-Orientierung dargestellt.

Z: EBOV-Zaire
R: Reston
M: MBGV
grün: zweifache Homologie, gelb: dreifache Homologie

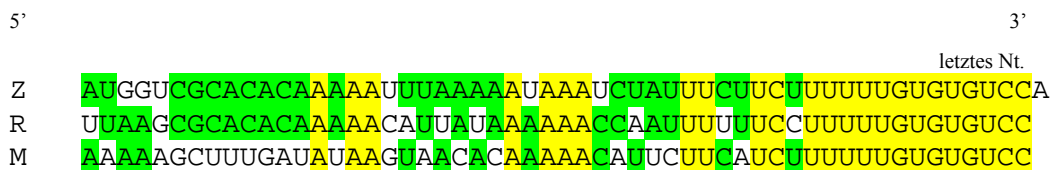


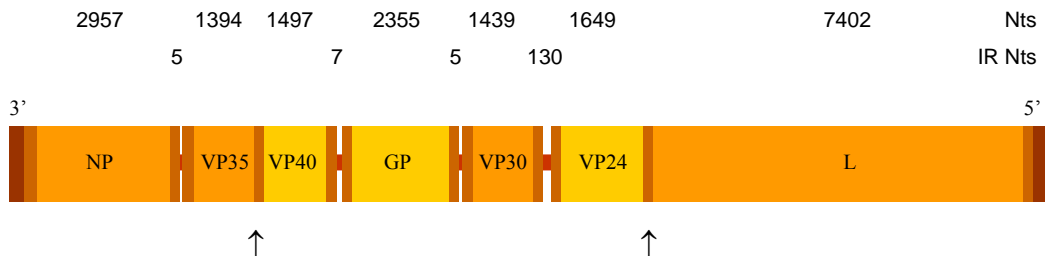
Abbildung 12: Nukleotid-Vergleich zwischen EBOV-Zaire, -Reston und MBGV im Bereich der Trailer-Regionen. Die Sequenz ist in (+)-Strang-Orientierung dargestellt.

Z: EBOV-Zaire
R: Reston
M: MBGV
grün: zweifache Homologie, gelb: dreifache Homologie

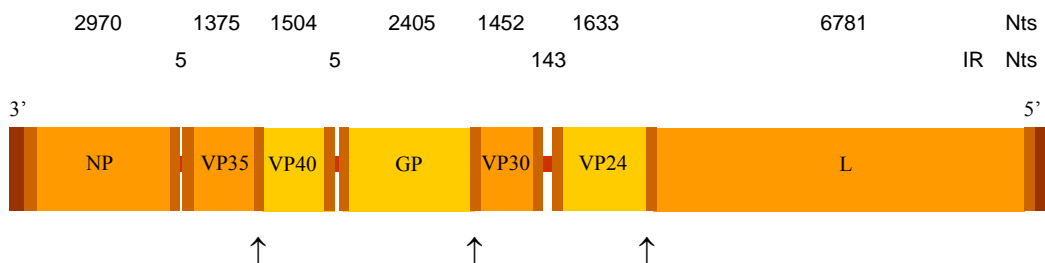
	NP	VP35	VP40	GP	VP30	VP24	L
EBOV-Reston (As)	740	330	332	677	289	252	2214
EBOV-Zaire (As)	740	341	327	676	289	252	2213
MBGV (As)	696	330	304	682	278	254	2332
Homologie (%) Zwischen EBOV-Reston und EBOV-Zaire	68,8	67,6	73,1	49,3	68,1	81,4	74,8
Homologie (%) Zwischen EBOV-Reston und MBGV	38,8	37,4	28,9	25,5	35,7	34,5	49,1
Homologie (%) Zwischen EBOV-Zaire und MBGV	38,7	37	31,8	27,6	36,5	36	48,3

Tabelle 4: Aminosäuresequenzvergleich zwischen EBOV-Zaire, EBOV-Reston und MBGV.

EBOV-Reston



EBOV-Zaire



MBGV

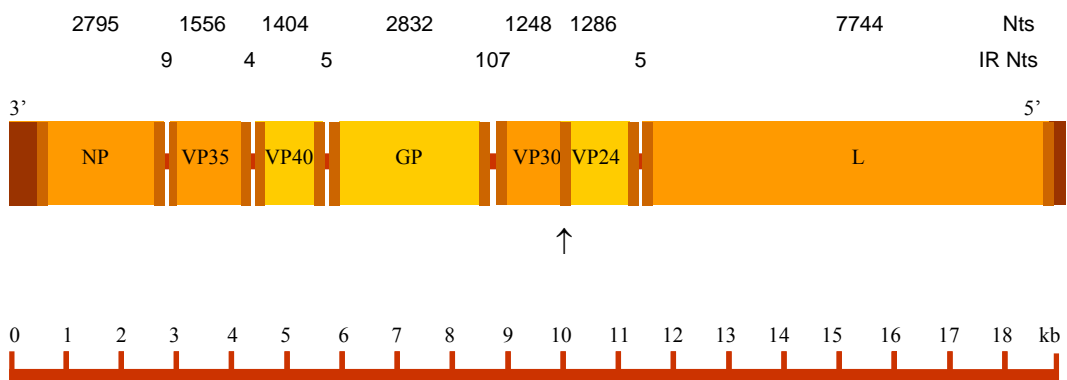


Abbildung 13: Genomorganisation des EBOV-Reston, des EBOV-Zaire und des MBGV.

- Nukleokapsidproteingene
- Matrixproteingene
- Nicht-translatierte Region
- Leader bzw. Trailer
- ↑ Genüberlappungen
- IR: intergenische Regionen
- Nts: Nukleotidanzahl der Gene bzw. intergenischen Regionen

4.2.4 Vergleich der Transkriptionsstartsignale

Die Transkriptionsstart- und -stoppsignale sind sehr hoch konserviert sowohl zwischen den einzelnen Genen als auch zwischen EBOV-Zaire und -Reston. Die konservierte Sequenz des Transkriptionsstartsignals lautet $GA^G/U GAAGAUUAA$ ((+)-Strang-Orientierung). Der einzige Unterschied zwischen EBOV-Zaire und -Reston ist beim Transkriptionsstartsignal des VP30-Gens zu finden, wo an Position drei ein Uracil bei EBOV-Zaire und ein Cytosin bei EBOV-Reston zu finden ist (Abb. 14). Die filoviralen Gene sind entweder durch intergenische Regionen von mindestens vier Nukleotiden voneinander separiert oder sie überlappen einander. Die Anzahl der Genüberlappungen variiert bei den verschiedenen Viren. So findet man im MBGV-Genom eine Überlappung, im Genom des EBOV-Reston zwei und im Genom des EBOV-Zaire drei (Abb. 14). Die Sequenzabfolge der intergenischen Regionen ist nicht konserviert.

	EBOV-Zaire	EBOV-Reston	MBGV
NP	GAGGAAGAUUAA	GAGGAAGAUUAA	GAAGAAUAUUA
VP35	GAUGAAGAUUAA	GAUGAAGAUUAA	GAAGAAUAUUA
VP40	GAUGAAGAUUAA	GAUGAAGAUUAA	GAAGAACAUUA
GP	GAUGAAGAUUAA	GAUGAAGAUUAA	GAAGAACAUUA
VP30	GAUGAAGAUUAA	GACGAAGAUUAA	GAAGAACAUUA
VP24	GAUGAAGAUUAA	GAUGAAGAUUAA	GAAGAACAUUA
L	GAGGAAGAUUAA	GAGGAAGAUUAA	GAUGGAUAUUA

Abbildung 14: Vergleich der Transkriptionsstartsignale ((+)-Strang-Orientierung).

N: identische Nukleotide zw. EBOV-Zaire, EBOV-Reston und MBGV

N: identische Nukleotide zw. EBOV-Zaire und EBOV-Reston

N: abweichendes Nukleotide bei MBGV

N: hochkonserviertes Pentamer

4.2.5 Vergleich der Transkriptionsstoppsignale

Sehr hoch konserviert sind bei Filoviren ebenfalls die Transkriptionsstoppsignale, sowohl bei EBOV-Zaire und -Reston als auch bei MBGV. Eine Besonderheit des VP24-Gens des EBOV-Zaire ist der Besitz von zwei Transkriptionsstoppsignalen. Dieses Phänomen ist weder bei EBOV-Reston noch bei MBGV zu finden (Abb. 15).

	EBOV-Zaire	EBOV-Reston	MBGV
NP	AUUAAGAAAAA A	AUUAAGAAAAA	AUUAAGAAAAA
VP35	AUUAAGAAAAA	AUUAAGAAAAA	AUUAAGAAAAA
VP40	AUUAAGAAAAA A	AUUAAGAAAAA	AGUAAGAAAAA
GP	AUUAAGAAAAA	AUUAAGAAAAA	AUUAAGAAAAA
VP30	AUUAAGAAAAA	AUUAAGAAAAA A	AUUAAGAAAAA
VP24	AUUAAGAAAAA AUUAAGAAAAA A	AUUAAGAAAAA	AUUAAGAAAAA
L	AUUA AAAAAA A	AUUAAG AAAAAA A	AUUAAGAAAAA

Abbildung 15: Vergleich der Transkriptionsstoppsignale ((+)-Strang-Orientierung).

N: identische Nukleotide bzw. Nukleotidanzahl zwischen EBOV-Zaire, EBOV-Reston und MBGV.

N: zusätzliches Adenin

N: hochkonserviertes Pentamer

4.2.6 Vergleich der intergenischen Regionen

In den meisten Fällen beginnen die intergenischen Regionen mit einem Cytosin-Rest (Abb. 16). Die größten intergenischen Regionen bei EBOV-Zaire (143 Nukleotiden), -Reston (130 Nukleotiden) und MBGV (107 Nukleotiden) zeigen keine bedeutende Homologie. Die ermittelte Homologie liegt bei 37% zwischen EBOV-Zaire und -Reston, 41% zwischen EBOV-Reston und MBGV und 38% zwischen EBOV-Zaire und MBGV (Abb. 17 und 18).

	EBOV-Zaire	EBOV-Reston	MBGV
NP/VP35	CUAAU	CAUUU	CUAAAAAUC
VP35/VP40	Überlapp	Überlapp	CUAU
VP40/GP	UCGGC	GAUAUAC	CUAAU
GP/VP30	Überlapp	CUUAU	G_(105Nts)C
VP30/VP24	C_(141Nts)U	U_(128Nts)G	Überlapp
VP24/L	Überlapp	Überlapp	CAAU

Abbildung 16: Sequenzvergleich zwischen EBOV-Zaire, -Reston und MBGV im Bereich der intergenischen Regionen ((+)-Strang-Orientierung).

Nukleotidkombinationen, die in der intergenischen Regionen gehäuft auftreten, sind grün dargestellt.

```

5'                                     3'
Z CUGCGGAACA UAAAUUCUUU AUGCUUCAAG CUGUGGAGGA GGUUUUUGU
R UCAUGAUUG UAGACAAUUU ACUGGUAGUC CUUGGUUAUC CAAGUUUAUG

Z AUUGGCUAUU GUUAUUUAC AAUCAAUAAC AAGCUUGUAA AAAUAUUGUU
R AAUAGAGCUA GAGAGAAUUU GCUACUCCG AGGUAUAACU UUAUUAUUUG

Z CUUGUUUCA GAGGUAGA UGUGACCGGAA AUGCUAAACU AAU
R CUACUUCGAA UGCCUAAAC CAGUAAUGCA G

```

Abbildung 17: Sequenzvergleich der intergenischen Region VP30/VP24 zwischen EBOV-Zaire und -Reston ((+)-Strang-Orientierung).

Z: EBOV-Zaire
R: EBOV-Reston
grün: identische Nukleotiden

```

5'                                     3'
M GAUAAAUAG AACACAAAGA AUUGACAAA UUUUACUUUG AUUGAUUUUGC
R UCAUGAUUG UAGACAAUUU ACUGGUAGUC CUUGGUUAUC CAAGUUUAUGA

M AAGGAGUUA UAAAAUCUU GAAGGAUAAA UUGUUAUAAA GUAGAGUC
R AUAGAGCUA GAGAGAAUUU GCUACUCCG AGGUAUAACU UUAUUAUUUG
M
R CUACUUCGAA UGCCUAAAAC CAGUAAUGCA G

```

Abbildung 18: Sequenzvergleich der intergenischen Regionen GP/VP30 (MBGV) und VP30/VP24 (EBOV-Reston) ((+)-Strang-Orientierung).

M: MBGV
R: EBOV-Reston
grün: identische Nukleotiden

4.3 Klonierung der Nukleokapsidproteingene des EBOV-Reston

Um eine effiziente Expression der Nukleokapsidproteingene des EBOV-Reston zu erhalten, wurden diese in den pTM1-Vektor kloniert (Anhang). Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass jeder eine definierte Restriktionsschnittstelle aufwies.

4.3.1 Klonierung des NP-Gens

Das NP-Gen wurde über eine RT-PCR unter Verwendung von viraler EBOV-Reston-RNA amplifiziert. Hierzu wurden die Primer #824 und #825 verwendet. Mittels der Restriktionsschnittstellen EcoRI am 5' Ende ((+)-Strang-Orientierung) und NotI am 3' Ende ((+)-Strang-Orientierung), wurde das PCR-Produkt verdaut und anschließend über ein präparatives Gel gereinigt. Parallel dazu wurde auch der pTM1-Vektor mit EcoRI und NotI verdaut und gelgereinigt (2.1.4). Es folgte eine Ligation (2.4.5) und die Transformation (2.9) von XL1-blue-Bakterien. Von einem positiven Klon wurde eine Maxiprep angefertigt (Abb. 19).

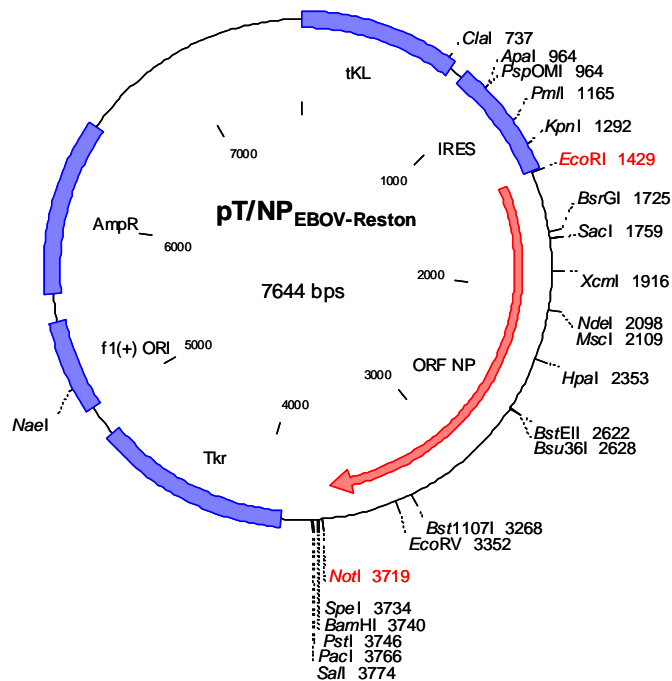


Abbildung 19: Klonierung des NP-Gens des EBOV-Reston in den Vektor pTM1.

Das klonierte Fragment des NP-Gens umfasst die Nukleotide 464 bis 2683 der EBOV-Reston-Sequenz (Anhang). Abbildung erstellt mit dem Programm Clone Manager 5N.

4.3.2 Klonierung des VP35- und VP30-Gens

Die Klonierung der Gene für VP35 und VP30 wurde ebenfalls mittels RT-PCR durchgeführt. Die eingesetzten Primer für VP35 und VP30 lauten #677, #678, #826 und #827. Da die Sequenz der beide Gene es erlaubte, wurden für das VP35- und das VP30-Gen dieselben Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI verwendet. Wiederum wurden die PCR-Produkten verdaut, gelgereinigt (2.1.4) und in den mit den gleichen Enzymen verdauten pTM1-Vektor kloniert. Anschließend wurden kompetente XL1-blue-Bakterien transformiert und positive Klone über Ampicillinresistenz selektioniert. Von je einem positiven Klon wurde eine Maxiprep angesetzt (Abb. 20 und 21).

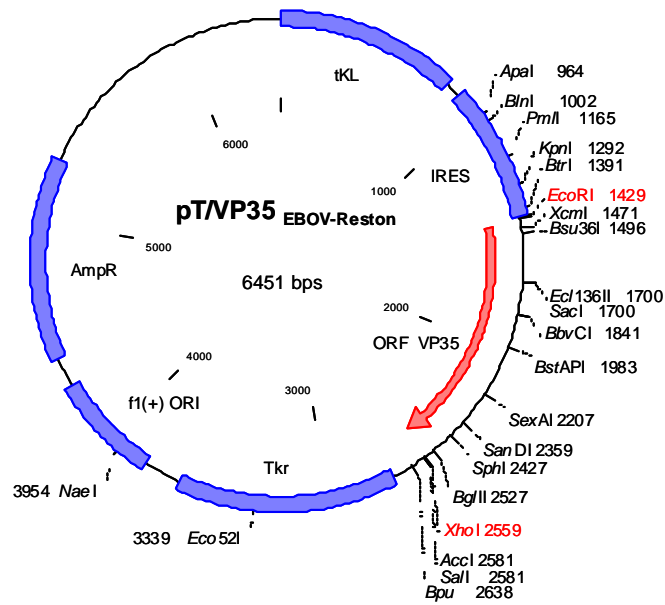


Abbildung 20: Klonierung des VP35-Gens des EBOV-Reston in den Vektor pTM1.

Das klonierte Fragment des VP35-Gens umfasst die Nukleotide 3155 bis 4144 der EBOV-Reston-Sequenz (Anhang). Abbildung erstellt mit dem Programm Clone Manager 5N.

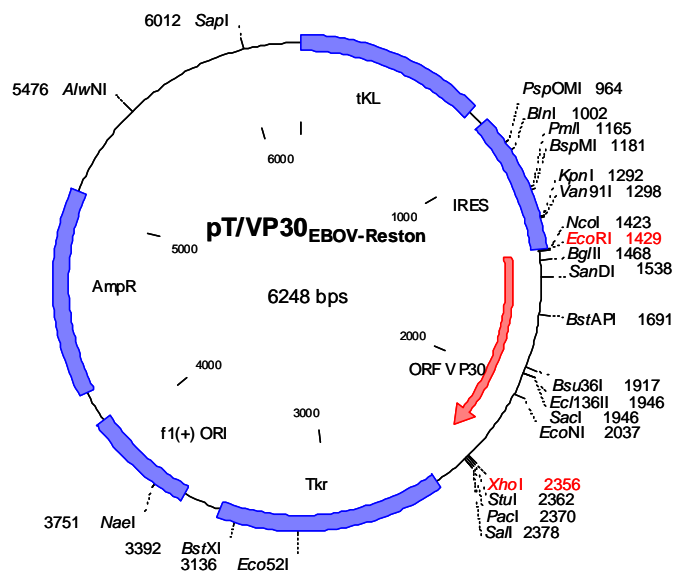


Abbildung 21: Klonierung des VP30-Gens des EBOV-Reston in den Vektor pTM1.

Das klonierte Fragment des VP30-Gens umfasst die Nukleotide 8487 bis 9353 der EBOV-Reston-Sequenz (Anhang). Abbildung erstellt mit dem Programm Clone Manager 5N.

4.3.3 Klonierung des L-Gens

Das L-Gen ist mit 6638 Nukleotiden das längste Gen des EBOV-Reston. So wurde als Klonierungsstrategie eine Klonierung in 3 Schritten durchgeführt. Die in diesem Abschnitt beschriebene Klonierungsstrategie ist in Abbildung 22 dargestellt. Um das L1-Fragment zu klonieren, wurden die Primer #979 und #980 eingesetzt, so dass ein 2638bp langes Fragment entstand. Der Primer #979 enthält eine künstlich erzeugte Schnittstelle für das Enzym XmaI. Im Primer #980 sind die L-genspezifische BstBI-Schnittstelle sowie eine zur Klonierung angehängte BamHI-Schnittstelle zu finden. Das L1-Fragment wurde nach einer RT-PCR mit XmaI und BamHI verdaut, gelgereinigt (2.1.4) und in den pTM1-Vektor inkloniert.

Um das L2-Fragment zu erzeugen, wurden die Primer #981 und #982 eingesetzt. So erhielt das 2000bp lange L2-Fragment eine BstBI-Schnittstelle am 5'Ende ((+)-Strang-Orientierung) und eine BamHI-Schnittstelle am 3'Ende ((+)-Strang-Orientierung). Zusätzlich wurde mittels des Primers #982 die im L-Gen liegende NruI-Schnittstelle am 3'Ende eingeführt.

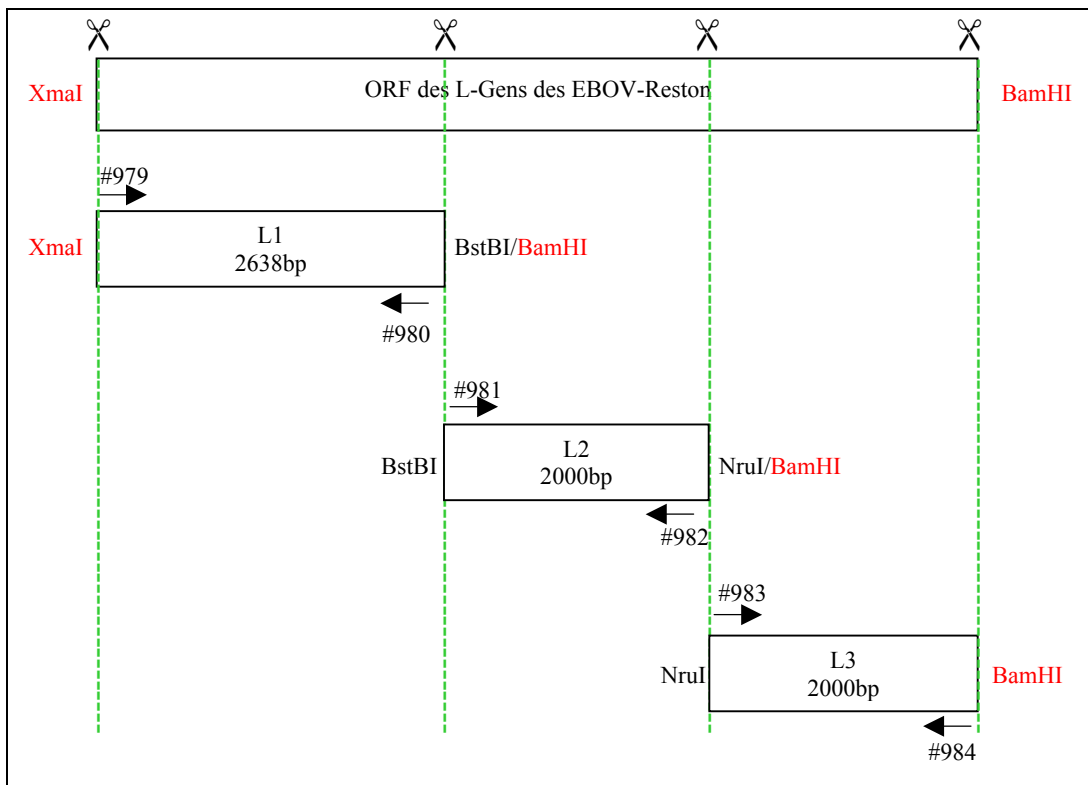


Abbildung 22: Klonierungsstrategie des L-Gens des EBOV-Reston in drei Schritten.

Die Scheren und gestrichelten Linien markieren die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen in der Sequenz des L-Gens des EBOV-Reston. L1 bis L3 sind die PCR-Fragmente über welche das L-Gen kloniert wurde.
 schwarz: Im L-Gen liegende Schnittstellen
 rot: Künstlich eingeführte Schnittstellen

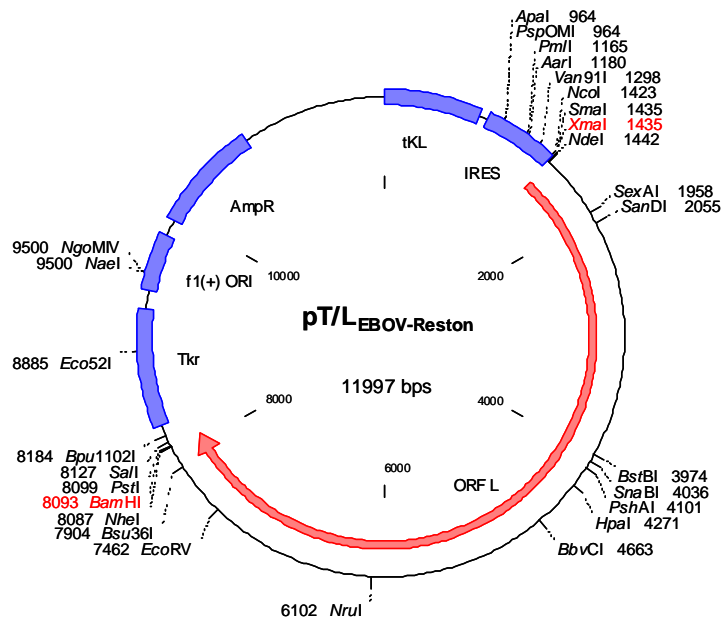


Abbildung 23: Klonierung des L-Gens des EBOV-Reston in den Vektor pTM1.

Das klonierte Fragment des L-Gens umfasst die Nukleotide 11550 bis 18191 der EBOV-Reston-Sequenz (Anhang). Abbildung erstellt mit dem Programm Clone Manager 5N.

Das L2-Fragment wurde mit BstBI und BamHI verdaut, gelgereinigt und in den mit BstBI/BamHI verdauten pT/L1-Vektor kloniert. Nach der Ligation erfolgte eine Transformation von XL1-Blue-Bakterien.

Für das letzte Fragment wurde das Primerpaar #983 und #984 verwendet, so dass ein PCR-Fragment von 2000bp entstand. Durch diese beiden Primer wurde am 5'Ende ((+)-Strang-Orientierung) des L3-Fragments eine NruI-Schnittstelle eingeführt und am 3'Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle. Das PCR Produkt wurde gelgereinigt, mit NruI/BamHI verdaut und in den mit NruI/BamHI verdauten pT/L1/L2-Vektor kloniert. Das Konstrukt pT/L umfasst den gesamten offenen Leserahmen des EBOV-Reston-L-Gens (Abb. 23). Von einem positiven Klon wurde eine Maxiprep angesetzt.

4.4 Klonierung des EBOV-Reston-spezifischen Minigenoms

Das Minigenom (3R-5R) umfasst die Leader- (Nukleotide 1 bis 467) und Trailer-Regionen (Nukleotiden 18189 bis 18891) des EBOV-Reston-Genoms. Als Reportergen wurde zwischen die EBOV-Reston-spezifischen Sequenzen das Chloramphenicol-acetyltransferase-Gen (CAT) kloniert.

Da das exakte 3'-Ende der EBOV-Reston-Sequenz zu Beginn der Klonierung noch nicht bekannt war, wurde für die Amplifikation der Leadersequenz ein Primer verwendet, der dem 3'-Ende des EBOV-Zaire-Leaders entsprach. Mittels Mutagenese mit den Primern #1017 und #1018 wurde später die exakte EBOV-Reston-Sequenz in das 3'-Ende eingeführt. Die Amplifikation der Leadersequenz erfolgte mit dem EBOV-Zaire-spezifischen Primer #284 und dem EBOV-Reston-spezifischen Primer #823 mit Hilfe der RT-PCR mit viraler RNA als Substrat. Durch die Primersequenz wurde das resultierende PCR-Fragment von einer RsrII- und einer NdeI- Schnittstelle flankiert. Das PCR-Produkt wurde dann verdaut, gelgereinigt (2.1.4) und in das mit RsrII- und NdeI verdaute Konstrukt 3M-5M kloniert. In diesem Konstrukt wurde auf diese Weise die MBGV-spezifische Leaderregion durch die EBOV-Reston-spezifische ausgetauscht. Nach einer Transformation von XL1-Blue-Bakterien wurden Klone durch Kontrollverdau überprüft, und von einem 3R-5M-Klon (EBOV-Reston-Leader/MBGV-Trailer) wurde eine Maxiprep angefertigt. Die Trailer-Region wurde ebenfalls mittels RT-PCR amplifiziert. Durch den Einsatz der Primer #1035 und #1036 wurde eine Schnittstelle für NotI am 5'Ende und für SmaI am 3'Ende eingeführt. Der Trailer wurde dann verdaut und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Konstrukt 3R-5M ligiert (2.4.5) (Abb. 25). Mit dem Ligationsansatz wurden XL1-Blue-Bakterien transformiert. Nach dem Kontrollverdau der Miniprep wurden positive Klone sequenziert. Die in diesem Abschnitt beschriebene Klonierungsstrategie ist in Abbildung 24 dargestellt.

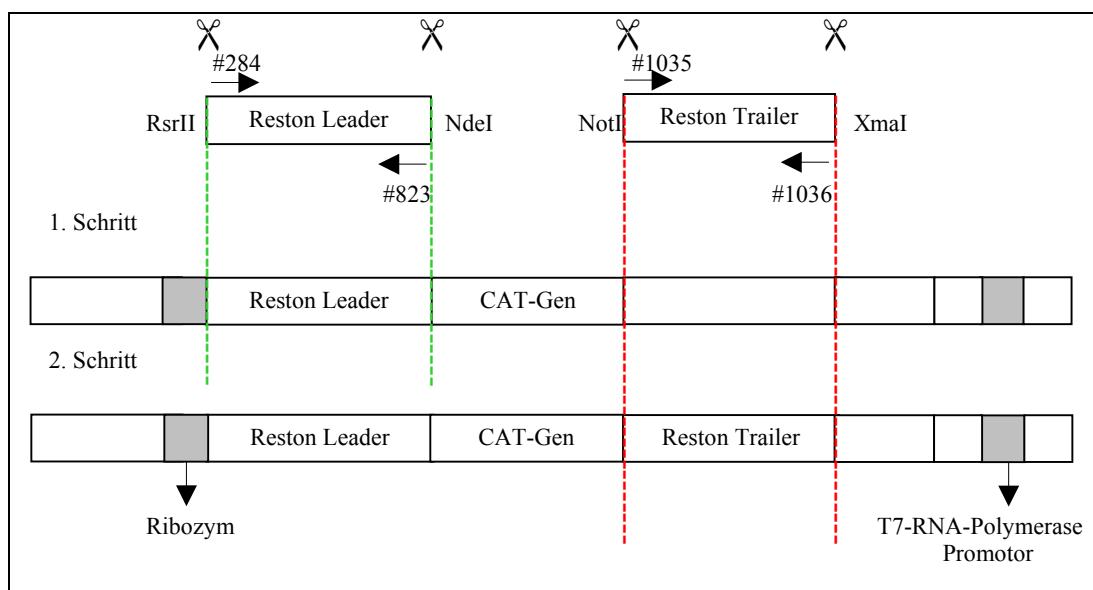


Abbildung 24: Klonierungsstrategie des EBOV-Reston-Minigenoms in zwei Schritten.

Die Scheren und gestrichelten Linien markieren die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen.

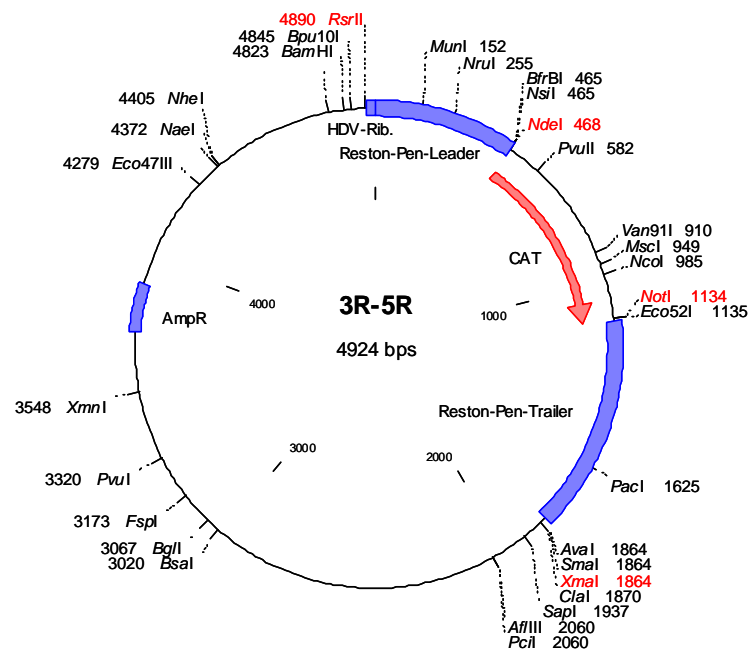


Abbildung 25: Klonierung des Minigenoms des EBOV-Reston in den Vektor Andy.

Das klonierte Fragment des Leaders umfasst die Nukleotide 1 bis 467, des Trailers die Nukleotide 18189 bis 18891 der EBOV-Reston-Sequenz (Anhang). Abbildung erstellt mit dem Programm Clone Manager 5N.

4.5 Etablierung eines EBOV-Reston-spezifischen Minigenomsystems

Für das EBOV-Zaire-Minigenom konnte gezeigt werden, dass die Proteine NP, VP35, VP30 und L nötig sind, um eine Expression des Reportergens zu vermitteln. Auf Grund der Verwandtschaft zwischen EBOV-Zaire und EBOV-Reston sollte in diesem Vorversuch geklärt werden, ob auch im EBOV-Reston-Replikationssystem alle vier Nukleokapsidproteine nötig sind oder nur drei und zwar NP, VP35 und L wie es der Fall beim MBGV ist.

BSR-T7/5-Zellen wurden mit den EBOV-Reston-spezifischen Plasmiden transfiziert wie es im Kapitel 2.8.2 beschrieben ist. Es wurden folgende Plasmidmengen für die Transfektion eingesetzt:

- 500ng pT/NP_{EBOV-Reston}
- 500ng pT/VP35_{EBOV-Reston}
- 500ng pT/VP30_{EBOV-Reston}
- 1µg pT/L_{EBOV-Reston}
- 2µg 3R-5R

Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen bei 37°C wurden die Zellen lysiert und 1µl des Zelllysats im CAT-Assay zum Nachweis der CAT-Aktivität eingesetzt (Abb. 26).

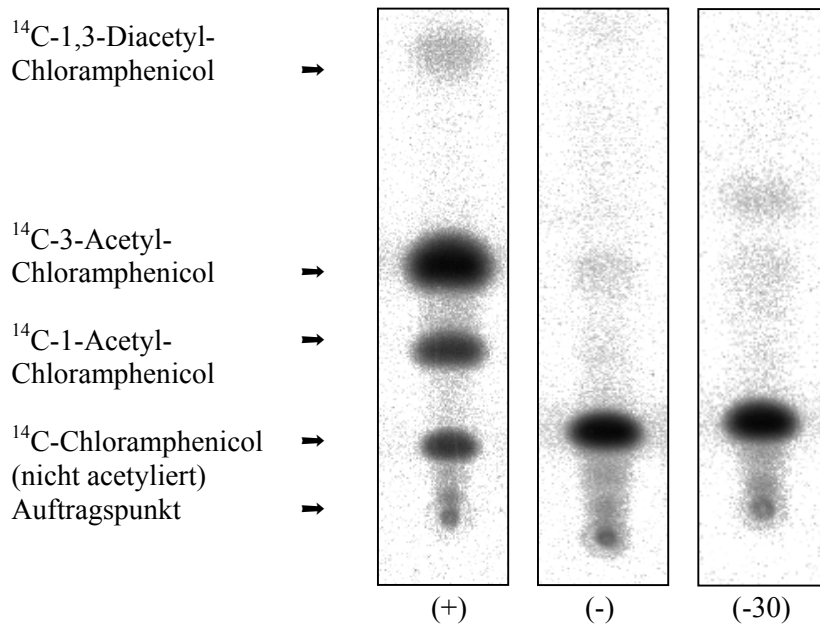


Abbildung 26: Nachweis der CAT-Aktivität im EBOV-Reston-spezifischen Minigenomsystem.

40-60% konfluente BSR-T7/5-Zellen wurden mit dem jeweiligen DNA-Transfektionsansatz transfiziert. Die Zellen wurden nach 2 Tagen lysiert und die CAT-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt. Für jeden Ansatz wurde 1 μ l des Zelllysats eingesetzt. Nach dem Dünnschichtchromatographie-Lauf wurde eine Bio-Imager-Platte 2h lang exponiert und anschließend ausgewertet.

Dem Transfektionsansatz der Positivkontrolle (+) wurden die Plasmide pT/NP_{EBOV-Reston}, pT/VP35_{EBOV-Reston}, pT/VP30_{EBOV-Reston}, pT/L_{EBOV-Reston} sowie je 1 μ g des Minigenom-Plasmids 3R-5R zugegeben. Dem Transfektionsansatz der Negativkontrolle (-) wurde das Plasmid pT/L_{EBOV-Reston} nicht zugegeben. Dem Transfektionsansatz (-30) wurde das Plasmid pT/VP30_{EBOV-Reston} nicht zugegeben.

Dieser Vorversuch zeigte, dass die rekombinanten Nukleokapsidproteine des EBOV-Reston aktiv waren und dass das Minigenom als Matrize für Replikation und Transkription akzeptiert wurde. Wie auch bei EBOV-Zaire waren alle vier Nukleokapsidproteine NP, VP35, VP30 und L nötig, um eine Expression des Reportergens zu erhalten.

4.6 Titration der EBOV-Reston-spezifischen Nukleokapsidproteingene

Wie in 4.5 beschrieben, waren alle vier Nukleokapsidproteine notwendig, um die CAT-Aktivität nachzuweisen. Das Ziel der folgenden Versuche war, die optimale DNA-Menge der vier Proteine durch Titration herauszufinden.

4.6.1 Titration des NP-Proteins des EBOV-Reston

Eine 6er-Zellkulturplatte mit 50% konfluenten BSR-T7/5-Zellen wurde mit folgenden Plasmidmengen transfiziert:

0,5µg pT/VP35_{EBOV-Reston}

0,5µg pT/VP30_{EBOV-Reston}

1µg pT/L_{EBOV-Reston}

2µg 3R-5R

und 100ng bis 4µg pT/NP_{EBOV-Reston}

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne pT/NP_{EBOV-Reston}. Die Transfektion wurde wie unter 2.8.2 beschrieben durchgeführt. Nach der Inkubationsperiode wurden die Zellen lysiert und die CAT-Aktivität bestimmt. Die Intensität der Signale wurde mittels des Programmes PC-BAS 2.09 ausgewertet und über das Programm Microsoft Excel graphisch dargestellt (Abb. 27).

Wie erwartet konnte bei der Negativkontrolle keine CAT-Aktivität nachgewiesen werden. Bei der Titration des pT/NP_{EBOV-Reston} zeigte sich, dass mit zunehmender Menge an eingesetztem pT/NP_{EBOV-Reston}-Plasmid das CAT-Signal stärker wurde bis zu einer Menge von 1µg. Bei größeren DNA-Mengen ging die Intensität des CAT-Signals wieder zurück, blieb jedoch nachweisbar.

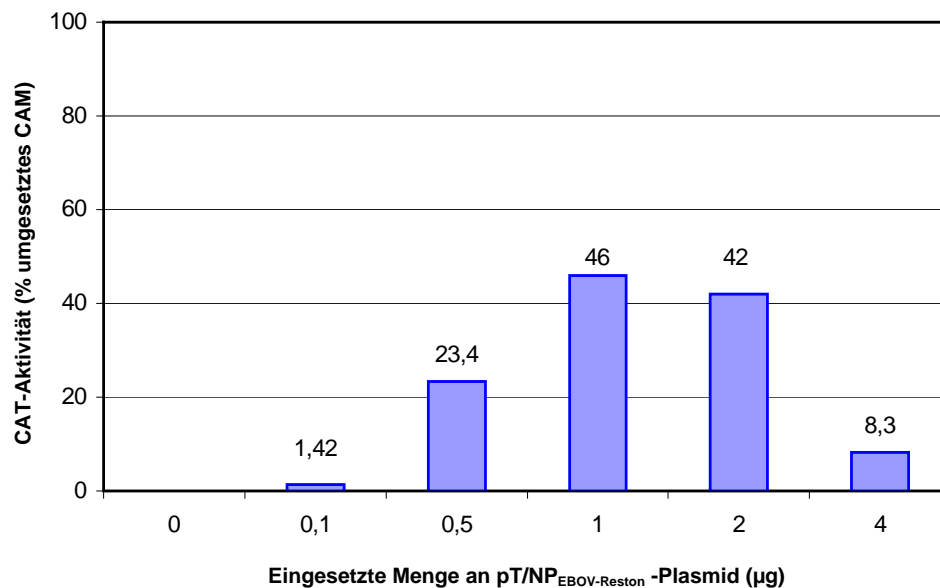


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Titration des pT/NP_{EBOV-Reston}-Plasmids.

Dargestellt ist die Signalintensität der CAT-Expression (% umgesetztes CAM) gegen die eingesetzte Menge an pT/NP_{EBOV-Reston}-Plasmid (µg). Der Anteil an umgesetztem ¹⁴C-Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz $[\text{Produkt}:(\text{Produkt}+\text{Edukt})]*100$ berechnet. Die Abbildung 27 ist repräsentativ für eine Versuchsreihe.

4.6.2 Titration des VP35-Proteins des EBOV-Reston

Die Titration des pT/VP35_{EBOV-Reston}-Plasmids erfolgte wie unter 4.6.1 beschrieben. Es wurden folgende Plasmidmengen eingesetzt:

0,5µg pT/NP_{EBOV-Reston}
 0,5µg pT/VP30_{EBOV-Reston}
 1µg pT/L_{EBOV-Reston}
 2µg 3R-5R

Die eingesetzte Menge an pT/VP35_{EBOV-Reston} lag zwischen 100ng und 4µg. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne pT/VP35_{EBOV-Reston}. Nach der Inkubationsperiode wurden die Zellen lysiert und die CAT-Aktivität bestimmt. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Bei einem Einsatz von 100ng Plasmid DNA wurde das Maximum an CAT-Aktivität erreicht. Diese sank mit zunehmender Menge an eingesetztem pT/VP35_{EBOV-Reston}-Plasmid.

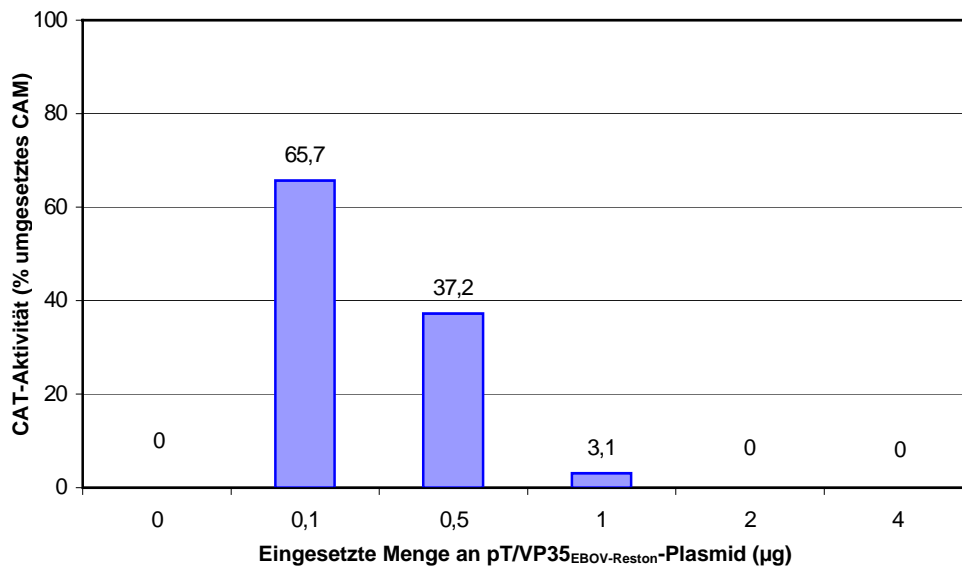


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Titration des pT/VP35_{EBOV-Reston}-Plasmids.

Dargestellt ist die Signalintensität der CAT-Expression (% umgesetztes CAM) gegen die eingesetzte Menge an pT/VP35_{EBOV-Reston}-Plasmid (µg). Der Anteil an umgesetztem ¹⁴C-Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz ($[\text{Produkt}/(\text{Produkt}+\text{Edukt})]*100$) berechnet. Die Abbildung 28 ist repräsentativ für eine Versuchsreihe.

4.6.3 Titration des VP30-Proteins des EBOV-Reston

VP30 fungiert bei EBOV-Zaire als Transkriptionsaktivator und wird nur in geringen Mengen benötigt. Auf Grund früherer Titrationsergebnisse von EBOV-Zaire-spezifischer VP30-Plasmid-DNA lagen die eingesetzten Mengen an pT/VP30_{EBOV-Reston} zwischen 50ng und 2µg. Die Titration wurde wie unter 4.6.1 beschrieben durchgeführt. Es wurden folgende Plasmidmengen eingesetzt:

0,5µg pT/NP_{EBOV-Reston}
 0,5µg pT/VP35_{EBOV-Reston}
 1µg pT/L_{EBOV-Reston}
 2µg 3R-5R

Ein Ansatz ohne pT/VP30_{EBOV-Reston} diente als Negativkontrolle. Die Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse und ihre graphische Darstellung. Durch die Negativkontrolle konnte gezeigt werden, dass das VP30 des EBOV-Reston - im Gegensatz zu dem VP30 des MBGV - eine obligatorische Komponente des Nukleokapsidkomplexes ist.

Schon bei 50ng pT/VP30_{EBOV-Reston} war eine schwache CAT-Aktivität nachweisbar, diese erreichte ihr Maximum bei 500ng. Bei Plasmidmengen, die 500ng überschritten, sank die CAT-Aktivität.

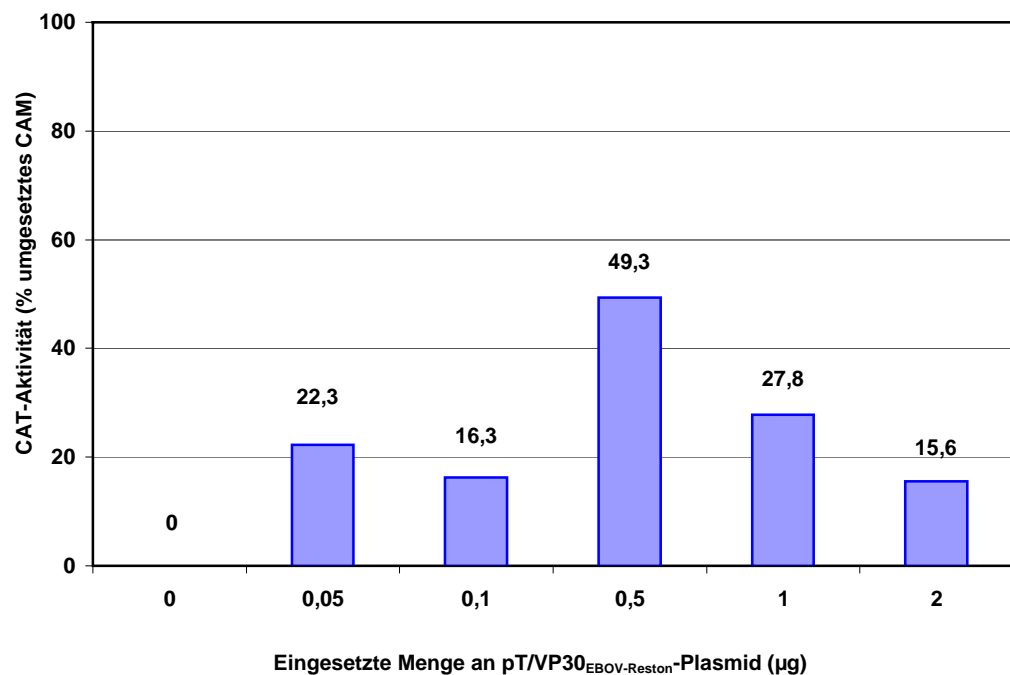


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Titration des pT/VP30_{EBOV-Reston}-Plasmids. Dargestellt ist die Signalintensität der CAT-Expression (% umgesetzt CAM) gegen die eingesetzte Menge an pT/VP30_{EBOV-Reston}-Plasmid (µg). Der Anteil an umgesetztem ¹⁴C-Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz ($[\text{Produkt}:(\text{Produkt}+\text{Edukt})]*100$) berechnet. Die Abbildung 29 ist repräsentativ für eine Versuchsreihe.

4.6.4 Titration des L-Proteins des EBOV-Reston

Um die letzte essentielle Nukleokapsid-Komponente zu titrieren, wurde das Plasmid pT/L in fünf verschiedenen Mengen von 100ng bis 4µg eingesetzt. Wiederum wurde der Versuch wie in 4.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Mengen der anderen Komponenten lauteten:

- 500ng pT/NP_{EBOV-Reston}
- 500ng pT/VP35_{EBOV-Reston}
- 500ng pT/VP30_{EBOV-Reston}
- 2µg 3R-5R

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne pT/L_{EBOV-Reston}. Nach der Inkubationsperiode wurden die Zellen lysiert und die CAT-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind der Abbildung 30 zu entnehmen. Es wurde gezeigt, dass die maximale CAT-Aktivität bei einer eingesetzten Plasmidmenge von 1-2µg erreicht wurde. Größere eingesetzte Mengen führten zu keiner Erhöhung der Intensität.

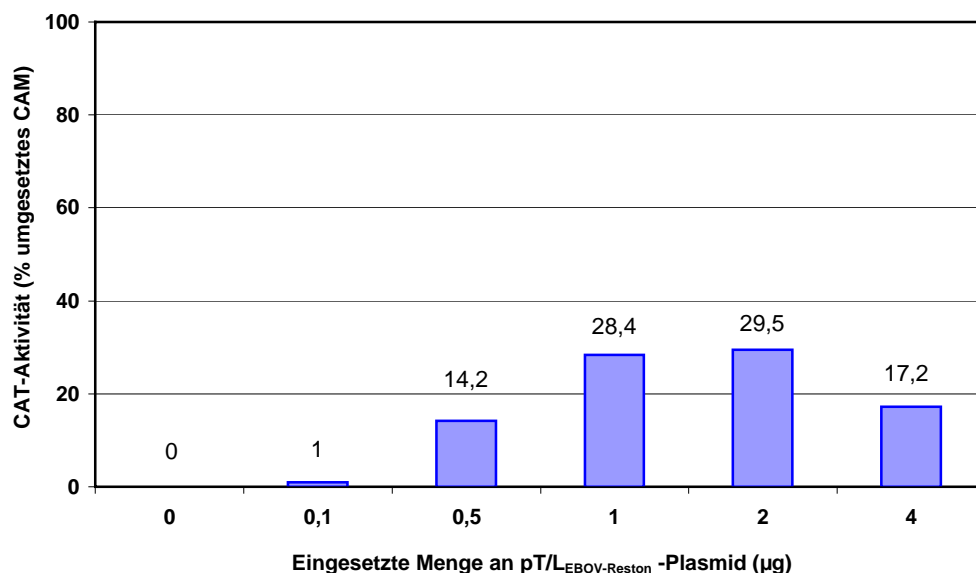


Abbildung 30: Graphische Darstellung der Titration des pT/L_{EBOV-Reston}-Plasmids.

Dargestellt ist die Signalintensität der CAT-Expression (% umgesetztes CAM) gegen die eingesetzte Menge an pT/L_{EBOV-Reston}-Plasmid (µg). Der Anteil an umgesetztem ¹⁴C-Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz ([Produkt:(Produkt+Edukt)]*100) berechnet. Die Abbildung 30 ist repräsentativ für eine Versuchsreihe.

4.6.5 Titration der EBOV-Reston-spezifischen Minigenome

Das Minigenom wird den Nukleokapsidproteinen als Substrat für Transkription und Replikation zur Verfügung gestellt. Das Minigenom 3R-5R wurde von 1µg bis 4µg titriert. Der Versuch wurde wie unter 4.6.1 beschrieben durchgeführt und die weiteren Komponenten wie folgt eingesetzt:

0,5µg pT/NP_{EBOV-Reston}

0,5µg pT/VP35_{EBOV-Reston}

0,5µg pT/VP30_{EBOV-Reston}

1µg pT/L_{EBOV-Reston}

Bei der Negativkontrolle wurde kein Minigenom zugegeben. CAT-Aktivität war schon bei 1µg nachweisbar und stieg weiter an bis zur maximal eingesetzten Menge von 4µg (Abb. 31).

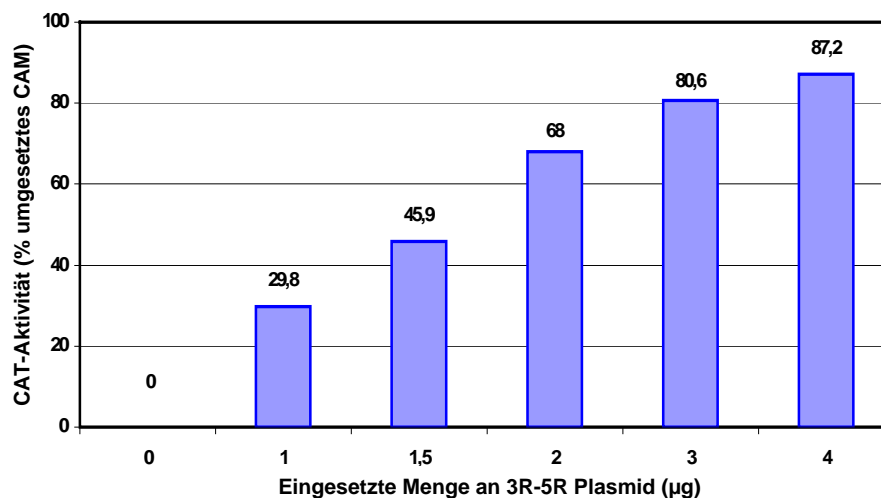
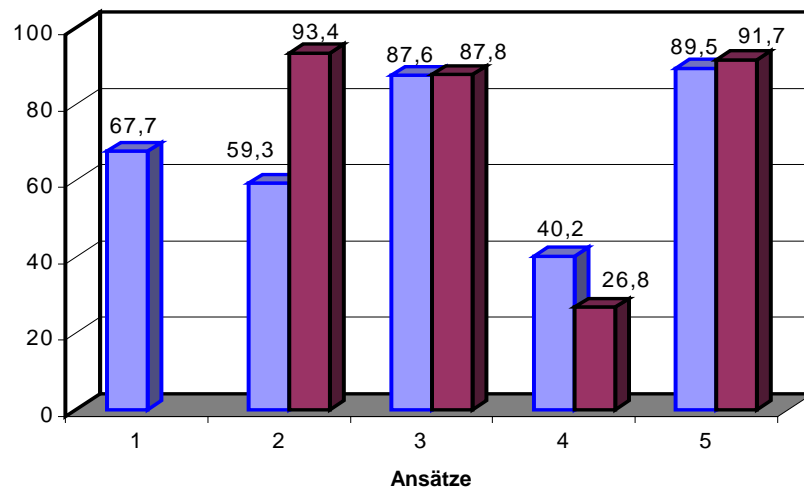


Abbildung 31: Graphische Darstellung der Titration des 3R-5R-Plasmids. Dargestellt ist die Signalintensität der CAT-Expression (% umgesetzt CAM) gegen die eingesetzte Menge an spezifischer Minigenom-DNA (µg). Der Anteil an umgesetztem ^{14}C -Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz ($[\text{Produkt}:(\text{Produkt}+\text{Edukt})]*100$) berechnet. Die Abbildung 31 ist repräsentativ für eine Versuchsreihe.

4.7 Zusammensetzung des Polymerasenkomplexes des EBOV-Reston

Eine weiterer essentieller Punkt, der im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet wurde, war die Bestimmung der Zusammensetzung des viralen Polymerasenkomplexes und der optimalen Transfektionsmengen der verschiedenen Komponenten, bei der die höchste CAT-Aktivität zu erhalten war. Aus den vorherigen Versuchen konnte geschlossen werden, dass alle vier Nukleokapsidproteine nötig sind, um eine Replikation zu erhalten (Kap. 4.5). Es wurden dabei Plasmidmengen eingesetzt, die sich in den Vorversuchen für die jeweiligen Plasmide als optimal erwiesen hatten. Um zu untersuchen, in welchem Verhältnis die transfizierten Plasmide vorliegen müssen, um maximale CAT-Aktivität zu erreichen, wurden verschiedene Ansätze ausgetestet. Die Ansätze wurden mit 2µg bzw. 4µg 3R-5R-Plasmid-DNA durchgeführt (Abb. 32). Da bei der Fugene-Transfektion das Verhältnis von DNA zu Transfektans 1:3 sein sollte (µg:µl), führt eine Erhöhung der Plasmidmenge zu einer Erhöhung der eingesetzten Fugene-Menge. Dies wiederum kann zu toxischen Effekten bei den Zellen führen. Deswegen wurde die niedrigste DNA-Menge, die zu einer effizienten Reporterexpression führte, für die weiteren Versuche eingesetzt. Die optimalen Plasmidmengen für das EBOV-Reston-spezifische Minigenom-system lauten:

1µg pT/NP_{EBOV-Reston}
 0,5µg pT/VP35_{EBOV-Reston}
 0,5µg pT/VP30_{EBOV-Reston}
 2µg pT/L_{EBOV-Reston}
 2µg 3R5R



EBOV-Reston NP	1	1	1	2	2	(µg)
EBOV-Reston VP35	0,1	0,1	0,5	0,1	0,5	(µg)
EBOV-Reston VP30	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	(µg)
EBOV-Reston L	1	2	2	2	2	(µg)

Abbildung 32: Graphische Darstellung der Titration der unterschiedlichen EBOV-Reston-Nukleokapsidproteingene und der spezifischen 3R-5R-Plasmide.

Dargestellt ist die Signalintensität der CAT-Expression (% umgesetztes CAM) gegen die eingesetzte Menge an Nukleokapsidproteingenen und an spezifischen Minigenomen (µg). Der Anteil an umgesetztem ^{14}C -Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz ($[\text{Produkt}:(\text{Produkt}+\text{Edukt})]*100$) berechnet.

— Ansatz mit 2µg Minigenom 3R-5R, — Ansatz mit 4µg Minigenom 3R-5R

4.8 Transkription des EBOV-Reston-spezifischen Minigenoms

Das im Kapitel 4.4 beschriebene Minigenom wurde nach der Klonierung im EBOV-Reston-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem auf sein Transkriptionsverhalten hin untersucht. Hierzu wurde eine 6er-Zellkulturplatte mit HUH-T7 Zellen (Zelldichte ca. 70%) mittels Fugene 6-Transfection-Reagent mit $\text{pT/VP35}_{\text{EBOV-Reston}}$, $\text{pT/VP30}_{\text{EBOV-Reston}}$, $\text{pT/L}_{\text{EBOV-Reston}}$ und dem EBOV-Reston-Minigenom, 3R-5R transfiziert (2.9). Dem Transfektionsansatz „-30“ wurde das Plasmid $\text{pT/VP30}_{\text{EBOV-Reston}}$ nicht zugegeben, während in den Negativkontrollen „-L“ das Plasmid $\text{pT/L}_{\text{EBOV-Reston}}$ fehlte. Als Vergleich wurden dieselben Ansätze mit dem EBOV-Zaire-Minigenom System angesetzt (2.8). Für die Isolierung der mRNA wurden pro Ansatz je zwei Vertiefungen transfiziert. 40h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die mRNA isoliert (2.5.2.1). Die mRNAs wurden auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (2.6.2), auf eine positiv geladene Nylon-Membran geblottet (2.6.3) und 6h lang prähybridisiert (2.6.4). Anschließend wurde der Blot 12h mit einer DIG-markierten, negativsträngigen RNA-Sonde BS/(-)CAT (pBluescript/-CAT) hybridisiert (2.6.4). Abbildung 33 zeigt ein Bild des Blots nach Detektion der DIG-markierten RNA mit CDP-Star (2.6.5). In Anwesenheit von VP30 wurden sowohl das EBOV-Reston-Minigenom als auch das EBOV-Zaire-Minigenom transkribiert. In

Abwesenheit von VP30 konnte weder im EBOV-Reston- noch im EBOV-Zaire-System mRNA nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das VP30 des EBOV-Reston in gleicher Weise wie das VP30 des EBOV-Zaire als Transkriptionsaktivator fungiert.

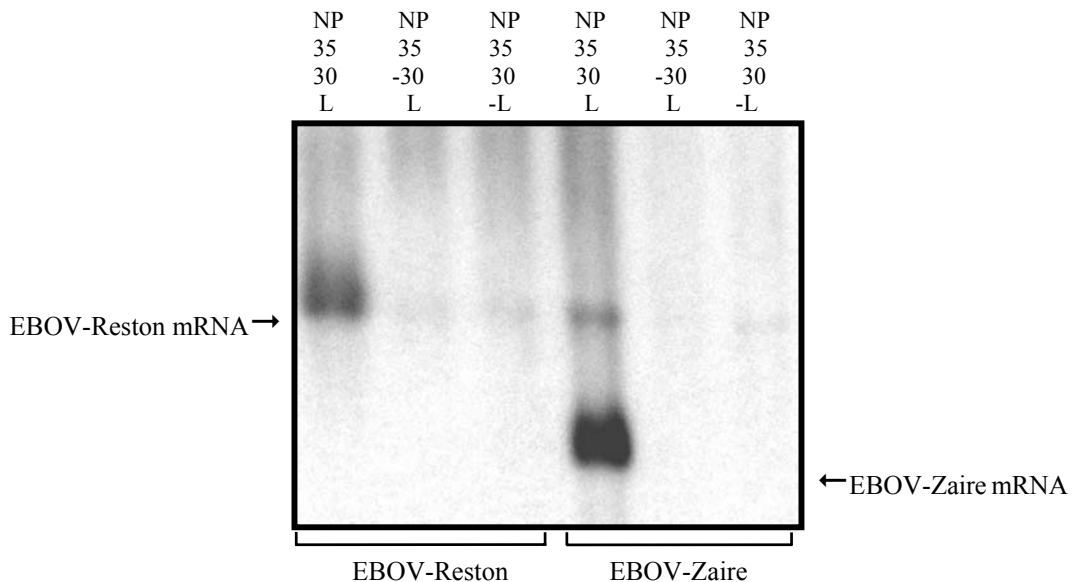


Abbildung 33: Northern-Blot-Analyse transkribierter mRNAs, welche in An- und Abwesenheit von VP30 transkribiert wurden.

HUH-T7-Zellen wurden in 6er Zellkulturplatten kultiviert und mittels des Fugene-6-Transfection-Reagent mit $pT/VP30_{EBOV-Reston}$, $pT/VP35_{EBOV-Reston}$, $pT/VP30_{EBOV-Reston}$, $pT/L_{EBOV-Reston}$ sowie 1 μ g des EBOV-Reston Minigenoms-Plasmid, 3R-5R bzw. $pT/VP30_{EBOV-Zaire}$, $pT/VP35_{EBOV-Zaire}$, $pT/VP30_{EBOV-Zaire}$, $pT/L_{EBOV-Zaire}$ sowie 1 μ g des EBOV-Zaire Minigenoms-Plasmid, 3E-5E transfiziert. Pro Mutante wurden zwei Schälchen transkribierter mRNAs mit Hilfe von Oligo(dT)-Zellulose isoliert. Nach Aufreinigung und Fällung wurden die mRNAs auf einem denaturierenden 1,5%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und anschließend einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Es folgte eine sechsstündige Prähybridisierung, an die sich eine zwölfstündige Hybridisierung mit 5 μ l der DIG-markierten, negativ-strängigen RNA-Sonde BS/(-)CAT (pBluescript/-CAT) anschloss. Die Pfeile verweisen auf die spezifischen Banden transkribierter (+)-strängiger RNA. Den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen (-L) wurde das Plasmid $pT/L_{EBOV-Reston}$ bzw. $pT/L_{EBOV-Zaire}$ nicht zugegeben, während den Transfektionsansätzen (-30) das Plasmid $pT/VP30_{EBOV-Reston}$ bzw. $pT/VP30_{EBOV-Zaire}$ nicht zugesetzt wurde.

4.9 Austausch der Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Reston, EBOV-Zaire und MBGV

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Nukleokapsidproteine von EBOV-Zaire, -Reston und MBGV ihre Funktion auch in den jeweils anderen Replikationssystemen ausüben können. Hierzu wurden die verschiedenen Komponenten des EBOV-Reston gegen die analogen Proteine des EBOV-Zaire bzw. des MBGV ausgetauscht und umgekehrt. Systematische ein-, zwei-, drei- und vierfach Austausche wurden durchgeführt. Anschließend wurden die Zelllysate auf CAT-Aktivität hin untersucht.

4.9.1 Verwendung von EBOV-Reston-Proteinen im EBOV-Zaire-spezifischen

Replikationssystem

In diesem Versuch wurden die Nukleokapsidproteine des EBOV-Zaire-spezifischen Replikationssystems durch die entsprechenden EBOV-Reston-Proteine ausgetauscht. Zunächst wurden 40-60% konfluente BSR-T7/5-Zellen mit dem jeweiligen DNA-Transfektionsansatz transfiziert. In diesen Ansätzen wurden die für die Nukleokapsidproteine kodierenden Plasmide miteinander kombiniert und das EBOV-Zaire-spezifische Minigenom als Substrat eingesetzt. Nach der Zellyse wurde die CAT-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt. Die Intensität der Signale wurde mittels des Programmes PC-BAS 2.09 ausgewertet und über das Programm Microsoft Excel graphisch dargestellt (Abb. 34). Die Plasmidmengen sind in Tabelle 5 aufgelistet und ihre Kombinationen sind aus der Legende der Abbildung 34 zu entnehmen.

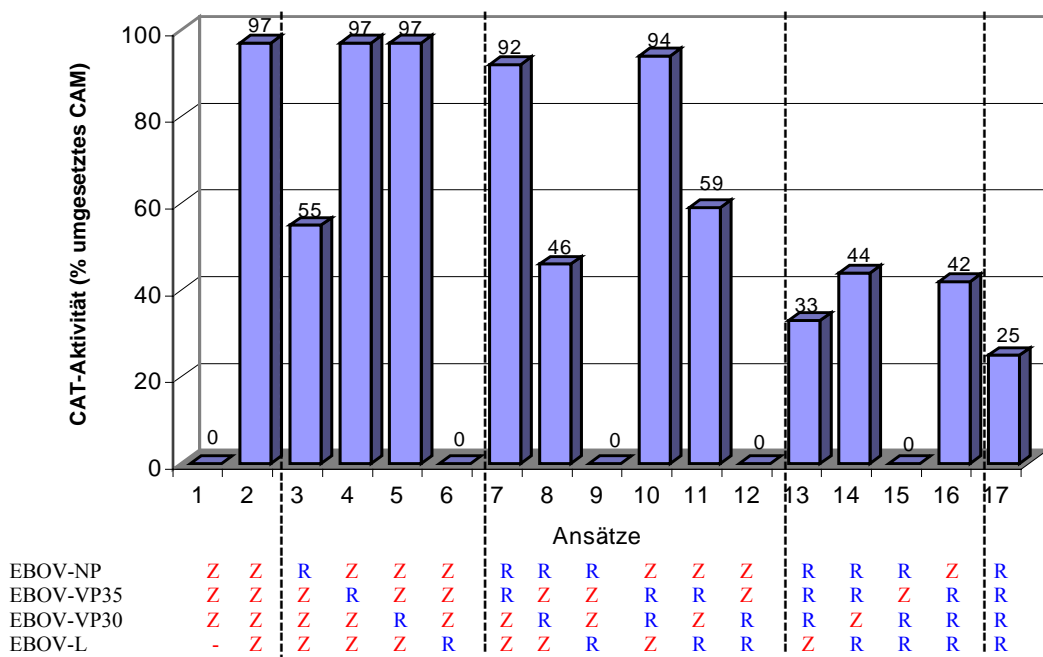


Abbildung 34: Graphische Darstellung der CAT-Aktivität bei Einsatz von EBOV-Reston-Proteinen im EBOV-Zaire-Replikationssystem.

Dargestellt ist die Signalintensität der CAT-Expression (% umgesetzt CAM) gegen die unterschiedlichen Plasmidkombinationen. 40-60% konfluente BSR-T7/5-Zellen wurden mit dem jeweiligen DNA-Transfektionsansatz transfiziert. In diesen Ansätzen wurden die für die Nukleokapsidproteine kodierenden Plasmide miteinander kombiniert und das EBOV-Zaire-spezifische Minigenom als Substrat eingesetzt. Die Zellen wurde nach 2 Tagen lysiert und die CAT-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt. Der Anteil an umgesetztem ^{14}C -Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz ($[\text{Produkt}:(\text{Produkt}+\text{Edukt})]*100$) berechnet. **R**: Ansatz mit EBOV-Reston-Plasmiden **Z**: Ansatz mit EBOV-Zaire-Plasmiden Ansatz 1 entspricht der Negativkontrolle, Ansatz 2 der Positivkontrolle. Die Abbildung 34 ist repräsentativ für eine Versuchsreihe.

µg	Minigenom	pT/NP	pT/VP35	pT/VP30	pT/L
EBOV-Reston	-	0,5	0,5	0,5	1
EBOV-Zaire	1	0,5	0,5	0,1	1

Tabelle 5: Eingesetzte EBOV-Reston und - Zaire Plasmidmengen.

In Abbildung 34 ist gezeigt, dass das EBOV-Zaire- spezifische Replikationssystem durch Reston-spezifische Nukleokapsidproteine komplementiert werden konnte. Wurden alle EBOV-Zaire-spezifischen Proteine durch EBOV-Reston-spezifische ausgetauscht, konnte CAT-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 34, Spur 17). Dies zeigt, dass das EBOV-Zaire-spezifische Minigenom vom EBOV-Reston-spezifischen Polymerase-Komplex als Matrize akzeptiert wird. Nur eine der Proteinkombinationen erwies sich als inaktiv: VP35-Zaire mit L-Reston (Abb. 34, Spuren 6, 9, 12, 15). Auch die Kombination des VP35 des EBOV-Zaire mit dem EBOV-Reston-spezifischen NP führte zu einer signifikanten Reduktion der CAT-Aktivität (Abb. 34, Spur 3, 8). Wurde dagegen das VP35 des EBOV-Reston mit EBOV-Zaire-spezifischen NP und L kombiniert, führte dies nicht zu einer Verminderung der CAT-Aktivität (Abb. 34, Spur 4, 10), was bedeutet, dass VP35-Reston in der Lage ist, mit NP-Zaire und L-Zaire einen funktionellen Polymerasekomplex zu bilden. Der Austausch des EBOV-Zaire-spezifischen L gegen das EBOV-Reston-spezifische führte in allen Fällen zu einem Abfall der CAT-Aktivität (Abb. 34, Spuren 6, 9, 11, 12, 14, 15). Dies könnte darauf hinweisen, dass das L-Protein des EBOV-Reston das EBOV-Zaire-spezifische Minigenom nur unzureichend als Substrat für Replikation und Transkription akzeptiert. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die für das L-Reston-Plasmid eingesetzte DNA-Menge zu gering war (vgl. 4.6.4 und 4.7).

Auch der Austausch von VP30 hatte nur einen geringen Effekt auf die gemessene CAT-Aktivität (Abb. 34, Spur 5 und 8 im Vergleich zu Spur 3 und 10).

4.9.2 Verwendung von EBOV-Zaire-Proteinen im EBOV-Reston-spezifischen

Replikationssystem

Hier wurden die Nukleokapsidproteine im EBOV-Reston-spezifischen Replikationssystem durch die entsprechenden EBOV-Zaire-Proteine ausgetauscht. Die Zellen wurden wie bereits unter 4.9.1 beschrieben transfiziert. Da die CAT-Expression im EBOV-Reston-spezifischen Replikationssystem schwächer ist als im EBOV-Zaire-spezifischen Replikationssystem, wurden alle Ansätze mit den für die EBOV-Reston-spezifischen Plasmide optimierten DNA-Mengen durchgeführt. Die Intensität der Signale wurde

mittels des Programmes PC-BAS 2.09 ausgewertet und über das Programm Microsoft Excel graphisch dargestellt (Abb. 35). Die Plasmidmengen sind in Tabelle 6 aufgelistet und ihre Kombinationen sind aus der Legende der Abbildung 35 zu entnehmen.

Plasmid (µg)	Minigenom	pT/NP	pT/VP35	pT/VP30	pT/L
EBOV-Reston	2	0,5	0,5	0,5	1
EBOV-Zaire	-	0,5	0,5	0,5	1

Tabelle 6: Eingesetzte EBOV-Reston und - Zaire Plasmidmengen.

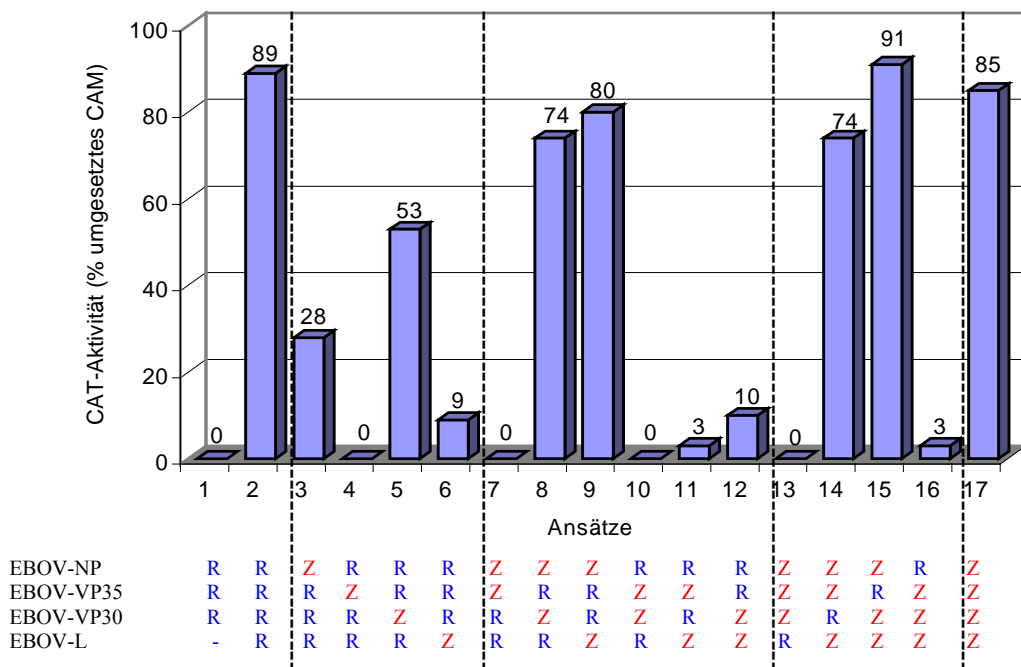


Abbildung 35: Graphische Darstellung der CAT-Aktivität bei Einsatz von EBOV-Zaire-Proteinen im EBOV-Reston-Replikationssystem.

Dargestellt ist die Signalintensität der CAT-Expression (% umgesetzt CAM) gegen die unterschiedlichen Plasmidkombinationen. 40-60% konfluente BSR-T7/5-Zellen wurden mit dem jeweiligen DNA-Transfektionsansatz transfiziert. In diesen Ansätzen wurden die für die Nukleokapsidproteine kodierenden Plasmide miteinander kombiniert und das EBOV-Zaire-spezifische Minigenom als Substrat eingesetzt. Die Zellen wurden nach 2 Tagen lysiert und die CAT-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt. Der Anteil an umgesetztem ^{14}C -Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz ($[\text{Produkt}/(\text{Produkt}+\text{Edukt})]*100$) berechnet.

R: Ansatz mit EBOV-Reston-Plasmiden Z: Ansatz mit EBOV-Zaire-Plasmiden

Ansatz 1 entspricht der Negativkontrolle, Ansatz 2 der Positivkontrolle. Die Abbildung 35 ist repräsentativ für eine Versuchsreihe.

Auch im EBOV-Reston-spezifischen Replikationssystem erwies sich die Kombination von VP35-Zaire mit L-Reston als inaktiv (Abb. 35, Spuren 4, 7, 10, 13). Das bedeutet, dass diese beiden Proteine nicht in der Lage sind, einen aktiven Polymerasekomplex zu konstituieren. Auch die Kombination von NP-Reston und L-Zaire erwies sich als kritisch (Abb. 35, Spuren 6, 11, 12, 16). Dagegen zeigte sich das VP35-Reston tolerant gegenüber

der Zugabe EBOV-Zaire-spezifischer Proteine (Abb. 35, Spuren 15). Dass VP35-Reston in der Lage ist, mit NP-Zaire und L-Zaire einen funktionellen Polymerasekomplex zu bilden, konnte bereits im EBOV-Zaire-spezifischen Replikationssystem nachgewiesen werden. Wurden sämtliche Reston-spezifischen Nukleokapsidproteine gegen Zaire-spezifische ausgetauscht, ließ sich eine starke CAT-Aktivität nachweisen (Abb. 35, Spur 17). Das bedeutet, dass der EBOV-Zaire-spezifische Replikationskomplex die in den Leader- und Trailerregionen lokalisierten Promotorsequenzen des EBOV-Reston mit großer Effizienz erkennt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die ermittelten Ergebnisse auf eine große funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit der Nukleokapsidproteine von EBOV-Zaire und -Reston hinweisen.

4.9.3 Verwendung von EBOV-Reston-Proteinen im MBGV-spezifischen

Replikationssystem

Es sollte nun überprüft werden, ob auch die Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Reston und MBGV ausgetauscht werden können. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Homologie zwischen diesen Proteinen im Durchschnitt bei 40,2% liegt, während die Homologie zwischen Nukleokapsiden von EBOV-Reston und -Zaire durchschnittlich 69,8% beträgt. 40-60% konfluente BSR-T7/5-Zellen wurden mit dem jeweiligen DNA-Transfektionsansatz transfiziert. Die eingesetzten DNA-Mengen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Nach der Zellyse wurde die CAT-Aktivität in den Zellysaten bestimmt.

µg	Minigenom	pT/NP	pT/VP35	pT/VP30	pT/L
EBOV-Reston	-	0,5	0,5	0,5	1
MBGV	1	0,1	0,5	0,1	1

Tabelle 7: Eingesetzte EBOV-Reston und MBGV Plasmidmengen.

Die Austausche zwischen EBOV-Reston und MBGV wurden wie zwischen EBOV-Reston und -Zaire durchgeführt. Bei keiner der getesteten Kombinationen konnte CAT-Aktivität nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass bei einem Austausch von MBGV-spezifischen Nukleokapsidproteinen gegen die Nukleokapsidproteine des EBOV-Reston diese nicht die Funktion der MBGV-Nukleokapsidproteine im MBGV-Replikationssystem übernehmen können und umgekehrt. Auch die Minigenome wurden von den Nukleokapsidproteinen des jeweils anderen Virus nicht als Substrat für Replikation und Transkription akzeptiert.

4.10 Untersuchung chimärer Minigenome

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die meisten der Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Reston und -Zaire austauschbar sind, sollten nun auch die cis-aktiven Elemente, also Leader- und Trailerregionen, zwischen den beide Viren rekombiniert werden.

4.10.1 Klonierung der chimären Minigenome

Ausgangsprodukte waren hier die beiden Minigenome 3R-5R und 3E-5E (Zaire Leader / Zaire Trailer). Beide Minigenome wurden zunächst mit NdeI und RsrII verdaut, so dass die jeweilige Leader-Region aus den Minigenomen entfernt wurde.

Die beiden Leader-Regionen wurden anschließend in das Vektorrückgrat des jeweils anderen Minigenoms inseriert. Dabei wurden folgende Minigenome konstruiert:

- Reston Leader / Zaire Trailer (Konstrukt 3R-5E)
- Zaire Leader / Reston Trailer (Konstrukt 3E-5R)

Eine genaue Darstellung der originalen und chimären Minigenome ist der Abbildung 36 zu entnehmen.

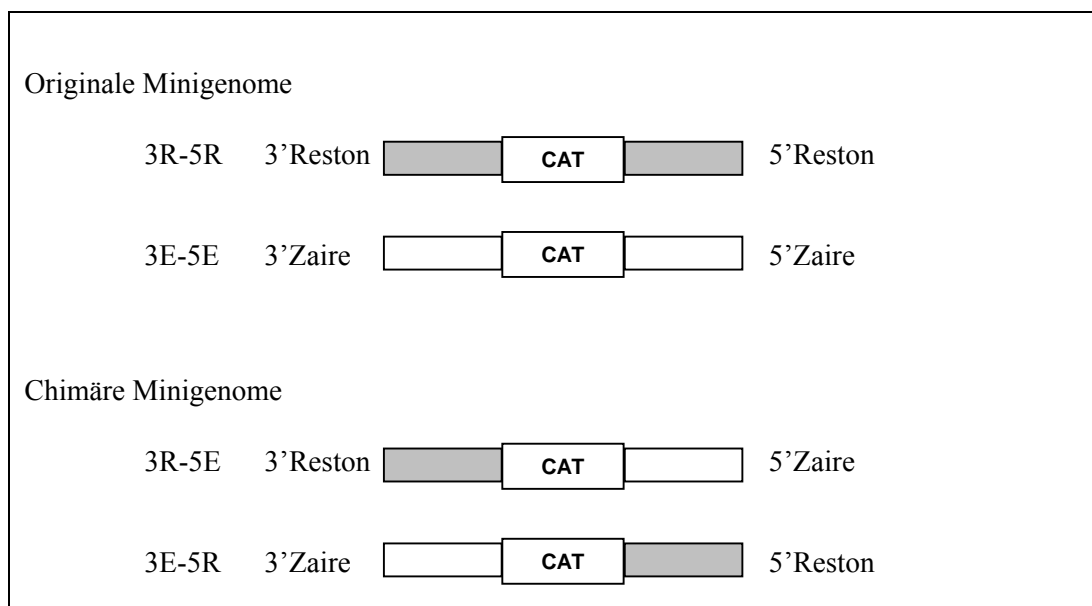


Abbildung 36: Originale und chimäre Minigenome.

grau: EBOV-Reston-spezifische Sequenzen
weiß: EBOV-Zaire-spezifische Sequenzen.

4.10.2 Transkription und Replikation der chimären Minigenome

In 6er-Zellkulturplatten ausgesäte 40-60% konfluente BSR-T7/5-Zellen wurden mit den für die EBOV-Reston- bzw. -Zaire-Nukleokapsidproteine kodierenden Plasmiden transfiziert wie es im Kapitel 2.8 beschrieben ist. Zu den Ansätzen wurden jeweils 2 µg des jeweiligen chimären Minigenoms hinzugegeben. Nach einer Inkubation von zwei

Tagen bei 37°C wurden die Zellen lysiert und 1µl des jeweiligen Zelllysats im CAT-Assay zum Nachweis der CAT-Aktivität eingesetzt. Die Ergebnisse dieses CAT-Assays sind in Abbildung 37 dargestellt und die verwendeten Plasmidmengen in Tabelle 8 aufgelistet. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne EBOV-Zaire- bzw. -Reston -L-Protein. Die Intensität der Signale wurde mit dem Programm PC-BAS 2.09 ausgewertet und über das Programm Microsoft Excel graphisch dargestellt.

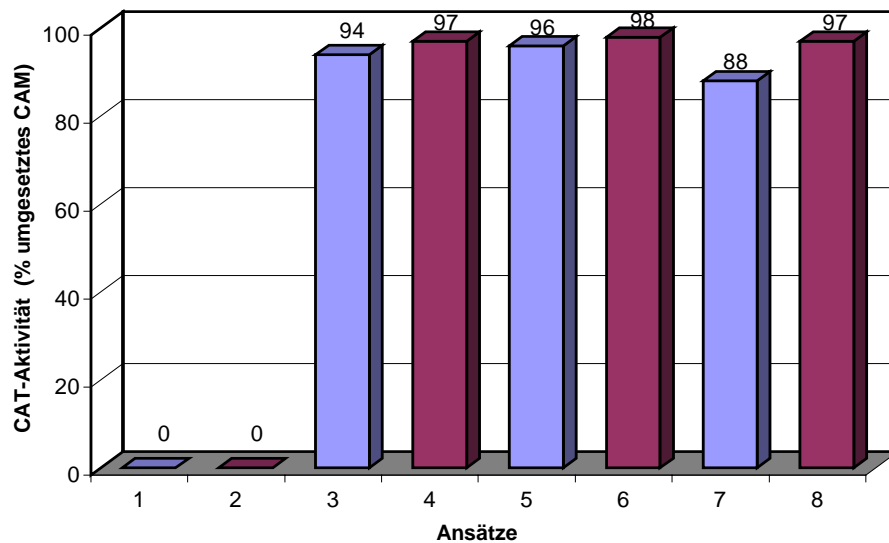


Abbildung 37: Graphische Darstellung der CAT-Aktivität bei Einsatz von EBOV-Zaire- bzw. -Reston Nukleokapsidproteinen und der chimären Minigenome.

Dargestellt ist die Signalintensität der CAT-Expression (% umgesetzt CAM) gegen die unterschiedlichen Plasmidkombinationen. 40-60% konfluente BSR-T7/5-Zellen wurden mit dem jeweiligen DNA-Transfektionsansatz transfiziert. Die Zellen wurden nach 2 Tagen lysiert und die CAT-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt. Der Anteil an umgesetztem ¹⁴C-Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz ($[\text{Produkt}:(\text{Produkt}+\text{Edukt})]*100$) berechnet.

Ansatz 1: EBOV-Reston-Nukleokapsidproteine ohne pT/L + 3R-5R (Negativkontrolle)

Ansatz 2: EBOV-Zaire-Nukleokapsidproteine ohne pT/L + 3E-5E (Negativkontrolle)

Ansatz 3: EBOV-Reston-Nukleokapsidproteine + 3R-5R (Positivkontrolle)

Ansatz 4: EBOV-Zaire-Nukleokapsidproteine + 3E-5E (Positivkontrolle)

Ansatz 5: EBOV-Reston-Nukleokapsidproteine + 3E-5R

Ansatz 6: EBOV-Zaire-Nukleokapsidproteine + 3E-5R

Ansatz 7: EBOV-Reston-Nukleokapsidproteine + 3R-5E

Ansatz 8: EBOV-Zaire-Nukleokapsidproteine + 3R-5E

— Ansatz mit EBOV-Reston-Plasmiden

— Ansatz mit EBOV-Zaire-Plasmiden

Plasmid (µg)	Minigenom	pT/NP	pT/VP35	pT/VP30	pT/L
EBOV-Reston	2	0,5	0,5	0,5	1
EBOV-Zaire	1	0,5	0,5	0,1	1

Tabelle 8: Eingesetzte EBOV-Reston und -Zaire Plasmidmengen.

Die Abbildung 37 zeigt, dass sowohl die Nukleokapsidproteine von EBOV-Reston als auch diejenigen von EBOV-Zaire beide chimären Minigenome effizient transkribieren. Ansätze mit den EBOV-Zaire-Nukleokapsidproteinen zeigen keinen Verlust an Aktivität im Vergleich zur Positivkontrolle, und dies unabhängig davon, welches chimäre Minigenom zum Einsatz kam. EBOV-Reston Nukleokapsidproteine zeigen in ihren Ansätzen eine schwächere CAT-Expression als EBOV-Zaire Proteine und scheinen mit dem EBOV-Zaire Leader effizienter zu sein.

4.11 Untersuchung über die zelluläre Kolokalisierung von EBOV-Zaire-VP35 und EBOV-Reston-L

Im Kapitel 4.9 wurde gezeigt, dass, mit Ausnahme einer einzigen Kombination, alle Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Zaire und -Reston austauschbar sind. Die Ansätze, bei denen gleichzeitig EBOV-Zaire-VP35 und EBOV-Reston-L vorhanden waren, zeigten jedoch keine CAT-Aktivität (Abb. 34 und 35). Das VP35 und das L des EBOV-Zaire bilden den aktiven Polymerasekomplex (Mühlberger et al., 1999). Des Weiteren wurde für das VP35 und das L des MBGV gezeigt, dass beide Proteine miteinander interagieren (Becker et al., 1998). Eine mögliche Erklärung für die Inkompatibilität von VP35-Zaire und L-Reston könnte darin liegen, dass beide Proteine nicht miteinander interagieren. Eine mögliche Interaktion beider Proteine sollte mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht werden. Die Expression des NP der Filoviren führt zur Bildung von typischen Einschlusskörperchen, welche dem Grundgerüst der Nukleokapside entsprechen (Kolesnikova et al., 2000) und in der Immunfluoreszenzanalyse als große Aggregate im Cytoplasma der Zellen erscheinen.

Bindungsstudien bezüglich der Nukleokapsidproteine wurden bisher nur für MBGV durchgeführt (Becker et al., 1998). Hier konnte gezeigt werden, dass wenn VP35 und VP30 in Abwesenheit von NP in Zellen exprimiert werden, beide Proteine homogen im Cytoplasma verteilt sind. Bei Koexpression mit NP kolokalisieren beide Proteine mit den vom NP gebildeten Einschlusskörpern. Auch das L-Protein ist homogen im Cytoplasma verteilt. Wird es jedoch gemeinsam mit VP35 und NP exprimiert, wird L über eine Bindung mit VP35 ebenfalls in die NP-Einschlusskörper dirigiert (Becker et al., 1998). Die unterschiedlichen Verteilungsmuster der Proteine lassen sich mit Immunfluoreszenzanalyse nachweisen. Da keine gegen die L-Proteine der Filoviren gerichteten Antikörper verfügbar sind, wurde das L-Reston zunächst mit einem N-terminal gelegenen Flag-Epitop versehen. Des Weiteren wurde ein verkürztes L-Protein synthetisiert, bezeichnet als EBOV-Reston L₁, das aus den ersten 879 Aminosäuren bestand. Auch dieses Protein

wurde mit einem am N-terminal gelegenen Flag-Epitop versehen (Abb. 38). Da für das MBGV-L gezeigt wurde, dass sich die Bindungsstelle für VP35 im N-terminalen Bereich des Proteins befindet, sollte mit dieser Mutante überprüft werden, ob auch hier der N-terminale Teil des Proteins ausreicht, um eine Wechselwirkung mit dem VP35 zu gewährleisten. Das Flag-Epitop stellt ein Oktapeptid der Abfolge DYKDDDDK dar. Die Klonierungsstrategie zur Herstellung der Flag-markierten Proteine ist unter Abb. 38 beschrieben. Als Hinweis für ein Flag-markiertes EBOV-Reston-L oder -L₁ ist an die Proteinbezeichnung ein „Flag“ angehängt (z.B. EBOV-Reston-L_{Flag}). Die zwei Flag-markierten Proteine wurden in HeLa-Zellen mittels des MVA-T7-Expressionssystems (2.10) synthetisiert und einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse (2.13) unterzogen. Abbildung 38 zeigt die zwei Flag-markierten Proteine.

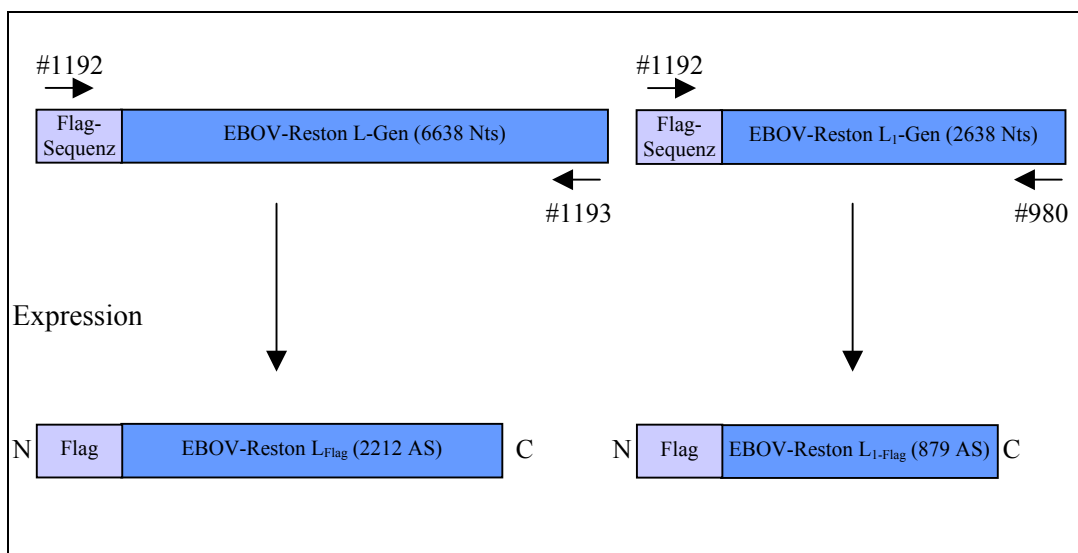


Abbildung 38: Flag-markierte L-Proteine des EBOV-Reston .

#980, #1192, #1193: Primer, die zur Klonierung verwendet wurden.

Als Positivkontrolle für das EBOV-Reston wurden HeLa-Zellen, auf Deckgläsern kultiviert, mit MVA-T7 infiziert (2.10) und mit pT/L_{Flag}-EBOV-Reston bzw. -pT/L_{1Flag}-EBOV-Reston (1µg), pT/VP35_{EBOV-Reston} (0,5µg) und pT/NP_{EBOV-Reston} (1µg), kotransfiziert (2.8). Acht Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzanalyse mit einem monoklonalen Flag-Antikörper unterzogen (2.13). Gebundene Antikörper wurden mit einem Sekundärantikörper, einem FITC-konjugierten Ziege α-Maus-IgM F(ab')₂-Fragment (1:100 verdünnt) bzw. einem Rhodamin-konjugierten Ziege α-Maus-IgG Antikörper (1:100 verdünnt), detektiert.

Abbildung 39 zeigt, dass bei Einzelexpression der Polymerase $L_{\text{Flag-EBOV-Reston}}$ bzw. $L_{\text{1Flag-EBOV-Reston}}$ eine homogene Verteilung des Proteins innerhalb der Zelle zu finden war (Abb. 39, Bild ① und ②). Wurde das L-Gen mit VP35 und NP kotransfiziert, relokalisierte das Protein mit den NP-spezifischen Einschlusskörpern (Abb. 39, Bild ③ und ④). Daraus kann geschlossen werden, dass das L-Reston über eine Bindung mit VP35-Reston in die NP-Reston-spezifischen Einschlusskörper gezogen wird.

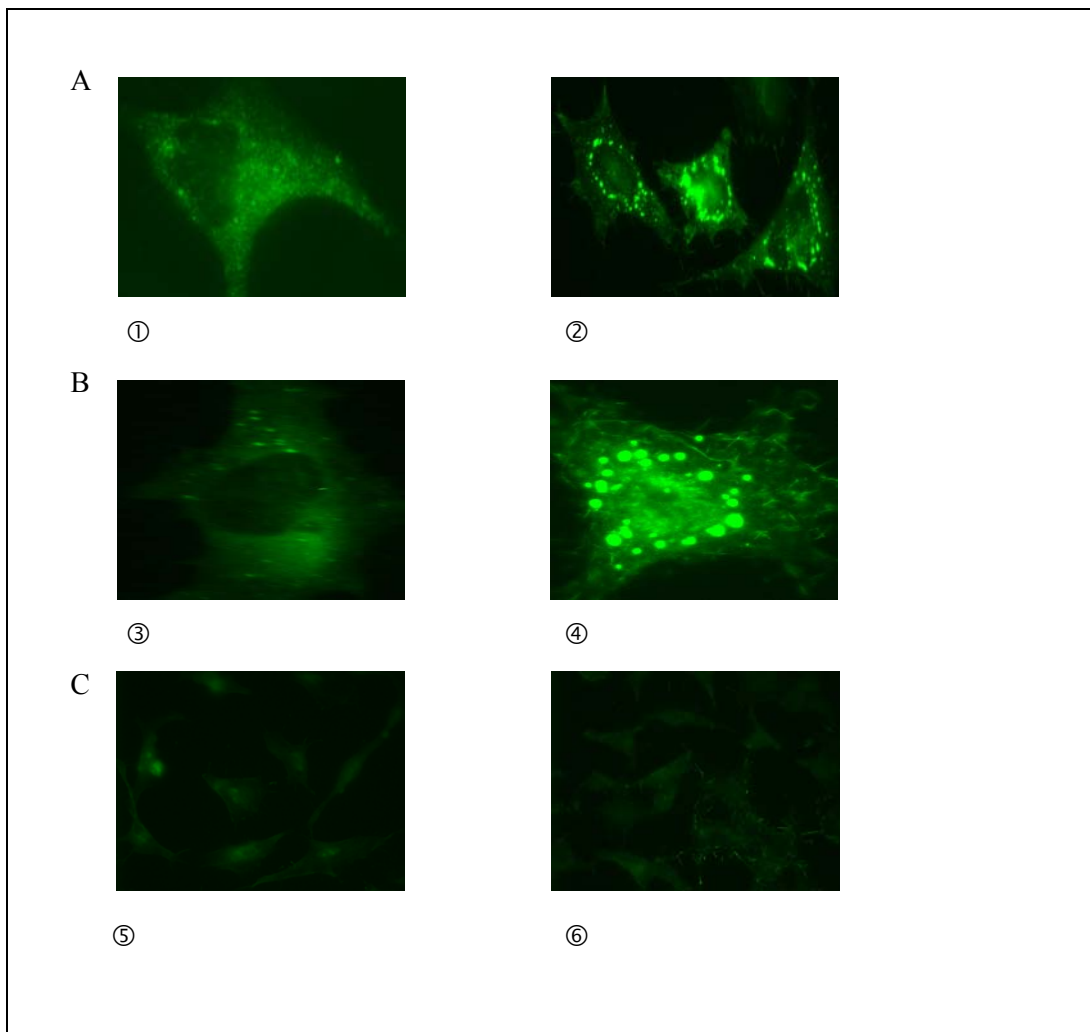


Abbildung 39: Untersuchung zu Wechselwirkung zwischen L_{Reston} und $VP35_{\text{Reston}}$.

HeLa-Zellen, auf Deckgläsern kultiviert, wurden mit MVA-T7 infiziert und mit $pT/L_{\text{Flag-EBOV-Reston}}$ bzw. $pT/L_{\text{1Flag-EBOV-Reston}}$ ($1\mu\text{g}$), $pT/VP35_{\text{EBOV-Reston}}$ ($0,5\mu\text{g}$) und $pT/NP_{\text{EBOV-Reston}}$ ($1\mu\text{g}$), kotransfiziert. 8h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzanalyse mit einem monoklonalen Flag-Antikörper unterzogen. Gebundene Antikörper wurden mit einem FITC-konjugierten Ziege α -Maus-IgM $F(ab')_2$ -Fragment (1:100) detektiert. (A) Einzelexpression von $pT/L_{\text{Flag-EBOV-Reston}}$ ① und $pT/L_{\text{1Flag-EBOV-Reston}}$ ②. (B) Koexpression von $pT/L_{\text{Flag-EBOV-Reston}}$, $pT/VP35_{\text{EBOV-Reston}}$ und $pT/NP_{\text{EBOV-Reston}}$ ③ und von $pT/L_{\text{1Flag-EBOV-Reston}}$, $pT/VP35_{\text{EBOV-Reston}}$ und $pT/NP_{\text{EBOV-Reston}}$ ④. (C) MVA-T7-infizierte HeLa-Zellen ⑤, HeLa-Zellen ohne Infektion ⑥.

Die EBOV-Zaire-Positivkontrollen wurden auf ähnliche Weise wie beim EBOV-Reston durchgeführt. So ist bei Einzelexpression der Polymerase EBOV-Zaire- L_{Flag} eine homogene Verteilung des Proteins in der Zelle zu beobachten (Abb. 40, Bild ①). Bei Kotransfektion mit Plasmiden, die für VP35-Zaire und NP-Zaire kodieren, war das L-Zaire nun in den Einschlusskörpern lokalisiert. Das bedeutet, dass auch hier das L-Protein eine Interaktion mit VP35 eingeht.

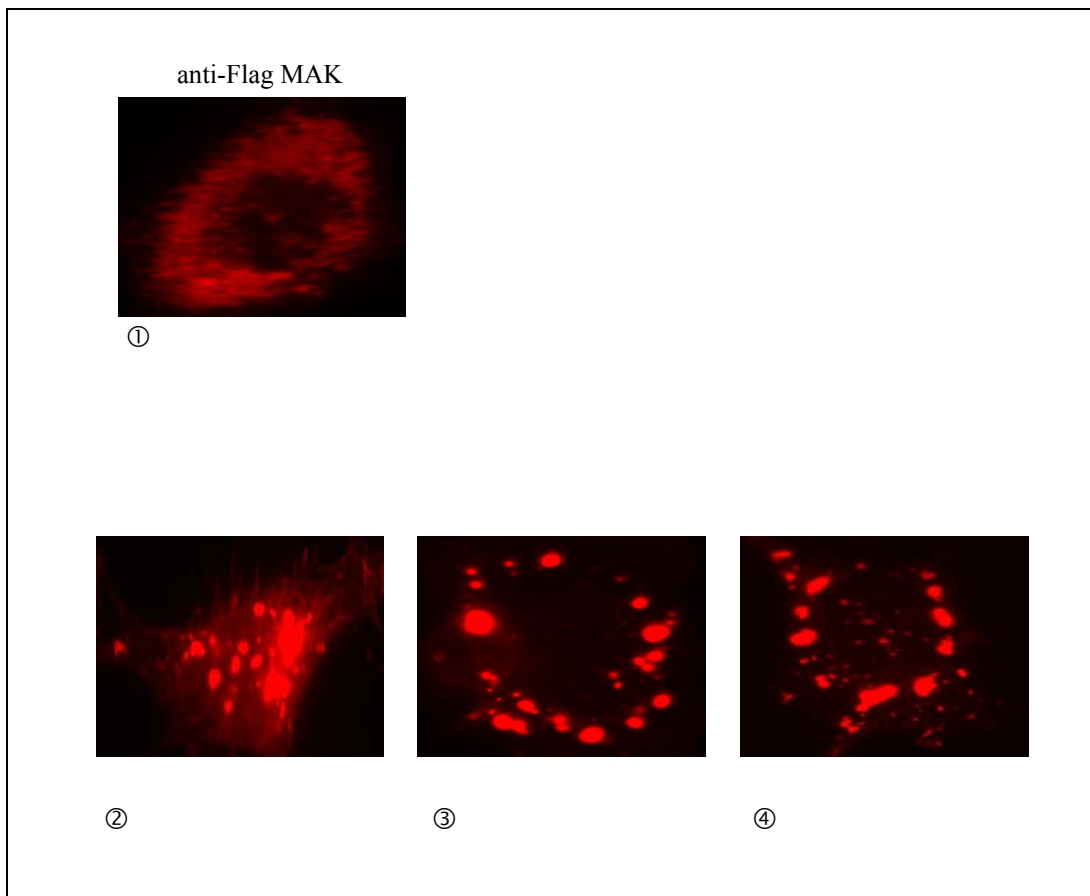


Abbildung 40: Untersuchung zu Wechselwirkung zwischen L_{Zaire} und $VP35_{\text{Zaire}}$.

HeLa-Zellen, auf Deckgläsern kultiviert, wurden mit MVA-T7 infiziert und mit $pT/L_{\text{Flag-EBOV-Zaire}}$ ($1\mu\text{g}$), $pT/VP35_{\text{EBOV-Zaire}}$ ($0,5\mu\text{g}$) und $pT/NP_{\text{EBOV-Zaire}}$ ($1\mu\text{g}$), kotransfiziert. 8h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzanalyse mit einem monoklonalen Flag-Antikörper unterzogen. Gebundene Antikörper wurden mit einem Rhodamin-konjugierten Ziege α -Maus-IgG Antikörper (1:100) detektiert. Einzelexpression von $pT/L_{\text{Flag-EBOV-Zaire}}$ ①. Koexpression von $pT/L_{\text{Flag-EBOV-Zaire}}$, $pT/VP35_{\text{EBOV-Zaire}}$ und $pT/NP_{\text{EBOV-Zaire}}$ ②. MVA-T7-infizierte HeLa-Zellen ③, HeLa-Zellen ohne Infektion ④.

Nachdem nun geklärt war, dass die L-Proteine beider EBOV-Subtypen mit VP35 eine Interaktion eingehen, wurde nun das L-Protein von EBOV-Reston mit dem VP35 und NP von EBOV-Zaire koexprimiert. In Abbildung 41 ist dargestellt, dass sowohl die N-terminale Deletionsmutante $L_{1\text{Flag-Reston}}$ als auch das vollständige Protein $L_{\text{Flag-Reston}}$ von VP35-Zaire in die NP-Zaire-spezifischen Einschlusskörper dirigiert werden. Daraus

kann geschlossen werden, dass L-Reston und VP35-Zaire miteinander interagieren und dass die fehlende Funktion bei Replikation und Transkription nicht auf eine fehlende Wechselwirkung zurückzuführen ist.

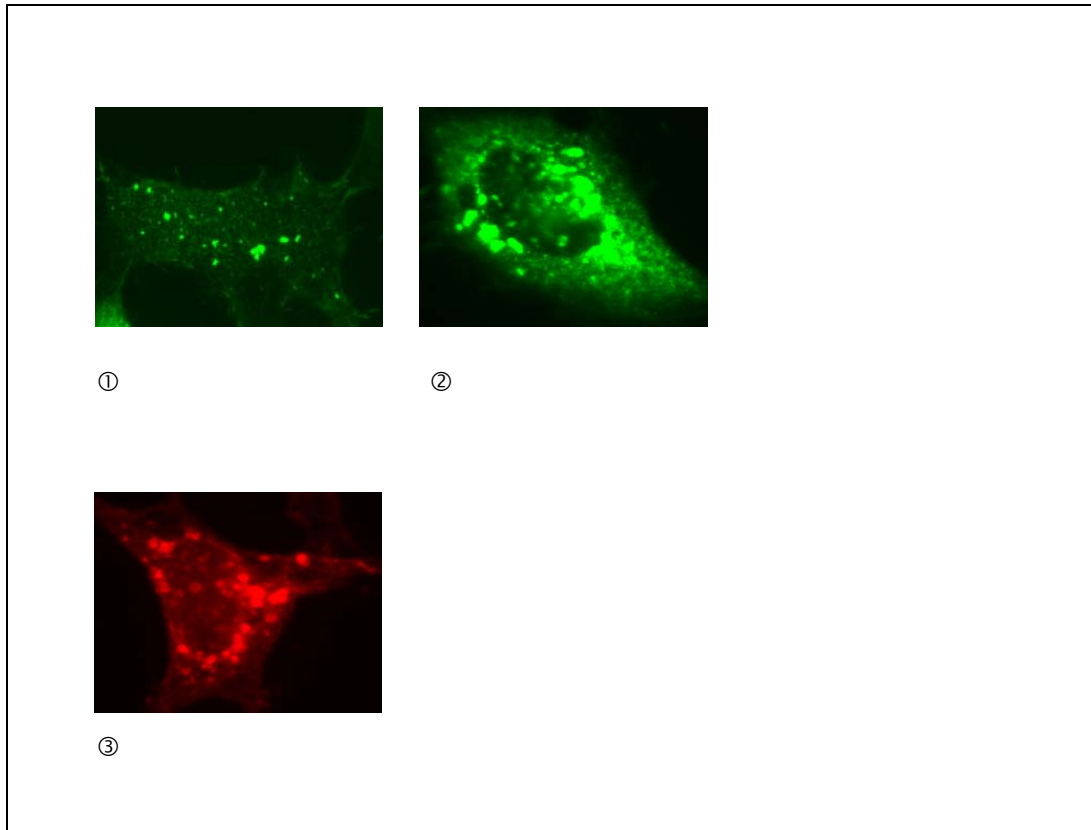


Abbildung 41: Untersuchung zu Wechselwirkung zwischen L_{Reston} und $VP35_{\text{Zaire}}$.

Hela-Zellen, auf Deckgläsern kultiviert, wurden mit MVA-T7 infiziert und mit $pT/L_{\text{Flag-EBOV-Reston}}$ bzw. $-L_{\text{Flag-EBOV-Reston}}$ ($1\mu\text{g}$), $pT/VP35_{\text{EBOV-Zaire}}$ ($0,5\mu\text{g}$) und $pT/NP_{\text{EBOV-Zaire}}$ ($1\mu\text{g}$), kotransfiziert. 8h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und einer Immunfluoreszenzanalyse mit einem monoklonalen Flag-Antikörper unterzogen. Gebundene Antikörper wurden mit einem FITC-konjugierten Ziege α -Maus-IgM $F(ab')_2$ -Fragment (1:100) oder einem Rhodamin-konjugierten Ziege α -Maus-IgG Antikörper (1:100) detektiert. Koexpression von $pT/L_{\text{Flag-EBOV-Reston}}$, $pT/VP35_{\text{EBOV-Zaire}}$ und $pT/NP_{\text{EBOV-Zaire}}$. ① und ②. Koexpression von $pT/L_{\text{Flag-EBOV-Reston}}$, $pT/VP35_{\text{EBOV-Zaire}}$ und $pT/NP_{\text{EBOV-Zaire}}$. ③

4.12 Untersuchung regulatorischer Elemente auf dem EBOV-Zaire-Genom

Im zweiten Teil dieser Arbeit geht es um die Untersuchung regulatorischer Elemente auf dem Genom des EBOV-Zaire. Dies betrifft die hochkonservierten Transkriptionsstart- und -stoppsignale sowie die Rolle, die die verschiedenen intergenischen Regionen bei der Transkription spielen.

Eine Besonderheit des EBOV-Zaire-VP24-Gens ist der Besitz von 2 Stoppsignalen, die durch 11 Nukleotide voneinander getrennt sind (Abb. 42). Das Ziel dieser Versuchsreihe war es herauszufinden, ob beide Stoppsignale funktionsfähig sind und wenn ja, welches tatsächlich verwendet wird.

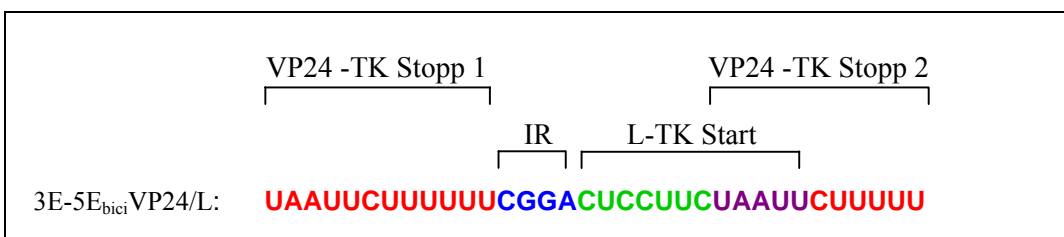


Abbildung 42: Teilsequenz des VP24-Gens des EBOV-Zaire.

TK: Transkription, IR: intergenische Region, **UAAUU**: überlappendes Pentamer
rot: Transkriptionsstoppsignal, grün: Transkriptionsstartsignal
blau: intergenische Region.

4.12.1 Herstellung von VP24-Stoppsignal-Mutanten

Mittels in vitro-Mutagenese sollten Mutanten erzeugt werden, in denen jeweils eines der Stoppsignale mutiert vorlag. Als Ausgangsprodukt wurde hier das bicistronische Minigenom 3E-5E_{bici}VP24/L verwendet. Zwei Reportergene, Δ CAT und CAT, umschließen die intergenische Region VP24/L. Das erste Gen des bicistronischen Minigenoms wird vom Transkriptionsstartsignal des EBOV-Zaire-NP-Gens flankiert, das zweite Gen vom Transkriptionsstoppsignal des L-Gens (Abb.43). Mittels Mutagenese (2.4.1) wurden zwei Minigenome hergestellt, in denen jeweils eines der Stoppsignale mutiert wurde, so dass nur noch ein funktionsfähiges Stoppsignal vorhanden war. Die Primer #667 und #668 dienten zur Herstellung der Mutante 1 (Stopp I mutiert), die Primer #669 und #670 zur Herstellung der Mutante 2 (Stopp II mutiert).

Eine genaue Darstellung der originalen und mutierten intergenischen Region ist Abbildung 44 zu entnehmen.

Bei einem funktionsfähigen VP24-Transkriptionsstoppsignal müssten bei der Transkription zwei monocistronische mRNA-Banden nachzuweisen sein (Abb.43, mRNA₁ und mRNA₂). Bei einer Zerstörung des Stoppsignals hingegen wäre zu erwarten, dass der Polymerasekomplex die Synthese von mRNA₁ nicht abschließen und folglich die

Transkription von mRNA₂ nicht initiieren könnte. Die Folge wäre die Generierung einer bicistronischen read-through mRNA (Abb. 43). Da sich die verschiedenen mRNAs in ihrer Länge unterscheiden, können sie im Northern Blot-Verfahren voneinander differenziert werden.

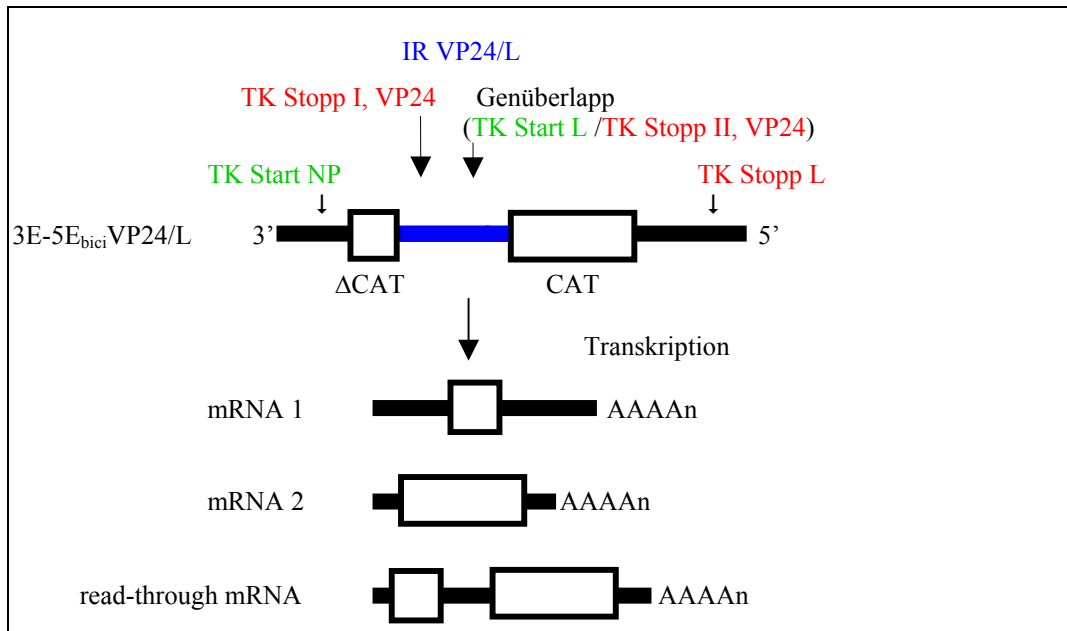


Abbildung 43: EBOV-Zaire spezifisches bicistronisches Minigenom 3E-5E_{bici}VP24/L.

Darstellung des Minigenoms in Negativstrang-Orientierung.

mRNA₁, mRNA₂: erwartete mRNA-Spezies bei intaktem VP24-Stoppsignal
read-through mRNA: erwartete mRNA-Spezies bei zerstörtem VP24 Stoppsignal

— Leader, Trailer, — intergenische Region (IR).

□ verkürztes CAT-Gen, □ CAT-Gen

rot: Transkriptionsstoppsignal, grün: Transkriptionsstartsignal.

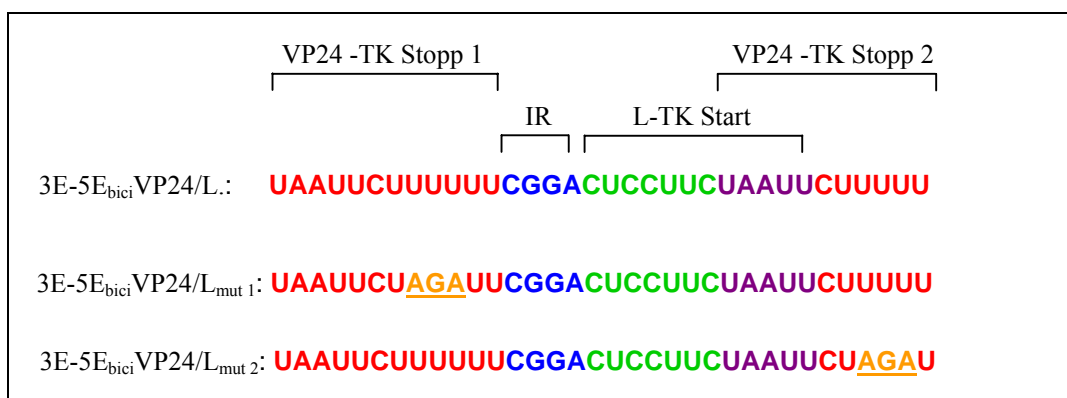


Abbildung 44: Mutation der intergenischen Region VP24/L, vRNA Orientierung.

3E-5E_{bici}VP24/L: Originalsequenz

3E-5E_{bici}VP24/L_{mut 1}: Mutante 1 mit eingeführter Mutation in Stopp I

3E-5E_{bici}VP24/L_{mut 2}: Mutante 2 mit eingeführter Mutation in Stopp II

AGA: eingeführte Mutation, TK: Transkription, IR: intergenische Region

UAAUU: überlappendes Pentamer, blau: intergenische Region.

rot: Transkriptionsstoppsignal, grün: Transkriptionsstartsignal

4.12.2 Transkription der VP24-Stopp-signal-Mutanten

Die im Abschnitt 4.12.1 beschriebenen mutierten Minigenome wurden nach dem Mutationsvorgang im EBOV-Zaire spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem auf ihr Transkriptionsverhalten hin untersucht. Hierzu wurden in 6er-Zellkulturplatten ausgesäte HUH-T7 Zellen (Zelldichte ca. 70%) mittels Fugene 6-Transfection-Reagent mit den Plasmiden pT/NP_{EBOV-Zaire}, pT/VP35_{EBOV-Zaire}, pT/VP30_{EBOV-Zaire}, pT/L_{EBOV-Zaire} und den beiden mutierten Minigenomen transfiziert. Als Positivkontrolle wurde das bicistronische Minigenom mit der originalen intergenischen Region VP24/L des EBOV-Zaire-Genoms verwendet. In den Negativkontrollen „-L“ fehlte das Plasmid pT/L_{EBOV-Zaire}. Es wurden pro Ansatz je zwei Vertiefungen transfiziert. 40h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen, und die mRNA wurde isoliert (2.5.2.1). Die mRNAs wurden auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (2.6.2), auf eine positiv geladene Nylon-Membran geblottet (2.6.3) und 6h lang prähybridisiert (2.6.4). Anschließend wurde der Blot 12h mit der gegen die Reportergene Δ CAT und CAT gerichteten DIG-markierten RNA-Sonde hybridisiert (2.6.4). Abbildung 45 zeigt ein Bild des Blots nach Detektion der DIG-markierten RNA mit CDP-Star (2.6.5).

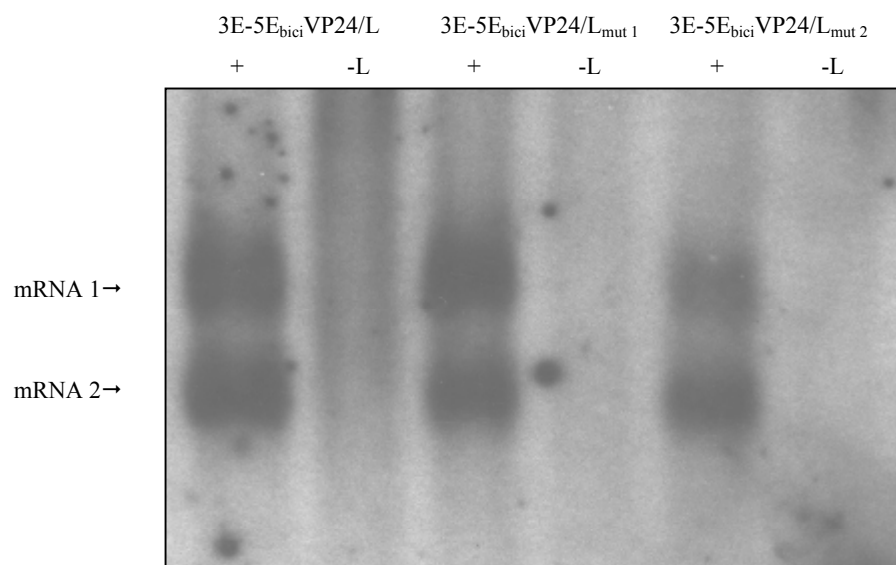


Abbildung 45: Northern-Blot-Analyse transkribierter mRNAs der Minigenome 3E-5E_{bici} VP24/L, 3E-5E_{bici}VP24/L_{mut 1} und 3E-5E_{bici}VP24/L_{mut 2}.

HUH-T7-Zellen wurden in 6er Zellkulturplatten kultiviert und mittels Fugene-6-Transfection-Reagent mit pT/NP_{EBOV-Zaire}, pT/VP35_{EBOV-Zaire}, pT/VP30_{EBOV-Zaire}, pT/L_{EBOV-Zaire} (fehlt bei der Negativkontrolle) sowie mit 1µg des jeweiligen bicistronischen Minigenoms transfiziert. Pro Mutante wurden zwei Schälchen transfiziert. 40h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die transkribierter mRNAs mit Hilfe von Oligo(dT)-Zellulose isoliert. Nach Aufreinigung und Fällung wurden die mRNAs auf einem denaturierenden 1,5%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und anschließend einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Es folgte eine sechsstündige Prähybridisierung, an die sich eine zwölfstündige Hybridisierung mit 5 µl der DIG-markierten, negativ-strängigen RNA-Sonde BS/(-)CAT (pBluescript/-CAT) anschloss. Die Pfeile verweisen auf die spezifischen Banden transkribierter (+)-strängiger mRNA.

Die Ergebnisse der mRNA-Analyse zeigen deutlich, dass beide Transkriptionsstoppsignale funktionsfähig sind, da sowohl bei der Mutante 3E-5E_{bici}VP24/L_{mut 1} als auch bei der Mutante 3E-5E_{bici}VP24/L_{mut 2} zwei mRNA Banden detektiert werden. Read-through-mRNA konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

4.12.3 Bestimmung des verwendeten Stoppsignals

Um herauszufinden, welches der beiden Stoppsignale im authentischen System von der viralen Polymerase verwendet wird, wurden HUH-T7-Zellen mit EBOV-Zaire infiziert und 40 h nach der Infektion die zelluläre RNA isoliert. Mit dieser RNA wurde ein 3'RACE mit einem VP24-genspezifischen Primer (#1149) und einem oligo-dT-spezifischen Primer (#115) durchgeführt, um das 3'-Ende der VP24-mRNA zu kartieren. Nach der RT-PCR wurde das PCR-Produkt gelgereinigt und in den pCR[®]II-Topo[®] der Firma Stratagene kloniert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mittels pCR[®]II-Topo[®]-spezifischer Vorwärts- und Rückwärtssequenzierprimer sequenziert (Anhang).

Es wurden 13 Klone sequenziert. Bei allen Klonen wurde das erste Transkriptionsstoppsignal als Polyadenylierungssignal verwendet (Abb. 46).

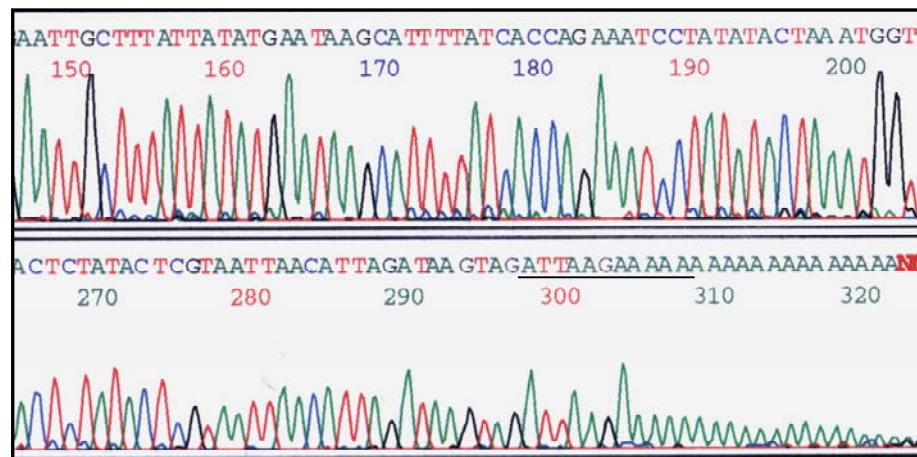


Abbildung 46: Direkte Sequenzierung des PCR-Produkts der VP24-mRNA.
Das Transkriptionsstoppsignal 1 des VP24-Gens ist unterstrichen.

4.13 Untersuchung zur Spezifität der Transkriptionssignale

EBOV und MBGV, die einzigen Mitglieder der Familie Filoviridae, weisen viele Ähnlichkeiten bezüglich Pathogenese, Struktur und Genomaufbau auf. Das negativsträngige RNA-Genom beider Viren umfasst 7 Gene und jedes davon ist von hochkonservierten Transkriptionsstart- und stoppsignalen flankiert, die sich zwischen EBOV und MBGV geringfügig unterscheiden (4.2.4; 4.2.5). An den Genomenden sind Leader und Trailer lokalisiert, die die Replikations- und Transkriptionspromotoren enthalten. Trotz der signifikanten Ähnlichkeiten im Genomaufbau beider Viren werden EBOV-spezifische Minigenome nicht als Substrat für Replikation und Transkription von MBGV-Nukleokapsidproteinen akzeptiert und umgekehrt.

Um herauszufinden, welche Bereiche der Transkriptionsstartsignale für eine virus-spezifische Transkription relevant sind, wurden in MBGV-spezifische mono- und bicistronische Minigenome die Transkriptionsstartsignale und intergenischen Regionen durch EBOV-spezifische ausgetauscht. Der Aufbau der mono- und bicistronischen Minigenome ist Abbildung 47 zu entnehmen.

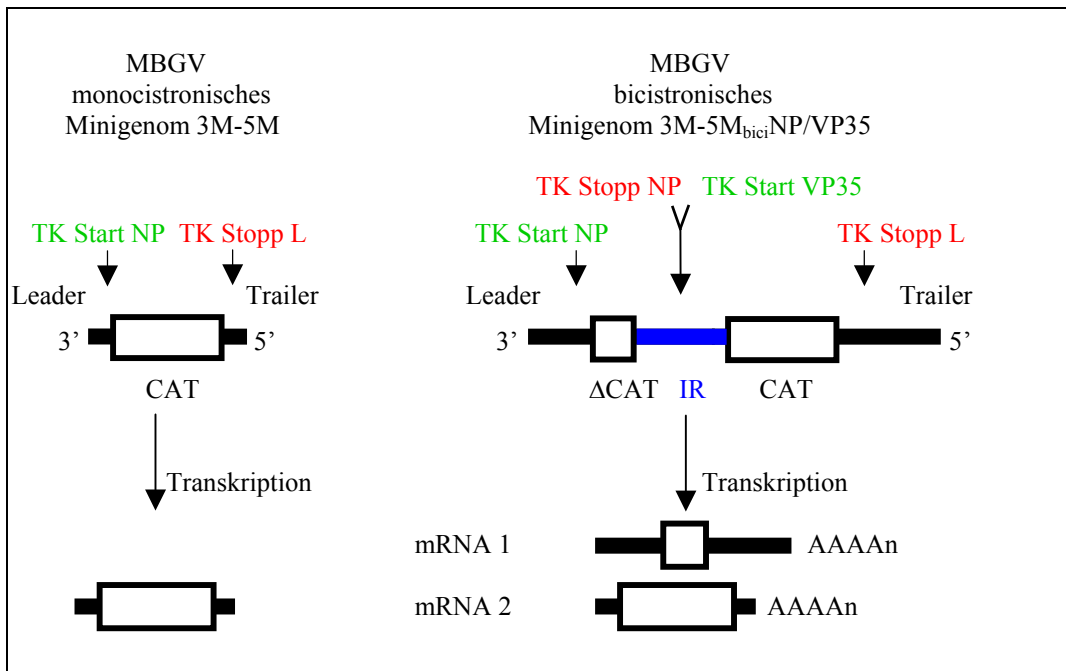


Abbildung 47: MBGV-spezifische mono- und bicistronische Minigenome.

Das monocistronische Minigenom besteht aus dem Leader und Trailer des MBGV-Genoms und dem CAT-Gen als Reporter gen.

Das erste Gen des bicistronischen Minigenoms wird vom Transkriptionsstart- und -stoppsignal des NP-Gens flankiert, das zweite Gen vom Transkriptionsstartsignal des VP35-Gens und vom Transkriptionsstoppsignal des L-Gens.

— Leader, Trailer, — intergenische Region IR.

□ verkürztes CAT-Gen, □ CAT-Gen.

rot: Transkriptionsstoppsignal, grün: Transkriptionsstartsignal

blau: intergenische Region.

Das an die Leader-Region angrenzende Transkriptionsstartsignal wurde in einem MBGV-spezifischen monocistronischen Minigenom durch das Transkriptionsstartsignal des EBOV-spezifischen NP-Gens ausgetauscht. Die Abbildung 48 zeigt die Transkriptionsstartsignale des originalen und des mutierten Minigenoms.

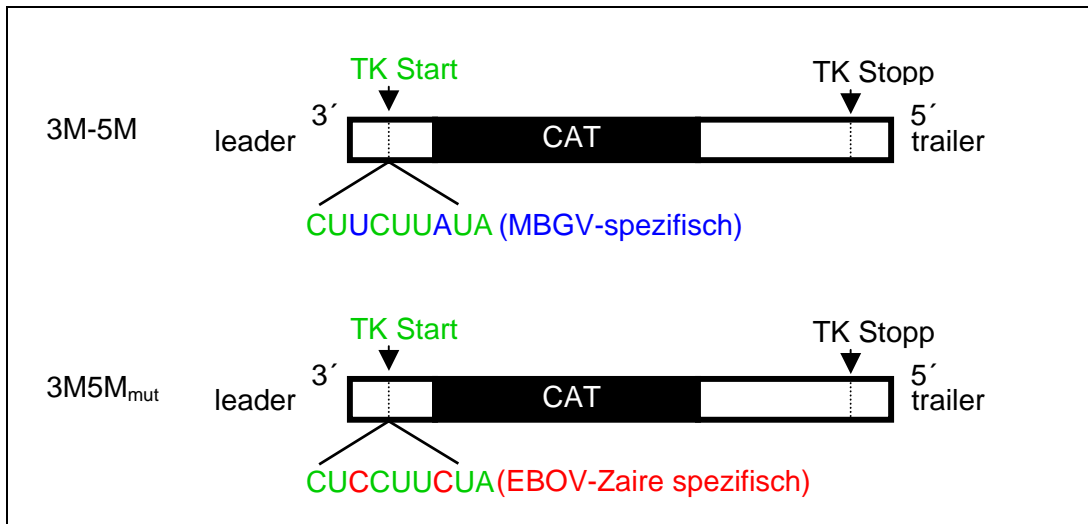


Abbildung 48: Austausch des MBGV-spezifischen Transkriptionsstartsignals durch das EBOV-spezifische, vRNA Orientierung.

3M-5M: monocistronisches MBGV-Minigenom

3M-5M_{mut}: mutiertes monocistronisches MBGV-Minigenom

Beide Minigenome wurden in einem MBGV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem daraufhin untersucht, ob sie als Substrat für Replikation und Transkription akzeptiert werden. Dazu wurden in 6er Zellkulturplatten HeLa-Zellen kultiviert, mit MVA-T7 infiziert und anschließend mit pT/NP_{MBGV} (0,1 µg), pT/VP35_{MBGV} (0,5 µg), pT/L_{MBGV} (1 µg) (fehlt bei der Negativkontrolle) sowie 1 µg des MBGV Minigenom-Plasmids, 3M-5M, transfiziert. Pro Mutante wurden zwei Schälchen transfiziert. 40h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die transkribierte mRNA bzw. die replizierte RNA isoliert. Nach Aufreinigung und Fällung wurde die RNA auf einem denaturierenden 1,5%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und anschließend einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Es folgte eine sechsstündige Prähybridisierung, an die sich eine zwölfstündige Hybridisierung mit 5 µl der DIG-markierten, negativ-strängigen RNA-Sonde BS/(-)CAT (pBluescript/-CAT) anschloss. Abbildung 49 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Es zeigte sich, dass der Austausch der Transkriptionsstartstelle keinen Einfluss auf die Replikation ausübte (Abb. 49, A). Das mutierte Minigenom wurde jedoch nicht transkribiert (Abb. 49, B). Das bedeutet, dass die Leader-proximale EBOV-spezifische Transkriptionsstelle vom Transkriptionskomplex des MBGV nicht erkannt wird.

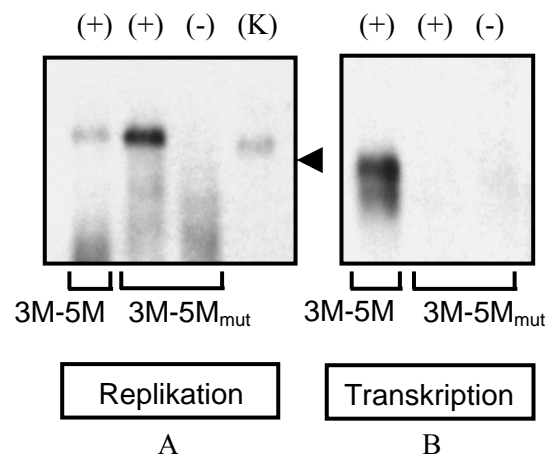


Abbildung 49: Replikation und Transkription des originalen und des mutierten MBGV-spezifischen Minigenoms.

HeLa-Zellen wurden in 6er Zellkulturplatten kultiviert und mittels der Lipofektin-Methode nach Infektion mit 100 μ l MVA-T7-Virus je Zellkulturschälchen mit den Plasmiden pT/NP_{MBGV}, pT/VP35_{MBGV}, pT/VP30_{MBGV}, pT/L_{MBGV} sowie je 1 μ g des Minigenom-Plasmids transfiziert. Pro Mutante wurden zwei Schälchen transfiziert. 40 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert (Poolen der Doppelansätze). (A) Die replizierte RNA wurde mit 3 U der Mikrokokken-Nuklease für 30 min bei 30°C inkubiert und isoliert. (B) Die transkribierter RNA wurden mit Hilfe von Oligo(dT)-Zellulose isoliert. Nach Aufreinigung und Fällung wurde die RNA auf einem denaturierenden 1,5%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und anschließend einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Es folgte eine sechsstündige Prähybridisierung, an die sich eine zwölfstündige Hybridisierung mit 5 μ l der DIG-markierten, negativsträngigen RNA-Sonde BS/(-)CAT (pBluescript/-CAT) anschloß. Die Pfeile verweisen auf die spezifischen Banden replizierter bzw. transkribierte (+)-strängiger RNA.

Den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen (-) wurde das Plasmid pT/L_{MBGV} nicht zugegeben. Den Transfektionsansätzen der Positivkontrolle (+) wurde den Plasmiden pT/NP_{MBGV}, pT/VP35_{MBGV}, pT/VP30_{MBGV}, pT/L_{MBGV} sowie je 1 μ g des Minigenom-Plasmids 3M-5M zugegeben. Als Hybridisierungskontrolle (K) wurde das (+)-strängige Plasmid 3M-5M(+) mitgeführt.

4.13.1 Klonierung Chimärer bicistronischer Minigenome

Um zu untersuchen, ob intern gelegene Transkriptionssignale spezifisch erkannt werden, wurden in einem MBGV-spezifischen bicistronischen Minigenom die intergenische Region sowie die intern gelegenen Transkriptionsstart- und -stoppsignale durch EBOV-spezifische Sequenzen ausgetauscht. Zwei Reportergene, Δ CAT und CAT, umschließen die jeweilige intergenische Region. Das erste Gen des bicistronischen Minigenoms wird vom Transkriptionsstartsignal des MBGV-NP-Gens flankiert, das zweite Gen vom Transkriptionsstoppsignal des MBGV-L-Gens (Abb. 50). In der Originalsequenz liegt die MBGV-spezifische intergenische Region NP/VP35 zwischen beiden Genen. Mittels der Restriktionsschnittstellen NdeI und NotI bzw. BglII und NotI wurden zwei chimäre Minigenome hergestellt, in denen die MBGV-spezifische intergenische Region durch die EBOV-spezifischen intergenischen Regionen NP/VP35 bzw. VP35/VP40 ausgetauscht wurden. Eine genaue Darstellung der originalen und chimären Minigenome ist Abbildung 50 zu entnehmen.

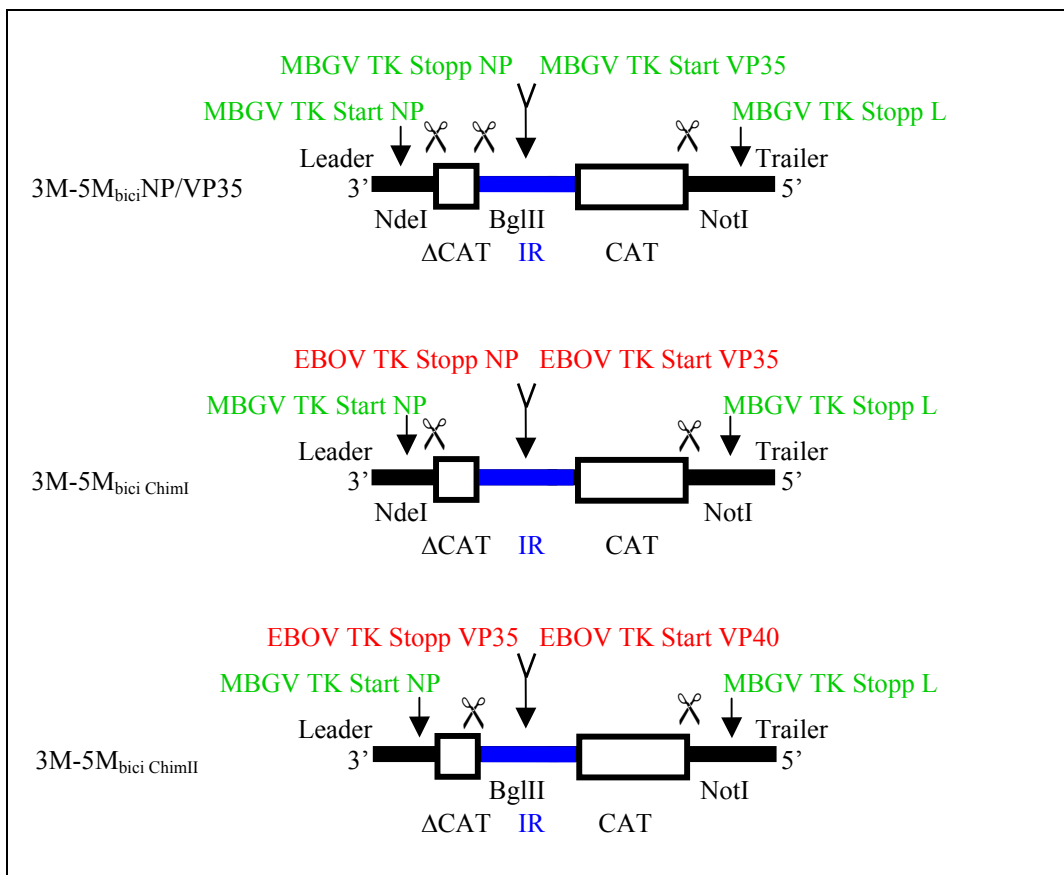


Abbildung 50: Original und Chimäre MBGV-spezifische bicistronische Minigenome.

3M-5M_{bici}NP/VP35: MBGV-spezifisches bicistronisches Minigenom mit originaler intergenischer Region (IR) NP/VP35. Das erste Gen des bicistronischen Minigenoms wird vom Transkriptionsstart- und -stoppsignal des NP-Gens flankiert, das zweite Gen vom Transkriptionsstartsignal des VP35-Gens und vom Transkriptionsstoppsignal des L-Gens.

3M-5M_{bici} ChimI: Intergenische Region (IR) NP/VP35 des EBOV

3M-5M_{bici} ChimII: Intergenische Region (IR) VP35/VP40 des EBOV.

— Leader, Trailer, — intergenische Region (IR).

□ verkürztes CAT-Gen, □ CAT-Gen. rot: Transkriptionsstopp- und startsignal des EBOV. grün: Transkriptionsstopp- und startsignal des MBGV

4.13.2 Replikation und Transkription der chimären Minigenome

Die im Abschnitt 4.13.1 beschriebenen chimären Minigenome 3M-5M_{ChimI} und 3M5M_{ChimII} wurden nach dem Mutationsvorgang im MBGV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem darauf hin untersucht, ob sie als Substrat für Replikation und Transkription akzeptiert werden. Hierzu wurden zwei 6er-Zellkulturplatten mit HeLa-Zellen (Zelldichte ca. 70%) mit rekombinantem Vaccinia-Virus MVA-T7 infiziert und pro Vertiefung mit den Plasmiden pT/NP_{MBGV}, pT/VP35_{MBGV}, pT/L_{MBGV} und der jeweiligen Minigenom-Plasmid-DNA transfiziert (2.8). Als Positivkontrolle wurde das MBGV-spezifische bicistronische Minigenom 3M-5M_{bici}NP/VP35 mit der originalen intergenischen Region NP/VP35 verwendet, während in den Negativkontrollen das pT/L_{MBGV}-Plasmid fehlte. Für die Isolierung der replizierten bzw. der transkribierten

RNA wurden pro Ansatz je zwei Zellkulturschälchen infiziert und transfiziert. Nach 40h post Transfektion wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die replizierte bzw. transkribierte RNA isoliert (2.5.2). Die RNAs wurden auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (2.6.2) und einer Northern-Hybridisierung unterzogen (2.6.3). Abbildung 51 zeigt ein Bild der Membranen nach Detektion der DIG-markierten RNA-Sonde mit CDP-Star (2.6.5). Es ist zu sehen, dass die chimären Minigenome sowohl repliziert als auch transkribiert wurden. Das bedeutet, dass der MBGV-Polymerasekomplex die EBOV-spezifischen Transkriptionssignale erkennt, wenn diese intern lokalisiert sind.

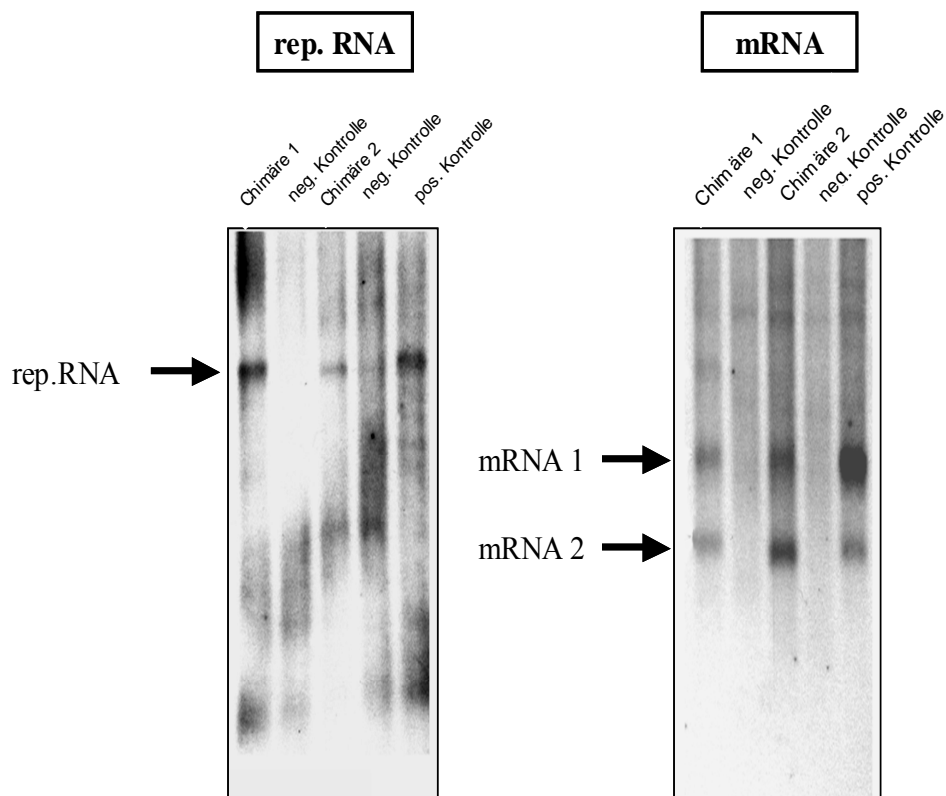


Abbildung 51: Northern-Blot-Analyse der replizierten und transkribierten RNA der originalen und mutierten Minigenome 3M-5M_{bici}, NP/VP35, 3M-5M_{bici} ChimI und 3M-5M_{bici} ChimII.

HeLa-Zellen wurden in 6er Zellkulturplatten kultiviert und mittels der Lipofektin-Methode nach Infektion mit 100µl MVA-T7-Virus je Zellkulturschälchen mit den Plasmiden pT/NP_{MBGV}, pT/VP35_{MBGV}, pT/L_{MBGV} sowie je 1 µg des Minigenom-Plasmids transfiziert. Pro Mutante wurden zwei Schälchen transfiziert. 40 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert (Poolen der Doppelansätze). Die replizierte RNA wurde mit 3 U der Mikrokokken-Nuklease für 30 min bei 30°C inkubiert und isoliert. Die transkribierte RNA wurden mit Hilfe von Oligo(dT)-Zellulose isoliert. Nach Aufreinigung und Fällung wurde die RNA auf einem denaturierenden 1,5%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und anschließend einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Es folgte eine sechsstündige Prähybridisierung, an die sich eine zwölfstündige Hybridisierung mit 5 µl der DIG-markierten, negativsträngigen RNA-Sonde BS/(-)CAT (pBluescript/-CAT) anschloß. Die Pfeile verweisen auf die spezifischen Banden replizierter bzw. transkribierter (+)-strängiger RNA.

Den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen (-) wurde das Plasmid pT/L_{MBGV} nicht zugegeben. Den Transfektionsansätzen der Positivkontrolle (+) wurde den Plasmiden pT/NP_{MBGV}, pT/VP35_{MBGV}, pT/L_{MBGV} sowie je 1 µg des Minigenom-Plasmids 3M-5M zugegeben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Austausch von transkriptionsrelevanten Signalen im Leaderbereich zum Verlust der Transkriptionsaktivität führt, während der Austausch interner Signale im Bereich der intergenischen Regionen toleriert wird. Dies weist darauf hin, dass die Spezifität der Transkription ausschließlich von Signalen determiniert wird, die im Leaderbereich lokalisiert sind.

4.14 Untersuchung der intergenischen Regionen des EBOV-Zaire

Ein weiterer essentieller Punkt, der im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet wurde, war der Einfluss der intergenischen Regionen auf die Transkriptionsaktivität der Polymerase. Es sollte dabei untersucht werden, inwieweit intergenische Regionen und Genüberlappungen die Erkennung der konservierten Transkriptionsstart- und -stoppsignale beeinflussen.

Zwischen Leader und Trailer sind 7 Gene angeordnet (Abb. 10), welche an ihren Enden von hochkonservierten Transkriptionsstart- und -stoppsignalen flankiert werden. Die Gene sind meistens durch kurze intergenische Basenfolgen voneinander getrennt sog. intergenische Regionen (IR) (Abb. 52) oder überlappen sich im Bereich ihrer Start- und Stoppsignale in einem hoch konservierten Pentamer 3'-UAAUU-5', das bei allen Filoviren zu finden ist (Abb. 52). Bei den Genüberlappungen befindet sich das Startsignal des stromabwärts gelegenen Gens vor dem Stoppsignal des stromaufwärts gelegenen Gens. So bildet das Pentamer gleichzeitig das Ende des Startsignals und den Anfang des Stoppsignals. Die Abbildung 52 zeigt zwei der unterschiedlich strukturierten intergenischen Regionen, die zwischen dem NP- und VP35-Gen bzw. dem VP35- und VP40-Gen des EBOV-Zaire-Genoms lokalisiert sind. Diese beiden Regionen wurden verwendet, um die Unterschiede zwischen den beiden Typen der intergenischen Regionen zu untersuchen.

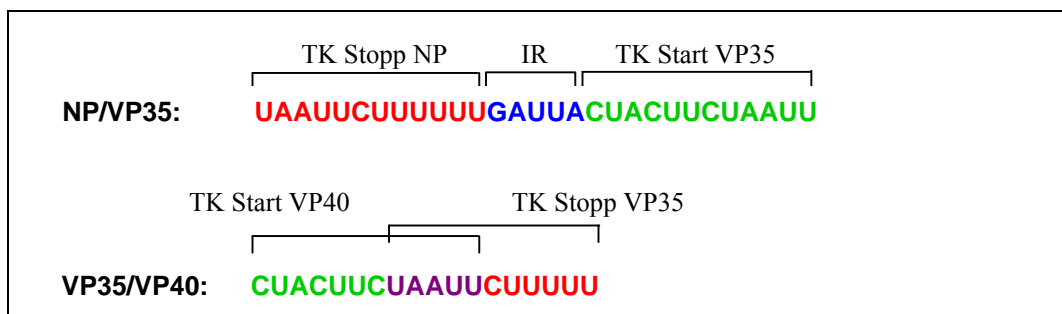


Abbildung 52: Intergenische Regionen des EBOV-Zaire Genoms, vRNA-Orientierung.

Das Transkriptionsstoppsignal des NP- und das Transkriptionsstartsignal des VP35-Gens sind durch eine intergenische Region von 5 Nukleotiden voneinander separiert. Das Transkriptionsstartsignal des VP40- und das Transkriptionsstoppsignal des VP35-Gens überlappen einander. Dabei wird ein konserviertes Pentamer (UAAUU) von beiden Signalen genutzt.

rot: Transkriptionsstoppsignal, grün: Transkriptionsstartsignal,
blau: intergenische Region, **UAAUU**: überlappendes Pentamer.

Als Ausgangsprodukt für die Untersuchung wurde ein bicistronisches EBOV-spezifisches Minigenom verwendet. Zwei Reportergene, Δ CAT und CAT, umschließen die intergenische Region NP/VP35 bzw. VP35/VP40. Das erste Gen des bicistronischen Minigenoms wird vom Transkriptionsstartsignal des EBOV-Zaire NP-Gens flankiert, das zweite Gen vom Transkriptionsstoppsignal des L-Gens (Abb. 53). Mittels Mutagenese

(2.4) wurden unterschiedliche Minigenome hergestellt, wie der Abbildung 54 zu entnehmen ist. Abhängig davon, ob Transkriptionsstart- und -stoppsignal beachtet werden, entstehen als Transkriptionsprodukte nur die erste mRNA, die erste und die zweite mRNA oder eine read-through mRNA (Abb. 53).

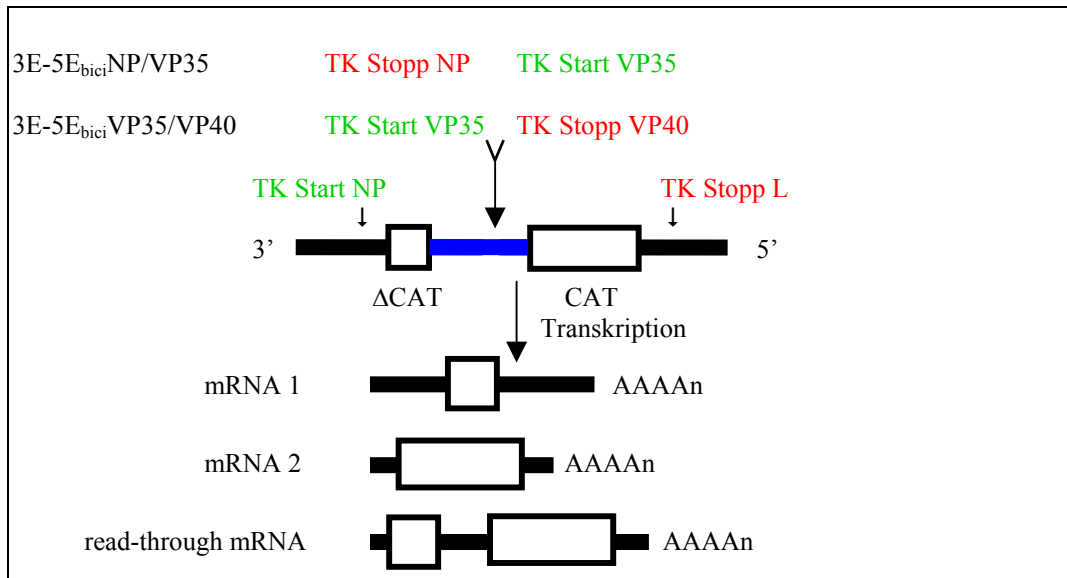


Abbildung 53: EBOV-Zaire spezifische bicistronische Minigenome 3E-5E_{bici} NP/VP35 und 3E-5E_{bici} VP35/VP40.

Darstellung des Minigenoms in Negativstrang-Orientierung.

mRNA₁, mRNA₂: erwartete mRNA-Spezies bei Erkennung der Transkriptionsstart- und -stoppsignale.

read-through mRNA: erwartete mRNA-Spezies bei Missachtung des Transkriptionsstoppsignals.

— Leader, Trailer, — intergenische Region (IR).

□ verkürztes CAT-Gen, □ CAT-Gen

rot: Transkriptionsstoppsignal, grün: Transkriptionsstartsignal.

4.14.1 Untersuchung der EBOV-Zaire NP/VP35 intergenischen Region

Die erste intergenische Region des EBOV-Zaire Genoms besteht aus fünf Nukleotiden, welche das Transkriptionsstoppsignal des NP-Gens vom Transkriptionsstartsignal des VP35-Gens trennen. Um die Frage zu beantworten, inwieweit die Transkriptionssignale von den fünf intergenischen Nukleotiden beeinflusst werden, wurden drei mutierte Minigenome hergestellt. Die Mutante 3E-5E_{bici}NP/VP35_{A1} zeigt mit der intergenischen Region 3'-CAGUU-5' drei Austausche im Vergleich zu der originalen Sequenz 3'-GAUUA-5'. Mit zwei weiteren Austauschen besitzt die Mutante 3E-5E_{bici}NP/VP35_{A2} eine komplette mutierte intergenische Region. Die Sequenz lautet 3'-CCGGU-5'. Deletionen an der ersten und fünften Stelle bei der Mutante 3E-5E_{bici}NP/VP35_B reduzieren die intergenische Region von fünf Nukleotiden auf drei. Bei der Mutante 3E-5E_{bici}NP/VP35_C wurde die gesamte intergenische Region deletiert, so dass das Transkriptionsstoppsignal des NP-Gens direkt an das Transkriptionsstartsignal des

VP35-Gens angrenzt. Die Primer #1213 und #1214 dienten zur Herstellung der Mutante 3E-5E_{bici}NP/VP35_{A1}, die Primer #1215 und #1216 zur Herstellung der Mutante 3E-5E_{bici}NP/VP35_{A2}, die Primer #1217 und #1218 zur Herstellung der Mutante 3E-5E_{bici}NP/VP35_B und die Primer #1219 und #1220 zur Herstellung der Mutante 3E-5E_{bici}NP/VP35_C. Die Sequenzen der originalen und mutierten intergenischen Region sind in Abbildung 54 dargestellt.

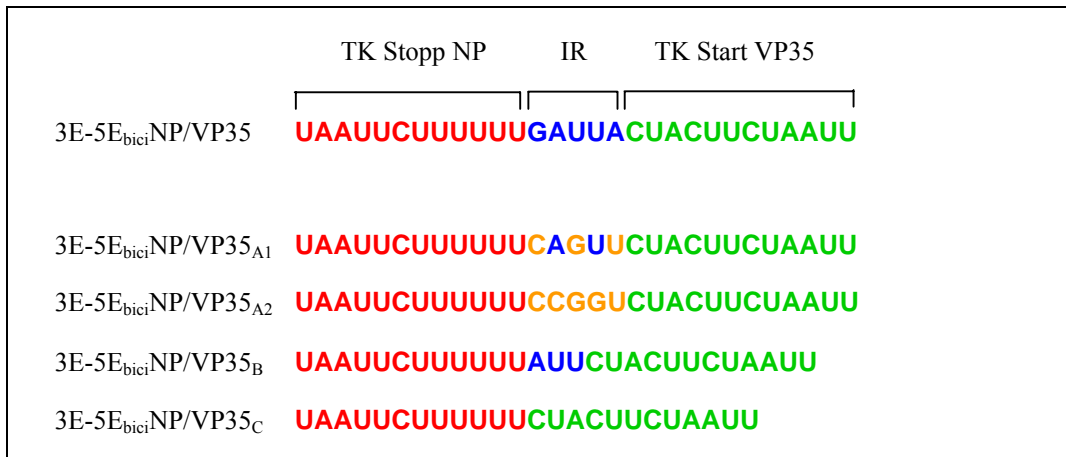


Abbildung 54: Originale und mutierte intergenische Region NP/VP35, vRNA-Orientierung.

3E-5E_{bici}NP/VP35: Originalsequenz
 3E-5E_{bici}NP/VP35_{A1}: partieller Austausch der intergenischen Region
 3E-5E_{bici}NP/VP35_{A2}: kompletter Austausch der intergenischen Region
 3E-5E_{bici}NP/VP35_B: Deletion des ersten und letzten Nukleotids der intergenischen Region
 3E-5E_{bici}NP/VP35_C: komplette Deletion der intergenischen Region
 rot: Transkriptionsstoppsignal, grün: Transkriptionsstartsignal
 blau: intergenische Region, gelb: eingeführte Mutation

Die beschriebenen mutierten Minigenome wurden nach der Mutagenese im EBOV-Zaire-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem untersucht. Hierzu wurde eine 6er-Zellkulturplatte mit HUH-T7-Zellen (Zelldichte ca. 70%) mittels Fugene-6-Transfection-Reagent mit den Plasmiden pT/NP_{EBOV-Zaire}, pT/VP35_{EBOV-Zaire}, pT/VP30_{EBOV-Zaire}, pT/L_{EBOV-Zaire} und den in Abbildung 54 aufgeführten Minigenomen transfiziert (2.8). Die Transfektionsansätze (-) dienten als Negativkontrollen, das Plasmid pT/L_{EBOV-Zaire} wurde hier nicht zugegeben. Nach einer zweitägigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen lysiert und 1µl des Zelllysats im CAT-Assay zum Nachweis der CAT-Aktivität eingesetzt. Die nachgewiesene CAT-Aktivität ist in diesem System ein Indikator für die Transkription des zweiten Gens. Die Transkription des ersten Gens lässt sich über einen CAT-Assay nicht nachweisen, da im ersten Gen das CAT-Gen zerstört ist. In Abbildung 55 ist gezeigt, dass weder Nukleotidaustausche noch Deletionen innerhalb der intergenischen Region zu einem dramatischen Aktivitätsverlust bezüglich der Transkription führten.

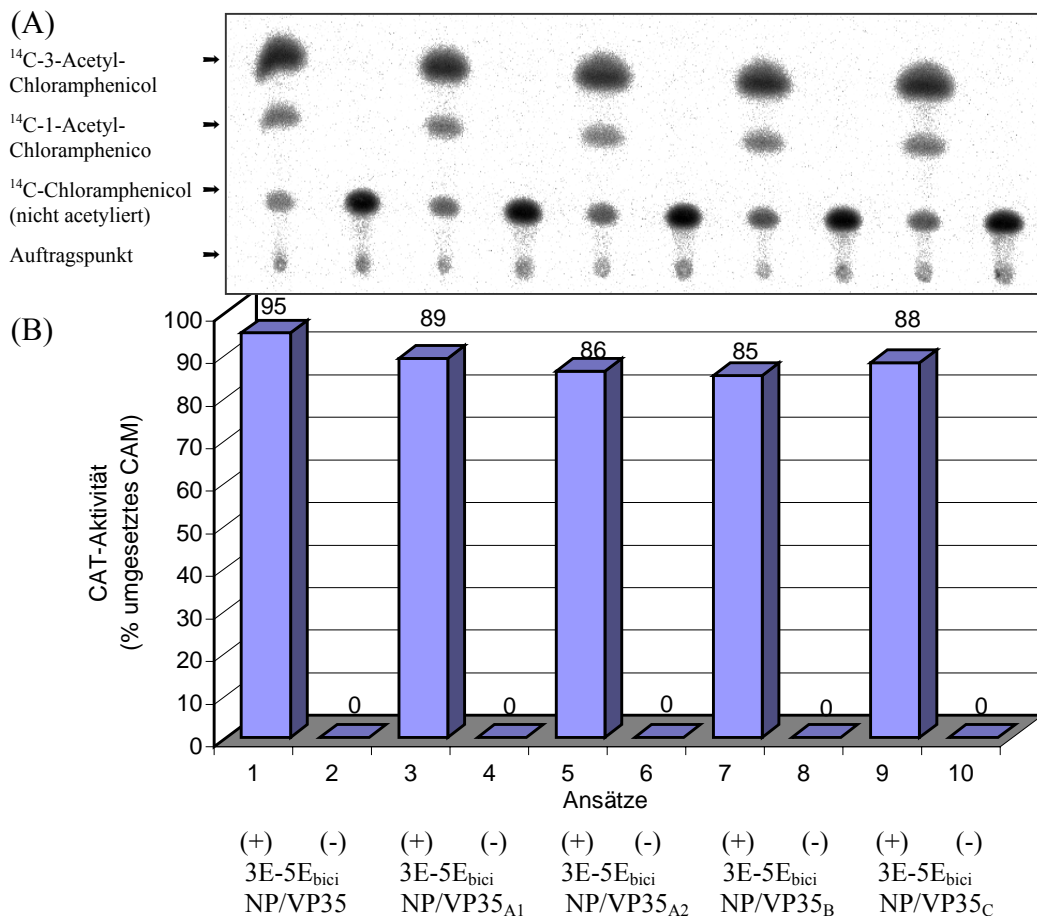


Abbildung 55: Graphische Darstellung der CAT-Aktivität der EBOV-Zaire-spezifischen bicistronischen Minigenome 3E-5E_{bici} NP/VP35, 3E-5E_{bici}NP/VP35_{A1}, 3E-5E_{bici}NP/VP35_{A2}, 3E-5E_{bici} NP/VP35_B und 3E-5E_{bici}NP/VP35_C.

(A) 40-60% konfluente BSR-T7/5-Zellen wurden mit dem jeweiligen DNA-Transfektionsansatz transfiziert. Die Zellen wurden nach 2 Tagen lysiert und die CAT-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt. Für jeden Ansatz wurde 1 µl des Zelllysats eingesetzt. Nach dem Dünnschichtchromatographie-Lauf wurde eine Bio-Imager-Platte 2h lang exponiert und anschließend ausgewertet.

(B) Graphische Darstellung der CAT-Aktivität. Der Anteil an umgesetztem ¹⁴C-Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz ($[\text{Produkt}:(\text{Produkt}+\text{Edukt})] \cdot 100$) berechnet.

Den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen (-) wurde das Plasmid pT/L_{EBOV} nicht zugegeben. Den Transfektionsansätzen der Positivkontrolle (+) wurde den Plasmiden pT/NP_{EBOV}, pT/VP35_{EBOV}, pT/VP30_{EBOV}, pT/L_{EBOV} sowie je 1 µg des jeweiligen Minigenom-Plasmids zugegeben. Die Abbildung 55 ist repräsentativ für eine Versuchsreihe.

4.14.2 Untersuchung der EBOV-Zaire VP35/VP40 intergenischen Region

Die zweite intergenische Region des EBOV-Zaire-Genoms bildet eine Genüberlappung (1.2.2). Um hier die Fragen beantworten zu können, inwieweit sich die beiden Transkriptionssignale innerhalb der Genüberlappung beeinflussen, wenn das eine oder das andere durch Mutation entfernt wurde, und ob die Polymerase in der Lage ist, die Transkriptionssignale noch zu erkennen, wenn sie durch die Insertion einer künstlichen intergenischen Region voneinander getrennt werden, wurden folgende mutierten

Minigenome hergestellt. Die Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₁ zeigt drei Mutationen im VP40-Transkriptionsstartsignal, so dass dieses für die Polymerase nicht mehr erkennbar ist. Bei der Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₂ wurde das VP35-Transkriptionsstoppsignal mutiert. Bei diesen beiden Mutanten wurden die Mutationen so eingeführt, dass das Pentamer 3'-UAAUU-5' im nicht-mutierten Transkriptionssignal erhalten blieb. Mit einer Insertion von 10 Nukleotiden wurden das Transkriptionsstopp- und -startsignal in Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₃ voneinander separiert. Dies führte dazu, dass das Transkriptionsstartsignal des zweiten Gens stromaufwärts des Transkriptionsstoppsignals des ersten Gens zu liegen kam. Die Primer #1221 und #1222 dienten zur Herstellung der Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₁, die Primer #1223 und #1224 zur Herstellung der Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₂ und die Primer #1225 und #1226 zur Herstellung der Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₃. Die Sequenzen der originalen und mutierten Minigenome sind in Abbildung 56 dargestellt.

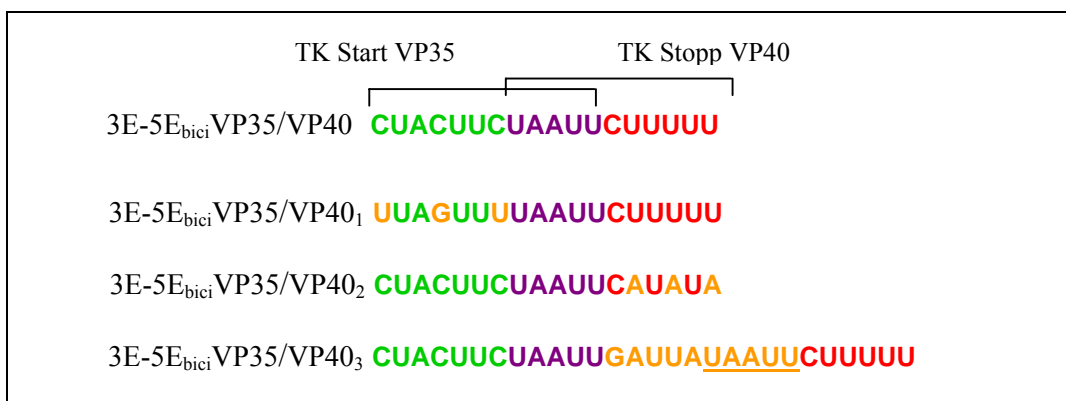


Abbildung 56: Originale und mutierte intergenische Region VP35/VP40, vRNA-Orientierung.

3E-5E_{bici}VP35/VP40: Originalsequenz

3E-5E_{bici}VP35/VP40₁: Mutation innerhalb des Transkriptionsstartsignals

3E-5E_{bici}VP35/VP40₂: Mutation innerhalb des Transkriptionsstoppsignals

3E-5E_{bici}VP35/VP40₃: Herstellung einer künstlichen intergenischen Region

rot Transkriptionsstoppsignal, grün Transkriptionsstartsignal

UAAUU: überlappendes Pentamer, gelb: eingeführte Mutation mit zusätzlichem Pentamer.

Die beschriebenen drei mutierten Minigenome wurden nach der Mutagenese im EBOV-Zaire-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem untersucht. Hierzu wurde eine 6er-Zellkulturplatte mit HUH-T7 Zellen (Zelldichte ca. 70%) mittels Fugene 6-Transfection-Reagent und Plasmiden transfiziert wie es unter 4.14.1 beschrieben ist. Die Transfektionsansätze „-“, denen das Plasmid pT/L_{EBOV-Zaire} nicht zugegeben wurde, dienten wiederum als Negativkontrollen. Nach einer zweitägigen Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen lysiert und 1µl des Zelllysats im CAT-Assay zum Nachweis der CAT-Aktivität eingesetzt (Abb. 57A). Die Intensität der Signale wurde mittels des Programmes PC-BAS 2.09 ausgewertet und über das Programm Microsoft Excel

graphisch dargestellt (Abb. 57B).

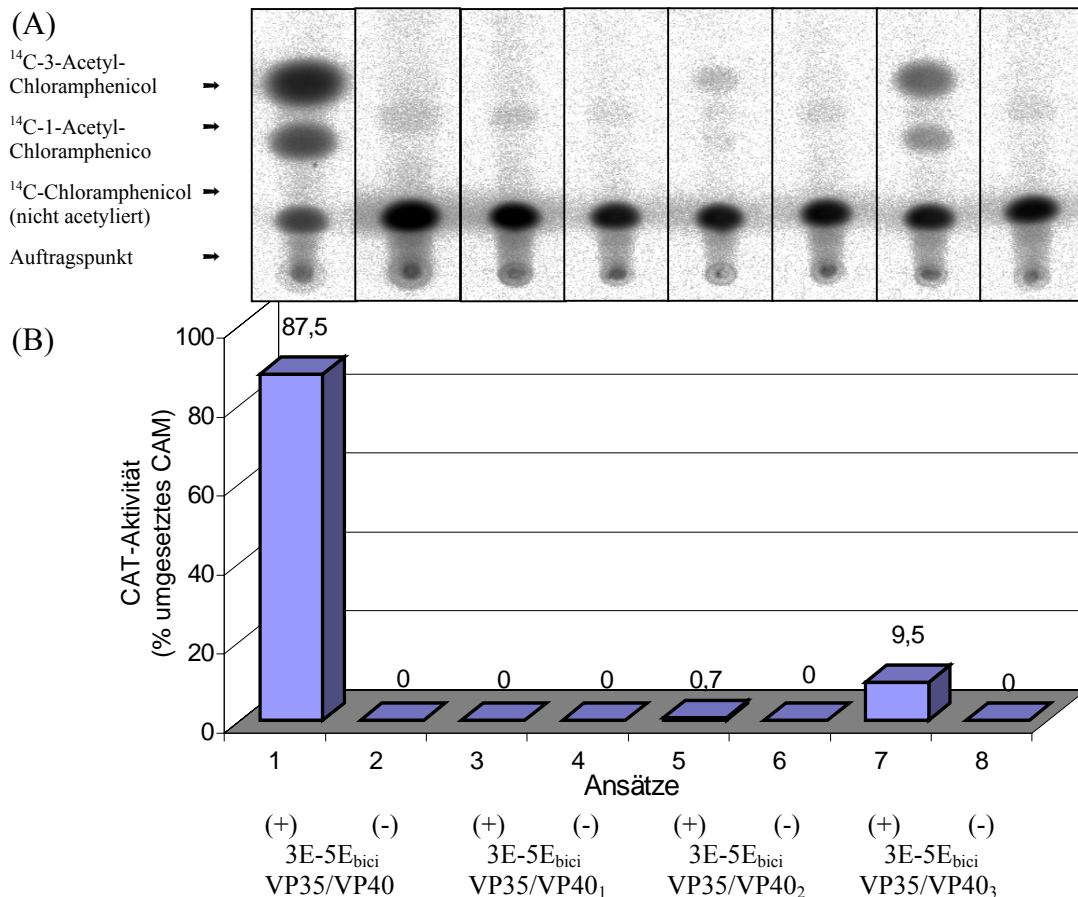


Abbildung 57: Graphische Darstellung der CAT-Aktivität der EBOV-Zaire-spezifischen bicistronischen Minigenome 3E-5E_{bici}VP35/VP40, 3E-5E_{bici}VP35/VP40₁, 3E-5E_{bici}VP35/VP40₂ und 3E-5E_{bici}VP35/VP40₃.

(A) 40-60% konfluente BSR-T7/5-Zellen wurden mit dem jeweiligen DNA-Transfektionsansatz transfiziert. Die Zellen wurden nach 2 Tagen lysiert und die CAT-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt. Für jeden Ansatz wurde 1 µl des Zelllysats eingesetzt. Nach dem Dünnschichtchromatographie-Lauf wurde eine Bio-Imager-Platte 2h lang exponiert und anschließend ausgewertet.

(B) Graphische Darstellung der CAT-Aktivität. Der Anteil an umgesetztem ¹⁴C-Chloramphenicol wurde mit der Software PC-BAS 2.09 bestimmt und als prozentualer Umsatz ($[\text{Produkt}:(\text{Produkt}+\text{Edukt})] \cdot 100$) berechnet.

Den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen (-) wurde das Plasmid pT/L_{EBOV} nicht zugegeben. Den Transfektionsansätzen der Positivkontrolle (+) wurde den Plasmiden pT/NP_{EBOV}, pT/VP35_{EBOV}, pT/VP30_{EBOV}, pT/L_{EBOV} sowie je 1 µg des jeweiligen Minigenom-Plasmids zugegeben. Die Abbildung 57 ist repräsentativ für eine Versuchsreihe.

Wie bereits erwähnt, reflektiert die CAT-Aktivität nur die Transkription des zweiten Gens. Die Abbildung 57 zeigt, dass bei der Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₁, bei der das Transkriptionsstartsignal des zweiten Gens zerstört wurde, keine CAT-Aktivität nachzuweisen war. Das heißt, dass das zweite Gen nicht transkribiert wurde. Die Zerstörung des Transkriptionsstoppsignals des ersten Gens in Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₂ führte zu einer dramatischen Reduktion der CAT-Aktivität auf 0,7%. Das heißt, dass eine effiziente Transkription des zweiten Gens nur dann

gewährleistet ist, wenn die Transkription des ersten Gens korrekt terminiert wurde. Überraschenderweise war die Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₃, bei der durch die Insertion von zehn Nukleotiden die Transkriptionssignale voneinander getrennt und in umgekehrter Reihenfolge zu liegen kamen, transkriptionsaktiv. Allerdings war die Transkription des zweiten Gens im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant reduziert (Abb. 57, Spur 7). Auf die Besonderheit dieses Ergebnisses wird im Diskussionsteil näher eingegangen. Da mittels des CAT-Assays nur die Transkription des zweiten Gens gezeigt werden konnte, wurden die im Kapitel 4.14.2 beschriebenen bicistronischen Minigenome, 3E-5E_{bici}VP35/VP40, 3E-5E_{bici}VP35/VP40₁, 3E-5E_{bici}VP35/VP40₂ und 3E-5E_{bici}VP35/VP40₃, im EBOV-Zaire-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystem transkribiert und anschließend die synthetisierten mRNA-Spezies mittels Northern-Hybridisierung nachgewiesen. Dafür wurde eine 6er-Zellkulturplatte mit HUH-T7-Zellen (Zelldichte ca. 70%) mittels Fugene 6-Transfection-Reagent mit pT/NP_{EBOV-Zaire}, pT/VP35_{EBOV-Zaire}, pT/VP30_{EBOV-Zaire}, pT/L_{EBOV-Zaire} und den oben genannten bicistronischen Minigenomen transfiziert (2.8). Die Transfektionsansätze „-L“ dienten als Negativkontrollen. Für die Isolierung der mRNA wurde pro Ansatz je eine Vertiefung transfiziert. 40h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die mRNAs mit Hilfe von Oligo(dT)-Zellulose isoliert (2.5.2.1). Die mRNAs wurden auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt (2.6.2), auf eine positiv geladene Nylon-Membran gebロットet (2.6.3) und 6h lang prähybridisiert (2.6.4). Anschließend wurde der Blot 12h mit der DIG-markierten, negativsträngigen RNA-Sonde BS/(-)CAT (pBluescript/-CAT) hybridisiert (2.6.4). Abbildung 58 zeigt ein Bild des Blots nach Detektion der DIG-markierten RNA mit CDP-Star (2.6.5).

Bei korrekter Transkription beider Gene entstehen zwei mRNAs, mRNA₁ und mRNA₂, die bei dem nicht-mutierten Minigenom 3E-5E_{bici}VP35/VP40 nachgewiesen werden konnten (Abb. 58, Spur 1). Bei der Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₁ bei welcher das Transkriptions-startsignal des zweiten Gens zerstört, das Transkriptionsstoppsignal des ersten Gens jedoch erhalten war, wurde nur das erste Gen effizient transkribiert. Dies zeigt, dass trotz der Überlappung der Transkriptionssignale die Transkription des ersten Gens unabhängig vom überlappenden Startsignal des folgenden Gens korrekt terminiert werden kann. Da die Transkription des zweiten Gens wegen des mutierten Startsignals nicht initiiert werden konnte, wurde mRNA₂ nicht synthetisiert (Abb. 58, Spur 2). Dies ist auch der Grund, warum sich Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₁ im CAT-Assay als negativ erwies (Abb. 57, Spur 3). Bei Mutante 3E-5E_{bici}VP35/VP40₂ bei der das Transkriptionsstoppsignal des ersten Gens mutiert wurde und das Transkriptionsstartsignal des zweiten

Gens intakt war, konnte keine der beiden monocistronischen mRNAs nachgewiesen werden. Es wurde jedoch eine „read-through“- mRNA synthetisiert, bei deren Synthese das Transkriptionssignal in der intergenischen Region überlesen wurde (Abb. 53 und 58, Spur 3). Die read-through m-RNA ergab ein sehr schwaches Signal im CAT-Assay (Abb. 57, Spur 5). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch bei einem intakten zweiten Transkriptionsstartsignal die Transkription des zweiten Gens nur dann initiiert werden kann, wenn die Transkription des ersten Gens abgeschlossen wurde. Das bedeutet, dass die Transkriptionsinitiation stromabwärts liegender Gene von der korrekten Transkriptionstermination stromaufwärts liegender Gene abhängt.

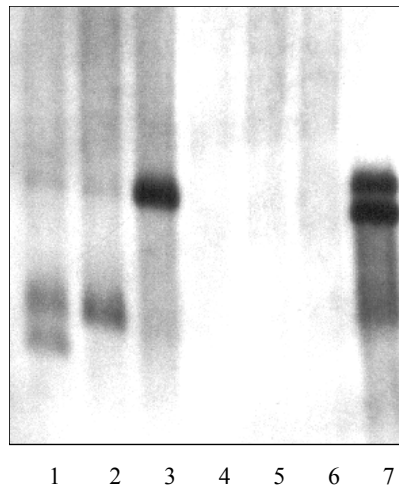


Abbildung 58: Northern-Blot-Analyse der transkribierten mRNAs der EBOV-Zaire-spezifischen bicistronischen Minigenome 3E-5E_{bici}VP35/VP40, 3E-5E_{bici}VP35/VP40₁ und 3E-5E_{bici}VP35/VP40₂.

HUH-T7-Zellen wurden in 6er Zellkulturplatten kultiviert und mittels der Fugene-6-Transfection-Reagent mit pT/NP_{EBOV-Zaire}, pT/VP35_{EBOV-Zaire}, pT/VP30_{EBOV-Zaire}, pT/L_{EBOV-Zaire} sowie 1 µg des jeweiligen EBOV-Zaire-spezifischen bicistronischen Minigenoms, transfiziert. Pro Mutante wurde ein Schälchen transfiziert. 40h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die transkribierten mRNAs mit Hilfe von Oligo(dT)-Zellulose isoliert. Nach Aufreinigung und Fällung wurden die mRNAs auf einem denaturierenden 1,5%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und anschließend einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Es folgte eine sechsstündige Prähybridisierung, an die sich eine zwölfstündige Hybridisierung mit 5 µl der DIG-markierten, negativ-strängigen RNA-Sonde BS/(-)CAT (pBluescript/-CAT) anschloss. Die Pfeile verweisen auf die spezifischen Banden transkribierter (+)-strängiger RNA.

Den Transfektionsansätzen der Negativkontrollen (-) wurde das Plasmid pT/L_{EBOV} nicht zugegeben. Den Transfektionsansätzen der Positivkontrolle (+) wurde den Plasmiden pT/NP_{EBOV}, pT/VP35_{EBOV}, pT/VP30_{EBOV}, pT/L_{EBOV} sowie je 1 µg Minigenom-Plasmids zugegeben. Als Hybridisierungskontrolle wurde das (+)-strängige Plasmid 3E-5E(+) mitgeführt.

Ansatz 1: 3E-5E_{bici}VP35/VP40 (+)

Ansatz 2: 3E-5E_{bici}VP35/VP40₁ (+)

Ansatz 3: 3E-5E_{bici}VP35/VP40₂ (+)

Ansatz 4: 3E-5E_{bici}VP35/VP40 (-)

Ansatz 5: 3E-5E_{bici}VP35/VP40₁ (-)

Ansatz 6: 3E-5E_{bici}VP35/VP40₂ (-)

Ansatz 7: Hybridisierungskontrolle

5. Diskussion

Über das EBOV-Reston ist bis heute sehr wenig bekannt. EBOV-Reston wurde erstmals 1989 aus philippinischen Affen in den Vereinigten Staaten isoliert. Die infizierten Affen, *Macacca fascicularis*, stammten aus der Nähe von Manila und waren von den Philippinen in die USA exportiert worden (Jahrling et al., 1990). Obwohl das EBOV-Reston in Affen ein schweres hämorrhagisches Fieber hervorruft, wurden noch keine menschlichen Todesfälle mit EBOV-Reston als Krankheitsursache gemeldet. Trotzdem unterliegt dieses Virus denselben strengen Sicherheitsmaßnahmen wie das hochpathogene EBOV-Zaire.

Ziel dieser Arbeit war, das EBOV-Reston näher zu charakterisieren. Dazu wurde das gesamte EBOV-Reston-Genom sequenziert, ein EBOV-Reston-Minigenomsystem etabliert und chimäre Minigenome von EBOV-Zaire und EBOV-Reston untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden für die Transkription relevante regulatorische Elemente auf den Genomen von EBOV-Zaire und MBGV untersucht.

5.1 Sequenzierung des EBOV-Reston-Genoms und Vergleich mit EBOV-Zaire und MBGV

Da zu Beginn dieser Arbeit nur die Sequenz des Glykoprotein-Gens des EBOV-Reston publiziert war (Sanchez et al., 1998), musste zunächst dessen vollständiges Genom sequenziert werden.

Aus der Sequenzierung ergab sich, dass das Reston-Virus ebenfalls sieben Gene besitzt, deren Anordnung den Genomen von EBOV-Zaire und MBGV-Musoke entspricht (Groseth et al., 2002). Die Homologie zum EBOV-Zaire-Genom beträgt 60%, wohingegen Sequenzvergleiche mit dem MBGV-Musoke-Genom nur eine Übereinstimmung von 38 % ergaben. Die zur Initiation der Transkription und Replikation erforderlichen Leader- und Trailer-Regionen sind ebenfalls zwischen EBOV-Zaire und EBOV-Reston höher konserviert (Leader 87%, Trailer 74%), als zwischen EBOV-Reston und MBGV (Leader 64%, Trailer 59%).

Weitere Vergleiche zwischen den Transkriptionsstart- und -stoppsignalen der einzelnen Gene von EBOV-Reston, EBOV-Zaire und MBGV zeigten eine sehr hohe Übereinstimmung und ein konserviertes Pentamer mit der Nukleinsäureabfolge UAAUU. Beim Vergleich der intergenischen Regionen ergaben sich keine Homologien.

Mittlerweile liegen zwei Veröffentlichungen über die genomische Sequenz des EBOV-Reston vor. Im Vergleich zu der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Sequenz des Isolats

Pennsylvania zeigt die veröffentlichte Sequenz des Isolats Philippine 1996 von T. Ikegami et al. (2001) eine Homologie von 98,5%, wobei die größten Unterschiede im Leader- und Trailer-Bereich liegen. Die von Groseth et al. (2002) veröffentlichte Sequenz, die ebenfalls anhand des Isolats Pennsylvania ermittelt wurde, weist dagegen eine Homologie von 99,7 % auf. Das bedeutet dass die verschiedenen EBOV-Reston-Isolate geringe Sequenzabweichungen aufweisen.

5.2 Etablierung eines EBOV-Reston spezifischen Minigenom-Systems

Um Replikations- und Transkriptionsstudien mit EBOV-Reston durchführen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein auf dem T7-RNA-Polymerase-Expressionssystem basierendes Replikationssystem für EBOV-Reston (Isolat: Pennsylvania) etabliert werden. Ähnliche Replikationsassays wurden schon für Rhabdo- und Paramyxoviren beschrieben (Conzelmann, 1996; Roberts and Rose, 1998), und für MBGV und EBOV-Zaire existieren ebenfalls vergleichbare Systeme (Mühlberger et al. 1998; 1999).

Die Aktivität des EBOV-Reston-Replikationssystems wurde über Reporterexpression gemessen. Für eine effiziente Reporteraktivität im EBOV-Reston-Minigenomsystem wurden vier Nukleokapsidproteine benötigt, NP, VP35, L und VP30. Bei Abwesenheit von NP, VP35 und L konnte keine CAT-Aktivität gemessen werden, bei Abwesenheit von VP30 eine stark reduzierte.

Zur Untersuchung der optimalen EBOV-Reston-Plasmidmengen mit maximaler Reporterexpression wurde eine systematische Titration der Plasmid-DNA durchgeführt. Dazu wurde jeweils die Menge eines der Plasmide sukzessiv erhöht, während die eingesetzte Menge der anderen Plasmide konstant gehalten wurde. Aus den einzelnen Titrationen ergab sich für NP ein Maximum an CAT-Aktivität bei 1 µg, für VP35 bei 500 ng, für VP30 bei 500 ng und für L bei 2 µg eingesetzter Plasmid-DNA. Eine weitere Erhöhung der eingesetzten DNA-Menge führte in allen Fällen zu einer starken Abnahme der CAT-Aktivität. Im Gegensatz zu früheren Beobachtungen in einem Respiratorischen Syncytial-Virus (RSV)- oder EBOV-Zaire-Replikationssystem, in dem ein Plasmid-Verhältnis von N (NP) zu P (VP35) bei 1:1 als optimal beschrieben wurde (Großfeld et al., 1995; Mühlberger et al., 1999), liegt das Verhältnis der Plasmidmengen im EBOV-Reston-Minigenomsystem für maximale Reporteraktivität bei 2:1 für NP zu VP35.

Obwohl das VP35 des EBOV im Gegensatz zu den P-Proteinen der Rhabdo- und Paramyxoviren nicht phosphoryliert ist (Elliot et al., 1985), scheint es dieselbe Funktion

wie die P-Proteine auszuüben. Wie die P-Proteine wird auch das VP35 des EBOV-Reston vom zweiten Gen kodiert und ist Bestandteil des Nukleokapsidkomplexes.

Das VP35 und L des EBOV-Zaire bilden den aktiven Polymerasekomplex (Mühlberger et al., 1999), und für das VP35 und L des MBGV konnte eine direkte Interaktion beider Proteine nachgewiesen werden (Becker et al., 1998).

Über das VP30 des EBOV-Reston ist noch sehr wenig bekannt. Das VP30 des EBOV-Zaire liegt in phosphorylierter Form vor (Elliott et al. 1985). Zwischen EBOV-Reston-VP30 und EBOV-Zaire-VP30 gibt es eine Homologie von 68,1% auf Aminosäureebene und eine hohe Konservierung der VP30-Phosphorylierungsstellen von EBOV-Zaire (Modrof et al., 2001, 2002; Modrof, 2002).

	29-31	42 44 46	52
EBOV-Zaire	RAR SSS RENYRGEYRQ SRSAS QVRVPTV FH		
EBOV-Reston	RSR SL S R DPNQVDRRQ SRSAS QIRV PN L FH		
	30-32	43 45 47	53

Abbildung 59: Nukleotid-Vergleich zwischen EBOV-Zaire und -Reston im Bereich der VP30-Phosphorylierungsstellen.

rot: Phosphorylierungsstelle bei EBOV-Zaire (Modrof et al., 2002).

blau: Homologie der EBOV-Zaire Phosphorylierungsstellen bei EBOV-Reston

Eine Titration des EBOV-Reston-VP30 im EBOV-Reston-Replikationssystem zeigte, dass VP30 schon in geringen Mengen (0,1 bzw. 0,5µg) eine Erhöhung der CAT-Aktivität bewirkte. Mit Hilfe eines Northern-Blots wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von VP30 sowohl das EBOV-Reston-Minigenom als auch das EBOV-Zaire-Minigenom transkribiert wurden. In Abwesenheit von VP30 konnte weder im EBOV-Reston- noch im EBOV-Zaire-System mRNA nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das VP30 des EBOV-Reston in gleicher Weise wie das VP30 des EBOV-Zaire als Transkriptionsaktivator wirkt (Mühlberger et al., 1999, Volchkov et al., 2001, Neumann et al., 2002). Für das VP30 des EBOV-Zaire wurde gezeigt, dass es als sehr früher Antiterminations-faktor unmittelbar nach der Transkriptionsinitiation fungiert, die Transkriptionselongation jedoch nicht beeinflusst (Weik et al., 2002).

Die einzigen anderen NNS-RNA-Viren, die ein Strukturprotein mit ähnlichen Charakteristika wie das EBOV-VP30 enthalten, gehören zu den Paramyxoviren. Das M2-1 Protein des RSV ist ebenfalls wie das VP30 ein viertes Nukleokapsid-assoziiertes Protein und wird im Genom ebenso stromabwärts des Glycoproteingens kodiert. Das M2-1 ist auch ein viraler Transkriptionsfaktor, ist aber in die Elongation und

Antitermination der viralen mRNA involviert (Kuo et al., 1996; Fearn and Collins, 1999). Für das MBGV-VP30 konnte bislang keine Funktion bei der Transkription nachgewiesen werden. Das MBGV-VP30 war in einem MBGV-spezifischen Minigenomsystem nicht notwendig zur Bildung monocistronischer Minigenom-RNA (Mühlberger et al., 1998). Die für die effiziente EBOV-Reston- und -Zaire-Transkription nötige Anwesenheit von VP30 scheint somit ein grundlegender Unterschied zwischen beiden Vertretern der Familie der Filoviridae zu sein. Auch für die meisten bisher untersuchten Rhabdo- und Paramyxoviren ist beschrieben, dass sowohl die Replikation als auch die Transkription von drei Nukleokapsidproteinen, N (NP), P (VP35) und L, katalysiert werden. Dies wurde beispielsweise für das Rabies-Virus, das vesiculäre Stomatitis-Virus (VSV) und das Masern-Virus beschrieben (Conzelmann und Schnell, 1994; Pattnaik et al., 1990; Yu et al., 1995; Radecke et al., 1995).

5.2.1 Austausch der Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Reston, EBOV-Zaire und MBGV

Nach Herstellung eines EBOV-Reston-spezifischen Minigenomsystems sollte untersucht werden, ob die Nukleokapsidproteine von EBOV-Zaire, -Reston und MBGV ihre Funktion auch in den jeweils anderen Replikationssystemen ausüben können.

Dazu wurden systematische Austausche der Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Reston, EBOV-Zaire und MBGV durchgeführt. Zunächst wurden Austausche zwischen EBOV-Reston und -Zaire durchgeführt. Es zeigte sich, dass bis auf die Kombination von Zaire-VP35 mit Reston-L das EBOV-Zaire-spezifische Replikationssystem durch Reston-spezifische Nukleokapsidproteine komplementiert werden konnte und umgekehrt. Dies bedeutet, dass sowohl das EBOV-Zaire-spezifische Minigenom vom Reston-spezifischen Polymerasekomplex als Matrize akzeptiert wird als auch, dass das Reston-spezifische Minigenom vom Zaire-spezifischen Polymerasekomplex als Matrize akzeptiert wird.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das VP35 von EBOV-Reston in der Lage ist, mit NP und L von EBOV-Zaire einen funktionellen Polymerasekomplex zu bilden, während die Kombination von Zaire-VP35 mit Reston-L zu keiner CAT-Aktivität mehr führte.

Für das MBGV-VP35 wurden Interaktionen zwischen NP-VP35, VP35-L und NP-VP35-L nachgewiesen (Becker et al., 1998). Dabei nimmt VP35 eine Brückenfunktion zwischen NP und L ein. Die Interaktion zwischen NP und VP35 ähnelt der Interaktion von N und P-Proteinen von Paramyxo-, Rhabdo- und Bornavirus (Davis et al., 1986;

Ryan and Portner, 1990; Huber et al., 1991; Horikami et al., 1992, Schwemmle et al., 1998).

Eine mögliche Interaktion zwischen Zaire-VP35 und Reston-L wurde mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Bei Einzelexpression der EBOV-L-Proteine zeigte sich eine homogene Verteilung in der Zelle. Koexpression von NP, VP35 und L von EBOV-Reston führte zu einer Kollokalisierung von L mit den von NP gebildeten Einschlusskörpern. Dies konnte auch für das L des EBOV-Zaire gezeigt werden nach Koexpression von NP, L und VP35 des EBOV-Zaire. Das VP35 bildet also auch hier vermutlich eine Verbindungsbrücke zwischen NP und L.

Wurde Reston-L mit Zaire-VP35 und Zaire-NP koexprimiert, kollokalisierte das Reston-L-Protein ebenfalls mit den NP-Einschlusskörpern von EBOV-Zaire.

Somit liegt die fehlende Polymeraseaktivität des Zaire-VP35 und Reston-L vermutlich nicht an einer fehlenden Interaktion beider Proteine, sondern an einer zu starken Bindung, welche zu Inaktivierung führt oder zu einer Konformationsänderung eines bzw. beider Proteine.

Der Austausch der Minigenomsystemkomponenten wurde auch für EBOV-Reston und MBGV durchgeführt. Jedoch konnte bei keiner der getesteten Kombinationen CAT-Aktivität nachgewiesen werden. Demnach können die EBOV-Reston-spezifischen Nukleokapsidproteine nicht die Funktion der MBGV-Nukleokapsidproteine im MBGV-Replikationssystem übernehmen und umgekehrt. Die Minigenome wurden ebenfalls nicht als Substrat von den Nukleokapsidproteinen des jeweils anderen Virus für Replikation und Transkription akzeptiert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Austausch der Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Zaire und MBGV (Mühlberger et al., 1999) sowie zwischen Sendai Virus und Parainfluenza Typ III (Curran and Kolakofsky 1991) gezeigt.

5.2.2 Untersuchung chimärer Minigenome von EBOV-Zaire und-Reston

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die meisten der Nukleokapsidproteine zwischen EBOV-Reston und –Zaire austauschbar sind, wurden auch die cis-aktiven Elemente, also Leader- und Trailerregionen zwischen den beiden Viren rekombiniert (3E-5R; 3R-5E).

Ähnliche Versuche wurden schon für EBOV-Zaire und MBGV durchgeführt (Mühlberger et al., 1999). Hier wurde beobachtet, dass ein chimäres Minigenom, das den Leader von EBOV-Zaire in Kombination mit dem Trailer des MBGV enthielt (3E-5M), von beiden Viren effizient repliziert und transkribiert wurde. Die Kombination des MBGV-

spezifischen Leaders mit dem EBOV-Zaire spezifischen Trailer (3M-5E) wurde dagegen von keinem der Viren toleriert.

Die Nukleokapsidproteine von EBOV-Reston sowie die von EBOV-Zaire konnten effizient beide chimäre Minigenome transkribieren. Interessanterweise wurde jedoch bei Einsatz der Reston-spezifischen Proteine mit beiden Minigenomen eine schwächere CAT-Aktivität nachgewiesen als bei Einsatz der Zaire-spezifischen Proteine.

Weiterhin lag die CAT-Aktivität insgesamt höher, wenn der Zaire-Leader vorlag. Replikation und/oder Transkription scheinen also effizienter abzulaufen, wenn die Leadersequenz des EBOV-Zaire eingesetzt wird. Dies weist darauf hin, dass EBOV-Zaire einen wesentlich stärkeren genomischen Replikations- und/oder Transkriptionspromotor besitzt als EBOV-Reston. Ein stärkerer Promotor könnte wiederum zu einer erhöhten RNA-Syntheserate und damit zu einem beschleunigten Replikationszyklus führen.

Dies wäre im Einklang mit der Beobachtung, dass der cytopathische Effekt von EBOV-Zaire-infizierten Zellen schon nach drei Tagen, bei EBOV-Reston jedoch erst nach acht Tagen zu beobachten ist.

5.3 Bestimmung des verwendeten VP24-Transkriptionsstoppsignals

Eine Besonderheit des EBOV-Zaire-VP24-Gens ist der Besitz von zwei Transkriptionsstoppsignalen. Dieses Phänomen wurde bisher noch für kein anderes Gen eines negativsträngigen RNA-Virus beschrieben.

Um die Frage zu klären, ob beide Stoppsignale funktionsfähig sind und wenn ja, welches der beiden Stoppsignale tatsächlich verwendet wird, wurde ein EBOV-Zaire-spezifisches bicistronisches Minigenom verwendet, welches zwischen den zwei monocistronischen Genen die VP24-Stoppsignale enthält. Mit Hilfe von Minigenom-Mutanten, die Mutationen im Bereich der VP24-Stoppsignale aufwiesen, konnte gezeigt werden, dass beide Stoppsignale im VP24-Gen funktionsfähig sind. Aus einer 3'-RACE-Analyse von mRNA, die aus EBOV-infizierten Zellen isoliert wurde, ging hervor, dass nur das erste Stoppsignal von der viralen Polymerase verwendet wird.

In Sequenzvergleichen von EBOV-Zaire mit EBOV-Reston ist das VP24 mit einer Homologie von 80% am höchsten konserviert (Groseth, et al. 2002). Jedoch besitzt das VP24-Gen von EBOV-Reston nur ein Transkriptionsstoppsignal welches der Sequenz des zweiten Stoppsignals von EBOV-Zaire entspricht (Sanchez et al. 1993).

Nähere Betrachtungen der Reston-Sequenz lassen vermuten, dass das erste Stoppsignal wie bei EBOV-Zaire ursprünglich vorhanden war und durch zwei Deletionen (Adenin) und zwei Mutationen (Guanin statt Adenin) im Poly-A-Schwanz zerstört wurde:

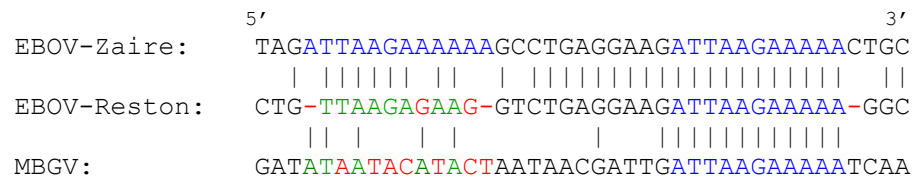


Abbildung 60: Nukleotid-Vergleich zwischen EBOV-Zaire, -Reston und MBGV im Bereich der VP24-Transkriptionsstoppsignale.

blau: Transkriptionsstoppsignale.

grün: homologe Nukleotide in den Sequenzen von EBOV-Reston und MBGV im Vergleich zu den Transkriptionsstoppsignalen des VP24-Gens des EBOV-Zaire

rot: Mutationen und Deletionen in den Sequenzen von EBOV-Reston und MBGV im Vergleich zu den Transkriptionsstoppsignalen des VP24-Gens des EBOV-Zaire

Untersucht man die Sequenz des VP24-Gens von MBGV findet man nur ein eindeutiges Stoppsignal und keine Reste eines zweiten ursprünglich vorhandenen Stoppsignals.

5.4 Spezifität der Transkriptionssignale von MBGV

EBOV-spezifische Minigenome werden nicht als Substrat für die Replikation/Transkription von den MBGV-Nukleokapsidproteinen akzeptiert und umgekehrt. Das heißt, dass die an den Genomenden lokalisierten Leader- und Trailersequenzen, die die Replikations- und Transkriptionspromotoren enthalten, eine virusspezifische Vermehrung gewährleisten. Erstaunlicherweise wurden aber chimäre Minigenome mit dem EBOV-Leader und MBGV-Trailer von beiden Viren enkapsidiert, repliziert und transkribiert (Mühlberger, et al. 1999). Das bedeutet, dass die Viren unter bestimmten bisher nicht verstandenen Voraussetzungen in der Lage sind, virusunspezifische replikations- und transkriptionsrelevante Signale zu tolerieren.

Von anderen untereinander nahe verwandten NNS-RNA-Viren wurde berichtet, dass sie in der Lage sind eine heterogene RNA als Matrize zu akzeptieren. So konnten die humanen Parainfluenza Viren (hPIV) Typ I und III ein Sendai-Virus-Minigenom als Matrize für die Replikation benutzen, wohingegen das Masern-Virus dazu nicht in der Lage war (Curran and Kolakofsky 1991).

In dieser Arbeit wurden chimäre MBGV/EBOV-Minigenome untersucht, um herauszufinden, ob die Transkriptionsstartsignale für die virusspezifische Transkription relevant sind. Während die Transkriptionsstoppsignale von MBGV und EBOV identisch

sind, weisen die Transkriptionsstartsignale der einzelnen Gene kleine Unterschiede auf. Die Sequenzen unterscheiden sich lediglich im dritten und siebten Nukleotid.

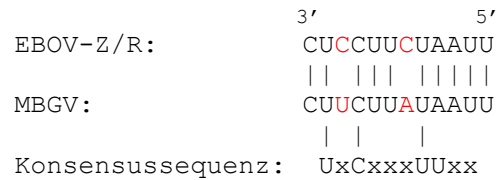


Abbildung 61: Nukleotid-Vergleich zwischen EBOV-Zaire, -Reston, MBGV und die Konsensussequenz (Feldmann et al., 1992) im Bereich der Transkriptionsstartsignal.

rot: Unterschiede in den Transkriptionsstartsignalen von EBOV und MBGV

Zunächst wurde in einem MBGV-spezifischen Minigenom das leaderproximale Transkriptionsstartsignal, also das Startsignal des ersten Gens, durch die konservierte EBOV-spezifische Sequenz ausgetauscht. Dieses Minigenom wurde zwar repliziert, es konnte jedoch keine Transkription nachgewiesen werden, was bedeutet, dass der MBGV-spezifische Polymerasekomplex nicht in der Lage war, das EBOV-spezifische Transkriptionsstartsignal zu erkennen.

Auf der Basis eines MBGV-spezifischen bicistronischen Minigenoms wurden weiterhin zwei chimäre Minigenome hergestellt, die anstelle der intergenischen Region NP/VP35 von MBGV die intergenische Region NP/VP35 oder VP35/VP40 des EBOV-Zaire enthielten. Anhand einer Northern-Blot-Analyse wurde gezeigt, dass die chimären Minigenome sowohl transkribiert als auch repliziert wurden. Waren also die EBOV-spezifischen Transkriptionssignale innerhalb des MBGV-spezifischen Minigenoms lokalisiert, wurden sie vom MBGV-Polymerasekomplex erkannt, wohingegen EBOV-Sequenzen im MBGV-Leader-Bereich nicht toleriert werden. Dies weist darauf hin, dass die Spezifität der Transkription ausschließlich von Signalen, die im Leaderbereich lokalisiert sind, determiniert wird.

Paramyxoviren, Rhabdoviren und Filoviren besitzen eine konservierte Transkriptionsstart- und -stoppssequenz am Anfang und Ende jeden Gens. Für diese drei Familien wurde von Feldmann et al. (1992) eine Konsensussequenz für das Transkriptionsstartsignal vorgeschlagen (Abb. 61). Demnach hätte der Austausch des ersten Transkriptionsstartsignals (NP) im MBGV-Minigenom gegen die Transkriptionsstartsequenz von Zaire-NP keinen negativen Einfluss auf die Transkription haben dürfen, da diese Konsensussequenz für MBGV und EBOV übereinstimmt und die ausgetauschten Nukleotide nicht zu den konservierten Nukleotiden gehören.

5.5 Untersuchung der intergenischen Regionen von EBOV-Zaire

Die einzelnen EBOV-Gene werden durch intergenische Regionen voneinander getrennt oder sie überlappen. So gibt es zwischen den Genen für NP/VP35 sowie für VP40/GP eine intergenische Region von fünf Nukleotiden und zwischen VP30/VP24 eine intergenische Region von 141 Nukleotiden. Bei den Genen VP35/VP40, GP/VP30 und VP24/L gibt es eine Überlappung des Transkriptionsstoppsignals des vorderen Gens mit dem Transkriptionsstartsignal des nachfolgenden Gens.

In dieser Arbeit wurde für NP/VP35 und VP35/VP40 der Einfluss der intergenischen Region bzw. der Genüberlappung auf die Erkennung der Transkriptionsstart- und Stoppsignale überprüft. Ausgangspunkt hierfür war wiederum die Herstellung bicistronischer Minigenome, die die zu untersuchenden Genregionen enthielten.

Für die Charakterisierung der intergenischen Region von NP/VP35 wurden Minigenome hergestellt, in denen die intergenische Region entweder mutiert oder deletiert war. Eine vollständige Deletion der intergenischen Region sowie Mutationen innerhalb der Region führten nur zu geringen Aktivitätsverlusten. Daraus lässt sich schließen, dass die intergenische Region für eine effiziente Transkription nicht von Bedeutung ist. Dies stimmt nicht überein mit Untersuchungen von Rassa et al. (1999) zum Simian-Virus Typ 5 (SV5). Hier wurde die intergenische Region von SV5 (22 Nukleotide) untersucht. Die Termination und Reinitiation der Gene M und F wird nicht durch Veränderung der Länge der intergenischen Region beeinflusst. Wurde jedoch das erste Nukleotid der intergenischen Region von G zu A mutiert, konnte man Verluste in der Transkriptionseffizienz der Gene beobachten. Somit scheint also ein Guanin zu Beginn einer intergenischen Region von Bedeutung für die Transkriptionstermination des ersten und die Transkriptionsinitiation des zweiten Gens bei SV5 zu haben. Bei EBOV ist dies nicht der Fall. So führte der Austausch des ersten Nukleotids der intergenischen Region von G zu A zu keinem dramatischen Verlust der CAT-Aktivität.

Weiter wurde für VSV gezeigt, dass ein Transkriptionsstoppsignal einen minimalen Abstand zum nachfolgenden Transkriptionsstartsignal haben muss, um eine effiziente Termination des ersten Gens zu erhalten. Hier wurden unterschiedliche Konstrukte hergestellt, bei denen die Länge der intergenischen Region variierte (Harmon et al. 2001). Ein minimaler Abstand zwischen Transkriptionsstoppsignal und -startsignal scheint bei EBOV-Zaire nicht nötig zu sein, da die Mutanten mit verkürzter oder vollständig deletierter intergenischer Region keinen wesentlichen Aktivitätsverlust im Vergleich zum Wildtyp zeigten.

Ebenso zeigte eine Mutation der intergenischen Region von EBOV-Zaire keinen negativen Effekt auf die Transkription der Gene, was auch von Hwang et al. (1998) bei VSV beobachtet wurde.

Eine untergeordnete Rolle der Länge der intergenische Region wurde auch für RSV beschrieben. Kuo et al., (1996) zeigten anhand unterschiedlicher Mutanten, dass die Substitution von zehn intergenischen Nukleotiden oder ihre Eliminierung nur einen geringen oder sogar keinen Einfluss auf die Transkription der beiden Gene hatte.

So ist zu vermuten, dass allein die fünf bis sechs Uridinreste des Transkriptionsstoppsignals des NP-Gens von EBOV-Zaire neben ihrer Funktion als Polyadenylierungssignal der Polymerase signalisieren, dass ein Transkriptionsstartsignal in unmittelbarer Nähe vorhanden ist.

Die Ergebnisse von Hinzman et al. (2002) zeigten ebenfalls, dass der U-Schwanz des Transkriptionsstoppsignals zwischen den Genen N und P von VSV eine multifunktionelle Region ist, die nicht nur für die Polyadenylierung und Termination des ersten Gens zuständig ist, sondern auch für die effiziente Transkription des nachfolgenden Gens sorgt.

Zur Untersuchung der Genüberlappung zwischen VP35/VP40 wurden mutierte EBOV-Minigenome mit Nukleotidaustauschen im Transkriptionsstoppsignal des VP35 oder im Transkriptionsstartsignal des VP40 hergestellt. Bei diesen beiden Mutanten ließ sich keine CAT-Aktivität im EBOV-spezifischen Transkriptionssystem nachweisen. Das bedeutet, dass eine effiziente Transkription des zweiten Gens nur dann gewährleistet ist, wenn die Transkription des ersten Gens korrekt terminiert wurde. Dies wurde auch beschrieben für RSV (Kuo et al. 1996).

Eine weitere Minigenommutante, in der künstlich eine intergenische Region von fünf Nukleotiden zwischen den Transkriptionssignalen von VP35 und VP40 inseriert wurde, zeigte erstaunlicherweise eine geringe Transkriptionsaktivität. Der Erkennungsbereich der Polymerase ist offenbar groß genug, um zwei getrennte Transkriptionssignale zu erkennen, obwohl diese durch fünf Nukleotide getrennt sind und in umgekehrter Reihenfolge liegen.

Bei RSV gibt es eine Genüberlappung vom M2- und L-Gen von 45 Nukleotiden. Es wurde gezeigt, dass die Polymerase nach Erkennung des Transkriptionsstoppsignals des M2-Gens in der Lage ist, auf der Matrize stromaufwärts nach dem Transkriptionsstartsignal des L-Gens zu suchen. Es kommt aber nur zur Transkription des L-Gens, wenn das Stoppsignal des M-Gens vorhanden ist.

Jedoch enden 90% der Transkripte, deren Transkription am Startsignal des L-Gens initiiert wurde, am Transkriptionsstoppsignal des M2-Gens, und nur in 10% der Fälle wird das L-Gen korrekt terminiert. Die überlappende Region bildet also den größten Teil der Transkriptionsprodukte. Es wurde deswegen vermutet, dass diese Genüberlappung eine regulatorische Funktion auf die Synthese der Polymerase hat und eine Überexpression des Proteins verhindern soll.

Die Nukleotidabfolge zwischen den Stopp- und Startsignalen im überlappenden Bereich scheint dabei unbedeutend zu sein (Fearn et al., 1999).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kuo et al. (1996), die eine untergeordnete Rolle der verschiedenen intergenischen Regionen bei der Transkription des RSV postulieren, konnten Hardy et al., (1999) mit verschiedenen bicistronischen RSV-Minigenomen, die jeweils eine im RSV natürlich vorkommende intergenische Region enthielten, zeigen, dass die Effizienz der Transkriptionstermination von der jeweiligen verwendeten intergenischen Region beeinflusst wurde. Zusätzlich reguliert die Präsenz des M2-1-Proteins, eines Antiterminationsfaktors, die effiziente Termination der verschiedenen Gene unterschiedlich, wobei die Termination in der intergenischen Region von F und M2 am sensitivsten auf die Anwesenheit des M2-1-Proteins reagierte. In Abwesenheit von M2-1 wurde das F-Gen erfolgreich terminiert und die mRNA des M2-Gens synthetisiert, wohingegen bei hoher Konzentration des M2-1 15mal mehr readthrough-Transkripte entstanden. Es wird deswegen vermutet, dass das M2-1 seine eigene Produktion über einen negativen Rückkopplungsmechanismus selbst regulieren kann.

Wahrscheinlich gibt es bei RSV ein Zusammenspiel der Transkriptionsstoppsignale der einzelnen Gene mit bestimmten Sequenzen der intergenischen Regionen, um eine effiziente Transkriptionstermination zu erhalten.

Dieser Mechanismus lässt sich aus den hier vorliegenden Untersuchungen nicht für die intergenischen Regionen von EBOV-Zaire nachweisen.

6. Zusammenfassung

Der im Jahr 1989 erstmals isolierte Ebola-Virus (EBOV)-Subtyp Reston verursacht in Affen ein schweres hämorrhagisches Fieber mit tödlicher Folge. Bisher wurden noch keine durch EBOV-Reston ausgelöste Erkrankungen beim Menschen gemeldet. Tierfänger und Tierpfleger, die mit infizierten Tieren in Kontakt kamen, zeigten keine Symptome der Erkrankung, doch konnte eine Antikörperbildung gegen das Virus nachgewiesen werden. Es ist noch ungewiss, ob EBOV-Reston für den Menschen nicht pathogen ist oder ob die übertragenen Virusmengen nicht ausreichen, um eine Infektion auszulösen. So bleibt die Frage der Pathogenität für den Menschen offen, und die Forschung an diesem Virus unterliegt denselben strengen Sicherheitsmaßnahmen wie für das hochpathogene EBOV-Zaire.

Vergleicht man das Wachstum von EBOV-Zaire und -Reston in Zellkultur, zeigen mit EBOV-Zaire infizierte Zellen bereits nach zwei Tagen einen starken zytopathischen Effekt, während Zellen, die mit EBOV-Reston infiziert wurden, erst nach acht bis zehn Tagen einen zytopathischen Effekt aufweisen. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte in einem stark verzögerten Replikationszyklus des EBOV-Reston im Vergleich zu EBOV-Zaire zu finden sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die genomische Sequenz des EBOV-Reston ermittelt, und mit Hilfe der erhaltenen Sequenzdaten wurden die Gene für die Nukleokapsidproteine NP, VP35, VP30 und L kloniert. Des Weiteren wurde ein EBOV-Reston-spezifisches Minigenom erzeugt, das als Matrize für Replikation und Transkription in einem auf reverser Genetik basierenden Replikations- und Transkriptionsassays diente. Mit Hilfe dieses Assays konnte gezeigt werden, dass für die EBOV-Reston-spezifische Transkription vier Nukleokapsidproteine, NP, VP35, L und VP30 essentiell sind. Damit verhält sich EBOV-Reston bezüglich seines Transkriptionsmodus wie das hochpathogene EBOV-Zaire. Für Marburg-Virus (MBGV) wurde dagegen gezeigt, dass für die Transkription NP, VP35 und L ausreichend sind. Wurden die Nukleokapsidproteine von EBOV-Reston und -Zaire untereinander ausgetauscht, so ließ sich mit einer Ausnahme Replikations- und Transkriptionsaktivität nachweisen. Nur die Kombination des L-Proteins des EBOV-Reston mit dem VP35 des EBOV-Zaire erwies sich als inaktiv. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen wurde nachgewiesen, dass beide Proteine trotz ihrer funktionellen Inkompatibilität in der Lage sind, miteinander zu interagieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch cis-aktive regulatorische Elemente wie die Leader- und Trailerregionen von EBOV-Zaire und -Reston miteinander kombiniert und vom

Polymerasekomplex des jeweiligen anderen Virus erkannt werden können. Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass die für Replikation und Transkription relevanten cis- und trans-aktiven Komponenten von EBOV-Reston- und Zaire eine hohe funktionelle und strukturelle Homologie aufweisen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung transkriptionsregulatorischer Signale bei MBGV und EBOV-Zaire. Hierbei wurde zum Einen die Spezifität der bei den Filoviren hoch konservierten Transkriptionsstart- und stoppsignale untersucht und zum Anderen die Rolle von intergenischen Regionen und Genüberlappungen bei der Transkription von EBOV-spezifischen Genen. Bezüglich der Spezifität der Transkriptionssignale von EBOV-Zaire und MBGV wurde gezeigt, dass EBOV-spezifische Transkriptionssignale, die innerhalb eines bicistronischen MBGV-spezifischen Minigenoms lokalisiert waren, vom MBGV-Polymerasekomplex toleriert wurden, während Austausch von Signalen im Leaderbereich zum Verlust der Transkriptionsaktivität führten. Dies weist darauf hin, dass die Spezifität der Transkription bei MBGV ausschließlich von Signalen, die im Leaderbereich lokalisiert sind, determiniert wird.

Der Einfluss intergenischer Regionen und Genüberlappungen auf die Transkription wurde mit Hilfe bicistronischer EBOV-spezifischer Minigenome untersucht. Es zeigte sich, dass weder Nukleotidaustausche noch eine vollständige Deletion der intergenischen Region zu dramatischen Aktivitätsverlusten in dem EBOV-spezifischen Transkriptionsassay führten. Bezüglich der überlappenden Gene VP35 und VP40, bei denen das VP35-spezifische Transkriptionsstoppsignal über einen Bereich von fünf Nukleotiden mit dem VP40-spezifischen Transkriptionsstartsignal überlappt, wurde gezeigt, dass eine effiziente Transkription des zweiten Gens nur dann gewährleistet ist, wenn die Transkription des ersten Gens korrekt terminiert wurde. Wurde dagegen das Transkriptionsstartsignal des zweiten Gens zerstört, hatte dies keinen Einfluss auf die Transkription des ersten Gens. Eine Insertion von fünf Nukleotiden zwischen den Transkriptionssignalen, die dazu führte dass das VP40-spezifische Startsignal stromaufwärts des VP35-spezifischen Stoppsignals zu liegen kam, führte erstaunlicherweise zu einer geringen Transkriptionsaktivität, was darauf hinweist, dass der Erkennungsbereich der EBOV-spezifischen Polymerase groß genug ist, um zwei getrennte Transkriptionssignale zu erkennen.

Schlüsselwörter:

Ebola-Virus (EBOV)/ EBOV-Reston/ EBOV-Zaire/ Marburg-Virus/ Transkription/
Nukleokasidproteine/ CAT-Assay/ Minigenom/ Mononegavirales/ Reverse Genetik/
RNA-Nachweis/ Replikationsassay/

7. Literaturverzeichnis

- Baize, S., Leroy, E. M., Georges-Courbot, M. C., Capron, M., Lansoud-Soukate, J., Debre, P., Fisher-Hoch, S. P., McCormick, J. B. and Georges, A. J. (1999). Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nat Med* 5, 423-6.
- Baron, R. C., McCormick, J. B. & Zubeir, O. A. (1983). Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull World Health Organ* 61, 997-1003.
- Basler, C. F., Wang, X., Mühlberger, E., Volchkov, V., Paragas, J., Klenk, H. D., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2000). The ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12289-94.
- Becker und Mühlberger, Structural Proteins of Filoviruses, *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 23-34 (1999)
- Becker, S., Huppertz, S., Klenk, H. D. and Feldmann, H. (1994). The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated. *J Gen Virol* 75, 809-18.
- Becker, S., Rinne, C., Hofsäuss, U., Klenk, H.-D. and Mühlberger, E. (1998). Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology* 249, 406-17.
- Bray, M., Driscoll, J. & Huggins, J. W. (2000). Treatment of lethal Ebola virus infection in mice with a single dose of an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase inhibitor. *Antiviral Res* 45, 135-47.
- Buchholz, U.J., Finke, S. & Konzelmann, K.K. (1999) Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 73, 251-9.
- Bwaka, M. A., Bonnet, M. J., Calain, P., Colebunders, R., De Roo, A., Guimard, Y., Katwili, K. R., Kibadi, K., Kipasa, M. A., Kuvula, K. J., Mapanda, B. B., Massamba, M., Mupapa, K. D., Muyembe-Tamfum, J. J., Ndaberey, E., Peters, C. J., Rollin, P. E. & Van den Enden, E. (1999). Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. *J Infect Dis* 179, Suppl 1, S1-7.
- CDC (1990a). Update: filovirus infection in animal handlers. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 39, 221.
- CDC (1990b). Update: filovirus infections among persons with occupational exposure to nonhuman primates. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 39, 266-7; 273.
- CDC, Sanchez et al., Reemergence of Ebola Virus in Afrika (1996)
- CDC Disease information, viral hemorrhagic fevers: fact sheets about Ebola hemorrhagic fever (2002)
- CDC Ebola Hemorrhagic Fever, Table Showing Known Cases and Outbreaks (2002)
- CDC Filoviruses (2002)
- CDC Ebola Hemorrhagic Fever (2002)
- Chan, S. Y., Empig, C. J., Welte, F. J., Speck, R. F., Schmaljohn, A., Kreisberg, J. F. & Goldsmith, M. A. (2001). Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell* 106, 117-26.
- Conzelmann, K. K. (1996). Genetic manipulation of non-segmented negative-strand RNA viruses. *J Gen Virol* 77, 381-9.
- Conzelmann KK, Schnell M. Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. *J Virol.* (1994) Feb;68(2):713-9.
- Curran JA, Kolakofsky D. Rescue of a Sendai virus DI genome by other parainfluenza viruses: implications for genome replication. *Virology.* (1991) May;182(1):168.

- Davis NL, Arnheiter H, Wertz GW. Vesicular stomatitis virus N and NS proteins form multiple complexes. *J Virol.* (1986) Sep;59(3):751-4.
- Dessen A, Volchkov V, Dolnik O, Klenk HD, Weissenhorn W. Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *EMBO J.* 2000 Aug 15;19(16):4228-36.
- Elliott, L. H., Kiley, M. P. and McCormick, J. B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology* 147, 169-76.
- Fearns R, Collins PL. Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 1999 Jan;73(1):388-97.
- Feldmann, H. and Kiley, M. P. (1999). Classification, structure, and replication of filoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 1-21.
- Feldmann, H., Mühlberger, E., Randolph, A., Will, C., Kiley, M. P., Sanchez, A. and Klenk, H. D. (1992). Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Res* 24, 1-19.
- Feldmann, H., Slenczka, W. & Klenk, H.-D. (1996). Emerging and reemerging of filoviruses. *Arch Virol Suppl* 11, 77-100.
- Fisher-Hoch, S. P. & McCormick, J. B. (1999). Experimental filovirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 117-43.
- Fisher-Hoch, S. P., Perez-Oronoz, G. I., Jackson, E. L., Hermann, L. M. & Brown, B. G. (1992). Filovirus clearance in non-human primates. *Lancet* 340, 451-3.
- Formenty, P., C. Hatz, B. Le Guenno, A. Stoll, P. Rogenmoser, and A. Widmer. (1999). Human infection due to Ebola virus, subtype Cote d'Ivoire: clinical and biologic presentation. *J Infect Dis.* 179 Suppl 1:S48-53.
- Garcia, J., Garcia-Barreno, B., Vivo, A. & Melero, J. A. (1993). Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* 195, 243-7.
- Gear, J. S., Cassel, G. A., Gear, A. J., Trappler, B., Clausen, L., Meyers, A. M., Kew, M. C., Bothwell, T. H., Sher, R., Miller, G. B., Schneider, J., Koornhof, H. J., Gomperts, E. D., Isaacson, M. and Gear, J. H. (1975). Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br Med J* 4, 489-93.
- Geisbert, T. W. and Jahrling, P. B. (1995). Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res* 39, 129-50.
- Groseth, A., Ströher, U., Theriault, S., Feldmann, H., Molecular characterization of an isolate from the 1989/90 epizootic of Ebola virus Reston among macaques imported into the United States. *Virus Research* 87 (2002), 155-163.
- Grosfeld, H., Hill, M. G. & Collins, P. L. (1995). RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *J Virol* 69, 5677-86.
- Harcourt, B. H., Sanchez, A. & Offermann, M. K. (1998). Ebola virus inhibits induction of genes by double-stranded RNA in endothelial cells. *Virology* 252, 179-88.
- Hardy RW, Harmon SB, Wertz GW. Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol.* (1999) Jan;73(1):170-6.
- Harmon SB, Megaw AG, Wertz GW. RNA sequences involved in transcriptional termination of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 2001 Jan;75(1):36-44.
- Hevey, M., Negley, D., Pushko, P., Smith, J. & Schmaljohn, A. (1998). Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology* 251, 28-37.
- Hinzman EE, Barr JN, Wertz GW. Identification of an upstream sequence element required for vesicular stomatitis virus mRNA transcription. *J Virol.* (2002) Aug;76(15):7632-41.

- Horikami, S. M., J. Curran, D. Kolakofsky, and S. A. Moyer. (1992). Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. *J Virol.* 66:4901-8.
- Huber, M., Cattaneo, R., Spielhofer, P., Orvell, C., Norrby, E., Messerli, M., Perriard, J. C., and Billeter, M. A. (1991). Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology*: 185:299-308.
- Hwang LN, Englund N, Pattnaik AK. Polyadenylation of vesicular stomatitis virus mRNA dictates efficient transcription termination at the intercistronic gene junctions. *J Virol.* (1998) Mar;72(3):1805-13.
- ICTV Filoviridae (2002)
- Ikegami T, Calaor AB, Miranda ME, Niikura M, Saijo M, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. Genome structure of Ebola virus subtype Reston: differences among Ebola subtypes. Brief report. *Arch Virol.* (2001) Oct;146(10):2021-7.
- Jaax N, Jahrling P, Geisbert T, Geisbert J, Steele K, McKee K, Nagley D, Johnson E, Jaax G, Peters C. Transmission of Ebola virus (Zaire strain) to uninfected control monkeys in a biocontainment laboratory. *Lancet.* (1995) Dec 23-30;346(8991-8992):1669-71.
- Jahrling, P. B., Geisbert, T. W., Dalgard, D. W., Johnson, E. D., Ksiazek, T. G., Hall, W. C. and Peters, C. J. (1990). Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet* 335, 502-5.
- Jahrling PB, Geisbert TW, Jaax NK, Hanes MA, Ksiazek TG, Peters CJ. Experimental infection of cynomolgus macaques with Ebola-Reston filoviruses from the 1989-1990 U.S. epizootic. *Arch Virol Suppl.* (1996);11:115-34.
- Kiley, M. P., Cox, N. J., Elliott, L. H., Sanchez, A., DeFries, R., Buchmeier, M. J., Richman, D. D. and McCormick, J. B. (1988). Physicochemical properties of Marburg virus: evidence for three distinct virus strains and their relationship to Ebola virus. *J Gen Virol* 69, 1957-67.
- Kiley, M. P., Wilusz, J., McCormick, J. B. and Keene, J. D. (1986). Conservation of the 3' terminal nucleotide sequences of Ebola and Marburg virus. *Virology* 149, 251-4.
- Kingsbury, D. W. (1990). Paramyxoviridae and their replication. In *Fields Virology*, 2 edn, pp. 945-962. Edited by B. N. Fields, and D.M. Knipe. New York: New York.
- Kolakofsky, D., Vidal, S. & Curran J. (1991). Paramyxovirus RNA synthesis and P gene expression. In Kingsbury DW, ed. *The Paramyxoviruses*. New York: Plenum, 1991:215-33.
- Kolesnikova, L., Bugany, H., Klenk, H. D. and Becker, S. (2002). VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment. *J Virol* 76, 1825-38.
- Kolesnikova, L., Mühlberger, E., Ryabchikova, E. and Becker, S. (2000). Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *J Virol* 74, 3899-904.
- Ksiazek, T. G., West, C. P., Rollin, P. E., Jahrling, P. B. and Peters, C. J. (1999). ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S192-8.
- Kuo L, Grosfeld H, Cristina J, Hill MG, Collins PL. Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol.* (1996) Oct;70(10):6892-901.
- Le Guenno, B., P. Formentry, M. Wyers, P. Gounon, F. Walker, and C. Boesch. (1995). Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet.* 345:1271-4.
- Leroy, E. M., Baize, S., Debre, P., Lansoud-Soukate, J. & Mavoungou, E. (2001). Early immune responses accompanying human asymptomatic Ebola infections. *Clin Exp Immunol* 124, 453-60.

- Martini, G.A., & Siegert, R. (ed.) (1971). Marburg Virus Disease. 1st ed., pp. 1-230. Springer, New York.
- Miranda, M. E., Ksiazek, T. G., Retuya, T. J., Khan, A. S., Sanchez, A., Fulhorst, C. F., Rollin, P. E., Calaor, A. B., Manalo, D. L., Roces, M. C., Dayrit, M. M. & Peters, C. J. (1999). Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S115-9.
- Modrof, J. (2002). Strukturelle Charakteristika des Ebola-Virus-VP30 und deren funktionelle Bedeutung. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Modrof, J., Moritz, C., Kolesnikova, L., Konakova, T., Hartlieb, B., Randolph, A., Mühlberger, E. and Becker, S. (2001). Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. *Virology* 287, 171-82.
- Modrof, J., Mühlberger, E., Klenk, H. D. and Becker, S. (2002). Phosphorylation of VP30 impairs Ebola virus transcription. *J Biol Chem* 277, 6.
- Modrow und Falke *Molekulare Virologie* (1997)
- Mühlberger, E., Lotfering, B., Klenk, H.-D. and Becker, S. (1998). Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP30, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J Virol* 72, 8756-64.
- 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, 534-47.
- Mühlberger, E., Trommer, S., Funke, C., Volchkov, V., Klenk, H.-D. and Becker, S. (1996). Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Virology* 223, 376-80.
- Mühlberger, E., Weik, M., Volchkov, V. E., Klenk, H.-D. and Becker, S. (1999). Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J Virol* 73, 2333-42.
- Muyembe-Tamfum, J.-J., Borchert, M., Swanepoel, R., Bausch, D. G., Tshioko, F. K., Campbell, P., Roth, C., Sleurs, H., Olinda, L. A., Libande, M., Colebunders, R., Rodier, G., Leirs, H., Zeller, H., Van der Stuyft, P. and Rollin, P. E. (2001). Marburg hemorrhagic fever in Watsa/Durba (DRC): an endemoepidemic phenomenon. *Infect. Dis. Rev.* 3, 34-45.
- Ndambi, R., Akamituna, P., Bonnet, M. J., Tukadila, A. M., Muyembe-Tamfum, J. J. & Colebunders, R. (1999). Epidemiologic and clinical aspects of the Ebola virus epidemic in Mosango, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S8-10.
- Neumann, G., Feldmann, H., Watanabe, S., Lukashevich, I. and Kawaoka, Y. (2002). Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol* 76, 406-10.
- Pattnaik AK, Wertz GW. Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs. *J Virol.* 1990 Jun;64(6):2948-57.
- Peters, C. J. & Khan, A. S. (1999). Filovirus diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 85-95.
- Peters, C. J., Sanchez, A., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G. & Murphy, F. A. (1996). Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. Fields, B. N. (ed.). *Virology*, third edn., pp. 1161-76. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber M, Dotsch C, Christiansen G, Billeter MA. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J.* (1995) Dec 1;14(23):5773-84.

- Rassa JC, Parks GD. Highly diverse intergenic regions of the paramyxovirus simian virus 5 cooperate with the gene end U tract in viral transcription termination and can influence reinitiation at a downstream gene. *J Virol.* (1999) May;73(5):3904-12.
- Regnery, R. L., Johnson, K. M. and Kiley, M. P. (1980). Virion nucleic acid of Ebola virus. *J Virol* 36, 465-9.
- Roberts, A. and Rose, J.K. (1998) Recovery of negative-strand RNA viruses from plasmid DNAs: A positive approach revitalizes a negative field. *Virology* 247:1-6
- Roels, T. H., Bloom, A. S., Buffington, J., Muhungu, G. L., Mac Kenzie, W. R., Khan, A. S., Ndambi, R., Noah, D. L., Rolka, H. R., Peters, C. J. & Ksiazek, T. G. (1999). Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: risk factors for patients without a reported exposure. *J Infect Dis* 179 Suppl 1, S92-7.
- Ruigrok, R. W., Schoehn, G., Dessen, A., Forest, E., Volchkov, V., Dolnik, O., Klenk, H.-D. & Weissenhorn, W. (2000). Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J Mol Biol* 300, 103-12.
- Ryabchikova, E. I., Kolesnikova, L. V. & Netesov, S. V. (1999). Animal pathology of filoviral infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 145-73.
- Ryan, K. W., and A. Portner. (1990). Separate domains of Sendai virus P protein are required for binding to viral nucleocapsids. *Virology.* 174:515-21.
- Sambrook, A., E. F. Fritsch & A. K. Maniatis. (1989). *Molecular cloning, A Laboratory Manual.* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, A., Kiley, M. P., Holloway, B. P. and Auperin, D. D. (1993). Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus. *Virus Res* 29, 215-40.
- Sanchez, A., Yang, Z. Y., Xu, L., Nabel, G. J., Crews, T. and Peters, C. J. (1998). Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J Virol* 72, 6442-7.
- Sänger, C. (2000). Untersuchungen zum Transport und zur Reifung des Marburg-Virus Oberflächenproteins GP. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg.
- Sänger, C., Mühlberger, E., Ryabchikova, E., Kolesnikova, L., Klenk, H. D. and Becker, S. (2001). Sorting of Marburg virus surface protein and virus release take place at opposite surfaces of infected polarized epithelial cells. *J Virol* 75, 1274-83.
- Schwemmler, M., M. Salvatore, L. Shi, J. Richt, C. H. Lee, and W. I. Lipkin. (1998). Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J Biol Chem.* 273:9007-12.
- Siegert, R., Shu, H.-L., Slenczka, W., Peters, D. and Müller, G. (1967). Zur Aetiologie einer unbekanntenen, von Affen ausgegangenen menschlichen Infektionskrankheit. *Dtsch Med Wschr* 51, 2341-3.
- Slenczka, W. G. (1999). The Marburg virus outbreak of 1967 and subsequent episodes. *Curr Top Microbiol Immunol* 235, 49-75.
- Smith, D. H., Johnson, B. K., Isaacson, M., Swanapoel, R., Johnson, K. M., Killey, M., Bagshawe, A., Siongok, T. and Keruga, W. K. (1982). Marburg-virus disease in Kenya. *Lancet* 1, 816-20.
- Sullivan, N. J., Sanchez, A., Rollin, P. E., Yang, Z. Y. & Nabel, G. J. (2000). Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 408, 605-9.
- Sureau PH. Firsthand clinical observations of hemorrhagic manifestations in Ebola hemorrhagic fever in Zaire. *Rev Infect Dis.* (1989) May-Jun;11 Suppl 4:S790-3.
- Sutter, G., Ohlmann, M. & Erfle, V. (1995). Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett* 371, 9-12.

- Swanepoel, R., Leman, P. A., Burt, F. J., Zachariades, N. A., Braack, L. E., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Zaki, S. R. & Peters, C. J. (1996). Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. *Emerg Infect Dis* 2, 321-5.
- Takada, A., Watanabe, S., Ito, H., Okazaki, K., Kida, H. & Kawaoka, Y. (2000). Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* 278, 20-6.
- van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. (2000). *Virus Taxonomy*, VIIth report of the ICTV. Academic Press, SanDiego.
- Vanderzanden, L., Bray, M., Fuller, D., Roberts, T., Custer, D., Spik, K., Jahrling, P., Huggins, J., Schmaljohn, A. & Schmaljohn, C. (1998). DNA vaccines expressing either the GP or NP genes of Ebola virus protect mice from lethal challenge. *Virology* 246, 134-44.
- Volchkov, V. E., Feldmann, H., Volchkova, V. A. & Klenk, H.-D. (1998). Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5762-7.
- Volchkov VE. Processing of the Ebola virus glycoprotein. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;235:35-47.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Chepurnov, A. A., Blinov, V. M., Dolnik, O., Netesov, S. V. and Feldmann, H. (1999). Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol* 80, 355-62.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Mühlberger, E., Kolesnikova, L. V., Weik, M., Dolnik, O. and Klenk, H. D. (2001). Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* 291, 1965-9.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Slenczka, W., Klenk, H. D. and Feldmann, H. (1998). Release of viral glycoproteins during Ebola virus infection. *Virology* 245, 110-9.
- Volchkova, V. A., Klenk, H. D. and Volchkov, V. E. (1999). Delta-peptide is the carboxy-terminal cleavage fragment of the nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus. *Virology* 265, 164-71.
- Wagner, R. R. (1990). Rhabdoviridae and their replication. In *Fields Virology*, 2 edn, pp. 867-881. Edited by B. N. Fields, and D.M. Knipe. New York: Raven Press.
- Weik, M. (2001). Untersuchung cis-aktiver Elemente im Genom des Ebola-Virus, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg.
- Weik, M., Modrof, J., Klenk, H. D., Becker, S. and Mühlberger, E. (2002). Ebola Virus VP30-Mediated Transcription Is Regulated by RNA Secondary Structure Formation. *J Virol* 76, 8532-9.
- WHO, Ebola Virus Reston (1992)
- WHO, Fact Sheet N° 97, (1998)
- WHO, Ebola Virus Reston 1999
- WHO, Fact Sheet N° 103, (2000)
- WHO, (2002). WHO Disease Outbreaks Report: Ebola haemorrhagic fever in Gabon/The Republic of the Congo - Update 22, WER.
- Wilson, J. A. & Hart, M. K. (2001). Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. *J Virol* 75, 2660-4.
- Wilson, J. A., Hevey, M., Bakken, R., Guest, S., Bray, M., Schmaljohn, A. L. & Hart, M. K. (2000). Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science* 287, 1664-6.
- Xu, L., Sanchez, A., Yang, Z., Zaki, S. R., Nabel, E. G., Nichol, S. T. & Nabel, G. J. (1998). Immunization for Ebola virus infection. *Nat Med* 4, 37-42.

- Yang, Z., Delgado, R., Xu, L., Todd, R. F., Nabel, E. G., Sanchez, A. & Nabel, G. J. (1998). Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins. *Science* 279, 1034-7.
- Yu Q, Hardy RW, Wertz GW. Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P, and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J Virol.* (1995) Apr;69(4):2412-9.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1. Einleitung

Abbildung 1:	Filovirus Ausbrüche seit 1967.....	3
Abbildung 2:	Die Struktur des EBOV.....	8
Abbildung 3:	Genomorganisation des EBOV-Zaire.....	9
Abbildung 4:	Schematische Übersicht über die Funktionsweise des EBOV-spezifischen Replikations- und Transkriptionssystems.....	14
Tabelle 1:	Einteilung der Filoviren nach ihrem Auftreten und ihrer Pathogenität.....	3
Tabelle 2:	Filovirus-Ausbrüche.....	4
Tabelle 3:	Überblick über die Eigenschaften und Funktionen der Filovirusproteine.....	11

4. Ergebnisse

Abbildung 5:	Beispiel für die Auswahl eines degenerierten Primers zur Sequenzierung des EBOV-Reston-Genoms.....	56
Abbildung 6:	Plan der 5'RACE zur Identifizierung des exakten 5'-Endes des EBOV-Reston-Genoms.....	57
Abbildung 7:	Sequenzierung der 5'RACE zur Identifizierung des exakten Endes der EBOV-Reston-Genoms.....	57
Abbildung 8:	Schema der RNA-Ligation und folgenden PCRs zur Identifizierung des exakten 3'-Endes des EBOV-Reston-Genoms.....	57
Abbildung 9:	Sequenzierung der RNA-Ligation zur Identifizierung des exakten 3'-Endes des EBOV-Reston-Genoms.....	58
Abbildung 10:	Genomorganisation des EBOV-Reston.....	58
Abbildung 11:	Nukleotid-Vergleich zwischen EBOV-Zaire, -Reston und MBGV im Bereich der Leader-Regionen. Die Sequenz ist in (+)-Strang-Orientierung dargestellt.....	60
Abbildung 12:	Nukleotid-Vergleich zwischen EBOV-Zaire, -Reston und MBGV im Bereich der Trailer-Regionen. Die Sequenz ist in (+)-Strang-Orientierung dargestellt.....	60
Abbildung 13:	Genomorganisation des EBOV-Reston, des EBOV-Zaire und des MBGV.....	61
Abbildung 14:	Vergleich der Transkriptionsstartsignale ((+)-Strang-Orientierung).....	62
Abbildung 15:	Vergleich der Transkriptionsstoppsignale ((+)-Strang-Orientierung).....	63
Abbildung 16:	Sequenzvergleich zwischen EBOV-Zaire, -Reston und MBGV im Bereich der intergenischen Regionen ((+)-Strang-Orientierung).....	63
Abbildung 17:	Sequenzvergleich der intergenischen Region VP30/VP24 zwischen EBOV-Zaire und -Reston ((+)-Strang-Orientierung).....	64
Abbildung 18:	Sequenzvergleich der intergenischen Regionen GP/VP30 (MBGV) und VP30/VP24 (EBOV-Reston) ((+)-Strang-Orientierung).....	64
Abbildung 19:	Klonierung des NP-Gens des EBOV-Reston in den Vektor pTM1.....	65
Abbildung 20:	Klonierung des VP35-Gens des EBOV-Reston in den Vektor pTM1.....	66
Abbildung 21:	Klonierung des VP30-Gens des EBOV-Reston in den Vektor pTM1.....	66
Abbildung 22:	Klonierungsstrategie des L-Gens des EBOV-Reston in drei Schritten.....	67
Abbildung 23:	Klonierung des L-Gens des EBOV-Reston in den Vektor pTM1.....	68
Abbildung 24:	Klonierungsstrategie des EBOV-Reston-Minigenoms in zwei Schritten.....	69
Abbildung 25:	Klonierung des Minigenoms des EBOV-Reston in den Vektor Andy.....	70
Abbildung 26:	Nachweis der CAT-Aktivität im EBOV-Reston-spezifischen Minigenomsystem.....	71
Abbildung 27:	Graphische Darstellung der Titration des pT/NP _{EBOV-Reston} -Plasmids.....	72
Abbildung 28:	Graphische Darstellung der Titration des pT/VP35 _{EBOV-Reston} -Plasmids.....	73

<u>Abbildung 29:</u>	Graphische Darstellung der Titration des pT/VP30 _{EBOV-Reston} -Plasmids.....	74
<u>Abbildung 30:</u>	Graphische Darstellung der Titration des pT/L _{EBOV-Reston} -Plasmids.....	75
<u>Abbildung 31:</u>	Graphische Darstellung der Titration des 3R-5R-Plasmids.....	76
<u>Abbildung 32:</u>	Graphische Darstellung der Titration der unterschiedlichen EBOV-Reston-Nukleokapsidproteingene und der spezifischen 3R-5R-Plasmide.....	77
<u>Abbildung 33:</u>	Northern-Blot-Analyse transkribierter mRNAs, welche in An- und Abwesenheit von VP30 transkribiert wurden.....	78
<u>Abbildung 34:</u>	Graphische Darstellung der CAT-Aktivität bei Einsatz von EBOV-Reston-Proteinen im EBOV-Zaire-Replikationssystem.....	79
<u>Abbildung 35:</u>	Graphische Darstellung der CAT-Aktivität bei Einsatz von EBOV-Zaire-Proteinen im EBOV-Reston-Replikationssystem.....	81
<u>Abbildung 36:</u>	Originale und chimäre Minigenome.....	83
<u>Abbildung 37:</u>	Graphische Darstellung der CAT-Aktivität bei Einsatz von EBOV-Zaire- bzw. -Reston Nukleokapsidproteinen und der chimären Minigenome.....	84
<u>Abbildung 38:</u>	Flag-markierte L-Proteine des EBOV-Reston.....	86
<u>Abbildung 39:</u>	Untersuchung zu Wechselwirkung zwischen L _{Reston} und VP35 _{Reston}	39
<u>Abbildung 40:</u>	Untersuchung zu Wechselwirkung zwischen L _{Zaire} und VP35 _{Zaire}	88
<u>Abbildung 41:</u>	Untersuchung zu Wechselwirkung zwischen L _{Reston} und VP35 _{Zaire}	89
<u>Abbildung 42:</u>	Teilsequenz des VP24-Gens des EBOV-Zaire.....	90
<u>Abbildung 43:</u>	EBOV-Zaire spezifisches bicistronisches Minigenom 3E-5E _{bici} VP24/L.....	91
<u>Abbildung 44:</u>	Mutation der intergenischen Region VP24/L, vRNA Orientierung.....	91
<u>Abbildung 45:</u>	Northern-Blot-Analyse transkribierter mRNAs der Minigenome 3E-5E _{bici} VP24/L, 3E-5E _{bici} VP24/L _{mut 1} und 3E-5E _{bici} VP24/L _{mut 2}	92
<u>Abbildung 46:</u>	Direkte Sequenzierung des PCR-Produkts der VP24-mRNA.....	93
<u>Abbildung 47:</u>	MBGV-spezifische mono- und bicistronische Minigenome.....	94
<u>Abbildung 48:</u>	Austausch des MBGV-spezifischen Transkriptionsstartsignals durch das EBOV- spezifische, vRNA Orientierung.....	95
<u>Abbildung 49:</u>	Replikation und Transkription des originalen und des mutierten MBGV-spezifischen Minigenoms.....	96
<u>Abbildung 50:</u>	Original und Chimäre MBGV-spezifische bicistronische Minigenome.....	97
<u>Abbildung 51:</u>	Northern-Blot-Analyse der replizierten und transkribierten RNA der originale und mutierten Minigenome 3M-5M _{bici} NP/VP35, 3M-5M _{bici} ChimI und 3M-5M _{bici} ChimII.....	98
<u>Abbildung 52:</u>	Intergenische Regionen des EBOV-Zaire Genoms, vRNA-Orientierung.....	100
<u>Abbildung 53:</u>	EBOV-Zaire spezifische bicistronische Minigenome 3E-5E _{bici} NP/VP35 und 3E-5E _{bici} VP35/VP40.....	101
<u>Abbildung 54:</u>	Originale und mutierte intergenische Region NP/VP35, vRNA-Orientierung.....	102
<u>Abbildung 55:</u>	Graphische Darstellung der CAT-Aktivität der EBOV-Zaire-spezifischen bicistronischen Minigenome 3E-5E _{bici} NP/VP35, 3E-5E _{bici} NP/VP35 _{A1} , 3E-5E _{bici} NP/VP35 _{A2} , 3E-5E _{bici} NP/VP35 _B und 3E-5E _{bici} NP/VP35 _C	103
<u>Abbildung 56:</u>	Originale und mutierte intergenische Region VP35/VP40, vRNA-Orientierung.....	104
<u>Abbildung 57:</u>	Graphische Darstellung der CAT-Aktivität der EBOV-Zaire-spezifischen bicistronischen Minigenome 3E-5E _{bici} VP35/VP40, 3E-5E _{bici} VP35/VP40 ₁ , 3E-5E _{bici} VP35/VP40 ₂ und 3E-5E _{bici} VP35/VP40 ₃	105
<u>Abbildung 58:</u>	Northern-Blot-Analyse der transkribierten mRNAs der EBOV-Zaire-spezifischen bicistronischen Minigenome 3E-5E _{bici} VP35/VP40, 3E-5E _{bici} VP35/VP40 ₁ und 3E-5E _{bici} VP35/VP40 ₂	107
<u>Tabelle 4:</u>	Aminosäuresequenzvergleich zwischen EBOV-Zaire, EBOV-Reston und MBGV.....	60
<u>Tabelle 5:</u>	Eingesetzte EBOV-Reston und - Zaire Plasmidmengen.....	80
<u>Tabelle 6:</u>	Eingesetzte EBOV-Reston und - Zaire Plasmidmengen.....	81
<u>Tabelle 7:</u>	Eingesetzte EBOV-Reston und MBGV Plasmidmengen.....	82
<u>Tabelle 8:</u>	Eingesetzte EBOV-Reston und -Zaire Plasmidmengen.....	84

5. Diskussion

<u>Abbildung 59:</u>	Nukleotid-Vergleich zwischen EBOV-Zaire und –Reston im Bereich der VP30-Phosphorylierungsstellen.....	110
<u>Abbildung 60:</u>	Nukleotid-Vergleich zwischen EBOV-Zaire, –Reston und MBGV im Bereich der VP24- Transkriptionsstoppsignale.....	114
<u>Abbildung 61:</u>	Nukleotid-Vergleich zwischen EBOV-Zaire, -Reston, MBGV und die Konsensussequenz (Feldmann et al., 1992) im Bereich der Transkriptionsstartsignal.....	115

9. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AS	Aminosäure
BHK	baby hamster kidney
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CAMP	Chloramphenicol
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
def.	deficient
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
ΔCAT	verkürztes CAT-Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig(e)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBOV	Ebola-Virus
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guanin
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GP	Glykoprotein
h	Stunde(n)
IR	intergenische Region
l	Liter
M	Mol
m	Meter
MBGV	Marburg-Virus
min	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NNS	nichtsegmentiert, negativ orientiert, einzelsträngig
NP	Nukleoprotein
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT	Reverse Transkription
ss	single strand = Einzelstrang
SV5	Simian-Virus 5
T	Thymin
TK Start	Transkriptionsstart
TK Stopp	Transkriptionsstopp
U	units
UpM	Umdrehungen pro Minute
VSV	vesikuläres Stomatitis-Virus

10. Anhang

RACE Protokoll

3.5 First Strand cDNA Synthesis

This procedure is designed to convert specific RNA sequence(s) from a background of 1-5 µg of total RNA into first strand cDNA. In general, 100 to 500 ng of total RNA should provide sufficient material for the amplification of low copy messages by 5' RACE (6). Although poly(A) + RNA may be used in this protocol to enrich for very rare messages, this level of purity is typically not necessary. If you wish to use the control RNA, refer to Sections 5.2 and 5.5 for proper procedure.

1. Add the following to a 0.5-ml microcentrifuge tube (or thin-walled PCR tube if using a thermal cycler):

Component Amount

GSP1..... 2.5 pmoles (~10 to 25 ng)
sample RNA..... 1-5 µg
DEPC-treated water..... sufficient for a final volume of 15.5 µl
(or sterile, distilled water)

2. Incubate the mixture 10 min at 70°C to denature RNA. Chill 1 min on ice. Collect the contents of the tube by brief centrifugation and add the following in the order given:

Component Volume (µl)

10X PCR buffer2.5
25 mM MgCl₂2.5
10 mM dNTP mix 1
0.1 M DTT..... 2.5
final volume..... 8.5
The final volume of step 1 and 2 is 24 µl.

3. Mix gently, and collect the reaction by brief centrifugation. Incubate for 1 min at 42°C.
4. Add 1 µl of SuperScript II RT. Mix gently and incubate for 50 min at 42°C.
Note: 30 min incubation is usually sufficient for short (<4 kb) mRNAs. Longer transcripts require at least 50 min to synthesize enough cDNA for a consistent signal in long PCR. Final composition of the reaction:

20 mM Tris-HCl (pH 8.4)
50 mM KCl
2.5 mM MgCl₂
10 mM DTT
100 nM cDNA primer (GSP1)
400 µM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP
1-5 µg (~40 ng/µl) RNA
200 units SuperScript II RT

5. Incubate at 70°C for 15 min to terminate the reaction.
6. Centrifuge 10 to 20 s and place the reaction at 37°C.
7. Add 1 µl of RNase mix, mix gently but thoroughly, and incubate for 30 min at 37°C.
8. Collect the reaction by brief centrifugation and place on ice.
The procedure may be stopped at this point and the reactions stored at 20°C.

3.6 S.N.A.P. Column Purification of cDNA

1. Equilibrate the binding solution to room temperature.
2. For each sample to be purified, equilibrate ~100 µl of sterilized, distilled water at 65°C for use in step 9.
3. Add 120 µl of binding solution (6 M NaI) to the first strand reaction.
4. Transfer the cDNA/NaI solution to a S.N.A.P. column. Centrifuge at 13,000 xg for 20s.
5. Remove the cartridge insert from the tube and transfer the flowthrough to a microcentrifuge tube. Save the solution until recovery of the cDNA is confirmed. Place the cartridge insert back into the tube.
6. Add 0.4 ml of **COLD** (4°C) 1X wash buffer to the spin cartridge. Centrifuge at 13,000 x g for 20 s. Discard the flowthrough. Repeat this wash step **three** additional times.
7. Wash the cartridge two times with 400 µl of **COLD** (4°C) 70% ethanol as described in step 6.

8. After removing the final 70% ethanol wash from the tube, centrifuge at 13,000 x g for 1 min.
9. Transfer the spin cartridge insert into a fresh sample recovery tube. Add 50 µl of sterilized, distilled, water (**preheated to 65°C**) to the spin cartridge. Centrifuge at 13,000 x g for 20 s to elute the cDNA.

3.7 TdT Tailing of cDNA

Variable amounts of purified cDNA from the S.N.A.P. column purification may be used in the TdT-tailing reaction. Factors, such as the amount of RNA used in the first strand reaction and relative abundance of the desired mRNA, should be considered. If desired, the cDNA pool may be concentrated by lyophilization and the entire contents used in the tailing reaction. To evaluate the specificity of the subsequent amplification reaction from the oligo-dC tail, inclusion of a control reaction that omits TdT is recommended.

1. Add the following components to each tube and mix gently:

Component Volume (µl)	
DEPC-treated water	6.5
5X tailing buffer	5.0
2 mM dCTP	2.5
S.N.A.P.-purified cDNA sample.....	10.0
final volume.....	24.0

2. Incubate for 2 to 3 min at 94°C. Chill 1 min on ice. Collect the contents of the tube by brief centrifugation and place on ice.
3. Add 1 µl TdT, mix gently, and incubate for 10 min at 37°C.
4. Heat inactivate the TdT for 10 min at 65°C. Collect the contents of the reaction by brief centrifugation and place on ice.

3.8 PCR of dC-tailed cDNA

Tailed cDNA obtained from the preceding protocol may be amplified directly by PCR. Amplification of > 5 µl volumes of the tailing reaction requires appropriate adjustments for buffer, MgCl₂, and dNTP concentrations in the PCR.

1. Equilibrate the thermal cycler block to 94°C. In most cases, the iigood startll pro-cedure gives specific amplification products. For some target and primer sets,irhot startlt has been reported to improve the specificity of the reaction (44,45).
2. Add the following to a 0.2 or 0.5-ml thin-wall PCR tube sitting on ice:

Component Volume (µl)	
sterilized, distilled water.....	31.5
10X PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]	5.0
25 mM MgCl ₂	3.0
10 mM dNTP mix.....	1.0
nested GSP2 (prepared as 10 µM solution).....	2.0
Abridged Anchor Primer (10 µM).....	2.0
dC-tailed cDNA	5.0
final volume	49.5

3. Add 0.5 µl of *Taq* DNA polymerase (5 units/l) immediately before mixing.
4. Mix the contents of the tube (*Taq* DNA polymerase is added immediately before going into the thermal cycler) and overlay with 50 to 100 µl of mineral oil (if necessary).
5. Transfer tubes directly from ice to the thermal cycler preequilibrated to the initial denaturation temperature (94°C).
6. Perform 30 to 35 cycles of PCR. A typical cycling protocol for cDNA with <1 kb amplified region is:

PAD:	94°C for 1-2 min
Cycle:	
Denaturation:	94°C for 0.5-1 min
Annealing of primers:	55°C for 0.5-1 min
Primer extension:	72°C for 1-2 min
Followed by:	
Final extension:	72°C, 5-7 min
Indefinite hold:	5°C, until samples are removed.

7. Analyze 5-20 µl of 5' RACE products by agarose gel electrophoresis according to standard protocols, using appropriate size standards (19). Either TAE or TBE electro-phoresis buffer may be used for the procedure. The volume of the sample used for analysis will depend on the

volume and thickness of the sample well. If products will be extracted for reamplification, ultraviolet (UV) visualization of ethidium bromide-stained products should be performed using either a long wavelength (356-nm) UV or 302-nm wavelength source to minimize DNA nicking.

3.9 Nested Amplification

Often a single PCR of 25 to 35 cycles will not generate enough specific product to be detectable by ethidium bromide staining. Increasing the number of cycles performed during the PCR beyond 35 cycles may generate numerous nonspecific products and is not recommended. Similarly, high target levels may exacerbate amplification of non-specific products during PCR and contribute to the production of a heterologous smear of PCR products. Instead, a dilution of the original PCR (0.1 to 0.05%) can be reamplified (7) using the AUAP or UAP and a nested GSP (see figures 1 and 2, see Chapter 4 for more information). If there is insufficient sequence information to design a nested GSP, re-amplification of gel purified, size-selected PCR products using the UAP, or AUAP, and original GSP is useful for enriching specific 5' RACE products or installation of dUMP-cloning sequences for UDG cloning. Nested PCR may also be conveniently conducted using a plug of agarose from the gel analysis of the initial 5' RACE reaction (see section 6.5) (63).

1. Dilute a 5 μ l aliquot of the primary PCR into 495 μ l TE buffer [10 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 1 mM EDTA].
2. Equilibrate the thermal cycler block to 94°C.
3. Add the following to a 0.2 or 0.5-ml thin-wall PCR tube sitting on ice.

Component Volume (μ l)

sterilized, distilled water.....	33.5
10X PCR buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]	5.0
25 mM MgCl ₂	3.0
10 mM dNTP mix.....	1.0
nested GSP (prepared as 10 μ M solution).....	1.0
AUAP or UAP (10 μ M).....	1.0
dilution of primary PCR product	5.0
final volume	49.5

4. Add 0.5 μ l of *Taq* DNA polymerase (5 units/l) immediately before mixing.
5. Mix the contents of the tube (*Taq* DNA polymerase is added immediately before going into the thermal cycler) and overlay with 50 to 100 μ l of mineral oil (if necessary).
6. Transfer tubes directly from ice to the thermal cycler preequilibrated to the initial denaturation temperature.
7. Perform 30 to 35 cycles of PCR.
8. Analyze 5 to 20 μ l of the amplified sample, using agarose gel electrophoresis, ethidium bromide staining, and the appropriate molecular size standards.

Sequenzierungs- und Klonierungsprimer spezifisch für EBOV-Reston

3'			
kb			
0		#1044	ResLeaRibFbis(1) #1126 Res-lea+/XmaI(1)
		#1015	ResLeader-F/(2) #1017 ResLeadRibF(2)
		#1016	ResLeader-R(23) #1018ResLeadRibR(23) #1045ResLeaRibRbis(23)
		#955	Res-NP(140)-R
		#860	Res-NP-R/(144)
		#861	Res-NP-R/(204)
		#789	Res-NP-F(301)
		#987	Res-NP-(338)-R
		#988	Res-NP-(443)-R
		#824	ResNP(458)F/EcoRI
		#823	Res3'-466R/NdeI(466)
		#805	Res-NP-F/(907)
1		#678	Res-35-R/XhoI/(1168)
		#809	Res-NP-R(1535)
		#796	Res-NPm/2693(1687)
		#795	Res-NPv/1803(1796)
2		#825	ResNP(2741)R/NotI
3		#679	Res-30mR/NdeI/(3008)
		#677	Res-35-F/EcoRI/(3060)
		#733	Res-35R-313/(3292)
		#752	Res-35F/402/(3381)
		#732	Res-35F-932/(3914)
4		#831	Res24F-S34.3(4422)
8		#777	Res-GP-F/1989(8013)
		#826	Res30/8481F/EcoRI(8483)
		#791	Res-30-F/(8668)
		#808	Res-30-L-F/310(8976)
9		#827	Res30-(9401)R/XhoI
		#848	Res-VP24-F-S13y1(9883)
10		#847	Res-VP24-R-S15y2 (10333)
		#832	Res24R-S34.3.1(10801)
11		#807	Res-30-L-F(11219)
		#813	Res-VP30II196F(11490)
		#979	Res-L-F/1951/XmaI (11546)
		#1192	ResLFlagF1431(11552)
		#830	Res-L-F-33y9(11762)
12		#1193	ResL-R1973(12078)
		#829	Res-L-R-S32y8(12883)
13		#810	Res-L-R(13133)
		#811	Res-L-F(13226)
		#849	Res-L-F-S29y5(13692)
14		#981	Res-L-F/4491/(14076)
		#980	Res-L-R/4511BamHI (14087)
		#851	Res-L-F-S21y6(14122)
		#816	Res-L-F/(14670)
15		#846	Res-L-F-S17y1(15021)
		#853	Res-L-F-S18y3(15468)
16		#983	Res-L-F/6618/(16203)
		#852	Res-L-R-S17y2(16204)
		#982	Res-L-R/6636/NruI/(16206)
		#845	Res-L-R-S18y2(16661)
		#858	Res-L-F-S18y2(16748)
		#843	Res-L-S-F18y2(16913)
		#857	Res-L-F-S18y2(16959)
17		#939	Res-seq24y7F/R(17119)
		#936	Res-seq24y7F/F(17278)
		#937	Res-seq24y7F/F(17307)
		#938	Res-seq24y7F/F(17345)
		#953	Res-S23y5-F/(17587)
		#954	Res-S20y2-F/(17772)
18		#984	Res-L-R/8621/BamHI/ (18192) #1035Res-TR-F18188/NotI (18192)
		#985	Res-L-F/(18483)
		#986	Res-L-F/(18570)
		#952	Res-S20y2-R/(18577)
5'		#1036	Res-TR-R(18894)/ ClaI/XmaI/SmaI #1127Res-trai+/RsrII(18894)

Ebolavirus Reston Subtyp Pennsylvania

1 ccggacacac aaaaagaaaa aagggtttttt aagacttttt gtgtgcgagt
 51 aactatgagg aagattaaca gttttcctca gtttaagata tacactgaaa
 101 ttgagattga gattctcctc tttgctattc tgtaactttc cctggttgtg
 151 acaattgaat cagttttatc tattaccaat taccatcaac atgggatgtc
 201 tagtgatctt gggactcttc ttcattctgg ttttcctaga gctctgaatc
 251 catttcgcga gaagttcatc caaacgaccc agtgtctgaa aatacaaaaag
 301 gttccccttt ccgtcaagtt taaggggttg ttttgattgt gtgtagattt
 351 tataatccta gagtgccaag gaggttgcgt tcatcattga ttgggaagat
 401 caaggaaaca atttgttcca ataatatcgt acatcttgac taagtcgaac
 451 acggggaagt cgatatggat cgtgggacca gaagaatctg ggtgtcgcaa
 501 aatcaagggtg atactgattt agattatcat aaaattttga cagctgtcct
 551 tactgttcaa cagggatttg tcaggcagaa aataatttct gtatatcttg
 601 ttgataactt ggaggctatg tgtcaattgg taatacaagc ctttgaggcc
 651 ggaattgatt tccgagaaaa tgccgacagc ttccttctga tgctttgcct
 701 acatcatgct taccaagggtg actataaatt gttcttgagg agcaatgctg
 751 tacagtattt ggaaggctat ggattcaaat ttgagctccg gaagaaggac
 801 ggtgtcaatc ggctcgagga attgcttctc gctgcaacga gtggaaaaaa
 851 catcaggcgt acgttggccg cactgcctga agaggagact acagaagcaa
 901 atgcagggca atttctctca tttgcgagtc tgtttcttcc caaactggtt
 951 gtgggagaga aggcttgctt ggaaaaagtc cagcgacaaa ttcaggttca
 1001 tgcagaacag ggtttaattc aatatcccac tgcattggca tcagttggac
 1051 acatgatggg aatcttcaga ttgatgagga ctaatttctt gattaaatat
 1101 ttactgatcc accagggtat gcataaggta gctggccacg atgccaatga
 1151 tgctgtcatt gctaattcag ttgctcaggc tcgcttttca ggactcctaa
 1201 ttgtcaaaac cgttcttgat catattctgc aaaaaaccga ccaaggagta
 1251 agacttcacc ctttggcccg aacagccaaa gtgctgaatg aggttaatgc
 1301 atttaaggcc gccctaagct cacttgctaa gcatggggaa tatgccctt
 1351 ttgctcgcct tctcaatctc tcgggagtta acaacctaga acatggtctc
 1401 taccacagct tatcagcaat tgctcttgga gttgccacag cacatggtag
 1451 cacccttgca ggagttaatg ttggtgagca gtatcagcag cttagagagg
 1501 ctgccactga agctgagaag caactccaac aatatgctga gtccagagaa
 1551 ctcgacagcc taggcctgga cgatcaggaa ggaagaatac taatgaactt
 1601 ccatcagaag aaaaacgaaa ttagtttcca gcagaccaat gcaatggtaa
 1651 cccttaggaa agagcgactg gctaaattaa cagaagctat aacgctggcc
 1701 tcaagacctt acctcgggtc tagacaagac gacggcaatg aaataaccgtt
 1751 ccctgggcct ataagcaaca acccagacca agatcatctg gaggatgatc
 1801 ctagagactc cagagacacc atcattccta atgggtgcaat tgaccccag
 1851 gatggtgatt ttgaaaatta caatggctat catgatgatg aagttgggac
 1901 ggcagggtgac tgggtcctgt tcgatcttga cgatcatgag gatgacaata
 1951 aagcttttga gccacaggac agctcgccac aatcccaaag ggaaatagag
 2001 agagaaagat taactcatcc acccccaggc aacaacaagg acgacaatcg
 2051 agcctcagac aacaatcaac aatcagcaga ttctgaggaa caaggaggctc
 2101 aatacaactg gcaccgaggc ccagaacgta cgaccgcaa tcgaagactc
 2151 tcaccagtgc acgaagagga cacccttatg gatcaagggtg atgatgatcc
 2201 ctcaagctta cctccgctgg aatctgatga tgacgatgca tcaagtagcc
 2251 aacaagatcc cgattataca gctgttgccc ctctgctcc tgtataaccg
 2301 agtgcagaag cccacgagcc tccccaaaa tcctcgaacg agccagctga
 2351 aacatcacia ttgaatgaag accctgatat cggatcaatc aagtctatgc
 2401 aaaaattaga agagacatat caccatctgc tgagaactca aggtccattt
 2451 gaagccatca attattatca catgatgaag gatgagccgg taatatttag
 2501 cactgatgat ggggaaggat acacctaccg ggattcactt gaggaagcct
 2551 atcctccatg gctcaccgag aaagaacgac tggacaaaaga gaatcgctac
 2601 atttacataa ataatacaaca gttctcctgg cctgtcatga gtcccagaga
 2651 caaatttctt gcaatcttgc agcaccatca gtaaccacag cacaaagcgc
 2701 ggtccacttc gtaaagctaa atacacttaa gacttgaccg attcatctac
 2751 aaaaactaat ccattataac ttattagtgc tacttttcta taagtgattc
 2801 ttaatctaag gccattaaga gtttaagtaa tatacatata cacttacacc
 2851 ggtctatcca agatgtggct caatgttctt gatttgaaca tagtcataag
 2901 gggataaata atactttata tttctgattg tggattgacc cattctgctt
 2951 aaaatgcttc gccattgaa aatgtgatct aatagatagc cctgactaga

3001 caaattaaga aaaacatttg atgaagatta aaaccttcat cgccagtaaa
3051 tgattatatt gtctgtaggc aggtgtttac tccaccttaa atttggaat
3101 atcctacctt aggaccattg tcaagaggtg cataggcatt accacccttg
3151 agaacatgta caataataaa ttgaaggatg gttcaggccc agaaacgact
3201 ggatggattt ctgagcaact tatgacaggt aagattccag taactgatat
3251 attcattgat attgataaca agccagatca aatggaagtc cgactcaaac
3301 catcatcaag gagctcaaca agaacttgta caagtagcag tcagacggag
3351 gtcaactatg tacctctcct taaaaagggt gaggatacat taactatgct
3401 agtgaatgcc accagtcgtc agaatgctgc aatcgaggcc cttgaaaacc
3451 gcctcagcac acttgagagt agcttaaagc caatccaaga catgggtaaa
3501 gtgatttcat cattgaaatcg cagttgtgcc gaaatggttg caaaatatga
3551 tcttctagtt atgacaactg gacgggctac ttcaactgca gctgcagtag
3601 atgctgattg gaaagagcac aaacagccac caccagggcc agcgttgtat
3651 gaagagaatg cgcttaaagg aaaaatcgat gatcctaaca gctatgtacc
3701 agatgctgtg caagaggctt acaagaacct tgacagtaca tcgaccctga
3751 ccgaggaaaa ttttgggaaa ccttatatat ctgctaaaga cctgaaggag
3801 atcatgtatg atcatctacc tggttttggg actgcctttc accaacttgt
3851 tcaagtgatt tgtaaaatag gaaaggataa caaccttttg gacacaatcc
3901 atgctgagtt ccaggcaagt ctagcagatg gtgactctcc ccaatgtgca
3951 ctcatacaga taaccaaag ggtcccaatc ttccaggatg tgccgcccc
4001 gataatccat attagatccc gtggtgacat cccacgagca tgccaaaaga
4051 gtctccgacc agcaccacca tcacccaaaa ttgatcgtgg ttgggtttgt
4101 ttgtttaaga tgcaagatgg taaaacgctt ggacttaaga tctaagaatc
4151 aagatttatt taacaaggca agccacaacc ttagatggaa cctcagccag
4201 actattgaac tattgacgct gttgatgata atatataatt aatggctcta
4251 tttgaaatag acaacatctt gcttcttgtt ctgccttgta gctctttgaa
4301 ttggaagatc attccaaact tacaacatg cacaagatgt taaggtttag
4351 caaagaattg ataggagtac tggatatata tgtaaataa ataagtatg
4401 aagattaaga aaaaccagtc ggtattttcc agacttggca tttcttatct
4451 tcatcttcta aagtgagata ttttatcatc aaaaaatgag gcgcggagtg
4501 ttaccaacgg ctctccagc atataatgat attgcatacc ctatgagcat
4551 actcccaacc cgaccaagtg tcatagtcaa tgagaccaa tcagatgtac
4601 tggcagtgcc aggggcagat gttccatcaa actccatgag accagtggtc
4651 gatgataaca ttgatcactc aagccatact ccaagcggag tagcttctgc
4701 ctttatattg gaagctacag tgaatgtaat ttcgggaaca aaagtcctga
4751 tgaagcaaat acctatgtg cttccactgg gtgtagctga tcagaagata
4801 tacagctttg attcaacaac agccgcaatt atgttggctt cctacacagt
4851 gacacacttc ggggaagatat ctaacccgct ggtacgtgtc aacaggctag
4901 gcccaggaat acccgatcat ccgttccggc tcttgaggtt gggcaaaaaa
4951 gcgttccctc ccgggtttgt tcttccacca gtccagcttc cccagtattt
5001 cacatttgat ctaacagctc taaagctcat cactcaacca ttgccagctg
5051 caacctggac agacgaaact ccagcaggag cagtcaatgc tcttcgtcct
5101 gggctctcac tccatcccaa gcttcgtcca attctcctgc cggggaagac
5151 aggaaagaaa ggacatgctt cagacttaac atcacctgac aagattcaaa
5201 caatcatgaa tgcaataccg gacctcaaaa ttgtcccgat ttgccaacc
5251 aagaacatag ttggaattga ggtccagaa ttactagttc aaagctgac
5301 cggcaaaaaa ccacaaccca aaaaatggcca accaattatt ccagttcttc
5351 ttccgaaata tgttggactt gatcctatat cgccagggga cttaactatg
5401 gttatcacc aggattgtga ttcatgccac tctccagcca gccatacgt
5451 tcacatggac aagcagaata gttaccaata atttaaattc cattcgagct
5501 attattctgc tagtaattcc gacgggatca atagactaaa aatctgattg
5551 tatagaatta taaaagaatc aagcagaggc aacagactca cagcttacgc
5601 ctagataact aatattaagg agttttttaa tctaattttc cagtcttgag
5651 taataatcat ttcttttgta attaattatg catttgtaa cttatcggtg
5701 cgagatttcc ttgagaacct ggcggagctt ctactatctg cagtaaccag
5751 aagagaagtt caaccagtc aaaactaaac caagcaatat tctgaatgct
5801 ctatagtcta ttctaactcag aggtataaca atggctaaga tttcaatgac
5851 tcgttaacaa tcgctagtaa ttttaatctc cagattaaga aaaagatata
5901 cgatgaagat taaggcgaca acgagccgaa acttcatctc ttttaaagat
5951 ctaacattat ctgttccaaa gtcatacaag gacacattca aatcagggat
6001 tgtaagctgc tatttcttac ctccccaaat tacctataca acatggggctc
6051 aggatatcaa cttctccaat tgcctcggga acgttttctg aaaacttctg
6101 tcttagtatg ggtaatcatc ctctccagc gagcaatctc catgcccgtt

6151 ggtatagtga caaatagcac tctcaaagca acagaaattg atcaattggt
6201 ttgtcgggac aaactgtcat caaccagtca gctcaagtct gtggggctga
6251 atctggaagg aaatggaatt gcaaccgatg tcccatcagc aacaaaacgc
6301 tggggatttc gttcagggtg gcctcccaag gtgggtcagct atgaagccgg
6351 agaatgggca gaaaattgct acaatctgga gatcaaaaaag tcagacggaa
6401 gtgaatgcct ccctctccct cccgacggtg tacgaggatt ccctagatgt
6451 cgctatgtcc acaaagttca aggaacaggt ccttgtcctg gtgacttagc
6501 tttccataaa aatggggctt ttttcttgta tgatagattg gcctcaactg
6551 tcatctaccg agggacaact tttgctgaag gtgtcgtagc ttttttaatt
6601 ctgtcagagc ccaagaagca tttttggaag gctacaccag ctcatgaacc
6651 ggtgaacaca acagatgatt ccacaagcta ctacatgacc ctgacactca
6701 gctacgagat gtcaaatttt gggggcaatg aaagtaacac cttttttaag
6751 gtagacaacc acacatatgt gcaactagat cgtccacaca ctccgcagtt
6801 ccttgttcag ctcaatgaaa cacttcgaag aaataatcgc cttagcaaca
6851 gtacagggag attgacttgg acattggatc ctaaaattga accagatggt
6901 ggtgagtggg ccttctggga aactaaaaaa acttttccca acaacttcat
6951 ggagaaaact tgcatttcca aattctatca acccacacca acaactcctc
7001 agatcagagc ccggcgggaa ctgtccaagg aaaaattagc taccaccac
7051 ccgccaacaa ctccgagctg gttccaacgg attcccctcc agtggtttca
7101 gtgctcactg caggacggac agaggaaatg tgcacccaag gtctaaccaa
7151 cggagagaca atcacagggt tcaccgcgaa cccaatgaca accaccattg
7201 ccccaagtcc aaccatgaca agcggaggtg ataacaatgt accaagtga
7251 caaccgaaca acacagcatc cattgaagac tccccccat cggcaagcaa
7301 cgagacaatt taccactccg agatggatcc gatccaaggc tcgaacaact
7351 ccgcccagag cccacagacc aagaccacgc cagcaccac aacatccccg
7401 atgaccagag acccgcaaga gacggccaac agcagcaaac caggaaccag
7451 ccaggaagc gcagccggac caagttagc cggactcact ataaatacag
7501 taagtaaggt agctgattca ctgagtccca ccaggaaaca aaagcagatc
7551 gttcgacaaa acaccgctaa taaatgtaac ccagatcttt actattggac
7601 agctggtgat gagggggcag cagtaggatt ggcattggatt ccatatttctg
7651 gacctgcagc agaaggcatc tacattgagg gtgtaatgca taatcagaat
7701 gggcttattt gcgggctacg tcagctagcc aatgaaacta cccaggctct
7751 tcaattattt ctgcgggcca caacagaact gaggacttac tcaacttctta
7801 acagaaaagc tattgatttt cttcttcaac gatggggagg tacctgtcga
7851 atcctaggac catcttggtg cattgagcca catgattgga caaaaaatat
7901 tactgatgaa attaaccaaa ttaaacaatga ctttattgac aatcccctac
7951 cagaccacgg agatgatctt aatctatgga cagggtggag acaatggatc
8001 ccggctggaa ttgggattat tggagttata attgctataa tagccctact
8051 ttgtatatgt aagatthttgt gttgatttat tctgagatct gagagagaaa
8101 aatctcaggg ttactctaag gagaaatatt atttttaaaa tttacttgaa
8151 tgctgaccac ttatcttaaa tgagcaatta ataatatggt tttctgcttc
8201 tttgcttgat ttacaatatg atatttctct taataatgat taatatatta
8251 agaaaaactt atgacgaaga ttaaaggaga ggatcgtaa cgggaaaacc
8301 tcccatctcg ttctgcaag ccacgttggg ggtgcttgca gctgagaaca
8351 actccagaga ttgtaggtag aaaggaccaa catttatagg taggggtcag
8401 aaagcaacaa taaccataaa aggagagcct gacattgcta ttaatatcc
8451 tagaacctga tttctaggtt ctagctttaa aatccggatg atggagcatt
8501 caagagaacg gggtagatct agcaacatgc gacataatag ccgggaacca
8551 tacgaaaatc catcaaggtc tcgctcatta tctcgggacc ctaatcaggt
8601 tgatcgtaga cagcctcgaa gtgcatccca aattcgtggt ccgaatctgt
8651 tccatcggaa aaagactgat gcaactatag ttcctccgac tcctaaagat
8701 atatgccccaa cactcaaaaa aggattcctc tgcgatagca aatthttgcaa
8751 aaaagatcac caattggata gcttaaataga tcatgaatta ctactgctaa
8801 ttgcaagaag aacatgtgga attatcgaga gcaattcgca gattacatcc
8851 ccaaaagata tgcgggttagc gaatccaaca gctgaagact tctcacatgg
8901 taatagtcct aaattaacac ttgcagtcct tcttcaaatt gctgaacatt
8951 gggcaaccag agacctaaag caaattgagg actctaaact tagagctctt
9001 ttaacccttt gtgccgtatt aacaaggaaa ttttctaaat cccaactggg
9051 tcttctatgt gagaccacc tacggcatga gggcctcggg caggaccaag
9101 ctgattctgt attagaggtc taccaaagac tccacagtga taaaggaggg
9151 aatthttgagg ctgcccgtg gcaacaatgg gaccgacagt cattaataat
9201 gttcatctct gctthttctca acattgctct ccagatacct tgtgaaagtt
9251 ctagtgtcgt agtctcaggt cttgccacat tgtaccacg acaagacaat

9301 tctacacccat ccgaggcaac taatgatacc acctggtcaa gtacagttga
9351 atagaaaacc actggagcta tttttccacg attgctctca gtcaataaat
9401 taatatagat ataatacgac ttcgggtgtgc aattgtcaag agttccattt
9451 agtaataatg attcttaaaa caatctacta tgcgaattat cgatggatct
9501 accctatattg acggtacatg acttgaatgt aataaggtaa gttggtatct
9551 gaggtatattt gtctagagta tactcaaaat cgtatgtcta gcaaattatc
9601 aatagcaaaag ttaaattctc ctaacctcat attttgatca agtaatcatg
9651 attttatgat aattcttttc agattatcgg tttaatcttt attaagaaaa
9701 aatcatgatt gtagacaatt tactggtagt ccttgggtat ccaagtttat
9751 gaatagagct agagagaatt tgctacttcc gaggtataac tttattatct
9801 gctacttcga atgcctaaaa ccagtaatgc aggatgaaga ttaattgcgg
9851 aggaatcagg aattcaactt tagttcctta aggcctcgtc cgaatcttca
9901 tcagttcgtg agttctttta tagaagtcac tagcttctaa ggtgattata
9951 ttttagtatt aaattttgct aattgcttgc tataaagttg aaatgtctaa
10001 tgcttaaatg aacacttttt tgaagctgac atacgaatac atcatatcat
10051 atgaaaacat cgcaattaga gcgtccttga agtctggcat tgacagtcac
10101 caggctgttc tcagtagtct gtccttggaa gctcttgggg agacaaaaag
10151 aggtcccaga gagtcccaac aggttggcat aaggtcatta acaccagcat
10201 agtcggctcg accaagactg taagcgggtc gatttcaact aaaaagatta
10251 tttcttggtg ttaaacaaa ttccttttgt gtgagacatc ctcaaggcac
10301 aagatggcta aagccacagg ccgatacaat ctctggtccc caaagaaaaga
10351 tatggaaaag ggagtgattt ttagtgatct ttgtaatttc ttgattactc
10401 aaacctgca aggttggag gtttattggg caggaattga gtttgatgta
10451 agtcaaaaag gcatggctct tctgacaaga ctcaaaaaca atgactttgc
10501 tcctgctgg gcgatgaca gaaatctttt cccacatctg ttccagaacc
10551 caaatcggg tattcaatct cccatctggg ctttgagggt aattttggca
10601 gccggattgc aggatcagtt gttagaccat tcattggttg agccattgac
10651 aggggctctc ggtctaattt ctgattggct cctaactaca acgtcaacac
10701 atttcaatct tcgtactaga agcgtaaagg accagcttag tcttcgtatg
10751 ttatctttga tcaggtaaaa catcttgcag ttcatacaaca agcttgacgc
10801 cctgcatgtt gtcaattaca atggtttact cagtagtatt gagatcggga
10851 cttctacaca cacaatcatt ataactcgta caaatatggg ttttctcgtg
10901 gaagttcaag agcctgaca atcagctatg aattctaagc gcccaggacc
10951 agtcaagttc tcattacttc atgagtctgc cttcaaacct ttcactcgtg
11001 ttccacaatc tgggatgcaa tcattaataa tggagttcaa cagtttggtg
11051 gcaatttaac aaggtaatct taaaataagt acatgaatga gaattagttg
11101 tgggtcttat ctagcattgt tgagttaact atctaacta ttttcgctaa
11151 ttgcattgag cactgcta at aggtttgtat cacgttaaag atttggagtg
11201 tatgaattgt gcagatttaa acttggggtt tgccttatgc ttcataagggtg
11251 gtctttttga aatggagatt atcagcattt cttaaaggg aggagttagc
11301 aatcagaaat tggagataaa tggacatcgg gatagaacaa tgcctaacta
11351 ttgggctgct tccattttta catgtgtata taaccaatct tttcctatct
11401 ttgcttataat tgggtgtaact ttattttaat aacatgtcaa tgctatactg
11451 ttaagagaag gtctgaggaa gattaagaaa aaggcctcgt gttcactttg
11501 ttgcccgtcaa gtactcgtg gtttttttct acctaacttc cctcacctat
11551 atggctacce agcatacc caaccggat gcacgtttat cctcacctat
11601 agtcctggat caatgtgatt tggtaactcg agcatgtggg ttatattcat
11651 cttattctct aaatcctcaa ctaaggcaat gtaaattacc aaaacatata
11701 tatgactta agttcgacac aatagtatcc aaatcctaa gtgatacacc
11751 tgtagcaaca ctgccgatag actatttagt accaattctc ctgcttccc
11801 taacggggca cggtgatagg ccattgacc cgacttgcaa tcaattcctt
11851 gatgaaatta ttaattacac tcttcatgat gcagcctttc ttgattacta
11901 tctcaaggca acaggtgcac aggaccattt gacaaacatt gcaactagag
11951 agaagcttaa aaacgaaatt ctaaacaatg attatgtcca tcaattgttc
12001 ttctggcatg acctttctat tttggctcga cgtgggctgc tgaatcgcgg
12051 gaacaaccgt tcaacctggt ttgttcatga tgaattcatt gatattttag
12101 gatatggcga ttatattttt tggagaatac ctttatcatt attaccagtt
12151 actatagacg gggcccaca cgcagcaact gactggtatc aaccgactct
12201 ttttaaagaa tccatcctag ggcatagcca aatcctatct gtgtcaacag
12251 ctgaaatact aattatgtgt aaagatatta tcacctgtag gtttaataca
12301 tcaactgattg catccattgc aaaattagag gatgtagatg tgtctgatta
12351 tcctgacctg agtgatattc ttaagatata caatgctgga gactatgtaa
12401 tatctattct tggctcagag ggttataaga taataaagta ccttgaacca

12451 ctttgtttgg ccaaaatcca actttgctct aaattcacag aaagaaaagg
12501 tcgtttccctc acacagatgc gtttatcagt aataaatgat cttcgggagt
12551 tgatttctaa ccgcagggtta aaggactatc agcaagagaa gattagagat
12601 tttcacaaaa tattattaca attgcaatta tctcctcaac agttttgtga
12651 attattctct gttcaaaaac attgggggca tccaatttta catagtgaga
12701 aagctataca aaaagtaaaa cggcatgcaa ccatccttaa ggctctcaga
12751 cctaagtca tctttgagac atattgtgta ttcaagtaca atattgccaa
12801 gcactatttc gacagccaag gaacttggtta cagtgtaatc tcagacagga
12851 atttaactcc aggactcaac tccgtcataa aacgtaatca ctttccttca
12901 ctaccatga ttaaggatct tctatgggaa ttctatcatc ttaatcacc
12951 tccgttattc tctacaaagg tgattagtga ctttaagtatt ttcacaaag
13001 atagggccac agctggtgaa cagacatggt gggatgcagt ctttgaacct
13051 aatgtgctag gttacaatcc tccaaacaaa ttctccacta aaaggggtgcc
13101 ggaacaatct ctagaacaag aggtttttc aatcgaaagt gtcctgaatt
13151 atgcacagga attacattat ttattaccac agaataggaa tttttccttt
13201 tctctcaaag aaaaggaatt aaatattgga cgaacatttg ggaagctacc
13251 atatctcaca cggaatgtcc aaactttatg tgaggctctg ttagcagatg
13301 gactggccaa ggccttcccc agtaacatga tggtagtaac tgaacgtgga
13351 caaaaagaga gccttcttca tcaggcatca tggcaccaca ccagtgatga
13401 ttttggagag aatgctaccg ttcgagggag tagttttgta actgatttag
13451 agaagtacaa tcttgcatct cgctatgagt tcaactgcacc atttattgag
13501 tactgcaacc attgctatgg tgtgcgtaat gtctttaatt ggatgcatta
13551 tttaatcccg cagtgttaca tgcatgtaag tgattattat aatccgcctc
13601 acaatgttaa tcttagcaat cgagaatatc ctctgaagg cccgagttcg
13651 taccgagggc acttaggagg catagagggg ttacaacaaa aactgtggac
13701 gagtatatcc tgtgcacaaa tctccttagt ggaaattaa actggtttta
13751 agttacgac agcggctatg ggagacaatc agtgataac cgtattgtct
13801 gtttttccac ttgaaacaga cctgaagag caggagcaaa cgcgcaaga
13851 caatgctgca agagtagcag caagtcttgc aaaagtaacc agtgcattgtg
13901 ggatctttct taaaccagat gagacatttg tacactcagg tttcatttat
13951 ttcggaaaaa aacaatatct caatggtgta caattaccgc aatcactcaa
14001 aacagcagca agaatggcac cactctctga tgctatattc gatgatctac
14051 aaggaacact tgccagtatt ggaactgcct tcgaacgtgc tatatcggaa
14101 acgcgacata tctcccatg tctgattgta gcagctttcc atacgtattt
14151 cgccgttcgg attttacaat atcaccatct tggatttaat aaaggcatcg
14201 atttaggaca gttgtcactt agtaaaccat tagactatgg gactattact
14251 ctaacattgg cggttccaca agtccttggg ggattgtctt ttctaaatcc
14301 agaaaagtgt ttttatcgaa acttcggaga tctgtgact tctggacttt
14351 tccagctacg ggtgtacct gaaatgggta acatgaaaga cctattttgt
14401 ccattaatat cgaaaaatcc aggaaattgt agtgccattg attttgcctt
14451 aatccatcc ggattaaatg ttccaggatc acaagacttg acatcctttt
14501 tgcgacaaat cgttaggcgt agtattacc taactgctag aaataagtta
14551 attaacactc tcttccatgc ctctgctgat ttggaagatg agatggtttg
14601 taagtggctc ctttcatcaa accctgtcat gagtgccttt gcagcggata
14651 tttttccag gacaccgagt ggtaaacgtc tccaaatatt aggttatctt
14701 gaagggacca ggactctatt ggctccaaa atcataaaca acaacagtga
14751 gacacctgta cttgataagc tgaggaagat caccctacaa agatggaatc
14801 tgtggttcag ttatttggac cattgtgacc aattactagc agatgctcta
14851 cagaaaatta gttgcacggg ggatttggcc cagattttgc gtgagtatac
14901 atggtcacac atcttagagg gtagatcatt gatcggagcg acattaccat
14951 gtatggtgga gcaattcaaa gtttaagtggc taggacaata tgaaccttgt
15001 ccagaatgtc tcaacaaaaa aggctcaaat gcttatgtct cagttgcagt
15051 caaagatcaa gtggtcagtg cttggcctaa tacttctcga ataagtggga
15101 caatagggag tgggtgcccc tatatagggg caagaaccga ggataaaatc
15151 ggacagcctg ctatcaagcc gcgatgccct tcatctgccc tcaaggaggc
15201 tatagaatta gcatcaaggc tcaactgggt tacacaagga ggttctaata
15251 gtgaacaatt aatccggcct ttcttgggaag cgagagtcaa ccttagtgtc
15301 agtgaagtcc tgcaaatgac accatcacat tattcaggaa atattgtcca
15351 tcgatataac gaccaatata gccgcactc atttatggcg aatcgcagta
15401 gcaatactgc gaccogtctc atagtgtcaa ctaatacact tggagaatth
15451 tcaggtggag ggcaggccgc cagggatagc aatataatth tccagaatgt
15501 tataaatth gcaagttgcc tttatgatat tagattccgg aatacaaca
15551 cctctgatat aaggcataat agggctcatc ttcacctgac agagtgtctg

15601 actaaagagg tcccggccca gtatttgaca tatacaagtg cacttaatct
15651 ggatttgagc cgttatcgtg gtaatgaact aatatatgac tcaaatccac
15701 tgaagggagg attgaactgc aatttaacaa tagatagtc tttagtgaag
15751 ggtcctaggg ttaacatgat tgaagatgat cttctccgct ttccacacct
15801 ttctggatgg gagttagcga aaacgggtgg acaatccatc atctcagaca
15851 atagcaactc atcaacagat ccaatcagta gcggagaaac acgctctttc
15901 acaactcatt ttctcactta ccctcagatt ggccttcttt acagtttcgg
15951 agcagtatta tgcttttata taggcaatac tatcctatgg actaaaaaac
16001 ttgattacga ccagtttcta tattatttgc ataaccagct gcacaactta
16051 cctcatcgag cactccgtgt ttttaaacca acatttaagc atgccagtg
16101 gatgtcccga ttaatggaaa ttgattctaa cttctcaatt tatattggcg
16151 ggacatctgg agatcgaggg ctgtctgatg ctgctcgact gtttcttcgg
16201 acagcaatcg cgagtttttt acaatttctt aaaagctgga tcatcgatcg
16251 ccaaaagaca attcctttat ggatagtata tccgcttgaa ggtcaacagc
16301 cggaatccat caatgaattt ctacataaaa ttttgggtct gctcaaacaa
16351 ggccccaaaa gtattccaaa ggaggtcagc atccaaaatg atggacattt
16401 ggatttggca gaaaataatt atgtttacaa tagtaagagc actgctagta
16451 atttcttcca tgcacctta gcttactgga gaagtaggaa atctcggaaa
16501 actcaagacc ataatgattt ctcaagaggg gatggaacac ttacagaacc
16551 cgtgcgtaag ttttcaagca atcatcagtc agatgcaaag tactacaatg
16601 tgacatgtgg aaagtcaccg aagccgcaag aacgcaaaga cttctcgcaa
16651 tacagactca gcaataacgg gcaaacaatg agtaatcatc gtaagaaagg
16701 gaagtccac aagtggaaat cctgcaaaaat gttaatggag agtcaaaggg
16751 gaactgttct aacagagggg gactactttc aaaacaatac tccaccaaca
16801 gatgatgtat caagtccctc ccgactcatt ctaccatttt ttaaattggg
16851 aaatcacaac catgacatg atcaagatgc ccaagaattg atgaatcaaa
16901 atattagca gtacctacat cagctaaggt ctatgttga caccactata
16951 tattgtagat tcacagggat agtctcatcc atgcattaca aattggacga
17001 agttcttcta gaatacaata gtttcgattc agctatcaca ttagtgaag
17051 gtgaggggtc aggggctcta ttacttttgc aaaaatatag tacaaggtta
17101 ttatttttga acacattggc aacagaacac agtatagaat cagaagttgt
17151 atcagggttt tctactccga gaatgttgtt accaataatg caaaaggttc
17201 atgaaggaca agtcaactgt atcttaaata attcatcaag tcacataact
17251 gacataacta gctcaatgtg gctaagtagt aatcaaaaat ataacttacc
17301 ttgtcaagtt gaaatcatta tgatggatgc tgaacaaca gagaacttaa
17351 acaggtccca actctaccga gcagtatata acttaatact tgatcacatt
17401 gatccgcagt atctcaaggt ggtggtactc aaagtatttc tgagtgatat
17451 agaaggaata ttatggatta atgattactt ggctccatta ttcggggctg
17501 gttacttgat taaaccgatt acatcaagtg cccgggtcaag tgaatggtac
17551 ctttgcottat caaatttgat atctactaac aggagatcgg cccatcagac
17601 tcacaaggca tgtcttgggt ttatcagaga tgctttgcaa gcacaagtcc
17651 agcgagggcg gtactgggtg agtcacatcg cacagtatgc tacaagaat
17701 ctccattgtg aatacatagg ccttgggttc ccatctctag aaaaggctct
17751 atatcacagg tataatctag ttgatactgg actcgggtcca ttgtcgtcag
17801 ttattagaca ttaactaac ctccaggcag agatacgaga cttagtatta
17851 gattataacc tgatgagga gagtcgcact caaacgtacc atttattaa
17901 gactgcaaaa ggcagaatca caaagttagt caatgacttt ctgaagtttt
17951 ctttaattgt ccaggcactc aaaaataatt cttcttggta tactgagctt
18001 aaaaaattac ctgaggttat taatgtgtgt aatcgatttt atcactactca
18051 caattgcgaa tgtcaggaaa aattctttgt ccagacgctt tatttacaac
18101 gcctacgoga tgcagaaatc aagctaattg aacgccttac cgggttaatg
18151 cgattttatc cagaaggggt aatatattcc aatcacacat aggtactaaa
18201 tcatcatagt atgaggaata agataatgat aattcctgac gacagtttta
18251 gttccgattc taagtatatc ggaagagagt atgccaatct taattgtag
18301 aggtaacaag ctattagtta ttacttattg ataagaatac actttatcat
18351 agcgtaacac atcataactt tataacgatt ttgcatttct aatcctagta
18401 tttattagaa tgtactacca gagaaatgac cccagttcct atctttaa
18451 aatgattgtg tgtattaaat tattagttta ttaggtttat gaggttggtta
18501 cacagtgagt attagtaatt gaggattatg tagataggta atctaacact
18551 gaatcaccca tctgatgtca ccatatcaa atgttgtgct agtcgcattt
18601 aaacatgcta tcttcagtta agtaacatag gctgaaaatg ctaagaagag
18651 attggagtaa aagtataaaa taaatttaat taaacttcaa agtgattaaa
18701 tgataatgat cttgggaact cgatatgacc tcaagtcaaa aataatgtca

18751 atataattgt ttagtaatat gagtgataat gtaaattttg ataactaact
18801 agcttttagta gttaagatca aatgcaaaca ttataagaat gttaagcgca
18851 cacaaaaaca ttataaaaaa ccaatttttt cctttttgtg tgtcc

Präsentation der Arbeit auf Kongressen und Tagungen

Yannik Boehmann, Hans-Dieter Klenk, and Elke Mühlberger

Establishing of a reconstituted replication and transcription assay for Ebola Virus Reston and comparison with Ebola Virus Zaire. IUMS The world of microbes, 27th July to 1st August 2002 Paris.

Vortrag

Yannik Boehmann, Hans-Dieter Klenk, and Elke Mühlberger

Establishing of a reconstituted replication and transcription assay for Ebola Virus Reston and comparison with Ebola Virus Zaire. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), 8.-11. April 2002 Erlangen.

Vortrag

Yannik Boehmann, Hans-Dieter Klenk und Elke Mühlberger

Untersuchungen zur Spezifität der transkriptionssignale von Filoviren. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), 14.-17.03.2001 in Dresden.

Poster

Veröffentlichungen in Vorbereitung

- **Boehmann, Y. and E. Mühlberger.** Comparison of the replication and transcription processes of the Ebola virus subtypes Zaire and Reston.
- **Boehmann, Y. and E. Mühlberger.** Role of the intergenic regions for Ebola virus transcription.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk vom Institut für Virologie danke ich für die Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Themas und die Möglichkeit zur selbständigen Bearbeitung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Lingelbach für die Betreuung meiner Dissertation am Fachbereich Biologie bedanken.

Frau Dr. Elke Mühlberger danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung während meiner Promotion, die Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung meines Projekts und Ihre Offenheit für meine Ideen. Mein besonderer Dank gilt Ihr auch für die nicht einfache Erstkorrektur der vorliegenden Arbeit.

Auch bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Stephan Becker möchte ich mich für seine Unterstützung und seine hilfreichen Anregungen bedanken.

Danken möchte ich auch allen anderen Mitarbeitern aus E104 und G23. Dr. Michael Weik, Sven Miller, Sven Enterlein, Kathrin Schlenz, Melanie Grosch, Kristina Brauburger, Verena Krählig, Judith Küsters und Dr. Larissa Kolesnikova, Dr. Jens Modrof, Sandra Bamberg, Peggy Möller, Andrea Di Carlo, Thomas Hoenen und Beate Berghöfer waren jederzeit gerne bereit, fachliche Fragen zu beantworten und sorgten für eine offene herzliche Arbeitsatmosphäre.

Ein besonders herzliches Dankeschön an Bettina Hartlieb für die Korrekturarbeit und die vielseitigen Gespräche.

Bei Angelika Lander bedanke ich mich für die stets guten und einsetzbaren Zellen sowie für die Erfüllung meiner Zellwünsche.

Dr. Rüttger Ebdndt danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz bei aussichtslosen Hardware-Konflikten und für die Beantwortung allgemeiner Computerfragen.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie bedanke ich mich an dieser Stelle für die jederzeit erwiesene Hilfsbereitschaft.