

Aus dem Institut für Virologie

Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Der Einfluss der Phosphorylierung von Marburgvirus NP auf den viralen Lebenszyklus

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Anne Kelterbaum (geb. Brüggemann)

aus Emsdetten

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 21. Juni 2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. S. Becker

1. Korreferent: Herr Dr. M. Lauth

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Taxonomie und Epidemiologie.....	1
1.2 Pathogenese.....	3
1.3 Impfstoffe und Therapie	5
1.4 Morphologie und Genomstruktur	6
1.5 Viraler Replikationszyklus	8
1.6 Reverse Genetik	11
1.6.1 Infektiöser <i>virus-like particle</i> (iVLP) Assay.....	11
1.6.2 Rescue von rekombinantem Marburgvirus.....	13
1.7 Fragestellung	14
2. Material.....	18
2.1 Chemikalien.....	18
2.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.3 Kits	20
2.4 Geräte	21
2.5 Puffer und Lösungen.....	22
2.5.1 Puffer.....	22
2.5.2 Lösungen	23
2.6 Wachstumsmedien.....	24
2.6.1 Wachstumsmedien für Bakterien	24
2.6.2 Wachstumsmedien für Säugerzellen	24
2.7 Nukleinsäuren und Nukleotide.....	25
2.7.1 Nukleinsäuren als Größenmarker	25
2.7.2 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide.....	25
2.7.3 DNA-Oligonukleotide (Primer für Sequenzierungen / Mutagenesen).....	25
2.8 Vektoren und rekombinante Plasmide	27
2.8.1 Vektoren.....	27
2.8.2 Rekombinante Plasmide.....	27
2.9 Proteine, Peptide und Aminosäuren	28
2.9.1 Enzyme	28
2.9.2 Antikörper	28
2.9.2.1 <i>Primärantikörper</i>	28
2.9.2.2 <i>Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzanalysen</i>	28
2.9.2.3 <i>Sekundärantikörper für Western Blot Analysen</i>	29

2.9.3	Proteinmarker.....	29
2.10	Zellen	29
2.10.1	Prokaryotische Zellen.....	29
2.10.2	Eukaryotische Zellen	29
2.11	Software.....	29
3.	Methoden.....	30
3.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1	Amplifikation von DNA-Sequenzen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
3.1.2	Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.1.3	Ortsgerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese	31
3.1.4	Reverse Transkription PCR	32
3.1.5	Aufreinigung von Nukleinsäuren	33
3.1.5.1	<i>Aufreinigung von DNA</i>	33
3.1.5.2	<i>Aufreinigung von RNA</i>	33
3.1.6	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	34
3.1.7	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
3.1.8	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren.....	35
3.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren	35
3.1.10	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen.....	36
3.1.11	Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterien	36
3.1.12	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	36
3.1.13	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
3.1.14	DNA-Sequenzierung.....	37
3.2	Zellbiologische Methoden.....	37
3.2.1	Kultivierung von HEK293-, HUH7- und VeroE6-Zellen	37
3.2.2	Transiente DNA-Transfektion mit TransIT®	38
3.2.3	Transiente DNA-Transfektion mit Calciumphosphat	39
3.2.4	Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot	39
3.2.5	Marburgvirus spezifischer Minigenom Assay.....	40
3.2.6	Marburgvirus spezifischer infektiöser VLP Assay	41
3.2.7	Flotationsanalyse im diskontinuierlichen Nycodenz-Gradienten	44
3.3	Virologische Methoden.....	45
3.3.1	Reverse Genetik von rekombinantem Marburgvirus.....	45
3.3.2	Anzucht und Ankonzentrierung von Viren	46
3.3.3	Bestimmung des Virustiters: TCID ₅₀ -Assay	46
3.3.4	Infektion mit rekombinantem Marburgvirus	47

3.3.5	Immunoplaque-Assay	47
3.4	Biochemische und immunologische Methoden	48
3.4.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	48
3.4.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	49
3.4.3	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)	50
3.4.4	Coomassie®-Färbung	51
3.4.5	Vorbereitung von Proben für die Elektronenmikroskopie (Negativkontrastierung)	51
4.	Ergebnisse	52
4.1	Klonierung und Charakterisierung von MARV NP-Phosphorylierungsmutanten	52
4.1.1	Untersuchung des Laufverhaltens der NP-Mutanten im SDS-Gel	52
4.1.2	Einfluss der Phosphorylierung in Regionen VI und VII auf die Transkription/Replikation	55
4.1.3	Einfluss der Phosphorylierung auf die intrazelluläre Verteilung von NP	56
4.1.4	Einfluss der Phosphorylierung auf die Kolo-kalisation von NP mit anderen viralen Proteinen	57
4.1.5	Flotationsanalyse der NP-Phosphorylierungsmutanten	61
4.1.6	Charakterisierung der NP-Phosphorylierungsmutanten im infektiösen VLP Assay	62
4.2	Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Viren	66
4.2.1	Herstellung rekombinanter Viren	66
4.2.2	Charakterisierung der rekombinanten Viren	67
4.2.3	Infektiosität der verschiedenen Virusmutanten	72
4.2.4	Wachstumsverhalten der S619-Phosphorylierungsmutanten in HUH7-Zellen ...	73
4.2.5	Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf die Virusfreisetzung	75
4.2.6	Die Rolle der dynamischen Phosphorylierung in der viralen Infektion	77
4.3	Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf die Interaktion von NP und VP24 ...	79
5.	Diskussion	85
5.1	Der Einfluss der Phosphorylierung von S602 (Phosphorylierungsregion VI) auf den viralen Lebenszyklus	86
5.1.1	Der Einfluss der Phosphorylierung von S602 auf das Laufverhalten von NP im SDS-Gel	86
5.1.2	Der Einfluss der Phosphorylierung von S602 auf die frühen Schritte der viralen Infektion	87
5.1.3	Der Einfluss der Phosphorylierung von S602 auf die virale Replikation und Transkription	87
5.1.4	Der Einfluss der Phosphorylierung von S602 auf den Zusammenbau und die Freisetzung neuer Viruspartikel	88

5.1.5	Relevanz der dynamischen Phosphorylierung von S602 im viralen Lebenszyklus.....	89
5.2	Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 (Phosphorylierungsregion VII) auf den viralen Lebenszyklus	91
5.2.1	Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf das Laufverhalten von NP im SDS-Gel	91
5.2.2	Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf die frühen Schritte der viralen Infektion	91
5.2.3	Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf die virale Replikation und Transkription	93
5.2.4	Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf den Zusammenbau und die Freisetzung neuer Viruspartikel.....	96
5.2.5	Relevanz der dynamischen Phosphorylierung von S619 im viralen Lebenszyklus.....	97
6.	Zusammenfassung.....	100
7.	Summary	101
8.	Literaturverzeichnis	102
9.	Abbildungsverzeichnis	114
10.	Abkürzungsverzeichnis	116
11.	Veröffentlichungen.....	118
12.	Verzeichnis der akademischen Lehrer	120
13.	Danksagung	121

1. Einleitung

1.1 Taxonomie und Epidemiologie

Gemeinsam mit dem Ebolavirus (EBOV) und dem Lloviuvirus (LLOV) gehört das Marburgvirus (MARV) in die Familie der *Filoviridae*, die ihren Namen der charakteristischen fadenförmigen Struktur (lat. *filum* = Faden) der Viruspartikel verdanken (33, 39, 79, 109, 113). Aufgrund ihres nicht-segmentierten RNA-Genoms negativer Orientierung werden sie gemeinsam mit den Vertretern der *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae* und *Bornaviridae* in die Ordnung der *Mononegavirales* eingruppiert.

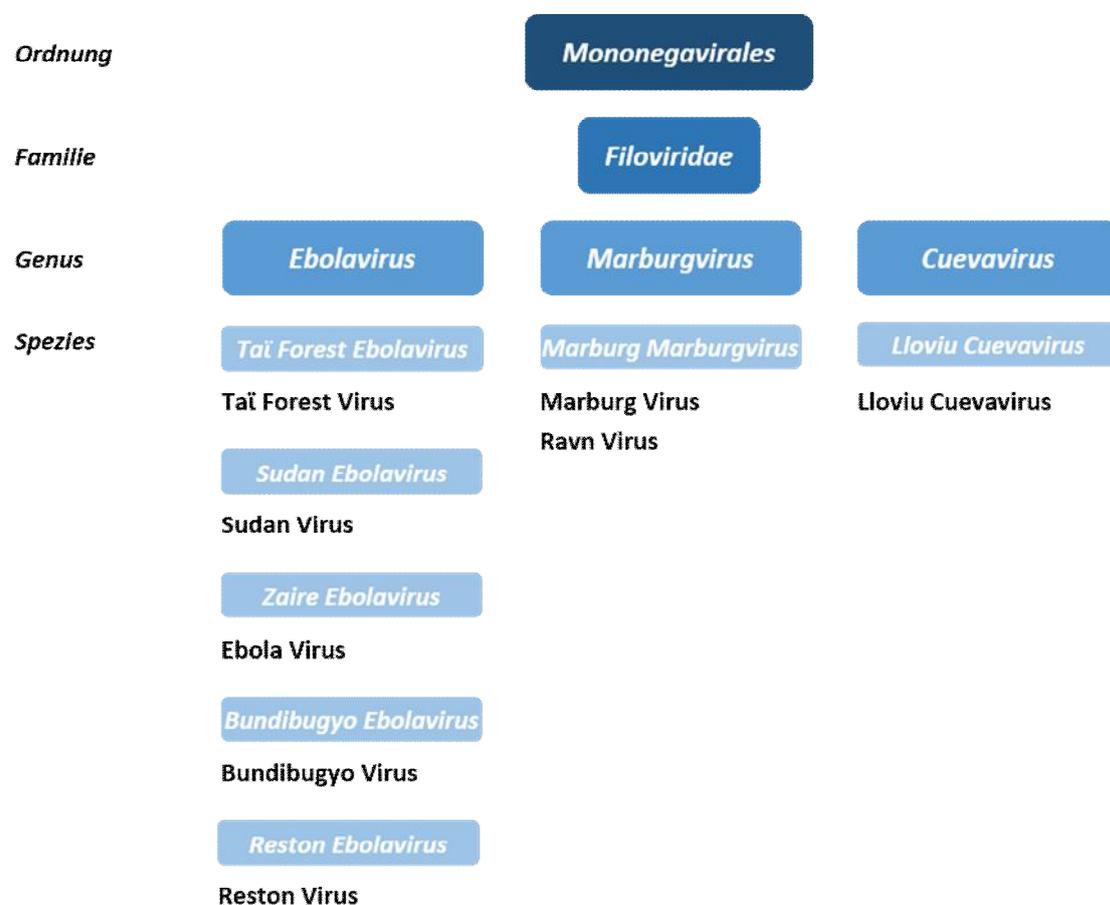


Abbildung 1: Taxonomische Einordnung von Marburgvirus.

Das Genus *Marburgvirus* besteht aus einer Spezies *Marburg Marburgvirus* und beinhaltet zwei Vertreter: das Marburg Virus (MARV) und das Ravn Virus (RAVV). Das Genus *Ebolavirus* wiederum wird in fünf Spezies unterteilt: die humanpathogenen Vertreter sind Taï Forest Virus (TAFV), Sudan Virus (SUDV), Zaire Virus (EBOV) und Bundibugyo Virus (BDBV), der fünfte Vertreter des Genus ist das nicht-humanpathogene Reston Virus (RESTV) (33).

Zum ersten Ausbruch von Filoviren kam es 1967, als Labormitarbeiter und Tierpfleger in Marburg, Frankfurt und Belgrad nach Kontakt mit aus Uganda importierten grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) an einer fiebrigen Erkrankung mit unspezifischen Symptomen und teils hämorrhagischen Verläufen litten. Während dieses ersten Ausbruchs verstarben 7 der insgesamt 32 Erkrankten. Das isolierte Virus wurde nach der Stadt der Erstbeschreibung *Marburgvirus* (MARV) genannt (89).

Der zweite Vertreter der *Filoviridae* wurde 1976 beschrieben und isoliert, als es nahezu gleichzeitig zu Krankheitsausbrüchen in Zaire (heute: Demokratische Republik Kongo) und im Sudan (heute: Südsudan) kam. Das dabei isolierte neue Virus wurde nach einem im Ausbruchsgebiet liegenden Fluss, Ebola, benannt. Diese parallelen Ausbrüche wurden durch Viren aus zwei verschiedenen Spezies verursacht, *Zaire Ebolavirus* mit einer Letalitätssrate von 88 % und *Sudan Ebolavirus* mit einer Letalitätssrate von 55 % (15, 62, 119).

Die Spezies *Reston Ebolavirus* wurde 1989 entdeckt, als in Reston (USA) *Cynomogulus*-Affen, die von den Philippinen importiert worden waren, an einem schweren hämorrhagischen Fieber erkrankten (60). Für den Menschen ist RESTV nicht pathogen, es wurde später auf den Philippinen in Schweinepopulationen nachgewiesen (5, 66).

Der vierte Vertreter des Genus *Ebolavirus*, TAFV, wurde 1994 als erster Vertreter der *Filoviridae* zunächst in Tieren entdeckt, nachdem mehrere Schimpansen einer größeren Population im Taï National Park in der Republik Côte d'Ivoire verstorben waren (34). Bisher wurde nur eine Humaninfektion mit TAFV beschrieben, die nicht letal war und durch direkten Kontakt mit den infizierten Schimpansen verursacht wurde (35).

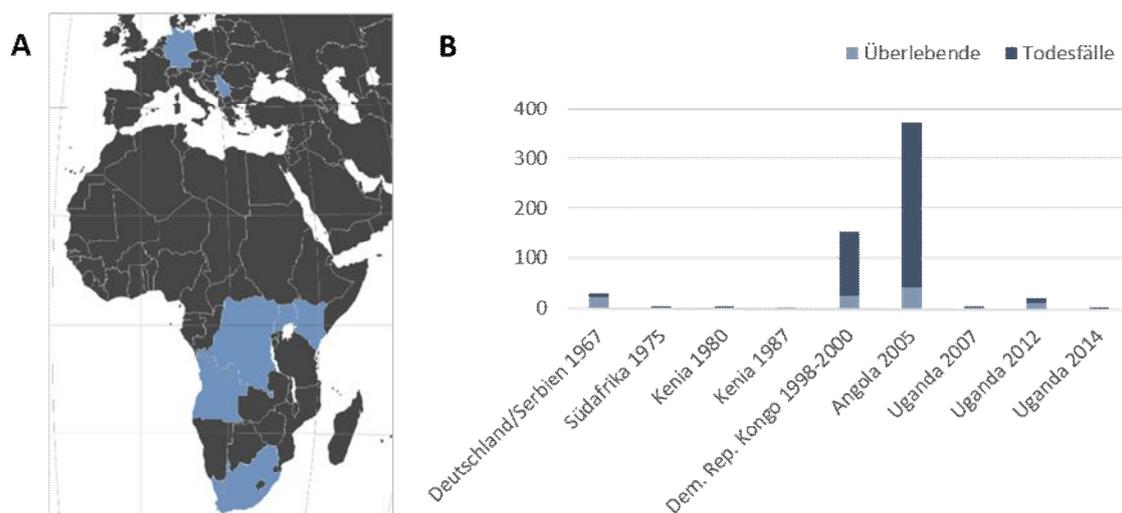


Abbildung 2: MARV-Ausbrüche seit der Entdeckung des Virus.

A. Geographisches Auftreten. Die betroffenen Länder sind farblich hervorgehoben.

B. Fallzahlen und Todesfälle der einzelnen Ausbrüche.

Quelle der Karte: www.mygeo.info

Bundibugyo Virus (BDBV) wurde 2007 als Auslöser eines größeren Filovirus-Ausbruchs im Bundibugyo-Distrikt in Uganda entdeckt, im Vergleich zu SUDV und EBOV waren die Letalitätsraten in BDBV-Ausbrüchen bisher mit ca. 43 % deutlich geringer (86, 140).

Seit der Entdeckung der Filoviren kam es zu vereinzelt größeren Ausbrüchen in verschiedenen afrikanischen Staaten südlich der Sahara. MARV zum Beispiel verursachte zwischen 1998 und 2000 einen Ausbruch in der Demokratischen Republik Kongo mit 154 verzeichneten Fällen und 128 Todesfällen und 2005 in Angola mit 347 Fällen und 329 Todesfällen. Danach kam es zu vereinzelt Infektionen mit nur geringen Fallzahlen, teilweise wurden Touristen infiziert, so dass das Virus in die USA und nach Europa importiert wurde. Zu Sekundärinfektionen kam es allerdings nicht (87).

Bis 2013 waren auch die Ausbrüche, die durch EBOV verursacht wurden, lokal begrenzt und wiesen geringe Fallzahlen auf, die größeren Ausbrüche umfassten bis dahin zwischen 150 und 450 Fälle. Im Dezember 2013 begann der bislang größte Ausbruch, der durch EBOV verursacht wurde, mit über 28.000 registrierten Fällen und über 11.000 Todesfällen. Neben den drei hauptsächlich betroffenen westafrikanischen Ländern (Guinea, Sierra Leone, Liberia) kam es auch hier zu importierten Fällen in anderen afrikanischen Ländern sowie in Europa und in den USA (26, 158).

Das natürliche Reservoir der Filoviren war lange unbekannt (102, 115). Affen werden zwar als wichtiges Element der Infektionskette angesehen (z.B. durch den Import von Affen wie im ersten MARV-Ausbruch oder durch Verzehr von Affenfleisch sowie direkten Kontakt bei der Jagd bei einigen Ausbrüchen in Zentralafrika), da experimentelle Infektionen jedoch für alle Tiere letal verliefen, scheiden sie als Wirt aus.

Mittlerweile wurden Flughunde (*Pteropodidae*) als Wirt identifiziert, ihr Verbreitungsgebiet deckt sich mit dem Auftreten von Filovirus-Infektionen (14, 61, 82, 83, 141). MARV konnte in Nilflughunden (*Rousettus aegyptiacus*) nachgewiesen werden (117, 134, 139, 141), als Reservoir für Ebolaviren werden die Flughundarten *Epomops franqueti*, *Hypsignathus monstrosus* und *Myonycteris torquata* anhand serologischer Daten und RNA-Detektion als Reservoir angenommen (83, 117).

1.2 Pathogenese

Die Übertragung von Filoviren erfolgt über den Kontakt mit Körperflüssigkeiten (Blut, Fäzes, Urin, Erbrochenes, Schweiß) einer infizierten Person, die bereits Erkrankungssymptome zeigt. Das Virus kann über die Schleimhäute (vor allem Augen und Mund) bzw. über Läsionen der Haut in den Körper eindringen. Experimentell ist es zwar gelungen, nichthumane Primaten mit Filovi-

rus-Aerosolen zu infizieren (2), anhand der bisher beschriebenen Verläufe von Filovirus-Ausbrüchen scheint diese Infektionsroute allerdings bei der Mensch-zu-Mensch Übertragung keine Rolle zu spielen.

Nach einer Inkubationszeit von 3 bis 21 Tagen (typischerweise 5 bis 10 Tage) setzen zunächst unspezifische Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall ein. Bei ungefähr der Hälfte der Patienten kommt es zur Ausbildung eines makulopapulösen Exanthems (159).

Der schwere Verlauf des viralen hämorrhagischen Fiebers manifestiert sich als Störung der Blutgerinnung: Im frühen Stadium kommt es zu vermehrten Blutungen an Punktionsstellen der Haut und zu Blutbeimengungen in Urin und Fäzes. Histopathologisch kommt es zu Nekrosen, die zunächst die Lymphknoten, Leber und Milz betreffen, sich im weiteren Verlauf der Erkrankung allerdings auf Niere und Lunge ausweiten können. Im späteren Verlauf kommt es zu einer disseminierten intravaskulären Verbrauchskoagulopathie, die im Endstadium der Erkrankung ca. 8 bis 9 Tage nach Auftreten der ersten Symptome zum Tod durch Multiorganversagen führt (48, 77, 97, 159).

Die primären Zielzellen der Filoviren sind Dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen am Ort des Viruseintritts in den Körper. Diese infizierten Immunzellen gelangen zu den Lymphknoten und transportieren die Viren über die Lymph- und Blutbahn weiter in die primären Zielorgane Leber und Milz, wo es nach dem Befall zu den bereits erwähnten Nekrosen kommt (77, 163).

Die filovirale Infektion führt über zwei verschiedene Mechanismen zu ihrem schweren Verlauf: Zum einen über eine direkte Gewebsschädigung, da viele verschiedene Zelltypen infizierbar sind und die Infektion der Zellen zur Nekrose führt (2, 41, 42, 43, 50, 121). Zum anderen beeinträchtigt die Infektion der Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen die Abläufe der Immunantwort (50). Durch die Infektion von Makrophagen und Dendritischen Zellen wird die Typ-I-Interferonantwort herunterreguliert, es kommt nicht zur Eliminierung des Virus durch das angeborene Immunsystem, so dass sich die Viren weiter verteilen können (3, 143). Weiterhin verhindert die Infektion der Dendritischen Zellen die Ausschüttung von Mediatoren, die T-Zell-Aktivierung bleibt aus, es kommt somit nicht zu einer Bildung von Filovirus-spezifischen Antikörpern. Die sogenannte „Bystander“ Apoptose von Lymphozyten wirkt zusätzlich immunsuppressiv (2, 50), letztendlich führt die Infektion von Makrophagen zur Ausschüttung verschiedenster proinflammatorischer Zytokine (TNF α , IL1 β , IL6, IL10) (2, 37, 42, 43, 50, 131). Die Endothelpermeabilität steigt und es kommt zu intravaskulären Gerinnungsstörungen, so dass letztendlich ein hypovolämischer Schock und Multiorganversagen auftreten (77, 97, 159).

Aufgrund der bis Ende 2013 räumlich und zeitlich begrenzt verlaufenden Ausbrüche mit vergleichsweise geringen Fallzahlen konnten nur wenige Daten zum Langzeit-Gesundheitsstatus von Überlebenden einer Filovirus-Infektion erhoben werden (89). Durch die große Anzahl der Infizierten während des EBOV-Ausbruchs in Westafrika bietet sich nun erstmals die Möglichkeit, solche Daten in großem Umfang zu erheben. Symptome des sogenannten „post-Ebolavirus disease syndrome“ (PEVDS) sind chronische Muskel- und Gelenkschmerzen, Erschöpfung, Anorexie, Kopfschmerzen, Schlafstörungen, Störungen des Kurzzeitgedächtnisses sowie Hörverlust und Sehstörungen (56, 95, 111). Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Persistenz der Viren in bestimmten Körperflüssigkeiten: In der Samenflüssigkeit konnte EBOV-RNA bis zu 9 Monate nach einer Infektion nachgewiesen werden (22), ebenso wird eine Persistenz des Virus in der Augenkammerflüssigkeit für einige Wochen nach Eliminierung des Virus aus dem Blut beschrieben (144). Die sexuelle Übertragung von Filoviren wurde bereits 1967 während des ersten MARV-Ausbruchs beschrieben (90). Eine sexuelle Übertragung scheint auch der Grund neuer EBOV-Erkrankungen in Liberia im März 2015 zu sein, 30 Tage nachdem der EBOV-Ausbruch im Land für beendet erklärt wurde (18, 92). Auch wenn der Anteil der sexuell übertragenen Infektionen im Ausbruch eine eher untergeordnete Bedeutung spielt, so stellt die lange Persistenz eine Gefahr des Auftretens später Fälle dar. Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization, WHO*) erklärt einen Ausbruch nach ihren Richtlinien nach zwei Inkubationszeiten, d.h. 42 Tage, nach Entlassung bzw. Versterben des letzten infizierten Patienten als beendet. Die mögliche deutlich spätere sexuelle Übertragung stellt die betroffenen Länder vor die Herausforderung, auch nach dem Ausbruchsende eine erhöhte Sensibilität in der Bevölkerung und im Gesundheitssystem aufrecht zu erhalten.

1.3 Impfstoffe und Therapie

Bisher existieren keine zugelassenen Impfstoffe oder Therapeutika zur Vorbeugung bzw. Behandlung einer Filovirus-Infektion.

Bereits früh nach der Entdeckung der Filoviren wurden erste Versuche unternommen, einen Impfstoff zu entwickeln. Als erster Ansatz wurden inaktivierte Ganzvirusvakzine mit oder ohne Adjuvans verwendet, bei Impfung verschiedener Spezies in Tierversuchen wurden allerdings widersprüchliche bzw. nicht-reproduzierbare Ergebnisse erzielt (59), außerdem würde die Herstellung eines solchen Impfstoffs in großem Maßstab unter BSL-4-Bedingungen ein massives logistisches Problem darstellen.

Ein anderer Ansatz war die Herstellung von virusähnlichen Partikeln (virus like particles, VLPs), die bei der Expression vom viralen Matrixprotein VP40 und Glykoprotein GP von Zellen in den

Überstand freigesetzt werden. Dieser Ansatz bietet den Vorteil, dass die Herstellung unter geringeren Sicherheitsvorkehrungen stattfinden kann und das virale Antigen auf Partikeln vorliegt, die dem natürlichen Virus auch morphologisch ähneln. Eine Immunisierung mit VLPs schützt sowohl Mäuse und Meerschweinchen als auch nichthumane Primaten vor einer Infektion mit einer letalen Dosis von MARV bzw. EBOV, die Wirksamkeit der Impfung korreliert mit dem Gehalt an GP in der VLP-Präparation (135, 148, 149). Eine Schwierigkeit bei der Herstellung der VLPs ist die Sicherstellung eines gleichmäßigen GP-Gehalts; da die VLPs nicht replikationsfähig sind, müssten zur Erreichung eines Impfschutzes außerdem mehrere Injektionen verabreicht werden.

Aktuelle Impfansätze beruhen auf der Verwendung von rekombinanten nicht- bzw. nur schwach humanpathogenen Viren, in deren Genom der offene Leserahmen für GP eingebracht wird, so dass das filovirale Glykoprotein auf der Virusoberfläche vorliegt. Die am weitesten entwickelten Plattformen beruhen hier auf der Verwendung von nicht-replikationsfähigen Adenoviren oder replikationsfähigen Vesikulären Stomatitis Viren (VSV) (20, 40, 147). Die Ansätze wurden während des westafrikanischen EBOV-Ausbruchs im Rahmen klinischer Studien getestet (21, 58, 130), vor allem die VSV-Vakzine hat in einer Ringvakzinierungsstudie in Guinea eine gute Wirksamkeit gezeigt (49). Die behördliche Zulassung eines Filovirus-Impstoffes ist bisher allerdings noch nicht erfolgt.

Therapeutisch wird im Ausbruchsgeschehen aufgrund der eingeschränkten Versorgungslage in den betroffenen Ländern ausschließlich symptomatisch behandelt (96). Die derzeit in der Entwicklung am weitesten fortgeschrittenen spezifischen Behandlungsmöglichkeiten sind zum einen ein rekombinant hergestellter Cocktail aus Antikörpern gegen drei EBOV-GP-Epitope (ZMapp) sowie eine Behandlung mit small interfering RNAs, (siRNAs; TKM-Ebola), die gegen die EBOV-Proteine VP35, VP24 sowie die Polymerase L gerichtet sind (78, 118). Sowohl ZMapp als auch TKM-Ebola wurden während des EBOV-Ausbruchs in Westafrika an einzelne Patienten verabreicht, eine weitere klinische Entwicklung steht noch aus. In neueren Studien wird auch ein Nukleosidanalogen untersucht, das die Funktion der viralen Polymerase hemmt (150).

Die Entwicklung dieser und weiterer Therapieoptionen wurde vor allem durch den EBOV-Ausbruch in Westafrika vorangetrieben, so dass die Möglichkeiten derzeit vor allem EBOV-spezifisch sind. Die weitere klinische Entwicklung bis zur Zulassung sowie die Entwicklung MARV-spezifischer Therapien stehen aber derzeit noch aus (51).

1.4 Morphologie und Genomstruktur

Filoviren haben eine charakteristische fadenförmige Struktur, elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die Partikel entweder länglich, rund oder hirtensstabförmig geformt sind. Sie besitzen einen Durchmesser von 80 nm und eine Länge von bis zu 1 µm (39). Abbildung 1

zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines MARV-Partikels, seinen strukturellen Aufbau und die Genomstruktur.

Filoviren besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom, das in negativer Orientierung vorliegt und nicht segmentiert ist. Das Genom kodiert für 7 Strukturproteine, die offenen Leserahmen werden von nichtkodierenden Regionen flankiert, die die Transkriptionsstart- und -stoppsignale beinhalten. Am 3'- und 5'-Ende des Genoms befinden sich die hochkonservierten Leader- und Trailer-Sequenzen, die Promotoren für die Replikation und Transkription sowie die Verpackungssignale enthalten (10, 32, 65, 114, 145).

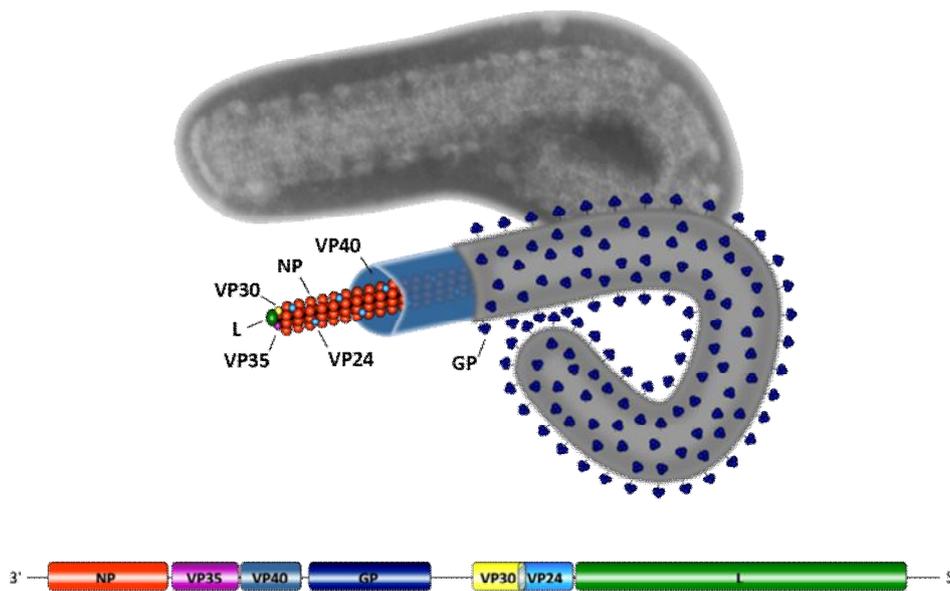


Abbildung 3: Morphologie und Genomorganisation.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Gordian Schudt.

Im Inneren des Viruspartikels liegt das Nukleokapsid vor, das aus der viralen RNA und dem Nukleoprotein NP, dem viralen Protein VP30, dem Polymerasekofaktor VP35 und der Polymerase L besteht (8, 31). Das Nukleokapsid ist die Replikations- und Transkriptionseinheit des Virus. Die viralen Proteine lagern sich hierbei zu helikalen Nukleokapsiden zusammen, innerhalb derer die virale RNA geschützt vorliegt. Den mengenmäßig größten Anteil dieser Nukleokapside macht NP aus, das die virale RNA umschließt und somit vor dem Abbau durch zelluläre Nukleasen schützt, außerdem ist NP essentiell für die virale Replikation und Transkription (106). Dazu interagiert NP auch mit dem Matrixprotein VP40, wodurch der Zusammenbau und die Freisetzung neuer Viruspartikel ermöglicht werden (84, 129). NP ist an Serin- und Threoninresten seines C-Terminus stark phosphoryliert. Während in infizierten Zellen die nichtphosphorylierte und die phosphorylierte Form vorliegen, wird in Virionen ausschließlich phosphoryliertes NP eingebaut (9, 85).

Der Polymerasekofaktor VP35 entspricht dem Phosphoprotein anderer Vertreter der *Mono-negavirales* und ist essentiell für die Bildung des Polymerasekomplexes, da es als bindendes Element die Interaktion von NP und der Polymerase L vermittelt (8, 106, 107). Im Gegensatz zu anderen Vertretern der *Mononegavirales* verfügen Filoviren noch über ein viertes Nukleokapsidprotein, VP30. Für die Replikation und Transkription in einem MARV-spezifischen Minigenomsystem ist VP30 nicht essentiell (106, 155), eine Herunterregulation von VP30 in der Virusinfektion führt allerdings zur Reduktion der Menge aller anderen viralen Proteine in infizierten Zellen, so dass ein Einfluss auf die virale Replikation und/oder Transkription in der Infektion vermutet wird (36).

Dem viralen Protein VP24 wurde lange Zeit eine Funktion als Matrixprotein zugesprochen, neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass auch VP24 mit dem Nukleokapsidkomplex assoziiert vorliegt (10). Die genaue Funktion von VP24 ist bisher weitgehend ungeklärt. Eine Herunterregulierung von VP24 in der viralen Infektion hat keinen Einfluss auf Replikation und Transkription, führt allerdings zur verminderten Freisetzung infektiöser Partikel, so dass ein Einfluss auf die korrekte Bildung der Nukleokapside vermutet wird (4).

Das virale Matrixprotein VP40 hat als klassisches Matrixprotein eine wichtige Funktion im Zusammenbau und der Abknospung neuer Viruspartikel, wobei es den Transport der Nukleokapside aus dem Zytoplasma an die Plasmamembran sowie die Umverteilung des Glykoproteins GP an den Ort des *Buddings* vermittelt (24, 71, 73). Außerdem hat es einen regulatorischen Einfluss auf die virale Replikation (155).

Das GP ist als Typ-I Transmembranprotein in Trimeren in die Virushülle eingebaut und mit der Rezeptorbindung sowie die anschließende Fusion von Virus- und Wirtszellmembran für die initialen Schritte der Virusinfektion verantwortlich (157).

1.5 Viraler Replikationszyklus

Der MARV-Replikationszyklus lässt sich in die Schritte (1) Bindung und Aufnahme, (2) Replikation und Transkription und (3) Zusammenbau neuer Viruspartikel und deren Freisetzung unterteilen. Abbildung 4 stellt schematisch den viralen Replikationszyklus dar.

Die Bindung und Aufnahme von Filoviren wurde vor allem an EBOV genau untersucht, häufig werden für MARV die gleichen Mechanismen unterstellt, auch wenn es relativ wenige MARV-spezifische Studien gibt.

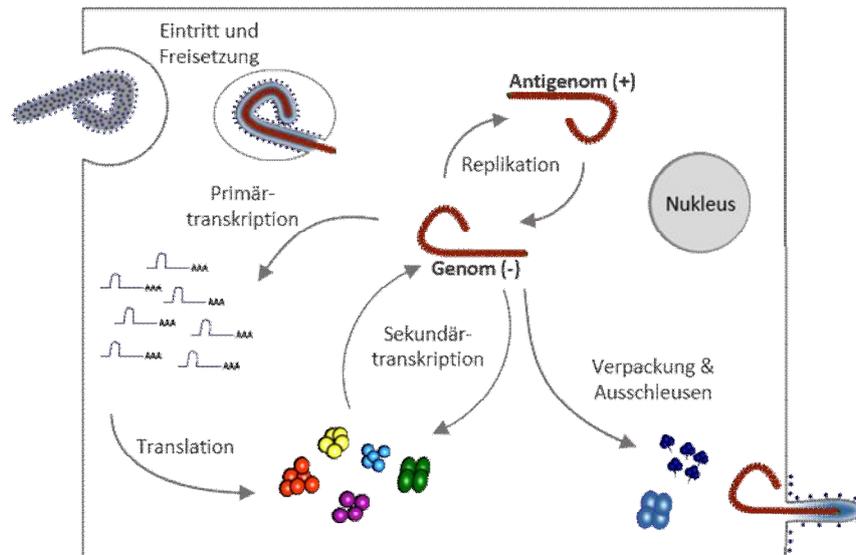


Abbildung 4: Viraler Replikationszyklus.

Zunächst erfolgt die Bindung von MARV an die Zielzelle, hierbei kann das Virus an TIM-1 (T-Zell Immunglobulin und Mucin Domäne-1), an verschiedene zelluläre Lektine des C-Typs, aber auch an andere Oberflächenproteine wie verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen der TAM-Familie binden (7, 44, 76, 91, 94, 126, 136). Die Expression dieser Bindungsfaktoren auf vielen unterschiedlichen Zelltypen erklärt den breiten Wirtszelltropismus von MARV.

Nach der Bindung an die Zelle erfolgt die Aufnahme über Makropinozytose (1, 55, 108, 110, 122). Im späten Endosom / Lysosom wird das stark glykosylierte GP durch Wirtszell-Proteasen proteolytisch gespalten (98). Für EBOV GP wurden die Proteasen Cathepsin B und L identifiziert, diese sind allerdings für die proteolytische Spaltung von MARV GP nicht essentiell. Durch die Spaltung wird die Rezeptorbindedomäne freigelegt, so dass eine Bindung von GP an den endosomalen Cholesterin Transporter Niemann-Pick C1 (NPC1) erfolgen kann (17, 19). Das saure Milieu im Endosom bewirkt eine Konformationsänderung des membrangebundenen GP, wodurch die Fusion von Endosomen- und Virusmembran vermittelt wird, und das virale Nukleokapsid ins Zytoplasma gelangt (67).

Nach der Freisetzung ins Zytoplasma erfolgt zunächst die Primärtranskription, bei der durch den mit dem eindringenden Nukleokapsid assoziierten virusspezifischen Transkriptionskomplex sieben monocistronische mRNAs hergestellt werden, die für die viralen Strukturproteine kodieren und während der Transkription eine 5'-CAP-Struktur erhalten und polyadenyliert werden (105). Der Transkriptionskomplex besteht aus NP, VP35 und L. VP30 wird im MARV Minigenomsystem für die Transkription nicht benötigt (106, 155), andere Untersuchungen zeigen jedoch, dass ein Rescue von rekombinantem MARV ohne VP30 nicht möglich ist und dass bei Untersuchungen mit VP30-spezifischer siRNA die Menge aller anderen viralen Proteine herunterreguliert wird (29, 36). Ein supportiver Einfluss von VP30 auf die virale Transkription und die Replikation kann

somit nicht ausgeschlossen werden. EBOV VP30 hingegen ist ein essentieller Transkriptionsfaktor, für die Replikation wird EBOV VP30 allerdings nicht benötigt (107).

Analog zu anderen Vertretern der Mononegavirales wird der Transkriptionsprozess durch ein Startsignal in der 3'-leader-Region des Genoms initiiert, und der MARV-Transkriptionskomplex transkribiert die einzelnen mRNAs sequenziell entsprechend ihrer Reihenfolge im Genom. Zwischen den einzelnen offenen Leserahmen kommt es zum Stop und zur anschließenden Reinitiation der Transkription. Allerdings ist der Polymerasekomplex an den intergenischen Regionen wahrscheinlich schwächer mit der RNA assoziiert, so dass er sich leichter löst. Da die Transkription nur durch Bindung an der 3'-Leadersequenz wieder gestartet werden kann, entsteht ein mRNA-Gradient, bei dem das Vorhandensein der mRNA vom 3'- zum 5'-Ende des Genoms abnimmt. Dieser Gradient ist in etwas abgewandelter Form auch auf Proteinebene nachweisbar (104, 156).

Die Translation der viralen mRNAs erfolgt durch die zelluläre Translationsmaschinerie an freien Ribosomen im Zytoplasma, lediglich GP wird am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert und über den sekretorischen Transportweg an die Zelloberfläche transportiert (47, 69, 70).

Der Mechanismus, der den Wechsel von Transkription zu Replikation vermittelt, ist bisher unbekannt. Für die Synthese der viralen genomischen RNA wird zunächst ein Antigenom in positiver Orientierung (5'-3') hergestellt, das revers komplementär zum viralen Genom ist. Es dient als Matrize für die Replikation neuer negativsträngiger Virusgenome, wobei sowohl die Genome als auch die Antigenome direkt von den Nukleokapsidproteinen umhüllt werden, um sie vor einem Abbau durch Nukleasen zu schützen (106, 107). Die äußeren 13 Nukleotide der 3'- und 5'-untranslatierten Bereiche sind komplementär, so dass die Bindestelle für den Polymerasekomplex sowohl für den Transkriptionsmodus auf dem negativsträngigen Virusgenom als auch für den Replikationsmodus auf dem Antigenom identisch ist (28, 156). Die so synthetisierten enkapsidierten negativsträngigen Virusgenome werden entweder erneut vom Polymerasekomplex abgelesen oder in neue Viruspartikel verpackt.

Die verschiedenen Komponenten der neuen Viruspartikel gelangen auf unterschiedlichen Wegen an den Ort der Freisetzung: Die neu synthetisierten Nukleokapside akkumulieren im Zytoplasma in perinukleären *inclusion bodies* (9, 72), von wo aus sie über einen aktinabhängigen Transport an die Plasmamembran transportiert werden (125).

Erst in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran trifft das Nukleokapsid auf das Matrixprotein VP40 (125). Da VP40 in transient exprimierenden Zellen sowohl mit den *inclusion bodies* kolokalisiert vorliegt aber auch an der Plasmamembran lokalisiert ist, könnte die Assoziation mit dem

Nukleokapsid an beiden Stellen erfolgen (4). Die Lokalisation von VP24 im Nukleokapsid spricht allerdings dafür, dass der Einbau in den *inclusion bodies* erfolgt (10).

Das Matrixprotein VP40 ist entscheidend für den Zusammenbau und die Freisetzung von neuen Viruspartikeln, in dem es die Nukleokapside und neu synthetisierte membrangebundene Glykoproteine an den Ort der Freisetzung rekrutiert (70, 99).

VP40 selbst wird über den retrograden späten endosomalen Weg in so genannten multivesicular bodies (MVBs) transportiert (73, 74). GP wird während des Transports im Trans-Golgi Netzwerk proteolytisch in die zwei Untereinheiten GP1 und GP2 gespalten, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind und wird ebenfalls in die MVBs transportiert (146). NP trägt auf seinem C-Terminus ein late domain Motiv und rekrutiert dadurch TSG101, ein Protein der zellulären ESCRT-Maschinerie (endosomal sorting complex required for transport), welches die Abschnürung und Freisetzung neuer Viruspartikel verbessert (25, 24).

Die Freisetzung von Viruspartikeln findet vor allem an Filopodien statt, eine Freisetzung von der Plasmamembran ist zwar auch möglich, scheint aber eine eher untergeordnete Rolle einzunehmen. Filopodien sind dynamische, aktinhaltige, filamentöse Ausstülpungen der Zelle, die bis zu mehreren Mikrometern lang sein können. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass die Freisetzung gerichtet ist. Das Nukleokapsid wird somit in einer einheitlichen Orientierung in die Partikel eingebaut und anschließend freigesetzt (30, 68, 10, 124, 154).

1.6 Reverse Genetik

Die sogenannte Reverse Genetik dient der Untersuchung spezifischer Genfunktionen, wobei im Gegensatz zur klassischen Genetik nicht die genetische Grundlage für einen Phänotyp untersucht wird sondern durch gezielte Veränderungen eines Gens (z.B. durch ortsgerichtete Mutagenese, Deletion oder Insertion) das so modifizierte Gen bzw. Genprodukt phänotypisch charakterisiert werden kann. Im hier beschriebenen Kontext erlaubt die Reverse Genetik eine gezielte Veränderung des viralen Genoms zur Herstellung rekombinanter Viren und die Untersuchung ihres Phänotyps. Des Weiteren wurden Minigenomsysteme sowie infektiöse *virus-like particle* (iVLP) Assays entwickelt, die die Untersuchung einzelner Schritte des viralen Replikationszyklus unter BSL-1 Bedingungen erlauben (106, 155).

1.6.1 Infektiöser *virus-like particle* (iVLP) Assay

Der iVLP Assay beruht auf einem MARV-spezifischen Minigenom. Für das Minigenom wurden alle offenen Leserahmen des MARV-Genoms deletiert und durch einen Reporter, in diesem Fall das *Renilla*-Luciferase-Gen ersetzt, die 3'-Leader- und die 5'-Trailer-Sequenzen des viralen Ge-

noms flankieren hierbei das Reportergen. Das Minigenom steht unter der Kontrolle des T7-Promotors, am Ende ist zur Synthese definierter Enden eine Ribozymsequenz des Hepatitis Delta Virus eingefügt (106).

Das Minigenom wird mit Plasmiden, die für die T7-Polymerase und alle viralen Strukturproteine kodieren, in Zellen transfiziert (Abb. 5). Die T7-Polymerase synthetisiert eine Minigenom-RNA, die Expression der viralen Proteine wird durch zelluläre Promotoren kontrolliert. Ausgehend von den durch die zelluläre Transkriptionsmaschinerie synthetisierten viralen mRNAs werden von der zellulären Translationsmaschinerie die viralen Proteine synthetisiert, die die Minigenom-RNA enkapsidieren.

Durch den viralen Polymerasekomplex kann dann analog zum viralen Replikationszyklus die Minigenom-RNA entweder transkribiert oder repliziert werden. Die Transkription führt zur Bildung von *Renilla*-Luciferase mRNA, die durch die Zelle translatiert wird. Die Menge an synthetisierter *Renilla*-Luciferase kann nach Lyse der Zellen und durch eine luminometrische Analyse untersucht werden, sie repräsentiert die virale Replikations- und Transkriptionsaktivität. Da beide Prozesse gleichzeitig ablaufen und neu replizierte Minigenom-RNA wiederum als Matrize für die Transkription dienen kann ist eine Differenzierung der beiden Prozesse in diesem Modellsystem nicht möglich. Durch die große Menge an viralen Proteinen in diesen sogenannten VLP-produzierenden Zellen werden modellhaft eher späte Phasen einer viralen Infektion abgebildet (155).

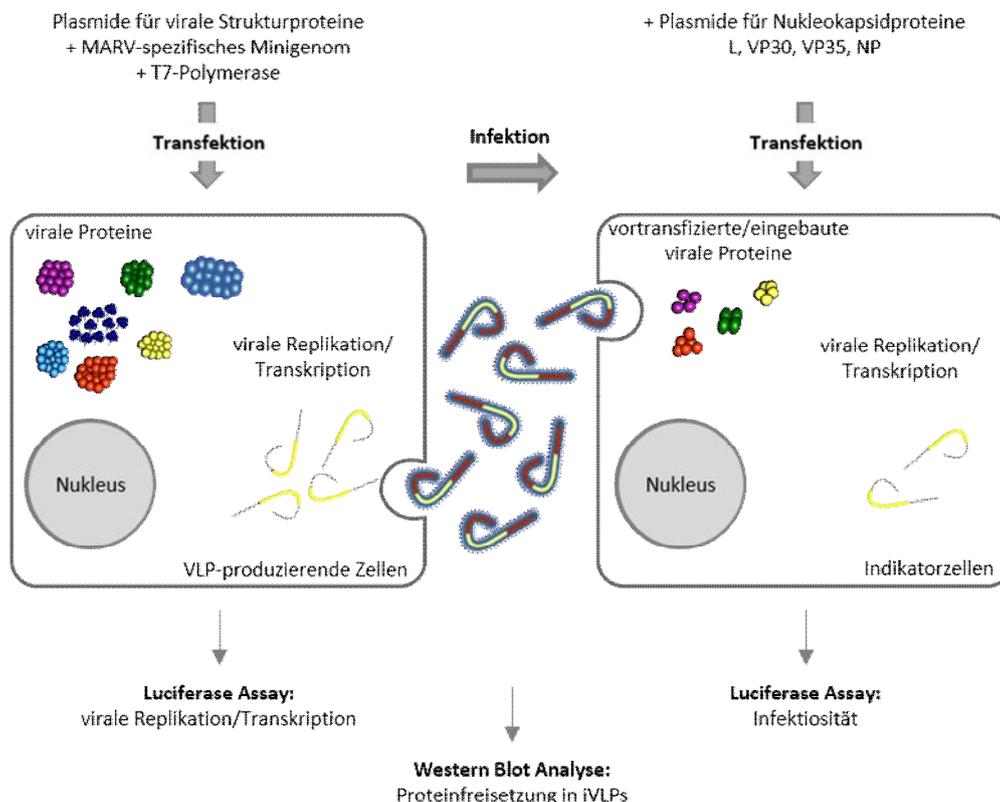


Abbildung 5: Infektiöser VLP Assay.

Da in den Zellen alle viralen Proteine plasmidbasiert exprimiert werden, auch VP40 und GP, können virusähnliche Partikel abgeschnürt und in den Überstand freigesetzt werden. Morphologisch ähneln die freigesetzten Partikel sehr stark MARV-Partikeln, elektronenmikroskopisch lassen sich runde, längliche und 6-förmige Partikel unterscheiden. Da das Minigenom mit 2,2 kb im Vergleich zum 19 kb langen viralen Genom deutlich kürzer ist sind auch die Nukleokapside kürzer, so dass auch die freigesetzten VLPs kürzer sind.

Die freigesetzten Partikel können auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht werden, ebenso können damit neue Zellen infiziert werden, die als Indikatorzellen bezeichnet werden. Die iVLPs infizieren Zellen analog zur MARV-Infektion: Die Partikel werden in die Zellen aufgenommen, das Nukleokapsid wird freigesetzt und die Transkription der Minigenom-RNA startet. Eine Replikation findet nur statt, wenn die Indikatorzellen mit Plasmiden transfiziert werden, die die viralen Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und die Polymerase L exprimieren. Eine enzymatische Messung der Renilla-Reporteraktivität nach Lyse der Indikatorzellen dient als Maß für die Infektiosität der iVLPs. In naiven, nicht vorbehandelten Indikatorzellen dient die Reporteraktivität als Maß für die Primärtranskription, modellhaft können so die frühen Phasen einer Infektion untersucht werden.

1.6.2 Rescue von rekombinantem Marburgvirus

Mit Hilfe der Reversen Genetik können gezielt Mutationen in das virale Genom und damit Aminosäureaustausche in viralen Proteinen eingefügt werden. Auswirkungen der Proteinmutationen können somit im viralen Kontext untersucht werden.

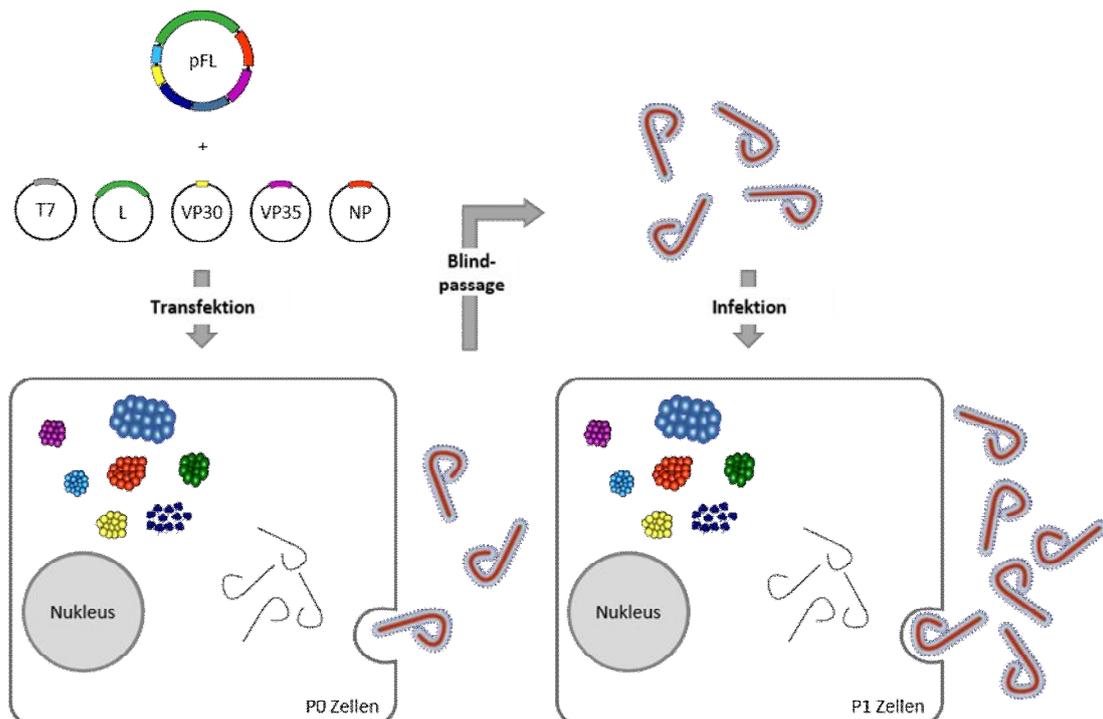


Abbildung 6: Rescue von rekombinantem Marburgvirus.

Ausgangspunkt für die Herstellung rekombinanter Viren ist die Herstellung eines Plasmids, das die vollständige Information des viralen Genoms enthält. Das virale Genom ist in drei kürzere Fragmente unterteilt, die eine Veränderung (Insertion, Deletion, Mutation) mit Hilfe molekularbiologischer Methoden ermöglichen. Nach entsprechender Modifikation des gewünschten Fragments erfolgt die Ligation der einzelnen Bestandteile und des entsprechenden Backbones zum Volllängeplasmid, welches unter der Kontrolle des T7-Promotors steht.

Wie in Abbildung 6 dargestellt wird zum Rescue rekombinanter Viren unter BSL-4-Bedingungen das Volllängeplasmid in Zellen transfiziert. Durch die gleichzeitige Expression der T7-Polymerase wird die DNA in einen RNA-Strang umgeschrieben. Durch die simultane, zellulär kontrollierte plasmidbasierte Expression der viralen Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und L, die als Helferproteine die neu synthetisierte virale RNA enkapsidieren und weitere Replikation und Transkription des Genoms ermöglichen, werden rekombinante Viren synthetisiert und in den Überstand freigesetzt. Die so generierten Viren können analog zum viralen Replikationszyklus neue Zellen infizieren (29).

1.7 Fragestellung

Der Prozess der Phosphorylierung beschreibt das reversible Anhängen einer Phosphatgruppe an ein Molekül, die Phosphorylierung von Proteinen wurde seit den 1950er Jahren untersucht und ist ein wichtiger Mechanismus zur Regulation biologischer Prozesse. Seit dieser Zeit konnten zahlreiche verschiedene Funktionen der Proteinphosphorylierung charakterisiert und beschrieben werden, zu den prominentesten gehören die Signaltransduktion sowie die Konformationsänderung von Proteinen.

Der Insulinrezeptor beispielsweise ist eine Tyrosinkinase, die durch Bindung von Insulin auf der extrazellulären Seite zunächst eine Autophosphorylierung durchläuft und durch diese Phosphorylierung aktiviert wird: Der Rezeptor phosphoryliert nun als Tyrosinkinase weitere intrazelluläre Proteine, so dass eine Signalkaskade aktiviert wird und in der Zelle insulinabhängige Prozesse ablaufen (57, 81, 162).

Ein Beispiel für ein Protein, dass durch eine Phosphorylierung seine Konformation verändert, ist die Glycogenphosphorylase. Die Glycogenphosphorylase liegt als zytosolisches Protein in der Zelle vor und katalysiert dort die Spaltung von Glycogen in Glucose-1-Phosphat. Eine Phosphorylierung des Enzyms führt zu einer Konformationsänderung, durch die es gleichzeitig zur Aktivierung kommt (63, 137).

Posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierung können also den Funktionsbereich von Proteinen erweitern bzw. Enzyme gezielt aktivieren oder inaktivieren. Gerade im viralen

Kontext sind viele posttranslationale Modifikationen beschrieben, durch die auch eine beschränkte Anzahl an Proteinen verschiedene Funktionen erfüllen können: Das filovirale Genom hat eine geringe Kodierungskapazität und kodiert nur für sieben virale Proteine. Das Virus profitiert daher von verschiedenen posttranslationalen Modifikationen der einzelnen Proteine, um auch trotz der geringen Proteinanzahl die vielfältigen Funktionen während des viralen Replikationszyklus erfüllen zu können.

Wie oben beschrieben, ist das Nukleoprotein NP ein essentieller Bestandteil des Ribonukleoproteinkomplexes und des viralen Replikationszyklus. In infizierten Zellen sind zwei Formen von NP detektierbar (92 und 94 kDa), die 94 kDa-Form ist durch Dephosphorylierung in die 92 kDa-Form überführbar. In Viruspartikel wird ausschließlich die phosphorylierte, 94 kDa-Form eingebaut (9).

Neben NP sind für die Filoviren Phosphorylierungen des Matrixproteins VP40 sowie von VP30 und GP beschrieben. Ihre Funktionen konnten teilweise genauer charakterisiert werden (12, 23, 71, 85, 88, 100, 101, 123). Das unterschiedliche Phosphorylierungsmuster von NP in infizierten Zellen im Vergleich zu Viruspartikeln deutet darauf hin, dass die beiden Formen unterschiedliche Funktionen wahrnehmen können bzw. möglicherweise Interaktionen mit anderen viralen oder zellulären Proteinen vom Phosphorylierungsstatus von NP abhängen.

Es sind nur Serine und Threonine phosphoryliert, in Untersuchungen mit Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass ausschließlich Phosphorylierungen am C-Terminus, im Bereich der Aminosäuren S404 bis S619 vorkommen. Auch wenn sich im konservierten N-Terminus von NP viele potentielle Phosphatakzeptorstellen befinden, konnte in Untersuchungen zur Lokalisation der phosphorylierten Aminosäuren im NP keine Phosphorylierung des N-Terminus festgestellt werden (85). Dies könnte darauf hindeuten, dass dieser Bereich des NP nicht für Kinasen zugänglich ist, sondern durch die NP-Homooligomerisierung im Inneren des Nukleokapsids geschützt ist.

Es wurden sieben Phosphorylierungsregionen (I-VII) beschrieben, die in Abbildung 7 A schematisch dargestellt sind. Von den beschriebenen Regionen wurde bisher nur die Phosphorylierungsregion II (S446 – T472) genauer untersucht. Charakteristisch an dieser Region ist ein Serincluster, das aus sechs aufeinanderfolgenden Serinen besteht (S450-455). Die wichtigsten Phosphatakzeptorstellen der Region sind das Serin S446 sowie innerhalb des beschriebenen Clusters die Serine S453-455. Die Phosphorylierung in Region II hat keinen Einfluss auf die Interaktion mit VP30 oder VP35, allerdings moduliert sie die virale Replikation und Transkription. Im iVLP Assay konnte modellhaft gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Serine S453-455 die Replikations- und Transkriptionsaktivität in frühen Phasen der Infektion steigert (23, 85).

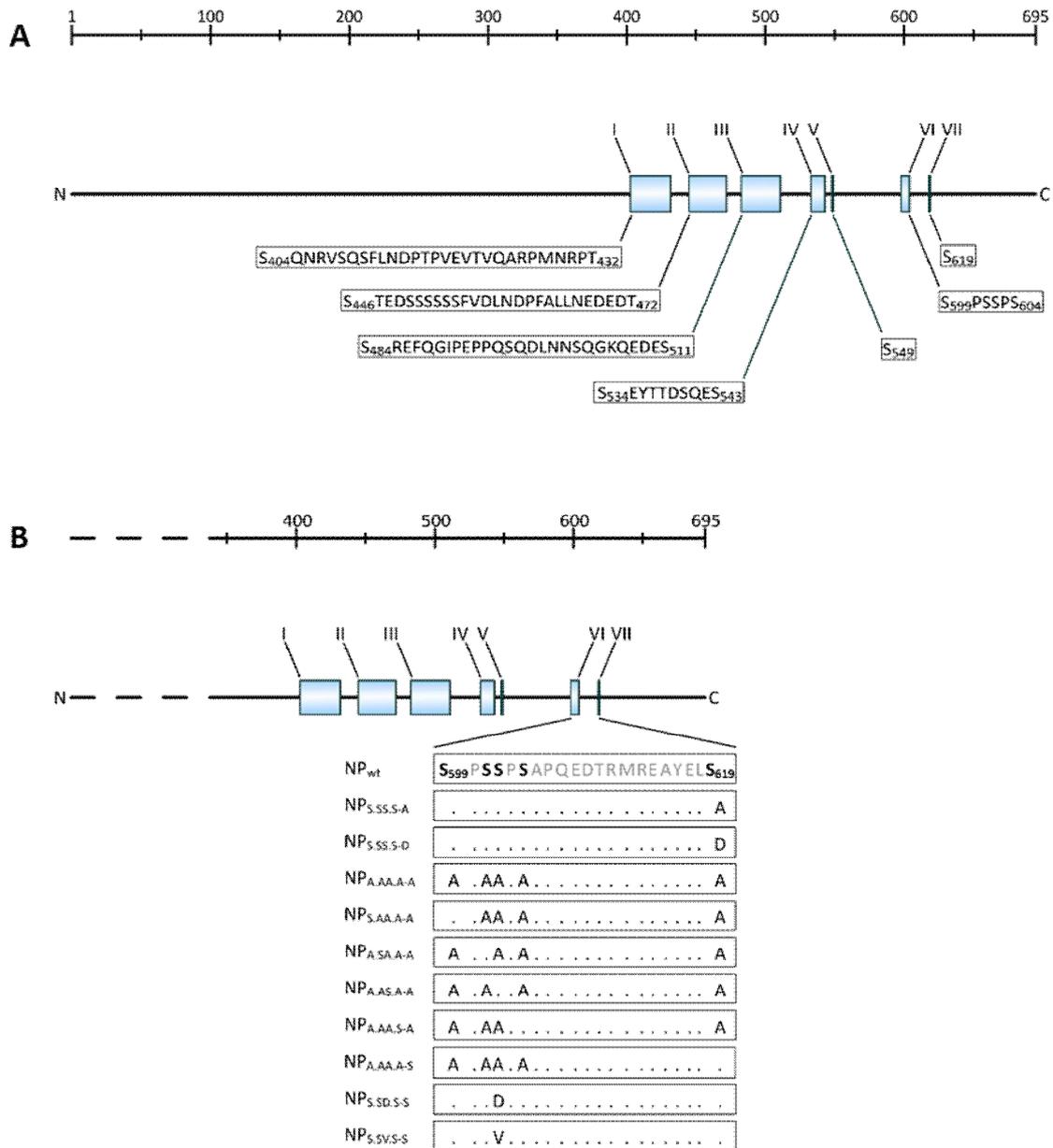


Abbildung 7: Schematische Darstellung der NP-Phosphorylierungsregionen.

A. Schematische Struktur von MARV NP, Aminosäuresequenzen der Phosphorylierungsregionen I bis VII (adaptiert nach Lötfering et al., 1998).

B. Aminosäuresequenz der Phosphorylierungsregionen VI und VII, Auflistung und Nomenklatur aller untersuchten NP-Phosphorylierungsmutanten. Die potentiell phosphorylierbaren Serine in beiden Regionen sind in der NP_{wt}-Sequenz hervorgehoben. Für die Phosphorylierungsmutanten sind jeweils nur die im Vergleich zu NP_{wt} veränderten Aminosäuren hervorgehoben.

Neben der Phosphorylierungsregion II wurden bisher keine weiteren Regionen funktionell untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, die C-terminalen Regionen VI (S599-S604) und VII (S619) genauer zu untersuchen und funktionell zu charakterisieren, in beiden Regionen sind nur Serine als Phosphatakteptorstellen vorhanden, Region VII besteht nur aus einem einzelnen Serin.

Es sollte zunächst untersucht werden, ob einzelne Serine in den Regionen VI und VII für das unterschiedliche Laufverhalten der NP-Phosphorylierungsformen im SDS-Gel verantwortlich sind.

Die Mutagenese potentieller Phosphatakzeptorstellen zu den sogenannten phosphomimetischen Aminosäuren Alanin bzw. Valin oder Aspartat dient der Imitation einer konstant unphosphorylierten Aminosäure (durch das kleine unpolare Alanin bzw. Valin) oder einer konstant phosphorylierten Aminosäure (durch das große saure Aspartat), um die Funktion der Phosphorylierung bzw. Nicht-Phosphorylierung gezielt untersuchen zu können.

Die funktionelle Untersuchung solcher Phosphorylierungsmutanten wurde bereits für verschiedene Proteine beschrieben. Als filovirales Protein wurde beispielsweise die Funktion der Phosphorylierung von EBOV VP30 mit Hilfe von Phosphorylierungsmutanten erfolgreich untersucht (12, 13, 29, 88, 101).

Durch ortsgerichtete Mutagenese sollten daher in dieser Arbeit NP-Mutanten generiert und funktionell charakterisiert werden, die einen konstant phosphorylierten (durch Mutagenese zu Aspartat) oder nichtphosphorylierten (durch Mutagenese zu Alanin oder Valin) Status einzelner Aminosäuren imitieren. Es sollte untersucht werden, ob die nichtphosphorylierte Form von NP bestimmte Funktionen in der infizierten Zelle, zum Beispiel die Replikation und Transkription unterstützt und warum nur die phosphorylierte Form in die neu entstehenden Viruspartikel freigesetzt wird. In Abbildung 7 B sind die Sequenzen aller in der vorliegenden Arbeit untersuchten und beschriebenen Phosphorylierungsmutanten inklusive ihrer Nomenklatur aufgelistet.

2. Material

2.1 Chemikalien

Agarose PeqGold universal	Peqlab, Erlangen (D)
Alkalische Phosphatase (AP) from calf intestine	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
Alcyan Blue	Sigma-Aldrich, München (D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, Hercules (USA)
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg (D)
Bacto™-Agar	Becto, Dickinson & Company, Sparks (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München (D)
Bromphenolblau (BPB)	Roth, Karlsruhe (D)
Calciumchlorid (CaCl₂ x 2H₂O)	Merck, Darmstadt (D)
Carboxymethylcellulose (CMC)	Sigma-Aldrich, München (D)
Caseinhydrolysat	Merck, Darmstadt (D)
<i>Complete</i> Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Indianapolis (USA)
Coomassie® Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg (D)
D(+)- Glucose	Merck, Darmstadt (D)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, München (D)
1,4 Diazabicyclo-[2.2.2]-octan (DABCO)	Sigma-Aldrich, München (D)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt (D)
Dinatriummethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe (D)
Essigsäure (HAc)	Merck, Darmstadt (D)
Ethanol abs. (EtOH)	Sigma-Aldrich, München (D)
Ethanol vergällt (EtOH)	Fischar, Saarbrücken (D)
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim (D)
Fluoprep	BioMérieux, Nürtingen (D)
Formvar	Sigma-Aldrich, München (D)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (D)
Glycin	Roth, Karlsruhe (D)
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt (D)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München (D)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe (D)
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München (D)
L-Glutamin 200 mM	Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Luminata™ Forte Western HRP Substrat	Millipore, Billerica (USA)
Luminata™ Crescendo Western HRP Substrat	Millipore, Billerica (USA)
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg (D)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck, Darmstadt (D)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7H ₂ O)	Merck, Darmstadt (D)
6x MassRuler™ DNA Loading Dye	Fermentas, St.Leon-Rot (D)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München (D)

Natriumazid (NaN₃)	Merck, Darmstadt (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel-de-Haën, Seelze (D)
N(onidet)P40	Merck, Darmstadt (D)
Nycodenz	Axis-Shield, Oslo (NOR)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe (D)
Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco® /Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Pepton	Merck, Darmstadt (D)
Phosphorwolframsäure	Serva, Heidelberg (D)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München (D)
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, München (D)
Rotiphorese® Gel 30 (Polyacrylamid)	Roth, Karlsruhe (D)
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt (D)
Stickstoff (99,996 %)	Messer-Griesheim, Siegen (D)
Sucrose	Serva, Heidelberg (D)
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Waltham (USA)
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Waltham (USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Biorad, Hercules (USA)
TransIT® LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio, Madison (USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics, Geel (B)
TritonX- 100	Sigma-Aldrich, München (D)
Tween® 20	neoLab®, Heidelberg (D)

2.2 Verbrauchsmaterialien

6, 24, 96 well Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
96 well Platten <i>LumiNunc™</i> , schwarz oder weiß	Nunc, Roskilde (DK)
2 ml Kryoröhrchen mit Dichtung	Corning®, Acton (USA)
Blottingpapier <i>GB 002</i> (Whatman® 3 mm)	Whatman, Maidstone (UK)
Chemilumineszenzfilm Hyperfilm	Amersham Biosciences, Buckinghamshire (UK)
Deckgläser, Ø 12 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Indikatorpapier	Merck, Darmstadt (D)
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Objektträger 76 x 22 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Parafilm	Pechiney Plastic, Menasha (USA)
PCR-Tubes, 0.2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf (D)
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml <i>Cellstar®</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)

Pipettenspitzen 0.1-1 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL <i>TipOne</i> [®] (gefiltert und ungefiltert)	Starlab, Ahrensburg (D)
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml/50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Immobilion [®] -P (PVDF-Membran), Porengröße 0,45 µm	Millipore, Billerica (USA)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg (D)
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Skalpell no.22 Feather	Feather, Osaka (J)
Sterilfilter Ø 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Maidstone (UK)
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg (D)
Zentrifugenröhrchen, <i>Ultraclear</i> [™] für SW41, SW60, SW32, TLA55	Beckmann, Palo Alto (USA)

2.3 Kits

Beetle-Juice Kit	PJK, Kleinblittersdorf (D)
Renilla-Juice Kit	PJK, Kleinblittersdorf (D)
HiSpeed [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden (D)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen (D)
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden (D)
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn (D)
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn (D)
Trascriptor One-Step RT-PCR Kit	Roche, Mannheim (D)
Z-Competent [™] <i>E.coli</i> Transformation Kit	Zymo Research, Orange (USA)
Gel Extraction Kit	OMEGA bio-tek, Norcross (USA)
E.Z.N.A. DNA Probe Purification Kit	OMEGA bio-tek, Norcross (USA)
E.Z.N.A. FastFilter Plasmid DNA Maxi Kit	OMEGA bio-tek, Norcross (USA)
E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I	OMEGA bio-tek, Norcross (USA)

2.4 Geräte

Brutschrank HERAcell150, HERAcell240	Thermo Fisher, Hudson (USA)
ChemiDoc™ XRS+	Biorad, Hercules (USA)
DNA-Gelkammern	bsb11, Schauenburg (D)
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen (D)
Entwicklermaschine Optimax® 2010	Protec, Oberstenfeld (D)
Eppendorf Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Reference® Pipetten	Eppendorf, Hamburg (D)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen (D)
Fluoreszenzmikroskop Leica MM AF	Leica, Wetzlar (D)
Geldokumentationssystem GelDoc 2000	Biorad, Hercules (USA)
Horizontalschüttler	GFL, Burgwedel (D)
Lichtmikroskop Axiovert200M	Zeiss, Jena (D)
Lichtmikroskop Wilovert®	Will, Wetzlar (D)
Luminometer Centro LB 960	Berthold, Bad Wildbad (D)
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim (D)
Metallblockthermostat TCS	neoLab®, Heidelberg (D)
Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe (D)
Minizentrifuge GMC-060	neoLab®, Heidelberg (D)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
PCR Cycler Primus 25	Peqlab, Erlangen (D)
pH-Meter Ø32	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
Pipettierhilfe pipetboy	Integra Bioscience, Chur (CH)
Power Supply PowerPac™ HC	Biorad, Hercules (USA)
Power Supply Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen (D)
Reagenzglasnischer Vortex	neoLab®, Heidelberg (D)
Rotor Ultrazentrifuge SW32, SW41, SW60	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
SDS-Gelkammern Mini-Protean	Biorad, Hercules (USA)
SemiDry Blotapparatur Trans-Blot SD	Biorad, Hercules (USA)
Sicherheitswerkbank BDK SK 1200	BDK, Sonnenbühl-Genkingen (D)
Sonifizierer Branson Sonifier 450	Emerson, St. Louis (USA)
Spektralphotometer NanoDrop Lite	Thermo Fisher, Waltham (USA)
StepOne™ ABI, RealTime PCR Cycler	Applied Biosystem, Carlsbad (USA)
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischfuge Spectrafuge®	neoLab®, Heidelberg (D)
Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg (D)
Tisch-Ultrazentrifuge Optima™ MAX-XP	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
Überkopffrotierer	Heidolph, Schwabach (D)
Ultrazentrifuge Optima™ L-100K/ -80XP	Beckmann Coulter, Palo Alto (USA)
UV-Schirm 302 nm	Bachofer, Reutlingen (D)
Vakuumpumpe Mini-Vac E1	Axonlab, Reichenbach (D)
Waage excellence	Sartorius, Göttingen (D)
Wasserbad MT	Lauda, Lauda-Königshofen (D)

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Puffer

Blockierungspuffer für IFA	2 % Bovines Serumalbumin 5 % Glycerin 0,05 % NaN ₃ 0,2 % Tween® 20 in PBS _{def}
Blockierungspuffer für WB	10 % Magermilchpulver in PBS _{def}
Lysis-Puffer für Flotation	10 mM Tris HCl, pH 7,5 20 mM Sucrose 1 mM EDTA 200 µM Orthovanadat 1 mM PMSF 1 x Complete in dH ₂ O
PBS _{def} , pH 7,5 (Phosphatpuffer _{deficient})	0,2 g KCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 8 g NaCl ad 1 l dH ₂ O
Proteinprobenpuffer (4x)	10 ml Mercaptoethanol 200 mg Bromphenolblau 20 ml Glycerin 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 6,8 4 g SDS ad 50 ml dH ₂ O
Proteingellaufpuffer (10x)	144 g Glycin 10 g SDS 30 g Tris-Base ad 1 l dH ₂ O
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,4 % SDS 1,5 M Tris/HCl, pH 6,8 in dH ₂ O

SDS-PAGE-Trenngelpuffer	0,4 % SDS 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 in dH ₂ O
TAE, pH 8,0 (50x)	100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 1 M Eisessig 242 g Tris-Base ad 1 l dH ₂ O
TNE-Puffer (1x)	1 mM EDTA, pH 8,0 150 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 in dH ₂ O
Transferpuffer (1x)	100 ml Ethanol 144 mg Glycin 300 mg Tris ad 1 l dH ₂ O
Verdünnungspuffer für WB	1 % Magermilchpulver 0,1 % Tween [®] 20 in PBS _{def}
Waschpuffer für WB (PBS _{def} /Tween)	0,1 % Tween 20 [®] in PBS _{def}
2.5.2 Lösungen	
Ampicillin-Stammlösung	100 mg Ampicillin ad 1 ml dH ₂ O
Coomassie [®] -Färbelösung	300 ml Ethanol 100 ml Essigsäure 0,05 % Coomassie Brilliant Blue R250 ad 1 l dH ₂ O
Kanamycin-Stammlösung	25 mg Kanamycin ad 1 ml dH ₂ O
Nycodenz 60 % in TNE	60 g Nycodenz ad 1 l TNE-Puffer (1x)

2.6 Wachstumsmedien

2.6.1 Wachstumsmedien für Bakterien

LB-Agar (1,5 %)	3,75 g Bacto™ Agar ad 250 ml LB-Medium
LB-Medium	10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Pepton ad 1 l dH ₂ O
SOB-Medium	20 g Pepton 5 g Hefeextrakt 0,58 g NaCl 0,19 g KCl 10 ml 1 M MgCl ₂ 10 ml 1 M MgSO ₄ ad 1 l dH ₂ O

2.6.2 Wachstumsmedien für Säugerzellen

DMEM _{10 % FCS + Q + P/S}	500 ml DMEM 50 ml FCS (Fötales Kälberserum) 5 ml L-Glutamin 200 mM (100x) 5 ml Penicillin/Streptomycin 5.000 IU/ml
DMEM _{5 % FCS + Q + P/S}	500 ml DMEM 25 ml FCS (Fötales Kälberserum) 5 ml L-Glutamin 200 mM (100x) 5 ml Penicillin/Streptomycin 5.000 IU/ml
DMEM _{3 % FCS + Q + P/S}	500 ml DMEM 15 ml FCS (Fötales Kälberserum) 5 ml L-Glutamin 200 mM (100x) 5 ml Penicillin/Streptomycin 5.000 IU/ml
DMEM _{+ Q + P/S}	500 ml DMEM 5 ml L-Glutamin 200 mM (100x) 5 ml Penicillin/Streptomycin 5.000 IU/ml
DMEM _{+ Q}	500 ml DMEM 5 ml L-Glutamin 200 mM (100x)

1,5 % CMC in MEM₅ % FCA + Q + P/S100 ml 3 % CMC in dH₂O100 ml MEM₅ % FCA + Q + P/S

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Gibco®/InvitrogenTM, Karlsruhe (D)

Fötale Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS)

Gibco®/InvitrogenTM, Karlsruhe (D)

OPTI-MEM®

Gibco®/InvitrogenTM, Karlsruhe (D)

2 x MEM

Gibco®/InvitrogenTM, Karlsruhe (D)

Trypsin-EDTA (0,5 %)

Gibco®/InvitrogenTM, Karlsruhe (D)

2.7 Nukleinsäuren und Nukleotide

2.7.1 Nukleinsäuren als Größenmarker

O'Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder

75-20.000 bp Fermentas, St. Leon-Rot(D)

O'Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder

50-1.000 bp Fermentas, St. Leon-Rot(D)

2.7.2 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide

dNTP-Mix

2'Desoxyadenosin 5'Triphosphat
 2'Desoxyzytosin 5'Triphosphat
 2'Desoxyguanosin 5'Triphosphat
 2'Desoxythymidin 5'Triphosphat
 jeweils 10 mM

Thermo Scientific, Waltham
 (USA)

2.7.3 DNA-Oligonukleotide (Primer für Sequenzierungen / Mutagenesen)

Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Mutierte Nukleotide sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet, fett hervorgehoben ist jeweils die insgesamt mutierte Aminosäure. Die Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) synthetisiert.

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')
1	NP45.2 F	CTG TCT CAG CTA AGG AGC TTC A
7	37.1 Pst 3 Fr	GTT CTT TCC TCA GTT GTG ACT CTC
14	VP30v 47 B	<u>CAG GAA TTC</u> GAA ATT AAT TCA CAC AAG GTA G
20	VP30 - 2157	TAC CTC CAC CAC TGC CCA CAG CCC
26	GPv 1458-Sal	<u>CAG GTC GAC</u> ACC CTA ACA TGA AGA CCA CAT GTT TCC
40	VP35-3205-Bam	<u>CAG GGA TCC</u> GCA CTC TAAGCG AAG TAA CAA CAA GAG
48	Anschluß an 8/46	CC TTG GAG TGG TTC CTC CAG
72	GPv-7244	CCT CTG GAG GGA AGG CGA CAT G
81	NPv 1349	CTA CAC CTG TGG AAG TAA CGG
83	NPv 561	AGG CTT TAA GAC AAG TAA CAG TGC
116	NPv 2515-Bam	<u>CAG GGA TCC</u> CAT GAC TTG ATT CAA AGA ATA TAC
121	VP35m-2950	CCC ACA TTG TGA GAA TTA CTA TT
126	VP40v5284	GTC CCA GAG AAG ACG AGC CT
183	L 11714 F	AAC TTC CAT TCA ATA TGA TGC
339	ANDY IN (2037)	GCT CGC CGC AGC CGA ACG ACC
340	ANDY BACK (181)	GGG GTT ATG CTA GTT ATT GCT CAG

965	NP2731/F	CCT ACT GCT CTG CCT CCC CC
1233	pCAGGS-forw	CCT TCT TCT TTT TCC TAC AG
1422	M13 Fwd(-40)	GTT TTC CCA GTC ACG AC
3137	MARV-NP S.AA.A-A	C TTA GAA CCT ATA AGA tCA CCT GCG GCG CCA GC
3138	MARV-NP S.AA.A-A	GC TGG CGC CGC AGG TGa TCT TAT AGG TTC TAA G
3139	MARV-NP A.SA.A-A	CCT ATA AGA GCA CCT tCG GCG CCA GCT GC
3140	MARV-NP A.SA.A-A	GC AGC TGG CGC CGa AGG TGC TCT TAT AGG
3141	MARV-NP A.AS.A-A	CCT ATA AGA GCA CCT GCG tCG CCA GCT GCT CC
3142	MARV-NP A.AS.A-A	GG AGC AGC TGG CGa CGC AGG TGC TCT TAT AGG
3143	MARV-NP A.AA.S-A	CCT GCG GCG CCA tCT GCT CCT CAG G
3144	MARV-NP A.AA.S-A	C CTG AGG AGC AGa TGG CGC CGC AGG
3145	MARV-NP A.AA.A-S	GG GAA GCC TAT GAA TTG tCG CCT GAT TTC ACA AAT GAT G
3146	MARV-NP A.AA.A-S	C ATC ATT TGT GAA ATC AGG CGa CAA TTC ATA GGC TTC CC
3191	MARV NP S.SD.S-S	CCT ATA AGA TCA CCT TCT gac CCA TCT GCT CCT CAG G
3242	MARV-NP S.SV.S-S	CCT ATA AGA TCA CCT TCT GtA CCA TCT GCT CC
3280	MARV-NP FL S.SV.S-S fw	GA TCA CCT ATA AGA TCA CCT TCT gtA CCA TCT GCT CCT CAG G
3281	MARV-NP FL S.SV.S-S rev	C CTG AGG AGC AGA TGG Tac AGA AGG TGA TCT TAT AGG TGA TC
3282	MARV-NP FL S.SD.S-S rev	C CTG AGG AGC AGA TGG gtc AGA AGG TGA TCT TAT AGG
3283	MARV-NP FL S.SS.S-D fw	G AGG GAA GCC TAT GAA TTG gat CCT GAT TTC ACA AAT GAT GAG G
3284	MARV-NP FL S.SS.S-D rev	C CTC ATC ATT TGT GAA ATC AGG atc CAA TTC ATA GGC TTC CCT C
3351	MARV-NP FL S.SS.S-A fw	GG GAA GCC TAT GAA TTG gCG CCT GAT TTC ACA AAT GAT GAG G
3352	MARV-NP FL S.SS.S-A rev	C CTC ATC ATT TGT GAA ATC AGG CGc CAA TTC ATA GGC TTC CC
3409	MARV-NP A.AD.A-A	CCT ATA AGA GCA CCT GCG Gac CCA GCT GCT CC
3410	MARV-NP A.AV.A-A	CCT ATA AGA GCA CCT GCG Gta CCA GCT GCT CC
3883	NP 1389 EcoRI	at cga cca aga <u>atT</u> CTG CCT CCC CCA GTT GAC GAC
3884	VP35 2954 XhoI	AGT CCC ACA <u>Tct cGA</u> GAA TTA CTA TTT CAA TAC GTT

2.8 Vektoren und rekombinante Plasmide

2.8.1 Vektoren

pCAGGS

Institut für Virologie, Marburg

2.8.2 Rekombinante Plasmide

Vektor	Protein	
pCAGGS	T7	Y. Kawaoka, Wisconsin (USA)
pAndy	3M-5M Luc	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	GP	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP40	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP24	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP30	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	VP35	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	L	Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS	NP	Institut für Virologie, Marburg
pGEM	NP-SA	Institut für Virologie, Marburg
pGEM	NP-SD	Institut für Virologie, Marburg
pGEM	NP-AASA	Institut für Virologie, Marburg
pAndy	pFLMB T7wt SacI10511 #16 (VL wt)	Institut für Virologie, Marburg
pBSII	pBSII SK FR1 MB 3138C (VL Fragment 1)	Institut für Virologie, Marburg
pBSII	pBSII SK FR2 MB (VL Fragment 2)	Institut für Virologie, Marburg
pBSII	pBSII SK FR3 MB (VL Fragment 3)	Institut für Virologie, Marburg

kloniertes Plasmid		Matrize	Primer/Klonierung	Zielvektor
pCAGGS	NP S.SS.S-A	pGEM NP-SA	SK durch RV mit E-coRI	pCAGGS
pCAGGS	NP S.SS.S-D	pGEM NP-SD	SK durch RV mit E-coRI	pCAGGS
pCAGGS	NP A.AA.A-A	pGEM NP AASA	SK durch RV mit E-coRI	pCAGGS
pCAGGS	NP S.AA.A-A	pCAGGS NP A.AA.A-A	3137, 3138	-
pCAGGS	NP A.SA.A-A	pCAGGS NP A.AA.A-A	3193, 3140	-
pCAGGS	NP A.AS.A-A	pCAGGS NP A.AA.A-A	3141, 3142	-
pCAGGS	NP A.AA.S-A	pCAGGS NP A.AA.A-A	3143, 3144	-
pCAGGS	NP A.AA.A-S	pCAGGS NP A.AA.A-A	3145, 3146	-
pCAGGS	NP S.SD.S-S	pCAGGS NP	3191	-
pCAGGS	NP S.SV.S-S	pCAGGS NP	3217	-
pCAGGS	NP A.AD.A-A	pCAGGS NP A.AA.A-A	3409	-
pCAGGS	NP A.AV.A-A	pCAGGS NP A.AA.A-A	3410	-

pBSII	pBSII SK FR1 T7 NP S.S.S-A	pBSII SK FR1 MB 3138C	3351, 3352	-
pBSII	pBSII SK FR1 T7 NP S.S.S-D	pBSII SK FR1 MB 3138C	3283, 3284	-
pBSII	pBSII SK FR1 T7 NP S.S.D.S-S	pBSII SK FR1 MB 3138C	3191, 3282	-
pBSII	pBSII SK FR1 T7 NP S.S.V.S-S	pBSII SK FR1 MB 3138C	3280, 3281	-

SK: Subklonierung. RV: Restriktionsverdau.

Die Bezeichnung der Primer erfolgt mit der internen Labornummer, der komplette Name sowie die Sequenz sind 2.7.3 zu entnehmen.

2.9 Proteine, Peptide und Aminosäuren

2.9.1 Enzyme

Alkalische Phosphatase (1 U/ μ l) Roche Diagnostics, Mannheim (D)
 Restriktionsendonukleasen: NEB, Frankfurt (D)
 ClaI (10 U/ μ l), DpnI (10 U/ μ l), EcoRI (20 U/ μ l), FspI (10 U/ μ l), KpnI (10 U/ μ l),
 NaeI (10 U/ μ l), PvuI (10 U/ μ l), SacI (20 U/ μ l), SacII (10 U/ μ l), XhoI (20 U/ μ l)
 T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l) NEB, Frankfurt (D)

2.9.2 Antikörper

2.9.2.1 Primärantikörper

Name	Spezies	Firma	Verdünnung	
			IFA	WB
α -MARV	Ziege	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:250	1:3.000
α -MARV NP 59-9-10	Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:20	1:500
α -MARV VP40 40-2-2	Maus	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:100	1:5.000
α -MARV NP 2	Meerschw.	Institut für Virologie, Marburg (D)	1:200	-
α -MARV VP24 1	Kaninchen	Institut für Virologie, Marburg (D)	-	1:100
α -flag™ M2	Maus	Sigma-Aldrich, München	1:50	-

2.9.2.2 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzanalysen

Name		Spezies	Firma	Verdünnung
α -Maus	Alexa 488	Esel	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:500
α -Meerschw.	Alexa 594	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:500
α -Meerschw.	Alexa 488	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:500
α -Ziege	Alexa 488	Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe (D)	1:500
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)				1:10.000

2.9.2.3 Sekundärantikörper für Western Blot Analysen

Name		Spezies	Firma	Verdünnung
α-Maus	HRP	Ziege	Dako, Hamburg (D)	1:40.000
α-Meerschw.	HRP	Esel	Dako, Hamburg (D)	1:20.000
α-Ziege	HRP	Esel	Dako, Hamburg (D)	1:40.000
α-Kaninchen	HRP	Schwein	Dako, Hamburg (D)	1:20.000

2.9.3 Proteinmarker

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

2.10 Zellen**2.10.1 Prokaryotische Zellen**

E. coli XL1 blue

Stratagene, Heidelberg (D)

Genotyp: TetrΔ (mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac The *F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]

2.10.2 Eukaryotische Zellen

HEK293-Zellen

humane embryonale Nierenzellen

HUH7-Zellen

humane Hepatomzellen

VeroE6-Zellen

Nierenzellen, Grüne Meerkatze

2.11 Software

BioEdit 7.0.5.3

Sequenzanalyse

Clone Manager 9

Klonierungsstrategien

ImageJ 1.47p

Quantifizierung von Mikroskop-Aufnahmen
(Zählung infizierter Zellen)

Image Lab 5.2

Detektion von Western Blots und Quantifizierung

Leica MM AF 1.6.0

Immunfluoreszenzaufnahmen

Macromedia® Freehand® 11.0.2

Abbildungen

Microsoft Excel 2013

Statistische Auswertungen

NIS-Elements F 3.0

Zellaufnahmen

TINA 5

Quantifizierung von Western-Blots, die an der
Entwicklermaschine detektiert wurden

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Amplifikation von DNA-Sequenzen durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* amplifiziert. Die beiden eingesetzten sequenzspezifischen Primer (mit einer Länge von jeweils 15-25 Nukleotiden) binden jeweils an einen DNA-Strang, so dass die Zielsequenz zwischen den Primern liegt. Je nach Ziel und Strategie der Klonierung kann das 5'-Ende des Primers durch zusätzliche Sequenzen z.B. für Schnittstellen von Restriktionsenzymen oder durch bestimmte Epitope (z.B. HA-Tag) modifiziert sein. Gemäß der gewünschten Lesegenauigkeit und dadurch Exaktheit der Amplifikate können verschiedene Polymerasen eingesetzt werden. Die verwendete *Pwo* DNA-Polymerase zeichnet sich durch eine hohe Lesegenauigkeit aus, da sie neben ihrer 5'-3' Polymeraseaktivität auch über eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität verfügt. Der Reaktionszyklus wird ca. 30 Mal wiederholt, wobei die amplifizierte DNA sich exponentiell im Reaktionsgemisch anreichert. Die amplifizierten DNA-Fragmente werden über ein präparatives DNA-Agarosegel (3.1.6) aufgetrennt und durch Gelextraktion (3.1.5.1) aufgereinigt.

Reaktionsansatz:	100 ng	DNA-Matrize
	je 2 µl	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM
	12,5 µM	Vorwärts-Primer
	12,5 µM	Rückwärts-Primer
	5 µl	Reaktionspuffer (komplett), 10x
	0,125 µl	<i>Pwo</i> DNA-Polymerase (1 U/µl)
	ad 50 µl	dH ₂ O

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	15 sek	30
Annealing	50-60°C	30 sek	
Elongation	72°C	1 min / kb	
Elongation	72°C	2 min	1
Ende	4°C	∞	1

3.1.2 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Kolonie-PCR lässt sich DNA aus Bakterien schnell amplifizieren und anschließend sequenzieren, ohne sie zuvor isolieren und aufreinigen zu müssen. Dafür werden einzelne Bakterienklone nach der Transformation auf eine LB-Platte (3.1.11) mit einer Pipettenspitze (10 µl) aufgenommen und direkt im vorgelegten PCR-Mastermix resuspendiert.

Die hier verwendete Taq DNA-Polymerase besitzt neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch die Amplifikation fehleranfällig wird. Für die nach der Kolonie-PCR folgende Sequenzierung reicht die Lesegenauigkeit allerdings aus:

Reaktionsansatz:	100 ng	DNA-Matrize
	0,5 µl	dNTP Mix 10 mM
	12,5 µM	Vorwärts-Primer
	12,5 µM	Rückwärts-Primer
	2 µl	MgCl ₂ 25 mM
	2,5 µl	Taq-Puffer (+KCl, -MgCl ₂), 10x
	0,125 µl	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)
	ad 25 µl	dH ₂ O

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	1 min	1
Denaturierung	95°C	30 sek	35
Annealing	T _m -5°C	30 sek	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Elongation	72°C	5-15 min	1
Ende	4°C	∞	1

Im Anschluss an die PCR kann die DNA direkt sequenziert werden (3.1.14).

3.1.3 Ortsgerichtete *in vitro*-Mutagenese

Punktmutationen, kurze Deletionen oder Insertionen können mit Hilfe des QuikChange™ Multi Site Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) in Plasmid-DNA eingebracht werden.

Mit Hilfe des Kits wird in einer PCR (3.1.1) das zu mutagenisierende Plasmid durch einen Polymerase-Enzymmix amplifiziert. Es können gleichzeitig bis zu vier Mutagenese-Vorwärtsprimer eingesetzt werden, komplementäre Rückwärts-Primer werden nicht benötigt.

Im Anschluss an die PCR wird das Reaktionsgemisch mit der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut. Das Enzym baut methylierte DNA vollständig ab, so dass die methylierte Template-DNA

(aus Bakterienzellen isoliert), die die gewünschten Mutationen nicht trägt, entfernt wird, die neu synthetisierte DNA bleibt erhalten.

Nach dem Verdau kann die mutagenisierte zirkuläre DNA direkt in ultrakompetente E. coli XL1-Blue-Zellen transformiert werden (3.1.10).

Reaktionsansatz:

- 10 ng DNA-Matrize
- je 125 ng Vorwärts-Primer
- 1 µl dNTP-Mix (25 mM)
- 0,5 µl QuikSolution™
- 2,5 µl QuikChange™ Multi Puffer 10x
- 0,5 µl QuikChange™ Multi Enzymmix (2,5 U/µl)
- ad 25 µl dH₂O

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95°C	1 min	1
Denaturierung	95°C	30 sek	30
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	65°C	2 min/kb	
Ende	4°C	∞	1

3.1.4 Reverse Transkription PCR

Zur Sequenzierung des Genoms rekombinanter Viren wird die isolierte RNA (3.1.5.2) zunächst in cDNA umgeschrieben, anschließend kann sie in einer PCR amplifiziert werden. Mit Hilfe des Transcriptor One-Step RT-PCR Kits von Roche können diese Reaktionen direkt hintereinander in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden. Die Amplifikation erfolgt gemäß Herstellerangaben mit MARV-spezifischen Primern. Zur Überprüfung der RT-PCR werden 5 µl des Reaktionsansatzes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (3.1.6), anschließend kann das synthetisierte DNA-Fragment sequenziert werden (3.1.14).

Reaktionsansatz:

- 5 µl Template RNA
- 10 µl Reaction Buffer 5x
- 2 µl Vorwärts-Primer (10 µM)
- 2 µl Rückwärts-Primer (10 µM)
- 1 µl Transcriptor Enzyme Mix
- ad 50 µl dH₂O

	Temperatur	Zeit	Zyklen
RT-Schritt	48°C	30 min	1
Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	30 sek	10
Annealing	50°C	30 sek	
Elongation	68°C	4 min	
Denaturierung	94°C	30 sek	25
Annealing	50°C	30 sek	
Elongation	68°C	4 min + 5 sek	
Ende	4°C	∞	1

3.1.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Vor dem Einsatz von DNA oder RNA in molekularbiologischen Experimenten müssen Kontaminationen (z.B. Phenol, Chloroform, Ethanol, EDTA, Detergenzien, Salze, Proteine) entfernt werden.

3.1.5.1 Aufreinigung von DNA

DNA-Fragmente mit einer Größe von >100 bp können nach biochemischen Reaktionen wie Restriktionsverdau (3.1.7) oder PCR (3.1.1) mit dem E.Z.N.A. DNA Probe Purification Kit aufgereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgt über eine Säulenmatrix und wird entsprechend der Herstelleranweisung durchgeführt. Die aufgereinigte DNA wird in 50 µl dH₂O eluiert.

Die Aufreinigung von DNA aus präparativen Agarosegelen (3.1.6) erfolgt mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit. Auch hier wird die DNA gemäß Herstelleranweisung aufgereinigt und in 50 µl dH₂O eluiert.

Bis zur weiteren Verwendung wird die aufgereinigte DNA bei -20 °C gelagert.

3.1.5.2 Aufreinigung von RNA

Die Aufreinigung von viraler RNA von Proben aus dem BSL-4-Labor erfolgt mit Hilfe des QIAamp Viral RNA Mini Kits. Jeweils 140 µl Probe werden im BSL-4-Labor mit 560 µl AVL (komplettiert mit Carrier-RNA) inaktiviert. Nach Zugabe von 560 µl Ethanol 100% wird der Ansatz in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und ausgeschleust. Außerhalb des Sicherheitslabors wird die Aufreinigung gemäß Herstelleranweisungen fortgesetzt. Die RNA wird in 60 µl AVE-Puffer eluiert und kann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

3.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Da Nukleinsäuren durch ihre Phosphatgruppen negative Ladungen tragen, können sie mit Hilfe eines Agarosegels nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Zur Größenbestimmung einer analytischen PCR oder nach dem Restriktionsverdau werden analytische Agarosegele verwendet, zur Isolation und Aufreinigung eines Ziel-Fragments werden hingegen präparative Agarosegele verwendet. Die Gele können sich je nach Größe des untersuchten Fragments in der Agarose-Konzentration sowie im Probenvolumen unterscheiden.

Agarosegel: 0,75-2 % (w/v) Agarose, in TAE Puffer gelöst

Laufpuffer: TAE-Puffer, pH 8,0

Die Agarose wird durch Erhitzen im TAE-Puffer gelöst und in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Für ein analytisches Gel werden 5 µl DNA-Probe, für ein präparatives Gel 40 µl DNA-Probe mit der entsprechenden Menge 6 x MassRuler™ Loading Dye (Fermentas) versetzt und gemeinsam mit einem DNA-Größenmarker im polymerisierten Agarosegel bei einer Spannung von 100 Volt und maximalem Stromfluss aufgetrennt. Die Färbung des Gels erfolgt anschließend in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für ca. 20 Minuten. Aus einem präparativen Agarosegel werden die gewünschten DNA-Banden auf einem UV-Schirm ($\lambda=302$ nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Im Anschluss an das Ausschneiden bzw. die Färbung wird die DNA mit Hilfe des Geldokumentationssystem GelDoc 2000 (BioRad) visualisiert.

3.1.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA-Moleküle (dsDNA) können mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungsstellen hydrolytisch gespalten werden. Diese Enzyme erkennen Sequenzen (meist palindromisch) im DNA-Doppelstrang, an denen der Strang geöffnet wird. Sie können präparativ zum Herausschneiden eines Inserts aus einem Vektor oder zur Analyse von DNA verwendet werden: Verschiedene DNA-Moleküle, die sich in Anzahl oder Position der Schnittstellen unterscheiden erzeugen nach einem analytischen Restriktionsverdau und der anschließenden Gelelektrophorese (3.1.6) ein charakteristisches Bandenmuster im Agarosegel, anhand dessen sie unterschieden werden können. Die Reaktionsbedingungen werden entsprechend der Herstellerangaben in Bezug auf Temperatur, ggf. BSA-Zugabe und Wahl der Puffer angepasst. Die Reaktion selbst läuft je nach Aktivität des Enzyms für 2-4 Stunden. Die anschließende Aufreinigung erfolgt mit dem E.Z.N.A. DNA Probe Purification Kit (3.1.5.1) oder über ein präparatives Agarosegel (3.1.6) mit anschließender Gelextraktion (3.1.5.1).

Ansatz für analytischen Verdau:	100-500 ng	DNA
	1 µl	Puffer nach Herstellerangaben, 10x
	(1 µl	BSA 10 %, optional)
	1-5 U	Restriktionsendonuklease
	ad 10 µl	dH ₂ O
Ansatz für präparativen Verdau:	5 µg	DNA
	5 µl	Puffer nach Herstellerangaben, 10 x
	(5 µl	BSA 10 %, optional)
	10-20 U	Restriktionsendonuklease
	ad 50 µl	dH ₂ O

3.1.8 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

Die Behandlung der durch Restriktionsendonukleasen verdauten Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*, AP) dient der Entfernung der 5'-Phosphatgruppen. So soll eine Religation der linearisierten Plasmide verhindert werden. Die Reaktion erfolgt für 1-2 h bei 37 °C. Die DNA wird anschließend mit dem E.Z.N.A. DNA Probe Purification Kit gereinigt (3.1.5.1), um mögliche bei einer Ligation (3.1.9) störende Substanzen zu entfernen.

Reaktionsansatz:	44 µl	linearisierte DNA aus Restriktionsverdau (3.1.7)
	1 µl	AP (1 U/µl)
	5 µl	AP-Puffer 10x

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren

DNA-Ligasen katalysieren die Bindung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Stranges mit der freien 3'-Hydroxylgruppe eines zweiten DNA-Stranges. Ein über PCR (3.1.1) und/oder Restriktionsendonukleaseverdau (3.1.7) erhaltenes Insert kann so in einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor (3.1.8) ligiert werden. Zur Kontrolle wird ein Religationsansatz mitgeführt, bei dem nur linearisierte Vektor-DNA und statt der Ligase dH₂O eingesetzt werden. Die Reaktion erfolgt für mindestens 1 h bei Raumtemperatur, anschließend werden Z-kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen mit den Ansätzen transformiert (3.1.10). Bei Vollelängeplasmiden wird aufgrund der Größe über Nacht für 16 h bei 14 °C ligiert.

Ansatz:	100-200 ng	verdaute, gereinigte Insert-DNA
	25-50 ng	verdaute, gereinigte, linearisierte Vektor-DNA
	2 µl	Ligationspuffer, 10x
	0,5 µl	T4 DNA Ligase (1 U/µl)
	ad 20 µl	dH ₂ O

3.1.10 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Rekombinante Plasmide können mit Hilfe von Bakterienzellen vermehrt werden. Vor der Transformation werden E. coli-Bakterien (XL1-Blue) zunächst mit dem Z-Competent™ E. coli Transformation Kit (ZymoResearch) nach Herstellerangaben behandelt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die so hergestellten Z-kompetenten E. coli-Bakterien werden auf Eis aufgetaut. Zur Transformation werden 100µl Bakteriensuspension zur DNA-Lösung (z.B. 10 µl Ligationsansatz oder 10 ng Plasmid-DNA) gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert.

3.1.11 Anzucht und Selektion rekombinanter Bakterien

Zur Selektion transformierter Bakterien von Bakterien, die keine Plasmid-DNA aufgenommen haben, tragen Vektor-Plasmide ein Antibiotika-Resistenzgen. Nach der Transformation erfolgt die Animpfung von LB-Agarplatten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt sind (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml), für ca. 16 h bei 37 °C. Es können sich nur die Bakterien vermehren und Kolonien bilden, die durch Transformation den entsprechenden Vektor mit dem Antibiotika-Resistenzgen aufgenommen haben.

3.1.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Präparationen von Plasmiden aus Bakterienkulturen werden entweder im kleinen Maßstab als Mini-Präparation (3 ml) oder im großen Maßstab als Maxi-Präparation (100 ml) durchgeführt. Hierfür werden einzelne Bakterienkolonien in LB-Medium, dem das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml) zugesetzt wurde, aufgenommen und für 16 h bei 37 °C schüttelnd (200 U/min) inkubiert. Die Plasmide werden anschließend gemäß Herstellerangaben mit dem E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I bei Mini-Präparationen oder mit dem E.Z.N.A. FastFilter Plasmid DNA Maxi Kit bei Maxi-Präparationen isoliert. Die isolierte DNA wird in 50 µl (Mini-Präparation) bzw. 1,5 ml (Maxi-Präparation) dH₂O eluiert.

Zur Analyse der Plasmid-DNA aus Mini-Präparationen werden 5 µl Eluat einem Restriktionsverdau unterzogen (3.1.7), der Ansatz wird anschließend auf einem analytischen Agarosegel aufgetrennt (3.1.6). Die qualitative und quantitative Untersuchung der DNA erfolgt am Photometer

(NanoDrop Lite, Thermo Scientific) (3.1.13). Anschließend kann die DNA-Präparation durch Sequenzierung untersucht werden (3.1.14).

3.1.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger DNA-Lösungen wird durch Messung ihres Absorptionsvermögens photometrisch mit Hilfe des NanoDrop Lite (Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) ist direkt proportional zu ihrem Nukleinsäuregehalt.

Für doppelsträngige DNA gilt: $OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 50 = \text{DNA-Gehalt in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$

Der Quotient OD_{260}/OD_{280} erlaubt eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurepräparation. Reine Lösungen sind durch einen Quotienten zwischen 1,6 und 2,9 charakterisiert. Verunreinigungen mit Proteinen ergeben einen Wert kleiner als 1,6, Kontaminationen durch Phenol oder RNA ergeben deutlich höhere Quotienten.

3.1.14 DNA-Sequenzierung

Zur Analyse der zu sequenzierenden DNA werden die Proben an die Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen geschickt.

Hierfür werden die Proben folgendermaßen vorbereitet:

700-1200 ng gereinigte Plasmid-DNA oder PCR-Produkt
 30 pmol Primer
 ad 15 μl dH₂O

Vor dem Versand von MARV-Volllängeplasmiden werden diese einem Restriktionsverdau (3.1.7) mit NaeI und PvuI unterzogen, um die Plasmide zu linearisieren.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von HEK293-, HUH7- und VeroE6-Zellen

Die permanenten Zelllinien werden in 75 cm² Zellkulturflaschen in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* in Gegenwart von 10 % fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), L-Glutamin (Q) und Penicillin/Streptomycin (P/S) (DMEM_{10%FCS + Q + P/S}) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Passage der Zelllinien findet alle drei bis vier Tage statt. Der konfluente Zellrasen wird dabei nach Abnahme des Zellkulturmediums zweimal mit ca. 10 ml erwärmtem PBS_{def} gewaschen und durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle wird durch Zugabe von 8 ml DMEM_{10%FCS + Q + P/S} die Reaktion abgestoppt, die

Zellen werden resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturflaschen bzw. -platten ausgesät.

Wenn HEK293-Zellen längere Zeit nach Transfektion (d.h. 72 h) bei 37 °C inkubiert werden sollen (z.B. für die Produktion von virusähnlichen Partikeln (iVLPs, 3.2.6), werden die Zellkulturplatten zunächst mit Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet. Dazu werden die Platten mit einer entsprechenden Menge Poly-D-Lysinlösung (z.B. 1 ml pro Well einer 6-Well-Platte) für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, dann zweimal mit PBS_{def} gewaschen. Anschließend werden die Zellen darauf ausgesät. Durch die Poly-D-Lysin-Beschichtung wird verhindert, dass die HEK293-Zellen sich leicht vom Boden der Zellkulturplatte ablösen.

3.2.2 Transiente DNA-Transfektion mit TransIT®

Um DNA in eukaryotische Zellen zu transferieren, wird deren negative Ladung durch Komplexbildung mit kationischen Lipiden maskiert. Die DNA-Lipidkomplexe lagern sich an die Zellmembran und passieren diese, so dass eine Expression von Proteinen in Zellen ermöglicht wird. Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion passagiert (Transfektion bei ca. 60 % Konfluenz). Der Transfektionsansatz wird entsprechend der Herstellerempfehlungen von TransIT® angesetzt (3 µl TransIT®/µg DNA).

Pro well einer 6 Well-Platte:	3 µl	TransIT®
	250 µl	Opti-MEM
	1 µg	DNA

Das TransIT® wird auf Raumtemperatur angewärmt und kurz gevortext und anschließend mit dem ebenfalls auf Raumtemperatur angewärmten Opti-MEM gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wird die Mischung mit der vorgelegten DNA versetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 15-30 min bei Raumtemperatur wird der Transfektionsansatz tropfenweise dem Zellkulturmedium (DMEM_{10 % FCS + Q + P/S}) zugesetzt. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bei längeren Experimenten wird frühestens nach 4-6 h, spätestens nach einem Tag ein Mediumwechsel zu 3 ml DMEM_{3 % FCS + Q + P/S} durchgeführt.

Eingesetzte DNA-Mengen (soweit nicht anders angegeben):

Immunfluoreszenzanalyse (3.4.1):	500 ng DNA pro Plasmid
Expression für Western Blot (3.4.2, 3.4.3):	500 ng - 1 µg DNA pro Plasmid
Flotationsanalyse (3.2.7):	insgesamt 3-4 µg DNA

Differenzen der DNA-Mengen werden mit Leervektor (pCAGGS_{leer}) ausgeglichen.

3.2.3 Transiente DNA-Transfektion mit Calciumphosphat

Für die kostengünstige Transfektion von größeren Mengen DNA (z.B. für iVLP-Assays im großen Ansatz, 3.2.6) bietet sich die Calciumphosphat-Präzipitation an. Hierbei wird die DNA mit Calcium und einem Phosphatpuffer gemischt, so dass sich feine Kristalle aus Calciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) und DNA bilden. Die Kristalle werden von den Zellen per Endocytose aufgenommen, so dass die Proteine exprimiert werden können. Auch die Calciumphosphat-Transfektion wird einen Tag nach Passage der Zellen durchgeführt, ca. 1 Stunde vor Transfektion wird das Medium zu DMEM_{3 % FCS + Q} gewechselt.

Pro 10 cm-Schale:	100 µl	CaCl ₂ -Lösung (2,5 mol/L)
	900 µl	dH ₂ O
	1000 µl	HEPES-Puffer, pH 6,95
	20,98 µg	DNA

dH₂O, CaCl₂ und HEPES-Puffer werden auf 37 °C vorgewärmt, anschließend wird die vorgelegte DNA mit der CaCl₂-Lösung und dem dH₂O gemischt. Der HEPES-Puffer wird vortexend zu der Mischung gegeben, anschließend genau 1 min. inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellen gegeben.

Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, nach 6 h wird ein Mediumwechsel zu 12 ml DMEM_{3 % FCS + Q + P/S} pro Schale durchgeführt.

3.2.4 Ernte von Zellen zur Analyse im Western Blot

Von transfizierten Zellen wird das Medium abgenommen, anschließend werden 300 µl 4x Probenpuffer pro Well einer 6-Well-Platte direkt auf die Zellen gegeben. Mit Hilfe eines Zellschabers werden die Zellen abgekratzt und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Die Zellen werden beim Aufkochen für 10 min. bei 99 °C durch die im Probenpuffer enthaltenen Detergenzien lysiert, gegebenenfalls können die Zellmembranen zusätzlich durch Beschallung mit einem Stab-Sonifizierer (Branson) aufgeschlossen werden. Hierfür werden die Proben für 5 min beschallt.

Infizierte Zellen werden ebenfalls direkt in 4x Probenpuffer wie oben beschrieben aufgenommen und anschließend für mindestens 10 min. bei 99 °C aufgeköcht. Nach dem Überführen in ein neues Röhrchen können die Proben aus dem BSL-4-Labor ausgeschleust werden. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel zur weiteren Analyse im Western Blot werden sie erneut für 10 min. bei 99 °C aufgeköcht (3.4.2, 3.4.3).

3.2.5 Marburgvirus spezifischer Minigenom Assay

Bei einem Minigenom-Assay wird die Transkriptions- und Replikationsaktivität durch Expression der viralen Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und L zusammen mit einem MARV-spezifischen Minigenom untersucht. Das Prinzip entspricht dem iVLP-Assay (1.6.1), das Oberflächenprotein GP, das Matrixprotein VP40 sowie VP24 werden beim Minigenom-Assay allerdings nicht transfiziert, so dass keine virusähnlichen Partikel in den Überstand freigesetzt werden.

HEK293-Zellen (ausgesät in 6-Well-Platten, 60 % konfluent) werden mit TransIt® mit den folgenden Plasmiden transfiziert, ein Ansatz entspricht einem Well einer 6-Well-Platte.

	Plasmid	Menge	Promotor
1	pCAGGS VP30	100 ng	β-chicken actin
2	pCAGGS VP35	100 ng	β-chicken actin
3	pCAGGS L	1.000 ng	β-chicken actin
4	pCAGGS T7-Polymerase	500 ng	β-chicken actin
5	pAndy 3M-5M Renilla Luciferase (Minigenom)	1.000 ng	T7
6	pGL4 (Firefly-Luciferase)	100 ng	SV40
7	pCAGGS NPwt bzw. NPmut	500 ng	β-chicken actin

Aus den Plasmiden 1-6 wird ein Mastermix hergestellt, NPwt bzw. die entsprechende NP-Mutante wird einzeln zu jedem Ansatz dazugegeben.

4-6 h nach Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel zu 3 ml DMEM_{3 % FCS + Q + P/S} pro Well.

72 h nach Transfektion werden die Zellen einmal mit PBSdef gewaschen, in 1 ml PBSdef pro Well mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 min bei 3.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 250 µl Lysis-Puffer (Renilla-Juice bzw. Firefly-Juice Kit, pj) resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur und 1.400 U/min auf dem Schüttler lysiert. Die Zelldebris werden im Anschluss für 5 min bei 4 °C und 13.000 U/min abzentrifugiert, der Überstand wird nach Herstellerangaben des Renilla-Juice bzw. Beetle-Juice Kits (beides von pj) in einem Luminometer gemessen. Bei der Messung werden die Renilla-Luciferase und die Firefly-Luciferase-Aktivität gemessen. Die Renilla-Luciferase-Aktivität ist ein Maß für die MARV-spezifische Transkription/Replikation, die Aktivität der Firefly-Luciferase entspricht der zellulären Transkription und wird daher für die Normalisierung der Zelllysate genutzt.

3.2.6 Marburgvirus spezifischer infektiöser VLP Assay

Bei einem infektiösen VLP Assay (iVLP Assay) werden Virus-ähnliche Partikel (*virus-like particles*, VLPs) generiert, die eine Minigenom-RNA anstatt der genomischen MARV-RNA enthalten. Das Prinzip des iVLP-Assays ist unter (1.6.1) beschrieben.

HEK293-Zellen (ausgesät auf Poly-D-Lysin-beschichteten 10 cm-Zellkulturschalen, 60 % konfluent) werden mit Calciumphosphat mit den folgenden Plasmiden transfiziert, ein Ansatz entspricht einer 10 cm-Schale (3.2.3). Die so transfizierten Zellen werden als VLP-produzierende Zellen bezeichnet.

	Plasmid	Menge	Promotor
1	pCAGGS GP	2.400 ng	β-chicken actin
2	pCAGGS VP40	2.400 ng	β-chicken actin
3	pCAGGS VP24	340 ng	β-chicken actin
4	pCAGGS VP30	480 ng	β-chicken actin
5	pCAGGS VP35	480 ng	β-chicken actin
6	pCAGGS L	4.800 ng	β-chicken actin
7	pCAGGS T7-Polymerase	2.400 ng	β-chicken actin
8	pAndy 3M-5M Renilla Luciferase (Minigenom)	4.800 ng	T7
9	pGL4 (Firefly-Luciferase)	480 ng	SV40
10	pCAGGS NPwt bzw. NPmut	2.400 ng	β-chicken actin

Aus den Plasmiden 1-9 wird ein Mastermix hergestellt, NPwt bzw. die entsprechende NP-Mutante wird einzeln zu jedem Ansatz dazugegeben. Für die Produktion großer Mengen iVLPs werden drei 10 cm-Schalen jeweils mit dem gleichen Ansatz transfiziert.

4-6 h nach Transfektion erfolgt ein Mediumwechsel zu 12 ml DMEM_{3% FCS + Q + P/S} pro Schale.

Untersuchung der iVLPs

72 h nach Transfektion werden die Überstände zur Analyse der iVLPs von den Zellen abgenommen, hierbei wird gegebenenfalls der Überstand gleich transfizierter Zellen gepoolt. Schwimmende Zellen werden durch Zentrifugation für 10 min. bei 2.000 U/min abzentrifugiert. Die Hälfte des Überstands wird in Ultraclear®-Zentrifugenröhrchen (Beckman) für SW32 Ultrazentrifugen-Rotoren überführt und mit 5 ml Sucroslösung (20 % in TNE) unterschichtet. Danach wird vorsichtig der restliche Überstand in die Röhrchen überführt. Die Zentrifugenröhrchen werden mit TNE aufgefüllt, austariert und in der Ultrazentrifuge für 3 h bei 4 °C und 32.000 U/min in einem SW32-Rotor zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vorsichtig abgenommen,

das Röhrchen trockengewischt und das Pellet in 730 µl TNE resuspendiert. Sollen Proben elektronenmikroskopisch untersucht werden, werden 10 µl iVLP-Suspension mit 10 µl PFA (8 % in DMEM) versetzt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert (3.4.5).

Die iVLPs werden im Anschluss über einen diskontinuierlichen Nycodenz-Gradienten in sphärische und filamentöse Partikel aufgetrennt. Hierzu wird pro Ansatz ein Gradient in SW60 Ultraclear®-Zentrifugenröhrchen vorbereitet:

Konzentration Nycodenz in TNE	Menge
2,5 %	490 µl
5 %	490 µl
7,5 %	490 µl
10 %	490 µl
15 %	490 µl
20 %	490 µl
30 %	730 µl

Die resuspendierten iVLPs werden vorsichtig auf den vorbereiteten Gradienten pipettiert und durch Zentrifugation für 15 min. bei 4 °C und 16.000 U/min im SW60-Rotor aufgetrennt.

Dann werden 6 Fraktionen à 450 µl vorsichtig von oben abgenommen, die Fraktionen 1-3 (sphärische Partikel) sowie die Fraktionen 4-6 (filamentöse Partikel) werden jeweils in einem TLA45 Ultrazentrifugenröhrchen gepoolt.

Im Anschluss werden die iVLPs durch einen erneuten Ultrazentrifugationsschritt für 2 h bei 4 °C und 45.000 U/min im TLA55-Rotor erneut pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet in 200 µl DMEM_{+Q} resuspendiert.

Die Proteinzusammensetzung der iVLPs kann durch SDS-PAGE (3.4.2) und anschließenden Western Blot (3.4.3) analysiert werden, hierfür werden 15 µl iVLP-Suspension mit 5 µl 4 x PP versetzt, die übrige Suspension wird für die Infektion von HUH7-Zellen verwendet (Indikatorzellen).

Nachweis der MARV-spezifischen Transkription/Replikation in VLP-produzierenden Zellen

72 h nach Transfektion werden die Zellen einmal mit PBS_{def} gewaschen, in 2 ml PBS_{def} pro Schale mit einem Zellschaber abgekratzt, gleiche Ansätze werden in einem Falcon-Röhrchen gepoolt und für 5 min bei 3.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1.200 µl Lysis-Puffer (Renilla-Juice bzw. Firefly-Juice Kit, pjk) resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur und 1.400 U/min auf dem Schüttler lysiert. Die Zelldebris werden im Anschluss für 10 min bei 4 °C und 13.000 U/min abzentrifugiert, der Überstand wird nach

Herstellerangaben des Renilla-Juice bzw. Firefly-Juice Kits von pjk in einem Luminometer gemessen. Bei der Messung werden die Renilla-Luciferase und die Firefly-Luciferase-Aktivität gemessen. Die Renilla-Luciferase-Aktivität ist ein Maß für die MARV-spezifische Transkription/Replikation, die Aktivität der Firefly-Luciferase entspricht der zellulären Transkription und wird daher für die Normalisierung der Zelllysate genutzt.

Infektion von HUH7-Zellen (Indikatorzellen)

Nach der Ultrazentrifugation werden die iVLPs wie oben beschrieben resuspendiert, zur Infektion von HUH7-Zellen werden sie in einem finalen Volumen von 400 µl pro Well einer 12-Well-Platte eingesetzt. Nach Infektion mit den iVLPs für 1,5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wird 1 ml DMEM_{3 % FCS + Q + P/S} zugegeben, die Zellen werden für weitere ca. 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Je nach Fragestellung werden entweder unbehandelte Indikatorzellen verwendet oder Zellen, die bereits 6 h vor der Infektion mit Plasmiden für die Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und L sowie die Firefly-Luciferase (zur Normalisierung der Zellzahl) transfiziert wurden (3.2.2). Je nach Ansatz wurde hierbei entweder NPwt oder die entsprechende Mutante verwendet, die auch in den VLP-produzierenden Zellen exprimiert wurde, ein Ansatz entspricht einem Well einer 12-Well-Platte.

Plasmid	Menge
NPwt oder NPmut	250 ng
VP30	50 ng
VP35	50 ng
L	500 ng
pGL 4 (Firefly-Luciferase)	40 ng

Zur Ernte werden die Zellen einmal mit PBS_{def} gewaschen, in 1 ml PBS_{def} pro Well mit einem Zellschaber abgekratzt und für 5 min bei 3.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 100 µl Lysis-Puffer (Renilla-Juice bzw. Firefly-Juice Kit, pjk) resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur und 1.400 U/min auf dem Schüttler lysiert. Die Zelldebris werden im Anschluss für 10 min bei 4 °C und 13.000 U/min abzentrifugiert, der Überstand wird nach Herstellerangaben des Renilla-Juice bzw. Firefly-Juice Kits von pjk in einem Luminometer gemessen. Auch hier werden bei der Messung die Renilla-Luciferase und die Firefly-Luciferase-Aktivität gemessen. Die Renilla-Luciferase-Aktivität ist ein Maß für die MARV-spezifische Transkription/Replikation in den Indikatorzellen, die ein Maß für die Infektiosität der

iVLPs darstellt. Die Aktivität der Firefly-Luciferase entspricht der zellulären Transkription und wird daher für die Normalisierung der Zellzahl genutzt.

3.2.7 Flotationsanalyse im diskontinuierlichen Nycodenz-Gradienten

Die Flotationsanalyse dient der Charakterisierung von membranassoziierten Proteinen. NP selbst ist nicht bzw. nur schwach membranassoziiert, bei einer Co-Expression von NP mit VP40 steigert sich die Membranassoziation allerdings, so dass die Flotationsanalyse als Nachweis der Interaktion von NP und VP40 dient. Bei der zusätzlichen Expression von VP24 wird die Membranassoziation weiter gesteigert, so dass auch eine Interaktion von NP mit VP24 untersucht werden kann.

HUH7-Zellen (ausgesät auf 6 cm-Schalen) werden mit Plasmiden für die gewünschten Proteine mit TransIt® transfiziert, ein Ansatz entspricht einer 6 cm-Schale:

Plasmid	Menge
NPwt oder NPmut	2 µg
VP40	1 µg
VP24	1 µg

24 h nach Transfektion werden die Proben für die Flotationsanalyse vorbereitet, alle Arbeitsschritte erfolgen auf Eis: Zunächst werden die Zellen in der Zellkulturschale dreimal mit je 1 ml Hypotonem Lysispuffer (inklusive 2 µmol/ml PMSF) gewaschen und anschließend in 300 µl Hypotonem Lysispuffer (inklusive 2 µmol/ml PMSF und 1 x Complete Proteaseinhibitor-Cocktail) mit einem Zellschaber abgekratzt. Die mechanische Zerstörung der Zellmembranen erfolgt mit Hilfe einer Spritze durch zwölfmaliges Aufziehen und Auslassen der Suspension durch eine 26G-Kanüle. Mit einer 60 %igen Nycodenz-Lösung (in TNE) wird das Zell-Lysat auf eine Nycodenz-Konzentration von 40 % eingestellt. 45 µl der so vorbereiteten Probe werden als Expressions- und Ladekontrolle mit 15 µl 4 x PP versetzt, das übrige Lysat wird in Ultraclear® Zentrifugenröhrchen für SW60-Rotoren pipettiert. Das Lysat wird nacheinander vorsichtig mit 3 ml 30 %iger und 500 µl 5 %iger Nycodenz-Lösung überschichtet und 16,5 h bei 4 °C und 36.000 U/min im SW60-Rotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation lassen sich makroskopisch Zellmembranen an der Phasengrenze zwischen der 30 %igen und der 5 %igen Nycodenzlösung erkennen, in dieser Phase sind die Proteine detektierbar, die membranassoziiert vorliegen. Zur Analyse der Proteinverteilung werden von oben vorsichtig 7 Fraktionen à 600 µl abgenommen, pro Fraktion werden 60 µl Probe mit 20 µl 4 x PP versetzt und zusammen mit den Zell-Lysaten mittels SDS-PAGE (3.4.2) und anschließendem Western Blot (3.4.3) analysiert.

3.3 Virologische Methoden

3.3.1 Reverse Genetik von rekombinantem Marburgvirus

Die Klonierungsstrategie zur Generierung von Volllängeplasmiden, die das komplette Genom von MARV kodieren, beruht auf der Ligation von 3 Fragmenten mit einem Vektor, wobei die einzelnen Genfragmente für verschiedene MARV-Proteine kodieren. Das Fragment 1 kodiert für NP, VP35, VP40 und den N-Terminus von GP, die gewünschte Mutation kann per ortsgerichteter *in-vitro*-Mutagenese eingebracht werden (3.1.3). Anschließend werden die einzelnen Fragmente mittels verschiedener Restriktionsendonukleasen verdaut, danach erfolgt die Ligation mit dem Vektor pAndy (3.1.7, 3.1.8, 3.1.9).

Genfragment	Restriktionsenzyme
Fragment 1	Clal, Fspl, SacII
Fragment 2	Fspl, KpnI, SacII
Fragment 3	KpnI, PvuI, SacI
Vektor	Clal, SacI

Das Volllängeplasmid pFLMB T7wt SacII10511 #16 (VL wt kodiert für das wildtypische MARV und wird hier im Weiteren als pFL MARV NPwt bezeichnet.

Ein 1.:1-Gemisch von HUH7- und VeroE6-Zellen (50 % konfluent) wird mit Plasmiden, die für die viralen Nukleokapsidproteine NP (wt oder gewünschte Mutante), VP30, VP35 und L kodieren sowie dem gewünschten Volllängeplasmid transfiziert. Die so transfizierten Zellen werden als Passage 0 (P0)-Zellen bezeichnet. Ein Ansatz entspricht einem Well einer 6-Well-Platte.

Nukleokapsidproteine	0,5 µg	pCAGGS NPwt oder NP-Mutante
	0,1 µg	pCAGGS VP30
	0,1 µg	pCAGGS VP35
	2 µg	pCAGGS L
Volllängeplasmid	2 µg	pFL MARV NPwt bzw. Mutante
DNA-abhängige RNA-Polymerase	0,5 µg	T7 Polymerase

Die Transfektion erfolgt pro Ansatz in einem Well einer 6-Well-Platte pro Ansatz mit TransIT® nach Herstellerangaben, vor der Transfektion wird ein Mediumwechsel zu 3 ml DMEM_{+Q} pro Well durchgeführt. 4-6 h nach der Transfektion wird das Medium zu 3 ml DMEM_{3 % FCS+Q + P/S} gewechselt. 7-10 Tage nach der Transfektion wird eine Blindpassage auf neue VeroE6-Zellen (Passage 1, P1) durchgeführt. Hierzu wird das Medium von den P1-Zellen abgenommen, 1 ml Überstand der P0-Zellen wird auf die P1-Zellen gegeben und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂

inkubiert. Anschließend werden zu jedem Well 3 ml DMEM_{5 % FCS + Q + P/S} gegeben. Nach 7-10 Tagen wird lichtmikroskopisch der zytopathische Effekt (CPE) begutachtet. Die P1-Zellen sowie eine Probe vom Überstand werden mit 4x Probenpuffer versetzt und für mindestens 10 min bei 99 °C aufgeköcht. Die Proben werden anschließend in neue Gefäße überführt und aus dem BSL-4-Labor ausgeschleust. Vor der Analyse per SDS-PAGE und Western Blot werden sie erneut für 10 min bei 99 °C aufgeköcht (3.4.2, 3.4.2).

3.3.2 Anzucht und Ankonzentrierung von Viren

Zur Anzucht von Viren werden VeroE6-Zellen in 125 cm²-Flaschen (60 % konfluent) mit je 5 ml Virusverdünnung in DMEM_{+ Q + P/S} infiziert und 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, dann werden 30 ml DMEM_{10 % FCS + Q + P/S} zugegeben. Die Zellen werden im Anschluss so lange inkubiert (ca. 7 – 10 Tage), bis sich ein deutlicher CPE entwickelt. Der Überstand wird in 50 ml-Falconröhrchen überführt, in einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) werden für 10 min bei 1.000 Upm evtl. schwimmende Zellen abzentrifugiert. Die Virussuspension wird in 2 ml-Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Titration des so erhaltenen Virusstocks erfolgt mittels TCID₅₀-Analyse (3.3.3). Für die Ankonzentrierung des Virus wird der zellfreie Zellkulturüberstand über ein Sucrosekissen (20 % Sucrose in TNE-Puffer) ultrazentrifugiert. Je nach Menge des zu konzentrierenden Überstands kann dies in SW60- SW32- oder TLA45-Ultrazentrifugenröhrchen erfolgen. Nach der Zentrifugation wird das Viruspellet in 50 µl 2 x PP resuspendiert und für mindestens 10 min bei 99 °C aufgeköcht. Die Proben werden anschließend in neue Gefäße überführt, aus dem BSL-4-Labor ausgeschleust. Vor der Analyse per SDS-PAGE und Western Blot werden sie erneut für 10 min bei 99 °C aufgeköcht (3.4.2, 3.4.3).

Für eine elektronenmikroskopische Analyse der Viren wird das Pellet mit 4 % PFA-Lösung (in DMEM) versetzt und 16 h bei 4 ° inkubiert. Vor dem Ausschleusen erfolgt ein Wechsel zu frischer 4 %iger PFA-Lösung.

3.3.3 Bestimmung des Virustiters: TCID₅₀-Assay

Zur Bestimmung des Virustiters dient der TCID₅₀-Assay (*tissue culture infectious dose 50*). Hierbei wird die Virusverdünnung bestimmt, bei der noch 50 % der Zellen infiziert sind. Dazu werden VeroE6- oder HUH7-Zellen in 96-Well-Zellkulturplatten zu einer Dichte von ca. 50 % ausgesät. Vor der Infektion wird das Medium zu 100 µl DMEM_{5 % FCS + Q + P/S} pro Well gewechselt. Separat wird aus dem Virusstock eine Verdünnungsreihe mit Verdünnungen von 10⁻² bis 10⁻⁷ in DMEM_{+ Q + P/S} hergestellt. Bei der Herstellung der Verdünnungsreihe wird nach jedem Verdünnungsschritt die Pipettenspitze gewechselt, um ein Verschleppen von Virus in höhere Verdünnungen

zu vermeiden. Je 100 µl jeder Verdünnung wird anschließend mit einer Multipipette zu den vorbereiteten Zellen gegeben, es wird eine achtfache Bestimmung jeder Verdünnung durchgeführt, als Negativkontrolle wird eine Mock-Infektion mit DMEM_{+Q+P/S} mitgeführt. Die Zellen werden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis der CPE sich nicht mehr verändert (ca. 10-14 Tage). Die Berechnung des Titers (TCID₅₀/ml) erfolgt nach der Spearman und Kärber Methode (64).

3.3.4 Infektion mit rekombinantem Marburgvirus

VeroE6- oder HUH7-Zellen werden im gewünschten Zellkulturgefäß (24-Well- / 12-Well- / 6-Well-Zellkulturplatte oder T25-Zellkulturflasche) so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Dichte von 30-50 % haben. Vor der Infektion wird das Medium zu DMEM_{+Q+P/S} gewechselt. Die gewünschte Virusverdünnung oder *multiplicity of infection* (MOI, bei den Versuchen jeweils angegeben) wird hergestellt, indem der Virusstock mit einer entsprechenden Menge DMEM_{+Q+P/S} versetzt wird. Für die Infektion wird das Medium von den Zellen abgenommen und die Virussuspension auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wird das Inokulum entfernt und frisches Medium (DMEM_{3%FCS+Q+P/S}) auf die Zellen gegeben.

3.3.5 Immunoplaque-Assay

Ein Immunoplaque-Assay wird zur Bestimmung des Titers sowie der Morphologie der Plaques verschiedener rekombinanter Viren durchgeführt. Die Infektion von VeroE6-Zellen (ca. 80 %ig) erfolgt in einer 12-Well-Zellkulturplatte in verschiedenen Verdünnungen. Vor der Infektion wird das Medium zu 450 µl DMEM_{+Q+P/S} gewechselt. Zunächst erfolgt eine Vorverdünnung (Faktor 1:10) des Virusstocks in PBS_{def}, anschließend werden 50 µl der Verdünnung in das erste Well gegeben, gemischt und dann 50 µl in das nächste Well überführt und wiederum gemischt. Nach jedem Well wird die Pipettenspitze gewechselt, um ein Verschleppen von Virus in höhere Verdünnungen zu vermeiden. Die Bestimmung wird in einem zweifachen Ansatz durchgeführt. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wird das Inokulum entfernt und durch 1 ml 1,5 % CMC in MEM_{5%FCA+Q+P/S} ersetzt, der Zusatz von Cellulose im Medium steigert dessen Viskosität, so dass sich die Viren nur durch Zell-Zell-Kontakte, nicht aber durch das Medium verbreiten können. Die infizierten Zellen werden für 3-4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wird der Überstand abgenommen und die Zellen werden durch Zugabe von 4 % PFA/DMEM fixiert und inaktiviert. Nach einer Inkubation von mindestens 16 h bei 4 °C wird die PFA-Lösung durch frisches 4 % PFA/DMEM ersetzt, so dass die Zellkulturplatte ausgeschleust werden kann. Nach ei-

ner weiteren Inkubation von mindestens 16 h bei 4 °C kann die Immunfärbung erfolgen, die analog des Protokolls zur indirekten Immunfluoreszenzanalyse nach dem Fixierungs-Schritt erfolgt (3.4.1).

3.4 Biochemische und immunologische Methoden

3.4.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Die indirekte Immunfluoreszenzanalyse dient der Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen. Das Prinzip beruht auf zwei Antigen-Antikörper-Bindungen: Der Erstantikörper bindet an das Zielprotein in der Zelle; der Zweitantikörper bindet an den Erstantikörper und ist mit einem Fluorezenzfarbstoff markiert. Dieser Farbstoff wird durch das UV-Licht eines Fluoreszenzmikroskops angeregt, emittiert Licht und zeigt somit die Lokalisation des Proteins in der Zelle an.

HUH7- oder VeroE6-Zellen werden hierzu auf runden Deckgläsern (12 mm Durchmesser) in Zellkulturplatten kultiviert (30-40 % Konfluenz) und mit TransIT® transfiziert (3.2.2) oder mit MARV im BSL-4-Labor infiziert (3.3.4). Nach ca. 16-20 h nach der Transfektion bzw. Infektion werden die Zellen mit 4 % PFA/DMEM für mindestens 30 min bei Raumtemperatur fixiert.

Proben aus dem BSL-4-Labor werden für mindestens 16 h mit 4 % PFA/DMEM bei 4 °C fixiert. Danach werden die Deckgläschen in eine neue Zellkulturplatte überführt, frisches 4 % PFA/DMEM wird dazugegeben und die Proben werden ausgeschleust. Vor der weiteren Verwendung werden die Proben erneut für mindestens 16 h bei 4 °C aufbewahrt.

Nach der Fixierung werden die Deckgläschen dreimal für je 5 min mit PBS_{def} gewaschen, anschließend folgt eine Inkubation für 5 min in 100 mM Glycin/PBS_{def}. Danach werden die Zellen mit 0,1 % Triton/PBS_{def} für 5 min permeabilisiert und im Anschluss erneut für 5 min in PBS_{def} gewaschen. Dann werden die Zellen für 10 min mit Blockierungspuffer inkubiert, um bei der Antikörperfärbung unspezifische Bindungen zu vermeiden. Die so vorbereiteten Zellen werden mit dem ersten Antikörper (verdünnt in Blockierungspuffer) für 1 h inkubiert. Dazu werden pro Deckgläschen 20 µl der Antikörperverdünnung auf Parafilm gegeben und das Deckgläschen anschließend mit der zellbewachsenen Seite auf der Lösung platziert. Nach der Inkubation werden die Deckgläschen erneut dreimal für jeweils 5 min in PBS_{def} gewaschen, anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Zweitantikörper für 1 h wie oben beschrieben. Zur Anfärbung der Zellkerne wird der Zweitantikörper-Verdünnung DAPI zugegeben. Die Inkubationen erfolgen jeweils in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Nach weiterem dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit PBS_{def} werden die Deckgläschen kurz in dH₂O getaucht und mit der zellbewachsenen Seite nach unten in Fluoprep (+ DABCO) eingedeckelt. Nach dem Trocknen

der Eindeckelflüssigkeit können die gefärbten Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops analysiert werden. Die Detektion der Proteine erfolgt am Fluoreszenzmikroskop Leica MM AF.

Erstantikörper	Spezies	Verdünnung
α -MARV	Ziege	1:250
α -MARV NP 59-9-10	Maus	1:20
α -MARV VP40 40-2-2	Maus	1:100
α -MARV NP 2	Meerschweinchen	1:200
α -flag™ M2	Maus	1:50

Zweitantikörper	Spezies	Verdünnung	
α -Maus	Alexa 488	Esel	1:500
α -Meerschweinchen	Alexa 594	Ziege	1:500
α -Meerschweinchen	Alexa 488	Ziege	1:500
α -Ziege	Alexa 488	Kaninchen	1:500
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)			1:10.000

3.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Proteine werden nach ihrer Größe durch eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Dafür werden die Proteine mit SDS komplexiert und dadurch negativ geladen. Die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern in einem Polyacrylamidgel nach Anlegen einer Spannung in Richtung Anode und trennen sich entsprechend ihrer Molekülgröße auf. Das Gel besteht aus einem 5 % Sammelgel und einem höherprozentigen Trenngel, dessen Acrylamid-Konzentration nach Größe der aufzutrennenden Proteine gewählt wird. Vor dem Auftragen der Proteine auf das Gel werden sie mit einer entsprechenden Menge 4x Probenpuffer versetzt, um sie bei einer Inkubation von 10 min bei 95 °C zu denaturieren. Die Gelelektrophorese erfolgt in einer Gelkammer mit 1x Proteingellaufpuffer bei 25 mA pro Gel und maximaler Spannung für ca. 45 min. Bei der Auftrennung von NP in seine phosphorylierte und nichtphosphorylierte Form dauert die Auftrennung ca. 90 min. Anschließend wird zur Analyse der Proben ein Western Blot durchgeführt (3.4.3).

Mengen für jeweils 4 Gele	Sammelgel 5 %	Trenngel 8 %	Trenngel 12 %
dH ₂ O	6,8 ml	9,3 ml	6,6 ml
30 % Polyacrylamid-Lösung (Rotyphorese® 30)	1,7 ml	5,3 ml	8 ml
PAGE-Sammelgelpuffer	1,25 ml	-	-
PAGE-Trenngelpuffer	-	5 ml	5,3 ml
APS (10 % in dH ₂ O)	0,1 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED	0,01 ml	0,012 ml	0,01 ml

Erstantikörper	Spezies	Verdünnung
α -MARV	Ziege	1:3.000
α -MARV NP 59-9-10	Maus	1:500
α -MARV VP40 40-2-2	Maus	1:5.000
α -MARV VP24 1	Kaninchen	1:100

3.4.3 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot)

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen, die von einem SDS-Polyacrylamidgel (3.4.2) auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen und anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Zur Durchführung eines Western Blots nach dem Semi-Dry-Blot-Prinzip wird zunächst die PVDF-Membran für 1 min in Ethanol aktiviert und anschließend in 1x Transferpuffer befeuchtet. Pro Gel werden 8 Blatt Whatman-Papier (6,3 x 9,1 cm) ebenfalls in 1x Transferpuffer befeuchtet. In einer Western-Blot-Kammer werden die einzelnen Komponenten aufeinandergelegt: 4 Blatt Whatman-Papier werden mit der vorbereiteten PVDF-Membran bedeckt, anschließend wird das Gel auf die Membran gelegt und von weiteren 4 Blatt Whatman-Papier bedeckt. Eventuell vorhandene Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten werden durch vorsichtiges Überrollen mit einer Plastikpipette entfernt. Der Transfer der Proteine erfolgt bei einer Spannung von 20 V und maximalem Stromfluss von der Kathode zur Anode für 40 min (kurzes Protokoll). Alternativ können die Proteine – vor allem für die Detektion kleiner Proteine – auch bei einer Stromstärke von 43 mA pro Membran und voller Spannung für 90 min transferiert werden (langes Protokoll).

Analog zur Immunfluoreszenzanalyse beruht die Detektion der Proteine auf zwei Antigen-Antikörper-Bindungen: Der Erstantikörper bindet an das Zielprotein, das auf die Membran transferiert wurde; der Zweitantikörper bindet an den Erstantikörper und ist mit einer Peroxidase markiert. In einer enzymatischen Reaktion kann die Peroxidase ein Substrat spalten, wobei Licht emittiert wird. Die Stärke des emittierten Lichts dient als Maß für die Proteinmenge und kann mit Hilfe der Entwicklermaschine oder am BioRad ChemiDoc-System detektiert werden.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran über Nacht bei 4 °C oder für 1^h bei Raumtemperatur in 10 % Milchpulver/PBS_{def} inkubiert. Im Anschluss wird die Membran dreimal für jeweils 5 min mit PBS_{def} + 0,1 % Tween gewaschen und für 1 h mit einem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen für je mindestens 5 min mit PBS_{def} + 0,1 % Tween entfernt. Im Anschluss wird die Membran für 1 h mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Membran wird anschließend 2 x 5 min mit PBS_{def} + 0,1 % Tween und 2 x 5 min mit PBS_{def} gewaschen. Alle Antikörper werden in 1 % Milchpulver/PBS_{def} + 0,1 % Tween verdünnt.

Zweitantikörper		Spezies	Verdünnung
α-Maus	HRP	Ziege	1:40.000
α-Meerschw.	HRP	Esel	1:20.000
α-Ziege	HRP	Esel	1:40.000
α-Kaninchen	HRP	Schwein	1:20.000

3.4.4 Coomassie®-Färbung

Durch eine SDS-PAGE (3.4.2) aufgetrennte Proteine können auch direkt im Gel mit Coomassie® Brilliant Blue R250 angefärbt werden.

Dazu wird das Gel 20-30 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd in Coomassie®-Färbelösung inkubiert und anschließend in H₂O bis zum gewünschten Grad entfärbt, sodass nur die Proteinbanden mit möglichst wenig Hintergrund sichtbar bleiben.

Anschließend wird das Gel gescannt, die Proteinbanden können mit Hilfe des ChemiDoc Systems quantifiziert werden.

3.4.5 Vorbereitung von Proben für die Elektronenmikroskopie (Negativkontrastierung)

Für die Untersuchung der Morphologie der rMARV wurden die Viren zunächst mittels Ultrazentrifugation konzentriert und mit 4 % PFA/DMEM inaktiviert. Nickel-Grids werden zunächst mit einer Schicht aus 3 % Formvar in Chloroform und anschließend mit Kohlenstoff versehen. Die Beschichtung mit 20 µl der inaktivierten Viren erfolgt je nach Konzentration für 5 Minuten bis 12 Stunden. Dabei kann die Anheftung der Viruspartikel an die Grids mit einer vorigen Inkubation mit 1 % Alcyan Blau für 1 Minute verbessert werden. Nach dem Abnehmen überschüssiger Flüssigkeit mit Filterpapier, werden die Grids dreimal für 5 Minuten in dH₂O gewaschen. Die Negativkontrastierung erfolgt mit 2 % Phosphorwolframsäure (in dH₂O, pH 7,2) für 2 Minuten. Überschüssige Phosphorwolframsäure wird von den Grids entfernt, die anschließend im Elektronenmikroskop analysiert werden können. Dieser Versuchsteil wurde von Dr. Larissa Kolesnikova durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung und Charakterisierung von MARV NP-Phosphorylierungsmutanten

4.1.1 Untersuchung des Laufverhaltens der NP-Mutanten im SDS-Gel

Zunächst wurden bereits vorhandene NP-Mutanten in pCAGGS umkloniert, in Zellen exprimiert und ihr Laufverhalten im SDS-Gel untersucht. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (3.2.2) und 48 h nach der Transfektion lysiert. Das Laufverhalten der NP-Mutanten wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Westernblot analysiert (3.4.2, 3.4.3).

In Abb. 8 A ist schematisch MARV NP mit den 7 Phosphorylierungsregionen dargestellt, die potentiellen Phosphatakzeptorstellen der untersuchten Regionen VI und VII sind fett hervorgehoben. Eine Übersicht über die viralen Proteine im Überstand infizierter Zellen zeigt Abb. 8 B, der Zellkulturüberstand infizierter Zellen wurde hierzu über ein Sucrosekissen pelletiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine wurden mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die viralen Proteine L und VP30 sind aufgrund ihrer geringen Mengen in den Viruspartikeln nicht detektierbar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in den folgenden Abbildungen ausschließlich die jeweils untersuchten viralen Proteine und nicht die kompletten Western Blots gezeigt.

Die Auftrennung von NP in die unphosphorylierte und die phosphorylierte Bande ist aufgrund des geringen Größenunterschieds der beiden Banden nur mit Hilfe eines niedrigprozentigen Trenngels möglich. In Abb. 8 C ist eine NP-Doppelbande mit den beiden Phosphorylierungsbanden gezeigt, die durch eine Auftrennung mit einem 8 % Trenngel mit einer Laufzeit von ca. 90 Minuten bei 25 mA pro Gel dargestellt wurde.

Mit Hilfe des Proteinmarkers, der für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurde (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas), wurde die Größe der unphosphorylierten NP-Bande im SDS-Gel mit ca. 103 kDa bestimmt, die phosphorylierte NP-Bande lief bei ca. 105 kDa. Da allerdings die Größe der beiden Proteinmodifikationen in der Literatur mit 92 kDa (unphosphoryliert) und 94 kDa (phosphoryliert) angegeben werden, werden die verschiedenen Banden im weiteren Verlauf der Arbeit mit ihren publizierten Größen bezeichnet. Die unterschiedlichen Laufhöhen im Gel sind wahrscheinlich durch unterschiedliche Untersuchungsbedingungen bedingt: Die Gelsysteme, die Laufzeiten sowie die verschiedenen Proteinmarker die in dieser Arbeit genutzt wurden unterschieden sich von denen in bereits publizierten Arbeiten.

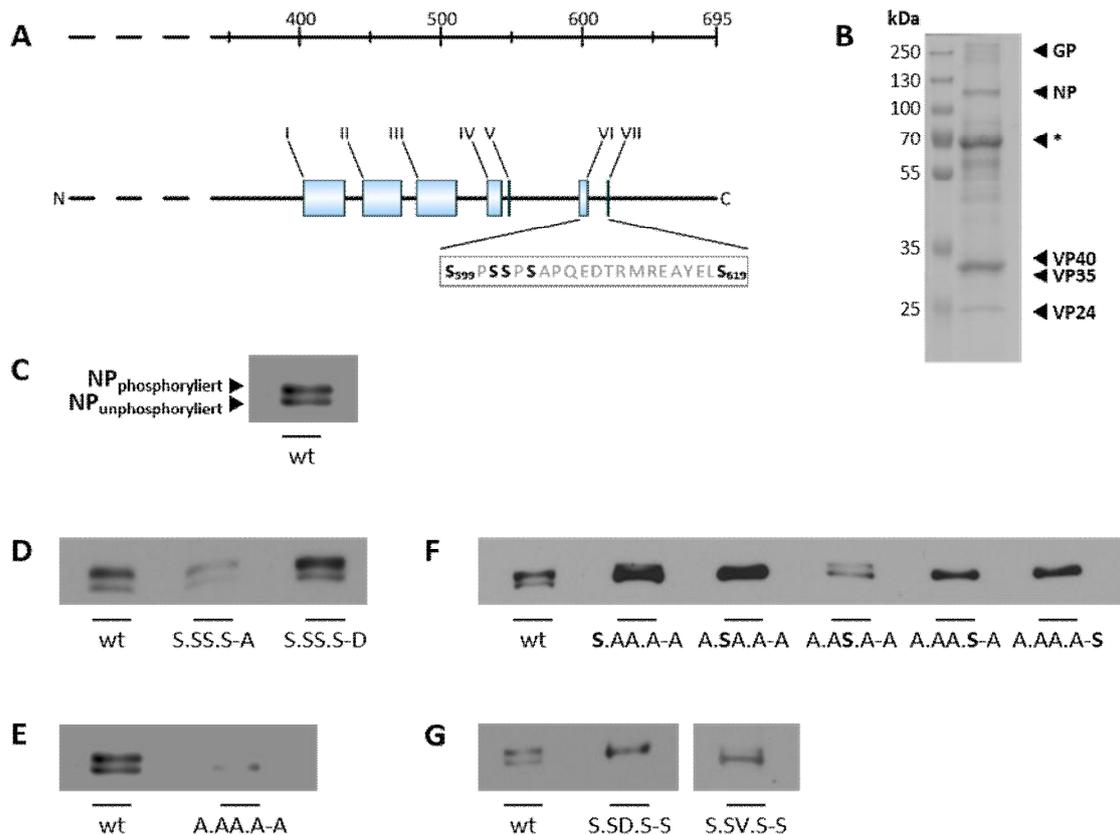


Abbildung 8: Untersuchung des Laufverhaltens der NP-Phosphorylierungsmutanten im SDS-Gel.
A. Schematische Struktur von MARV NP, Aminosäuresequenz der Phosphorylierungsregionen VI und VII. Die potentiell phosphorylierbaren Serine in beiden Regionen sind hervorgehoben.
B. Auftrennung von rMARV NP_{wt} im SDS-Gel zur Darstellung der Größe der verschiedenen viralen Proteine. HUH7-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit einer MOI von 1 infiziert, 96 h nach Infektion wurden die Viren im Überstand über ein Sucrosekissen pelletiert. Die viralen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer Coomassie-Lösung angefärbt. * repräsentiert eine unspezifische BSA-Bande.
C. Detektion der NP-Doppelbande im SDS-Gel. HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben mit pCAGGS-NP_{wt} transfiziert, 48 h nach Transfektion wurde das Zell-Lysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt, im Western Blot wurde MARV NP mit einem NP-spezifischen Antikörper angefärbt. Es lassen sich zwei Banden detektieren, die obere entspricht phosphoryliertem NP, die untere unphosphoryliertem NP.
D. Laufverhalten der Region VII-Phosphorylierungsmutanten. E. Laufverhalten der Phosphorylierungsmutante, in der alle Serine aus Regionen VI und VII zu Alanin mutiert sind. F. Serinscreen von Phosphorylierungsregionen VI und VII. G. Laufverhalten der Phosphorylierungsmutanten für Position S602.

Die Mutanten NP_{S.SS.S-A} und NP_{S.SS.S-D} zeigen bei der Analyse ihres Laufverhaltens keinen Unterschied zu NP_{wt}, es sind beide NP-Banden (92 kDa und 94 kDa) detektierbar (Abb. 8 C, Spuren 3 und 4). Bei Mutante NP_{A.AA.A-A} ist im Gegensatz dazu die 94 kDa-Bande verschwunden (Abb. 8 D, Spur 2). Die Phosphorylierungsregionen I – V sind bei dieser Mutante unverändert, somit sind insgesamt nur fünf Serinreste im NP zu Alanin mutiert worden.

Die Mutante läuft ausschließlich auf Höhe der 92 kDa-Bande, eine oder mehrere Phosphatakzeptorstellen in der Phosphorylierungsregion VI sind daher für das Laufverhalten der NP-Phosphorylierungsformen essentiell.

Im Vergleich zum Laufverhalten von NP_{wt} könnte dies einerseits bedeuten, dass die Phosphorylierung einzelner Serine der hier untersuchten Phosphorylierungsregion unmittelbar zu einer Konformationsänderung von NP führt. Ebenso könnte die Phosphorylierung einzelner Serine in dieser Phosphorylierungsregion das Phosphorylierungsmuster der anderen Phosphorylierungsregionen von NP beeinflussen und so indirekt zum charakteristischen Laufmuster von NP im SDS-Gel beitragen.

Zur Untersuchung, ob einer der Serinreste in der Phosphorylierungsregion VI die Konformationsänderung von NP verursacht, wurde ein *Serinscreen* durchgeführt: Durch ortsgerichtete Mutagenese (3.1.3) ausgehend von der Mutante NP_{A,AA,A-A} wurden alle Alanine einzeln zu Serin rückmutiert. Die Mutanten wurden anschließend wie oben beschrieben in HEK293-Zellen exprimiert und ihr Laufverhalten mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 8 E).

Eine Rückmutation von Alanin zu Serin an Position 602 führte dazu, dass wieder beide NP-Banden detektierbar waren (Abb. 8 E, Spur 4). Zur detaillierten Analyse der Funktion von S602 wurden daher ausgehend von NP Wildtyp zwei Mutanten generiert. NP_{S,SD,S-S} imitiert eine konstante Phosphorylierung an Position 602, NP_{S,SV,S-S} imitiert ein konstant unphosphoryliertes Serin an dieser Position. Anstelle einer Mutation zu Alanin wurde hier bewusst zu Valin mutiert, da sonst ein PSAP-Motiv eingeführt werden würde, das als Late-Domäne mit zellulären Interaktionspartnern interagieren könnte. NP besitzt natürlicherweise und in unmittelbarer Nähe (Aminosäuren 603-606) ein solches PSAP-Motiv, über das es mit dem zellulären Partner TSG101 interagiert (25, 24). Der Austausch gegen Valin als alternative unpolare kleine Aminosäure sollte an dieser Stelle eine Untersuchung der Funktion der Phosphorylierung ermöglichen, ohne die Ergebnisse durch mögliche veränderte Interaktionen mit TSG101 zu verfälschen.

Die Untersuchung des Laufverhaltens der beiden Mutanten im SDS-Gel (s. Abb. 8 F) zeigte, dass NP_{S,SD,S-S} wie erwartet ausschließlich in der Höhe der 94 kDa-Bande läuft (Abb. 8 F, Spur 2). Bei NP_{S,SV,S-S} sind weiterhin zwei Banden detektierbar, auch wenn die 92 kDa-Bande mengenmäßig überwiegt (Abb. 8 F, Spur 3). Die Beobachtungen sprechen dafür, dass die Phosphorylierung bzw. die NP-Konformation, die der phosphorylierten Form entspricht, so wichtig ist, dass die Funktion zumindest teilweise durch eine oder mehrere andere Aminosäuren übernommen werden kann. Da bei diesen Mutanten alle anderen Phosphorylierungsregionen von NP unverändert sind (Regionen I – V), besteht grundsätzlich auch die Möglichkeit, dass die Phosphorylierung durch Phosphatazeptorstellen der anderen Phosphorylierungsregionen kompensiert wird.

4.1.2 Einfluss der Phosphorylierung in Regionen VI und VII auf die Transkription/Replikation

Der Einfluss der Phosphorylierung auf die Replikation und Transkription wurde mit Hilfe des MARV-spezifischen Minigenomsystems untersucht. Um modellhaft die Situation in einer viralen Infektion möglichst realistisch nachzustellen wurden in den verwendeten HEK293-Zellen neben den Proteinen, die im klassischen Minigenomsystem exprimiert werden (NP, VP30, VP35 und L) auch VP24, VP40 und GP in Zellen exprimiert.

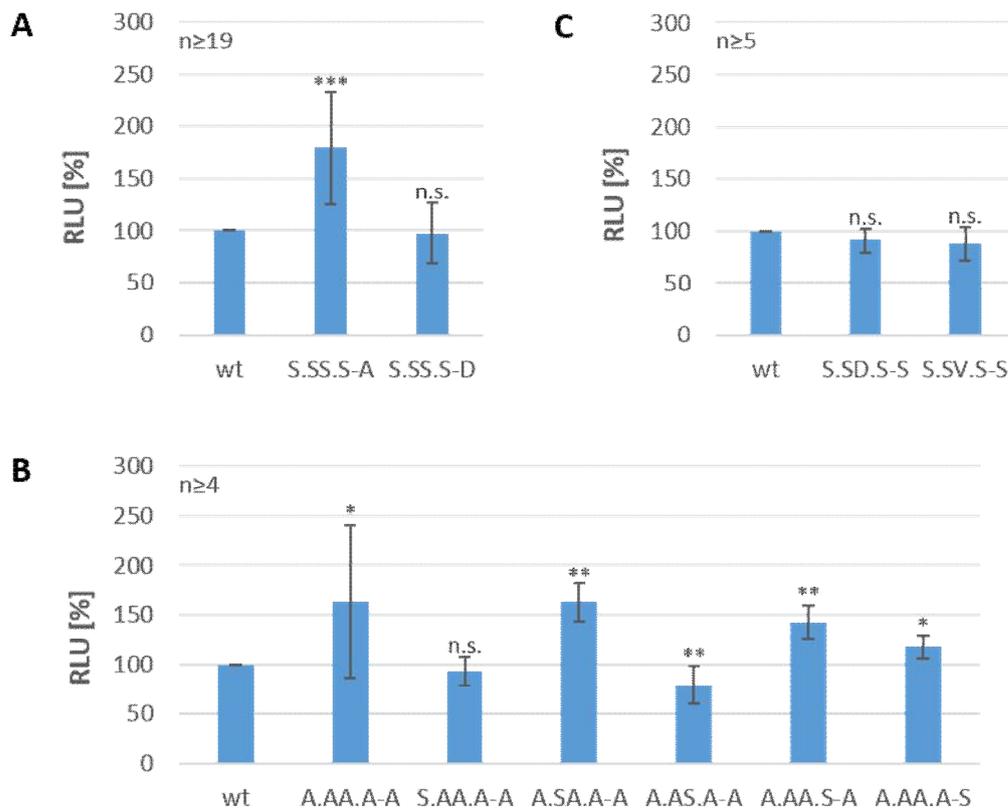


Abbildung 9: Untersuchung der Replikations-/Transkriptionsaktivität der NP-Phosphorylierungsmutanten.

Reporteragenaktivität in iVLP-produzierenden Zellen. HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.6 beschrieben transfiziert, 72 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Reporteragenaktivität ermittelt (RLU, *relative light units*). Die Aktivität von NP_{wt} wurde auf 100 % gesetzt.

A. S619-NP-Mutanten.

B. NP-Mutanten, die im Serinscreen generiert wurden.

C. S602-NP-Mutanten. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zu NP_{wt} ermittelt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Für die S619-Phosphorylierungsmutanten zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Hinblick auf die Reporteragenaktivität (Abb. 9 A): Die Mutation zu Alanin (NP_{S.SS.S-A}) führte zu einer deutlich gesteigerten Replikations-/Transkriptionsaktivität, die für NP_{S.SS.S-D} gemessene Aktivität unterschied sich nicht von NP_{wt}. Die für den Replikationszyklus wichtigen Schritte der Synthese neuer

viraler RNA und viraler Strukturproteine sind also begünstigt, wenn S619 nicht phosphoryliert vorliegt.

Alle NP- Mutanten, die im Rahmen des oben beschriebenen Serinscreens generiert wurden, wurden mittels des Minigenomsystems untersucht (Abb. 9 B). Einige NP-Mutanten (NP_{A.AA.A-A}, NP_{A.SA.A-A}, NP_{A.AA.S-A} und NP_{A.AA.A-S}) zeigten eine im Vergleich zu NP_{wt} moderat erhöhte Aktivität, Mutante NP_{S.AA.A-A} verhielt sich nicht signifikant unterschiedlich zu NP_{wt} während Mutante NP_{A.AS.A-A} eine geringere Reporteragenaktivität als NP_{wt} aufwies. Die Phosphorylierung bzw. Nicht-phosphorylierung bestimmter Serine in Phosphorylierungsregion VI scheinen die Replikation und Transkription zu beeinflussen, ein bestimmtes Muster, wie zum Beispiel eine konstant erhöhte Aktivität bei einer Mutation von S619 zu Alanin, ließ sich nicht feststellen.

NP_{S.SD.S-S} und NP_{S.SV.S-S} zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in ihrer Transkriptions-/Replikationsaktivität im Vergleich zu NP_{wt} (Abb. 9 C).

Da für die Mutanten des Serinscreens kein funktionaler Zusammenhang zwischen dem Laufverhalten im SDS-Gel und der Replikations-/Transkriptionsaktivität zu bestehen schien, wurden die weiteren funktionellen Charakterisierungen mit den Mutantenpaaren NP_{S.SS.S-A} und NP_{S.SS.S-D} (Untersuchung der Phosphorylierungsregion VII) und NP_{S.SD.S-S} und NP_{S.SV.S-S} (Untersuchung der Funktion der verschiedenen NP-Konformationen) durchgeführt. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden die beiden Mutantenpaare jeweils als „S602-Phosphorylierungsmutanten“ (Region VI, NP_{S.SD.S-S} und NP_{S.SV.S-S}) sowie als „S619-Phosphorylierungsmutanten“ (Region VII, NP_{S.SS.S-A} und NP_{S.SS.S-D}) bezeichnet.

4.1.3 Einfluss der Phosphorylierung auf die intrazelluläre Verteilung von NP

Die intrazelluläre Verteilung der NP-Mutanten wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenzanalyse untersucht. NP akkumuliert in sogenannten *inclusion bodies*, die im Zytoplasma verteilt, meistens perinukleär vorliegen. Zur Untersuchung, ob auch die Mutanten diese charakteristische Eigenschaft besitzen, wurden HUH7-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit einem NP-spezifischen Antikörper gefärbt (3.2.2, 3.4.1).

Alle NP-Mutanten sind wie NP_{wt} in der Lage, *inclusion bodies* zu bilden (Abb. 10 A). Da neben den Zellen mit den charakteristischen *inclusion bodies* auch Zellen detektierbar waren, in denen NP eine diffuse Verteilung aufweist, wurden Bildserien aufgenommen und die Zellen mit *inclusion bodies* bzw. mit ausschließlich diffuser Verteilung von NP ausgezählt (Abb. 10 B). Hierbei lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen NP_{wt} und NP_{S.SS.S-A}, NP_{S.SS.S-D}, NP_{S.SD.S-S} und NP_{S.SV.S-S} feststellen. Die Mutationen haben bei Einzelexpression keinen Einfluss auf die Verteilung von NP in der Zelle.

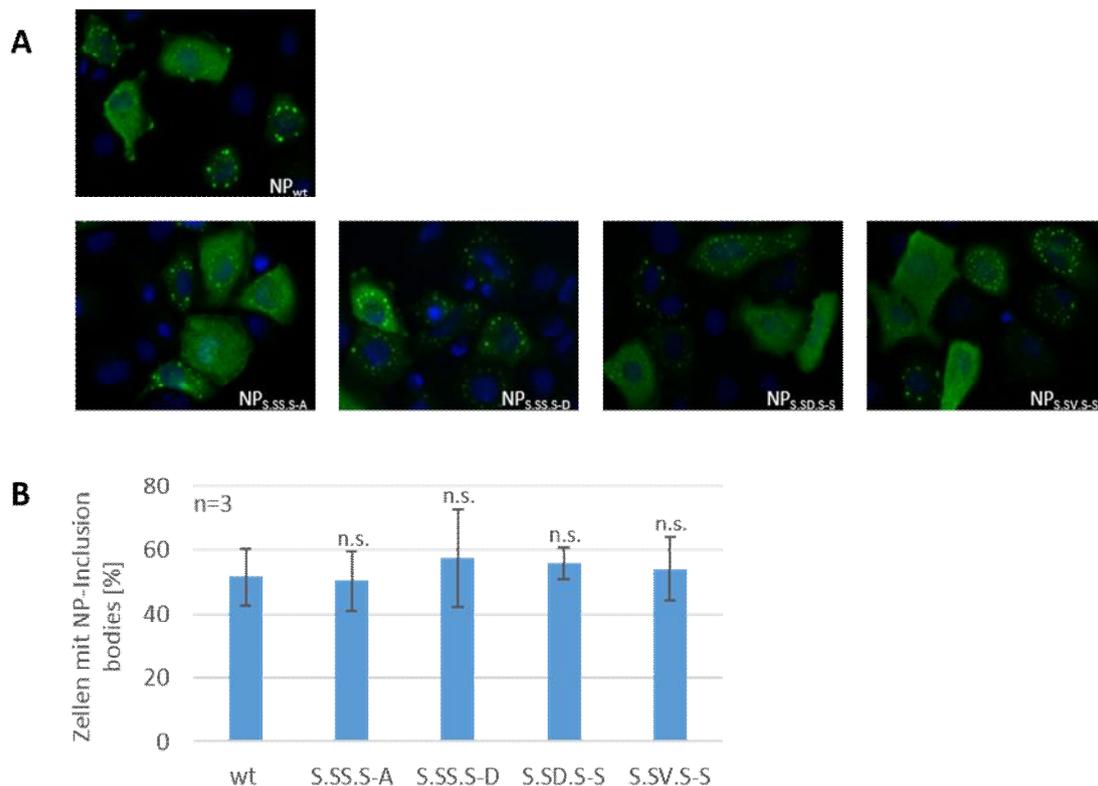


Abbildung 10: Intrazelluläre Verteilung der NP-Phosphorylierungsmutanten.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.4.1 beschrieben transfiziert, 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Das exprimierte NP wurde mit folgenden Antikörpern detektiert: α -NP (Meerschweinchen) und α -Meerschweinchen (Ziege) 488; Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Zur Quantifizierung der NP-Verteilung wurden Bildserien aufgenommen und die verschiedenen Zellpopulationen (NP ausschließlich in *inclusion bodies* oder NP diffus verteilt bzw. Mischformen) quantifiziert.

A. Immunfluoreszenzaufnahmen der NP-Mutanten.

B. Anteil der NP-positiven Zellen, in denen NP ausschließlich in *inclusion bodies* vorliegt. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zu NP_{wt} ermittelt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

4.1.4 Einfluss der Phosphorylierung auf die Kolokalisation von NP mit anderen viralen Proteinen

NP hat im viralen Replikationszyklus verschiedene wichtige Funktionen: Es rekrutiert die Nukleokapsidproteine VP30 und VP35 in die *inclusion bodies* und damit an den Ort der viralen Replikation und Transkription. Außerdem interagiert NP mit dem Matrixprotein VP40, wodurch der Transport neu gebildeter Nukleokapside aus den *inclusion bodies* an die Plasmamembran ermöglicht wird. An der Plasmamembran kommt es dann zum Zusammenbau und zur Freisetzung neuer Viruspartikel.

Die Interaktion der NP-Mutanten mit verschiedenen anderen MARV-Proteinen wurde mittels Immunfluoreszenz-Kolokalisationsstudien untersucht. Hierzu wurden HUH7-Zellen mit Plasmiden, die für NP_{wt} bzw. den NP-Phosphorylierungsmutanten und einem Plasmid, das für ein weiteres virales Protein codiert, transfiziert.

24 h nach Transfektion wurden die Proteine angefärbt und im Immunfluoreszenzmikroskop analysiert.

Interaktion von NP und VP35

Wird VP35 allein exprimiert, so liegt es diffus im Zytoplasma verteilt vor (Abb. 11). Bei gleichzeitiger Expression von NP wird VP35 in die *inclusion bodies* rekrutiert, die Kolokalisation der beiden Proteine ist bei Überlagerung der beiden Aufnahmen deutlich zu erkennen. Zur Charakterisierung der Interaktion der NP-Mutanten mit VP35 wurde ein *flag*-markiertes VP35 (*flag*-VP35) verwendet. Neben NP_{wt} sind auch alle untersuchten NP-Mutanten in der Lage, VP35 in die *inclusion bodies* zu rekrutieren (Abb. 11).

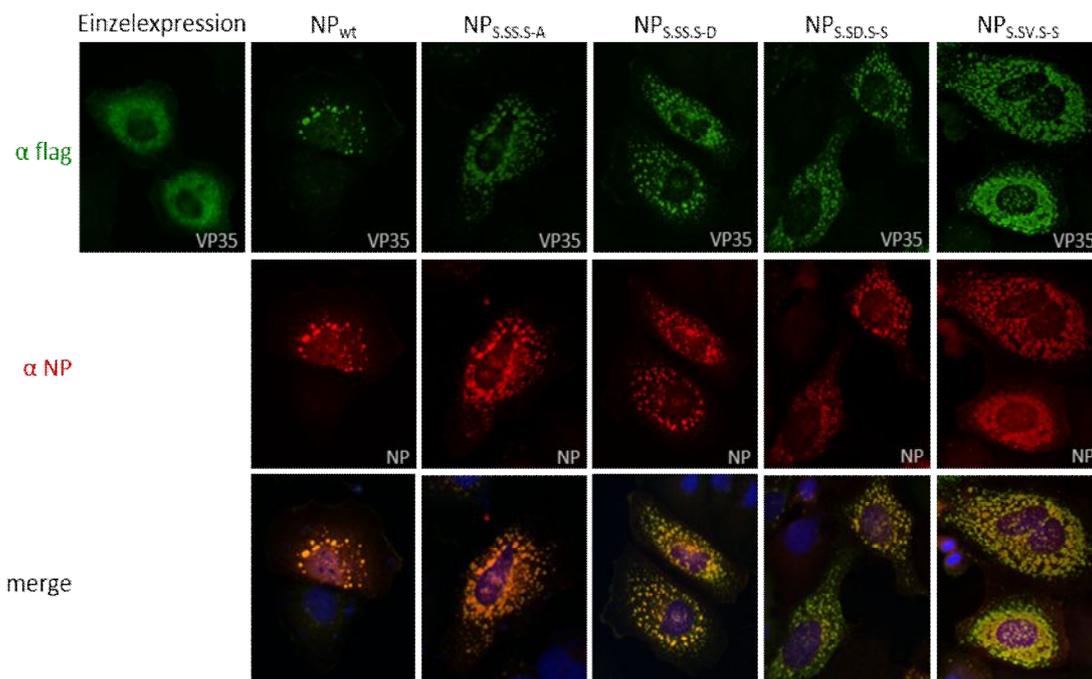


Abbildung 11: Interaktion von NP und VP35.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.4.1 beschrieben transfiziert, 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die exprimierten Proteine wurden mit folgenden Antikörpern detektiert: *flag*-markiertes VP35 mit α -flag (Maus) und α -Maus (Ziege) 488; NP mit α -NP (Meerschweinchen) und α -Meerschweinchen (Ziege) 594; Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Interaktion von NP und VP30

Ähnlich wie VP35 liegt auch VP30 bei Einzelexpression diffus im Zytoplasma verteilt vor. Bei einer Koexpression mit NP wird VP30 ebenfalls in die *inclusion bodies* rekrutiert, die *inclusion bodies* sind im Vergleich zur Koexpression von NP mit VP35 allerdings deutlich kleiner und nicht so gleichmäßig rund geformt. Die Interaktion von NP mit VP30 wurde mit Hilfe eines GFP-markierten Konstrukts von VP30 untersucht. VP30-GFP trägt am C-Terminus ein grün fluoreszierendes Protein, so dass das Protein zur Detektion in der Immunfluoreszenz nicht zusätzlich gefärbt werden muss.

Abbildung 12 zeigt die Kolo­kalisierung von den untersuchten NP-Mutanten mit VP30, es sind keine Unterschiede zu NP_{wt} detektierbar. Sowohl die Form der *inclusion bodies* als auch die Kolo­kalisierung von NP und VP30 entspricht der Verteilung, die bei NP_{wt} zu beobachten ist.

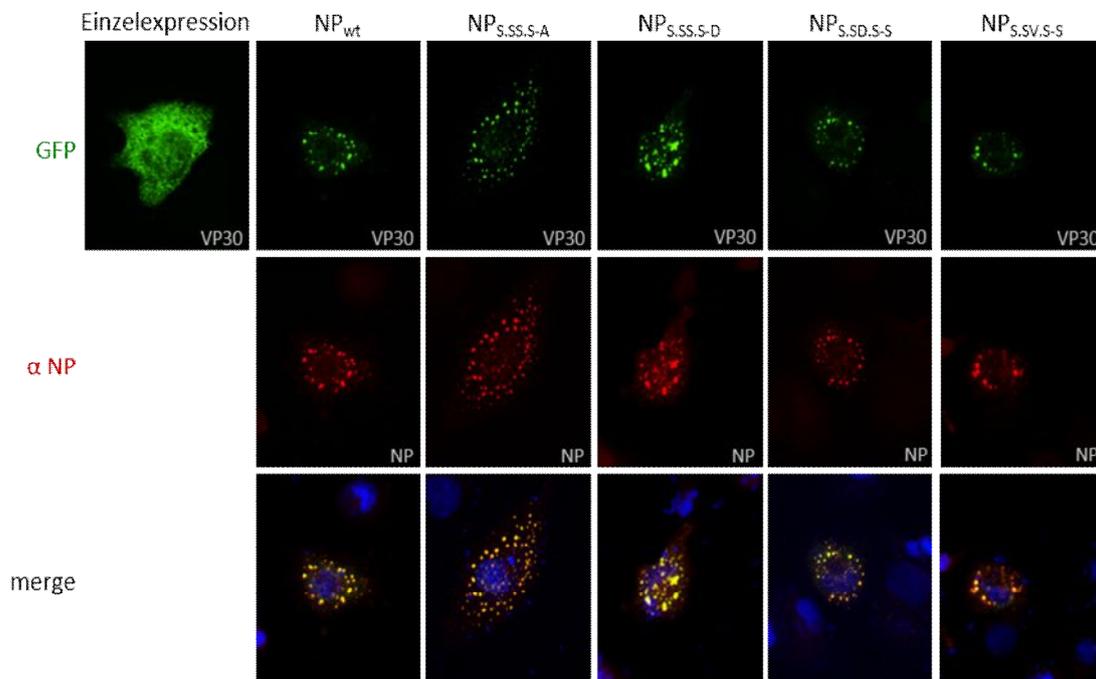


Abbildung 12: Interaktion von NP und VP30.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.4.1 beschrieben transfiziert, 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die exprimierten Proteine wurden mit folgenden Antikörpern detektiert: VP30 wurde als GFP-markiertes Protein exprimiert und musste daher nicht extra ange­färbt werden; NP mit α-NP (Meerschweinchen) und α-Meerschweinchen (Ziege) 594; Zellkerne wurden mit DAPI ange­färbt.

Interaktion von NP und VP40

Das virale Matrixprotein VP40 akkumuliert bei einer Einzelexpression in perinukleären Clustern (s. Abb. 13 A, die Cluster in der VP40-Einzelexpression sind durch Pfeilspitzen markiert), bei einer Koexpression mit NP wird ein Teil von VP40 in oder an die *inclusion bodies* rekrutiert, VP40 ist aber auch diffus im Zytoplasma verteilt detektierbar. Bei längeren Belichtungszeiten der gleichen Proben am Immunfluoreszenzmikroskop werden auch schwächer leuchtende Strukturen sichtbar. So kann auch die Peripherie der Zelle dargestellt werden, wodurch die VP40-positiven Filopodien detektiert werden können (s. Abb. 13 B). NP ist punktförmig in den Filopodien oder außerhalb der Filopodien lokalisiert, wahrscheinlich entspricht das NP-Signal außerhalb der Filopodien ausgeschleusten NP-positiven virusähnlichen Partikeln, die durch die Expression von VP40 induziert werden. Ähnlich wie bei den anderen untersuchten viralen Proteinen sind auch hier mikroskopisch keine Unterschiede in der Interaktion zwischen NP_{wt} und den untersuchten NP-Mutanten mit VP40 detektierbar.

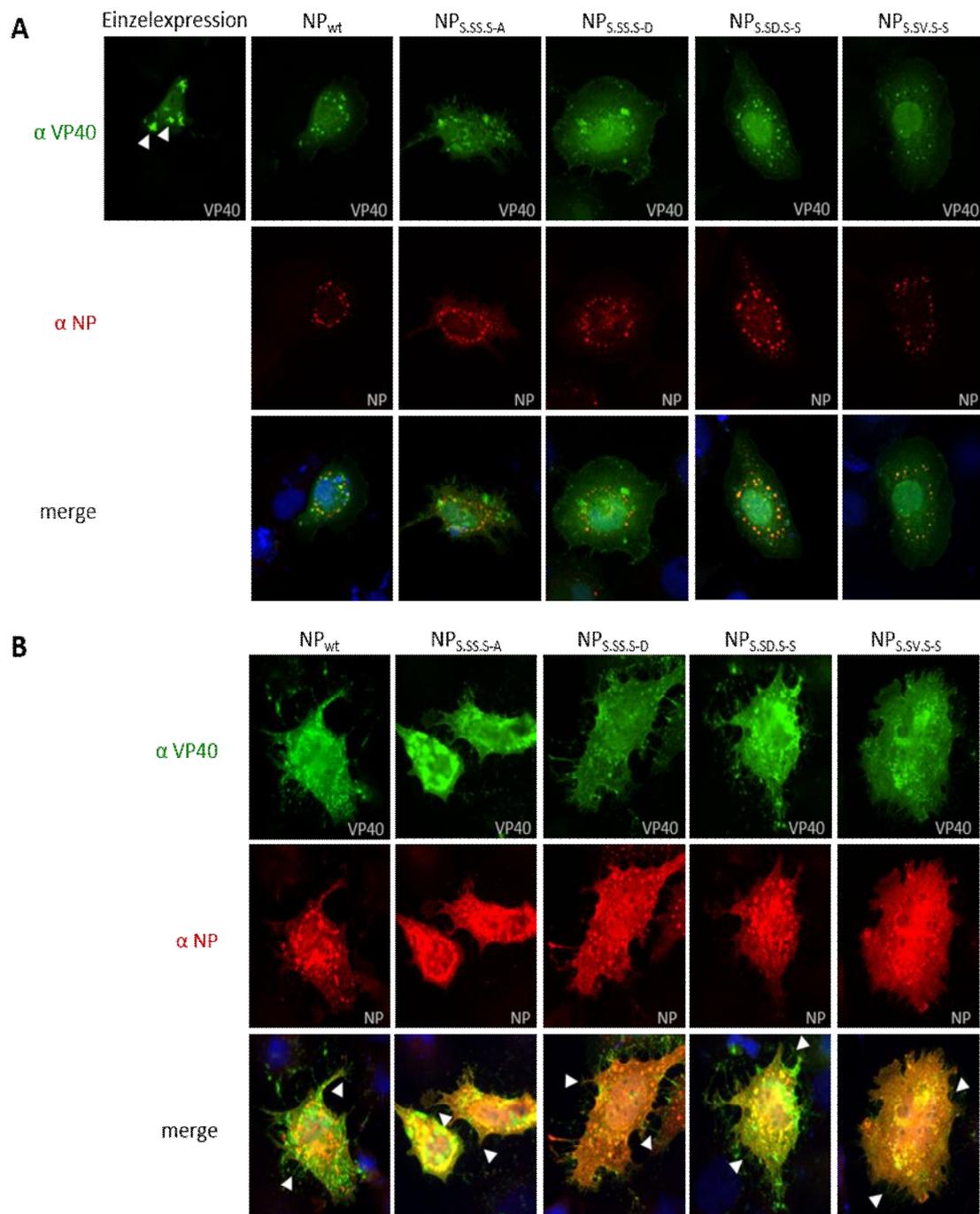


Abbildung 13: Interaktion von NP und VP40.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.4.1 beschrieben transfiziert, 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die exprimierten Proteine wurden mit folgenden Antikörpern detektiert: VP40 mit α -VP40 (Maus) und α -Maus (Ziege) 488; NP mit α -NP (Meerschweinchen) und α -Meerschweinchen (Ziege) 594; Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

A. Kurze Belichtungszeit zur Detektion von NP-spezifischen *inclusion bodies*. Pfeilspitzen markieren die perinukleären VP40-Cluster, in denen das Protein bei Einzelexpression akkumuliert.

B. Lange Belichtungszeit zur Detektion von VP40-positiven Filopodien. Pfeilspitzen markieren die durch VP40 induzierten Filopodien.

4.1.5 Flotationsanalyse der NP-Phosphorylierungsmutanten

Die Flotationsanalyse dient klassischerweise der Untersuchung von Membranproteinen (3.2.7). Hierbei werden Zelllysate, die die zu untersuchenden Proteine exprimieren, in einem Dichtegradienten ultrazentrifugiert, nach der Zentrifugation werden sieben Fraktionen gewonnen. Membrangebundene Proteine steigen aufgrund der geringen Dichte der Lipidmembranen während der Ultrazentrifugation nach oben und sind in den oberen Fraktionen mit geringerer Dichte detektierbar (s. Abb. 14 A, Flotation, Spuren 1-3). Proteine, die nicht membrangebunden vorliegen, finden sich in den unteren Fraktionen mit der höheren Dichte wieder (s. Abb. 14 A, Flotation, Spuren 6-7).

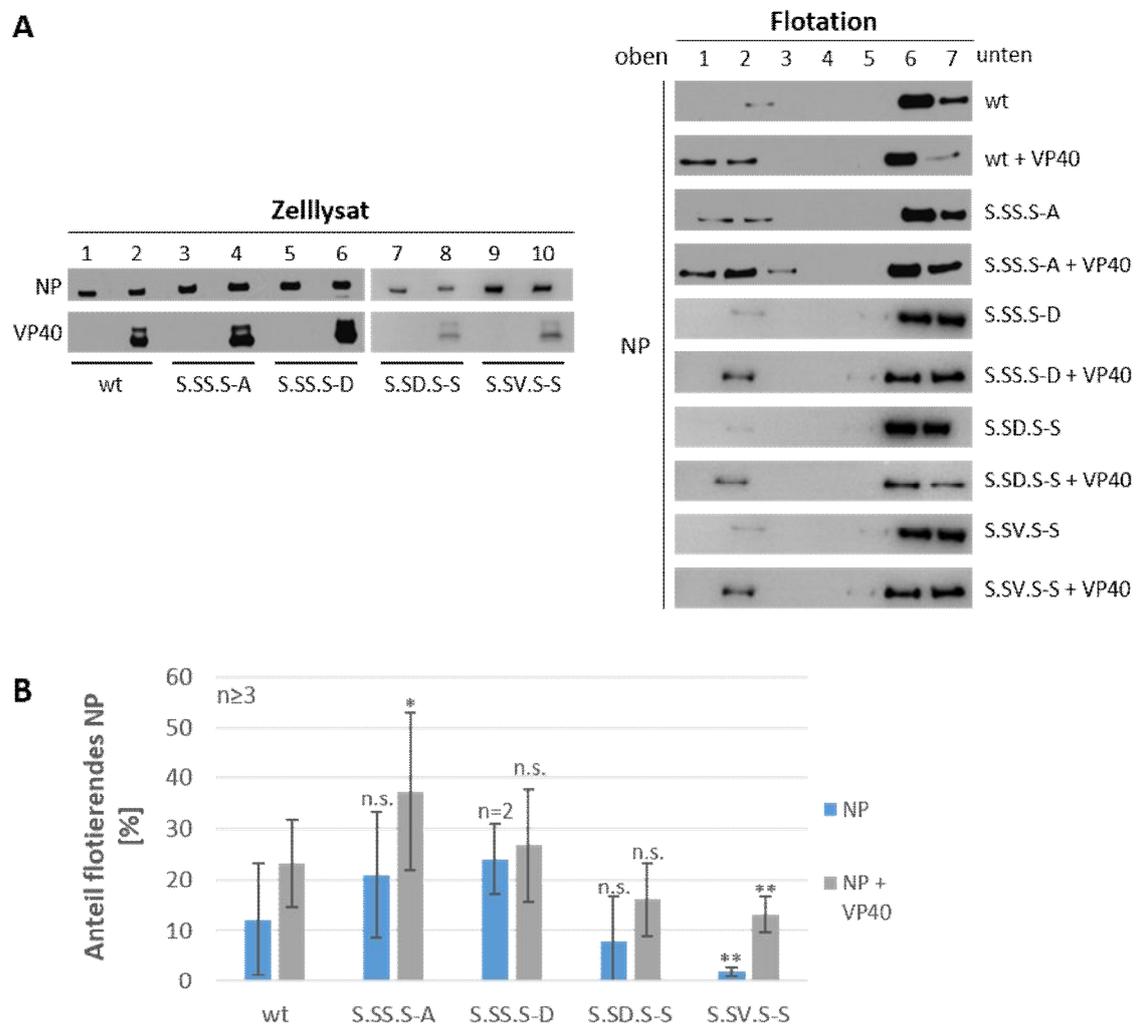


Abbildung 14: Flotationsanalyse der NP-Phosphorylierungsmutanten.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.2.7 beschrieben transfiziert, 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und einer Flotationsanalyse unterzogen.

A. Western Blot der Zell-Lysate und der aufgetrennten Fraktionen nach Flotation.

B. Flotierender Anteil der Gesamt-NP-Menge. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zu NP_{wt} (NP_{wt} - VP40 für Ansätze ohne VP40, NP_{wt} + VP40 für Ansätze mit VP40) ermittelt: * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001

Für MARV dient die Flotationsanalyse auch der Charakterisierung der Interaktion von NP mit dem Matrixprotein VP40: Bei singulärer Expression flotiert NP zu einem geringen Anteil, bei Koexpression von NP und VP40 steigt der Anteil des flotierenden NPs, so dass die Koflotation von NP und VP40 als Maß für eine Interaktion der beiden Proteine dient.

Vom wildtypischen NP flotiert bei singulärer Expression ca. 10-15 % der Gesamt-NP-Menge im Zell-Lysat, bei Koexpression mit VP40 steigt der Anteil auf 20-25 % (s. Abb. 14 B, wt).

In der Flotationsanalyse zeigten die singulär exprimierte Phosphorylierungsmutanten NP_{S,SS,S-A} und NP_{S,SS,S-D} keinen statistisch signifikanten Unterschied zu NP_{wt}. Bei Koexpression mit VP40 flotiert allerdings ein größerer Anteil an NP_{S,SS,S-A}, ein unphosphoryliertes Serin an Position 619 verbessert also die Interaktion mit VP40 bzw. die Membranbindung von NP in Anwesenheit von VP40 (s. Abb. 14 B).

Anders stellt sich die Situation für die S602-Phosphorylierungsmutanten dar: Mutante NP_{S,SD,S-S} unterschied sich im Flotationsverhalten weder in Einzelexpression noch bei der Koexpression mit VP40 signifikant von NP_{wt}, bei NP_{S,SV,S-S} flotierte in beiden Fällen ein deutlich geringerer Anteil des von der Zelle exprimierten NP (s. Abb. 14 B). NP_{S,SV,S-S} repräsentiert anhand des Laufverhaltens im SDS-Gel vor allem die 92 kDa-Bande und damit die unphosphorylierte Konformation von NP, somit interagiert unphosphoryliertes NP wahrscheinlich schlechter mit VP40 bzw. wird schlechter zur Membran und damit zum Ort des Zusammenbaus und der Freisetzung neuer viraler Partikel transportiert. Eine Phosphorylierung und dadurch bedingte Konformationsänderung des NP ist also für die effiziente Interaktion von NP mit VP40 essentiell.

4.1.6 Charakterisierung der NP-Phosphorylierungsmutanten im infektiösen VLP Assay

Zur funktionellen Charakterisierung der NP-Phosphorylierungsmutanten in allen Phasen des viralen Lebenszyklus dient ein infektiöser VLP Assay (iVLP Assay) (1.6.1, 3.2.6).

In 4.1.2 wurde zur Charakterisierung der verschiedenen generierten NP-Phosphorylierungsmutanten bereits die Replikations- und Transkriptionsaktivität in den VLP-produzierenden Zellen dargestellt.

Ein kompletter iVLP Assay dient der modellhaften Untersuchung aller Phasen des viralen Replikationszyklus: Die VLP-produzierenden Zellen exprimieren plasmidbasiert alle viralen Proteine sowie zusätzlich die DNA-abhängige T7-Polymerase und eine Renilla-Luciferase als Reporter. Da diese Zellen alle viralen Proteine in großen Mengen synthetisieren repräsentieren sie eher späte Stadien der viralen Infektion. Die Renilla-Aktivität in den VLP-produzierenden Zellen ist das Maß für die Replikations- bzw. Transkriptionseffizienz der untersuchten NP-Phosphorylierungsmutanten.

Von den VLP-produzierenden Zellen werden VLPs in den Überstand freigesetzt, die morphologisch sehr stark MARV-Partikeln ähneln. Zusätzlich werden von den Zellen allerdings vesikuläre Partikel abgeschnürt, die zwar virale Proteine enthalten, deren Einbau allerdings unspezifisch erfolgt (75, 155). Vor der Untersuchung der Zusammensetzung der iVLPs im SDS-Gel mit anschließender Western Blot-Analyse werden die Partikel daher über einen Nycodenz-Gradienten nach ihrer Dichte in sphärische (in den oberen Fraktionen) und filamentöse (in den unteren Fraktionen) Partikel aufgetrennt (s. 3.2.6). Die sphärischen Partikel werden verworfen, die filamentösen Partikel werden zum einen auf ihre Proteinmenge und -zusammensetzung hin untersucht, zum anderen werden mit ihnen die sogenannten Indikatorzellen infiziert. Die Gesamt-Proteinmenge in den freigesetzten Partikeln dient als Maß für die Freisetzungseffizienz, die Untersuchung der Proteinzusammensetzung dient der Charakterisierung der NP-Phosphorylierungsmutanten.

Durch Bestimmung der Reporteraktivität in den Indikatorzellen wird die Infektiosität der iVLPs bestimmt.

Wie bereits zuvor dargestellt (4.1.2) und aus Gründen der Übersichtlichkeit und Vollständigkeit in Abbildung 15 A nochmals gezeigt, ist die Replikations- bzw. Transkriptionsaktivität von NP_{S,SS,S-A} in den VLP-produzierenden Zellen deutlich erhöht, während die anderen untersuchten Mutanten sich nicht signifikant von NP_{wt} unterscheiden. Die NP- und VP40-Expressionslevel in den VLP-produzierenden Zellen wurden mit einer Western Blot-Analyse bestimmt (s. Abb. 15 B), es konnten keine signifikanten Unterschiede in den exprimierten Proteinmengen festgestellt werden. Die im Renilla-Luciferaseassay gemessenen unterschiedlichen Aktivitäten wurden also nicht durch unterschiedliche Proteinmengen verursacht.

Eine Nicht-Phosphorylierung von Serinrest 619 ist demnach in späten Phasen der viralen Infektion (die durch die VLP-produzierenden Zellen repräsentiert werden) von Vorteil. Die Synthese großer Mengen viraler RNA oder mRNAs wird so besonders effizient unterstützt.

Die Proteinzusammensetzung der filamentösen iVLPs wurde mit Hilfe einer Western Blot-Analyse bestimmt (Abb. 15 C). Alle NP-Mutanten wurden in die filamentösen Partikel eingebaut, zur genaueren Quantifizierung wurde durch Bildung des Quotienten aus Proteinmenge in den VLPs und Proteinmenge im Zell-Lysat die relative freigesetzte Proteinmenge bestimmt. Anschließend wurde der Quotient von NP_{wt} pro VP40 als 1 gesetzt und mit den NP-Mutanten verglichen (Abb. 15 D). Im Vergleich der einzelnen Phosphorylierungsmutanten mit NP_{wt} wird deutlich, das NP_{S,SS,S-A} schlechter, NP_{S,SS,S-D} hingegen besser in die iVLPs eingebaut wird. Die Unterschiede sind statistisch signifikant. Die beiden Mutanten NP_{S,SD,S-S} und NP_{S,SV,S-S} unterscheiden sich hier nicht von NP_{wt}.

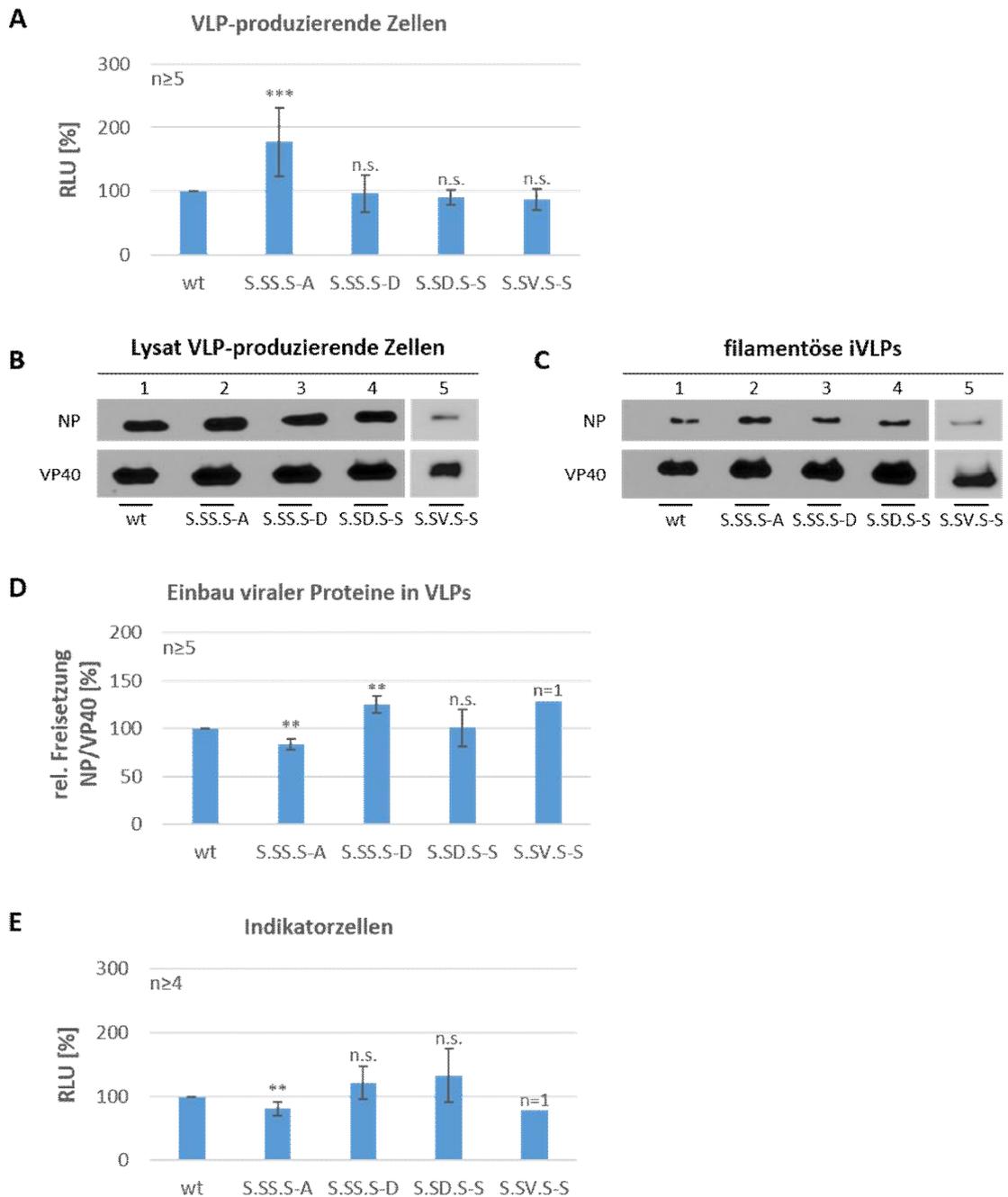


Abbildung 15: Untersuchung der NP-Phosphorylierungsmutanten im infektiösen VLP-Assay.

HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.6 beschrieben transfiziert, 72 h nach Transfektion wurden die VLP-produzierenden Zellen lysiert und die Reporterogenaktivität ermittelt (RLU, *relative light units*). Die filamentösen VLPs wurden durch Ultrazentrifugation aufgereinigt und zur Infektion von Indikatorzellen genutzt. Die Indikatorzellen wurden zuvor mit Plasmiden für die Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und L vortransfiziert, wobei jeweils die gleiche NP-Mutante verwendet wurde, die auch in die VLPs eingebaut war. 72 h nach Infektion wurden die Indikatorzellen lysiert und die Reporterogenaktivität ermittelt. Die Aktivität bzw. relative Freisetzung von NP_{wt} wurde auf 100% gesetzt.

A. Replikations-/Transkriptionsaktivität in VLP-produzierenden Zellen.

B. Western Blot der Lysate von VLP-produzierenden Zellen.

C. Western Blot der filamentösen iVLPs.

D. Verhältnis der relativen freigesetzten Mengen von NP und VP40 in den filamentösen iVLPs.

E. Replikations-/ Transkriptionsaktivität in Indikatorzellen. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zum jeweiligen NP_{wt}-Ansatz ermittelt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Die Funktion der iVLPs im Hinblick auf ihre Fähigkeit, neue Zielzellen zu infizieren, wurde ebenfalls untersucht. Die Zielzellen wurden hierzu mit den Nukleokapsidproteinen NP, VP30, VP35 und L vortransfiziert, wobei jeweils mit der NP-Mutante vortransfiziert wurde, die auch in die iVLPs eingebaut war.

Wie in Abbildung 15 E dargestellt, unterschied sich die Replikations-/Transkriptionsaktivität in den Indikatorzellen für NP_{S,SS,S-D} sowie NP_{S,SD,S-S} und NP_{S,SV,S-S} nicht deutlich von NP_{wt}, die Aktivität von NP_{S,SS,S-A} war allerdings leicht reduziert.

Da die Indikatorzellen mit den viralen Nukleokapsidproteinen NP, VP30, VP35 und L vortransfiziert waren, konnten hier Replikation und Transkription gleichzeitig ablaufen. Die in den Indikatorzellen gemessene Aktivität ist daher nicht ausschließlich ein Maß für die Infektiosität der iVLPs. Es ist anzunehmen, dass analog zur erhöhten Aktivität in den VLP-produzierenden Zellen auch in den Indikatorzellen die Replikations- und Transkriptionsaktivität von NP_{S,SS,S-A} erhöht ist. Zusätzlich könnten durch die erhöhte Aktivität in den VLP-produzierenden Zellen mehr Minigenom-Templates synthetisiert und freigesetzt worden sein, die zusätzlich die Aktivität in den Indikatorzellen erhöhen können.

Zusammenfassend lässt sich aus den iVLP-Ergebnissen ablesen, dass ein nichtphosphoryliertes Serin 619 in der viralen Infektion vorteilhaft für eine effiziente Replikation und/oder Transkription ist. Für einen effizienten Einbau in die iVLPs und die Infektion neuer Zellen ist allerdings die Phosphorylierung an dieser Position günstig. Somit kann angenommen werden, dass zur optimalen Unterstützung der verschiedenen Phasen im viralen Lebenszyklus die dynamische Phosphorylierung an dieser Position eine wichtige Rolle spielt.

Überraschenderweise hat die Konformation von NP, deren Funktion mit Hilfe der S602-Phosphorylierungsmutanten NP_{S,SD,S-S} und NP_{S,SV,S-S} untersucht wurde, augenscheinlich keinen Einfluss auf Replikation und Transkription sowie die Freisetzung in iVLPs und die anschließende Infektion. Für die Untersuchung von Freisetzung und Infektion von Indikatorzellen war allerdings für Mutante NP_{S,SV,S-S} nur ein Versuch auswertbar.

4.2 Herstellung und Charakterisierung rekombinanter Viren

4.2.1 Herstellung rekombinanter Viren

Um die Funktion der dynamischen Phosphorylierung in der viralen Infektion zu untersuchen, wurden rekombinante Viren generiert (1.6.2), die die oben beschriebenen NP-Phosphorylierungsmutanten exprimieren.

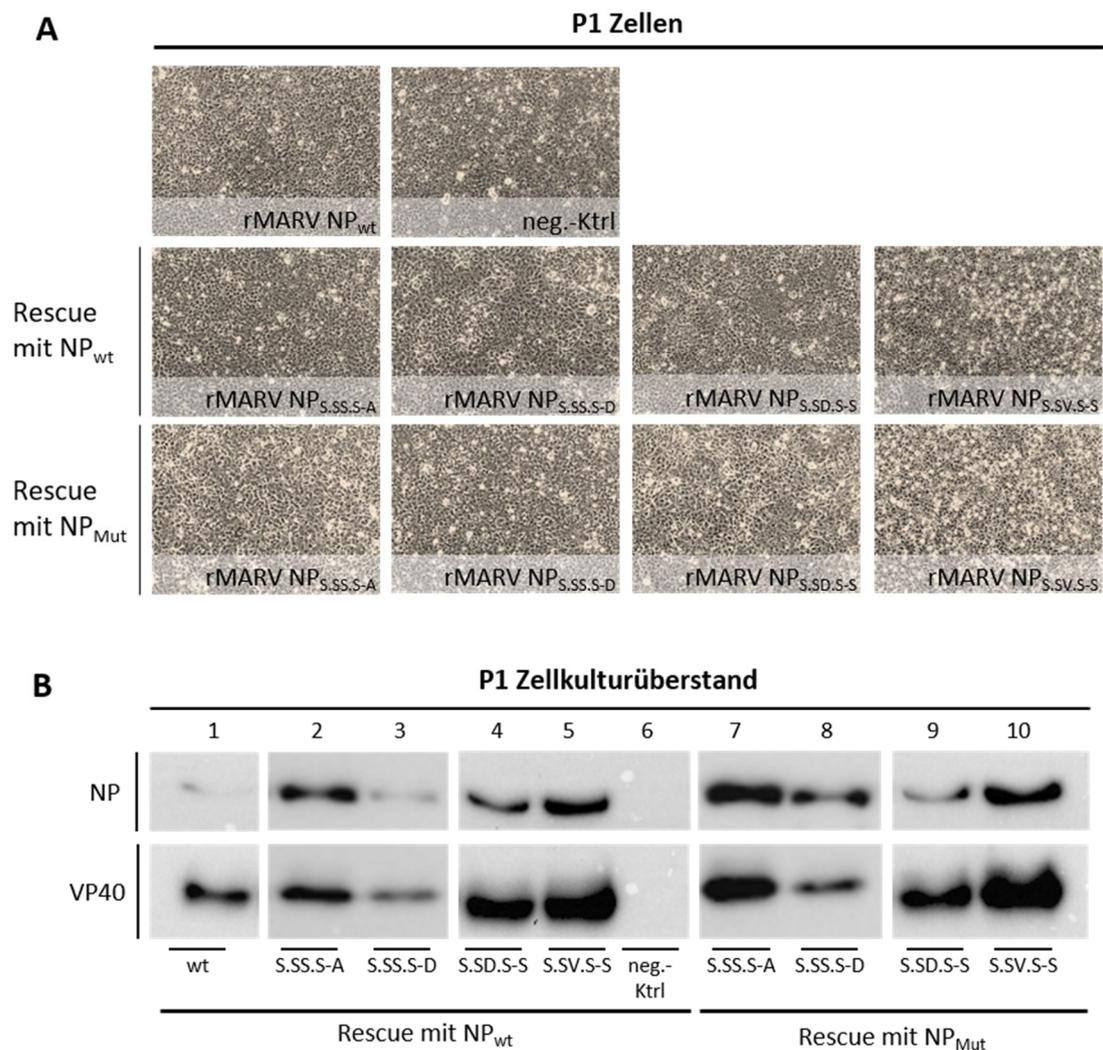


Abbildung 16: Rescue von rekombinantem MARV.

Eine Mischung aus VeroE6- und HUH7-Zellen (P0-Zellen) wurden wie unter 3.3.1 beschrieben transfiziert, 7 d nach Transfektion wurden schwimmende Zellen aus dem Überstand entfernt und auf neue VeroE6-Zellen (P1-Zellen) gegeben. 7-10 Tage nach der Passage wurden die P1-Zellen lichtmikroskopisch untersucht bzw. der Zellkulturüberstand einer Western Blot-Analyse unterzogen.

A. Lichtmikroskopische Aufnahmen der infizierten P1-Zellen.

B. MARV-spezifische Proteine NP und VP40 im P1-Zellkulturüberstand. Die viralen Proteine wurden mit folgenden Antikörpern detektiert: VP40 mit α -VP40 (Maus) und NP mit α -NP (Maus); als Zweitantikörper wurde ein HRP-gekoppelter α -Maus- Antikörper eingesetzt.

Der Rescue der Viren wurde wie oben beschrieben durchgeführt (3.3.1), die eingesetzten Helferplasmide kodierten entweder NP_{wt} oder die jeweilige NP-Mutante sowie VP30, VP35 und L.

Ein 1:1 Gemisch aus HUH7- und VeroE6-Zellen wurde mit dem Vollelängeplasmid (pFL NP_{wt} oder pFL NP_{Mut}), einem Plasmid, das die T7-Polymerase kodiert, sowie den oben genannten Helferplasmiden transfiziert. 10 Tage nach der Transfektion wurde eine Blindpassage des Zellkulturüberstands auf frische VeroE6-Zellen (Passage 1, P1) vorgenommen.

7-10 Tage nach der Blindpassage ließ sich bei positiven Ansätzen lichtmikroskopisch ein deutlicher CPE erkennen (s. Abb. 16 A). Der Nachweis der viralen Proteine NP und VP40 in den P1-Zellkulturüberständen im Western Blot zeigte zusätzlich, dass der Rescue der rekombinanten Viren erfolgreich war (s. Abb. 16 B).

Als Negativkontrolle wurde ein kompletter Ansatz mit pFL NP_{wt} ohne das Helferplasmid für die virale Polymerase L transfiziert. Abbildung 16 zeigt, dass hierbei weder ein CPE zu erkennen ist (Abb. 16 A, neg.-Ktrl) noch virale Proteine im Überstand nachweisbar sind (Abb. 16 B, Spur 6).

Bei der wiederholten Durchführung der Versuche war die rekombinante Herstellung der verschiedenen Viren nicht für alle Mutanten gleich verlässlich reproduzierbar (s. Tab. 1). Vor allem rMARV NP_{S,SD,S-S} ließ sich im Vergleich zu den anderen Mutanten schlechter gewinnen.

rekombinantes Virus Rescue-Helferplasmid	rMARV NP _{wt}	rMARV NP _{S,SS,S-A}	rMARV NP _{S,SS,S-D}	rMARV NP _{S,SD,S-S}	rMARV NP _{S,SV,S-S}
NP _{wt}	6/6	1/2	3/3	2/4	4/4
NP _{Mut}		2/2	2/3	2/4	4/4

Tabelle 1: Rescue von rekombinantem MARV.

Erfolgsquote der Rescues pro Mutante.

4.2.2 Charakterisierung der rekombinanten Viren

Wachstumskinetik in VeroE6-Zellen

Nach erfolgreicher Herstellung der rekombinanten Viren wurde zunächst das Wachstumsverhalten der verschiedenen Virusmutanten in VeroE6-Zellen untersucht.

Hierzu wurden VeroE6-Zellen mit rMARV NP_{wt} bzw. den entsprechenden Phosphorylierungsmutanten mit einer MOI von 1 infiziert. Für 7 Tage wurde täglich der Überstand abgenommen, zur Analyse der Mengen der viralen Proteine im Zelllysat und Überstand wurden die entsprechenden Proben zur weiteren Bearbeitung mittels SDS-PAGE und Western Blot vorbereitet (3.4.2, 3.4.3). Die Titer der täglich gewonnenen Überstände wurden anschließend mittels TCID₅₀-Assay ermittelt (3.3.3).

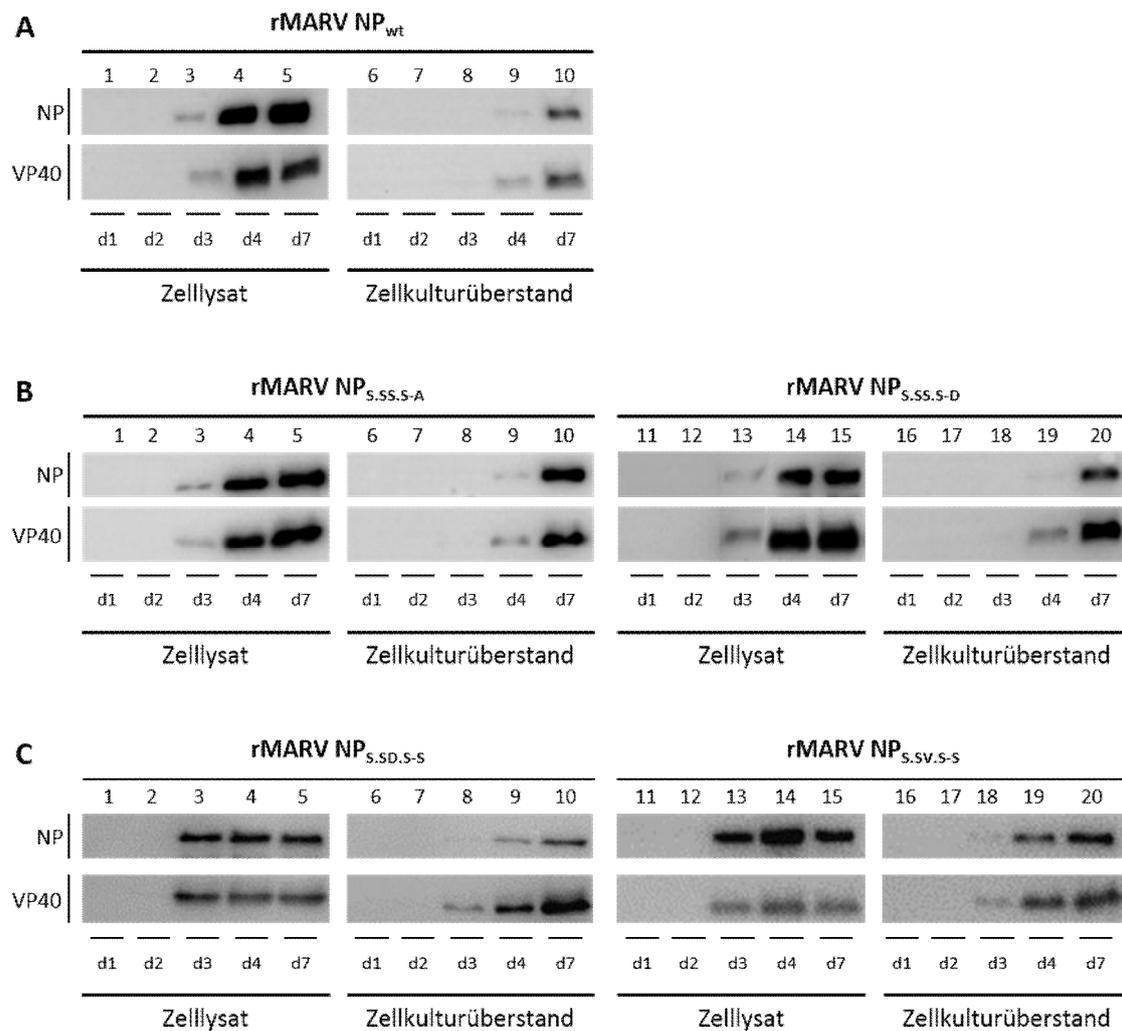


Abbildung 17: Wachstumskinetik der rMARV-Phosphorylierungsmutanten, Western Blots der Zellysate und Zellkulturüberstände.

VeroE6-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit einer MOI von 0,1 infiziert, für 7 Tage wurde täglich der Überstand von den Zellen abgenommen und die Zellen lysiert, anschließend wurden die gewonnenen Proben einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die viralen Proteine wurden mit folgenden Antikörpern detektiert: VP40 mit α -VP40 (Maus) und NP mit α -NP (Maus); als Zweitantikörper wurde ein HRP-gekoppelter α -Maus-Antikörper eingesetzt.

A. Proteinexpression und -freisetzung von rMARV NP_{wt}.

B. Proteinexpression und -freisetzung der S619-Phosphorylierungsmutanten.

C. Proteinexpression und -freisetzung der S602-Phosphorylierungsmutanten.

In Abbildung 17 A sind die Proteinmengen im Zellysat der mit rMARV NP_{wt} infizierten Zellen in den Spuren 1-5, die Proteinmengen im Zellkulturüberstand in den Spuren 6-10 dargestellt. Virale Proteine ließen sich im Zellysat ab Tag 3 nach der Infektion nachweisen (Abb. 17 A Spur 3), im Überstand wurden virale Proteine ab Tag 4 nach der Infektion detektiert (Abb. 17 A Spur 9).

Beim Vergleich der S619-Phosphorylierungsmutanten untereinander (Abb. 17 B) ließen sich anhand der Proteinmengen im Western Blot keine Unterschiede in der Proteinmenge in den Zellysaten der infizierten Zellen feststellen (Abb. 17 B, Spuren 1-5 und 11-15).

Im Vergleich zum rMARV NP_{wt}-Zellkulturüberstand (Abb. 17 A, Spur 10) wurden von den Zellen, die mit diesen Virusmutanten infiziert wurden, mehr Viren in den Überstand freigesetzt: Für rMARV NP_{S.S.S.S-A} (Abb. 17 B Spuren 5-10) und rMARV NP_{S.S.S.S-D} (Abb. 17 B Spuren 16-20) wurde im Western Blot ein verstärktes NP- sowie VP40-Signal detektiert. Im Vergleich der beiden Virusmutanten untereinander ließ sich kein Unterschied in der Menge der freigesetzten Proteine detektieren.

Beim Vergleich der S602-Phosphorylierungsmutanten untereinander (Abb. 17 C) ließen sich ebenfalls keine deutlichen Wachstumsunterschiede detektieren: Weder in den Lysaten der infizierten Zellen (Abb. 17 C, Spuren 1-5 und 11-15) noch in den Zellkulturüberständen (Abb. 17 C, Spuren 6-10 und 16-20) unterschieden sich die Mengen der viralen Proteine NP und VP40.

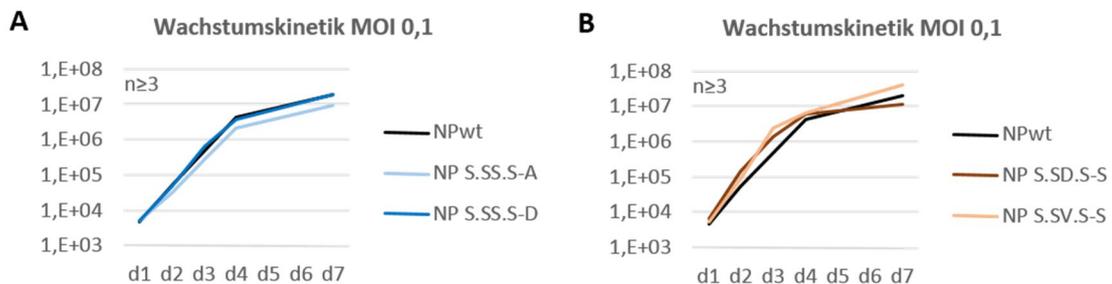


Abbildung 18: Wachstumskinetik der rMARV-Phosphorylierungsmutanten, Wachstumskurven.

VeroE6-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit einer MOI von 0,1 infiziert, für 7 Tage wurde täglich der Überstand von den Zellen abgenommen, anschließend wurden die Titer der so gewonnen Überstände bestimmt.

A. Kinetik der S619-Phosphorylierungsmutanten.

B. Kinetik der S602-Phosphorylierungsmutanten.

In Abbildung 18 sind die Verläufe der Titer der Zellkulturüberstände dargestellt, die mit Hilfe eines TCID₅₀-Assays ermittelt wurden. Abbildung 18 A zeigt die Wachstumskinetik der S619-Phosphorylierungsmutanten, Abbildung 18 B bildet die Wachstumskurve der S602-Phosphorylierungsmutanten ab. In beiden Diagrammen ist zum Vergleich auch jeweils die rMARV NP_{wt}-Wachstumskurve dargestellt.

Analog zu den Western Blot Analysen ließen sich auch beim Verlauf der Wachstumskurven keine signifikanten Unterschiede bei den erreichten Titern sowohl im Vergleich zu rMARV NP_{wt} als auch beim Vergleich der Mutanten untereinander feststellen, die Viren wuchsen im untersuchten Zeitraum von bis zu 7 Tagen nach der Infektion in einer vergleichbaren Geschwindigkeit und zu gleichen Titern.

Verteilung von NP in infizierten Zellen

Die Verteilung von NP in infizierten Zellen wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenzanalyse untersucht (3.4.1), bei der nach Fixierung das NP in infizierten Zellen angefärbt wurde.

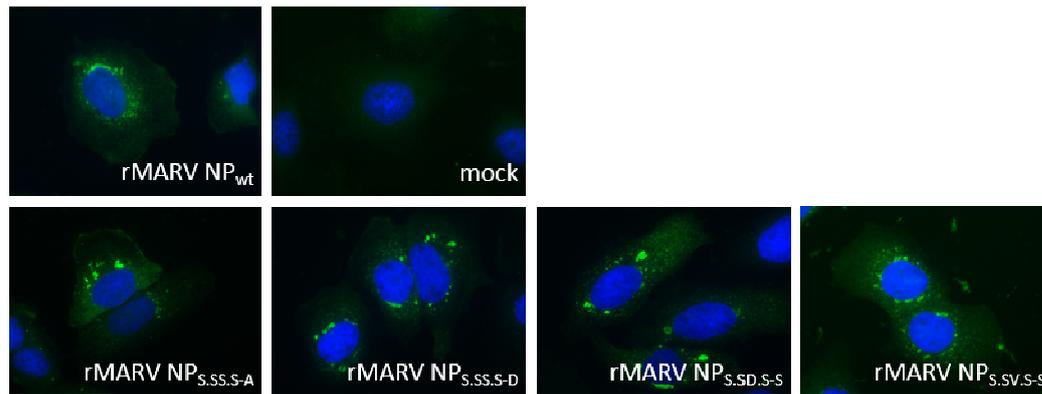


Abbildung 19: Verteilung von NP in rMARV-infizierten Zellen.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit einer MOI von 0,1 infiziert, 20 h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Das virale NP wurde mit folgenden Antikörpern detektiert: α -NP (Meerschweinchen) und α -Meerschweinchen (Ziege) 488 Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Genau wie rMARV NP_{wt} bildeten auch alle Phosphorylierungsmutanten die charakteristischen NP-*inclusion bodies* aus. In ihrer Größe und Form unterschied sich diese nicht von den *inclusion bodies*, die rMARV NP_{wt} induziert. Auch die intrazelluläre Verteilung von NP war bei rMARV NP_{wt} und bei den untersuchten rMARV Mutanten vergleichbar.

Zusätzlich zu NP wurde in einer Doppelfärbung auch die intrazelluläre Verteilung von VP40 nachgewiesen, durch lange Belichtungszeiten der Proben am Immunfluoreszenzmikroskop konnten einzelne Viruspartikel an der Zelloberfläche sichtbar gemacht werden. Hierbei wurde ein phänotypischer Unterschied von rMARV NP_{S.S.V.S.-S} im Vergleich zu den anderen Virusmutanten nachgewiesen, mehr Viruspartikel (bzw. VP40-umschlossene Nukleokapside) waren an der Zelloberfläche detektierbar (s. Abb. 20 A, die Viruspartikel an der Oberfläche sind durch Pfeilspitzen markiert). Durch Aufnahmen mehrerer Zellen und anschließende Auszählung wurde die Anzahl der Viruspartikel an der Oberfläche quantifiziert.

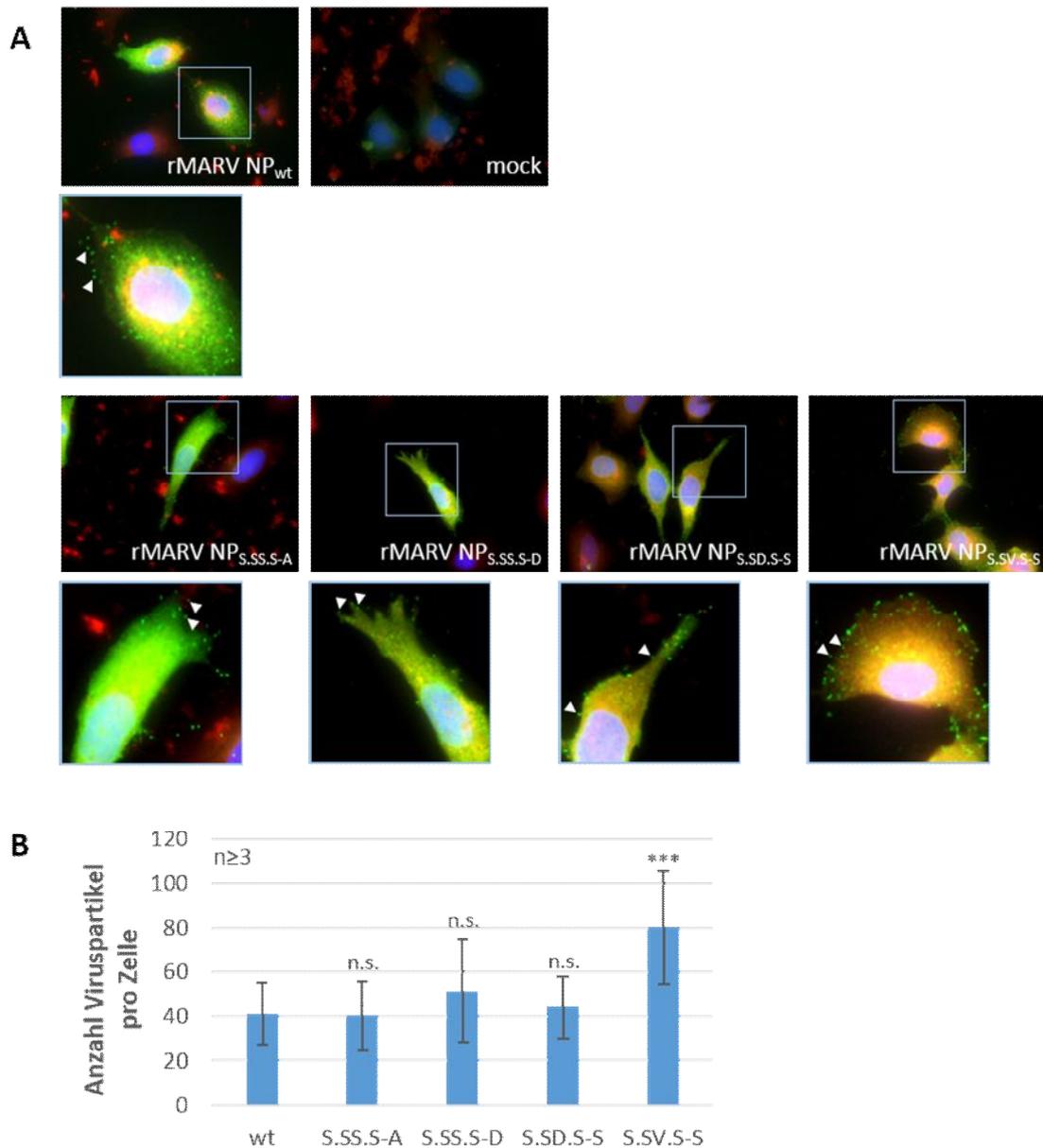


Abbildung 20: Viruspartikel an der Oberfläche rMARV-infizierter Zellen.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit einer MOI von 0,1 infiziert, 20 h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die Anzahl der Viruspartikel an der Zelloberfläche wurde manuell ausgezählt.

A. Immunfluoreszenzfärbung der infizierten Zellen. Die viralen Proteine wurden mit folgenden Antikörpern detektiert: VP40 mit α -VP40 (Maus) und α -Maus (Ziege) 488; NP mit α -NP (Meerschweinchen) und α -Meerschweinchen (Ziege) 594; Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die Viruspartikel an der Zelloberfläche wurden durch lange Belichtungszeiten sichtbar gemacht. Bildausschnitte sind jeweils vergrößert dargestellt, Pfeilspitzen markieren die Viruspartikel an der Zelloberfläche.

B. Anzahl der Viruspartikel an der Zelloberfläche. Pro Versuch wurden mindestens drei Zellen ausgezählt. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zu rMARV NP_{wt} ermittelt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Die S619-Phosphorylierungsmutanten rMARV NP_{S.S.S.-A} und rMARV NP_{S.S.S.-D} unterschieden sich in ihrem Phänotyp nicht von rMARV NP_{wt}, die Anzahl der Viruspartikel an der Zelloberfläche war im Vergleich der Virusmutanten untereinander sowie zu rMARV NP_{wt} vergleichbar (Abb. 20).

Auch die S602-Phosphorylierungsmutante rMARV NP_{S,SD,S-S} unterschied sich nicht von rMARV NP_{wt}. Die Zellen, die mit rMARV NP_{S,SV,S-S} infiziert wurden, zeigten allerdings deutlich mehr Viruspartikel an der Zelloberfläche, der Unterschied im Vergleich zu rMARV NP_{wt} ist statistisch signifikant (Abb. 20 B).

Durch die Mutation von S602 liegt in Zellen, die mit rMARV NP_{S,SV,S-S} infiziert sind, hauptsächlich die 92 kDa-Form von NP vor. Diese nichtphosphorylierte Konformation von NP scheint unter den gewählten Bedingungen eine Defizienz in der Abschnürung der neu gebildeten Viruspartikel von der infizierten Zelle zu besitzen.

4.2.3 Infektiosität der verschiedenen Virusmutanten

Zur Untersuchung der Infektiosität der verschiedenen Viren wurden Zellen mit äquivalenten Mengen Virus, normalisiert auf den NP-Gehalt, infiziert. Hierzu wurden Proben der Virusstocks mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einer Western Blot Analyse unterzogen (3.4.2, 3.4.3). Der NP-Gehalt in den verschiedenen Stocks wurde durch Quantifizierung der NP-Bande im Western Blot bestimmt. Anschließend wurden Zellen mit den Virusmutanten mit äquivalenten NP-Mengen, die einer MOI von 1 für rMARV NP_{wt} entsprachen, infiziert. Ca. 20 h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen.

Der Anteil der infizierten Zellen wurde durch manuelle Auszählung der NP-positiven Zellen in den Immunfluoreszenzaufnahmen (s. Abb. 21 A) berechnet.

In Abbildung 21 B sind die Ergebnisse der Auszählung der NP-positiven Zellen dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass das bei der Infektion mit rMARV NP_{S,SS,S-D} im Vergleich zu rMARV NP_{wt}-infizierten Zellen signifikant mehr Zellen NP-positiv waren. Beim Vergleich von rMARV NP_{S,SS,S-A}- und rMARV NP_{wt}-infizierten Zellen waren keine Unterschiede hinsichtlich des NP-Signals zu erkennen.

Für die S602-Phosphorylierungsmutanten waren nach der Infektion mit rMARV NP_{S,SV,S-S} im Vergleich zu rMARV NP_{wt} mehr NP-positive Zellen detektierbar. Für die Infektion mit rMARV NP_{S,SD,S-S} waren nur zwei Versuche auswertbar, so dass eine statistische Auswertung für diese Virusmutante nicht möglich war (s. Abb. 21 B).

Anhand des Versuchsaufbaus lässt sich hier nicht eindeutig unterscheiden, welcher Schritt im viralen Replikationszyklus beeinflusst wird. Ein erhöhter Anteil NP-positiver Zellen könnte zum einen aus einer verbesserten Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle resultieren. Zum anderen könnten auch die frühen Schritte des viralen Replikationszyklus nach der Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle, also die Freisetzung der Nukleokapside, ihr Transport an die Orte der viralen Replikation und Transkription sowie die Primärtranskription, schneller bzw. effizienter ablaufen.

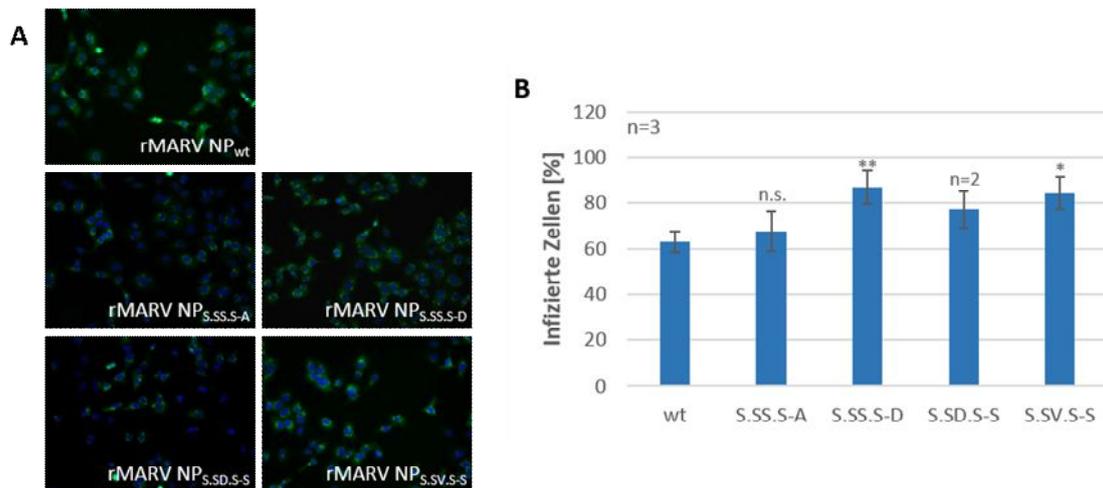


Abbildung 21: Untersuchung der Infektiosität der Virusmutanten.

Der NP-Gehalt der Virusstocks wurde mittels Quantifizierung der NP-Bande im Western Blot (3.4.2, 3.4.3) bestimmt, anschließend wurden HUH7-Zellen wie unter 3.3.4 beschrieben mit der jeweils gleichen Menge NP (normalisiert auf eine MOI von 1 bei NP_{wt}) infiziert, ca. 20 h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Serien von 100 Bildern pro Deckgläschen wurden aufgenommen, von denen jeweils 10 Bilder ausgezählt wurden.

A. Immunfluoreszenz-färbung der infizierten Zellen. Das virale NP wurde mit folgenden Antikörpern detektiert: α -NP (Meerschweinchen) und α -Meerschweinchen (Ziege) 488; Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

B. Anteil der infizierten Zellen. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zu rMARV NP_{wt} ermittelt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4.2.4 Wachstumsverhalten der S619-Phosphorylierungsmutanten in HUH7-Zellen

Im Vergleich der Ergebnisse der Infektiositätsuntersuchungen (vgl. 4.2.3) mit denen der Wachstumskinetik (vgl. 4.2.1) war der Virustiter an d1 nach Infektion zwischen den Mutanten und rMARV NP_{wt} gleich (s. Abb. 17 und 18), bei der Untersuchung der Infektiosität allerdings zeigten sich zwischen den Virusmutanten unterschiedliche Eigenschaften. Ein Unterschied zwischen beiden Versuchen besteht im verwendeten Zelltyp. Während die Wachstumskinetik in VeroE6-Zellen durchgeführt wurde, wurden für die Untersuchung zur Infektiosität HUH7-Zellen verwendet. Um das unterschiedliche Verhalten für die S619-Phosphorylierungsmutanten weiter zu untersuchen, wurde zunächst die Wachstumskinetik noch einmal in HUH7-Zellen durchgeführt.

Für die Phosphorylierungsmutanten unterschieden sich die Virustiterverläufe in HUH7-Zellen nicht signifikant von rMARV NP_{wt}. An Tag 1 nach der Infektion war der Virustiter im Zellkulturüberstand von Zellen, die mit rMARV NP_{S,SS,S-A} infiziert wurden, allerdings fast um eine Logstufe geringer als der Virustiter im Überstand von Zellen, die mit rMARV NP_{wt} infiziert wurden (s. Abb. 22 A).

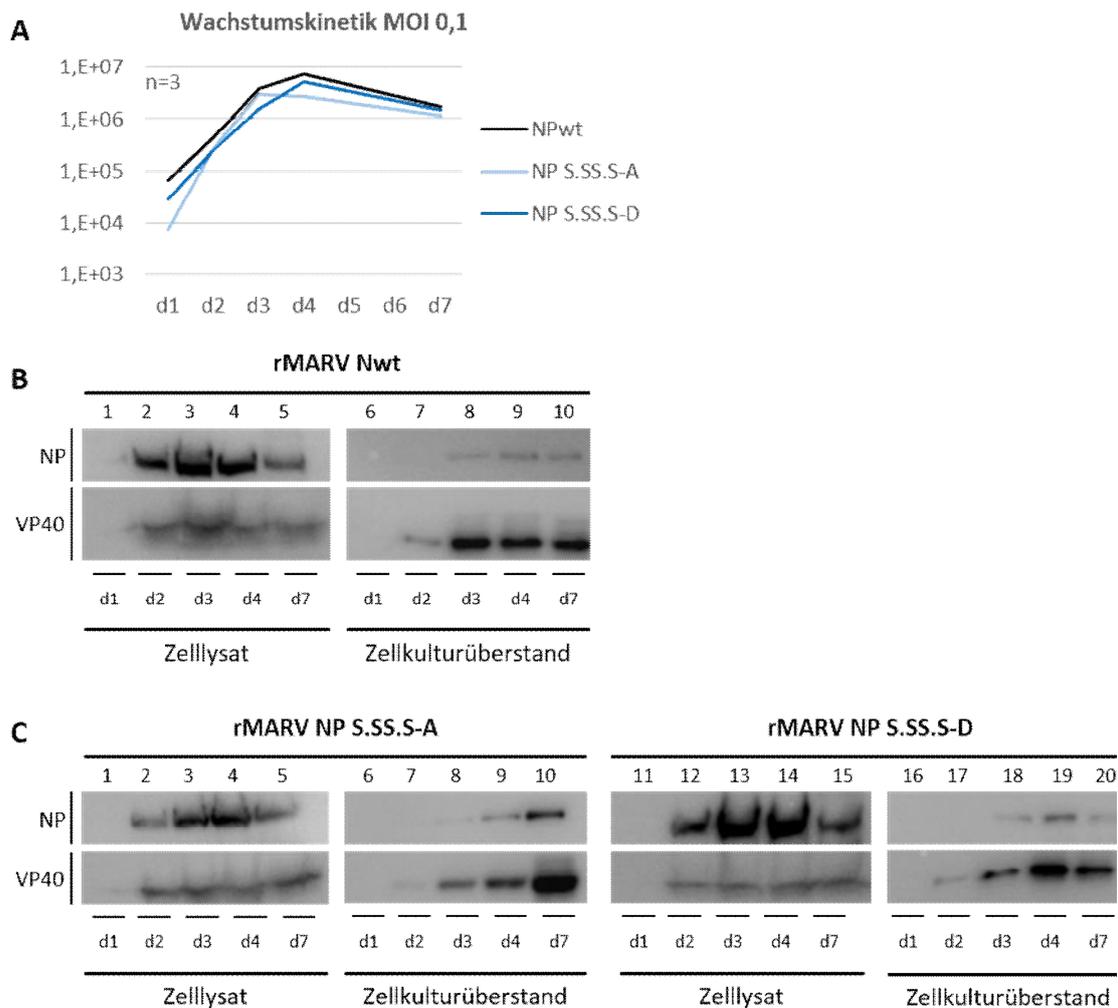


Abbildung 22: Wachstumskinetik der S619-Phosphorylierungsmutanten.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit einer MOI von 0,1 infiziert, für 7 Tage wurde täglich der Überstand von den Zellen abgenommen und die Zellen lysiert. Anschließend wurden die Titer der Überstände bestimmt und die gewonnenen Proben einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die viralen Proteine wurden mit folgenden Antikörpern detektiert: VP40 mit α -VP40 (Maus) und NP mit α -NP (Maus); als Zweitantikörper wurde ein HRP-gekoppelter α -Maus-Antikörper eingesetzt.

A. Wachstumskinetik.

B. Proteinexpression und -freisetzung von rMARV NPwt.

C. Proteinexpression und -freisetzung der S619-Phosphorylierungsmutanten.

Bei der Western-Blot Analyse der Zelllysate und der Zellkulturüberstände wurden weitere Unterschiede zwischen den Virusmutanten ersichtlich: In Abbildung 22 B sind die Western Blots der Zelllysate und der Zellkulturüberstände der rMARV NP_{wt}-infizierten Zellen dargestellt, in Abbildung 22 C die entsprechenden Proben der S619-Phosphorylierungsmutanten.

Generell werden in HUH7-Zellen die Viren schneller vermehrt, so dass im Vergleich zu VeroE6-Zellen (s. Abb. 17) bereits zu frühen Zeitpunkten virale Proteine im Zelllysate und auch im Überstand detektiert werden können.

Für die verschiedenen Viren unterschieden sich die in den Überstand freigesetzten Virusmengen an d7 nach Infektion deutlich voneinander. Die Mengen an viralen Proteinen in Zellen, die mit

rMARV NP_{wt} (Abb. 22 B; Spur 10) bzw. rMARV NP_{S.S.S-D} (Abb. 22 C, Spur 20) infiziert wurden, waren vergleichbar. Die Zellen, die mit rMARV NP_{S.S.S-A} (Abb. 22 C, Spur 10) infiziert wurden, hatten zu diesem Zeitpunkt allerdings mehr Viruspartikel in den Überstand abgegeben. Die Signale im Western Blot für die untersuchten Proteine NP und VP40 waren deutlich stärker.

Im Hinblick auf die Virustiter hatte diese größere Anzahl an freigesetzten Viruspartikeln allerdings keinen Einfluss: in Abbildung 22 A sind die Wachstumskurven der Virusmutanten dargestellt, die d7-Titer der verschiedenen Virusmutanten unterschieden sich nicht.

4.2.5 Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf die Virusfreisetzung

In einem weiteren Versuch zur genaueren Untersuchung der Partikelfreisetzung der S619-Phosphorylierungsmutanten besonders zu frühen Zeitpunkten der Infektion wurden die in den Zellkulturüberstand freigesetzten Partikel mittels EM-Analyse ausgezählt und nach den Phänotypen der freigesetzten Viruspartikel (lange Partikel, 6-förmige Partikel, runde Partikel) unterschieden. Hierzu wurden HUH7-Zellen infiziert (3.3.4), zwei Tage nach der Infektion wurde der Zellkulturüberstand gewonnen und die darin enthaltenen Viren durch Ultrazentrifugation pelettiert. Anschließend wurden die Viren in PFA fixiert und für die elektronenmikroskopische Untersuchung vorbereitet (3.4.5). Pro Virus wurden mindestens 10 Zählfelder am Elektronenmikroskop ausgezählt. Neben der EM-Analyse wurde parallel der Titer der Zellkulturüberstände mittels Immuno-plaquetest bestimmt (3.3.5). Hierzu wurden VeroE6-Zellen mit jeweils gleichen Volumina der Zellkulturüberstände im doppelten Ansatz infiziert, drei Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert und mit einem MARV-spezifischen Ziegenserum und einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper gefärbt. Die Plaques wurden am Immunfluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Da die von MARV gebildeten runden Partikel als weniger infektiös erachtet werden, allerdings kein Unterschied in der Infektiosität zwischen 6-förmigen und länglichen Partikeln angenommen wird, wurden zur Auswertung die letztgenannten Phänotypen zu einer Population zusammengefasst.

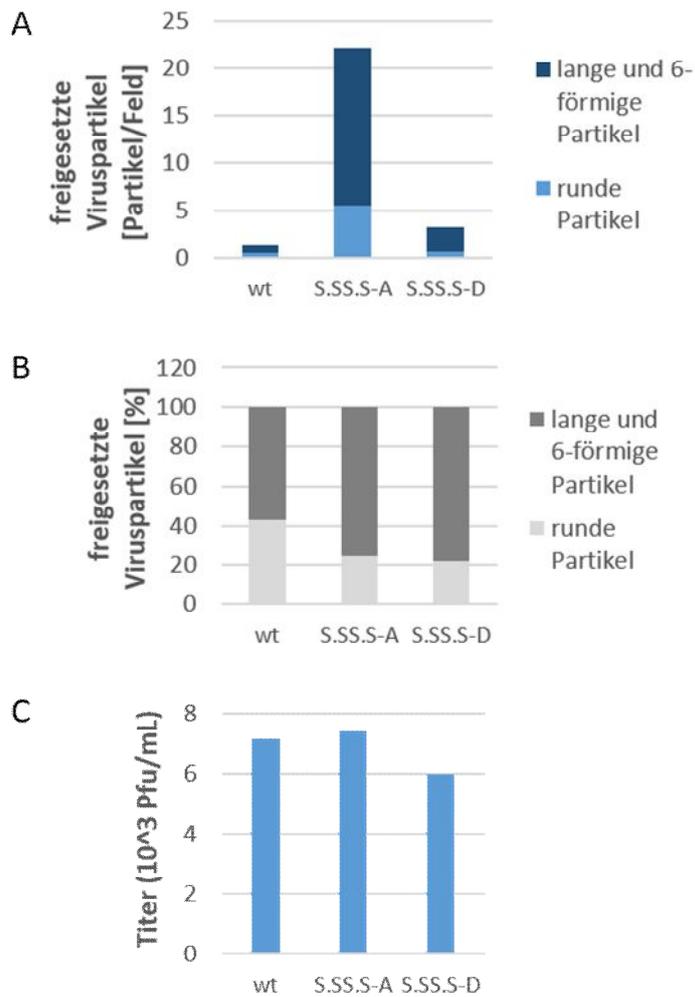


Abbildung 23: Analyse der Viruspartikelfreisetzung der S619-Phosphorylierungsmutanten.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit einer MOI von 1 infiziert, 2 Tage nach Infektion wurde der Überstand gewonnen und durch Ultrazentrifugation pelletiert bzw. eine Titerbestimmung mittels Immunoplaquetest (3.3.5) auf VeroE6-Zellen durchgeführt. Das pelletierte Virus wurde fixiert und einer EM-Analyse unterzogen (3.4.5).

A. Absolute Anzahl der freigesetzten Phänotypen.

B. Relative Anzahl der freigesetzten Phänotypen.

C. Virale Titer, mittels Immunoplaquetest bestimmt.

In Abb. 23 A sind die absoluten Zahlen der freigesetzten Partikel, getrennt nach Phänotyp, dargestellt. In Abb. 23 B ist der relative Anteil der unterschiedlichen Phänotypen gezeigt. Abbildung 23 A zeigt deutlich, dass rMARV NP_{wt} und rMARV NP_{S.S.S.S-D} eine vergleichbare Anzahl an Partikeln in den Überstand freigesetzt haben, rMARV NP_{S.S.S.S-A} hat allerdings eine deutlich gesteigerte Menge an Viruspartikeln freigesetzt. Die relative Menge der verschiedenen Phänotypen war allerdings für alle drei Virusmutanten vergleichbar (s. Abb. 23 B): rMARV NP_{wt} setzte eine größere Menge ringförmiger Partikel frei, für die beiden untersuchten S619-Phosphorylierungsmutanten waren die Anteile der Phänotypen nahezu identisch.

Durch den parallel durchgeführten Plaquetest konnte die Infektiosität der freigesetzten Partikel bestimmt werden, die ermittelten Titer sind in Abbildung 23 C dargestellt. Trotz der großen Diskrepanzen in der Anzahl der freigesetzten Viruspartikel zeigten sich hierbei kaum Unterschiede, die untersuchten Virusmutanten wuchsen zu vergleichbaren Titern. Im Vergleich zur Anzahl freigesetzter Partikel besitzt rMARV NP_{S,SS,S-A} eine deutlich reduzierte Infektiosität, rMARV NP_{wt} infiziert am effizientesten. Durch den Serinrest an Position 619 erlaubt eine dynamische Phosphorylierung den Wechsel zwischen den unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien, so dass für verschiedene Schritte im viralen Replikationszyklus die jeweiligen Funktionen optimal genutzt werden können.

4.2.6 Die Rolle der dynamischen Phosphorylierung in der viralen Infektion

Die oben beschriebenen Infektionsversuche wurden zur Charakterisierung der Funktion der dynamischen Phosphorylierung von MARV NP am Serin 619 parallel durchgeführt, allerdings wurden Zellen jeweils nur mit einer Virusmutante infiziert.

Zur Untersuchung, ob die phosphorylierte Form einen Wachstumsvorteil gegenüber der nicht-phosphorylierten Form hat, wurde ein Wettbewerbsversuch als direkter Wachstumsvergleich durchgeführt. Hierbei wurden HUH7-Zellen mit Virus-Mischungen im Verhältnis 1:1 bei einer geringen Gesamt-MOI von 0,01 infiziert (3.3.4). Zwei Tage nach der Infektion wurde der Überstand abgenommen und die virale RNA isoliert. Nach dem Umschreiben in cDNA mit NP-spezifischen Primern (3.1.4) konnte die Zusammensetzung des Überstands durch Sequenzierung und anschließende Auswertung des Ferrogramms analysiert werden (3.1.14).

In Abbildung 24 A sind die Tripletcodes für die untersuchten Aminosäuren an Position 619 dargestellt. Abbildung 24 B zeigt die Ergebnisse der Wettbewerbsversuche.

Im direkten Vergleich zwischen den beiden Mutanten rMARV NP_{S,SS,S-A} und rMARV NP_{S,SS,S-D} war im Inokulum (Abb. 24 B 1) gleich viel Virus beider Mutanten detektierbar, die Nukleotidpeaks im Ferrogramm sind nahezu identisch. Zwei Tage nach der Infektion war im Ferrogramm (Abb. 24 B 4) allerdings fast ausschließlich die Sequenz von rMARV NP_{S,SS,S-D} detektierbar. Die phosphorylierte Form von NP besitzt in der Mischinfektion im Vergleich mit der nichtphosphorylierten Form einen deutlichen Wachstumsvorteil.

Um zu verifizieren, ob rMARV NP_{wt} durch den dynamisch phosphorylierbaren Serinrest einen zu erwartenden Wachstumsvorteil gegenüber beiden Phosphorylierungsmutanten besitzt, wurden Wettbewerbsversuche mit rMARV NP_{wt} und jeweils einer Phosphorylierungsmutante durchgeführt.

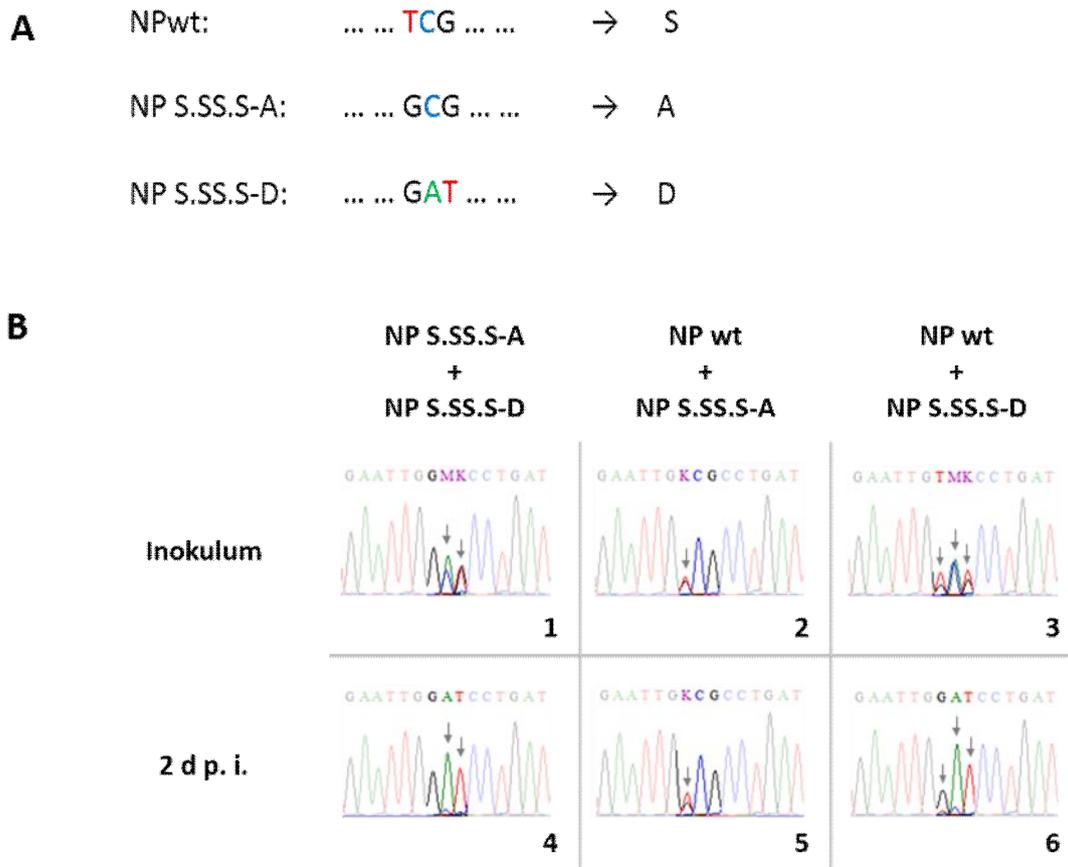


Abbildung 24: Kompetitionsassay der S619-Phosphorylierungsmutanten.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.3.4 beschrieben mit einer Gesamt-MOI von 0,01 infiziert, 2 Tage nach Infektion wurde die virale RNA aus dem Überstand isoliert (3.1.5.2) und mittels PCR in cDNA umgeschrieben (3.1.4). Nach der Sequenzierung (3.1.14) wurde die Zusammensetzung des Überstands 2 d p. i. im Vergleich zum Inokulum untersucht.

A. Tripletcode, der für die verschiedenen untersuchten Aminosäuren an Position 619 codiert.

B. Ferrogramme der untersuchten Proben. Mit Pfeilen markiert sind jeweils die Nukleotide, die für die Synthese unterschiedlicher Aminosäuren an Position 619 verantwortlich sind.

Wie Abbildung 24 B 2 zeigt, lag bei der Mischinfektion von rMARV NP_{wt} und rMARV NP_{S.SS.S-A} im Inokulum eine gleichmäßige Mischung beider Viren vor, zwei Tage nach Infektion (Abb. 24 B 5) war mehr rMARV NP_{wt} als rMARV NP_{S.SS.S-A} im Überstand detektierbar, rMARV NP_{wt} hat durch die Möglichkeit der dynamischen Phosphorylierung also einen Wachstumsvorteil.

Im Gegensatz dazu war bei der Mischinfektion von rMARV NP_{wt} und rMARV NP_{S.SS.S-D} zwar das Inokulum wiederum gleichmäßig gemischt (Abb. 24 B 3), kurze Zeit nach der Infektion allerdings war hauptsächlich die Sequenz von rMARV NP_{S.SS.S-D} detektierbar (Abb. 24 B 6).

Zum gewählten Zeitpunkt scheint also die Mutante, die die konstant phosphorylierte Form von NP S619 imitiert, dem Virus einen Wachstumsvorteil gegenüber rMARV NP_{wt} zu bieten.

Anhand der Infektionsversuche in HUH7-Zellen (s. 4.2.4 und 4.2.5) konnte für die S619-Phosphorylierungsmutanten gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit rMARV NP_{S.SS.S-A} mehr virale

Proteine im Zellysate vorliegen und auch mehr Viruspartikel in den Überstand freigesetzt werden. Die Phosphorylierung an Position S619 ist daher nicht essentiell für eine Freisetzung des Virus in den Überstand. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Infektiosität (4.2.3) und der Wettbewerbsversuche (4.2.6) allerdings weisen darauf hin, dass die freigesetzten Partikel mit nichtphosphoryliertem NP möglicherweise in den frühen Phasen der viralen Infektion im Vergleich zur phosphorylierten Form benachteiligt sind.

Da ein Einfluss von NP auf die Aufnahme und Freisetzung des Nukleokapsidkomplexes ins Zytoplasma eher unwahrscheinlich scheint, wurde in weiteren Transfektionsversuchen die Interaktion zwischen NP und dem fünften Nukleokapsidprotein VP24 weiter untersucht.

4.3 Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf die Interaktion von NP und VP24

Flotation von NP bei Koexpression mit VP40 und VP24

Die Flotationsanalyse dient klassischerweise zur Untersuchung von membrangebundenen Proteinen (3.2.7), wird aber für Marburg Virus wie oben beschrieben auch für die Untersuchung der Interaktion von NP mit dem Matrixprotein VP40 (4.1.5) herangezogen.

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen NP und VP24 wurde hier ebenfalls die Flotationsanalyse gewählt, in diesem Ansatz wurde zusätzlich zum Flotationsverhalten von NP bei Koexpression mit VP40 auch das Flotationsverhalten von NP bei einer Koexpression mit VP40 und VP24 untersucht.

Analog zur Flotationsanalyse von singularär exprimiertem NP bzw. von NP bei Koexpression mit VP40 wurden die Zellysate in einem Dichtegradienten ultrazentrifugiert, nach der Zentrifugation wurden sieben Fraktionen gewonnen. Die Anteile an flotierendem NP bei Koexpression mit VP40 und bei Koexpression mit VP40 und VP24 wurden anschließend bestimmt und verglichen.

Abbildung 25 A zeigt die Proteinmengen von NP, VP40 und VP24 in den Zellysaten sowie die NP-Mengen in den einzelnen Fraktionen nach der Flotation. Abbildung 25 B zeigt den Anteil von NP, der membrangebunden vorliegt und daher flotierte, jeweils in An- und Abwesenheit von VP24. Für NP_{wt} ist deutlich erkennbar, dass die zusätzliche Expression von VP24 den flotierenden Anteil an NP steigert: Bei einer Koexpression von NP und VP40 flotieren ca. 20 % des insgesamt exprimierten NP, bei einer zusätzlichen Expression von VP24 steigt der Anteil an flotierendem NP auf ca. 35 %. Zusätzlich zur direkten Interaktion zwischen NP und VP40 ist daher eine direkte Interaktion zwischen NP und VP24 oder eine über VP24 vermittelte Interaktion zwischen NP und VP40 möglich.

Zur anschaulichen Darstellung der Änderung des NP-Flotationsverhaltens bei der zusätzlichen Koexpression von VP24 zeigt Abbildung 25 C die relative flotierende Menge an NP in Anwesenheit von VP24 und VP40 im Vergleich zur flotierenden NP-Menge in Anwesenheit von VP40.

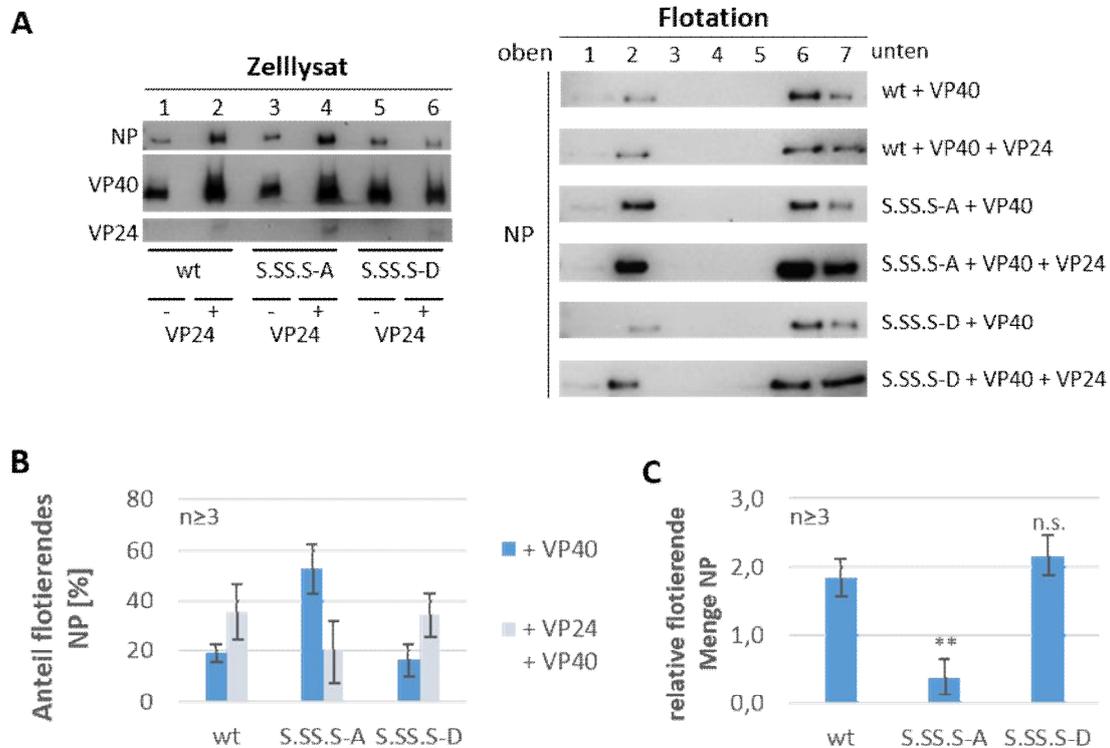


Abbildung 25: Flotationsassay der S619-Phosphorylierungsmutanten mit VP40 +/- VP24.

HUH7-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert, 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und einer Flotationsanalyse unterzogen (3.2.7).

A. Western Blot der Zell-Lysate und der aufgetrennten Fraktionen nach Flotation.

B. Flotierender Anteil der Gesamt-NP-Menge ohne bzw. mit VP24.

C. Relative flotierende NP-Menge. Zur Bestimmung der relativen flotierenden NP-Menge wurde der Faktor des flotierenden Anteils von NP in Anwesenheit von VP24 im Vergleich zum Ansatz ohne VP24 bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zu NP_{wt} ermittelt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Analog zu NP_{wt} führte auch bei NP_{S.S.S.S-D} die zusätzliche Koexpression von VP24 zu einer weiteren Steigerung der Menge an NP, die membranassoziiert vorliegt.

Für NP_{S.S.S.S-A} kehrte sich das Bild allerdings um. Wie zuvor beschrieben (4.1.5, Abbildung 14 B) lag für diese Mutante im Vergleich zu NP_{wt} ein größerer Anteil an Protein membranassoziiert vor, was auf eine bessere Interaktion mit VP40 schließen lässt. In Anwesenheit von VP24 nahm allerdings der Anteil an membranassoziiertem NP stark ab (Abb. 25 B). Besonders deutlich wird dieser Unterschied beim Vergleich der relativen flotierenden NP-Mengen (Abb. 25 C). Für sowohl NP_{wt} als auch NP_{S.S.S.S-D} stieg der Anteil an flotierendem NP in Anwesenheit von VP24 auf die ungefähr zweifache Menge im Vergleich zur Flotation ohne VP24 an. Für NP_{S.S.S.S-A} sank dieser Faktor allerdings auf weniger als 0,5. Die Phosphorylierung von S619 ist daher für die direkte

Interaktion zwischen NP und VP24 oder die möglicherweise durch VP24 vermittelte Interaktion von NP und VP40 essentiell.

Einfluss von VP24 auf die Replikations- und Transkriptionsaktivität

Um einen möglichen Einfluss der veränderten Interaktion zwischen NP und VP24 auf den viralen Lebenszyklus zu untersuchen, wurden Minigenomanalysen zur Untersuchung von Replikation und Transkription sowie infektiöse VLP-Assays durchgeführt.

Für die Minigenomanalyse wurden die viralen Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und L zusammen mit dem MARV-spezifischen Minigenom in An- oder Abwesenheit von VP24 exprimiert und die Reporterogenaktivität bestimmt, um eine Veränderung der Replikations-/Transkriptionsaktivität in Anwesenheit von VP24 zu untersuchen.

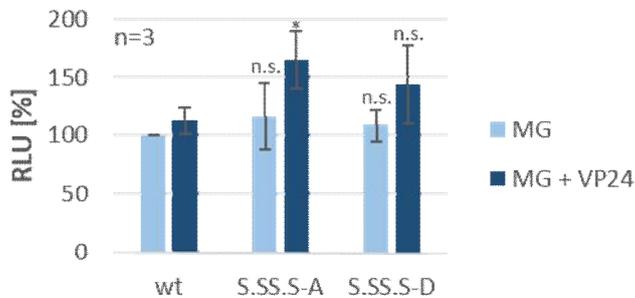


Abbildung 26: Untersuchung der Replikations-/Transkriptionsaktivität der S619-Phosphorylierungsmutanten im Minigenomassay in Anwesenheit von VP24.

HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert, 72 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Reporterogenaktivität ermittelt (RLU, *relative light units*). Die Aktivität von NP_{wt} wurde auf 100% gesetzt. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zum jeweiligen NP_{wt}-Ansatz ermittelt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Die Anwesenheit von VP24 steigerte in allen Ansätzen die Replikations-/Transkriptionsaktivität, für NP_{S.S.S.S-A} war die Steigerung im Vergleich zu NP_{wt} statistisch signifikant.

Im infektiösen VLP-Assay (3.2.6) wurde ebenfalls die Veränderung der Replikations- und Transkriptionsaktivität in Anwesenheit und Abwesenheit von VP24 untersucht. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Minigenomanalyse wurden hierbei zusätzlich VP40 und GP in den Zellen exprimiert.

Da zu erwarten war, dass die Menge an freigesetzten Partikeln in Abwesenheit von VP24 verringert ist (vgl. 1.5), wurde bei dieser Untersuchung keine Trennung in sphärische und filamentöse VLPs vorgenommen. Eine Auftrennung in sphärische und filamentöse VLPs führt durch die zusätzlichen Ultrazentrifugationsschritte (vgl. 3.2.6) zum Verlust von Partikeln, so dass bei geringen Mengen an Ausgangsmaterial (Partikel, die durch die VLP-produzierenden Zellen freigesetzt

werden) die aufgereinigten Partikel für eine erfolgreiche Infektion und anschließende Auswertung nicht ausreichen würden.

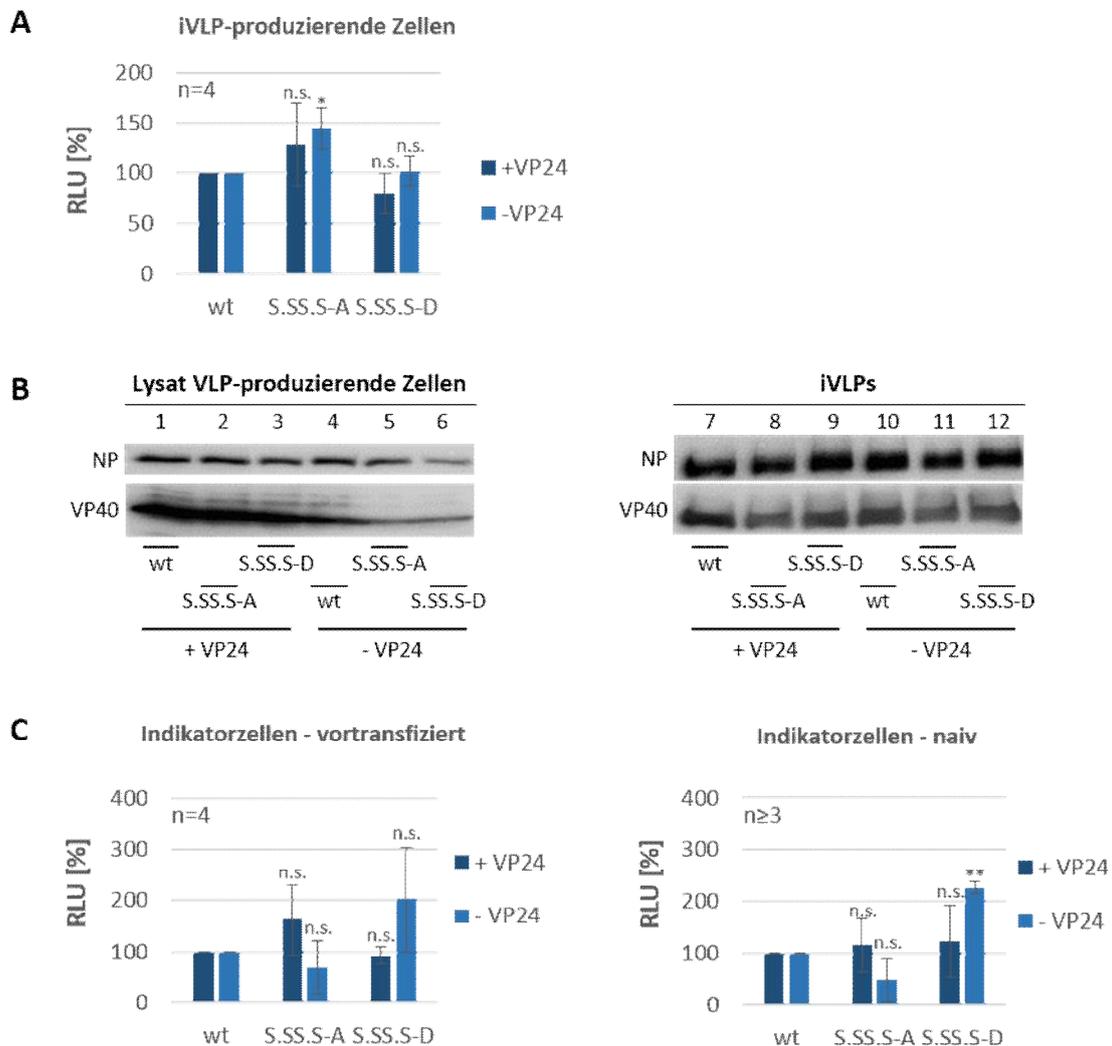


Abbildung 27: Untersuchung der S619-Phosphorylierungsmutanten im infektiösen VLP-Assay in An- bzw. Abwesenheit von VP24.

HEK293-Zellen wurden wie unter 3.2.2 beschrieben transfiziert, 72 h nach Transfektion wurden die VLP-produzierenden Zellen lysiert und die Reporterogenaktivität ermittelt (RLU, *relative light units*). Die VLPs wurden durch Ultrazentrifugation aufgereinigt und zur Infektion von Indikatorzellen genutzt. Die Indikatorzellen wurden zuvor mit Plasmiden für die Nukleokapsidproteine NP, VP30, VP35 und L vortransfiziert, wobei jeweils die gleiche NP-Mutante verwendet wurde, die auch in die VLPs eingebaut war. Parallel wurden unbehandelte (naive) Indikatorzellen infiziert. 72 h nach Infektion wurden die Indikatorzellen lysiert und die Reporterogenaktivität ermittelt. Die Aktivität von NPwt wurde auf 100 % gesetzt.

A. Replikations-/Transkriptionsaktivität in VLP-produzierenden Zellen.

B. Western Blot der Lysate von VLP-produzierenden Zellen und der VLPs.

C. Replikations-/Transkriptionsaktivität in Indikatorzellen, relativ zum jeweiligen NPwt-Ansatz. Die statistische Signifikanz wurde im Vergleich zum jeweiligen NPwt-Ansatz ermittelt: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Ausgehend von der Reportergen-RNA wird daher durch den in den VLPs verpackten Nukleokapsidkomplex neue Reportergen-mRNA synthetisiert. Ausgehend von dieser neu synthetisierten

mRNA wird dann durch die zelluläre Translationsmaschinerie das entsprechende Protein synthetisiert und luminometrisch gemessen.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der VLP-Assays dargestellt. In den VLP-produzierenden Zellen war die Replikations- bzw. Transkriptionsaktivität für NP_{S,SS,S-D} mit oder ohne VP24 jeweils nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zum NP_{wt}-Ansatz. In Anwesenheit von VP24 war die Aktivität für NP_{S,SS,S-A} ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu NP_{wt}, in Abwesenheit von VP24 war die Aktivität allerdings erhöht (Abb. 27 A).

Bei der Western-Blot Analyse der Zellysate und der iVLPs fiel auf, dass in Abwesenheit von VP24 nicht weniger Partikel in den Überstand freigesetzt wurden, die Proteinmengen für NP und VP40 im Überstand waren für alle Ansätze vergleichbar (Abb. 27 B, Spuren 7-12).

Für die Ansätze, in denen alle viralen Proteine exprimiert wurden, waren sowohl für die vortransfizierten als auch für die naiven Indikatorzellen keine Unterschiede zwischen NP_{wt} und den Phosphorylierungsmutanten detektierbar (Abb. 27 C, dunkelblaue Balken).

Da in den naiven Indikatorzellen keine Unterschiede in der Reporteraktivität detektiert werden konnten, hat die Phosphorylierung von S619 in diesem System offensichtlich keinen Einfluss auf die Primärtranskription.

Außerdem hat die in der FLOTationsanalyse (s. Abb. 26) gezeigte stärkere Interaktion zwischen NP_{S,SS,S-D} und VP24 keinen Einfluss auf die Infektiosität der iVLPs, die Aktivität von NP_{S,SS,S-A} und NP_{S,SS,S-D} in den naiven Indikatorzellen war in Anwesenheit von VP24 nahezu identisch (Abb. 27 C, naive Indikatorzellen, dunkelblaue Balken).

Die Zielzellen wurden daher mit dem durch Ultrazentrifugation konzentrierten VLP-Gemisch infiziert. Für die Infektion wurden sowohl vortransfizierte als auch unbehandelte (naive) Indikatorzellen verwendet. Naive Indikatorzellen dienen der Untersuchung von Effekten auf die virale Primärtranskription, da nach der Infektion unbehandelter Zellen ausschließlich die in die VLPs verpackten Proteine für die ersten Schritte des viralen Replikationszyklus zur Verfügung stehen. In Abwesenheit von VP24 allerdings war die Replikations-/Transkriptionsaktivität für NP_{S,SS,S-A} im Vergleich zu NP_{wt} verringert, während sie für NP_{S,SS,S-D} deutlich erhöht war. Der Trend war hierbei für vortransfizierte und naive Indikatorzellen gleich (Abb. 27 C, hellblaue Balken).

In Abwesenheit von VP24 hat die Phosphorylierung von S619 daher sehr wohl einen Einfluss auf die Primärtranskription. Im Vergleich zu den vortransfizierten Indikatorzellen sind die Aktivitäten allerdings nahezu identisch, so dass hier die Unterschiede zwischen NP_{S,SS,S-A} und NP_{S,SS,S-D} durch die unterschiedliche Transkriptionsaktivität verursacht wird, nicht aber durch eine unterschiedliche Replikationsaktivität. In vortransfizierten Indikatorzellen können aufgrund des Vorhandenseins der viralen Nukleokapsidproteine in großen Mengen beide Prozesse parallel ablaufen.

Die deutlich unterschiedliche Reporteraktivität der beiden Phosphorylierungsmutanten in Abwesenheit von VP24 zeigt zum einen die Bedeutung von VP24 für eine effektive Infektion bzw. die ersten Schritte im viralen Lebenszyklus. Zum anderen kann eine Phosphorylierung von S619 (NP_{S.SS.S-D}) in den frühen Phasen der Infektion das hier modellhaft dargestellte Fehlen von VP24 teilweise ausgleichen.

5. Diskussion

Innerhalb der Ordnung Mononegavirales sind die stark phosphorylierten P-Proteine, die zusammen mit dem Nukleoprotein und der Polymerase den Transkriptions- und Replikationskomplex bilden, für den viralen Replikationszyklus funktionell bedeutend (38). Die Funktion der Phosphorylierung der P-Proteine ist hierbei nicht für alle Vertreter eindeutig geklärt. Die Filoviren bilden innerhalb der Ordnung eine Besonderheit, da sie zusätzlich zum wenig phosphorylierten P-Homolog VP35 mit VP30 ein zusätzliches Nukleokapsidprotein besitzen, das stark phosphoryliert ist (27, 6).

Die Rolle der Phosphorylierung von MARV VP30 ist derzeit noch unklar, für EBOV ist VP30 ein spezifischer Transkriptionsfaktor, dessen Funktion maßgeblich durch die Phosphorylierung beeinflusst wird: Die Phosphorylierung von VP30 inhibiert die virale Transkription und unterstützt die virale Replikation (12, 13). Gleichzeitig konnte für VP30 gezeigt werden, dass die dynamische Phosphorylierung für eine vollständige Funktion des Proteins essentiell ist. Sowohl phosphoryliertes als auch nichtphosphoryliertes VP30 werden bei bestimmten Prozessen des viralen Replikationszyklus benötigt (13).

Die Nukleoproteine verschiedener Vertreter der Mononegavirales sind ebenfalls phosphoryliert, beschrieben wurde diese Modifikation für Sendavirus (52, 80), Masernvirus (120, 142), Hundestaupevirus (16), Rinderpestvirus (45), Newcastle-Disease-Virus (127), Mumpsvirus (112), Tollwutvirus (138, 160, 161) und auch für die Filoviren Ebolavirus (27) und Marburgvirus (9). Das Nukleoprotein des vesikulären Stomatitisvirus als Modellvertreter der Mononegavirales ist allerdings nicht phosphoryliert (103, 128).

Die Phosphorylierung des Nukleoproteins hat häufig direkt oder indirekt einen Einfluss auf die virale Transkription und/oder Replikation, allerdings stehen detaillierte Charakterisierungen für die meisten der oben genannten Viren noch aus.

Von den sieben Phosphorylierungsregionen im MARV NP C-Terminus (85) wurde bisher Region II genauer charakterisiert. Innerhalb dieser Region liegen die Phosphatakzeptorstellen S446 sowie ein Cluster von sechs Serinresten (S450-455), die Phosphorylierung dieser Aminosäuren hat einen Einfluss auf die virale Transkription und Replikation, wobei vor allem das Phosphorylierungsmuster der einzelnen Akzeptorstellen wichtig ist: Transkriptions- und Replikationsaktivität sind erhöht, wenn S446 unphosphoryliert und gleichzeitig die Serine im Cluster S450-455 phosphoryliert sind (23).

Die funktionelle Charakterisierung weiterer Phosphorylierungsregionen von MARV NP stand bisher noch aus, daher wurden in der vorliegenden Arbeit die C-terminalen Regionen VI und VII genauer untersucht.

In Region VI sind vier Serinreste und damit vier potentiell phosphorylierbare Aminosäuren vorhanden. Das genaue Phosphorylierungsmuster dieser Region ist nicht bekannt. Da allerdings die Phosphorylierung von S602 die Konformationsänderung von NP verursacht bzw. dazu beiträgt, wurde innerhalb dieser Region S602 genauer untersucht und die Funktion der Phosphorylierung an dieser Stelle charakterisiert.

Region VII wird durch den einzelnen Serinrest S619 gebildet. Da bereits bekannt war, dass dieser Serinrest phosphoryliert ist, wurde hier ebenfalls die Funktion der dynamischen Phosphorylierung dieser Aminosäure untersucht und funktionell charakterisiert.

Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten zur besseren Übersicht und Unterscheidung für die beiden Regionen einzeln diskutiert.

5.1 Der Einfluss der Phosphorylierung von S602 (Phosphorylierungsregion VI) auf den viralen Lebenszyklus

5.1.1 Der Einfluss der Phosphorylierung von S602 auf das Laufverhalten von NP im SDS-Gel

In Virionen liegt NP ausschließlich phosphoryliert vor (94 kDa), in infizierten Zellen sind sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte (92 kDa) Form vorhanden, beide Formen lassen sich anhand ihrer Laufhöhe im SDS-Gel unterscheiden (9). Durch den schrittweisen Austausch einzelner bzw. mehrerer Serine in der Phosphorylierungsregion VI gegen Aspartat (D) zur Imitation eines konstant phosphorylierten Serinrests bzw. gegen Alanin (A) oder Valin (V) zur Imitation eines konstant unphosphorylierten Serinrests, konnte der Einfluss der Phosphorylierung einzelner Serine auf das Laufverhalten von NP untersucht werden.

Die Phosphorylierung von S602 ist entscheidend für den Konformationswechsel von NP. Die Mutante NP_{S,SD,S-S} läuft im SDS-Gel auf der gleichen Höhe wie die phosphorylierte NP-Bande, die Mutante NP_{S,SV,S-S} bewegt sich auf Höhe der nichtphosphorylierten NP-Bande (s. 4.1.1).

Dass bereits ein einzelner Aminosäureaustausch (alle anderen Phosphorylierungsregionen wurden nicht verändert) zur Veränderung des Laufverhaltens im SDS-Gel führt, spricht für eine Änderung der NP-Konformation durch die Phosphorylierung von S602. Alternativ könnte die Phosphorylierung von S602 auch die Veränderung des Phosphorylierungsmusters der anderen Regionen bewirken, was dann indirekt die Konformation beeinflusst.

Die Beobachtung, dass trotz Imitation einer konstanten Nichtphosphorylierung von S602 (NP_{S,SV,S-S}) weiterhin Spuren der 94 kDa NP-Bande im SDS-Gel zu detektieren sind, lässt auf die Bedeutung der phosphorylierten Form schließen. Das Protein wird möglicherweise durch die

Phosphorylierung anderer Serin-/Threoninreste in die 94 kDa-Form überführt, was auf die Relevanz dieser Form für den effizienten Einbau in neue Viruspartikel hinweist.

5.1.2 Der Einfluss der Phosphorylierung von S602 auf die frühen Schritte der viralen Infektion

In der viralen Infektion führt die Nichtphosphorylierung von S602 (NP_{S.SV.S-S}) zu einer erhöhten Anzahl an NP-positiven Zellen zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion (s. 4.2.3). MARV, das an S602 ein phosphoryliertes NP (NP_{S.SD.S-S}) imitiert, verhält sich hier nicht anders als MARV NP_{wt}. Ein Einfluss der Phosphorylierung von NP auf die Freisetzung des Nukleokapsids nach Eintritt des Virus in die Zelle ist eher unwahrscheinlich. Deshalb spricht die Tatsache, dass bei Infektion mit einem Virus, das ein an Position S602 nichtphosphoryliertes NP (NP_{S.SV.S-S}) exprimiert dafür, dass die weiteren Schritte, also der Transport der Nukleokapside an den Ort von Replikation und Transkription sowie die Primärtranskription, durch die nichtphosphorylierte Form von NP verstärkt unterstützt werden. Einen Hinweis auf einen Einfluss auf die Primärtranskription liefern auch die Rescueerfolge für das Virus, das die konstant phosphorylierte Form von S602 imitiert (S_{S.SD.S-S}): Viren mit dieser Mutation ließen sich nicht so zuverlässig generieren wie alle anderen untersuchten Mutanten (s. 4.2.1, Tabelle 1). In den Wachstumskinetiken waren die im Vergleich zu NP_{wt} beobachteten Unterschiede allerdings nicht signifikant, so dass der Einfluss der Phosphorylierung von S602 auf die frühen Schritte im Replikationszyklus unter den untersuchten Bedingungen relativ gering ist.

5.1.3 Der Einfluss der Phosphorylierung von S602 auf die virale Replikation und Transkription

Die Untersuchung der Funktion der Phosphorylierung einzelner Serinreste in Phosphorylierungsregion VI ergab kein klares Muster hinsichtlich der Transkriptions- und/oder Replikationseffizienz (s. 4.1.2). Zwar waren die Aktivitäten einzelner Mutanten im Vergleich zu Wildtyp höher oder niedriger, ein Zusammenhang zwischen der Nichtphosphorylierung einzelner Reste und der Transkriptions- und/oder Replikationsaktivität wurde allerdings nicht deutlich.

Ebenso unterschied sich in den iVLP-Assays die Aktivität der S602-Phosphorylierungsmutanten (NP_{S.SD.S-S} und NP_{S.SV.S-S}) nicht von NP_{wt}, die Konformationsänderung von NP hat offensichtlich keinen Einfluss auf die virale Transkription und Replikation.

Zusammen mit der Beobachtung, dass ausschließlich die phosphorylierte Konformation von NP in Virionen eingebaut wird, spricht die unveränderte Replikations- und/oder Transfektionseffizienz in den untersuchten Modellsystemen dafür, dass die Phosphorylierung von S602 vor allem wichtig für den Transport und die Verpackung von NP in neue Viruspartikel ist.

Ein kleiner Teil des NP liegt allerdings auch trotz der Mutation weiterhin in der 94 kDa-Form vor (s. 4.1.1), möglicherweise wird ausschließlich dieser Teil in neu freigesetzte Viren eingebaut.

Für das Masernvirus wurde kürzlich ein Einfluss der Phosphorylierung eines Threoninrestes des Nukleoproteins (T279) auf die Bildung der Nukleokapside beschrieben. Eine Phosphorylierung von T279 führt demnach zu einer Konformationsänderung, die die Voraussetzung für den korrekten Zusammenbau der Nukleokapside und die RNA-Enkapsidierung ist. Für den Zusammenbau der Masernvirus-Nukleokapside muss allerdings nicht jedes Nukleoproteinmolekül an Position 279 phosphoryliert sein, sondern nur jedes siebte (132).

Da aber die NP-Mutanten, die ausschließlich die 92 kDa-Form (NP_{A,AA,A-A}) oder ausschließlich die 94 kDa-Form (NP_{S,SD,S-S}) repräsentieren, replikations- und transkriptionsaktiv sind (s. 4.1.2), hat die Phosphorylierung von MARV NP S602 und die damit verbundene Konformationsänderung im Gegensatz zum Nukleoprotein des Masernvirus keinen Einfluss auf den korrekten Zusammenbau der Nukleokapside.

5.1.4 Der Einfluss der Phosphorylierung von S602 auf den Zusammenbau und die Freisetzung neuer Viruspartikel

Die Nichtphosphorylierung von NP an Position S602 (NP_{S,SV,S-S}) hat einen Einfluss auf die Interaktion mit dem Matrixprotein VP40. VP40 ist entscheidend für den Plasmamembrantransport der Nukleokapside und erhöht den Anteil an NP, der mit Membranen interagieren kann auf das Doppelte (24). Die verstärkte Membranbindung von NP in Gegenwart von VP40 spiegelt wahrscheinlich das Andocken der Nukleokapside an die Plasmamembran wider, ein Prozess, der das Abschnüren neuer Viruspartikel einleiten könnte. Ist NP an Position S602 unphosphoryliert, so reduziert sich die membranassoziierte im Vergleich zu NP_{wt} in Gegenwart von VP40 (s. 4.1.5). Die Beobachtung, dass in MARV-infizierten Zellen beide Konformationen von NP vorliegen, allerdings nur die 94 kDa-Form in neue Viruspartikel eingebaut wird (9), könnte daher verschiedenen Transportmustern der beiden Formen an die Plasmamembran und damit an den Ort des Zusammenbaus und der Freisetzung neuer Viruspartikel geschuldet sein. Die 92 kDa-Form von NP scheint in geringerem Maße an der Plasmamembran zur Verfügung zu stehen, so dass möglicherweise ausschließlich NP in der 94 kDa-Form in Viruspartikel eingebaut wird.

In Gegenwart aller viralen Proteine (iVLP System) allerdings sind diese Unterschiede nicht mehr detektierbar: Überraschenderweise hat die Konformation von hier NP keinen Einfluss auf den Einbau in VLPs, auch die 92 kDa-Form von NP (NP_{S,SV,S-S}) wird in die VLPs eingebaut (s. 4.1.6).

Im Gegensatz zur viralen Infektion sind allerdings in den VLP-produzierenden Zellen sämtliche viralen Proteine in großen Mengen vorhanden, so dass Unterschiede der verschiedenen NP-Mutanten in der Transporteffizienz oder Rekrutierung zur Plasmamembran unter diesen Versuchsbedingungen nicht detektierbar ist.

Bei der Untersuchung rekombinanter Viren, die die entsprechenden Mutationen tragen, zeigten sich hingegen Unterschiede in der Freisetzung: Im Vergleich mit den anderen generierten Viren wurde die Mutante, die hauptsächlich die 92 kDa-Form von NP aufweist (rMARV NP_{s.sv.s-s}), an der Zelloberfläche zurückgehalten (s. 4.2.2). Auf die viralen Titer in der Wachstumskinetik hatte die Mutation allerdings keinen Einfluss. Auch wenn NP in diesem Fall vorwiegend in der 92 kDa-Form vorliegt, die bei einer Infektion mit wildtypischem MARV nicht in Virionen eingebaut wird, scheint die Mutante unter den gewählten Bedingungen nicht wachstumsdefekt zu sein.

5.1.5 Relevanz der dynamischen Phosphorylierung von S602 im viralen Lebenszyklus

Durch die Phosphorylierung und die Dephosphorylierung von S602 steht das Nukleoprotein für verschiedene Funktionen im viralen Lebenszyklus zur Verfügung.

Nach Infektion von neuen Zielzellen kommt es zunächst zur Freisetzung des Nukleokapsids ins Zytoplasma und anschließend zur Primärtranskription. Die nichtphosphorylierte, 92 kDa-Form von NP unterstützt besonders die Primärtranskription (Abb. 21 B), so dass es nach der Freisetzung des Nukleokapsids ins Zytoplasma möglicherweise zur Dephosphorylierung durch eine zelluläre Phosphatase (bisher noch nicht identifiziert) kommen muss. Die Primärtranskription wird zwar auch durch die 94 kDa-Form von NP unterstützt, allerdings scheint in diesem Fall der Prozess weniger effizient abzulaufen.

Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es nach der Primärtranskription zur Translation der viralen mRNAs durch die zelluläre Translationsmaschinerie, neue virale Proteine werden synthetisiert. Durch die neu gebildeten viralen Proteine können Sekundärtranskription sowie Replikation der viralen RNA stattfinden, so dass alle Komponenten zum Zusammenbau neuer Viruspartikel in großer Menge synthetisiert werden.

Das neu synthetisierte NP wird von einer bisher noch nicht identifizierten zellulären Kinase phosphoryliert, von den *inclusion bodies* als dem Ort der viralen Replikation und Transkription werden dann bevorzugt Nukleokapside mit der 94 kDa-Form an die Plasmamembran transportiert und dort in neue Viruspartikel eingebaut und diese freigesetzt.

Denkbar ist auch ein bevorzugter Einbau der 94 kDa-Form in die neu gebildeten Nukleokapside, dies wurde allerdings in dieser Arbeit nicht untersucht.

Die oben beschriebenen Einflüsse werden durch die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten unterstützt, in ihrem Wachstumsverhalten unterschieden sich die Virusmutanten, die die verschiedenen Konformationen von NP repräsentieren, allerdings kaum.

Aufgrund der Tatsache, dass ausschließlich phosphoryliertes NP in MARV-Viruspartikeln vorliegt, wäre ein unterschiedlicher Phänotyp bzw. ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zu erwarten gewesen. Möglicherweise waren allerdings die hier gewählten Bedingungen (z.B. der gewählte Zelltyp) bzw. Versuchsansätze nicht geeignet, um existierende Unterschiede zu erfassen.

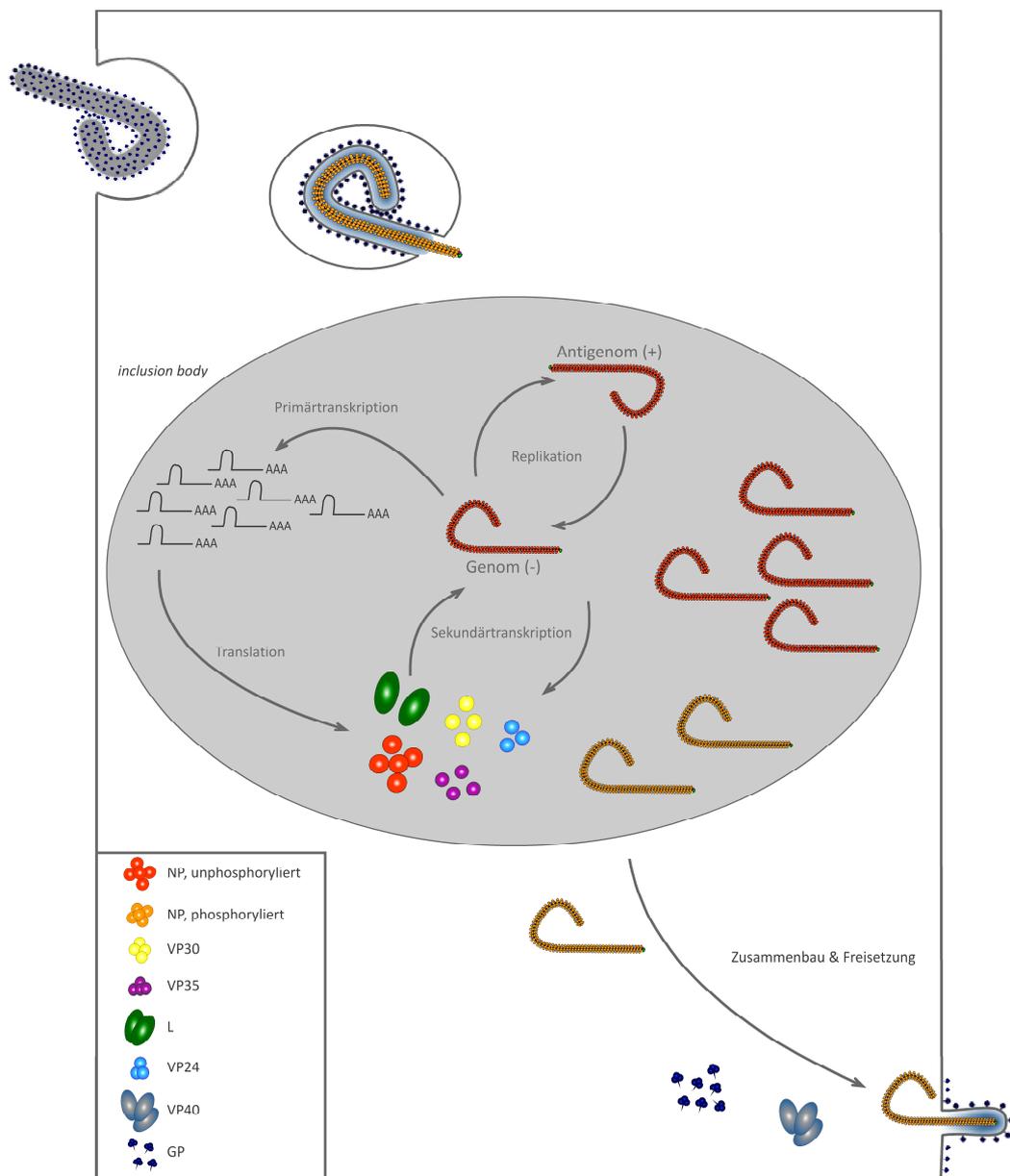


Abbildung 28: Arbeitsmodell zur Funktion der dynamischen Phosphorylierung von S602.

Die hier beschriebenen Funktionen der verschiedenen Phosphorylierungsstadien von S602 sind in Abbildung 28 als Arbeitsmodell dargestellt.

Abschließend bleibt festzustellen, dass unter den im Rahmen dieser Arbeit gewählten Bedingungen die Effekte der durch die Phosphorylierung ausgelöste Konformationsänderung von NP auf die verschiedenen untersuchten Schritte im viralen Replikationszyklus überraschend klein waren.

Möglicherweise waren allerdings die gewählten Bedingungen nicht ideal, um bestehende funktionelle Unterschiede zwischen der 92 kDa- und der 94 kDa-Form von NP herauszustellen. Bei Versuchen mit Makrophagen, als den primären Zielzellen von MARV, wären möglicherweise Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten zu detektieren gewesen.

Solche Untersuchungen würden die ersten Schritte für die weitere Charakterisierung der dynamischen Phosphorylierung an Position S602 und der dadurch bedingten Konformationsänderung von MARV NP darstellen.

5.2 Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 (Phosphorylierungsregion VII) auf den viralen Lebenszyklus

5.2.1 Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf das Laufverhalten von NP im SDS-Gel

Wie zuvor beschrieben hat der Phosphorylierungsstatus von S602 in Phosphorylierungsregion VI einen Einfluss auf das Laufverhalten von NP im SDS-Gel und damit auf die Konformation von NP.

Die Phosphorylierung von S619, also Phosphorylierungsregion VII, hat keinen Einfluss auf die Migration im SDS-Gel, für beide untersuchten Mutanten NP_{S,SS,S-A} und NP_{S,SS,S-D} sind sowohl die 92 kDa- als auch die 94 kDa-Bande detektierbar. Die funktionalen Unterschiede des Proteins in den beiden unterschiedlichen Phosphorylierungsstadien sind damit unabhängig von seiner im SDS-Gel nachweisbaren Konformationsänderung.

5.2.2 Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf die frühen Schritte der viralen Infektion

In Infektionsstudien sind zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion mehr NP-positive Zellen detektierbar, wenn S619 phosphoryliert ist (s. 4.2.2). Die Detektion von NP in infizierten Zellen setzt voraus, dass die Viren in die Zellen aufgenommen wurden, die Nukleokapside ins Zytoplasma freigesetzt wurden und die virale RNA transkribiert sowie die gebildeten mRNAs translatiert wurden. Einer oder mehrere dieser Schritte werden also durch die Phosphorylierung von S619 bevorzugt unterstützt.

Denkbar ist zum einen ein schnellerer Transport des freigesetzten phosphorylierten Nukleokapsids an die Orte viraler Replikation und Transkription, eine weitere Möglichkeit wäre ein Einfluss der Phosphorylierung auf die korrekte Kondensation der Nukleokapside und die Verpackung der Nukleokapside in die Viruspartikel. Wären die Nukleokapside nicht korrekt kondensiert und der Polymerasekomplex dadurch möglicherweise nicht richtig lokalisiert, dann müssten Einflüsse der Phosphorylierung auf die Primärtranskription und damit die ersten Schritte zur Synthese neuer viraler Proteine detektierbar sein. Der Einfluss eines filoviralen Nukleokapsidproteins auf die Kondensation des viralen Nukleokapsids wurde kürzlich für EBOV VP24 beschrieben (153). Die Interaktion von EBOV VP24 mit dem Nukleokapsid führt zu dessen Kondensation und gleichzeitig zur korrekten Lokalisierung des Polymerasekomplexes. Nach der Infektion neuer Zellen und der Freisetzung der Nukleokapside ins Zytoplasma kann die Primärtranskription direkt effizient ablaufen. Ohne EBOV VP24 kommt es nicht zur Kondensation des Nukleokapsids, das daher nicht in neue Partikel verpackt werden kann. Eine produktive Infektion neuer Zellen findet daher nicht statt.

Die hier präsentierten Daten lassen den Schluss zu, dass im Zusammenspiel mit MARV VP24 der Phosphorylierungsstatus von S619 die Aktivität des Proteins in der Primärtranskription beeinflusst: Nichtphosphoryliertes NP ist deutlich weniger aktiv als phosphoryliertes NP (s. 4.3, Abb. 27 C).

Die Annahme, dass analog zum EBOV VP24 auch MARV VP24 wichtig für die korrekte Kondensation des Nukleokapsids bzw. die korrekte Lokalisierung des Polymerasekomplexes am Nukleokapsid ist, führt auf der Basis der hier präsentierten Daten daher zu zwei Annahmen:

Zum einen könnte in Abwesenheit von VP24 die Phosphorylierung von NP S619 dazu führen, dass die fehlende Funktion von VP24 ausgeglichen werden kann. Möglicherweise unterstützt die Phosphorylierung von NP selbst eine korrekte Nukleokapsidkondensation.

Zum anderen verstärkt die verbesserte Interaktion von VP24 mit NP, das an S619 phosphoryliert ist, möglicherweise die Rekrutierung von VP24 an das Nukleokapsid und damit seine durch VP24 vermittelte Kondensation.

Die Tatsache, dass im iVLP-System in den naiven Indikatorzellen in Anwesenheit von VP24 keine Unterschiede zwischen den beiden Phosphorylierungsmutanten zu beobachten sind, steht hierzu nicht im Widerspruch: Die VP24-Menge in den VLP-produzierenden Zellen ist durch die plasmidbasierte Expression im Vergleich zur Virusinfektion hoch, so dass trotz der schlechteren Interaktion mit dem nichtphosphorylierten NP (NP_{S_{SS}S-A}) das VP24 eine effektive Nukleokapsidkondensation vermitteln könnte. Während der MARV-Infektion ist die Menge an VP24 in der Zelle besser reguliert, so dass die Ergebnisse der Infektionsversuche die Situation realistischer

abbilden: Hierbei hat NP, das an S619 phosphoryliert ist, einen eindeutigen Wachstumsvorteil (s. 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6).

5.2.3 Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf die virale Replikation und Transkription

Mit Hilfe von NP-Phosphorylierungsmutanten, die entweder ein konstant phosphoryliertes S619 (NP_{S,SS,S-D}) oder ein konstant unphosphoryliertes S619 (NP_{S,SS,S-A}) imitieren, konnte nachgewiesen werden, dass die Nichtphosphorylierung von S619 zu einer erhöhten Replikations- und/oder Transkriptionsaktivität im Vergleich zu NP_{wt} führt (NP_{S,SS,S-A}) (ca. 179 %, s. 4.1.2).

Die erhöhte Transkriptions- und/oder Replikationseffizienz von unphosphoryliertem S619 (NP_{S,SS,S-A}) ist nicht auf eine veränderte Interaktion mit VP30 oder VP35 zurück zu führen. Für die nichtphosphorylierte Mutante sowie auch bei phosphoryliertem S619 (NP_{S,SS,S-D}) war die intrazelluläre Verteilung sowie die Kolo-kalisation mit VP30 und VP35 nicht unterschiedlich zu NP_{wt} (s. 4.1.4).

Für verschiedene andere Vertreter der Mononegavirales wurde beschrieben, dass ein unphosphoryliertes Nukleoprotein die Replikations- bzw. Transkriptionsaktivität herunterreguliert:

Für das Tollwutvirus führt die Dephosphorylierung vom Nukleoprotein zu einer verstärkten Bindung an die Leader-RNA, wodurch der Replikations- bzw. Transkriptionskomplex einen schlechteren Zugang zur RNA hat und somit beide Prozesse reduziert stattfinden (161). Die Phosphorylierung des Nukleoproteins führt dann möglicherweise durch die Einführung der negativen Ladung zu einer Abschwächung der RNA-NP-Bindung, so dass der Polymerasekomplex besseren Zugang zur RNA hat und die Transkription und Replikation initiieren kann (160). Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Funktion der Phosphorylierung des MARV NPs in der Phosphorylierungsregion II angenommen. Hier führt die Phosphorylierung der Serine 453-455 zu einer vermehrten Transkriptions- und/oder Replikationsaktivität im iVLP-System.

Auch für Masernvirus und Nipahvirus wurde eine verringerte Aktivität im Minigenom beschrieben, wenn das Nukleoprotein un- bzw. nur eingeschränkt phosphoryliert war (46, 53).

Da die Nichtphosphorylierung von MARV NP S619 zu einer erhöhten Transkriptions- und/oder Replikationsaktivität führt, scheint hier ein anderer Mechanismus zu Grunde zu liegen. Auch beim Mumpsvirus Nukleoprotein steigt die Reporteraktivität im Minigenom, wenn die Hauptphosphorylierungsstelle unphosphoryliert vorliegt. Der Mechanismus, der zur Hochregulation der Transkription und/oder Replikation führt, ist hier allerdings noch nicht geklärt (164).

Wie oben beschrieben wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf die Interaktion mit dem Nukleokapsidprotein VP24 untersucht. Bei der Koexpression von NP, VP24 und VP40 wurde unphosphoryliertes NP S619 (NP_{S,SS,S-A}) zu einem deutlich geringeren Anteil an die Membran rekrutiert, die fehlende Phosphorylierung führte also zu einer verminderten Interaktion mit VP24 bzw. zu einer verminderten VP24-vermittelten Interaktion von NP und VP40.

Die Auswirkung dieser veränderten Interaktion auf die virale Replikation und Transkription wurde im Minigenomassay weiter untersucht. Für EBOV VP24 wurde gezeigt, dass VP24 die Transkriptions- und/oder Replikationsaktivität bei plasmidbasierter Expression im Minigenomsystem herunterreguliert (151).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen konnte für MARV VP24 keine Reduktion der Luciferaseaktivität im Minigenomsystem beobachtet werden. Im Gegenteil wurden sowohl für NP_{wt} als auch für die S619-Phosphorylierungsmutanten die Transkriptions- und/oder Replikationsaktivität durch VP24 erhöht.

Für die Untersuchung der Funktion von EBOV VP24 wurde bei der Verwendung eines EBOV-spezifischen tetracistronischen Minigenoms, das neben dem Luciferasegen auch die offenen Leseraster für VP40, GP und VP24 trägt, gezeigt, dass der Einfluss von VP24 auf die Transkription und Replikation deutlich geringer ist (153) als vorher angenommen. Es wird daher vermutet, dass die Herunterregulierung der Transkriptions- und/oder Replikationsaktivität im Minigenom bei plasmidbasierter Expression auf die große Menge von EBOV VP24 in der Zelle zurückzuführen ist. Das tetracistronische Minigenom repräsentiert eher die Proteinmengen während der viralen Infektion.

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Untersuchung der Interaktion zwischen den S619-Phosphorylierungsmutanten und VP24 unterscheiden sich in der Komposition der viralen Proteine: Bei der Flotationsanalyse, in der die VP24-NP-Interaktion untersucht wurde, wird neben NP und VP24 auch VP40 exprimiert. Im Minigenomsystem liegt kein VP40 vor, dafür aber die Nukleokapsidproteine L, VP35 und VP30. Eine direkte Korrelation zwischen der verringerten Interaktion von unphosphoryliertem NP und VP24 auf der einen Seite und der gesteigerten Minigenomaktivität im Beisein von VP24 auf der anderen Seite ist daher nicht möglich.

Bei früheren Untersuchungen der Funktion von MARV VP24 und EBOV VP24 wurde VP24 in der viralen Infektion jeweils durch spezifische siRNAs herunterreguliert, wodurch die Anzahl der freigesetzten Partikel deutlich reduziert wurde. Die virale Transkription und Replikation wurden in diesen Versuchen durch das Fehlen von VP24 allerdings nicht beeinflusst (4, 93). Als Maß für die

Replikation und Transkription wurden hierbei allerdings die Mengen der viralen Proteine in den infizierten Zellen in An- bzw. Abwesenheit von VP24 miteinander verglichen, wobei keine Unterschiede festgestellt wurden. Das in dieser Arbeit für die Untersuchung der Replikations- und Transkriptionsaktivität verwendete Minigenomsystem ist wahrscheinlich sensitiver als die Bestimmung der Proteinmenge, so dass die hier präsentierten Daten nicht unbedingt im Widerspruch zu früheren Arbeiten stehen.

Allerdings unterscheiden sich im hier präsentierten iVLP-System die Proteinmengen in den freigesetzten VLPs für die Ansätze mit und ohne VP24 nicht, während durch das Fehlen von VP24 in der viralen Infektion deutlich weniger Viren in den Überstand freigesetzt wurden. Dies kann allerdings daran liegen, dass es sich hierbei um ein Modellsystem handelt, bei dem die Proteinexpression plasmidbasiert erfolgt und nicht wie in der viralen Infektion gesteuert ist. Wie oben beschrieben führte das Fehlen von VP24 in der viralen Infektion zur Reduktion der Menge aller viralen Proteine in der Zelle. Bei einer plasmidbasierten Expression werden die Mengen der anderen viralen Proteine nicht beeinflusst. Außerdem sind HEK293-Zellen in der Lage, proteinhaltige Vesikel abzuschnüren, so dass die nachgewiesenen Proteine möglicherweise nicht ausschließlich minigenomassoziiert in VLPs verpackt vorliegen (75, 155) (s. 4.3).

Auch für EBOV wurde beschrieben, dass bei einer plasmidbasierten Expression infektiöse VLPs in Abwesenheit von VP24 in den Überstand freigesetzt werden, was dafürspricht, dass VP24 weder für die Freisetzung neuer Viren noch für die initialen Schritte des viralen Lebenszyklus essentiell ist (152). Allerdings ist das Minigenom im Vergleich zum viralen Genom deutlich kleiner (ca. um den Faktor 10), so dass die Funktion von VP24 für eine effiziente Verpackung des Minigenoms aufgrund seiner geringen Länge in diesem Modellsystem möglicherweise nicht relevant ist.

Mit Hilfe von Cryo-EM-Analysen wurde für EBOV beschrieben, dass NP, VP35 und VP24 notwendig für die Bildung des Nukleokapsids sind (54). Weiterhin wurde gezeigt, dass bei einer Koexpression von EBOV NP und VP40 kondensierte Nukleokapsid-Strukturen gebildet werden, die bei zusätzlicher Expression von VP35 und VP24 starrer wurden und somit den Nukleokapsidstrukturen aus EBOV in ihrer Symmetrie, Struktur, Variabilität und Flexibilität gleichwertig sind (11).

Die für MARV durchgeführten Cryo-EM-Analysen zeigten, dass VP24 nukleokapsidassoziiert vorliegt, die Interaktion mit NP allerdings weniger stabil ist als die Interaktion zwischen NP und VP35 (10). Studien zur Nukleokapsidkondensation wie bei EBOV wurden hier allerdings nicht durchgeführt.

5.2.4 Der Einfluss der Phosphorylierung von S619 auf den Zusammenbau und die Freisetzung neuer Viruspartikel

Die Nichtphosphorylierung von NP an Position S619 (NP_{S,SS,S-A}) hat einen Einfluss auf die Interaktion mit dem Matrixprotein VP40. Liegt S619 unphosphoryliert vor, dann ist die Interaktion von NP mit VP40 verstärkt, wodurch mehr NP in membranahen Bereichen lokalisiert ist.

Bei der Expression aller weiteren viralen Proteine allerdings sind diese Unterschiede nicht mehr detektierbar: Bei Zusammenbau und Freisetzung von virusähnlichen Partikeln im iVLP-System unterschied sich NP, das an Position S619 unphosphoryliert ist (NP_{S,SS,S-A}) nicht stark von NP_{wt}, eine Phosphorylierung von S619 (NP_{S,SS,S-D}) führt allerdings zu einer verstärkten Freisetzung von NP in die VLPs.

Die Infektion von Indikatorzellen mit den iVLPs zeigte eine leicht reduzierte Reporteraktivität für NP, das an Position S619 unphosphoryliert ist (NP_{S,SS,S-A}) (s. 4.1.6).

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei der Untersuchung rekombinanter Viren, die die entsprechenden Mutationen tragen.

Im Gegensatz zur modellhaften Untersuchung im iVLP-System wurden für die rekombinanten Viren bei Nichtphosphorylierung von S619 (rMARV NP_{S,SS,S-A}) vermehrt Viruspartikel freigesetzt (s. 4.2.2, 4.2.4 und 4.2.5), was vermutlich auf die vermehrte Menge an viralen Proteinen und viraler RNA in der Zelle durch die erhöhte Transkription und Replikation zurückzuführen ist.

Die einzelnen Partikel sind allerdings nicht so infektiös wie Viren, die an dieser Position eine Phosphorylierung tragen (rMARV NP_{S,SS,S-D}). Trotz deutlich erhöhter Partikelmenge bei rMARV NP_{S,SS,S-A} unterschieden sich die Titer nicht signifikant von rMARV NP_{S,SS,S-D} (s. 4.2.5), was ein weiterer Hinweis für einen negativen Einfluss der Nichtphosphorylierung von S619 auf die ersten Schritte der viralen Infektion nach der Aufnahme der Viren in die Zelle und der Freisetzung des Nukleokapsids ins Zytoplasma ist.

Für das Mumpsvirus wurde gezeigt, dass die Nichtphosphorylierung des Nukleoproteins N trotz der erhöhten RNA- und Proteinmenge in infizierten Zellen zu einer verringerten Virusproduktion in interferonkompetenten Zellen führt, ein Defekt in der Verpackung der viralen RNA wird vermutet.

Für das Mumpsvirus wurde außerdem eine verringerte Interaktion zwischen dem unphosphorylierten N und dem Phosphoprotein P nachgewiesen (164).

Ein Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung vom Nukleoprotein N und der Interaktion mit dem Phosphoprotein P wurde ebenfalls für das Masernvirus gezeigt. Die unphosphorylierte

Form von N interagiert hier besser mit P, der N-P-Komplex umschließt dann die neu synthetisierte RNA, um sie vor dem Abbau durch Nukleasen zu schützen (133).

In den hier durchgeführten Transfektionsexperimenten konnte allerdings kein Einfluss der Phosphorylierung von NP auf die Interaktionen mit dem P-Homolog VP35 oder dem weiteren viralen Nukleokapsidprotein VP30 festgestellt werden (s. 4.1.4).

5.2.5 Relevanz der dynamischen Phosphorylierung von S619 im viralen Lebenszyklus

Im direkten Vergleich der beiden S619-Phosphorylierungsmutanten bei einer Infektion mit einem Gemisch beider Mutanten liegt 2 Tage nach Infektion im Überstand der infizierten Zellen nahezu ausschließlich das Virus vor, das NP mit der phosphorylierten Form von S619 kodiert (NP_{S.S.S-D}) (s. 4.2.6). Die Phosphorylierung von NP an Position S619 scheint also einen Wachstumsvorteil zu vermitteln.

In Abwägung aller zuvor beschriebenen Funktionen der verschiedenen Phosphorylierungsstadien von S619 kann man allerdings zu dem Schluss kommen, dass gerade die Dynamik der Phosphorylierung von NP für die verschiedenen Funktionen im viralen Lebenszyklus wichtig ist:

Durch die Phosphorylierung von S619 kann NP verstärkt mit VP24 interagieren, so dass neu synthetisierte Nukleokapside aus den *inclusion bodies* an die Zellmembran transportiert werden, wo sie dann in neue Viruspartikel verpackt und freigesetzt werden können. Möglicherweise führt entweder die verstärkte Interaktion mit VP24 oder die Phosphorylierung selbst zu einer leichten strukturellen Veränderung des Nukleokapsids, so dass der Polymerasekomplex korrekt an das Nukleokapsid assoziiert in neue Viruspartikel eingebaut wird. Letztendlich führt entweder diese korrekte Assoziation oder die Phosphorylierung selbst zu einer gesteigerten Primärtranskription. Ist S619 nicht phosphoryliert, wird der Polymerasekomplex nicht richtig eingebaut, so dass nach Infektion neuer Zielzellen und Freisetzung des Nukleokapsids ins Zytoplasma die Primärtranskription nicht effizient stattfinden kann.

Zu späteren Zeitpunkten wiederum unterstützt das in den Zellen neu synthetisierte unphosphorylierte NP die Transkription und Replikation, so dass eine ausreichende Menge viraler Proteine und viraler RNA synthetisiert werden kann. Ob schon für den Transport der Nukleokapside aus den *inclusion bodies* an die Plasmamembran S619 phosphoryliert vorliegt oder ob zunächst unphosphoryliertes NP an die Plasmamembran transportiert und dort von zellulären Kinasen (bisher noch nicht identifiziert) phosphoryliert wird, lässt sich anhand der gewonnenen Ergebnisse nicht eindeutig klären.

Die schlechtere Interaktion von NP mit VP24 bei nichtphosphoryliertem S619 spricht allerdings dafür, dass die Phosphorylierung in der Nähe der *inclusion bodies* stattfindet. Somit würde un-

phosphoryliertes NP zur effizienten Unterstützung von Replikation und Transkription in den *inclusion bodies* zurückgehalten, während phosphoryliertes NP zum Zusammenbau und zur Freisetzung neuer Viruspartikel von dort zusammen mit der viralen RNA und den weiteren Nukleokapsidproteinen zu Nukleokapsiden aggregiert und an die Zellmembran transportiert wird.

S619 ist innerhalb der Filoviren nicht konserviert, so dass eine ähnliche Modifikation von EBOV NP (falls vorhanden) möglicherweise durch die Phosphorylierung anderer Reste erfolgt (116).

In Abbildung 29 sind die hier beschriebenen Funktionen der verschiedenen Phosphorylierungsstadien von NP S619 im viralen Replikationszyklus als Arbeitsmodell dargestellt.

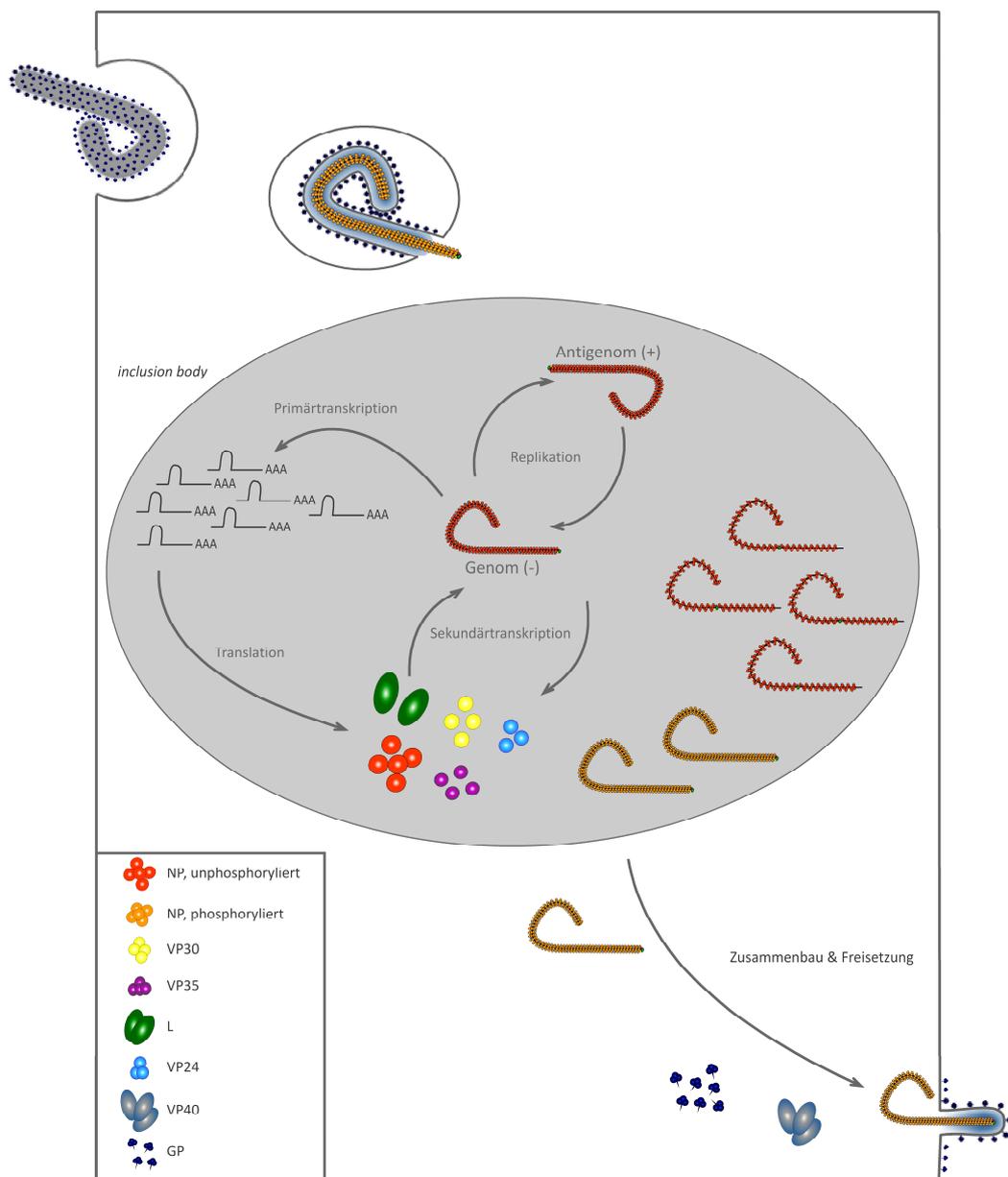


Abbildung 29: Arbeitsmodell zur Funktion der dynamischen Phosphorylierung von S619.

Zur weiteren Charakterisierung der Rolle von MARV VP24 sowie zur Interaktion von VP24 und den hier beschriebenen Phosphorylierungsmutanten im iVLP-Modellsystem wäre analog zu den Untersuchungen für EBOV VP24 eine Analyse mithilfe eines multicistronischen Minigenomsystems denkbar.

6. Zusammenfassung

Das Marburgvirus (MARV) bildet zusammen mit Ebolavirus (EBOV) und Lloviuvirus (LLOV) die Familie der *Filoviridae* und besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom negativer Orientierung. Filoviren werden als BSL-4-Pathogene klassifiziert, da sie schwere hämorrhagische Fieber bei Menschen und Affen verursachen.

Das Nukleoprotein NP bildet zusammen mit den viralen Proteinen VP30, VP35, VP24 und der Polymerase L das Nukleokapsid, das die virale RNA umschließt. Frühere Studien haben gezeigt, dass NP an C-terminalen Serin- und Threoninresten phosphoryliert ist. Während in infizierten Zellen sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte Form von NP nachgewiesen werden können, wird in neu gebildete Viruspartikel ausschließlich die phosphorylierte Form eingebaut, was auf eine Funktion der Phosphorylierung in der Bildung neuer Viruspartikel hinweist. Für NP wurden sieben Phosphorylierungsregionen beschrieben, wovon bisher eine (Phosphorylierungsregion II) näher funktionell charakterisiert wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Phosphorylierungsregionen VI und VII genauer untersucht und die Funktion der Phosphorylierung der Serinreste in diesen Regionen charakterisiert. Mit Hilfe phosphomimetischer Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung eines einzelnen Serinrests (S602) in Phosphorylierungsregion VI für die Konformationsänderung von NP ausreicht. Eine Phosphorylierung von NP an Position S602 bewirkt im Vergleich zur unphosphorylierten Form einen verbesserten Transport von den viralen *inclusion bodies* als den Orten viraler Replikation und Transkription zur Plasmamembran, womit bevorzugt phosphoryliertes NP zum Zusammenbau und zur Freisetzung neuer Viren zur Verfügung steht.

Die Phosphorylierung vom einzigen Serinrest (S619) in Phosphorylierungsregion VII wurde ebenso mit phosphomimetischen Mutanten untersucht: Ist NP an Position S619 nicht phosphoryliert, so werden Replikation und/oder Transkription unterstützt, damit zur Freisetzung neuer Viren ausreichend virale Proteine und virale RNA zur Verfügung stehen. Für eine effiziente Interaktion mit dem weiteren Nukleokapsidprotein VP24 und damit die Bildung funktioneller Nukleokapside ist allerdings die Phosphorylierung von S619 essentiell.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der Phosphorylierung des Nukleoproteins für den viralen Replikationszyklus: Die dynamische Phosphorylierung verschiedener Aminosäuren führt zu einem breiten Spektrum verschiedener Funktionen von NP, die zu verschiedenen Zeitpunkten im Replikationszyklus von Bedeutung sind.

7. Summary

Marburgvirus (MARV), Ebolavirus (EBOV) and Lloviuvirus (LLOV) form the family *Filoviridae* and possess a single-stranded RNA genome of negative polarity. Causing severe hemorrhagic fevers in humans and nonhuman primates, filoviruses are classified as BSL-4 pathogens.

The nucleoprotein NP, together with the viral proteins VP30, VP35, VP24 and the polymerase L, form the nucleocapsid that encapsidates the viral RNA. Previous studies have shown that NP is phosphorylated at C-terminal serine and threonine residues. While in infected cells both phosphorylated and unphosphorylated NP can be detected, only the phosphorylated form is incorporated into released viral particles, suggesting a role of the phosphorylation in virogenesis. Seven phosphorylation regions have been identified in NP, one of those (phosphorylation region II) has already been studied more in detail.

Phosphorylation regions VI and VII were studied in the present thesis, the function of the serine residues' phosphorylation in these regions was characterized. Using phosphomimetic mutants it could be shown that the phosphorylation of a single residue (S602) in phosphorylation region VI is sufficient for the conformational change of NP. NP that is phosphorylated at S602 is preferentially transported from the viral *inclusion bodies* that represent areas of viral replication and transcription to the plasma membrane when compared to the unphosphorylated form. Therefore, predominantly phosphorylated NP is available for the budding of new virions.

The phosphorylation of the single serine (S619) in phosphorylation region VII was also studied by using phosphomimetic mutants: Replication and/or transcription are enhanced when S619 is unphosphorylated so that enough viral proteins and viral RNA are synthesized for the budding of new viral particles. Phosphorylation of S619 however is required for an efficient interaction with the nucleocapsid protein VP24 and therefore the formation of functionally active nucleocapsids.

Taken together, the results presented in this thesis underline the importance of the phosphorylation of NP for the viral lifecycle: The phosphorylation of NP conveys a broad spectrum of functions that are important in different stages of the viral lifecycle.

8. Literaturverzeichnis

- 1 **Aleksandrowicz, P., A. Marzi, N. Biedenkopf, N. Beimforde, S. Becker, T. Hoenen, H. Feldmann and H. J. Schnittle.** 2011. Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *J Infect Dis.* **204 Suppl 3**:957-967
- 2 **Alves, D.A., A. R. Glynn, K. E. Steele, M. G. Lackemeyer, N. L. Garza, J. G. Buck, C. Mech, and D. S. Reed.** 2010. Aerosol Exposure to the Angola Strain of Marburg Virus Causes Lethal Viral Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques. *Vet Pathol.* **47**:831-851
- 3 **Bale, S., J. P. Julien, Z. A. Bornholdt, C. R. Kimberlin, P. Halfmann, M. A. Zandonatti, J. Kunert, G. J. Kroon, Y. Kawaoka, I. J. MacRae, I. A. Wilson, and E. O. Saphire.** 2012. Marburg virus VP35 can both fully coat the backbone and cap the ends of dsRNA for interferon antagonism. *PLoS Pathog.* **8**:e1002916
- 4 **Bamberg, S., L. Kolesnikova, P. Möller, H. D. Klenk and S. Becker.** 2005. VP24 of Marburg Virus Influences Formation of Infectious Particles. *J Virol.* **79**:13421-13433
- 5 **Barrette, R. W., S. A. Metwally, J. M. Rowland, L. Xu, S. R. Zaki, S. T. Nichol, P. E. Rollin, J. S. Towner, W. J. Shieh, B. Batten, T. K. Sealy, C. Carrillo, K. E. Moran, A. J. Bracht, G. A. Mayr, M. Sirios-Cruz, D. P. Catbagan, E. A. Lautner, T. G. Ksiazek, W. R. White, and M. T. McIntosh.** 2009. Discovery of swine as a host for the Reston ebola-virus. *Science* **325**:204-206
- 6 **Becker, S., and E. Mühlberger.** 1999. Co- and posttranslational modifications and functions of Marburg virus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* **235**:23-34
- 7 **Becker, S., M. Spiess, and H. D. Klenk.** 1995. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol.* **76**:393-399
- 8 **Becker, S., Rinne C., Hofsäss U., Klenk H. D. and E. Mühlberger.** 1998. Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology.* **249**:406-417.
- 9 **Becker, S., S. Huppertz, H. D. Klenk and H. Feldmann.** 1994. The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated. *J Gen Virol.* **75**:809-818.
- 10 **Bharat, T. A. M., J. D. Riches, L. Kolesnikova, S. Welsch, V. Krähling, N. Davey, M.-L. Parsy, S. Becker and J. A. G. Briggs.** 2011. Cryo-Electron Tomography of Marburg Virus Particles and Their Morphogenesis within Infected Cells. *PLoS Biol.* **9**:e1001196.
- 11 **Bharat, T. A., T. Noda, J. D. Riches, V. Kraehling, L. Kolesnikova, S. Becker, Y. Kawaoka, and J. A. Briggs.** 2012. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **109**:4275–4280
- 12 **Biedenkopf, N., B. Hartlieb, T. Hoenen, and S. Becker.** 2013. Phosphorylation of Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex: impact on viral transcription and replication. *J Biol Chem.* **288**:11165-11174
- 13 **Biedenkopf, N., C. Lier, and S. Becker.** 2016. Dynamic Phosphorylation of VP30 is essential for Ebola virus life cycle. *J Virol.* **90**:4914-4925
- 14 **Biek, R., P. D. Walsh, E. M. Leroy, and L. A. Real.** 2006. Recent common ancestry of Ebola Zaire virus found in a bat reservoir. *PLoS Pathog* **2**:e90
- 15 **Bowen, E. T., G. Lloyd, W. J. Harris, G. S. Platt, A. Baskerville, and E. E. Vella.** 1977. Viral haemorrhagic fever in southern Sudan and northern Zaire. Preliminary studies on the aetiological agent. *Lancet.* **1**:571-573

- 16 **Campbell, J. J., S. L. Cosby, J. K. Scott, B. K. Rima, S. J. Martin, and M. Appel.** 1980. A comparison of measles and canine distemper virus polypeptides. *J Gen Virol.* **48**:149-159
- 17 **Carette, J. E., M. Raaben, A. C. Wong, A. S. Herbert, G. Obernosterer, N. Mulherkar, A. I. Kuehne, P. J. Kranzusch, A. M. Griffin, G. Ruthel, P. Dal Cin, J. M. Dye, S. P. Whelan, K. Chandran, and T. R. Brummelkamp.** 2011. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature.* **477**:340-343
- 18 **Christie, A., G. J. Davies-Wayne, T. Cordier-Lassalle, D. J. Blackley, A. S. Laney, D. E. Williams, S. A. Shinde, M. Badio, T. Lo, S. E. Mate, J. T. Ladner, M. R. Wiley, J. R. Kugelmann, G. Palacios, M. R. Holbrook, K. B. Janosko, E. de Wit, N. van Doremalen, V. J. Munster, J. Pettitt, R. J. Schoepp, L. Verhenne, I. Evlampidou, K. K. Kollie, S. B. Sieh, A. Gasasira, F. Bolay, F. N. Kateh, T. G. Nyenswah, K. M. De Cock.** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2015. Possible sexual transmission of Ebola virus - Liberia, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **64**:479-481
- 19 **Côté, M., J. Misasi, T. Ren, A. Bruchez, K. Lee, C. M. Filone, L. Hensley, Q Li, D. Ory, K. Chandran, and J. Cunningham.** 2011. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature.* **477**:344-348
- 20 **Daddario-DiCaprio, K. M., T. W. Geisbert, J. B. Geisbert, U. Ströher, L. E. Hensley, A. Grolla, E. A. Fritz, F. Feldmann, H. Feldmann, and S. M. Jones.** 2006. Cross-protection against Marburg virus strains by using a live, attenuated recombinant vaccine. *J Virol.* **80**:9659-9666
- 21 **De Santis, O., R. Audran, E. Pothin, L. Warpelin-Decrausaz, L. Vallotton, G. Wuerzner, C. Cochet, D. Estoppey, V. Steiner-Monard, S. Lonchamp, A. C. Thierry, C. Mayor, R. T. Bailer, O. T. Mbaya, Y. Zhou, A. Ploquin, N. J. Sullivan, B. S. Graham, F. Roman, I. De Ryck, W. R. Ballou, M. P. Kieny, V. Moorthy, F. Spertini, and B. Genton.** 2015. Safety and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus-vectored Ebola vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 1/2a study. *Lancet Infect Dis.* **16**:311-320
- 22 **Deen, G. F., B. Knust, N. Broutet, F.R. Sesay, P. Formenty, C. Ross, A.E. Thorson, T.A. Massaquoi, J.E. Marrinan, E. Ervin, A. Jambai, S.L.R. McDonald, K. Bernstein, A.H. Wurie, M.S. Dumbuya, N. Abad, B. Idriss, T. Wi, S.D. Bennett, T. Davies, F.K. Ebrahim, E. Meites, D. Naidoo, S. Smith, A. Banerjee, B.R. Erickson, A. Brault, K.N. Durski, J. Winter, T. Sealy, S.T. Nichol, M. Lamunu, U. Ströher, O. Morgan and F. Sahr.** 2015. Ebola RNA Persistence in Semen of Ebola Virus Disease Survivors — Preliminary Report. *N Engl J Med.* **2015 Oct 14.** [Epub ahead of print]
- 23 **DiCarlo, A., N. Biedenkopf, B. Hartlieb, A. Klussmeier and S. Becker.** 2011. Phosphorylation of Marburg virus NP region II modulates viral RNA synthesis. *J Infect Dis.* **204**:S927-933
- 24 **Dolnik, O., L. Kolesnikova, L. Stevermann, and S. Becker.** 2010. Tsg101 is recruited by a late domain of the nucleocapsid protein to support budding of Marburg virus-like particles. *J Virol.* **84**:7847-7856
- 25 **Dolnik, O., L. Kolesnikova, S. Welsch, T. Strecker, G. Schudt, and S. Becker.** 2014. Interaction with Tsg101 is necessary for the efficient transport and release of nucleocapsids in marburg virus-infected cells. *PLoS Pathog.* **10**:e1004463
- 26 **World Health Organization.** Ebola virus disease. Fact sheet No 103. Updated **August 2015** <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/>

- 27 **Elliott, L. H., M. P. Kiley, and J. B. McCormick.** Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology*. **147**:169-176
- 28 **Enterlein, S., K. M. Schmidt, M. Schümann, D. Conrad, V. Krähling, J. Olejnik, and E. Mühlberger.** 2009. The marburg virus 3' noncoding region structurally and functionally differs from that of ebola virus. *J Virol*. **83**:4508-4519.
- 29 **Enterlein, S., V. Volchkov, M. Weik, L. Kolesnikova, V. Volchkova, H. D. Klenk, and E. Mühlberger.** 2006. Rescue of recombinant Marburg virus from cDNA is dependent on nucleocapsid protein VP30. *J Virol*. **80**:1038-1043.
- 30 **Faix, J., and K. Rottner.** 2006. The making of filopodia. *Curr Opin Cell Biol*. **18**:18-25
- 31 **Feldmann, H., H. D. Klenk, and A. Sanchez.** 1993. Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch Virol Suppl*. **7**:81-100
- 32 **Feldmann, H., E. Mühlberger, A. Randolph, C. Will, M. P. Kiley, A. Sanchez, and H.-D. Klenk.** 1992. Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Res*. **24**:1-19.
- 33 **Feldmann, H., T. W. Geisbert, P. B. Jahrling, H. D. Klenk, S. V. Netesov, C. J. Peters, A. Sanchez, R. Swanepoel, and V. E. Volchkov.** 2005. Family Filoviridae. In Fauquet C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball: *Virus Taxonomy – Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 645–653
- 34 **Formenty, P., C. Boesch, M. Wyers, C. Steiner, F. Donati, F. Dind, F. Walker, and B. Le Guenno.** 1999. Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Côte d'Ivoire. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S120-126
- 35 **Formenty, P., C. Hatz, B. Le Guenno, A. Stoll, P. Rogenmoser, and A. Widmer.** 1999. Human infection due to Ebola virus, subtype Côte d'Ivoire: clinical and biologic presentation. *J Infect Dis* **179 Suppl 1**:S48-53
- 36 **Fowler, T., S. Bamberg, P. Möller, H. D. Klenk, T. F. Meyer, S. Becker, and T. Rudel.** 2005. Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNA interference. *J Gen Virol*. **86**:1181-1188
- 37 **Fritz, E. A., J. B. Geisbert, T. W. Geisbert, L. E. Hensley, and D. S. Reed.** 2008. Cellular immune response to Marburg virus infection in cynomolgus macaques. *Viral Immunol*. **21**:355-363
- 38 **Fuentes, S. M., D. Sun, A. P. Schmitt, and B. He.** 2010. Phosphorylation of paramyxovirus phosphoprotein and its role in viral gene expression. *Future Microbiol*. **5**:9-13
- 39 **Geisbert, T. W., and P. B. Jahrling.** 1995. Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res*. **39**:129-150
- 40 **Geisbert, T. W., and H. Feldmann.** 2011. Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. *J Infect Dis*. **204 Suppl 3**:S1075-1081
- 41 **Geisbert, T. W., and N. K. Jaax.** Marburg hemorrhagic fever: report of a case studied by immunohistochemistry and electron microscopy. 1998. *Ultrastruct Pathol*. **22**:3-17
- 42 **Geisbert, T. W., K. M. Daddario-DiCaprio, J. B. Geisbert, H. A. Young, P. Formenty, E. A. Fritz, T. Larsen, and L. E. Hensley.** 2007. Marburg Virus Angola Infection of Rhesus Macaques: Pathogenesis and Treatment with Recombinant Nematode Anticoagulant Protein c2. *J Infect Dis*. **196 Suppl 2**:S372-381

- 43 **Geisbert, T. W., L. E. Hensley, T. R. Gibb, K. E. Steele, N. K. Jaax, and P. B. Jahrling.** 2000. Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses. *Lab Invest.* **80**:171-186
- 44 **Gramberg, T., H. Hofmann, P. Möller, P. F. Lalor, A. Marzi, M. Geier, M. Krumbiegel, T. Winkler, F. Kirchhoff, D. H. Adams, S. Becker, J. Münch, and S. Pöhlmann.** 2005. LSECtin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology.* **340**:224-236
- 45 **Grubman, M. J., C. Mebus, B. Dale, M. Yamanaka, and T. Yilma.** 1988. Analysis of the polypeptides synthesized in rinderpest virus-infected cells. *Virology.* **163**:261-267
- 46 **Hagiwara, K., H. Sato, Y. Inoue, A. Watanabe, M. Yoneda, F. Ikeda, K. Fujita, H. Fukuda, C. Takamura, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, S. Sugano, S. Ohmi, and C. Kai.** 2008. Phosphorylation of measles virus nucleoprotein upregulates the transcriptional activity of minigenomic RNA. *Proteomics.* **8**:1871-1879
- 47 **Hartlieb, B., and W. Weissenhorn.** 2006. Filovirus assembly and budding. *Virology.* **344**:64-70
- 48 **Hartman, A. L., J. S. Towner, and S. T. Nichol.** 2010. Ebola and marburg hemorrhagic fever. *Clin Lab Med.* **30**:161-177
- 49 **Henao-Restrepo, A. M., I. M. Longini, M. Egger, N. E. Dean, W. J. Edmunds, A. Camacho, M. W. Carroll, M. Doumbia, B. Draguez, S. Duraffour, G. Enwere, R. Grais, S. Gunther, S. Hossmann, M. K. Kondé, S. Kone, E. Kuisma, M. M. Levine, S. Mandal, G. Norheim, X. Riveros, A. Soumah, S. Trelle, A. S. Vicari, C. H. Watson, S. Kéïta, M. P. Kieny, and J. A. Røttingen.** 2015. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. *Lancet.* **386**:857-866
- 50 **Hensley, L. E., D. A. Alves, J. B. Geisbert, E. A. Fritz, C. Reed, T. Larsen, and T. W. Geisbert.** 2011. Pathogenesis of Marburg Hemorrhagic Fever in *Cynomolgus* Macaques. *J Infect Dis.* **204 Suppl 3**:S1021-1031
- 51 **Hoenen, T., and H. Feldmann.** 2014. Ebolavirus in West Africa, and the use of experimental therapies or vaccines. *BMC Biol.* **12**:80
- 52 **Hsu, C. H., and D. W. Kingsbury.** 1982. Topography of phosphate residues in Sendai virus proteins. *Virology.* **120**:225-234
- 53 **Huang, M., H. Sato, K. Hagiwara, A. Watanabe, A. Sugai, F. Ikeda, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, M. Yoneda M, and C. Kai.** 2011. Determination of a phosphorylation site in Nipah virus nucleoprotein and its involvement in virus transcription. *J Gen Virol.* **92(Pt 9)**:2133-2141
- 54 **Huang, Y., L. Xu, Y. Sun, and G. J. Nabel.** 2002. The Assembly of Ebola Virus Nucleocapsid Requires Virion-Associated Proteins 35 and 24 and Posttranslational Modification of Nucleoprotein. *Mol Cell.* **10**:307-316
- 55 **Hunt, C. L., A. A. Kolokoltsov, R. A. Davey, and W. Maury.** 2011. The Tyro3 receptor kinase Axl enhances macropinocytosis of Zaire ebolavirus. *J Virol.* **85**:334-347
- 56 **Hunt, L., and V. Knott.** 2015. Serious and common sequelae after Ebola virus infection. *Lancet Infect Dis.* **16**:270-271
- 57 **Hunter, T.** 2000. Signaling-2000 and beyond. *Cell.* **100**:113-127

- 58 **Huttner, A., J. A. Dayer, S. Yerly, C. Combescure, F. Auderset, J. Desmeules, M. Eickmann, A. Finckh, A. R. Goncalves, J. W. Hooper, G. Kaya, V. Krähling, S. Kwilas, B. Lemaitre, A. Matthey, P. Silvera, S. Becker, P. E. Fast, V. Moorthy, M. P. Kieny, L. Kaiser, C. A. Siegrist, and the VSV-Ebola Consortium.** 2015. The effect of dose on the safety and immunogenicity of the VSV Ebola candidate vaccine: a randomised double-blind, placebo-controlled phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis.* **15**:1156-1166
- 59 **Ignatyev, G. M., A. P. Agafonov, M. A. Streltsova, and E. A. Kashentseva.** 1996. Inactivated Marburg virus elicits a nonprotective immune response in Rhesus monkeys. *J Biotechnol.* **44**:111-118
- 60 **Jahrling, P. B., T. W. Geisbert, D. W. Dalgard, E. D. Johnson, T. G. Ksiazek, W. C. Hall, and C. J. Peters.** 1990. Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet.* **335**:502-505
- 61 **Jayme, S.I., H. E. Field, C. de Jong, K. J. Olival, G. Marsh, A. M. Tagtag, T. Hughes, A. C. Bucad, J. Barr, R. R. Azul, L. M. Retes, A. Foord, M. Yu, M. S. Cruz, I. J. Santos, T. M. Lim, C. C. Benigno, J. H. Epstein, L. F. Wang, P. Daszak, and S. H. Newman.** 2015. Molecular evidence of Ebola Reston virus infection in Philippine bats. *Virol J.* **12**:107
- 62 **Johnson, K. M., J. V. Lange, P. A. Webb, and F. A. Murphy.** 1977. Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet.* **1**:569-571
- 63 **Johnson, L. N.** 2009. The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans.* **37(Pt 4)**:627-641
- 64 **Karber, G.** 1931. 50% end-point calculation. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **162**:480-483
- 65 **Kiley, M.P., J. Wilusz, J.B. McCormick, and J.D. Keene.** 1986. Conservation of the 3' terminal nucleotide sequences of Ebola and Marburg virus. *Virology.* **149**:251-254
- 66 **Kobinger, G. P., A. Leung, J. Neufeld, J. S. Richardson, D. Falzarano, G. Smith, K. Tierney, A. Patel, and H. M. Weingartl.** 2011. Replication, Pathogenicity, Shedding, and Transmission of Zaire ebolavirus in Pigs. *J Infect Dis* **204**:200-208
- 67 **Koellhoffer, J. F., V. N. Malashkevich, J. S. Harrison, R. Toro, R. C. Bhosle, K. Chandran, S. C. Almo, and J. R. Lai.** 2012. Crystal structure of the Marburg virus GP2 core domain in its postfusion conformation. *Biochemistry.* **51**:7665-7675
- 68 **Kolesnikova, L., A. B. Bohil, R. E. Cheney, and S. Becker.** 2007. Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cell Microbiol.* **9**:939-951
- 69 **Kolesnikova, L., and S. Becker.** 2004. Virus maturation. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
- 70 **Kolesnikova, L., B. Berghofer, S. Bamberg, and S. Becker.** 2004. Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope. *J. Virol.* **78**:12277-12287
- 71 **Kolesnikova, L., E. Mittler, G. Schudt, H. Shams-Eldin, and S. Becker.** 2012. Phosphorylation of Marburg virus matrix protein VP40 triggers assembly of nucleocapsids with the viral envelope at the plasma membrane. *Cell Microbiol.* **14**:182-197
- 72 **Kolesnikova, L., E. Mühlberger, E. Ryabchikova, and S. Becker.** 2000. Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *J Virol.* **74**:3899-3904
- 73 **Kolesnikova, L., H. Bugany, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2002. VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment. *J Virol.* **76**:1825-1838

- 74 **Kolesnikova, L., S. Bamberg, S. Berghöfer, and S. Becker.** 2004. The matrix protein of Marburg virus is transported to the plasma membrane along cellular membranes: exploiting the retrograde late endosomal pathway. *J Virol.* **78**:2382-2393
- 75 **Kolesnikova, L., T. Strecker, E. Morita, F. Zielecki, E. Mittler, C. Crump, and S. Becker.** 2009. Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus. *J Virol.* **83**:2327-2337
- 76 **Kondratowicz, A. S., N. J. Lennemann, P. L. Sinn, R. A. Davey, C. L. Hunt, S. Moller-Tank, D. K. Meyerholz, P. Rennert, R. F. Mullins, M. Brindley, L. M. Sandersfeld, K. Quinn, M. Weller, P. B. McCray Jr, J. Chiorini, and W. Maury.** 2011. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**:8426-3831
- 77 **Kortepeter, M. G., D. G. Bausch, and M. Bray.** 2011. Basic clinical and laboratory features of filoviral hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* **204 Suppl 3**:S810-8166
- 78 **Kraft, C. S., A. L. Hewlett, S. Koepsell, A. M. Winkler, C. J. Kratochvil, L. Larson, J. B. Varkey, A. K. Mehta, G. M. Lyon 3rd, R. J. Friedman-Moraco, V. C. Marconi, C. E. Hill, J. N. Sullivan, D. W. Johnson, S. J. Lisco, M. J. Mulligan, T. M. Uyeki, A. K. McElroy, T. Sealy, S. Campbell, C. Spiropoulou, U. Ströher, I. Crozier, R. Sacra, M. J. Connor Jr, V. Sueblinvong, H. A. Franch, P. W. Smith, B. S. Ribner, Nebraska Biocontainment Unit, and the Emory Serious Communicable Diseases Unit.** 2015. The Use of TKM-100802 and Convalescent Plasma in 2 Patients With Ebola Virus Disease in the United States. *Clin Infect Dis.* **61**:496-502
- 79 **Kuhn, J. H., S. Becker, H. Ebihara, T. W. Geisbert, K. M. Johnson, Y. Kawaoka, W. I. Lipkin, A. I. Negredo, S. V. Netesov, S. T. Nichol, G. Palacios, C. J. Peters, A. Tenorio, V. E. Volchkov, and P. B. Jahrling.** 2010. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Arch Virol.* **155**:2083–2103
- 80 **Lamb, R. A., and P. W. Choppin.** 1977. The synthesis of Sendai virus polypeptides in infected cells. III. Phosphorylation of polypeptides. *Virology.* **81**:382-397
- 81 **Lemmon, M. A., and J. Schlessinger.** 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* **141**:1117-1134
- 82 **Leroy, E. M., B. Kumulungui, X. Pourrut, P. Rouquet, A. Hassanin, P. Yaba, A. Délicat, J. T. Paweska, J. P. Gonzalez, and R. Swanepoel.** 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* **438**:575-576
- 83 **Leroy, E. M., A. Epelboin, V. Mondonge, X. Pourrut, J. P. Gonzalez, J. J. Muyembe-Tamfum, and P. Formenty.** 2009. Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* **9**:723-728
- 84 **Liu, Y., S. Stone, and R. N. Harty.** 2011. Characterization of filovirus protein-protein interactions in mammalian cells using bimolecular complementation. *J Infect Dis.* **204 Suppl 3**:S817-824
- 85 **Lötfering, B., E. Mühlberger, T. Tamura, H. D. Klenk, and S. Becker.** 1999. The nucleoprotein of Marburg virus is target for multiple cellular kinases. *Virology.* **255**:50-62

- 86 **MacNeil, A., E. C. Farnon, J. Wamala, S. Okware, D. L. Cannon, Z. Reed, J. S. Towner, J. W. Tappero, J. Lutwama, R. Downing, S. T. Nichol, T. G. Ksiazek, and P. E. Rollin.** 2010. Proportion of deaths and clinical features in Bundibugyo Ebola virus infection, Uganda. *Emerg Infect Dis* **16**:1969-1972
- 87 **World Health Organization.** Marburg haemorrhagic fever. Fact sheet. November 2012 http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs_marburg/en/
- 88 **Martinez, M. J., V. A. Volchkova, H. Raoul, N. Alazard-Dany, O. Reynard, and V. E. Volchkov.** 2011. Role of VP30 phosphorylation in the Ebola virus replication cycle. *J Infect Dis.* **204 Suppl 3**:S934-940
- 89 **Martini, G. A.** 1973. Marburg Virus Disease. *Postgrad Med J.* **49**:542-546
- 90 **Martini, G. A., and H. A. Schmidt.** 1968. Spermatogene Übertragung des „Virus Marburg“ (Erreger der „Marburger Affenkrankheit“). *Klin Wochenschr.* **46**:398-400
- 91 **Marzi, A., T. Gramberg, G. Simmons, P. Möller, A. J. Rennekamp, M. Krumbiegel, M. Geier, J. Eisemann, N. Turza, B. Saunier, A. Steinkasserer, S. Becker, P. Bates, H. Hofmann, and S. Pöhlmann.** 2004. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* **78**:12090-12095
- 92 **Mate, S.E., J.R. Kugelman, T.G. Nyenswah, J.T. Ladner, M.R. Wiley, T. Cordier-Lassalle, A. Christie, G.P. Schroth, S.M. Gross, G.J. Davies-Wayne, S.A. Shinde, R. Murugan, S.B. Sieh, M. Badio, L. Fakoli, F. Taweh, E. de Wit, N. van Doremalen, V.J. Munster, J. Pettitt, K. Prieto, B.W. Humrighouse, U. Ströher, J.W. DiClaro, L.E. Hensley, R.J. Schoepp, D. Safronetz, J. Fair, J.H. Kuhn, D.J. Blackley, A.S. Laney, D.E. Williams, T. Lo, A. Gasasira, S.T. Nichol, P. Formenty, F.N. Kateh, K.M. De Cock, F. Bolay, M. Sanchez-Lockhart, and G. Palacios.** 2015. Molecular Evidence of Sexual Transmission of Ebola Virus. *N Engl J Med.* **373**:2448-2454
- 93 **Mateo, M., C. Carbonnelle, M. J. Martinez, O. Reynard, A. Page, V. A. Volchkova, and V. E. Volchkov.** 2011. Knockdown of Ebola Virus VP24 Impairs Viral Nucleocapsid Assembly and Prevents Virus Replication. *J Infect Dis.* **204(S3)**:S892-S896
- 94 **Matsuno, K., N. Kishida, K. Usami, M. Igarashi, R. Yoshida, E. Nakayama, M. Shimojima, H. Feldmann, T. Irimura, Y. Kawaoka, and A. Takada.** 2010. Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains. *J Virol.* **84**:5140-5147
- 95 **Mattia, J. G., M. J. Vandy, J. C. Chang, D. E. Platt, K. Dierberg, D. G. Bausch, T. Brooks, S. Conteh, I. Crozier, R. A. Fowler, A. P. Kamara, C. Kang, S. Mahadevan, Y. Mansaray, L. Marcell, G. McKay, T. O'Dempsey, V. Parris, R. Pinto, A. Rangel, A. P. Salam, J. Shantha, V. Wolfman, S. Yeh, A. K. Chan, and S. Mishra.** 2015. Early clinical sequelae of Ebola virus disease in Sierra Leone: a cross-sectional study. *Lancet Infect Dis.* **16**:331-338
- 96 **Médecins Sans Frontières.** 2008. Filovirus Haemorrhagic Fever Guideline
- 97 **Mehedi, M., A. Groseth, H. Feldmann, and H. Ebihara.** 2011. Clinical aspects of Marburg hemorrhagic fever. *Future Virol.* **6**:1091-1106
- 98 **Misasi, J., K. Chandran, J. Y. Yang, B. Considine, C. M. Filone, M. Côté, N. Sullivan, G. Fabozzi, L. Hensley, and J. Cunningham.** 2012. Filoviruses require endosomal cysteine proteases for entry but exhibit distinct protease preferences. *J Virol.* **86**:3284-3292
- 99 **Mittler, E., L. Kolesnikova, T. Strecker, W. Garten, and S. Becker.** 2007. Role of the transmembrane domain of marburg virus surface protein GP in assembly of the viral envelope. *J Virol.* **81**:3942-3948

- 100 **Modrof, J., C. Möritz, L. Kolesnikova, T. Konakova, B. Hartlieb, A. Randolph, E. Mühlberger, and S. Becker.** 2001. Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. *Virology*. **287**:171-182
- 101 **Modrof, J., E. Mühlberger, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2002. Phosphorylation of VP30 impairs ebola virus transcription. *J Biol Chem*. **277**:33099-33104
- 102 **Monath, T. P.** 1999. Ecology of Marburg and Ebola viruses: speculations and directions for future research. *J Infect Dis*. **179 Suppl 1**:127-138
- 103 **Moyer, S. A., and D. F. Summers.** 1974. Phosphorylation of vesicular stomatitis virus in vivo and in vitro. *J Virol*. **13**:455-465
- 104 **Mühlberger, E.** 2004. Genome organization, replication and transcription of filoviruses. Horizon Bioscience, Norfolk, U.K.
- 105 **Mühlberger, E., S. Trommer, C. Funke, V. Volchkov, H. D. Klenk, and S. Becker.** 1996. Termini of all mRNA species of Marburg virus: sequence and secondary structure. *Virology*. **223**:376-380
- 106 **Mühlberger, E., B. Lötfering, H. D. Klenk, and S. Becker.** 1998. Three of the Four Nucleocapsid Proteins of Marburg Virus, NP, VP35, and L, Are Sufficient To Mediate Replication and Transcription of Marburg Virus-Specific Monocistronic Minigenomes. *J Virol*. **72**:8756-8764.
- 107 **Mühlberger, E., M. Weik, V. E. Volchkov, H. D. Klenk, and S. Becker.** 1999. Comparison of the Transcription and Replication Strategies of Marburg Virus and Ebola Virus by Using Artificial Replication Systems. *J Virol*. **73**:2333-2342
- 108 **Mulherkar, N., M. Raaben, J. C. de la Torre, S. P. Whelan, and K. Chandran.** 2011. The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytic pathway. *Virology*. **419**:72-83
- 109 **Murphy, F. A., G. Van der Groen, S. G. Whitfield, and J. V. Lange.** 1978. Ebola and Marburg virus morphology and taxonomy. Elsevier/North Holland, Amsterdam, The Netherlands.
- 110 **Nanbo, A., M. Imai, S. Watanabe, T. Noda, K. Takahashi, G. Neumann, P. Halfmann, and Y. Kawaoka.** 2010. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog*. **6**:e1001121
- 111 **Nanyonga, M., J. Saidu, A. Ramsay, N. Shindo, and D. G. Bausch.** 2016. Sequelae of Ebola Virus Disease, Kenema District, Sierra Leone. *Clin Infect Dis*. **62**:125-126
- 112 **Naruse, H., Y. Nagai, T. Yoshida, M. Hamaguchi, T. Matsumoto, S. Isomura, and S. Suzuki.** 1981. The polypeptides of mumps virus and their synthesis in infected chick embryo cells. *Virology*. **112**:119-130
- 113 **Negredo, A., G. Palacios, S. Vázquez-Morón, F. González, H. Dopazo, F. Molero, J. Juste, J. Quetglas, N. Savji, M. de la Cruz Martínez, J. E. Herrera, M. Pizarro, S. K. Hutchison, J. E. Echevarría, W. J. Lipkin, and A. Tenorio.** 2011. Discovery of an ebola-virus-like filovirus in europe. *PLoS Pathog*. **7**:e1002304
- 114 **Neumann, G., S. Watanabe, and Y. Kawaoka.** 2009. Characterization of Ebolavirus Regulatory Genomic Regions. *Virus Res*. **144**:1-7
- 115 **Peterson, A. T., D. S. Carroll, J. N. Mills, and K. M. Johnson.** 2004. Potential mammalian filovirus reservoirs. *Emerg Infect Dis*. **10**:2073-2081

- 116 **Peyrol, J., C. Thizon, J. C. Gaillard, C. Marchetti, J. Armengaud, and F. Rollin-Genetet.** 2013. Multiple phosphorylatable sites in the Zaire Ebola virus nucleoprotein evidenced by high resolution tandem mass spectrometry. *J Virol Methods*. **187**:159-165
- 117 **Pourrut, X., M. Souris, J. S. Towner, P. E. Rollin, S. T. Nichol, J. P. Gonzalez, and E. Leroy.** 2009. Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus*. *BMC Infect Dis* **9**:159
- 118 **Qiu, X., G. Wong, J. Audet, A. Bello, L. Fernando, J. B. Alimonti, H. Fausther-Bovendo, H. Wei, J. Aviles, E. Hiatt, A. Johnson, J. Morton, K. Swope, O. Bohorov, N. Bohorova, C. Goodman, D. Kim, M. H. Pauly, J. Velasco, J. Pettitt, G. G. Olinger, K. Whaley, B. Xu, J. E. Strong, L. Zeitlin, and G. P. Kobinger.** 2014. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*. **514**:47-53
- 119 **Richman, D. D., P. H. Cleveland, J. B. McCormick, and K. M. Johnson.** 1983. Antigenic analysis of strains of Ebola virus: identification of two Ebola virus serotypes. *J Infect Dis* **147**:268-271
- 120 **Robbins, S. J., and R. H. Bussell.** 1979. Structural phosphoproteins associated with purified measles virions and cytoplasmic nucleocapsids. *Intervirology*. **12**:96-102
- 121 **Ryabchikova, E., L. Strelets, L. Kolesnikova, O. Pyankov, and A. Sergeev.** 1996. Respiratory Marburg virus infection in guinea pigs. *Arch Virol*. **141**:2177-2190
- 122 **Saeed, M. F., A. A. Kolokoltsov, T. Albrecht, and R. A. Davey.** 2010. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog*. **6**:e1001110
- 123 **Sänger, C., E. Mühlberger, B. Lötfering, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2002. The Marburg virus surface protein GP is phosphorylated at its ectodomain. *Virology*. **295**:20-29
- 124 **Schmidt, K. M., M. Schumann, J. Olejnik, V. Krähling, and E. Mühlberger.** 2011. Recombinant Marburg virus expressing EGFP allows rapid screening of virus growth and real-time visualization of virus spread. *J Infect Dis*. **204 Suppl 3**:S861-870
- 125 **Schudt, G., L. Kolesnikova, O. Dolnik, B. Sodeik, and S. Becker.** 2013. Live-cell imaging of Marburg virus-infected cells uncovers actin-dependent transport of nucleocapsids over long distances. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**:14402-14407.
- 126 **Shimojima, M., A. Takada, H. Ebihara, G. Neumann, K. Fujioka, T. Irimura, S. Jones, H. Feldmann, and Y. Kawaoka.** 2006. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol*. **80**:10109-10116
- 127 **Smith, G. W., and L. E. Hightower.** 1981. Identification of the P proteins and other disulfide-linked and phosphorylated proteins of Newcastle disease virus. *J Virol*. **37**:256-267
- 128 **Sokol, F., and H. F. Clark.** 1973. Phosphoproteins, structural components of rhabdoviruses. *Virology*. **52**:246-263
- 129 **Spiegelberg, L., V. Wahl-Jensen, L. Kolesnikova, H. Feldmann, S. Becker, and T. Hoenen.** 2011. Genus-specific recruitment of filovirus ribonucleoprotein complexes into budding particles. *J Gen Virol*. **92**:2900-2905
- 130 **Stanley, D. A., A. N. Honko, C. Asiedu, J. C. Trefry, A. W. Lau-Kilby, J. C. Johnson, L. Hensley, V. Ammendola, A. Abbate, F. Grazioli, K. E. Foulds, C. Cheng, L. Wang, M. M. Donaldson, S. Colloca, A. Folgori, M. Roederer, G. J. Nabel, J. Mascola, A. Nicosia,**

- R. Cortese, R. A. Koup, and N. J. Sullivan.** 2014. Chimpanzee adenovirus vaccine generates acute and durable protective immunity against ebolavirus challenge. *Nat Med.* **20**:1126-1129
- 131 **Ströher, U., E. West, H. Bugany, H. D. Klenk, H. J. Schnittler, and H. Feldmann.** 2001. Infection and Activation of Monocytes by Marburg and Ebola Viruses. *J Virol.* **75**:11025-11033
- 132 **Sugai, A., H. Sato, K. Hagiwara, H. Kozuka-Hata, M. Oyama, M. Yoneda, and C. Kai.** 2014. Newly identified minor phosphorylation site threonine-279 of measles virus nucleoprotein is a prerequisite for nucleocapsid formation. *J Virol.* **88**:1140-1149
- 133 **Sugai, A., H. Sato, M. Yoneda, and C. Kai.** 2013. Phosphorylation of measles virus nucleoprotein affects viral growth by changing gene expression and genomic RNA stability. *J Virol.* **87**:11684-11692
- 134 **Swanepoel, R., S. B. Smit, P. E. Rollin, P. Formenty, P. A. Leman, A. Kemp, F. J. Burt, A. A. Grobelaar, J. Croft, D. G. Bausch, H. Zeller, H. Leirs, L. E. Braack, M. L. Libande, S. Zaki, S. T. Nichol, T. G. Ksiazek, J. T. Paweska, and I. S. a. T. C. f. M. H. F. C. i. t. D. R. o. Congo.** 2007. Studies of reservoir hosts for Marburg virus. *Emerg Infect Dis* **13**:1847-1851
- 135 **Swenson, D. L., K. L. Warfield, D. L. Negley, A. Schmaljohn, M. K. Aman, and S. Bavari.** 2005. Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine.* **23**:3033-3042
- 136 **Takada, A., K. Fujioka, M. Tsuiji, A. Morikawa, N. Higashi, H. Ebihara, D. Kobasa, H. Feldmann, T. Irimura, and Y. Kawaoka.** 2004. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol.* **8**:2943-2947
- 137 **Tarrant, M. K., and P. A. Cole.** 2009. The chemical biology of protein phosphorylation. *Annu Rev Biochem.* **78**:797-825
- 138 **Toriumi, H., and A. Kawai.** 2004. Association of rabies virus nominal phosphoprotein (P) with viral nucleocapsid (NC) is enhanced by phosphorylation of the viral nucleoprotein (N). *Microbiol Immunol.* **48**:399-409
- 139 **Towner, J. S., B. R. Amman, T. K. Sealy, S. A. Carroll, J. A. Comer, A. Kemp, R. Swanepoel, C. D. Paddock, S. Balinandi, M. L. Khristova, P. B. Formenty, C. G. Albarino, D. M. Miller, Z. D. Reed, J. T. Kayiwa, J. N. Mills, D. L. Cannon, P. W. Greer, E. Byaruhanga, E. C. Farnon, P. Atimmedi, S. Okware, E. Katongole-Mbidde, R. Downing, J. W. Tappero, S. R. Zaki, T. G. Ksiazek, S. T. Nichol, and P. E. Rollin.** 2009. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog* **5**:e1000536
- 140 **Towner, J. S., T. K. Sealy, M. L. Khristova, C. G. Albariño, S. Conlan, S. A. Reeder, P. L. Quan, W. I. Lipkin, R. Downing, J. W. Tappero, S. Okware, J. Lutwama, B. Bakamutumaho, J. Kayiwa, J. A. Comer, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, and S. T. Nichol.** 2008. Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog* **4**:e1000212

- 141 **Towner, J. S., X. Pourrut, C. G. Albariño, C. N. Nkogue, B. H. Bird, G. Grard, T. G. Ksiazek, J. P. Gonzalez, S. T. Nichol, and E. M. Leroy.** 2007. Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS One* **2**:e764
- 142 **Vainiopää, R., B. Ziola, and A. Salmi.** 1978. Measles virus polypeptides in purified virions and in infected cells. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* **86B**:379-385
- 143 **Valmas, C., M. N. Grosch, M. Schümann, J. Olejnik, O. Martinez, S. M. Best, V. Krähling, C.F. Basler, and E. Mühlberger.** 2010. Marburg Virus Evades Interferon Responses by a Mechanism Distinct from Ebola Virus. *PLoS Pathog.* **6**:e1000721
- 144 **Varkey, J. B., J. G. Shantha, I. Crozier, C. S. Kraft, G. M. Lyon, A. K. Mehta, G. Kumar, J. R. Smith, M. H. Kainulainen, S. Whitmer, U. Ströher, T. M. Uyeki, B. S. Ribner, and S. Yeh.** 2015. Persistence of Ebola Virus in Ocular Fluid during Convalescence. *N Engl J Med.* **372**:2423-2427
- 145 **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, A. A. Chepurinov, V. M. Blinov, O. Dolnik, S. V. Netesov, and H. Feldmann.** 1999. Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *J Gen Virol.* **80**:355-362
- 146 **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, U. Ströher, S. Becker, O. Dolnik, M. Cieplik, W. Garten, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 2000. Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology.* **68**:1-6
- 147 **Wang, D., A. L. Schmaljohn, N. U. Raja, C. M. Trubey, L. Y. Juompan, M. Luo, S. B. Deitz, H. Yu, J. Woraratanadharm, D. H. Holman, K. M. Moore, B. M. Swain, W. D. Pratt, and J. Y. Dong.** 2006. De novo syntheses of Marburg virus antigens from adenovirus vectors induce potent humoral and cellular immune responses. *Vaccine.* **24**:2975-2986
- 148 **Warfield, K. L., and M. J. Aman.** 2011. Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses. *J Infect Dis.* **204 Suppl 3**:S1053-1059
- 149 **Warfield, K. L., D. L. Swenson, D. L. Negley, A. L. Schmaljohn, M. J. Aman, and S. Bavari.** 2004. Marburg virus-like particles protect guinea pigs from lethal Marburg virus infection. *Vaccine.* **22**:3495-3502
- 150 **Warren, T. K., J. Wells, R. G. Panchal, K. S. Stuthman, N. L. Garza, S. A. Van Tongeren, L. Dong, C. J. Retterer, B. P. Eaton, G. Pegoraro, S. Honnold, S. Bantia, P. Kotian, X. Chen, B. R. Taubenheim, L. S. Welch, D. M. Minning, Y. S. Babu, W. P. Sheridan, and S. Bavari.** 2014. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature.* **508**:402-405
- 151 **Watanabe, S., T. Noda, P. Halfmann, L. Jasenosky, and Y. Kawaoka.** 2007. Ebola virus (EBOV) VP24 inhibits transcription and replication of the EBOV genome. *J Infect Dis.* **196 Suppl 2**:S284-290
- 152 **Watanabe, S., T. Watanabe, T. Noda, A. Takada, H. Feldmann, L. D. Jasenosky, and Y. Kawaoka.** 2004. Production of novel Ebola virus-like particles from cDNAs: an alternative to Ebola virus generation by reverse genetics. *J. Virol.* **78**:999-1005
- 153 **Watt, A., F. Moukambi, L. Banadyga, A. Groseth, J. Callison, A. Herwig, H. Ebihara, H. Feldmann, and T. Hoenen.** 2014. A novel life cycle modeling system for Ebola virus shows a genome length-dependent role of VP24 in virus infectivity. *J Virol.* **88**:10511-10524
- 154 **Welsch, S., L. Kolesnikova, V. Krähling, J. D. Riches, S. Becker, and J. A. Briggs.** 2010. Electron tomography reveals the steps in filovirus budding. *PLoS Pathog* **6**:e1000875.

- 155 **Wenigenrath, J., L. Kolesnikova, T. Hoenen, E. Mittler, and S. Becker.** 2010. Establishment and application of an infectious virus-like particle system for Marburg Virus. *J Gen Virol.* **91**:1325-1334
- 156 **Whelan, S. P., J. N. Barr, and G. W. Wertz.** 2004. Transcription and replication of non-segmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* **283**:61-119
- 157 **Will, C., E. Mühlberger, D. Linder, W. Slenczka, H. D. Klenk, and H. Feldmann.** 1993. Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein. *J Virol.* **67**:1203-1210
- 158 **World Health Organization.** Ebolasitrep. 03 February 2016
- 159 **World Health Organization.** Marburg Virus Disease Fact Sheet. 31 March 2005
- 160 **Wu, X., X. Gong, H. D. Foley, M. J. Schnell, and Z. F. Fu.** 2002. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. *J Virol.* **76**:4153-4161
- 161 **Yang, J., H. Koprowski, B. Dietzschold, and Z. F. Fu.** 1999. Phosphorylation of rabies virus nucleoprotein regulates viral RNA transcription and replication by modulating leader RNA encapsidation. *J Virol.* **73**:1661-1664
- 162 **Yu, K. T., and M. P. Czech.** 1984. Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor beta subunit activates the receptor-associated tyrosine kinase activity. *J Biol Chem.* **259**:5277-5286
- 163 **Zaki, S.R., and C. S. Goldsmith.** 1999. Pathologic features of filovirus infections in humans. *Curr Top Microbiol Immunol.* **235**:97-116
- 164 **Zengel, J., A. Pickar, P. Xu, A. Lin, and B. He.** 2015. Roles of Phosphorylation of the Nucleocapsid Protein of Mumps Virus in Regulating Viral RNA Transcription and Replication. *J Virol.* **89**:7338-7347

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Taxonomische Einordnung von Marburgvirus.....	1
Abbildung 2:	MARV-Ausbrüche seit der Entdeckung des Virus.	2
Abbildung 3:	Morphologie und Genomorganisation.....	7
Abbildung 4:	Viraler Replikationszyklus.....	9
Abbildung 5:	Infektiöser <i>VLP Assay</i>	12
Abbildung 6:	Rescue von rekombinantem Marburgvirus.	13
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der NP-Phosphorylierungsregionen.	16
Abbildung 8:	Untersuchung des Laufverhaltens der NP-Phosphorylierungsmutanten im SDS-Gel.	53
Abbildung 9:	Untersuchung der Replikations-/Transkriptionsaktivität der NP-Phosphorylierungsmutanten.	55
Abbildung 10:	Intrazelluläre Verteilung der NP-Phosphorylierungsmutanten.	57
Abbildung 11:	Interaktion von NP und VP35.....	58
Abbildung 12:	Interaktion von NP und VP30.....	59
Abbildung 13:	Interaktion von NP und VP40.....	60
Abbildung 14:	Flotationsanalyse der NP-Phosphorylierungsmutanten.....	61
Abbildung 15:	Untersuchung der NP-Phosphorylierungsmutanten im infektiösen VLP-Assay.....	64
Abbildung 16:	Rescue von rekombinantem MARV.	66
Abbildung 17:	Wachstumskinetik der rMARV-Phosphorylierungsmutanten, Western Blots der Zelllysate und Zellkulturüberstände.....	68
Abbildung 18:	Wachstumskinetik der rMARV-Phosphorylierungsmutanten, Wachstumskurven.....	69
Abbildung 19:	Verteilung von NP in rMARV-infizierten Zellen.....	70
Abbildung 20:	Viruspartikel an der Oberfläche rMARV-infizierter Zellen.....	71
Abbildung 21:	Untersuchung der Infektiosität der Virusmutanten.....	73
Abbildung 22:	Wachstumskinetik der S619-Phosphorylierungsmutanten.....	74
Abbildung 23:	Analyse der Viruspartikelfreisetzung der S619-Phosphorylierungsmutanten...	76

Abbildung 24: Kompetitionsassay der S619-Phosphorylierungsmutanten.	78
Abbildung 25: Flotationsassay der S619-Phosphorylierungsmutanten mit VP40 +/- VP24.....	80
Abbildung 26: Untersuchung der Replikations-/Transkriptionsaktivität der S619-Phosphorylierungsmutanten im Minigenomassay in Anwesenheit von VP24.....	81
Abbildung 27: Untersuchung der S619-Phosphorylierungsmutanten im infektiösen VLP-Assay in An- bzw. Abwesenheit von VP24.....	82
Abbildung 28: Arbeitsmodell zur Funktion der dynamischen Phosphorylierung von S602.....	90
Abbildung 29: Arbeitsmodell zur Funktion der dynamischen Phosphorylierung von S619.....	98
Tabelle 1: Rescue von rekombinantem MARV.	67

10. Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen. Die Abkürzungen der chemischen Substanzen wurden im Materialteil (s. Kapitel 2) aufgeführt.

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BDBV	Bundibugyo Virus
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSL-4	<i>biosafety level 4</i> , Biologische Schutzstufe 4
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> , Atlanta (USA)
cDNA	<i>complimentary DNA</i> , komplementäre DNA
CMC	Carboxymethylcellulose
CPE	<i>cytopathic effect</i> , zytopathischer Effekt
C-Terminus	Carboxyterminus
d	<i>day</i> , Tag
d (bei dH ₂ O)	deionisiert
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EBOV	Ebolavirus
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
for	<i>forward</i> , vorwärts
GP	Glykoprotein
h	Stunden
HEK293	humane embryonale Nierenzellen
HUH7	humane Hepatomazellen
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
IL	Interleukin
iVLP	<i>infectious virus like particle</i> , infektiöser virusähnlicher Partikel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	<i>Large Protein</i> , Polymerase L
LB(-Medium)	<i>lysogeny broth</i>
LLOV	Lloviuvirus
MARV	Marburgvirus
min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MVB	<i>multi-vesicular bodies</i> , multivesikuläre Strukturen
NP	Nukleoprotein
N-Terminus	Aminoterminus

OD	Optische Dichte
p.i.	<i>post infectionem</i> , nach der Infektion
p.t.	<i>post transfectionem</i> , nach der Transfektion
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEVDS	<i>post-Ebolavirus Disease Syndrome</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PP	Probenpuffer
RAVV	Ravn Virus
rMARV	rekombinantes Marburgvirus
RESTV	Reston Virus
rev	<i>reverse</i> , rückwärts
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s.	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SOB(-Medium)	<i>super optimal broth</i>
SUDV	Sudan Virus
TAFV	Tai Forest Virus
TNF	Tumornekrosefaktor
TSG101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
U	<i>units</i> , Einheiten
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VeroE6	Nierenzellen, Grüne Meerkatze
VLP	<i>virus like particle</i> , virusähnlicher Partikel
VP	Virusprotein
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
w/v	Masse pro Volumen
WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
α	anti
λ	<i>Lambda</i> , Wellenlänge

11. Veröffentlichungen

Publikationen

08/2015

Temporal and spatial analysis of the 2014-2015 Ebola virus outbreak in West Africa.

Miles W. Carroll, David A. Matthews, Julian A. Hiscox, Michael J. Elmore, Georgios Pollakis, Andrew Rambaut, Roger Hewson, Isabel García-Dorival, Joseph Akoi Bore, Raymond Koundouno, Saïd Abdellati, Babak Afrough, John Aiyepada, Patience Akhilomen, Danny Asogun, Barry Atkinson, Marlis Badusche, Amadou Bah, Simon Bate, Jan Baumann, Dirk Becker, Beate Becker-Ziaja, Anne Bocquin, Benny Borremans, Andrew Bosworth, Jan Peter Boettcher, Angela Cannas, Fabrizio Carletti, Concetta Castilletti, Simon Clark, Francesca Colavita, Sandra Diederich, Adomah Donatus, Sophie Duraffour, Deborah Ehichioya, Heinz Ellerbrok, Maria Dolores Fernandez-Garcia, Alexandra Fizet, Erna Fleischmann, Sophie Gryseels, Antje Hermelink, Julia Hinzmänn, Ute Hopf-Guevara, Yemisi Ighodalo, Lisa Jameson, Anne Kelterbaum, Zoltan Kis, Stefan Kloth, Claudia Kohl, Miša Korva, Annette Kraus, Eeva Kuisma, Andreas Kurth, Britta Liedigk, Christopher H. Logue, Anja Lüdtke, Piet Maes, James McCowen, Stéphane Mély, Marc Mertens, Silvia Meschi, Benjamin Meyer, Janine Michel, Peter Molkenthin, César Muñoz-Fontela, Doreen Muth, Edmund N. C. Newman, Didier Ngabo, Lisa Oestereich, Jennifer Okosun, Thomas Olokor, Racheal Omiunu, Emmanuel Omomoh, Elisa Pallasch, Bernadett Pályi, Jasmine Portmann, Thomas Pottage, Catherine Pratt, Simone Priesnitz, Serena Quartu, Julie Rappe, Johanna Repits, Martin Richter, Martin Rudolf, Andreas Sachse, Kristina Maria Schmidt, Gordian Schudt, Thomas Strecker, Ruth Thom, Stephen Thomas, Ekaete Tobin, Howard Tolley, Jochen Trautner, Tine Vermoesen, Inês Vitoriano, Matthias Wagner, Svenja Wolff, Constanze Yue, Maria Rosaria Capobianchi, Birte Kretschmer, Yper Hall, John G. Kenny, Natasha Y. Rickett, Gytis Dudas, Cordelia E. M. Coltart, Romy Kerber, Damien Steer, Callum Wright, Francis Senyah, Sakoba Keita, Patrick Drury, Boubacar Diallo, Hilde de Clerck, Michel Van Herp, Armand Sprecher, Alexis Traore, Mandiou Diakite, Mandy Kader Konde, Lamine Koivogui, N'Faly Magassouba, Tatjana Avšič-Županc, Andreas Nitsche, Marc Strasser, Giuseppe Ippolito, Stephan Becker, Kilian Stoecker, Martin Gabriel, Hervé Raoul, Antonino Di Caro, Roman Wölfel, Pierre Formenty, Stephan Günther

Nature, 06 August 2015, Vol. 524, Number 7563, p. 97-101

Kongressbeiträge

- 06/2015 **Phosphorylation of Marburg virus NP influences replication and assembly**
Anne Kelterbaum and Stephan Becker
Posterpräsentation, Negative Strand Virus Meeting,
Siena, Italien
- 06/2013 **Phosphorylation of Marburg virus NP and its influence on replication and assembly**
Anne Brüggemann, Olga Dolnik and Stephan Becker
Posterpräsentation, Negative Strand Virus Meeting,
Granada, Spanien
- 03/2011 **Phosphorylation status of Marburg virus NP inversely affects RNA synthesis and assembly**
Anne Brüggemann, Olga Dolnik and Stephan Becker
Posterpräsentation, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie,
Essen

12. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren ProfessorInnen bzw. PrivatdozentInnen:

Anagnostou, Bakowsky, Bremmer, Culmsee, Diederich, Feuser, Friedrich, Grünweller, Hanefeld, Hartmann, Hohmann, Keusgen, Kissel, Klebe, Kleemann, Kuschinsky, Link, Matern, Matern, Morck, Petersen, Plant, Reuter, Schlitzer, Sottriffer, Steinmetzer

13. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die direkte und indirekte Unterstützung einiger Leute möglicherweise niemals fertig geworden, deshalb möchte ich mich herzlich bedanken bei...

...Prof. Dr. Stephan Becker: Danke, dass Du Dich auf das etwas ungewöhnliche Modell der „Teilzeit-Promotion“ eingelassen hast, dass Du stets ein offenes Ohr für Fragen hattest, zu Diskussionen bereit warst, mich ermutigt hast, auch wenn ich meine Ergebnisse blöd fand, Geduld mit mir hattest, auch wenn alles nicht so schnell ging und mich all die Jahre unterstützt hast

...der gesamten AG Becker: Danke an Euch alle für eine helfende Hand, einen guten Ratschlag, ein nettes Wort, den einen oder anderen Kaffee, superleckeren Kuchen und wenn das alles nicht geholfen hat auch einen Schnaaaaaaps zur rechten Zeit. Danke natürlich auch für die regelmäßigen Ohrwürmer (...jede Zelle...36 Grad...Hello again...) und dass ich Euch mit Schlagern und Karnevalsmusik quälen durfte. Ihr alle habt dafür gesorgt, dass ich gerne ins Labor gekommen bin, auch wenn das Job-Hopping manchmal etwas anstrengend war.

...dem gesamten Institut für Virologie: Danke für die tolle Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Ein großes Dankeschön vor allem an Markus, Michael und Gotthardt, dass das Arbeiten im roten Klotz immer so unkompliziert war und zu besonderen Feiertagen sogar Heintje mit dabei war.

...meinen Kollegen bei Novartis/GSK: Danke für Euer Interesse an meiner „anderen“ Arbeit und dass ihr die eine oder andere Aufgabe von mir übernommen habt, wenn ich mal wieder einige Wochen Laborurlaub hatte. Ein besonders großer Dank geht an Susanne Wege: dafür, dass Du mir den Urlaub fürs Labor auch genehmigt hast und mich in jedweder Hinsicht in meiner Entwicklung unterstützt hast.

...meinen Freundinnen Angela, Ayşe, Dini, Eva, Evi, Lisa, Steffi, Vera: Danke, dass ihr mich immer wieder daran erinnert, was wirklich wichtig ist und dass missglückte Versuche einem nicht die Laune verderben sollten. Für Karneval, Wellness, Schwimmen, Plätzchenbacken, Spontangrillen und was wir sonst noch so gemeinsam machen.

...meiner Familie: Danke, dass ihr mich immer unterstützt und in jeder Lebenslage zur Stelle seid. Ohne Euch wäre ich nicht was, wo und wie ich bin.

...Daniel: Danke für die richtigen Worte zur richtigen Zeit, für die aufregende Zeit, die wir schon gemeinsam hatten und die wahrscheinlich noch viel aufregendere Zeit, die noch vor uns liegt.

Danke!