

# **Die Bedeutung des ESCRT-Systems für die Partikelfreisetzung von Masernviren**

Dissertation  
zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Andreas Salditt**

aus  
Mönchengladbach

Würzburg, Februar 2010

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: .....

Gutachter: .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Für Mama und Papa

Erklärungen gem. § 4 Abs. 3 S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig angefertigt und keine anderen als die genannten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe bisher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Andreas Salditt

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies  
Institut für Virologie und Immunbiologie  
Universität Würzburg  
Versbacherstr. 7  
97078 Würzburg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Krohne  
Theodor-Boveri-Institut für  
Biowissenschaften  
Lehrstuhl für Entwicklungs- und  
Zellbiologie  
Universität Würzburg  
Am Hubland  
97074 Würzburg

Zeitraum der Arbeit: Februar 2006 bis Februar 2010

## INHALT

<b>1</b>	<b>EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Masernvirus</b>	<b>8</b>
1.1.1	Taxonomie	8
1.1.2	Epidemiologie und Pathogenese	9
1.1.3	Masernvirus-induzierte Immunsuppression	11
1.1.4	Genomaufbau	11
1.1.5	Replikation und Transkription	12
1.1.6	MV-Matrix-Protein	16
1.1.7	Bedeutung der Matrix-Proteine	17
1.1.8	L-Domänen	18
1.1.9	Das ESCRT-System	20
<b>1.2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>24</b>
<b>2.2</b>	<b>Bakterien</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Virus</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Plasmide</b>	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>Antikörper</b>	<b>27</b>
2.5.1	Antikörper für die Immunfluoreszenz	27
2.5.2	Primärantikörper	27
2.5.3	Sekundärantikörper	28
2.5.4	FACS Antikörper	28
2.5.5	Western-Blot Antikörper	28
<b>2.6</b>	<b>Primer für die Sequenzierung</b>	<b>29</b>
<b>2.7</b>	<b>Primer für die Mutagenese</b>	<b>29</b>
<b>2.8</b>	<b>Medien und Zusätze</b>	<b>30</b>
2.8.1	Zellkultur	30
2.8.2	Bakterien	30
<b>2.9</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>31</b>
<b>2.10</b>	<b>Kits</b>	<b>32</b>
<b>2.11</b>	<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>33</b>
<b>2.12</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>33</b>
<b>2.13</b>	<b>Geräte</b>	<b>34</b>
<b>2.14</b>	<b>Software</b>	<b>34</b>

<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>35</b>
3.1.1	Zellkultur adhärenter und semiadhärenter Zelllinien	35
3.1.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	36
3.1.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	36
3.1.4	Mykoplasmentest	36
<b>3.2</b>	<b>Virologische Methoden</b>	<b>37</b>
3.2.1	Präparation von Virusstocks	37
3.2.2	Titerbestimmung mittels Endpunkttitration nach Spearman und Kärber	38
3.2.3	Titration der Überstände	39
3.2.4	Infektion adhärenter und semiadhärenter Zelllinien	39
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>40</b>
3.3.1	Transformation von Bakterien	40
3.3.2	Präparation und Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA	40
3.3.3	Agarosegelelektrophorese	41
3.3.4	Site-directed Mutagenesis	41
3.3.5	Sequenzierung	43
3.3.6	Transiente Proteinexpression in 293 T-Zellen	44
3.3.7	Transiente Proteinexpression in HeLa-Zellen mit Lipofectamine®-Transfektionsreagenz	45
<b>3.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>45</b>
3.4.1	Herstellung und Konzentrationsbestimmung von Zelllysaten	45
3.4.2	Azeton-Präzipitation von Proteinen	46
3.4.3	Fraktionierung Detergenz-resistenter Membranfraktionen	46
3.4.4	Cholesterin-Depletion in infizierten Zellen	47
3.4.5	Virus- bzw. <i>Virus-like particle</i> -Freisetzung	47
3.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
3.4.7	Western-Blot-Analyse und Quantifizierung	49
<b>3.5</b>	<b>Durchflusszytometrie</b>	<b>50</b>
3.5.1	FACS Oberflächenfärbung	50
3.5.2	Intrazelluläre FACS-Färbung	50
3.5.3	Immunfluoreszenzmikroskopie	51
3.5.4	Labeling Kit	52
3.5.5	Kolokalisationskoeffizient-Bestimmung	52
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>Bestimmung potentieller L-Domänen in der MV-M-Sequenz</b>	<b>54</b>
4.1.1	Überprüfung der Kolokalisation der ESCRT-Proteine mit dem MV-M-Protein	55
4.1.2	Einfluss dominant negativer ESCRT-Proteine auf die MV-Freisetzung	58
4.1.3	Einfluss der Vps4 ATPase auf die Virusfreisetzung	61
4.1.4	Mutation der potentiellen L-Domänen in der MV-M-Sequenz	65
4.1.5	Intrazelluläre Verteilung der M-Protein-Mutanten	67
4.1.6	Lipid Raft Assoziation der M-Protein-Mutanten	68
4.1.7	Analyse der VLP-Freisetzung der M-Protein-Mutanten	69
<b>4.2</b>	<b>Überprüfung der MV-Partikelfreisetzung in Zellen ohne Lipid Rafts</b>	<b>71</b>
<b>4.3</b>	<b>Vergleichende Analyse der intrazellulären Verteilung des MV-M-Proteins mit dem ESCRT interagierenden VP40-Matrix-Protein des EBOV</b>	<b>72</b>
4.3.1	Analyse der Membran-Mikrodomänen-Assoziation des M- und VP40-Proteins	74

---

4.3.2	Kolokalisationsanalysen des M- und VP40-Proteins mit verschiedenen Kompartimentmarkern	76
<b>4.4</b>	<b>Transfer einer L-Domäne in das MV-M-Protein</b>	<b>80</b>
4.4.1	Verteilung und Lipid Raft Assoziation der M <sup>Δ</sup> PTAPPEY-Protein-Mutante	80
4.4.2	Ändert der Transfer der L-Domäne in das M-Protein die Assoziation mit Kompartimenten und den Tetraspaninen?	82
4.4.3	Vergleichende Untersuchung der M- bzw. M <sup>Δ</sup> PTAPPEY-Protein abhängigen VLP-Produktion	83
4.4.4	Assoziation mit Tsg101 und Untersuchung der Abhängigkeit der VLP-Freisetzung vom ESCRT-System	84
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>127</b>
10.1	Publikationen	127
10.2	Vorträge und Posterpräsentationen	127
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>129</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>130</b>

# 1 Einführung und Problemstellung

## 1.1 Das Masernvirus

### 1.1.1 Taxonomie

Das Masernvirus (MV) gehört zu der Familie der Paramyxoviridae, einer Familie human- und tierpathogener Minusstrang-RNA-Viren, die in zwei Unterfamilien, die Pneumovirinae und Paramyxovirinae, eingeteilt ist (Tab.1.1, Abb. 1.1). In der Unterfamilie Paramyxovirinae sind die Morbilliviren im Menschen durch das MV, im Tier durch das Hundestaube-, das Rinderpestvirus, das Peste-des-Petitis-Ruminants-Virus sowie durch Staupeviren von Wassersäugetieren (z.B. Delphin und Seehund) vertreten (Griffin, 2001, Visser et al., 1993).

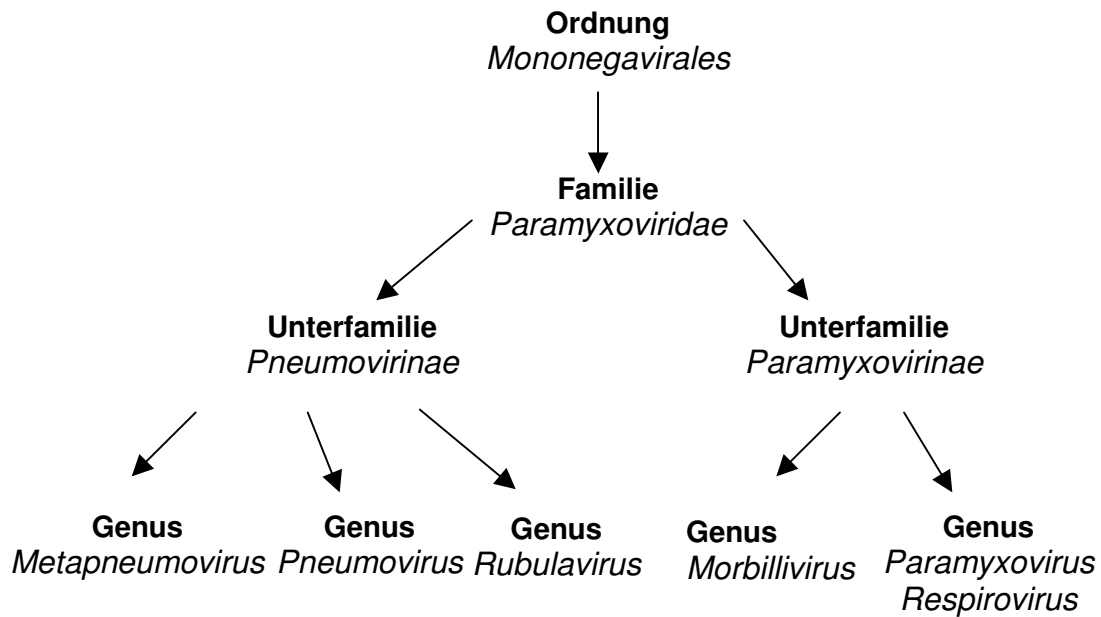
Unterfamilie	Genus	Mensch	Tier
Paramyxovirinae	Paramyxovirus	Parainfluenzavirus	Sendai Virus
Pneumovirinae	Rubulavirus	Typ1+3	Newcastle-Disease-Virus
	Morbillivirus	Mumpsvirus	Vogelparamyxoviren
	Pneumovirus	Parainfluenza Typ 2+4	Typen 2-9
		Masernvirus	Hundestaubevirus
	Respiratorisches Syncyticalvirus (RSV)	Rinderpestvirus	Respiratorisches Syncyticalvirus des Rindes

**Tab. 1.1.: Charakteristische Vertreter der Paramyxoviren**

Quelle: Modrow & Falke, Molekulare Virologie, 1998 (verändert)

Aufgrund ihres unsegmentierten, einzelsträngigen RNA-Genoms mit Minusstrang-Polarität werden die Morbilliviren, die zur Gattung der Paramyxoviren gehören, der Ordnung der Mononegavirales zugeordnet. Ein Charakteristikum der Morbilliviren ist die fehlende Neuraminidase-Aktivität.





**Abb.1.1: Übersicht über die Taxonomie der Ordnung Mononegavirales**

Die Familie der Paramyxoviridae wird in die zwei Unterfamilien der Pneumovirinae und der Paramyxovirinae unterteilt.

Evolutionsgeschichtlich ist das MV nicht sehr alt. Es entstand vermutlich vor 4.000 bis 5.000 Jahren und könnte sich aus dem eng verwandten Rinderpestvirus in einem Umfeld, in dem Menschen und Rinder in räumlicher Nähe zueinander lebten, entwickelt haben (McNeill, 1976). Das einzige natürliche Reservoir ist der Mensch, obwohl auch einige Primatenarten infiziert werden können. Die akute Infektion löst eine Immunantwort aus, die zu einer lebenslangen Immunität führt. Begleitet wird die Erkrankung von einer temporären generellen Immunsuppression (von Pirquet, 1908). Das Virus ist weltweit verbreitet und weist eine hohe antigene Stabilität auf. Das MV wird anhand der Sequenz des C-Terminus des Nukleokapsidproteins (N) in verschiedene Genotypen unterteilt. Einige Genotypen gelten als ausgestorben, die restlichen zirkulieren weltweit.

### 1.1.2 Epidemiologie und Pathogenese

Das MV ist der Erreger der akuten Masernerkrankung, einer hochinfektiösen Krankheit des Menschen. Jedes Jahr erkranken weltweit 40-50 Millionen Menschen an Masern, wobei etwa 200.000 Menschen (WHO 2008) an ihren Folgen sterben (Murray and Lopez, 1997). Ursache der hohen Sterblichkeit ist oft eine bakterielle Überinfektion, die aufgrund der MV-induzierten

Immunsuppression auftritt. Dabei tragen mangelnde Hygiene, einseitige Ernährung und schlechte medizinische Versorgung vor allem bei Kleinkindern in Entwicklungsländern zu schweren Verlaufsformen bei. Übertragen wird das MV durch Tröpfcheninfektion, der Mensch ist das einzige natürliche Reservoir des Virus. Die Inkubationszeit beträgt neun bis elf Tage, wobei Schnupfen, Fieber, Husten oder Bindehautentzündung die ersten Symptome sind. Ein typisches Frühsymptom sind die Koplik'schen Flecken an der Wangenschleimhaut der Mundhöhle. Drei bis vier Tage nach Einsetzen der Krankheit tritt das maserntypische Exanthem auf, das sich, hinter den Ohren beginnend, innerhalb von zwei Tagen am ganzen Körper ausbreitet. Das Exanthem ist ein Zeichen für das Einsetzen der spezifischen Immunantwort (Sergiev et al., 1963).

Nach initialer Infektion CD150 positiver dendritischer Zellen und anschließender Replikation (de Swart et al., 2007; Riley et al., 1978) breitet sich das Virus in lokalen Lymphorganen aus. Dort kommt es zu einer verstärkten Replikation und Virusvermehrung. Durch die folgende Virämie kann sich das MV systemisch ausbreiten. Bei einer MV-Infektion kann es neben Pneumonien zu schweren ZNS-Komplikationen (Zentrales Nervensystem), den Enzephalitiden, kommen, von denen drei Formen bekannt sind. Diese sind die akute postinfektiöse Enzephalitis (PIE), die Einschlusskörperchen-Enzephalitis (measles inclusion body encephalitis, MIBE) und die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE).

Die PIE entwickelt sich gleichzeitig oder kurz nach Auftreten des Exanthems, wobei das MV nicht im Gehirn nachweisbar ist. Bei der MIBE und der SSPE findet in Zellen des Gehirns eine Virusreplikation statt. Beide sind persistierende Infektionen und verlaufen tödlich (Connolly et al., 1967, Connolly et al., 1971). Während die MIBE nur bei Patienten mit T-Zell-Defekten innerhalb weniger Monate auftritt, tritt die SSPE in einem von 10.000 Fällen etliche Jahre nach der akuten Infektion auf (Takasu et al., 2003). Sequenzanalysen zeigen, dass das virale Genom in SSPE und MIBE eine relativ hohe Frequenz von Mutationen in den Hüllproteinen aufweist (Ayata et al., 1989, Baczko et al., 1993, Cattaneo et al., 1988, Furukawa et al., 2001, Rima and Duprex, 2005). Die Leseraster für die replikations-essentiellen Gene bleiben dagegen relativ konserviert. Interessanterweise sind in nahezu allen Fällen die zytoplasmatische Domäne des Fusionsproteins und in unterschiedlichem Ausmaß das Leseraster des Matrix (M)-Protein-Gens von diesen Mutationen betroffen.

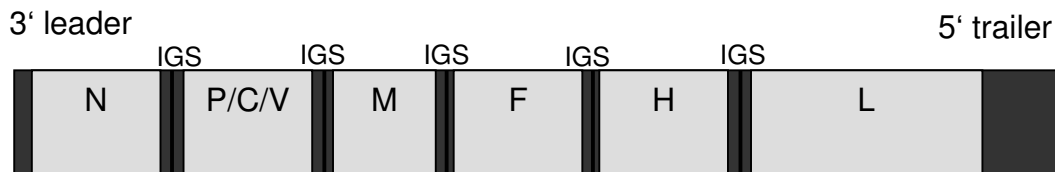
### 1.1.3 Masernvirus-induzierte Immunsuppression

Der Induktion virusspezifischer Immunität steht eine profunde, unspezifische Immunsuppression gegenüber. Bereits 1908 berichtete von Pirquet vom Ausbleiben der Tuberkulinreaktion nach einer Maserninfektion, was auf eine Störung der zellulären Immunantwort hindeutet. In den Entwicklungsländern ist die Immunsuppression der Hauptgrund für die hohe Todesrate nach einer MV-Infektion. Ein auffälliges Merkmal ist die Leukopenie (Permar et al., 2003). Die Immunsuppression besteht noch nach Wochen, wenn die Anzahl der Lymphozyten den normalen Wert wieder erreicht hat und MV-infizierte Zellen kaum noch im Organismus zu finden sind (Okada et al., 2001). Schon früh konnte in vitro die Beeinträchtigung der zellulären Immunantwort beobachtet werden. So proliferierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in Reaktion auf Mitogene oder Allogene nicht mehr (Greenstein and McFarland, 1983, Arneborn and Biberfeld, 1983). Wie sich später herausstellte ist hierfür nicht die Infektion der T-Zellen selbst notwendig, sondern bereits der Kontakt von PBLs (peripheral blood lymphocytes) mit MV (Yanagi et al., 1992). Die kontaktbedingte Inhibition der Proliferation wird dabei durch die beiden viralen Glykoproteine vermittelt, da bereits wenige infizierte Zellen im Versuchsansatz, die diese Glykoproteine exprimieren, in der Lage sind, die Proliferation der übrigen unabhängig von der Virusreplikation zu unterdrücken (Schlender et al., 1996). In T-Zellen konnte dieser Arrest im Zellzyklus auf die Inhibition der Proteinkinase B/Akt (Avota et al., 2001) zurückgeführt werden.

### 1.1.4 Genomaufbau

Das nicht-segmentierte RNA-Genom negativer Polarität umfasst 15.894 Nukleotide und besitzt folgende Genanordnung: 3'-N-P(C/V)-M-F-H-L-5' (Abb. 1.2). Am 3'Ende befindet sich eine sogenannte "Leader"-Sequenz (52 Nukleotide), die als Promotor für die Transkription und Replikation dient. Zudem enthält diese "Leader"-Region Erkennungssequenzen für die Verpackung mit dem N-Protein. Zwischen den einzelnen Genen sowie nach der "Leader" und vor der "Trailer"-Sequenz befinden sich kurze intergenische nicht kodierende Sequenzen (IGS) (Crowley et al., 1988). Mit Ausnahme des P-Gens kodieren alle Gene für ein Protein (Horikami and Moyer, 1995). Beim

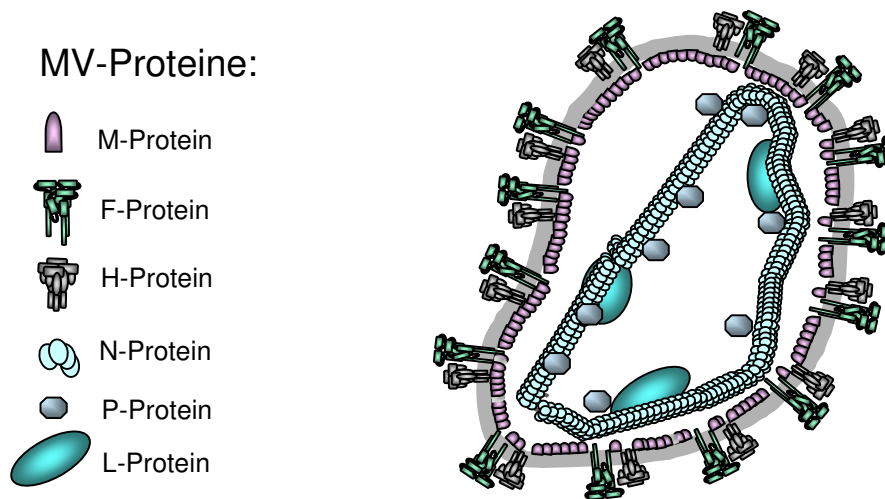
P-Gen kann es durch die Verwendung eines anderen Leserasters innerhalb der P-mRNA zur Entstehung des C-Proteins kommen (Bellini et al., 1985). Das V-Protein entsteht durch RNA-Editing. Hierbei führt die Polymerase ko-transkriptionell an einer definierten Position ein genomisch nicht kodiertes Nukleotid ein. Infolge dieser Leserasterverschiebung entsteht das V-Protein, das N-terminal dem P-Protein analog ist und einen cysteinreichen C-Terminus besitzt (Cattaneo et al., 1989).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung des Genoms der Morbilliviren**  
Das Genom beginnt mit einer "Leader"-Sequenz am 3'-Ende und endet mit einer "Trailer"-Sequenz am 5'-Ende. Zwischen den Genen für die Strukturproteine liegen die nichtkodierenden Sequenzen (IGS= intergenische Sequenz).

### 1.1.5 Replikation und Transkription

Das Viruspartikel hat eine pleomorphe Gestalt mit einer Größe von 200 bis 300 nm (Lund et al., 1984). Es besteht aus den sechs Strukturproteinen H (Hämagglutinin-Protein), F (Fusions-Protein), M (Matrix-Protein), N (Nukleokapsid-Protein), P (Phospho-Protein (die kleine Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase)) und L (Large (die katalytische Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase)), sowie einer unsegmentierten, einzelsträngigen RNA mit negativer Polarität. Eine Lipidhülle umgibt das Virus (Abb. 1.3). Die genomische RNA und das N-Protein bilden das Nukleokapsid. Daran assoziiert ist der virale Polymerasekomplex, bestehend aus dem P- und L-Protein (Lund et al., 1984, Robbins et al., 1980). Jedes N-Protein bedeckt ungefähr sechs Basen des MV-Genoms und schützt dieses dadurch vor dem Abbau durch zelluläre Nukleasen. Gleichzeitig ist es an der Initiation der Replikation beteiligt (Gombart et al., 1993). Als RNA-abhängige RNA-Polymerase stellt das L-Protein den katalytischen Teil des Polymerase-Komplexes dar, während das P-Protein als Transaktivator die Funktion des L-Proteins reguliert. Das L-Protein ist für die Polyadenylierung und das "capping" der viralen Transkripte verantwortlich. Die Hülle besteht aus Membranlipiden, die aus der Zytoplasmamembran der Wirtszelle stammen und enthält die beiden Glykoproteine, das Hämagglutinin-Protein (H) und das Fusions-Protein (F).



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung eines Masernvirions mit gesonderter Auflistung der Oberflächen- und Nukleokapsidproteine (Quelle Dr. I. M Klagge)

Beide sind als Oberflächenproteine in der Membran verankert und vermitteln die Fusion der viralen Hüllmembran mit der zellulären Zielmembran und die Zell-Zell-Fusion (Wild et al., 1991).

Das M-Protein interagiert mit dem Nukleokapsid (Griffin, 1996; Runkler et al., 2007; Wild et al., 1995) und den zytopathischen Domänen des F- und H-Proteins in der Hüllmembran (Cathomen et al., 1998a). Das M-Protein spielt eine wichtige Rolle für die Reifung und den Austritt des Viruspartikels sowie für Bildung und Verpackung der viralen RNA ("Virus Assembly"). Das M-Protein ist zudem ein Transkriptions- und Fusionsregulator (Cathomen et al., 1998b, Reuter et al., 2006). Das H-Protein bildet Tetramere, bestehend aus zwei Homodimeren (Hu et al., 1995, Ogura et al., 1991). Die wichtigste Aufgabe des H-Proteins (ein Typ-II Membranprotein) ist die Bindung an den zellulären Rezeptor. Als erster zellulärer Rezeptor für das MV wurde CD46 identifiziert (Naniche et al., 1993, Dorig et al., 1993). Dieses Oberflächenprotein gehört zu den Komplementregulatoren ("regulators of complement activity") und wird auf kernhaltigen menschlichen Zellen exprimiert. An CD46 binden vor allem MV-Vakzinestämme. Diese können aber auch an den zweiten zellulären MV-Rezeptor, CD150, binden. MV-Wildtyp-Stämme können effizient nur an CD150 oder "SLAM"-Moleküle ("signalling lymphocyte activation molecule") und nicht an CD46 binden (Erlenhoefer et al., 2001; Tatsuo et al., 2000). Das F-Protein ist als ein Typ-I Membranprotein für die Fusion der viralen Membran mit der Wirtszellmembran verantwortlich. Es wird als inaktives  $F_0$ -Vorläuferprotein synthetisiert und im trans-Golgi-Kompartiment durch die zelluläre Furin-Protease (Bolt and Pedersen, 1998) in die beiden Untereinheiten  $F_1$  und  $F_2$

gespalten. Dabei bildet  $F_1$  die transmembrane Untereinheit, die über eine Disulfidbrücke mit der  $F_2$  Untereinheit verbunden ist (Sato et al., 1988; Watanabe et al., 1995). Der funktionelle  $F_1/F_2$  Komplex wird als Trimer auf der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert und in das Virion eingebaut (Joshi et al., 1998; Russell et al., 1994). Durch die Bindung des H-Proteins an den zellulären Rezeptor erfolgt eine Konformationsänderung des oligomeren H/F-Komplexes. Der dadurch vermittelte pH-unabhängige Fusionsprozess der viralen Hüllmembran mit der zellulären Plasmamembran (Joshi et al., 1998; Samuel and Shai, 2001a) ermöglicht dem Nukleokapsid den Eintritt in die Wirtszelle (Wild et al., 1995).

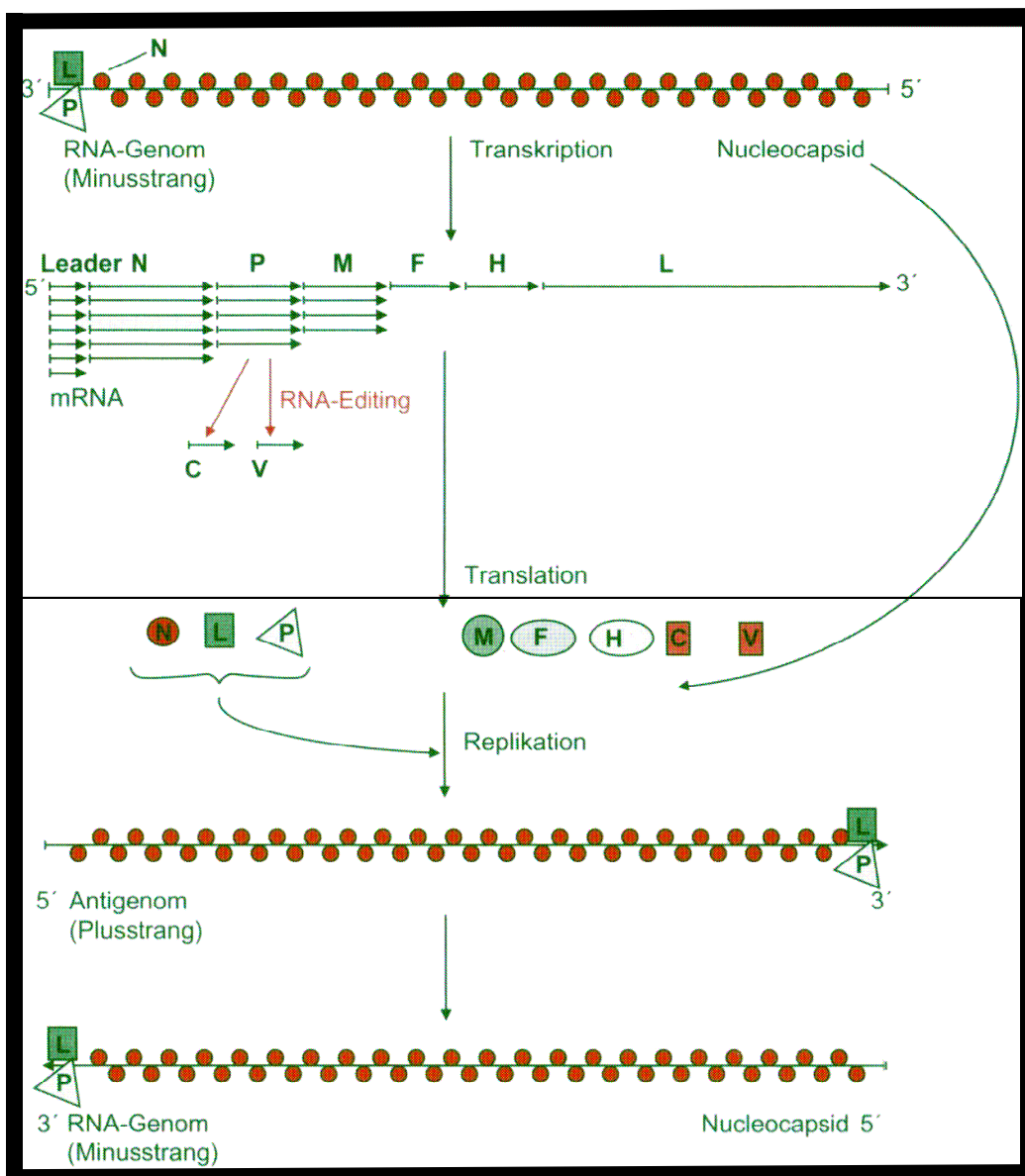


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Replikationszyklus der Paramyxoviren  
(Quelle: Modrow S., 2003)

Im Zytoplasma der Wirtszelle beginnt der Polymerase-Komplex mit der Transkription subgenomischer viraler mRNAs. Dabei bindet der Polymerase-Komplex an die nicht kodierende "Leader"-Sequenz am 3'-Ende des Genoms, die als Promotor für die Polymerase dient (Crowley et al., 1988). In den intergenischen Regionen fällt die Polymerase vom Nukleokapsid ab und beginnt an der folgenden Initiationssequenz innerhalb der intergenischen Sequenz vor dem nächsten Gen erneut mit der Transkription viraler mRNA.

Nach der Transkription des N-Gens erfolgt seine Polyadenylierung an der poly-Uridin-Sequenz. Es erfolgt entweder eine erneute Initiation am P-Gen oder die Polymerase dissoziiert von der RNA ab (Banerjee and Barik, 1992) und initiiert wieder neu am 3' Ende des Genoms. Die Häufigkeit der Reinitiation an der folgenden Startsequenz nimmt mit der Entfernung des Gens von der 3'"Leader"-Region ab. Die Lage eines Gens im MV-Genom bestimmt somit die Effizienz seiner Transkription.

Der dadurch entstehende Transkriptionsgradient (Abb. 1.4, oberer Teil) legt die Häufigkeit der einzelnen Proteine fest (Cattaneo et al., 1987; Schneider-Schaulies et al., 1989). Er führt zur Translation einer großen Menge von strukturell benötigtem N-Protein (zur Enkapsidierung des Genoms) und einer sehr geringen Menge des L-Proteins (Harder and Osterhaus, 1997). Voraussetzung für die Bildung eines neuen Virusgenoms ist die Synthese durchgehender RNA-Moleküle in Positivstrang-Orientierung. Nach dem Erreichen einer kritischen Konzentration an freien N-Proteinen im Zytosol schaltet die Polymerase von Transkription auf Replikation um. Das N-Protein beginnt nach der Freisetzung des P-Proteins die neu entstehende "Leader"-Sequenz zu enkapsidieren. Dadurch ignoriert die virale Polymerase die Stoppsignale der intergenischen Regionen und synthetisiert eine neue vollständige positivsträngige Kopie der genomischen RNA (Banerjee, 1987; Blumberg et al., 1981; Lamb, 1996). Die genomische RNA dient wiederum als Vorlage für die Herstellung neuer negativsträngiger Genome, die von N-Proteinen umhüllt sind (Abb. 1.4 unterer Teil). Die während der Replikation neusynthetisierten viralen Hüllproteine H und F werden in die Membran der infizierten Zelle eingelagert. Der H/F-Komplex geht Wechselwirkungen mit dem Matrix-Protein ein, das seinerseits an den Ribonukleinkomplex bindet (Cathomem 1998, Runkler 2007). Es kommt zur Freisetzung neuer Viruspartikel durch Knospung oder Lyse der Zelle.

### 1.1.6 MV-Matrix-Protein

Das MV-M-Protein (37 kDa) wird von einer mRNA translatiert, welche eine 400 Nukleotid lange, nicht-kodierende 3' Region enthält (Bellini et al., 1986). Das M-Protein ist basisch und in seiner Aminosäuresequenz hoch konserviert. Einige der Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen attenuierten Stämmen und Wildtypstämmen sind ebenfalls konserviert (u. a. an Position 64, 89 und 209). Die Aminosäure an Position 89 trägt zur Adaption des Viruswachstums in verschiedenen Zellen, Vero- und primären Lungenzellen von Baumwollratten, bei (Tahara et al., 2005, Dong et al., 2009).

Das M-Protein ist ein peripheres Membranprotein, das in infizierten Zellen sowohl mit den zytoplasmatischen Anteilen des F-Proteins interagiert als auch mit dem Nukleoproteinkomplex assoziiert ist (Bellini et al., 1994, Wild, 1995, Griffin, 1996, Cathomen et al., 1998a, Moll et al., 2002, Runkler et al., 2007). Das M-Protein wirkt als negativer Regulator der viralen Polymeraseaktivität, wenn es an den RNP-Komplex (Ribonukleoproteinkomplex) gebunden ist (Suryanarayana et al., 1994). Wird durch RNAi die Expression des Matrix-Proteins inhibiert, wird die Expression der übrigen viralen mRNA und genomischer RNA um den Faktor 2-2,5 erhöht (Reuter et al., 2006).

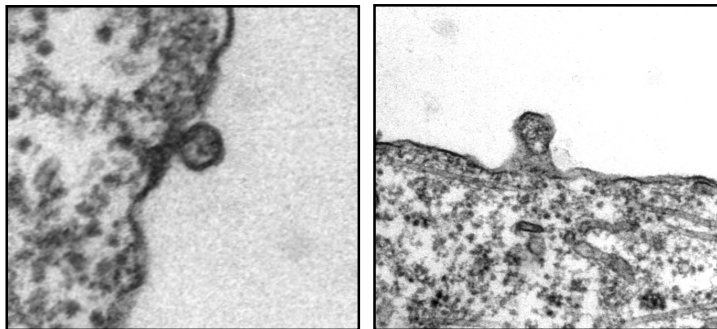
Das M-Protein oligomerisiert in höhermolekularen Komplexen und liegt dabei transient monoubiquitiniert vor (Pohl et al., 2007), was wahrscheinlich für die Partikelentstehung von Bedeutung ist. Es ist nicht bekannt, wie das M-Protein an die Plasmamembranen bindet, es wird aber zusammen mit dem Nukleokapsidprotein an die Plasmamembran transportiert (Runkler et al., 2007). Posttranslationale Modifikationen wie Lipidanker (Myristoylierung oder Palmitoylierung) wurden bisher nicht beschrieben. Das M-Protein assoziiert mit Membranen, die aber noch nicht genauer charakterisiert werden konnten. Dabei scheint die Assoziation des M-Proteins mit Membranen und der intrazelluläre Transport unabhängig von dem anderer viraler Bestandteile stattzufinden (Riedl et al., 2002). Bisher sind nur die Membranmikrodomänen der Plasmamembran, die DRMs (Detergenz-resistenten Membranfraktionen) bekannt, mit denen das M-Protein etwa zu 20 % assoziiert ist (Manie et al., 2000). Die Koexpression des MV-Glykoproteins F erhöhte den Anteil des mit DRM-assoziierten M-Proteins, steigerte jedoch, wie auch die Koexpression des H-Proteins, die Effizienz der VLP-Freisetzung ("virus-like particles") nicht



(Pohl et al., 2007). Die DRM-Assoziierung des M-Proteins zeigt, dass die Lipid Rafts die "Assembly site" aber nicht notwendigerweise die "Budding site" darstellen, da mittels eines rekombinanten MV, das das nicht Raft-assoziierte Glykoprotein G des VSV (Vesicular-Stomatitis-Virus) anstelle des F- und H-Proteins exprimiert, gezeigt wird, dass die Partikelfreisetzung auch außerhalb der DRMs, jedoch ohne die Inkorporation des M-Proteins erfolgen kann (Spielhofer et al., 1998).

Das M-Protein beeinflusst die fusogene Aktivität des F/H Komplexes und führt zur apikalen Verlagerung der Glykoproteine in Epithelzellen (Plempner et al., 2002). Ein rekombinantes MV (MV- $\Delta$ M), dessen M-Gen deletiert wird, zeigt gegenüber der Kontrolle eine erhöhte Zell-Zell-Fusion, während die Virusfreisetzung um das 250-fache reduziert war (Cathomen et al., 1998b).

Nach transienter Expression des M-Proteins in Fibroblasten kann eine Produktion von VLPs nachgewiesen werden (Abb. 1.5) (Pohl et al., 2007). In persistenten Infektionen des zentralen Nervensystems sind häufig Mutationen im Leseraster des M-Proteins zu finden (Billeter et al., 1994). Die große Anzahl an Mutationen könnte den beobachteten Defekt in der Partikelbildung erklären (Schneider-Schaulies et al., 1991). Dies und die beschriebene VLP-Produktion gelten als Evidenz für die große Bedeutung des M-Proteins in der Partikelmorphogenese (Pohl et al., 2007).



**Abb. 1.5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von VLPs in MV-M transfizierten 293 T-Zellen**  
 293 T-Zellen wurden mit dem pCG-M (ED) Plasmid transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, entwässert und in Epon eingebettet. Die angefertigten Ultradünnschnitte wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Abgebildet ist jeweils ein Ausschnitt der Oberfläche einer Zelle. Alle Aufnahmen wurden bei 25.000-facher Vergrößerung gemacht. Quelle: Dissertation C.Pohl 2007

### 1.1.7 Bedeutung der Matrix-Proteine

Die Matrix-Proteine der Vertreter der Mononegavirales sind essentiell für die Knospung und Partikelmorphogenese. In infizierten Zellen assoziieren

Matrix-Proteine sehr stark mit Membranen, sind aber keine Transmembranproteine (Kolesnikova et al., 2002). Diese Bindung kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein. So liegt zum Beispiel das M-Protein von VSV zu 90 % in löslicher Form und zu 10 % in membrangebundener Form vor (Chong and Rose, 1993), während 80 % des VP40-Proteins des Marburgvirus (MARV) an Membranen bindet (Kolesnikova et al., 2002).

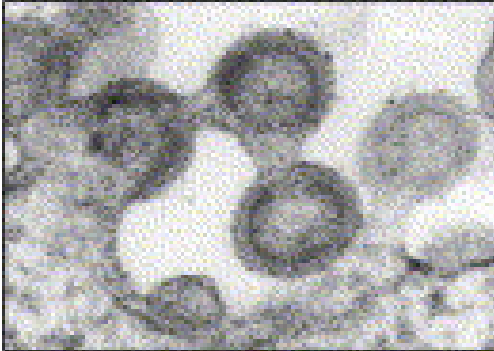
Dieses assoziiert früh nach der Synthese mit kleinen Membranvesikeln und nachfolgend mit Lamp-1-positiven endosomalen Membranen. Es wird über den sogenannten retrograden endosomalen Transportweg zum Knospungsort, der Zytoplasmamembran, transportiert (Kolesnikova et al., 2004a; Kolesnikova et al., 2004b; Kolesnikova et al., 2002). Der Ort der Partikelfreisetzung sind die Lipid Rafts, sie bestehen vorwiegend aus Cholesterin und Sphingholipiden. An die Lipid Rafts (DRMs) wird das VP40-Protein rekrutiert. Die DRMs dienen für viele Viren als Ausgangspunkt der Partikelfreisetzung (Bavari et al., 2002; Laliberte et al., 2006; Nayak et al., 2004; Ono and Freed, 2001).

Die solitäre Expression von Matrix-Proteinen führt, auch in Abwesenheit anderer viraler Proteine, zur Abschnürung von VLPs, die strukturell reifen Viruspartikeln ähneln und deren Morphologie und Partikelgröße vom M-Protein determiniert sind (Coronel et al., 1999; Justice et al., 1995, Timmins et al., 2001). Auch die VP40-Proteine des MARV oder Ebolavirus (EBOV) katalysieren die Freisetzung von VLPs (Bosio et al., 2004). Dies ist ebenfalls für die Matrix-Proteine des Sendaivirus, des humanen Parainfluenzavirus, des Lassavirus und des VSV, aber auch für das Gag-Protein des HIV-1 (humanen Immundefizienzvirus-1) beschrieben (Justice et al., 1995, Schmitt, 2002; Strecker et al., 2003; Takimoto and Portner, 2004). Für das VP40-, und das Gag-Protein ist nachgewiesen, dass die Oligomerisierung essentiell für die VLP-Freisetzung ist.

### **1.1.8 L-Domänen**

Late-Domänen (L-Domänen) sind hoch konservierte, kurze Peptidsequenzen, die wesentlich für späte Phasen der Virusmorphogenese sind. Zuerst wurden L-Domänen innerhalb der p6 Domäne des HIV-1 Gag-Proteins charakterisiert. P6 defiziente Viren sind nicht in der Lage sich

abzuschnüren, sie bleiben vielmehr durch einen dünnen Membranstiel mit der Plasmamembran verbunden (Abb. 1.6) (Gottlinger et al., 1991, Huang et al., 1995).



**Abb. 1.6: Abschnürungsdefekt**

Die C-terminalen Deletionen im p6-Protein beim HIV-1 Gag-Protein führen zu Virionen, welche sich nicht von der Plasmamembran ablösen können. Der Budding-Defekt ist dadurch gekennzeichnet, dass Virionen durch einen dünnen Membranstiel mit der Plasmamembran verbunden bleiben. Quelle: (Bieniasz, 2006).

Für diesen Phänotyp sind Mutationen innerhalb des Sequenzmotivs P(T/S)AP verantwortlich (Huang et al., 1995, Luban, 2001, Freed, 2002, Pornillos et al., 2002a, Strack et al., 2003). Domänen mit ähnlicher Aktivität konnten später auch in anderen Retroviren gefunden werden. So wird im RSV (Rous-Sarkom-Virus) p2b-Protein ein PPxY-Motiv mit L-Domänen Aktivität beschrieben (Parent et al., 1995, Xiang et al., 1996) und im EIAV ("equine infectious anemia virus") p9-Protein erstmalig ein YxxL-Motiv (Puffer et al., 1997, Demirov and Freed, 2004, Morita and Sundquist, 2004). Auch im M-Protein von VSV sowie im VP40-Protein des EBOV und des MARV finden sich L-Domänen (Pornillos et al., 2002b, Morita and Sundquist, 2004, Bieniasz, 2006).

Virus	Familie	L-Domäne	Protein
HIV-1	Retroviridae	PTAP	p6
HIV-1	Retroviridae	YxxL	p6
MLV	Retroviridae	PPxY	p12
RSV	Retroviridae	PPxY	p2b
M-PMV	Retroviridae	PPxY	p24/16
EIAV	Retroviridae	YxxL	p9
VSV	Rhabdoviridae	PPxY	M
EBOV	Filoviridae	PTAPPxY	VP40
SV-5	Paramyxoviridae	FPIV	M
MuV	Paramyxoviridae	FPIV	M

**Tabelle 1.2: Zusammenfassung der wichtigsten L-Domänen**

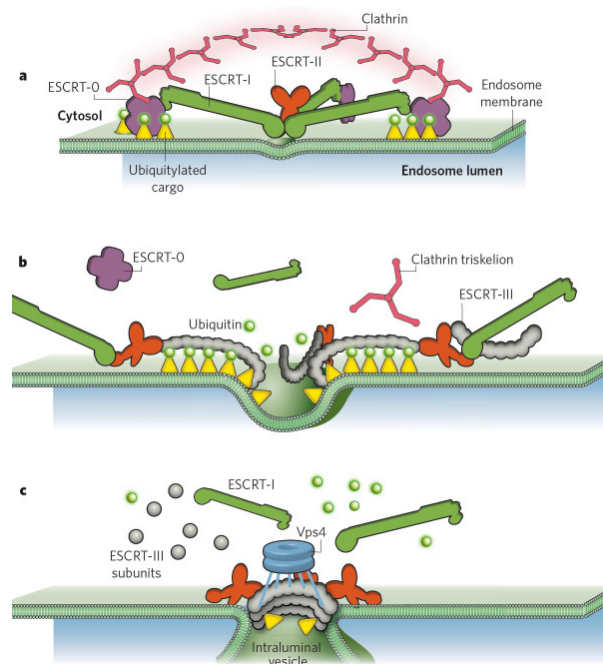
Gegenwärtig sind vier verschiedene Motiv-Typen bekannt: PT/SAP, PPxY, YxxL und FPIV (Freed, 2002, Schmitt et al., 2005, Li et al., 2002) (Tabelle 1.2). Ob das MV-M-Protein eine funktionelle L-Domäne besitzt, ist unbekannt. L-Domänen sind bis zu einem gewissen Grade zwischen Retroviren und anderen umhüllten Viren funktionell austauschbar und wirken zum Teil auch positionsunabhängig (Parent et al., 1995, Yuan et al., 2000, Martin-Serrano et al., 2001, Strack et al., 2003, Li et al., 2002, Martin-Serrano et al., 2004).

Die Mutation oder Deletion dieser L-Domänen-Motive führt zu einer drastischen Reduktion der Freisetzung von VLPs bzw. reifer Viruspartikel aus infizierten Zellen (Licata et al., 2003, Gottwein et al., 2003). Es wird angenommen, dass die L-Domäne als Bindestelle für das zelluläre ESCRT-System fungiert, das u.a. in der endozytotischen Recycling-Maschinerie von zellulären Oberflächenrezeptoren involviert ist (Pornillos et al., 2002a).

### **1.1.9 Das ESCRT-System**

Das ESCRT-System ("endosomal sorting complexes required for transport") ist zentrales Element der Proteinsortierung in den endozytotischen Pathway, indem es den Proteintransport zwischen dem trans-Golgi Netzwerk (TGN), der Plasmamembran und den Lysosomen reguliert (Gruenberg and Maxfield, 1995, Raiborg et al., 2003, Babst, 2005, Raiborg and Stenmark, 2009). Die Sortierung und der Transport von Cargo-Proteinen in frühe und späte Endosomen verläuft über "Multivesiculäre Bodies" (MVB), welche durch Invagination und Abschnürung von Vesikeln in das endosomale Lumen entstehen (Abb. 1.7).

Die MVBs sind also die Sortierungskompartimente, aus denen Proteine entweder zum proteolytischen Abbau in Lysosomen transportiert oder an die Zelloberfläche zurücktransferiert werden. Dieser Rücktransport wird als retrograder Transport bezeichnet (Pelchen-Matthews et al., 2004). Als Hauptsignale für die Proteinsortierung in MVB dienen Monoubiquitinierungen, die zur Erkennung der Proteine durch ein Netzwerk aus Proteinkomplexen, den HRS-(ESCRT-0-Komplex) und ESCRT-Komplexen I-III führen, welche die MVB-Bildung vorantreiben (Rocca et al., 2001, Katzmann et al., 2001, Raiborg et al., 2003, Raiborg and Stenmark, 2009).



**Abb. 1.7: Modell für die Ubiquitin-abhängige Sortierung von Transmembranproteinen in das Endosom**

Ubiquitin-bindende Proteine (des ESCRT-0-Komplexes) formen zusammen mit Clathrin einen Clathrin-Coat zur Konzentrierung der zu endozytierenden Proteine. Der ESCRT-I-Komplex wird aus dem Zytosol an das Endosom, wo es mit monoubiquitinierten Cargo-Proteinen interagiert und den ESCRT-II-Komplex aktiviert und rekrutiert. Der ESCRT-II-Komplex bewerkstelligt dann die Zusammenlagerung der Komponenten des ESCRT-III-Komplexes. Dieser Komplex konzentriert die Cargo-Proteine und rekrutiert zusätzliche Faktoren wie Bro1 und Vps4. Bro1 rekrutiert Doa4, welches das Ubiquitin der Cargo-Proteine abspaltet. Vps4 deassoziiert den ESCRT-III-Komplex. Die Einstülpung der Endosomen und die Bildung der MVB-Vesikel scheint über eine lokale Asymmetrie der Lipid-Zusammensetzung der beiden Membran-Doppelschichten zustande zu kommen (gelbe Dreiecke).

Quelle : (Raiborg and Stenmark, 2009).

Das ESCRT-System besteht aus vier Proteinkomplexen. Während ESCRT-0, ESCRT-I und -II für die Rekrutierung mono-ubiquitiniertes Transmembranproteine zu endosomalen Membrandomänen notwendig sind, ist ESCRT-III an der Membraneinstülpung beteiligt. Die ESCRT-Komplexe bestehen aus zytoplasmatischen Proteinen, die sich transient am Ort der Vesikelbildung einfinden und nach Partikelabschnürung durch die katalytische Aktivität einer ATPase wieder dissoziieren (Pornillos et al., 2002c, Martin-Serrano et al., 2004, Bowers et al., 2004, Babst, 2005). Virale L-Domänen interagieren spezifisch mit Proteinen der zellulären ESCRT-Komplexe und rekrutieren die ESCRT-Komponenten an die Plasmamembran. Eine der bestuntersuchten Interaktionen ist die des HIV-Gag-Proteins. Es wird gezeigt, dass die HIV-1 Gag p6 PTAP L-Domäne spezifisch mit der ESCRT-I-Komplex Komponente Tsg101 ("tumor susceptibility gene product 101") interagiert (Garrus et al., 2001, VerPlank et al., 2001, Demirov et al., 2002, Pornillos et al., 2002b). Das Ubiquitin-Ligase ähnliche Protein Tsg101 ist Teil des ESCRT-I-Komplexes, welcher spezifisch

ubiquitinierte Substrate erkennt und ins vacuoläre/ lysosomale Lumen sortiert (Babst et al., 2000, Katzmann et al., 2001). Die Expression dominant negativer Formen von Tsg101 (Demirov et al., 2002) oder die Depletion von Tsg101 durch siRNAs (Garrus et al., 2001) inhibieren die Virusfreisetzung. In der C-terminalen Region von p6 befindet sich eine weitere, für die Virusfreisetzung notwendige L-Domäne, YPxL (YxxL), mit der das Protein Aip-1/ALIX ("apoptosis-linked-gene-2 interacting protein/ ALG-2-interacting protein X") wechselwirkt. Aip-1/ALIX ist ein Teil des ESCRT-II-Komplexes und interagiert mit Tsg101 und Komponenten des ESCRT-III-Komplexes (Strack et al., 2003). Das YPxL-Motiv kann zudem die Freisetzung von PTAP-defizienten HIV-Mutanten aufrechterhalten (Stuchell et al., 2004, Demirov and Freed, 2004).

Die PPxY L-Domänen binden an die WW-Domäne von HECT ("homologous to E6AP c-terminus") E3 Ubiquitin-Ligasen (z.B. Nedd4), von denen in eukaryotischen Zellen derzeit neun verschiedene Spezies bekannt sind. Für das FVIP-Motiv ist bisher noch kein Interaktionspartner nachgewiesen, aber es kann ebenfalls das Fehlen der PTAP-L-Domäne in HIV-1 kompensieren (Schmitt et al., 2005). Das Ebolavirus VP40-Protein hat eine überlappende L-Domäne, PTAPPEY, die mit der Ubiquitin-Ligase Nedd4 und Tsg101 interagiert (Harty et al., 2000). Für die letzten Schritte der Partikelabschnürung, Virusfreisetzung und Dissoziation des ESCRT-Komplexes sind Komponenten des ESCRT-III-Komplexes (CHMP-Proteine) sowie die enzymatische Aktivität von Vps4 ("vacuolar protein sorting 4") essentiell. Dominant-negative Formen der CHMP-Proteine (Martin-Serrano et al., 2003a, Martin-Serrano et al., 2003b, Strack et al., 2003) sowie von Vps4 (Martin-Serrano et al., 2003b, Tanzi et al., 2003) inhibieren die Virusfreisetzung. Demnach gilt die Sensitivität gegenüber dominant negativem Vps4 als Kriterium für eine ESCRT-Abhängigkeit des Knospungsprozesses, auch wenn keine kanonischen L-Domänen im Virus zu finden sind.

## **1.2 Zielsetzung**

Die letzten Schritte der Virusmorphogenese werden entscheidend durch die M-Proteine definiert. Dies wird bereits für Matrix-Proteine anderer negativsträngiger RNA-Viren gezeigt. Auch das MV-M-Protein gilt als wichtig für die Virusfreisetzung.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Prozess der Partikelfreisetzung von MV und der daran beteiligten viralen und zellulären strukturellen Komponenten näher untersucht werden. Im letzten Schritt der Freisetzung membranumhüllter Viren fungieren in vielen Fällen L-Domänen im viralen Matrix-Protein als Interaktionspartner für zelluläre Faktoren des ESCRT-Systems, das den Knospungsprozess vorantreibt. Innerhalb der MV-M-Gene sind zwei konservierte Sequenzmotive mit Ähnlichkeit zu den bisher bekannten L-Domänen Motiven enthalten. Die Funktion dieser Motive im Hinblick auf ihre Rolle in der Partikelfreisetzung, sowie im Speziellen deren mögliche L-Domänen Aktivität, soll in der vorliegenden Arbeit analysiert werden. Zu dieser Analyse gehört auch die Frage, ob der Knospungsprozess des MV außerdem auch dem zellulären ESCRT-Sortierungsweg unterliegt.

Der zweite Teil dieser Arbeit dient der Charakterisierung spezifischer Membran-Domänen, wie DRMs, die für den Freisetzungsprozess essentiell sind.

## 2 Material

### 2.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien waren alle im Institut verfügbar, oder wurden mir (293 T-Zelllinien, die entweder stabil Vps4 WT oder die Vps4 E228->Q Mutante exprimieren) freundlicherweise von Prof. Colin M. Crump, University of Cambridge, zur Verfügung gestellt. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um:

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
HeLa	Fibroblastenzelle	(Cervixkarzinom), Mensch (homo sapiens)
CHO h TLR-2	Epithelzelle	(Ovarien), Hamster (Cricetulus griseus)
B95a	B-Lymphozyt, mit EBV transformiert	Krallenaaffe ( <i>Callithrix jacchus</i> )
Vero	Fibroblastenzelle	(Niere), afrikanische grüne Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )
293 T	Fibroblastenzelle, transfiziert mit dem T-Antigen von SV40	(Niere), Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )
293-Vps4-WT	Fibroblastenzelle, die induzierbar Vps4 WT (Wildtyp) exprimiert	(Niere), Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )
293-Vps4-E228->Q	Fibroblastenzelle, die induzierbar Vps4 E228->Q exprimiert	(Niere), Mensch ( <i>Homo sapiens</i> )



## 2.2 Bakterien

Zur Vermehrung der verwendeten Plasmide wurden selbstgezüchtete und kompetent gemachte E.coli K12, bzw. E.coli XL10-Gold Bakterien von Stratagene verwendet.

## 2.3 Virus

Der Edmonston Vakzinestamm wurde auf Vero-Zellen vermehrt.

## 2.4 Plasmide

Alle MV-M-Protein kodierenden Plasmide wurden durch Modifikation des eukaryotischen Expressionsvektors pCG(DC), der Restriktionsschnittstellen für die Enzyme DraI und CspI enthält, erzeugt. Die M-Gene stehen unter der Kontrolle des frühen CMV-Promotors. Sie wurden im Labor von Dr. W.P. Duprex, Centre for Cancer Research and Cell Biology, School of Biomedical Sciences, Queen' s University Belfast, Nordirland, erzeugt.

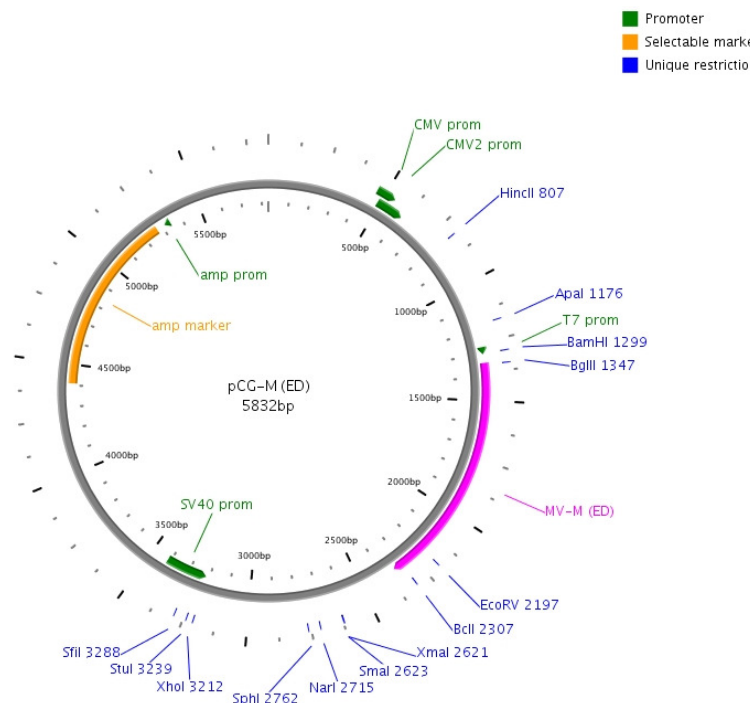


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des pCG-M Vektors

Übersicht der verwendeten Plasmide:

Plasmid	kodiertes Protein
pCG-M (ED)	MV-M-Protein (ED)
pCAGGS-VP40	EBOV-VP40-Protein
pCG-GFP	pCG-Vektor der GFP exprimiert
pCR3.1-YFP-Vps4	gelb-fluoreszierendes-Protein ("yellow-fluorescent protein", YFP)-gekoppeltes Vps4
pCR3.1-YFP-Vps4 (228E228→Q)	dominant-negative Form des YFP-gekoppelten Vps4 mit einem Aminosäureaustausch an Position 228 (Glutaminsäure [E] zu Glutamin [Q])
pCR3.1GFP-Tsg101	YFP-gekoppeltes Tsg101 Protein
pCR3.1GFP-Tsg101 $\Delta$ 1-157	YFP-gekoppeltes Tsg101 Protein, dem N-terminal 157 Aminosäuren (AS) fehlen
pCR3.1GFP-Tsg101 $\Delta$ 303-360	YFP-gekoppeltes Tsg101 Protein, dem C-terminal 57 AS fehlen
pCR3.1YFP Aip-1	YFP-gekoppeltes Aip-1 Protein
pCR3.1YFP Aip-1 $\Delta$ 1-176	YFP-gekoppeltes Aip-1 Protein, dem N-terminal 176 AS fehlen
pCAGGS-VP40	VP40 von EBOV
pCG-M`PTTY	M-Protein, in dem die PTTY Sequenz durch AAAA ersetzt wurde
pCG-M`PIQP	M-Protein, in dem die PIQP Sequenz durch AAAA ersetzt wurde
pCG-M`YMFL	M-Protein, in dem die YMFL Sequenz durch AAAA ersetzt wurde
pCG-M`PSVP	M-Protein, in dem die PSVP Sequenz durch AAAA ersetzt wurde
pCG-M`FKNV	M-Protein, in dem die FKNV Sequenz durch AAAA ersetzt wurde
pCG-M`PTAPPEY	M-Protein, in dem die PIQPTTY Sequenz durch PTAPPEY ersetzt wurde

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Antikörper für die Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen mit einer 100 µl Antikörperlösung bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

### 2.5.2 Primärantikörper

Spezifität	Name	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
AP-3	26/P47A	Maus, IgG	1 : 100	Becton-Dickinson
Calnexin	Calnexin	Kaninchen, IgG	1 : 200	Sigma Aldrich
CD9	K41	Maus, IgG	1 : 80	Univ. Würzburg
CD63	CD63	Maus, IgG	1 : 100	Univ. Würzburg
CD63	sc5275/MX49	Maus, IgG1	1 : 150	Santa Cruz
CD81	sc9518/H-121	Kaninchen, IgG	1 : 50	Santa Cruz
CD81	Z.81.1	Maus, IgG1	1 : 200	Univ. Würzburg
CD82	KAI-1	Maus, IgG3	1 : 100	Santa Cruz
CD82	Z.81.2	Maus, IgG	1 : 200	Univ. Würzburg
EEA-1	EEA-1	Kaninchen, IgG	1 : 25	Affinity BioReagents
EBOV-VP40	2C4	Maus IgG	1 : 100	S. Becker, Marburg
EBOV-Serum	Ziege anti-EBOV-Serum		1 : 300	S. Becker, Marburg
ERGIC	ERGIC 53	Kaninchen IgG	1 : 100	Sigma Aldrich
Lamp-1	931-A	Kaninchen IgG	1 : 1000	S. Carlsson, Umeå
LC3	LC 3B	Kaninchen	1 : 100	E. Snijder, Leiden
MV-M	MAB8910	Maus-IgG-1	1 : 200	Chemicon
TGN 46	TGN46	Kaninchen IgG	1 : 100	Abcam

### 2.5.3 Sekundärantikörper

Antikörperspezifität	Verdünnung	Hersteller
Alexa 488 Huhn anti-Maus	1 : 1000	Molecular Probes
Alexa 488 Kaninchen anti-Maus	1 : 1000	
Alexa 488 Ziege anti-Maus	1 : 1000	
Alexa 594 Huhn anti-Kaninchen	1 : 1000	
Alexa 594 Huhn anti-Ziege	1 : 1000	
Alexa 594 Kaninchen anti-Maus	1 : 1000	
Alexa 594 Ziege anti-Maus	1 : 1000	

### 2.5.4 FACS Antikörper

Antikörperspezifität	Verdünnung	Konjugat	Hersteller
MV-H (K83)	1 : 100		Institut für Virologie
MV-M (MAB8910)	1 : 100		Chemikon
Ziege anti-Maus IgG	1 : 100	FITC	Dianova
Ziege anti-Maus IgG	1 : 100	PE	Becton Dickinson

### 2.5.5 Western-Blot Antikörper

Antikörperspezifität	Verdünnung (in Milch)	Hersteller
MV-M	1 : 2000	Chemikon
Kaninchen anti-Ziege	1 : 2000	Dianova
Ziege anti-EBOV Serum	1 : 1000	Institut für Virologie Marburg
Ziege anti-Maus	1 : 3000	Dianova
2C4 (Maus) VP40	1 : 1000	Institut für Virologie Marburg

## 2.6 Primer für die Sequenzierung

Name	“Forward“-Sequenz	“Reverse“-Sequenz
MV-M- <sub>1081</sub>	CTACATCCTGGTCATCATCC	GATTTAGGTAATATTTTTTG
MV-M- <sub>1321</sub>	CTAAATCCATTATAAAAAAC	CTAGGGGATCCCGGAGGTTA
MV-M- <sub>1561</sub>	GATCCCCTAGGGCCTCCAAT	CGCCAATTAGACTATGGCGA
MV-M- <sub>1801</sub>	GCGGTTAATCTGATACCGCT	TTGAAGTCCTCTTTCTTCTC
MV-M- <sub>2041</sub>	AACTTCAGGAGAAAGAAGAG	GAGCAACTTCCTGAGGCAAC

## 2.7 Primer für die Mutagenese

Motiv	Richtung	Primer
PIQP	Forward	GGGTCGATCGCTGCGGCAGCAGCCACCACCTAC AGT
	Reverse	ACTGTAGGTGGTGGCTGCTGCCGCAGCGATCGA CCC
PTTY	Forward	GCTCCGATACAAGCCGCCGCCAGTGATGGC AGG
	Reverse	CCTGCCATCACTGGCGGCGGCGGCTTGTATCGG AGC
YMFL	Forward	GAATGCTTTTATGGCCATGTTTGCGCTGGGGGTT GTT
	Reverse	AACAACCCCCAGCGCAAACATGGCCATAAAGCA TTC
PSVP	Forward	GCAGTTTTGCAGGCATCAGTTGCTCAAGAATTCC GC
	Reverse	GCGGAATTCTTGAGCAACTGATGCCTGCAAACT GC
FKVL	Forward	GACCAAGGACTAGCCAAAGTTGCGTAGACCGTA GTG
	Reverse	CACTACGGTCTACGCAACTTTGGCTAGTCCTTGG TC
PTAPPEY	Forward	TCGATCGCTCCGACAGCACCCCCGAGTACAGT GATGGC
	Reverse	GCCATCACTGTAICTCGGGGGGTGCTGTCCGAGC GATCGA

## 2.8 Medien und Zusätze

Die Zellkulturmedien (MEM und RPMI) und Zusätze (5,6 %-Natriumhydrogencarbonat, Penicillin/Streptomycin (100 I.E./ml)) wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Medienküche des Instituts für Virologie (Universität Würzburg) bezogen.

### 2.8.1 Zellkultur

Medium	Anbieter
Ciprofloxacin (2 mg/ml)	Bayer
G418	Roth, Calbiochem
FKS	Biochrom
OptiMEM	Gibco
Fusionsinhibitorisches Peptid (FIP) (Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH)	Bachem
Zeocin	Invitrogen

### 2.8.2 Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt ad 1 l Aqua bidest
LB-Agar	wie LB-Medium + 15 g Agar-Agar ad 1 l Aqua bidest
Ampicillin-Selektionsagar	wie LB-Agar + 50 mg/ml Ampicillin ad 1 l Aqua bidest

## 2.9 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
ATV	0,8 (w/v) NaCl, 0,04 % (w/v) KCl, 0,1 % (w/v) D-Glukose, 0,058 % (w/v) NaHCO <sub>3</sub> , 0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA
Natriumazid-Lösung	32 % w/v
Trypanblau	0,25 % (w/v) in PBS
FACS-Puffer	0,4 % BSA, 0,02 % Natriumazid, in Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> freien PBS
Saponin-Puffer	0,33 % Saponin in FACS-Puffer, pH 7,4
7-Aminoaktinomycin-D (7-AAD)	Vorratslösung 1 mg/ml in DMSO Arbeitslösung 1:60 in FACS-Puffer
Anodenpuffer 30mM	30 mM Tris/HCl, 20 % Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer 300mM	300 mM Tris/HCl, 20 % Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer	39,6 mM Aminohexansäure, 25mM TrisHCl, 20 % Methanol, pH 9,4
Milchpuffer	5 % (w/v) 0,05 % (v/v) Magermilchpulver, Tween 20, in PBS
Waschpuffer	0,05 % Tween in PBS
Proteingelpuffer	250 mM Tris/HCl, 1,9 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,7
6 x SDS Probenpuffer	0,5 M Tris pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS, 6 ml Glycerol, 0,6 ml β-Mercaptoethanol, 2,4 mg Bromphenolblau ad 20 ml Aqua bidest
Brij-98 Lysispuffer	25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM NaF, 0,1 (v/v) Brij-98 (Sigma), Roche Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette/ 50 ml), ad Aqua bidest

NP-40-Lysepuffer	120 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7,4, 40 mM $\beta$ -Glycerophosphat, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1mM NP-40, 1 % Roche Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette/ 50 ml) ad Aqua bidest
NTE	10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, Roche Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette/50 ml) ad Aqua bidest, pH 7,2
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml EDTA (0,5 M; pH 8), ad 1 l Aqua bidest
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, ad Aqua bidest, pH 8,5
10 x Agarose-Laufgelpuffer	144 Glycin, 30,3 g Tris, 50 ml 20 %ige SDS-Lösung (w/v; in Aqua bidest), ad 1 l Aqua bidest, pH 8,7
1 %ige Ethidiumbromid-Lösung	in PBS
2 X HBS	8 g NaCl; 0,38 g KCl, 0,1 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 5 g HEPES; 1 g Glucose ad 0,5 l Aqua bidest, pH 7,05
Einfriermedium	Fötales Kälberserum (FKS), 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)

### 2.10 Kits

Name	Anbieter
Bicinchoninic Acid (BCA) Kit zur Proteinbestimmung	Sigma
ECL-Detektions-Reagenz	Amersham
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Zenon® Mouse IgG Labeling Kit	Invitrogen



## 2.11 Verbrauchsmaterial

Durchflusszytometrierröhrchen	Becton Dickinson, BD
Einmalküvetten	Roth
Einmalküvetten UVette	Eppendorf
Entwickler und Fixierer für Röntgenfilm	Kodak
Elektrophoreseapparatur	Inst. für Virologie, Wü
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner bio-one
Membranfilter 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Plastikartikel für Bakterien- und Zellkultur	Greiner, Nunc
Röntgenfilm	Fuji Foto Film
UZ-Röhrchen	Laborgeräte Beranek
Whatman-Papier Typ GB002	Schleicher & Schuell
Zellschaber	Hartenstein
Zellkulturflaschen (mit Filter)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten 6, 24, Näpfe	Greiner bio-one
Zellkulturplatten 96 Näpfe	Becton Dickinson
Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml	Greiner bio-one

## 2.12 Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen BioRad, Böhringer, Merk, Promega, R&D Systems, Roth, Serva , Sigma Aldrich bezogen.

Brij-98	Sigma
Ciprofloxacin (Ciprobay)	Bayer
Fluoromount-G	SouthernBiotech
Magermilchpulver	Salitar
Methyl-beta cyclodextrin	Sigma
Mevalonolactone	Sigma
Mevalonat	Sigma
Polyethylenimine (PEI) 25K,	Polyscience
PonasteroneA	Invitrogen
Proteinstandardlösung 1,0 mg/ml	Sigma
Zeocin	Invitrogen

### **2.13 Geräte**

Bakterienschüttler	Infors
BIO-Photometer	Eppendorf
ELISA Processor III	Behring
FACScan Calibur	Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Halbtrockenblottingapparatur	Institutswerkstatt
konfokales Laserscanningmikroskop LMS510 Meta	Leitz
Lichtmikroskop, Labovert FS	Leitz
Mehrkanalpipetten	Flow Laboratories
Mikropipetten	Eppendorf
PCR-Maschine Thermal Cycler DNA 480	Perkin Elmer
Schüttler	Bühler
Sterilwerkbank	Nuaire
Spannungsquelle	Gibco, BioRad
Tischzentrifuge	Heraeus, Sepatech
Zählkammer	Neubauer, Thoma
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich, Sorvall

### **2.14 Software**

AIDA	Raytest
LSM510 Version 3.2. SP2	Zeiss

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturplastikflaschen im Brutschrank bei 37° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei einem 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert.

Die verwendeten Medien waren mit 15 ml Natriumhydrogencarbonat gepuffert und mit Penicillin/ Streptomycin (100 µg/ml) oder Ciprofloxacin (10 µg/ml) versetzt.

#### **3.1.1 Zellkultur adhärenter und semiadhärenter Zelllinien**

B95a-Zellen wurden mit RPMI 1640, mit 5 % FKS, HeLa- und Vero-Zellen in MEM mit 5 % FKS und Antibiotika (Penicillin/ Streptomycin) kultiviert. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen entweder für die beschriebenen Experimente verwendet oder in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 gesplittet, d.h. in neue Flaschen ausgesät. Dafür wurden die Zellen kurz mit ATV gewaschen und danach 2 min mit ATV im Brutschrank inkubiert, dann mit dem jeweiligen Medium abgespült, verdünnt und in neue Flaschen ausgesät.

CHO<sub>h</sub>TLR-2 Zellen wurden in HAM F12 Medium (10 % FKS, 0,5 mg/ml G418 + Hygromycin 400 U/ml) kultiviert. Nach Bildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen entweder für einen Mycoplasmentest benutzt oder gesplittet.

Die semiadhärenten Zelllinien 293 T, 293 T-Vps 4 (WT) und 293 T-Vps4 (E228→Q) wurden in MEM mit 10 % FKS kultiviert, wobei das Medium für die stabil transfizierten Zelllinien 293 Vps4 WT und 293 Vps4 E228→Q als Zusatz 400 µg/ml G418 und 200 µg/ml Zeocin enthielt. Nach Ausbildung eines zu 80-90 % konfluenten Zellrasens wurden die Zellen mit frischem Medium vom Boden der Kulturflasche abgespült und 1:5 bis 1:10 verdünnt in frischem Medium wieder ausgesät.

### 3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Dazu wurden aus einer Zellsuspension 10 µl abgenommen und mit 90 µl Trypanblaulösung gemischt. 10 µl der Lösung wurden anschließend in eine Neubauerzählkammer gegeben. Da der Farbstoff nur von toten Zellen aufgenommen wird, wurde mit Hilfe des Lichtmikroskops die Zahl der lebenden, ungefärbten Zellen ermittelt. Die Gesamtzellzahl in der vorhandenen Zellsuspension konnte mit Hilfe des Kammerfaktors errechnet werden. Die Zellsuspension wurde anschließend entsprechend der gewünschten Zellzahl verdünnt und für die nächsten Versuche weiter verwendet.

### 3.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für eine längerfristige Lagerung wurden die Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder im flüssigen Stickstoff eingefroren. Dafür wurden von Zelllinien  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium (FKS/ 10 % DMSO) resuspendiert und zunächst für 1 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und danach über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Aliquots wurden in flüssigen Stickstoff überführt oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weiter gelagert.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese zügig bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut, mit einem Überschuss an vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen und in dem entsprechenden frischen Medium ausgesät.

### 3.1.4 Mykoplasmentest

Die Kontamination der Zellkultur mit Mykoplasmen kann zu einem veränderten Wachstumsverhalten bzw. Absterben führen. Für den Test auf Mykoplasmenkontamination standen CHO 3E10hTLR2-Zellen zur Verfügung. Diese Zellen sind stabil mit einem CD25-Reportergen (ELAM-tac) transfiziert, welches unter einem NFκB abhängigen Promoter steht. Die Zellen exprimieren TLR2 (Toll Like Receptor) sowie CD14 als Korezeptor (Medvedev et al., 2001). Außerdem enthalten die Zellen endogenes TLR4, das bei Stimulation (beispielsweise durch LPS) ebenfalls NFκB aktiviert. Bei

einer Kontamination mit Mykoplasmen, die als TLR-Agonisten bekannt sind (Takeuchi et al., 2000), wird TLR2 aktiviert, NF $\kappa$ B in den Kern transloziert und CD25-exprimiert. Für den Test wurden in eine 24 Loch-Platte pro zu untersuchender Probe 50.000 CHO 3E10hTLR2 Zellen ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium (1 ml) ausgetauscht. Gleichzeitig wurde 10  $\mu$ g der zu untersuchenden Probe (Virusstock oder Zellkulturüberstand) dazugegeben. Als Positivkontrolle wurde 1  $\mu$ l LPS (100 ng/ml), als Negativkontrolle Medium verwendet. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit ATV abgelöst, mit Medium gewaschen und durchflusszytometrisch (FACS Calibur) mit einem CD25 spezifischen Antikörper analysiert.

## **3.2 Virologische Methoden**

### **3.2.1 Präparation von Virusstocks**

Für die Produktion des ED-Stammes wurde ein konfluenter Verozellrasen ( $\sim 2 \times 10^7$  Zellen/ 550 ml Zellkulturflasche) mit einer MOI ("multiplicity of infection", MOI) von 0,01 infiziert. Dazu wurde das vorhandene Medium abgesaugt. Das entsprechende Volumen Virussuspension wurde in 10 ml MEM ohne FKS pro Flasche aufgenommen und auf die Zellen pipettiert. Die Zellkulturflaschen wurden dann für eine Stunde bei 20° C auf einer Wippe inkubiert, bevor das Virus-Inokulum wieder entfernt und durch frisches MEM mit 5 % FKS (20 ml/ Flasche) ersetzt wurde. Die weitere Kultur erfolgte bei 37° C. Sobald 80 bis 90 % der Zellen einen zytopathischen Effekt (CPE, "cythopathic effect") zeigten, wurde das Medium entfernt und die Zellen in 1-2 ml PBS (Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup>-frei) pro Flasche aufgenommen und über Nacht (ü.N.) bei -20° C eingefroren. Nach dem schnellen Wiederauftauen am darauf folgenden Tag wurde der verbliebene Zellrasen mit einem Zellschaber gelöst und die Suspension in 50 ml Röhrchen überführt. Um zellassoziertes Virus freizusetzen und Zelltrümmer zu entfernen, wurde die virushaltige Lösung durch Zentrifugation (3.000 rpm, 30 min, 4° C) von Zelltrümmern befreit und der Überstand in vorgekühlte 2 ml Röhrchen aliquotiert und bei -80° C eingefroren. Der Virustiter wurde durch TCID<sub>50</sub> am darauf folgenden Tag bestimmt. Parallel zur Anzucht der Viren wurden nicht-infizierte Vero-Zellen kultiviert. Statt mit Virus wurden diese mit PBS behandelt und danach,

wie für die Präparation der Virusstocks beschrieben, aufgearbeitet. Diese Präparationen dienten als Mockkontrollen.

### 3.2.2 Titerbestimmung mittels Endpunkttitration nach Spearman und Kärber

Die  $TCID_{50}$  ("tissue culture infectious dose 50 %") gibt die Verdünnung einer virushaltigen Lösung an, die noch ausreicht, die Hälfte einer Zellkultur zu infizieren. Für die Bestimmung der  $TCID_{50}/ml$  mittels der 50 %-Endpunkttitration wurden  $1 \times 10^5$  B95a-Zellen in einer 96-Loch-Zellkulturplatte in 100  $\mu l$  RPMI 1640 ohne FKS pro Napf ausgesät, 8-10 Virusstockverdünnungen in RPMI 1640 ohne FKS auf Eis angesetzt und pro Verdünnungsstufe 8 Näpfe mit je 100  $\mu l$  versetzt. Nach 1-3 h im Brutschrank bei 37° C wurde das Medium abgesaugt und 100  $\mu l$  frisches RPMI 1640 mit 5 % FKS pro Napf dazugegeben. Dann konnte man nach 3-5 Tagen die Anzahl der CPE-positiven Näpfe im Lichtmikroskop bestimmen und entsprechend den Formeln nach Spearman und Kärber (siehe in Formel 3.2.2.1 und 3.2.2.2) den Titer berechnen.

#### 3.2.2.1 Darstellung der Formel zur Berechnung der 50 %-Endpunkttitration nach Spearman und Kärber

Es wurde der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe berechnet, bei der 50 % der Näpfe einen CPE aufweisen.

$$\log TCID_{50} = x_{p-1} + \frac{1}{2} d - d \sum p$$

**Formel 3.1: Formel zur Bestimmung der 50 % Endpunkttitration**

$x_{p=1}$ : dekadischer Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch in allen Ansätzen ein CPE sichtbar ist,  $d$ : dekadischer Logarithmus des Verdünnungsfaktors,  $p$ : Anteil an CPE positiven Näpfen pro Verdünnungsstufe,  $\sum p$ : Summe aller  $p$  ab der Verdünnungsstufe  $x_{p=1}$  und den  $p$ -Werten aller höheren Verdünnungen mit beobachtetem CPE. Berechnet wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe, bei der 50 % der Ansätze einen CPE aufweisen.

### 3.2.2.2 Darstellung der Formel zur Berechnung des Standardfehlers der TCID<sub>50</sub>, berechnet nach Spearman und Kärber

Es wurde der dekadische Logarithmus der TCID<sub>50</sub> berechnet:

$$SE \log TCID_{50} = \sqrt{d^2 \sum \frac{p(1-p)}{n-1}}$$

**Formel 3.2: Formel zur Berechnung des Standardfehlers der TCID<sub>50</sub>**

*d*: dekadischer Logarithmus der Verdünnungsstufe, *p*: Anteil an CPE positiven Näpfen pro Verdünnungsstufe; *n*: Anzahl der Näpfe pro Verdünnungsstufe.

### 3.2.3 Titration der Überstände

Bei geringer Überstandsmenge (1-2 ml) wurde dieser vor Zugabe auf die B95a-Zellen kurz abzentrifugiert (5 min, 1.200 rpm). Größere ÜS-Volumina mussten erst eingeeengt werden. Dafür wurde der gesamte Überstand auf ein 20 % Saccharose-Kissen gegeben und 2 h ultrazentrifugiert (150.000 g, 4° C), bevor das Pellet in 1 ml Puffer aufgenommen und dann zur Titration für 1-2 h auf die B95a-Zellen gegeben wurde (wie in 3.2.2 beschrieben).

### 3.2.4 Infektion adhärenter und semiadhärenter Zelllinien

Am Tag vor der Infektion wurden die Zellen in 6 bzw. in 24 Napf-Zellkulturplatten oder 15 cm Zellkulturschalen ausgesät, sodass sie ü.N. im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> adhären konnten. Die Infektion des etwa 80 % konfluenten Zellrasens erfolgte durch Entfernen des Mediums und Zugabe der entsprechenden Menge an Virus- oder Mocksuspension in 1 ml bzw. 0,5 ml (in 6 bzw. 24 Lochplatten) oder 5-8 ml (in 15 cm Schalen) des jeweiligen zur Kultivierung verwendeten Medientyps ohne FKS. Nach einer Inkubation von 1-2 h bei 37° C wurde im Anschluss das Inokulum abgenommen und durch frisches Medium mit FKS ersetzt, das mit 200 mM FIP versetzt war, um die Zell-Zellfusion zu verhindern (Richardson et al., 1980). Nach 24 oder 48 h Infektionsdauer bei 37° C im Brutschrank wurden die Zellen für die jeweiligen Experimente verwendet.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Transformation von Bakterien

Für die Transformation wurde ein Eppendorf-Cap mit 100 µl kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Bakterien wurde 10-50 ng Plasmid-DNA (in TE Puffer) und, nach je 5 min bei 37° C bzw. 4° C, 1 ml LB-Medium dazu pipettiert. Die Suspension wurde für 15 min bei RT inkubiert und dann 100 min lang bei 37° C und 180 rpm geschüttelt. Je 50 bis 100 µl der Bakteriensuspension wurden auf Ampicillin-Selektionsagar ausplattiert und im Brutschrank bei 37° C ü.N. inkubiert. Gewachsene Einzelkolonien wurden zum Animpfen von Bakterienkulturen für die Präparation von Plasmid-DNA verwendet.

#### 3.3.2 Präparation und Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Für die Maxi-Präparation von Plasmid-DNA wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit verwendet. Mit der von der Agarplatte gepickten Kolonie wurde eine 5 ml Vorkultur angesetzt und für ca. 2 h bei 37° C inkubiert. Die Vorkultur wurde zu 100-200 ml LB-Medium gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37° C wurde die Suspension am nächsten Tag abzentrifugiert (15 min, 10° C, 4.000 rpm). Das Pellet mit der Plasmid-DNA wurde mittels „EndoFree® Plasmid Maxi Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert, anschließend deren Konzentration photometrisch bei 260nm mit dem Eppendorf BioPhotometer bestimmt. Dazu wurde die zu messende DNA-Lösung 1:100 in H<sub>2</sub>O verdünnt und in UVetten vermessen. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgt nach folgender Formel:

$$c[\text{ng / ml}] = OD_{260} \times V \times F$$

**Formel 3.3: Formel zur Berechnung der DNA-Konzentration**

*V: Verdünnungsfaktor, F: Multiplikationsfaktor (für doppelsträngige DNA = 50)*

Durch Einrechnung der eingesetzten Verdünnungsstufe erhält man die Konzentration der DNA. Der Grad der Verunreinigung durch Proteine kann durch Messung der Extinktion bei 280 nm festgestellt werden. Das Verhältnis



OD<sub>260</sub>/ OD<sub>280</sub> gibt den Reinheitsgrad der Nukleinsäure wieder. Reine DNA-Präparationen besitzen einen Quotienten von 1,8 und 2,0.

### **3.3.3 Agarosegelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese wird zur Analyse und Kontrolle von Plasmid-DNA-Präparationen, PCR-Amplifikationen und Restriktionsverdauen benutzt. Hierfür nutzt man die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten negativ geladener Moleküle in einer Agarosematrix, an die ein elektrisches Feld angelegt wird. 1 µg der Plasmid-Präparation bzw. 3 µl des PCR Ansatzes wurden mit 2 µl 6x Agarosegel-Ladepuffer versetzt, mit H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt und auf ein kleinvolumiges (40 ml) 1 %iges TAE-Agarosegel aufgetragen, das mit 5 µl Ethidiumbromidlösung versetzt war. Zur Überprüfung der Größe wurden zusätzlich 5 µl des DNA-Größenstandards aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V in TAE-Puffer. Anschließend wurde die im Agarosegel aufgetrennte DNA mit UV-Licht (280 nm) sichtbar gemacht.

### **3.3.4 Site-directed Mutagenesis**

Für die Mutagenese wurde das QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet, welches die PfuUltra DNA-Polymerase enthält. Bei der in Vitro-Mutagenese werden die PCR-Primer so gewählt, dass sie die gewünschte Mutation in der Mitte tragen. Mit Hilfe der unter Punkt 2.7 beschriebenen Primer wurden im pCG-M Plasmid die potentiellen L-Domänen mutiert und durch vier Alanine ersetzt.

Die Methode dieses Kits besteht aus 3 Schritten:

- 1.) Der mutierte Strang wird synthetisiert, indem man das DNA-template denaturiert, den Primer mit der gewünschten Mutation anhybridisiert und anhand der PfuUltra-DNA-Polymerase zu einem mutierten Plasmid verlängert.
- 2.) Durch den Verdau mit DpnI werden parental hemimethylierte und methylierte DNA-Stränge zerstört und nur die DNA-Stränge, die Mutation enthaltenden, werden selektiert.

- 3.) Schließlich wird die mutierte DNA in superkompetente XL1-Blue Zellen transformiert.

#### Ansatz der Kontroll-Reaktion für die PCR

5,00 µl 10 x Reaktionspuffer  
 2,00 µl (10 ng) des pWhitescript 4.5 kb Kontroll-Plasmid  
 1,25 µl (125 ng) des Oligonucleotid-Kontroll-Primers #1  
 1,25 µl (125 ng) des Oligonucleotid-Kontroll-Primers #2  
 1,00 µl des dNTP Mix  
 38,5 µl ddH<sub>2</sub>O ( ad 50 µl Gesamtvolumen)  
 1,00 µl PfuUltra HF DNA Polymerase (2,5 U/ µl)

#### Ansatz der Mutation-PCRs

5 µl 10 x Reaktionspuffer  
 X µl (50 ng) des dsDNA-Template  
 X µl (125 ng) des mutierten Oligonucleotid-Primers #1  
 X µl (125 ng) des mutierten Oligonucleotid-Primers #2  
 1,0 µl des dNTP Mix  
 ddH<sub>2</sub>O add 50 µl  
 1,0 µl PfuUltra HF DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Beide Reaktionsansätze wurden in der PCR-Maschine mit folgendem Programm amplifiziert

1x { 95° C 30 s  
 18x { 95° C 30 s  
       55° C 1 min  
       68° C 6 min  
 1x { 68° C 10 min

und nach Beendigung auf Eis gestellt.

Im zweiten Schritt wurden nun zum PCR-Ansatz 1 µl des Restriktionsenzym Dpn I (10 U/µl) gegeben und leicht vermischt. Der Reaktionsansatz wurde kurz zentrifugiert und bei 37° C für 1 h inkubiert, um die parentale "supercoiled" dsDNA zu verdauen. Im dritten Schritt wurden die XL1-Blue superkompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und für jede Reaktion 50 µl davon in ein separates Reaktionsgefäß pipettiert. Dann wurden 1 µl der DpnI behandelten DNA und der Kontrollreaktion zu den kompetenten Zellen gegeben und weiter, wie in 3.3.1 beschrieben, transformiert. 50 µl der Transformationsreaktion wurde auf Agarplatten, die Ampicillin als Selektionsantibiotikum enthielten, ausgestrichen.

Für die Mutagenese-Kontrolle wurden 250 µl der Zellen auf LB-Ampicillinplatten mit 80 µg/ml X-gal und 20 mM IPTG ausplattiert. Diese wurden dann ü.N. bei 37° C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag die Kolonien gezählt.

### 3.3.5 Sequenzierung

Zur Sequenzierung und Bestimmung der Richtigkeit bestimmter Sequenzfolgen von Plasmiden wurde der "ABI PRISM 310 Genetic Analyzer" verwendet. Zunächst wurde die zu sequenzierende DNA mit Hilfe von Taq-Polymerase, entsprechenden Primern und einem Gemisch aus unmarkierten dNTPs und fluorchrommarkierten ddNTPs in der PCR-Maschine amplifiziert und markiert. Jedes der vier ddNTPs ist mit einem anderen Fluorchrom markiert. Nach Ablauf der Reaktion befinden sich im Reaktionsgefäß DNA-Fragment-Populationen unterschiedlicher Länge, wobei die Fragmente gleicher Länge an der Abbruchstelle mit dem gleichen Farbstoff markiert sind. Nach Auftrennung dieser Fragmente entsprechend ihrer Größe durch die Kapillargelelektrophorese kann die Sequenz durch Detektion des emittierten Lichts bestimmt und mittels gekoppelter Software analysiert werden. Die Sequenzierung wurde folgendermaßen angesetzt:

- 2 µl Plasmid-DNA (50 ng/µl)
- 1 µl der entsprechenden Sequenzierprimer (5 pmol)
- 1 µl 5 x-BDT-Puffer
- 1 µl BDH

Der Einbau der fluorochrommarkierten ddNTPs für die "one-lane-Sequenzierreaktion" erfolgte für 29 Zyklen in der PCR-Maschine unter folgenden Bedingungen:

96° C: 30 s; 50° C: 15 s; 60° C: 4 min

Anschließend wurde die Sequenzierreaktion bis zur automatischen Sequenzierung bei 4° C gelagert.

### **3.3.6 Transiente Proteinexpression in 293 T-Zellen**

293 T-Zellen wurden je nach Versuch und Plasmid mit Calciumphosphat oder PEI transfiziert.

#### **3.3.6.1 Transfektion mit Calciumphosphat**

Pro 15 cm Zellkulturschale wurden 8-10 x 10<sup>6</sup> 293 T-Zellen ausgesät und ü.N. bei 37° C im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von etwa 70 bis 80 % inkubiert. Pro Schale zu transfizierender Zellen wurden in einem FACS-Röhrchen 200 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> mit 15-25 µg DNA gemischt und auf 2 ml mit 2x HBS aufgefüllt. Dabei sollte mit einer Pasteurpipette gemischt werden, indem man Luft in die Lösung drückt. Der DNA-Mix wurde dann direkt auf die Zellen gegeben, deren Medium vorher abgesaugt war. Nach 2-3 maligem Schwenken der Schale wurde diese mit frischem Medium auf 10 ml aufgefüllt. Nach 6-10 h wurden die Zellen erneut gewaschen, d.h. der Transfektionsmix wurde abgenommen, die Zellen einmal mit Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS gewaschen, bevor sie frisches Medium (MEM, 10 % FKS) bekamen. Die Zellen wurden dann je nach Versuch 24 bis 72 h bei 37° C inkubiert.

#### **3.3.6.2 Transfektion mit PEI (Polyethylenimine)-Transfektionsreagenz**

293 T-Zellen wurden in einer 6-Napf-Zellkulturplatte ausgesät (1 x 10<sup>6</sup> Zellen) und ü.N. bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 70 bis 80 % erreicht hatten, erfolgte die Transfektion. Dafür wurden pro Napf zu transfizierender Zellen in einem 1,5 ml-

Reaktionsgefäß 150 µl NaCl (150 mM) mit 18 µl PEI gemischt. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 150 µl NaCl mit einer Gesamtmenge von 7 µg Plasmid-DNA versetzt. Beide Gemische wurden 5 min lang bei RT inkubiert, anschließend miteinander gemischt und nach einer Inkubation von 30 min bei RT direkt auf die Zellen gegeben, bevor der Napf auf 1 ml mit frischem Medium (MEM + 10 % FKS + Antibiotika) aufgefüllt wurde. Nach 4-6 h wurde der Transfektionsmix abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium versorgt.

### **3.3.7 Transiente Proteinexpression in HeLa-Zellen mit Lipofectamine®-Transfektionsreagenz**

In Platten mit 6 Vertiefungen je  $2 \times 10^5$  bzw. in Platten mit 24 Vertiefungen je  $7,5 \times 10^4$  wurden HeLa-Zellen ausgesät und ü.N. bei 37° C zur Ausbildung eines etwa 90-95 % konfluenten Zellrasens kultiviert. Am folgenden Tag wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 50 µl serum- und antibiotikafreies Opti-MEM vorgelegt und mit 0,5-1 µg der Plasmid-DNA gemischt. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 2 µl Lipofectamine®-Transfektionsreagenz in 50 µl serum- und antibiotikafreiem Opti-MEM gelöst. Beide Ansätze wurden vor der Zusammenmischung für 5 min bei RT inkubiert. Nach 20 min Inkubation wurde der Transfektionsmix in die Näpfe gegeben, die einmal gewaschen und mit 400 µl frischem Medium (MEM/ 5 % FKS mit Antibiotika) versehen wurden. Nach 2-3 h Inkubation wurden die Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen und mit 1 ml MEM/ 5 % FKS/ Antibiotika bedeckt und für 24 bzw. 48 h im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

## **3.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.4.1 Herstellung und Konzentrationsbestimmung von Zelllysaten**

Transfizierte, infizierte oder unbehandelte Zellen wurden zur Herstellung von Zelllysaten mit PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) gewaschen. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgenommen und 3 ml PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) in jede Vertiefung einer 6-Napf-Zellkulturplatte (oder 10 ml in 15 cm Zellkulturschale) pipettiert. Adhärente Zellen wurden mit Zellschabern von der Oberfläche

gelöst (HeLa), während semiadhärente Zellen (293 T) mit Hilfe einer Pipette abgespült wurden. Die Zellsuspension wurde in 15 ml Röhrchen überführt und 10 min lang bei 1.600 rpm und RT zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 200-800 µl NP40-Lysepuffer versetzt, mit Proteaseinhibitor-Cocktail resuspendiert, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße transferiert, 45 s lang gevortext und 20 min lang im Eisbad lysiert. Um die Zellkerne und -trümmer zu entfernen, wurden die Proben 20 min lang bei 13.000 rpm und 4° C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mittels des Bicinchoninic Acid (BCA)-Kits bestimmt.

Dafür wurde eine 1:50 Verdünnung von Kupfer(II)Sulfat in BCA hergestellt. Zu 995 µl der Verdünnung wurden 5 µl der zu untersuchenden Probe (bzw. des Proteinstandards (1 mg/ml) BSA) gegeben und für 15 min bei 60° C in den Heizblock gestellt. Als Leerwert diente ein Ansatz, in den 5 µl des Lysepuffers eingesetzt wurde. In Anwesenheit von Protein wird bei einem hohen pH-Wert  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, das mit dem BCA-Reagenz violett gefärbte Chelate bildet, die dann im Photometer detektiert werden. Nach der Überführung der Proben in Küvetten misst man im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm deren Proteingehalt.

### 3.4.2 Azeton-Präzipitation von Proteinen

Eine Proteinlösung wurde mit doppeltem Volumen an eiskaltem Azeton versetzt, gemischt und mindestens 60 min lang bei -20° C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (20 min, 13.000 rpm, 4° C) wurde der ÜS vorsichtig abgenommen und das Sediment in dem gewünschten Volumen SDS-Probenpuffer resuspendiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### 3.4.3 Fraktionierung Detergenz-resistenter Membranfraktionen

Transfizierte oder infizierte 293 T- oder HeLa-Zellen wurden mit 10 ml  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS (pro 3 Vertiefungen einer 6-Napfplatte) durch Auf- und Abpipettieren abgelöst, in 15 ml-Röhrchen überführt und gewaschen (10 min, 350 g, RT). Das Zellsediment wurde in 200 µl Brij-98-Lysepuffer resuspendiert, gevortext und die Zellen 20 min lang auf Eis lysiert. Dieses Zelllysate wurde mit 600 µl 60 %iger Saccharose-Lösung (in NTE) versetzt, in ein 4 ml Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt und nacheinander mit 2,5 ml

30 %iger und 800 µl 2,5 %iger Saccharose-Lösung vorsichtig überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 350.000 g 16 h lang bei 4° C. Vom Boden des Gradienten her wurden 0,5 ml Fraktionen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und mit Azeton präzipitiert (siehe Abschnitt 3.4.2). Die Proben wurden nach Versetzen mit 30 µl SDS-Probenpuffer für die weitere Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese (3.4.6) mit anschließendem Western Blot (3.4.7) eingesetzt.

#### **3.4.4 Cholesterin-Depletion in infizierten Zellen**

Nach Infektion von 293 T-Zellen mit MV (MOI 3) wurden nach 30 h die Zellen gewaschen und mit 10 mM  $\beta$ -MCD (in Medium) für 1 h bei 37° C inkubiert. Nach dem erneuten Absaugen des Überstandes wurde zu den Zellen frisches Medium gegeben, das nur 2,5 % FKS enthielt, um eine Rückgewinnung von Cholesterin aus dem FKS zu minimieren. Zusätzlich enthielt das Medium Mevalonolactone/ Mevastatin (Imhoff et al., 2007), die die Neusynthese von Cholesterin verhindern. Nach weiteren 8-10 h wurde der Überstand geerntet, die Lysate wie 3.4.1 beschrieben hergestellt und auf ein 15 % iges SDS-Gel aufgetragen.

#### **3.4.5 Virus- bzw. *Virus-like particle*-Freisetzung**

Nach 48 h Infektion oder 72 h Transfektion wurden die Zell-Überstände (aus 4 Vertiefungen einer 6-Napf-Kulturplatte, oder einer 15 cm Schale pro Ansatz) in einem 15 ml Röhrchen gesammelt, zuerst niedertourig (3.000g, 10 min, 4° C) und dann durch ein 20 %iges Saccharosekissen (0,5 ml in NTE) ultrazentrifugiert (150.000 g, 2 h, 4° C). Das Sediment wurde in 20 µl SDS-Probenpuffer und 30 µl PBS mit Proteinkinase-Inhibitor resuspendiert und bis zur Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot bei – 80° C gelagert. Die Zellen eines Napfes wurden wie unter Punkt 3.4.1 beschrieben lysiert und dienten als Expressionskontrolle.

### 3.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine der Überstände und der Lysate wurde eine diskontinuierliche SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem fünfzehnprozentigen Trenngel und Sammelgel benutzt. Das Trenngel bestand aus folgenden Komponenten:

1,5 M Tris/ HCl , pH 8,7	8,0 ml
Wasser	10,8 ml
Acrylamid-4K-Lsg (30 %)	12,8 ml
20 % SDS	160 µl
10 % APS	280 µl
TEMED	10 µl

Überschichtung des Trenngels mit einem Sammelgel nach der Polymerisation:

1 M Tris/ HCl , pH 6,8	1,25 ml
Wasser	6,0 ml
Acrylamid-4K-Lsg	1,3 ml
20 % SDS	50 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl

Die zu analysierenden Proben wurden in einen reduzierenden 6-fach Probenpuffer aufgenommen und für 5 min auf 100° C erhitzt. Pro Spur wurden 30 µg Lysat aufgetragen.

Die Gelkammer wurde aufgebaut und mit SDS-Laufpuffer gefüllt, die Proben aufgetragen und bei 50 mA pro Gel für etwa 4 h aufgetrennt.



### 3.4.7 Western-Blot-Analyse und Quantifizierung

Hierfür wurden die aufgetrennten Proteine durch einen Elektrobplot auf Nitrozellulose übertragen. Das Gel wurde zunächst im Kathodenpuffer äquilibriert und der Halbtrockenblot aufgebaut.

Auf die mit Wasser befeuchtete Kathodenplatte wurden zwei in Kathodenpuffer getauchte 3MM-Whatman-Papiere gelegt, die mit dem Gel bedeckt wurden, bevor eine in 30 mM Anodenpuffer getauchte Nitrozellulosemembran aufgelegt wurde. Anschließend folgten zwei Schichten 3MM Whatmannpapier aus je zwei Lagen, die in 30 mM- bzw. in 300 mM-Anodenpuffer eingetaucht waren. Der gesamte Aufbau sollte luftblasenfrei erfolgen. Nach dem Schließen der Blotkammer wurden für eine Stunde bei 100 mA die Proteine transferiert.

Die Nitrozellulose wurde dann zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 20 min in mit 10 % Trockenmilchpulver versetztem PBS/ Tween geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/ Tween erfolgte ein Immunonachweis der Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit spezifischen monoklonalen Antikörpern. Nach 1 h Inkubation bei RT oder nach 12 h bei 4° C wurde der Blot dreimal mit PBS/ Tween gewaschen und mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper erneut für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneuten Waschschrritten konnte man mittels des ELC<sup>TM</sup>-Systems die Proteine nachweisen. Die Nitrozellulosemembran wurde dazu in einem 1:1 Gemisch der beiden ELC-Komponenten für 1 min inkubiert, in Folie gewickelt und in eine Filmkassette überführt. Die enzymatische Aktivität der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase setzt ein im Detektions-Kit vorhandenes Substrat unter Lichteinwirkung (Photonen) um, welches zur Schwärzung eines angelegten Röntgenfilms führt. Die spezifischen Banden wurden durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert, und, wenn angegeben, digitalisiert und mit der AIDA-Software von Raytest ausgewertet.

Für die Quantifizierung wurde die Menge des M-Proteins im Überstand (ÜS) durch die gesamte Menge des M-Proteins, d.h. Überstand und Lysat dividiert. Für einen besseren Vergleich und zur Gleichstellung der verschiedenen Versuche wurde dann für den Kontrollwert das Ergebnis gleich 100 % gesetzt.

### **3.5 Durchflusszytometrie**

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden durchflusszytometrisch in einem Becton-Dickinson FACScan™ unter Verwendung der Lysis II™-Software aufgenommen und mittels der CellQuest-Software™ ausgewertet.

Durch die Verwendung des “Fluorescence activated cell scanner“ (FACS) kann man Zellen mit Hilfe des Laserlichts anhand morphologischer Kriterien wie Größe (im “forward scatter“ = FSC) und Granularität (im “side scatter“ = SSC), sowie exprimierter Antigene (nach Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen) unterscheiden. Durch die Messungen der mittleren Fluoreszenzintensität ist es möglich, Aussagen über die Menge an pro Zelle vorhandenem Antigen zu treffen.

#### **3.5.1 FACS Oberflächenfärbung**

Je  $10^5$  Zellen wurden gut resuspendiert in ein FACS-Röhrchen gegeben, mit je 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und 5 min bei 1.600 rpm und 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl Primärantikörperlösung (mit der entsprechenden Antikörperverdünnung in FACS-Puffer) aufgenommen, für 30 min in Dunkelheit bei 4° C inkubiert und nach Zugabe von 1 ml FACS-Puffer 5 min bei 1.600 rpm zentrifugiert. Nach Resuspension in 50 µl Sekundärantikörperlösung wurden die Zellen erneut für 30 min in Dunkelheit bei 4° C inkubiert, anschließend zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und jeweils für 5 min bei 1.600 rpm und 4° C zentrifugiert.

Unmittelbar vor der Analyse wurden die Zellen in einigen Experimenten mit 25 µl einer 7-AAD-Lösung versetzt, um tote Zellen, die den Farbstoff aufnehmen, von lebenden zu unterscheiden.

#### **3.5.2 Intrazelluläre FACS-Färbung**

$1 \times 10^5$  Zellen wurden zunächst mit 4 % Paraformaldehyd in  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  freiem PBS für 20 min auf Eis fixiert und nach dem Waschen mit 1 ml FACS-Puffer zur Zellpermeabilisierung mit 1 ml Saponin-Puffer für 10 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden 5 min bei 1.600 rpm und 4° C zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl abgesaugt. Die Zellen wurden mit 50 µl einer spezifischen Antikörperverdünnung (siehe 2.5.4) (verdünnt in Saponin-

Puffer) für 30 min bei 4° C in Dunkelheit inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1 ml Saponin-Puffer und Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen für weitere 30 min bei 4° C im Dunkeln mit einem Zweitantikörper (siehe 2.5.4) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Saponin-Puffer und einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und analysiert.

### 3.5.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Färbung von Proteinen wurden HeLa-Zellen in 24 Napf-Zellkulturplatten, auf deren Boden sich Deckgläschen befanden, ausgesät, infiziert oder transfiziert, und nach 24 h einmal mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 20 min mit 4 % igem Paraformaldehyd (in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS) fixiert, ein weiteres Mal vorsichtig gewaschen, mit Saponin-Puffer permeabilisiert (20 min, RT) und wieder gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Zellen 20 min lang mit einer 5 %igen BSA-Lösung (in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS) behandelt. Die Färbung mit Antikörpern dauerte jeweils 1 h bei 37° C (100 µl Antikörperlösung pro Napf). Nach jedem Färbeschrift wurden die Zellen dreimal mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen. Zunächst erfolgte die Inkubation mit dem unmarkierten Primärantikörper, gefolgt von einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper. Bei Doppelfärbungen wurde nacheinander mit dem ersten Primärantikörper und dem dazugehörigen Zweitantikörper und danach mit dem zweiten Primärantikörper und dem entsprechenden zweiten Zweitantikörper gefärbt. Beide Primärantikörper stammten aus unterschiedlichen Spezies und die dazugehörigen Zweitantikörper waren verschieden gekoppelt (Alexa 488/594). Bei Verwendung von zwei Primärantikörpern der gleichen Spezies wurde ein Primärantikörper mit Hilfe eines Labeling Kits direkt gekoppelt (3.5.4). Anschließend wurden die Zellen mit Fluoromount eingedeckt und mit dem konfokalen Lasermikroskop unter Verwendung der 488- und 564-nm-Laserkennlinien (Argon/Helium-Neon-Laser) untersucht und dokumentiert.

### 3.5.4 Labeling Kit

Um zwei Primärantikörper aus der gleichen Spezies benutzen zu können, wurde mit Hilfe des Zenon Mouse IgG Labeling Kits der monoklonale Maus-Antikörper der Firma Chemicon direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 594 gekoppelt. Dafür wurde 1 µl des Antikörpers mit 10 µl Labeling Reagenz und nach einer Inkubation von 5 min mit 10 µl der Blocking Reagenz des Kits behandelt. Danach musste der Antikörper innerhalb der nächsten 30 min eingesetzt werden.

### 3.5.5 Kolokalisationskoeffizient-Bestimmung

Um den Grad einer Kolokalisation zwischen zwei Proteinen in einer Zelle zu quantifizieren, benutzte man die Software „LSM510 Version 3.2. SP2“ von Zeiss. Diese beinhaltet eine Funktion, die es erlaubt, zwei digitale Bilder aus verschiedenen Farbkanälen zu überlagern und auf Kolokalisationen der beiden Farbsignale hin zu analysieren. Der Kolokalisationskoeffizient R misst dabei die Kolokalisation zweier verschiedener Farben (rot/grün) in der 'region of interest' (ROI) und zwar unabhängig der Signalstärke. Als ROI wurden im Bild alle roten Pixel (Alexa594) mit einem Signal (8 bit, 0-255), das höher als der Schwellenwert war, definiert ( $S_i(\text{rot})$ ). Der Schwellenwert war abhängig vom Signal-/Rauschanteil und dem Signalanteil zum Hintergrundwert. Die ROI ist in den Beispielbildern mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Anzahl der grünen Pixel (Alexa488), die größer als der Schwellenwert in der ROI zu finden waren, umfassten den zweiten Teil des Kolokalisationskoeffizienten und wurden als  $S_i(\text{rot, grün})$  deklariert. Der Koeffizient R ist definiert als:

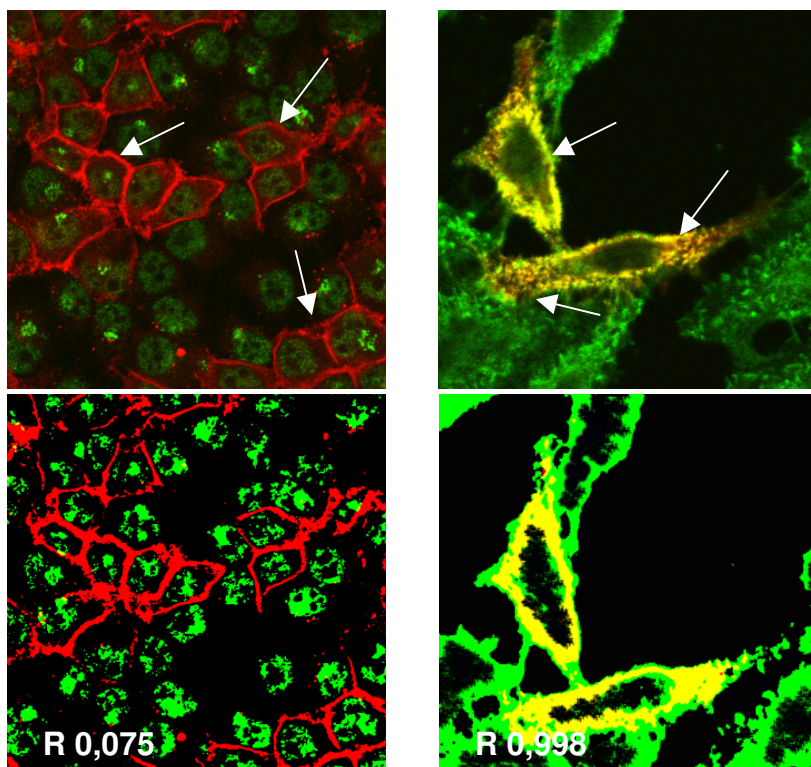
$$R = \frac{\sum_i S_i(\text{rot/grün})}{\sum_i S_i(\text{rot})}$$

**Formel 3.4: Formel zur Bestimmung der Kolokalisationskoeffizienten**

*R = der Kolokalisationskoeffizient,  $\sum_i S_i(\text{rot/grün})$  = Summe der grünen Pixel in der ROI,  $\sum_i S_i(\text{rot})$  = Summe der roten Pixel, die über dem Schwellenwert liegen (gleichzeitig die Definition für die ROI).*

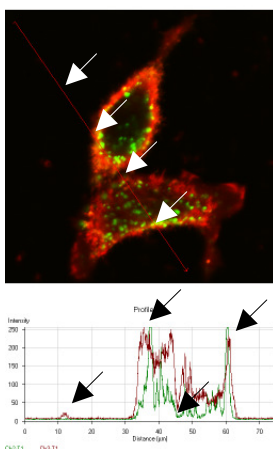
Die Analyse für die Schwellenwerte für den roten bzw. den grünen Hintergrund wurden experimentell mittels der LSM Software ("tool profile") ermittelt (Abb. 3.2). Für den Koeffizienten R wurden mindestens 35 Zellen analysiert. Nach eigener Definition wurden Werte unter 0,5 als eine negativ (oder keine), zwischen 0,5 und 0,7 als eine geringe oder transiente und

größer als 0,7 als eine signifikante Kollokalisierung bewertet. Die Abb. 3.1 zeigt Beispiele, links für keine und rechts für eine stattgefundene Kollokalisierung. Die obere Reihe zeigt die Originalbilder, die untere Bilder der Computerauswertung, in denen sich die Kollokalisierung (unabhängig der Intensität) als dunkelgelb darstellt.



**Abb. 3.1: Beispielaufnahmen für die Erfassung des Kollokalkationskoeffizienten  $R$**

Dafür wurden als ROI im Bild alle roten Pixel (Alexa594), bei denen das Signal (8 bit, 0-255) höher als der Schwellenwert war, definiert. Die ROI ist in den oberen Bildern mit Pfeilen gekennzeichnet. In den unteren Bildern, in denen der Hintergrund abgezogen wurde und die Kollokalisierung gelb dargestellt ist, sind weiß die errechneten Koeffizienten dargestellt. Das linke Bild ist ein Bsp. dafür, dass keine ( $R=0,075$ ), das rechte dafür, dass eine Kollokalisierung ( $R=0,998$ ) stattfindet.



**Abb. 3.2: Beispiel einer Profilanalyse**

Die Errechnung der Schwellenwerte für den roten bzw. den grünen Hintergrund wurden experimentell mittels eines Profils ermittelt. Die weißen Pfeile zeigen verschiedene Punkte des Profils (rote Linie). Aufgrund der unten im Diagramm abgebildeten Werte konnte der Hintergrund berechnet werden.

## 4 Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Versuche dienen der näheren Untersuchung des Prozesses der Partikelfreisetzung. Mit welchen Proteinen interagiert das MV-M-Protein vor und während der Freisetzung? Gibt es eine Interaktion mit dem ESCRT-System? Um mit den ESCRT-Proteinen interagieren zu können, müsste das MV-Matrix-Protein hochkonservierte sogenannte L-Domänen besitzen.

### 4.1 Bestimmung potentieller L-Domänen in der MV-M-Sequenz

Betrachtet man die Sequenz des Matrix-Proteins des Edmonston-Stammes in Abb. 4.1, so gibt es fünf Motive, die potentielle L-Domänen darstellen könnten. Dabei sind das YMFL-Motiv (Position aa 52-55) und das PSVP-Motiv (Position aa 311-314) am ähnlichsten zu den bisher bekannten und untersuchten L-Domänen. Das YMFL-Motiv gleicht dem YxxL-Motiv, das mit dem Aip-1 Protein, welches die Verbindung zwischen ESCRT-I- und ESCRT-II-Komplex darstellt, interagiert. Die PSVP-Sequenz gleicht bis auf eine AS (Aminosäure) dem PT/SAP-Motiv. Hier ist nur ein Valin gegenüber einem Alanin ausgetauscht. Die anderen möglichen Motive, das PIQP (Position aa 20-23), das PTTY (Position aa 23-26) und das FKVL (Position aa 332-335) zeigen nur entfernte Ähnlichkeiten mit dem PPxY und den FVIP-Motiv.

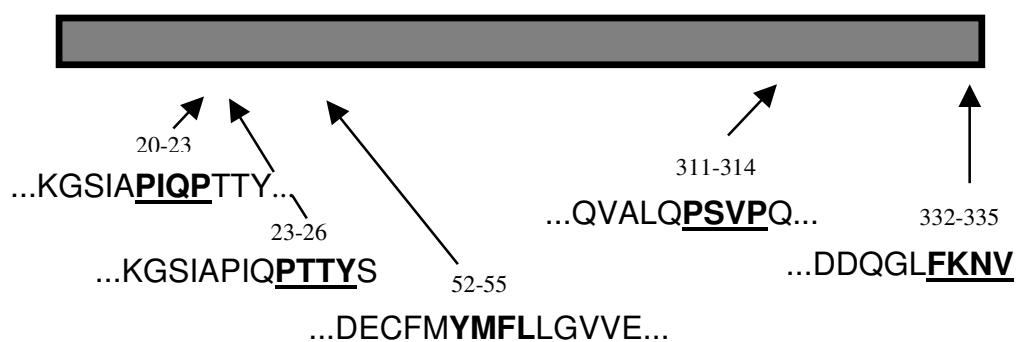
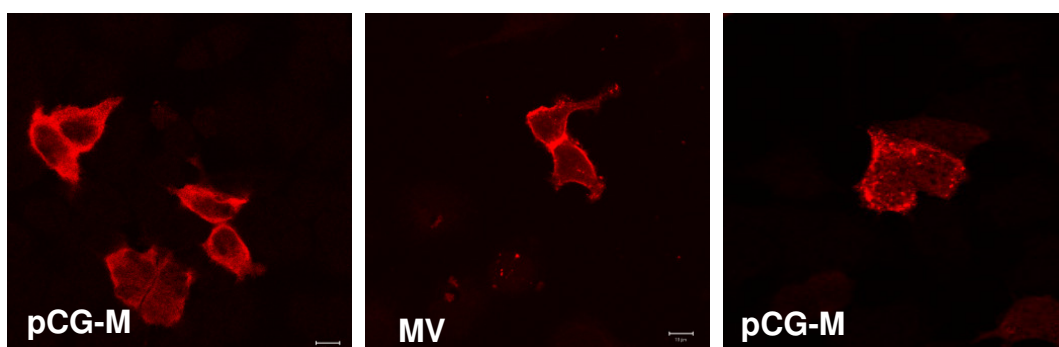


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der M-Sequenz des Edmonston-Stammes, in der die potentiellen L-Domänen hervorgehoben sind.

#### 4.1.1 Überprüfung der Kollokalisierung der ESCRT-Proteine mit dem MV-M-Protein

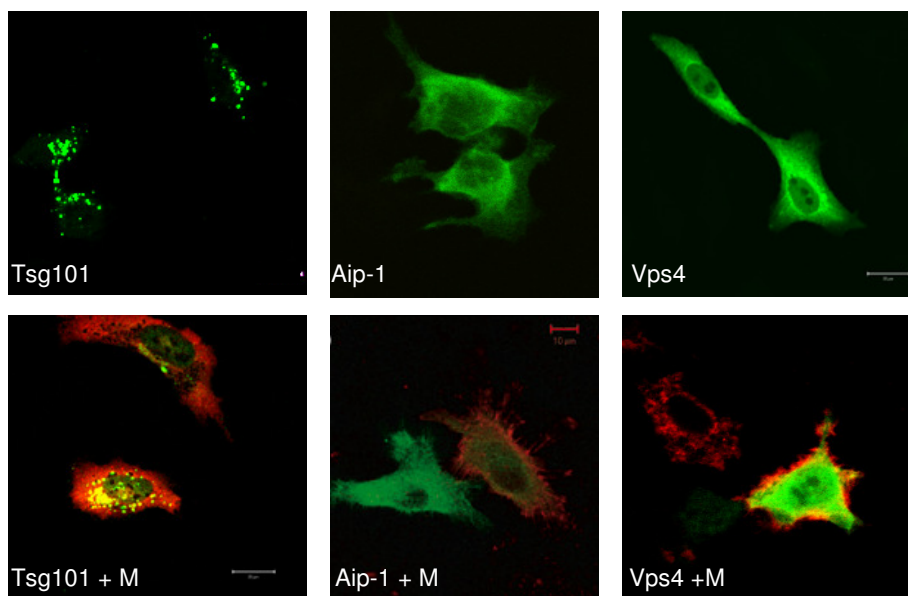
Die Sequenzanalyse in 4.1 zeigte u.a. zwei potentielle Motive innerhalb des M-Proteins, die mit Komponenten des ESCRT-Komplexes interagieren könnten. Um eine mögliche Interaktion des MV-M-Proteins mit den ESCRT-Komponenten zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen gleichzeitig mit Plasmiden, die für das MV-M-Protein oder verschiedene ESCRT-Proteine kodieren, transfiziert. Als möglicher Bindungspartner wurde neben Tsg101 und Aip-1 zusätzlich noch Vps4 untersucht. Vps4 ist eine ATPase und terminiert die Interaktion des ESCRT-Komplexes mit seinen Bindungspartnern. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das MV-M-Protein rot angefärbt. Die ESCRT-Proteine besitzen einen YFP-tag und autofluoreszieren nach Anregung grün. Ziel war eine Kodetektion des M-Proteins und der ESCRT-Komponenten im allgemeinen, spezifisch aber an der Plasmamembran, wo die Partikelfreisetzung stattfindet. In Abwesenheit kotransfizierter Proteine lokalisiert nach 24 h der Großteil des MV-M-Proteins an der Plasmamembran, im Zytoplasma dagegen konnte nur ein kleiner Teil detektiert werden. An der Plasmamembran zeigte das M-Protein eine sehr gleichmäßige Verteilung. Das Gleiche gilt auch für MV-infizierte Zellen (24 h p.i.). In etwa 20-35 % der Fälle zeigte das M-Protein aber auch eine punktförmige Verteilung an der Plasmamembran (Abb. 4.2. rechts).



**Abb. 4.2: Verteilung des M-Proteins in transfizierten bzw. infizierten Zellen**

HeLa-Zellen wurden ausgesät und mit dem pCG-M-Plasmid transfiziert bzw. mit ED infiziert (MOI 0,5). Das M-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Allein exprimiert, sowie in infizierten Zellen befindet sich nach 24 h der Großteil des M-Proteins an der Plasmamembran, wogegen nur ein geringer Teil im Zytoplasma detektiert werden konnte. Unten rechts in den Aufnahmen ist der Maßstab angegeben: 10  $\mu$ m (linkes und mittleres Bild).

Im Gegensatz zum M-Protein zeigten die ESCRT-Proteine eine rein zytoplasmatische Verteilung. Während das Tsg101 in Aggregaten vorlag, zeigten das Aip1 und das Vps4 eine diffuse Verteilung im Zytoplasma. Kofransfiziert (Abb. 4.3) kolokalisiert das Tsg101 mit dem MV-M-Protein im Zytoplasma der Zelle, wird jedoch nicht an die Plasmamembran rekrutiert. Keine Kolokalisation konnte zwischen dem M-Protein und Aip-1 festgestellt werden, während mit der ATPase Vps4 eine Kolokalisation im Zytoplasma und zu einem geringen Anteil (5-10 %) an der Plasmamembran zu sehen war.



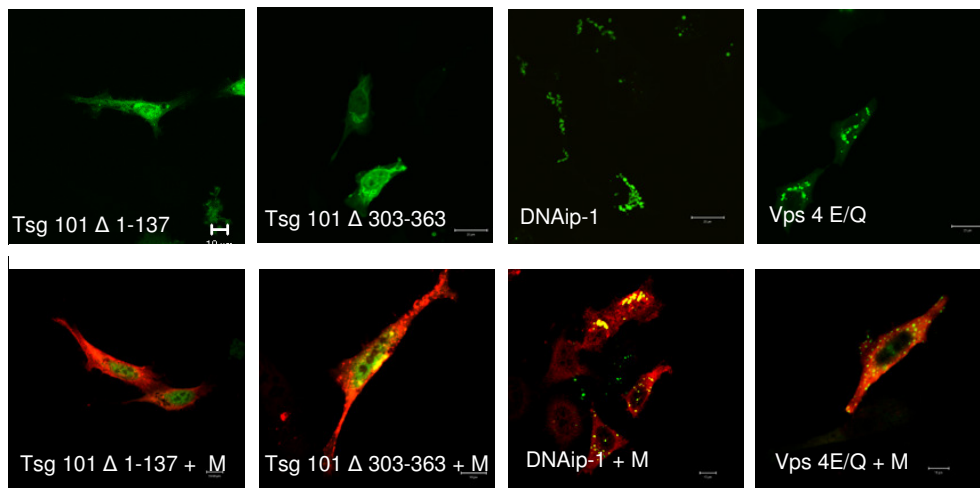
**Abb. 4.3: Verteilung der ESCRT-Proteine allein und zusammen mit dem M-Protein**

HeLa-Zellen wurden doppelt mit den für das MV-M-Protein und verschiedene ESCRT-Proteine kodierenden Plasmiden transfiziert. Das M-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Die ESCRT-Proteine leuchten durch ihr YFP-tag im Fluoreszenzmikroskop grün. Die Gelbfärbung zeigt eine Überlagerung des roten und grünen Signals an, wenn beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander vorliegen. Obere Reihe von links nach rechts: Tsg101, Aip-1, Vps4 allein exprimiert (grün), untere Reihe: Doppeltransfektion Tsg101, Aip-1, Vps4 (grün) zusammen mit MV-M-Protein (rot). Unten rechts ist in einigen Aufnahmen der Maßstab (10  $\mu$ m) angegeben.

Überexpression von Vps4 E228→Q führte in Übereinstimmung mit den publizierten Daten, zu den typisch vergrößerten endosomalen Kompartimenten (Bishop and Woodman, 2000, Tanzi et al., 2003). Die dominant negative Mutante (DN) von Aip-1 zeigte ebenfalls eine punktförmige Verteilung im Zytoplasma, die Mutante von Tsg101  $\Delta$ 1-137 lokalisierte perinukleär, die Tsg101  $\Delta$ 303-363 Mutante zytoplasmatisch (Freed and Mouland, 2006). Wurden die Zellen gleichzeitig mit Plasmiden,



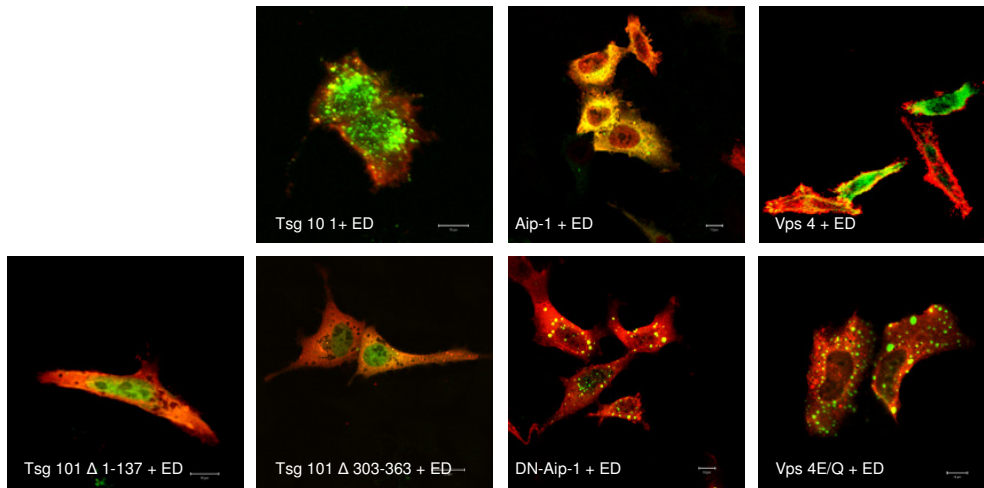
die das M-Protein bzw. die dominant negativen Mutanten der jeweiligen ESCRT-Proteine exprimierten, transfiziert (Abb. 4.4), konnten unterschiedliche Ergebnisse dokumentiert werden. Während keinerlei Kolokalisation zwischen dem M-Protein und der Tsg101  $\Delta$ 1-137 Mutante festgestellt werden konnte, kolokalisierte Tsg101  $\Delta$ 303-363, DNAip-1 und Vps4 E228→Q partiell mit dem M-Protein im Zytoplasma.



**Abb. 4.4: Verteilung der dominant negativen(DN)-ESCRT-Proteine allein und zusammen mit dem M-Protein**  
 HeLa-Zellen wurden ausgesät und doppelt mit Plasmiden, die für das MV-M-Protein und für die verschiedenen DN-ESCRT-Proteine kodieren, transfiziert. Das M-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Die DN-ESCRT-Proteine autofluoreszieren nach Anregung durch ihr YFP-tag im Fluoreszenzmikroskop grün. Die Gelbfärbung zeigt eine Überlagerung des roten und grünen Signals an, wenn beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander vorliegen. Obere Reihe von links nach rechts: Tsg101  $\Delta$ 1-137, Tsg101  $\Delta$ 303-363, DN-Aip-1, Vps4 E228→Q allein exprimiert (grün), untere Reihe: Doppeltransfektion Tsg101  $\Delta$ 1-137, Tsg101  $\Delta$ 303-363, DN-Aip-1, Vps4 E228→Q (grün) zusammen mit MV-M-Protein (rot). Unten rechts ist in den Aufnahmen der Maßstab (10  $\mu$ m) angegeben.

Um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Assoziation des M-Proteins mit den ESCRT-Komponenten gibt, wenn dies nicht Plasmid-abhängig sondern im Kontext einer Infektion exprimiert wird, wurden HeLa-Zellen zunächst mit den ESCRT-Proteinen transfiziert und 4 h später mit ED (MOI 0,5) infiziert (24 h).

Mit einer Ausnahme ergaben sich jedoch keinerlei Unterschiede bezüglich der Kolokalisation von M und den ESCRT-Komponenten zu den mit den Plasmiden erhaltenen Daten. In infizierten Zellen ist im Gegensatz zu M-Protein transfizierten Zellen eine Kolokalisation mit Aip-1 zu erkennen, jedoch nur im Zytoplasma und nicht an der Plasmamembran.



**Abb. 4.5: Verteilung der ESCRT-Proteine (WT und DN) in ED infizierten HeLa-Zellen**

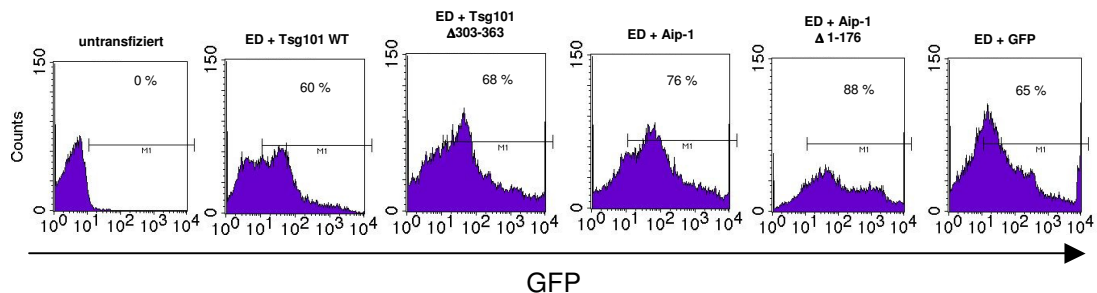
HeLa-Zellen wurden ausgesät und zunächst mit den verschiedenen WT bzw. DN-ESCRT-Proteinen kodierenden Plasmiden transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit ED (MOI 0,5) infiziert. Nach der Fixierung wurde das M-Protein mit dem  $\alpha$ -M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Die WT bzw. die DN-ESCRT-Proteine leuchten durch ihr YFP-tag im Fluoreszenzmikroskop grün. Die Gelbfärbung zeigt eine Überlagerung des roten und grünen Signals an, wenn beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander vorliegen. Obere Reihe von links nach rechts: Tsg101 WT, Aip-1, und Vps4 + ED, untere Reihe: Tsg101  $\Delta$ 1-137, Tsg101  $\Delta$ 303-363, DN-Aip-1 und Vps4 E228→Q + ED. Unten rechts in den Aufnahmen ist der Maßstab (10  $\mu$ m) angegeben.

Insgesamt gesehen konnte in infizierten oder in M-transfizierten Zellen eine Kolo-kalisation des M-Proteins mit Tsg101, Aip-1 und Vps4 detektiert werden, die abgesehen von Vps4 nicht an der Plasmamembran stattfand. Damit ist das M-Protein nicht in der Lage ESCRT-Proteine dorthin zu rekrutieren.

#### 4.1.2 Einfluss dominant negativer ESCRT-Proteine auf die MV-Freisetzung

Die Freisetzung ESCRT-abhängiger Viren konnte durch die Überexpression unterschiedlicher dominant negativer ESCRT-Proteine stark reduziert werden (Garrus et al., 2001, Demirov et al., 2002, Silvestri et al., 2007). Um deren Einfluss auf die MV-Freisetzung zu untersuchen, wurden 293 T-Zellen mit Plasmiden, die das jeweilige Wildtyp-Protein oder dessen dominant negative Mutante (Tsg101 und Aip-1) exprimieren, sowie als Negativkontrolle mit einem Plasmid, das nur GFP exprimiert, transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit MV (MOI 0,5) infiziert und nach weiteren 24 h die Überstände geerntet und die Lysate, wie 3.4.5 und 3.4.1 beschrieben, hergestellt und im Western Blot analysiert. Zur Überprüfung der jeweiligen Transfektionsrate wurde im Durchflusszytometer das Signal des

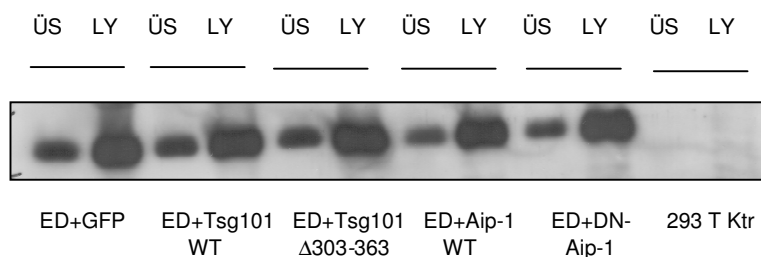
GFP/YPF-Tags der ESCRT-Proteine im FITC Kanal gemessen. Ein Beispiel ist in Abb. 4.6. zu sehen.



**Abb. 4.6: Bestimmung der Transfektionsrate via FACS**

24 h nach der Transfektion der Zellen mit den verschiedenen ESCRT-Proteinen wurde die GFP-Expression im FACS gemessen. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte 293 T-Zellen. Die FACS Bilder zeigen, dass zwischen 60 und 90 % der Zellen die jeweiligen ESCRT-Proteine exprimieren.

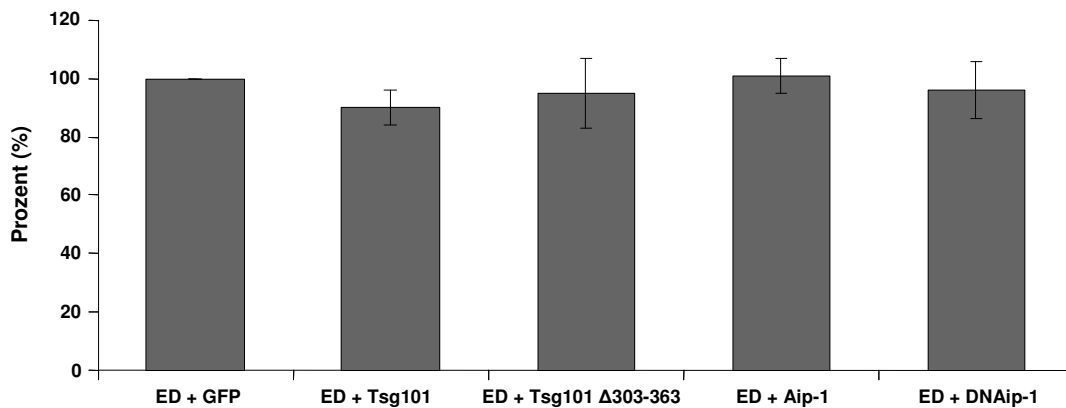
Insgesamt war in allen Experimenten die Transfektionsrate mindestens 60 % (Tsg101) und erreichte ein Maximum von 88 % (Aip-1). Eine hohe Transfektionsrate ist wichtig, damit ein möglicher Einfluss der Überexpression der ESCRT-Proteine auf die Virusfreisetzung nicht durch untransfizierte Zellen maskiert wird. Betrachtet man das Verhältnis der M-Proteinmenge im Überstand zur Gesamtmenge des M-Proteins, kann man keinen Unterschied feststellen zwischen den Versuchsansätzen mit Zellen, die wildtypische ESCRT-Proteine exprimieren, solchen die dominant negative ESCRT-Proteine exprimieren und Zellen, die zur Kontrolle nur mit einem GFP-Plasmid transfiziert wurden.



**Abb. 4.7: Freisetzung von Viruspartikeln in 293 T-Zellen, die verschiedene ESCRT-Proteine überexprimieren**  
293 T-Zellen wurden mit Tsg101 bzw. mit Aip-1 WT oder den dazugehörigen dominant negativen Mutanten transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit ED (MOI 0,5) infiziert. Die Überstände der Zellen wurden nach 24 h ultrazentrifugiert und das sedimentierte Material zusammen mit 30 µg der aus den Zellen hergestellten Zelllysate (LY) gelelektrophoretisch in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Im Western Blot wurden die M-Proteine mit dem α-M-Antikörper (MAB8910) nachgewiesen.

Dies wird durch die Quantifizierung in der Abb 4.8 bestätigt. Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis zwischen der Menge des M-Proteins im Überstand (ÜS) und der Gesamtmenge des M-Proteins, d.h. Überstand und

Lysat, berechnet. Der für die Positivkontrolle (GFP-transfizierte Zellen) ermittelte Wert wurde als 100 % festgelegt. Eine Überexpression des Tsg101 Wildtyp, bzw. des dominant negativen Proteins, führte lediglich zur einer Reduktion von 10 bzw. 4 % der Menge des M-Proteins im Überstand. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Überexpression des Aip-1 Wildtyp Proteins (2 %) oder dessen dominant negativer Form (3 %).



**Abb. 4.8: Quantifizierung der Menge des M-Proteins im Überstand**

Der in Abb. 4.7 dargestellte Blot wurde quantitativ ausgewertet. Dafür wurde für die einzelnen Proben die Menge von M im ÜS durch die Gesamtmenge von M (ÜS + LY) dividiert. Der ermittelte Wert für die Positivkontrolle, 293 T-Zellen transfiziert mit einem leeren GFP-Plasmid und infiziert mit ED (MOI 0.5), wurde gleich 100 % gesetzt. Die Quantifizierung zeigt, dass es in den verschiedenen ESCRT-Proteinen überexprimierender Zellen keine Unterschiede in der Menge an M im ÜS gibt.

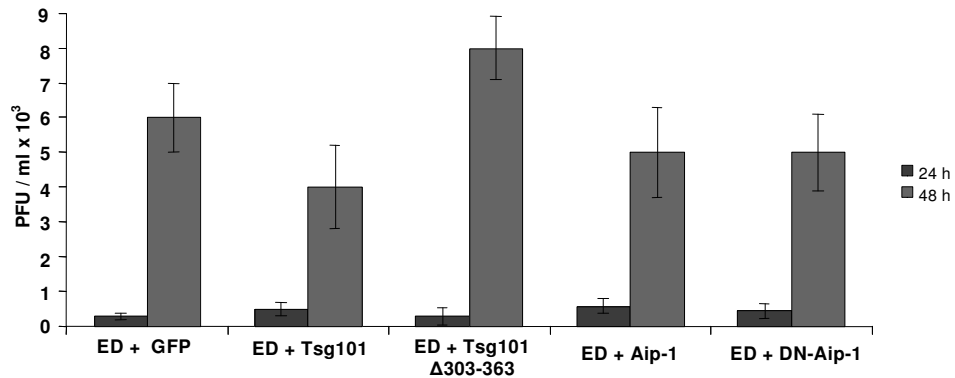
Um zu überprüfen, ob es zu Unterschieden in der Freisetzung von infektiösem Virus durch die Überexpression der verschiedenen ESCRT-Proteine kam, wurden die Überstände wie in 3.2.3 beschrieben auf B95a-Zellen titriert. Wie in der Tabelle 4.1 zu sehen, kam es weder nach 24 h noch nach 48 h Infektion zu ESCRT-abhängigen Unterschieden in der Freisetzung infektiöser Partikel.

	24 h (pfu/ml)	48 h (pfu/ml)
ED + GFP	$3 \times 10^2$ (+/-40)	$6 \times 10^3$ (+/-1000)
ED + Tsg101	$5 \times 10^2$ (+/-20)	$3 \times 10^3$ (+/-1200)
ED + Tsg101 Δ303-363	$4 \times 10^2$ (+/-50)	$8 \times 10^3$ (+/- 700)
ED + Aip-1	$6 \times 10^2$ (+/-20)	$5 \times 10^3$ (+/-1200)
ED + DNAip-1	$5 \times 10^2$ (+/-40)	$5 \times 10^3$ (+/-1000)

**Tabelle 4.1. Zusammenfassung der Titer der Überstände nach 24 und 48 h**

In der Tabelle sind die Titer aus 3 verschiedenen Experimenten zusammengefasst. Nach der Infektion der 293 T-Zellen, die entweder Tsg101 oder Aip-1 bzw. die jeweiligen dominant negativen Mutanten exprimieren, mit ED (MOI 0,5), wurden die ÜS nach 24 bzw. 48 h geerntet und nach kurzer Aufbereitung wie in 3.2.3 beschrieben direkt auf B95a Zellen titriert.

Nach 24 bzw. nach 48 h lag der Titer der Kontrolle wie der der verschiedenen Ansätze zwischen  $3 \times 10^2$  und  $6 \times 10^2$  pfu/ml bzw. zwischen  $3 \times 10^3$  und  $8 \times 10^3$  pfu/ml.

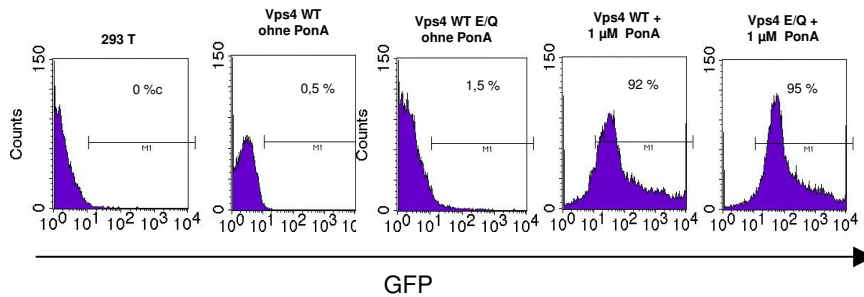


**Abb. 4.9: Titration der Überstände der Zellen, die Tsg101 oder Aip-1 WT Proteine bzw. die entsprechenden dominant negativen Mutanten überexprimierten**  
 Dafür wurden 24 bzw. 48 h nach der Infektion die ÜS abgenommen und direkt auf B95a-Zellen titriert. Alle ÜS zeigten im Vergleich zur ED-Kontrolle in etwa die gleiche Infektiösität.

Es konnte also kein signifikanter Unterschied in der Infektiösität in den unterschiedlichen Überständen gefunden werden, d.h. die Überexpression der wildtyp bzw. der dominant negativen Form der Tsg101  $\Delta 303-363$  und Aip-1 Proteine zeigte weder einen Einfluss auf die abgegebene Menge des M-Proteins in den Überstand (Abb. 4.7, 4.8) noch auf die Freisetzung infektiöser Partikel (Abb. 4.9, Tabelle 4.1).

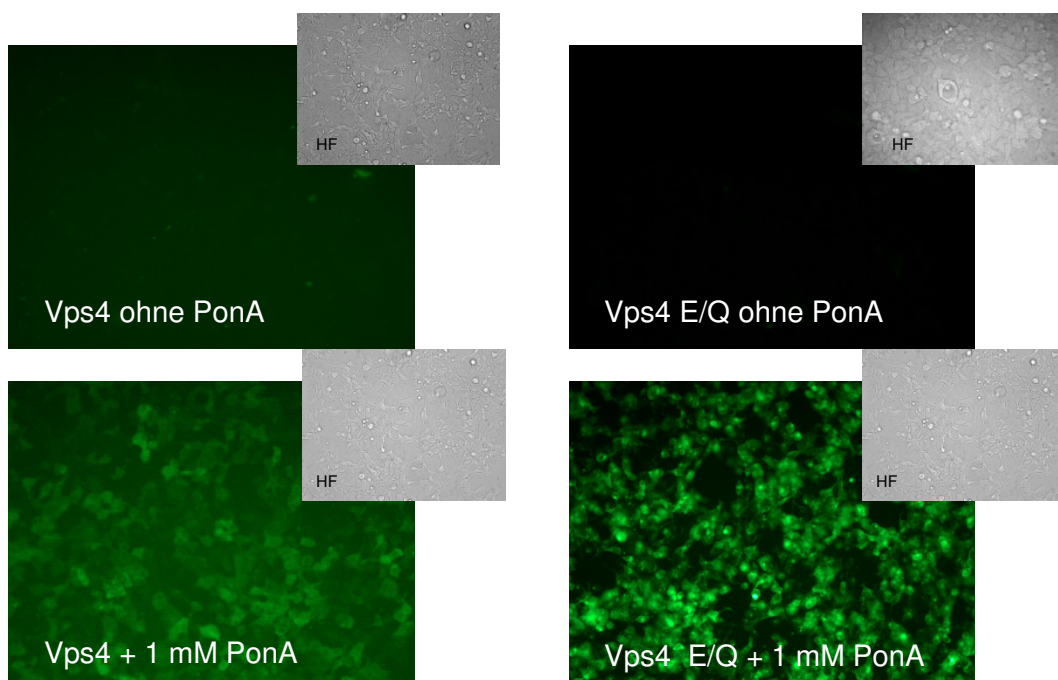
#### 4.1.3 Einfluss der Vps4 ATPase auf die Virusfreisetzung

Auch wenn die dominant negative Form des Tsg101- bzw. des Aip-1-Proteins keinen Einfluss auf die MV-Freisetzung hatte, war damit noch nicht geklärt, ob das ESCRT-System eine Bedeutung für die MV-Freisetzung hat. Sensitivität der Virusfreisetzung gegenüber dominant negativem Vps4 (Vps4 E228→Q) gilt als entscheidendes Kriterium für eine ESCRT-Beteiligung. Hierfür standen 293 T-Zellen zur Verfügung, die PonasteroneA induzierbar stabil Vps4 WT oder Vps4 (E228→Q) exprimierten. In der Abb 4.11 ist der Unterschied zwischen nicht-induzierten und induzierten Zellen gezeigt. Da die Transgene als GFP-Fusionsproteine exprimiert werden, sind sie direkt nach Induktion detektierbar (Abb. 4.10, 4.11).



**Abb. 4.10: Expressionskontrolle via FACS**

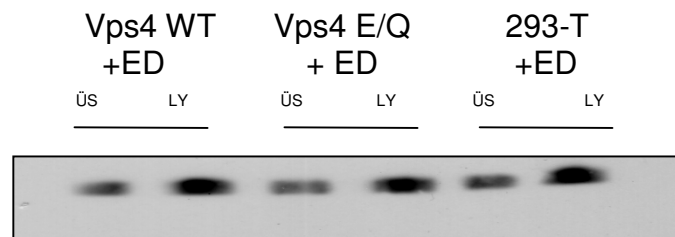
24 h nach der Induktion der Zellen mit PonA wurde die GFP Expression im FACS gemessen. Als Negativkontrolle dienten nicht-induzierter 293 T-Vps4 WT (E228→Q) bzw. normale 293 T-Zellen. Die FACS Bilder zeigen, dass ca. 92 % der Zellen das Vps 4 WT-Protein bzw. 95 % die Vps 4 E228→Q Mutante exprimieren.



**Abb. 4.11: Fluoreszenzaufnahmen der nicht-induzierten bzw. induzierten 293 T-Vps4 Zellen**

Oberere Reihe: Fluoreszenzaufnahme unstimulierter Zellen, links 293 Vps4 WT, rechts 293 Vps4 E228→Q. Untere Reihe: Nach Stimulation mit PonA (1 mM). In jedem Fluoreszenzbild ist oben rechts die entsprechende Hellfeldaufnahme zu sehen. Das WT-Protein zeigt wie in Abb. 4.3 eine diffuse, die E228→Q Mutante eher eine punktförmige Verteilung.

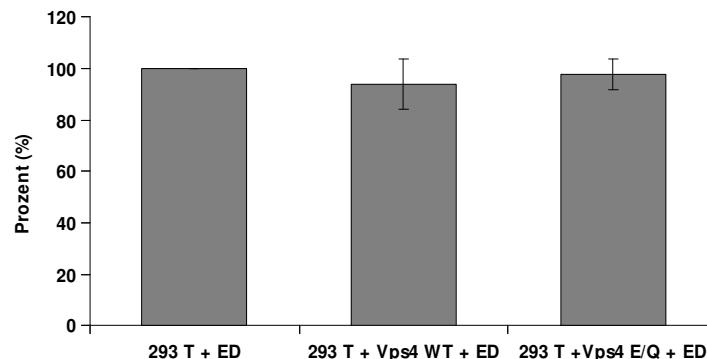
Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass nach Induktion mit PonA 92 % das Vps4 WT-Protein und 95 % der Zellen die Mutante exprimierten. Nach Infektion (MOI 0,5) wurden die Zellen mit PonA (1 mM) induziert und 24 h später die Überstände (3.4.5) geerntet und die Lysate (3.4.1) hergestellt, um sie im Western Blot zu analysieren (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12: Freisetzung von Viruspartikeln in 293 T-Zellen, die stabil Vps4 WT bzw. dessen dominant negative Form exprimieren**

293 T-Zellen wurden nach Induktion mit PonA (1 mM) mit ED (MOI 0,5) infiziert und nach 24 h die Überstände der Zellen ultrazentrifugiert und das sedimentierte Material zusammen mit 30 µg der aus den Zellen hergestellten Lysate (LY) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Zellen wurden mit NP-40-Lysepuffer lysiert. Im Western Blot wurden die M-Proteine mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper (MAB8910) nachgewiesen. Als Kontrolle dienten infizierte 293 T-Zellen.

Die Quantifizierung (in Abb. 4.13) zeigte, dass weder die Expression des WT (94 % +/-10 %) noch die der dominant negativen Form (98 % +/-6 %) der Vps4 ATPase einen Einfluss auf die Menge des M-Proteins im Überstand im Vergleich zur Gesamtmenge hatte. Als Kontrolle wurden in den nicht transfizierten 293 T-Zellen das Verhältnis zwischen der Menge des M-Proteins im Überstand und der Gesamtmenge des M-Proteins (ÜS+LY) berechnet und der ermittelte Wert als 100 % festgelegt.

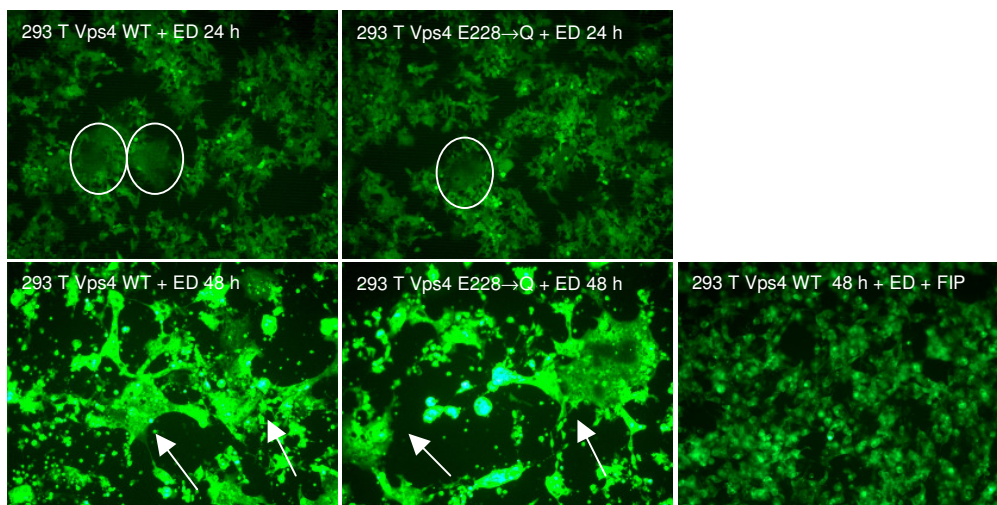


**Abb. 4.13: Quantifizierung der Menge des M-Proteins im Überstand**

Der in Abb. 4.12 dargestellte Blot wurde quantitativ ausgewertet. Dafür wurde für die einzelnen Proben die Menge von M im ÜS durch die gesamte Menge von M (ÜS + LY) dividiert. Der ermittelte Wert für die 293 T-Zellen, die nicht transfiziert waren, wurden als Kontrolle gleich 100 % gesetzt.

Um zu überprüfen, ob eine Überexpression von Vps4 E228→Q Auswirkungen auf die Fusion MV-infizierter Zellen hat, wurden 293 T-Zellen, die stabil Vps4 WT bzw. die dominant negative Form (Vps 4 E228→Q) exprimieren, mit ED infiziert (MOI 0,1) und nach 24 bzw. 48 h der entstandene CPE im Mikroskop betrachtet.

Bei der Zell-Zell-Fusion kommt es zur Ausbildung von Synzytien, die für den typischen MV-CPE verantwortlich sind. Als Kontrolle dienten hier Zellen, die nach der Infektion mit FIP (Fusionsinhibitor-Peptid) behandelt wurden. Durch dieses Peptid wird die Fusion MV-infizierter Zellen mit benachbarten nicht infizierten Zellen und die Fusion der in den Überstand abgegebenen Viren mit nicht infizierten Zellen verhindert. Die Mikroskopaufnahmen zeigten nach 24 h in beiden Zelllinien in etwa die gleiche Synzytiengröße (weiße Kreise). Nach 48 h war in beiden Fällen die Fusion sehr weit fortgeschritten, sodass nur noch wenige Einzelsynzytien erkennbar waren (Abb.4.14).



**Abb. 4.14: CPE Aufnahmen nach 24 bzw. 48 h**

293 T-Zellen, die stabil Vps4 WT (linke Spalte) bzw. die dominant negative Form Vps4 E228→Q (mittlere Spalte) exprimieren, wurden mit ED infiziert (MOI 0,1) und nach 24 bzw. 48 h wurde die Größe der entstandenen CPEs im Mikroskop analysiert. Als Positivkontrolle dienten 293 T Vps 4 WT-Zellen, die nach der Infektion mit FIP behandelt wurden (rechte Spalte). Die weißen Kreise zeigen nach 24 h Synzytien gleicher Größe, die weißen Pfeile nach 48 h die letzten Einzelsynzytien an.

Um zu überprüfen, ob es nach der Überexpression von Vps4 E228→Q zu Unterschieden in der Freisetzung von infektiösem Virus kam, wurden die Überstände, wie in 3.2.3 beschrieben, auf B95a Zellen titriert. Um zu untersuchen, ob es dabei einen MOI-abhängigen Effekt gibt, wurden die Zellen vor der Induktion mit PonA mit einer MOI von 0,1; 1 und 3 infiziert. In allen Fällen war kein Unterschied zwischen Vps4 WT und Vps4 E228→Q zu erkennen, beide zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Menge an infektiösem Virus im Überstand (Abb. 4.15).

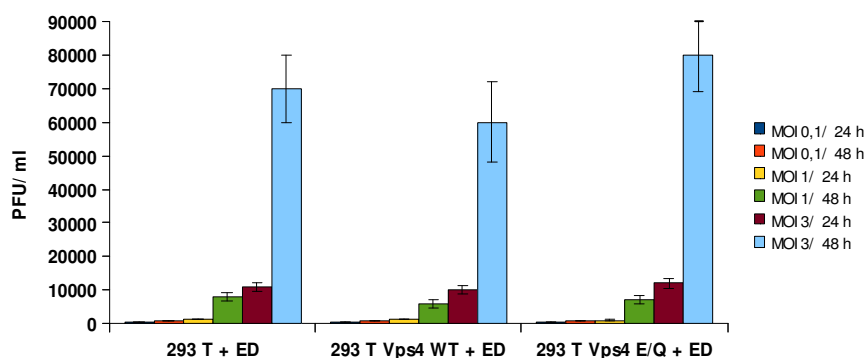
Die Titrationsergebnisse (Abb. 4.15) und die Mikroskopaufnahmen (Abb. 4.14) belegen, dass das Vps4 weder einen Einfluss auf die Fusion noch auf die MV-Freisetzung hat.



Zellen/Zeit	MOI 0,1		MOI 1		MOI 3	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
293 T	$5 \times 10^0$ (+/-3)	$2 \times 10^1$ (+/-10)	$8 \times 10^2$ (+/-100)	$8 \times 10^3$ (+/-300)	$3 \times 10^3$ (+/-900)	$7 \times 10^4$ (+/-10.000)
293 T Vps4 WT	$5 \times 10^0$ (+/-2)	$3 \times 10^1$ (+/-10)	$9 \times 10^2$ (+/-90)	$6 \times 10^3$ (+/-500)	$4 \times 10^3$ (+/-1200)	$6 \times 10^4$ (+/-12.000)
293 T Vps4 E228→Q	$4 \times 10^0$ (+/-2)	$4 \times 10^1$ (+/-20)	$7 \times 10^2$ (+/-120)	$7 \times 10^3$ (+/-300)	$3 \times 10^3$ (+/-1300)	$8 \times 10^4$ (+/-11.000)

**Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Titer der Überstände aus 3 verschiedenen Experimenten nach Infektion der 293 T Vps4 Zelllinie für 24 bzw. 48 h**

Nach der Infektion Vps 4 WT bzw. Vps4 E228→Q exprimierender 293 T-Zellen mit ED (MOI 0,1, 1 und 3) wurden die ÜS nach 24 bzw. 48 h geerntet und direkt auf B95a-Zellen titriert. Die Ergebnisse sind in pfu/ml dargestellt.



**Abb. 4.15: Titration der Überstände von 293 T-Zellen, die Vps4 WT bzw. die Mutante E228→Q exprimieren und die 24 bzw. 48 h mit verschiedenen Mengen an Virus infiziert waren (MOI 0,1, 1 und 3)**

#### 4.1.4 Mutation der potentiellen L-Domänen in der MV-M-Sequenz

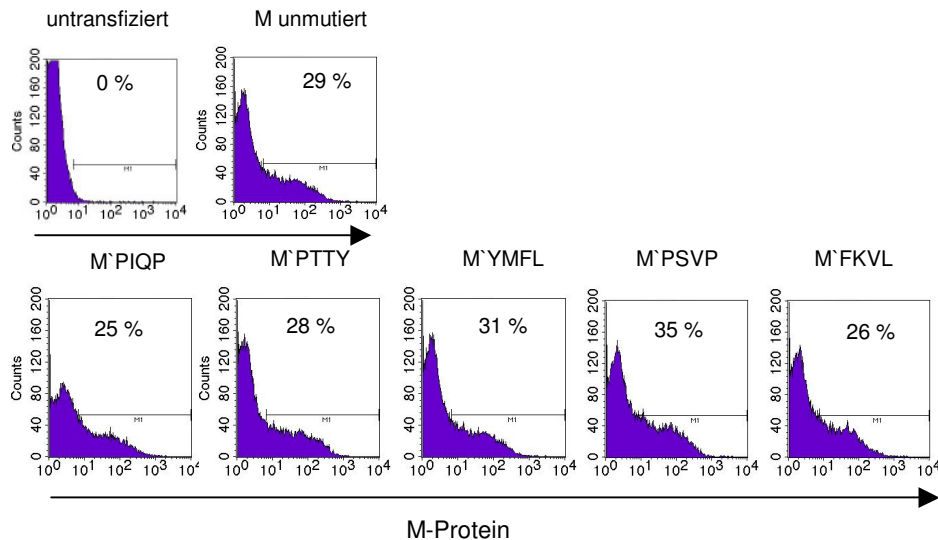
Betrachtet man die Sequenz des Matrix-Proteins in Abb. 4.1, so gibt es fünf mögliche Motive, die eine potentielle L-Domäne darstellen könnten und die jeweils durch vier Alanine ersetzt wurden (Abb. 4.16). Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung (3.3.5) überprüft. Die rekombinanten M-Proteine wurden M` (Motiv) bezeichnet.

Motiv	ersetzt durch	Bezeichnung
PIQP →	AAAA	M`PIQP
PTTY →	AAAA	M`PTTY
YMFL →	AAAA	M`YMFL
PSVP →	AAAA	M`PSVP
FKVL →	AAAA	M`FKVL

**Abb. 4.16: Mutation der möglichen L-Domänen**

In dem pCG-M-Vektor wurden die möglichen L-Domänen durch vier Alanine ersetzt und als M`PQP, M`PTTY, M`YMFL, M`PSVP und M`FKVL bezeichnet.

Die Expression der rekombinanten M-Proteine wurde nach transienter Expression in 293 T-Zellen überprüft. Hierzu wurden die Zellen transfiziert und 24 h später ein Teil der Zellen fixiert und im FACS der Anteil M-Protein positiver Zellen gemessen, während der andere Teil der Zellen lysiert und die M-Expression mittels Western Blot analysiert wurde. In allen Fällen lag die Transfektionsrate zwischen 25 und 35 %, was etwa dem Wert (28 %) des unmutierten M-Proteins entsprach (Abb 4.17).



**Abb. 4.17: Durchflusszytometrische Analyse der M-Mutanten**

293 T-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion fixiert und das M-Protein mit dem  $\alpha$ -M-Primärantikörper MAB8910 und einem PE-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte Zellen (obere Reihe links), während die Transfektion mit nicht mutiertem M-Plasmid die Positivkontrolle war (obere Reihe rechts). Die untere Reihe zeigt die Transfektion der M-Mutanten. In jedem Bild ist oben rechts der Prozentsatz M-positiver Zellen angegeben. Untere Reihe ist von links nach rechts dargestellt: M'PIQP, M'PTTY, M'YMFL, M'PSVP, M'FKVL.

In Abb. 4.18 konnte im Western Blot ebenfalls mit Hilfe eines MV-M spezifischen Antikörper die Expression der verschiedenen M-Mutanten gezeigt werden. Die verschiedenen M-Mutanten wurden also erfolgreich exprimiert.

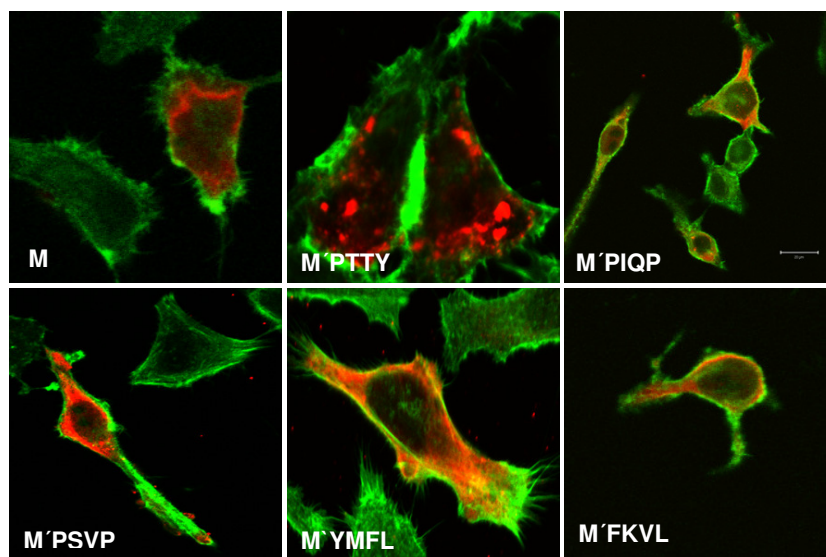


**Abb. 4.18: Nachweis der M-Mutanten im Western Blot**

293 T-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion, mit den entsprechenden pCG-Plasmiden, lysiert. Von den 293 T-Zelllysaten wurden 30  $\mu$ g Gesamtprotein pro Gelspur aufgetragen und M-Proteine im Western Blot unter Verwendung des MAB8910 Antikörper nachgewiesen.

#### 4.1.5 Intrazelluläre Verteilung der M-Protein-Mutanten

Um den Einfluss der Mutation der möglichen L-Domänen auf die intrazelluläre Verteilung zu untersuchen, wurden, wie in 3.3.7 beschrieben, HeLa-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und im konfokalen Mikroskop analysiert. Nach der Fixierung der Zellen (24 h nach Transfektion) wurden sie zuerst mit Phalloidin gefärbt, permeabilisiert und das MV-M-Protein detektiert (rot). Durch die extrazelluläre Phalloidin-Färbung konnte der cortikale Aktinring grün angefärbt werden.



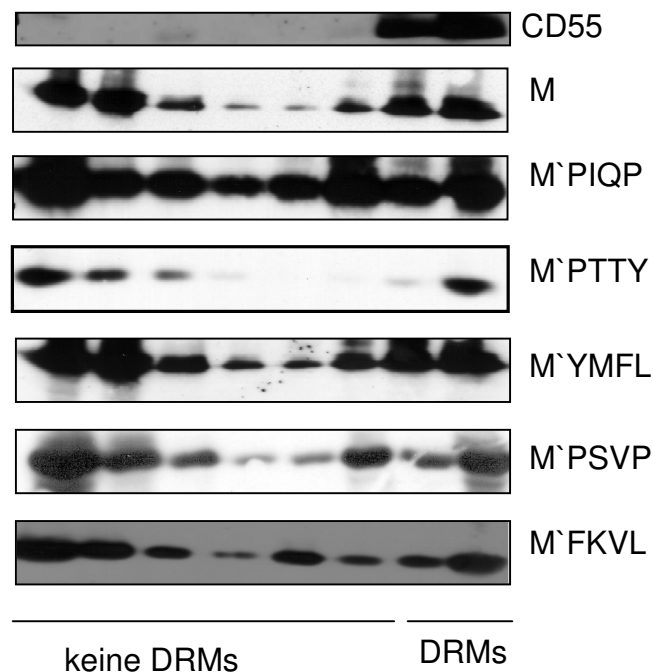
**Abb. 4.19: Verteilung der M-Mutanten in HeLa-Zellen**

Für die Überprüfung der Verteilung der M-Mutanten wurden HeLa-Zellen mit den Plasmiden, die die verschiedenen MV-M-Mutanten exprimieren, transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und das M-Protein mit dem  $\alpha$ -M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Grün gefärbt ist der cortikale Aktinring (Phalloidin 488). Dargestellt ist von links nach rechts: M (unmutiert), M`PTTY, M`PIQP, M`YMFL, M`PSVP und M`FKVL. Unten rechts ist in der Aufnahme (obere Reihe, ganz rechts) der Maßstab (10  $\mu$ m) angegeben.

Die Verteilung der M`PIQP-, M`YMFL-, M`PSVP- und der M`FKVL-Protein-Mutante entspricht der des unmutierten M-Proteins. Wie in Punkt 4.1.1 beschrieben, fand man das MV-M-Protein hauptsächlich an der Plasmamembran und zu einem kleinen Anteil im Zytoplasma. Nur die M`PTTY-Protein-Mutante zeigte eine veränderte intrazelluläre Verteilung. Das mutierte M-Protein lag hauptsächlich im Zytoplasma vor, wo es in großen Aggregaten akkumulierte, wobei nur ein geringer Teil an die Plasmamembran gelangte. Eine Kolokalisation mit dem cortikalen Aktinring konnte nur sehr marginal für das unmutierte M- und für die M-Protein-Mutanten erkannt werden (Abb. 4.19).

#### 4.1.6 Lipid Raft Assoziation der M-Protein-Mutanten

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation des MV-M-Proteins in den CD55-haltigen Lipid Rafts ein wichtiger Schritt für die Virusfreisetzung ist (Manie et al., 2000, Vincent et al., 2000, Pohl et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob die oben beschriebenen M-Protein-Mutanten ebenfalls eine Assoziation mit DRMs zeigen. Um die Lipid Raft Assoziation der verschiedenen M-Protein-Mutanten zu untersuchen, wurden 293 T-Zellen transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Proben wurden nach einer Dichtegradientenzentrifugation und der Fraktionierung wie in 3.4.3 beschrieben auf ein SDS-Gel aufgetragen. In allen Versuchen wurde parallel zu dem M-Protein auch CD55 nachgewiesen, das als Marker für DRMs dient (Abb. 4.20, oberer Blot).



**Abb. 4.20: Assoziation der M-Protein-Mutanten mit Detergenz-resistenten Membranfraktionen**

Lysate von 293 T-Zellen, die mit MV-M (unmutiert), bzw. mit den verschiedenen M-Mutanten transfiziert waren (48 h), wurden nach einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation und Fraktionierung gelelektrophoretisch aufgetrennt (15 % Acrylamid) und im Western Blot auf das Vorkommen von M und CD55 (als Marker für Detergenz-resistente Membranfraktionen) untersucht.

Der Vergleich der verschiedenen Versuchsansätze zeigte eine gleichstarke Assoziation der M-Protein-Mutanten bzw. des unmutierten M-Proteins mit den DRMs (Tab. 4.3).

	nicht DRM (%)	DRM (%)
M	70 (+/-5)	30 (+/-5)
M`PTTY	71 (+/-4)	29 (+/-4)
M`PIQP	61 (+/-7)	39 (+/-7)
M`YMFL	68 (+/-3)	32 (+/-3)
M`PSVP	68 (+/-5)	32 (+/-5)
M`FKVL	72 (+/-4)	28 (+/-4)

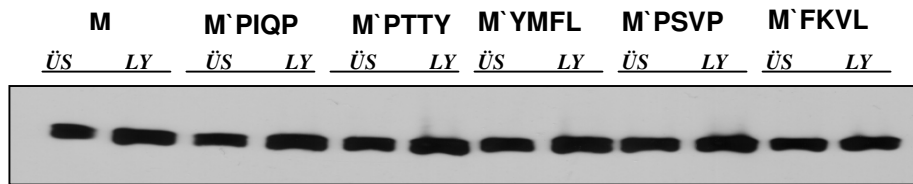
**Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Menge an M-Protein, welches mit DRMs assoziiert ist**

Zur Quantifizierung wurden Mittelwerte aus vier verschiedenen Experimenten ausgewertet. Alle Werte sind in Prozent angegeben.

Die DRM-Assoziation liegt für unmutiertes M bei etwa 30 %, dies entspricht in etwa dem Wert der M`PIQP- (29 %), der M`FKVL- (28 %), der M`PSVP- (32 %) und auch der M`YMFL-Mutante (32 %). Einzig die M`PTTY-Mutante besitzt eine leicht erhöhte DRM-Assoziation (39 %).

#### 4.1.7 Analyse der VLP-Freisetzung der M-Protein-Mutanten

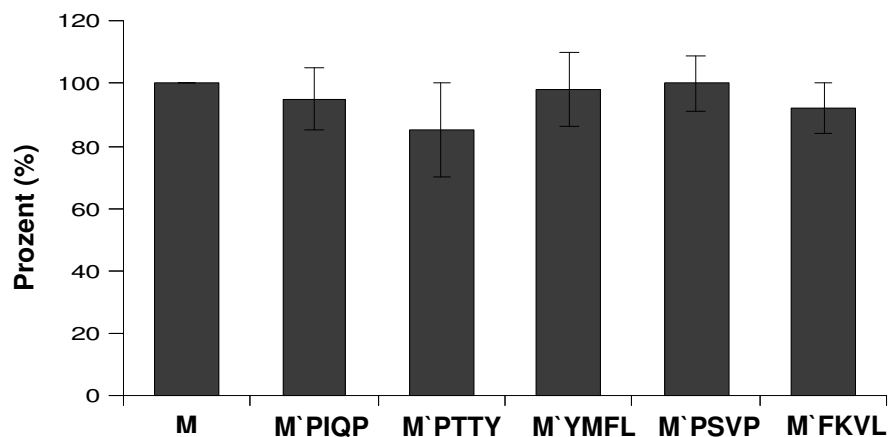
Die M-Protein-Mutanten wurden darauf getestet, ob sie mit gleicher Effizienz VLPs wie das unmutierte M-Protein freisetzen können (Pohl et al., 2007). Hierfür wurden Überstände von 293 T-Zellen 48 h nach Transfektion mit pCG-M-, pCG-M`PTTY-, pCG-M`PIQP-, pCG-M`PSVP-, pCG-M`YMFL- oder dem pCG-M`FKVL-Plasmid gesammelt und analysiert. Sie wurden zunächst niedertourig und anschließend über eine 20 %ige Saccharose-Lösung ultrazentrifugiert. Die erhaltenen Sedimente wurden zusammen mit 30 µg des entsprechenden Zelllysats, das als Expressionskontrolle diente, in einem 15 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Für alle M-Mutanten konnte im Überstand von 293 T-Zellen VLPs detektiert werden (Abb. 4.15).



**Abb. 4.21: VLP-Freisetzung der M-Mutanten**

293 T-Zellen wurden mit pCG-M (ED) oder den verschiedenen pCG-M-Mutanten transfiziert. Die Überstände dieser Zellen (ÜS) wurden nach 48 h ultrazentrifugiert und das sedimentierte Material zusammen mit 30µg der hergestellten Lysate (LY) gelelektrophoretisch in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Im Western Blot wurde das M-Protein mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper (MAB8910) nachgewiesen.

Um die VLP-Freisetzung aus unterschiedlichen Experimenten zu quantifizieren, wurde mittels der AIDA Software die Menge des M-Proteins im Überstand in Relation zur Gesamtmenge des M-Proteins, also der Gesamtmenge aus Lysat und Überstand, gesetzt und dieser Wert für die Zellen, die mit dem unmutierten MV-M-Plasmid transfiziert wurden, gleich 100 % gesetzt. So konnten Unregelmäßigkeiten in der Transfektionsrate ausgeglichen werden, da nur das direkt produzierte M-Protein gemessen wurde (Abb. 4.22).



**Abb. 4.22: Quantifizierung der VLP-Menge durch die verschiedenen M-Mutanten**

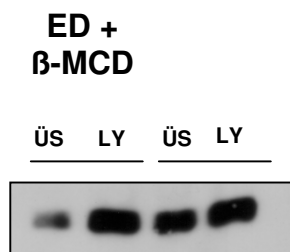
Der in Abb. 4.21 dargestellte Blot wurde mit AIDA quantitativ ausgewertet. Dafür wurde für die einzelnen Proben die Menge des M-Proteins im ÜS durch die Gesamtmenge des M-Proteins (ÜS + LY) dividiert. Der ermittelte Wert für die Positivkontrolle, dem unmutierten pCG-M-Vektor, wurde gleich 100 % gesetzt.

Die Quantifizierung (Abb. 4.22) zeigt, dass die VLP-Produktion der verschiedenen M-Mutanten genauso effizient war wie die des unmutierten M-Proteins (M`PIQP 95 % +/- 10 %, M`YMFL 98 % +/-12 %, M`PSVP 100 % +/- 8 %, M`FKVL 92 % +/-7 %). Die augenscheinlich geringere Effizienz von M`PTTY 85 % (+/-13) war aufgrund der hohen Varianz der Werte statistisch nicht relevant. Das Experiment belegt, dass die im MV-M-Protein

enthaltenen Motive, die eine starke Ähnlichkeit mit den bisher bekannten L-Domänen zeigen, nicht notwendig für die VLP-Produktion sind.

#### 4.2 Überprüfung der MV-Partikelfreisetzung in Zellen ohne Lipid Rafts

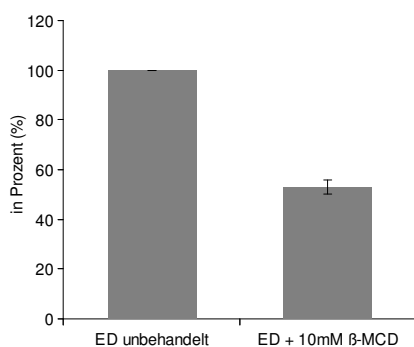
Um zu zeigen, dass die Assoziation von MV mit den Lipid Rafts wirklich ein entscheidender Schritt in der Virusfreisetzung ist, wurden HeLa-Zellen mit  $\beta$ -MCD behandelt, welches das Cholesterin, einem Hauptbestandteil der Lipid Rafts, depletiert. Nach Infektion von 293 T-Zellen mit MV (MOI 3) wurde nach 30 h das Medium gewechselt und die Zellen mit 10 mM  $\beta$ -MCD (1 h) behandelt. Nach einem Waschschriff mit PBS wurde frisches Medium zu den Zellen gegeben, das nur 2,5 % FKS enthielt, um eine Rückgewinnung von Cholesterin aus dem FKS zu minimieren. Zusätzlich enthielt das Medium Mevalonolactone/ Mevastatin (Imhoff et al., 2007), die die Neusynthese von Cholesterin verhinderten. Nach weiteren 8 h wurden die Überstände geerntet, die Lysate wie in 3.4.1 beschrieben hergestellt und im Western Blot analysiert (Abb. 4.23).



**Abb. 4.23: Freisetzung von Viruspartikeln in 293 T-Zellen, die mit  $\beta$ -MCD behandelt wurden**

293 T-Zellen wurden 30 h nach der Infektion für 1 h mit 10 mM  $\beta$ -MCD behandelt und nach weiteren 8 h die Überstände und die Lysate der Zellen auf ein 15 % iges SDS-Gel aufgetragen. Im Western Blot wurden die M-Proteine mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper (MAB8910) nachgewiesen.

Die Quantifizierung erfolgte wie in 4.1.2 beschrieben und der ermittelte Wert für die unbehandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt.



**Abb. 4.24: Quantifizierung der Menge an Viruspartikeln**

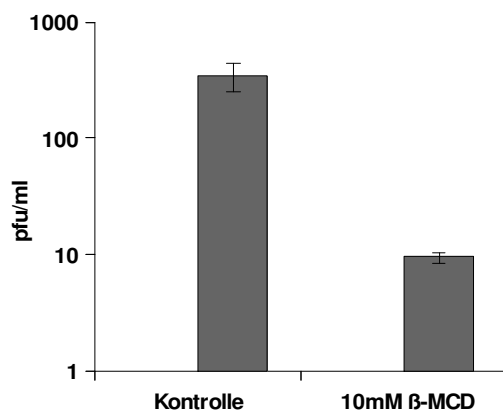
Der in Abb. 4.23 dargestellte Blot wurde mit AIDA quantitativ ausgewertet. Dafür wurde für die einzelnen Proben die Menge des M-Proteins im ÜS durch die Gesamtmenge des M-Proteins (ÜS + LY) dividiert. Der ermittelte Wert der Positivkontrolle, unbehandelte 293 T-Zellen, wurde gleich 100 % gesetzt. Die Quantifizierung zeigt, dass nach  $\beta$ -MCD Behandlung fast 50 % weniger M im ÜS zu finden ist.

Die Quantifizierung ergab, dass  $\beta$ -MCD behandelte Zellen 47 % weniger M-Protein in den Überstand freisetzen als die unbehandelten Zellen. Um zu überprüfen, ob die Cholesterin-Depletion die Produktion infektiöser Partikel beeinflusste, wurden die Überstände wie in 3.2.3 beschrieben auf B95a-Zellen titriert. Wie die Abb. 4.25 zeigt, kam es zur Verminderung der Infektiösität (1 log Stufe Reduktion) nach der Behandlung mit  $\beta$ -MCD (Tab. 4.4). Der Titer der Kontrolle lag bei  $4 \times 10^2$  (+/-100) und nach der Depletion bei  $1 \times 10^1$  (+/-1). Die Assoziation der MV-Proteine mit den Lipid Rafts ist also entscheidend für die Freisetzung von infektiösem Virus.

	Versuch 1 (pfu/ ml)	Versuch 2 (pfu/ ml)
ED unbehandelt	$5 \times 10^2$	$3 \times 10^2$
ED + 10 mM $\beta$ -MCD	$1 \times 10^1$	$9 \times 10^0$

**Tabelle 4.4: Titer von Überständen unbehandelter und  $\beta$ -MCD behandelter Zellen**

In der Tabelle sind die Titer aus 2 verschiedenen Experimenten dargestellt. Nach der Infektion der 293 T-Zellen, die entweder mit 10 mM  $\beta$ -MCD oder nicht behandelt waren, wurden die ÜS 8-10 h nach der Depletion geerntet und nach kurzer Aufbereitung, wie in 3.2.3 beschrieben, direkt auf B95a Zellen titriert.



**Abb. 4.25: Titration der Überstände von Zellen, die unbehandelt- oder  $\beta$ -MCD behandelt waren**

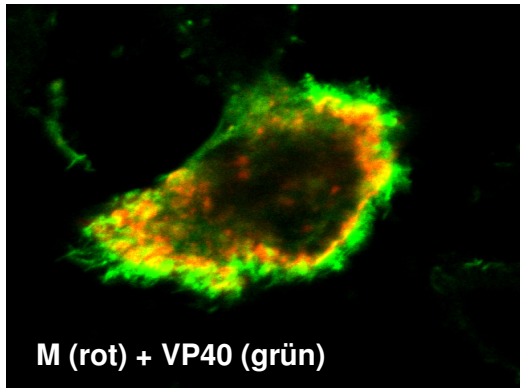
Nach 30 h p.i. (MOI 3) wurden die Zellen für 1 h mit  $\beta$ -MCD (10 mM) inkubiert. Weitere 8 h später wurden die ÜS abgenommen und direkt auf B95-Zellen titriert. Die  $\beta$ -MCD behandelten ÜS zeigten gegenüber der Kontrolle eine signifikante Reduktion (1 log Stufe) in der Infektiösität.

### 4.3 Vergleichende Analyse der intrazellulären Verteilung des MV-M-Proteins mit dem ESCRT interagierenden VP40-Matrix-Protein des EBOV

Das MV-M-Protein ist, wie in den Ergebnissen (4.1– 4.1.7) gezeigt, in seiner Verteilung und in seiner Funktion als treibende Kraft der Virusfreisetzung ESCRT-unabhängig. Um zu überprüfen, ob sich die intrazelluläre Verteilung des MV-M von einem Matrix-Protein unterscheidet, dessen Budding-Prozess ESCRT-abhängig ist, wurden HeLa-Zellen mit MV-M und dem VP40-Matrix-Protein des Ebolavirus transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das M-Protein rot und das VP40-Protein grün dargestellt.



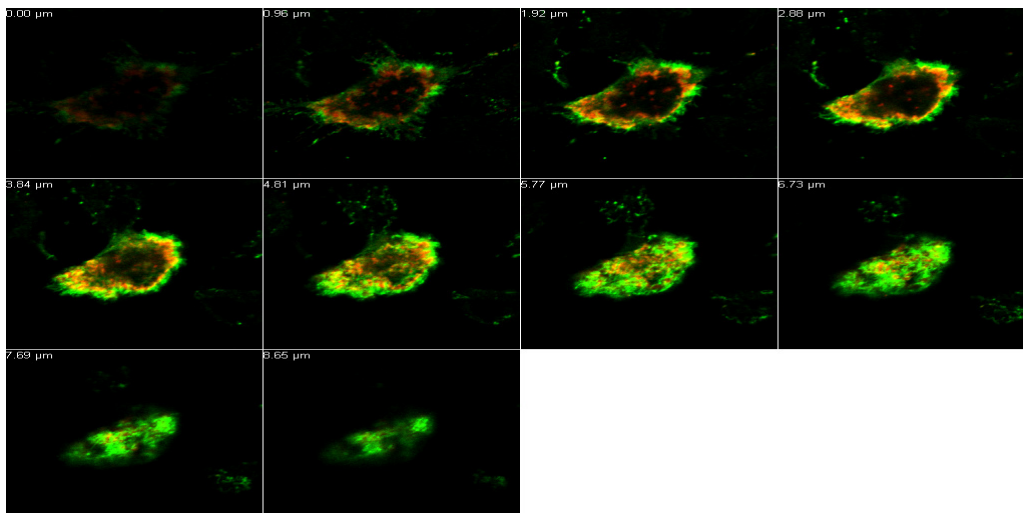
Wie in der Abb 4.26 zu sehen kolokalisieren zwar beide Proteine geringfügig an der Plasmamembran, zeigen aber auch eine klar unterschiedliche Verteilung. Während das VP40-Protein an der Plasmamembran zu finden ist, liegt das MV-M-Protein etwas unterhalb des VP40-Proteins (siehe auch Abb. 4.27). Das VP40-Protein scheint besser und effizienter als das M-Protein an der Plasmamembran zu akkumulieren.



**Abb. 4.26: Kotransfektion der beiden Matrix-Proteine M und VP40**

HeLa-Zellen wurden dafür mit Hilfe von Lipofectamine 2000 mit dem MV-M-Protein und dem EBOV-VP40-Protein doppelt transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Proteine angefärbt. Das MV-M-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa 594  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Anschließend wurde das EBOV-VP40-Protein mit dem anti-EBOV-Ziege-Serum und Alexa 488-gekoppeltem  $\alpha$ -Ziege-Sekundärantikörper gefärbt (grün).

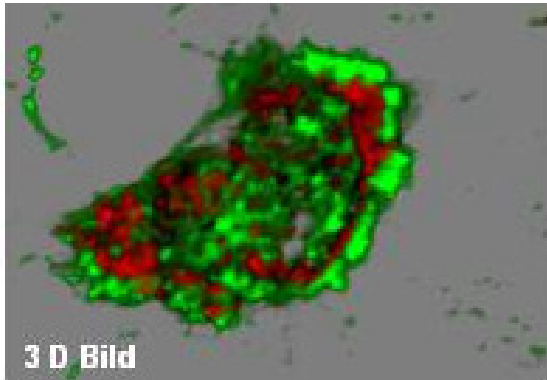
Wird das Bild in Z-Stacks, das sind Bilderstapel über die Z-Achse, unterteilt, wird dies noch deutlicher. Schon im zweiten Stack, noch deutlicher erkennbar im dritten Stack, ist das VP40 stärker und effizienter an der Plasmamembran zu finden als das M-Protein, was sich auch in allen weiteren Stacks bestätigte (Abb. 4.27).



**Abb. 4.27: Z-Stacks durch eine HeLa-Zelle, die VP40 und M exprimiert**

Die Abb. 4.26 diente als Grundlage für die Konstruktion des Bilderstapels mit 4  $\mu$ m Dicke (erkennbar oben links in den Bildern) über der Z-Achse.

Die unterschiedliche Verteilung und die nur geringe Überlagerung der beiden Proteine zeigt auch eine 3D Rekonstruktion aus den Z-Stacks (Abb. 4.27.1).



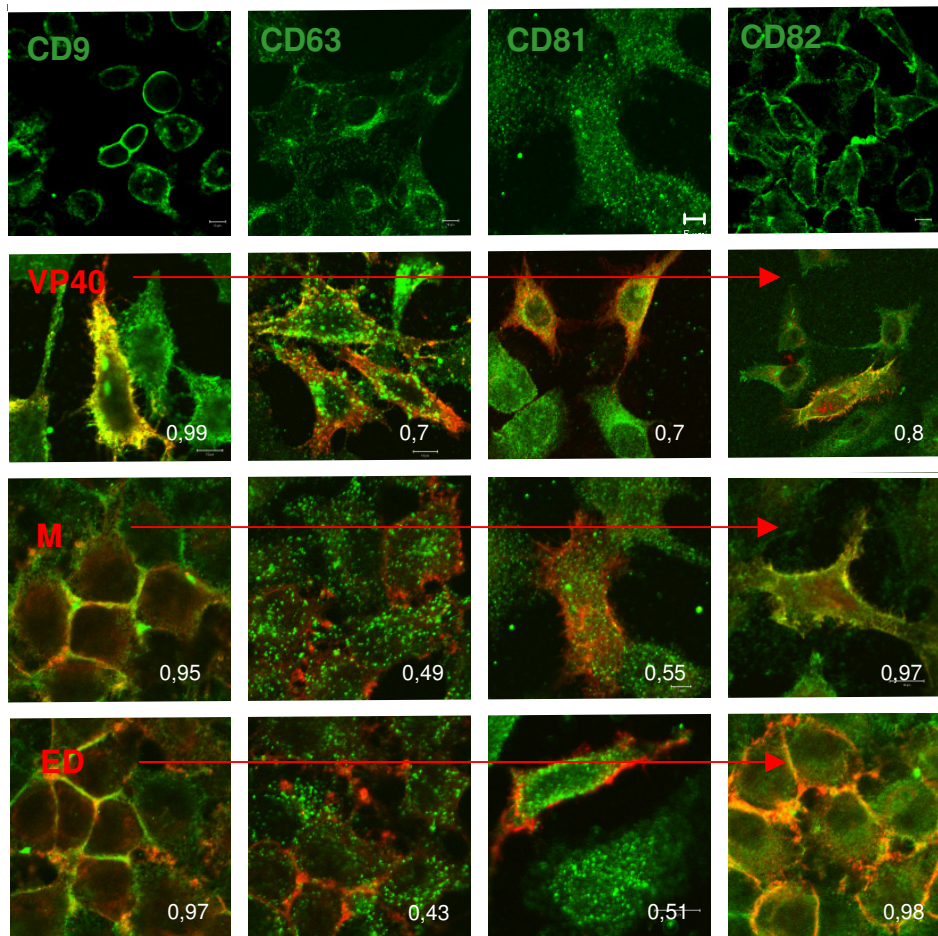
**Abb. 4.27.1: 3D Rekonstruktion**

Aus den Z-Stacks aus Abb.4.27 wurde dieses 3D Bild rekonstruiert.

### **4.3.1 Analyse der Membran-Mikrodomänen-Assoziation des M- und VP40-Proteins**

#### **4.3.1.1 Assoziation des M- und VP40-Proteins mit Tetraspaninen**

Es ist bekannt, dass Tetraspanine oligomerisieren und in sogenannten TEMs ("Tetraspanin Enriched Microdomains") an der Plasmamembran akkumulieren. Für HI- und Influenza-Virus konnte gezeigt werden, dass diese TEMs an der Budding site zu finden und für die Virusfreisetzung wichtig sind (Nydegger et al., 2006, Jolly and Sattentau, 2007, Deneka et al., 2007, Khurana et al., 2007). Um eine mögliche Assoziation mit verschiedenen Tetraspaninen zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit Plasmiden, die entweder für das M- oder VP40-Protein kodieren, transfiziert bzw. mit MV infiziert (MOI 1). 24 h nach der Transfektion bzw. der Infektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und das M- oder VP40-Protein (rot) und die Tetraspanine (grün) dargestellt. Um eine klare Unterscheidung zwischen einer partiellen und einer starken Kolokalisation machen zu können, wurde der in Punkt 3.5.5 erklärte Kolokalkationskoeffizient  $R$  ermittelt. Nach Einberechnung des Hintergrunds und der Intensität in unserem System wurde für  $R$  kleiner als 0,5 keine,  $R \leq 0,7$  eine partielle und  $R > 0,7$  eine starke Kolokalisation definiert.



**Abb. 4.28: Kolokalisationsanalyse des M- bzw. VP40-Proteins mit verschiedenen Tetraspaninen**

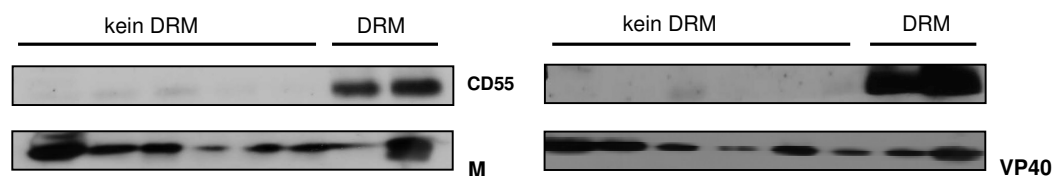
HeLa-Zellen wurden mit M bzw. VP40 transfiziert oder mit MV infiziert (MOI 0,5). Das M-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper MAB8910, der direkt mit einem Alexa594-Farbstoff gekoppelt war, das VP40-Protein mit einem  $\alpha$ -EBOV-Serum und Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Ziege-Sekundärantikörper angefärbt (rot). Die Tetraspanine der Zellen wurden mit verschiedenen Primärantikörpern und Alexa488 gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörpern angefärbt (grün). Die Gelbfärbung zeigt eine Überlagerung des roten und grünen Signals an. Obere Reihe von links nach rechts sind die Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und CD82 allein dargestellt. VP40-Protein und Tetraspanine kotransfizierte Zellen sieht man in der zweiten Reihe. M-Protein transfizierte bzw. MV-infizierte Zellen zusammen mit den Tetraspaninen sind in der dritten bzw. der vierten Reihe dargestellt. Die Kolokalisation wurde quantitativ mit Hilfe des Kolokalisationskoeffizienten R (3.5.5) ausgewertet. Unten rechts ist in einigen Aufnahmen der Maßstab (10  $\mu$ m) angegeben.

Wie in der Abb. 4.28 zu erkennen, kolokalisieren CD9 und CD82 effizient mit dem M- und VP40-Protein. Für CD9 gibt es zwischen den beiden Proteinen keinerlei Unterschiede in der Effizienz (R 0,99 zu 0,95), während die Assoziation mit CD82 für das M-Protein (R 0,97) stärker zu sein scheint als für das VP40-Protein (R 0,8). Anders verhält es sich mit CD63 und CD81. Während das M-Protein hier nur eine sehr partielle bzw. keine Kolokalisation zeigt (R 0,49 bzw. 0,55), findet für das VP40-Protein eine partielle (R je 0,7) Kolokalisation statt. Die Tetraspanin-Assoziation unterscheidet sich also zwischen M und VP40 in der Effizienz bei CD63, CD81 und CD82. In der

Assoziation mit den untersuchten Tetraspaninen konnte keinerlei Unterschied zwischen dem transfizierten M- und dem M-Protein in infizierten Zellen gefunden werden. Alle R-Werte waren in etwa gleich.

#### 4.3.1.2 Assoziation des M- und VP40-Proteins mit Lipid Rafts

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in infizierten HeLa-Zellen die neu entstehenden MV-Partikel vorzugsweise aus CD55-haltigen DRMs freigesetzt werden (Manie et al., 2000, Vincent et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob es Unterschiede in der Verteilung zwischen dem M- und dem VP40-Protein mit DRMs gibt. In Abb. 4.29 (links) ist erkennbar, dass etwa 30 % des M-Proteins in den DRM-Fractionen des Gradienten vorliegen, während der Rest in den Fraktionen vorliegt, die Brij-98 lösliche Proteine enthalten



**Abb. 4.29: Vergleich der Assoziation des M- und VP40-Proteins mit Detergenz-resistenten Membranfraktionen**

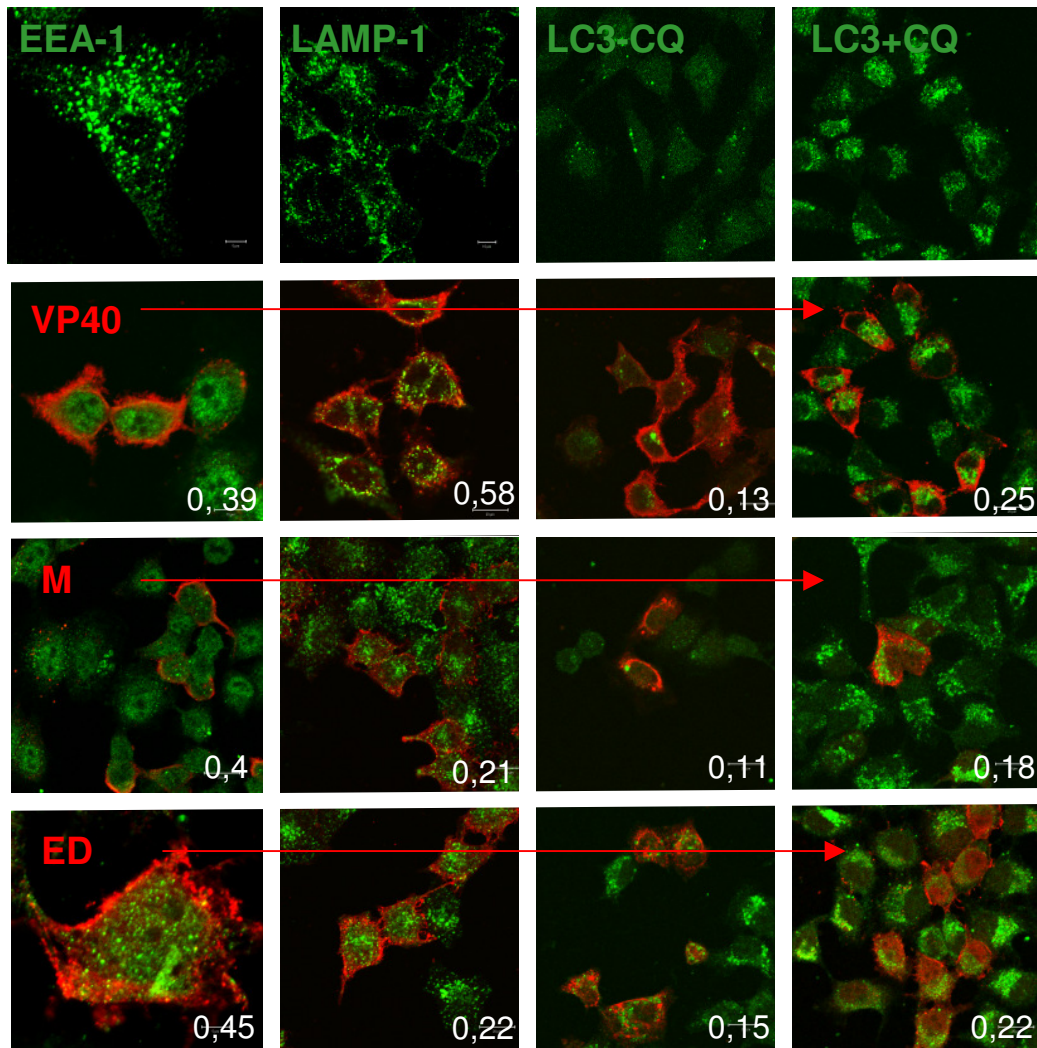
Lysate von 293 T-Zellen, transfiziert (48 h) mit MV-M (links), bzw. mit VP40 (rechts), wurden einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation mit einem dreistufigen Gradienten unterzogen, die Fraktionen im Western Blot auf das Vorkommen des M- bzw. VP40- und CD55-Proteins (als Marker für Detergenz-resistente Membranfraktionen) untersucht.

Ein vergleichbares Ergebnis weist auch der Western Blot für das VP40-Protein in Abb. 4.29 rechts auf, das ebenfalls zu etwa 33 % in den DRM-Fractionen vorhanden war. In allen Versuchen wurde parallel zu den Matrix-Proteinen CD55 nachgewiesen, das als Marker für DRMs dient (Abb. 4.29 oberer Blot).

#### 4.3.2 Kolokalisationsanalysen des M- und VP40-Proteins mit verschiedenen Kompartimentmarkern

Um erste Hinweise auf den Transport der beiden Matrix-Proteine M und VP40 zu bekommen, wurde die Assoziation der jeweiligen Proteine mit intrazellulären Kompartimenten untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert oder mit MV infiziert (MOI 0,5), nach

24 h fixiert und hinsichtlich der Kolo­kalisierung mit Kompartimentmarkern untersucht. Für das EEA-1, das frühe Endosomen markiert, konnten weder für das VP40- noch für das M-Protein Evidenzen für eine Kolo­kalisierung nachgewiesen werden (Abb. 4.30 1. Spalte).



**Abb. 4.30: Kolo­kalisierung des M- bzw. VP40-Proteins mit verschiedenen Kompartimentmarkern**

HeLa-Zellen wurden mit M bzw. VP40 transfiziert oder mit MV infiziert (MOI 0,5). Das M-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper MAB8910, der direkt mit einem Alexa594-Farbstoff gekoppelt war, das VP4-Protein mit einem  $\alpha$ -EBOV-Serum und Alexa594-gekoppeltem  $\alpha$ -Ziege-Sekundärantikörper ange­färbt (rot). Die Kompartimentmarker wurden mit verschiedenen Primärantikörpern und Alexa488 gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörpern ange­färbt (grün). Die Gelbfärbung zeigt eine Überlagerung des roten und grünen Signals an, wenn beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander vorliegen. In der oberen Reihe sind HeLa-Zellen, in der zweiten VP40 transfizierte, in der dritten M transfizierte und in der unteren MV infizierte HeLa-Zellen mit den einzelnen Kompartimentmarkern zu sehen. Die Marker sind von links nach rechts: EEA1, Lamp-1, LC3 und LC3 + CQ. Die Kolo­kalisierung wurde quantitativ mit Hilfe des Kolo­kalkulationskoeffizienten R (3.5.5) ausgewertet. Unten rechts ist in einigen Aufnahmen der Maßstab (10  $\mu$ m) angegeben.

Im Verlauf des retrograden endosomalen Transportes können Proteine von den endosomalen Membranen zur Zelloberfläche transportiert werden. Zu

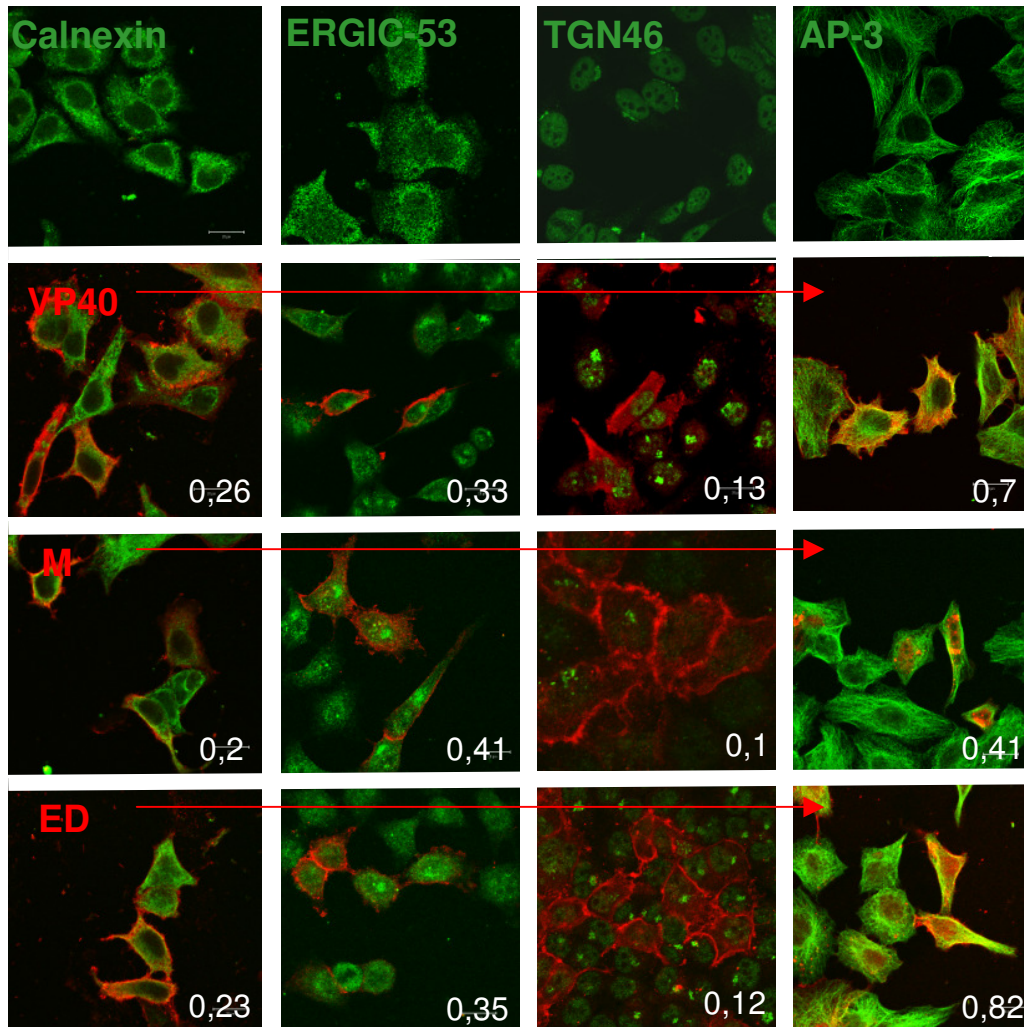
den am Transport beteiligten endosomalen Kompartimenten gehören neben den MVBs auch Lamp-1-positive späte Endosomen. Für das VP40-, das Matrix-Protein des Marburgvirus, wurde gezeigt, dass es mit Lamp-1 positiven Membranen interagiert und über den retrograden Weg an die Zelloberfläche gelangt (Kolesnikova et al., 2002, Kolesnikova et al., 2004a). Dies gilt zum Teil auch für das VP40-Protein aus dem EBOV. Hier konnte mit Lamp-1 eine partielle, aber schwache (R 0,58) (Abb 4.30 2. Spalte) Kolokalisation festgestellt werden. Dagegen ist keine Assoziation mit dem M-Protein in transfizierten oder in infizierten Zellen (R 0,21 bzw. 0,22) zu erkennen.

Für andere Viren konnte gezeigt werden, dass Autophagosomenmembranen als Plattformen für Replikation und Oligomerisierung dienen können (Wileman, 2006, Kyei et al., 2009). LC3, das einen wesentlichen Bestandteil der Autophagosomenmembran darstellt, zeigte eine punktförmige Verteilung im Zytoplasma (Abb. 4.30 3. Spalte). Nach Stabilisation der Autophagosomen mit Chloroquin (CQ) erhöhte sich die Frequenz LC3-positiver Kompartimente. Aber weder vor noch nach der Stabilisation konnte eine Kolokalisation mit dem VP40- oder dem M-Protein detektiert werden (Abb. 4.30 4. Spalte). Dies macht auch der Kolokalkoeffizient R deutlich (0,11 bis 0,15 ohne und 0,18 bis 0,25 nach Stabilisation).

Der sekretorische "Pathway", dem der Transport von Membranproteinen unterliegt, involviert initial das ER (markiert durch Calnexin), danach das ER-Golgi Intermediärkompartiment (ERGIC, markiert durch das ERGIC-53) und den Golgi bzw. das Trans Golgi Netzwerk (TGN, markiert durch das TGN46). Für keinen dieser Marker konnten signifikante Kolokalisationen mit dem VP40- oder dem M-Protein detektiert werden, noch zeigten sich Evidenzen für eine transfektions- bzw. infektionsbedingte Umverteilung (Abb. 4.3.1, 1.-3. Spalte).

Anders war das für das AP-3 (Adapterprotein-3), welches wichtig für den Transport von Vesikeln zu den späten Endosomen, den "Multivesicular-Bodies" (MVBs) und den Lysosomen ist. Betrachtet man nun AP-3 im Zusammenhang mit dem VP40-Protein (Abb. 4.31, 4. Spalte, 2. Reihe), so erkennt man eine starke Kolokalisation (R 0,71) der beiden Proteine. Dazu kommt es zu einer Umverteilung des AP-3 an die Plasmamembran. Im Gegensatz zu VP40- konnte beim transfiziertem M-Protein keine Kolokalisation (R: 0,41) mit AP-3 detektiert werden (Abb. 4.31, 4. Spalte, 3. Reihe). Das wiederum steht im Kontrast zu MV-infizierten Zellen, in denen

das M-Protein (ähnlich wie das VP40-Protein) eine starke Assoziation mit AP-3 zeigt (R 0,82) (Abb. 4.31, 4. Spalte, 4. Reihe).



**Abb. 4.31: Kolokalisation von M bzw. VP40 mit verschiedenen Kompartimentmarkern**

HeLa-Zellen wurden mit M bzw. VP40 transfiziert oder mit MV infiziert (MOI 0,5). Das M-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper MAB8910, der direkt mit einem Alexa594-Farbstoff gekoppelt war, das VP40-Protein mit einem  $\alpha$ -EBOV-Serum und Alexa594-gekoppeltem  $\alpha$ -Ziege-Sekundärantikörper angefärbt (rot). Die Kompartimentmarker wurden mit verschiedenen Primärantikörpern und Alexa488 gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörpern angefärbt (grün). Die Gelbfärbung zeigt eine Überlagerung des roten und grünen Signals an, wenn beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander vorliegen. In der oberen Reihe sind HeLa-Zellen, in der zweiten VP40 transfizierte, in der dritten M transfizierte und in der unteren MV infizierte HeLa-Zellen mit den einzelnen Kompartimentmarkern zu sehen. Die Marker sind von links nach rechts: Calnexin, ERGIC-53, TGN46 und AP-3. Die Kolokalisation wurde quantitativ mit Hilfe des Kolokalisationskoeffizienten R (3.5.5) ausgewertet. Unten rechts ist in einigen Aufnahmen der Maßstab (10  $\mu$ m) angegeben.

Damit ist AP-3 der einzige Marker, der einen Unterschied zwischen M-Protein-transfizierten und MV-infizierten Zellen aufzeigt. Unterschiede zwischen dem M- und dem VP40-Protein in der Assoziation mit Kompartimentmarkern konnten nur für Lamp-1 und AP-3 entdeckt werden.

#### 4.4 Transfer einer L-Domäne in das MV-M-Protein

Um zu untersuchen, ob man die Partikelfreisetzung des MV in einen ESCRT-abhängigen pathway lenken kann, wurde in das M-Protein die überlappende L-Domäne „PTAPPEY“ des Ebolavirus (Harty et al., 2000) eingesetzt. Die Entscheidung für diese L-Domäne begründet sich auf zwei Gegebenheiten. Zum Ersten besitzt das M-Protein schon ein Grundgerüst dieser L-Domäne. Wie in Abb. 4.32 zu sehen ist, besitzt das M-Protein drei wichtige der sieben Aminosäuren, nämlich die erste, die mittlere und die letzte. Zum Zweiten ist die Position der L-Domäne aus dem VP40-Protein fast identisch mit dem im M-Protein zu findenden Grundgerüst. Beide liegen am N-terminalen Ende der Sequenz. Die überlappende L-Domäne (PTAPPEY) wurde, wie in 3.3.4 beschrieben, mit Hilfe der Site-directed Mutagenese anstelle des PIQPTTY-Motivs innerhalb des pCG-M Plasmids eingesetzt (als M`PTAPPEY bezeichnet).

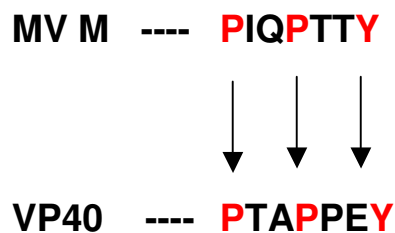
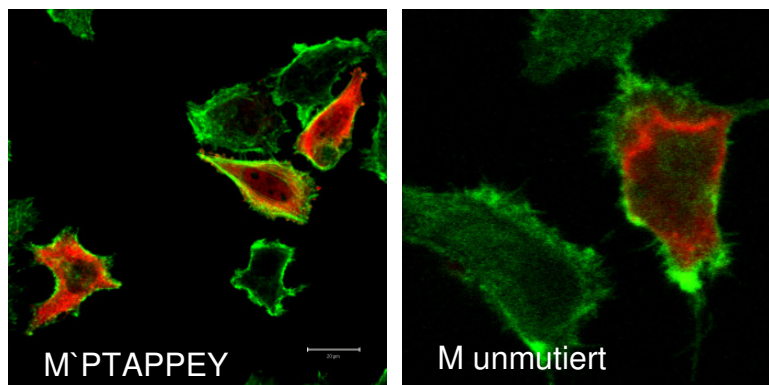


Abb. 4.32: Schematische Darstellung der MV-M-Sequenz, in der die überlappende L-Domäne PTAPPEY transferiert wurde

##### 4.4.1 Verteilung und Lipid Raft Assoziation der M`PTAPPEY-Protein-Mutante

Nach der Mutagenese galt es, als ersten Schritt die Verteilung der neuen M-Mutante zu untersuchen. Dafür wurden, wie in 3.3.7 beschrieben, HeLa-Zellen mit dem M`PTAPPEY-Plasmid transfiziert, nach 24 h fixiert, permeabilisiert und das M-Protein (rot) sowie der cortikale Aktinring (Phalloidin, grün) angefärbt. Wie in der Abb. 4.33 zu sehen zeigte die M`PTAPPEY-Mutante die gleiche Verteilung wie das unmutierte M-Protein. Das mutierte M-Protein konnte ebenfalls zu einem großen Anteil an der Plasmamembran und nur zu einem kleinen Teil im Zytoplasma der Zelle detektiert werden (Abb. 4.33).

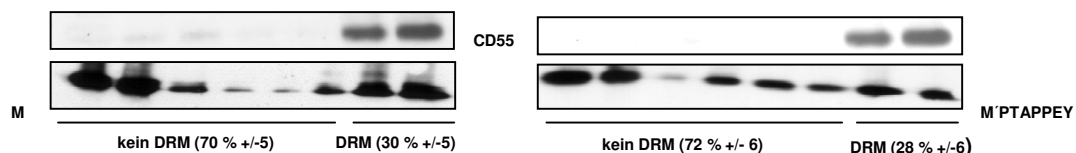




**Abb. 4.33: Verteilung der M`PTAPPEY-Protein-Mutante in HeLa-Zellen**

Für die Überprüfung der Verteilung der M`PTAPPEY-Mutante wurden HeLa-Zellen mit dem Plasmid, das die MV-Mutante exprimiert, transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und das M-Protein mit dem  $\alpha$ -M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Grün gefärbt ist der cortikale Aktinring (Phalloidin 488). Als Vergleich dienten Zellen, die mit dem unmutierten M-Plasmid transfiziert wurden (rechtes Bild). Unten rechts ist im linken Bild der Maßstab (20  $\mu$ m) angegeben.

Auch in der Lipid Raft Assoziation zeigte die M`PTAPPEY-Protein-Mutante gegenüber dem unmutierten M-Protein keinen Unterschied. Wie in 3.4.3 beschrieben, wurde der dreistufige Saccharose-Gradient fraktioniert und im Western Blot analysiert. Als Marker für die Lipid Rafts diente wiederum CD55.



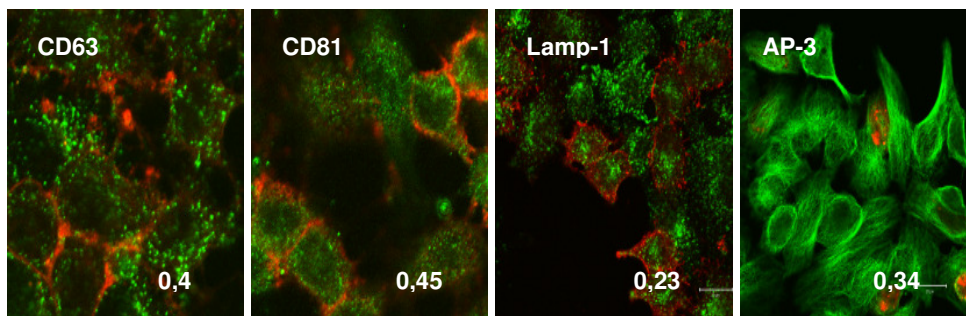
**Abb. 4.34: Vergleich der Assoziation des M- und M`PTAPPEY-Proteins mit Detergenz-resistenten Membranfraktionen**

Lysate von 293 T-Zellen, mit M (links) bzw. mit M`PTAPPEY (rechts) transfiziert (48 h), wurden einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation mit einem dreistufigen Gradienten unterzogen, die Fraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt (15 % Acrylamid) und im Western Blot auf das Vorkommen von M und CD55 (als Marker für Detergenz-resistente Membranen) untersucht. Die Quantifizierung der DRM- bzw. nicht DRM-Fractionen entspricht dem Mittelwert aus vier verschiedenen Versuchen.

Wie in der Abb 4.34 zu sehen, ist die Assoziation mit den DRMs bei der Mutante (32 %) und dem M-Protein (30 %) fast identisch. Für die Quantifizierung der Assoziation mit den Lipid Rafts wurde der Mittelwert aus vier Experimenten errechnet.

#### 4.4.2 Ändert der Transfer der L-Domäne in das M-Protein die Assoziation mit Kompartimenten und den Tetraspaninen?

Unterschiede zwischen dem VP40- und dem M-Protein in der Kolokalisation mit Membranmikrodomänen und Kompartimentmarkern waren marginal und betrafen nur die Assoziation mit Lamp-1, AP-3 und den Tetraspaninen CD63 und CD81. Deshalb wurde untersucht, ob der Transfer der L-Domäne Einfluss auf die Assoziation mit diesen Markern hat.



**Abb. 4.35: Kolokalisation der M'PTAPPEY Mutante mit CD63, CD81, Lamp-1 und AP-3**

Für die Überprüfung der Assoziation der M'PTAPPEY-Mutante mit den oben genannten Proteinen wurden HeLa-Zellen mit dem Plasmid, das die MV-M-Mutante exprimiert, transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und das M-Protein mit dem  $\alpha$ -M-Primärantikörper MAB8910, der direkt mit einem Alexa594 Farbstoff (rot) gekoppelt war, gefärbt. CD81, CD82 und AP-3 wurden mit Primärantikörpern aus der Maus und einem Alexa488  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (grün). Lamp-1 wurde mit einem Alexa488  $\alpha$ -Kaninchen-Sekundärantikörper detektiert. Unten rechts ist in einigen Aufnahmen der Maßstab (20  $\mu$ m) angegeben.

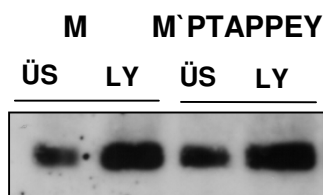
Wie man in der Abb. 4.35 sieht, zeigt die M'PTAPPEY-Protein-Mutante die gleiche Assoziation mit den Tetraspaninen, Lamp-1 und AP-3 wie das unmutierte M-Protein. Dies wird auch durch R-Werte bestätigt. Die Werte der M'PTAPPEY-Mutante zeigen in etwa dieselben Werte wie des M-Proteins und nicht etwa wie des VP40-Proteins (Tab. 4.5).

Marker\ Protein	MV-M	MV-M'PTAPPEY	EBOV-VP40
CD63	0,49	0,4	0,65
CD81	0,55	0,45	0,8
Lamp-1	0,21	0,23	0,58
AP-3	0,41	0,34	0,7

**Tabelle 4.5: Zusammenfassung und Vergleich der R-Werte von M'PTAPPEY, MV-M und EBOV-VP40**

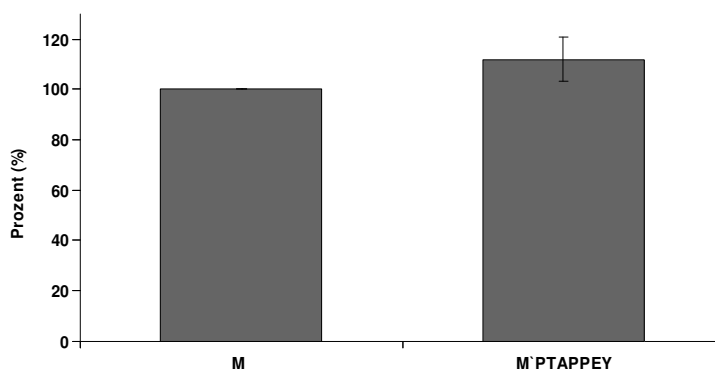
#### 4.4.3 Vergleichende Untersuchung der M- bzw. M`PTAPPEY-Protein abhängigen VLP-Produktion

Zur Analyse der VLP-Freisetzung der M`PTAPPEY-Protein-Mutante wurden 293 T-Zellen mit der Mutante und, zum Vergleich, mit dem unmutierten M-Protein transfiziert und 48 h nach der Transfektion, wie in 3.4.5 beschrieben, die Überstände geerntet, die Lysate hergestellt und im Western Blot analysiert (Abb 4.36).



**Abb. 4.36: Freisetzung von VLPs durch die M`PTAPPEY-Mutante**  
293 T-Zellen wurden mit pCG-M(ED) oder der pCG-M`PTAPPEY-Mutante transfiziert. Die Überstände dieser Zellen wurden nach 48 h ultrazentrifugiert und das sedimentierte Material zusammen mit 30 µg der Zellysate (LY) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Western Blot wurden die M-Proteine mit dem α-M-Antikörper (MAB8910) nachgewiesen.

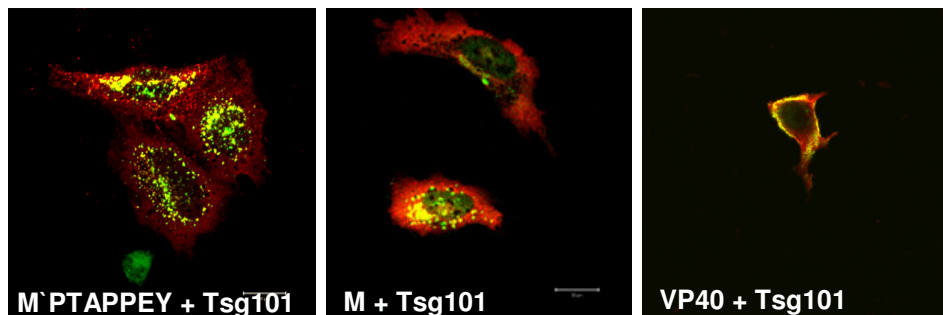
Für die Quantifizierung wurde wie in 4.1.2 beschrieben das Verhältnis zwischen der Menge des M-Proteins im Überstand und der Gesamtmenge des M-Proteins (ÜS + LY) berechnet. Der für das unmutierte M-Protein ermittelte Wert wurde als 100 % festgelegt. Gegenüber dem M-Protein zeigte die M`PTAPPEY-Protein-Mutante eine geringfügige Erhöhung der VLP-Freisetzung. Nach drei Experimenten konnte ein Mittelwert von 112 % ermittelt werden.



**Abb. 4.37: Quantifizierung der Menge an VLPs durch die M`PTAPPEY-Mutante**  
Der in Abb. 4.36 dargestellte Blot wurde mit AIDA quantitativ ausgewertet. Dafür wurde für die einzelnen Proben die Menge des M-Proteins im ÜS durch die gesamte Menge des M-Proteins (ÜS + LY) dividiert. Der ermittelte Wert wurde für die Positivkontrolle, dem unmutierten pCG-M-Plasmid, gleich 100 % gesetzt.

#### 4.4.4 Assoziation mit Tsg101 und Untersuchung der Abhängigkeit der VLP-Freisetzung vom ESCRT-System

Die Koexpression von M<sup>PTAPPEY</sup> zeigte keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von Tsg101, wie es bereits für das unmutierte M-Protein beschrieben wurde (Abb. 4.37, 4.3). In Übereinstimmung mit der Literatur (Silvestri et al., 2007) vermittelte das VP40-Protein hingegen eine deutliche Rekrutierung des Tsg101 an die Plasmamembran.

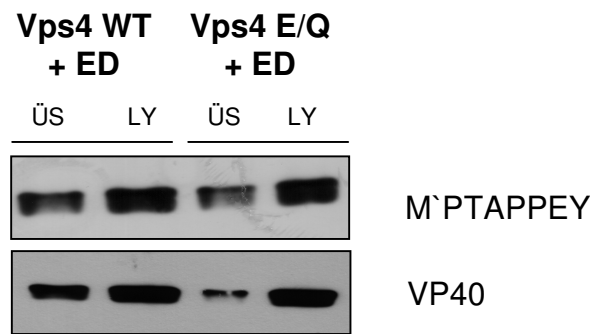


**Abb. 4.37: Kollokalisationsanalyse des M<sup>PTAPPEY</sup>-Proteins mit Tsg101**

HeLa-Zellen wurden ausgesät und doppelt entweder mit M, VP40 oder der M<sup>PTAPPEY</sup>-Mutante und dem WT-Protein von Tsg101 transfiziert. Das M-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (rot). Das ESCRT-Protein Tsg101 leuchtet durch sein YFP-tag im Fluoreszenzmikroskop grün. Die Gelbfärbung zeigt eine Überlagerung des roten und grünen Signals an, wenn beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander vorliegen. Rechts ist die Postivkontrolle zur Umverteilung des Tsg101 an die Budding site zu sehen. Hier wurden die Zellen doppelt mit VP40 (rot) und Tsg101 (grün) transfiziert. Unten rechts ist in einigen Aufnahmen der Maßstab (20  $\mu$ m) angegeben.

Der Einbau einer L-Domäne in das M-Protein zeigt also keinerlei Auswirkungen auf eine Umverteilung von Tsg101, obwohl die L-Domäne ein Sequenzmotiv für die Interaktion mit Tsg101 trägt.

Um zu zeigen, ob die VLP-Freisetzung der M<sup>PTAPPEY</sup>-Mutante ESCRT-abhängig ist, wurde erneut auf die 293 T-Zelllinie zurückgegriffen, die stabil (nach Induktion) Vps4 WT oder dessen dominant-negative Mutante, Vps E228 $\rightarrow$ Q, exprimiert.  $8 \times 10^6$  Zellen wurden mit dem M<sup>PTAPPEY</sup>- und zur Kontrolle mit dem VP40-Protein transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Überstände geerntet, die Lysate hergestellt (siehe 3.1) und im Western Blot analysiert (Abb. 4.38).

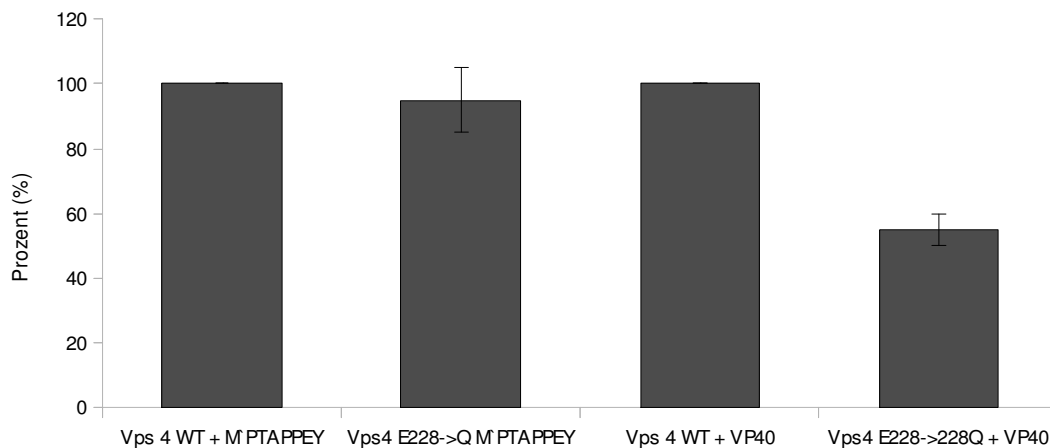


**Abb. 4.38: Freisetzung von VLPs der M`PTAPPEY Mutante in 293 T-Zellen, die stabil Vps4 WT bzw. dessen dominant negative Form exprimieren**

293 T Vps4-Zellen wurden nach Induktion mit PonA (1 mM) mit M`PTAPPEY oder VP40 transfiziert und nach 48 h die Überstände der Zellen ultrazentrifugiert und das sedimentierte Material zusammen mit 30 µg der aus den Zellen hergestellten Lysate (LY) im Western Blot analysiert. Die Zellen wurden mit NP-40-Lysepuffer lysiert. Im Western Blot wurden die M-Proteine mit dem α-M-Antikörper (MAB8910), die VP40-Proteine mit dem α-VP40-Antikörper (2C4) nachgewiesen.

Der nach der Quantifizierung ermittelte Wert (siehe 4.1.2) wurde für die Positivkontrolle, Zellen die Vps4 WT exprimierten, gleich 100 % gesetzt. Die dominant negative Mutante von Vps4 hatte keinen Einfluss auf die VLP-Freisetzung des M`PTAPPEY-Proteins (93 % +/-10), im Gegensatz zum VP40-Protein. Hier verringerte sich die VLP-Freisetzung in den dominant negativen Vps4 exprimierenden Zellen um 45 %.

Damit hatte der Einbau der überlappenden L-Dömane aus dem VP40-Protein die Partikelfreisetzung des MV nicht in den ESCRT-abhängigen Weg verschoben.



**Abb. 4.39: Quantifizierung der VLP-Produktion der M`PTAPPEY-Mutante bzw. des VP40-Protein in 293 T Vps4-exprimierenden Zellen**

Die in Abb. 4.38. dargestellten Blots wurde quantitativ ausgewertet. Dafür wurde für die einzelnen Proben die Menge des M-Proteins (bzw.VP40-) im ÜS durch die Gesamtmenge des M-Proteins ((bzw. VP40) (ÜS + LY) dividiert. Der ermittelte Wert der Positivkontrolle, pCG-M`PTAPPEY (bzw. VP40) in Vps4 WT-Zellen, wurde gleich 100 % gesetzt.

## 5 Diskussion

Die Morphogenese von Viruspartikeln und deren Freisetzung aus infizierten Zellen sind späte Schritte im viralen Lebenszyklus. Matrix-Proteine (M) negativsträngiger RNA-Viren bzw. die Gag-Proteine der Retroviren, bei denen es sich um periphere Membran-assoziierte Proteine handelt, spielen für diese Prozesse eine besonders wichtige Rolle. In Analogie zu Befunden in orthologen Viren wurde schon früh eine wesentliche Bedeutung des MV-M-Proteins für den Zusammenbau und die Freisetzung viraler Partikel postuliert (Rima et al., 1995).

Neben seiner Funktion als Transkriptions- und Fusionsregulator ist das M-Protein der wichtigste Faktor der Morphogenese und Partikelfreisetzung. Im Verlauf der MV-Infektion interagiert das M-Protein mit dem viralen Nukleoproteinkomplex in der Zelle bzw. im Innern der Viruspartikel und mit den viralen Glykoproteinen auf der Oberfläche (Cathomen et al., 1998b; Runkler et al., 2007). Das MV-M-Protein ist ein multifunktionales Protein, das, wenn an den RNP-Komplex gebunden, (Suryanarayana et al., 1994) u.a. die MV-Transkription negativ reguliert. Wird durch siRNA die Expression des Matrix-Proteins inhibiert, steigt zum einen die fusogene Aktivität der Glykoproteine, zum anderen erhöht sich die Expression der übrigen viralen mRNAs (Reuter et al., 2006). Eine erhöhte Fusionsaktivität zeigen auch MV, deren M-Proteine deletiert wurden (Cathomen et al., 1998a). Das MV-M-Protein assoziiert mit Membranen und speziellen Membranmikrodomänen, sogenannten Detergenz-resistenten Membranfraktionen (DRMs) und fördert nach transienter Expression in Fibroblasten die Produktion virusähnlicher Partikel ("virus-like particles", VLPs) (Pohl et al., 2007). Diese VLPs sind in Morphologie und Größe nicht von Viruspartikeln zu unterscheiden. Bekannt ist weiterhin, dass das M-Protein zu höhermolekularen Komplexen oligomerisiert und dabei transient monoubiquitiniert vorliegt (Pohl et al., 2007). Monoubiquitinierung zellulärer Membranproteine dient als Signal für die Endozytose und die ESCRT-vermittelte Sortierung in MVBs. Auch die Gag-Proteine verschiedener Retroviren werden, wenn auch nur in geringem Maße, monoubiquitiniert (Freed, 2002). Inwieweit der Transport zur Zytoplasmamembran und die Morphogenese von VLPs oder viraler Partikel vom ESCRT-Komplex abhängig ist, ist Gegenstand dieser Dissertation.

### ***Potentielle L-Domänen in der MV-M-Sequenz***

Funktionelle klassische L-Domänen, die entscheidend für die Rekrutierung der ESCRT-Komplexe und die anschließende Sortierung retroviraler Gag-Proteine und filo- und rhabdoviraler M-Proteine sind, wurden in MV-Proteinen bisher nicht definiert.

Die Tatsache, dass MV-M-Proteine die Produktion von VLPs vermitteln, lässt auf die Existenz wenigstens einer funktionellen L-Domäne schließen. Potenzielle Kandidaten sind die beiden hochkonservierten Motive YMFL an Position aa 52-55 und PSVP an Position aa 311-314 (Abb. 4.1), die möglicherweise mit den zellulären Proteinen Aip-1/ALIX bzw. Tsg101 interagieren (Freed, 2002). Die 2005 beschriebene paramyxovirale L-Domäne mit dem Sequenzmotiv FPIV ist in der MV-M-Proteinsequenz nicht vorhanden (Schmitt et al., 2005). Eine geringe Ähnlichkeit zu dem FPIV zeigt nur das FKNV-Motiv am C-Terminus der M-Protein-Sequenz (Abb. 4.1). Dies entspricht aber nicht der Position des FPIV-Motivs beim Mumpsvirus. Da L-Domänen aber positionsunabhängig wirken, ist die Position einer L-Domäne nicht von Bedeutung (Li et al., 2002, Parent et al., 1995, Yuan et al., 2000). Das FPIV-Motiv ist im Mumps-Virus vielmehr am N-Terminus in Position aa 21-24 zu finden. An dieser Stelle zeigt die MV-M-Sequenz ein SIAP-Motiv, das keinerlei Ähnlichkeit zum FVIP-Motiv aufweist. Für die FPIV-Domäne wurde bisher noch kein Interaktionspartner aus dem ESCRT-Komplex gefunden. Experimentell belegt wurde bisher, dass die FPIV-Domäne eine fehlende PTAP-Domäne ersetzen kann (Schmitt et al., 2005).

### ***Kolokalisationsanalysen des M-Proteins mit den möglichen Interaktionspartnern des ESCRT-Systems***

Um den Einfluss des ESCRT-Systems auf die Morphogenese und Partikelfreisetzung des MV zu untersuchen, wurden die potentiellen L-Domänen im M-Protein mutiert und der Einfluss auf die VLP-Produktion untersucht. Zudem wurde in Kolokalisationsanalysen nach möglichen Interaktionspartnern des M-Proteins im ESCRT-System gesucht und gleichzeitig der Einfluss dominant negativer Mutanten der ESCRT-Proteine auf die MV-Freisetzung in 293 T-Zellen analysiert.

In der Abb. 4.3 und 4.5 zeigen die Immunfluoreszenzanalysen, dass das M-Protein und Tsg101 zwar kolokalisierten, die Rekrutierung des Tsg101 zur

Plasmamembran aber ausblieb (Abb. 4.3). Mit Aip-1 kolokalisiert das M-Protein nur in infizierten Zellen (Abb. 4.5). Ähnlich wie beim Tsg101 wurde Aip-1 aber nicht zur Budding site, d.h. zur Plasmamembran, umverteilt. Anders verhielt es sich mit der ATPase Vps4, die die ESCRT-Interaktion mit der ubiquitinierten Cargo terminiert. Diese kolokalisierte partiell mit dem M-Protein an der Plasmamembran (Abb. 4.3, 4.5). Virale Proteine, die funktionelle PTAP-Domänen enthalten, wie das VP40-Protein des Ebolavirus, zeigen dagegen eine Umverteilung des Tsg101 an die Budding site (Abb. 4.37) (Martin-Serrano et al., 2001).

Auch die Koexpression des M-Proteins mit den dominant negativen Mutanten der ESCRT-Proteine zeigte keine Rekrutierung dieser Proteine an die Plasmamembran. Das M-Protein verteilte sich weiterhin zum größten Teil an der Plasmamembran und die ESCRT-Mutanten im Zytoplasma (Abb. 4.4, 4.5). Dies steht im Gegensatz zu Studien, die eine Interaktion der ESCRT-Komplexe mit dem Gag-Protein des EIA-Virus untersuchten. Hier wurde sowohl das Vps4 WT-Protein als auch dessen dominant negative Mutante an die Plasmamembran umverteilt (Tanzi et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls für das Ebola-VP40-Protein erzielt, das eine Umverteilung des Tsg101- und des Vps4-Proteins (WT und Mutante) zur Plasmamembran (Silvestri et al., 2007) induzierte.

### ***Einfluss dominant negativer ESCRT-Proteine auf die MV-Freisetzung***

Obwohl das Vps4 in MV-infizierten oder M-Plasmid transfizierten Zellen ineffizient an die Plasmamembran rekrutiert wurde, wurde der Einfluss der ESCRT-Proteine auf die Virusfreisetzung untersucht. Dafür wurden in 293 T-Zellen vor der Infektion verschiedene ESCRT-Proteine überexprimiert. Als Kontrolle für die dominant negativen Proteine von Aip-1 und Tsg101 dienten dabei die Wildtyp-Proteine (Abb. 4.7). Insgesamt konnte weder bei einer Überexpression der Wildtyp-Proteine noch der dominant negativen Mutanten eine Veränderung der Menge an M-Protein (Abb. 4.8) oder an infektiösem Virus im Überstand (Abb. 4.9) festgestellt werden. Anders ist es beim HI-Virus, bei dem eine Überexpression der Tsg101-Mutante eine Reduktion der Virusfreisetzung zwischen 60 und 80 % (Demirov et al., 2002; Freed, 2003) induzierte. Auch die RNAi vermittelte Depletion von zellulärem Tsg101 verminderte stark die HIV-Partikelfreisetzung (Garrus et al., 2001). Obwohl Tsg101 und Aip1 beim MV keinen Einfluss auf die Virusfreisetzung hatten,



könnte trotzdem ein anderer bisher nicht untersuchter Interaktionspartner aus dem ESCRT-System wichtig sein, da bei den Kolokalisationsanalysen eine partielle Kolokalisation an der Budding site mit Vps4 auftrat.

### ***Einfluss der Vps4 ATPase auf die MV-Freisetzung***

Sensitivität der Virusfreisetzung gegenüber dominant negativem Vps4 (Vps4 E228→Q) gilt als entscheidendes Kriterium für eine ESCRT-Beteiligung. Hierfür standen 293 T-Zellen zur Verfügung, die PonasteroneA induzierbar stabil Vps4 WT oder Vps4 (E228→Q) exprimieren (Abb. 4.11). Eine Studie von L. Kolesnikova beschreibt für EBOV in 293 Vps4 E228→Q exprimierenden Zellen eine Reduktion der Virusproteine im Überstand um mehr als 50 % und eine Reduktion in der Abgabe von infektiösem Virus um das 11-fache (1,5 Log-Stufen im Titer) (Kolesnikova et al., 2009).

Ähnliches gilt auch für HIV und MLV. Hier waren nach der Expression der Vps4 E228→Q-Mutante weniger als 10 % des Virus im Überstand nachweisbar (Garrus et al., 2001). Auch das Parainfluenzavirus 5 (SV5) zeigte eine fast vollständige Inhibierung des in den Überstand abgegebenen Virus nach der Überexpression von Vps4 E228→Q (Schmitt et al., 2005). Die MV-Freisetzung wurde durch die Überexpression der Vps4 E228→Q-Mutante nicht gehemmt (Abb. 4.12). So hatte weder die Expression des Vps4 Wildtyps noch die der dominant-negativen Mutante Einfluss auf die Abgabe von infektiösem Virus in den Überstand aus 293 T-Zellen (Abb. 4.13). Auch eine Infektion dieser Zellen mit unterschiedlichen MOIs führte zu keinem anderen Ergebnis (Abb. 4.15).

### ***Proteasom-Inhibitoren***

Es ist bekannt, dass die Virusfreisetzung vieler Viren z. B. Retroviren durch Zugabe von Proteasomen-Inhibitoren und die dadurch bedingte Verringerung an freiem Ubiquitin in der Zelle unterbunden werden kann (Ott et al., 2003; Patnaik et al., 2000; Schubert et al., 2000). Die Ubiquitin-Modifikation von Proteinen steht in Übereinstimmung mit der Notwendigkeit zur Initiation und schrittweisen Rekrutierung von ESCRT-Komplexen und der nachfolgenden Sortierung und Vesikelknospung in MVBs, die bei Viren dem Transport der M-Proteine zur Plasmamembran, dem Ort der Partikelknospung, entspricht. Weil es aber keinen Hinweis auf eine ESCRT-Beteiligung gibt und nur eine

kleine Fraktion des M-Proteins eine Ubiquitin-Modifikation trägt und gleichzeitig die VLP-Produktion des M-Proteins sehr gering ist, wäre der Einfluss einer MG 132 Behandlung, ein Inhibitor des Ubiquitin-Proteasom-Systems, schwer nachzuweisen (Pohl et al., 2007).

### ***Mutation potentieller L-Domänen***

Potentielle L-Domänen innerhalb des MV-M-Proteins waren die beiden hochkonservierten Motive YMFL an Position aa 52-55 und PSVP an Position aa 311-314 (Abb. 4.1). Sie ähneln dem YxxL- und dem PT/SAP-Motiv (Demirov and Freed, 2004). Eine geringe Ähnlichkeit zur FVIP-Domäne zeigte nur das FKNV-Motiv in Position aa 332-335. Diese drei Motive und das prolinreiche Motiv in Position aa 20-23 (PIQP) wurden wie das PTTY-Motiv in Position aa 23-26 (Abb. 4.1) mutiert und durch je vier Alanine ersetzt (Abb. 4.16). Mutationsstudien an L-Domänen zeigen, dass eine Änderung einer oder zweier Positionen innerhalb eines Motivs oft schon ausreicht, um die funktionelle Interaktion mit den ESCRT-Proteinen zu verhindern (Huang et al., 1995).

Trotz der Mutation aller vier Aminosäuren zeigten alle M-Mutanten bis auf die M`PTTY-Mutante eine normale intrazelluläre Verteilung (Abb. 4.19) und eine ähnliche Lipid Raft Assoziation (Abb. 4.20). Dagegen wiesen Mutationen der L-Domäne im HIV-Gag-Protein eine veränderte Verteilung auf. Durch die Unterbrechung des Transportweges zur Plasmamembran akkumulierte das Gag-Protein im Zytoplasma (Demirov and Freed, 2004). Das Nipahvirus (NiV) Matrix-Protein, das eine YxxL L-Domäne besitzt, weist nach Mutation des Motivs ebenfalls eine veränderte, zellkern-assoziierte, intrazelluläre Verteilung auf. Damit verbunden ist eine Inhibierung der VLP-Produktion (Ciancanelli and Basler, 2006), sodass das YxxL-Motiv bei NiV nicht nur eine L-Domänen-Funktion zeigt, sondern auch als Transport-Signal wirkt. Einzig die M`PTTY-Mutante zeigte im Vergleich zum unmutierten M-Protein ein verändertes Verteilungsmuster. Hier akkumulierte der größte Teil des M-Proteins im Zytoplasma und nur ein kleiner Anteil gelangte an die Plasmamembran (Abb. 4.19).

Trotz der veränderten Verteilung produzierte die M`PTTY-Mutante die gleiche Menge VLPs (Abb. 4.21) wie das unmutierte M-Protein und die anderen M-Mutanten (Abb. 4.22).

Es scheint also, dass der geringe Anteil des M-Proteins, der bei der M`PTTY-Mutante in die Nähe der Plasmamembran gelangte, ausreichend für die VLP-Produktion war. Die erhöhte Akkumulation im Zytoplasma weist darauf hin, dass dieses Motiv wichtig für die Verteilung und den Transport des M-Proteins ist.

### **ESCRT-unabhängige Virusfreisetzung**

Basierend auf der ursprünglichen Bedeutung einer L(Late(späte))-Domäne muss das M-Protein, das ja die VLP-Freisetzung katalysiert, entsprechende, bislang nicht identifizierte L-Domänen enthalten. ESCRT-unabhängig werden ebenfalls einige andere umhüllte Viren freigesetzt. So zeigten das humane Zytomegalovirus (HCMV) nach der Depletion des zellulären Tsg101 und Aip-1 durch siRNA keine Reduktion in der Virusfreisetzung und das, obwohl sich in den Tegument- und Glykoproteinen mögliche PPxY, PTAP und YxxL L-Domänen Motive befinden. Eine Depletion des Vps4 steigerte sogar leicht die HCMV-Partikelfreisetzung, während die VLP-Produktion von Gag-Proteinen und die Virusfreisetzung von VSV inhibiert wurden (Fraile-Ramos et al., 2007). Auch beim Influenza-A Virus zeigt das ESCRT-System keinen Einfluss auf die Partikelfreisetzung. Dies gilt auch unabhängig davon, ob Vps4 E228→Q überexprimiert wird oder ob andere ESCRT-Proteine durch siRNA depletiert werden (Bruce et al., 2009).

### ***Vergleichende Analyse des M-Proteins mit dem VP40-Protein***

Der Prozess der Partikelfreisetzung ist für das MV ESCRT-System unabhängig. Es galt im Rahmen der Dissertation nun zu analysieren, ob es in der Verteilung von Matrixproteinen, die während des Prozesses der Virusfreisetzung mit dem ESCRT-System interagieren, Unterschiede gibt zu Matrix-Proteinen, die nicht mit dem ESCRT-System interagieren. Für das MV-M-Protein diente als Vergleich das VP40-Matrixprotein des Ebolavirus. Dieses VP40-Protein besitzt eine überlappende L-Domäne, die das PTA(P) und das (P)PEY-Motiv enthält. Das (P) ist Teil beider Motive (Harty et al., 2000). Das VP40-Protein interagiert mit Tsg101 (Abb. 4.37) und ist abhängig von der Vps4 ATPase (Harty et al., 2000; Martin-Serrano et al., 2001; Silvestri et al., 2007).

Der Fokus der vergleichenden Analyse lag in der Untersuchung der Kolokalisation mit verschiedenen Kompartimenten, sowie in der Assoziation mit bestimmten Membran-Mikrodomänen. Im Besonderen handelt es sich bei diesen Membran-Mikrodomänen um TEMs ("tetraspanin enriched microdomains") und DRMs.

### ***Kolokalisationsanalysen mit Kompartimentmarkern***

Die Kolokalisationsanalyse zeigte, dass weder das VP40- noch das M-Protein mit dem trans-Golgi-Netzwerk Marker TGN46 assoziierten (Abb. 4.31, 3. Spalte). Dies ist unterschiedlich zum HIV-Gag-Protein, das mit TGN46 kolokalisiert und durch POSH (plenty of SH3), eine Ubiquitin-Ligase, die ebenfalls mit dem trans-Golgi Netzwerk assoziiert ist, ubiquitiniert wird (Alroy et al., 2005). Die Tatsache, dass das M- und VP40-Protein auch ubiquitiniert waren, aber nicht mit dem TGN assoziierten, deutet eventuell auf eine Beteiligung anderer Ubiquitin-Ligasen hin. Mit dem ER (Abb. 4.31, 1. Spalte), dem ER-Golgi Intermediärkompartiment (ERGIC) (Abb. 4.31, 2. Spalte) und LC3 (Abb. 4.30, 3. Spalte), dem Autophagosomenmarker, konnte ebenfalls keine Interaktion beobachtet werden. Eine Kolokalisation mit dem ER bzw. ERGIC war auch nicht zu erwarten, da die Funktion dieser Kompartimente die Verteilung von Transmembranproteinen ist. Eine Kolokalisation mit den Autophagosomen wäre vorstellbar gewesen, da Autophagosomen-Membranen als Plattformen für die Replikation vieler Viren dienen (Kyei et al., 2009; Wileman, 2006, Huang et al., 2009; Mizui et al., 2009; Taylor et al., 2009; Zhou et al., 2009). Aber selbst nach der Stabilisation der Autophagosomen mittels Chloroquin (Abb. 4.30, 4. Spalte) war keine Assoziation des M- und VP40-Proteins mit LC3 nachweisbar. Auch führte die Stabilisation der Autophagosomen nicht zur einer Akkumulation des M-Proteins in der Zelle (Koethe et al, in Vorbereitung).

Ebenfalls keine Assoziation zeigten das VP40- und das M-Protein mit den frühen Endosomen (EEA-1 als Marker). Dabei spielte es auch keine Rolle, ob das M-Protein alleine in den Zellen exprimiert wurde oder ob die Zellen infiziert waren (Abb. 4.30, 1. Spalte). Hier unterschieden sich beide Proteine vom Gag-Protein. Für das HIV-Gag-Protein konnte eine Assoziation mit den frühen Endosomen belegt werden (Kawada et al., 2008).

Das Ebola-VP40-Protein zeigt im Gegensatz zum M-Protein eine partielle Assoziation mit Lamp-1, einem Marker der späten Endosomen (Abb. 4.30,

2. Spalte). Diese Kollokalisierung deutete auf eine Beteiligung am endosomalen Transportweg für das EBOV hin, der für das verwandte Marburgvirus schon beschrieben wurde (Jasenosky and Kawaoka, 2004; Kolesnikova et al., 2004).

Der vesikuläre Transport von den späten Endosomen zur Plasmamembran ist essentiell für die Freisetzung von Ebola-, Marburg- und Masernviren. Dabei spielt das Rab9-Protein eine wichtige Rolle. Wird es durch siRNA deletiert, reduziert sich die MV-Freisetzung nach zwei Tagen um mehr als 90 % (Murray et al., 2005). Im Zusammenhang mit dem vesikulären Transportweg ist AP-3 ein weiterer wichtiger Faktor. Das AP-3 (Adaptorprotein-3) ist u.a. wichtig für den Transport von Vesikeln zu den späten Endosomen, den MVBs und den Lysosomen. Außerdem ist das AP-3 am Transport der lytischen Granula in die Immunologische-Synapse und zu den tubulären Sortierungskompartimenten beteiligt (Clark et al., 2003; Newell-Litwa et al., 2007; Peden et al., 2004). Es ist außerdem wichtig für den Transport des Gag-Proteins zur Plasmamembran und somit für den Freisetzungsprozess des HIV (Dong et al., 2005; Garcia et al., 2008).

Das VP40-Protein zeigte eine Interaktion mit AP-3 in HeLa-Zellen, erkennbar ist dies durch die Umverteilung von AP-3 an die Plasmamembran und die dortige Kollokalisierung (Abb. 4.31, 4. Spalte). Im Gegensatz zum VP40-Protein des EBOV scheint das M-Protein nicht mit AP-3 zu assoziieren, wenn es alleine in Zellen exprimiert wurde. Sind die Zellen maserninfiziert, kollokalisiert das AP-3 mit dem M-Protein (Abb. 4.31, 4. Spalte). Das AP-3 ist somit wichtig für den VP40-Transport, aber nicht für den des M-Proteins. Da das M-Protein selbst wohl nicht der Interaktionspartner des AP-3 ist, müssen andere virale Proteine, die mit dem M-Protein interagieren können, mit dem AP-3 assoziieren und so beide in lokale Nähe zueinander bringen. Obwohl es bisher noch nicht experimentell bestätigt wurde, scheinen das N- oder das P-Protein Kandidaten dafür zu sein. Um dies zu beweisen, müsste man HeLa-Zellen mit Plasmiden, die für das M- und für das N- oder das P-Protein kodieren, kotransfizieren und danach die Assoziation mit AP-3 untersuchen. In weiteren Studien müsste nun analysiert werden, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen AP-3 und der MV- bzw. der EBOV-Freisetzung gibt und ob diese Interaktion essentiell für die Partikelfreisetzung ist. Für HIV wurde gezeigt, dass durch eine Herunterregulierung der Delta-Untereinheit des AP-3 die Partikelfreisetzung in infizierten dendritischen Zellen signifikant reduziert werden konnte (Garcia et al., 2008). Eine andere Studie zeigte,

dass das Inhibieren der Interaktion des Gag-Proteins mit AP-3, den Transport des Gag-Proteins zu den MVBs unterbindete und damit die HIV-Freisetzung verhinderte (Dong et al., 2005).

### ***Analyse der Tetraspanin-Assoziation des M- und VP40-Proteins***

Tetraspanine bilden eine Gruppe von etwa 200 bis 350 Aminosäuren langen Transmembranproteinen, die sich durch eine für sie charakteristische Sekundär- und Tertiärstruktur auszeichnen. Wie der Name implementiert, enthalten Tetraspanine als auffälligstes Kriterium vier hydrophobe transmembrane Domänen. Zwischen der ersten und zweiten sowie der dritten und vierten Transmembranregion besitzen Tetraspanine zwei extrazelluläre Schleifen, die diverse Proteinbindungen ermöglichen. Tetraspanine können sehr unterschiedliche Funktionen haben und sind z.B. bei der Aktivierung, Adhäsion und Motilität von Zellen, bei der Zelldifferenzierung und den Zell-Zell-Interaktionen beteiligt. Sie werden auch mit Tumorwachstum und Metastasierungsprozessen in Verbindung gebracht (Berditchevski and Odintsova, 2007). Die verschiedenen Tetraspanine weisen ein sehr unterschiedliches Expressionsverhalten auf. Während einige eine fast ubiquitäre Verbreitung aufweisen (CD9, CD63, CD81, CD82), haben andere ein sehr spezifisches Expressionsmuster in Zellen des Immunsystems (CD37, CD53). Fast immer befinden sich mehrere Tetraspanine gleichzeitig auf derselben Zelle. Eine besondere Eigenschaft der Tetraspanine liegt in deren Fähigkeit, molekulare Interaktionen untereinander und mit anderen Oberflächenproteinen wie z. B. Integrinen einzugehen und eine strukturelle Plattform zu bilden. Diese molekularen Komplexe werden als tetraspaninreiche Mikrodomänen (TEMs) bezeichnet (Boucheix and Rubinstein, 2001; Hemler, 2005; Shoham et al., 2006). Sie könnten eine ähnliche Funktion haben wie die DRM-Mikrodomänen (Munro, 2003; Pierce, 2004), von denen angenommen wird, dass sie durch eine lokale Anreicherung von Proteinen lokale Komplexe amplifizieren. Tetraspanine wurden untersucht, da Studien zeigen, dass die TEMs wichtig für die Freisetzung von HI- und Influenza-Viren sind (Deneka et al., 2007; Khurana et al., 2007; Kremontsov et al., 2009; Sato et al., 2008). In den TEMs waren neben den viralen Partikeln auch bestimmte ESCRT-Proteine zu finden. Dies spricht für die TEMs als einem Ort der Virusfreisetzung (Nydegger et al., 2006).

Bei der Assoziation mit den analysierten Tetraspaninen konnten zwischen dem VP40- und dem M-Protein nur geringe Unterschiede festgestellt werden. Während es beim CD9 (Abb. 4.28, 1. Spalte) keinerlei Unterschiede gab, schien die Assoziation des CD82 mit dem M-Protein geringfügig höher zu sein als mit dem VP40-Protein (Abb. 4.28, 4. Spalte). Ähnlich verhielt es sich mit CD63 und CD81 (Abb. 4.28, 2+3. Spalte). Beide Matrix-Proteine, kolokalisierten partiell mit den Proteinen, wobei die Kolokalisation von VP40 geringfügig stärker war.

In der Assoziation mit den Tetraspaninen zeigten das VP40- und das M-Protein keine großen Unterschiede, deshalb mögen die TEMs für beide Proteine für die Freisetzung (Budding) gleich wichtig oder unwichtig sein. Um dies zu klären, müssten weitere Untersuchungen gemacht werden. Ein Ansatz wäre die Depletion der einzelnen Tetraspaninen (Knockout-Experimente) und deren Auswirkung auf die Virus-Freisetzung. Der Nachweis einzelner Tetraspanine in freigesetzten Viruspartikeln könnte ein Hinweis sein, welche Tetraspanine für die Virus-Freisetzung von Bedeutung sind.

Einzelnen Tetraspaninen eine Interaktion mit bestimmten Mikrodomänen zuzuordnen ist eigentlich unmöglich, da die TEMs immer mehrere Tetraspanine enthalten, die sich von Zelltyp zu Zelltyp in Anzahl und Art der einzelnen Tetraspanine unterscheiden (Hemler, 2005). Dies scheint im Widerspruch zu liegen mit Studien, die zeigen, dass bestimmte Mitglieder der TEMs wichtig für die Freisetzung von HI- und Influenza-Viren sind (Deneka et al., 2007; Khurana et al., 2007; Kremontsov et al., 2009; Sato et al., 2008. Nydegger et al., 2006). Eine Studie von M. Marsh zeigte jedoch, dass die Assoziation des Gag-Proteins mit CD63 und die Inkorporation von CD63 in neu entstandenen Partikeln nicht essentiell für die Virusproduktion und die Infektiosität des Virus ist (Ruiz-Mateos et al., 2008).

Deshalb ist die Assoziation mit verschiedenen Tetraspaninen wohl nicht essentiell für den Zusammenbau bzw. den Freisetzungsprozess der Viren (Deneka et al., 2007; Dong et al., 2005; Garcia et al., 2005).

### ***Analyse der MV-Freisetzung in Cholesterin-depletierten Zellen***

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass cholesterinreiche Plasmamembran-Mikrodomänen, bekannt als DRMs (Brown and London, 2000; Simons and Toomre, 2000), eine wichtige Rolle in der Replikation und

Freisetzung umhüllter Viren spielen (Briggs et al., 2003; Ono and Freed, 2005). Neben Retroviren (Ding et al., 2003; Ono and Freed, 2001) weisen auch Orthomyxo- (Manie et al., 2000; Panchal et al., 2003; Scheiffele et al., 1999; Takeda et al., 2003), Paramyxo- (Manie et al., 2000; Vincent et al., 2000) und Filoviren (Bavari et al., 2002; Takeda et al., 2003) eine Assoziation mit Lipid Rafts auf.

Im Rahmen dieser Studie wird gezeigt, dass durch eine Depletion des Cholesterins mittels  $\beta$ -MCD 50 % weniger M-Protein in den Überstand abgegeben wurde (Abb. 4.23, 4.24), und, dass die Abgabe von infektiösem Virus in den Überstand  $\beta$ -MCD behandelter Zellen um mehr als eine Log-Stufe reduziert ist (Abb. 4.25). Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit einer HIV-Studie, die zeigte, dass Cholesterin-Depletion die HIV-Freisetzung in HeLa-Zellen um 70-80 % reduzierte (Ono and Freed, 2001). Für das EBOV und MARV konnte gezeigt werden, dass nach einer  $\beta$ -MCD Behandlung die viralen Proteine nicht mehr mit den Lipid Rafts assoziierten. Eine Untersuchung der Partikelfreisetzung in diesen Zellen erfolgte nicht. Da aber Marburg- und Ebola-Virionen während des Budding-Prozesses das Raft-Molekül GM1 aufnehmen, scheinen die Lipid Rafts auch für diese Viren der Ort der Partikelfreisetzung zu sein (Bavari et al., 2002).

Die Wichtigkeit der Lipid Rafts für die Partikelfreisetzung konnte auch durch die Analyse der Lipidhülle von HIV bestätigt werden. Mittels Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass die Membran von HIV die gleiche Zusammensetzung wie Lipid Rafts aufwies und sich somit stark von der Zusammensetzung der übrigen Zellmembran von T-Zellen, die für die Experimente benutzt wurden, unterschied. Durch die Inhibierung der Synthese von Sphingolipiden konnte in dieser Studie die Abgabe von infektiösem Virus stark reduziert werden. Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen wurde nach Inhibierung 80 % weniger infektiöses Virus von T-Zellen in den Überstand abgegeben (Brügger et al., 2006).

### ***DRM-Assoziation des M- und VP40-Proteins***

Die Analyse der Lipid Raft-Assoziation in dieser Arbeit zeigte keinerlei Unterschiede in der Verteilung der beiden Matrix-Proteine (M und VP40) innerhalb der CD55-positiven Fraktionen. Beide Proteine waren zu etwa einem Drittel (30 %) in 293 T-Zellen in den Lipid Raft-Fraktionen zu finden (Abb. 4.28). Die Raft-Assoziation der beiden Proteine ist also ebenso wenig



unterschiedlich wie ihre Tetraspanin-Assoziation. Damit unterschieden sich das M- und das VP40-Protein zwar sicherlich in ihrem Bedarf an ESCRT-Komplexen zur Partikelfreisetzung, nicht aber wesentlich in ihrer Assoziation mit zellulären Kompartimenten oder Membranmikrodomänen.

### ***Assoziation mit der Plasmamembran***

Einzig die Effizienz der Assoziation an der Plasmamembran (Abb. 4.26) war unterschiedlich. An der Plasmamembran akkumulierte das VP40- deutlich stärker als das M-Protein (Abb. 4.27). Beide Proteine kotransfiziert kolokalisierten nach 24 h nur marginal in HeLa-Zellen (Abb. 4.28).

Dies könnte auf eine höhere Effizienz des Transports des VP40-Proteins zur Budding site hindeuten. Ob die Interaktion mit den ESCRT-Proteinen dafür verantwortlich ist oder andere Interaktionen bzw. Modifikationen, muss an anderer Stelle noch untersucht werden. Die bessere Akkumulation an der Plasmamembran (Abb. 4.26) könnte aber ein Grund für die effizientere VLP-Produktion (~20 %) des VP40-Proteins (Timmins et al., 2001) gegenüber der des M-Proteins (2-3 %) (Pohl et al., 2007) sein. Im Gegensatz zum VP40-Protein (Bavari et al., 2002) wurde die VLP-Produktion beim M-Protein (Pohl et al., 2007) nicht durch die Koexpression der Glykoproteine erhöht. Dies deutet ebenfalls auf unterschiedliche Mechanismen hin. Die „Transplantation“ einer funktionellen L-Domäne war nicht ausreichend, um das M-Protein-Budding in einen ESCRT-abhängigen Modus zu überführen (Abb. 4.39).

### ***Transfer der PTAPPEY L-Domäne in das M-Protein und anschließende Analysen der Verteilung und der VLP-Produktion***

Die Ähnlichkeit in Position und Sequenz des MV-M (PIQPPTY) mit der PTAPPEY L-Domäne des VP40-Proteins (Abb. 4.32) könnte ein Hinweis auf eine frühere L-Domäne im M-Protein sein, die ihre Fähigkeit, Tsg101 oder Nedd4 zu rekrutieren, verloren hat. Eine vollständige Wiederherstellung der L-Domäne mit Hilfe der Site-directed Mutagenese änderte die intrazelluläre Verteilung der M`PTAPPEY-Mutante gegenüber dem M-Protein nicht (Abb. 4.33). Zudem erhöhte die L-Domäne im M-Protein dessen Assoziation mit der Plasmamembran nicht (Abb. 4.33). Da zwischen dem VP40- und M-Protein zuvor schon keine Unterschiede festgestellt werden konnten, änderte der Transfer der L-Domäne in das M-Protein den Anteil der Lipid Raft

Assoziation nicht (Abb. 4.34). Auch eine Erhöhung der VLP-Produktion des M-Proteins fand nicht statt (Abb. 4.37). Dies ist möglicherweise durch die unveränderte Verteilung des M-Proteins mit seiner mangelnden Effizienz zur Assoziation an die Plasmamembran (gegenüber dem VP40-Protein) bedingt. Auch zeigte die M<sup>Δ</sup>PTAPPEY-Mutante keine Veränderung in der Assoziation mit AP-3, Lamp-1 und den Tetraspaninen CD63 und CD81 (Abb.4.35). Dies waren die Marker, deren Assoziation Unterschiede zwischen dem M- und VP40-Protein zeigten. Auch das Tsg101 konnte nach dem Transfer der L-Domäne nicht zur Budding site rekrutiert werden (Abb. 4.37). Dies steht im Gegensatz zu dem Befund, dass der Transfer derselben L-Domäne in das VSV-M-Protein die Rekrutierung von Tsg101 in virale Partikel und daher sicherlich auch an die Budding site induzierte (Irie et al., 2005).

### ***Abhängigkeit der M<sup>Δ</sup>PTAPPEY-Mutante vom ESCRT-System***

Da die Sensitivität der Virusfreisetzung gegenüber dem dominant negativen Vps4 (Vps4 E228→Q) als entscheidendes Kriterium für eine ESCRT-Beteiligung galt, wurde die VLP-Produktion von M<sup>Δ</sup>PTAPPEY in den 293 T-Zellen, die nach PonasteroneA Induktion stabil Vps4 WT oder Vps4 (E228→Q) exprimierten, untersucht. Die M<sup>Δ</sup>PTAPPEY-Mutante zeigte aber wie das M-Protein in dominant negativen Vps4 exprimierenden Zellen keine Reduzierung der VLP-Produktion. Als Kontrolle dienten VP40-Protein transfizierte 293 T Vps4 E228→Q-Zellen. Im Gegensatz zum M<sup>Δ</sup>PTAPPEY verringerte sich die VLP-Produktion beim VP40-Protein in den dominant negativen Zellen um 45 %. Dies stand im Einklang mit der Studie von Kolesnikova, die ebenfalls eine Reduktion der VP40 (EBOV) produzierten VLPs im Überstand um 50 % zeigte (Kolesnikova et al., 2009). In einer anderen Studie zeigte sich, dass die VLP-Produktion bis zu 80 % reduziert war (Silvestri et al., 2007).

### ***Einfluss der flankierenden Sequenzen***

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Interaktion des M-Proteins mit dem ESCRT-System, trotz eines PTAPPEY-Transfers, könnten die flankierenden Sequenzen sein, die sich suboptimal auf die Domäne auswirken könnten (Irie et al., 2005, Pornillos et al. 2002).

Ein Beispiel für die Bedeutung der flankierenden Sequenzen zeigt sich in einer Studie über das VSV-M-Protein (Irie and Harty, 2005). Dieses besitzt ein PSAP-Motiv, das aber nicht als funktionale L-Domäne agiert, da ein Ersatz des Motivs durch vier Alanine keinen Einfluss auf die Freisetzung des Virus hat. Auch eine Mutation zu einem PTAP-Motiv zeigte keine Veränderung und konnte auch nicht den Freisetzungsdefekt der PPPY-Mutante (PPPY stellt die funktionelle L-Domäne des VSV dar) kompensieren (Irie et al., 2005). Der Transfer der PTAP L-Domäne mit den flankierenden Sequenzen des HIV p6-Proteins dagegen konnte den Freisetzungsdefekt der PPPY-Mutante kompensieren (Irie and Harty, 2005). Eine Studie von Ciancanelli dagegen zeigt, dass der alleinige Transfer der YMFL Nipah L-Domäne den Freisetzungsdefekt des VP40-Proteins, dessen PTAPPEY Domäne deletiert war, kompensieren konnte (Ciancanelli et al., 2006).

## 6 Zusammenfassung

Die Matrix-Proteine von Vertretern der Ordnung *Mononegavirales* sind essentiell für späte Schritte im viralen Lebenszyklus, insbesondere der Knospung und Partikelmorphogenese. Die Abschnürung und Freisetzung umhüllter RNA-Viren ist dabei abhängig von dem Transport des viralen Matrix-Proteins und seiner Interaktion mit Wirtsproteinen wie dem ESCRT-System ("endosomal sorting complex required for transport"), welches in die Sortierung zellulärer Proteine involviert ist. Im Verlauf der Masernvirus (MV)-Infektion interagiert das M-Protein einerseits mit dem viralen Nukleoproteinkomplex und andererseits mit den viralen Glykoproteinen an der Oberfläche. Die Bedeutung des MV-M-Proteins für die Partikelproduktion und sein intrazellulärer Transport wurden bislang kaum untersucht. Bisher ist nur bekannt, dass das M-Protein oligomerisiert, teilweise monoubiquitiniert vorliegt und in Zellen, wenn alleine exprimiert, die Produktion von Virus-like-particle (VLP) vermittelt (Pohl et al., 2007).

In dieser Studie wird gezeigt, dass das MV-M-Protein ähnlich wie das VP40-Protein des Ebolavirus (EBOV) mit Lipid Rafts und TEMs ("tetraspanin enriched microdomain") assoziiert ist, wobei aber das M-Protein weniger effizient an der Plasmamembran akkumuliert. Beide Proteine unterscheiden sich nicht wesentlich in ihrer Assoziation mit Kompartimentmarkern. Interessant ist jedoch, dass das VP40-Protein und das M-Protein an der Plasmamembran mit dem Adaptor Protein-3 (AP-3) kolokalisieren. Die Kolokalisation des M-Proteins mit AP-3 wird aber nur in infizierten Zellen und nicht in Zellen, in denen das M-Protein allein exprimiert wird, beobachtet.

Im Gegensatz zum VP40-Protein, welches die ESCRT-Komponenten über seine N-terminale L-Domäne rekrutiert und diese für die Partikelproduktion benutzt, geschieht dies beim M-Protein ESCRT-unabhängig, da die Mutation der Motive, die Ähnlichkeiten zu den bekannten L-Domänen zeigen, keine Auswirkungen auf die VLP-Produktion haben. Zudem rekrutierte das M-Protein weder Tsg101, Aip-1 oder Vps4 an die Plasmamembran, noch wird die VLP- oder die Virusproduktion durch dominant negatives Vps4 inhibiert.

Der Transfer der VP40 L-Domäne in das MV-M-Protein hatte weder einen Einfluss auf die Assoziation mit Tetraspaninen noch auf die ESCRT-Abhängigkeit der VLP-Produktion. Damit wurde gezeigt, dass die VLP-Freisetzung des MV-M-Proteins ESCRT-unabhängig ist. Die Freisetzung

erfolgt beim MV durch einen grundsätzlich anderen Weg, der noch untersucht werden muss.

## 7 Summary

The matrix proteins of the order *Mononegavirales* are essential for late steps in the viral life cycle, especially for budding process and viral morphogenesis. Budding and release of enveloped RNA-viruses depend on transport of the viral matrix protein and its interaction with host proteins, which are involved in sorting of cellular proteins, e.g. the ESCRT system.

During the course of measles virus infection, the M-protein interacts with the viral nucleocapsid-complex and the viral glycoproteins.

The impact of MV-M-protein for the particle production and intracellular transport is barely known yet. So far, it has been shown that the M-protein forms oligomers, is partially mono-ubiquitinated and has the capability to promote VLP-production.

In this study it could be shown that the MV-M-protein and EBOV-VP40-protein associate with detergent-resistant and tetraspanin-enriched microdomains. However, compared to the VP40-protein the M-protein accumulates less efficiently at the plasma membrane. Both proteins do not essentially vary in their association with compartment markers. Interestingly, VP40- and M-protein, the latter only when expressed in the context of MV infection (but not from plasmid), efficiently co-localised with adaptor protein 3 (AP-3) at the plasma membrane indicating its importance for membrane targeting.

In contrast to VP40, which recruits ESCRT components via its N-terminal late (L) domain and exploits them for particle production, M-protein promotes particle production independently of this pathway since 1) ablation of motifs bearing similarity to canonical L domains did not affect VLP production, 2) it did not redistribute Tsg101, AIP-1, or Vps4 to the plasma membrane, and 3) neither VLP nor infectious virus production were sensitive to inhibition by dominant negative Vps4. In addition, transfer of the VP40 L domain into the MV-M-protein did not alter trafficking or ESCRT dependence for VLP production to that of VP40 suggesting that budding activity of MV-M-protein follows an ESCRT independent pathway.

## 8 Literaturverzeichnis

Alroy, I., Tuvia, S., Greener, T., Gordon, D., Barr, H. M., Taglicht, D., Mandil-Levin, R., Ben-Avraham, D., Konforty, D., Nir, A., et al. (2005).

The trans-Golgi network-associated human ubiquitin-protein ligase POSH is essential for HIV type 1 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1478-1483.

Arneborn, P., and Biberfeld, G. (1983).

T-lymphocyte subpopulations in relation to immunosuppression in measles and varicella. *Infect Immun* 39, 29-37.

Avota, E., Avots, A., Niewiesk, S., Kane, L. P., Bommhardt, U., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2001). Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat Med* 7, 725-731.

Ayata, M., Hirano, A., and Wong, T. C. (1989). Structural defect linked to nonrandom mutations in the matrix gene of biken strain subacute sclerosing panencephalitis virus defined by cDNA cloning and expression of chimeric genes. *J Virol* 63, 1162-1173.

Babst, M. (2005). A protein's final ESCRT. *Traffic* 6, 2-9.

Babst, M., Odorizzi, G., Estepa, E. J., and Emr, S. D. (2000). Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking. *Traffic* 1, 248-258.

Baczko, K., Lampe, J., Liebert, U. G., Brinckmann, U., ter Meulen, V., Pardowitz, I., Budka, H., Cosby, S. L., Isserte, S., and Rima, B. K. (1993). Clonal expansion of hypermutated measles virus in a SSPE brain. *Virology* 197, 188-195.

Banerjee, A. K. (1987). The transcription complex of vesicular stomatitis virus. *Cell* 48, 363-364.

Banerjee, A. K., and Barik, S. (1992). Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. *Virology* 188, 417-428.

Bavari, S., Bosio, C. M., Wiegand, E., Ruthel, G., Will, A. B., Geisbert, T. W., Hevey, M., Schmaljohn, C., Schmaljohn, A., and Aman, M. J. (2002). Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med* 195, 593-602.

Bellini, W. J., Englund, G., Rozenblatt, S., Arnheiter, H., and Richardson, C. D. (1985). Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* 53, 908-919.

Bellini, W. J., Rota, J. S., and Rota, P. A. (1994). Virology of measles virus. *J Infect Dis* 170 Suppl 1, S15-23.

Berditchevski, F., and Odintsova, E. (2007). Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic* 8, 89-96.

Bieniasz, P. D. (2006). Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344, 55-63.

Billeter, M. A., Cattaneo, R., Spielhofer, P., Kaelin, K., Huber, M., Schmid, A., Bacsko, K., and ter Meulen, V. (1994). Generation and properties of measles virus mutations typically associated with subacute sclerosing panencephalitis. *Ann N Y Acad Sci* 724, 367-377.

Bishop, N., and Woodman, P. (2000). ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking. *Mol Biol Cell* 11, 227-239.

Blumberg, B. M., Leppert, M., and Kolakofsky, D. (1981). Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell* 23, 837-845.

Bolt, G., and Pedersen, I. R. (1998). The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types. *Virology* 252, 387-398.



Bosio, C. M., Moore, B. D., Warfield, K. L., Ruthel, G., Mohamadzadeh, M., Aman, M. J., and Bavari, S. (2004). Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells. *Virology* 326, 280-287.

Bossart, K. N., Wang, L. F., Flora, M. N., Chua, K. B., Lam, S. K., Eaton, B. T., and Broder, C. C. (2002). Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the Nipah virus and Hendra virus envelope glycoproteins. *J Virol* 76, 11186-11198.

Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58, 1189-1205.

Bowers, K., Lottridge, J., Helliwell, S. B., Goldthwaite, L. M., Luzio, J. P., and Stevens, T. H. (2004). Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 5, 194-210.

Briggs, J. A., Wilk, T., and Fuller, S. D. (2003). Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping? *J Gen Virol* 84, 757-768.

Brown, D. A., and London, E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275, 17221-17224.

Bruce, E. A., Medcalf, L., Crump, C. M., Noton, S. L., Stuart, A. D., Wise, H. M., Elton, D., Bowers, K., and Digard, P. (2009). Budding of filamentous and non-filamentous influenza A virus occurs via a VPS4 and VPS28-independent pathway. *Virology* 390, 268-278.

Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. T., and Krausslich, H. G. (2006). The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2641-2646.

Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M. A., and Cattaneo, R. (1998a). A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *Embo J* 17, 3899-3908.

Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M. A., and Cattaneo, R. (1998b). A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *Embo J* 17, 3899-3908.

Cathomen, T., Naim, H. Y., and Cattaneo, R. (1998b). Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol* 72, 1224-1234.

Cathomen, T., Naim, H. Y., and Cattaneo, R. (1998a). Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol* 72, 1224-1234.

Cattaneo, R., Kaelin, K., Bacsko, K., and Billeter, M. A. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56, 759-764.

Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Bacsko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M. A. (1987). Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *Embo J* 6, 681-688.

Cattaneo, R., Schmid, A., Billeter, M. A., Sheppard, R. D., and Udem, S. A. (1988). Multiple viral mutations rather than host factors cause defective measles virus gene expression in a subacute sclerosing panencephalitis cell line. *J Virol* 62, 1388-1397.

Chong, L. D., and Rose, J. K. (1993). Membrane association of functional vesicular stomatitis virus matrix protein in vivo. *J Virol* 67, 407-414.

Ciancanelli, M. J., and Basler, C. F. (2006). Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. *J Virol* 80, 12070-12078.

Clark, R. H., Stinchcombe, J. C., Day, A., Blott, E., Booth, S., Bossi, G., Hamblin, T., Davies, E. G., and Griffiths, G. M. (2003). Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat Immunol* 4, 1111-1120.

Connolly, J. H., Allen, I. V., Hurwitz, L. J., and Millar, J. H. (1967). Measles-virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet* 1, 542-544.

Connolly, J. H., Haire, M., and Hadden, D. S. (1971). Measles immunoglobulins in subacute sclerosing panencephalitis. *Br Med J* 1, 23-25.

Coronel, E. C., Murti, K. G., Takimoto, T., and Portner, A. (1999). Human parainfluenza virus type 1 matrix and nucleoprotein genes transiently expressed in mammalian cells induce the release of virus-like particles containing nucleocapsid-like structures. *J Virol* 73, 7035-7038.

Craven, R. C., Harty, R. N., Paragas, J., Palese, P., and Wills, J. W. (1999). Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras. *J Virol* 73, 3359-3365.

Crowley, J. C., Dowling, P. C., Menonna, J., Silverman, J. I., Schuback, D., Cook, S. D., and Blumberg, B. M. (1988). Sequence variability and function of measles virus 3' and 5' ends and intercistronic regions. *Virology* 164, 498-506.

de Swart, R. L., Ludlow, M., de Witte, L., Yanagi, Y., van Amerongen, G., McQuaid, S., Yuksel, S., Geijtenbeek, T. B., Duprex, W. P., and Osterhaus, A. D. (2007). Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* 3, e178.

Demirov, D. G., and Freed, E. O. (2004). Retrovirus budding. *Virus Res* 106, 87-102.

Demirov, D. G., Ono, A., Orenstein, J. M., and Freed, E. O. (2002). Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 955-960.

Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E., and Marsh, M. (2007). In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol* 177, 329-341.

Ding, L., Derdowski, A., Wang, J. J., and Spearman, P. (2003). Independent segregation of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein complexes and lipid rafts. *J Virol* 77, 1916-1926.

Dong, J. B., Saito, A., Mine, Y., Sakuraba, Y., Nibe, K., Goto, Y., Komase, K., Nakayama, T., Miyata, H., Iwata, H., and Haga, T. (2009). Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness. *Virus Genes*.

Dong, X., Li, H., Derdowski, A., Ding, L., Burnett, A., Chen, X., Peters, T. R., Dermody, T. S., Woodruff, E., Wang, J. J., and Spearman, P. (2005). AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* 120, 663-674.

Erlenhoef, C., Wurzer, W. J., Loffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (2001). CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* 75, 4499-4505.

Fraile-Ramos, A., Pelchen-Matthews, A., Risco, C., Rejas, M. T., Emery, V. C., Hassan-Walker, A. F., Esteban, M., and Marsh, M. (2007). The ESCRT machinery is not required for human cytomegalovirus envelopment. *Cell Microbiol* 9, 2955-2967.

Freed, E. O. (2002). Viral late domains. *J Virol* 76, 4679-4687.

Freed, E. O. (2003). The HIV-TSG101 interface: recent advances in a budding field. *Trends Microbiol* 11, 56-59.

Freed, E. O., and Mouland, A. J. (2006). The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* 3, 77.

Furukawa, K., Ayata, M., Kimura, M., Seto, T., Matsunaga, I., Murata, R., Yamano, T., and Ogura, H. (2001). Hemadsorption expressed by cloned H genes from subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) viruses and their possible progenitor measles viruses isolated in Osaka, Japan. *Microbiol Immunol* 45, 59-68.

Garcia, E., Nikolic, D. S., and Piguet, V. (2008). HIV-1 replication in dendritic cells occurs through a tetraspanin-containing compartment enriched in AP-3. *Traffic* 9, 200-214.

Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J. F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J. M., Demaurex, N., Marsh, M., and Piguet, V. (2005). HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* 6, 488-501.

Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L., et al. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55-65.

Gombart, A. F., Hirano, A., and Wong, T. C. (1993). Conformational maturation of measles virus nucleocapsid protein. *J Virol* 67, 4133-4141.

Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3195-3199.

Gottwein, E., Bodem, J., Muller, B., Schmechel, A., Zentgraf, H., and Krausslich, H. G. (2003). The Mason-Pfizer monkey virus PPPY and PSAP motifs both contribute to virus release. *J Virol* 77, 9474-9485.

Greenstein, J. I., and McFarland, H. F. (1983). Response of human lymphocytes to measles virus after natural infection. *Infect Immun* 40, 198-204.

Griffin, D. E. (1996). measles virus).

Griffin, D. E. (2001). measles virus).

Gruenberg, J., and Maxfield, F. R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7, 552-563.

Harder, T. C., and Osterhaus, A. D. (1997). Canine distemper virus--a morbillivirus in search of new hosts? *Trends Microbiol* 5, 120-124.

Harty, R. N., Brown, M. E., Wang, G., Huibregtse, J., and Hayes, F. P. (2000). A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13871-13876.

Hemler, M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 801-811.

Horikami, S. M., and Moyer, S. A. (1995). Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 35-50.

Hu, A., Cathomen, T., Cattaneo, R., and Norrby, E. (1995). Influence of N-linked oligosaccharide chains on the processing, cell surface expression and function of the measles virus fusion protein. *J Gen Virol* 76 ( Pt 3), 705-710.

Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A., and Freed, E. O. (1995). p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* 69, 6810-6818.

Huang, S. C., Chang, C. L., Wang, P. S., Tsai, Y., and Liu, H. S. (2009). Enterovirus 71-induced autophagy detected in vitro and in vivo promotes viral replication. *J Med Virol* 81, 1241-1252.

Irie, T., and Harty, R. N. (2005). L-domain flanking sequences are important for host interactions and efficient budding of vesicular stomatitis virus recombinants. *J Virol* 79, 12617-12622.

Irie, T., Licata, J. M., and Harty, R. N. (2005). Functional characterization of Ebola virus L-domains using VSV recombinants. *Virology* 336, 291-298.

Imhoff, H., von Messling, V., Herrler, G., and Haas, L. (2007). Canine distemper virus infection requires cholesterol in the viral envelope. *J Virol* 81, 4158-4165.

Jasenosky, L. D., and Kawaoka, Y. (2004). Filovirus budding. *Virus Res* 106, 181-188.

Jayakar, H. R., Murti, K. G., and Whitt, M. A. (2000). Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release. *J Virol* 74, 9818-9827.

Johnson, M. C., Spidel, J. L., Ako-Adjei, D., Wills, J. W., and Vogt, V. M. (2005). The C-terminal half of TSG101 blocks Rous sarcoma virus budding and sequesters Gag into unique nonendosomal structures. *J Virol* 79, 3775-3786.

Jolly, C., and Sattentau, Q. J. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J Virol* 81, 7873-7884.

Joshi, S. B., Dutch, R. E., and Lamb, R. A. (1998). A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology* 248, 20-34.

Justice, P. A., Sun, W., Li, Y., Ye, Z., Grigera, P. R., and Wagner, R. R. (1995). Membrane vesiculation function and exocytosis of wild-type and mutant matrix proteins of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 69, 3156-3160.

Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145-155.

Kawada, S., Goto, T., Haraguchi, H., Ono, A., and Morikawa, Y. (2008). Dominant negative inhibition of human immunodeficiency virus particle production by the nonmyristoylated form of gag. *J Virol* 82, 4384-4399.

Khurana, S., Krementsov, D. N., de Parseval, A., Elder, J. H., Foti, M., and Thali, M. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 and influenza virus exit via different membrane microdomains. *J Virol* 81, 12630-12640.

Kolesnikova, L., Bamberg, S., Berghofer, B., and Becker, S. (2004a). The matrix protein of Marburg virus is transported to the plasma membrane along cellular membranes: exploiting the retrograde late endosomal pathway. *J Virol* 78, 2382-2393.

Kolesnikova, L., Berghofer, B., Bamberg, S., and Becker, S. (2004b). Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope. *J Virol* 78, 12277-12287.

Kolesnikova, L., Bugany, H., Klenk, H. D., and Becker, S. (2002). VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment. *J Virol* 76, 1825-1838.

Kolesnikova, L., Strecker, T., Morita, E., Zielecki, F., Mittler, E., Crump, C., and Becker, S. (2009). Vacuolar protein sorting pathway contributes to the release of Marburg virus. *J Virol* 83, 2327-2337.

Krementsov, D. N., Weng, J., Lambele, M., Roy, N. H., and Thali, M. (2009). Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1. *Retrovirology* 6, 64.

Kyei, G. B., Dinkins, C., Davis, A. S., Roberts, E., Singh, S. B., Dong, C., Wu, L., Kominami, E., Ueno, T., Yamamoto, A., et al. (2009). Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol* 186, 255-268.

Laliberte, J. P., McGinnes, L. W., Peebles, M. E., and Morrison, T. G. (2006). Integrity of membrane lipid rafts is necessary for the ordered assembly and release of infectious Newcastle disease virus particles. *J Virol* 80, 10652-10662.

Lamb, R. A., Kolakofsky (1996). *Paramyxoviridae: The viruses and their replication* (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers).

Li, F., Chen, C., Puffer, B. A., and Montelaro, R. C. (2002). Functional replacement and positional dependence of homologous and heterologous L domains in equine infectious anemia virus replication. *J Virol* 76, 1569-1577.



- Licata, J. M., Simpson-Holley, M., Wright, N. T., Han, Z., Paragas, J., and Harty, R. N. (2003). Overlapping motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola virus VP40 protein function independently as late budding domains: involvement of host proteins TSG101 and VPS-4. *J Virol* 77, 1812-1819.
- Luban, J. (2001). HIV-1 and Ebola virus: the getaway driver nabbed. *Nat Med* 7, 1278-1280.
- Lund, G. A., Tyrrell, D. L., Bradley, R. D., and Scraba, D. G. (1984). The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids. *J Gen Virol* 65 ( Pt 9), 1535-1542.
- Manie, S. N., de Breyne, S., Vincent, S., and Gerlier, D. (2000). Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J Virol* 74, 305-311.
- Martin-Serrano, J., Perez-Caballero, D., and Bieniasz, P. D. (2004). Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J Virol* 78, 5554-5563.
- Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D., and Bieniasz, P. D. (2003a). Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12414-12419.
- Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P. D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7, 1313-1319.
- Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P. D. (2003b). Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol* 77, 4794-4804.
- McNeill (1976). *Plagues and People*. Garden City, NJ, Anchor Press/Doubleday,, 329.

Medvedev, A. E., Henneke, P., Schromm, A., Lien, E., Ingalls, R., Fenton, M. J., Golenbock, D. T., and Vogel, S. N. (2001). Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol* 167, 2257-2267.

Mizui, T., Yamashina, S., Tanida, I., Takei, Y., Ueno, T., Sakamoto, N., Ikejima, K., Kitamura, T., Enomoto, N., Sakai, T., et al. (2009). Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol*.

Moll, M., Klenk, H. D., and Maisner, A. (2002). Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses. *J Virol* 76, 7174-7186.

Morita, E., and Sundquist, W. I. (2004). Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 395-425.

Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377-388.

Murray, C. J., and Lopez, A. D. (1997). Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349, 1436-1442.

Murray, J. L., Mavrakis, M., McDonald, N. J., Yilla, M., Sheng, J., Bellini, W. J., Zhao, L., Le Doux, J. M., Shaw, M. W., Luo, C. C., et al. (2005). Rab9 GTPase is required for replication of human immunodeficiency virus type 1, filoviruses, and measles virus. *J Virol* 79, 11742-11751.

Nayak, D. P., Hui, E. K., and Barman, S. (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* 106, 147-165.

Newell-Litwa, K., Seong, E., Burmeister, M., and Faundez, V. (2007). Neuronal and non-neuronal functions of the AP-3 sorting machinery. *J Cell Sci* 120, 531-541.

Nozawa, Y., Ono, N., Abe, M., Sakuma, H., and Wakasa, H. (1994). An immunohistochemical study of Warthin-Finkeldey cells in measles. *Pathol Int* 44, 442-447.

Nydegger, S., Khurana, S., Kremmentsov, D. N., Foti, M., and Thali, M. (2006). Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol* 173, 795-807.

Ogura, H., Sato, H., Kamiya, S., and Nakamura, S. (1991). Glycosylation of measles virus haemagglutinin protein in infected cells. *J Gen Virol* 72 ( Pt 11), 2679-2684.

Okada, H., Sato, T. A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., and Tashiro, M. (2001). Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol* 146, 859-874.

Ono, A., and Freed, E. O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13925-13930.

Ono, A., and Freed, E. O. (2005). Role of lipid rafts in virus replication. *Adv Virus Res* 64, 311-358.

Ott, D. E., Coren, L. V., Sowder, R. C., 2nd, Adams, J., and Schubert, U. (2003). Retroviruses have differing requirements for proteasome function in the budding process. *J Virol* 77, 3384-3393.

Panchal, R. G., Ruthel, G., Kenny, T. A., Kallstrom, G. H., Lane, D., Badie, S. S., Li, L., Bavari, S., and Aman, M. J. (2003). In vivo oligomerization and raft localization of Ebola virus protein VP40 during vesicular budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15936-15941.

Parent, L. J., Bennett, R. P., Craven, R. C., Nelle, T. D., Krishna, N. K., Bowzard, J. B., Wilson, C. B., Puffer, B. A., Montelaro, R. C., and Wills, J. W. (1995). Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J Virol* 69, 5455-5460.

Patnaik, A., Chau, V., and Wills, J. W. (2000). Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13069-13074.

Peden, A. A., Oorschot, V., Hesser, B. A., Austin, C. D., Scheller, R. H., and Klumperman, J. (2004). Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *J Cell Biol* 164, 1065-1076.

Pelchen-Matthews, A., Raposo, G., and Marsh, M. (2004). Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* 12, 310-316.

Permar, S. R., Moss, W. J., Ryon, J. J., Douek, D. C., Monze, M., and Griffin, D. E. (2003). Increased thymic output during acute measles virus infection. *J Virol* 77, 7872-7879.

Pierce, S. K. (2004). To cluster or not to cluster: FRETting over rafts. *Nat Cell Biol* 6, 180-181.

Plempner, R. K., Hammond, A. L., Gerlier, D., Fielding, A. K., and Cattaneo, R. (2002). Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *J Virol* 76, 5051-5061.

Pohl, C., Duprex, W. P., Krohne, G., Rima, B. K., and Schneider-Schaulies, S. (2007). Measles virus M and F proteins associate with detergent-resistant membrane fractions and promote formation of virus-like particles. *J Gen Virol* 88, 1243-1250.

Pornillos, O., Alam, S. L., Davis, D. R., and Sundquist, W. I. (2002a). Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nat Struct Biol* 9, 812-817.

Pornillos, O., Alam, S. L., Rich, R. L., Myszka, D. G., Davis, D. R., and Sundquist, W. I. (2002b). Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *Embo J* 21, 2397-2406.

Pornillos, O., Garrus, J. E., and Sundquist, W. I. (2002c). Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol* 12, 569-579.

Puffer, B. A., Parent, L. J., Wills, J. W., and Montelaro, R. C. (1997). Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J Virol* 71, 6541-6546.

Raiborg, C., Rusten, T. E., and Stenmark, H. (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 15, 446-455.

Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445-452.

Reuter, T., Weissbrich, B., Schneider-Schaulies, S., and Schneider-Schaulies, J. (2006). RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *J Virol* 80, 5951-5957.

Richardson, C. D., Scheid, A., and Choppin, P. W. (1980). Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology* 105, 205-222.

Riedl, P., Moll, M., Klenk, H. D., and Maisner, A. (2002). Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. *Virus Res* 83, 1-12.

Riley, E. C., Murphy, G., and Riley, R. L. (1978). Airborne spread of measles in a suburban elementary school. *Am J Epidemiol* 107, 421-432.

Rima, B. K., and Duprex, W. P. (2005). Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res* 111, 132-147.

Rima, B. K., Earle, J. A., Baczko, K., Rota, P. A., and Bellini, W. J. (1995). Measles virus strain variations. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 65-83.

Robbins, S. J., Fenimore, J. A., and Bussell, R. H. (1980). Structural phosphoproteins associated with measles virus nucleocapsids from persistently infected cells. *J Gen Virol* 48, 445-449.

Rocca, A., Lamaze, C., Subtil, A., and Dautry-Varsat, A. (2001). Involvement of the ubiquitin/proteasome system in sorting of the interleukin 2 receptor beta chain to late endocytic compartments. *Mol Biol Cell* 12, 1293-1301.

Ruiz-Mateos, E., Pelchen-Matthews, A., Deneka, M., and Marsh, M. (2008). CD63 is not required for production of infectious human immunodeficiency virus type 1 in human macrophages. *J Virol* 82, 4751-4761.

Runkler, N., Pohl, C., Schneider-Schaulies, S., Klenk, H. D., and Maisner, A. (2007). Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiol* 9, 1203-1214.

Russell, R., Paterson, R. G., and Lamb, R. A. (1994). Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology* 199, 160-168.

Samuel, O., and Shai, Y. (2001a). Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry* 40, 1340-1349.

Sato, K., Aoki, J., Misawa, N., Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y., and Koyanagi, Y. (2008). Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol* 82, 1021-1033.

Sato, T. A., Kohama, T., and Sugiura, A. (1988). Intracellular processing of measles virus fusion protein. *Arch Virol* 98, 39-50.

Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T., and Simons, K. (1999). Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem* 274, 2038-2044.

Schlender, J., Schnorr, J. J., Spielhoffer, P., Cathomen, T., Cattaneo, R., Billeter, M. A., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (1996). Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13194-13199.

Schmitt, A. P., Leser, G. P., Morita, E., Sundquist, W. I., and Lamb, R. A. (2005). Evidence for a new viral late-domain core sequence, FPIV, necessary for budding of a paramyxovirus. *J Virol* 79, 2988-2997.

Schmitt, B. (2002). Vesicular stomatitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 18, 453-459, vii-viii.

Schneider-Schaulies, S., Kreth, H. W., Hofmann, G., Billeter, M., and Ter Meulen, V. (1991). Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. *Virology* 182, 703-711.

Schneider-Schaulies, S., Liebert, U. G., Baczko, K., Cattaneo, R., Billeter, M., and ter Meulen, V. (1989). Restriction of measles virus gene expression in acute and subacute encephalitis of Lewis rats. *Virology* 171, 525-534.

Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G., and Yewdell, J. W. (2000). Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13057-13062.

Sergiev, P. G., Shroit, I. G., and Riazantseva, N. E. (1963). [Experimental study of the pathogenesis of measles.]. *Pediatrics* 42, 28-35.

Shoham, T., Rajapaksa, R., Kuo, C. C., Haimovich, J., and Levy, S. (2006). Building of the tetraspanin web: distinct structural domains of CD81 function in different cellular compartments. *Mol Cell Biol* 26, 1373-1385.

Silvestri, L. S., Ruthel, G., Kallstrom, G., Warfield, K. L., Swenson, D. L., Nelle, T., Iversen, P. L., Bavari, S., and Aman, M. J. (2007). Involvement of vacuolar protein sorting pathway in Ebola virus release independent of TSG101 interaction. *J Infect Dis* 196 Suppl 2, S264-270.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.

Spielhofer, P., Bachi, T., Fehr, T., Christiansen, G., Cattaneo, R., Kaelin, K., Billeter, M. A., and Naim, H. Y. (1998). Chimeric measles viruses with a foreign envelope. *J Virol* 72, 2150-2159.

Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E., and Gottlinger, H. G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689-699.

Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Dieter Klenk, H., Garten, W., and Lenz, O. (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J Virol* 77, 10700-10705.

Stuchell, M. D., Garrus, J. E., Muller, B., Stray, K. M., Ghaffarian, S., McKinnon, R., Krausslich, H. G., Morham, S. G., and Sundquist, W. I. (2004). The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem* 279, 36059-36071.

Suryanarayana, K., Baczko, K., ter Meulen, V., and Wagner, R. R. (1994). Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol* 68, 1532-1543.



Tahara, M., Takeda, M., and Yanagi, Y. (2005). Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J Virol* 79, 15218-15225.

Tajima, M., and Kudow, S. (1976). Morphology of the Warthin-Finkeldey giant cells in monkeys with experimentally induced measles. *Acta Pathol Jpn* 26, 367-380.

Takasu, T., Mgone, J. M., Mgone, C. S., Miki, K., Komase, K., Namae, H., Saito, Y., Kokubun, Y., Nishimura, T., Kawanishi, R., et al. (2003). A continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Epidemiol Infect* 131, 887-898.

Takeda, M., Leser, G. P., Russell, C. J., and Lamb, R. A. (2003). Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14610-14617.

Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F., and Akira, S. (2000). Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164, 554-557.

Takimoto, T., and Portner, A. (2004). Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res* 106, 133-145.

Tanzi, G. O., Piefer, A. J., and Bates, P. (2003). Equine infectious anemia virus utilizes host vesicular protein sorting machinery during particle release. *J Virol* 77, 8440-8447.

Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. (2000). [The cellular receptor for measles virus: SLAM (CDw 150)]. *Uirusu* 50, 289-296.

Taylor, M. P., Burgon, T. B., Kirkegaard, K., and Jackson, W. T. (2009). Role of microtubules in extracellular release of poliovirus. *J Virol* 83, 6599-6609.

Timmins, J., Scianimanico, S., Schoehn, G., and Weissenhorn, W. (2001). Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40. *Virology* 283, 1-6.

VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T. J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J., and Carter, C. A. (2001). Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7724-7729.

Vincent, S., Gerlier, D., and Manie, S. N. (2000). Measles virus assembly within membrane rafts. *J Virol* 74, 9911-9915.

Visser, I. K., Van Bresseem, M. F., de Swart, R. L., van de Bildt, M. W., Vos, H. W., van der Heijden, R. W., Saliki, J. T., Orvell, C., Kitching, P., Kuiken, T., and et al. (1993). Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. *J Gen Virol* 74 ( Pt 4), 631-641.

Watanabe, M., Wang, A., Sheng, J., Gombart, A. F., Ayata, M., Ueda, S., Hirano, A., and Wong, T. C. (1995). Delayed activation of altered fusion glycoprotein in a chronic measles virus variant that causes subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol* 1, 177-188.

Wild, T. F. (1995). *Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins* (Berlin, Springer Verlag).

Wild, T. F., Malvoisin, E., and Buckland, R. (1991). Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol* 72 ( Pt 2), 439-442.

Wild, T. F., Nanche, D., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D., Malvoisin, E., Lecouturier, V., and Buckland, R. (1995). Mode of entry of morbilliviruses. *Vet Microbiol* 44, 267-270.

Wileman, T. (2006). Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science* 312, 875-878.

Xiang, Y., Cameron, C. E., Wills, J. W., and Leis, J. (1996). Fine mapping and characterization of the Rous sarcoma virus Pr76gag late assembly domain. *J Virol* 70, 5695-5700.

Yanagi, Y., Cubitt, B. A., and Oldstone, M. B. (1992). Measles virus inhibits mitogen-induced T cell proliferation but does not directly perturb the T cell activation process inside the cell. *Virology* 187, 280-289.

Yuan, B., Campbell, S., Bacharach, E., Rein, A., and Goff, S. P. (2000). Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses. *J Virol* 74, 7250-7260.

Zhou, Z., Jiang, X., Liu, D., Fan, Z., Hu, X., Yan, J., Wang, M., and Gao, G. F. (2009). Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy* 5, 321-328.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
ATV	Adjusted Trypsin Versene
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CPE	cytopathic effect
Da	Dalton
DCs	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRM	Detergenz-resistente Membranmikrodomänen
E	Glutaminsäure
EBOV	Ebolavirus
E.coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
ED	Edmonston
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal complex required for transport</i> , Protein-Komplex, der an der Sortierung von Proteinen für den endosomalen Transport beteiligt ist
F	Phenylalanin
FACS	fluorescence-activated cell sorter, Durchflusszytometer
FIP	fusioninhibitorisches Peptid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
F-Protein	Fusionsprotein
h	Stunde(n)
H-Protein	Hämagglutinin-Protein
I	Isoleucin
K	Lysin
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid

---

M	Molar
m	Milli-
μ	Mikro-
MARV	Marburgvirus
mAk	monoklonaler Antikörper
MIBE	<i>measles inclusion body encephalitis</i> , Einschlusskörperchen-Enzephalitis
min.	Minute
MOI	Multiplicity of infection
M-Protein	Matrix-Protein
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MV	Masernvirus
<i>MVB</i>	<i>multivesicular body</i> , multivesikuläres Körperchen
N-Protein	Nukleokapsidprotein
OD	optische Dichte
P	Prolin
PBS	phosphate-buffered saline
PIE	postinfektiöse Enzephalitis
PFA	Paraformaldehyd
PFU	plaque forming unit
P-Protein	Phosphoprotein
Q	Glutamin
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin
SDS	Natrium ( <i>Sodium</i> )-Dodecylsulfat
SLAM	signaling lymphocyte activation molecule, CD150
SSPE	subakute sklerotisierende Panenzephalitis
T	Threonin
TCID <sub>50</sub>	tissue culture infection dose 50
TLR	Toll-like-receptor
ü.N.	über Nacht
V	Valin
VLP	<i>Virus-like particle</i> , Virus-ähnliches Partikel

Vps	<i>vacuolar protein sorting</i> , Vakuoläre Proteinsortierung
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i> , Virus der vesikulären Stomatitis
x	eine beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin

## 10 Veröffentlichungen

### 10.1 Publikationen

Salditt Andreas, Susanne Koethe, Christine Pohl, Harry Harms, Larissa Kolesnikova, Stephan Becker and Sibylle Schneider-Schaulies

“Measles virus M protein driven particle production does not involve the ESCRT system”

J. Gen. Virol., accepted.

### 10.2 Vorträge und Posterpräsentationen

2006 Teilnahme an der Jahrestagung der Society for General Microbiology in Warwick mit Präsentation

“Cell type specific trafficking of measles virus matrix protein”

(Lehmann, C., Salditt, A., Duprex, P., Rima, B. K., Schneider-Schaulies, S).

2006 Teilnahme am Annual Meeting GFV in München und Posterpräsentation mit dem Titel

“Cell type specific trafficking of measles virus matrix protein”.

2006 Teilnahme am XVI. Measles Meeting in Würzburg mit der Präsentation „MV matrix protein: potential L-domains and cellular effector proteins”.

2007 Teilnahme am XVII. Measles Meeting in Würzburg mit der Präsentation „The role of the MV M protein in viral assembly and release “.

2008 Teilnahme an der Jahrestagung der Society for General Microbiology in Edinburg und Posterpräsentation mit dem Titel

„MV matrix protein: potential L-domains and cellular effector proteins”.

2008 Teilnahme am Annual Meeting GFV in Heidelberg und Posterpräsentation mit dem Titel

„Towards identification of domains within the MV M protein functionally required for particle release”.

2008 Teilnahme am XVIII. Measles Meeting in Würzburg mit der Präsentation

„The role of the MV M protein in viral assembly and release“.

2009 Teilnahme am Annual Meeting GFV in Leipzig und Posterpräsentation mit dem Titel

„Measles virus particle formation is independent of the ESCRT system“.

2009 Teilnahme am XVIII. Measles Meeting in Würzburg mit der Präsentation

„Measles virus M protein shares trafficking pathways with Ebolavirus VP40, but not the ESCRT requirement for particle production“.



## 12 Danksagung

### Ich danke

...Frau Prof. Dr. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies für die Unterstützung, Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft während der Zeit meiner Doktorarbeit.

...Herrn Prof. Dr. Krohne für die freundliche Übernahme des Koreferats.

...Dr. Harms für die Hilfe und die Unterstützung am konfokalen Mikroskop.

...Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies für die konstruktiven Diskussionen im Dienstagsseminar.

...Dr. Christine Lehmann, die sich im ersten Jahr dieser Doktorarbeit immer Zeit genommen hat, meine Fragen zu beantworten und mir mit Rat und Tat zur Seite zu stand.

...Susanne für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft

...allen meinen Kollegen, Ibo, Evelyn, Elita, Marion, Hiu, Charlene und Caroline, die stets mit Rat und Tat zur Stelle waren.

...Markus Fehrholz danke ich besonders für die konstruktiven Diskussionen und aufmunternden Gespräche.

...Sabine und Dajana für den bereitgestellten Virus.

...meinen Eltern, die mich immer unterstützt und ermuntert haben, meinem Vater für seine Geduld und Hilfe bei den Korrekturen.

...meiner Oma und meinen Geschwistern, Thomas, Tina und Anne möchte ihre für Unterstützung und ihren Optimismus in meine Fähigkeiten danken.