

Aus der Abteilung Infektionsbiologie
(Prof. Dr. S. Pöhlmann)
des Deutschen Primatenzentrums, Leibniz-Institut für Primatenforschung
in Göttingen

Analyse der antiviralen Aktivität von IFITM-Proteinen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jacqueline Possiel

aus

Wolfsburg

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. U. Groß

Ko-Betreuer: Prof. Dr. S. Pöhlmann

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. U. Groß

Ko-Referent: Prof. Dr. S. Pöhlmann

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Analyse der antiviralen Aktivität von IFITM-Proteinen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Viren als Auslöser von Krankheiten	1
1.2 Pathogenese der Influenza-A-Virus-Infektion	1
1.3 Pathogenese der Ebolavirus-Infektion.....	3
1.4 Pathogenese der HIV-Infektion.....	5
1.5 Interferone als Mediatoren des Immunsystems	7
1.6 IFITM-Proteine	8
1.6.1 Topologie und subzelluläre Lokalisation.....	8
1.6.2 Antivirales Spektrum.....	9
1.6.3 Wirkmechanismus	10
1.7 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.2 Methoden.....	27
3 Ergebnisse.....	46
3.1 Klonierung von Env-Varianten mit V5-tag.....	46
3.2 IFITM3 in transfizierten Zellen hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von MLV-basierten Viruspartikeln mit EBOV-GP, MLV-Env und IAV-HA	47
3.3 IFITM3 aus transfizierten Zellen wird in MLV-basierte Viruspartikel inkorporiert.....	49
3.4 IFITM3 in transfizierten Zellen kann die Infektiosität von MLV-basierten Viruspartikeln reduzieren, der Effekt ist abhängig vom viralen Hüllprotein	51
3.5 IFITM3 in transfizierten Zellen interferiert mit der Prozessierung von verschiedenen viralen Glykoproteinen.....	52
3.6 Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Freisetzung und Infektiosität von MLV-Partikeln sowie die Glykoproteinprozessierung	57
3.7 Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von EBOV- und HIV-VLPs	62
3.8 EBOV-Proteine haben keinen Einfluss auf die IFITM3-Oberflächenexpression	64
3.9 IFITM3 in transduzierten Zellen hat keinen Einfluss auf die Replikation, aber auf den Eintritt von EBOV	65
3.9.1 IFITM3 inhibiert den Zelleintritt von EBOV	66
3.9.2 IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Replikation von EBOV	67
3.9.3 IFITM3 verhindert nicht die Reifung von EBOV.....	68
3.9.4 Überprüfung der Transduktionsviren	70

3.10	IFITM3 in transfizierten Zellen inhibiert die Replikation und den Zelleintritt von EBOV-trVLPs	70
3.11	Kein Unterschied in der Expressionsstärke und subzellulären Lokalisation zwischen IFITM3 in transduzierten und transfizierten Zellen.....	73
4	Diskussion	77
4.1	IFITM3 in transfizierten Zellen reduziert die Infektiosität von MLV-Pseudoviren mit den Glykoproteinen von HIV, SIV, EBOV, MLV und IAV.....	77
4.2	IFITMs in transfizierten Zellen inhibieren die Prozessierung der Glykoproteine von HIV-1, HIV-2, SIV, EBOV und MLV, aber nicht die Glykoproteinspaltung von IAV	79
4.3	IFITM3 in transduzierten Zellen beeinflusst den Eintritt, aber nicht die Replikation von EBOV-trVLPs	81
4.4	Die Wirkung von IFITM unterscheidet sich je nach verwendeter Methode zur Expression in der Zelle (Transfektion, Transduktion).....	83
5	Zusammenfassung	87
6	Literaturverzeichnis	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Topologie von IFITM-Proteinen	8
Abbildung 2: Antivirale Aktivität von IFITM3	11
Abbildung 3: Inhibition der HIV-1-Env-Prozessierung durch IFITMs	13
Abbildung 4: Struktur des EBOV-Genoms und Minigenoms und Lebenszyklus.....	38
Abbildung 5: Transduktionsschema	40
Abbildung 6: Klonierungsschema für V5-getaggte Glykoproteine	46
Abbildung 7: Restriktionsanalyse der positiven <i>env</i> -V5-Klone.....	47
Abbildung 8: Schematische Darstellung des 3-Plasmid-Systems.....	48
Abbildung 9: Kotransfektion eines Expressionsplasmids für IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von MLV-Partikeln mit EBOV-GP, MLV-Env und IAV-HA.....	49
Abbildung 10: IFITM3 wird in MLV-Partikel inkorporiert	51
Abbildung 11: Kotransfektion eines Expressionsplasmids für IFITM3 reduziert die Infektiosität von MLV-Partikeln	52
Abbildung 12: Koexpression von IFITM-Proteinen inhibiert die Prozessierung verschiedener Glykoproteine.....	54
Abbildung 13: Koexpression von IFITM-Proteinen hemmt die Prozessierung verschiedener Glykoproteine.....	56
Abbildung 14: Trypsin kann die Infektiosität von MLV-Partikeln nicht wiederherstellen	57
Abbildung 15: Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von MLV-Partikeln.....	58
Abbildung 16: Stabil exprimiertes IFITM3 wird in MLV-Partikel inkorporiert	59
Abbildung 17: Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Infektiosität von MLV-Partikeln.....	60
Abbildung 18: Stabil exprimiertes IFITM3 inhibiert die Freisetzung von MLV-Partikeln mit EBOV-GP, aber nicht MLV-GP	60
Abbildung 19: Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Glykoproteinprozessierung von MLV-Partikeln	61
Abbildung 20: Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von EBOV- und HIV-VLPs.....	63
Abbildung 21: EBOV-Proteine antagonisieren nicht die zelluläre Expression oder Oberflächenexpression von IFITM3.....	65
Abbildung 22: Schematische Darstellung zur Untersuchung des Einflusses von IFITM3 auf den Eintritt von EBOV-trVLPs.....	66
Abbildung 23: IFITM3 inhibiert den Eintritt von EBOV-trVLPs	67
Abbildung 24: Schematische Darstellung zur Untersuchung des Einflusses von IFITM3 auf die Replikation von EBOV-trVLPs.....	67
Abbildung 25: Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Replikation von EBOV-trVLPs.....	68
Abbildung 26: Schematische Darstellung zur Untersuchung des Einflusses von IFITM3 auf die Maturation von EBOV-trVLPs	69
Abbildung 27: IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Maturation von EBOV-trVLPs	69
Abbildung 28: Überprüfung der zur IFITM3-Transduktion verwendeten MLV-basierten Transduktionsviren.....	70
Abbildung 29: Transfiziertes IFITM3 inhibiert die Produktion von EBOV-trVLPs	71
Abbildung 30: Zeitversetzt transfiziertes IFITM3 inhibiert die Produktion von EBOV-trVLPs	72
Abbildung 31: Transfiziertes IFITM3 inhibiert den Zelleintritt von EBOV-trVLPs	72

Abbildung 32: Kein Unterschied in der subzellulären Lokalisation von IFITM3 zwischen transduzierten und transfizierten Zellen	74
--	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhibierte Viren	9
Tabelle 2: Primärantikörper	15
Tabelle 3: Sekundärantikörper	16
Tabelle 4: Bakterien	16
Tabelle 5: Zelllinien	16
Tabelle 6: Reagenzien und Chemikalien	17
Tabelle 7: Enzyme	17
Tabelle 8: Eingesetzte Geräte	18
Tabelle 9: Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen	20
Tabelle 10: Nährmedien für Zellkulturen	20
Tabelle 11: Oligonukleotide	20
Tabelle 12: Verwendete Plasmide	21
Tabelle 13: Allgemeine Lösungen für die DNA- bzw. Proteinanalyse	23
Tabelle 14: PAGE-Gele	25
Tabelle 15: Molekulargewichtsmarker für DNA-Agarose Gele und SDS-PAGE	25
Tabelle 16: Kommerzielle Reagenzsysteme	26
Tabelle 17: Verbrauchsmaterial	26
Tabelle 18: Phusion HF DNA-PCR	28
Tabelle 19: Thermocycler-Bedingungen zur Amplifikation von SIV- <i>env</i> -V5	28
Tabelle 20: Thermocycler-Bedingungen zur Amplifikation von MLV- <i>env</i> -V5	29
Tabelle 21: Reaktionsansatz für Restriktionsspaltungen	29
Tabelle 22: Eingesetzte Restriktionsenzyme	29
Tabelle 23: Restriktionsansatz für Ligationen	30
Tabelle 24: Reaktionsansatz für Kolonie-PCRs	31
Tabelle 25: Proben für Sequenzierungen	32
Tabelle 26: Zellkulturformate	32
Tabelle 27: Calcium-Phosphat-Transfektion	33
Tabelle 28: Transfektion mit Plasmiden für Pseudoviren	34
Tabelle 29: Transfektion mit Plasmiden für Transduktionsviren	36
Tabelle 30: Transfektion mit Plasmiden für VLPs	37
Tabelle 31: Produzentenzellen - Transfektion mit Plasmiden für EBOV-trVLPs	39
Tabelle 32: Zielzellen - Transfektion mit Plasmiden für EBOV-trVLPs	40
Tabelle 33: Zellysate und Kulturüberstände für den Western-Blot	42
Tabelle 34: Schema für die Konfokale Mikroskopie	44
Tabelle 35: Unterschiedliche Ergebnisse je nach verwendeter Methode	83

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäuren
Cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CIL	<i>Conserved intracellular loop</i> (konservierter, intrazellulärer Loop)
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i> (Coronavirus-Krankheit-2019)
cps	<i>Counts per second</i> (Anzahl pro Sekunde)
CTD	Carboxy-terminale Domäne
C-terminal	Carboxy-terminal
dd-H ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
EBOV	Ebolavirus
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>env</i>	<i>Envelope</i> -Gen für die Hüllproteine
Env	<i>Envelope</i> -Protein (Hüllprotein)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i> (für Transportmaschinen erforderliche endosomale Sortierkomplexe)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fätales Kälberserum)
<i>gag</i>	<i>Group-Antigen</i> -Gen für Matrix- und Kapsidproteine
Gag	<i>Group-Antigen</i> -Proteine (Matrix- und Kapsidproteine)
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein)
GP	Glykoprotein
HA	Hämagglutinin
HBS	<i>HEPES buffered saline</i> (HEPES-gepufferte Salzlösung)
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IAV	Influenza-A-Virus
IFITM	Interferon induzierbare Transmembran Proteine
IFN	Interferon
ISG	Interferon-stimulierte Gene
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
LLOV	Lloviu-Cuevavirus

<i>luc</i>	Luziferase-Gen
Luc	Luziferase-Protein
MARV	Marburgvirus
MLV	Murines Leukämievirus
mRNA	<i>Messenger</i> -Ribonukleotinsäure
NA	Neuraminidase
NP	Nukleoprotein
NTD	Aminosäure-terminale Domäne
N-terminal	Aminosäure-terminal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PBST	<i>Phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)-Tween
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
<i>pol</i>	Gen für Protease, Reverse Transkriptase und Integrase P
RESTV	Reston-Ebolavirus
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i> (Affenimmundefizienz-Virus)
SUDV	Sudan-Ebolavirus
SV40	<i>Simian virus 40</i> (Affenvirus 40)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAFV	Tai-Forrest-Ebolavirus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Toll-like-Rezeptor)
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease serine subtype 2</i> (Transmembrane Serinprotease 2)
trVLP	Transkriptions- und replikationskompetenter <i>Virus-like-particle</i>
VLP	<i>Virus-like-particle</i> (Virus-ähnlicher Partikel)
VP	Virales Protein
vRNP-Komplex	Viraler Ribonukleoprotein-Komplex
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis-Virus-Glykoprotein

1 Einleitung

1.1 Viren als Auslöser von Krankheiten

Viren sind intrazelluläre Parasiten, die zur Vermehrung auf den Stoffwechsel ihres Wirts angewiesen sind. Ihr Genom ist in *ribonucleic acid* (Ribonukleinsäure, RNA) oder *deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure, DNA) kodiert und von einer Proteinhülle umgeben. Einige Viren besitzen zudem eine mit viralen und zellulären Proteinen besetzte, vom Wirt stammende Hüllmembran (Knipe und Howley 2013). Diese werden als behüllte Viren bezeichnet. Virale Infektionen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Die Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) ist hier ein wichtiges Beispiel: Die HIV-Infektion führt zum erworbenen Immundefizienzsyndrom (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) – im Jahre 2016 Nummer vier der häufigsten Todesursachen in einkommensschwachen Ländern (WHO 2018a). Viruserkrankungen werden in der heutigen Medizin immer relevanter, da die Menschen global verkehren, immer weiter in bis dato unberührte Lebensräume vordringen und der Klimawandel Virusüberträgern, wie z. B. Mücken, neue Lebensräume ermöglicht. Neu auftretende Viren können deshalb zu einer immensen Bedrohung der Weltgesundheit werden, wie die Ebolavirus(EBOV)-Epidemie in West Afrika (2014 – 2016) und die Pandemie der Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) verdeutlichen (WHO 2016; WHO 2020). Auch das Influenza-A-Virus (IAV) ist neben den saisonalen Influenza-Epidemien für Pandemien verantwortlich, wie für die Spanische Grippe, die in den Jahren 1918 – 1919 etwa 30 – 50 Mio. Todesopfer forderte. Im Gegensatz zu saisonalen Epidemien und anderen Influenza-Pandemien traten hier schwere Verläufe und Todesfälle insbesondere bei jungen, zuvor gesunden Patienten auf (RKI 2017). Das menschliche Immunsystem, zu denen auch Interferon induzierbare Transmembran Proteine (IFITM) gehören, bietet einen wichtigen Schutz gegen virale Infektionen. Diese Arbeit konzentriert sich besonders auf die Interaktion zwischen IFITM-Proteinen und den Viren HIV, EBOV und IAV, weshalb die genannten Viren im Folgenden vorgestellt werden, um den Einfluss von IFITM-Proteinen auf sie besser zu verstehen.

1.2 Pathogenese der Influenza-A-Virus-Infektion

Das Influenza-A-Virus ist Teil der Familie der *Orthomyxoviridae* (ICTV 2020) und führt zu einer Erkrankung des Respirationstraktes. Die klinische Ausprägung reicht von einer milden Erkältung bis hin zu einer schweren Pneumonie mit letalem Ausgang. Schwere Verläufe werden vor allem bei Kleinkindern und älteren oder chronisch kranken Patienten beobachtet. Allein saisonale Influenzawellen verursachen jährlich weltweit drei bis fünf Mio. schwere Erkrankungen und 290.000 bis 650.000 Todesfälle (WHO 2018b). Influenza-Pandemien

können schwerwiegendere Konsequenzen haben, wie beispielsweise 1918 die Spanische Grippe. Im Zuge der Spanischen Grippe von 1918 starben in weniger als einem Jahr 40 Mio. Menschen, d. h. 2 % der Weltbevölkerung (Palese 2004).

Das Influenza-A-Virus ist ein behülltes RNA-Virus, dessen in acht Segmente geteiltes einzelsträngiges Genom mit negativer Polarität für bis zu 14 Proteine kodiert (Knipe und Howley 2013). Nach Koinfektion (Infektion einer Zelle mit zwei oder mehr Virusstämmen) kann es zur Bildung von neuen Viren mit durchmischem Genom kommen (sog. *antigenic shift*), die dem immunologischen Gedächtnis der Bevölkerung unbekannt sind. Im Gegensatz dazu ist bei Punktmutationen in den Genen für die Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) (sog. *antigenic drift*) eine effiziente Kontrolle von zirkulierenden Viren durch die Immunantwort möglich (Clancy 2008). Die Konsequenz sind die jährlichen Influenzawellen (Epidemien).

Das HA bindet Sialinsäuren auf der Wirtsmembran und ist für den Zelleintritt verantwortlich. Das Sialinsäuren-spaltende NA ist dagegen für die Freisetzung von Virionen aus infizierten Zellen wichtig. Ein weiterer Bestandteil der Virushülle ist das M2-Protein, welches Ionenkanäle bildet und eine wichtige Rolle bei der Freisetzung der viralen RNA in das Zytoplasma der Wirtszellen spielt (sog. *Uncoating*). Unter der Hüllmembran liegt das M1-Protein, welches den viralen Ribonukleoprotein(vRNP)-Komplex bindet. Der vRNP vereint die RNA-Segmente, das virale Nukleoprotein (NP) und den RNA-Polymerasekomplex (PA, PB1, PB2) (Szewczyk et al. 2014).

Das Influenza-A-Virus bindet mithilfe von HA an Sialinsäuren der Wirtszellmembran (Skehel und Wiley 2000). Das Hämagglutinin wird als inaktives Vorläuferprotein HA0 synthetisiert, dessen Untereinheiten HA1 und HA2 über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Zelluläre Proteasen, wie Furin und die *transmembrane protease serine subtype 2* (Transmembrane Serinprotease 2, TMPRSS2), spalten HA0 in HA1 und HA2 (Stieneke-Gröber et al. 1992; Böttcher et al. 2006). Das HA1 ist für die Wirtszellbindung, HA2 für die Membranfusion verantwortlich (Skehel und Wiley 2000). Das Hämagglutinin von humanen sowie gering pathogenen aviären IAV wird durch Proteasen wie TMPRSS2 an der Zelloberfläche prozessiert, die im Wesentlichen im Aerodigestivtrakt exprimiert werden. Die Virusverbreitung ist daher auf diese Gewebe beschränkt. Das HA hochpathogener aviärer IAV wird intrazellulär von ubiquitär vorkommenden Proteasen, wie z. B. Furin, gespalten und die Viren verursachen eine systemische Infektion (Steinhauer 1999; Horimoto und Kawaoka 2005). *In vitro* erfolgt die Spaltung durch Zugabe von Trypsin in das Nährmedium der Zellen. Das HA1 von humanpathogenen IAV bindet an N-Acetyl-Neuraminsäuren, die α 2-6-glykosidisch mit Galaktose verbunden sind und sich überwiegend im Pharynx, Nasenepithelium, der Trachea und in Bronchien finden. Das HA1 von aviären IAV bindet an N-Acetyl-Neuraminsäuren mit α 2-3-Verknüpfung zur Galaktose, die beim Menschen vor allem in den Alveolen vorkommen (Shinya et al. 2006; van Riel et al. 2006). Auf die Rezeptorbindung folgt die Internalisierung des Virus über Clathrin-vermittelte Endozytose

(Rust et al. 2004), wobei auch Clathrin und Caveolin-unabhängige Mechanismen, wie Makropinozytose, nachgewiesen wurden (Sieczkarski und Whittaker 2002; de Vries et al. 2011; Rossman et al. 2012). Der niedrige pH-Wert in späten Endosomen induziert eine Konformationsänderung von HA2. Dies ermöglicht die Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran (Más und Melero 2013). Außerdem leitet der Ionenkanal M2 Protonen ins Virusinnere und sorgt dafür, dass die vRNPs von M1 dissoziieren. Sie gelangen durch die Fusionspore in das Zytosol und aufgrund der Kernlokalisierungssequenz des NP in den Nukleus. Die virale RNA (vRNA) dient als Matrize für die Synthese von *messenger*-RNA (mRNA) und komplementärer RNA (cRNA) durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (PA, PB1, PB2) (Samji 2009; Knipe und Howley 2013). Das NP reguliert die Replikation, während das Nichtstrukturprotein NS1 die antivirale Interferonantwort der Wirtszelle supprimiert, indem es die Signalkaskade zur Synthese von Typ-I-Interferonen hemmt (García-Sastre et al. 1998). Anschließend werden HA, NA und M2 am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert, multimerisieren dort und werden über den Golgi-Apparat zur Kernmembran transportiert. Die restlichen Proteine werden an freien Ribosomen translatiert, gelangen zurück in den Nukleus und assoziieren mit der vRNA. Mithilfe des nukleären Exportproteins (NEP) wird der vRNP-Komplex zur Zellmembran transportiert und assoziiert mit HA, NA und M2 (Boulo et al. 2007; Knipe und Howley 2013). Aufgrund von Sequenzmotiven in ihren Transmembrandomänen, lokalisieren HA und NA in cholesterinreichen Mikrodomänen, den sog. *lipid rafts*, an der apikalen Seite von infizierten, polarisierten Zellen (z. B. Lungenepithel) (Kundu et al. 1996; Lin et al. 1998; Barman und Nayak 2000). Die vRNPs werden in Viruspartikel eingebaut, deren Bildung von den Proteinen M1, HA und NA abhängig ist und die von der Plasmamembran mit Hilfe vom M2-Protein abgeschnürt werden. Schließlich spaltet das NA die N-Acetyl-Neuraminsäuren von Proteinen und Lipiden der Plasmamembran ab, sodass sich neu gebildete Partikel von den Zellen lösen können (Samji 2009; Knipe und Howley 2013).

1.3 Pathogenese der Ebolavirus-Infektion

Ebolaviren verursachen im Menschen ein hämorrhagisches Fieber mit extrem hoher Sterberate (bis zu 90 %). Zu ihnen gehören Zaire(EBOV)-, welches 2014 eine Epidemie in Westafrika auslöste (WHO (World Health Organization) 2016), Sudan(SUDV)-, Tai-Forest(TAFV)-, Bundibugyo-, Bombali- und das für immunkompetente Menschen apathogene Reston(RESTV)-Ebolavirus (Geisbert et al. 1992; ICTV 2020). Sie sind Mitglieder der *Filoviridae*-Familie, genauso wie u. a. das Marburgvirus (MARV) und das Lloviu-Cuevavirus (LLOV). Nach einer Inkubationszeit von fünf bis sieben Tagen manifestiert sich eine grippeähnliche Symptomatik, die über starke Beschwerden (Erbrechen, Diarrhoe, Nierenversagen und hämorrhagisches Fieber) bis zum Tod führen kann (Mahanty und Bray 2004). Sogar in virusfrei erklärten Überlebenden kann das Virus im Sperma noch nach über sechs Monaten nachweisbar sein (Deen et al. 2017). Genesene Patienten können

ebenfalls persistent infiziert sein und Rückfälle erleiden (MacIntyre und Chughtai 2016). Die Ebolaepidemie 2014 – 2016 in Westafrika führte zu mehr als 28.000 Erkrankungsfällen und forderte über 11.000 Menschenleben (WHO (World Health Organization) 2016). Neben den schweren gesundheitlichen Folgen sind in den am stärksten betroffenen Ländern Guinea, Liberia und Sierra Leone nun die wirtschaftlichen und sozialen Folgen bemerkbar (bpb 2015).

Ebolaviren sind behüllte, fadenförmige Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom mit negativer Polarität. Das Genom kodiert für das Wirtszellen-bindende Glykoprotein, das für die Bildung und Freisetzung neuer Viren wichtige Matrixprotein Virales Protein(VP)40 und für die Nukleokapsid-assoziierten Proteine NP (Nukleoprotein), VP24, VP35, VP30 sowie die RNA-Polymerase L (Knipe und Howley 2013).

Für den Zelleintritt bindet EBOV unspezifisch über sein in der Virusmembran lokalisiertes Glykoprotein an zelluläre Lektine, wie DC-SIGN/L-SIGN (Alvarez et al. 2002; Simmons et al. 2003), LSECtin (Dominguez-Soto et al. 2007; Gramberg et al. 2008) und hMGL (Takada et al. 2004). Außerdem können Phosphatidylserine (PS) in der viralen Hülle mit PS-Rezeptoren, wie den Rezeptoren der Tyro3-Familie (Shimojima et al. 2006) und mit TIM-Proteinen (Kondratowicz et al. 2011; Dahmann et al. 2015) auf der Oberfläche von Zielzellen interagieren. EBOV wird durch Makropinozytose (Nanbo et al. 2010) oder andere Aufnahmewege (Bhattacharyya et al. 2011) in die Wirtszelle aufgenommen. Das Glykoprotein wird durch Subtilisin-ähnliche Proteasen (vor allem Furin) in der infizierten Zelle in Glykoprotein(GP)1 und GP2 gespalten, welche über eine Disulfidbrücke verbunden sind (Volchkov et al. 1998). Das GP1 besteht aus der rezeptorbindenden Domäne, einer Glykankappe und einer Muzin-ähnlichen Domäne. Das GP2 vereint das Fusionspeptid, zwei Wiederholungen einer kurzen Aminosäuresequenz (sog. *heptad repeats*) und einen Transmembrananker (Lee und Saphire 2009). In späten Endosomen entfernen die pH-abhängigen Proteasen Cathepsin B und L die Glykankappe und die Muzin-ähnliche Domäne von GP1 (Chandran et al. 2005; Dube et al. 2009). Damit kann die rezeptorbindende Domäne den endosomalen Rezeptor Niemann-Pick C1 (NPC1) binden (Carette et al. 2011; Côté et al. 2011; Miller et al. 2012). Konformationsänderungen in GP2 führen anschließend zur Fusion der Membranen und zur Freisetzung des vRNP-Komplexes ins Zytoplasma.

Die Replikation und Transkription der RNA wird vom Polymerasekomplex aus RNA-abhängiger-RNA-Polymerase L, NP, VP35 und VP30 durchgeführt (Mühlberger et al. 1998; Mühlberger et al. 1999). Dabei haben VP40 und VP24 eine regulierende Funktion (Watanabe et al. 2007; Hoenen et al. 2010). Bei der Replikation entstehen sieben monocistronische mRNAs, welche in Proteine translatiert werden sowie Antigenome (RNAs mit positiver Polarität), die zur Produktion neuer viraler Genome dienen (Mühlberger et al. 1999; Mühlberger 2007). Nach der Translation wird das Glykoprotein im Golgi-Apparat durch Furin gespalten (Sanchez et al. 1998) und an mehreren Stellen glykosyliert (Will et al. 1993; Feldmann et al. 1994; Jeffers et al. 2002; Lin et al. 2003). Die Proteine VP40 und GP werden

an die Zellmembran transportiert und akkumulieren in sog. *lipid rafts* (Bavari et al. 2002; Jasenosky und Kawaoka 2004; Hartlieb und Weissenhorn 2006). Die Proteine NP, VP24 sowie VP35 bilden gemeinsam mit der neuen viralen RNA das Nukleokapsid (Noda et al. 2006; Bharat et al. 2012). Für die Knospung der Viruspartikel ist VP40 wichtig, welches mit Glykoprotein und Nukleokapsid interagiert (Timmins et al. 2001; Noda et al. 2006). Zur Partikelbildung rekrutiert VP40 Bestandteile der *endosomal sorting complexes required for transport* (für Transportmaschinen erforderliche endosomale Sortierkomplexe, ESCRT) der Wirtszelle, wie Tsg101, Vps4A, Vps4B sowie Nedd4 (Harty et al. 2000; Martin-Serrano et al. 2001; Licata et al. 2003; Timmins et al. 2003; Yasuda et al. 2003; Jasenosky und Kawaoka 2004; Hartlieb und Weissenhorn 2006; Urata et al. 2007; Kolesnikova et al. 2009; Dolnik et al. 2010).

1.4 Pathogenese der HIV-Infektion

Das zur Gattung der Lentiviren innerhalb der Familie der *Retroviridae* gehörende humane Immundefizienz-Virus (HIV) führt beim Menschen zu einer schleichenden Immunschwäche, die unbehandelt meist in AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) resultiert (ICTV 2020). Die Patienten erkranken oft an für Immunkompetente harmlosen Erregern. Weltweit war AIDS bis zum Anfang des 21. Jahrhunderts Nummer sieben der häufigsten Todesursachen, in Entwicklungsländern sogar Nummer vier (WHO (World Health Organization) 2018). Seit Beginn der Pandemie haben sich weltweit 74,9 Mio. Menschen mit HIV infiziert und 32 Mio. Menschen sind an AIDS gestorben (UNAIDS 2019). Die Viren HIV-1 und HIV-2 entstanden aus verschiedenen Typen der bei bestimmten Affenarten vorkommenden Affenimmundefizienz-Viren. Das HIV-1 ist für die AIDS-Pandemie verantwortlich, während das weniger pathogene HIV-2 in Westafrika und Indien endemisch ist. Inzwischen erhalten 62 % der Infizierten eine antiretrovirale Therapie, welche zwar nicht das Virus eliminiert, aber seine Vermehrung inhibiert (UNAIDS 2019).

HIV ist ein Retrovirus, welches vorwiegend T-Helferzellen und Makrophagen befällt. Es enthält die Gene *gag* (*group-Antigen*), *env* (*envelope*) und *pol* (*polymerase*), wobei letzteres die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease kodiert, sowie die Gene *vif*, *vpr*, *vpr*, *tat*, *rev* und *nef*, die für regulatorische Proteine kodieren (Knipe und Howley 2013).

Etwa 1 % der europäischen Bevölkerung ist durch eine Mutation beider Kopien des CCR5-Gens resistent gegen HIV (CCR5 Δ 32), während 16 % die Mutation auf einem Gen aufweisen, was den Krankheitsverlauf abmildert (Lucotte 2002). Die Transplantation von Knochenmark eines homozygoten CCR5 Δ 32-Spenders in einen HIV-Infizierten führte sogar zur Heilung (Hütter et al. 2009).

Das HI-Virus bindet über die gp120-Untereinheit seines Oberflächenproteins Env (*envelope*) an das CD4-Protein (CD = *cluster of differentiation*) der Zielzelle (Dalglish et al. 1984; Maddon et al. 1986). In den frühen Infektionsstadien nutzt HIV den CC-Chemokin Rezeptor 5 (CCR5) als Korezeptor für den Zelleintritt (Alkhatib et al. 1996; Deng et al. 1996; Doranz et

al. 1996; Dragic et al. 1996; Berger et al. 1998). In den späten Infektionsstadien entstehen in etwa 30-40 % der Infizierten Viren, die den Korezeptor CXCR4 verwenden (Endres et al. 1996; Bleul et al. 1997; Berger et al. 1998; Feng et al. 2011). Der Korezeptortropismus des Virus bestimmt den Zelltropismus: CCR5-verwendende Viren können Makrophagen und/oder T-Zellen infizieren, während CXCR4-verwendende Viren T-Zellen und T-Zelllinien infizieren.

Die Bindung von Env an CD4 induziert eine Konformationsänderung in der gp120-Untereinheit. Vorher verborgene Epitope werden somit freigelegt und die Bindung an den Chemokinrezeptor sowie die Membranfusion ermöglicht (Doms und Peiper 1997). Nach der Fusion wird das Kapsid, das den Nukleoproteinkomplex enthält, ins Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt. Die virale RNA wird von der viralen reversen Transkriptase in doppelsträngige komplementäre DNA umgeschrieben, die auf beiden Seiten von *long terminal repeats* (LTRs) flankiert wird. Mit den Kapsidkomponenten verbunden, wird sie als Präintegrationskomplex in den Nukleus befördert. Dort erfolgt die Integration in das Wirtsgenom mittels viraler Integrase. Damit bleibt das Provirus in der Zelle erhalten und wird bei der Mitose an nachfolgende Zellen weitergegeben (Knipe und Howley 2013). Die Entstehung neuer Viruspartikel beginnt mit der Transkription der proviralen DNA durch die zelluläre DNA-abhängige RNA-Polymerase II. Zytokine und Mitogene induzieren die Transkription durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (West et al. 2001). An freien zytoplasmatischen Ribosomen findet die Translation viraler Proteine statt, obschon das Env-Protein indes an Polyribosomen des ER translatiert wird. Es erfolgt eine Verankerung des Env-Proteins an der hydrophoben Region der ER-Membran. Nachfolgend wird es an den Asparaginresten glykosyliert. Die Spaltung von Env in den luminalen (gp120) und den membranverankerten Proteinanteil (gp41) durch die zelluläre Protease Furin erfolgt während des Transports zur Zelloberfläche (Sundquist und Kräusslich 2012; Knipe und Howley 2013). Die viralen Bestandteile sammeln sich in speziellen Mikrodomänen (*lipid rafts*) der Wirtszellmembran, wo Gag ein Proteinnetzwerk bildet und durch Konformationsänderungen die notwendigen Schritte zur Virusassemblierung induziert. Dazu zählen die Bindung der Plasmamembran, Protein-Protein-Interaktionen zur Bildung viraler Partikel, die Konzentrierung von Env und die Verpackung des Genoms. Gag rekrutiert zudem die ESCRT-Maschinerie, welche die Knospung der unreifen Viruspartikel von der Wirtszellmembran ermöglicht (*budding*). Dabei wird die HIV-Protease aktiviert, die die Vorläuferproteine spaltet, sodass reife infektiöse HIV-Partikel entstehen (Sundquist und Kräusslich 2012; Freed 2015). Die Virushülle zeigt gegenüber der Plasmamembran eine Akkumulation bestimmter Phospholipide sowie von Cholesterin (Brügger et al. 2006) und integriert selektiv zelluläre Proteine (Arthur et al. 1992; Franke et al. 1994; Compton et al. 2014; Tartour et al. 2014).

1.5 Interferone als Mediatoren des Immunsystems

Das menschliche Immunsystem stellt eine Verteidigung gegen körperfremde Strukturen dar. Trotz der Möglichkeiten der heutigen Medizin bietet das kompetente Immunsystem, das sich während der Evolution stetig weiterentwickelt hat, immer noch den besten Schutz gegen Pathogene. Es besteht aus einer nicht-adaptiven, angeborenen und einer adaptiven, erworbenen Immunantwort. Die evolutionär ältere, angeborene Abwehr reagiert schnell, innerhalb von Minuten oder Stunden und reicht oftmals zur Eindämmung der Pathogene aus. Überwinden Erreger mechanische Barrieren, wie die Haut, können Zellen des angeborenen Immunsystems diese durch Phagozytose eliminieren oder die Immunreaktion durch die Produktion von Zytokinen, wie Interferonen steuern. Die langsamere, erworbene Abwehr kooperiert mit dem angeborenen Immunsystem und erkennt spezifisch körperfremde Antigene. Antigenpräsentierende Zellen phagozytieren Pathogene und veranlassen T-Zellen zur Eliminierung der infizierten Zellen und Aktivierung von B-Zellen zur Antikörperproduktion. Außerdem verbleiben nach einer Infektion Gedächtniszellen, die bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen rasch rekrutiert werden können (Murphy et al. 2017, S. 1).

Die Infektion von Zellen führt zur Produktion von Interferonen (IFN), die zu den Zytokinen gehören und ihren Namen aufgrund der Interferenz mit der Replikation von IAV erhalten haben (Isaacs et al. 1957; Isaacs und Lindenmann 1957). *Pattern Recognition Receptors* (PRR) können Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), wie Lipopolysaccharide und Nukleinsäuren von Bakterien und Viren erkennen (Pandey et al. 2014). Dies induziert eine Signalkaskade, die zur Synthese von Interferonen führt (Wu und Chen 2014).

Interferone werden in Typ I (IFN- α , β , ϵ , κ , ω), Typ II (IFN- γ) und Typ III (IFN- λ) Interferone eingeteilt (Murphy et al. 2017, S. 121). Unter den Typ-I Interferonen sind wichtige Mediatoren der Abwehr viraler Infektionen. IFN- α und IFN- β können von fast jeder Zelle produziert werden, am meisten sezernieren jedoch plasmazytoide dendritische Zellen, die zum unspezifischen Immunsystem gehören (Siegal et al. 1999).

Die Bindung von Interferonen an ihre Rezeptoren auf benachbarten Zellen induziert den JAK/STAT-Signalweg und damit die Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISGs) (Stark und Darnell 2012). Viele der über 380 ISG-kodierten Effektorproteine haben antivirale Aktivität, sodass fast jeder Schritt des viralen Replikationszyklus inhibiert werden kann (Schoggins et al. 2011). Einige Effektormoleküle können dabei nur eine Virusspezies abwehren (z. B. HIV-Inhibition durch Mx2), während andere, wie Mx1, Tetherin und IFITMs eine Vielzahl von Virusinfektionen unterdrücken können (Schneider et al. 2014).

1.6 IFITM-Proteine

Die Gruppe der IFITM-Proteine gehört zu den durch ISGs kodierten Proteinen und beinhaltet die antiviralen, ubiquitär vorkommenden Proteine IFITM1-3, das nicht Interferon-induzierbare, in der Knochenmineralisation wichtige IFITM5 (Moffatt et al. 2008) und das noch weitgehend unerforschte IFITM10. Die Gene für IFITM1-3 und 5 liegen gruppiert innerhalb einer 20 Kilobasenpaare(kb)-Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 und kodieren mit jeweils zwei Exons für etwa 15 kDa große Proteine (Bailey et al. 2014).

1.6.1 Topologie und subzelluläre Lokalisation

Die IFITM-Proteine sind Mitglieder der Dispanin Proteinfamilie, die durch zwei hydrophobe, membranassoziierte Proteindomänen gekennzeichnet ist. Diese werden in IFITMs durch einen *conserved intracellular loop* (konservierter, intrazellulärer Loop, CIL) verbunden (Abbildung 1).

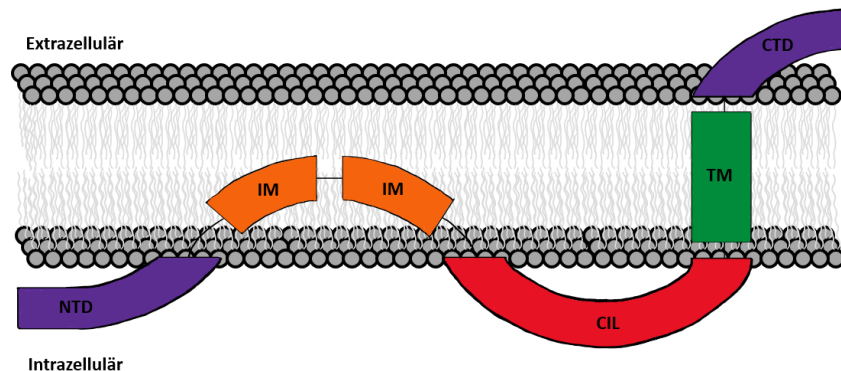


Abbildung 1: Topologie von IFITM-Proteinen. Die IFITM-Proteine zeigen eine transmembranöse α -Helix (TM, grün) an der luminalen CTD (violett) und zwei intramembranöse α -Helizes (IM, orange) an der luminalen NTD (violett), die durch CIL (rot) verbunden werden. Modifiziert nach Bailey et al. (2014).

Die Enden bilden variable N-(NTD) und C-terminale Domänen (CTD), wobei die NTD von IFITM1 signifikant kürzer sind als die von IFITM2 und 3. Die IFITM-Proteine weisen eine C-terminale transmembranöse α -Helix und zwei kurze intramembranöse α -Helizes auf, wobei die NTD zytosolisch und die CTD luminal ausgerichtet sind (Siegrist et al. 2011; Ling et al. 2016). Die subzelluläre Lokalisation wird durch den N-Terminus bestimmt. Ein YXXF Motiv in der NTD von IFITM2 und 3 bindet das Clathrin Adaptorprotein AP2 und ermöglicht die Clathrin-vermittelte Endozytose, die zur endo- und lysosomalen Akkumulation führt. Der kürzeren NTD von IFITM1 fehlt dieses Motiv, sodass IFITM1 auf der Zelloberfläche akkumuliert (Jia et al. 2012). Zudem beeinflussen posttranslationale Modifikationen die Lokalisation und antivirale Wirkung. Die Ubiquitinierung von NTD und CIL sowie die Mutation von Cysteinresten, die normalerweise S-palmitoyliert werden können (Yount et al. 2010), führen zu einer reduzierten antiviralen Aktivität (Yount et al. 2012; John et al. 2013; Narayana et al. 2015).

1.6.2 Antivirales Spektrum

Interferon induzierbare Transmembran Proteine hemmen den Wirtszelleintritt von zahlreichen behüllten Viren, wie Viren der Familien *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Coronaviridae*, *Retroviridae*, *Bunyaviridae* und *Paramyxoviridae* (Brass et al. 2009; Weidner et al. 2010; Huang et al. 2011; Lu et al. 2011; Everitt et al. 2012; Jia et al. 2012; Bertram et al. 2013; Everitt et al. 2013; Li et al. 2013; Mudhasani et al. 2013; Warren et al. 2014; Wrensch et al. 2014; Qian et al. 2015; Wrensch et al. 2015), aber auch die unbehüllten Reoviren (Anafu et al. 2013) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Inhibierte Viren (modifiziert nach Smith et al. (2014))

Familie	Virus	Inhibition	Pseudotyp (P) oder authentisches Virus (V)	Referenz
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza-A-Virus	✓	P V	(Brass et al. 2009)
	Influenza B Virus	✓	V	(Everitt et al. 2012)
<i>Flaviviridae</i>	West Nil Virus	✓	P	(Brass et al. 2009)
	Dengue Virus	✓	P	(Brass et al. 2009)
	Hepatitis C Virus	✓	P V	(Brass et al. 2009; Wilkins et al. 2013)
<i>Rhabdoviridae</i>	Vesikuläres Stomatitis Virus	✓	P V	(Weidner et al. 2010)
<i>Filoviridae</i>	Ebolavirus	✓	P V	(Huang et al. 2011)
	Marburg Virus	✓	P V	(Huang et al. 2011)
<i>Coronaviridae</i>	SARS Coronavirus	✓	P V	(Huang et al. 2011)
<i>Retroviridae</i>	HIV-1	✓	P V	(Brass et al. 2009; Lu et al. 2011; Jia et al. 2012; Tartour et al. 2014)
	<i>Simian immunodeficiency virus</i> (Affenimmundefizienz-Virus, SIV)	✓	P V	(Qian et al. 2015)
	Murines Leukämievirus (MLV)	✗	P V	(Brass et al. 2009)
	Jaagsiekte Schafvirus	✓	p	(Li et al. 2013)
<i>Arenaviridae</i>	Lassa Virus	✗	P	(Brass et al. 2009)
	Machupo Virus	✗	P	(Brass et al. 2009)
	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus	✗	P	(Brass et al. 2009)

Familie	Virus	Inhibition	Pseudotyp (P) oder authentisches Virus (V)	Referenz
<i>Alphaviridae</i>	Semliki Forest Virus		V	(Li et al. 2013)
<i>Bunyaviridae</i>	La Crosse Virus	✓	V	(Mudhasani et al. 2013)
	Rifttal Fieber Virus	✓	V	(Mudhasani et al. 2013)
	Hämorrhagisches Krim-Kongo-Fieber-Virus	✗	V	(Mudhasani et al. 2013)
<i>Herpesviridae</i>	Herpes simplex Virus	✗	V	(Xie et al. 2015)
	Humanes Zytomegalie Virus	✗	✗	(Warren et al. 2014; Xie et al. 2015)

Der Zelleintritt von IAV wird stark durch IFITMs inhibiert (Brass et al. 2009), während einige andere behüllte Viren, wie Arenaviren, das Bunyavirus Krim-Kongo, das Herpes simplex Virus und das Murine Leukämievirus gegenüber IFITMs resistent sind. Das Coronavirus OC43 nutzt sogar IFITM2 und 3 zur Zellinfektion (Zhao et al. 2014) und in mit dem humanen Zytomegalie Virus infizierten Zellen führt der knock-down von IFITM zu einer abgeschwächten Produktion von Viruspartikeln, die zudem weniger infektiös sind (Xie et al. 2015). *In vivo* wurde bei Ifitm3-defizienten Mäusen ein schwererer Verlauf einer Infektion mit dem Respiratorisches Synzytial-Virus beobachtet. Es wurde dagegen kein Einfluss auf die Abwehr von Bakterien (*Salmonella typhimurium*, *Citrobacter rodentium* sowie *Mycobacterium tuberculosis*) und Protozoen (*Plasmodium berghei*) beobachtet (Everitt et al. 2013; Ranjbar et al. 2015).

Eine antivirale Wirkung von IFITM-Proteinen konnte auch im Menschen nachgewiesen werden. Personen, die mit einer schweren IAV-Infektion hospitalisiert wurden, zeigten gehäuft einen Polymorphismus im IFITM3-Gen. Der Polymorphismus könnte zur Expression eines verkürzten, inaktiven Proteins führen, das *in vivo* jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnte (Everitt et al. 2012; Williams et al. 2014; Xuan et al. 2015). Neue Arbeiten zeigten, dass der Polymorphismus nicht zur Expression eines verkürzten IFITM-Proteins führt (Makvandi-Nejad et al. 2018).

1.6.3 Wirkmechanismus

Die Abwehr einer großen Zahl unterschiedlicher, auf verschiedenen Wegen in Zellen eintretender Viren, zeigte in den bisherigen Studien kein einheitliches Bild des genauen Wirkmechanismus von IFITMs (Abbildung 2). So werden RNA- und DNA-Viren, Viren mit und ohne Membranhülle, über die Plasmamembran (HIV-1), über frühe (Hepatitis-C-Virus (HCV), Vesikuläres Stomatitis-Virus (VSV)) sowie späte (IAV, Filo- und Coronaviren) Endosomen und über Lysosomen eintretende Viren gehemmt.

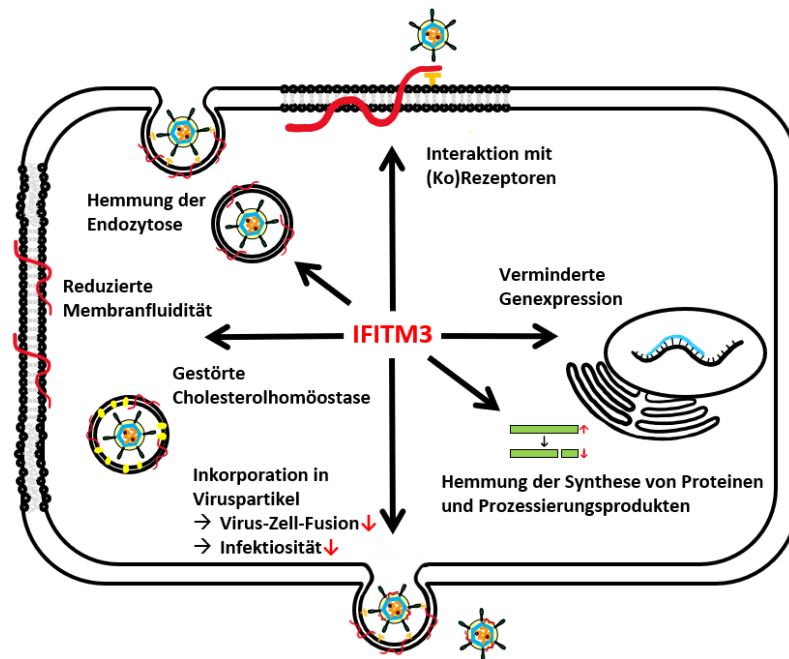


Abbildung 2: Antivirale Aktivität von IFITM3. Das IFITM-Protein 3 interferiert mit dem Eintritt (gestörte Membranfluidität/-krümmung, Rezeptorinteraktion), der Genexpression und dem Austritt (Glykoproteinprozessierung, Inkorporation in die virale Membran) von Viren.

Die Inhibition von sowohl vermehrungsfähigen Viren als auch mit Glykoprotein versehenen, nicht-vermehrungsfähigen Pseudoviren legt die Hemmung eines mit dem viralen Glykoprotein in Verbindung stehenden Schrittes nahe. Möglichkeiten wären Eingriffe in die Wirtsrezeptorbindung, z. B. durch die Blockade der Interaktion oder des Zugangs zum Rezeptor, die Endozytose und die Membranfusion. Gegen eine verminderte Rezeptorexpression sprechen die von IFITM unbeeinflussten IAV- (Sialinsäuren), SARS-CoV- (ACE2) und HIV-Rezeptoren (Brass et al. 2009; Huang et al. 2011; Yu et al. 2015). Für HCV wurde jedoch eine Interaktion zwischen IFITM1 und den HCV-Korezeptoren CD81 und Occludin nachgewiesen, die den Zelleintritt verhindert (Wilkins et al. 2013).

Die subzelluläre IFITM-Lokalisation korreliert in einigen Fällen mit der antiviralen Aktivität. IFITM2 und 3 hemmen vor allem mit Endosomen fusionierende Viren, während IFITM1 über die Plasmamembran eintretende Viren, wie das Jaagsiekte Schafvirus, hemmt, was für eine Abwehr im Stadium der Membranfusion spricht (Li et al. 2013; Jia et al. 2014).

Für HIV-1 spielt der Korezeptor-Tropismus eine entscheidende Rolle für die IFITM-Sensitivität. CCR5-trope HIV (R5) werden vorwiegend von IFITM1 gehemmt, wohingegen CXCR4-favorisierende HIV (X4) vor allem von IFITM2 und 3 inhibiert werden (Foster et al. 2016). Zudem wurde gezeigt, dass ein IFITM2-Polymorphismus ($\Delta 20$ -IFITM2) den Eintritt von X4-, aber nicht R5-Viren hemmt (Wu et al. 2017). Der Austausch der V3-Schleife (*V3 loop*) von gp120, welche bestimmt, ob CXCR4 oder CCR5 als Korezeptor benutzt wird, kehrt die IFITM-Sensitivität um (Foster et al. 2016). Laut Wang et al. (2017) entscheidet die V3-Schleife von gp120 nicht nur über den Korezeptortropismus, sondern auch über die Konformation. Ein geschlossener Grundzustand, in dem funktionelle Zentren

von Env maskiert werden, ist resistenter gegen Antikörper und anderen Faktoren wie IFITM3 (Munro und Mothes 2015; Wang et al. 2017).

Eine Analyse des Stadiums der Hemmung zeigte, dass IFITMs die Hemifusion, das Stadium der Verschmelzung der äußeren Membranschichten von Virus und Wirtszelle, verhindern. Dies geschieht möglicherweise durch eine IFITM-induzierte Reduktion der Membranfluidität oder durch eine Veränderung der Membrankrümmung. In der *Fluorescence-lifetime imaging* Mikroskopie (FLIM) offenbarten IFITM enthaltende Zellmembranen eine höhere molekulare Ordnung und geringere Fluidität (Li et al. 2013). Zudem konnte Chlorpromazin, ein Wirkstoff, der den Übergang von der Hemifusion zur Fusion fördert, die IFITM3 vermittelte Inhibition nicht aufheben. Oleinsäure jedoch, welche eine negative Membrankrümmung und Hemifusion fördert, löste die Wirkung von IFITM3 auf (Li et al. 2013). Unterstützt wird die Theorie der Fusionshemmung von einer Studie an IFITM3-Mutanten: Die Mutation zweier Phenylalanine in der ersten Intermembrandomäne führt demnach zu einem Verlust der Interaktion von IFITMs, was in einer abgeschwächten Abwehr resultiert. Die Interaktion zwischen IFITMs könnte zu einer herabgesetzten Membranfluidität und damit behinderten Membranfusion führen (John et al. 2013). Allerdings zeigten Desai et al. (2014) in der mikroskopischen Betrachtung von Fluoreszenzmarkierten Lipiden und IAV-Virionen, dass IFITM3 nicht die Hemifusion, sondern die Bildung von Fusionsporen verhindert.

Weiterhin wurde eine Störung der Cholesterolumhomöostase als Wirkmechanismus vorgeschlagen, wobei IFITMs die Interaktion zwischen VAP-A (*Vesicle-associated membrane protein-associated protein-A*) und OSBP (*oxysterol-binding protein*) stören, sodass Cholesterin in Endosomen akkumuliert und die Freisetzung von Viren blockiert (Amini-Bavil-Olyaei et al. 2013). Die Rolle von Cholesterin in der IFITM-Aktivität wird von Experimenten bestätigt, die die Aufhebung der IFITM-induzierten Inhibition von IAV und dem *simian immunodeficiency virus* (Affenimmundefizienz-Virus, SIV) durch Amphotericin B zeigen. Amphotericin interagiert mit Cholesterin und erhöht die Membranfluidität, könnte also so der Wirkung von IFITMs entgegensteuern (Lin et al. 2013; Qian et al. 2015). Dieser Hypothese widersprechen jedoch Experimente, bei denen die endosomale Akkumulation von Cholesterin nicht mit dem inhibitorischen Effekt von IFITMs korreliert (Desai et al. 2014; Wrensch et al. 2014) und Amphotericin B die IFITM vermittelte Inhibition nicht für Ebolaviren aufhebt (Wrensch et al. 2015).

In anderen Untersuchungen konnte ein direkter Einfluss von IFITMs auf die Expression von Genen beobachtet werden. So hemmte die Überexpression von IFITMs die Synthese von HIV-p55-Gag sowie dessen Prozessierungsprodukt HIV-p24-Gag (Lu et al. 2011; Ding et al. 2014). Des Weiteren inhibierte eine IFITM3-Überexpression die Produktion von HCV-Proteinen (Yao et al. 2011; Narayana et al. 2015).

Forschungsergebnisse zu HIV lenkten den Fokus von der Inhibition des Zelleintritts auf die der Virusfreisetzung. So soll die Inkorporation von IFITMs zu weniger infektiösen HIV-1

Virionen, einer beeinträchtigten Virus-Zell-Fusion und einer reduzierten viralen Ausbreitung führen (Compton et al. 2014; Tartour et al. 2014). Allerdings wurden nicht alle Resultate von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Yu et al. (2015) beobachteten ebenfalls eine Partikelinkorporation von IFITM-Proteinen, jedoch keine Korrelation mit der viralen Infektiosität: IFITM1 mit dem geringsten antiviralen Effekt wurde am meisten in Viruspartikel inkorporiert. Zudem demonstrierten Yu et al. (2015) die spezifische Interaktion von IFITM mit HIV-1-gp41 und eine durch IFITM inhibierte Env-Prozessierung, die in einer Akkumulation des Vorläuferproteins gp160 und einer reduzierten Spaltung in gp41 sowie gp120 resultierte (Abbildung 3). Die verminderte Env-Prozessierung und die vermehrte Freisetzung von gp120 nach extrazellulär reduzierten die virale Fusionsaktivität (Yu et al. 2015).

Foster et al. (2016) konnten eine Inhibition der Env-Spaltung durch IFITMs nicht bestätigen, zeigten jedoch, dass *env*-Mutationen die Inhibition des Viruseintritts durch IFITMs beeinflussen. Zu Beginn der Infektion ist HIV-1 größtenteils IFITM-resistent, wird jedoch im Verlauf der chronischen Infektion, durch *env*-Anpassungsmutationen, die Resistenz gegen neutralisierende Antikörper des adaptiven Immunsystems vermitteln, IFITM-sensibel (Foster et al. 2016). Durch wiederholte Passagierung von HIV-1 in Gegenwart von IFITM erfolgt die Selektion von Mutationen in *env* und *vif*, welche IFITM-Resistenz und Virusausbreitung begünstigen (Ding et al. 2014; Yu et al. 2015).

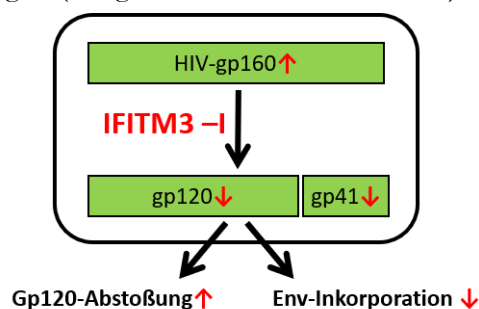


Abbildung 3: Inhibition der HIV-1-Env-Prozessierung durch IFITMs. Das IFITM-Protein 3 interagiert mit HIV-1-Env, hemmt dessen Prozessierung und Inkorporation in Virionen und fördert die Abstoßung von gp120 (SU) in den Extrazellularraum. Damit reduziert es die Infektiosität sowie die Fusionsaktivität von HIV-1. Modifiziert nach Yu et al. (2015).

Zusammenfassend gibt es klare Hinweise für eine Inhibition des Zelleintritts im Stadium der Hemifusion. Der molekulare Mechanismus, möglicherweise durch eine modifizierte Membranfluidität oder -krümmung, ist jedoch noch unklar. Der Einfluss von IFITMs auf die Virusfreisetzung wurde in dieser Arbeit weiter untersucht.

1.7 Zielsetzung

Interferon-induzierte Transmembranproteine sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und inhibieren den Zelleintritt von zahlreichen Viren, wie IAV, EBOV und HIV, aber nicht vom Murinen Leukämievirus (MLV).

Vor kurzem konnte ein antiviraler Effekt von IFITMs auf die Virusfreisetzung von HIV gezeigt werden. So werden IFITMs in HIV-1 Viruspartikel inkorporiert und reduzieren deren Infektiosität. Außerdem inhibieren IFITM-Proteine die Prozessierung von HIV-1-Env durch die Wirtszellprotease Furin und führen zu einer Umkehr des Verhältnisses von gp160 zu gp120 und gp41, sodass gp160 überwiegt. Unbekannt war, ob IFITMs auch in andere Viruspartikel inkorporiert werden und so die virale Infektiosität herabsetzen. Weiterhin stellte sich die Frage, ob IFITM-Proteine auch mit anderen viralen Hüllproteinen interagieren und deren proteolytische Prozessierung blockieren.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es daher zu klären, ob IFITMs auch in andere Viruspartikel inkorporiert werden und einen Einfluss auf deren Freisetzung, Infektiosität sowie Glykoproteinspaltung zeigen. Dies sollte mithilfe von MLV-Partikeln, die Glykoproteine von HIV-1, SIV, MLV, IAV oder EBOV tragen, erreicht werden.

Aufgrund der zum Zeitpunkt der Arbeit in Afrika vorliegenden Ebola-Epidemie, sollte im zweiten Teil des Projektes geklärt werden, ob IFITMs die Replikation und den Eintritt von transkriptions- und replikationskompetenten EBOV-Partikeln inhibieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Arbeit eingesetzten Materialien werden tabellarisch aufgeführt.

2.1.1 Antikörper

Die nachfolgend aufgeführten Antikörper wurden, bis auf die Hybridome, in dreiprozentigem Milchpulver in *phosphate-buffered saline* (phosphatgepufferte Salzlösung, PBS)-Tween (PBST) verdünnt eingesetzt (Tabelle 2, Tabelle 3).

Tabelle 2: Primärantikörper

Name	Eigenschaft, Verdünnung	Quelle
anti- β -Aktin (A5441-)	Maus, monoklonal, 1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-Flag (SAB4200071)	Ratte, monoklonal, 1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
anti-HIV-1-p24 (183-H12-5C)	Maus, monoklonal, Hybridom	NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, von Dr. Bruce Chesebro
anti-HIV-1-IIIB-gp160 (Chessie 13-39.1)	Maus, monoklonal, Hybridom	NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, von Dr. George Lewis
anti-HIV-1-gp41 (Chessie 8)	Maus, monoklonal, Hybridom	NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, von Dr. George Lewis
anti-HIV-2 (S723)	Rhesus, polyklonal, 1:200 Serum	Zur Verfügung gestellt von Christiane Stahl-Hennig
anti-IFITM3	Kaninchen, monoklonal, 1:1000	ProteinTech Group, Chicago, USA
anti-MLV-Gag-p30 (4B2)	Maus, monoklonal, 1:1000	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
anti-myc (9E10)	Maus, monoklonal, Hybridom	(Evan et al. 1985)
anti-SIVmac239/316Env (DA6)	Maus, monoklonal	Zur Verfügung gestellt von Ron Desrosiers
anti-SIVmac p27 (55-2F12)	Maus, monoklonal, Hybridom	NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, von Dr. George Lewis
anti-V5	Maus, monoklonal, 1:2500	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 3: Sekundärantikörper

Name	Eigenschaft, Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 488 anti-human IgG	Ziege, monoklonal, 1:1000	Invitrogen, Carlsbad, USA
Alexa Fluor 647 anti-Maus-IgG (SKU # A-21236)	Ziege, monoklonal, 1:100	Invitrogen, Carlsbad, USA
anti-Kaninchen <i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase, HRP) (111-035-004)	Ziege, monoklonal, 1:10000	Dianova GmbH, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
anti-human-IgG HRP (109-035-005)	Ziege, monoklonal, 1:10000	Dianova GmbH, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
anti-Maus-IgG HRP (115-035-003)	Ziege, monoklonal, 1:1000	Dianova GmbH, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
anti-rhesus HRP	Ziege, HRP, monoklonal, 1:1000	Dianova GmbH, Schwäbisch Gmünd, Deutschland

2.1.2 Biologisches Material

Die verwendeten Bakterien sowie Zelllinien sind in den folgenden Tabellen gelistet (Tabelle 4, Tabelle 5).

Tabelle 4: Bakterien

Bakterien	Genotyp	Transformationsmethode
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F- araD139 Δ (ara, leu)7697 Δ lacX74 galU galK rpsL deoR ϕ 80lac Δ M15 endA1 nupG recA1 mcrA Δ (mrr hsdRMS mcrBC) (Grant et al. 1990; Durfee et al. 2008)	Chemische Kompetenz
<i>Escherichia coli</i> SURE	F0[proAB+ lacIq lacZ Δ M15 Tn10(TetR) endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC: Tn5(KanR uvrC e14-(mcrA-) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171	Chemische Kompetenz

Tabelle 5: Zelllinien

Zelllinien	Ursprung	Charakteristika	Hersteller	Eingesetzte Transfektionsmethode
293T	Humane Niere	Standardzelllinie, exprimiert <i>simian-virus-40</i> (Affenvirus-40)-T-Antigen, immortalisiert durch Adenovirus 5 E1A- und E1B-Proteine	ATCC, Manassas USA	Calcium-Phosphat: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) buffered saline (HEPES-gepufferte Salzlösung, HBS) pH 7.11
Cos7	Affenniere	Exprimiert SV40 T-Antigen, gute Untergrundhaftung	Laborinterne Charge	Calcium-Phosphat: HBS, pH 7.11

2.1.3 Chemikalien

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien gelistet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Reagenzien und Chemikalien

Produkt	Hersteller
> 99,5 % Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Luziferase-Assay-System	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 40-88	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel A (30 % Acrylamidlösung)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel B (2 % Bisacrylamidlösung)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.4 Enzyme

Die in der Tabelle aufgelisteten Enzyme wurden in dieser Arbeit genutzt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Restriktionsverdau und Ligation	
CIP (10 U/ μ L)	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
Eco72 (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EcoRI (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Bezeichnung	Hersteller
Restriktionsverdau und Ligation	
HindIII (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NotI (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sall (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4-DNA-Ligase (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Puffer	
10x Puffer Orange	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10x Puffer Red	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10x Puffer Tango Yellow	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10x T4-DNA-Ligase Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion, PCR)</i>	
Vent® DNA-Polymerase (2 U/ μ LL)	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
10 mM Desoxy-Nukleotidtriphosphat(dNTP)-Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ThermoPol® Reaction Buffer	New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland
Sequenzierreaktion	
5x Sequenzierpuffer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
BigDye	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Primer X76 for (mw 702)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Primer MV seq	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sonstige	
Trypsin: TPCK-Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.5 Geräte

Die zur Durchführung der Experimente eingesetzten Geräte sind nachfolgend aufgeführt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Eingesetzte Geräte

Geräte	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bakterien-Schüttler: Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Durchflusszytometer BD™ LSRII	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Geräte	Hersteller
Heizblock: MBT250	ETG – Entwicklungs- und Technologie Gesellschaft mbH, Ilmenau, Deutschland
Kühlschrank (-20 °C)	Liebherr Group, Bulle, Schweiz
Kühlschrank (4 °C)	Siemens AG, Berlin und München, Deutschland
Kühlzentrifuge: Heraeus Fresco 7	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlzentrifuge: Multizentrifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Laser scanning microscope (LSM 5)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Luminometer, Plate Chameleon	Hidex, Turku, Finnland
Mikroskop ID03	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop Olympus IX70	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland
NanoDrop® ND-100 Spektrophotometer	VWR International, Radnor, USA
Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)/Western-Blot-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
PCR-Cycler: Thermal Cycler, My Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Pipetten	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipetus: Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Sterilbank: Hera Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taumelrollenmischer RM5-30V	CAT, M.Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, Deutschland
UV-Kamera	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
UV-Mikroskop: Axiovert 40CFL (HBO50 UV-Licht)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Vortexer: Reax Control	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	LAUDA-GFL, Burgwedel, Deutschland
Western-Blot-Imager: Chemo-Cam	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Zell-Inkubator: BDD 6220	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge: Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.6 Medien

Im Folgenden sind die Nährmedien für die die Bakterien- und Zellkulturen beschrieben (Tabelle 9, Tabelle 10).

Tabelle 9: Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen

Bezeichnung	Hersteller
Luria-Bertani(LB)-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin (Amp), 100 µg/mL	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 10: Nährmedien für Zellkulturen

Bezeichnung	Zusätze	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	10 % FCS, 1 % PS, 250 mL H ₂ O	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
<i>fetal calf serum (Fätales Kälberserum, FCS), 10 %</i>		Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
PS (Penicillin/Streptomycin, jeweils 1 %)		PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

2.1.7 Oligonukleotide

Nachfolgend sind für die PCRs und die Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide aufgeführt (Tabelle 11). Die Konstruktion der *primer* erfolgte mit der Software Vektor-NTI.

Tabelle 11: Oligonukleotide

Name (Laborinterne Nummer)	Nukleotid-Sequenz (in 5'-3' Richtung)	Hersteller
SIV- <i>env</i> -V5-3Sal (# 2176)	GCGTCGACCTAGGTGCTGTCCAGGCCAGCAGTGGATTG GGGATGGGCTTACGCGTCAAGAGAGTGAGCTCAAGCC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
239 <i>env</i> -5A (# 2299)	GCGGTACCACCATGGGATGTCTTGGGAATCAG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MLV- <i>env</i> -5Acc (# 2801)	GGGGTACCACCATGGCGCGTTCAACGCTCTC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MLV- <i>env</i> -V5-3Sal (# 2797)	GCGTCGACCTAGGTGCTGTCCAGGCCAGCAGTGGATTG GGGATGGGCTTACGCGTTGGCTCGTACTCTATAGGCTTC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
pCAGGS-5'Seq (# 126)	CAGCTCCTGGGCAACGTGCTGG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
pCAGGS-3'Seq (# 127)	CAGAAGTCAGATGCTCAAGGG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.8 Plasmide

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit genutzten Expressionsplasmide gelistet (Tabelle 12).

Tabelle 12: Verwendete Plasmide

Plasmid (laborint. Nr.)	Charakteristika	Resistenz	Vektor	Referenz
pHF GFP (# 20)	Eukaryotes Expressionsplasmid für <i>green fluorescent protein</i> (Grün fluoreszierendes Protein, GFP), Transfektionskontrolle	Amp	pCAGGS	Nicht angegeben
VSV-G (# 32)	Eukaryotes Expressionsplasmid für das GP des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV)	Amp	pcDNA	(Naldini et al. 1996; Simmons et al. 2003)
pCAGGS-MCS (# 58)	Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV- <i>enhancer</i> /β-Aktin-Promotor	Amp	pCAGGS	(Niwa et al. 1991)
EBOV-GP (# 69)	Expressionsplasmid für EBOV-GP	Amp	pcDNA3.1 Zeo (+)	(Marzi et al. 2004)
MLV-<i>env</i> (# 129)	Expressionsplasmid für MLV-Env	Amp		(Simmons et al. 2003)
DC-SIGN-AU1 (# 204)	Expressionsplasmid für DC-Sign (CD209), einem C-Typ-Lektin-Rezeptor auf dendritischen Zellen, der u. a. EBOV bindet	Amp	pcDNA3.1 Zeo(+)	Nicht angegeben
SIV-<i>env</i> (239<i>env</i>) (# 213)	Expressionsplasmid für SIV-Env	Amp	pcDNA (+ Xho)	Nicht angegeben
HIV-<i>gag/pol</i> (# 284)	Expressionsplasmid für HIV-Gag/Pol	Amp	pcDNA3.1(-)	(Gao et al. 2003)
V5-EBOV-GP (# 374)	Expressionsplasmid für EBOV-GP mit V5- <i>tag</i>	Amp	pcDNA6	Nicht angegeben
myc-EBOV-VP40 (# 437)	Expressionsplasmid für das EBOV-Matrixprotein VP40 mit <i>myc-tag</i>	Amp	pCR3.1	Nicht angegeben
HIV-NL4-3-<i>env</i> (# 553)	Expressionsplasmid für HIV-Env	Amp	pCAGGS	Nicht angegeben
V5-IAV-H1N1-1918-HA (# 665)	Expressionsplasmid für 1918-IAV-HA (H1N1) mit C-terminalen V5- <i>tag</i>	Amp	pCAGGS	Nicht angegeben

Plasmid (laborint. Nr.)	Charakteristika	Resistenz	Vektor	Referenz
IAV-WSN/1933-HA (H1N1) (# 845)	Expressionsplasmid für WSN/1933-IAV-HA	Amp	pCAGGS	Zur Verfügung gestellt von Lily Ngai
IAV-WSN/1933-NA (H1N1) (# 846)	Expressionsplasmid für WSN/1933-IAV-NA	Amp	pCAGGS	Zur Verfügung gestellt von Lily Ngai
EBOV-VP24 (# 827)	Expressionsplasmid für das EBOV-Matrixprotein VP24	Amp	pCAGGS	Nicht angegeben (aus Marburg)
SUDV-GP-V5 (# 1062)	Expressionsplasmid für das SUDV-GP mit <i>V5-tag</i>	Amp	pCAGGS	(Kühl et al. 2011)
EBOV-GP-V5 (# 1063)	Expressionsplasmid für das EBOV-GP mit <i>V5-tag</i>	Amp	pCAGGS	(Kühl et al. 2011)
IFITM1 (# 1078)	Expressionsplasmid für humanes IFITM1	Amp	pQCXIP	(Brass et al. 2009)
IFITM3 (#1080)	Expressionsplasmid für humanes IFITM3	Amp	pQCXIP	(Brass et al. 2009)
V5-MARV-GP (# 1107)	Expressionsplasmid für MARV-GP mit <i>V5-tag</i>	Amp	pCAGGS	Nicht angegeben
V5-TAFV-GP (# 1108)	Expressionsplasmid für TAFV-GP mit <i>V5-tag</i>	Amp	pCAGGS	Nicht angegeben
V5-RESTV-GP (# 1109)	Expressionsplasmid für RESTV-GP mit <i>V5-tag</i>	Amp	pCAGGS	Nicht angegeben
pmax GFP (# 1294)	Eukaryotes Expressionsplasmid für GFP, Transfektionskontrolle	Kanamycin	Nicht angegeben	Amara GmbH Köln, Deutschland
IFITM3 (# 1334)	Expressionsplasmid für humanes IFITM3	Amp	pCAGGS-mcs-modifiziert	(Bertram et al. 2013)
AU1-HIV-2-A ROD10-GP (# 1452)	Expressionsplasmid für HIV-2-A ROD10. Der C-terminale <i>AU1-tag</i> funktioniert nicht.	Amp	pCAGGS	Christian Krapp (Kirchhoff Lab, Ulm)
Cat (# 1491)	Expressionsplasmid für Chloramphenicol-Acetyltransferase (Cat)	Amp	pQCXIP	(Eckert et al. 2014)
MLV-luc (# 1506)	Eukaryotes Expressionsplasmid für Luziferase, ein Enzym, welches Luziferin unter Lichtemission prozessiert (HCMV-Promoter)	Amp	Vermutlich pTG13077	Zur Verfügung gestellt von Graham Simmons

Plasmid (laborint. Nr.)	Charakteristika	Resistenz	Vektor	Referenz
MLV-gag/pol (# 1507)	Eukaryotes Expressionsplasmid für Matrix- und Kapsidproteine sowie Polymerase von MLV	Amp	Wahrscheinlich pHIT60 oder pTG5349	Zur Verfügung gestellt von Graham Simmons, wahrscheinlich (Bartosch et al. 2003)
IFITM3-SVKS81-84AAAA (# 1665)	Humanes IFITM3 mit SVKS81-84AAAA Mutation. Antiviral unwirksam gegen EBOV-GP und MARV-GP vermittelten Eintritt. Erleichtert den von LLOV-GP vermittelten Eintritt.	Amp	pCQXIP	(John et al. 2013; Wrensch et al. 2015)
IFITM3-43-48AS (# 1776)	Humanes IFITM3 mit 43-48 AAAAAA Mutante. Antiviral funktionslos.	Amp	PCQXIP	Zur Verfügung gestellt von Brass. (John et al. 2013)
IFITM3-ins111AA (# 2195)	Humanes IFITM3 mit ins111AA Mutation. Antiviral funktionslos.	Amp	pCQXIP	Nicht angegeben
EBOV-trVLP-System (# 2147 – 2154)	Expressionsplasmide für transkriptions- und replikations-kompetente <i>Ebolavirus-like-particles</i> : NP, VP35, VP30, Protein L, tetracistronisches Minigenom, Tim-1	Amp	pCAGGS Minigenom: p4cis	Zur Verfügung gestellt von A. Marzi. (Watt et al. 2014)

2.1.9 Puffer und Lösungen

In der folgenden Tabelle sind die nach laborinternen Rezepten angesetzten Puffer und Lösungen aufgelistet (Tabelle 13), zudem ist die Zusammensetzung der PAGE-Gele beschrieben (Tabelle 14) und die Molekulargewichtsmarker für DNA-Agarose Gele und Sodium dodecyl sulfate(Natriumdodecylsulfat, SDS)-PAGE (Tabelle 15) aufgeführt.

Tabelle 13: Allgemeine Lösungen für die DNA- bzw. Proteinanalyse

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blocklösung (Western-Blot)	5 % (w/v) Milchpulver in 1x PBST
1x Blotting-Puffer (Western-Blot)	100 mL 10x Elektrophorese-Puffer, 200 mL Methanol, 700 mL doppelt destilliertes Wasser (dd-H ₂ O)
2,5 M CaCl₂-Lösung	2,5 M CaCl ₂ sterilfiltriert

Bezeichnung	Zusammensetzung
5 mM EDTA-Lösung	1x PBS, 5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
10x Elektrophorese-Puffer (PAGE)	250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 35 mM SDS
10 mg/mL Ethidiumbromid-Lösung	
<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie, FACS)-Puffer	1x PBS, 5 % FCS, 5 mM EDTA, 0,02 M NaN ₃
2x HBS, pH 7,08 - 7,13	280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 50 mM HEPES, auf pH 7,08 – 7,13 mit NaOH eingestellt, sterilfiltriert
6x Loading Dye (Agarosegelelektrophorese)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lysepuffer (Luziferase-Assay)	2x Lyse-Puffer Stocklösung ansetzen (500 mL): 2 mL 1M DTT 0,6928 g 1,2-Diaminocyclohexantetraessigsäure (CDTA) 10 mL Triton X-100 100 mL Glycerol pH auf 7,8 mit NaOH einstellen, damit die CDTA sich vollständig löst; mit dd-H ₂ O auf 500 mL auffüllen, sterilfiltriert
Mini-Prep-Solution-Buffer P1	50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8,0
Mini-Prep-Solution-Buffer P2	200 mM NaOH, 1 % SDS
Mini-Prep-Solution-Buffer P3	3 M Kaliumacetat pH 4,8
1,5 M Natriumacetat	
4 % PFA	4 % (w/v) PFA in 1x PBS
PBST	1 L 10x PBS, 10 mL Tween 20, auf 10 L mit dd-H ₂ O auffüllen, pH 7,2
Protein A/G PLUS-Agarose Sc-2003	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
1x SDS-Gelelektrophorese-Laufpuffer	1x Elektrophorese-Puffer, 0,1 % SDS
10 % (w/v) SDS-Lösung	
2x SDS-Probenpuffer	1,5 mL 1M TrisHCl pH 6,8 6 mL 80 % Glycerol (> 10 %) 10 mL 10 % SDS (> 2 %) 2,5 mL β-Mercaptoethanol (> 0,1 %) 5 mL 1 % Bromphenolblau 50 µL 1 M EDTA pH 8.0 (> 1 mM) Auf 50 mL mit dd-H ₂ O auffüllen, aliquotieren
Stripping-Puffer (Western-Blot)	31,25 mL 1M Tris-HCl pH 6,8 100 mL 10 % SDS Auf 500 mL mit dd-H ₂ O auffüllen

Bezeichnung	Zusammensetzung
	Vor Nutzung auf 100 mM β -Mercaptoethanol einstellen
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE) (Agarosegelelektrophorese)	2 M Tris, 60 mM EDTA, 5,7 % (v/v) Eisessig, autoklaviert
1x TAE Laufpuffer	1x TAE, 1 μ g/mL Ethidiumbromid
1 M Tris, pH 6,8	
2 M Tris, pH 8,8	
WB-Entwicklung Solution A (Lagerung bei 4 °C)	Für 200 mL: 20 mL 1 M Tris-HCl pH 8,6 180 mL Millipore H ₂ O 50 mg Luminol Natriumsalz
WB-Entwicklung Solution B (Lagerung bei Raumtemperatur (RT))	Für 50 mL: 55 mg Hydroxycomarinsäure 50 mL DMSO
Western-Blot: HRP-Juice Plus Two Bottle Substrate A + B	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland

Tabelle 14: PAGE-Gele

Polyacrylamidgele	Trenngel (10 % AA)	Sammelgel (5 % AA)
30 % Acrylamid	2,5 ml	0,425 ml
2 % Bisacrylamid	0,5 mL	0,0175 mL
10 % SDS	0,075 mL	Ø
2 M Tris-HCl pH 8,8	1,4 mL	Ø
1 M Tris-HCl pH 6,8	Ø	0,3 mL
dd-H₂O	3,15 mL	1,575 mL
Für die Polymerisation		
10 % <i>ammonium persulfate solution</i> (Ammoniumpersulfatlösung, APS)	28,1 μ L	12,5 μ L
TEMED	5,625 μ L	5 μ L

Tabelle 15: Molekulargewichtsmarker für DNA-Agarose Gele und SDS-PAGE

Produkt	Größenbereich	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use	250 - 10.000 Basenpaare	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	10 - 180 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.10 Software

Agarose-Gelelektrophorese-Visualisierung: Intas GDS Application Software (Intas Science Imaging)

DNA-Konzentrationsbestimmung: NanoDrop 3.1.0 Software Konfokale Mikroskopie: LSM 510 Release Version 4.0 SP2 (Zeiss)

FACS: BD-FACS-Diva-Software (BD Biosciences)

Graphikdarstellung: Excel Office 2019, p-Wert mittels ttest, SEM manuell errechnet

Western-Blot-Visualisierung: ChemoStar Aufnahmesoftware (Intas Science Imaging)

Western-Blot-Quantifizierung: Fiji Is Just ImageJ (Schindelin et al. 2012)

2.1.11 Verbrauchsmaterial

Das Einmalmaterial, welches im Zuge dieser Arbeit genutzt wurde, ist in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt (Tabelle 16, Tabelle 17).

Tabelle 16: Kommerzielle Reagenzsysteme

Reagenzsystem	Hersteller
Gel-Extraktion: Nucleo Spin Gel and PCR-clean up kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Midi- und Maxipräparation: Nucleobond plasmid purification kit PC-100 und PC-500	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Luziferase-Kit	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
Western-Blot-Detection Reagent: Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE-Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien

Tabelle 17: Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Cryo-Gefäße	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Einmal-Pipetten 25 mL, 10 mL, 5 mL, 2 mL: Serologische Pipette	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
falcon-Röhrchen: Cellstar-Tubes	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
0,45 µl Filter: Minisart, Syringe Filter	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
6-, 24-, 48-Well-Platten	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
96-Well-Platten: Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nitrozellulose Membran: Amersham Protran 0,2 µm NC	GE-Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Objektträger: Menzel-Gläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR-Gefäße: Multiply-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland

Name	Hersteller
Pipetten-Spitzen	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Plastik Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL): SafeSeal-Gefäß	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
T175-, T25-Flaschen	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Weißer 96-Loch-Platten	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Whatman Papier	GE-Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien

2.2 Methoden

Der folgende Abschnitt behandelt die in dieser Arbeit eingesetzten Methoden. Zuerst erfolgt die Beschreibung der Klonierungen, im Anschluss Zellkulturtechniken und zuletzt die Methoden zur Untersuchung des Wirkmechanismus von IFITMs in Zellen.

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Um den Einfluss von IFITM-Proteinen auf die Prozessierung viraler Glykoproteine untersuchen zu können, war es nötig diese zunächst mit leicht detektierbaren Epitoptags zu versehen. Dies ermöglichte eine spezifische Detektion der Spaltprodukte der viralen Glykoproteine mittels eines monoklonalen Antikörpers im Western-Blot (Uhlén et al. 1983; Uhlén 2008). Die dazu erforderlichen rekombinanten DNA-Techniken werden in dem nachfolgend beschrieben. Bei dieser Methode erfolgt eine Manipulation des Zielgens, nachfolgend eine Integration in einen Expressionsvektor und anschließend eine Selektion auf das gewünschte Merkmal hin. Schlussendlich wird der Vektor mit dem integrierten Zielgen in Bakterien amplifiziert (Corley 2005).

2.2.1.1 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde mithilfe eines Aufreinigungssystem der Firma Macherey-Nagel (Midi-Präparation) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Dabei folgt auf eine modifizierte alkalische Lyse eine Anionenaustauschchromatografie. In dieser bindet die Plasmid-DNA bei niedriger Salzkonzentration und geringem pH-Wert an die positiv geladene Säule. Anschließend wird die Säule mit einem Puffer mittlerer Konzentration gewaschen, bei der die Plasmid-DNA gebunden bleibt, aber Verunreinigungen, wie chromosomale DNA und Proteine entfernt werden. Die DNA wurde mithilfe von Isopropanol ausgefällt sowie mit Ethanol (70 %) entsalzt. Die Konzentrationsbestimmung wurde mittels Nano-Drop durchgeführt.

2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion

Die *polymerase chain reaction* (Polymerasekettenreaktion, PCR) dient der thermisch zyklischen Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz (Saiki et al. 1986; Saiki et al. 1988). In diesem

Projekt erfolgte eine Variation der PCR. Die verwendeten Oligonukleotid-*primer* wiesen zur *template*-DNA komplementäre Basensequenzen und angehängte, nicht komplementäre Bereiche, mit einem V5-*tag* und Restriktionsenzymststellen, auf. Die angehängten Sequenzen wurden mitamplifiziert, sodass die Ursprungs-DNA verlängert wurde (Higuchi et al. 1988).

Das SIV-*env*-Gen wurde mit den Oligonukleotiden 239*env*-5A und SIV-*env*-V5-3Sal über eine *Touchdown*-PCR vervielfältigt. Das MLV-*env*-Gen wurde über *Overlap*-Extensions-PCR mit dem Vorwärtsprimer MLV-*env*-5Acc und dem Rückwärtsprimer MLV-*env*-V5-3Sal amplifiziert. Die PCR-Amplifikate wurden mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Nachfolgend sind der verwendete PCR-Ansatz und die Thermocycler-Bedingungen aufgeführt (Tabelle 18, Tabelle 19, Tabelle 20).

Tabelle 18: Phusion HF DNA-PCR

PCR-Reaktionsansatz	Volumen
5x Phusion HF Buffer	10 µL
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP - 10 mM)	2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL
Betain (5 M)	10 µL
Forward Primer (10 µM)	1 µL
Reverse Primer (10 µM)	1 µL
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/µL)	0,5 µL
Template (100 ng)	1 µL
dd-H ₂ O	22,5 µL
Endvolumen	50 µL

Tabelle 19: Thermocycler-Bedingungen zur Amplifikation von SIV-*env*-V5

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	68 °C	30 sec, -0,5 °C/Cycle
Elongation	72 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	58 °C	30 sec
Elongation	72 °C	3 min
Finale Elongation	72 °C	10 min
Hold	12 °C	∞

Tabelle 20: Thermocycler-Bedingungen zur Amplifikation von MLV-*env*-V5

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing	55 °C	30 sec
Elongation	72 °C	3 min
Finale Elongation	72 °C	10 min
Hold	12 °C	∞

} 34x

2.2.1.3 Restriktionsspaltung

Restriktionsenzyme sind bakterielle Nukleasen, die doppelsträngige DNA an spezifischen, oft palindromischen Erkennungssequenzen, schneiden (Alberts et al. 2008). In diesem Projekt wurden PCR-Produkte und Vektoren mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten und ligiert. Die Restriktionsspaltung wurde den Herstellerangaben entsprechend bei 37 °C für mindestens 2 h durchgeführt. Gespaltene Vektoren wurden an den 5'-OH-Enden dephosphoryliert (10 U CIP, 1 h, 37 °C), um eine Rückligation zu verhindern. Der benutzte Reaktionsansatz und die verwendeten Restriktionsenzyme sind nachfolgend aufgeführt (Tabelle 21, Tabelle 22).

Tabelle 21: Reaktionsansatz für Restriktionsspaltungen

Restriktionsspaltung	Menge
PCR-Produkt oder Plasmid-DNA	5 µL (entspricht 1 - 5 µg)
Restriktionsenzym 1 (10 U/µL)	1 µL
Restriktionsenzym 2 (10 U/µL)	1 µL
Passender 10x Puffer	2 µL
dd-H ₂ O	bis auf 20 µL hinzufügen

Tabelle 22: Eingesetzte Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Enden
Acc65I	G/GTACC	<i>sticky-ends</i>
SaII	G/TCGAC	<i>sticky-ends</i>

2.2.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Mittels Agarose-Gelelektrophorese werden lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente in einem Spannungsfeld nach ihrer Größe aufgetrennt (Corley 2005). Hier diente sie der Analyse von PCR-Amplifikaten und Klonierungsprodukten.

Ein Ladepuffer (6x Loading Dye, 1x Endkonzentration) erhöhte die Dichte der Proben. Im Lauffpuffer enthaltenes, zwischen den Basen interkalierendes Ethidiumbromid konnte durch UV-Licht im Gel iX Imager (Intas) angeregt werden, sodass DNA-Fragmente auf dem Gel zu sehen sind. Als Größenstandard wurde der DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Mithilfe Agarose-Gelelektrophorese (1 % Agarose, 45 min bei 120 V) aufgetrennte PCR-Amplifikate und Klonierungsprodukte wurden mit dem NucleoSpin®-Gel and PCR-Clean up Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.1.5 Ligation

Die durch Restriktionsspaltung generierten Fragmente (Vektor und Insert) wurden von der T4-DNA-Ligase kovalent verbunden (Fareed und Richardson 1967). Die Konzentrationen von Vektor und Insert wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese anhand der Bandenintensitäten verglichen, um ein Verhältnis von eins (Vektor) zu drei (Insert) in der Ligation einzusetzen. Die Ligation wurde den Herstellerangaben nach dem nachfolgend aufgeführten Reaktionsansatz durchgeführt (Tabelle 23) (16 °C, mind. 4 h). Als Negativkontrolle diente ein Rückligationsansatz ohne Insert.

Tabelle 23: Restriktionsansatz für Ligationen

Ligation	Menge
Verhältnis von Vektor zu Insert	1 : 3
T4-DNA-Ligase (5 U/μL)	1 μL
10x T4-Ligase-Puffer	1 μL
dd-H ₂ O	bis auf 10 μL hinzufügen

2.2.1.6 Generierung chemisch-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien wurden 250 mL Luria-Bertani(LB)-Medium mit 7 mL einer *Escherichia coli*(E. coli)-Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterienkultur wurde unter Schütteln inkubiert (37 °C, 1 – 1,5 h, 250 *revolutions per minute* (Umdrehungen pro Minute, rpm)) und anschließend zentrifugiert (10 min, 5000 rpm). Die Sedimente von je zwei Bechern wurden in 10 mL 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert. Die Bakterien wurden für 5 min bei 4000 rpm erneut zentrifugiert und das Sediment in 6 mL 50 mM CaCl₂-Lösung mit 15 % Glycerol gelöst. 50 mL-Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.1.7 Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien

Die Transformation erfolgte unter modifizierten Bedingungen nach Hanahan (1983). Chemisch-kompetente E. coli DH10B (MLV-*env*) und SURE (SIV-*env*) (50 μL) wurden mit 5 μL Ligationsansatz gemischt. Der Ansatz wurde für 20 min auf Eis gekühlt, 2 min bei 42 °C inkubiert, 1 min auf Eis abgekühlt und mit 1 mL LB-Medium inkubiert (30 min, 37 °C,

600 rpm). Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min bei 4000 rpm) und auf LB-Ampicillin(Amp)-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Von den Platten wurden einzelne Bakterienklone in 5 mL LB-Amp-Medium-Kulturen erneut über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) vermehrt. Durch Plasmidpräparation im Mini-Maßstab, Überprüfung der Klone auf die richtige Sequenz in einer Kolonie-PCR und anschließender Restriktionsspaltung mit Acc65I und SalI sowie Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der richtigen Fragmentgrößen von Vektor und Insert, wurde der Erfolg der Klonierung geprüft.

2.2.1.8 Mini-Präparation

Mini-Präparationen werden zur raschen Aufreinigung von DNA genutzt (Zagursky et al. 1985), sie resultieren in einer geringen DNA-Menge -Qualität. Die oben beschriebenen 5 mL LB-Amp-Medium-Kulturen wurden mithilfe von Zentrifugation sedimentiert und das Sediment in „Solution“-Puffer (300 µl) aufgenommen. Die bakteriellen Membranen wurden durch Zugabe eines Lyse-Puffers alkalisch aufgeschlossen. Nach 5 min wurde diese Reaktion durch Zugabe eines Neutralisierungs-Puffers beendet. Anschließend erfolgte durch Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm) die Abtrennung von größeren Zellbestandteilen (Protein, DNA). Durch die Zugabe von Isopropanol (450 µl) erfolgte die Ausfällung von im Zellüberstand befindlicher DNA sowie eine Pelletierung durch Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm). Die Proben wurden nach einem Waschschrift (70 % Ethanol) getrocknet (56 °C) und anschließend in 30 µl doppelt destillierten Wasser (dd-H₂O) für Sequenzierungen und Restriktionsspaltung gelöst.

2.2.1.9 Kolonie-PCR

Kolonie-PCRs wurden zur schnellen Analyse von Klonen auf Präsenz einer spezifischen Sequenz durchgeführt. Die Methode gleicht einer Standard-PCR, bei der jedoch anstelle von gereinigter DNA als *template* eine Bakterienkultur verwendet wird (Hofmann und Brian 1993). Der Reaktionsansatz ist nachfolgend tabellarisch beschrieben (Tabelle 24).

Tabelle 24: Reaktionsansatz für Kolonie-PCRs

Kolonie-PCR	Menge
Oligonukleotid 3' (50 pmol)	1 µL
Oligonukleotid 5' (50 pmol)	1 µL
<i>template</i>	Eine Kolonie oder DNA, 1 µL
PCR-Puffer (10x)	5 µL
DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µL
dNTP-Mix (100 mM)	0,5 µL
DMSO (100 %)	1 µL
dd-H ₂ O	40 µL

Das PCR-Produkt wurde in einer Agarosegelelektrophorese (90 V, 50 min) aufgetrennt. Schließlich wurde unter UV-Licht geprüft, ob das Amplifikat die erwartete Größe zeigt.

2.2.1.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde von der Abteilung Primatengenetik basierend auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte anschließend mit den Programmen Vektor NTI und ContigExpress (Invitrogen). In der folgenden Tabelle sind die Probenmengen für die Sequenzierungen angegeben (Tabelle 25).

Tabelle 25: Proben für Sequenzierungen

Sequenzierprobe	Menge
DNA-Template	1 µL
Sequenzierprimer	1 µL
dd-H ₂ O	3 µL

2.2.2 Zellkulturtechniken

2.2.2.1 Kultur von HEK293T- und Cos7-Zellen

Die Kultur von HEK293T- und Cos7-Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)-Zellkulturmedium, dem zusätzlich 10 % *fetal calf serum* (Fätales Kälberserum, FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. In der Tabelle sind verwendete Mengen und Formate verzeichnet (Tabelle 26). Für die Kultur stabil transduzierter 293T-Zellen wurden zusätzlich 0,5 µg/mL Puromycin hinzugefügt. Die stabil die Gene IFITM3 beziehungsweise Chloramphenicol-Acetyltransferase (Cat) exprimierenden Zellen waren durch Transduktion mit Hilfe von MLV-basierten retroviralen Vektoren (S. 36) generiert worden (Wrensch et al. 2014).

Tabelle 26: Zellkulturformate. „Well“ (Englisch für Wanne) bezeichnet die Anzahl der Probenbehältnisse einer Kulturplatte.

Kulturformate	Volumen/ Well	Zellzahl/ Well
96- Well	50 µL	14.000
24- Well	0,5 mL	120.000
12- Well	1 mL	250.000
6- Well	2 mL	700.000
T25-Flasche	5 mL	1.500.000

Alle drei bis vier Tage, wenn die Zellen ungefähr 80 % Konfluenz erreicht haben, erfolgte eine Passagierung. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mittels Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) vom Boden der T75-

Zellkulturflasche abgelöst. Das Trypsin wurde anschließend durch DMEM mit FCS inaktiviert und die erhaltene Zellsuspension, abhängig von der Zellzahl, mit neuem Medium 1:3 bis 1:10 verdünnt und erneut ausgesät

2.2.2.2 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden zur Langzeitaufbewahrung in 90 % FCS + 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80 °C gelagert. Für die Kultivierung wurden sie 5-10 min bei Raumtemperatur aufgetaut und in ein 15 mL-*falcon*-Röhrchen überführt. Dieses wurde mit 5 mL DMEM aufgefüllt, zentrifugiert (1.500 rpm, 5 min) und das Zellsediment in 10 mL DMEM gelöst. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen bei 37 °C inkubiert und 6 h nach dem Auftauen das Medium gewechselt.

2.2.2.3 Calcium-Phosphat-Transfektion

Bei der Calcium-Phosphat-Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryote Zellen eingeschleust, um von der Fremd-DNA kodierte Gene zu exprimieren (transiente Transfektion). Die DNA wird hierbei mit Calciumchlorid und Phosphatpuffer (2x HBS, pH 7,13) gemischt. Das entstehende Co-Präzipitat wird anschließend auf Zellen gegeben und von diesen aufgenommen (Lottspeich und Engels 2009). Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen ausgesät. Zur Transfektion wurde ein Ansatz, der ein Zehntel des zu transfizierenden Zellvolumens einnimmt, eingesetzt. Dieser bestand aus den unten tabellarisch aufgeführten Komponenten (Tabelle 27). Der Phosphatpuffer (2x HBS) wurde unter raschem Mischen hinzugefügt, 5 min inkubiert und die Suspension tropfenweise auf die Zellen verteilt. Nach 6 bis 8 h Inkubation bei 37 °C wurde das Medium gewechselt. Die Ernte erfolgte je nach Experiment 48 bis 72 h nach der Transfektion. Als Transfektionskontrolle wurde ein für *green fluorescent protein* (Grün fluoreszierendes Protein, GFP) kodierendes Plasmid verwendet.

Tabelle 27: Calcium-Phosphat-Transfektion

Transfektion	Menge
Plasmid-DNA	Gewünschte Menge
dd-H ₂ O	Auf 45 % des Gesamtvolumens auffüllen
2,5 M CaCl ₂	5 % des Gesamtvolumens
2x HBS (pH 7,11)	50 % des Gesamtvolumens

2.2.3 Generierung von Viruspartikeln

2.2.3.1 MLV-Partikel mit Luziferase-Reportergen

Mit einem Großteil der untersuchten Viren kann nur in einem Labor der Risikogruppe 3 oder 4 gearbeitet werden. Deshalb wurde der Einfluss von IFITMs auf die Freisetzung und Infektiosität von Viren mittels retroviraler Partikel, in deren Membran das Glykoprotein des

zu untersuchenden Virus inkorporiert ist, sogenannten Pseudoviren, analysiert. Das verwendete retrovirale System basiert auf dem murinen Leukämievirus (MLV). Die Transfektion von Zellen mit den Expressionsplasmiden für die Synthese von MLV-Gag und einem fremden Glykoprotein führt zur Bildung und Abschnürung von Virus-ähnlichen Partikeln mit heterologem Glykoprotein in der Membran. Die in MLV-Partikeln enthaltenen Genome werden mit einem *Firefly*-Luziferase-Gen ausgestattet. Bei der Infektion von Zielzellen mit den Viruspartikeln, kann die Quantifizierung des Zelleintritts durch die Messung der Luziferaseaktivität erfolgen. Die *Firefly*-Luziferase katalysiert die Reaktion von Luziferin in Oxyluziferin, welches bei Zerfall Licht der Wellenlänge 562 nm emittiert. Die Lichtemission korreliert mit der Anzahl fusionierter MLV-Partikel (Lottspeich und Engels 2009).

Zur Generierung von MLV-Partikeln wurden 293T-Zellen in T25-Flaschen ausgesät und nach 24 h mit 3 µg des MLV-*gag*-Plasmids, 3 µg des Expressionsplasmids für das zu untersuchende Glykoprotein und 6 µg des MLV-Vektor-Plasmids mit Luziferase-Reporter gen transfiziert (Tabelle 28). Alternativ wurden stabil die Gene IFITM3 oder Cat exprimierende 293T-Zellen verwendet. Zur Analyse des Einflusses von kotransfiziertem IFITM3 wurden zusätzlich 1 µg IFITM3 oder als Kontrolle ein Leervektor transfiziert. Nach 6 h wurde das Medium gewechselt und nach 72 h der Kulturüberstand und das Zelllysate geerntet. Der Überstand wurde durch einen Sterilfilter filtriert (Porengröße 0,45 µm) und anschließend bei -80 °C gelagert. Proben für den Western-Blot wurden wie oben beschrieben vorbereitet und mit Antikörpern gegen MLV-Gag, IFITM3 und β-Aktin untersucht.

Tabelle 28: Transfektion mit Plasmiden für Pseudoviren

Plasmid	Menge
MLV- <i>gag</i>	3 µg
Glykoprotein	3 µg
<i>Firefly</i> -Luziferase-Gen	6 µg
eventuell IFITM3 oder pCAGGS	1 µg

2.2.3.1.1 Infektion und Luziferaseaktivität

Für die Infektion wurden 293T-Zellen zunächst in 6-*Well*-Platten ausgesät. Nach 15 h wurden je 4 µg der Expressionsplasmide für HIV-1-Rezeptoren (CD4 sowie CXCR4) beziehungsweise je 4 µg der Expressionsplasmide für SIV-Rezeptoren (rhesus CD4 sowie CCR5) transfiziert. Etwa 6 h später folgte ein Mediumswechsel und 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in Medium (2 mL) resuspendiert und 50 µL je Zellsuspension in 96-*Well*-Platten ausgesät.

Nach weiteren 24 h wurden die Zielzellen in Triplikaten mit je 50 µL der MLV-Partikel infiziert. Etwa 6 h später wurden 100 µL Medium hinzugefügt und nach 72 h die Zelllysate geerntet. Dazu wurden die Zellen in 50 µL Lysepuffer inkubiert (10 min, RT) und in eine

weiße Luminometer-Platte überführt. Die Messung der *Firefly*-Luziferaseaktivität im Luminometer (HIDEX Plate Chameleon) erfolgte mit Luziferase-Substratlösung (Beetle Juice) nach Herstellerangaben.

2.2.3.1.2 Trypsin vermittelte Aktivierung von MLV-Env

Es wurde untersucht, ob Trypsin die Infektiosität von MLV-Partikeln, die MLV-Env tragen, erhöht. Dazu wurden zwei verschiedene Protokolle verfolgt (Sjöberg et al. 2014; Hoffmann et al. 2016).

Die MLV-Partikel mit MLV-Env wurden wie oben beschrieben produziert. Für beide Protokolle wurden 293T-Zellen 24 h vor der Trypsin Behandlung auf 96-*Well*-Platten ausgesät.

Zu den MLV-Partikeln wurde bovines Trypsin (Endkonzentration: 50 µg/mL) oder als Kontrolle 1x PBS hinzugefügt. Nach 15 min (RT) wurde Trypsin durch die Zugabe eines Trypsin-Inhibitors (Endkonzentration: 50 µg/mL) inaktiviert beziehungsweise zur Kontrolle dasselbe Volumen an 1x PBS hinzupipettiert.

Von den 293T-Zellen wurde das Medium entfernt und 52 µL der Mixtur aus MLV-Partikeln und Trypsin sowie Inhibitor beziehungsweise 1x PBS in Triplikaten hinzugefügt. Nach 6 h wurden 150 µL Medium ergänzt und 72 h nach der Infektion folgte die Luziferase-Messung (Hoffmann et al. 2016).

Nach einem zweiten Protokoll wurde zu den MLV-Partikeln 2 µg/mL bovines Trypsin oder 1x PBS hinzupipettiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Reaktion mit 0,5 mg/mL Trypsin-Inhibitor oder 1x PBS gestoppt. Die Mixtur wurde erneut 30 min auf Eis inkubiert, bevor die 293T-Zellen im 96-*Well* mit 50 µL in Triplikaten infiziert wurden. Etwa 6 h später wurden 100 µL Medium hinzugefügt und nach 72 h die Luziferaseaktivität bestimmt (Sjöberg et al. 2014).

2.2.3.2 Transduktionsviren

Zur stabilen Expression von IFITM- und anderen Genen, wurden Zellen mit MLV-Partikeln, die das Hüllprotein des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) und das gewünschte Reporter gen tragen, sogenannten Transduktionsviren, transduziert. VSV-G bindet an den ubiquitär vorkommenden *Low Density Lipoprotein*-Rezeptor und wird somit von vielen Zellen aufgenommen.

Zur Produktion der Transduktionsviren wurden 293T-Zellen in T25-Flaschen ausgesät und nach 24 h mit den Expressionsplasmiden zur Produktion von MLV-Gag, VSV-G und dem gewünschten Fremdprotein (IFITM3, IFITM3-Mutanten, Cat oder GFP) transfiziert (Tabelle 29). Etwa 6 h später erfolgte ein Wechsel des Mediums und nach 72 h wurde der Kulturüberstand geerntet. Der Überstand wurde durch einen Sterilfilter filtriert (Porengröße 0,45 µm) und bei -80 °C gelagert.

Für die Transduktion wurden 293T-Zellen auf 96-*Well*-Platten ausgesät. Nach 15 h wurden 50 μ L der Transduktionsviren hinzugefügt und über Spinoculation (4.000 x g, 30 min, RT) in die Zelle gebracht.

Tabelle 29: Transfektion mit Plasmiden für Transduktionsviren

Plasmid	Menge
MLV- <i>gag</i>	3 μ g
VSV-G	3 μ g
Vektor mit zu transduzierendem Gen	6 μ g

2.2.3.2.1 Transduktionsassay mit retroviralen Pseudoviren

Zur Analyse des Einflusses von stabil exprimierten IFITM-Genen auf den Eintritt von MLV-Partikeln wurden 293T-Zellen mit Transduktionsviren, die verschiedene Gene trugen, transduziert. Nach der stabilen Integration der Gene in das Zellgenom, wurden die Zellen mit MLV-Partikeln (Pseudoviren), die das Hüllprotein von EBOV, MLV oder anderen Viren sowie ein *Firefly*-Luziferase-Reportergen tragen, infiziert.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben im 96-*Well*-Format transduziert. Nach 48 h wurde das Medium entfernt und 50 μ L frisches Medium sowie 50 μ L der MLV-Partikel in Triplikaten hinzugefügt. Etwa 6 h später wurden 100 μ L Medium ergänzt und 72 h nach der Infektion die Luziferaseaktivität der Zellysate wie oben beschrieben gemessen.

2.2.3.3 Virus-like-particles

Virus-like-particles (Virus-ähnliche Partikel, VLP) sind Viruspartikel ohne Nukleinsäuren und damit ohne Vermehrungspotenzial in Zielzellen. Sie wurden genutzt, um den Einfluss von IFITM3 auf die Freisetzung von realitätsnäheren Viruspartikeln als die MLV-Retroviren zu untersuchen. Das VLP-System wurde für HIV, SIV und EBOV verwendet.

Dazu wurden stabil Cat oder IFITM3 synthetisierende 293T-Zellen auf 6-*Well*-Platten ausgesät. Nach 15 h erfolgte die Transfektion der Zellen mit den Plasmiden für HIV-Gag und HIV-Env zur Produktion von HIV-VLPs, mit den Plasmiden für SIV-Gag und SIV-Env zur Synthese von SIV-VLPs und mit VP40-myc und EBOV-GP zur Produktion von EBOV-VLPs (Tabelle 30). Als Kontrollen wurden statt Expressionsplasmiden für das Strukturprotein bzw. das Hüllprotein ein Leervektor transfiziert. Nach 6 h wurde das Medium gewechselt und 48 h nach Transfektion die Kulturüberstände sowie Zellysate für den Western-Blot wie oben beschrieben geerntet. Die Kulturüberstände und Zellysate wurden im Western-Blot mit einem anti-p24-Gag, anti-p27-Gag und anti-myc-Hybridomüberstand gegen das HIV-, SIV und EBOV-Strukturprotein sowie Antikörpern gegen IFITM3 und β -Aktin untersucht.

Tabelle 30: Transfektion mit Plasmiden für VLPs

VLPs	Plasmide	Menge
HIV-VLPs	HIV- <i>gag</i>	3 µg
	HIV- <i>env</i>	1,5 µg
SIV-VLPs	SIV- <i>gag</i>	3 µg
	SIV- <i>env</i>	1,5 µg
EBOV-VLPs	VP40- <i>myc</i>	3 µg
	EBOV-GP	1,5 µg

2.2.3.4 GP-Prozessierung

Die Untersuchung des Einflusses von IFITM-Proteinen auf die Prozessierung viraler Glykoproteine erfolgte durch Western-Blot und anschließender Detektion der Spaltfragmente mittels spezifischer Antikörper. Dazu wurden Wildtyp-293T-Zellen sowie stabil die Gene Cat oder IFITM3 exprimierende 293T-Zellen in 24-*Well*-Platten ausgesät und nach 15 h mit 1 µg des zu analysierenden Hüllproteins transfiziert. Die Wildtyp-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die Glykoproteine von HIV-1, HIV-2, SIV, EBOV, SUDV, MLV und IAV-1918 (+ 0,5 µg TMPRSS2), die stabil Cat beziehungsweise IFITM synthetisierenden Zellen mit den Expressionsplasmiden für die Glykoproteine von EBOV, SUDV, RESTV, TAFV, LLOV, MARV, HIV-1, HIV-2, SIV sowie MLV transfiziert. Die Wildtyp-Zellen wurden zusätzlich mit 1,5 µg an Leervektor (pCAGGS) beziehungsweise Expressionsplasmid, IFITM1, 2 oder 3 transfiziert. Nach 6-8 h wurde das Medium gewechselt und 48 h nach der Transfektion die Zellen in 100 µL 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 15 min bei 95 °C inkubiert. Die Zelllysate wurden im Western-Blot mit Antikörper gegen die jeweiligen Hüllproteine untersucht. Die *Filoviridae*, MLV, IAV und SIV wiesen einen V5-*tag* auf und konnten mit einem anti-V5-Antikörper nachgewiesen werden. Für HIV-1 wurde ein anti-gp41 und anti-gp120-Hybridomüberstand, für HIV-2 ein anti-HIV-2-Serum und für SIV ein anti-SIVmac239-Antikörper genutzt. Außerdem erfolgte die Detektion von β-Aktin und IFITM3.

2.2.3.5 EBOV-trVLP-System

Mithilfe eines Systems für transkriptions- und replikations-kompetente *Ebolavirus-like-particles* (trVLP-System) sollte überprüft werden, ob IFITM3 einen Einfluss auf die Replikation und den Eintritt von EBOV hat. Das trVLP-System ermöglicht die Untersuchung des EBOV-Lebenszyklus unter Konditionen der biologischen Schutzstufe 2 (Watt et al. 2014). Dabei werden Zellen mit einem EBOV-Minigenom und den Expressionsplasmiden für alle weiteren EBOV-Proteine transfiziert (Abbildung 4).

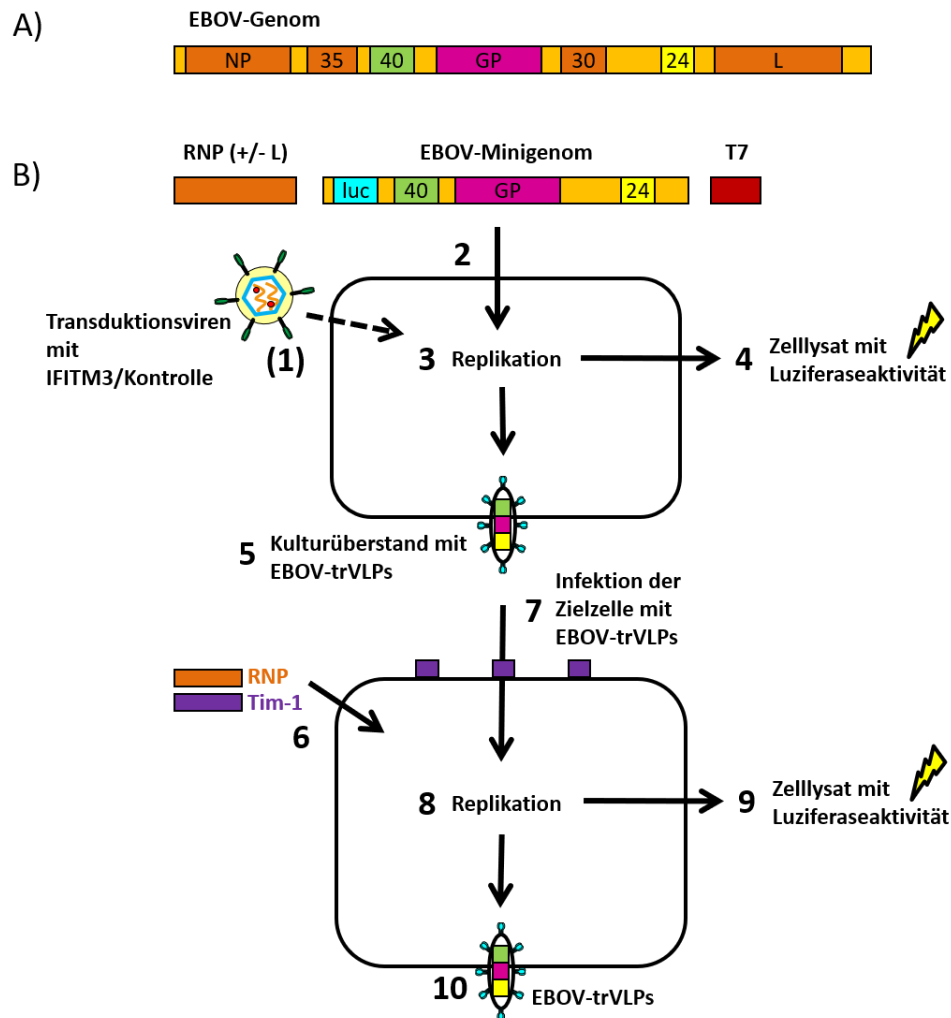


Abbildung 4: Struktur des EBOV-Genoms und Minigenoms und Lebenszyklus. A) Die im EBOV-Genom Protein-kodierende Bereiche sind orange (NP, VP35, VP30 und L), grün (VP40), pink (GP1,2) sowie gelb (VP24) dargestellt. B) Das tetracistronische Minigenom besteht aus nicht-kodierenden Bereichen, einem Luciferase-Gen (blau) und den drei EBOV-Genen VP40, GP und VP24. 2) Zellen werden mit den Expressionsplasmiden zur Produktion von EBOV-trVLPs (RNP-Komplex mit oder ohne das Protein L, EBOV-Minigenom, T7-Polymerase) transfiziert. Zur Analyse des Effekts von IFITMs auf deren Lebenszyklus können die Zellen zuvor 1) mit Transduktionsviren, die die Gene IFITM3 oder eine Kontrolle exprimieren, transduziert werden. 3) Nach Replikation werden 4) die Luciferaseaktivität in den Zellysaten gemessen und 5) die Zellüberstände mit den synthetisierten trVLPs geerntet. 6) Zielzellen werden mit den Expressionsplasmiden für den RNP-Komplex und den Rezeptor Tim-1 transfiziert und 7) mit den zuvor produzierten EBOV-trVLPs infiziert. 8) Nach Replikation kann 9) die Luciferaseaktivität im Zellysate gemessen werden und 10) der Kulturüberstand mit den EBOV-trVLPs geerntet werden. Modifiziert nach Watt et al. (2014).

Das tetracistronische Minigenom kodiert für eine Renilla-Luziferase und drei Gene, welche für die Morphogenese, die Abschnürung und den Eintritt von EBOV wichtig sind (VP40, VP24 und EBOV-GP1,2). Transfizierte Produzentenzellen bilden und schnüren EBOV-Partikel ab, die das Minigenom enthalten. Diese können Zielzellen infizieren, die den Rezeptor Tim-1 sowie EBOV-Proteine zur Replikation und Transkription des Minigenoms synthetisieren (L, VP35, VP30 und NP). Die von den Zielzellen hergestellten trVLPs können wiederum zur Infektion eingesetzt werden. Die Renilla-Luziferaseaktivität kann sowohl in

den Produzentenzellen zur Quantifizierung der Replikation von EBOV-Partikeln, als auch in Zielzellen zur Messung des Infektionserfolges bestimmt werden.

Zur Generierung von EBOV-trVLPs wurden 293T-Zellen auf 6-*Well*-Platten ausgesät. Nach 15 h wurden diese mit den Expressionsplasmiden für den vRNP-Komplex (NP, VP35, VP30, L), das tetracistronische Minigenom und die T7-Polymerase transfiziert (trVLP-System) (Tabelle 31). Als Negativkontrolle wurde das trVLP-System ohne L verwendet, hierbei sollten keine EBOV-Partikel produziert werden und die Luziferaseaktivität der Zellysate gering sein. Nach 6 h wurde das Medium gewechselt und 72 h nach der Transfektion die Kulturüberstände und Zellysate geerntet.

Tabelle 31: Produzentenzellen - Transfektion mit Plasmiden für EBOV-trVLPs

Plasmid	Menge
Nukleoprotein (NP)	125 ng
VP35	125 ng
VP30	75 ng
Protein L bzw. als Negativkontrolle pCAGGS	1 µg
Tetracistronisches Minigenom	250 ng
T7-Polymerase	250 ng
eventuell IFITM3 oder Kontrollen	1 µg

Die Kulturüberstände wurden zentrifugiert (4.000 rpm, 5min, RT) und 1,6 mL zur Infektion von prätransfizierten Zielzellen verwendet werden (s. unten). Von den Produzentenzellen wurde die Renilla-Luziferaseaktivität gemessen. Dazu wurden die Zellen in 300 µL Lysepuffer/*Well* inkubiert (10 min, Schüttler, RT) und 50 µL in Triplikaten auf eine weiße Luminometer-Platte überführt. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgte im Luminometer (HIDEX Plate Chameleon) mit dem Substrat Coelenterazin (1 mM, 500 x), welches 1:500 in PBS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) verdünnt wurde. Die Renilla-Luziferase katalysiert die Reaktion von Coelenterazin und Sauerstoff zu Coelenteramid. Es wird Licht der Wellenlänge 480 nm emittiert, wobei die Intensität proportional zur Menge an exprimierten Luziferase-Gen in den Zellen ist. Die Vorbereitung der Zielzellen erfolgte parallel zur Produktion der trVLPs. Es wurden 293T-Zellen in 6-*Well*-Platten ausgesät und nach 15 h mit den vRNP-Proteinen (NP, VP35, VP30, L) und dem Rezeptor Tim-1 transfiziert (Tabelle 32).

Etwa 6 h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und nach 48 h die Zielzellen gesplittet. Dazu wurden diese in 2 mL Medium resuspendiert und je 0,9 mL in ein neues 6-*Well* überführt. Etwa 72 h nach der Transfektion erfolgte die Infektion der Zielzellen mit den EBOV-trVLPs. Das Medium wurde entfernt und 1,6 mL der Kulturüberstände mit den trVLPs hinzugefügt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und 72 h nach der Infektion

die Luziferaseaktivität der Zellysate wie oben beschrieben gemessen. Die Kulturüberstände wurden verworfen und nicht für weitere Infektionen eingesetzt.

Tabelle 32: Zielzellen - Transfektion mit Plasmiden für EBOV-trVLPs

Plasmid	Menge
Nukleoprotein	125 ng
VP35	125 ng
VP30	75 ng
Protein L	1 µg
Tim-1	250 ng

2.2.3.6 Einfluss von transduziertem IFITM3 auf die Replikation von EBOV-trVLPs

Zur Analyse des Einflusses von IFITM3 auf die Replikation von EBOV-trVLPs wurden 293T-Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 15 h mit Transduktionsviren, die die Reportergene GFP, Cat, IFITM3 oder die IFITM3-Mutanten SVKS, 43-48AS und ins111AA tragen, transduziert (Abbildung 5). Dazu wurde das Medium entfernt und 0,5 mL der Transduktionsviren sowie 0,5 mL Medium zu den Zellen hinzugefügt. Nach 6 h wurde 1 mL Medium hinzugefügt und die Zellen mit dem EBOV-trVLP-System transfiziert. Etwa 15 h später wurde das Medium ausgetauscht. Die nächsten Schritte folgten wie oben beschrieben. Die Zielzellen wurden parallel vorbereitet.

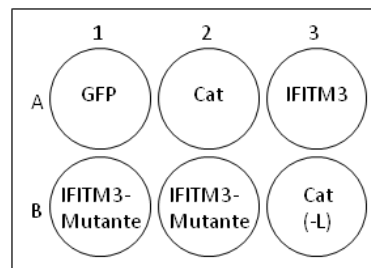


Abbildung 5: Transduktionsschema. 293T-Zellen wurden auf 6-Well-Platten mit Transduktionsviren, die das Reportergen GFP, Cat oder IFITM3 tragen, transduziert. Nach 6 h folgte die Transfektion der Zellen mit dem EBOV-trVLP-System. Als Negativkontrolle wurde das trVLP-System ohne die Polymerase L transfiziert.

2.2.3.7 Einfluss von transfiziertem IFITM3 auf die Replikation von EBOV-trVLPs

Die Wirkung von transfizierten IFITM3 auf die Reifung von EBOV-trVLPs wurde analysiert, indem Produzentenzellen neben dem trVLP-System mit IFITM3 oder Kontrollplasmiden kotransfiziert wurden. Die 293T-Zellen wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 15 h mit dem trVLP-System sowie 1 µg GFP, Cat, IFITM3, IFITM5, IFITM1 oder 11 verschiedenen IFITM3-Mutanten (SVKS, 43-48AS, ins111AA, F75A-F78A, CCC->AAA, 49-54AS, 97-102AS, del111L, ins111AA, del126V, ins126A) kotransfiziert. Die weiteren Schritte folgten wie oben angegeben, Zielzellen wurden parallel vorbereitet. In einem zweiten Experiment wurde die Transfektion von IFITM3 und des trVLP-Systems zeitversetzt durchgeführt. Die Zellen wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und

nach 15 h mit je 1 µg der Expressionsplasmide für IFITM oder die Kontrollen transfiziert. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 15 h die Transfektion des trVLP-Systems. Etwa 6 h später wurde das Medium ausgetauscht, das weitere Vorgehen ist oben erklärt.

2.2.3.8 Einfluss von transduziertem IFITM auf den Eintritt von EBOV-trVLPs

Für die Untersuchung der Wirkung von IFITM3 auf den Eintritt von EBOV-trVLPs, wurden Zielzellen mit Transduktionsviren, die IFITM3 oder Kontrollgene tragen, transduziert und anschließend mit EBOV-trVLPs infiziert. Die Generierung der trVLPs erfolgte wie oben beschrieben. Für die Zielzellen wurden 293T-Zellen im 6-Well-Platten ausgesät, nach 15 h das Medium entfernt und 0,5 mL frisches Medium sowie 0,5 mL Transduktionsviren, die GFP, Cat, IFITM3 oder die IFITM3-Mutanten SVKS, 43-48AS und ins111AA tragen, hinzugefügt. Etwa 6 h später wurde 1 mL Medium ergänzt und die Zellen mit Plasmiden für die EBOV-RNP-Proteine und den Rezeptor Tim-1 transfiziert. Nach 15 h wurde das Medium ausgetauscht und 48 h nach der Transfektion die Zellen gesplittet (s. oben). Die Zellen wurden 72 h nach der Transfektion mit den parallel produzierten trVLPs infiziert. Das weitere Vorgehen ist oben beschrieben.

2.2.3.9 Einfluss von transfiziertem IFITM auf den Eintritt von EBOV-trVLPs

Zur Untersuchung des Effekts von transfiziertem IFITM auf den Eintritt von trVLPs, wurden Zielzellen neben den EBOV-RNP-Proteinen und Tim-1 mit IFITM3 oder Kontrollplasmiden kotransfiziert. Die Zielzellen wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und nach 15 h mit den Expressionsplasmiden für RNP-Proteine, Tim-1 und einem Plasmid zur Synthese von GFP, Cat, IFITM1, IFITM3 oder den IFITM3-Mutanten SVKS, 43-48AS und ins111AA kotransfiziert. Das weitere Prozedere ist oben erläutert.

2.2.4 Immunoblotting

Das Immunoblotting ist eine Methode zur spezifischen Analyse der Menge und Größe von Proteinen mithilfe von Antikörpern. Dabei werden Proteine zuerst durch SDS-PAGE aufgetrennt, im Western-Blot auf Membranen übertragen und fixiert und anschließend mittels Antikörper detektiert.

2.2.4.1 Ernte von Zellen und Kulturüberständen für das Immunoblotting

Je nach Kulturformat wurden die Zellen und Kulturüberstände zur Analyse im Western-Blot wie nachfolgend beschrieben geerntet (Tabelle 33). Die Proben wurden im Anschluss bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 33: Zellysate und Kulturüberstände für den Western-Blot

Format	Kulturüberstände	Zellysate
T25	Zentrifugieren (4.000 rpm, 5 min, RT) 1. 50 µL Überstand + 50 µL 2x SDS 2. 250 µL Überstand + 50 µL 20 % Sucrose, zentrifugieren (13.300 rpm, 2 h, 4 °C), 50 µL Pellet + 50 µL 2x SDS 3. Rest des Überstandes -80 °C	1. Zellen in 1 mL 1x PBS resuspendieren, davon 200 µL zentrifugieren (4.000 rpm, 5 min, RT) 2. Pellet + 100 µL H ₂ O + 100 µL 2x SDS
6-Well	Zentrifugieren (4.000 rpm, 5 min, RT), 1400 µL Überstand + 140 µL 20 % Sucrose, zentrifugieren (13.300 rpm, 2 h, 4 °C), 50 µL Pellet + 50 µL 2x SDS	Zellen + 250 µL 1x SDS
12-Well	keine Verwendung	Zellen + 200 µL 1x SDS
24-Well	keine Verwendung	Zellen + 100 µL 1x SDS

2.2.4.2 SDS-PAGE

Mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung der Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt (Lottspeich und Engels 2009).

Die Kulturüberstände und Zellysate wurden wie oben beschrieben vorbereitet und auf das Gel aufgetragen. Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele ist im Materialteil beschrieben. Die radikalische Substitutionsreaktion wurde von Ammoniumpersulfat und als Polymerisierungskatalysator TEMED initiiert.

Die Proben wurden geladen, bei 100 V konzentriert und anschließend bei 200 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Prestained Marker (SM #26616) der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet.

2.2.4.3 Western-Blot

Im *Tankblotting*-Verfahren werden die Proteine elektrophoretisch vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Im Anschluss werden sie immunologisch nachgewiesen. In einem elektrischen Feld laufen die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode und binden an die Nitrozellulose-Membran (Corley 2005; Lottspeich und Engels 2009).

Der Blot wurde in gekühltem Blotting-Puffer für 90 min bei 110 V durchgeführt. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden nach dem Transfer mit Milch geblockt (5 % Milchpulver in PBS-Tween (PBST), 30 min RT oder über Nacht bei 4 °C). Im Anschluss folgte die Inkubation unter Drehen (Taumelrollenmischer RM5-30V, CAT) in 5 mL Milch mit Primärantikörper der angegebenen Konzentrationen (1 h RT oder über Nacht bei 4 °C). Nach dreimaliger Waschung mit PBST, wurde die Membran in 5 mL Milch mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (1 h, RT) und erneut dreimal gewaschen.

Die Detektion erfolgte nach der *Enhanced Chemoluminescence*(ECL)-Methode durch Zugabe des HRP-Juice Plus Substrats (PJK GmbH) nach Angaben des Herstellers. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP katalysiert die Oxidierung des Luminols in der Entwicklerlösung, welches unter Lichtemission (425 nm) in seinen Grundzustand zurückkehrt (Alegria-Schaffer et al. 2009). Die Lichtemission wurde mithilfe des ChemoCam Imagers (Intas) detektiert und mit der Intas GDS Application Software ausgewertet.

Zum immunologischen Nachweis eines anderen Proteins auf der Membran, wurde diese in Stripping Puffer inkubiert (30 min, 50 °C), dreimal 10 min mit PBST gewaschen, erneut in Milch geblockt und die obigen Schritte mit anderen Antikörpern wiederholt.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Mithilfe des *fluorescence activated cell sorting* (Durchflusszytometrie, FACS) können Zellen in einem Flüssigkeitsstrom gezählt und charakterisiert werden. Dabei werden Zellen in einer laminaren Strömung einzeln hintereinander aufgereiht und von dem gebündelten Licht eines Lasers angestrahlt. Detektoren können die Stärke und Richtung der Lichtstreuung messen, wodurch die Zellgröße (*forward scatter*, FSC) und Granularität (*side scatter*, SSC) ermittelt werden kann. Zusätzlich können fluoreszierende Farbstoffe und Proteine mit entsprechenden Lasern angeregt und die Stärke der Emissionen gemessen werden. Die Stärke der Emission ist proportional zur Anzahl der fluoreszierenden Moleküle (Lottspeich und Engels 2009). In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um den Einfluss von EBOV-Proteinen auf die Oberflächenexpression von IFITM3 zu untersuchen. Dazu wurden Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und nach 15 h mit je 1 µg der entsprechenden EBOV-Proteine (VP30, VP35, NP, L, VP40, GP und VP24) sowie 1 µg IFITM3-myc transfiziert. Als Negativkontrolle dienten das Leerplasmid pCAGGS und GFP. Nach 6-8 h erfolgte ein Mediumwechsel und 48 h später wurden die Zellen geerntet. Bei einem Ansatz pro Protein wurde zur Kontrolle ein Western-Blot mit Antikörpern gegen den myc-tag sowie gegen β-Aktin durchgeführt. Dazu wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 200 µL 1x SDS lysiert. Zwei Ansätze dienten der Analyse im FACS. Hierzu wurden die Kulturüberstände entfernt, die Zellen mit 0,5 mL 1x PBS gewaschen, in 0,5 mL FACS-Puffer gelöst, in FACS-Röhrchen überführt und in der Heraeus Multifuge X3R Zentrifuge pelletiert (1200 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 0,5 ml FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 50 µL myc-Hybridomüberstand für 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und 30 min lichtgeschützt auf Eis in 50 µL Alexa Fluor 647 anti-Maus-Antikörper inkubiert (1:100). Im Folgenden wurden die Zellen erneut zweimal mit 1 mL FACS-Puffer gewaschen und das Zellpellet in je 150 µL FACS-Puffer und 4 % Paraformaldehyd in 1x PBS resuspendiert. Die Proben wurden bis zur Messung bei 4 °C gelagert. Die Messungen wurden an einem BD LSR II durchgeführt, die Steuerung erfolgte mit der BD-FACS-Diva-Software und die erlangten Daten wurden in Microsoft Excel ausgewertet.

2.2.6 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Mithilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) wurde die subzelluläre Lokalisation von Fluoreszenz-markiertem IFITM3, welches durch Transduktion oder Transfektion in 293T-Zellen gebracht wurde, verglichen. Bei der LSM fokussiert ein Objektiv Laserlicht auf einen gewählten Punkt der Probe, sodass fluoreszierende Farbstoffe angeregt werden. Ein dichroischer Spiegel reflektiert das anregende Licht zurück zur Probe und leitet das emittierte über eine variable Lochblende (pinhole) zu einem Detektor (Photomultiplier). Der Fokuspunkt und das pinhole liegen in konjugierten Ebenen (konfokal) zueinander, weshalb nur das Licht aus dem Fokuspunkt und kein Streulicht durch das pinhole gelangt (Lottspeich und Engels 2009).

Für dieses Experiment wurden, wegen ihres großen Zytoplasmas und ihrer guten Oberflächenhaftung auf Deckgläschen, Cos7-Zellen verwendet. Die Zellen wurden auf 6-Well-Platten ausgesät (300.000 Zellen/Well). Nach 24 h folgte die Transfektion mit 5 µg der Markerproteine Emerin (Kernmembran), Rab1 (Endosomen) oder TGN46 (Golgi-Apparat) oder der Negativkontrolle pCAGGS. Das Medium wurde nach 6 h gewechselt, nach 24 h wurden die Zellen eines 6-Well auf sieben mit Deckgläschen bestückte Wells in 24-Well-Platten aufgeteilt. Die Zellen wurden dazu resuspendiert und 200 µL der Suspension zu 300 µL neuem Medium gegeben. Die Leervektorkontrolle wurde nur auf 3 Wells verteilt. Etwa 24 h nach dem Transfer wurde die Transduktion beziehungsweise Transfektion nach dem Schema in der folgenden Tabelle durchgeführt (Tabelle 34).

Tabelle 34: Schema für die Konfokale Mikroskopie

Markerprotein	Transfektion		Transduktion		Transfektion	
Emerin (Kernmembran)	pQCXIP	IFITM3	pQCXIP	IFITM3	pCAGGS	IFITM3
Rab1 (Endosomen)	pQCXIP	IFITM3	pQCXIP	IFITM3	pCAGGS	IFITM3
TGN46 (Golgi)	pQCXIP	IFITM3	pQCXIP	IFITM3	pCAGGS	IFITM3
pCAGGS (Kontrolle)	pQCXIP	IFITM3	pQCXIP	IFITM3	pCAGGS	IFITM3

Die Zellen in zwei der Wells eines jeden Markerproteins wurden mit pQCXIP-Cat oder pQCXIP-IFITM3 transduziert (0,2 mL Transduktionsviren/Well + 0,3 mL neues Medium). Die Zellen in vier der Wells wurden mit 1 µg pQCXIP, pQCXIP-IFITM3, pCAGGS oder pCAGGS-IFITM3 transfiziert. Die Zellen des letzten Wells eines jeden Markerproteins und die Leerkontrolle pCAGGS wurde nicht weiter transfiziert oder transduziert. Die Zellen in zwei der Wells mit prätransfiziertem pCAGGS wurden mit pCAGGS oder pCAGGS-IFITM3 transfiziert. Nach 15 h erfolgte ein Mediumwechsel in den transfizierten Wells. Etwa 48 h nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dazu wurden die Zellen zweimal gewaschen (200 µL 1x PBS), in 4 % Paraformaldehyd (PFA) zur irreversiblen Quervernetzung der Proteine inkubiert (300 µL, 10 min, RT), viermal mit PBS gewaschen und in PBS/0,2 % Triton X-100 inkubiert (2 min, RT), welches die Membran permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit PBS bedeckt 12 h bei

4 °C gelagert. Daraufhin wurden die Zellen erst in 200 µL 10 % FCS in PBS zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen und anschließend in 150 µL anti-IFITM3-Primärantikörper (1:1000 in 10 % FCS) je 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 500 µL, 2 min auf dem Schüttler) erfolgte die Färbung in 150 µL anti-Kaninchen-Alexa Fluor 555-Sekundärantikörper (1:1000 in 10 % FCS, 30 min, 37 °C). Die Kontrollen mit Markerprotein bzw. pCAGGS ohne weitere Transfektion wurden statt im Sekundärantikörper in 150 µL 1x PBS inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschvorgang (500 µL, 2 min auf dem Schüttler) wurden die Deckgläser mithilfe von Mowiol auf Objektträgern fixiert und bei Raumtemperatur gelagert. Zur Zellkernanfärbung wurde Mowiol mit Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33342, Stocklösung 10 mM, 1:5000) versetzt, welcher an doppelsträngige DNA bindet. Die Immunfluoreszenzbilder wurden unter Laseranregung der Farbstoffe mit einem 63-fachen Objektiv an einem ZEISS LSM 5 Pascal aufgenommen und mit der Software Axiovision (ZEISS) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung von Env-Varianten mit V5-tag

Um den Einfluss der IFITM-Proteine auf die proteolytische Spaltung viraler Glykoproteine analysieren zu können, wurden die viralen Glykoproteine des murinen Leukämievirus (MLV-Env) und des Affen-Immundefizienzvirus (SIV-Env) mit einem V5-Epitoptag fusioniert (Abbildung 6). Die Fusion der Glykoproteine mit dem V5-Epitoptag erlaubt die spezifische Detektion der Spaltprodukte der viralen Glykoproteine mittels eines monoklonalen Antikörpers im Western-Blot.

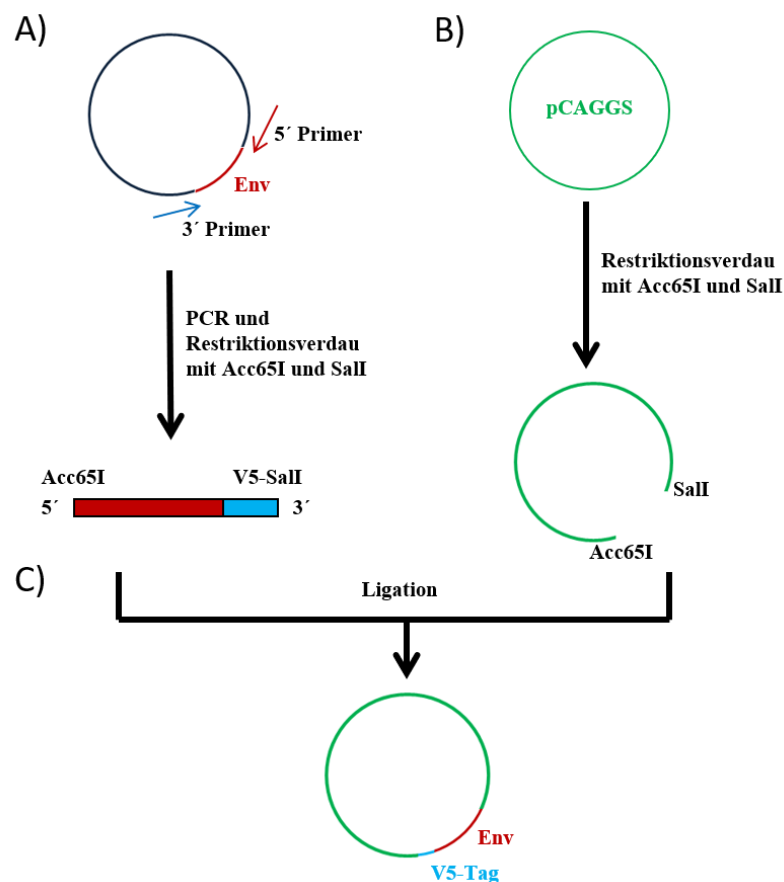


Abbildung 6: Klonierungsschema für V5-getaggte Glykoproteine. Zur Klonierung von MLV- und SIV-env mit V5-tag wurde (A) env (rot) mit Hilfe von Primern, die einen V5-tag (blau) sowie Restriktionsverdauungsschnittstellen aufweisen, amplifiziert und geschnitten (Insert), (B) der Vektor pCAGGS (grün) mit Restriktionsenzymen geschnitten und (C) Vektor und Insert ligiert. Plasmide sind kreisförmig, Inserts als Striche dargestellt.

Zunächst wurde eine PCR durchgeführt, um die Sequenz für das Glykoprotein (Env) zu amplifizieren. Der Vorwärtsprimer enthielt eine Schnittstelle für Acc65I, der Rückwärtsprimer diente der Erweiterung der Sequenz um die für den V5-tag kodierenden Nukleotide und wies eine Schnittstelle für SalI auf. Das Amplifikat und der passende Vektor (pCAGGS) wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und ligiert. Es erfolgte eine Transformation mit klonaler Vermehrung in *E. coli*-Bakterien. Die Plasmid-

DNA einzelner Kolonien wurden im Restriktionsverdau mit *Acc65I* und *SalI* sowie anschließender Agarosegelelektrophorese auf die erfolgreiche Klonierung geprüft (Abbildung 7). Hierbei wurde das Gen für MLV-Env bzw. SIV-Env aus dem Vektor wieder herausgeschnitten, sodass sich beide Fragmente in der Agarosegelelektrophorese darstellen. Das gesamte über PCR klonierte Fragment wurde durch Sequenzanalyse verifiziert. Die Funktionalität des *V5-tags* wurde nach Zelltransfektion mit einem Antikörper gegen V5 auf die korrekte Länge des Glykoproteins im Western-Blot überprüft (Abbildung 19, S. 61). Beide Proteine zeigten die erwartete Größe.

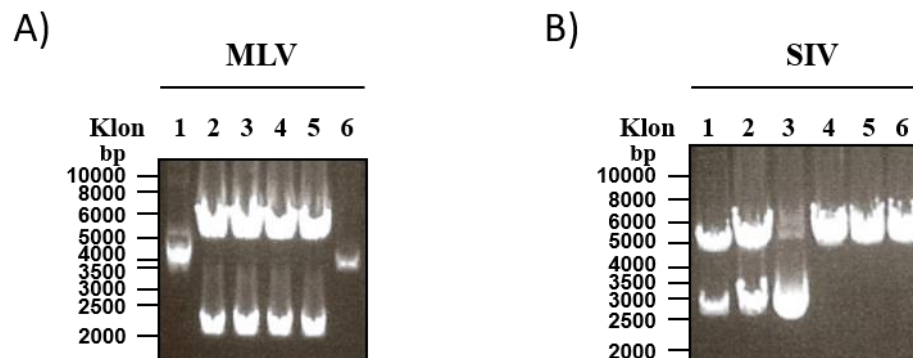


Abbildung 7: Restriktionsanalyse der positiven *env*-V5-Klone. Zur Identifizierung von Klonen mit den Genen *MLV-env-V5* (A) bzw. *SIV-env-V5* (B) wurde die Plasmid-DNA einzelner Kolonien im Restriktionsverdau mit *Acc65I* und *SalI* geschnitten und in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Positive Klone zeichnen sich durch die Präsenz von Vektor und Insert aus (*MLV-env-V5*: 2 kb, *SIV-env-V5*: 2,7 kb). (Positive Klone *MLV-env-V5*: Klon 2-5, *SIV-env-V5*: Klon 1-3).

3.2 IFITM3 in transfizierten Zellen hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von MLV-basierten Viruspartikeln mit EBOV-GP, MLV-Env und IAV-HA

Es ist bekannt, dass IFITMs mit der Freisetzung von HIV-1 interferieren und die Inkorporation von IFITMs zu weniger infektiösen HIV-1 Virionen führt. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirkung von IFITM3 auf die Freisetzung von Viruspartikeln aus der Wirtszelle untersucht. Dazu wurden MLV-Partikel mit verschiedenen Hüllproteinen generiert und der Einfluss der Expression des IFITM3-Gens auf die Freisetzung dieser Partikel mittels Western-Blot analysiert.

293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden zur Produktion von MLV-Gag/Pol, MLV-Luziferase (Luc) und verschiedenen viralen Glykoproteinen sowie einem Plasmid zur Synthese von pCAGGS-IFITM3 oder einem Kontrollplasmid (pCAGGS) transfiziert (3-Plasmid-System, Abbildung 8). Nach 72 h wurden die über Sucrose gereinigten Kulturüberstände im Western-Blot analysiert. Dabei diente ein Antikörper gegen MLV-Gag zur Ermittlung der Viruspartikelmenge und ein anti-IFITM3-Antikörper zur Detektion von IFITM3. Zur Kontrolle der Expression und als Ladekontrolle wurden die Zellysate im Immunoblot auf MLV-Gag und β -Aktin untersucht.

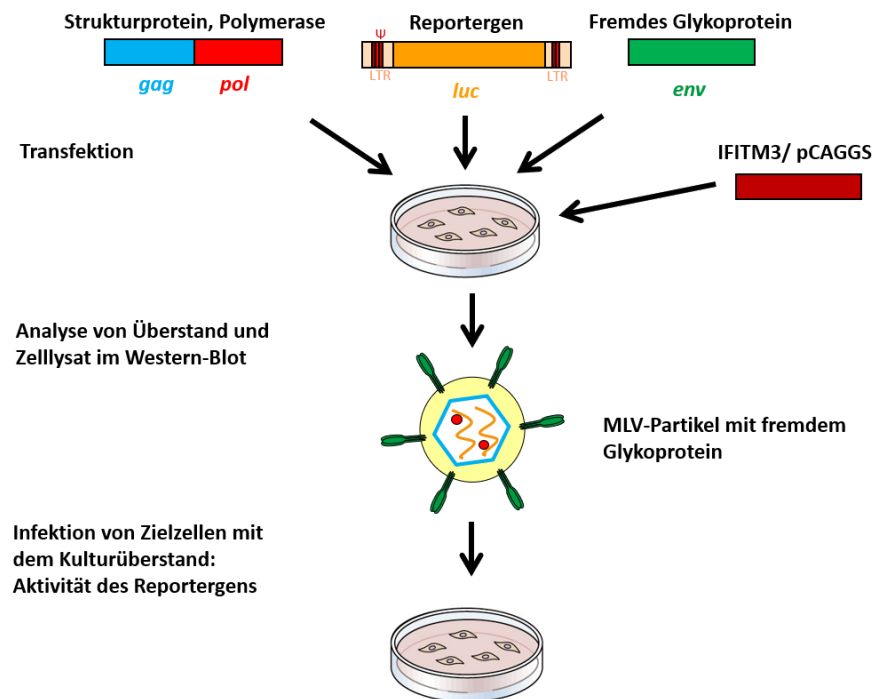


Abbildung 8: Schematische Darstellung des 3-Plasmid-Systems. 293T-Zellen wurden mit den abgebildeten Plasmiden für MLV-Gag/Pol, MLV-Luc und Env kotransfiziert. Die Zellen generierten replikationsinkompetente, retrovirale MLV-Partikel, die im Western-Blot analysiert und für die Infektion von Zielzellen eingesetzt werden konnten. Basierend auf laborinternen Präsentationen (modifiziert).

Zur Ermittlung der idealen Versuchsbedingungen wurden zunächst Vorexperimente durchgeführt. Drei unabhängige Experimente zeigten, dass die Kotransfektion eines Expressionsplasmids für IFITM3 unabhängig vom synthetisierten Glykoprotein zu einer deutlichen Reduktion der Partikelfreisetzung führt (Abbildung nicht gezeigt). Deshalb wurde die IFITM3-Plasmidmenge titriert und mit der Expressionsstärke stabil IFITM3 synthetisierender Zellen verglichen. So konnte die IFITM3-Genexpression auf ein physiologischeres Maß reduziert werden (Abbildung nicht gezeigt). Unter diesen Expressionsbedingungen konnte in drei unabhängigen Experimenten gezeigt werden, dass IFITM3 keinen Einfluss auf die Freisetzung von MLV-Partikel mit EBOV-GP, MLV-Env und IAV-HA hat. Allerdings inhibierte IFITM3 die Freisetzung von MLV-Partikeln mit HIV-1-Env und im geringen Maße SIV-Env (Abbildung 9A). Eine Quantifizierung der Immunoblots mittels ImageJ zeigte bei HIV-1-Env für die IFITM3 synthetisierenden Zellen eine Reduktion der Freisetzung um 65 % (SEM \pm 19, $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle und für SIV-Env eine Reduktion um 40 % (SEM \pm 4, $p < 0,05$) (Abbildung 9B). Die Expression des IFITM3-Gens konnte sowohl im Überstand, als auch im Zelllysate mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Die β -Aktin Kontrolle zeigte keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Proben. Die Ergebnisse zeigen, dass IFITM3 nicht nur die Freisetzung von MLV-Partikeln mit HIV-1-Env, sondern auch mit SIV-Env reduziert, aber keinen Einfluss auf die Freisetzung von Viruspartikeln mit EBOV-GP (108 ± 26 % von der Kontrolle, $p > 0,05$), MLV-Env (102 ± 23 %, $p > 0,05$) und IAV-HA (112 ± 58 %, $p > 0,05$) hat.

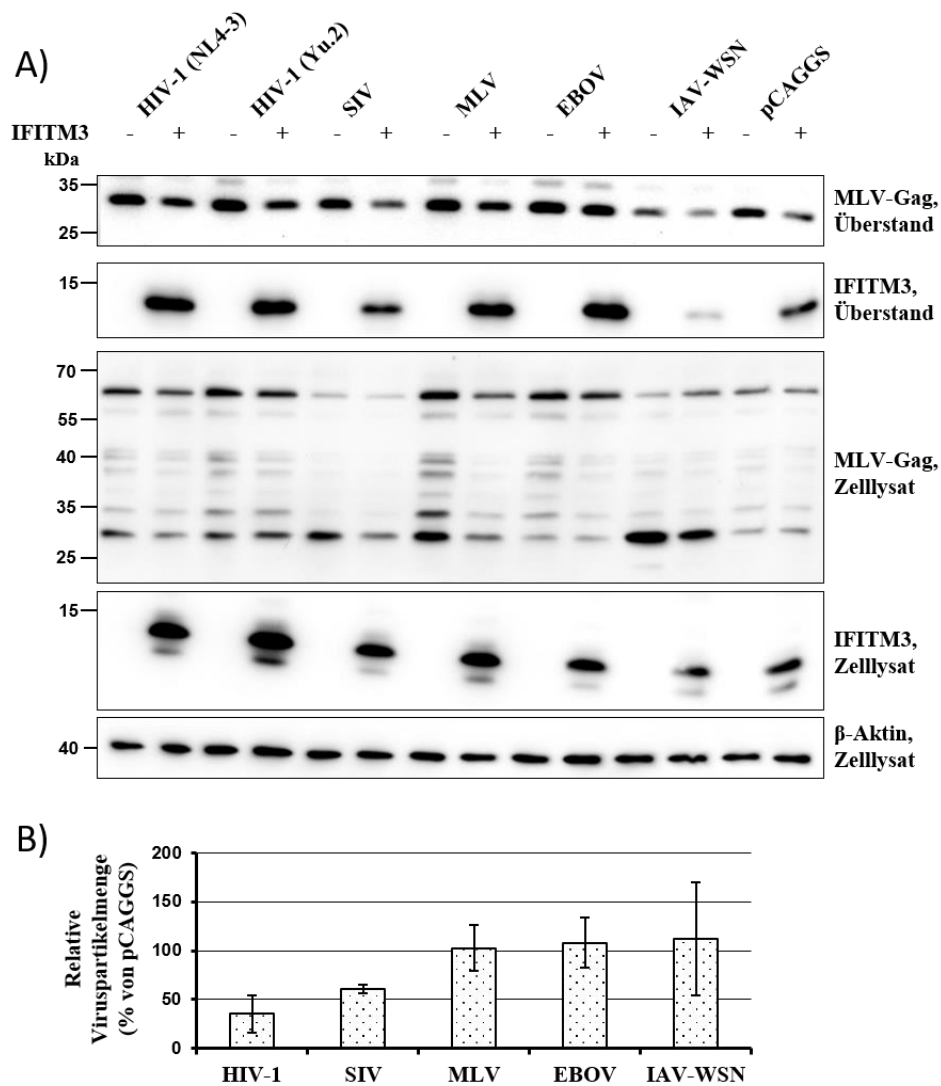


Abbildung 9: Kotransfektion eines Expressionsplasmids für IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von MLV-Partikeln mit EBOV-GP, MLV-Env und IAV-HA. (A) Transiente Kotransfektion von 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für MLV-Gag/Pol, MLV-Luc, dem Glykoprotein der genannten Viren und für IFITM3 (IFITM3+) bzw. pCAGGS (IFITM3-). Nach 72 h wurden die Zellüberstände und Zelllysate geerntet und die Proteinexpression mit Antikörpern gegen MLV-Gag, β -Aktin und IFITM3 mittels Western-Blot analysiert. (B) Die Western-Blots in (A) wurden mit ImageJ quantifiziert und jeweils auf die Kontrollansätze (pCAGGS) normalisiert (Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit dem Standardfehler des Mittelwertes).

3.3 IFITM3 aus transfizierten Zellen wird in MLV-basierte Viruspartikel inkorporiert

Interferon induzierbare Transmembran Proteine werden in die Membran von HIV-1, aber auch in die von Exosomen aufgenommen. In dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob IFITMs auch in MLV-basierte Viruspartikel inkorporiert werden. Dazu wurden die Kulturüberstände von Zellen, in denen Viruspartikel und IFITM produziert wurden, sowie die Kulturüberstände von Zellen, die nur IFITM produzierten, auf IFITM-Expression hin untersucht.

Zur Analyse des Einbaus von IFITM3 in Viruspartikel wurden 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für MLV-Gag/Pol, einem MLV-Reportervektor (MLV-Luc), HIV-1-Env, und IFITM3 oder einem Kontrollplasmid (pCAGGS) transfiziert und die Kulturüberstände sowie Zellysate im Western-Blot auf Präsenz des IFITM3-Proteins untersucht. Als Kontrollen dienten Transfektionen ohne die Plasmide für MLV-Gag bzw. HIV-1-Env. Ohne MLV-Gag-Synthese sollten keine MLV-Partikel produziert werden, sodass IFITM3 nicht in Viruspartikel, aber in Exosomen inkorporiert wird. In Kulturüberständen von Zellen, die Viruspartikel und Exosomen mit inkorporierten IFITM3 abschnüren, sollte deshalb, bei erfolgreicher Inkorporation in Viruspartikel, mehr IFITM3 detektierbar sein. Ohne HIV-1-Env können zwar MLV-Partikel generiert werden, sollte die Inkorporation von IFITM3 jedoch durch eine Interaktion mit gp41 erfolgen, wäre in dem Kulturüberstand ebenfalls IFITM3 nur in Exosomen detektierbar.

Zusätzlich wurde die Infektiosität der geernteten Zellkulturüberstände gemessen. Dazu wurden Zellen, die mit Expressionsplasmiden für HIV-Rezeptoren transfiziert wurden, mit den Kulturüberständen infiziert und die Luziferaseaktivität nach 72 h gemessen. Nur Kulturüberstände mit MLV-Partikel sollten Zellen infizieren.

Im Western-Blot wurden die Virus-enthaltenden Kulturüberstände sowie Zellysate auf IFITM3 untersucht (Abbildung 10A). In den Überständen ohne MLV-Viruspartikel konnte IFITM3 detektiert werden. Dies zeigte, dass IFITM3, vermutlich als Bestandteil von Exosomen, in den Zellkulturüberstand abgegeben wird. In Kulturüberständen mit MLV-Partikeln ohne HIV-Env wurden vergleichbare IFITM3-Mengen beobachtet. Im Gegensatz dazu befand sich in den Kulturüberständen mit MLV-Partikeln, die HIV-1-Env tragen, mehr IFITM3, als in den Kulturüberständen ohne funktionsfähige MLV-Partikel. Dies kann durch die Inkorporation von IFITM3 in die Membran der HIV-Env tragenden MLV-Partikel erklärt werden. Die Summe aus IFITM3 in Exosomen und Viruspartikeln führte zu der beobachteten stärkeren Bande im Western-Blot im Vergleich zu den Überständen ohne MLV-Partikel bzw. mit HIV-Partikeln ohne HIV-Env. Dies zeigt, dass IFITM3 nur in Viruspartikel mit Glykoprotein inkorporiert wird. In den Zellysaten war die IFITM3-Menge in den Proben ohne transfiziertes MLV-*gag*-Plasmid und ohne HIV-*env* sehr stark, in den Lysaten ohne transfiziertes IFITM3-Plasmid konnte dieses nicht detektiert werden. β -Aktin zeigte keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Proben. Im Luziferase-Assay waren die MLV-Partikel mit inkorporiertem IFITM3 weniger infektiös als die in Gegenwart vom Leervektor (pCAGGS) produzierten MLV-Partikeln (0,6 % von der Kontrolle, SEM \pm 473, $p < 0,01$, Abbildung 10B). Die Kulturüberstände ohne MLV-Partikel und diejenigen mit MLV-Partikeln ohne HIV-1-Env waren nicht infektiös.

Zusammengefasst ergibt sich, dass IFITM3 in die Membran von MLV-Partikeln mit HIV-1-Env inkorporiert wird und dort deren Infektiosität reduziert. Zusätzlich wird IFITM3 auch in Exosomen integriert.

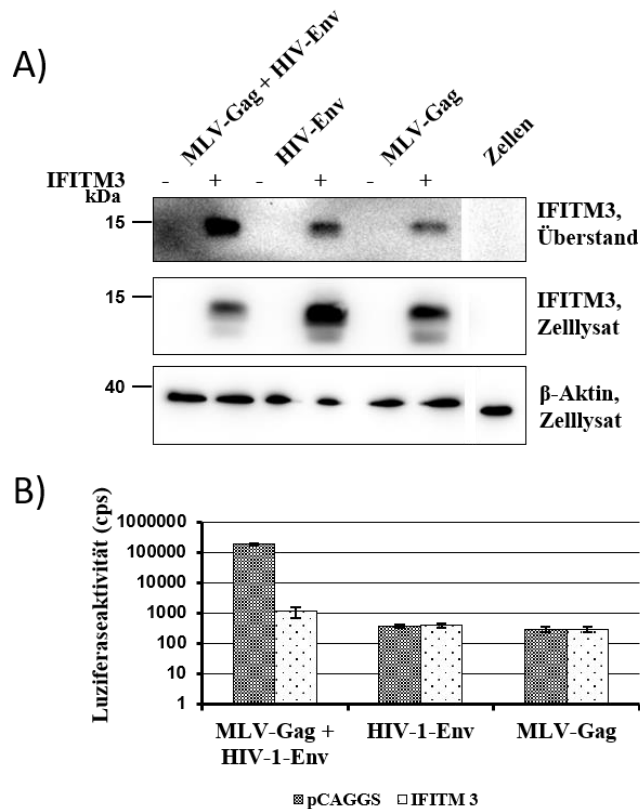


Abbildung 10: IFITM3 wird in MLV-Partikel inkorporiert. (A) 293T-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden, dem retroviralen Vektor MLV-Luc sowie den Expressionsplasmiden für IFITM3 oder pCAGGS transfiziert. Nach 72 h wurde IFITM3 in den Zellysaten und den Kulturüberständen im Western-Blot detektiert (ein Experiment). (B) 293T-Zellen mit prätransfizierten Expressionsplasmiden für HIV-Rezeptoren wurden mit den Kulturüberständen aus (A) infiziert und nach 72 h die Luziferaseaktivität der Zellysate gemessen (ein Experiment, Standardfehler des Mittelwertes, cps = *counts per second*, Anzahl pro Sekunde).

3.4 IFITM3 in transfizierten Zellen kann die Infektiosität von MLV-basierten Viruspartikeln reduzieren, der Effekt ist abhängig vom viralen Hüllprotein

Nachdem sich kein wesentlicher Einfluss von IFITM3 auf die Freisetzung von Viruspartikeln mit EBOV-GP, MLV-Env und IAV-HA, aber auf solche mit HIV- und SIV-Env zeigte, wurde die Infektiosität der in Gegenwart von IFITM3 produzierten MLV-Partikel untersucht. Dazu wurden MLV-Partikel mit verschiedenen Hüllproteinen in Gegenwart bzw. Abwesenheit von IFITM3 generiert, diese zur Infektion von Zielzellen eingesetzt und die Infektionsrate quantifiziert.

Die MLV-Partikel wurden wie zuvor mit einem MLV-Vektor mit *Firefly*-Luziferase-Gen (MLV-*luc*) in Gegenwart von pCAGGS-IFITM3 oder einem Kontrollplasmid produziert. Die Zielzellen wurden mit Plasmiden, welche Rezeptorgene für HIV-1 und SIV exprimieren, transfiziert (HIV: CD4, CXCR4, SIV: rhCD4, rhCCR5) und nach 72 h mit den MLV-Partikeln infiziert. Der Infektionserfolg konnte anhand der Luziferaseaktivität bestimmt werden.

In drei unabhängigen Experimenten zeigten sich in Gegenwart von IFITM3 hergestellte Zellkulturüberstände, die Viruspartikel mit den Glykoproteinen von HIV-1 ($8 \pm 3 \%$ von der Kontrolle, $p > 0,05$), SIV ($21 \pm 10 \%$, $p > 0,05$), MLV ($4 \pm 2 \%$, $p < 0,05$), EBOV ($55 \pm 25 \%$, $p > 0,05$) und IAV ($40 \pm 12 \%$, $p > 0,05$) enthielten, in ihrer Infektiosität reduziert (Abbildung 11). Die Infektiosität von Viruspartikeln mit den Glykoproteinen von HIV-1, SIV und MLV war um mehr als 80 % und mit EBOV-GP oder IAV-HA um 50 % reduziert. Besonders differenziert war die Infektiosität zwischen in Gegenwart von IFITM3 produzierten MLV-Partikeln mit MLV-GP und der Kontrolle. Die Ergebnisse zeigten sich bis auf jene mit MLV-GP nicht signifikant, weshalb weitere Bestätigungsexperimente nötig sind. Zusammengefasst hat IFITM3 in transfizierten Zellen zwar keinen Einfluss auf die Freisetzung von MLV-Partikeln mit EBOV-GP, MLV-Env und IAV-HA, reduziert jedoch deren Infektiosität zum Teil deutlich.

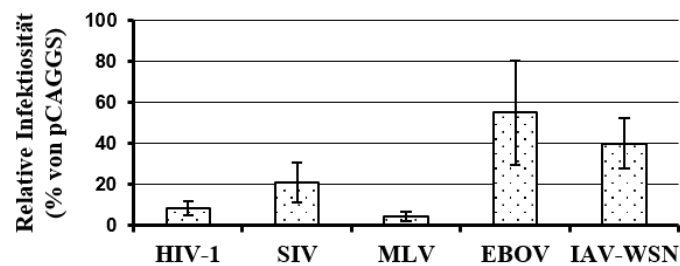


Abbildung 11: Kotransfektion eines Expressionsplasmids für IFITM3 reduziert die Infektiosität von MLV-Partikeln. 293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die Wirtszellrezeptoren von HIV-1 (CD4, CXCR4) sowie SIV (rhCD4, rhCCR5) transfiziert und nach 72 h mit MLV-Partikeln, die unterschiedliche virale Glykoproteine trugen, infiziert. Nach 72 h wurde die Luziferaseaktivität der Zelllysate gemessen (Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit dem Standardfehler des Mittelwertes).

3.5 IFITM3 in transfizierten Zellen interferiert mit der Prozessierung von verschiedenen viralen Glykoproteinen

IFITM3 inhibiert die Prozessierung von HIV-1-Env. In den vorherigen Experimenten dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IFITM3 im Überstand von MLV-Partikel produzierenden Zellen erscheint, keinen Einfluss auf die Freisetzung, jedoch auf die Infektiosität der Viruspartikel hat. Zur Überprüfung, ob diese reduzierte Infektiosität mit einer gehemmten Glykoproteinspaltung korreliert, wurden 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für verschiedene, teilweise V5-getaggte, virale Glykoproteine sowie IFITM1-3 oder einer Kontrolle (pCAGGS) transfiziert. Um die Prozessierung von IAV-HA zu ermöglichen, wurde ein Expressionsplasmid für die Protease TMPRSS2 kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zelllysate geerntet und im Immunoblot mit einem Antikörper gegen das Hüllprotein analysiert.

In drei unabhängigen Experimenten konnte für IFITM1 ein moderater und für IFITM2 und 3 ein starker inhibitorischer Einfluss auf die Prozessierung von HIV-1-Env, HIV-2-Env, SIV-Env, MLV-Env und EBOV-GP nachgewiesen werden (Abbildung 12A-F). Die

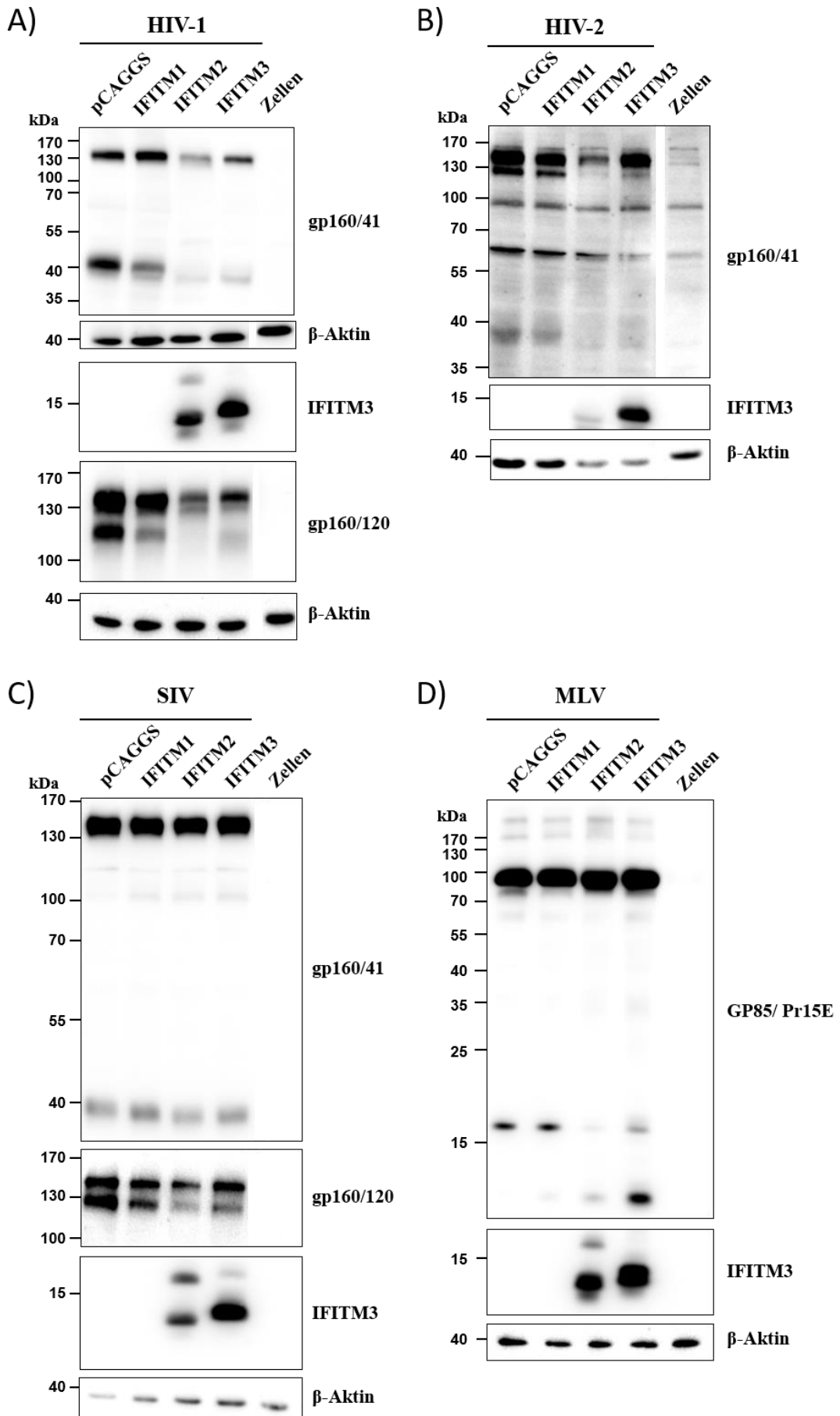
Prozessierung von IAV-HA mittels Tmprss2 wurde durch die Präsenz von IFITM-Proteinen nicht beeinflusst (Abbildung 12G). Die abgebildeten Western Blots repräsentieren drei unabhängige Experimente. Zu beachten ist, dass IFITMs generell die Expression der Glykoproteine im Immunoblot abschwächen, weshalb für die abgebildeten Western Blots das Verhältnis von gespaltenen zu ungespaltenen Glykoprotein berechnet wurde, um die Inhibition der proteolytischen Prozessierung zu erkennen. Dies erfolgte anhand einer Quantifizierung der Western-Blots mittels ImageJ und der Berechnung des Verhältnisses von gespaltenem zu ungespaltenem Glykoprotein (Abbildung 13).

Für die Glykoproteine von HIV-1 und HIV-2 wurden zwei Quotienten gebildet (gp41/gp160, gp120/gp160), da beide Spaltprodukte mit Antikörpern detektiert werden konnten. Im Western-Blot ließ sich für HIV-1-Env, HIV-2-Env und SIV-Env in Gegenwart von IFITM2 und 3 eine Zunahme des Vorläuferproteins gp160 und eine Abnahme der Spaltprodukte gp41 und gp120 erkennen. Das Resultat für HIV-1 diente als Positivkontrolle, da bereits bekannt ist, dass IFITM3 die Glykoproteinspaltung von HIV inhibiert.

Für EBOV-GP und SUDV-GP erkennt man ebenfalls eine Zunahme des Vorläuferglykoproteins (GP0, 130 kDa) und eine Abnahme des prozessierten GP2 (21 kDa). Das zweite Prozessierungsprodukt GP1 konnte mit dem anti-V5-Antikörper nicht detektiert werden, da der V5-tag mit dem GP2 fusioniert ist. Deshalb konnten nur das unprozessierte Glykoprotein und GP2 den Antikörper binden.

Das MLV-Env-Vorläuferprotein GP85 (85 kDa) wird von einem zellulären Enzym zu GP70 und Pr15E gespalten. Während oder kurz nach der Virusfreisetzung spaltet eine virale Protease Pr15E weiter zu p15E. Bei der Verwendung eines nicht-reduzierenden Lysepuffers konnte mit dem anti-V5-Antikörper bei 170 kDa eine Bande detektiert werden, die möglicherweise dem mittels Disulfid-Brücke verbundenen Komplex aus GP70 und Pr15E/p15E entspricht. Für diesen Komplex wird in der Literatur eine Größe von ca. 100 kDa angegeben. In dem gezeigten Blot mit reduzierendem SDS-Puffer sind der nicht reduzierte Komplex schwach bei 170 kDa, GP85 bei 90 kDa, Pr15E bei etwas über 15 kDa und p15E bei etwas unter 15 kDa sichtbar. GP70 kann mit dem anti-V5-Antikörper nicht identifiziert werden, da der V5-tag mit dem Pr15E-V5 fusioniert ist und der Antikörper nur die Glykoproteinspaltprodukte, die Pr15E-V5 enthalten, binden kann. Die Quantifizierung ergab auch hier eine Zunahme des Vorläuferproteins GP85 und Abnahme von Pr15E.

Es konnte kein inhibitorischer Einfluss von IFITM3 auf die Prozessierung von IAV-HA-V5 festgestellt werden. Der V5-tag ist mit HA2 fusioniert, weshalb nur das Vorläuferprotein HA0 (75 kDa, hier etwa 70 kDa) und das Spaltprodukt HA2 (25 kDa) detektiert werden konnten. Das Verhältnis von HA0 zu HA2 präsentierte sich in jedem der drei unabhängigen Experimente unterschiedlich und wurde nicht durch IFITMs beeinflusst.



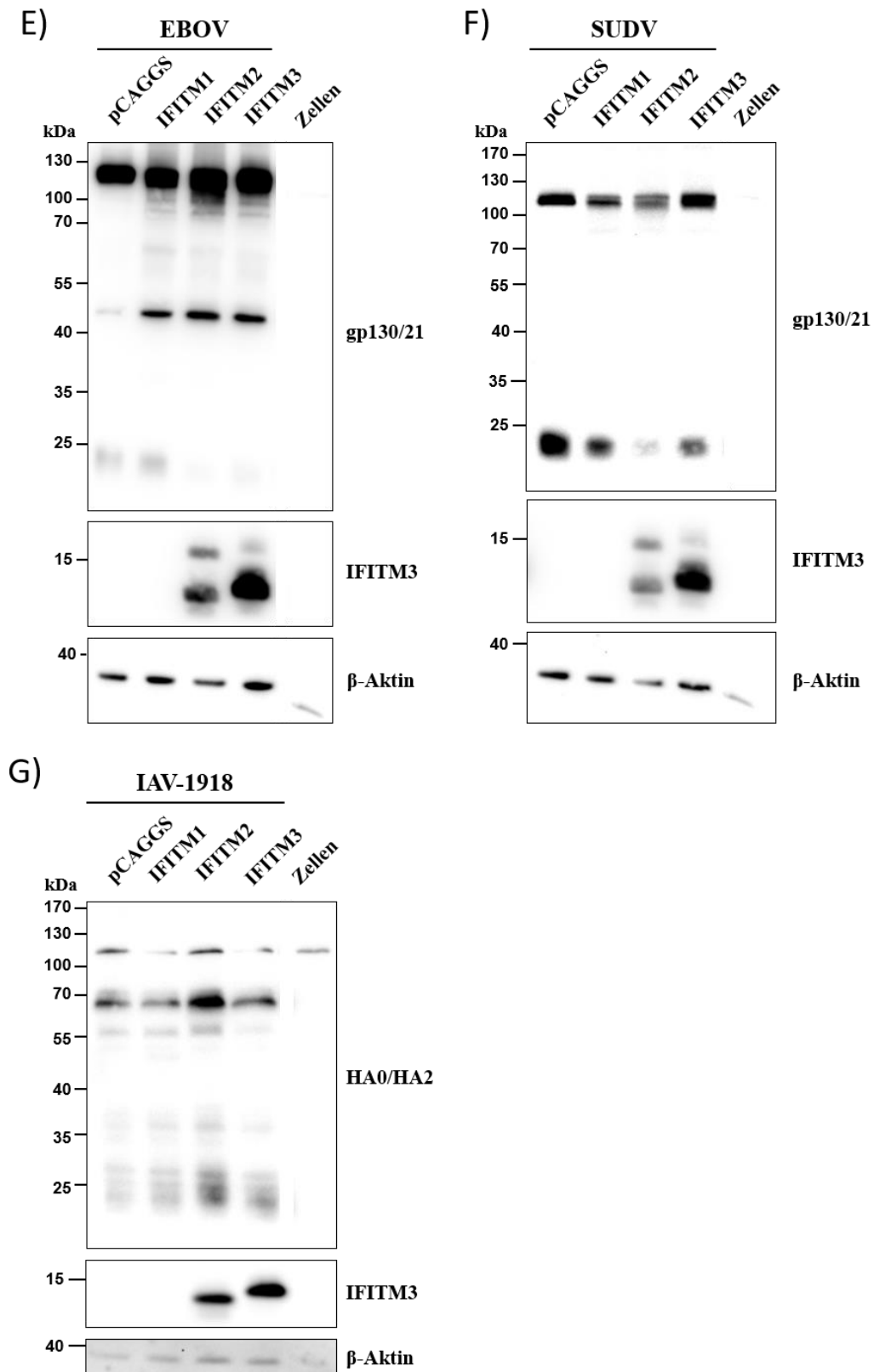


Abbildung 12: Koexpression von IFITM-Proteinen inhibiert die Prozessierung verschiedener Glykoproteine. 293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für IFITM1-3 oder einer Kontrolle und mit den Glykoproteinen der genannten Viren transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Analyse der Zellysate mit einem Antikörper gegen das Hüllprotein im Western-Blot (repräsentativ für drei unabhängige Experimente).

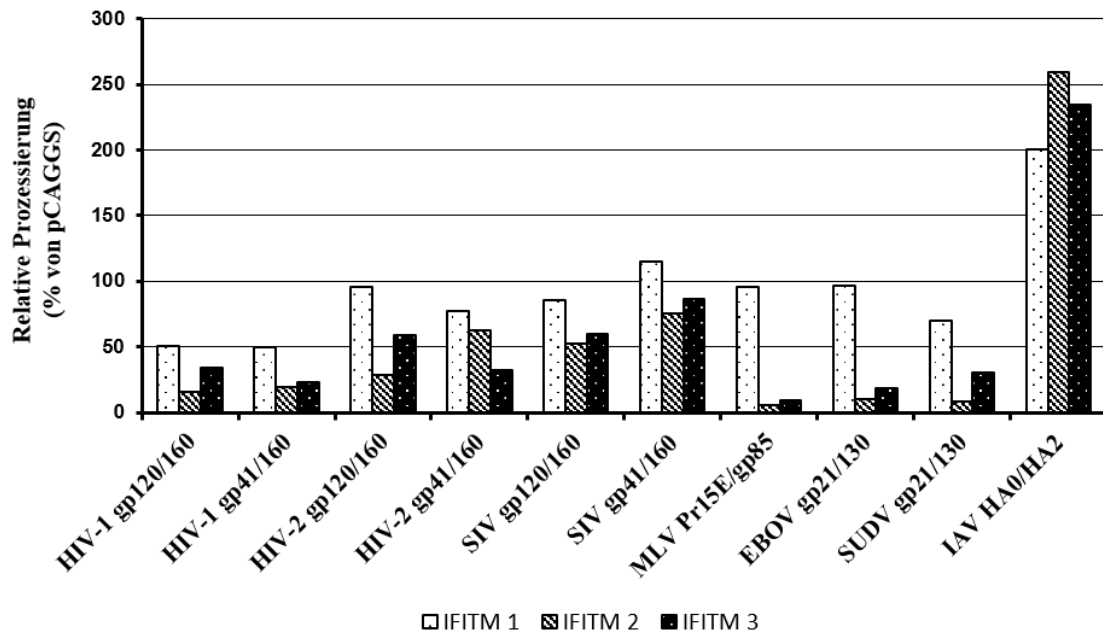


Abbildung 13: Koexpression von IFITM-Proteinen hemmt die Prozessierung verschiedener Glykoproteine. Quantifizierung der IFITM3-vermittelten Inhibition der Prozessierung verschiedener Glykoproteine. Die in Abbildung 12 gezeigten Western-Blots wurden mittels ImageJ quantifiziert und das Verhältnis der Glykoproteine zueinander berechnet.

Besonders der Einbau von IFITM3 in MLV-Partikel mit MLV-Env bewirkte in den vorherigen Experimenten eine starke Reduktion der Infektiosität. Deshalb wurde überprüft, ob die Infektiosität durch eine Förderung der Glykoproteinspaltung mittels Trypsins wiederhergestellt werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass Trypsin in der Lage ist, eine MLV-Mutante, die nicht durch Furin prozessiert werden kann, zu spalten und so einen Teil ihrer Fusionsaktivität wiederherzustellen. MLV-Env tragende MLV-Partikel wurden daher in Gegenwart von IFITM3 oder einer Kontrolle hergestellt, mit Trypsin inkubiert und im Anschluss zur Infektion von Zielzellen genutzt. Der Infektionserfolg wurde nach 72 h mit Hilfe der Luziferaseaktivität ermittelt. In drei unabhängigen Experimenten zeigte sich kein erheblicher Effekt von Trypsin auf die Infektiosität der Partikel (Abbildung 14). IFITM3 reduzierte die Infektiosität von MLV-Partikeln um ca. 86 % (SEM \pm 3, $p < 0,05$). Zwischen IFITM2 und IFITM3 mit Trypsin zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Infektiosität der MLV-Partikel (14 ± 3 % versus 20 ± 5 %, $p > 0,05$).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass IFITM2 und 3 die Glykoproteinprozessierung von HIV-1, HIV-2, SIV, MLV, EBOV und SUDV hemmen. Eine Förderung der Glykoproteinspaltung von MLV durch Trypsin führt nicht zu einer reduzierten Wirkung von IFITM3 auf die Infektiosität. Somit korreliert die inhibierte Glykoproteinprozessierung nicht direkt mit der reduzierten Viruspartikelinfektiosität.

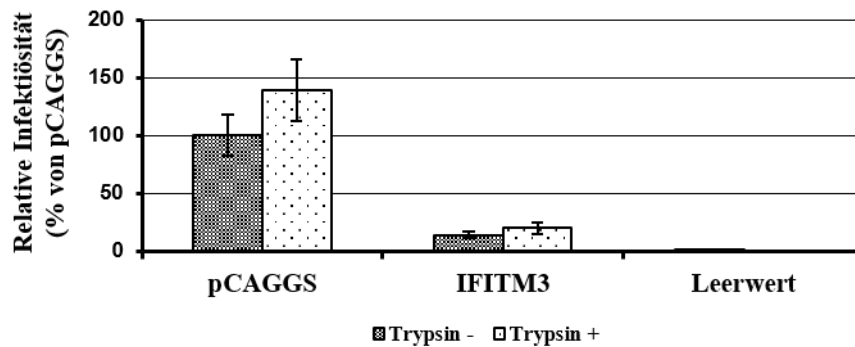


Abbildung 14: Trypsin kann die Infektiosität von MLV-Partikeln nicht wiederherstellen. In Gegenwart von IFITM3 oder einer Kontrolle generierte MLV-Partikel mit MLV-Env, wurden mit Trypsin und anschließend Trypsin-Inhibitor oder einer Kontrolle behandelt. Die Partikel wurden zur Infektion von 293T-Zellen eingesetzt und nach 72 h die Luziferaseaktivität gemessen (Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit dem Standardfehler des Mittelwertes).

3.6 Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Freisetzung und Infektiosität von MLV-Partikeln sowie die Glykoproteinprozessierung

Die Wirkung von IFITM3 auf die Freisetzung und Infektiosität von MLV-Partikeln wurde bis jetzt in transient transfizierten Zellen analysiert, die möglicherweise unphysiologisch hohe Mengen an IFITM3 exprimieren. Es stellte sich daher die Frage, ob IFITM3, wenn es zu physiologischeren Mengen stabil in 293T-Zellen exprimiert wird, ebenfalls keinen Einfluss auf die Freisetzung von MLV-Partikeln zeigt, aber die Infektiosität von MLV-Partikeln reduziert. Für die Freisetzungsanalyse wurden 293T-Zellen, die stabil IFITM3 oder Cat als Kontrolle exprimieren, mit Expressionsplasmiden für MLV-Gag/Pol, MLV-Luc und diversen Glykoproteinen transfiziert und nach 72 h die Kulturüberstände sowie Zellysate im Immunoblot auf MLV-Gag und IFITM3 untersucht. Mit Expressionsplasmiden für HIV- und SIV-Rezeptoren transfizierte Zielzellen wurden anschließend mit den Kulturüberständen infiziert und nach 72 h die Luziferaseaktivität gemessen.

Drei unabhängige Experimente in stabil exprimierenden Zellen offenbarten keine Wirkung von IFITM3 auf die Freisetzung von MLV-Partikeln mit HIV-1-Env, MLV-Env sowie EBOV-GP und eine geringe Inhibition für Partikel, die SIV-Env oder IAV-HA trugen (Abbildung 15A). Die Immunoblots wurden mittels ImageJ quantifiziert (Abbildung 15B). Hierbei ergab sich für die stabil IFITM3 synthetisierenden Zellen gegenüber der Kontrolle eine Hemmung der Freisetzung um 30 % für SIV-Env (SEM \pm 29, $p > 0,05$), für IAV-HA eine Reduktion um 40 % (SEM \pm 35, $p > 0,05$) und kein Einfluss auf HIV-1-Env (109 ± 3 % von der Kontrolle, $p > 0,05$), MLV-Env (121 ± 11 %, $p > 0,05$) sowie EBOV-GP (106 ± 24 %, $p > 0,05$). Die inhibierende Wirkung auf Viruspartikel mit SIV-Env und IAV-HA zeigte sich nicht signifikant, weshalb weitere Bestätigungsexperimente nötig sind. Die Expression des IFITM3-Gens konnte sowohl im Überstand als auch im Zellysate mittels

Western-Blot nachgewiesen werden. Die β -Aktin Kontrolle zeigte keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Proben. Insgesamt zeigt sich somit ein klarer Unterschied zwischen der Wirkung von IFITM3 auf die Freisetzung von MLV-Partikeln mit verschiedenen Glykoproteinen in transient transfizierten und stabil transduzierten Zellen.

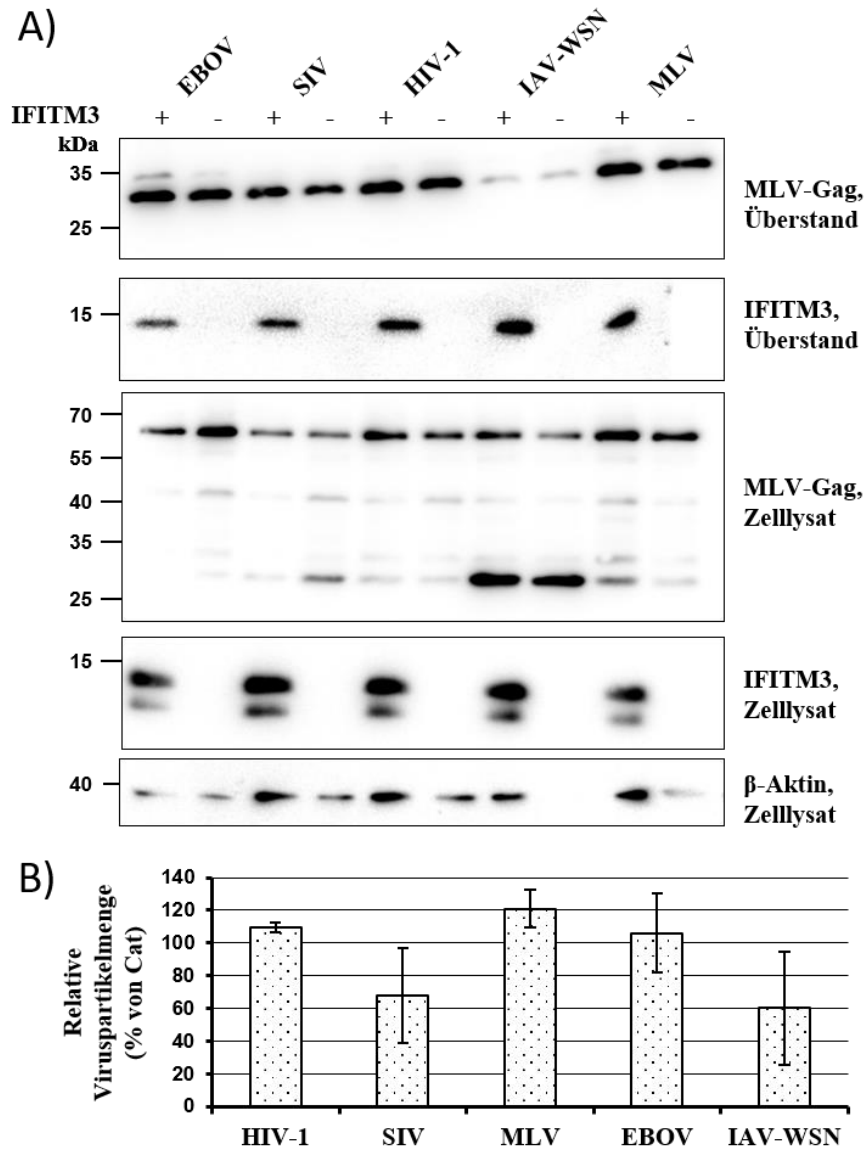


Abbildung 15: Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von MLV-Partikeln. (A) 293T-Zellen, die stabil IFITM3 oder Cat exprimieren, wurden mit Plasmiden transfiziert, die für MLV-Gag/Pol, viralen Glykoproteinen und MLV-Luc kodieren. Nach 72 h wurden die Zellüberstände und die Zellysate im Western-Blot untersucht. Der Immunoblot wurde mit Antikörpern gegen MLV-Gag, β -Aktin und IFITM3 durchgeführt (repräsentativ für drei unabhängige Experimente). (B) Der Western Blot in (A) wurde mit ImageJ quantifiziert (Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit dem Standardfehler des Mittelwertes).

In den vorangegangenen Experimenten konnte nach Transfektion von IFITM3-Plasmiden eine IFITM3-Inkorporation in MLV-Partikel gezeigt werden. Diese könnte zur reduzierten Infektiosität beitragen. Daher war es interessant zu untersuchen, ob MLV-Partikel, die in stabil IFITM3 synthetisierenden Zellen produziert wurden, ebenfalls IFITM3 inkorporieren.

Dazu wurden IFITM3- oder Cat-exprimierende Zellen mit den Expressionsplasmiden für MLV-Gag/Pol und HIV-Env sowie dem Vektor MLV-*luc* transfiziert und die Kulturüberstände und Zellysate im Western-Blot auf IFITM3-Expression untersucht. Als Kontrollen dienten Transfektionen ohne die Plasmide für MLV-Gag bzw. HIV-Env. Zusätzlich wurden die Überstände zur Infektion von Zielzellen eingesetzt, welche mit Expressionsplasmiden für die HIV-Rezeptoren transfiziert worden waren. Nach 72 h wurde die Luziferaseaktivität gemessen.

Im Western-Blot war die IFITM3-Menge in den Zellysaten der stabil IFITM3 exprimierenden Zellen in allen Proben etwa gleich stark, das heißt, es wurde gleich viel IFITM3 exprimiert (Abbildung 16A). In den Kulturüberständen mit HIV-1-Env tragenden MLV-Partikel konnte mehr IFITM3 als in den Kulturüberständen ohne funktionsfähige MLV-Partikel detektiert werden. Dies zeigte, dass IFITM3, wie zuvor in den transfizierten Zellen, in Exosomen, aber auch in Viruspartikel inkorporiert wird. Die Expression in Kulturüberständen mit MLV-Partikeln ohne HIV-1-Env stellte sich ebenfalls schwächer dar, was eine Rolle des Glykoproteins in der IFITM3-Inkorporation bestätigt. Im Luziferase-Assay waren die Viruspartikel mit inkorporierten IFITM3 nicht weniger infektiös, als die entsprechenden Kontrollpartikel (103 % von der Kontrolle, SEM \pm 19163, $p > 0,05$, Abbildung 16B). Kulturüberstände ohne MLV-Partikel und solche mit MLV-Partikeln ohne Glykoprotein waren nicht infektiös.

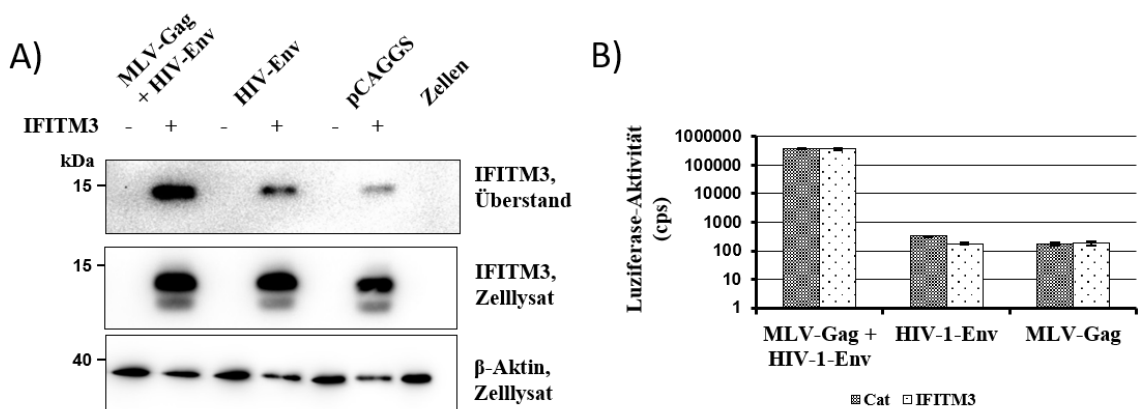


Abbildung 16: Stabil exprimiertes IFITM3 wird in MLV-Partikel inkorporiert. (A) 293T-Zellen, die stabil IFITM3 oder Cat exprimieren wurden mit den angegebenen Plasmiden und einem Plasmid für einen MLV-Luziferase-Vektor (MLV-Luc) transfiziert. Nach 72 h wurde mittels Western-Blot in den Zellysaten und in den Kulturüberständen IFITM3 detektiert (1 Experiment). (B) 293T-Zellen mit prätransfizierten Expressionsplasmiden für HIV-Rezeptoren wurden mit den Kulturüberständen aus (A) infiziert und nach 72 h die Luziferaseaktivität der Zellysate gemessen (ein Experiment, Standardfehler des Mittelwertes).

Die Wirkung von IFITM3 auf die Infektiosität von MLV-Partikeln mit verschiedenen viralen Glykoproteinen wurde im Luziferase-Assay untersucht (Abbildung 17). In drei unabhängigen Experimenten führte die Expression von IFITM3 zu keiner signifikanten Reduktion der Infektiosität von MLV-Partikeln mit HIV-1-Env (231 ± 18 % von der Kontrolle, $p > 0,05$), SIV-Env (235 ± 100 %, $p > 0,05$), MLV-Env (72 ± 27 %, $p > 0,05$), EBOV-GP (51 ± 13 %, $p > 0,05$) und IAV-HA (72 ± 29 %, $p > 0,05$). In Gegenwart von IFITM3 produzierte

MLV-Partikel mit HIV-1-Env und SIV-Env infizierten die Zielzellen sogar doppelt so gut wie die Kontrolle. IFITM3 reduzierte in geringem Maße die Infektiosität von MLV-Env, EBOV-GP und IAV-HA tragenden MLV-Partikeln, diese Reduktion war jedoch nicht signifikant. Damit zeigt sich auch hier ein Unterschied zwischen transfizierten und transduzierten Zellen.

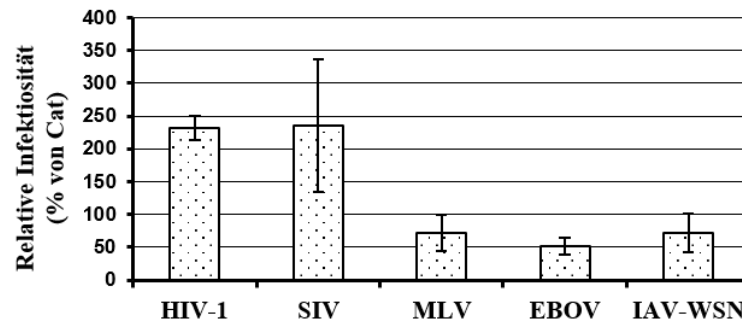


Abbildung 17: Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Infektiosität von MLV-Partikeln. 293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für HIV- sowie SIV-Rezeptoren transfiziert und nach 72 h mit MLV-Partikeln, die verschiedene Glykoproteine aufweisen, infiziert. Nach 72 h wurde die Luziferaseaktivität der Zellysate gemessen (Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit dem Standardfehler des Mittelwertes, für IAV zwei Experimente).

Aufgrund der differenziellen Wirkung von IFITM3 in transfizierten und transduzierten Zellen wurde der publizierte antivirale Effekt auf den Eintritt von EBOV und der fehlende Effekt auf den Eintritt von MLV reproduziert. Dazu wurden stabil IFITM3-exprimierende Zellen sowie Cat-exprimierende Kontrollzellen mit MLV-Partikeln transduziert, die das Glykoprotein von EBOV oder MLV trugen. Die Infektionseffizienz wurde nach 72 h mit Hilfe eines Luziferase-Assays bestimmt. Dabei hemmte IFITM3 deutlich den Zelleintritt von Viruspartikeln mit EBOV-GP ($10 \pm 8\%$ von der Kontrolle, $p > 0,05$), wohingegen MLV-GP-vermittelter Zelleintritt nur wenig reduziert wurde ($57 \pm 30\%$, $p < 0,05$), was der Literatur entspricht und somit die Funktionalität von IFITM3 in der Zelllinie bestätigt (Abbildung 18).

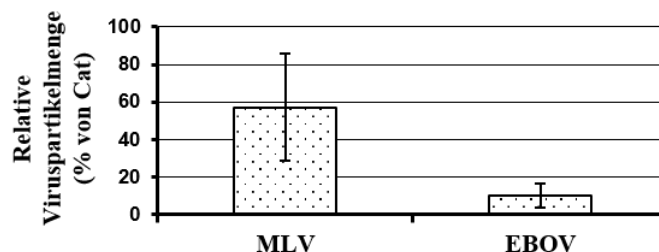


Abbildung 18: Stabil exprimiertes IFITM3 inhibiert die Freisetzung von MLV-Partikeln mit EBOV-GP, aber nicht MLV-GP. 293T-Zellen, die stabil IFITM3 oder Cat exprimieren, wurden mit EBOV-GP oder MLV-GP tragenden MLV-Partikeln infiziert und nach 72 h die Luziferaseaktivität gemessen (ein Experiment in Triplikaten mit dem Standardfehler des Mittelwertes).

Schließlich stellte sich die Frage, ob die Inhibition der Glykoproteinprozessierung durch transfizierte IFITM3-Plasmide auch auf IFITM3 in transduzierten Zellen zutrifft. Hierzu wurden stabil IFITM3- oder Cat-exprimierende 293T-Zellen mit den Expressionsplasmiden

für ungetaggte (HIV) und V5-getaggte (Filoviren) Glykoproteine transfiziert und nach 48 h die Zellysate im Western-Blot auf das Spaltmuster der Glykoproteine untersucht (Abbildung 19).

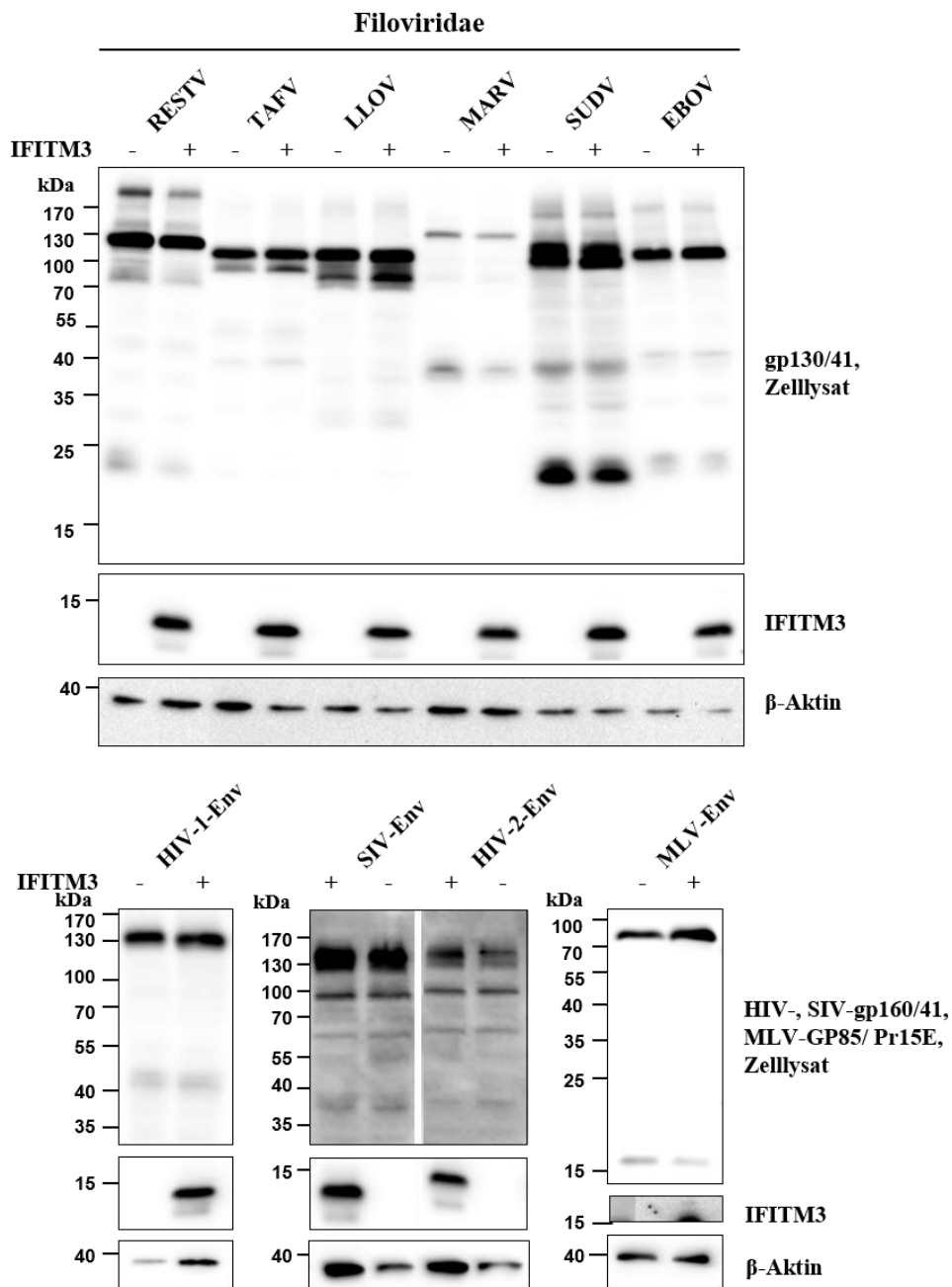


Abbildung 19: Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Glykoproteinprozessierung von MLV-Partikeln. 293T-Zellen, die stabil IFITM3 bzw. Cat exprimieren, wurden mit den Expressionsplasmiden der angegebenen viralen Glykoproteine transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Analyse der Zellysate mit einem Antikörper gegen das Hüllprotein im Western-Blot (repräsentativ für drei unabhängige Experimente).

In drei unabhängigen Experimenten bewirkte stabil exprimiertes IFITM3 keine Inhibition der Glykoproteinprozessierung der *Filoviridae* RESTV, TAFV, LLOV, MARV, SUDV und EBOV sowie der *Retroviridae* HIV-1, HIV-2, SIV und MLV.

Das IFITM-Protein 3 konnte im Zelllysate mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Die β -Aktin Kontrolle zeigte für einige Proben eine größere Zellzahl, hatte aber keinen Einfluss auf das Ergebnis, da nicht die Gesamtproteinmenge, sondern das Verhältnis der Glykoproteinprozessierungsstufen zueinander untersucht wurde. Die in transfizierten Zellen beobachtete IFITM-vermittelte Inhibition der Glykoproteinspaltung konnte somit nicht bestätigt werden.

3.7 Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von EBOV- und HIV-VLPs

Bisher wurden zur Analyse des antiviralen Effekts von IFITM3 auf die Freisetzung von Viren MLV-Partikel mit verschiedenen Glykoproteinen verwendet. Für HIV und EBOV konnten zusätzlich realitätsnähere *virus-like-particles* (VLP) genutzt werden. Diese besitzen neben dem Glykoprotein ein weiteres Strukturprotein des entsprechenden Virus. Es sollte überprüft werden, ob es Unterschiede in der Wirkung von IFITM3 zwischen VLPs und MLV-Partikeln gibt.

Dazu wurden stabil IFITM3 oder, als Negativkontrolle, Cat exprimierende 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für HIV-Gag und HIV-Env oder mit EBOV-GP und EBOV-VP40 transfiziert. Als Kontrolle dienten ein Ansatz ohne HIV-Gag bzw. VP40, in dem weniger effizient VLPs freigesetzt werden sollten und ein Ansatz ohne Glykoprotein, in dem IFITM3 keinen Einfluss auf die VLP-Freisetzung haben sollte, wenn es nicht mit Gag/VP40 interagiert. Nach 48 h wurden die Zelllysate im Western-Blot mit einem Antikörper gegen Gag bzw. VP40 analysiert. In zwei unabhängigen Experimenten konnte kein Einfluss von IFITM3 auf die Freisetzung von EBOV- (Abbildung 20A) und HIV-VLPs (Abbildung 20B) beobachtet werden. Die Präsenz von VP40 bzw. HIV-Gag ist in den VLPs der Kulturüberstände von Cat und IFITM3 produzierenden 293T-Zellen gleich stark. Als Kontrolle dienten die Zelllysate und unvollständige VLPs. In den Zelllysaten sollte die Produktion des Strukturproteins durch IFITM3 nicht verändert werden.

Tatsächlich sind Gag/VP40 nur in den entsprechenden Proben detektierbar und zwischen Cat und IFITM3 produzierenden Zellen kein Unterschied sichtbar. Im Kulturüberstand wurde in der Kontrolle mit Gag/VP40 ohne das entsprechende Glykoprotein kein Einfluss von IFITM3 auf die Freisetzung festgestellt. Die Expression von IFITM3 konnte sowohl im Überstand, als auch im Zelllysate nachgewiesen werden. Die β -Aktin Kontrolle offenbarte keine erheblichen Unterschiede zwischen Kontrollzellen und IFITM3 exprimierenden Zellen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in VLPs inkorporiertes IFITM3 weder die Expression noch die Prozessierung von HIV-Env oder EBOV-GP verändert (ein Experiment, Daten nicht gezeigt).

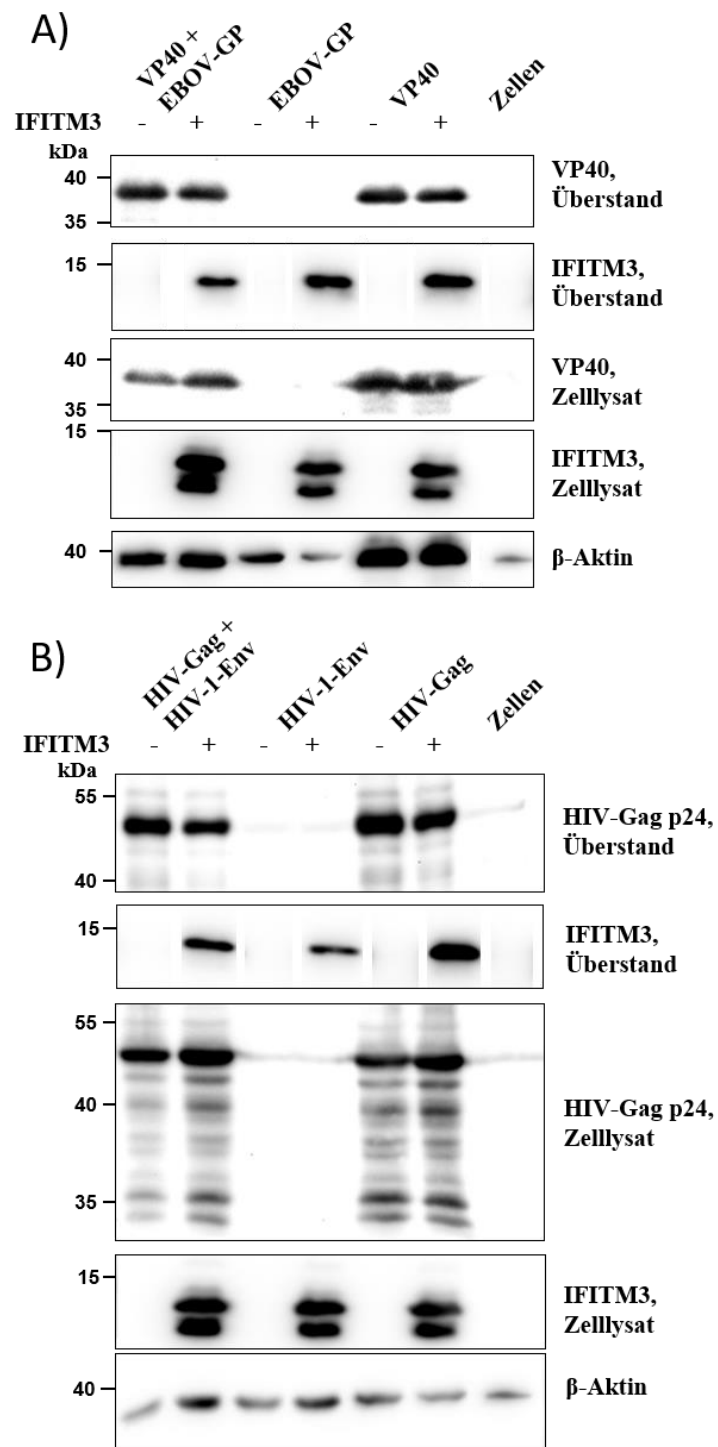


Abbildung 20: Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Freisetzung von EBOV- und HIV-VLPs. (A) Stabil IFITM 3 oder Cat exprimierende 293T-Zellen wurden mit den angegebenen EBOV-Plasmiden transfiziert. Nach 72 h wurden die Kulturüberstände und die Zellysate im Western-Blot auf VP40, IFITM3 und β-Aktin untersucht (repräsentativ für zwei Experimente). (B) Das Experiment in (A) wurde mit HIV-Plasmiden durchgeführt (repräsentativ für zwei Experimente).

3.8 EBOV-Proteine haben keinen Einfluss auf die IFITM3-Oberflächenexpression

Viele Viren haben im Laufe der Evolution Antagonisten gegen antivirale Wirtszellproteine entwickelt, um ihre Ausbreitung zu sichern, bislang sind jedoch keine IFITM-Antagonisten bekannt. Daher wurde analysiert, ob Proteine von EBOV als IFITM-Antagonisten fungieren. Es wurden EBOV-Proteine ausgewählt, da die Infektiosität von MLV-Partikeln mit EBOV-GP weniger sensitiv gegenüber der Inkorporation von IFITM3 war als die Infektiosität von MLV-Partikeln mit anderen Glykoproteinen (S. 51). Dazu wurden Zellen mit Expressionsplasmiden für myc-getaggtetes IFITM3 sowie für EBOV-Proteine transfiziert und die IFITM3-Oberflächenexpression im Immunoblot und in der Durchflusszytometrie untersucht. Um den Einfluss des myc-tags zu kontrollieren, wurden in diesem Experiment sowohl N- als auch C-terminal myc-getaggte IFITM3-Konstrukte verwendet. Die Detektion von (intra-)zellulärem IFITM3 erfolgte mittels Immunoblot. Die Oberflächenexpression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es zeigte sich, dass der N-terminale myc-tag lediglich für die Detektion von (intrazellulärem) IFITM3 im Western Blot geeignet ist, während der C-terminale myc-tag trotz lysosomaler Degradierung sowohl für die Detektion der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie, als auch für den Western Blot geeignet ist.

Die EBOV-Proteine (VP30, VP35, NP, L, VP40-myc, GP und VP24) zeigten in drei unabhängigen Experimenten im Western-Blot weder einen Einfluss auf die Produktion von N-terminal (Daten nicht gezeigt) noch auf die von C-terminal getaggttem IFITM3 (Abbildung 21A). In den mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzellen konnte kein IFITM3 detektiert werden. Die Transfektion der Expressionsplasmide für IFITM3 mit Leervektor-Kontrollen (pCAGGS oder GFP) dienten als Referenz, da die Kontrollplasmide keine Reduktion der IFITM3-Synthese und damit keine IFITM3-Antagonisierung bewirken sollten. GFP hatte einen leichten zytotoxischen Effekt auf Zellen, weshalb die Produktion von IFITM3 geringfügig reduziert war. In der β -Aktin-Kontrolle war kein wesentlicher Unterschied zwischen den Proben vorhanden.

In der Durchflusszytometrie war in drei unabhängigen Experimenten ein reduzierender Einfluss des Glykoproteins von 40 % (SEM \pm 18, $p > 0,05$) auf die Oberflächenexpression von C-terminal getaggttem IFITM3 sichtbar, jedoch ohne Signifikanz (Abbildung 21B). Für das Nukleoproteins (89 ± 28 % von der Kontrolle, $p > 0,05$) und die Proteine VP30 (149 ± 58 %, $p > 0,05$), VP35 (126 ± 38 %, $p > 0,05$), L (176 ± 56 %, $p > 0,05$), VP40 (108 ± 20 %, $p > 0,05$) und VP24 (141 ± 53 %, $p > 0,05$) ergab sich kein erheblicher Unterschied zur Kontrolle. In Gegenwart von VP30, VP35, L und VP24 war die Oberflächenexpression sogar erhöht, allerdings mit einer hohen Standardabweichung. Insgesamt ergibt sich somit keine Funktion von EBOV-Proteinen als IFITM3-Antagonisten.

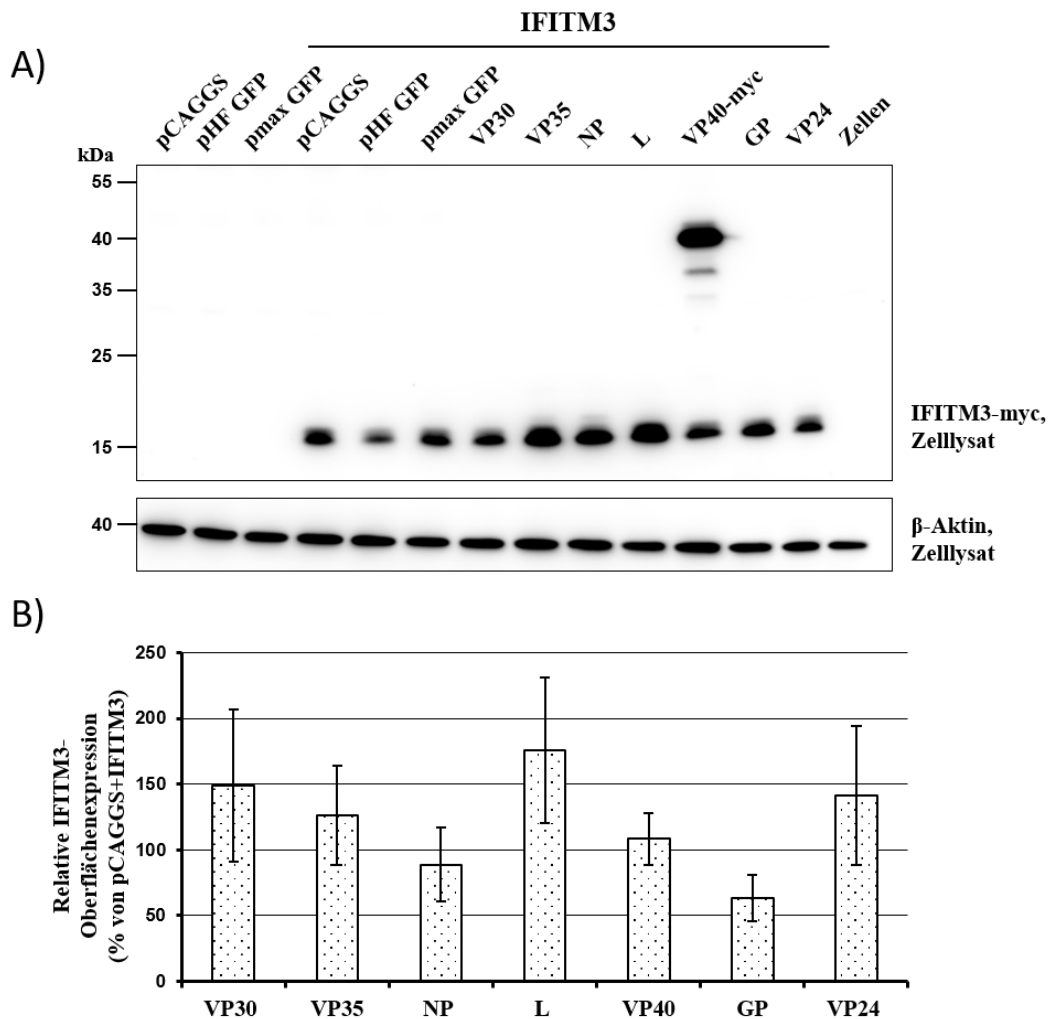


Abbildung 21: EBOV-Proteine antagonisieren nicht die zelluläre Expression oder Oberflächenexpression von IFITM3. (A) 293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für EBOV-Proteine bzw. Kontrollen (pCAGGS, GFP) und IFITM3-myc (hier C-terminal) bzw. eine Kontrolle transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellysate mit einem Antikörper gegen myc sowie β -Aktin im Western-Blot untersucht (repräsentativ für drei unabhängige Experimente). (B) Es wurden Zellen wie in (A) transfiziert und nach 48 h das Zellysat in der Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurde ein Antikörper gegen myc und ein fluoreszierender Sekundärantikörper verwendet (Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit dem Standardfehler des Mittelwertes).

3.9 IFITM3 in transduzierten Zellen hat keinen Einfluss auf die Replikation, aber auf den Eintritt von EBOV

Aufgrund der Aktualität des Ebola-Fieber-Ausbruchs in Westafrika 2013-2016 und der bereits demonstrierten reduzierten Infektiosität durch Inkorporation von IFITM3 in MLV-Partikel mit EBOV-GP, wurde versucht die Ergebnisse in einem System zu reproduzieren, das näher am natürlichen Ebolavirus ist. Ein entsprechendes System wurde 2014 mit dem Ebola transkriptions- und replikationskompetente *virus-like-particles* (trVLP)-System publiziert. Mithilfe der authentischen EBOV-trVLPs sollte überprüft werden, ob IFITM3 einen Einfluss auf den Eintritt und die Replikation von EBOV hat.

3.9.1 IFITM3 inhibiert den Zelleintritt von EBOV

Zur Analyse der Wirkung von IFITM-Proteinen auf den Zelleintritt von EBOV-trVLPs, wurden IFITM3 produzierende Zielzellen mit Luziferase exprimierenden EBOV-trVLPs infiziert und anschließend die Luziferaseaktivität gemessen, um den Infektionserfolg zu quantifizieren (Abbildung 22).

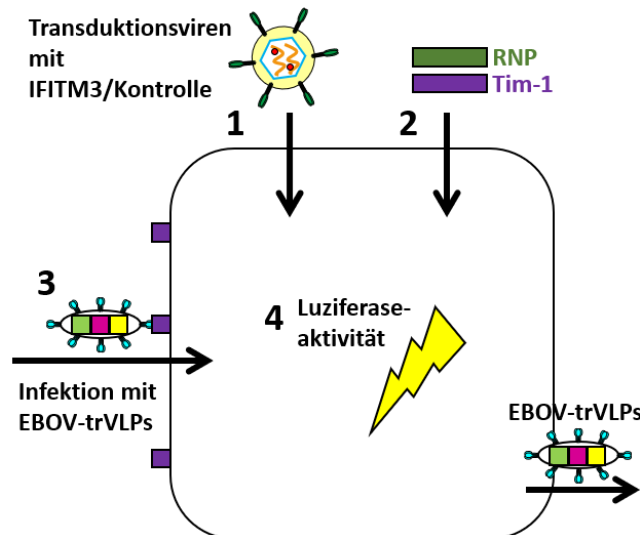


Abbildung 22: Schematische Darstellung zur Untersuchung des Einflusses von IFITM3 auf den Eintritt von EBOV-trVLPs. 1) Zellen werden mit Transduktionsviren, die die Gene IFITM3 oder eine Kontrolle exprimieren, transduziert und anschließend 2) mit den Expressionsplasmiden für den RNP-Komplex und den Rezeptor Tim-1 transfiziert. 3) Nach 72 h erfolgt die Infektion mit EBOV-trVLPs und 4) nach 72 h die Messung der Luziferaseaktivität in den Zellysaten. Modifiziert nach Watt et al. (2014).

Als Kontrollen wurden GFP, Cat und drei gegen den Zelleintritt antiviral funktionslose IFITM3-Mutanten (IFITM3-SVKS, IFITM3-43-48AS, IFITM3-ins111AA) eingesetzt. Außerdem wurden als zusätzliche Negativkontrolle trVLPs ohne das für die Replikation essentielle L-Protein produziert.

Die Zielzellen wurden mit den Expressionsplasmiden für den vRNP-Komplex (VP30, VP35, L, NP) und den Rezeptor Tim-1 transfiziert, um die Replikation der trVLPs zu gewährleisten und die Expression des Luziferase-Gens in den trVLPs zu verstärken. Zur Produktion von EBOV-trVLPs wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und die Überstände nach 72 h geerntet. Diese wurden anschließend zur Infektion der Zielzellen eingesetzt und nach 72 h die Luziferaseaktivität gemessen.

Die Expression von IFITM3 reduzierte den Zelleintritt der EBOV-trVLPs (nachgewiesen durch geringere Luziferaseaktivität in den Zielzellen) um 65 % gegenüber den Kontrollzellen (SEM \pm 5, $p < 0,05$) (Abbildung 23). Die IFITM3-Mutanten reduzierten den Viruseintritt um 20 % (SVKS: SEM \pm 8, $p > 0,05$ und 43-48AS: SEM \pm 8, $p > 0,05$) bzw. 46 % (ins111AA: SEM \pm 6, $p > 0,05$).

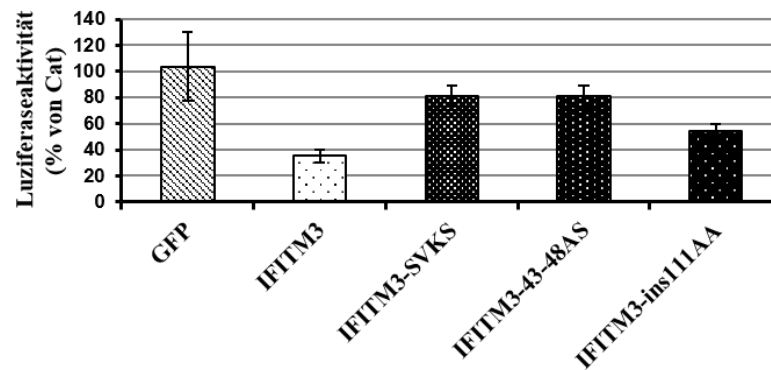


Abbildung 23: IFITM3 inhibiert den Eintritt von EBOV-trVLPs. 293T-Zellen wurden mit MLV-Partikeln, welche die angegebenen Proteine tragen, transduziert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit den Expressionsplasmiden für Tim-1 und die EBOV-RNP-Proteine. Zeitgleich wurden Produzentenzellen mit Plasmiden für das trVLP-System transfiziert. Nach 72 h wurden die Zielzellen mit den Kulturüberständen der Produzentenzellen infiziert. Nach 72 h folgte die Messung der Luciferaseaktivität der Zielzellen (ein Experiment in Triplikaten mit dem Standardfehler des Mittelwertes).

3.9.2 IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Replikation von EBOV

Zur Untersuchung, ob IFITM3 einen Einfluss auf die Replikation von EBOV ausübt, wurden die Produktion von EBOV-trVLPs in IFITM3-exprimierenden Zellen gemessen. Dazu wurden Zellen mit IFITM3 oder mit einem Kontrollprotein tragenden Transduktionsviren transduziert, nach 24 h mit den Expressionsplasmiden für das trVLP-System transfiziert und die Produktion der Partikel mittels Luciferase-Messung quantifiziert (Abbildung 24).

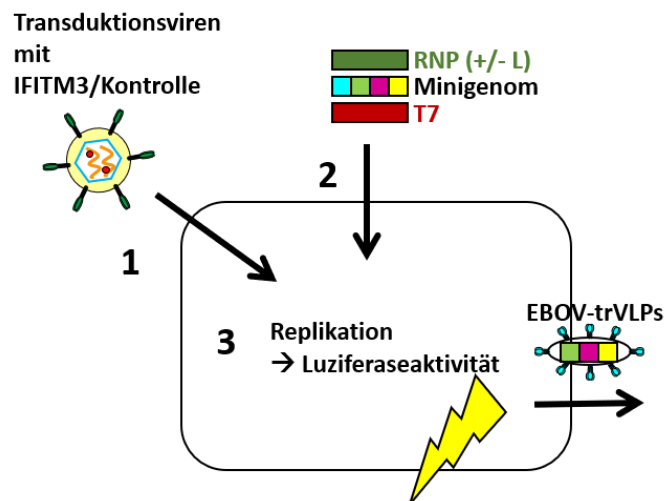


Abbildung 24: Schematische Darstellung zur Untersuchung des Einflusses von IFITM3 auf die Replikation von EBOV-trVLPs. Zellen werden mit Transduktionsviren, die die Gene IFITM3 oder eine Kontrolle exprimieren, transduziert und anschließend 2) mit den Expressionsplasmiden zur Produktion von EBOV-trVLPs (RNP-Komplex mit oder ohne das Protein L, tetracistronisches Minigenom, T7-Polymerase) transfiziert. 3) Nach 72 h wurde die Luciferaseaktivität der Zellysate gemessen. Modifiziert nach Watt et al. (2014).

Als Kontrollen wurden GFP, Cat und drei verschiedene IFITM3-Mutanten verwendet. Die Replikation der trVLPs korreliert direkt mit der Luciferaseaktivität, sodass sich über die

Messung der Luziferaseaktivität direkt der Einfluss von IFITM3 auf die Replikation nachweisen lässt.

Die Produktion der EBOV-trVLPs sowie der Kontroll-VLPs ohne das Protein L erfolgte wie oben beschrieben. Nach 72 h wurde die Luziferaseaktivität der Zellysate der trVLP-produzierenden-Zellen gemessen.

Die insgesamt hohe Luziferaseaktivität in den Zellen und die geringe Hintergrundaktivität von transfizierten 293T-Zellen ohne L-Protein sprachen für die Funktion des Systems (Abbildung nicht gezeigt). In der Replikationsanalyse wurde kein Unterschied in der Luziferaseaktivität zwischen 293T-Zellen, die in Gegenwart von IFITM3 trVLPs herstellten ($101 \pm 15 \%$, $p > 0,05$) und den IFITM3-Mutanten SVKS ($87 \pm 10 \%$, $p > 0,05$), 43-48AS ($92 \pm 9 \%$, $p > 0,05$) sowie ins111AA ($86 \pm 8 \%$, $p > 0,05$) festgestellt (Abbildung 25).

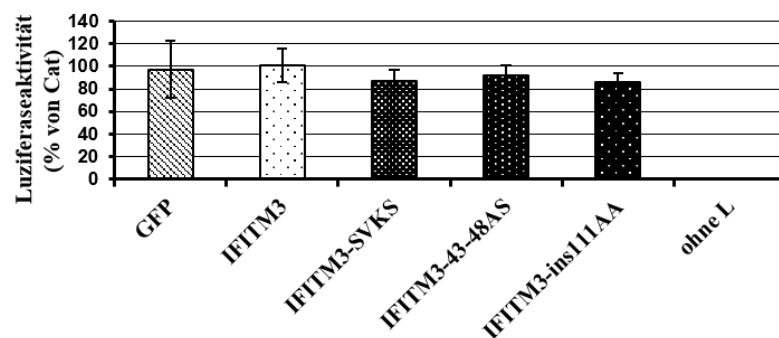


Abbildung 25: Stabil exprimiertes IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Replikation von EBOV-trVLPs. 293T-Zellen wurden zur Synthese der angegebenen Proteine mit Transduktionsviren transduziert und nach 24 h mit Expressionsplasmiden für das EBOV-trVLP-System transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde die Luziferaseaktivität der Zellysate gemessen (repräsentativ für zwei unabhängige Experimente, Standardfehler des Mittelwertes).

3.9.3 IFITM3 verhindert nicht die Reifung von EBOV

Um den Einfluss von IFITM3 auf die Reifung von EBOV zu analysieren, wurden EBOV-trVLPs in Gegenwart von IFITM3 produziert und anschließend zur Infektion von Zielzellen eingesetzt (Abbildung 26). Dazu wurden, wie oben beschrieben, Zellen mit Transduktionsviren, die für das IFITM3-Gen oder für ein Kontrollgen kodieren, transduziert und nach 24 h mit dem EBOV-trVLP-System transfiziert. Die produzierten trVLPs wurden nach 72 h zur Infektion von Zielzellen verwendet, die mit den Expressionsplasmiden für VP30, VP35, L, NP (RNP-Proteine) und dem Rezeptor Tim-1 transfiziert wurden. Nach 72 h wurde die Stärke der Infektion der Zielzellen durch Messung der Luziferaseaktivität der infizierten Zielzellen analysiert.

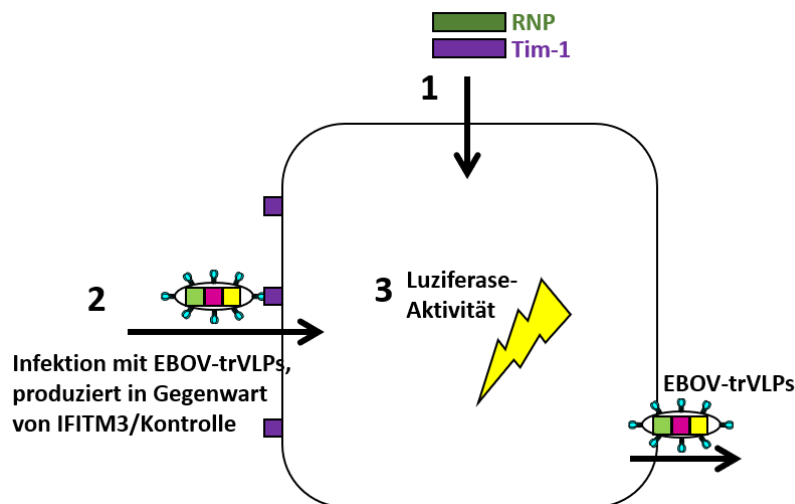


Abbildung 26: Schematische Darstellung zur Untersuchung des Einflusses von IFITM3 auf die Maturation von EBOV-trVLPs. 1) 293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für den RNP-Komplex und den Rezeptor Tim-1 transfiziert. 2) Nach 72 h erfolgte die Infektion mit EBOV-trVLPs, die in Gegenwart von IFITM3 oder einer Kontrolle synthetisiert wurden. 3) Nach 72 h wurde die Luziferaseaktivität in den Zellysaten gemessen. Modifiziert nach Watt et al. (2014).

In Gegenwart von IFITM3 produzierte EBOV-trVLPs infizierten Zielzellen etwa genauso effizient wie in Gegenwart der Kontrollen GFP und IFITM3-SVKS hergestellte trVLPs. Die Infektiosität war mit IFITM3 um 18 % (SEM \pm 12, $p > 0,05$) und mit SVKS um 16 % (SEM \pm 9, $p > 0,05$) reduziert (Abbildung 27). Die IFITM3-Mutanten IFITM3-43-48AS und IFITM3-ins111AA führten zu einer im Vergleich zu Cat um 30 % (SEM \pm 15, $p < 0,05$) bzw. 6 % (SEM \pm 11, $p > 0,05$) erhöhten Infektiosität. In den Kontrollen ohne das Replikationsprotein L konnte, wie erwartet, keine Luziferaseaktivität nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass IFITM3 die Reifung und damit Infektiosität von EBOV-trVLPs nicht behindert.

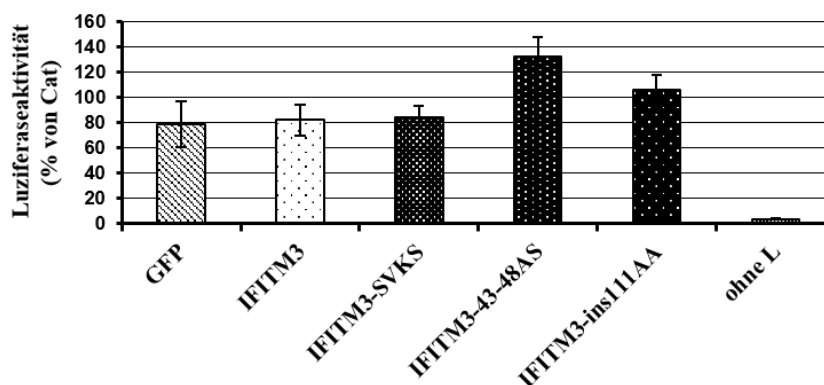


Abbildung 27: IFITM3 hat keinen Einfluss auf die Maturation von EBOV-trVLPs. 293T-Zellen wurden zur Synthese der angegebenen Proteine mit Transduktionsviren transduziert und nach 24 h mit den Expressionsplasmiden für das EBOV-trVLP-System transfiziert. Zeitgleich wurden Zielzellen mit den Expressionsplasmiden für Tim-1 und die EBOV-RNP-Proteine transfiziert. Nach 72 h wurden die Kulturüberstände mit den trVLPs zur Infektion der Zielzellen eingesetzt und nach 72 h die Luziferaseaktivität gemessen (repräsentativ für zwei unabhängige Experimente, Standardfehler des Mittelwertes).

3.9.4 Überprüfung der Transduktionsviren

Zur Überprüfung der antiviralen Aktivität der IFITM-Proteine wurden 293T-Zellen mit VSV-G tragenden Transduktionsviren, die für die Gene GFP, Cat, IFITM3 oder eine der drei IFITM3-Mutanten kodieren, transduziert. Nach 48 h folgte die Infektion mit MLV-Pseudoviren, die das Glykoprotein von EBOV oder MLV tragen. Nach 72 h wurde die Luziferaseaktivität gemessen, um zu untersuchen, ob IFITM3 die Infektion mit MLV-Partikeln verhindert.

Das IFITM-Protein 3 zeigte einen inhibitorischen Effekt auf den Eintritt von EBOV- (Reduktion um $90 \pm 2 \%$, $p = 0,056$), aber nicht MLV-GP tragenden MLV-Partikeln (Reduktion um $40 \pm 12 \%$, $p < 0,05$) (Abbildung 28), was der Literatur entspricht. Der inhibitorische Einfluss auf EBOV ist nicht signifikant, während die geringe inhibitorische Wirkung auf MLV signifikant erscheint, es handelt sich jedoch nur um ein Experiment.

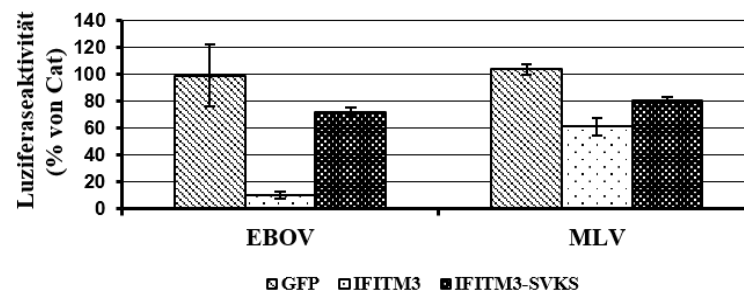


Abbildung 28: Überprüfung der zur IFITM3-Transduktion verwendeten MLV-basierten Transduktionsviren. Die Transduktionsviren wurden getestet, indem 293T-Zellen mit diesen transduziert und nach 48 h mit MLV-Pseudoviren mit MLV-Env bzw. EBOV-GP infiziert wurden. Nach weiteren 72 h Messung folgte die Analyse des Zelleintritts durch Messung der Luziferaseaktivität (ein Experiment).

3.10 IFITM3 in transfizierten Zellen inhibiert die Replikation und den Zelleintritt von EBOV-trVLPs

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass IFITM3 in transduzierten Zellen keinen Einfluss auf die Replikation, jedoch auf den Zelleintritt von EBOV-trVLPs hat. In Ergänzung dazu wurde untersucht, ob kotransfizierte IFITM3-Plasmide die gleichen Resultate zeigen. Damit sollte die Wirkung von IFITM3 in transfizierten und transduzierten Zellen miteinander verglichen werden. Für die Replikationsanalyse wurden Zellen mit den Expressionsplasmiden für das EBOV-trVLP-System und IFITM3 bzw. die Kontrollen GFP, Cat sowie IFITM3-Mutanten transfiziert und nach 72 h die Luziferaseaktivität in den Zelllysaten zur Beurteilung der EBOV-Produktion gemessen. Zur Zelleintrittsanalyse wurden Zielzellen mit den Plasmiden für RNP-Proteine und IFITM3 bzw. Kontrollen transfiziert, nach 72 h mit EBOV-trVLPs infiziert und nach 72 h die Luziferaseaktivität der Zielzellen gemessen. Als Hintergrundaktivität des Systems wurde die Luziferaseaktivität von Zellen, die mit den Plasmiden des EBOV-trVLP-Systems ohne die Luziferase L transfiziert wurden bestimmt, da in diesen keine Replikation der Partikel stattfindet.

In vier unabhängigen Experimenten konnte der inhibierende Einfluss der IFITMs auf die Replikation der EBOV-trVLPs bestätigt werden (Abbildung 29).

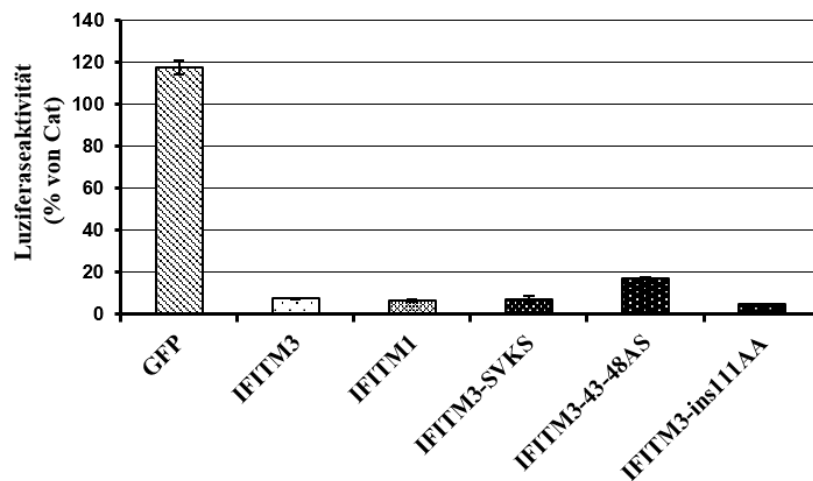


Abbildung 29: Transfiziertes IFITM3 inhibiert die Produktion von EBOV-trVLPs. 293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden der angegebenen Proteine und den Plasmiden für das EBOV-trVLP-System transfiziert. 72 h nach der Transfektion erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität der Zellysate (gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n=4), Standardfehler des Mittelwertes).

IFITM3, IFITM1 sowie die drei IFITM3 Mutanten reduzierten die Replikation gegenüber der Cat-Kontrolle um ca. 95 % (GFP 118 ± 3 %, $p < 0,05$, IFITM3 $8 \pm 0,79$ %, $p < 0,05$, IFITM1 $6 \pm 0,13$ %, $p < 0,05$, IFITM3-SVKS $7 \pm 0,58$ %, $p < 0,05$, IFITM3-43-48AS $17 \pm 1,4$ %, $p < 0,05$, IFITM3-ins111AA $5 \pm 0,42$ %, $p < 0,05$). Als Hintergrundaktivität wurde die Luziferaseaktivität in Zellen mit dem trVLP-Systems ohne die Polymerase L definiert, da hier keine trVLPs produziert werden sollten.

Insgesamt widerspricht dieses Resultat der Beobachtung, dass IFITM3 in transduzierten Zellen keinen Einfluss auf die EBOV-trVLP-Replikation hat. Das könnte an den verwendeten Verfahren oder an dem im Vergleich zur Transduktion anderen Zeitverlauf des Experiments liegen: Die Transduktion erfolgte im Vergleich zur Transfektion 24 h früher. Zur Überprüfung wurden Expressionsplasmide für IFITM3 und das trVLP-System um 24 h zeitversetzt transfiziert. Auch hier inhibierte IFITM3 die EBOV-Replikation (Abbildung 30). Somit ist die unterschiedliche Wirkung in transduzierten Zellen nicht durch den Zeitunterschied zu erklären. Die IFITM3-Mutanten SVKS und ins111AA waren genauso antiviral aktiv wie IFITM3, während IFITM3-43-48AS keinen Einfluss zeigte (GFP 93 ± 29 %, $p > 0,05$, IFITM3 53 ± 14 %, $p < 0,05$, IFITM3-SVKS 55 ± 17 %, $p < 0,05$, IFITM3-43-48AS 111 ± 28 %, $p > 0,05$, IFITM3-ins111AA 48 ± 11 %, $p < 0,05$).

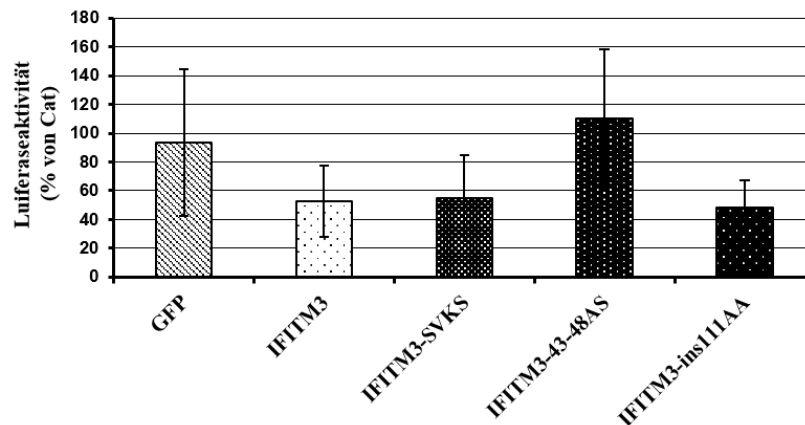


Abbildung 30: Zeitversetzt transfiziertes IFITM3 inhibiert die Produktion von EBOV-trVLPs. 293T-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden der angegebenen Proteine und 24 h später mit den Plasmiden für das EBOV-trVLP-System transfiziert. 72 h nach der Transfektion erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität der Zellysate (ein Experiment).

Für die Untersuchung des Zelleintritts wurden Zielzellen mit den Expressionsplasmiden für die RNP-Proteine sowie IFITM3 bzw. die Kontrollen Cat und verschiedene IFITM3-Mutanten transfiziert und nach 72 h mit EBOV-trVLPs infiziert. Hier zeigten sowohl IFITM3 als auch die Mutanten einen antiviralen Effekt und verhinderten den Eintritt von EBOV-trVLPs (Abbildung 31). IFITM3 und die antiviral inaktiven Mutanten reduzierten den Zelleintritt um etwa 95 % gegenüber Cat (IFITM3 $7 \pm 0,01$ %, $p < 0,05$, IFITM1 $2 \pm 0,17$ %, $p < 0,05$, IFITM3-SVKS $11 \pm 0,09$ %, $p < 0,05$, IFITM3-43-48AS $4 \pm 0,04$ %, $p < 0,05$, IFITM3-ins111AA $4 \pm 0,03$ %, $p < 0,05$).

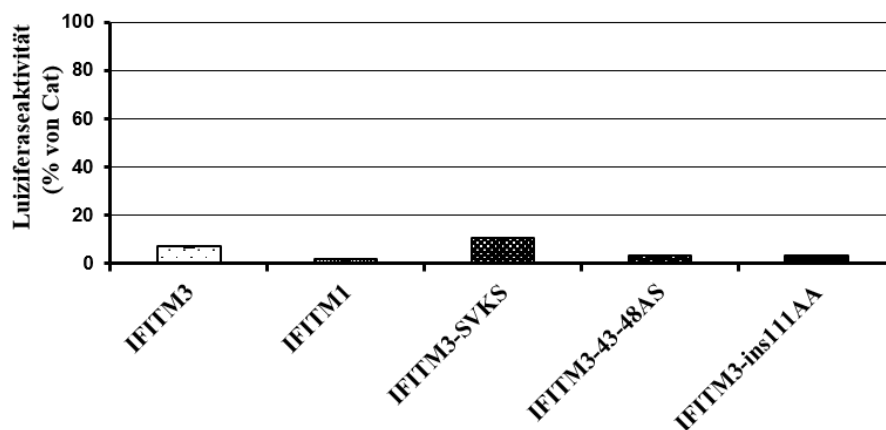


Abbildung 31: Transfiziertes IFITM3 inhibiert den Zelleintritt von EBOV-trVLPs. Zielzellen wurden mit den Expressionsplasmiden für RNP-Proteine und dem Rezeptor Tim-1 sowie IFITM3 oder den Kontrollen Cat oder antiviral inaktiven IFITM3-Mutanten kotransfiziert und nach 72 h mit EBOV-trVLPs infiziert. Nach 72 h wurde die Luziferaseaktivität der Zielzellen bestimmt (ein Experiment in Triplikaten, Standardfehler des Mittelwertes).

Zusammenfassend zeigte IFITM3 nach Transfektion sowohl einen inhibitorischen Effekt auf die Replikation, als auch auf den Zelleintritt der EBOV-trVLPs. Dies steht im Kontrast zu der Beobachtung, dass IFITM3 in transduzierten Zellen den Zelleintritt, aber nicht die Replikation von EBOV-trVLPs hemmt.

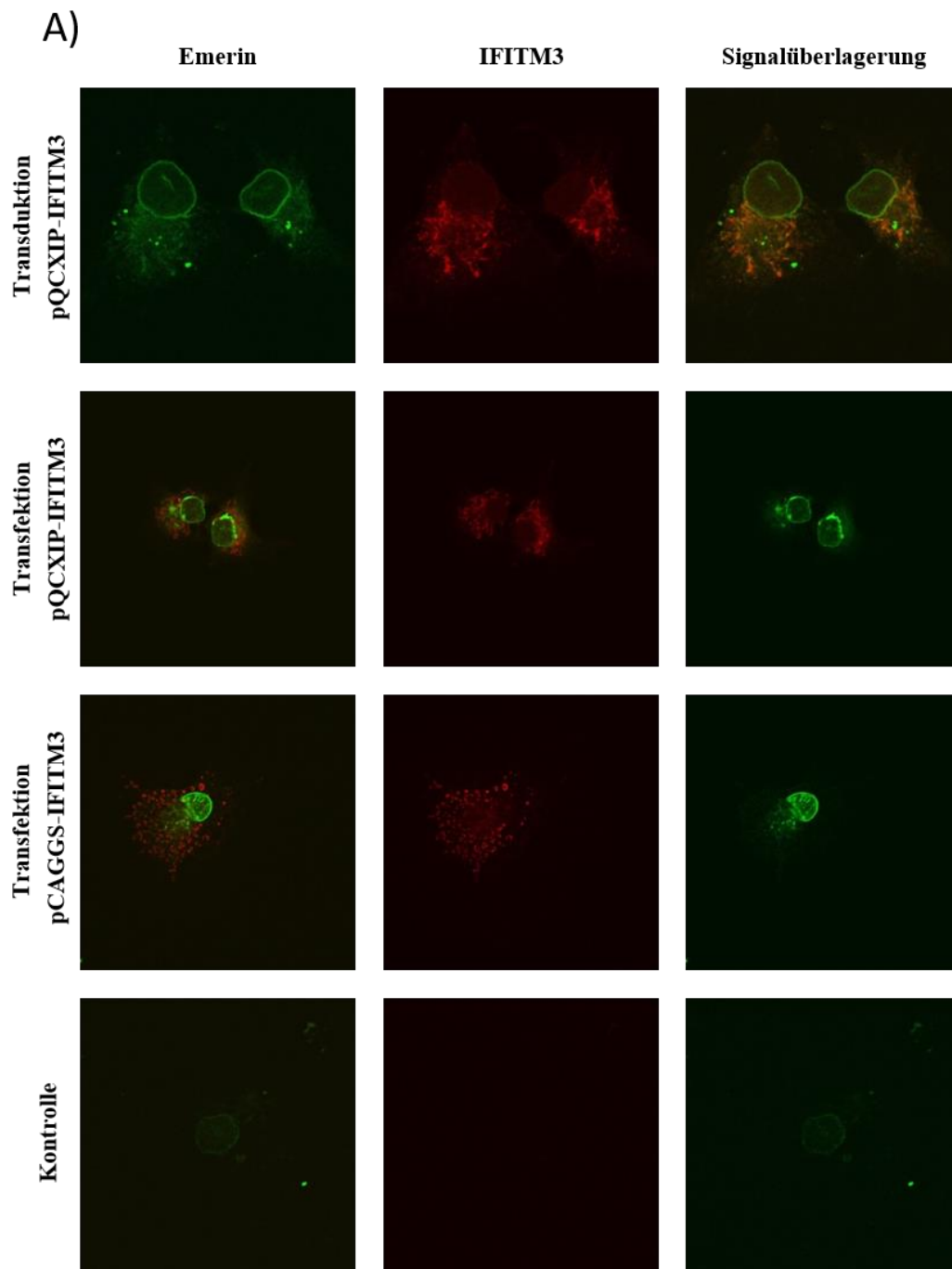
3.11 Kein Unterschied in der Expressionsstärke und subzellulären Lokalisation zwischen IFITM3 in transduzierten und transfizierten Zellen

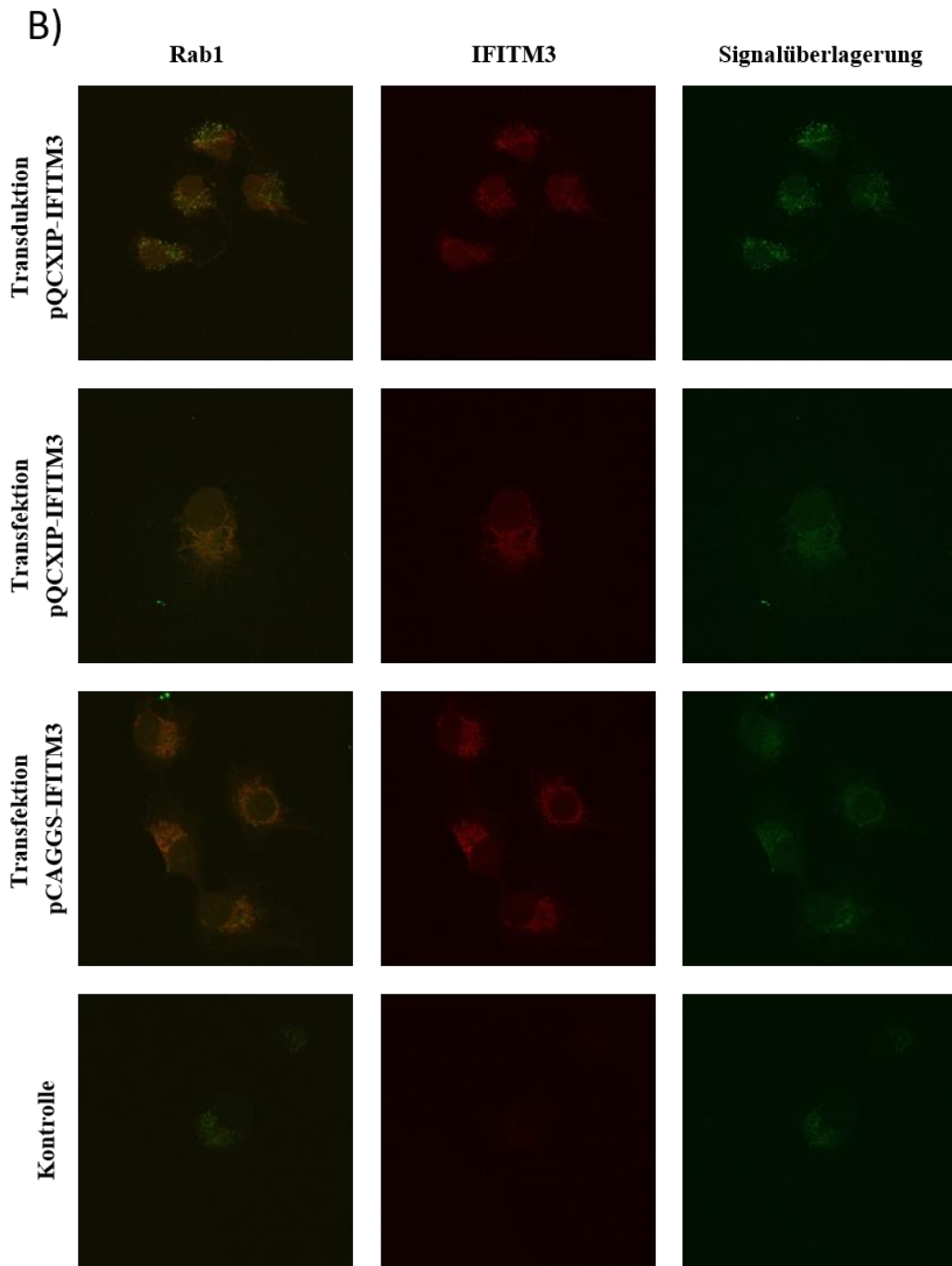
In den vorangegangenen Experimenten wurde eine Diskrepanz in der Wirkung von IFITM3 auf die Infektiosität von MLV-Partikeln mit diversen Glykoproteinen und auf die Replikation von EBOV-trVLPs zwischen transfizierten und transduzierten Zellen beobachtet. Deshalb wurde überprüft, ob die beiden Verfahren Transduktion und Transfektion zu einer unterschiedlichen Lokalisation von IFITM3 in Zellen führt. Die Transfektion könnte beispielsweise zu einer Überexpression von IFITM3 in der Zelle führen, die eine perinukleäre Akkumulation bedingt, wohingegen nach Transduktion in der Zelle synthetisiertes IFITM3 physiologischerweise endosomal und lysosomal zu erwarten wäre. Mittels konfokaler Mikroskopie sollte deshalb die intrazelluläre Lokalisation von IFITM3 überprüft werden. Zellen wurden mit den Plasmiden für fluoreszenzmarkierte Markerproteine verschiedener Zellorganellen und IFITM3 transfiziert bzw. transduziert und die Kolokalisation von IFITM3 und den Markerproteinen untersucht.

Dazu wurden neben 293T-Zellen, Cos7-Zellen ausgewählt, die ein größeres Zytoplasma als 293T-Zellen aufweisen, womit die Position von IFITM3 besser beurteilbar ist. Die Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für fluoreszenzmarkierte Proteine der Kernmembran (Emerin), des Golgi-Apparats (TGN46) oder von Endosomen (Rab1) kodieren und 48 h nach Transfektion mit IFITM3 oder eine Kontrolle (Leervektor) tragenden Transduktionsviren transduziert bzw. mit den Expressionsplasmiden für IFITM3 oder einer Kontrolle transfiziert. Bei der Transfektion wurde IFITM3 sowohl im Kontext des Vektors pCAGGS als auch pQCXIP eingesetzt, um einen möglichen Unterschied zwischen den Vektoren zu detektieren. Als Kontrolle diente die Transfektion mit den Expressionsplasmiden der Markerproteine oder des Leervektors pCAGGS, die nicht mit Sekundärantikörper behandelt wurden sowie die Transfektion von IFITM3- oder pCAGGS-Plasmiden ohne Markerprotein. Zellen, die nicht mit IFITM3-Plasmiden transfiziert oder mit IFITM3 tragenden MLV-Partikeln transduziert wurden, sollten eine geringe endogene IFITM-Genexpression aufweisen. Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen IFITM3 und einem fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper behandelt.

In der konfokalen Mikroskopie zeigte sich, dass IFITM3 unabhängig von natürlicher, endogener Expression oder den zwei verschiedenen zur exogenen Expression verwendeten Verfahren (Transfektion/Transduktion) weder mit Emerin (Abbildung 32A) noch TGN46 (Abbildung 32C) und partiell mit Rab1 (Abbildung 32B) kolokalisierte. Transduktion und Transfektion bedingten somit keine unterschiedliche subzelluläre Position. Das IFITM-Protein 3 konnte in allen Präparaten in zytoplasmatischen Vesikeln nachgewiesen werden. Emerin färbte die Kernmembran an und das zytoplasmatisch lokalisierte IFITM3 zeigte keine Kolokalisation. Mit dem Endosomen-Marker Rab1 zeigte IFITM3 eine partielle Kolokalisation. Der Marker TGN46 kennzeichnete den Golgi-Apparat. Auch hier ergab sich

eine vesikuläre Kolo­kalisierung mit IFITM3. Diese Beobachtung erfolgte in den Cos7-Zellen, in den 293T-Zellen ließ sich die subzelluläre IFITM-Position, aufgrund der geringen Zellgröße, kaum bestimmen (Abbildung nicht gezeigt).





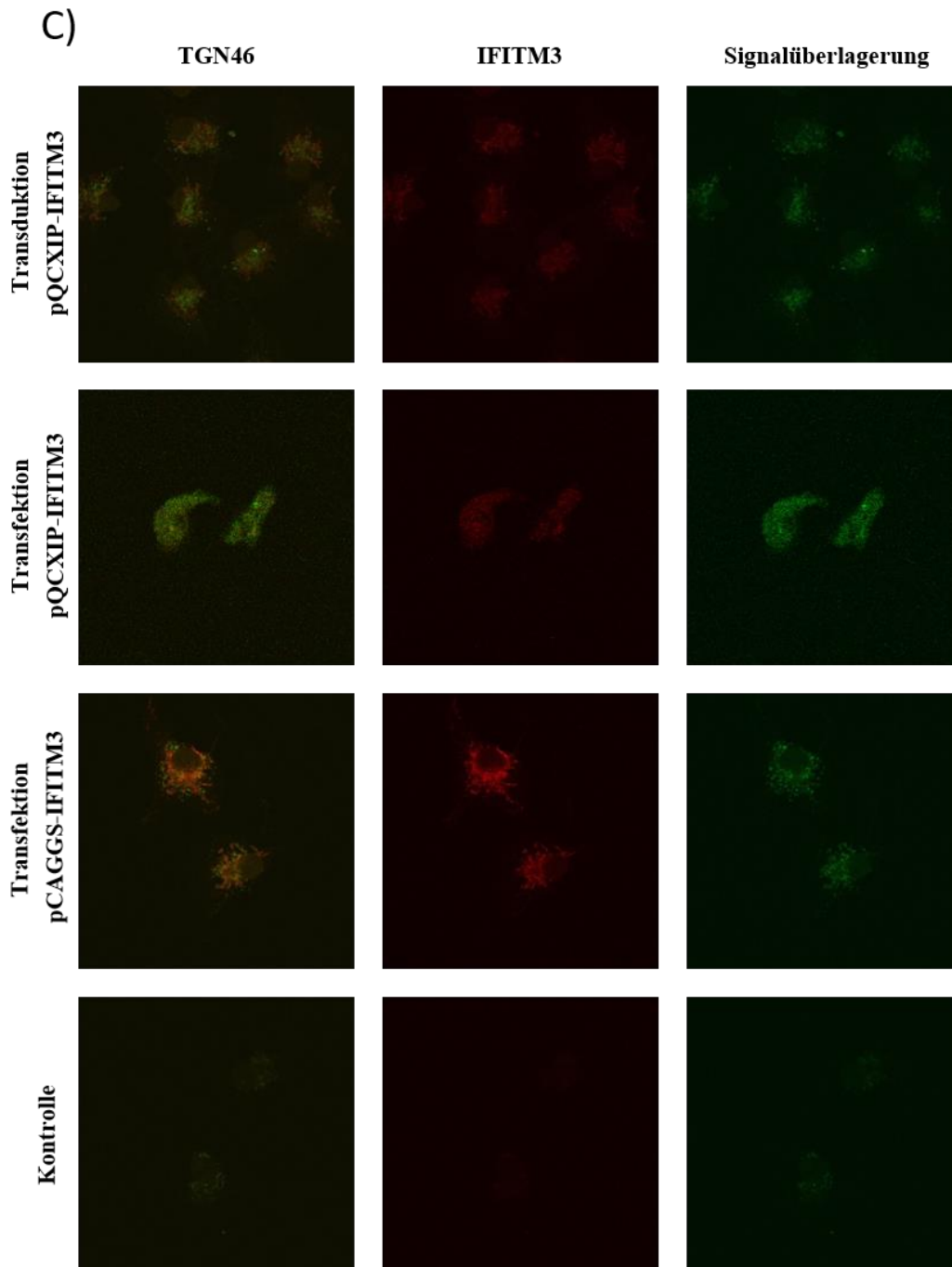


Abbildung 32: Kein Unterschied in der subzellulären Lokalisation von IFITM3 zwischen transduzierten und transfizierten Zellen. Transfektion von Cos7-Zellen mit den Expressionsplasmiden für die Markerproteine (A) Emerin, (B) Rab1 oder (C) TGN46. Nach 24 h erfolgte die Transduktion der Zellen mit IFITM3 tragenden MLV-Partikeln oder die Transfektion mit IFITM3-Plasmiden (pQCXIP oder pCAGGS-Vektor). Nach 48 h wurde eine Fixierung, Permeabilisierung und anschließende Behandlung mit anti-IFITM3-Antikörper sowie anti-Kaninchen-Alexa Fluor 555 sowie dem Farbstoff Hoechst, der die DNA einfärbt, durchgeführt. Als Kontrolle diente die Transfektion mit den Expressionsplasmiden für die Markerproteine und eine ausbleibende Färbung mit Sekundärantikörper. Andere verwendete Kontrollen sind nicht dargestellt. Analyse im Konfokalmikroskop mit 63-fachem Objektiv. Die Bilder sind jeweils repräsentativ für drei bis fünf Aufnahmen jedes Versuchsansatzes in einem Experiment. Links: Markerprotein (GFP), Mitte: IFITM3 (Alexa Fluor 555), Rechts: Signalüberlagerung. IFITM3 ist in den Abbildungen rot gefärbt sichtbar, die Markerproteine sind grün.

4 Diskussion

Interferon-induzierbare Transmembranproteine hemmen den Wirtzeintritt zahlreicher behüllter Viren (Bailey et al. 2014). Vor kurzem wurde zudem gezeigt, dass sie mit der Freisetzung von HIV-1 interferieren. Dabei binden IFITMs das HIV-1-Env-Protein und hemmen dessen proteolytische Spaltung durch die zelluläre Protease Furin (Yu et al. 2015). Außerdem werden sie in Viruspartikel inkorporiert und beeinträchtigen deren Infektiosität (Compton et al. 2014; Tartour et al. 2014; Yu et al. 2015).

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung des Einflusses von IFITMs auf die Freisetzung von HIV-1, HIV-2, SIV, MLV, EBOV und IAV. Die zentralen Ergebnisse sind:

- 1) IFITM3 in transfizierten Zellen reduziert die Infektiosität von MLV-Pseudoviren mit den Glykoproteinen von HIV, SIV, EBOV, MLV und IAV.
- 2) IFITM3 in transfizierten Zellen inhibiert die Prozessierung der Glykoproteine von HIV-1, HIV-2, SIV, EBOV und MLV, aber nicht die Glykoproteinspaltung von IAV.
- 3) IFITM3 in transduzierten Zellen beeinflusst den Zelleintritt, aber nicht die Replikation von Ebolaviren.
- 4) Die Wirkung von IFITM3 unterscheidet sich je nach verwendeter Methode zur Expression in der Zelle (Transfektion, Transduktion).

4.1 IFITM3 in transfizierten Zellen reduziert die Infektiosität von MLV-Pseudoviren mit den Glykoproteinen von HIV, SIV, EBOV, MLV und IAV

Bisher wurde hauptsächlich der Effekt von IFITMs auf den Zelleintritt untersucht. Für HIV-1 konnte jedoch zusätzlich ein Einfluss auf die Virusfreisetzung gezeigt werden.

So werden IFITMs in HIV-1 Virionen inkorporiert und damit deren Fusionsaktivität inhibiert (Compton et al. 2014; Tartour et al. 2014; Yu et al. 2015). Außerdem reduzieren IFITM2 und 3 die Infektiosität von HIV-1-Virionen durch Hemmung der proteolytischen Spaltung von Env (Yu et al. 2015). Dies stellt einen neuen antiviralen Mechanismus der IFITMs dar, der in dieser Arbeit näher untersucht wurde.

Der Einfluss von IFITM3 auf die Freisetzung von Viren wurde mithilfe von retroviralen Pseudoviren untersucht. Mit Hilfe dieses Modellsystems konnte bereits der Einfluss von IFITMs auf den viralen Zelleintritt nachvollzogen werden (Brass et al. 2009; Huang et al. 2011).

Die verwendeten 293T-Zellen lassen sich gut transfizieren und sind in der Analyse der antiviralen Rolle von IFITMs etabliert (Brass et al. 2009; Huang et al. 2011; Tartour et al. 2014; Yu et al. 2015). Um den Einfluss anderer viraler Proteine auf die beschriebenen

Beobachtungen nachzuvollziehen, sollten diese Ergebnisse mit replikationsfähigen Viren und den menschlichen Zielzellen der entsprechenden Viren (wie CD4⁺-T-Lymphozyten und Makrophagen für HIV (Knipe und Howley 2013) bestätigt werden.

In dieser Arbeit zeigte IFITM3 weder in transfizierten noch in transduzierten Zellen einen Einfluss auf die Freisetzung von Viruspartikel mit den Glykoproteinen von MLV, EBOV und IAV. IFITM3 inhibierte jedoch die Freisetzung von MLV-Partikeln mit HIV-1-Env und im geringeren Maße ebenfalls die Freisetzung von Partikeln mit SIV-Env. Tartour et al. (2014) zeigten einen geringen Einfluss von IFITMs auf die Produktion von infektiösen HIV-1-Partikeln.

Zudem konnte gezeigt werden, dass IFITM3 in MLV-Partikel mit dem Glykoprotein von HIV-1 inkorporiert wird und im Zellkulturüberstand von MLV-Partikeln mit den Glykoproteinen von SIV, MLV, EBOV und IAV detektierbar ist. Dies entspricht den bisherigen Ergebnissen, nach denen IFITM-Proteine in HIV-1-Virionen inkorporiert werden und dort ebenfalls den Wirtszelleintritt der entsprechenden Viren blockieren (Compton et al. 2014; Tartour et al. 2014; Yu et al. 2015). Die Inkorporation in MLV-Partikel scheint unabhängig vom viralen Glykoprotein zu erfolgen. Tartour et al. (2014) beschrieben bereits, dass eine passive Inkorporation von IFITMs in virale Partikel, aufgrund der breiten Verteilung der IFITMs in Zellmembranen und den Gemeinsamkeiten in der Virusassemblierung, nicht überraschend sei. Auch die Aufnahme von IFITMs in die Membran von Exosomen spricht für eine passive, virusunabhängige Inkorporation der IFITMs (Zhu et al. 2015).

Das IFITM-Protein 3 in transfizierten Zellen reduzierte die Infektiosität von Viruspartikeln mit den Glykoproteinen von HIV, SIV, MLV, EBOV und IAV. Zuvor war dies nur für HIV-1, HIV-2 und SIV bekannt (Compton et al. 2014; Tartour et al. 2014; Yu et al. 2015). Der genaue Mechanismus ist unklar. Zudem sollten, bei zum Teil nicht signifikanten Ergebnissen, weitere Bestätigungsexperimente folgen. Tartour et al. (2014) präferierten die Inkorporation von IFITMs in Viruspartikel als Grund für die beeinträchtigte Infektiosität. So könnten IFITMs in viralen Membranen den gleichen Effekt wie IFITMs in Wirtszellmembranen haben und beispielsweise die Hemifusion stören (Amini-Bavil-Olyae et al. 2013; Li et al. 2013). Yu et al. (2015) beobachteten hingegen keine Korrelation zwischen der Inkorporation von IFITMs und der reduzierten Infektiosität. So wurde IFITM1 mit dem geringsten antiviralen Effekt am meisten in Viruspartikel inkorporiert (Yu et al. 2015). Auch in dieser Arbeit wurde keine Korrelation zwischen der Menge von IFITM3 im Zellkulturüberstand und der Infektiosität der entsprechenden Viruspartikel beobachtet. Es wäre sinnvoll, die Infektiosität von Viruspartikeln, die in Gegenwart von nicht in virale Membranen inkorporierbare, aber antiviral wirksame IFITM-Mutanten produziert wurden, zu analysieren, um zu sehen, welchen Einfluss die Inkorporation auf die Virusinfektiosität hat.

Yu et al. (2015) schlugen als weitere Ursache der reduzierten Virusinfektiosität einen Effekt der IFITMs auf den Virusrezeptor, Co-Rezeptor oder auf Co-Faktoren der Virus-

Wirtszellbindung vor, konnten jedoch keinen Einfluss der IFITMs auf die Oberflächenexpression dieser Strukturen nachweisen.

Eine weitere mögliche Ursache der verminderten Infektiosität wäre die IFITM-vermittelte Modulation der viralen Genexpression und/oder deren Funktion, welche zu einer beeinträchtigten Virusproduktion oder defekten Virionen führt (Yu et al. 2015). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass IFITM3 die Menge an produzierten Viruspartikeln nicht verändert und somit keinen direkten Einfluss auf die Virusproduktion hat. In Zelleintrittsanalysen konnte jedoch gezeigt werden, dass IFITMs die Synthese von HIV-Gag-p55 und dessen Prozessierungsprodukt HIV-Gag-p24 sowie die Synthese von HCV-Proteinen hemmen (Lu et al. 2011; Yao et al. 2011; Ding et al. 2014; Narayana et al. 2015). Eine genexpressionsabhängige Hemmung der viralen Infektiosität durch die IFITMs müsste daher unabhängig von der Virusproduktion sein. Es bleibt deshalb zu untersuchen, ob IFITMs in produzierenden Zellen die Funktion der viralen Proteine beeinträchtigen und so zu einer verminderten Infektiosität führen. Schließlich könnte auch eine Interaktion mit dem viralen Glykoprotein zu weniger infektiösen Viren führen, was im Folgenden diskutiert wird.

Insgesamt zeigte sich bisher, dass IFITMs in Virusproduzentenzellen keinen Einfluss auf die Menge an freigesetzten Pseudoviren mit MLV-Env, EBOV-GP und IAV-HA haben, aber passiv in die Viruspartikeln inkorporiert werden und so deren Infektiosität durch einen noch ungeklärten Mechanismus reduzieren.

4.2 IFITMs in transfizierten Zellen inhibieren die Prozessierung der Glykoproteine von HIV-1, HIV-2, SIV, EBOV und MLV, aber nicht die Glykoproteinspaltung von IAV

Tartour et al. (2014) beobachteten, dass die Inkorporation von IFITMs keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von HIV-Env hat. Allerdings beeinflussen IFITMs die Spaltung von HIV-1-Env, die mit der reduzierten Virioneninfektiosität korreliert (Yu et al. 2015). Yu et al. (2015) zeigten ebenfalls, dass IFITM2 und 3 HIV-1-gp41 binden und die Env-Prozessierung inhibieren, was zu einer Akkumulation des Vorläuferproteins gp160 und einer reduzierten Spaltung in gp41 und gp120 führt. Die beeinträchtigte Env-Prozessierung und die vermehrte extrazelluläre Freisetzung von gp120 reduzieren die virale Fusionsaktivität (Yu et al. 2015).

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass IFITM2 und 3 die Prozessierung von HIV-1-Env inhibieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IFITM2 und 3 auch die Spaltung von HIV-2-Env, SIV-Env, MLV-Env, EBOV-GP und SUDV-GP inhibieren. Die Inhibition der Spaltung durch die IFITMs könnte eine Erklärung für die reduzierte Infektiosität der in Gegenwart von IFITMs produzierten Viruspartikeln mit den entsprechenden Glykoproteinen sein.

HIV-Env wird im Verlauf des Transports über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche durch Furin in den luminalen (gp120) und den membranverankerten Proteinanteil (gp41) gespalten (Sundquist und Kräusslich 2012; Knipe und Howley 2013). Analog dazu wird das MLV-Env-Vorläuferprotein GP85 (85 kDa) posttranslational wahrscheinlich von Trypsin oder Trypsin-ähnlichen Enzymen zu GP70 und Pr15E gespalten (Sjöberg et al. 2014). Auch das Glykoprotein von EBOV wird im Golgi-Apparat von Subtilisin-ähnlichen Proteasen, insbesondere durch Furin, gespalten (Sanchez et al. 1998; Volchkov et al. 1998). Es ist daher nicht überraschend, dass IFITMs die Glykoproteinprozessierung sowohl von Retroviren (HIV, SIV, MLV), als auch Filoviren (EBOV, SUDV) inhibieren, da diese in allen Fällen posttranslational durch Proteasen erfolgt. Ob IFITMs dabei, wie mit HIV-1-Env, ebenfalls direkt mit den Glykoproteinen anderer Viren interagiert und so deren Prozessierung verhindert, bleibt z. B. mittels Koimmunopräzipitation zu untersuchen. Yu et al. (2015) zeigten außerdem, dass HIV-1 der hemmenden Wirkung von IFITMs durch Mutation von Env entkommen kann. Es wäre daher naheliegend, Glykoproteinmutanten anderer Viren auf einen Verlust der IFITM-vermittelten Restriktion zu analysieren. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Glykoproteinen wurde die Prozessierung von IAV-HA mittels Tmprss2 durch die Präsenz von IFITM-Proteinen nicht beeinflusst.

HA0 wird im späten Endosom durch zelluläre Proteasen, wie Furin und Tmprss2, in HA1 und HA2 gespalten (Stieneke-Gröber et al. 1992; Huang et al. 2003; Böttcher et al. 2006; Szewczyk et al. 2014). Dies erfolgt also im Gegensatz zu den anderen untersuchten Viren erst während des Zelleintritts. IFITM 2 sowie 3 sind zwar im Endosom lokalisiert, allerdings spräche eine Inhibition in diesem Stadium eher für einen Einfluss auf den Viruseintritt und nicht auf die gemessene Virusproduktion. Bereits in anderen Arbeiten wurde ein Unterschied im Wirkmechanismus von IFITM-Proteinen in der antiviralen Aktivität gegen IAV und EBOV festgestellt. So konnte in Viruseintrittsanalysen Amphotericin B die IFITM-induzierte Hemmung von IAV und SIV, aber nicht EBOV aufheben (Lin et al. 2013; Qian et al. 2015; Wrensch et al. 2015). Auch der Vergleich von IAV und HIV-1 deutet auf Unterschiede in der Wirkungsweise hin. IFITMs reduzierten sowohl in Ziel- als auch in Virusproduzentenzellen die virale Fusionsaktivität von IAV, während die Fusionsaktivität von HIV-1 in Zielzellen nur geringfügig und sehr viel stärker in Produzentenzellen vermindert wurde (Lu et al. 2011; Yu et al. 2015). Dies spricht dafür, dass IFITMs Zelleintritt und Freisetzung von IAV und HIV-1 durch unterschiedliche Mechanismen inhibieren.

Die Inhibition der Glykoproteinspaltung wurde vor allem für IFITM2 sowie 3 und nur im geringen Maße für IFITM1 beobachtet. Das könnte daran liegen, dass sich IFITM1 gehäuft in der Plasmamembran befindet, wohingegen IFITM2 sowie 3 vor allem subzellulär und somit in räumlicher Nähe zu den viralen Glykoproteinspaltungen liegen (Li et al. 2013; Jia et al. 2014).

Die durch IFITMs reduzierte Infektiosität der Viruspartikel kann jedoch nicht vollständig durch die IFITM-vermittelte Inhibition der Glykoproteinprozessierung erklärt werden.

Neumann et al. (2002, 2007) zeigten, dass die Glykoproteinspaltung durch Furin für den Zelleintritt und die Replikation von Pseudoviren nicht nötig ist und die Infektiosität von rekombinanten EBOV nicht beeinflusst. Für MLV-Env zeigte sich mit über 80 % die stärkste Reduktion der Infektiosität in Gegenwart von IFITM3. Für MLV-Partikel mit EBOV-GP wurde eine Abnahme von etwa 50 % beobachtet, die Hemmung der GP-Spaltung durch IFITM3 ist in beiden Fällen vergleichbar stark. Im Fall von MLV-Env wurde versucht, die Partikelinfektiosität durch die unterstützende Glykoproteinspaltung mit extern hinzugefügtem Trypsin wiederherzustellen. Die Zugabe von Trypsin hatte jedoch nur einen geringen Effekt auf die Infektiosität. Dies ist im Einklang mit der publizierten Wirkung von Trypsin auf die MLV-Env-Prozessierung, die als schwach beschrieben wird (Sjöberg et al. 2014). Das bedeutet, dass IFITMs entweder noch einen sekundären inhibitorischen Effekt auf MLV-Env haben, die Hemmung der Prozessierung so stark ist, dass selbst durch einen Trypsin-Überschuss keine erhebliche Gegenregulation erreicht werden kann oder, dass andere Proteasen als Trypsin eine stärkere Rolle in der Glykoproteinspaltung spielen. Des Weiteren haben IFITMs laut Brass et al. (2009) keinen Einfluss auf den MLV-Env vermittelten Zelleintritt. Die beobachtete stark reduzierte Infektiosität der Viruspartikel spricht demzufolge dafür, dass IFITMs im Falle des Retrovirus MLV nicht im Stadium des Viruseintritts, sondern bei der Freisetzung agieren. Auch das Retrovirus HIV-1 wird durch IFITMs stärker bei der Virusfreisetzung, als im Eintritt inhibiert (Yu et al. 2015), was einen gemeinsamen IFITM-vermittelten Hemmmechanismus für Retroviren nahelegt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass IFITM2 und 3 die Glykoproteinspaltung von HIV-1, HIV-2, SIV, MLV, EBOV und SUDV inhibieren. Diese Hemmung scheint jedoch nicht direkt mit der reduzierten Infektiosität der Viruspartikel zu korrelieren.

4.3 IFITM3 in transduzierten Zellen beeinflusst den Eintritt, aber nicht die Replikation von EBOV-trVLPs

In dieser Arbeit wurde weder in transfizierten noch in transduzierten Zellen ein Einfluss von IFITM3 auf die Freisetzung von Viruspartikeln mit EBOV-GP beobachtet. Mithilfe von EBOV-trVLPs wurde untersucht, ob IFITM3 einen Einfluss auf den Eintritt und die Replikation von EBOV hat. In anderen Publikationen wurde bereits gezeigt, dass IFITMs den EBOV-GP vermittelten Zelleintritt inhibieren (Huang et al. 2011; Wrensch et al. 2015). Hier konnte dies mit authentischen EBOV-trVLPs bestätigt werden. Nach wie vor ist der Mechanismus dieser Hemmung ungeklärt.

Bisher gibt es keine Studien, ob IFITMs direkt die Replikation von EBOV beeinflussen. Allerdings ist bekannt, dass IFITMs die Bildung von HIV-Gag-p55, HIV-Gag-24 und die Produktion von HCV-Proteinen hemmen, was darauf hinweist, dass IFITMs ebenfalls einen direkten Einfluss auf die virale Genexpression oder auf die Proteintranslation ausüben (Lu et al. 2011; Yao et al. 2011; Ding et al. 2014; Narayana et al. 2015).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFITM3 in transduzierten Zellen die Replikation von EBOV nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde die Replikation in transfizierten Zellen durch IFITM3 deutlich gehemmt. Das Ergebnis in den transduzierten Zellen scheint allerdings verlässlicher, da in den transfizierten Zellen auch die IFITM3-Mutanten, für die in Zelleintrittsexperimenten gezeigt wurde, dass sie nicht antiviral aktiv sind (Wrensch et al. 2015), die Replikation von EBOV-trVLPs hemmten. Hierzu müsste jedoch überprüft werden, ob die genutzten IFITM3-Mutanten im Zellaustritt ebenso wenig antiviral aktiv sind, wie im Zelleintritt. In transduzierten Zellen hatte IFITM3 keinen Einfluss auf die Infektiosität der MLV-Pseudoviren mit EBOV-GP, während IFITM3 in transduzierten Zellen zu einer deutlich verminderten Infektiosität führte. Dies scheint mit den Resultaten zur EBOV-Replikation zu korrelieren, allerdings sollte eine verminderte Replikation auch zu einer reduzierten Freisetzung von Viruspartikeln führen, was in den vorherigen Experimenten weder in transfizierten, noch in transduzierten Zellen der Fall war. Alternativ könnte IFITM3 auch zu defekten Viruspartikeln führen, sodass sowohl die Luziferaseaktivität als Marker für die Replikation, als auch die Infektiosität der Viruspartikel vermindert wären, die Partikelzahl und deren Freisetzung jedoch unbeeinflusst blieben.

Des Weiteren reduzierte in Partikel inkorporiertes IFITM3 in dieser Arbeit die Infektiosität von EBOV-GP-tragenden MLV-Partikeln weniger stark, als die von MLV-Partikeln mit anderen Glykoproteinen. Es war daher interessant zu untersuchen, ob EBOV-GP oder andere EBOV-Proteine als IFITM3-Antagonisten fungieren, so wie viele andere Viren im Laufe der Evolution Antagonisten gegen antivirale Wirtszellproteine entwickelt haben (Haller et al. 2006; Versteeg und García-Sastre 2010; Duggal und Emerman 2012). In dieser Arbeit wurde kein bzw. ein geringer Einfluss von EBOV-Proteinen auf die Oberflächenexpression von IFITM3 festgestellt. Bisher sind keine viralen Proteine bekannt, die IFITMs antagonisieren. Für andere Interferon-induzierbare Gene, wie Tetherin, ein Restriktionsfaktor gegen u. a. Retroviren, Flaviviren, Herpesviren und Arenaviren, sind hingegen virale Antagonisten identifiziert worden. So agieren Vpu (HIV-1), Env (HIV-2) und EBOV-GP als Tetherin-Antagonisten (Kaletsky et al. 2009; Duggal und Emerman 2012; McNatt et al. 2013). Möglich wäre, dass EBOV-Proteine zwar keinen Einfluss auf die IFITM3-Oberflächenexpression haben, aber die antivirale Wirksamkeit durch einen anderen Mechanismus vermindern. Es bleibt zu erforschen, wie IFITM3 die Infektiosität von Viren vermindert, um zu klären, warum EBOV resistenter als die anderen untersuchten Viren erscheint. Interessant wäre es zudem, auch andere, insbesondere IFITM-resistente Viren wie Arenaviren (Brass et al. 2009), auf IFITM antagonisierende Proteine zu untersuchen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IFITM3 nicht nur den Zelleintritt von MLV-Partikeln mit EBOV-GP, sondern auch von authentischen EBOV-trVLPs hemmt, und dass IFITM3 keine Wirkung auf die Replikation von EBOV hat. Die IFITM-vermittelte Inhibition des Eintritts und der Freisetzung von EBOV scheint somit nicht durch einen Einfluss auf die Replikation bedingt zu sein.

4.4 Die Wirkung von IFITM unterscheidet sich je nach verwendeter Methode zur Expression in der Zelle (Transfektion, Transduktion)

Zur Analyse der antiviralen Aktivität von IFITMs wurden 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für IFITMs transfiziert oder mit retroviralen Vektoren transduziert, die für IFITMs kodieren. Beide Verfahren sind in vorangegangenen Arbeiten zu IFITM-Proteinen bereits angewandt wurden (Tartour et al. 2014; Wrensch et al. 2014; Wrensch et al. 2015).

In dieser Arbeit wurden erhebliche Unterschiede zwischen der Wirkung von IFITMs in transfizierten und transduzierten Zellen festgestellt (Tabelle 35).

Tabelle 35: Unterschiedliche Ergebnisse je nach verwendeter Methode

Experiment	Methode	IFITM-Wirkung
GP-Prozessierung	Transfektion	Reduktion
	Transduktion	Kein Einfluss
Freisetzung von Pseudoviren	Transfektion	Kein Einfluss
	Transduktion	Kein Einfluss
Inkorporation in Pseudoviren	Transfektion	Inkorporation
	Transduktion	Inkorporation
Infektiosität von Pseudoviren	Transduktion	Reduktion
	Transfektion	Kein Einfluss
Freisetzung von VLPs	Transduktion	Kein Einfluss
Replikation von EBOV-trVLPs	(zeitversetzte) Transfektion	Inhibition
	Transduktion	Kein Einfluss
Eintritt von EBOV-trVLPs	Transfektion	Inhibition
	Transduktion	Inhibition
Lokalisation von IFITM in der Zelle	Transfektion vs. Transduktion	Kein Unterschied

In transfizierten 293T-Zellen produziertes IFITM3 wurde in Viruspartikeln mit den Glykoproteinen von HIV, SIV, EBOV, MLV und IAV inkorporiert, zeigte keinen Einfluss auf deren Freisetzung, reduzierte jedoch deren Infektiosität. Des Weiteren inhibierte IFITM3 in transfizierten Zellen die Glykoproteinspaltung von HIV-1, HIV-2, SIV, EBOV und MLV, aber nicht von IAV. Schließlich konnte ein Einfluss von IFITM3 auf die Replikation und den Zelleintritt von EBOV-trVLPs in transfizierten Zellen beobachtet werden.

In transduzierten 293T-Zellen wurde IFITM3 in Viruspartikel mit den Glykoproteinen von HIV, SIV, EBOV, MLV und IAV inkorporiert und hatte weder einen Einfluss auf deren Freisetzung noch auf deren Infektiosität. Auch die Freisetzung von EBOV- und HIV-VLPs

wurde durch IFITM3 nicht inhibiert. In transduzierten Zellen zeigte IFITM3 weder einen Effekt auf die Prozessierung von Filovirus-GPs (RESTV-GP, TAFV-GP, SUDV-GP, EBOV-GP, LLOV-GP und MARV-GP) noch auf die Prozessierung von Retrovirus-Env-Proteinen (HIV-1-Env, HIV-2-Env, SIV-Env und MLV-Env). Außerdem zeigte IFITM3 keinen Einfluss auf die Replikation von EBOV-trVLPs, verhinderte jedoch deren Zelleintritt. Es stellt sich die Frage, warum IFITMs in transfizierten und transduzierten Zellen anders auf Viren wirken.

Eine Möglichkeit für die unterschiedliche Wirkung von IFITM-Proteinen in transfizierten und transduzierten Zellen, wären Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den beiden Systemen. Eine Überproduktion von IFITM3 könnte so zu einem hemmenden Effekt auf Viren führen. Zu Beginn der Arbeit wurden jedoch die Mengen an produziertem IFITM3 in transfizierten und transduzierten Zellen aufeinander abgestimmt, sodass diese Erklärungsmöglichkeit wenig wahrscheinlich ist.

Darüber hinaus könnte die Inkorporation von IFITMs in virale Partikel eine Rolle in der Wirkung von IFITMs spielen, sollte sich diese zum Beispiel in der Verteilung und der Dichte von IFITM-Proteinen über die Zellmembran zwischen transfizierten und transduzierten Zellen unterscheiden. Allerdings konnte weder in dieser Arbeit noch in den Experimenten von Yu et al. (2015) eine Korrelation zwischen dem Einfluss von IFITMs auf Viruspartikel und der Stärke der Inkorporation in diese beobachtet werden.

Eine weitere Möglichkeit der unterschiedlichen IFITM3-Wirkung wäre, dass die beiden Verfahren Transduktion und Transfektion zu einer unterschiedlichen Lokalisation von IFITM3 in Zellen führt. Bei der Transfektion wurden DNA-Plasmide mit Calciumchlorid und einer phosphathaltigen Lösung gemischt. Dabei entstehenden Kristalle, die von der Zelle aufgenommen werden können. Die DNA wird bei der Zellteilung in den Kern aufgenommen und dann von zellulären Enzymen transkribiert und translatiert. Die Transfektion könnte schließlich zu einer Überexpression von IFITM3 mit perinukleärer Akkumulation in der Zelle führen. In den Transduktionsexperimenten wurden 293T-Zellen dagegen mit für IFITM3 kodierenden MLV-Vektoren transduziert. Das Glykoprotein VSV-G bindet an den *Low Density Lipoprotein*-Rezeptor, das Virus fusioniert mit der Zelle und die RNA wird in das Wirtszellzytoplasma freigesetzt. Die virale reverse Transkriptase übersetzt die RNA in doppelsträngige komplementäre DNA, welche in den Zellkern transportiert und mithilfe der viralen Integrase kovalent in das Wirtsgenom integriert wird. In der Proteinbiosynthese wird IFITM3 von zellulären Enzymen synthetisiert und endosomal sowie lysosomal lokalisiert. IFITM3 in transduzierten Zellen wäre somit endosomal sowie lysosomal zu erwarten (Jia et al. 2014).

Mit konfokaler Mikroskopie wurde kein Unterschied in der subzellulären Lokalisation von IFITM3 zwischen den Verfahren gefunden. Endogen produziertes sowie IFITM3 in transfizierten und transduzierten Cos7-Zellen befand sich in Vesikeln zwischen den Endosomen. Um eine genaue Aussage über die Relevanz der subzellulären Lokalisation von

IFITM3 für die Experimente zu treffen, müsste die konfokale Mikroskopie mit 293T-Zellen wiederholt werden, da diese für sämtliche Experimente genutzt wurden. Das Zytoplasma von 293T-Zellen ist jedoch sehr klein, sodass die Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen in diesen Zellen schwierig ist. Außerdem ist ein Unterschied in der Proteinlokalisierung zwischen Cos7- und 293T-Zellen wenig wahrscheinlich.

Schließlich könnte auch eine unterschiedliche Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch Transfektion und Transduktion beobachteten Unterschiede hervorrufen. Die bei der Transfektion durchgeführte Überflutung der Zelle mit DNA könnte andere Teile des angeborenen Immunsystems aktivieren als der virale Gentransfer mit RNA der Transduktion.

Neben den Toll-like-Rezeptoren (TLR) TLR7 und TLR9, welche endosomale und eventuell autophagozytierte DNA erkennen (Hemmi et al. 2000; Ahmad-Nejad et al. 2002; Lee et al. 2007), gibt es zytoplasmatische DNA-Sensoren wie die cGMP-AMP Synthase sowie AIM2 (Bürckstümmer et al. 2009; Fernandes-Alnemri et al. 2009; Hornung et al. 2009; Sun et al. 2013, S. 20). Außerdem gibt es DNA-Sensorproteine, wie IFI16, RNA-Polymerase III sowie Mre11-Rad50, die eine wichtige Rolle in der Transkription und in DNA-Reparaturprozessen ausüben, aber auch das Immunsystem durch die Bindung von zytoplasmatisch und im Nukleus lokalisierter DNA aktivieren können (Ablasser et al. 2009; Chiu et al. 2009; Unterholzner et al. 2010; Roth et al. 2014). Die Erkennung der DNA durch PRRs führt über verschiedene Zellwege (u. a. Aktivierung von NF- κ B) zur Synthese von IFN Typ I und anderen Entzündungsfaktoren (Paludan und Bowie 2013; Paludan 2015). Interferone können in benachbarten Zellen den JAK/STAT-Signalweg und damit die Expression von Interferon-stimulierten Genen (ISGs), wie IFITMs initiieren (Stark und Darnell 2012).

Virale RNA aktiviert u. a. verschiedene TLRs, RIG-I sowie MDA5 und führt somit ebenfalls zur Genexpression von IFN Typ 1, welches zur Synthese von IFITMs führt (Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006; Züst et al. 2011; Jensen und Thomsen 2012). Das Ausmaß der IFN-Antwort hängt von der RNA-Sequenz ab, so resultiert ein nur gering ausgeprägter Unterschied zwischen der extern zugeführten RNA und der Wirtszell-RNA in einer schwächer ausgeprägten Immunantwort (Vabret et al. 2012; Vabret et al. 2014).

Die Verfahren Transfektion und Transduktion haben somit die Aktivierung verschiedener Faktoren der angeborenen Immunabwehr zur Folge, welche die Wirkung von IFITMs beeinflussen könnte. Interessant wäre es zu untersuchen, wie sich die IFN-Stimulation zwischen Transfektion und Transduktion qualitativ und quantitativ unterscheidet, um zu sehen, ob der Unterschied in der Aktivierung des Immunsystems durch die Verfahren auch zu einem Unterschied in der Art und Menge an produzierten IFN und letztlich IFITM führt.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit wichtige Erkenntnisse zur antiviralen Wirkung von IFITMs gewonnen werden. Bis dahin wurde vor allem der Einfluss von IFITMs auf den Zelleintritt von Viren untersucht. Über die Wirkung von IFITMs nach Eintritt in die Wirtszellen war wenig bekannt und nur für HIV wurde eine Inhibition der

Glykoproteinspaltung sowie eine reduzierte Infektiosität gezeigt. In dieser Arbeit konnte eine IFITM3-vermittelte reduzierte Infektiosität nicht nur von HIV, sondern auch SIV, EBOV, MLV und IAV nachgewiesen werden. Außerdem inhibiert IFITM3 neben der Prozessierung von HIV-Env, auch die Spaltung von SIV-Env, EBOV-GP und MLV-Env, allerdings nicht die von IAV-HA. Das Wirkspektrum von IFITMs kann damit auf den Zellaustritt ausgedehnt werden, was einen wichtigen Schritt im Verständnis der Wirkungsweise von IFITMs darstellt. Durch die Entdeckung von zusätzlichen Angriffspunkten im Lebenszyklus von Viren zeigt sich, dass IFITM3 potenter ist, als ursprünglich angenommen und ein wichtiges antivirales Protein im humanen Immunsystem darstellt. Mit der Inhibition des Virusaustritts erweitert sich auch das antivirale Spektrum, da Viren, deren Zelleintritt durch IFITMs nicht beeinträchtigt wurde, potenziell im Zellaustritt beeinflusst werden können, wie in dieser Arbeit für MLV gezeigt wurde.

Viren haben gegen viele antivirale Proteine, wie Tetherin, Antagonisten entwickelt, um ihre Ausbreitung zu sichern. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass EBOV, ein Virus mit extrem hoher Sterberate, welches selbst nach der Ebolaepidemie 2014-2016 sporadisch noch in Afrika auftritt und dessen Erforschung deshalb von höchster Relevanz ist, die IFITM3-Oberflächenexpression nicht beeinflusst. Allerdings wurde in dieser Arbeit deutlich, wie viele Angriffsziele im viralen Lebenszyklus IFITM3 hat, sodass EBOV-Proteine ein anderes Ziel als die IFITM3-Oberflächenexpression antagonisieren könnten. Mit der großen Zahl an Angriffsorten wird es für Viren jedoch auch schwierig, eines potent genug zu inhibieren, dass die antivirale Wirkung an den anderen Angriffsorten nebensächlich wird. Weitere Antagonisten sind dennoch zu suchen, da sich hier auch ein Ziel für antivirale Medikamente anbietet.

Aktuell zeigt sich im Zuge der COVID-19-Pandemie, wie wichtig die Erforschung des Lebenszyklus von Viren ist. Oft ist es schwierig, eine gezielte Therapie gegen Infektionen zu finden und Impfstoffe zu entwickeln, auch unter dem Aspekt, dass sich Viren durch Mutationen der gezielten Therapie entziehen können. Das kompetente Immunsystem ist durchaus in der Lage gegen virale Infektionen anzukämpfen, weshalb die Analyse seiner Komponenten helfen kann, zu verstehen, wie Viren in ihrer Ausbreitung behindert werden können und welche Möglichkeiten es gibt, dieses therapeutisch zu unterstützen. Besonders IFITMs mit ihrem breiten antiviralen Spektrum und vielen Angriffsorten im viralen Lebenszyklus, stellen eine der Komponenten im Immunsystem dar, die immer besser verstanden wird und daher an Bedeutung gewinnt. Deshalb ist die weitere Erforschung der antiviralen Aktivität von IFITM-Proteinen von großer Wichtigkeit.

5 Zusammenfassung

Virale Infektionen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Da nur unzureichende Therapieoptionen vorhanden sind und die hohe Mutationsrate vieler Viren eine schnelle Resistenzentwicklung zur Folge hat, sind dringend neue Therapieansätze notwendig. Das Interferon-System hemmt Viren und ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Interferon-induzierte antivirale Effektoren blockieren verschiedene Schritte des viralen Lebenszyklus und die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen könnte wertvolle Hinweise für die Entwicklung neuer antiviraler Medikamente liefern. Zu diesen antiviralen Effektoren zählen die Interferon-induzierten Transmembranproteine (IFITMs), welche den Wirtszelleintritt von zahlreichen umhüllten Viren wie Influenza-A-Virus, Ebolavirus und humanes Immundefizienz-Virus inhibieren. Dabei wurde gezeigt, dass IFITMs die Fusion von Virushülle und zellulärer Membran blockieren und dass ihr Einbau in humane Immundefizienz-Viren deren Infektiosität reduziert. Außerdem wurde beschrieben, dass IFITMs die Spaltung des Glykoproteins des humanen Immundefizienz-Virus durch die zelluläre Protease Furin hemmen. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob IFITMs auch in andere Viruspartikel inkorporiert werden und deren Freisetzung sowie Infektiosität modulieren. Zudem sollte untersucht werden, ob IFITMs auch mit der Glykoproteinprozessierung anderer Viren interferieren. Mittels retroviraler Pseudoviren und transients Transfektion konnte gezeigt werden, dass IFITM3 unabhängig von viralen Glykoproteinen in Viruspartikel inkorporiert wird und so deren Infektiosität reduziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die transiente Expression vom IFITM3 nicht nur die Spaltung des Glykoproteins des humanen Immundefizienz-Virus, sondern auch die Spaltung anderer viraler Glykoproteine hemmt. Durch die Verwendung eines Plasmidsystems, das die Herstellung von vermehrungsfähigen Ebolavirus-ähnlichen Partikeln erlaubt, konnte kein Einfluss von IFITM3 auf die Replikation von Ebolavirus festgestellt werden, welcher die IFITM3-vermittelte Inhibition des Eintritts und die Freisetzung von Ebolavirus erklären könnte. Schließlich wurde untersucht, ob das Ebolavirus für Proteine kodiert, die die antivirale Wirkung vom IFITM3 blockieren. Expressionsanalysen und funktionellen Studien zeigten, dass keines der Ebolavirus-Proteine die Expression oder die antivirale Wirkung vom IFITM3 hemmt. Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass IFITMs unabhängig vom viralen Glykoprotein in Viruspartikel inkorporiert werden, deren Infektiosität verringern und die Spaltung verschiedener viraler Glykoproteine hemmen. Außerdem konnte demonstriert werden, dass IFITM3 die Spaltung des Ebolavirus-Glykoproteins und die Infektiosität von Ebolavirus-ähnlichen Partikeln blockiert und dass Ebolavirus-Proteine nicht mit der antiviralen Wirkung vom IFITM3 interferieren. IFITM3 könnte daher die Ausbreitung von Ebolavirus in infizierten Personen reduzieren. Insgesamt erweitert diese Arbeit somit die Kenntnisse über die antivirale Wirkung von IFITMs und die weitere Erforschung dieser Mechanismen könnte wichtige Hinweise für die Entwicklung neuer antiviraler Therapiemaßnahmen mit breitem Wirkspektrum liefern.

6 Literaturverzeichnis

- Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V (2009): RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 10, 1065–1072
- Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H (2002): Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 32, 1958–1968
- Alberts B, Wilson J, Hunt T, Johnson A: *Molecular biology of the cell*: 5. Auflage; Garland Science, New York, NY 2008
- Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K (2009): Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Meth Enzymol* 463, 573–599
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA (1996): CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955–1958
- Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muñoz O, Corbí AL, Delgado R (2002): C-Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN Mediate Cellular Entry by Ebola Virus in cis and in trans. *J Virol* 76, 6841–6844
- Amini-Bavil-Olyaei S, Choi YJ, Lee JH, Shi M, Huang IC, Farzan M, Jung JU (2013): The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry. *Cell Host Microbe* 13, 452–464
- Anafu AA, Bowen CH, Chin CR, Brass AL, Holm GH (2013): Interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) restricts reovirus cell entry. *J Biol Chem* 288, 17261–17271
- Arthur LO, Bess JW, Sowder RC, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE (1992): Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 258, 1935–1938
- Bailey CC, Zhong G, Huang IC, Farzan M (2014): IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. *Annu Rev Virol* 1, 261–283
- Barman S, Nayak DP (2000): Analysis of the transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II transmembrane glycoprotein, for apical sorting and raft association. *J Virol* 74, 6538–6545
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL (2003): Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J Exp Med* 197, 633–642
- Bavari S, Bosio CM, Wiegand E, Ruthel G, Will AB, Geisbert TW, Hevey M, Schmaljohn C, Schmaljohn A, Aman MJ (2002): Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med* 195, 593–602
- Berger EA, Doms RW, Fenyö EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA (1998): A new classification for HIV-1. *Nature* 391, 240
- Bertram S, Dijkman R, Habjan M, Heurich A, Gierer S, Glowacka I, Welsch K, Winkler M, Schneider H, Hofmann-Winkler H, et al. (2013): TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *J Virol* 87, 6150–6160

- Bharat TAM, Noda T, Riches JD, Kraehling V, Kolesnikova L, Becker S, Kawaoka Y, Briggs JAG (2012): Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 4275–4280
- Bhattacharyya S, Hope TJ, Young JAT (2011): Differential requirements for clathrin endocytic pathway components in cellular entry by Ebola and Marburg glycoprotein pseudovirions. *Virology* 419, 1–9
- Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR (1997): The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1925–1930
- Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk HD, Garten W, Matrosovich M (2006): Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* 80, 9896–9898
- Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RWH, Baudin F (2007): Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* 124, 12–21
- bpb (Bundeszentrale für politische Bildung) (2015): Die Folgen von Ebola. <http://www.bpb.de/politik/hintergrund-aktuell/217096/die-folgen-von-ebola>; abgerufen am 14.06.2019
- Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, van der Weyden L, Fikrig E, et al. (2009): The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139, 1243–1254
- Brügger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, Kräusslich HG (2006): The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2641–2646
- Bürkstümmer T, Baumann C, Blüml S, Dixit E, Dürnberger G, Jahn H, Planyavsky M, Bilban M, Colinge J, Bennett KL, Superti-Furga G (2009): An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 10, 266–272
- Carette JE, Raaben M, Wong AC, Herbert AS, Obernosterer G, Mulherkar N, Kuehne AI, Kranzusch PJ, Griffin AM, Ruthel G, et al. (2011): Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* 477, 340–343
- Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM (2005): Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 308, 1643–1645
- Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ (2009): RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576–591
- Clancy S (2008): Genetics of the Influenza Virus. *Nature education* 1, 83
- Compton AA, Bruel T, Porrot F, Mallet A, Sachse M, Euvrard M, Liang C, Casartelli N, Schwartz O (2014): IFITM proteins incorporated into HIV-1 virions impair viral fusion and spread. *Cell Host Microbe* 16, 736–747
- Corley RB: A guide to methods in the biomedical sciences. Springer, New York, NY 2005
- Côté M, Misasi J, Ren T, Bruchez A, Lee K, Filone CM, Hensley L, Li Q, Ory D, Chandran K, Cunningham J (2011): Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* 477, 344–348

- Dahlmann F, Biedenkopf N, Babler A, Jähnen-Dechent W, Karsten CB, Gnirß K, Schneider H, Wrensch F, O'Callaghan CA, Bertram S, et al. (2015): Analysis of Ebola Virus Entry Into Macrophages. *J Infect Dis* 212, 247–257
- Dalglish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA (1984): The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763–767
- de Vries E, Tscherne DM, Wienholts MJ, Cobos-Jiménez V, Scholte F, García-Sastre A, Rottier PJM, de Haan CAM (2011): Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog* 7, e1001329
- Deen GF, Broutet N, Xu W, Knust B, Sesay FR, McDonald SLR, Ervin E, Marrinan JE, Gaillard P, Habib N, et al. (2017): Ebola RNA Persistence in Semen of Ebola Virus Disease Survivors - Final Report. *N Engl J Med* 377, 1428–1437
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, et al. (1996): Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661–666
- Desai TM, Marin M, Chin CR, Savidis G, Brass AL, Melikyan GB (2014): IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion. *PLoS Pathog* 10, e1004048
- Ding S, Pan Q, Liu SL, Liang C (2014): HIV-1 Mutates to Evade IFITM1 Restriction. *Virology* 454–455, 11–24
- Dolnik O, Kolesnikova L, Stevermann L, Becker S (2010): Tsg101 is recruited by a late domain of the nucleocapsid protein to support budding of Marburg virus-like particles. *J Virol* 84, 7847–7856
- Dominguez-Soto A, Aragonese-Fenoll L, Martin-Gayo E, Martinez-Prats L, Colmenares M, Naranjo-Gomez M, Borrás FE, Muñoz P, Zubiaur M, Toribio ML, et al. (2007): The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. *Blood* 109, 5337–5345
- Doms RW, Peiper SC (1997): Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 235, 179–190
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW (1996): A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85, 1149–1158
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA (1996): HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667–673
- Dube D, Brecher MB, Delos SE, Rose SC, Park EW, Schornberg KL, Kuhn JH, White JM (2009): The primed ebolavirus glycoprotein (19-kilodalton GP1,2): sequence and residues critical for host cell binding. *J Virol* 83, 2883–2891
- Duggal NK, Emerman M (2012): Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity. *Nat Rev Immunol* 12, 687–695
- Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, et al. (2008): The Complete Genome Sequence of Escherichia coli DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. *J Bacteriol* 190, 2597–2606

- Eckert N, Wrensch F, Gärtner S, Palanisamy N, Goedecke U, Jäger N, Pöhlmann S, Winkler M (2014): Influenza A virus encoding secreted Gaussia luciferase as useful tool to analyze viral replication and its inhibition by antiviral compounds and cellular proteins. *PLoS ONE* 9, e97695
- Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, Ahuja M, Turner JD, McKnight A, Thomas JF, Stoebenau-Haggarty B, Choe S, Vance PJ, et al. (1996): CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 87, 745–756
- Evan GI, Lewis GK, Ramsay G, Bishop JM (1985): Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610–3616
- Everitt AR, Clare S, Pertel T, John SP, Wash RS, Smith SE, Chin CR, Feeley EM, Sims JS, Adams DJ, et al. (2012): IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. *Nature* 484, 519–523
- Everitt AR, Clare S, McDonald JU, Kane L, Harcourt K, Ahras M, Lall A, Hale C, Rodgers A, Young DB, et al. (2013): Defining the Range of Pathogens Susceptible to Ifitm3 Restriction Using a Knockout Mouse Model. *PLoS One* 8, e80723
- Fareed GC, Richardson CC (1967): Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. II. The structural gene for polynucleotide ligase in bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci USA* 58, 665–672
- Feldmann H, Nichol ST, Klenk HD, Peters CJ, Sanchez A (1994): Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein. *Virology* 199, 469–473
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (2011): Pillars article: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 1996. 272: 872-877. *J Immunol* 186, 6076–6081
- Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES (2009): AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458, 509–513
- Foster TL, Wilson H, Iyer SS, Coss K, Doores K, Smith S, Kellam P, Finzi A, Borrow P, Hahn BH, Neil SJD (2016): Resistance of Transmitted Founder HIV-1 to IFITM-Mediated Restriction. *Cell Host Microbe* 20, 429–442
- Franke EK, Yuan HE, Luban J (1994): Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372, 359–362
- Freed EO (2015): HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* 13, 484–496
- Gao F, Li Y, Decker JM, Peyerl FW, Bibollet-Ruche F, Rodenburg CM, Chen Y, Shaw DR, Allen S, Musonda R, et al. (2003): Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C gag, pol, env, and nef genes: in vitro expression and immune responses in DNA-vaccinated mice. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19, 817–823
- García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, Palese P, Muster T (1998): Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology* 252, 324–330
- Geisbert TW, Jahrling PB, Hanes MA, Zack PM (1992): Association of Ebola-related Reston virus particles and antigen with tissue lesions of monkeys imported to the United States. *J Comp Pathol* 106, 137–152

- Gramberg T, Soilleux E, Fisch T, Lalor PF, Hofmann H, Wheeldon S, Cotterill A, Wegele A, Winkler T, Adams DH, Pöhlmann S (2008): Interactions of LSECtin and DC-SIGN/DC-SIGNR with viral ligands: Differential pH dependence, internalization and virion binding. *Virology* **373**, 189–201
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 4645–4649
- Haller O, Kochs G, Weber F (2006): The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344**, 119–130
- Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580
- Hartlieb B, Weissenhorn W (2006): Filovirus assembly and budding. *Virology* **344**, 64–70
- Harty RN, Brown ME, Wang G, Huibregtse J, Hayes FP (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 USA* **97**, 13871–13876
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK (1988): A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **16**, 7351–7367
- Hoenen T, Jung S, Herwig A, Groseth A, Becker S (2010): Both matrix proteins of Ebola virus contribute to the regulation of viral genome replication and transcription. *Virology* **403**, 56–66
- Hoffmann M, Krüger N, Zmora P, Wrensch F, Herrler G, Pöhlmann S (2016): The Hemagglutinin of Bat-Associated Influenza Viruses Is Activated by TMPRSS2 for pH-Dependent Entry into Bat but Not Human Cells. *PLoS One* **11**, e0152134
- Hofmann MA, Brian DA (1993): Sequencing DNA amplified directly from a bacterial colony. *Methods Mol Biol* **15**, 205–210
- Horimoto T, Kawaoka Y (2005): Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* **3**, 591–600
- Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann K-K, Schlee M, et al. (2006): 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994–997
- Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA (2009): AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514–518
- Huang IC, Bailey CC, Weyer JL, Radoshitzky SR, Becker MM, Chiang JJ, Brass AL, Ahmed AA, Chi X, Dong L, et al. (2011): Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathog* **7**, e1001258
- Huang Q, Sivaramakrishna RP, Ludwig K, Korte T, Böttcher C, Herrmann A (2003): Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin. *Biochim Biophys Acta* **1614**, 3–13

- Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, et al. (2009): Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 360, 692–698
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (2020): Virus Taxonomy. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>; abgerufen am 13.06.2019
- Isaacs A, Lindenmann J (1957): Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond, B, Biol Sci* 147, 258–267
- Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC (1957): Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond, B, Biol Sci* 147, 268–273
- Jasenosky LD, Kawaoka Y (2004): Filovirus budding. *Virus Res* 106, 181–188
- Jeffers SA, Sanders DA, Sanchez A (2002): Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein. *J Virol* 76, 12463–12472
- Jensen S, Thomsen AR (2012): Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol* 86, 2900–2910
- Jia R, Pan Q, Ding S, Rong L, Liu SL, Geng Y, Qiao W, Liang C (2012): The N-Terminal Region of IFITM3 Modulates Its Antiviral Activity by Regulating IFITM3 Cellular Localization. *Journal of Virology* 86, 13697–13707
- Jia R, Xu F, Qian J, Yao Y, Miao C, Zheng YM, Liu SL, Guo F, Geng Y, Qiao W, Liang C (2014): Identification of an endocytic signal essential for the antiviral action of IFITM3. *Cell Microbiol* 16, 1080–1093
- John SP, Chin CR, Perreira JM, Feeley EM, Aker AM, Savidis G, Smith SE, Elia AEH, Everitt AR, Vora M, et al. (2013): The CD225 domain of IFITM3 is required for both IFITM protein association and inhibition of influenza A virus and dengue virus replication. *J Virol* 87, 7837–7852
- Kaletsky RL, Francica JR, Agrawal-Gamse C, Bates P (2009): Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 2886–2891
- Knipe DM, Howley PM (Hrsg.): *Fields virology*. 6. Auflage; Wolters Kluwer, Philadelphia 2013
- Kolesnikova L, Strecker T, Morita E, Zielecki F, Mittler E, Crump C, Becker S (2009): Vacuolar Protein Sorting Pathway Contributes to the Release of Marburg Virus. *J Virol* 83, 2327–37
- Kondratowicz AS, Lennemann NJ, Sinn PL, Davey RA, Hunt CL, Moller-Tank S, Meyerholz DK, Rennert P, Mullins RF, Brindley M, et al. (2011): T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 8426–8431
- Kühl A, Hoffmann M, Müller MA, Munster VJ, Gnirss K, Kiene M, Tsegaye TS, Behrens G, Herrler G, Feldmann H, et al. (2011): Comparative analysis of Ebola virus glycoprotein interactions with human and bat cells. *J Infect Dis* 204, 840–849
- Kundu A, Avalos RT, Sanderson CM, Nayak DP (1996): Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol* 70, 6508–6515

- Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A (2007): Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315, 1398–1401
- Lee JE, Saphire EO (2009): Ebola virus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virol* 4, 621–635
- Li K, Markosyan RM, Zheng YM, Golfetto O, Bungart B, Li M, Ding S, He Y, Liang C, Lee JC, et al. (2013): IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion. *PLOS Pathogens* 9, e1003124
- Licata JM, Simpson-Holley M, Wright NT, Han Z, Paragas J, Harty RN (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
- Lin G, Simmons G, Pöhlmann S, Baribaud F, Ni H, Leslie GJ, Haggarty BS, Bates P, Weissman D, Hoxie JA, Doms RW (2003): Differential N-Linked Glycosylation of Human Immunodeficiency Virus and Ebola Virus Envelope Glycoproteins Modulates Interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77, 1337–1346
- Lin S, Naim HY, Chapin Rodriguez A, Roth MG (1998): Mutations in the Middle of the Transmembrane Domain Reverse the Polarity of Transport of the Influenza Virus Hemagglutinin in MDCK Epithelial Cells. *J Cell Biol* 142, 51–57
- Lin TY, Chin CR, Everitt AR, Clare S, Perreira JM, Savidis G, Aker AM, John SP, Sarlah D, Carreira EM, et al. (2013): Amphotericin B increases influenza A virus infection by preventing IFITM3-mediated restriction. *Cell Rep* 5, 895–908
- Ling S, Zhang C, Wang W, Cai X, Yu L, Wu F, Zhang L, Tian C (2016): Combined approaches of EPR and NMR illustrate only one transmembrane helix in the human IFITM3. *Sci Rep* 6, 24029
- Lottspeich F, Engels JW: *Bioanalytik*. 2. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009
- Lu J, Pan Q, Rong L, He W, Liu SL, Liang C (2011): The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *J Virol* 85, 2126–2137
- Lucotte G (2002): Frequencies of 32 base pair deletion of the (Delta 32) allele of the CCR5 HIV-1 co-receptor gene in Caucasians: a comparative analysis. *Infect Genet Evol* 1, 201–205
- MacIntyre CR, Chughtai AA (2016): Recurrence and reinfection—a new paradigm for the management of Ebola virus disease. *International Journal of Infectious Diseases* 43, 58–61
- Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R (1986): The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333–348
- Mahanty S, Bray M (2004): Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *Lancet Infect Dis* 4, 487–498
- Makvandi-Nejad S, Laurenson-Schafer H, Wang L, Wellington D, Zhao Y, Jin B, Qin L, Kite K, Moghadam HK, Song C, et al. (2018): Lack of Truncated IFITM3 Transcripts in Cells Homozygous for the rs12252-C Variant That is Associated With Severe Influenza Infection. *J Infect Dis* 217, 257–262
- Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD (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

- Marzi A, Gramberg T, Simmons G, Möller P, Rennekamp AJ, Krumbiegel M, Geier M, Eisemann J, Turza N, Saunier B, et al. (2004): DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 78, 12090–12095
- Más V, Melero JA (2013): Entry of enveloped viruses into host cells: membrane fusion. *Subcell Biochem* 68, 467–487
- McNatt MW, Zang T, Bieniasz PD (2013): Vpu binds directly to tetherin and displaces it from nascent virions. *PLoS Pathog* 9, e1003299
- Miller EH, Obernosterer G, Raaben M, Herbert AS, Deffieu MS, Krishnan A, Ndungo E, Sandesara RG, Carette JE, Kuehne AI, et al. (2012): Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *EMBO J* 31, 1947–1960
- Moffatt P, Gaumond MH, Salois P, Sellin K, Bessette MC, Godin E, de Oliveira PT, Atkins GJ, Nanci A, Thomas G (2008): Bril: a novel bone-specific modulator of mineralization. *J Bone Miner Res* 23, 1497–1508
- Mudhasani R, Tran JP, Retterer C, Radoshitzky SR, Kota KP, Altamura LA, Smith JM, Packard BZ, Kuhn JH, Costantino J, et al. (2013): IFITM-2 and IFITM-3 but not IFITM-1 restrict Rift Valley fever virus. *J Virol* 87, 8451–8464
- Mühlberger E (2007): Filovirus replication and transcription. *Future Virol* 2, 205–215
- Mühlberger E, Lötfering B, Klenk HD, Becker S (1998): Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J Virol* 72, 8756–8764
- Mühlberger E, Weik M, Volchkov VE, Klenk HD, Becker S (1999): Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J Virol* 73, 2333–2342
- Munro JB, Mothes W (2015): Structure and Dynamics of the Native HIV-1 Env Trimer. *J Virol* 89, 5752–5755
- Murphy KM, Janeway C, Weaver C, Mowat A, Berg L, Chaplin D, Travers P, Walport M: Janeway's immunobiology. 9. Auflage; Garland Science, Taylor & Francis Group, New York 2017
- Naldini L, Blömer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–267
- Nanbo A, Imai M, Watanabe S, Noda T, Takahashi K, Neumann G, Halfmann P, Kawaoka Y (2010): Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog* 6, e1001121
- Narayana SK, Helbig KJ, McCartney EM, Eyre NS, Bull RA, Eltahla A, Lloyd AR, Beard MR (2015): The Interferon-induced Transmembrane Proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 Inhibit Hepatitis C Virus Entry. *J Biol Chem* 290, 25946–25959
- Neumann G, Feldmann H, Watanabe S, Lukashevich I, Kawaoka Y (2002): Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol* 76, 406–410

- Neumann G, Geisbert TW, Ebihara H, Geisbert JB, Daddario-DiCaprio KM, Feldmann H, Kawaoka Y (2007): Proteolytic Processing of the Ebola Virus Glycoprotein Is Not Critical for Ebola Virus Replication in Nonhuman Primates. *J Virol* 81, 2995–2998
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991): Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193–199
- Noda T, Ebihara H, Muramoto Y, Fujii K, Takada A, Sagara H, Kim JH, Kida H, Feldmann H, Kawaoka Y (2006): Assembly and Budding of Ebolavirus. *PLoS Pathog* 2, e99
- Palese P (2004): Influenza: old and new threats. *Nat Med* 10, 82–87
- Paludan SR (2015): Activation and regulation of DNA-driven immune responses. *Microbiol Mol Biol Rev* 79, 225–241
- Paludan SR, Bowie AG (2013): Immune sensing of DNA. *Immunity* 38, 870–880
- Pandey S, Kawai T, Akira S (2014): Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a016246
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Näslund TI, Liljeström P, Weber F, Reis e Sousa C (2006): RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314, 997–1001
- Qian J, Le Duff Y, Wang Y, Pan Q, Ding S, Zheng YM, Liu SL, Liang C (2015): Primate lentiviruses are differentially inhibited by interferon-induced transmembrane proteins. *Virology* 474, 10–18
- Ranjbar S, Haridas V, Jasenosky LD, Falvo JV, Goldfeld AE (2015): A Role for IFITM Proteins in Restriction of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Cell Rep* 13, 874–883
- RKI (Robert Koch-Institut) (2017): Influenzapandemie (H1N1) 2009. <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Pandemie/Pandemie.html>; abgerufen am 04.06.2019
- Rossman JS, Leser GP, Lamb RA (2012): Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *J Virol* 86, 10950–10960
- Roth S, Rottach A, Lotz-Havla AS, Laux V, Muschwackh A, Gersting SW, Muntau AC, Hopfner KP, Jin L, Vanness K, et al. (2014): Rad50-CARD9 interactions link cytosolic DNA sensing to IL-1 β production. *Nat Immunol* 15, 538–545
- Rust MJ, Lakadamyali M, Zhang F, Zhuang X (2004): Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol* 11, 567–573
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986): Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324, 163–166
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491
- Samji T (2009): Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med* 82, 153–159
- Sanchez A, Yang ZY, Xu L, Nabel GJ, Crews T, Peters CJ (1998): Biochemical analysis of the secreted and virion glycoproteins of Ebola virus. *J Virol* 72, 6442–6447

- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682
- Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM (2014): Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 32, 513–545
- Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM (2011): A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481–485
- Shimajima M, Takada A, Ebihara H, Neumann G, Fujioka K, Irimura T, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y (2006): Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol* 80, 10109–10116
- Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y (2006): Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440, 435–436
- Sieczkarski SB, Whittaker GR (2002): Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 76, 10455–10464
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ (1999): The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835–1837
- Siegrist F, Ebeling M, Certa U (2011): The small interferon-induced transmembrane genes and proteins. *J Interferon Cytokine Res* 31, 183–197
- Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, et al. (2003): DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* 305, 115–123
- Sjöberg M, Wu SR, Löving R, Rantalainen K, Lindqvist B, Garoff H (2014): Furin cleavage of the Moloney murine leukemia virus Env precursor reorganizes the spike structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 6034–6039
- Skehel JJ, Wiley DC (2000): Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69, 531–569
- Smith S, Weston S, Kellam P, Marsh M (2014): IFITM proteins-cellular inhibitors of viral entry. *Curr Opin Virol* 4, 71–77
- Stark GR, Darnell JE (2012): The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36, 503–514
- Steinhauer DA (1999): Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258, 1–20
- Stieneke-Gröber A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD, Garten W (1992): Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* 11, 2407–2414
- Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ (2013): Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 339, 786–791
- Sundquist WI, Kräusslich HG (2012): HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006924

- Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E (2014): Introduction to molecular biology of influenza a viruses. *Acta Biochim Pol* 61, 397–401
- Takada A, Fujioka K, Tsuiji M, Morikawa A, Higashi N, Ebihara H, Kobasa D, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y (2004): Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol* 78, 2943–2947
- Tartour K, Appourchaux R, Gaillard J, Nguyen XN, Durand S, Turpin J, Beaumont E, Roch E, Berger G, Mahieux R, et al. (2014): IFITM proteins are incorporated onto HIV-1 virion particles and negatively imprint their infectivity. *Retrovirology* 11, 103
- Timmins J, Scianimanico S, Schoehn G, Weissenhorn W (2001): Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40. *Virology* 283, 1–6
- Timmins J, Schoehn G, Ricard-Blum S, Scianimanico S, Vernet T, Ruigrok RWH, Weissenhorn W (2003): Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol* 326, 493–502
- Uhlén M (2008): Affinity as a tool in life science. *BioTechniques* 44, 649–654
- Uhlén M, Nilsson B, Guss B, Lindberg M, Gatenbeck S, Philipson L (1983): Gene fusion vectors based on the gene for staphylococcal protein A. *Gene* 23, 369–378
- UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) (2019): Global HIV & AIDS statistics - 2019 fact sheet. <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>; abgerufen am 27.05.2020
- Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, et al. (2010): IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* 11, 997–1004
- Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa S, Yokosawa H, Yasuda J (2007): Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J Virol* 81, 4895–4899
- Vabret N, Bailly-Bechet M, Najburg V, Müller-Trutwin M, Verrier B, Tangy F (2012): The biased nucleotide composition of HIV-1 triggers type I interferon response and correlates with subtype D increased pathogenicity. *PLoS ONE* 7, e33502
- Vabret N, Bailly-Bechet M, Lepelley A, Najburg V, Schwartz O, Verrier B, Tangy F (2014): Large-scale nucleotide optimization of simian immunodeficiency virus reduces its capacity to stimulate type I interferon in vitro. *J Virol* 88, 4161–4172
- van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RAM, Osterhaus ADME, Kuiken T (2006): H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science* 312, 399
- Versteeg GA, García-Sastre A (2010): Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr Opin Microbiol* 13, 508–516
- Volchkov VE, Feldmann H, Volchkova VA, Klenk HD (1998): Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5762–5767
- Wang Y, Pan Q, Ding S, Wang Z, Yu J, Finzi A, Liu SL, Liang C (2017): The V3 Loop of HIV-1 Env Determines Viral Susceptibility to IFITM3 Impairment of Viral Infectivity. *J Virol* 91, 02441–16

- Warren CJ, Griffin LM, Little AS, Huang IC, Farzan M, Pyeon D (2014): The antiviral restriction factors IFITM1, 2 and 3 do not inhibit infection of human papillomavirus, cytomegalovirus and adenovirus. *PLoS ONE* 9, e96579
- Watanabe S, Noda T, Halfmann P, Jasenosky L, Kawaoka Y (2007): Ebola virus (EBOV) VP24 inhibits transcription and replication of the EBOV genome. *J Infect Dis* 196 Suppl 2, 284–290
- Watt A, Moukambi F, Banadyga L, Groseth A, Callison J, Herwig A, Ebihara H, Feldmann H, Hoenen T (2014): A novel life cycle modeling system for Ebola virus shows a genome length-dependent role of VP24 in virus infectivity. *J Virol* 88, 10511–10524
- Weidner JM, Jiang D, Pan XB, Chang J, Block TM, Guo JT (2010): Interferon-induced cell membrane proteins, IFITM3 and tetherin, inhibit vesicular stomatitis virus infection via distinct mechanisms. *J Virol* 84, 12646–12657
- West MJ, Lowe AD, Karn J (2001): Activation of human immunodeficiency virus transcription in T cells revisited: NF-kappaB p65 stimulates transcriptional elongation. *J Virol* 75, 8524–8537
- WHO (World Health Organization) (2016): Ebola outbreak 2014-2016. <http://www.who.int/csr/disease/ebola/en/>; abgerufen am 16.05.2020
- WHO (World Health Organization) (2018b): Influenza (Seasonal). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)); abgerufen am 16.05.2020
- WHO (World Health Organization) (2018a): The top 10 causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>; abgerufen am 16.05.2020
- WHO (World Health Organization) (2020): Coronavirus Disease (COVID-19). <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen>; abgerufen am 16.05.2020
- Wilkins C, Woodward J, Lau DTY, Barnes A, Joyce M, McFarlane N, McKeating JA, Tyrrell DL, Gale M (2013): IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatology* 57, 461–469
- Will C, Mühlberger E, Linder D, Slenczka W, Klenk HD, Feldmann H (1993): Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein. *J Virol* 67, 1203–1210
- Williams DEJ, Wu WL, Grotefend CR, Radic V, Chung C, Chung YH, Farzan M, Huang IC (2014): IFITM3 Polymorphism rs12252-C Restricts Influenza A Viruses. *PLoS One* 9, e110096
- Wrensch F, Winkler M, Pöhlmann S (2014): IFITM proteins inhibit entry driven by the MERS-coronavirus spike protein: evidence for cholesterol-independent mechanisms. *Viruses* 6, 3683–3698
- Wrensch F, Karsten CB, Gnirß K, Hoffmann M, Lu K, Takada A, Winkler M, Simmons G, Pöhlmann S (2015): Interferon-Induced Transmembrane Protein-Mediated Inhibition of Host Cell Entry of Ebolaviruses. *J Infect Dis* 212 Suppl 2, 210–218
- Wu J, Chen ZJ (2014): Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol* 32, 461–488
- Wu WL, Grotefend CR, Tsai MT, Wang YL, Radic V, Eoh H, Huang IC (2017): $\Delta 20$ IFITM2 differentially restricts X4 and R5 HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 7112–7117

- Xie M, Xuan B, Shan J, Pan D, Sun Y, Shan Z, Zhang J, Yu D, Li B, Qian Z (2015): Human cytomegalovirus exploits interferon-induced transmembrane proteins to facilitate morphogenesis of the virion assembly compartment. *J Virol* 89, 3049–3061
- Xuan Y, Wang LN, Li W, Zi HR, Guo Y, Yan WJ, Chen XB, Wei PM (2015): IFITM3 rs12252 T>C polymorphism is associated with the risk of severe influenza: a meta-analysis. *Epidemiol Infect* 143, 2975–2984
- Yao L, Dong H, Zhu H, Nelson D, Liu C, Lambiase L, Li X (2011): Identification of the IFITM3 gene as an inhibitor of hepatitis C viral translation in a stable STAT1 cell line. *J Viral Hepat* 18, e523-529
- Yasuda J, Nakao M, Kawaoka Y, Shida H (2003): Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *J Virol* 77, 9987–9992
- Yount JS, Moltedo B, Yang YY, Charron G, Moran TM, López CB, Hang HC (2010): Palmitoylome profiling reveals S-palmitoylation-dependent antiviral activity of IFITM3. *Nat Chem Biol* 6, 610–614
- Yount JS, Karssemeijer RA, Hang HC (2012): S-palmitoylation and ubiquitination differentially regulate interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3)-mediated resistance to influenza virus. *J Biol Chem* 287, 19631–19641
- Yu J, Li M, Wilkins J, Ding S, Swartz TH, Esposito AM, Zheng YM, Freed EO, Liang C, Chen BK, Liu SL (2015): IFITM Proteins Restrict HIV-1 Infection by Antagonizing the Envelope Glycoprotein. *Cell Rep* 13, 145–156
- Zagursky RJ, Baumeister K, Lomax N, Berman ML (1985): Rapid and easy sequencing of large linear double-stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. *Gene Analysis Techniques* 2, 89–94
- Zhao X, Guo F, Liu F, Cuconati A, Chang J, Block TM, Guo JT (2014): Interferon induction of IFITM proteins promotes infection by human coronavirus OC43. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 6756–6761
- Zhu X, He Z, Yuan J, Wen W, Huang X, Hu Y, Lin C, Pan J, Li R, Deng H, et al. (2015): IFITM3-containing exosome as a novel mediator for anti-viral response in dengue virus infection. *Cell Microbiol* 17, 105–118
- Züst R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, Maier R, Neuman BW, Ziebuhr J, Szretter KJ, Baker SC, Barchet W, Diamond MS, et al. (2011): Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol* 12, 137–143

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Stefan Pöhlmann danken, der das Experiment eines Humanmediziners in einer Abteilung voller Biologen fortsetzte und mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation in der Infektionsbiologie des DPZ zu absolvieren. Vielen Dank für die zahlreichen Hilfestellungen und inspirierenden Gespräche!

Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Uwe Groß für die Betreuung meiner Doktorarbeit sowie seine Unterstützung und Ideen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Michael Winkler für die Betreuung meiner Arbeit, die geduldigen Erklärungen, brillanten Ideen und hilfreichen Ratschläge. Vielen Dank, dass du immer erreichbar warst!

Vielen herzlichen Dank an Sabine Gärtner, meinem Anker im Labor. Du hast mich nicht nur in die Laborwelt eingeführt und geduldig auf meine zahlreichen Fragen geantwortet, sondern mich vor allem moralisch während meiner gesamten Zeit am DPZ unterstützt.

Florian, ich danke dir, dass ich dich immer mit Fragen zu IFITMs erreichen kann, für die Korrektur meiner Dissertation und dafür, dass du mir immer ehrlich und direkt deine Meinung sagst.

Stefan E., vielen Dank für deine Hilfe in der Arbeit mit LaTeX, du bist und bleibst mein Experte in diesem Bereich.

Außerdem möchte ich jedem Mitarbeiter der Abteilung danken, da jeder auf eine Weise zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen hat. Kathrin, Marianna, Inga, Constantin, Stefan E. und Florian: Danke für die Treffen außerhalb des Labors, ihr seid mir gute Freunde geworden.

Schließlich danke ich der Universitätsmedizin Göttingen für die Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit durch das Jacob-Henle-Programm.