

Aus dem Institut für Virologie
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort wird durch antagonistische Effekte der Marburg Virus Proteine GP und VP30 ausbalanciert

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

angefertigt am Institut für Virologie
der Philipps-Universität Marburg

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Cornelius Rohde
aus Offenbach am Main
Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
26. August 2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Stephan Becker

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Mühlenhoff

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnisse	1
1.1 Abkürzungsverzeichnis	1
1.2 Abbildungsverzeichnis	5
2. Einleitung	7
2.1 Taxonomie der <i>Filoviridae</i>	7
2.2 Epidemiologie	7
2.3 Pathogenese.....	9
2.4 Morphologie und Genomstruktur	10
2.5 Proteine des Marburg Virus.....	11
2.5.1 Glykoprotein	11
2.5.2 VP30	13
2.5.3 VP24	14
2.5.4 NP	14
2.5.5 VP35	14
2.5.6 VP40	15
2.5.7 L.....	15
2.6 Viraler Replikationszyklus	16
2.7 ER-Stress-Antwort	16
2.7.1 ER-Stress-Antwort.....	16
2.7.2 ER-Stress-induzierende Substanzen	19
2.7.3 Marburg Virus und die ER-Stress-Antwort	19
2.7.4 Viren und die ER-Stress-Antwort.....	21
2.7.5 Die ER-Stress-Antwort als therapeutisches Ziel	22
2.8 Fragestellung	23
3. Material und Methoden.....	25
3.1 Material.....	25
3.1.1 Chemikalien.....	25
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26

3.1.3 Kits	27
3.1.4 Geräte	27
3.1.5 Puffer.....	28
3.1.6 Lösungen	31
3.1.7 Wachstumsmedien für Bakterien	32
3.1.8 Wachstumsmedien für Säugerzellen	32
3.1.8 Nukleinsäuren	34
3.1.9 Proteine.....	36
3.1.10 Eukaryotische Zellen	38
3.1.11 Viren.....	38
3.1.12 Software	39
3.2 Methoden.....	40
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	40
3.2.2 Zellbiologische Methoden	47
3.2.3 Biochemische und immunologische Methoden	55
3.2.4 Virologische Methoden	59
3.2.5 Statistische Methoden	61
4. Ergebnisse	63
4.1 Der Einfluss von Thapsigargin und Tunicamycin auf die ER-Stress-Antwort in HuH7 Zellen.....	63
4.1.1 Die Charakterisierung der ER-Stress-Antwort-Aktivatoren Thapsigargin und Tunicamycin in HuH7 Zellen.....	63
4.1.2 Zusammenfassung: Der Einfluss von Thapsigargin und Tunicamycin auf HuH7 Zellen	65
4.2 Der Einfluss des Marburg Virus GP auf die ER-Stress-Antwort.....	65
4.2.1 Die Analyse der Aktivierung des ER-Stress-Antwort-spezifischen Promotors UPRE durch das Marburg Virus GP	65
4.2.2 Der Einfluss der Mucin-ähnlichen Domäne des Marburg Virus GP auf den UPRE-Promotor	67
4.2.3 Der Einfluss des Marburg Virus GP auf die Expression des Transkriptionsfaktors XBP1s.....	69

4.2.4 Der Einfluss des Marburg Virus GP auf IRE1	74
4.2.5 Zusammenfassung: Der Einfluss des Marburg Virus GP auf die ER-Stress-Antwort	75
4.3 Der Einfluss von VP30 auf die ER-Stress-Antwort	76
4.3.1 Der Einfluss der Marburg Virus Proteine VP24, VP35, VP40 oder NP auf die VP30-vermittelte Reduktion der GP-abhängigen Aktivierung des UPRE-Promotors.....	76
4.3.2 Die Analyse der Interaktion des Marburg Virus VP30 mit XBP1u und XBP1s	77
4.3.3 Die Charakterisierung der Marburg Virus VP30 Mutanten	80
4.3.4 Der Einfluss von Marburg Virus VP30 auf den UPRE-Promotor in HAP1 Zellen ...	85
4.3.5 Zusammenfassung: Der Einfluss von VP30 auf die ER-Stress-Antwort	88
4.4 Der Einfluss der ER-Stress-Antwort auf den Marburg Virus Replikationszyklus	89
4.4.1 Die Analyse der viralen Replikation und Transkription in Anwesenheit von Thapsigargin	89
4.4.2 Der Einfluss von Thapsigargin auf den viralen Replikationszyklus im infektiösen Virus-ähnliche Partikel-Assay	91
4.4.3 Die Analyse der Marburg Virus Replikation in HAP1 (Knock-out) Zellen.....	93
4.4.4 Der Einfluss von Thapsigargin auf Marburg Viren in HAP1 (Knock-out) Zellen	95
4.4.5 Zusammenfassung: Der Einfluss der ER-Stress-Antwort auf den Marburg Virus Replikationszyklus.....	96
5. Diskussion.....	98
5.1 Der Einfluss der ER-Stress-Aktivatoren Thapsigargin und Tunicamycin in HuH7 und HAP1 Zelllinien	98
5.2 Das Marburg Virus GP aktiviert die IRE1-abhängige Stress-Antwort.....	99
5.2.1 Das Marburg Virus GP führt zu einer Aktivierung von IRE1, XBP1s und UPRE	99
5.2.2 Die Aktivierung der ER-Stress-Antwort durch das Marburg Virus GP auf Grund posttranslatonaler Modifikationen	101
5.3 Die Marburg Virus VP30 Expression reduziert die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort	102
5.3.1 Das Marburg Virus VP30 reguliert die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort.....	102
5.3.2 Die RNA-abhängige Interaktion des Marburg Virus VP30 mit dem XBP1u Protein	103

5.3.3 Der Einfluss anderer Marburg Virus Proteine auf die Regulation der ER-Stress-Antwort.....	105
5.4 Der Einfluss der ER-Stress-Antwort auf den Marburg Virus Replikationszyklus	106
5.4.1 Die Freisetzung von Marburg Virus in Abwesenheit von IRE1 oder XBP1	106
5.4.2 Thapsigargin beeinflusst den Marburg Virus Replikationszyklus IRE1-unabhängig	107
5.5 Arbeitsmodell	108
6. Zusammenfassung/Summary	111
6.1 Zusammenfassung	111
6.2 Summary	112
7. Referenzen.....	114
8. Lebenslauf.....	130
9. Veröffentlichungen.....	131
9.1 Publikationen	131
9.2 Kongressbeiträge.....	131
10. Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	134
11. Ehrenwörtliche Erklärung.....	135
12. Danksagung	136

1. Abkürzungs- und Abbildungsverzeichnisse

1.1 Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen für SI-Einheiten, Aminosäuren und Nukleotide entsprechen den international verbindlichen Normen.

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ASGP-R	<i>Asialoglycoprotein receptor</i>
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
Axl	<i>Tyrosine-protein kinase receptor UFO</i>
BiP	<i>Binding protein</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
BSc	Bachelor of Science
BSL	Biologische Schutzstufe
CD	Zytoplasmatische Domäne
cDNA	copy DNA
CEB	Zellextraktionspuffer
CHIKV	Chikungunya Virus
CHIP	<i>carboxyl terminus of HSC70-interacting protein</i>
CMC	Carboxymethylcellulose
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DC-SIGN-R	DC-SIGN Rezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
Dtk	<i>Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3</i>
DTT	Dithiothreitol
EBOV	Ebola Virus
eIF2α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2α</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradation

ERSE	ER-Stress Element
ESCRT-Komplex	endosomal sorting complex required for transport
EtBr	Ethidumbromid
FCS	Fötales Kälber Serum
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GP	Glykoprotein
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HEK293	<i>human embryonic kidney 293</i> Zelllinie
hMGL	<i>human macrophage galactose type C-type lectins</i>
HuH7	<i>human hepatoma 7</i> Zelllinie
iVLP	infektiöse Virus-ähnliche Partikel
IFA	Immunofluoreszenz Assay
IRE1	<i>inositol-requiring enzyme 1 α</i>
JAK1	<i>Janus kinase 1</i>
JAK-STAT	<i>Janus kinases-Signal Transducer and Activator of Transcription proteins</i>
JEV	Japanische Enzephalitis Virus
k	kilo
KEAP1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KO	Knock-out
l	Liter
LSEctin	<i>Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin</i>
LV	Leervektor
M	Molar
MARV	Marburg Virus
MARV_{dMLD}	MARV mit GP _{dMLD}
MCMV	Murines Cytomegalovirus
Mer	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER</i>
MG	Minigenom
MHC-I	<i>major histocompatibility complex I</i>
min	Minute
miRNA	micro RNA
MLD	Mucin-ähnliche Domäne
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	messenger RNA
MSc	Master of Science

MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
Nck	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMI	<i>NMYC interactor</i>
NP	Nukleoprotein
NPC-1	<i>Niemann-Pick disease, type C1</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
ns	nicht signifikant
nt	Nukleotide
P	Prolin
PACT	<i>Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PERK	<i>protein kinase RNA-like ER kinase</i>
PFU	Plaque-forming Unit
PKR	<i>Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Proteinprobenpuffer
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2 A
p.i.	nach der Infektion
p.t.	nach der Transfektion
Q	Glutamin
qPCR	quantitative PCR
RBBP6	Retinoblastoma-binding protein 6
RBD	Rezeptor-Binde-Domäne
RIDD	<i>regulated IRE1-dependet decay of mRNA</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNP	Ribonukleoprotein
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Respiratorische Synzytial Virus
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin
SARS Virus	<i>Severe acute respiratory syndrome virus</i>

SERCA	sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
ssRNA	einzelsträngige RNA
Std	Stunde
TIM-1	<i>T cell immunoglobulin mucin domain 1</i>
Tg	Thapsigargin
TNFα	Tumornekrosefaktor- α
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
tRNA	transfer RNA
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>
Tu	Tunicamycin
U	Unit
ÜS	Überstand
UZ	Ultrazentrifuge
UPR	Unfolded Protein Response
UPRE	UPR Element
v/v	volume/volume
v/w	Volume/weight
VP	virales Protein
vRNA	virale RNA
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
w/v	weight/volume
WB	Western Blot
well	Vertiefung einer Zellkulturplatte
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XBP1s	<i>X-box binding protein 1 spliced</i>
XBP1u	<i>X-box binding protein 1 unspliced</i>
-ssRNA	negativ-orientierte, einzelsträngige RNA

1.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
2.1	<i>Filoviridae</i>	7
2.2	MARV Infektionen	8
2.3	Morphologie und Genomstruktur von MARV	10
2.4	Schematische Darstellung des MARV GP, GP-HA und GP _{dMLD}	12
2.5	IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort	18
2.6	MARV GP und VP30 regulieren die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort	20
3.1	Minigenom-Assay	52
3.2	Infektiöser-Virus-ähnliche Partikel (iVLP) Assay	54
4.1	Einfluss von Thapsigargin und Tunicamycin auf HuH7 Zellen	64
4.2	Einzelexpression Epitop-markierter MARV Proteine im UPRE-Assay	66
4.3	Titration von GP _{dMLD} im UPRE-Assay	68
4.4	Flag-XBP1-GFP Reporter	70
4.5	Einzelexpression von GP, GP _{dMLD} und NP mit dem Flag-XBP1-GFP Reporter	71
4.6	Koexpression von GP, GP _{dMLD} oder NP mit dem Flag-XBP1-GFP Reporter	73
4.7	Einzelexpression von IRE1 und GP oder NP	74
Z.1	MARV GP aktiviert die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort	75
4.8	Koexpression von GP und VP30 mit VP24, VP35, VP40 oder NP im UPRE-Assay	77
4.9	Ko-Immunpräzipitation von HA-VP30 und Flag-XBP1u	78
4.10	Ko-Immunpräzipitation von HA-VP30 und Flag-XBP1u in Abhängigkeit von RNA	79
4.11	Schematische Darstellung des MARV VP30 und dessen Mutanten	81
4.12	Expression der VP30 Mutanten im MG-Assay	83
4.13	Koexpression von GP und den VP30 Mutanten im UPRE-Assay	84

4.14	Titration von Thapsigargin und Tunicamycin in HAP1 (KO) Zellen	86
4.15	UPRE-Aktivierung in HAP1 (KO) Zellen in Anwesenheit von IRE1 oder XBP1	87
Z.2	VP30 reguliert die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort	88
4.16	Einfluss von Tg auf die Reporteraktivität im MG-Assay	90
4.17	Einfluss von Tg auf die Reporteraktivität im iVLP-Assay	92
4.18	Einfluss von Tg auf die MARV Replikation in HAP1 (KO) Zellen	94
Z.3	Die MARV Freisetzung in Abhängigkeit der ER Homöostase	96
Z.4	Arbeitsmodell - MARV GP und VP30 regulieren die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort	110

2. Einleitung

2.1 Taxonomie der *Filoviridae*

Die Ordnung der *Mononegvirales* beinhaltet alle Viren, die ein einzelsträngiges, negativ-orientiertes RNA-Genom (-ssRNA) besitzen. Dazu gehören neben der Familie der *Filoviridae* auch die Familien *Artoviridae*, *Lispiviridae*, *Xinmoviviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Mymonaviridae*, *Nyamiviridae*, *Pneumoviridae*, *Sunviridae* und *Bornaviridae*⁴. Zu den *Filoviridae* gehören die drei Genera *Marburgvirus*, *Ebolavirus* und *Cuevavirus*⁴ (Abb. 2.1). Der Name *Filoviridae* leitet sich vom lateinischen Wort *filum* für Faden ab, da die viralen Partikel eine längliche, fadenförmiges Erscheinungsbild haben (Abb. 2.3 A)^{86,102}. Das Genus *Marburgvirus* enthält eine Spezies, *Marburg marburgvirus*, und dieses wird unterteilt in Marburg Virus (MARV) und Ravn Virus. Das Genus *Ebolavirus* kann weiter unterteilt werden in die Spezies *Tai Forest ebolavirus*, die Spezies *Reston ebolavirus*, die Spezies *Sudan ebolavirus*, die Spezies *Zaire ebolavirus* (EBOV) und die Spezies *Bundibugyo ebolavirus*. Das Genus *Cuevavirus* umfasst die Spezies *Lloviu cuevavirus* (Abb. 2.1)⁴.

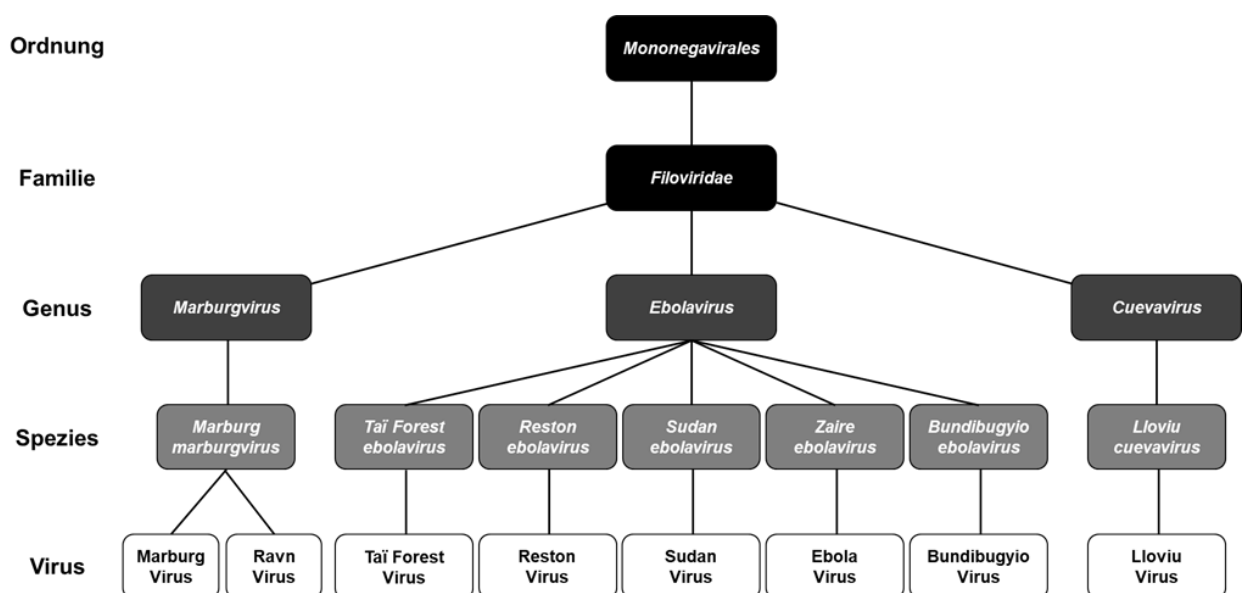


Abb. 2.1 Filoviridae

Taxonomie der *Filoviridae*. Abbildung in Anlehnung an Amarasinghe et al., 2017⁴.

2.2 Epidemiologie

1967 traten in Marburg, Frankfurt a.M. und Belgrad die ersten bekannten Fälle von MARV Infektionen auf. Das für die Erkrankung verantwortliche Virus konnte erstmals in Marburg charakterisiert werden, was namensgebend war¹¹². MARV wurde von Grünen Meerkatzen übertragen, die für die Herstellung von Impfstoffen aus Uganda importiert wurden. Dabei

wurden 31 Personen infiziert von denen sieben verstarben. Bis heute folgten zwölf weitere MARV Infektionen, die zum Teil zu größeren Ausbrüchen führten in Südafrika (Ursprung Zimbabwe)⁶⁰, Zimbabwe⁶⁰, Kenia¹⁵⁵, Sowjetunion (heute Russland)¹²⁸, Demokratische Republik Kongo¹⁹³, Angola¹⁶⁵, Uganda^{88,129,2,178}, USA (Ursprung Uganda) und Niederlande (Ursprung Uganda)¹⁶³. Insgesamt gibt es 478 bestätigte MARV Fälle mit einer Letalität von 80,5% (Abb. 2.2).

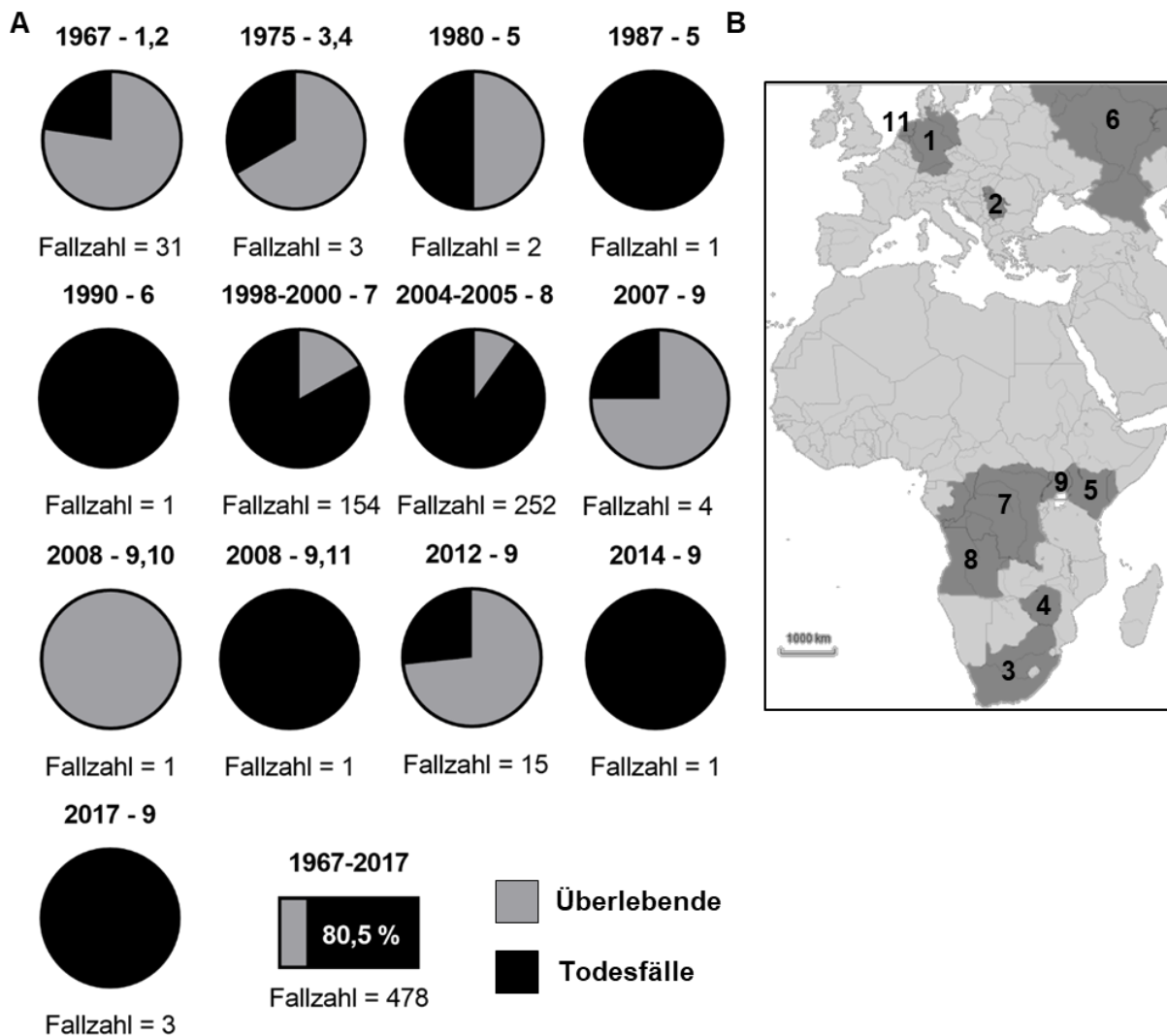


Abb. 2.2: MARV Infektionen

MARV Infektionen in den Jahren 1967-2017^{178,163,112,2,88,129,128,155,60,165,193}. **A:** MARV Fallzahlen. **B:** MARV Infektionen. 1: Deutschland, 2: Jugoslawien (heute Serbien), 3: Südafrika, 4: Zimbabwe, 5: Kenia, 6: Sowjetunion (heute Russland), 7: Demokratische Republik Kongo, 8: Angola, 9: Uganda, 10: USA (nicht auf der Karte eingezeichnet), 11: Niederlande.

Der natürliche Wirt für MARV ist der Flughund *Rousettus aegyptiacus*. Aus diesen konnte MARV isoliert werden^{164,3}. Von *R. aegyptiacus* kann MARV auf den Menschen oder Primaten übertragen werden, wobei das Infektionsrisiko mit den Geburtszyklen der *R. aegyptiacus*

korreliert⁵. MARV Ausbrüche haben in der Regel ihren Ursprung in Zentralafrika. Dort leben verschiedene Flughund-Spezies, in denen MARV-spezifische RNA und Antikörper nachgewiesen werden konnten^{166,158}.

2.3 Pathogenese

MARV ist ein zoonotisches Virus. Die Übertragung von MARV auf den Menschen erfolgt in der Regel durch Virus-haltige Körperflüssigkeiten von Tieren^{163,112,164}. Im Anschluss kann MARV weiter über Blut, Speichel, Schweiß, Stuhl, Urin, Tränenflüssigkeit, Brustmilch oder Sperma von Mensch zu Mensch übertragen werden^{112,61,8,113}. Die Inkubationszeit beträgt 2-21 Tage bevor Grippe-ähnliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen, Schüttelfrost und Gliederschmerzen eintreten. In der Folge kann es zu Diarrhoe und Hämorrhagien kommen, die zu einem Multiorganversagen und einem Schock führen können^{61,112,155,111}.

Zu Beginn einer MARV Infektion wird zunächst die angeborene Immunantwort aktiviert, was zu einer erhöhten Ausschüttung von Zytokinen führt²⁹. Primäre Zielzellen während einer MARV Infektion sind Makrophagen, Monozyten, Kupffer - und Dendritische Zellen^{62,57,48}. Infizierte Makrophagen können große Mengen des Tumornekrosefaktor- α (TNF α) sezernieren, was zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität⁴⁸, zu einer Verbrauchskoagulopathie und somit zu einer gestörten Blutgerinnung führt¹⁹². Weitere Zielorgane sind die Nieren, das Pankreas und die Leber, ihre Infektion kann zu Nekrosen und Multiorganversagen führen⁶².

Bisher gibt es keine zugelassenen Therapeutika oder Impfstoffe gegen MARV, was zusammen mit der hohen Letalität (Abb. 2.2) dazu führt, dass es als BSL 4 (Biologische Schutzstufe 4) Pathogen eingestuft ist. In den letzten Jahren wurden einige Impfstoffkandidaten, wie rekombinante Vesikuläre Stomatitis Viren (VSV) oder Adenoviren, die MARV Proteine tragen, Virus-ähnliche Partikel, rekombinante MARV Proteine, inaktiviertes MARV, sowie DNA- (MARV GP Plasmide) und RNA-Moleküle (Alphavirus Replikon Systeme) in Tiermodellen getestet und befinden sich teilweise in klinischen Studien. Eine Zulassung für einen Impfstoff könnte jedoch erst nach einer Überprüfung der Effektivität während eines MARV Ausbruchs erteilt werden¹³⁸.

2.4 Morphologie und Genomstruktur

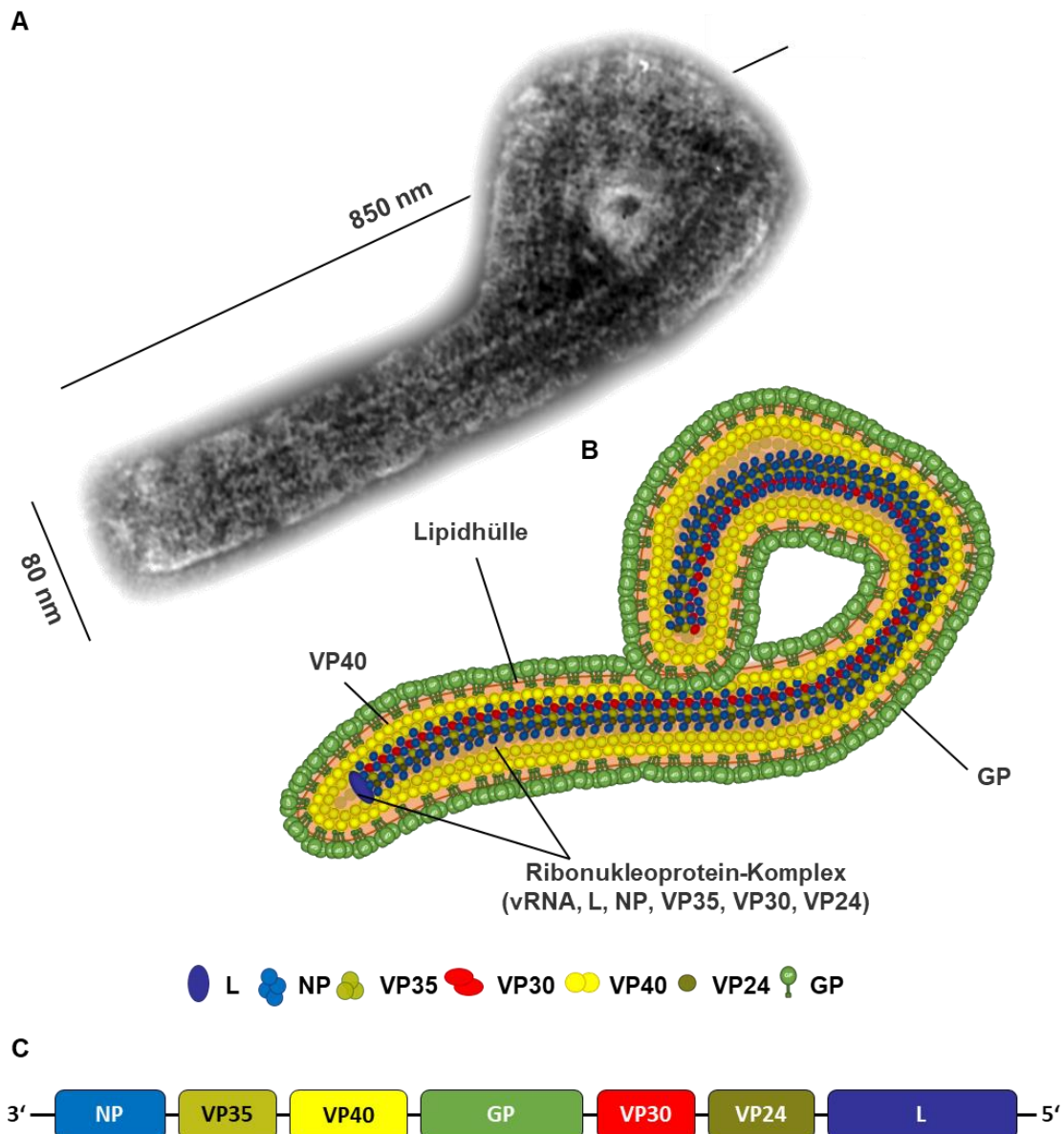


Abb. 2.3: Morphologie und Genomstruktur von MARV

A: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines MARV Partikels (Zur Verfügung gestellt von Dr. Larissa Kolesnikova, Philipps-Universität Marburg). **B:** Schematische Darstellung eines MARV Partikels. GP ist als Trimer in die Lipidhülle integriert. VP40 bildet eine Matrix zwischen Lipidhülle und Ribonukleoprotein-Komplex, welcher aus dem viralen Genom (vRNA) und den viralen Proteinen L, NP, VP35, VP30 und VP24 besteht. Abbildung in Anlehnung an Bharat *et al.*, 2011¹⁴. **C:** Schematische Darstellung des MARV Genoms. Abbildung in Anlehnung an Feldmann *et al.*, 1992⁴⁹

MARV Partikel sind filamentös⁸⁶, bis zu 850 nm lang und haben einen Durchmesser von 80-90 nm. Die Partikel können länglich, U-, 6-, oder Donut-förmig vorliegen (Abb. 2.3 A)¹⁴. Das MARV Genom (Abb. 2.3 C) besteht aus einer -ssRNA, welche 19,1 kb lang ist und für sieben Proteine kodiert. Die Gene sind in folgender Reihenfolge auf dem viralen Genom kodiert: 3'-

NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5'. Zwischen den offenen Leserahmen der sieben Gene befinden sich intergenische Regionen, die 3' den Transkriptionsstart und 5' den Transkriptionsstop der Gene beinhalten. Dabei ist die intergenische Region zwischen VP30 und VP24 überlappend. Die Enden des Genoms (3'-Leader und 5'-Trailer) sind essenziell für die Transkriptionsinitiation, die Replikation und die Verpackung des Genoms⁴⁹. Umhüllt ist das MARV Genom vom Ribonukleoprotein-Komplex, bestehend aus den viralen Proteinen L, NP, VP35, VP30 und VP24. Zwischen Ribonukleoprotein-Komplex und der Lipidhülle des Virus findet man das Matrixprotein VP40 und in der Lipidhülle befindet sich das Oberflächen-Glykoprotein GP (Abb. 2.3 B)¹⁴.

2.5 Proteine des Marburg Virus

2.5.1 Glykoprotein

2.5.1.1 GP

Das MARV Glykoprotein (GP, Abb. 2.4) ist ein Typ-I-Transmembranprotein, welches in der Lipidhülle des MARV als Homotrimer vorliegt (Abb. 2.3)⁵¹. Es besitzt eine molekulare Masse von 216 kDa und besteht aus 681 Aminosäuren (AS)¹⁸². Posttranslational wird GP im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Trans-Golgi-Netzwerk, durch N- und O-Glykosylierungen^{63,50}, Acylierungen⁵⁹ und Phosphorylierungen¹⁴⁴ modifiziert. Durch Furin und Furin-ähnliche Proteasen wird das GP an Position 435 in die beiden Untereinheiten GP₁ und GP₂ gespalten, die durch eine Disulfid-Brücke verbunden bleiben¹⁷³. GP wird vom ER über das Golgi-Netzwerk hin zur Plasmamembran transportiert, wobei es im ER akkumuliert. Eine vollständige und intakte Glykosylierung des GP ist wichtig für den Transport¹⁰.

GP besitzt mehrere charakteristische Domänen. Als Typ-I-Transmembranprotein¹⁸², lässt sich GP in eine Ektodomäne, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische-Domäne einteilen¹¹⁹. Die Ektodomäne beinhaltet die Rezeptorbindedomäne¹⁰³ und die Mucin-ähnliche Domäne (MLD)^{51,63}. Über die Rezeptorbindedomäne¹⁰³ bindet GP an die Wirtszelle, wobei verschiedene zelluläre Rezeptoren eine Rolle spielen^{12,27,114,151,159,115,100,25,30}. Die folgende Fusion mit der Wirtszelle wird über GP₂ vermittelt⁹². Darüber hinaus wirkt GP anti-viralen Mechanismen entgegen: GP kann die Tetherin-abhängige Blockade der VP40-vermittelte Freisetzung von viralen Partikeln antagonisieren⁶⁴. Die MLD spielt vermutlich für die Immun-Evasion von MARV eine Rolle^{54,68}, *in vitro* konnte der MLD bislang keine essenzielle Funktion nachgewiesen werden¹²¹. Auf die Replikation und Transkription des MARV Genoms hat GP keinen Einfluss¹⁷⁹.

2.5.1.2 GP Mutanten

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Mutanten von GP (2.5.1.1) sind in Abb. 2.4 aufgeführt.

GP-HA besitzt eine HA-Epitop-Markierung nach der AS 287. Das HA-Epitop ist ein Epitop des Influenza A-Virus Hämagglutinins und ist neun AS lang (YPYDVPDYA)^{52,183}. HA-Epitop-Markierungen unterschiedlicher Proteine ermöglichen es z.B. diese Proteine mit dem gleichen HA-spezifischen Antikörper zu detektieren, zu quantifizieren oder zu präzipitieren.

GP_{dMLD} besitzt keine MLD, wodurch es deutlich weniger Glykosylierungsstellen im Vergleich zum wildtypischen GP besitzt und keine Spaltstelle für Furin oder Furin-ähnliche Proteasen. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinante MARV ohne MLD (MARV_{dMLD}) *in vitro* zu vergleichbaren Titern wachsen wie MARV mit einem vollständigen GP¹²¹.

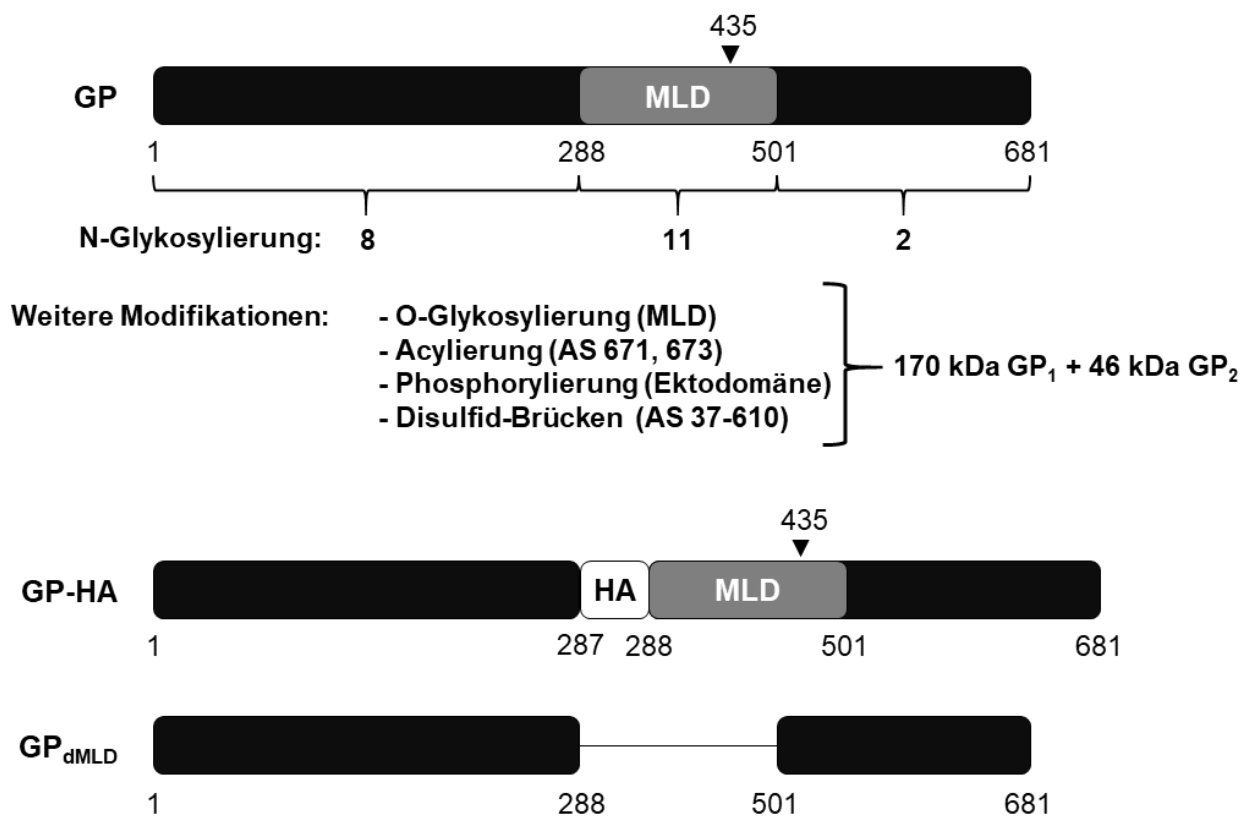


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des MARV GP, GP-HA und GP_{dMLD}

MARV GP umfasst 681 Aminosäuren (AS), hat eine Masse von circa 216 kDa und besitzt mehrere charakteristische Domänen: Die Ektodomäne (AS 1-642), welche die Rezeptor-Binde-Domäne (AS 38-188) und die Mucin-ähnliche Domäne (MLD, AS 289-501) beinhaltet, die Transmembrandomäne (AS 643-673) und die Zytoplasmatische Domäne (AS 1-673). Posttranslational wird das Protein stark modifiziert (N- und O-Glykosylierungen, Acylierungen, Phosphorylierungen und Disulfid-Brücken). An Position 435 wird GP durch Furin-ähnliche Proteasen in GP₁ und GP₂ gespalten. Im rekombinanten GP-HA ist eine zusätzliche HA-Epitop-Markierung hinter AS 287 eingefügt und im rekombinanten GP_{dMLD} ist die MLD deletiert. Entnommen und überarbeitet aus M.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴².

2.5.2 VP30

VP30 hat eine Länge von 281 AS und eine molekulare Masse von 33 kDa²³. Es ist Teil des Ribonukleoprotein-Komplex^{14,147} (Abb. 2.3). Für die Replikation und Transkription des MARV ist VP30 nicht essenziell¹²⁵, führt jedoch zu einer Steigerung der Replikations- und Transkriptionseffizienz^{3,162}. Die Generierung rekombinanter MARV ist ohne VP30 nicht möglich⁴⁷. Die Reduktion von VP30, mittels RNA-Interferenz (RNAi) während einer MARV Infektion, führt zu einer reduzierten Expression der MARV Proteine⁵⁵, was mit einer transkriptionsaktivierenden Wirkung im Einklang steht.

VP30 besitzt mehrere charakteristische Motive: Zwischen den AS 40-51 befindet sich ein Poly-Serin Motiv (⁴⁰SXSSX₂SSX₂SS⁵¹, Abb. 4.11), welches innerhalb der Filoviren konserviert ist. Für EBOV konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des ersten Serins innerhalb des Motivs verantwortlich für das Umschalten zwischen viraler Replikation und Transkription ist^{17,101,108,18,81}. Für MARV konnte gezeigt werden, dass die Bindung an NP (2.5.4) negativ beeinflusst wird, wenn S40/S42^{162,122} oder S46-51+T53¹⁶² nicht phosphoryliert sind. Für die AS S46-51+T53 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung zu einer Repression der Transkription und Replikation führt. Die Dephosphorylierung von VP30 wird über die Phosphatasen PP1 (Protein Phosphatase 1)¹⁶² und vermutlich auch PP2A (Protein Phosphatase 2 A) vermittelt¹⁰¹. Die Kinase, die VP30 phosphoryliert ist bisher nicht bekannt. Innerhalb der AS 70-74 befindet sich ein Penta-Prolin Motiv. Poly-Prolin Motive können zur Ausbildung helikaler Strukturen führen, die die Sekundärstruktur definieren und Protein/Protein Interaktionen vermitteln können^{135,32}. Das Penta-Prolin Motiv in VP30 ist bisher nicht weiter charakterisiert. Innerhalb der AS 88-96 befindet sich ein Zink-Finger Motiv (⁸⁸CX₈CX₄CX₃H⁹⁶, Abb. 4.11), welches bei Filoviren hoch konserviert ist. Das Zink-Finger Motiv ist essenziell für die Transkriptionsunterstützende Aktivität von VP30, jedoch nicht für die Generierung rekombinanter MARV⁴⁷. Innerhalb der AS 106-109 befindet sich ein Tetra-Leucin Motiv (¹⁰⁶LLLL¹⁰⁹, Abb. 4.11), welches innerhalb der Filoviren hoch konserviert ist. Für EBOV konnte gezeigt werden, dass das Tetra-Leucin Motiv essenziell für die Homooligomerisierung ist. Die Homooligomerisierung scheint auch die Voraussetzung für die transkriptionsunterstützende Wirkung von VP30 zu sein⁶⁷. Für EBOV konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass das Poly-Serin Motiv, das Poly-Leucin Motiv und das Zink-Finger Motiv die Bindung an die virale RNA beeinflussen¹⁹. Der C-Terminus von VP30 ist essenziell für die Bindung von NP⁸⁷ und somit für die VP30-abhängige Transkription und Replikation. Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass dieses Motiv auch die Bindung mit dem zellulären Retinoblastoma-binding protein 6 (RBBP6) vermittelt, was zu einer Reduktion der viralen Transkription und Replikation führt⁷.

2.5.3 VP24

VP24 ist das kleinste MARV Protein, besitzt eine molekulare Masse von 28 kDa und besteht aus 253 AS⁴⁹. Es ist, neben L, NP, VP35 und VP30, Teil des Ribonukleoprotein-Komplex (Abb. 2.3)¹⁴. In der Zelle liegt es als Oligomer vor und kann an Membranen binden⁶. In Anwesenheit von VP24 ist die Transkription und Replikation im MARV-spezifischen Minigenom-Assay reduziert¹⁷⁹. Reduziert man mittels RNAi die Menge von VP24, während einer MARV Infektion, führt dies zu einer Reduktion der freigesetzten viralen Partikel, ohne die intrazelluläre virale Replikation zu beeinflussen⁶. Darüber hinaus bindet VP24 als Monomer das zelluläre *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) und verhindert somit eine Interaktion von Keap1 mit dem *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2). In der Folge kann Nrf2 als Transkriptionsfaktor Gene der Oxidativen-Stress-Antwort regulieren. Insbesondere eine Aktivierung der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB)-abhängigen Genregulation, konnte gezeigt werden^{43,42,83,133,132}.

2.5.4 NP

Das MARV Nukleoprotein NP hat eine molekulare Masse von 94 kDa (phosphoryliert) bzw. 92 kDa (nicht phosphoryliert)^{49,143,9,34} und ist Teil des Ribonukleoprotein-Komplex (Abb. 2.3)^{125,14}. Intrazellulär bildet rekombinantes NP sogenannte Einschlusskörper in der Nähe des ER⁹⁸. In der MARV-infizierten Zelle sind diese Einschlusskörper die Orte in denen die virale Replikation und Transkription NP-abhängig stattfinden^{125,35,34,11,14}. NP kann mit den MARV Proteinen VP35^{11,35,109}, VP30^{11,87}, VP40^{36-38,110} und VP24⁶ interagieren und rekrutiert diese in die NP Einschlusskörper. Zusätzlich kann NP mit der zellulären Phosphatase PP2A¹⁰¹, und dem *Tumor susceptibility gene 101 protein* (Tsg101) interagieren. Die Interaktion mit Tsg101, einem Protein des *endosomal sorting complex required for transport-1* (ESCRT-1-Komplex), verstärkt die Freisetzung von MARV Partikeln^{37,38}.

Darüber hinaus konnte für NP eine posttranskriptionelle Editierung der NP mRNA gezeigt werden, welche zur Expression einer verkürzten NP Isoform führen könnte¹⁵⁰.

2.5.5 VP35

VP35 ist 329 AS lang und besitzt eine molekulare Masse von 35 kDa⁴⁹. Es ist Teil des Ribonukleoprotein-Komplexes (Abb. 2.3)¹⁴ und kann NP binden^{11,195,109}. VP35 fungiert als Trimer²¹, als essenzieller Polymerase-Kofaktor¹²³ für die virale Transkription und Replikation¹²⁵.

VP35 ist ein multifunktionales Protein, welches wichtig für die Immun-Evasion von MARV ist. Es bindet dsRNA um eine Aktivierung der angeborenen Immunantwort über RIG-I oder MDA5 zu verhindern^{137,44,188}. Darüber hinaus verhindert VP35 die Aktivierung der *Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase* (PKR), indem es *Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A* (PACT), einen PKR-Regulator, bindet⁷⁹. Zusätzlich kann VP35 die Reifung von Dendritischen Zellen beeinträchtigen, was einen Einfluss auf die adaptive Immunantwort hat^{20,188}.

2.5.6 VP40

Das Matrix-Protein VP40 bildet im Viruspartikel eine Schicht zwischen Lipidhülle und Ribonukleoprotein-Komplex (Abb. 2.3)¹⁴. Es besitzt eine molekulare Masse von 37 kDa (nicht phosphoryliert) oder 39 kDa (phosphoryliert)⁹⁷. VP40 kann in verschiedenen Homooligomeren vorkommen^{130,91}. Es assoziiert mit zellulären Membranen und wird über den retrograden, endosomalen Transport und über Multi-Vesikuläre Körper an die Zellmembran transportiert^{96,94,93,181}. Zudem liegt VP40 in NP-induzierten Einschlusskörpern vor und hat einen negativen Einfluss auf die Transkription und Replikation von MARV^{89,179,77,93}. In Anwesenheit von VP40 werden sowohl GP⁹⁹, als auch Proteine des MARV Ribonukleoprotein-Komplex (Abb. 2.3) umverteilt und in Virus-ähnliche Partikel inkorporiert^{36,95,120,179}. Der Transport der Nukleokapside zur Plasmamembran findet jedoch VP40-unabhängig statt¹⁴⁷. VP40 ist essenziell für die Freisetzung der viralen Partikel, die über die Proteine des ESCRT-Komplex vermittelt wird^{168,169,37-39}.

Darüber hinaus unterbindet VP40 die zelluläre Interferon-Antwort und umgeht das angeborene Immunsystem, indem es die Phosphorylierung von Janus kinase 1 (JAK1) blockiert und dadurch eine Aktivierung des *Janus kinases-Signal Transducer and Activator of Transcription proteins* (JAK-STAT) Signalwegs verhindert^{171,170,130}.

2.5.7 L

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase L ist das größte MARV Protein, besitzt 2331 AS und eine molekulare Masse von 220 kDa^{126,11}. Es interagiert mit NP¹¹ und wird in die NP-abhängigen Einschlusskörper rekrutiert⁸⁹. Zusammen mit dem Polymerase-Kofaktor VP35 formt L den Polymerase-Komplex¹²³, welcher essenziell für die MARV Transkription und Replikation ist^{125,179}. Darüber hinaus konnte für L eine posttranskriptionelle Editierung der L mRNA gezeigt werden, welche zur Expression einer verkürzten L Isoform führen könnte¹⁵⁰.

2.6 Viraler Replikationszyklus

MARV kann mittels des Oberflächenproteins GP¹⁰³ über verschiedene Rezeptoren, wie *T cell immunoglobulin mucin domain 1* (TIM-1)^{100,104}, *Asialoglycoprotein receptor* (ASGP-R)¹², *Tyrosine-protein kinase receptor UFO* (Axl), *Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3* (Dtk), *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER* (Mer)¹⁵¹, *Liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin* (LSECtin)⁶⁵, *human macrophage galactose type C-type lectins* (hMGL)¹¹⁵, *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (hMGL) und DC-SIGN Rezeptor¹¹⁴, an die Zelle binden und in diese aufgenommen werden. Dabei sind einige Rezeptoren Zelltyp-spezifisch¹² oder redundant, da eine Infektion auch in Abwesenheit einzelner Rezeptoren möglich ist¹⁰⁰. Die Aufnahme der MARV Partikel erfolgt über Makropinozytose^{118,80,15}. Im Endosom wird GP₁ durch Wirtsproteasen gespalten und aktiviert¹¹⁷, wodurch eine Bindung an den zellulären Rezeptor *Niemann-Pick disease, type C1* (NPC-1)^{104,25,30} ermöglicht wird und eine Fusion mit der Zellmembran über GP₂ erfolgt^{92,118}.

Es folgt die primäre Transkription des MARV Genoms durch den Polymerase-Komplex, bestehend aus L, VP35 und NP¹²⁵. Nicht phosphoryliertes VP30 unterstützt den Polymerase-Komplex, ist jedoch nicht essenziell^{125,3,179,162}. Die Initiation der Transkription erfolgt am 3'-Leader¹²⁷. Die transkribierten monocistronischen, polyadenylierten mRNAs⁴⁹ liegen in einem Gradienten vor, der der Reihenfolge im MARV Genom entspricht^{180,127}. Im Anschluss werden die viralen Proteine translatiert und sind im Zytoplasma innerhalb von Einschlusskörpern (außer GP) detektierbar^{98,51}.

In Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von neu translatierten MARV Proteinen findet in den Einschlusskörpern die Replikation des Genoms statt. Dabei wird ein 5'-3' Antigenom erstellt, welches als Matrize für die Replikation des MARV Genoms (3'-5') dient. Sowohl das Genom, als auch das Antigenom werden von NP enkapsidert, um es vor RNasen zu schützen^{125,127,46}.

Die synthetisierten Nukleokapside werden Aktin-abhängig zur Plasmamembran transportiert¹⁴⁷. VP40 und GP werden unabhängig davon und voneinander ebenfalls an die Plasmamembran transportiert^{96,94,93,120,119}. 18-22 Std nach der Infektion, findet die Freisetzung von MARV Partikeln an der Plasmamembran, insbesondere an Filopodien, statt⁹⁵.

2.7 ER-Stress-Antwort

2.7.1 ER-Stress-Antwort

Das ER eukaryotischer Zellen ist Ausgangspunkt für die Translation, Modifikation und Prozessierung von rund einem Drittel aller zellulären Proteine. Dazu zählen Proteine, die im

ER selbst, im Golgi-Apparat, im Endo-Lysosomalen Kompartiment und an der Plasmamembran lokalisiert sind, sowie Proteine, die von der Zelle sekretiert werden. Im ER befindet sich für diese Prozesse ein Netzwerk an Proteinen, die die Faltung, Modifikationen und Qualitätskontrolle der naszierenden Proteine sicherstellen. Proteine, die fehlgefaltet oder unvollständig modifiziert sind, werden über ER-assoziierte Degradation (ERAD) im Zytosol abgebaut¹⁴⁸.

Die Kapazität des ER ist limitiert. Befinden sich zu viele ungefaltete oder fehlerhaft modifizierte Proteine im ER, ist dies eine Stress-Situation (ER-Stress) für die Zelle. ER-Stress kann unter anderem auch durch einen Mangel an Nährstoffen oder eine Störung des Kalzium-Haushalts hervorgerufen werden. Um ER-Stress zu reduzieren bzw. diesem entgegenzuwirken kann die Zelle verschiedene Signalwege aktivieren. Diese werden zusammen als ER-Stress-Antwort bezeichnet [im englischen auch *Unfolded Protein Response (UPR)*]¹⁷⁴. Die ER-Stress-Antwort versucht in der Zelle zunächst die Homöostase des ER wiederherzustellen. Falls dies nicht gelingt, kann lang-anhaltender ER-Stress jedoch auch zur Apoptose der Zelle (terminale ER-Stress-Antwort) führen^{153,145}.

Die ER-Stress-Antwort besteht aus einem komplexen Netzwerk von Signalkaskaden, die über drei ER-Stress-Sensorproteine *Protein Kinase R-like ER kinase (PERK)*, *activating transcription factor 6 (ATF6)* und *inositol requiring enzyme 1 α (IRE1)* initiiert werden¹⁷⁶. Durch ER-Stress aktivierte PERK oligomerisiert und phosphoryliert sich selbst. In diesem aktiven Zustand kann PERK eIF2 α phosphorylieren, was zu einer stark reduzierten Translation und in der Folge zu einer Entlastung des ER führt¹⁷⁴. ER-Stress kann auch dazu führen, dass ATF6 in den Golgi-Apparat transportiert wird, dort proteolytisch gespalten wird und in der Folge als Transkriptionsfaktor in den Nukleus migriert⁷¹. Dort reguliert ATF6 verschiedene Gene über die Bindung an die Promotoren UPRE (*UPR element*)¹⁶⁰ und ERSE (*ER-stress element*)¹⁸⁵, die unter anderem für ERAD-Komponenten kodieren¹⁸⁴.

Die Kaskade der ER-Stress-Antwort, die über die Aktivierung von IRE1 vermittelt wird (Abb. 2.5) ist hoch konserviert und wurde initial in Hefen beschrieben^{124,72}. IRE1 ist ein Typ-I-Transmembranprotein, welches auf der zytosolischen Seite eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne, sowie eine Endoribonuklease-Domäne (RNase-Domäne) besitzt und auf der ER-Seite das Chaperon *binding protein (BiP)* bindet. Durch ER-Stress löst sich BiP von IRE1, um ungefaltete Proteine im ER zu stabilisieren, wodurch IRE1 dimerisieren kann und autophosphoryliert (IRE1-P). Die somit aktivierte RNase-Domäne von IRE1 spleißt die *X-Box binding protein 1 (XBP1) unspliced (XBP1u)* mRNA^{24,190}, welche durch das naszierende XBP1u Protein spezifisch an die ER-Membran assoziiert wird und sich somit in räumlicher Nähe zum IRE1 befindet^{186,152,187,85,134,157}. Nach dem Spleißen des 26 Nukleotide (nt) langen Introns aus der *XBP1u* mRNA, wird die gespleißte *XBP1 spliced (XBP1s)* mRNA durch den

tRNA ligase complex (RtcB) ligiert⁸⁴. *XBP1s* kodiert für den Transkriptionsfaktor XBP1s, welcher im Nukleus an die Promotoren UPRE und ERSE bindet und dort viele Gene reguliert, die Funktionen während der Proteinfaltung, ER-Sekretion, der ERAD und der Lipid-Synthese haben^{1,106,185}. XBP1s und ATF6 können darüber hinaus auch als Heterodimer-Transkriptionsfaktor agieren, was die Komplexität der ER-Stress-Antwort verstärkt¹⁵⁴. Das vollständig translatierte XBP1u Protein migriert ebenfalls in den Nukleus und kann dort ein Heterodimer mit XBP1s bilden, was zur ERAD-abhängigen Degradation des Dimers führt^{28,191}. Lang-anhaltender ER-Stress führt dazu, dass IRE1 weiter oligomerisiert und in der Folge spezifische mRNAs, rRNAs und miRNAs degradiert (*regulated IRE1-dependent decay of RNA* (RIDD)). Hierzu gehören auch anti-apoptotische RNAs, was die Induktion von Apoptose zur Folge haben kann¹¹⁶. Eine ER-Stress-unabhängige Aktivierung der RIDD kann zur Degradierung pro-apoptotischer miRNAs führen⁵³.

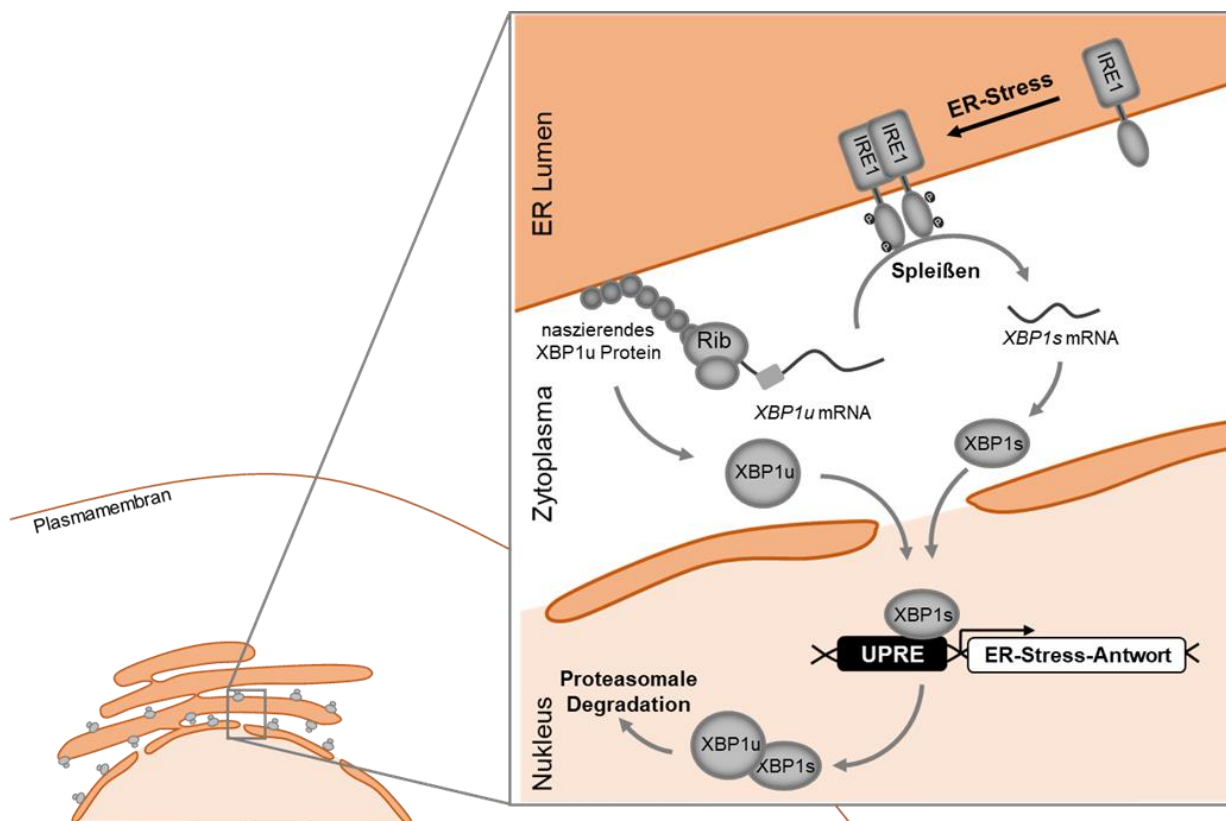


Abb. 2.5: IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort

ER-Stress führt zur Dimerisierung und Autophosphorylierung von IRE1. In der Folge kann das aktive IRE1-P über seine Endoribonuklease-Aktivität die *XBP1u* mRNA spleißen, welche durch das naszierende XBP1u Protein in räumlicher Nähe des IRE1 Proteins lokalisiert ist. Die gespleißte mRNA *XBP1s* kodiert für den Transkriptionsfaktor XBP1s, welcher im Zellkern verschiedene Promotoren (u.a. UPRE) binden und Gene der ER-Stress-Antwort regulieren kann. Eine Regulation der XBP1s-stimulierten Signalkaskade findet durch das XBP1u Protein statt, welches im Zellkern ein Dimer mit XBP1s bildet und es dem proteasomalen Abbau zuführt. Abbildung in Anlehnung an Kanda *et al.*, 2016⁸⁵ und Yoshida *et al.*, 2006¹⁹¹.

Darüber hinaus kann IRE1 mit verschiedenen Kofaktoren einen Komplex bilden (im Englischen auch *UPRosome*), wodurch es hyperaktiviert wird. In diesem hyperaktiven Zustand kann es weitere Signalwege anstoßen. Dazu gehören unter anderen die JNK- oder NF- κ B-abhängigen Signalwege⁷⁵. Auch die *major histocompatibility complex I* (MHC-I)-abhängige Antigenpräsentation kann durch die Aktivierung von IRE1 und XBP1s reguliert werden. Der Transkriptionsfaktor XBP1s induziert die Hochregulierung von MHC-I Komponenten, wohingegen RIDD den gegenteiligen Effekt hat und zu einer Degradierung dieser Komponenten führt. Auch die Kreuzpräsentation von Antigenen kann durch IRE1 und XBP1s beeinflusst werden¹³¹. Diese vielfältigen Aktivitäten, die teilweise Zeit- und/oder Konzentrations-abhängig sind, verdeutlichen die Komplexität des IRE1-abhängigen Signalwegs und der ER-Stress-Antwort.

2.7.2 ER-Stress-induzierende Substanzen

2.7.2.1 Thapsigargin

Thapsigargin (Tg) wird von der Pflanze *Thapsia garganica* produziert. Es blockiert den Ca^{2+} -Import in das ER, indem es die *sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase* (SERCA) inhibiert¹⁶¹. Das Ca^{2+} -Milieu im ER ist essenziell um die Funktionen der ER-residenten Proteine zu gewährleisten¹⁷². Die Inhibition von SERCA durch Tg führt in der Folge indirekt zu ER-Stress¹⁴⁹.

2.7.2.2 Tunicamycin

Tunicamycin (Tu) wird von verschiedenen *Streptomyces* Bakterien produziert und blockiert in Eukaryoten die N-verknüpfte Glykosylierung von Proteinen. Dies geschieht durch eine Inhibition der N-Acetylglucosamin (GlcNAc) Phosphotransferase. Unvollständig glykosylierte Proteine werden in der Folge nicht weiter transportiert, was zu einer Akkumulation der Proteine im ER und somit indirekt zu ER-Stress führt^{31,45}.

2.7.3 Marburg Virus und die ER-Stress-Antwort

Die Infektion mit MARV beansprucht Wirtszellen stark (2.6). Das virale Glykoprotein GP (2.5.1.1) ist ein Typ-I-Transmembranprotein und das einzige Oberflächenprotein des MARV; es wird im ER gefaltet, modifiziert und prozessiert. Das GP neigt zu einer Akkumulation im ER und es wurde vermutet, dass die Anheftung der vielen Zuckerseitenketten die Prozessierung

im ER verzögert, bevor GP über das Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran transportiert wird^{59,10,173,144,63,182,50}.

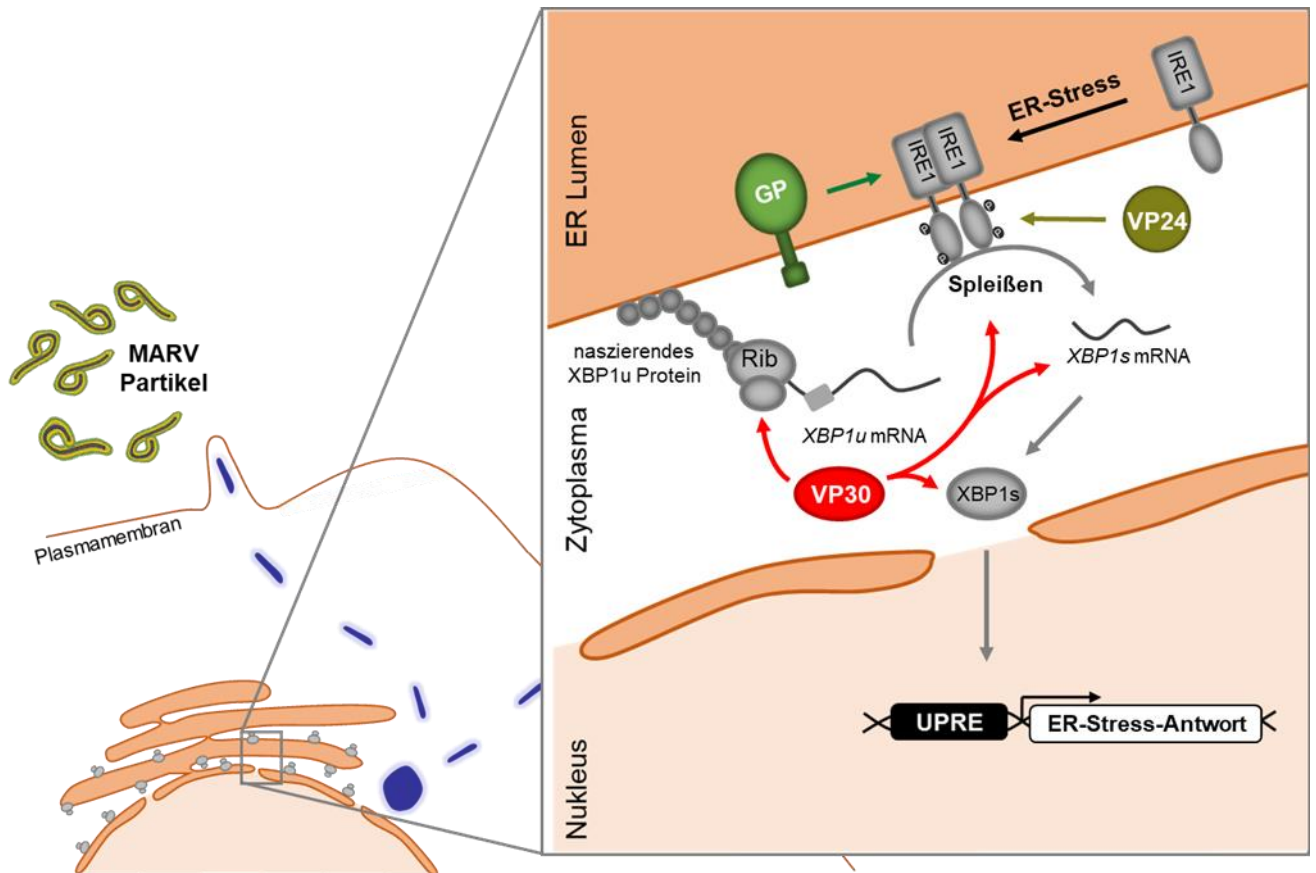


Abb. 2.6: MARV GP und VP30 regulieren die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort

MARV GP und VP24 führen zu einer Aktivierung der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort (Abb. 2.5). Im Gegensatz dazu reduziert VP30 die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort. Vermutlich findet diese Regulation im Zytoplasma statt. Abbildung in Anlehnung an Cornelius Rohde M.Sc. Arbeit¹⁴².

In Vorarbeiten (Cornelius Rohde M.Sc. Arbeit, Abb. 2.6)¹⁴² konnte gezeigt werden, dass MARV Proteine die ER-Stress-Antwort (2.7.1) regulieren. Die solitäre Expression von GP führte zu einer Dosis-abhängigen Aktivierung der ER-Stress-spezifischen Promotoren UPRE und ERSE in humanen Zelllinien (HuH7, HEK293)¹⁴². UPRE und ERSE können durch Homodimere des ATF6, als auch durch Heterodimere von ATF6 und XBP1s aktiviert werden^{160,185}. Die beobachtete Aktivierung konnte nicht auf den Transkriptionsfaktor ATF6 zurückgeführt werden, was eine Aktivierung durch XBP1s nahelegte. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Expression von GP_{dMLD} (2.5.1.2) zu einer signifikant reduzierten Aktivierung der ER-Stress-Antwort führt (UPRE-Assay, 3.2.2.6), obwohl eine verstärkte Expression im Vergleich zum wildtypischen GP beobachtet wurde. Im Gegensatz zur Einzeldexpression von GP konnte keine Aktivierung der ER-Stress-spezifischen Promotoren UPRE und ERSE durch eine MARV Infektion detektiert werden, obwohl die Expressionslevel von GP während der Infektion und

der solitären Transfektion vergleichbar stark waren. Weiterführende Ko-Expressionsstudien zeigten, dass das MARV Protein VP30 (2.5.2) die GP-abhängige ER-Stress-Induktion gegenregulieren kann. Darüber hinaus konnte VP30 auch die Tg- (2.7.2.1) und Tu-abhängige (2.7.2.2) ER-Stress-Antwort reduzieren. Wie VP30 die ER-Stress-Antwort reguliert, konnte bisher nicht gezeigt werden, es ist jedoch naheliegend, dass die Regulation im Zytosol stattfindet, wo VP30 lokalisiert ist (Abb. 2.6)¹⁴².

Neben GP führte auch die Expression von VP24 (2.5.3) zu einer Aktivierung der ER-Stress-spezifischen Promotoren UPRE und ERSE. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Proteinmenge des solitär exprimierten VP24 deutlich größer war als die Proteinmenge, die während einer MARV Infektion vorliegt¹⁴², zudem ist VP24 in der Lage die Oxidative-Stress-Antwort zu aktivieren^{43,132,42,83,133}. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Oxidativen-Stress-Antwort auch zu einer Aktivierung der ER-Stress-Antwort führen kann¹⁰⁵.

2.7.4 Viren und die ER-Stress-Antwort

Viren sind für ihre Replikation auf die Wirtszelle angewiesen. Virale Glykoproteine werden am rauen ER translatiert und im Lumen des ER modifiziert, was zu einer Überlastung des ER führen kann und somit dessen Homöostase stört. Um diese wiederherzustellen, werden verschiedene Signalwege aktiviert, die zusammengefasst als ER-Stress-Antwort (2.7.1) bezeichnet werden. Dabei werden zunächst Gene reguliert, die die Kapazität des ER erhöhen sollen, wie z.B. Chaperone oder ERAD-Komponenten. Eine zu starke oder lang-anhaltende Aktivierung der ER-Stress-Antwort führt jedoch zur Apoptose der Zelle. Die ER-Stress-Antwort kann somit von Vor- oder Nachteil für Viren sein^{145,174,153}.

Viren modulieren die ER-Stress-Antwort sehr unterschiedlich, was die folgenden Beispiele verdeutlichen sollen. Die Beispiele fokussieren sich auf die IRE1 Signalkaskade (Abb. 2.5).

Eine Influenza Virus (A/PR/8/34, H1N1) Infektion führt in primären Atemwegs-Epithelzellen zur Aktivierung der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort. Eine Inhibierung der Endoribonuklease-Domäne von IRE1 führt zu einer Reduktion des Virus Titer⁷⁰, was verdeutlicht, dass die XBP1s-abhängige ER-Stress-Antwort einen proviralen Effekt für das Influenza Virus hat.

Auch das Japanische Enzephalitis Virus (JEV) aktiviert IRE1. Dabei fördert die RIDD die Virus Replikation, da eine Inhibierung der RIDD zu einem reduzierten Virus Titer führt¹⁶. Für VSV, das Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) und das Hepatitis C Virus (HCV) konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von IRE1 zu einer verstärkten Replikation der Viren führt, da, vermutlich über RIDD, die pro-apoptotische miRNA miR125a degradiert wird⁵³. Das verdeutlicht, dass

die IRE1-abhängige Aktivierung der RIDD für JEV, VSV, HSV-1 und HCV von Vorteil ist. Zusammengenommen kann die Aktivierung der verschiedenen IRE1-Funktionen für die Replikation verschiedener Viren (Influenza, JEV, VSV, HSV-1, HCV) wichtig sein.

Auch das Respiratorische Synzytial Virus (RSV) aktiviert die IRE1- und ATF6-induzierte ER-Stress-Antwort. Im Gegensatz zur Influenza- und JEV-Replikation, ist die RSV-Replikation verstärkt in IRE1-defizienten Zellen. Der Effekt ist XBP1-unabhängig, was vermuten lässt, dass die RIDD restriktiv für RSV ist⁶⁹. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Tg-abhängige Stimulation der ER-Stress-Antwort während einer RSV Infektion die Virus Freisetzung reduziert¹⁴⁶. Das verdeutlicht, dass die IRE1-abhängigen Signalkaskaden einen sehr diversen Einfluss auf Viren haben kann.

Während einer *Severe acute respiratory syndrome* (SARS) Coronavirus Infektion findet man in infizierten Zellen nur die ungespleißte *XBP1u* mRNA. Für diesen Effekt scheint das virale Hüllprotein E verantwortlich zu sein, in dessen Abwesenheit die gespleißte Isoform der *XBP1* mRNA (*XBP1s*) nachweisbar ist, die für den XBP1s Transkriptionsfaktor kodiert. E kann darüber hinaus auch die Tg- und Tu-induzierte XBP1s-abhängige ER-Stress-Antwort reduzieren³³. Auch während einer Chikungunya Virus (CHIKV) Infektion kann keine Aktivierung der ER-Stress-Antwort nachgewiesen werden, wohingegen die Expression der Hüllproteine zu einer Aktivierung der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort führt. Weiter konnte gezeigt werden, dass das CHIKV Protein nsP2, welches die zelluläre Transkription blockiert, auch die IRE1-abhängige Aktivierung gegenregulieren kann⁵⁸. HSV-1 profitiert von einer aktiven IRE1 über RIDD⁵³, gleichzeitig degradiert dessen virales Protein UL41 die *XBP1* mRNA und wirkt somit einer Aktivierung der ER-Stress-Antwort entgegen¹⁹⁴. Das UL50 Protein des Humanen Cytomegalovirus (HCMV) und das homologe M50 Protein des Murinen Cytomegalovirus (MCMV) sind in der Lage IRE1 zu degradieren und somit ein Spleißen der *XBP1u* mRNA zu verhindern¹⁵⁶. In XBP1-defizienten Zellen ist die Virus Replikation von MCMV jedoch gehemmt, was eine ER-Stress-unabhängige Rolle des XBP1u Proteins für MCMV vermuten lässt⁴¹. All diese Beispiele verdeutlichen, dass Viren auf unterschiedlichste Weise bestimmte Teile der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort zu ihrem Vorteil regulieren.

2.7.5 Die ER-Stress-Antwort als therapeutisches Ziel

Die ER-Stress-Antwort spielt eine wichtige physiologische Rolle bei verschiedensten Krankheiten und ist ein interessanter Ansatzpunkt für die translationale Forschung. Ungefaltete und fehlgefaltete Proteine induzieren viele Krankheiten. So gehen z.B. Erkrankungen wie Chorea Huntington, Alzheimer, Parkinson oder Amyotrophe Lateralsklerose mit einer Aktivierung der ER-Stress-Antwort (2.7.1) einher. Auch das Entstehen und die

Ausbreitung von Tumoren kann durch eine aktivierte ER-Stress-Antwort begünstigt werden. Für Amyotrophe Lateralsklerose und Chorea Huntington konnte bereits gezeigt werden, dass der ER-Stress-assoziierte Transkriptionsfaktor XBP1 (Abb. 2.5) eine wichtige Rolle spielt und ein mögliches therapeutisches Ziel darstellt^{73,74,139}.

Derzeit gibt es verschiedene Ansätze die ER-Stress-Antwort therapeutisch zu manipulieren. Darunter auch eine Reihe an natürlichen Substanzen, die zur Aktivierung der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort genutzt werden können, wie verschiedene bakterielle Toxine (Citrinin, Methoxycitrin, Ochratoxin A, Patulin) und Flavonoide (Kaempferol, Quercetin, Apigenin)^{73,74,139}. Diese könnten als mögliche Therapeutika für eine MARV Infektion getestet werden, da die Regulation der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort wichtig für die virale Replikation zu sein scheint (2.7.3)¹⁴².

2.8 Fragestellung

MARV Infektionen können im Menschen zu einem schweren Fieber mit einer Letalitätsrate von bis zu 90% führen¹⁹³. Zur effektiven Vermehrung nutzt das MARV nicht nur die Translationsmaschinerie der infizierten Wirtszelle, sondern auch Funktionen vieler anderer zellulärer Proteine. Durch Wechselwirkungen des Virus mit zellulären Proteinen können diese in ihrer Funktion beeinflusst und Signalkaskaden in der Zelle positiv oder negativ reguliert werden⁷⁸.

GP ist das einzige Oberflächenprotein des MARV. Als Typ-I-Transmembranprotein wird es im ER synthetisiert, modifiziert und glykosyliert, hierbei akkumuliert es zeitweise in großen Mengen im ER¹⁰, was zur Induktion von ER-Stress führt. Die Wirtszelle versucht diese Stress-Situation über die Regulation verschiedener Signalkaskaden der ER-Stress-Antwort aufzuheben^{153,174,145}.

Viren modulieren die ER-Stress-Antwort zu ihrem Vorteil auf unterschiedliche Weise. Hierzu zählt auch der hoch konservierte IRE1-abhängige Signalweg. Für das Influenza Virus wurde z.B. gezeigt, dass es die IRE1-abhängige Signalkaskade aktiviert und die virale Replikation unterstützt⁷⁰. Für andere Viren wie z.B. SARS konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine spezifische und aktive Gegenregulation der ER-Stress Antwort stattfindet, um eine optimale Virus Replikation zu gewährleisten³³.

In Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die solitäre Expression des MARV GP zu einer Aktivierung der IRE1-abhängigen Stress-Antwort führt, nicht hingegen die Infektion von Zellen mit dem MARV. Der Grund hierfür ist, dass der MARV Transkriptionsfaktor VP30 die GP-abhängige ER-Stress-Antwort während der Infektion gegenregulieren kann¹⁴².

Aufbauend auf diesen Beobachtungen waren die Hauptziele der Arbeit die Aufklärung des Mechanismus, durch den VP30 die IRE1-abhängige Stress-Antwort reguliert, und die Charakterisierung des Einflusses, den die Signalkaskade auf die Vermehrung des MARV hat. Ob die vielen Glykosylierungen des GPs bei der Induktion der IRE1-abhängigen Stress-Antwort indirekt eine Rolle spielen, sollte ebenfalls näher untersucht werden.

Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass die Regulation der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort wichtig für die MARV Replikation ist¹⁴². Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen die Rolle der ER-Stress-Antwort für MARV weiter zu charakterisieren und darüber hinaus die Mechanismen der Virus-Wirt-Interaktion detaillierter zu beschreiben.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Agarose PeqGold universal	Peqlab, Erlangen (D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, Hercules (USA)
Ampicillin (Natriumsalz)	Serva, Heidelberg (D)
Bacto™-Agar	Becton, Dickinson & Company, (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München (D)
Bromphenolblau (BPB)	Roth, Karlsruhe (D)
Carboxymethylcellulose (CMC)	Sigma-Aldrich, München (D)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt (D)
Dinatriummethylenediamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe (D)
Essigsäure (HAc)	Merck, Darmstadt (D)
Ethanol abs. (EtOH)	Sigma-Aldrich, München (D)
Ethidiumbromid (EtBr) (10 mg/ml)	Promega, Mannheim (D)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (D)
6x MassRuler™ DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Glycin	Roth, Karlsruhe (D)
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt (D)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München (D)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe (D)
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg (D)
Methanol abs. (MeOH)	Sigma-Aldrich, München (D)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Bio-Rad, Hercules (USA)
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt (D)
N(onidet)P40	Merck, Darmstadt (D)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe (D)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München (D)
Pepton	Merck, Darmstadt (D)
Rotiphorese® Gel 30 (Polyacrylamid)	Roth, Karlsruhe (D)
Saccharose	Serva, Heidelberg (D)
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt (D)

TransIT® LT1 Transfection Reagent	Mirus Bio LLC, Madison (USA)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Acros Organics, Geel (B)
TritonX-100	Sigma-Aldrich, München (D)
Tween® 20	neoLab®, Heidelberg (D)
β-Mercaptoethanol (14,3 M)	Sigma-Aldrich, München (D)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-well / 12-well / 24-well / 96-well	
Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
96-well Platten LumiNunc™, weiß	Nunc, Roskilde (DK)
Blottingpapier GB 002 (Whatman® 3 mm)	Whatman, Maidstone (UK)
Deckgläser, Ø 12 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Fluoprep	bioMérieux, Marcy-l'Etoile (Fr)
Glasplatten <i>Mini Protean® System</i> (für WB)	Bio-Rad, Hercules (USA)
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Nitrocellulose Transfer Membran PROTRAN®, Ø 0,45 µm	Whatman, Maidstone (UK)
Objektträger, 76 x 22 mm	Menzel, Braunschweig (D)
Parafilm	Pechiney Plastic, Menasha (USA)
PCR-Tubes, 0,2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf (D)
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg (D)
Pipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml Cellstar®	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Pipettenspitzen 0,1-1 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Starlab, Ahrensburg (D)
TipOne® (mit und ohne Filter)	
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml / 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
PVDF Membran, Immobilon™ P, Ø 0,45 µm	Millipore, Billerica (USA)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürnberg (D)
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Reaktionsgefäße 5 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Skalpell no.11, oder no.22 Feather	Feather, Osaka (J)
Zellkulturflaschen (75 cm²)	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg (D)
Zentrifugenröhrchen <i>Ultra-Clear™</i> (SW60)	Beckman Coulter, Palo Alto (USA)
Zentrifugenröhrchen <i>Ultra-Clear™</i> (SW32)	Beckman Coulter, Palo Alto (USA)

3.1.3 Kits

Renilla-Juice BIG KIT	P.J.K, Kleinblittersdorf (D)
Beetle-Juice BIG KIT	P.J.K, Kleinblittersdorf (D)
E.Z.N.A.® DNA Probe Purification Kit	Omega Bio-Tek Inc., Norcross (USA)
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit	Omega Bio-Tek Inc., Norcross (USA)
E.Z.N.A.® Fast Filter Plasmid DNA Maxi Kit	Omega Bio-Tek Inc., Norcross (USA)
E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit	Omega Bio-Tek Inc., Norcross (USA)
QIAquick® Omniscript® Reverse Transcription	Qiagen, Hilden (D)
RNase-Free Dnase Set	Qiagen, Hilden (D)
Rneasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden (D)
Luminata Forte Western HRP	Millipore™, Burlington (USA)
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München (D)
Zellextraktionspuffer (CEB)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim (D)
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent, Santa Clara (USA)
Z-Competent™ E.coli Transformation Kit	Zymo Research, Orange (USA)
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden (D)

3.1.4 Geräte

Brutschrank HERAcCell150, HERAcCell240	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad, Hercules (USA)
DNA-Gelkammern	bsb11, Schauenburg (D)
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen (D)
Eppendorf Reference® Pipetten (0,1-2,5 µl, 0,5- 10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (D)
Fluoreszenzmikroskop <i>Axiovert200M</i>	Zeiss, Jena (D)
Geldokumentationssystem GelDoc 2000	Bio-Rad, Hercules (USA)
Heizblock Neoblock 1	neoLab®, Heidelberg (D)
Horizontalschüttler GFL 318	Gesellschaft für Labortechnik, (D)
Lichtmikroskop Wilovert®	Will, Wetzlar (D)
Luminometer Centro LB 960	Berthold, Bad Wildbad (D)

Magnetrührer	Heidolph, Kelheim (D)
Metallblockthermostat TCS	neoLab®, Heidelberg (D)
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau (D)
Minizentrifuge Minifuge™	Labnet International, Woodbridge (USA)
Multikanal-Pipette <i>Matrix Impactz</i> ®	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Odyssey CLx Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
Pipettierhilfe pipetus®-akku	Integra Bioscience, Chur (CH)
Plattenlesegerät PHOmO	Autobio Labtec Instruments Co., Ltd., Shanghai (CN)
Power Supply Consort EV231	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
SDS-Gelkammern Mini-Protean	Bio-Rad, Hercules (USA)
SemiDry Blotapparat Fast-Blot B34	Biometra, Göttingen (D)
Sicherheitswerkbank Heraeus Herasafe®	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Spektralphotometer Nanodrop ND1000	Peqlab, Erlangen (D)
Thermocycler Primus 25	Peqlab, Erlangen (D)
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg (D)
Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5417 R	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ultrazentrifuge <i>Optima</i> ™ <i>MAX-XP</i>	Beckman Coulter, Palo Alto (USA)
UV-Schirm 302 nm	Bachofer, Reutlingen (D)
Wasserbad <i>MT</i>	Lauda, Lauda-Königshofen (D)

3.1.5 Puffer

Antikörper-Puffer für In-Gel Western	BSA	100 g
	Tween® 20	1 ml
	PBS _{def}	ad 1000 ml
Antikörper-Puffer für WB I	Magermilchpulver	10 g
	Tween® 20	1 ml
	PBS _{def}	ad 1000 ml
Antikörper-Puffer für WB II	BSA	50 g
	Tween® 20	1 ml
	TBS	ad 1000 ml

Blockierungs-Puffer für IFA	BSA	2%
	Tween® 20	0,2%
	Glycerin	5%
	NaN ₃	0,05%
	in PBS _{def}	
Blockierungs-Puffer für WB I	Magermilchpulver	100 g
	PBS _{def}	ad 1000 ml
Blockierungs-Puffer für WB II	Magermilchpulver	100 g
	TBS	ad 1000 ml
Fixier-Lösung für IFA	Paraformaldehyd in PBS _{def}	4%
Fixier-Lösung für In-Gel Western	Isopropanol	50 ml
	Essigsäure	5 ml
	dH ₂ O	ad 100 ml
Ko-IP-Puffer (autoklaviert)	NaCl	100 mM
	Tris-HCl, pH 8.0	20 mM
	EDTA, pH 8.0	5 mM
	NP40	1%
	in dH ₂ O	
Ko-IP-Puffer (gebrauchsfertig)	cOmplete™	1 Tablette
	Ko-IP Puffer	40 ml
Lyse-Puffer für Ko-IP	Triton X-100 in Ko-IP Puffer (gebrauchsfertig)	1%

PBS _{def} (autoklaviert)	KCl	0,20 g
	KH ₂ PO ₄	0,20 g
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	NaCl	8,00 g
	dH ₂ O	ad 1000 ml
Permeabilisierungs-Lösung für IFA	Triton X-100	0,1%
	in PBS _{def}	
Proteinprobenpuffer (PP, 4x)	β-Mercaptoethanol	10 ml
	Bromphenolblau	200 mg
	Glycerin	1,15 g
	1 M Tris/HCl, pH 6.8	10 ml
	SDS	4 g
	dH ₂ O	ad 100 ml
Proteingellaufpuffer (10x)	Glycin	144 g
	Tris-Base	30 g
	SDS	10 g
	dH ₂ O	ad 100 ml
Quenching-Lösung für IFA (autoklaviert)	Glycin	100 mM
	in PBS _{def}	
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	SDS	0,4%
	Tris/HCl, pH 6.8	1 M
SDS-PAGE Trenngelpuffer	SDS	0,4%
	Tris/HCl, pH 8.8	1,5 M
Saccharose-Lösung (20%) (autoklaviert)	Saccharose	20%
	in TNE	

TAE-Puffer (50x), pH 8.0	0,5 M EDTA, pH 8.0	100 ml
	Essigsäure	57,1 g
	Tris-Base	242 g
	dH ₂ O	ad 1000 ml
TBS (autoklaviert)	Tris/HCl, pH 7.4	50 mM
	NaCl	150 mM
	in dH ₂ O	
TNE-Puffer (1x) (autoklaviert)	EDTA, pH 8.0	1 mM
	NaCl	150 mM
	Tris/HCl, pH 7.5	10 mM
Transferpuffer (1x)	Ethanol	100 ml
	Glycin	144 mg
	Tris	300 mg
	dH ₂ O	ad 1000 ml
Waschpuffer für In-Gel Western/WB	Tween® 20	1 ml
	PBS _{def}	ad 1000 ml
Zellextraktionspuffer (CEB)	PMSF (1 mM)	0,5 µl
	cOmplete™ (25x)	2 µl
	Calyculin A (10 µM)	0,5 µl
	CEB (10x)	5 µl
	PBS _{def}	ad 50 µl

3.1.6 Lösungen

Ampicillin Stammlösung	Ampicillin	100 mg
	dH ₂ O	ad 1 ml

Thapsigargin Stammlösung (1 μ M)	Thapsigargin DMSO	1 mg 1536 μ l
Tunicamycin Stammlösung (1 μ M)	Tunicamycin DMSO	1 mg 1192 μ l

3.1.7 Wachstumsmedien für Bakterien

LB-Agar	Bacto™ Agar LB-Medium	3,75 g ad 250 ml
LB-Medium	NaCl Hefeextrakt Pepton dH ₂ O	10 g 5 g 10 g ad 1000 ml
NZY ⁺	NaCl Hefeextrakt NZ Amine dH ₂ O	5 g 5 g 10 g ad 1000 ml

3.1.8 Wachstumsmedien für Säugerzellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach (D)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
L-Glutamin (200 mM)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
OPTI-MEM® I	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)
Trypsin-EDTA (0,5%)	Gibco®/Invitrogen™, Karlsruhe (D)

DMEM +++	DMEM	500 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	5 ml
	FCS	50 ml

DMEM 3%++	DMEM	500 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	5 ml
	FCS	15 ml
DMEM 2%++	DMEM	500 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	5 ml
	FCS	10 ml
DMEM 0%++	DMEM	500 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	5 ml
IMDM +++	IMDM	500 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	5 ml
	FCS	50 ml
IMDM 2%+	IMDM	500 ml
	Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	5 ml
	FCS	10 ml
IMDM 0%+	IMDM	500 ml
	Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	5 ml
CMC (autoklaviert)	Carboxymethylcellulose in PBS _{def}	4%

2xMEM 4%++	2xMEM	250 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Penicillin-Streptomycin (5000 U/ml)	5 ml
	FCS	10 ml
DMEM 4%PFA	Paraformaldehyd in DMEM	4%

3.1.8 Nukleinsäuren

3.1.8.1 Größenstandard

Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

3.1.8.2 Primer

Nummer	Name	Nukleotidsequenz (5'-3')	Verwendung
1233	pCAGGS-fwd	CCTTCTTCTTTTTCCTACAG	Sequenzierung, Klonierung
1234	pCAGGS-rev	CTGACTTCTGGCTAATAAAGG	Sequenzierung, Klonierung
3526	HA-VP30 NotI rev	GCAGCGGCCGCTAATCACTGTCCTT TACCTTGACTTTGAGGAAGAATAAAA TGATCGTATGAG	Klonierung
3552	HA-VP30 XhoI fwd	GCACTCGAGATGTATCCATATGATG TTCCAGATTATGCTATGCAACAACCT CGCGGAAGAAGT	Klonierung
3817	MARV VP30-C92S H96L	GCGCTGATCCCACTTCTAATAGAGA TCTTGACCTTGATAATCTA	<i>in vitro</i> Mutagenese
3818	MARV VP30-4LA	CAAATCGTGAAGCTGCGGCAGCGAT GGCCCGAAAAATGCTCCCAATAC	<i>in vitro</i> Mutagenese
3820	MARV VP30-4PA	CAACTTATCGAAACCCGCTGCTGCT GCAAAAGACATGTGCAGGAA	<i>in vitro</i> Mutagenese
3854	Flag-XBP1 XhoI fwd	GCACTCGAGGAAATGGACTACAAAG ACGATGACGACAAGGTGGTGGTGG CAGCCGCGCCGAAC	Klonierung

3855	Flag-XBP1 BamHI rev	GCAGGATCCGACACTAATCAGCTGG GGAAAGAGTTCATTGGCAAAGTGT CCTCCCAAGAATGGTTTACACCAAG CAGAGAGGACATG	Klonierung
3856	eGFP BamHI fwd	GCAGGATCCGTGAGCAAGGGCGAG GAG	Klonierung
3857	eGFP NheI rev	GATCTGCTAGCTAATTAAGAGCTCG CGGCC	Klonierung
3945	mCherry XhoI fwd	GCACTCGAGTAAATGGTGAGCAAGG GCGAGGA	Klonierung
3946	mCherry NheI rev	GCAGCTAGCTCCTTATTGCTTGTAC AGCTCGT	Klonierung
4238	HA-VP35 XhoI fwd	GCACTCGAGATGTATCCATATGATG TTCCAGATTATGCTTGGGACTCATC ATACATGCAGCAA	Klonierung
4239	HA-VP35 NotI rev	GCAGCGGCCGCTTAGATTTTAAGGG CCCGTGTTTCACCTTGCTCA	Klonierung
4507	XBP1dHR2 fwd 4507	CACCTTCTTCTTTTTCTACAG	Klonierung

3.1.8.3 Rekombinante Plasmide

Rekombinante Plasmide

Plasmid	Ursprung
pCAGGS-MARV-VP24	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV-VP30	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV-VP30-GFP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV-VP35	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV-HA-VP35	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV-VP40	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV-GP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV-NP	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV-NP-HA	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV-L	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-MARV-GP _{dMLD}	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS (LV)	Institut für Virologie, Marburg (D)
pCAGGS-eGFP	Institut für Virologie, Marburg (D)

pCAGGS-T7-Polymerase	Y. Kawaoka, Madison, WI (USA)
3M-5M (Minigenom)	Institut für Virologie, Marburg (D)
pGL3-5xUPRE	K. Mori, Kyoto (J)
pGL4.73	Promega, Mannheim (D)
pTM1-MARV-VP30 AA	Institut für Virologie, Marburg (D)
pTM1-MARV-VP30 DD	Institut für Virologie, Marburg (D)

Erstellte rekombinante Plasmide

Plasmid	Clone Chart Nummer
pCAGGS-MARV-GP-HA	CR-01/2016
pCAGGS-MARV-HA-VP30	CR-01/2014
pCAGGS-MARV-HA-VP30 C92S, H96L	CR-03/2015
pCAGGS-MARV-HA-VP30 L106-109A (4LA)	CR-02/2015
pCAGGS-MARV-HA-VP30 P71-74A (4PA)	CR-01/2015
pCAGGS-MARV-HA-VP30 S40D, S42-43D, S46-47D, S50-51D (DD)	CR-02/2018
pCAGGS-MARV-HA-VP30 S40A, S42-43A, S46-47A, S50-51A (AA)	CR-01/2018
pCAGGS-Flag-XBP1-GFP	CR-04/2015
pCAGGS-IRE1	CR-02/2017
pCAGGS-mCherry	CR-06/2015

3.1.8.4 Sonstige Nukleinsäuren

dNTPs	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat	Je 10 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham
	2'-Desoxycytosin 5'-Triphosphat		(USA)
	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat		
	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat		

3.1.9 Proteine

3.1.9.1 Enzyme

PstI-HF (20000 U/ml)	NEB, Frankfurt (D)
NotI-HF (20000 U/ml)	NEB, Frankfurt (D)
BamHI (20000 U/ml)	NEB, Frankfurt (D)
NheI (20000 U/ml)	NEB, Frankfurt (D)
XhoI (20000 U/ml)	NEB, Frankfurt (D)
MfeI (20000 U/ml)	NEB, Frankfurt (D)

RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
RNase A/T1 Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

3.1.9.2 Antikörper

Erstantikörper	Verdünnung (Puffer)	Ursprung
αMARV NP (59-9-10), monoklonal, IgG, Maus	1:4000 (Antikörper-Puffer für WB I)	BioGenes GmbH, Berlin (D)
αMARV VP30 (11-6-11), monoklonal, IgG, Maus	1:1000 (Antikörper-Puffer für WB I)	BioGenes GmbH, Berlin (D)
αMARV GST-VP24 (27.06.2002), polyklonal, Kaninchen	1:500 (Antikörper-Puffer für WB I)	Institut für Virologie, Marburg (D)
αMARV GP (50-6-10), monoklonal, IgG, Maus	1:100 (Antikörper-Puffer für WB I)	Institut für Virologie, Marburg (D)
αMARV VP40 (40-2-2), monoklonal, IgG, Maus	1:4000 (Antikörper-Puffer für WB I)	Institut für Virologie, Marburg (D)
αMARV VP35-2 (16.4.1898), polyklonal, Meerschweinchen	1:500 (Antikörper-Puffer für WB I)	Institut für Virologie, Marburg (D)
αFlag, polyklonal, IgG, Kaninchen	1:500 (Antikörper-Puffer für WB I)	Sigma Aldrich, St Louis (USA)
αHA, polyklonal, IgG, Kaninchen	1:500 (Antikörper-Puffer für WB I)	Rockland, Jacksonville (USA)
αHA, monoklonal, IgG, Maus	1:1000 (Antikörper-Puffer für WB I)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
αTubulin, monoklonal, IgG, Maus	1:1000 (Antikörper-Puffer für WB I)	Dianova, Hamburg (D)
αIRE1, monoklonal, IgG, Kaninchen	1:1000 (Antikörper-Puffer für WB II)	Cell Signaling Technology, Boston (USA)
αIRE1-P (S724), polyklonal, IgG, Kaninchen	1:1000 (Antikörper-Puffer für WB II)	Abcam, Cambridge (GB)

Zweitantikörper

Ziege α Maus, HRP, IgG (1 g/l)	1:40000 (Antikörper-Puffer für WB I)	Dako, Glostrup (DK)
Kaninchen α Meerschweinchen, HRP, IgG (1 g/l)	1:40000 (Antikörper-Puffer für WB I)	Dako, Glostrup (DK)
Schwein α Kaninchen, HRP, IgG (1 g/l)	1:40000 (Antikörper-Puffer für WB I)	Dako, Glostrup (DK)
Ziege α Meerschweinchen, Alexa Fluor 680, IgG	1:5000 (Antikörper-Puffer für WB I)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ziege α Maus, Alexa Fluor 680, IgG	1:5000 (Antikörper-Puffer für WB I)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Agarose-gekoppelte**Antikörper**

α HA-Agarose, monoklonal, IgG, Maus	Ko-IP-Puffer (gebrauchsfertig)	Sigma Aldrich, St Louis (USA)
--	--------------------------------	-------------------------------

3.1.9.3 Proteinmarker

PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
---	---

3.1.10 Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Zelltyp	Referenz-Nummer
HAP1 Zellen	humane Fibroblasten-ähnliche Zellen	CVCL Y019
HAP1 IRE1 KO Zellen	HAP1 Zellen ohne IRE1 Gen	CVCL SM43
HAP1 XBP1 KO Zellen	HAP1 Zellen ohne XBP1 Gen	CVCL TY31
HuH7 Zellen	humane Hepatomazelllinie	JCRB 0403
VeroE6 Zellen	Nieren Zelllinie, Grüne Meerkatze	ATCC CRL-1586

3.1.11 Viren

Name	Accession Number
<i>Lake Victoria marburgvirus</i> strain Musoke	NC_001608

3.1.12 Software

Software

Chromas Lite 2.1.1

Clone Manager 9

Fiji

Graphpad

Image Lab 4.0

Image Studio 3.1

Office 2013/2016

Nis-Elements

Quantity One

Visitron VisiView

Verwendung

Technelysium, South Brisbane (AUS)

Sci-Ed-Software, Morrisville (USA)

Image Lab 4.0 Bio-Rad, Hercules (USA)

Li-Cor, Lincoln (USA)

Microsoft, Redmond (USA)

Leica, Wetzlar (D)

Bio-Rad, Hercules (USA)

Visitron Systems, Puchheim (D)

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Reverse Transkription

Eine Reverse Transkription ermöglicht es *in vitro* von RNA als Matrize eine einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) zu amplifizieren. Die Reaktion benötigt einen Primer bestehend aus 15 bis 35 Nukleotiden (dNTPs), der den Start der zu vervielfältigenden DNA Sequenz markiert. Für die Dauer der Reaktion (1-2 Stunden) wird die Temperatur konstant bei 37°C, dem Temperaturoptimum der Reversen Transkriptase, gehalten. Das Anlagern des Primers und die Transkription finden zeitgleich statt. Die verwendete Omniscript® Reverse Transkriptase (QIAGEN) verfügt neben einer 3'-5' RNA- und DNA-abhängigen Polymerasefunktion über eine RNase H Aktivität, mit der die RNA aus DNA-RNA Hybriden entfernt wird.

Reaktionsansatz:

RNA	3-5 µl
Primer	1 µM
dNTPs	je 500 µM
RNase Inhibitor	10 U
Omniscript® Reverse Transkriptase	4 U
dH ₂ O (RNase frei)	ad 20 µl

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wird ein spezifischer doppelsträngiger DNA Abschnitt amplifiziert, der mit jedem Zyklus (35-40x) exponentiell vermehrt wird. Hierfür werden ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer komplementär zu Beginn und Ende der zu synthetisierenden DNA Sequenz benötigt. Die Primer bestehen aus ca. 15 bis 35 dNTPs und können in ihrem 5'-Bereich nicht komplementäre Sequenzen beinhalten, wie z.B. Schnittstellen von Restriktionsenzymen.

Um DNA zu amplifizieren wird diese zunächst durch eine Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Anschließend wird die Temperatur gesenkt, sodass sich die Primer an komplementäre Einzelstrangsequenzen anlagern können (Annealing).

Hierbei wird zunächst eine Temperatur gewählt, die 3 bis 5°C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer liegt. Für die Neusynthese der Doppelstränge wird die Temperatur auf das Optimum der *Pwo* (*Pyrococcus woesei*)-Polymerase erhöht (Elongation). Die *Pwo*-Polymerase besitzt neben der 5'-3' Polymeraseaktivität eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, die eine hohe Lesegenauigkeit garantiert. Um DNA-Kontaminationen auszuschließen, wird als Negativ-Kontrolle stets ein Ansatz ohne DNA mitgeführt.

Reaktionsansatz:

DNA	10-50 ng
Vorwärtsprimer	300 nM
Rückwärtsprimer	300 nM
dNTPs	je 200 µM
Puffer für <i>Pwo</i> -Polymerase	5 µl
<i>Pwo</i> -Polymerase	3 U
dH ₂ O (RNase frei)	ad 50 µl

Programm:

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	94°C	1-2 min
Denaturierung		94°C	15 s
Annealing	35-40	50-64°C	30 s
Elongation		68°C	1 min/kb
Elongation	1	68°C	7 min
Ende der Synthese	1	8°C	∞

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.1.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Bei der molekularbiologischen Arbeit mit DNA kommt es immer wieder zu Kontaminationen mit Phenol, Chloroform, Ethanol, EDTA, Detergenzien, Salzen oder Proteinen. Diese können einen negativen Einfluss auf biochemische Reaktionen haben und müssen für weitere Experimente entfernt werden.

Mit dem *Omega Biotek® E.Z.N.A. DNA Probe Purification Kit* können DNA Fragmente, die größer als 100 bp sind, über eine Säulenmatrix aufgereinigt werden. Die Reinigung wird

anhand der beiliegenden Arbeitsanleitung durchgeführt. Die gereinigte DNA wird mit 30 µl – 60 µl dH₂O eluiert.

Das *Omega Biotek® E.Z.N.A. Gel Extraction Kit* ermöglicht es, DNA Fragmente nach der präparativen Auftrennung (3.2.1.4) aus dem Agarosegel zu isolieren. Die Aufreinigung erfolgt über eine Säulenmatrix und wird entsprechend der beiliegenden Arbeitsanleitung durchgeführt. Eluiert wird mit 50 µl – 60 µl dH₂O.

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

DNA besitzt durch die Phosphatgruppen im Zucker-Phosphat-Rückgrat eine negative Ladung und kann somit in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden. DNA wandert in Richtung Anode, wobei die Geschwindigkeit abhängig von ihrer Größe ist. Kleinere Fragmente wandern durch die netzartige Gelstruktur schneller als große Fragmente. Mit Hilfe eines DNA-Größenstandards können die Größen der Fragmente abgeschätzt werden. Unter Verwendung des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (EtBr) und UV-Licht werden die DNA Fragmente sichtbar gemacht.

Analytische Auftrennung

Agarose wird durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und anschließend in einen Gelschlitten gegossen. Nach der Polymerisation wird der Schlitten in eine Elektrophoresekammer gelegt und das Gel mit TAE-Puffer bedeckt. Die aufzutrennenden Proben (5 oder 10 µl) werden mit 1 oder 2 µl 6x Loading Dye versetzt und aufgetragen. Zusätzlich werden 5 µl des Größenstandards pipettiert. Zur Auftrennung der Fragmente wird eine Spannung von 80-120 Volt (V) angelegt. Im Anschluss erfolgt die Färbung der DNA in einer wässrigen EtBr-Lösung (1 µl EtBr pro 10 ml H₂O). Nach 20 min wird die DNA unter Verwendung des Geldokumentationssystems GelDoc 2000 visualisiert.

Präparative Auftrennung

Das Agarosegel wird wie unter 3.2.1.4 - Analytische Auftrennung beschrieben vorbereitet. Das Probenvolumen liegt bei 30-100 µl inklusive *Loading Dye*. Nach der Auftrennung und Färbung werden die relevanten Banden auf einem UV-Schirm ($\lambda = 365 \text{ nm}$) mit dem Skalpell

ausgeschnitten und mittels *Omega Biotek® E.Z.N.A. Gel Extraction Kits* (3.2.1.3) aufgereinigt. Zur Dokumentation wird das Gel mit dem Geldokumentationssystem GelDoc 2000 fotografiert.

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.1.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA (dsDNA) an spezifischen, palindromischen Sequenzen hydrolytisch spalten können. Diese Eigenschaft kann man sich bei der Klonierung von Expressionsplasmiden zu Nutze machen. Beim analytischen Verdau erfolgt zunächst ein theoretischer Verdau der DNA am Computer mit dem Programm *Clone Manager 9*, das die spezifischen Fragmentgrößen ermittelt. Praktisch wird dieses Ergebnis mit Hilfe eines analytischen Agarosegels (3.2.1.4) verifiziert. Die Temperatur und die Pufferzusammensetzung richten sich nach den Angaben des Herstellers. Es ist möglich mehrere Endonukleasen zeitgleich einzusetzen, wenn sie sich in Puffer- und Temperaturbedingungen nicht unterscheiden. Der Ansatz wird für 2-4 Std inkubiert, anschließend kann das Enzym durch Hitze (20 min bei Enzym-spezifischer Temperatur) inaktiviert werden. Wird ein Vektor für die Klonierung vorbereitet wird dem Ansatz eine alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP) zugefügt. Dies dient der Entfernung der 5'-Phosphatgruppen an den DNA-Enden. Eine Re-Ligation des linearisierten Vektors wird dadurch verhindert.

Analytischer Ansatz:

DNA	0,2 - 1 µg
10x Puffer	1 µl
Restriktionsendonuklease	1-5 U
dH ₂ O	ad 10 µl

Präparativer Ansatz:

DNA	5 µg
10x Puffer	5 µl
CIP, falls ein Vektor verdaut wird	1 U
Restriktionsendonuklease	10-30 U
dH ₂ O	ad 50 µl

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.1.6 Ligation

Um ein DNA-Fragment aus der PCR (3.2.1.2) in linearisierte und dephosphorylierte Vektoren (3.2.1.5) zu klonieren, benötigt man eine DNA Ligase. Diese katalysiert die Bildung der Phosphodiesterbrücken des DNA-Rückgrats, indem sie unter ATP Verbrauch eine freie 3'-Phosphatgruppe mit einer freien 5'-OH Gruppe verbindet.

Zur Abschätzung des Anteils der ligierten Plasmide ohne inseriertes DNA-Fragment wird eine Re-Ligationskontrolle angefertigt. Hierbei wird statt des zu klonierenden DNA-Fragmentes dH₂O eingesetzt. Als weitere Kontrolle wird ein Ansatz ohne Ligase angesetzt, um zu überprüfen, ob intakte Expressionsplasmide anwesend waren. Ligationsansätze werden für 1 Std bei RT inkubiert. Im Anschluss werden 7,5 µl pro Ansatz in chemisch-kompetente *E.coli*-Bakterien (XL1-Blue) transformiert (3.2.1.8).

Reaktionsansatz:

Verdaute, gereinigte Insert-DNA	125 ng
Verdaute, gereinigte, CIP-behandelte Vektor-DNA	25 ng
10x Ligationspuffer, inkl. 10 mM rATP	1,5 µl
T4 DNA Ligase (4U/µl)	1 µl
dH ₂ O	ad 15 µl

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.1.7 Ortsgerichtete *In-vitro*-Mutagenese

Mittels *In-vitro*-Mutagenese-PCR können Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in DNA-Sequenzen zielgerichtet herbeigeführt werden. Die verwendete PfuTM Turbo DNA Polymerase kann sehr lange Sequenzen mit hoher Genauigkeit amplifizieren. Ihre Verwendung ermöglicht es somit vollständige Plasmide (bis 19 kb) zu synthetisieren. Die gewünschten Mutationen sind in die Primer für die PCR integriert. Nach der PCR werden die Ansätze mit dem Restriktionsenzym *DpnI* über Nacht bei 37°C verdaut, um die methylierte Template-DNA selektiv zu degradieren. 3 µl des Amplifikats werden anschließend in XL10Gold Zellen transformiert (3.2.1.8).

Reaktionsansatz:

DNA	100 ng
Primer	260 nM
dNTPs	je 10 μ M
10x Cloned Puffer für Pfu TM Turbo DNA-Polymerase	5 μ l
Pfu TM Turbo DNA-Polymerase	2,5 U
dH ₂ O	ad 50 μ l

Programm:

	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	99°C	3 min
Pfu-Turbo TM Zugabe	1	90°C	2 min
Denaturierung		90°C	1 min
Annealing	16	53°C	1 min
Elongation		72°C	8,5 min + 10 s / Zyklus
Elongation	1	72°C	10 min
Ende der Synthese	1	8°C	∞

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.1.8 Transformation von *E.coli* Bakterien

XL1blue

Die Vermehrung von rekombinanten Plasmiden wird in chemisch kompetenten XL1blue *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien durchgeführt. Damit diese fremde Plasmid DNA aufnehmen können, müssen sie zuerst kompetent gemacht, d.h. zur Aufnahme von DNA befähigt werden. Dies kann mithilfe des Z-Competent *E.coli* Transformation KitTM and Buffer Set erreicht werden. Die Bakterien werden entsprechend des Protokolls behandelt, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Z-kompetenten XL1blue Zellen werden auf Eis aufgetaut und transformiert, indem eine DNA-Lösung (z.B. 7,5 μ l Ligationsansatz oder 100 ng Plasmid DNA) zu 100 μ l Zellsuspension gegeben wird und dieser Ansatz für 1 Std auf Eis inkubiert wird. Im Anschluss daran wird der Transformationsansatz mit einem Drigalskispatel auf LB-Agarplatten (inkl. 0,1% Ampicillin) ausgestrichen. Die LB-Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

XL10Gold

XL10Gold® sind ultrakompetente *E. coli* Bakterien, die zur Transformation von großen Plasmiden kreiert wurden. Sie sind Tetracyclin- und Chloramphenicolresistent. Die Transformation wird wie im Protokoll des Stratagene® XL10-Gold® Ultracompetent Cells Kits durchgeführt. Modifikationen des Protokolls: Nach der Inkubation der Bakterien in 900 µl NZY⁺ Medium für 60 min bei 37°C wird die Lösung für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (ÜS) wird verworfen und das Zellpellet in 100 µl NZY⁺ Medium vorsichtig resuspendiert und auf LB-Agarplatten (inkl. 0,1% Ampicillin) ausgestrichen.

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.1.9 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien (kleiner Maßstab)

Die Plasmid DNA Isolierung im kleinen Maßstab dient der Isolierung rekombinanter Plasmide aus transformierten Bakterien (3.2.1.8). Man erhält kleine Mengen des aufgereinigten Plasmides, die zum einen zur Charakterisierung und zum anderen für Ansätze im großen Maßstab (3.2.1.10) verwendet werden. Hierfür werden einzelne Kolonien aus der Transformation in 5 ml LB-Medium (inkl. 0,1% Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. 4 ml dieser Bakteriensuspension werden für 1 min bei 10000 g pelletiert, der ÜS verworfen und das Pellet nach *E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit* Protokoll aufbereitet. Das Prinzip der Isolierung beruht auf der Bindung der Plasmid DNA an die in der Säule enthaltene Silicamembran. Durch verschiedene Wasch- und Trocknungsschritte wird die Plasmid DNA von Verunreinigungen befreit und anschließend mit 30 – 60 µl dH₂O eluiert. Zur Analyse der gewonnenen DNA wird ein Restriktionsverdau (3.2.1.5) mit 5 µl Eluat durchgeführt, welcher im nächsten Schritt auf einem Agarosegel analysiert wird (3.2.1.4). Die Quantität und Qualität kann anschließend am Spektralphotometer Nanodrop ND1000 bestimmt werden.

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.1.10 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien (großer Maßstab)

Die Aufreinigung im großen Maßstab dient der Produktion einer großen Menge eines Plasmides. Es werden 100 ng des Plasmides in 100 µl XL1blue Bakterien transformiert (3.2.1.8), in 100 ml LB-Medium (inkl. 0,1% Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Suspension wird pelletiert und nach dem Protokoll des *E.Z.N.A.® Plasmid Maxi Kit* aufgereinigt. Das Prinzip der Plasmid-Isolierung entspricht dem der DNA-Präparation im kleinen Maßstab (Bakterien werden pelletiert, alkalisch lysiert, das Lysat

neutralisiert, die Plasmide an die Anionenaustauscher-Matrix gebunden). Die Plasmid DNA wird mit 1500 µl dH₂O eluiert. Die Quantität und Qualität wird am Spektralphotometer Nanodrop ND1000 bestimmt.

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.1.11 Sequenzierungen

Zur Sequenz-Analyse der DNA wird diese an die Firma Microsynth AG Balgach, Schweiz gesendet, wobei die Proben wie folgt vorbereitet werden:

Reaktionsansatz:

DNA	1200 ng
Primer	20 pmol
dH ₂ O	ad 15 µl

Die Ergebnisse werden unter Verwendung der Computerprogramme Chromas, Clone Manager 9 und dem Align Sequences Nucleotide BLAST aus dem NCBI Toolkit analysiert(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

HuH7 Zellen sind humane Leberkrebszellen; VeroE6 sind renale Tumorzellen der Grünen Meerkatze; HAP1 (KO) Zelllinien sind humane, fast vollständig haploide Fibroblasten-ähnlich Zellen, die von der chronische myeloische Leukämie (CML) Zelllinie KBM-7 abstammen²⁵. Alle Zelllinien werden in 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert und alle zwei bis vier Tage passagiert. Das verwendete Wachstumsmedium für HuH7 oder VeroE6 Zellen ist Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), für die HAP1 (KO) Zelllinien Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), welche jeweils mit 10% fötalem Kälber Serum (FCS), L-Glutamin (Q) und Penicillin/ Streptomycin (P/S) komplettiert werden (DMEM +++ bzw. IMDM +++). Medium und PBS_{def} werden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Um die Zellen zu passagieren wird das Medium auf den Zellen verworfen, diese zweimal mit PBS_{def} gewaschen und mit 1-1,5 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Nachdem alle

Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst sind, werden 8,5 ml DMEM +++ bzw. 9 ml IMDM +++ hinzugefügt und die Zellen mehrfach resuspendiert. Schließlich werden die Zellen gezählt, verdünnt und in neue Zellkulturflaschen oder -platten ausgesät.

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.2.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Plasmid DNA kann mit unterschiedlichen Reagenzien in eukaryotische Zellen eingebracht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde TransIT®-LT1 verwendet. TransIT®-LT1 maskiert die negative Ladung des Phosphatrückgrats der DNA durch Komplexbildung derer mit kationischen Lipiden. In dieser Form können sich die DNA-Lipidkomplexe an die Zellmembran anlagern und diese passieren. Die Zellen sollten zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50 – 70% aufweisen. Die Transfektionsansätze wurden wie folgt vorbereitet:

Reaktionsansatz für HuH7 Zellen:

DNA in 100 µl DMEM 3%++ oder Opti-MEM® vorlegen
3x Menge *TransIT*® (µl zu µg DNA) in 100 µl DMEM 3%++ oder
Opti-MEM® vorlegen

Reaktionsansatz für HAP1 (KO) Zelllinien:

DNA in 100 µl Opti-MEM® vorlegen
3x Menge *TransIT*® (µl zu µg DNA) in 100 µl Opti-MEM® vorlegen

Die Ansätze der Transfektionsreagenzien werden 5 min bei RT inkubiert, bevor sie zu den DNA-Ansätzen pipettiert werden. Folgend werden die Ansätze weitere 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wird das Medium auf den HuH7 Zellen von DMEM +++ zu 37°C warmem DMEM 3%++ getauscht, bei den HAP1 (KO) Zelllinien von IMDM +++ zu 37°C warme Opti-MEM®. Nach der Inkubationszeit wird der Transfektionsansatz auf die Zellen geträufelt. Die Zellen werden bei 37°C im Brutschrank bei 5% CO₂-Begasung kultiviert. Nach 4-6 Std wird ein Mediumwechsel zu DMEM 3%++ bzw. IMDM 2%+ durchgeführt.

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.2.3 Zellernte für die Western Blot Analyse

Die Zellen werden 48 Std nach der Transfektion (p.t., 3.2.2.2) für Western Blot (WB, 3.2.3.2) Analysen geerntet. Hierfür werden sie einmal mit PBS_{def} gewaschen, in 500 µl PBS_{def} abgekratzt und in ein Eppendorfröhrchen überführt. Es folgt eine Zentrifugation für 5 min bei 8000 rpm. In der Regel wird das Pellet in 45-60 µl PBS_{def} resuspendiert und mit entsprechend 4x Proteinprobenpuffer (PP) inkl. 4% Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. Für die Detektion von endogenem IRE1 werden die Zellen 30 min auf Eis in 50 µl Zellextraktionspuffer (CEB) lysiert. Die Proben werden dabei alle 10 min gevortext. Anschließend werden sie bei 14000 rpm, 10 min bei 4°C zentrifugiert, der ÜS in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und mit 17 µl 4x PP versetzt.

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.2.4 Zellernte für die Messung der Luziferase Aktivität

Um die Renilla- und Firefly-Luziferase-Aktivität zu messen werden die Zellen 48 Std p.t. (3.2.2.2) geerntet. Sie werden einmal mit PBS_{def} gewaschen, in 500 µl PBS_{def} abgekratzt, in ein Eppendorfröhrchen überführt, 5 min bei 8000 rpm pelletiert und der ÜS verworfen. Anschließend wird das Pellet in 50-100 µl 1x Passiv-Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wird für mindestens 20 min bei RT inkubiert und zwischendurch gevortext. Die Lysate werden für 5 min (4°C) bei 14000 rpm zentrifugiert und anschließend 5 µl des ÜS in eine Microtiter-Platte für das Lumiometer überführt. Die Messung der Luziferaseaktivität erfolgt für 0,5-5 s.

Entnommen und überarbeitet aus M.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴²

3.2.2.5 RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Die RNA Isolierung dient der Isolierung kleiner Mengen zellulärer Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen (3.2.2.1). Hierfür werden die Zellen nach dem *QIAGEN RNeasy Mini Kit*® Protokoll aufbereitet. Das Prinzip der Isolierung beruht auf der Bindung der RNA an die in der Säule enthaltene Silicamembran. Durch verschiedene Wasch- und Trocknungsschritte wird die RNA von Verunreinigungen befreit, die DNA wird mit einem DNase I Verdau (20 min, RT) auf der Säule entfernt. Anschließend wird mit 40 µl RNase-freiem dH₂O eluiert. Die Quantität und Qualität wird am Spektralphotometer Nanodrop ND1000 bestimmt.

Entnommen und überarbeitet aus M.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴²

3.2.2.6 UPRE-abhängiger Luziferase (UPRE) Assay

Zur Untersuchung der ER-Stress-Antwort in eukaryotischen Zellen werden Reporter-Plasmide in HuH7 oder HAP1 Zellen (3.2.2.1) transfiziert (3.2.2.2). Die Plasmide enthalten das Gen zur Expression der Firefly-Luziferase, welches unter der Kontrolle des Promotors UPRE (UPR element) der ER-Stress-Antwort (2.7.1) steht. Durch deren Verwendung kann die Induktion des Transkriptionsfaktors XBP1s untersucht werden. Zu Normalisierungszwecken wird zusätzlich ein Reporter-Plasmid transfiziert, welches das Gen für die Renilla-Luziferase trägt und konstitutiv exprimiert wird. Zur Analyse der ER-Stress-Antwort werden zudem in verschiedenen Konzentrationen Plasmide transfiziert, die für MARV Proteine kodieren, gegebenenfalls wird mit Leervektor (LV) aufgefüllt. In den Positiv- und Negativ-Kontrollen wird, neben den Reportern, ausschließlich LV transfiziert. Zur Induktion der ER-Stress-Antwort werden die Zellen der Positiv-Kontrolle 16 Std vor der Ernte mit Tg (0,5-500 nM) oder Tu (50-1000 nM) in DMSO stimuliert. 48 Std p.t. werden die Zellen geerntet (3.2.2.4). Bei der Auswertung ist die Negativ-Kontrolle (DMSO) gleich 1 gesetzt, sodass alle anderen Proben als x-fache UPRE-Aktivierung in Relation zur Negativ-Kontrolle (DMSO) dargestellt sind.

Falls nicht anders beschrieben, werden die Plasmide in folgenden Konzentrationen transfiziert:

Plasmid	Konzentration (in ng)
pGL3-5xUPRE (Firefly)	500 (12-well) 1000 (6-well)
pGL4.73 (Renilla)	100
MARV Konstrukte (3.1.8.3)	1000
pCAGGS (LV)	ad 1000

Entnommen und überarbeitet aus M.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴²

3.2.2.7 Minigenom-Assay

Der Minigenom-Assay (MG-Assay) ist ein artifizielles System, mit dem die Replikation und Transkription von Filoviren unter BSL 1 Bedingungen untersucht werden kann (Abb. 3.1)⁷⁶. Der MG-Assay basiert auf einem sogenannten Minigenom, bei dem die offenen Leserahmen der viralen Proteine durch ein Reporter-gen ersetzt wurden. Die 3'-Leader- und 5'-Trailer-Sequenzen des viralen Genoms, die die für die virale Replikation und Transkription essenziellen Erkennungssignale enthalten, flankieren das Reporter-gen der Renilla-Luziferase. Das Minigenom steht unter der Kontrolle eines T7-Polymerase-Promotors. Die T7-Polymerase ist eine DNA-abhängige RNA-Polymerase, die das Minigenom in eine artifizielle,

negativsträngige RNA transkribiert. An die Leader-Sequenz schließt sich eine Ribozymsequenz des Hepatitis Delta Virus an, die ein definiertes 5'-Ende dieser RNA sicherstellt. Neben dem Minigenom werden HuH7 Zellen mit Plasmiden für die viralen Proteine L, VP35, VP30 und NP transfiziert (3.2.2.2). Zusätzlich wird ein Plasmid, das für die T7-Polymerase und ein Plasmid, das für die Firefly-Luziferase kodiert, transfiziert.

Falls nicht anders beschrieben, werden die Plasmide in folgenden Konzentrationen transfiziert:

Plasmid	Konzentration (in ng)
pAndy-3M-5M-LucR	1000
pCAGGS-MARV-L	1000
pCAGGS-MARV-VP35	100
pCAGGS-MARV-VP30	100
pCAGGS-MARV-NP	500
pCAGGS-T7-Polymerase	500
pGL4 (Firefly)	100

Die T7-Polymerase wird zur initialen Transkription des viralen Minigenoms benötigt, wohingegen die Firefly-Luziferase der Normalisierung der Messwerte (Transfektions-Effizienz) dient. Nach der initialen Transkription des Minigenoms wird die negativsträngige RNA durch den RNP-Komplex, bestehend aus den viralen Proteinen L, VP35, VP30 und NP repliziert und transkribiert. Dabei sind Bindungsstellen im 5'-Leader und 3'-Trailer-Bereich essenziell. Die entstehende mRNA kodiert für das Reportergen Renilla-Luziferase, welche zellulär translatiert wird und deren enzymatische Aktivität nach der Zellernte am Luminometer gemessen wird. Die Stärke des Renilla-Luziferasesignals korreliert dabei mit der Stärke von Transkription und Replikation und kann mit Hilfe des Signals der Firefly-Luziferase normalisiert werden. Die Zellen werden 48 Std p.t. geerntet (3.2.2.4).

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

Transfektion:

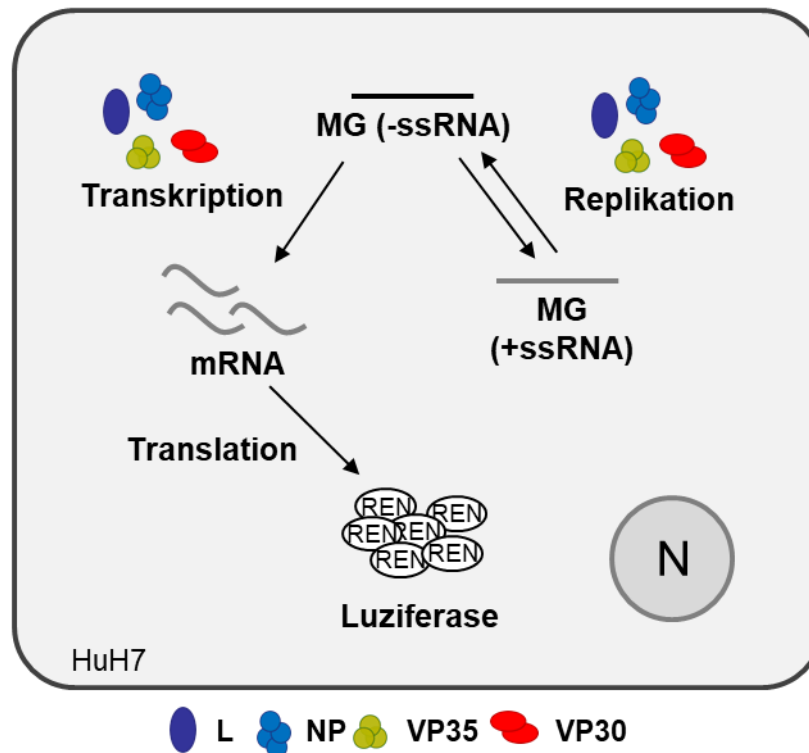
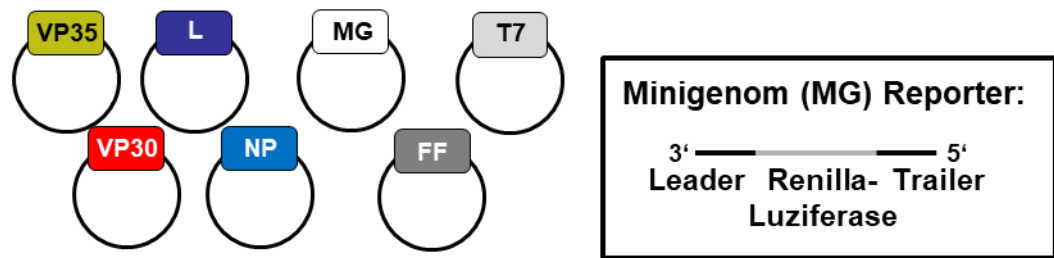


Abb. 3.1: Minigenom-Assay

FF: Firefly-Luziferase, REN: Renilla-Luziferase, T7: T7-Polymerase, MG: Minigenom, -ssRNA: negativ-orientierte, einzelsträngige RNA, +ssRNA: positiv-orientierte, einzelsträngige RNA, N: Nukleus⁷⁶

3.2.2.8 Infektiöser-Virus-ähnlicher-Partikel (iVLP) Assay

Der infektiöse-Virus-ähnliche-Partikel (iVLP) Assay ist ein Plasmid-basiertes System, das es ermöglicht neben Transkription und Replikation auch die Freisetzung und Infektiosität von Filoviren unter BSL 1 Bedingungen zu untersuchen (Abb. 3.2)⁷⁶. Neben den Plasmiden, die im MG-Assay (3.2.2.7) transfiziert werden (3.2.2.2), um die Transkription und Replikation zu analysieren, werden zusätzlich weitere Plasmide in HuH7 Zellen transfiziert, die für die viralen Proteine VP24, VP40 und GP kodieren (P0).

Falls nicht anders beschrieben, werden die Plasmide in folgenden Konzentrationen transfiziert:

P0

Plasmid	Konzentration (in ng)
pAndy-3M-5M-LucR	1000
pCAGGS-MARV-L	1000
pCAGGS-MARV-VP35	100
pCAGGS-MARV-VP30	100
pCAGGS-MARV-NP	500
pCAGGS-MARV-VP24	70
pCAGGS-MARV-VP40	500
pCAGGS-MARV-GP	500
pCAGGS-T7-Polymerase	500
pGL4 (Firefly)	100

Durch die Anwesenheit dieser werden die replizierten Minigenome in Nukleokapside verpackt, intrazellulär transportiert und an der Plasmamembran in iVLP in den ÜS freigesetzt. 48 Std p.t. werden die iVLP aus dem ÜS der P0 Zellen durch Ultrazentrifugation (UZ) aufgereinigt. Dafür wird der ÜS 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wird der ÜS in ein UZ-Röhrchen überführt und mit einer 20% Saccharose/TNE Lösung unterschichtet und 2 Std bei 40000 g und 4°C in der UZ pelletiert. Die Zellen (P0) werden geerntet und am Luminometer analysiert (3.2.2.4). Die Aktivität der Renilla-Luziferase entspricht der Stärke der Transkription und Replikation, die Aktivität der Firefly-Luziferase dient der Normalisierung. Das UZ-aufgereinigte iVLP-Pellet wird in PBS_{def}/DMEM resuspendiert und als Inokulum zwei Std auf neue HuH7 Zellen (P1) gegeben. Die P1 Zellen werden 16 Std vor der iVLP Infektion mit den Transkriptions- und Replikations-Helferplasmiden (L, VP30, VP35 und NP), sowie dem Reporter-Plasmid, welches für die Firefly-Luziferase kodiert, transfiziert (3.2.2.2).

Falls nicht anders beschrieben, werden die Plasmide in folgenden Konzentrationen transfiziert:

P1

Plasmid	Konzentration (in ng)
pCAGGS-MARV-L	1000
pCAGGS-MARV-VP35	100
pCAGGS-MARV-VP30	100
pCAGGS-MARV-NP	500
pGL4 (Firefly)	100

Nach der Infektion wird DMEM 3%++ zum Inokulum gegeben. Durch die Infektion mit den iVLP wird das Minigenom in die Zellen eingebracht. Dort wird es mit Hilfe der viralen Proteine L, VP30, VP35 und NP repliziert und transkribiert und unter Verwendung der zellulären Translationsmaschinerie das Reportergen Renilla-Luziferase translatiert. Die Stärke des Renilla-Luziferasesignals entspricht der Stärke an Transkription und Replikation nach erfolgreicher Infektion und kann mit Hilfe des Firefly-Luziferasesignals normalisiert werden. Die Zellen werden 72 Std nach der Infektion geerntet und am Luminometer analysiert (3.2.2.4).

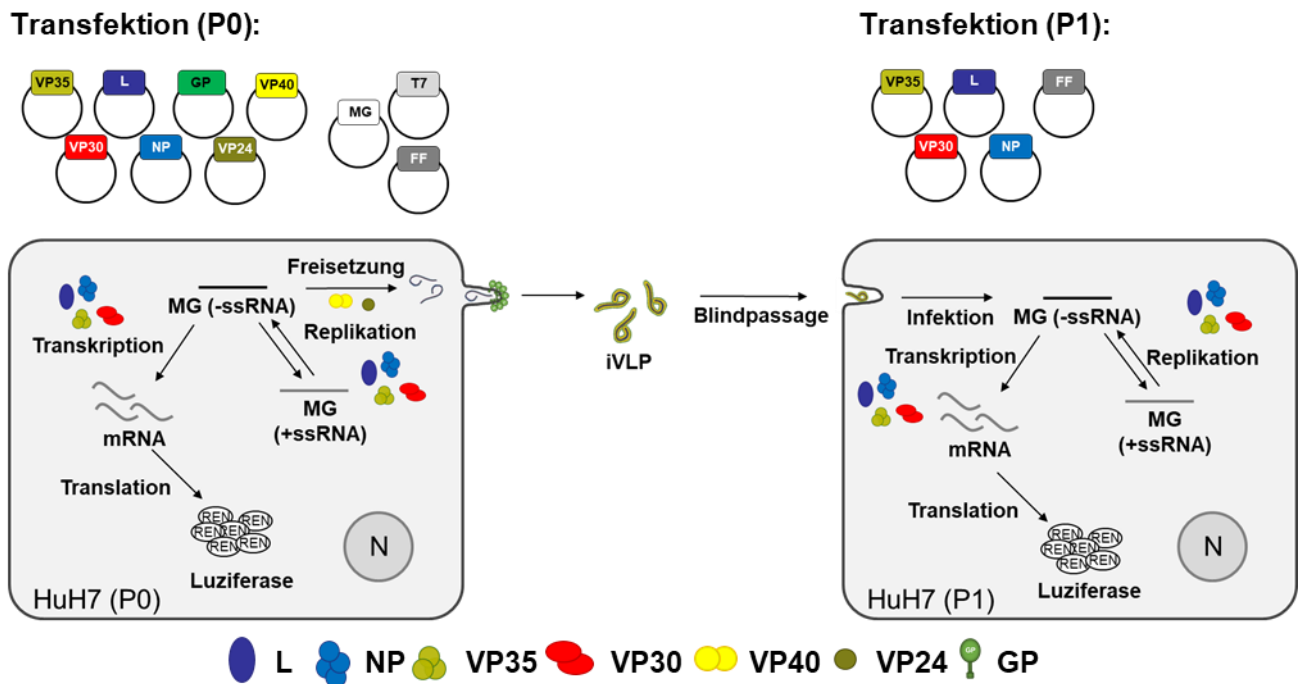


Abb. 3.2: Infektiöser-Virus-ähnliche Partikel (iVLP) Assay

FF: Firefly-Luziferase, REN: Renilla-Luziferase, T7: T7 Polymerase, MG: Minigenom, -ssRNA: negativ-orientierte, einzelsträngige RNA, +ssRNA: positiv-orientierte, einzelsträngige RNA, N: Nukleus, P0: Passage 0, P1: Passage 1⁷⁶

3.2.2.9 Zellproliferations-Assay

Mit dem Zellproliferations-Assay kann die Viabilität von eukaryotischen Zellen bestimmt werden. Dafür werden Zellen in einer 96-well Platte ausgesät (3.2.2.1) und optional transfiziert (3.2.2.2). 48 Std p.t. wird in jedes well MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) gegeben und für eine Stunde im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Proliferierende Zellen setzen MTS zu Formazan um. Die Absorption von Formazan (490 nm) kann anschließend an einem Plattenlesegerät gemessen werden.

3.2.3 Biochemische und immunologische Methoden

3.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts. Die Proben werden in 1x PP aufgenommen (3.2.2.3), der SDS beinhaltet. SDS bildet Komplexe mit den Proteinen in der Lösung, die somit eine negative Ladung bekommen und im elektrischen Feld wandern können. Die Proben werden für 10 min bei 99°C denaturiert und anschließend auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Dieses besteht aus einem 4%igen Sammelgel und einem 10%igen Trenngel (siehe Tabelle). In die Taschen wird ein Probenvolumen von 5 µl - 15 µl aufgetragen, freie Taschen werden mit dem gleichen Volumen an 1x PP gefüllt. Zur Analyse der Größe der Proteine wird ein passender Größenstandard parallel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgt in einer Bio-Rad®-Minigelkammer mit 1x Proteingellaufpuffer bei einer Spannung von 122 – 177 V. Die Proteine wandern durch ihre negative Ladung Richtung Anode.

	Sammelgel 4%	Trenngel 10%
H ₂ O	2,9 ml	4 ml
30% Acrylamid	750 µl	3,3 ml
1,5 M Tris pH 8,8 inkl. 0,4% SDS	-	2,5 ml
0,5 M Tris pH 6,8 inkl. 0,4% SDS	1,25 ml	-
10% APS	50 µl	100 µl
TEMED®	10 µl	10 µl

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.3.2 Western Blot (WB)

Proteine, die mittels SDS-PAGE (3.2.3.1) aufgetrennt wurden, können durch Anlegen einer Spannung vom Gel auf eine PVDF – oder Nitrocellulose Membran übertragen werden, sodass sie für immunologische Nachweisreaktionen gebunden sind. Das hier verwendete Semi-Dry-Blot-Verfahren benötigt neben einer PVDF Membran (in 100%igem Methanol aktiviert) oder Nitrocellulose Membran auch sechs Whatman Papiere. Membran und Whatman Papiere werden in Transferpuffer getränkt und in einer Semi-Dry-Blotapparatur wie folgt geschichtet:

Kathode
3x Whatman Papier
SDS-PAGE Gel
PVDF/Nitrocellulose Membran
3x Whatman Papier
Anode

Überschüssiger Transferpuffer wird entfernt, bevor eine Spannung von 20 V über einen Zeitraum von 25 min (PVDF Membran) oder 10 V über einen Zeitraum von 60 min (Nitrocellulose Membran) angelegt wird.

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.3.3 Antikörperfärbung (WB)

Die Antikörperfärbung dient der Detektion von Proteinen, die mittels WB auf eine PVDF – oder Nitrocellulose Membran übertragen wurden (3.2.3.2). Die PVDF Membran wird in PBS_{def} mit 10% Milchpulver für 1 Std bei RT auf dem Schüttler oder über Nacht bei 4°C inkubiert, die Nitrocellulose Membran wird in TBS/ 0,1% Tween20/ 5% BSA 1 Std bei RT inkubiert. Dies dient der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Im Anschluss wird die Membran 3x 10 min mit PBS_{def}/ 0,1% Tween20 (PVDF Membran) bzw. TBS/ 0,1% Tween20 (Nitrocellulose Membran) gewaschen. Es folgt die Inkubation mit den spezifischen Erstantikörpern für eine Std bei RT oder über Nacht bei 4°C, welche an Epitope der zu detektierenden Proteine binden. Sie werden in PBS_{def}/ 0,1% Tween20/ 1% Milchpulver (PVDF – oder Nitrocellulose Membran) bzw. TBS/ 0,1% Tween20/ 5% BSA (Nitrocellulose Membran) verdünnt. Dann wird die Membran erneut 3x 10 min mit PBS_{def}/ 0,1% Tween20 (PVDF - oder Nitrocellulose Membran) bzw. TBS/ 0,1% Tween20 (Nitrocellulose Membran) gewaschen. Anschließend wird die Membran für 1 Std bei RT mit einem geeigneten Peroxidase- oder Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert, welcher ebenfalls in PBS_{def}/ 0,1% Tween20/ 1% Milchpulver (PVDF - oder Nitrocellulose Membran) bzw. TBS/ 0,1% Tween20/ 1% Milchpulver (Nitrocellulose Membran) verdünnt wird und gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtet ist. Es folgen zwei Waschstschritte mit PBS_{def}/ 0,1% Tween20 (PVDF - oder Nitrocellulose Membran) bzw. TBS/ 0,1% Tween20 (Nitrocellulose Membran) und zwei mit PBS_{def} (PVDF - oder Nitrocellulose Membran) bzw. TBS (Nitrocellulose Membran) für je 10 min bei RT.

Die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper erfolgt mit Hilfe der Substrate Luminata Forte Western HRP (Millipore™) oder SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher Scientific) am ChemiDoc® Scanner. Die Quantifizierung der WB Protein Banden erfolgt mit Hilfe der Software Image Lab 4.0. Die Detektion der Fluoreszenz-Fabstoff-markierten Zweitantikörper erfolgt am Odyssey® Infrared Imaging Scanner.

Entnommen und überarbeitet aus B.Sc. Arbeit – Cornelius Rohde¹⁴¹

3.2.3.4 Antikörperfärbung (In-Gel Western)

Durch eine In-Gel Western Antikörperfärbung können Proteine, die durch die SDS-PAGE aufgetrennt wurden (3.2.3.1) direkt im Gel detektiert werden. Eine Protein-Detektion ohne WB-Transfer (3.2.3.2), wie im In-Gel Western, ermöglicht es die absolute Proteinmenge zu detektieren. Dadurch kann man besser Proteine unterschiedlicher Masse miteinander vergleichen.

Dafür werden die Proteine im Gel 15 min in Fixier-Lösung fixiert. Anschließend wird das Gel 15 min in dH₂O gewaschen und über Nacht mit einem Erstantikörper, der spezifisch an die Epitope der zu detektierenden Proteine bindet, in PBS_{def}/ 0,1% Tween20/ 5% BSA bei 4°C schüttelnd inkubiert. Dann wird das Gel 3x 10 min mit PBS_{def}/ 0,1% Tween20 gewaschen. Anschließend wird das Gel für 1 Std bei RT mit einem geeigneten Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert, welcher ebenfalls in PBS_{def}/ 0,1% Tween20/ 5% BSA verdünnt wird und gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtet ist. Es folgen drei Waschschrte mit PBS_{def}/ 0,1% Tween20 und drei mit PBS_{def} für je 10 min bei RT.

Die Detektion der Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper erfolgt am Odyssey® Infrared Imaging Scanner.

3.2.3.5 Antikörperfärbung (Immunfluoreszenz Analyse, IFA)

Mit der Immunfluoreszenz Analyse (IFA) können Proteine durch Antikörperfärbung in fixierten Zellen detektiert und anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops visualisiert werden. Dafür werden HuH7 Zellen auf Deckgläsern ausgesät (3.2.2.1) und optional transfiziert (3.2.2.2) oder infiziert (3.2.4.1). 24-72 Std p.t. oder Infektion werden die Zellen mindestens 20 min mit DMEM/ 4% PFA auf den Deckgläsern fixiert, 10 min mit PBS_{def}/ 0,1% Triton X-100 permeabilisiert, 10 min mit PBS_{def}/ 100 mM Glycin inkubiert, um freie Aldehydgruppen zu maskieren und 10 min mit Blockierungs-Puffer behandelt zum Absättigen unspezifischer Antikörper Epitope. Zwischen jedem Schritt werden die Zellen einmal mit PBS_{def} gewaschen.

Anschließend werden die Zellen 1 Std in einer feuchten Kammer mit spezifischen Erstantikörpern inkubiert, welche in Blockierungs-Puffer verdünnt werden. Die Deckgläser werden einmal mit PBS_{def} gewaschen und 1 Std in einer feuchten Kammer mit einem spezifischen Fluorochrom-gekoppeltem Zweitantikörper, verdünnt in Blockierungs-Puffer, inkubiert, die sich gegen die Antikörper-Spezies der Erstantikörper richtet. Durch Verwendung verschiedener Spezies bei den Erstantikörpern und unterschiedlichen Fluorochromen bei den Zweitantikörpern können mehrere Proteine gleichzeitig in einer Zelle visualisiert werden. Zusätzlich zur Antikörperfärbung können auch weitere Fluoreszenz-Farbstoffe, wie z.B. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), welcher spezifisch DNA anfärbt, eingesetzt werden. Zum Schluss werden die Deckgläser noch dreimal mit PBS_{def} und einmal mit dH₂O gewaschen und anschließend mit Hilfe von Fluoprep auf Objektträgern eingedeckelt. Die fertigen Präparate werden über Nacht bei 4°C getrocknet.

Die Detektion der Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper und Fluoreszenz-Farbstoffe erfolgt an Fluoreszenzmikroskopen.

3.2.3.6 Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP)

Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IP) ermöglichen es die Interaktion von zwei oder mehr Proteinen nachzuweisen. Dafür wird eines der Proteine spezifisch mit Hilfe von Agarose-gekoppelten Antikörpern aus dem Zelllysat präzipitiert und überprüft, ob andere Proteine ko-präzipitiert werden. Dafür werden HuH7 Zellen mit Expressionsplasmiden transfiziert (3.2.2.2), die für die zu analysierenden Proteine kodieren. 48 Std p.t. werden die Zellen in PBS_{def} geerntet und 3 min bei 3000 rpm (4°C) pelletiert. Im Anschluss werden die Pellets in Ko-IP Lyse Puffer resuspendiert und 20 min bei RT lysiert. Das Lysat wird 10 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Vom ÜS werden 45 µl zu 15 µl 4x PP gegeben. Dies dient der Expressionskontrolle der verwendeten Proteine im Lysat. Der restliche ÜS wird zu spezifischen Agarose-gekoppelten Antikörpern gegeben und 3 Std rotierend bei 4°C inkubiert (Präzipitation). Um zu untersuchen, ob die Protein-Protein-Interaktion RNA-abhängig ist, wird während der Präzipitation noch ein RNase A/T1 Mix (Thermo Fisher Scientific) hinzugegeben, der einzelsträngige RNA spaltet. Anschließend werden die Ansätze vier Mal mit Ko-IP Puffer + Protease Inhibitor gewaschen. Final wird das Agarose Pellet in 45 µl 2x PP resuspendiert (Ko-IP). Die Ko-IP und Lysat Proben werden 10 min bei 99°C aufgeköcht und mittels SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) analysiert.

3.2.4 Virologische Methoden

3.2.4.1 Marburg Virus Anzucht und Ankonzentrierung

Beim MARV handelt es sich um ein hochpathogenes Virus (2.2), welches aufgrund fehlender spezifischer Therapeutika oder einem zugelassenen Impfstoff in die höchste Sicherheitsstufe 4 (BSL 4) eingestuft wird. Somit müssen alle Infektionsversuche unter BSL 4-Bedingungen durchgeführt werden.

Um große Mengen von MARV zu generieren, werden VeroE6 Zellen in einer 25 cm² Zellkulturflasche mit einer MOI (Multiplizität der Infektion, gibt das Verhältnis der Viren zur Zellzahl an) von 0.01 (Vorkultur) infiziert (3.2.4.2). Sechs Tage nach der Infektion wird der ÜS der Vorkultur abgenommen und 1:20 in 100 ml DMEM 0%++ verdünnt. Je 10 ml werden für die Infektion (3.2.4.2) von VeroE6 Zellen in neun 175 cm² Zellkulturflaschen verwendet. Sechs Tage nach der Infektion wird der ÜS aller Flaschen gesammelt und in 50 ml Falcons 10 min bei 2500 rpm (4°C) zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Mittels UZ werden anschließend die MARV Partikel aufgereinigt. Dafür wird der ÜS in UZ-Röhrchen (SW32) überführt und mit 5 ml 20% Saccharose/TNE Lösung unterschichtet und 2 Std bei 25000 rpm (4°C) in der UZ pelletiert. Das Virus-Pellet eines Röhrchens wird in 200 µl PBS_{def} resuspendiert. Die Virussuspension aller Röhrchen wird vereinigt, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Titer der Viren wird mit Hilfe von TCID₅₀ – (3.2.4.4) oder Immuno-Plaque Assay (3.2.4.5) bestimmt.

3.2.4.2 Marburg Virus Infektion

Um sich zu vermehren, sind Viren auf Wirtszellen und deren Maschinerie angewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurden HuH7 oder HAP1 (KO) Zelllinien (3.2.2.1) infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion analysiert. Dafür werden Zellen im entsprechenden Format ausgesät. Am Folgetag wird das Medium durch das Inokulum (MARV Suspension in DMEM 0%++ (HuH7/VeroE6) oder IMDM 0%+ (HAP1)) mit einer spezifischen Menge an MARV (MOI) ersetzt und 1 Std im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Anschließend wird das Inokulum abgenommen, zwei Mal mit PBS_{def} gewaschen und durch DMEM 2%++ bzw. IMDM 2%+ ersetzt und 0-6 Tage im Brutschrank inkubiert.

3.2.4.3 Überstand- und Zellernte (BSL 4)

Infizierte Zellen (3.2.4.2) werden 0-6 Tage nach der Infektion geerntet. Aus dem ÜS wird die Menge freigesetzter, infektiöser Viren mittels TCID₅₀ - (3.2.4.4) oder Immuno-Plaque Assay (3.2.4.5) bestimmt. Deckgläser werden in eine neue Zellkulturplatte mit DMEM 4%PFA

überführt und bei 4°C über Nacht gelagert. Im Anschluss wird das DMEM 4%PFA gegen frisches DMEM 4%PFA ausgetauscht, bevor die Zellkulturplatte mit den Deckgläsern aus dem BSL 4 ausgeschleust wird. Die Platte wird erneut über Nacht bei 4°C gelagert bevor die Deckgläser gefärbt und analysiert werden können (3.2.3.5). Zellen, welche mittels SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) analysiert werden, werden wie in 3.2.2.3 beschrieben geerntet und 10 min bei 99°C gekocht. Die Proben werden in ein neues Röhrchen überführt und aus dem BSL 4 ausgeschleust. Anschließend werden sie erneut 10 min bei 99°C gekocht.

3.2.4.4 Virus Titer Bestimmung: TCID₅₀ Assay

Mit dem TCID₅₀ (*Tissue Culture Infectious Dose 50*) Assay kann der Virustiter bestimmt werden. Dabei wird die Virusverdünnung ermittelt bei der 50% der Zellen infiziert sind. VeroE6 Zellen werden in einer 96-well Platte 40-50% konfluent in 100 µl DMEM+++ ausgesät (3.2.2.1). Vor der Infektion wird in jedes well noch 80 µl DMEM 0%++ hinzugegeben. In die erste Reihe werden je 20 µl der virushaltigen Lösung gegeben und gemischt. 20 µl werden aus der ersten Reihe in die nächste Reihe überführt und gemischt. Der Vorgang wird bis zum Ende der Platte wiederholt, wodurch eine Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁷ vorliegt. Zur Kontrolle wird eine Mock Probe (DMEM 0%++ ohne Virus) mitgeführt. Falls nicht anders beschrieben, erfolgt die Bestimmung jeder Probe in vier Replikaten. Die Zellen werden 10-14 Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert bis der Zytopathische Effekt (CPE) sich nicht mehr verändert. Die Berechnung des Virus Titers (TCID₅₀/ml) erfolgt mit Hilfe der Spearman und Kärber Methode¹³⁶.

3.2.4.5 Virus Titer Bestimmung: Immuno-Plaque Assay

Mit dem Immuno-Plaque Assay kann der Virus Titer bestimmt werden. VeroE6 Zellen werden in einer 24-well Platte 100% konfluent ausgesät (3.2.2.1). Vor der Infektion (3.2.4.2) wird das Zellkultur Medium zu 450 µl DMEM 0%++ gewechselt. In das erste well werden je 50 µl der Virus Probe gegeben und mit dem Medium gemischt. 50 µl werden in das nächste well überführt und gemischt. Der Vorgang wird beliebig wiederholt, wodurch eine entsprechende Verdünnungsreihe entsteht. Aus dem letzten well werden 50 µl der Verdünnung verworfen. Zur Kontrolle wird eine Mock Probe (DMEM 0%++ ohne Virus) mitgeführt. 1 Std nach der Infektion wird der ÜS von den Zellen abgenommen und gegen 500 µl CMC Lösung und 500 µl 2xMEM 4%++ ausgetauscht. Die Zellen werden für eine MARV Infektion 3 Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Dann wird der ÜS durch DMEM 4%PFA ersetzt und über Nacht bei 4°C zur Inaktivierung der Viren inkubiert. Das DMEM 4%PFA wird durch

frisches DMEM 4%PFA ersetzt, bevor die Platte aus dem BSL 4 ausgeschleust wird, um erneut über Nacht bei 4°C gelagert zu werden. Folglich wird der Zellrasen analog zur IFA (3.2.3.5) mit Triton X-100, Glycin und Blockierungs-Puffer behandelt. Unter Verwendung des α MARV-(Ziege)-Serums werden die MARV Plaques detektiert und mit einem spezifischen fluoreszierenden Zweitantikörper visualisiert. Die Auszählung der Plaques erfolgt am Fluoreszenzmikroskop und der Virus Titer in Plaque-formenden Einheiten (PFU/ml) berechnet.

3.2.5 Statistische Methoden

Alle Diagramme in dieser Arbeit zeigen den Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung der gemessenen Proben. Jede Probe repräsentiert ein biologisches Replikat (Abb. 4.1 B, Abb. 4.2 A, Abb. 4.3 A, Abb. 4.5 A, Abb. 4.6 B, Abb. 4.7 B, Abb. 4.8, Abb. 4.10, Abb. 4.12, Abb. 4.13, Abb. 4.15, Abb. 4.16 B, Abb. 4.17 B, Abb. 4.17 D, Abb. 4.18 B und Abb. 4.18 C). Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit den folgenden Methoden bestimmt.

3.2.5.1 Zweistichproben-t-Test

Mit Hilfe des Zweistichproben t -Test wird überprüft, wie sich die Mittelwerte zweier Proben zueinander verhalten. Die Mittelwerte müssen dafür normalverteilt sein.

Dieser Test wurde für die Abbildungen 4.3 A, 4.5 A, 4.10 und 4.13 genutzt.

3.2.5.2 Welch-Test

Mit Hilfe des Welch-Test wird überprüft, wie sich die Mittelwerte zweier Proben zueinander verhalten. Die Mittelwerte müssen dafür nicht normalverteilt sein.

Dieser Test wurde für die Abbildungen 4.2 A, 4.7 B, 4.16 B und 4.17 D genutzt.

3.2.5.3 Einfaktorielle Varianzanalyse

Mit Hilfe der Einfaktoriellen Varianzanalyse werden die Mittelwerte mehrerer Proben zueinander verglichen, die sich in einem Faktor unterscheiden. Die Mittelwerte müssen dafür normalverteilt sein. Bei zwei Proben entspricht die Einfaktorielle Varianzanalyse dem zweistichproben t -Test (3.2.5.1).

Dieser Test wurde für die Abbildungen 4.6 B, 4.8, 4.12, 4.15 und 4.17 B genutzt.

3.2.5.4 Zweifaktorielle Varianzanalyse

Mit Hilfe der Einfaktoriellen Varianzanalyse werden die Mittelwerte mehrerer Proben zueinander verglichen, die sich in zwei Faktoren unterscheiden. Die Mittelwerte müssen dafür normalverteilt sein.

Dieser Test wurde für die Abbildungen 4.1 B, 4.18 B, und 4.18 C genutzt.

4. Ergebnisse

4.1 Der Einfluss von Thapsigargin und Tunicamycin auf die ER-Stress-Antwort in HuH7 Zellen

4.1.1 Die Charakterisierung der ER-Stress-Antwort-Aktivatoren Thapsigargin und Tunicamycin in HuH7 Zellen

Die ER-Stress-Antwort (2.7.1) kann durch verschiedenste Stimuli aktiviert werden, wie fehlgefaltete oder unvollständig modifizierte Proteine oder durch Substanzen wie Tg^{161,172,149} oder Tu^{31,45} (2.7.2), die die Homöostase des ER beeinflussen^{174,153,145}. Hier sollen die gut charakterisierten Substanzen Tg und Tu im UPRE-Assay (3.2.2.6) in HuH7 Zellen charakterisiert werden.

Mit dem UPRE-Assay kann die Aktivierung der ER-Stress-Antwort analysiert werden. Die gemessene Aktivität der Firefly-Luziferase ist dabei auf die spezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren ATF6 und XBP1s an den Promotor UPRE zurückzuführen¹⁵⁴. Die ER-Stress-induzierenden Substanzen Tg und Tu führen unter anderem zu einer Aktivierung des IRE1/XBP1s-abhängigen Signalwegs. Um die optimale Dosis beider Substanzen zu bestimmen, die jeweils zu einer Aktivierung des UPRE-Promotors führt, wurden unterschiedliche Konzentrationen im UPRE-Assay ausgetestet.

Hierfür wurden HuH7 Zellen, wie in 3.2.2.6 beschrieben, transfiziert und mit den entsprechenden Mengen an Tg, Tu oder DMSO stimuliert. Die Versuche wurden von Dr. Verena Krähling durchgeführt.

Die Zugabe von Tg (0,5-500 nM) und Tu (50-1000 nM) führte zu einer Dosis-abhängigen Aktivierung des UPRE-Promotors im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMSO) bis zur Tg Konzentration von 100 nM und für Tu von 600 nM. Für die Folgeversuche wurde, falls nicht anders beschrieben, Tg in einer Konzentration von 5 nM verwendet und Tu in einer Konzentration von 300 nM. Die gewählten Konzentrationen entsprechen jeweils der niedrigsten Konzentration, die zu einer eindeutigen Aktivierung des UPRE-Promotors führte.

Um den Einfluss von 5 nM Tg und 300 nM Tu auf die Viabilität von HuH7 Zellen (3.2.2.1) zu untersuchen, wurde ein Zellproliferations-Assay (3.2.2.9) durchgeführt. Die Versuche wurden von Dr. Verena Krähling durchgeführt.

Die Zellen wurden mit dem GFP Expressionsplasmid oder LV (Mock) transfiziert (3.2.2.2) oder unbehandelt gelassen (nicht transfiziert), 32 Std p.t. mit Tg, Tu oder DMSO stimuliert und anschließend, wie in 3.2.2.9 beschrieben, behandelt. Die Tg- bzw. Tu-stimulierten Proben sind im Verhältnis zu den DMSO-stimulierten Proben dargestellt (Abb. 4.1 B). Im Vergleich zu

DMSO-stimulierten Zellen proliferierten nach Tg-Stimulation durchschnittlich noch 80-89% der Zellen, nach Tu-Stimulation durchschnittlich noch 68-69% der Zellen.

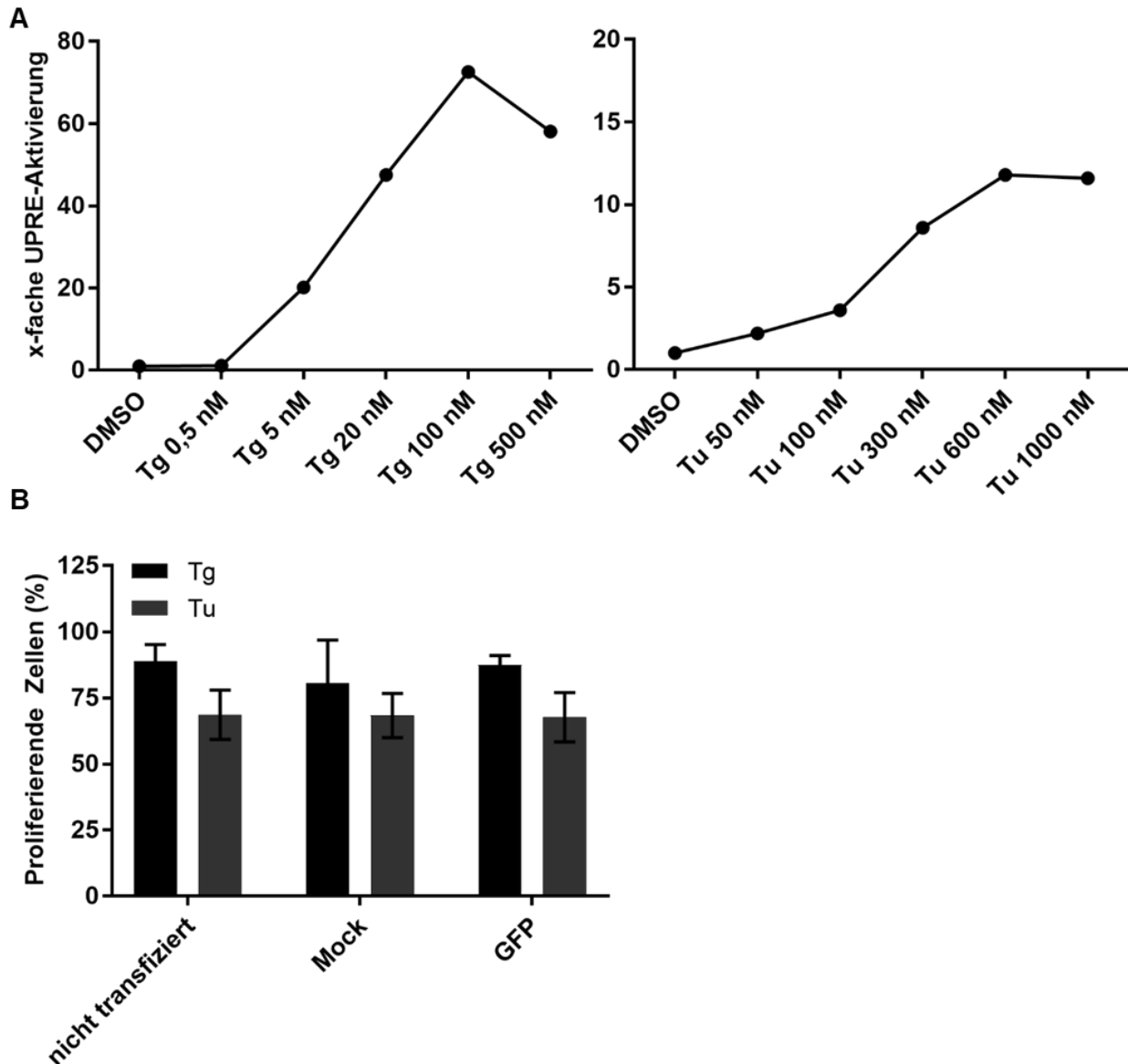


Abb. 4.1: Einfluss von Thapsigargin und Tunicamycin auf HuH7 Zellen

A: HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit 1 μ g LV, dem UPR-abhängigen Firefly-Luziferase Reporter-Plasmid und pGL4.73 (Renilla-Luziferase) zur Normalisierung, wie in 3.2.2.6 beschrieben, transfiziert. 32 Std p.t. wurden die Proben mit Tg (0,5 nM / 5 nM / 20 nM / 100 nM / 500 nM; 2.7.2.1) oder Tu (50 nM / 100 nM / 300 nM / 600 nM / 1000 nM, 2.7.2.2) und die Negativ-Kontrolle mit DMSO stimuliert. Die Analyse der Reporteraktivität erfolgte 48 Std p.t. Es folgte die Normalisierung der Werte anhand der Transfektionseffizienz-Kontrolle (Renilla-Luziferase). Die Negativ-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

B: HuH7 Zellen (4×10^3 Zellen/96-well) wurden mit 40 ng LV (Mock) oder pCAGGS-GFP (GFP) transfiziert (3.2.2.1). Die Kontroll-Zellen wurden nicht transfiziert. 32 Std p.t. wurden die Proben mit 5 nM Tg, 300 nM Tu oder mit DMSO stimuliert. 48 Std p.t. wurden die Zellen, wie in 3.2.2.9 beschrieben, analysiert. Die Tg- bzw. Tu-stimulierten Proben wurden ins Verhältnis zur jeweiligen DMSO-stimulierten Proben gesetzt. Der Versuch wurde drei Mal in Quadruplikaten wiederholt. Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Tg- bzw. Tu-stimulierten Proben vorhanden (3.2.5).

4.1.2 Zusammenfassung: Der Einfluss von Thapsigargin und Tunicamycin auf HuH7 Zellen

Gut charakterisierte Aktivatoren der ER-Stress-Antwort sind die Substanzen Tg (2.7.2.1)^{161,172,149} und Tu (2.7.2.2)^{31,45}. Für beide Substanzen konnte eine Dosis-abhängige Induktion der ER-Stress-Antwort im UPRE-Assay (3.2.2.6) nachgewiesen werden, wobei die niedrigste Dosis, die zu einer Aktivierung führte, bei 5 nM Tg bzw. 300 nM Tu lag (Abb. 4.1 A). Diese Konzentrationen wurden auch in den Folgeversuchen genutzt. Da langanhaltender ER-Stress zur Apoptose der Zelle führt, wurde weiterhin die Viabilität der HuH7 Zellen nach Tg- bzw. Tu-Stimulation analysiert (3.2.2.9). Im Vergleich zu DMSO-stimulierten Zellen proliferierten nach 5 nM Tg-Stimulation durchschnittlich noch 80-89% der Zellen, nach 300 nM Tu-Stimulation durchschnittlich noch 68-69% der Zellen (Abb. 4.1 B). Das zeigt, dass Tg und Tu die Viabilität der Zellen beeinflusst.

4.2 Der Einfluss des Marburg Virus GP auf die ER-Stress-Antwort

4.2.1 Die Analyse der Aktivierung des ER-Stress-Antwort-spezifischen Promotors UPRE durch das Marburg Virus GP

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die solitäre Expression des MARV GP zu einer Aktivierung des UPRE-Promotors führt, nicht aber die Expression des VP35 oder NP (2.7.3)¹⁴². Es sollte nun überprüft werden, ob eine Markierung der viralen Proteine mit einem HA-Epitop (HA-VP35, HA-NP, GP-HA) zu einem vergleichbaren Phänotyp hinsichtlich der ER-Stress Aktivierung führt.

Hierfür wurden HuH7 Zellen, wie in 3.2.2.6 beschrieben, transfiziert, stimuliert und analysiert. Zwei Replikate des Versuchs wurden von Cedrik Freiling innerhalb seiner Bachelor Arbeit durchgeführt⁵⁶.

Die Tg-Kontrolle führte zu einer Aktivierung des UPRE-Promotors im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMSO) (Abb. 4.2 A). Auch die Expression von GP führte zu einer signifikanten Aktivierung des UPRE-Promotors im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMSO). Die Expression von GP-HA aktivierte den UPRE-Promotor vergleichbar zu GP. Im Gegensatz dazu führten VP35, HA-VP35, NP und HA-NP zu keiner Aktivierung des Promotors im UPRE-Assay, sodass diese in Folgeversuchen als Negativ-Kontrollen genutzt wurden.

Im Anschluss wurden die Expressionslevel der MARV Proteine und das zelluläre Tubulin aus Abb. 4.2 A untersucht. Im WB (Abb. 4.2 B) wurden vergleichbare Expressionslevel der wildtypischen Proteine (VP35, NP, GP) und der jeweiligen HA-Epitop-markierten Proteine (HA-VP35, HA-NP, GP-HA) bestätigt.

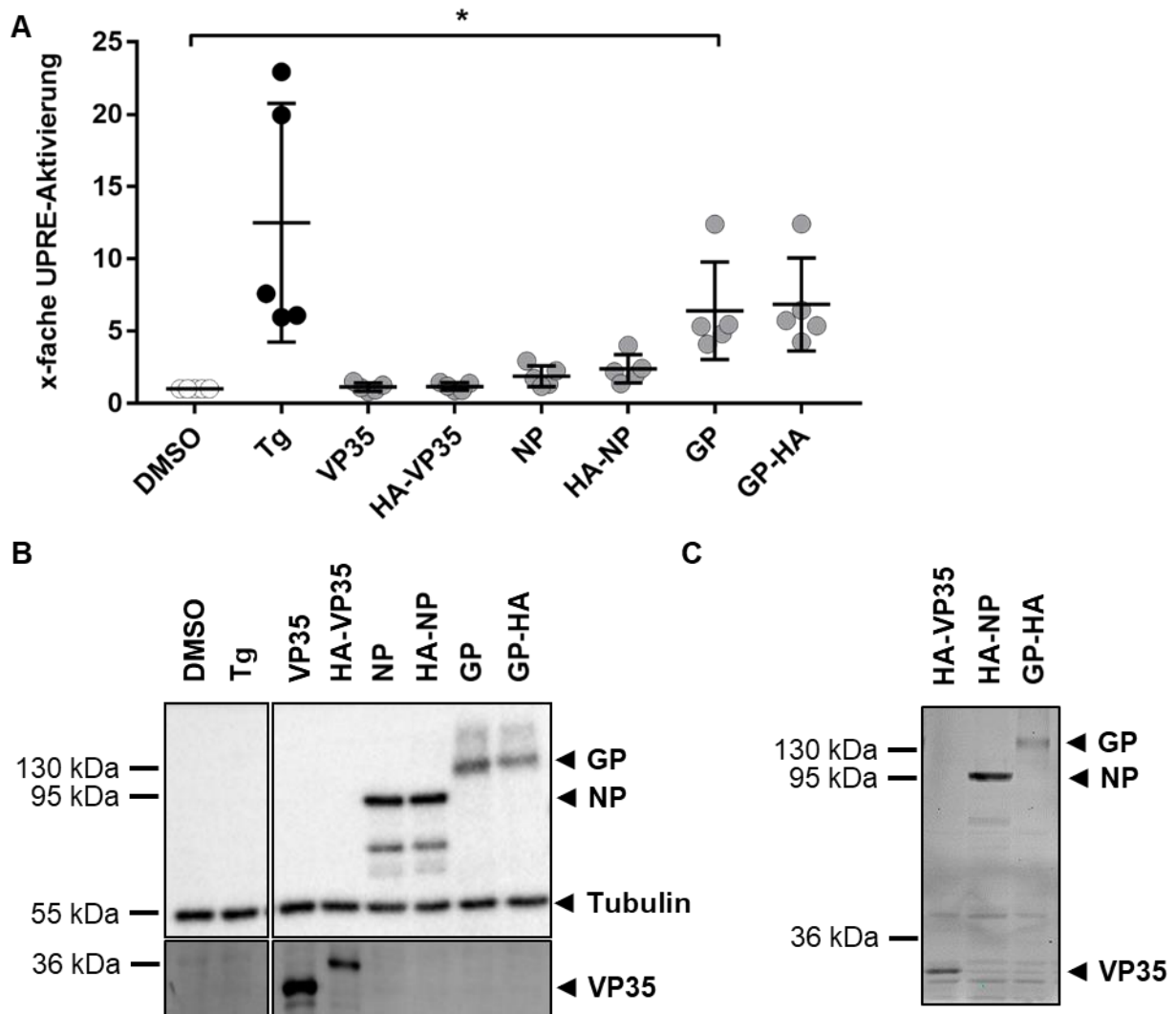


Abb. 4.2: Einzelexpression Epitop-markierter MARV Proteine im UPRE-Assay

A: HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit 1 μ g der entsprechenden MARV Expressionsplasmide (VP35, HA-VP35, NP, HA-NP, GP, GP-HA), dem UPRE-abhängigen Firefly-Luziferase Reporter-Plasmid und pGL4.73 (Renilla-Luziferase) zur Normalisierung, wie in 3.2.2.6 beschrieben, transfiziert. Positiv-(Tg) und Negativ-Kontrolle (DMSO) wurden mit 1 μ g LV transfiziert. 32 Std p.t. wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1) und die Negativ-Kontrolle mit DMSO stimuliert. Die Analyse der Reporteraktivität erfolgte 48 Std p.t. Es folgte die Normalisierung der Werte anhand der Transfektionseffizienz-Kontrolle. Die Negativ-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Der Versuch wurde fünf Mal durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind gezeigt (* p-Wert ≤ 0.05 , 3.2.5). **B:** Die Proben (A) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) analysiert. Färbung: Oben: α GP (50-6-10) (Maus, 1:100), α NP (59-9-10) (Maus, 1:4000), α Tubulin (Maus, 1:1000) und α Maus, HRP, IgG (Ziege, 1:40000). Unten: α MARV VP35-2 (1998) (Meerschweinchen, 1:500) und α Meerschweinchen, Alexa Fluor 680, IgG (Ziege, 1:5000). Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt (n = 5). **C:** Die Proben (A) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1) und Antikörperfärbung (3.2.3.4) analysiert. Färbung: α HA (Kaninchen, 1:500) und α Kaninchen, Alexa Fluor 680, IgG (Ziege, 1:5000). Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt (n = 5).

Um die absoluten Proteinmengen der HA-Epitop-markierten Proteine (HA-VP35, HA-NP, GP-HA) zu vergleichen, wurden diese mit Hilfe des In-Gel Western (3.2.3.4) direkt im SDS-PAGE

Gel (3.2.3.1) analysiert. Hier konnte jeweils gezeigt werden, dass HA-NP stärker exprimiert wurde als HA-VP35 und HA-VP35 stärker als GP-HA (Abb. 4.2 C).

4.2.2 Der Einfluss der Mucin-ähnlichen Domäne des Marburg Virus GP auf den UPRE-Promotor

Glykoproteine werden im ER stark modifiziert, insbesondere N-glykosyliert, was eine Belastung für das ER ist¹⁴⁸. Eine Überlastung der ER Kapazitäten führt zur Aktivierung der ER-Stress-Antwort^{148,174}, wie auch für die solitäre Expression von MARV GP gezeigt (2.5.1.1, 2.7.3, 4.2.1)¹⁴². Um zu überprüfen, ob eine Reduktion der molekularen Masse von GP und damit verbundenen Reduktion der Glykosylierungsstellen zu einer veränderten ER-Stress-Antwort führt, wurde die Deletionsmutante GP_{dMLD} (2.5.1.2), der die MLD fehlt, im UPRE-Assay (3.2.2.6) analysiert.

In der MLD liegen ein Großteil der N- und alle O-Glykosylierungsstellen von GP (Abb. 2.4). In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass GP_{dMLD} im Vergleich zu GP zu einer signifikant reduzierten Aktivierung des ER-Stress-spezifischen Promotors UPRE führt, wenn jeweils 1 µg der Glykoprotein-Expressionsplasmide (GP, GP_{dMLD}) transfiziert wurde (2.7.3)¹⁴². Dabei war die Expression von GP_{dMLD} jedoch deutlich stärker im Vergleich zu GP. Um zu überprüfen, wie die ER-Stress-Antwort reagiert, wenn vergleichbare Mengen von GP und GP_{dMLD} exprimiert werden, wurde die Menge von GP_{dMLD} im UPRE-Assay angepasst.

Hierfür wurden HuH7 Zellen mit den entsprechenden MARV Expressionsplasmiden GP (1 µg) und GP_{dMLD} (100 ng + 900 ng LV bzw. 25 ng + 975 ng LV), sowie den Luziferase Reportern, wie in 3.2.2.6 beschrieben, transfiziert. VP35 wurde als Negativ-Kontrolle (1 µg) mitgeführt.

Die Tg-Kontrolle führte zu einer Aktivierung des UPRE-Promotors im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMSO). Die Expression von VP35 führte zu keiner Induktion der ER-Stress-Antwort. Im Vergleich zu GP, führte GP_{dMLD} in beiden getesteten Konzentrationen ebenfalls zu keiner Aktivierung des UPRE-Promotors (Abb. 4.3 A).

Zur Kontrolle wurden die Expressionslevel von GP und GP_{dMLD} bestimmt. Neben den viralen Proteinen wurde auch das zelluläre Protein Tubulin gefärbt. In allen Proben konnte Tubulin detektiert werden (Abb. 4.3 B). In den Kontrollen (DMSO, Tg) konnte kein GP nachgewiesen werden. GP_{dMLD} zeigte in beiden getesteten Konzentrationen ein mindestens vergleichbares Expressionslevel zu GP.

Um zu überprüfen, ob die in Abb. 4.3 A-B transfizierten Mengen von GP_{dMLD} auf Einzelzellebene zu einer vergleichbaren Expression verglichen mit GP führen, wurden diese

mittels IFA (3.2.3.5) untersucht (Abb. 4.3 C). Hierfür wurden HuH7 Zellen auf Deckgläsern transfiziert (3.2.2.2) mit für GP oder GP_{dMLD}-kodierenden Plasmiden.

In den LV-transfizierten Proben (Mock) konnte kein GP nachgewiesen werden. GP_{dMLD} zeigte in beiden getesteten Konzentrationen eine GP-typische Verteilung innerhalb der Zelle, die vom ER über das Trans-Golgi-Netzwerk bis hin zur Plasmamembran reicht. Die Verteilung war vergleichbar zum wildtypischen GP.

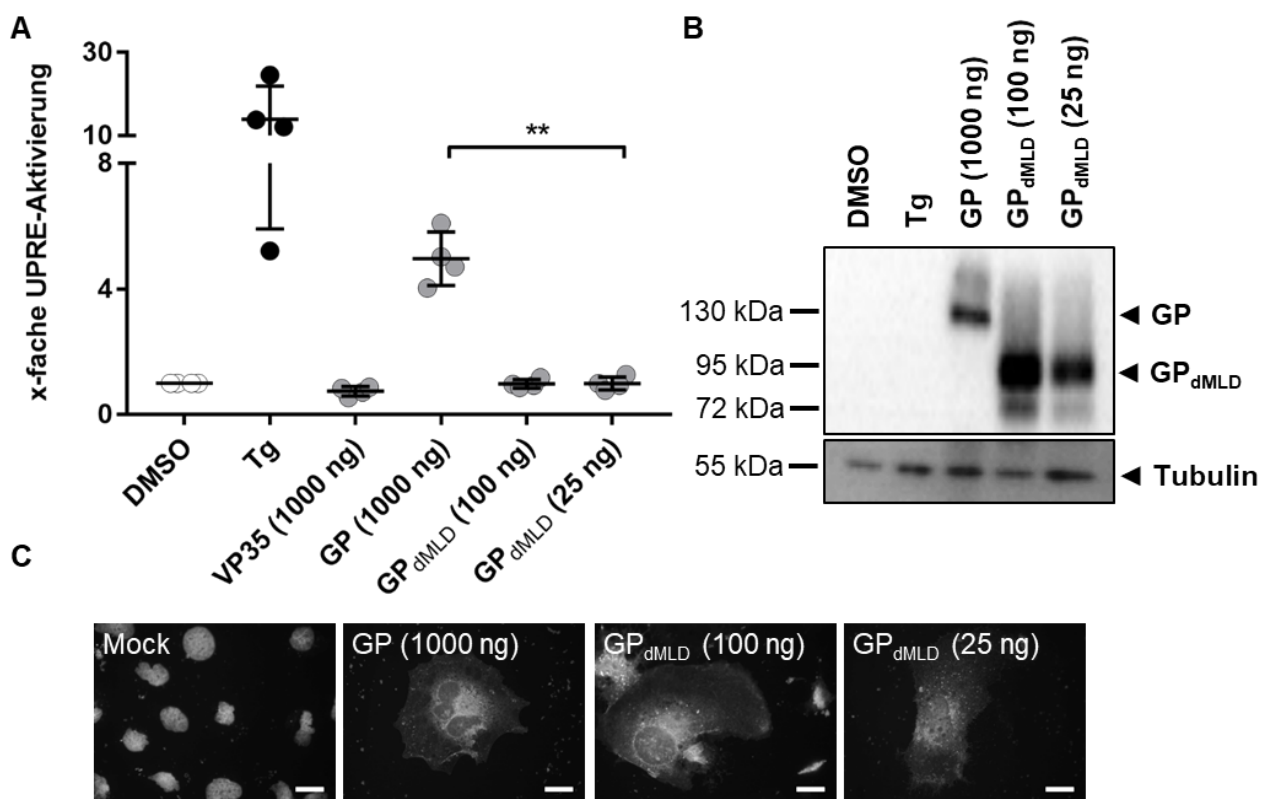


Abb. 4.3: Titration von GP_{dMLD} im UPRE-Assay

A: HuH7 Zellen wurden, wie in Abb. 4.2 beschrieben transfiziert, stimuliert und analysiert. Proben, die mit dem GP_{dMLD} Expressionsplasmid (25 ng oder 100 ng) transfiziert wurden, wurden mit der entsprechenden Menge LV auf 1 μ g ergänzt. Der Versuch wurde vier Mal durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind gezeigt (3.2.5, ** p-Wert \leq 0.01). **B:** Die Proben (A) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) analysiert. Färbung: Oben: α GP (50-6-10) (Maus, 1:100) und α Maus, HRP, IgG (Ziege, 1:40000); Unten: α Tubulin (Maus, 1:1000) und α Maus, HRP, IgG (Ziege, 1:40000). Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt (n = 4). **C:** HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit 1 μ g des MARV GP - oder 100 ng/25 ng des GP_{dMLD} Expressionsplasmids transfiziert. Proben, die mit dem GP_{dMLD} Expressionsplasmid transfiziert wurden, wurden mit der entsprechenden Menge LV auf 1 μ g ergänzt. Die Mock Probe wurde mit 1 μ g LV transfiziert. 48 Std p.t. wurden die Zellen mit α GP (50-6-10) (Maus, 1:50), DAPI (1:2000) und α Maus, Alexa Fluor 488, IgG (Ziege, 1:400) gefärbt (3.2.3.5). Der Längenstandard entspricht 25 μ m.

4.2.3 Der Einfluss des Marburg Virus GP auf die Expression des Transkriptionsfaktors XBP1s

Um zu überprüfen, ob die Expression von GP die Expression von XBP1s aktiviert, sollte ein XBP1 Reporterkonstrukt eingesetzt werden, was den Nachweis von XBP1s nach Stimulierung der IRE1 Signalkaskade mittels IFA (3.2.3.5) ermöglicht.

Um die Aktivierung des Transkriptionsfaktors XBP1s untersuchen zu können, wurde das Expressionsplasmid pCAGGS-Flag-XBP1-GFP (Abb. 4.4 A) kloniert und analog zu Iwawaki *et al.*, 2004⁸² hergestellt. Hierfür wurde ein Flag-Epitop-markiertes XBP1 Gen aus aufgereinigter HuH7 RNA (3.2.2.5) mittels Reverser Transkription (3.2.1.1) und spezifischer PCR (3.2.1.2) amplifiziert. Zusätzlich wurde ein Insert mit einem GFP Leserahmen (ohne zusätzliches Startcodon) amplifiziert (3.2.1.2). Das GFP Insert wurde über eine BamHI Restriktionsschnittstelle (3.2.1.5) am 3'-Ende des XBP1 Leserahmen ligiert (3.2.1.6). Das Insert Flag-XBP1-GFP wurde über die Restriktionsschnittstellen (3.2.1.5) XhoI und NheI in den Vektor pCAGGS ligiert.

Zellen, die mit dem Flag-XBP1-GFP Reporter transfiziert werden, transkribieren die *Flag-XBP1-GFP* mRNA, die ohne IRE1 Aktivierung zur Translation des Flag-XBP1u Proteins führt (Abb. 4.4 A). Wird IRE1 durch ER-Stress aktiviert (2.7.1), führt dies zum Spleißen der *Flag-XBP1-GFP* mRNA, wodurch spezifisch ein 26 nt langes Intron entfernt wird. Dadurch verschiebt sich der Leserahmen inklusive des ersten Stopcodons, sodass Flag-XBP1s-GFP translatiert wird. Folglich lässt sich die Aktivierung der ER-Stress-Antwort über die Expression der GFP-Markierung von Flag-XBP1s-GFP nachweisen.

Die Expression des Flag-XBP1-GFP Reporterplasmids wurde mittels IFA (3.2.3.5) untersucht. Dafür wurden HuH7 Zellen auf Deckgläsern mit je 1 µg des Plasmids transfiziert (3.2.2.2) und 32 Std p.t. mit 5 nM Tg (2.7.2.1), 300 nM Tu (2.7.2.2) oder DMSO stimuliert.

In DMSO-stimulierten Zellen wurde überwiegend Flag-XBP1u exprimiert. Zellen, die mit Tg oder Tu stimuliert wurden, zeigten hingegen eine verstärkte Expression von Flag-XBP1s-GFP (Abb. 4.4 B).

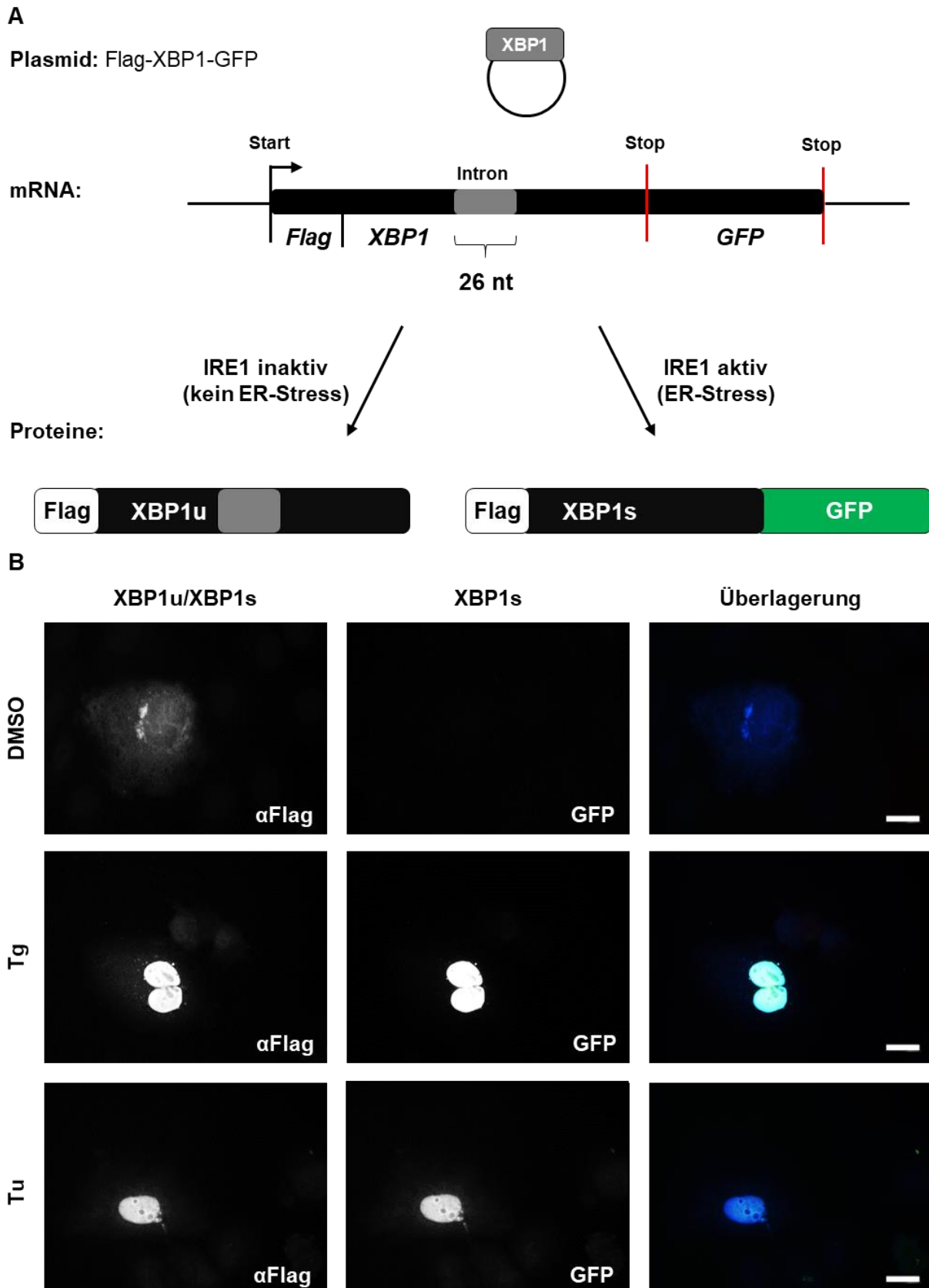


Abb. 4.4: Flag-XBP1-GFP Reporter

A: Schematische Darstellung der Expression des Plasmids pCAGGS-Flag-XBP1-GFP. B: HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit $1 \mu\text{g}$ des XBP1 Plasmids transfiziert (3.2.2.2). 32 Std p.t. wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1), 300 nM Tu (2.7.2.2) oder mit DMSO stimuliert. 48 Std p.t. wurden die Zellen

mit α Flag (Kaninchen, 1:50) und α Kaninchen, Marina Blue, IgG (Ziege, 1:40) Antikörpern gefärbt (3.2.3.5). Der Längenstandard entspricht 25 μ m.

In 4.2.2 wurde gezeigt, dass die Expression von GP zu einer Aktivierung des ER-Stress-spezifischen UPRE-Promotors führte (Abb. 4.2), die Expression von GP_{dMLD}, bei vergleichbarer Expressionsstärke zu GP, jedoch nicht (Abb. 4.3).

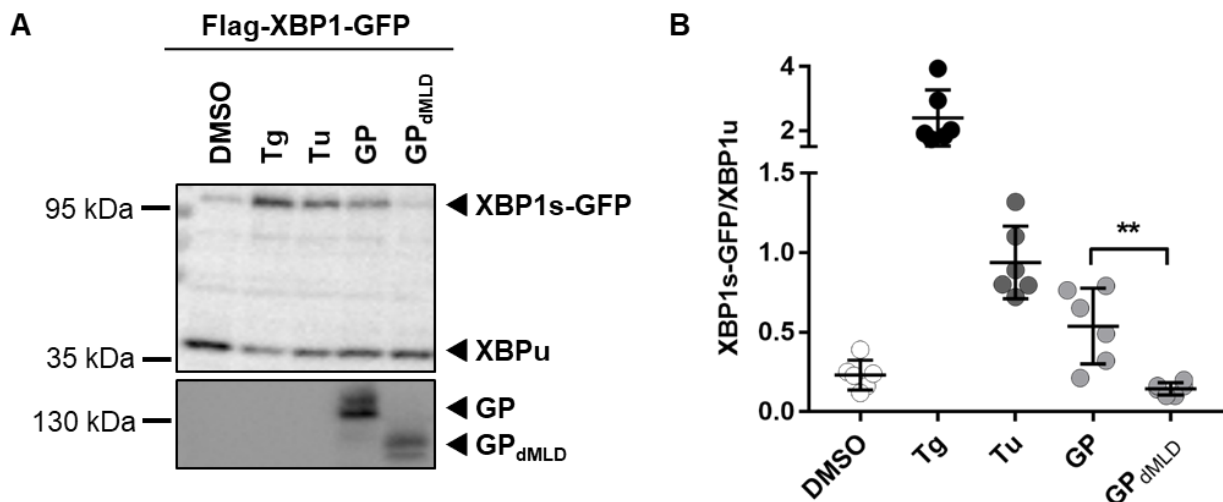


Abb. 4.5: Einzelexpression von GP, GP_{dMLD} und NP mit dem Flag-XBP1-GFP Reporter

A: HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit 1 μ g des XBP1 Expressionsplasmids transfiziert, sowie 1 μ g der entsprechenden MARV Expressionsplasmide (NP, GP). Bei GP_{dMLD} wurde 25 ng des GP_{dMLD} Expressionsplasmids und 975 ng LV transfiziert. Positiv- (Tg/Tu) und Negativ-Kontrollen (DMSO) wurden mit 1 μ g LV transfiziert. 32 Std p.t. wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1), 300 nM Tu (2.7.2.2) und die Negativ-Kontrolle mit DMSO stimuliert. Die Proben wurden 48 Std p.t. geerntet (3.2.2.3) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) analysiert. Färbung: Oben: α Flag (Kaninchen, 1:500) und α Kaninchen, HRP, IgG (Schwein, 1:40000); Unten: α GP (50-6-10) (Maus, 1:100) und α Maus, HRP, IgG (Ziege, 1:40000). Der Versuch wurde sechs Mal durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt. B: Quantifizierung des Protein-Verhältnis XBP1s zu XBP1u aus A. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, ** p-Wert ≤ 0.01).

Um zu überprüfen, ob die Expression beider Glykoproteine (GP, GP_{dMLD}) zur Translation des Transkriptionsfaktors XBP1s führen, wurden diese zusammen mit dem Flag-XBP1-GFP Reporterplasmid (Abb. 4.4) transfiziert. Hierfür wurden HuH7 Zellen mit je 1 μ g der XBP1 und der GP Expressionsplasmide transfiziert. Vom GP_{dMLD} Expressionsplasmid wurden 25 ng transfiziert und mit 925 ng LV aufgefüllt. Die Kontrollen (DMSO, Tg, Tu) wurden mit je 1 μ g LV transfiziert. Die Positiv-Kontrollen (Tg, Tu) wurden 32 Std p.t. mit 5 nM Tg (2.7.2.1) bzw. 300 nM Tu (2.7.2.2) stimuliert, die Negativ-Kontrolle (DMSO) mit DMSO. Die Zellen wurden 48 Std p.t. geerntet (3.2.2.3) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und

Antikörperfärbung (3.2.3.3) untersucht. Neben den viralen Proteinen wurden auch Flag-XBP1u und Flag-XBP1s-GFP gefärbt (Abb. 4.5 A).

Das Verhältnis der Proteinmengen von Flag-XBP1s-GFP zu Flag-XBP1u zeigte, dass die Behandlung mit Tg oder Tu im Gegensatz zu DMSO zu einer verstärkten Expression von Flag-XBP1s-GFP und folglich zu einer Aktivierung der ER-Stress-Antwort führte (Abb. 4.5 A-B). Die Expression von GP führte zu einer signifikant stärkeren Expression von Flag-XBP1s-GFP im Vergleich zu GP_{dMLD}-exprimierenden Proben.

Um die GP-spezifische Aktivierung von XBP1s in Abb. 4.5 auch auf Einzelzellebene zu überprüfen, wurden ein IFA (3.2.3.5) durchgeführt. Hierfür wurden HuH7 Zellen auf Deckgläsern, wie oben beschrieben, mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert (3.2.2.2). Die Kontrollen (DMSO, Tg, Tu) wurden mit einem mCherry Expressionsplasmid transfiziert und 32 Std p.t. mit DMSO, 5 nM Tg (2.7.2.1) oder 300 nM Tu (2.7.2.2) stimuliert. Die Zellen wurden 48 Std p.t. gefärbt (3.2.2.5) und analysiert (Abb. 4.6 A). Zellen, die mCherry oder ein MARV Protein exprimierten, wurden gezählt und der prozentuale Anteil der Zellen, die zusätzlich Flag-XBP1s-GFP exprimieren, bestimmt (Abb. 4.6 B).

Die Stimulation von Zellen mit Tg, Tu und die Expression von GP führten, im Gegensatz zur Expression von GP_{dMLD} und NP, zu signifikant mehr Flag-XBP1s-GFP-positiven Zellen im Vergleich zu DMSO-stimulierten Zellen.

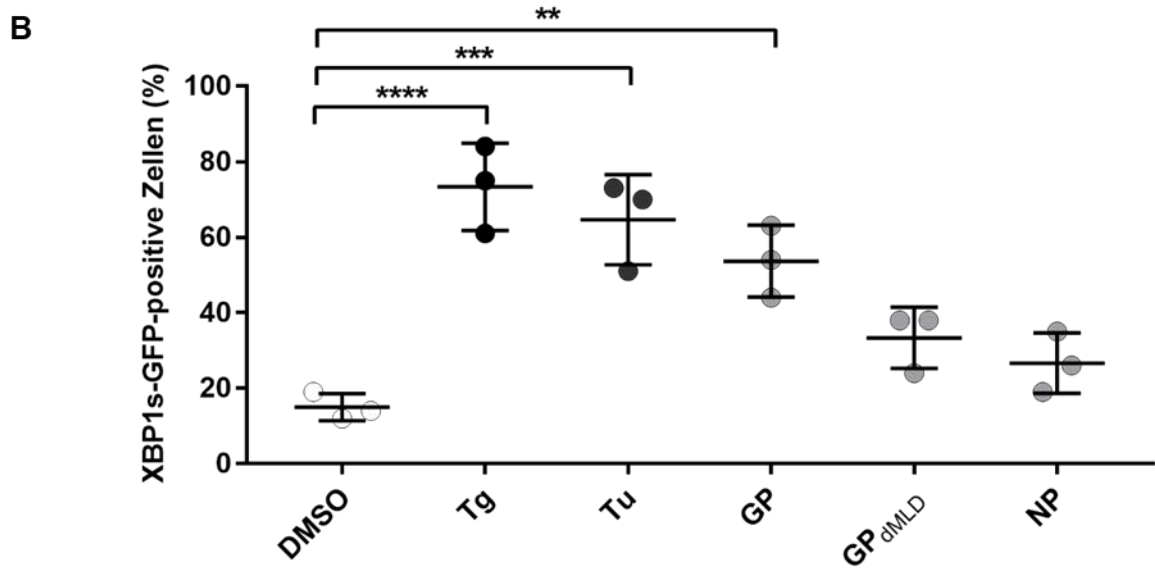
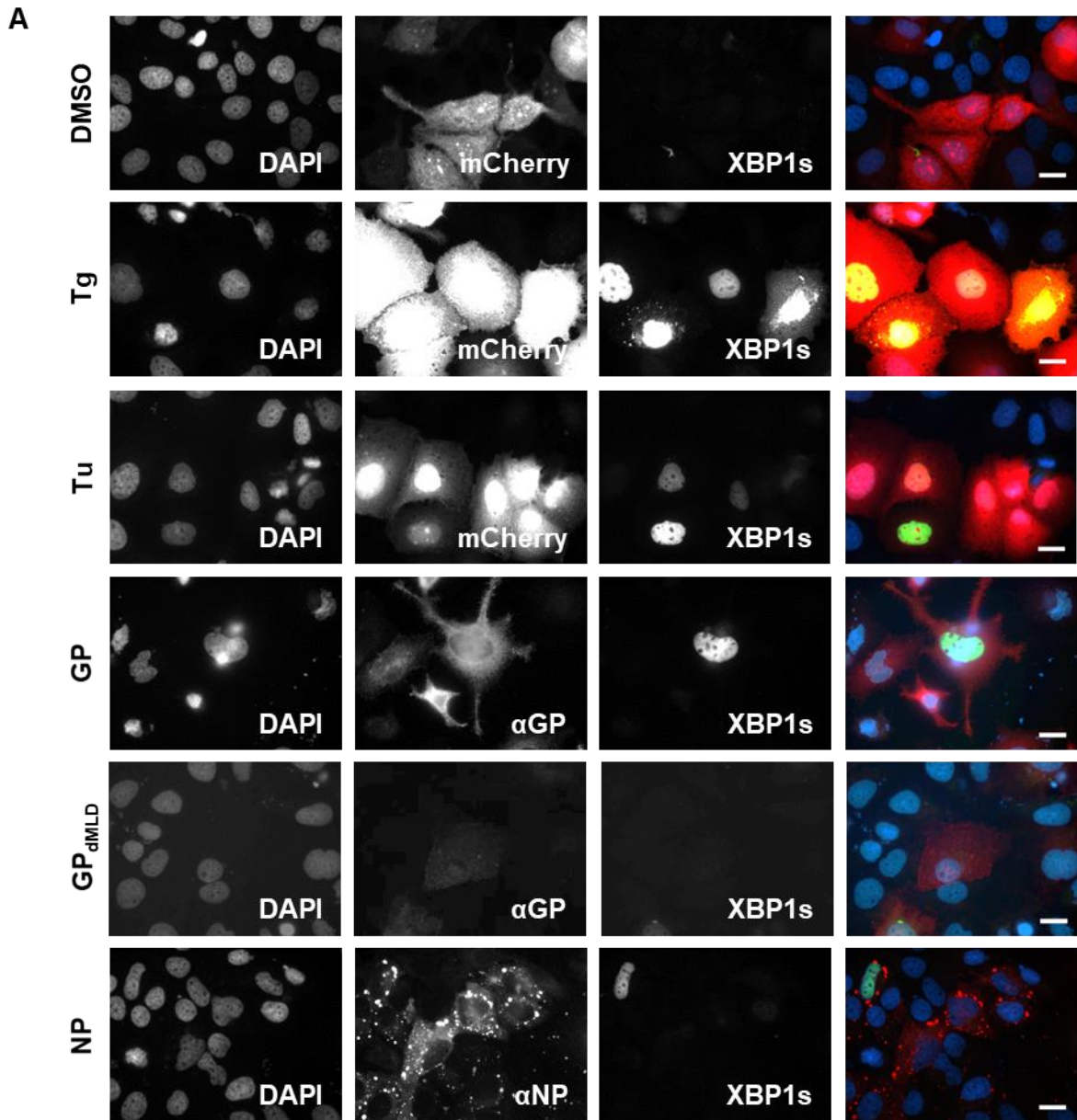


Abb. 4.6: Koexpression von GP, GP_{dMLD} oder NP mit dem Flag-XBP1-GFP Reporter

A: HuH7 Zellen wurden, wie in 4.5 beschrieben, transfiziert (3.2.2.2). Die Positiv- (Tg/Tu) und Negativ-Kontrollen (DMSO) wurden anstatt mit LV mit 1 µg des mCherry Expressionsplasmids transfiziert. 32 Std p.t. wurden die Kontrollen stimuliert. 48 Std p.t. wurden die Zellen gefärbt (3.2.3.5). Färbung: GP/GP_{dMLD}: αGP (50-6-10) (Maus, 1:50), DAPI (1:2000) und αMaus, Alexa Fluor 594, IgG (Ziege, 1:400); NP: αNP (59-9-10) (Maus, 1:50), DAPI (1:2000) und αMaus, Alexa Fluor 594, IgG (Ziege, 1:400). Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt. B: Quantifizierung der XBP1s-positiven Zellen aus A. In drei unabhängigen Versuchen wurden je acht Bilder ausgewertet. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, ** p-Wert ≤ 0.01, *** p-Wert ≤ 0.001, **** p-Wert ≤ 0.0001).

4.2.4 Der Einfluss des Marburg Virus GP auf IRE1

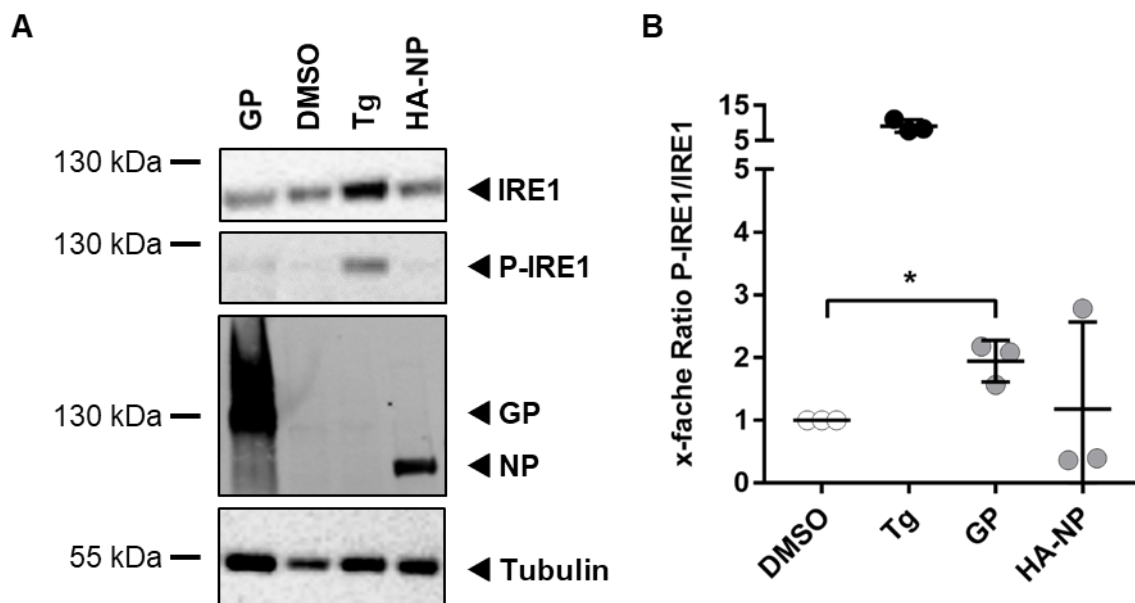


Abb. 4.7: Einzelexpression von IRE1 und GP oder NP

A: HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit 2 µg der entsprechenden MARV Expressionsplasmide (HA-NP, GP) transfiziert. Die Zellen der Kontrollen (DMSO, Tg) wurden mit je 2 µg des mCherry Expressionsplasmids transfiziert. 32 Std p.t. wurde die Positiv-Kontrolle mit 5 nM Tg (2.7.2.1) und die Negativ-Kontrolle mit DMSO stimuliert. Die Proben wurden 48 Std p.t. geerntet (3.2.2.3) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) analysiert. Färbung: IRE1: αIRE1 (Kaninchen, 1:1000) und αKaninchen, HRP, IgG (Ziege, 1:30000); IRE1-P: αIRE1 (S724) (Kaninchen, 1:1000) und αKaninchen, HRP, IgG (Ziege, 1:30000); HA-NP: αHA (Maus, 1:1000) und αMaus, Alexa Fluor 680, IgG (Ziege, 1:5000); GP: αGP (50-6-10) (Maus, 1:500) und αMaus, Alexa Fluor 680, IgG (Ziege, 1:5000); Tubulin: αTubulin (Maus, 1:500) und αMaus, HRP, IgG (Ziege, 1:30000). Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt. B: Quantifizierung des Verhältnisses von IRE1-P zu IRE1 aus A. Die IRE1-P und IRE1 Proteinmengen wurden anhand der Tubulin Proteinmengen normalisiert. Die Negativ-Kontrolle (DMSO) wurde gleich 1 gesetzt und das Verhältnis von IRE1-P zu IRE1 je Probe ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, * p-Wert ≤ 0.05).

Um zu überprüfen, ob die Expression von GP auch zur Aktivierung und Phosphorylierung von endogenem IRE1 (IRE1-P) führt, wurden HuH7 Zellen mit je 2 µg der MARV Expressionsplasmide (GP, HA-NP) oder mit je 2 µg des mCherry Expressionsplasmids (DMSO, Tg) transfiziert (3.2.2.2). Die Positiv-Kontrolle (Tg) wurde 32 Std p.t. mit 5 nM Tg

(2.7.2.1) stimuliert, die Negativ-Kontrolle (DMSO) mit DMSO. Die Zellen wurden 48 Std p.t. geerntet (3.2.2.3) und mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) untersucht. Neben den viralen Proteinen wurden IRE1, IRE1-P und Tubulin gefärbt (Abb. 4.7 A). Die IRE1 und IRE1-P Proteinmengen wurden quantifiziert und mittels der entsprechenden Tubulin Proteinmenge normalisiert. Anschließend wurden die DMSO-stimulierten Proben (IRE1 und IRE1-P) jeweils gleich 1 gesetzt und das Verhältnis von IRE1-P zu IRE1 bestimmt (Abb. 4.7 B). Die Versuche wurden von Astrid Herwig durchgeführt.

Die Expression von NP führte zu keiner Phosphorylierung von IRE1, wohingegen GP zu einem signifikanten Anstieg von IRE1-P im Vergleich zu DMSO-stimulierten Zellen führte (Abb. 4.7).

4.2.5 Zusammenfassung: Der Einfluss des Marburg Virus GP auf die ER-Stress-Antwort

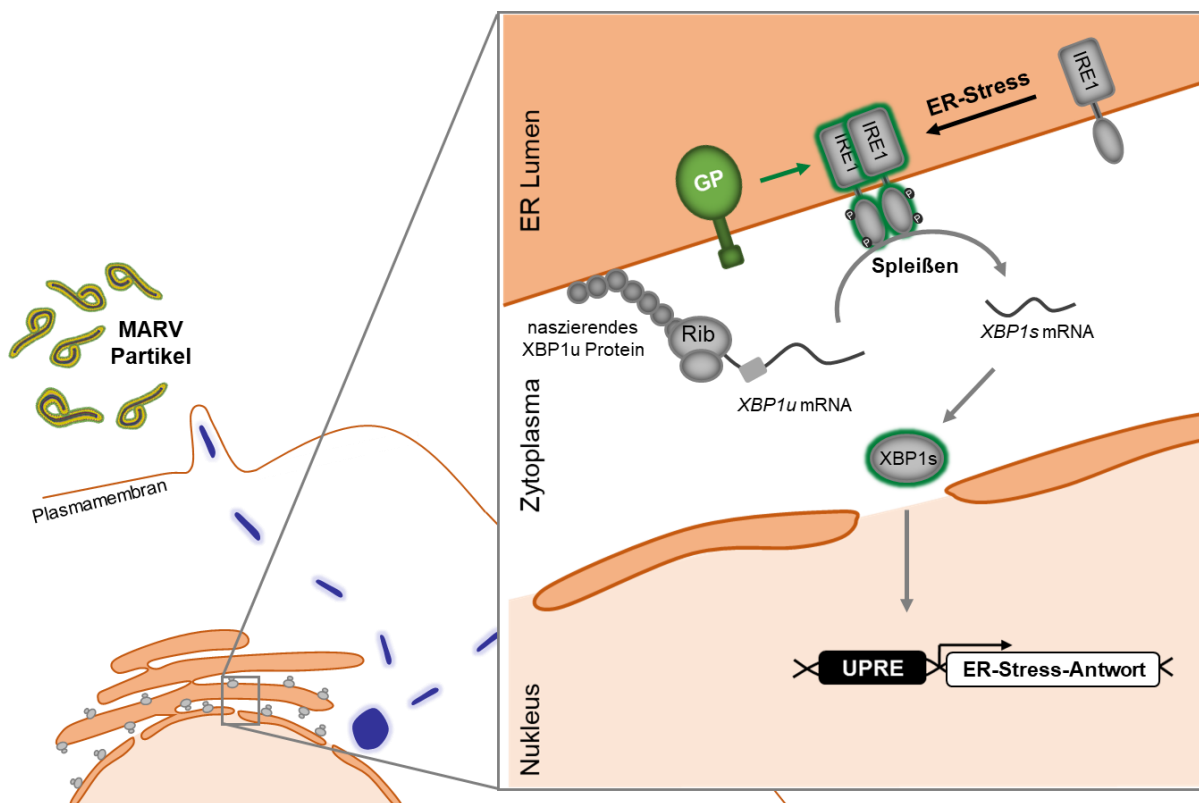


Abb. Z.1: MARV GP aktiviert die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort

MARV GP führt, auf Grund der im ER stattfindenden posttranslationalen Modifikationen, zu einer Aktivierung der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort (Abb. 2.5). GP aktiviert das Transmembranprotein IRE1, den Transkriptionsfaktor XBP1s und den Promotor UPRE.

Die solitäre Expression von GP führte zur Aktivierung des ER-residenten ER-Stress-Sensorproteins IRE1 (Abb. 4.7), des Transkriptionsfaktors XBP1s (Abb. 4.5 und 4.6), sowie

des XBP1s-responsiven UPRE-Promotors (Abb. 4.2). Im Gegensatz dazu führte die Expression von GP_{dMLD} (2.5.1.2), welches deutlich weniger Glykosylierungsstellen besitzt, zu keiner Aktivierung der ER-Stress-Antwort (Abb. 4.3 und Abb. 4.5). Auch die MARV Proteine VP35 und NP zeigten keinen Einfluss auf die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort (Abb. 4.2, Abb. 4.3, Abb. 4.5, Abb. 4.6 und Abb. 4.7).

4.3 Der Einfluss von VP30 auf die ER-Stress-Antwort

4.3.1 Der Einfluss der Marburg Virus Proteine VP24, VP35, VP40 oder NP auf die VP30-vermittelte Reduktion der GP-abhängigen Aktivierung des UPRE-Promotors

Für unterschiedliche Viren (SARS, CHIKV, HSV, HCMV, MCMV) ist bekannt, dass sie in der Lage sind die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort (2.7.1, Abb. 2.5) zu unterdrücken^{156,41,194,58,33}. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von VP30 die GP-, Tg- und Tu-abhängige Aktivierung der ER-Stress-Antwort im UPRE-Assay (3.2.2.6) reduzieren kann. VP30 war jedoch nicht in der Lage die GP-abhängige ER-Stress-Antwort vollständig aufzuheben, wie dies während einer MARV Infektion zu beobachten ist. Dies lässt vermuten, dass weitere MARV Proteine an der Regulierung der ER-Stress-Antwort beteiligt sind (2.7.3)¹⁴².

Um zu überprüfen, ob weitere MARV Proteine an der VP30-abhängigen Gegenregulation der ER-Stress-Antwort beteiligt sind, wurden Koexpressionsstudien von GP und VP30 mit VP24, VP35, VP40 oder NP durchgeführt.

Hierfür wurden HuH7 Zellen, wie in 3.2.2.6 beschrieben, transfiziert und analysiert (Abb. 4.8). Je 1 µg der entsprechenden MARV Expressionsplasmide wurde, neben den Luziferase Reportern, transfiziert und ggf. mit LV auf 3 µg aufgefüllt. Die Kontrollen (DMSO, Tg) wurden mit je 3 µg LV transfiziert.

Die Behandlung mit Tg führte zu einer Aktivierung des UPRE-Promotors. Die solitäre Expression von GP (Mock) führte, wie die Positiv-Kontrolle Tg, ebenfalls zu einer Aktivierung des UPRE-Promotors. Die zusätzliche Expression von VP30, VP30 + VP35, sowie VP30 + VP40 resultierte in einer signifikanten Reduktion der GP-abhängigen ER-Stress-Antwort. Im Gegensatz dazu kam es bei der Koexpression von VP24 oder NP mit VP30 zu einem gegenläufigen Effekt, der die ER-Stress-reduzierende Aktivität des VP30 aufzuheben schien (Abb. 4.8).

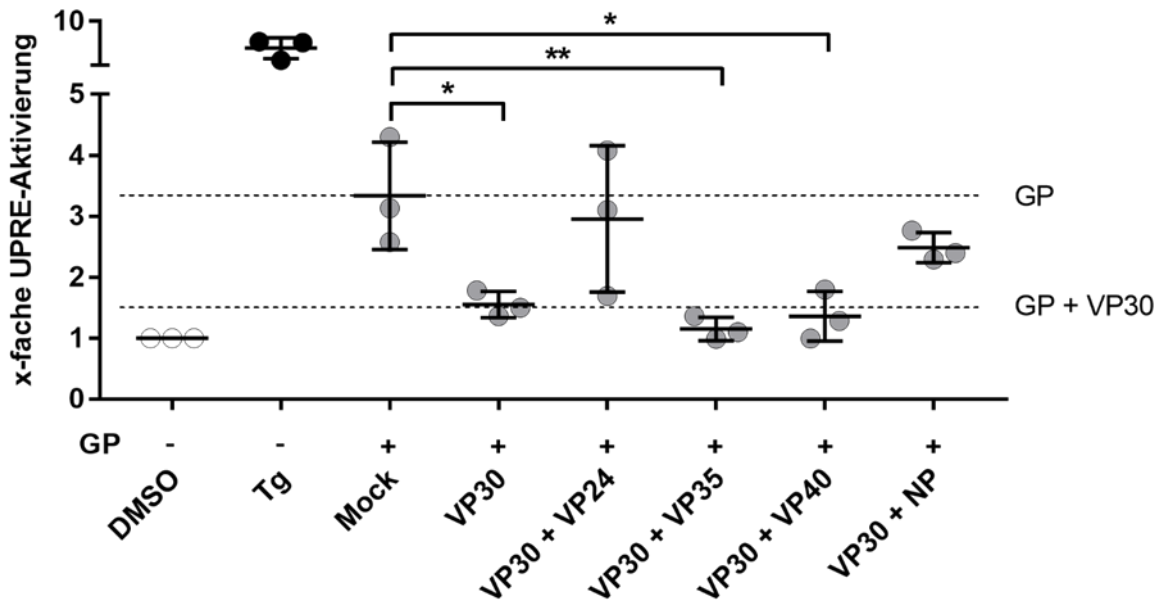


Abb. 4.8: Koexpression von GP und VP30 mit VP24, VP35, VP40 oder NP im UPR-Assay

HuH7 Zellen (5×10^4 Zellen/12-well) wurden mit je $1 \mu\text{g}$ der entsprechenden MARV Expressionsplasmide (GP, VP30, VP24, VP35, VP40, NP), dem UPR-abhängigen Firefly-Luziferase Reporter-Plasmid und pGL4.73 (Renilla-Luziferase) zur Normalisierung, wie in 3.2.2.6 beschrieben, transfiziert. Alle Proben wurden mit der gleichen Gesamt-DNA-Menge ($3,6 \mu\text{g}$) transfiziert, wenn nötig wurde mit LV aufgefüllt. 32 Std p.t. wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1) und die Negativ-Kontrolle mit DMSO stimuliert. Die Analyse der Reporteraktivität erfolgte 48 Std p.t. Es folgte die Normalisierung der Werte anhand der Transfektionseffizienz-Kontrolle. Die Negativ-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, * p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$).

4.3.2 Die Analyse der Interaktion des Marburg Virus VP30 mit XBP1u und XBP1s

Das naszierende XBP1u Protein rekrutiert seine eigene mRNA spezifisch an die ER Membran (XBP1u Protein/XBP1u mRNA Komplex), sodass diese in räumlicher Nähe zu IRE1 vorliegt (2.7.1)^{186,152,187,85,134,157}.

Um zu überprüfen, ob VP30 möglicherweise mit dem XBP1u Protein interagiert und dadurch die ER-Stress-Antwort unterdrückt, wurden Ko-IP Studien durchgeführt. HuH7 Zellen wurden mit je $1 \mu\text{g}$ der Expressionsplasmide Flag-XBP1-GFP und HA-VP30 transfiziert (3.2.2.2). Zur Kontrolle wurden Zellen mit je $1 \mu\text{g}$ der Expressionsplasmide HA-VP30 und LV oder Flag-XBP1-GFP und LV transfiziert. Jeder Ansatz wurde doppelt transfiziert und 32 Std p.t. wurde jeweils einer der Ansätze mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder DMSO stimuliert. 48 Std p.t. wurde HA-VP30, wie in 3.2.3.6 beschrieben, unter Verwendung von αHA -Agarose präzipitiert und analysiert (Abb. 4.9).

Alle exprimierten Proteine (HA-VP30, Flag-XBP1u und Flag-XBP1s-GFP) konnten in den jeweiligen Lysaten (Abb. 4.9, Lysat) nachgewiesen werden. Die Stimulation mit Tg führte zur

Induktion des Spleißens der *XBP1u* mRNA, was durch die reduzierte Expression von Flag-XBP1u und die verstärkte Expression von Flag-XBP1s-GFP in den jeweiligen Lysaten nachgewiesen wurde (Abb. 4.9, zweiter Blot von oben). Durch die Präzipitation mit der α HA-Agarose wurde Flag-XBP1u zum Teil unspezifisch präzipitiert (Abb. 4.9, vierter Blot von oben). In Anwesenheit von VP30 konnte die präzipitierte Menge von Flag-XBP1u gesteigert werden. Im Gegensatz dazu konnte Flag-XBP1s-GFP nicht ko-präzipitiert werden (Abb. 4.9, ierter Blot von oben).

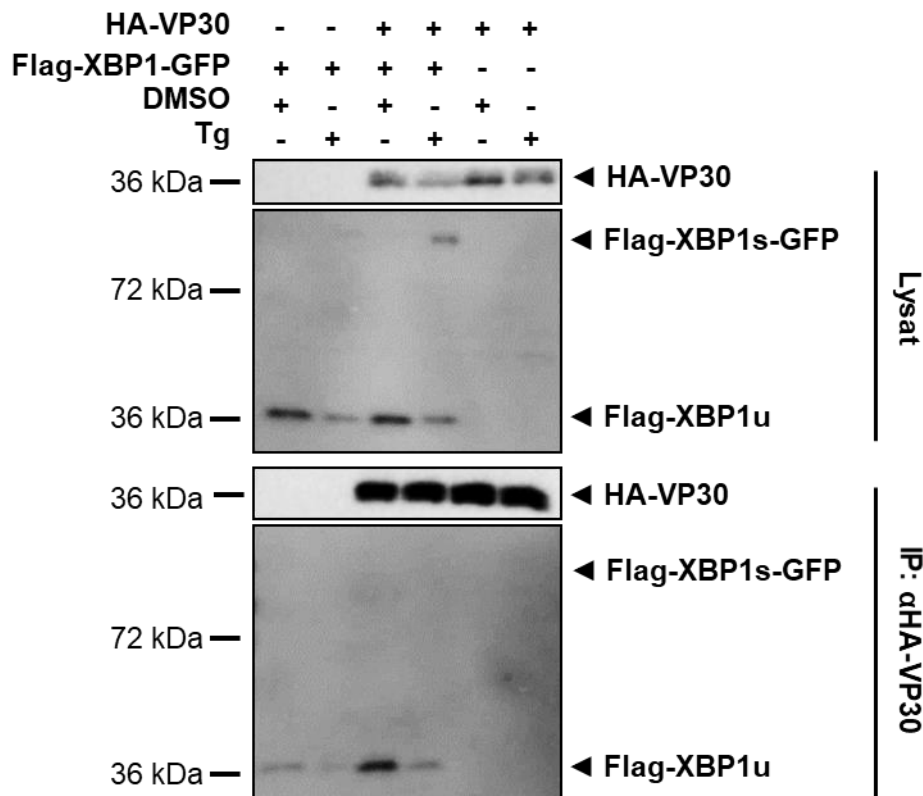


Abb. 4.9: Ko-Immünpräzipitation von HA-VP30 und Flag-XBP1u

HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit je 1 μ g des Flag-XBP1-GFP Expressionsplasmids und des MARV HA-VP30 Expressionsplasmids transfiziert. Sofern nur eines der beiden Plasmide transfiziert wurde, wurde mit 1 μ g LV aufgefüllt. 32 Std p.t. wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder mit DMSO stimuliert. 48 Std p.t. wurden die Zellen geerntet und HA-VP30 mittels HA-spezifischer Agarose präzipitiert (3.2.3.6). Anschließend wurden die Proben mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) analysiert. Färbung: HA-VP30: α HA (Kaninchen, 1:500) und α Kaninchen, HRP, IgG (Ziege, 1:40000); Flag: α Flag (Kaninchen, 1:500) und α Kaninchen, HRP, IgG (Ziege, 1:40000). Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt.

Um zu überprüfen, ob die, in Abb. 4.9 gezeigte, Interaktion von HA-VP30 und Flag-XBP1u RNA-abhängig ist, wurden HuH7 Zellen mit je 1 μ g HA-VP30 oder 1 μ g LV zusammen mit jeweils 1 μ g Flag-XBP1-GFP oder 1 μ g VP30-GFP transfiziert (3.2.2.2). Jeder Ansatz wurde doppelt transfiziert und während der Präzipitation wurde zu je einem Ansatz RNase A/T1 hinzugefügt, um an der Interaktion beteiligte RNA zu degradieren und somit die Interaktion

aufzuheben. 48 Std p.t. wurde HA-VP30, wie in 3.2.3.6 beschrieben, unter Verwendung von α HA-Agarose präzipitiert (Abb. 4.10 A).

Alle ektopisch exprimierten Proteine (HA-VP30, VP30-GFP und Flag-XBP1u) konnten in den jeweiligen Lysaten (Abb. 4.10 A, obere Blots) nachgewiesen werden. Durch die Präzipitation von HA-VP30 konnten Flag-XBP1u, wie bereits in Abb. 4.9 gezeigt, und VP30-GFP ko-präzipitiert werden (Abb. 4.10 A, unten links). In Anwesenheit von RNase A/T1 konnte nur VP30-GFP, nicht jedoch Flag-XBP1u, ko-präzipitiert werden (Abb. 4.10 A, unten rechts), was auf eine RNA-abhängige Interaktion von VP30 mit Flag-XBP1u hinweist. Die Interaktion von VP30 mit sich selbst ist RNA-unabhängig. Die Quantifizierung der Ergebnisse (Abb. 4.10 B) zeigt, dass die ko-präzipitierte Proteinmenge von Flag-XBP1u in Anwesenheit von HA-VP30 signifikant erhöht ist.

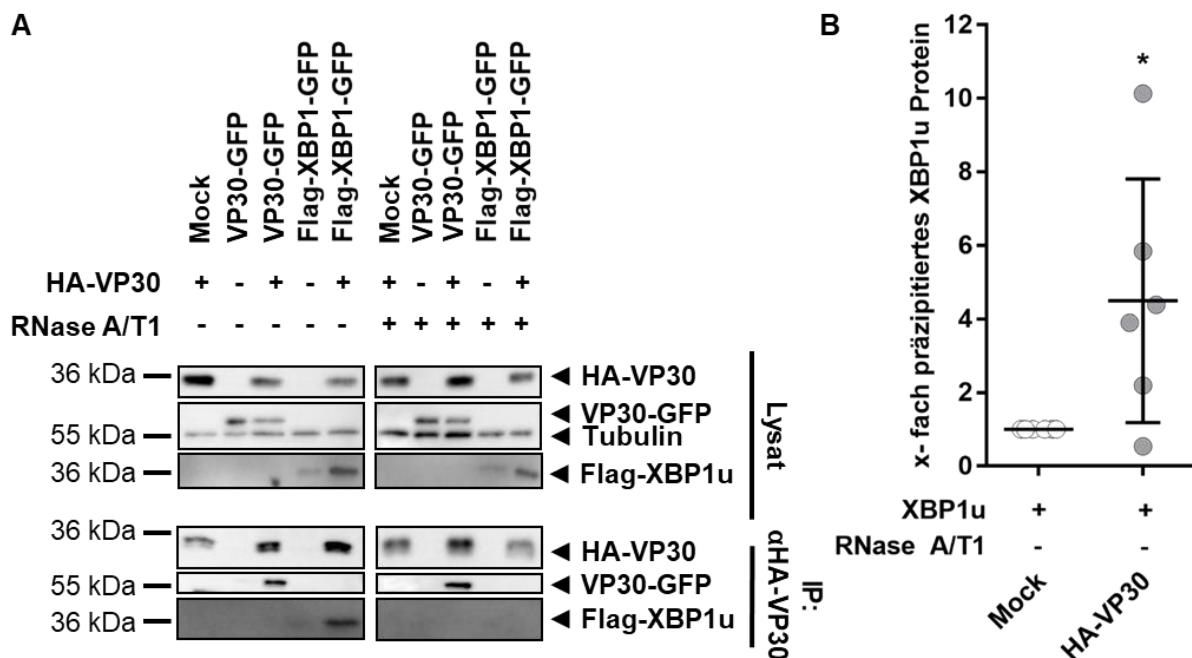


Abb. 4.10: Ko-Immünpräzipitation von HA-VP30 und Flag-XBP1u in Abhängigkeit von RNA

A: HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit je 1 μ g des MARV HA-VP30 Expressionsplasmids, sowie dem XBP1 oder MARV VP30-GFP Expressionsplasmids transfiziert. Sofern nur die Expressionsplasmide für XBP1 oder HA-VP30 transfiziert wurden, wurde entsprechend mit 1 μ g LV aufgefüllt. 48 Std p.t. wurden die Zellen geerntet und mittels Ko-IP und HA-spezifischer Agarose präzipitiert (3.2.3.6). Während der Präzipitation wurde RNase A/T1 zugegeben oder mit dem gleichen Volumen Ko-IP Puffer aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben wie in Abb. 4.9 beschrieben analysiert. VP30-GFP wurde analog zu HA-VP30 analysiert. Der Versuch wurde drei Mal wiederholt. Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt. B: Quantifizierung der präzipitierten Menge an XBP1u durch HA-VP30 (ohne RNase A/T1). Die Mengen an präzipitiertem Flag-XBP1u wurden anhand der Tubulin und XBP1u Mengen im Lysat normalisiert. Die Probe XBP1u + LV wurde gleich 1 gesetzt. Der Versuch wurde sechs Mal wiederholt. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, * p-Wert ≤ 0.05).

4.3.3 Die Charakterisierung der Marburg Virus VP30 Mutanten

VP30 (2.5.2) ist Teil des Ribonukleoproteinkomplexes¹⁴ und besitzt unterschiedliche Aufgaben im Replikationszyklus von MARV (2.6)^{125,162,7}. Es besitzt mehrere charakteristische Domänen und Motive. Viele dieser Motive sind innerhalb der Filoviren konserviert. So konnte z.B. für das VP30 des EBOV das Motiv charakterisiert werden, das essenziell für die RNA-Bindung ist¹⁹. Um zu überprüfen, ob die RNA-vermittelte Interaktion zwischen VP30 und XBP1u abhängig von den bekannten EBOV VP30 RNA-Bindemotiven (Poly-Serin Motiv, Poly-Leucin Motiv, Zink-Finger Motiv) ist, wurden die entsprechenden Sequenzen in MARV VP30 mutiert und analysiert. Zusätzlich wurde ein konserviertes Poly-Prolin Motiv untersucht.

Innerhalb der AS 40-51 von VP30 befindet sich ein Poly-Serin (S) Motiv (⁴⁰SXSSX₂SSX₂SS⁵¹, Abb. 4.11), welches innerhalb der Filoviren konserviert ist und eine wichtige Rolle im EBOV Replikationszyklus spielt, da die Phosphorylierung/Dephosphorylierung der Serine zu einem Wechsel zwischen Transkription und Replikation führt^{17,18,101,108}. Für EBOV VP30 konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der Serine zu Asparaginsäure (VP30 DD) den phosphorylierten Status imitiert und ein Austausch zu Alanin (A; VP30 AA) den dephosphorylierten Status^{162,122}. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass VP30 DD die virale RNA schlechter binden kann als das wildtypische VP30¹⁹. Um den Einfluss dieses Motivs innerhalb von MARV VP30 zu charakterisieren, wurden analog zu EBOV VP30 phosphomimetische Mutationen erzeugt (MARV HA-VP30 DD, MARV HA-VP30 AA). Die Klonierung dieser Mutanten erfolgte über eine spezifische PCR (3.2.1.2) auf der Basis der Plasmide pTM1-VP30 DD bzw. pTM1-VP30 AA. Das PCR Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen (3.2.1.5) XhoI und NotI in den Vektor pCAGGS ligiert (3.2.1.6).

Filoviren besitzen ein konserviertes Poly-Prolin (P) Motiv innerhalb des VP30 (⁷¹PPPP⁷⁴, Abb. 4.11, EBOV/RESTV: ⁶⁵PPAP⁶⁸). Poly-P Motive bilden Helices in der Sekundärstruktur von Proteinen und sind dadurch oft an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt^{32,135}. Um auch den Einfluss des Poly-P Motivs von VP30 zu charakterisieren, wurden im HA-VP30 Expressionsplasmid mittels ortsgerechter Mutagenese alle vier P zu A (HA-VP30 4PA) mutiert.

Für das Zink-Finger Motiv, welches ebenfalls innerhalb der Filovirus VP30 Proteine hoch konserviert ist (MARV VP30: ⁸⁸CX₈CX₄CX₃H⁹⁶, Abb. 4.11), konnte im Falle des EBOV VP30 gezeigt werden, dass es essenziell für die Bindung an die virale RNA ist^{19,47}. Um die Funktion des Zink-Finger Motivs zu zerstören, wie in Enterlein *et al.*, 2006⁴⁷ beschrieben, wurden mittels ortsgerechter Mutagenese (3.2.1.7) im HA-VP30 Expressionsplasmid zwei Punktmutationen (C92S, H96L) eingeführt (HA-VP30 C92S, H96L).

Innerhalb der AS 106-109 des MARV VP30 findet man ein Poly-Leucin (L) Motiv (¹⁰⁶LLLL¹⁰⁹, Abb. 4.11), welches auch in EBOV und RESTV VP30 auftaucht (EBOV/RESTV: ¹⁰⁰LLLL¹⁰⁴). Das Poly-L Motiv ist essenziell für die Homooligomerisierung⁶⁷ des EBOV VP30 und für die Bindung von RNA¹⁹. Um die Funktion des Poly-L Motivs zu untersuchen wurden, wie in Hartlieb *et al.*, 2003⁶⁷ beschrieben, mittels ortsgerechter Mutagenese (3.2.1.7) im HA-VP30 Expressionsplasmid alle vier L zu A mutiert (HA-VP30 4LA).

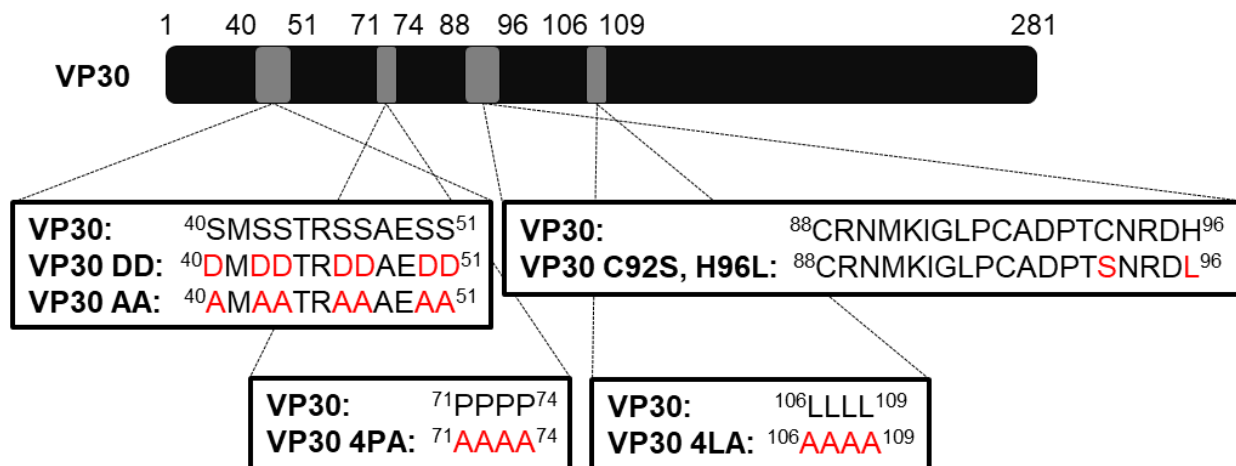


Abb. 4.11: Schematische Darstellung des MARV VP30 und dessen Mutanten

MARV VP30 umfasst 281 Aminosäuren (AS), hat eine Masse von ungefähr 33 kDa und besitzt mehrere charakteristische Motive: Ein Serin Motiv (AS 40-51), ein Poly-Prolin Motiv (AS 71-74), ein Zink-Finger Motiv (AS 88-96) und ein Poly-Leucin Motiv (AS 106-109). Mutationen im Vergleich zum wildtypischen VP30 sind in Rot hervorgehoben. Im rekombinant hergestellten VP30 DD sind alle Serine (S) des Serin Motivs zu Asparaginsäure (D) mutiert, bei VP30 AA zu Alanin (A). Im rekombinanten VP30 C92S, H96L sind die AS 92 von Cystein (C) zu S und die AS 96 von Histidin (H) zu Leucin (L) innerhalb des Zink-Finger-Motivs mutiert. Im rekombinant hergestellten VP30 4PA sind alle Proline (P) des Poly-Prolin Motivs zu A mutiert. Im rekombinanten VP30 4LA sind alle L des Poly-Leucin Motivs zu A mutiert.

4.3.3.1 Die Analyse der Marburg Virus VP30 Mutanten im Minigenom-Assay

Um die Funktionalität der einzelnen MARV VP30 Mutanten (4.3.3, Abb. 4.11) während der MARV Transkription und Replikation zu bestimmen, wurden diese im MG-Assay (3.2.2.7) analysiert. Mit dem MG-Assay kann die Transkription und Replikation von MARV unter BSL 1 Bedingungen untersucht werden. Dabei wird ein Plasmid transfiziert, welches aus der Leader und Trailer Sequenz des MARV Genoms besteht und an Stelle der MARV Gene einen Renilla-Luziferase Leserahmen besitzt (MG). Das MG wird initial von der T7 Polymerase transkribiert und in Anwesenheit der viralen Proteinen L, NP, VP35 und VP30 transkribiert, repliziert und von der zellulären Translationsmaschinerie translatiert. Die gemessene Aktivität der Renilla-Luziferase entspricht dabei der Effizienz der MARV Transkription und Replikation.

Hierfür wurden HuH7 Zellen, wie in 3.2.2.7 beschrieben, transfiziert und analysiert. Je 100 ng der einzelnen VP30 Expressionsplasmide wurden, neben den Luziferase Reportern, dem T7

Polymerase Expressionsplasmid und den MARV Expressionsplasmiden L, VP35 und NP transfiziert. Die Kontrollen (-L und -VP30) wurden mit der entsprechenden Menge LV statt L bzw. VP30 transfiziert. 48 Std p.t. wurden die Zellen geerntet (3.2.2.4) und die Aktivität der Luziferasen gemessen. Die Positiv-Kontrolle (VP30) wurde auf 100% gesetzt, sodass alle anderen Proben als relative Replikations- und Transkriptionsaktivität in Relation zur Positiv-Kontrolle dargestellt sind.

Wurde die Polymerase L nicht exprimiert, so fand keine Transkription und Replikation statt (-L). Wurde VP30 nicht exprimiert (-VP30), führte dies zu einer signifikanten Reduktion auf die Hälfte der ursprünglichen Aktivität (VP30) der Replikation und Transkription im MG-Assay. Wird HA-VP30 anstelle des wildtypischen VP30 exprimiert, findet man eine leicht reduzierte Aktivität im Vergleich zum wildtypischen VP30. Da alle VP30 Mutanten HA-Epitop-markiert sind, wird deren Aktivität im MG-Assay mit HA-VP30 verglichen. HA-VP30 C92S, H96L, HA-VP30 4LA und HA-VP30 4PA führten zu einer reduzierten Aktivität im MG-Assay. Im Gegensatz dazu war die Reporteraktivität von HA-VP30 DD vergleichbar mit HA-VP30 und HA-VP30 AA konnte die Transkriptions- und Replikations-Aktivität signifikant steigern. (Abb. 4.12 A).

Die Expression der in Abb. 4.12 A transfizierten Mengen von VP30 und den VP30 Mutanten wurde analysiert. In allen Proben konnte eine vergleichbare Menge an Tubulin und NP nachgewiesen werden. VP30 und HA-VP30 wurden immer in gleichen Mengen exprimiert. Im Gegensatz dazu schwankte die Expression der HA-VP30 Mutanten stark, wobei die Expression von HA-VP30 C92S, H96L und VP30 4PA in der Regel schwächer und die Expression von HA-VP30 4LA, HA-VP30 DD und HA-VP30 AA in der Regel stärker war als die Expression von HA-VP30 (Abb. 4.12 B).

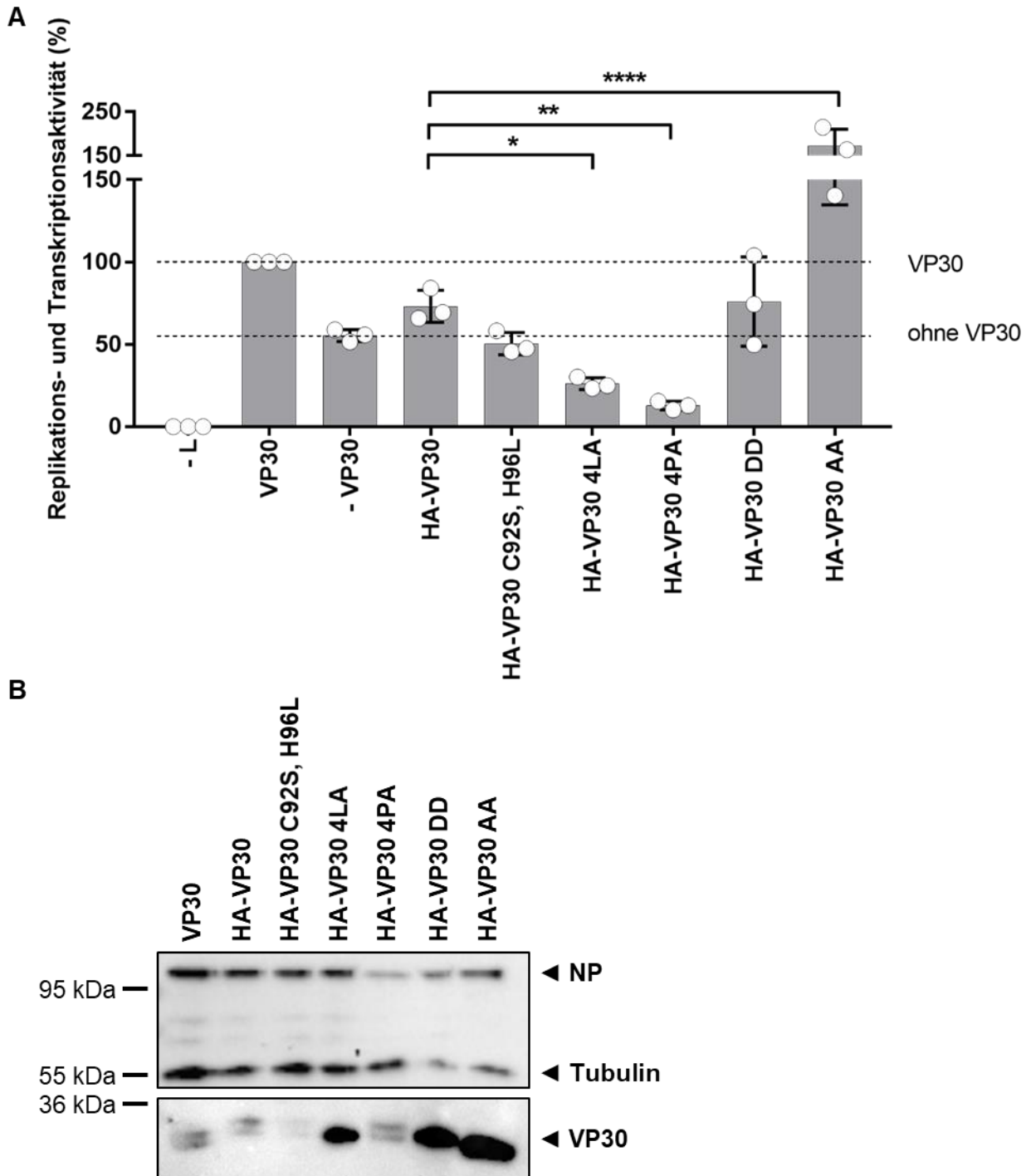


Abb. 4.12: Expression der VP30 Mutanten im MG-Assay

A: HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit den für die Transkription und Replikation wichtigen MARV Expressionsplasmiden (L, NP, VP35, VP30 oder den jeweiligen Mutanten), dem Minigenom Reporter-Plasmid (Renilla-Luziferase) und pGL4 (Firefly-Luziferase) zur Normalisierung, wie in 3.2.2.7 beschrieben, transfiziert. Bei den Kontrollen (- L/-VP30) wurde mit der entsprechenden Menge LV aufgefüllt. Die Bestimmung der Reporteraktivität erfolgte 48 Std p.t. Die Normalisierung der Werte erfolgte über die Firefly-Luziferase Aktivität. Die Positiv-Kontrolle (VP30) wurde gleich 100% gesetzt. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, * p-Wert ≤ 0.05 , ** p-Wert ≤ 0.01 , *** p-Wert ≤ 0.001 , **** p-Wert ≤ 0.0001). B: Die Proben (A) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) analysiert. Färbung: Oben: α NP (59-9-10) (Maus, 1:4000), α Tubulin (Maus, 1:1000) und α Maus, HRP, IgG (Ziege, 1:40000); Unten:

α VP30 (11-6-11) (Maus, 1:1000) und α Maus, HRP, IgG (Ziege, 1:40000); Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt (n = 3).

4.3.3.2 Die Analyse der Marburg Virus VP30 Mutanten auf den UPRE-Promotor

Die in 4.3.3 eingeführten MARV VP30 Mutanten (Abb. 4.11) besitzen mehrere Aminosäuremotive, die eine wichtige Rolle für die Transkription und Replikation spielen (Abb. 4.12). Um zu überprüfen, ob diese Motive in VP30 auch eine Rolle hinsichtlich der Regulierung der ER-Stress-Antwort haben, wurden die VP30 Mutanten im UPRE-Assay (3.2.2.6) analysiert.

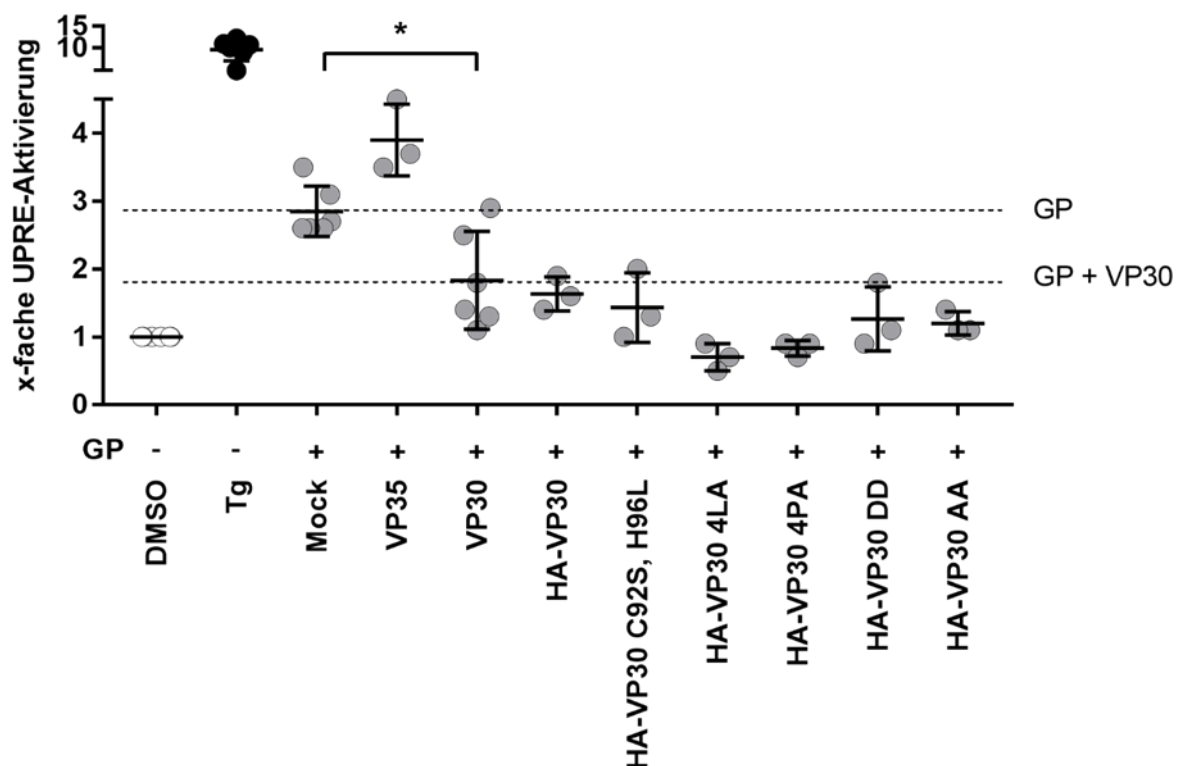


Abb. 4.13: Koexpression von GP und den VP30 Mutanten im UPRE-Assay

HuH7 Zellen (5×10^4 Zellen/12-well) wurden mit 1 μ g der entsprechenden MARV Expressionsplasmide, dem UPRE-abhängigen Firefly-Luziferase Reporter-Plasmid und pGL4.73 (Renilla-Luziferase) zur Normalisierung, wie in 3.2.2.6 beschrieben, transfiziert. Die Probe GP + Mock wurde mit 1 μ g LV transfiziert. Positiv- (Tg) und Negativ-Kontrolle (DMSO) wurden mit 2 μ g LV transfiziert. 32 Std p.t. wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1) und die Negativ-Kontrolle mit DMSO stimuliert. Die Analyse der Reporteraktivität erfolgte 48 Std p.t. Es folgte die Normalisierung der Werte anhand der Transfektionseffizienz-Kontrolle. Die Negativ-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Der Versuch wurde ≥ 3 Mal durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, * p-Wert ≤ 0.05).

Hierfür wurden HuH7 Zellen, wie in 3.2.2.6 beschrieben, mit dem ER-Stress-responsiven UPRE-abhängigen Luziferase Reporter und je 1 μ g des GP Expressionsplasmids, sowie des

VP35 (virale Negativ-Kontrolle) und den entsprechenden VP30 Expressionsplasmiden transfiziert.

Tg führte zu einer starken Aktivierung des UPRE-Promotors im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMSO). Auch die Expression von GP aktivierte den UPRE-Promotor im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMSO). Im Gegensatz zu VP35, führte eine Expression von VP30 und HA-VP30, sowie aller VP30 Mutanten (HA-VP30 C92S, H96L, HA-VP30 4LA, HA-VP30 4PA, HA-VP30 DD, HA-VP30 AA) zu einer Gegenregulation der GP-abhängigen Aktivierung des ER-Stress-responsiven Promotors UPRE. Zwischen HA-VP30 und den HA-VP30 Mutanten konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden (Abb. 4.13). Das zeigt, dass alle HA-VP30 Mutanten noch in der Lage sind die GP-abhängige ER-Stress-Antwort zu reduzieren.

4.3.4 Der Einfluss von Marburg Virus VP30 auf den UPRE-Promotor in HAP1 Zellen

MARV VP30 ist in der Lage die GP-, Tg- und Tu-abhängige ER-Stress-Antwort (2.7.1) zu reduzieren (2.7.3)¹⁴². Die Regulation findet vermutlich vor dem Spleißen der *XBP1u* mRNA statt, und es wird vermutet, dass die hier gezeigte RNA-abhängige Interaktion von VP30 mit dem XBP1u Protein dabei eine wichtige Rolle spielt (Abb. 4.9 und 4.10). Um diese Hypothesen zu bestätigen, soll die ER-Stress-regulierende Funktion von VP30 weiter in HAP1 Zellen charakterisiert werden. HAP1 Zelllinien sind humane, fast vollständig haploide, Fibroblasten-ähnliche Zellen, die von der chronische myeloische Leukämie (CML) Zelllinie KBM-7 abstammen (3.2.2.1). Fibroblasten gehören zu den Zielzellen von MARV⁶². In den HAP1 IRE1 KO Zellen ist ein Teil des IRE1 Gens, in den HAP1 XBP1 KO Zellen ein Teil des XBP1 Gens im Genom deletiert, was zu einer Verschiebung des jeweiligen Leserahmens führt und die Expression von IRE1 bzw. XBP1 vollständig unterbindet.

4.3.4.1 Die Charakterisierung des UPRE-Promotors in HAP1 Zellen

Um die HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zelllinien bezüglich der ER-Stress-Antwort zu charakterisieren, wurden die Zelllinien im UPRE-Assay (3.2.2.5) analysiert und mit den parental HAP1 Zellen verglichen. Hierfür wurden HAP1, HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen, wie in 4.1 beschrieben, transfiziert, mit DMSO, Tg oder Tu stimuliert und analysiert.

Wie in HuH7 Zellen (Abb. 4.1 A) führte die Stimulation von HAP1 Zellen mit Tg und Tu zu einer Dosis-abhängigen Aktivierung des UPRE-Promotors, die bei hohen Konzentrationen von 300-1000 nM Tu eine Sättigung erreichte (Abb. 4.15). Im Gegensatz dazu konnte die ER-Stress-Antwort in den HAP1 IRE1 KO oder HAP1 XBP1 KO Zelllinien nicht durch Tg oder Tu stimuliert werden. Für die Folgeversuche wurde, wie bereits bei den HuH7 Zellen, 5 nM Tg verwendet,

da dies die niedrigste Konzentration war, die zu einer klaren Aktivierung des UPRE-Promotors führte.

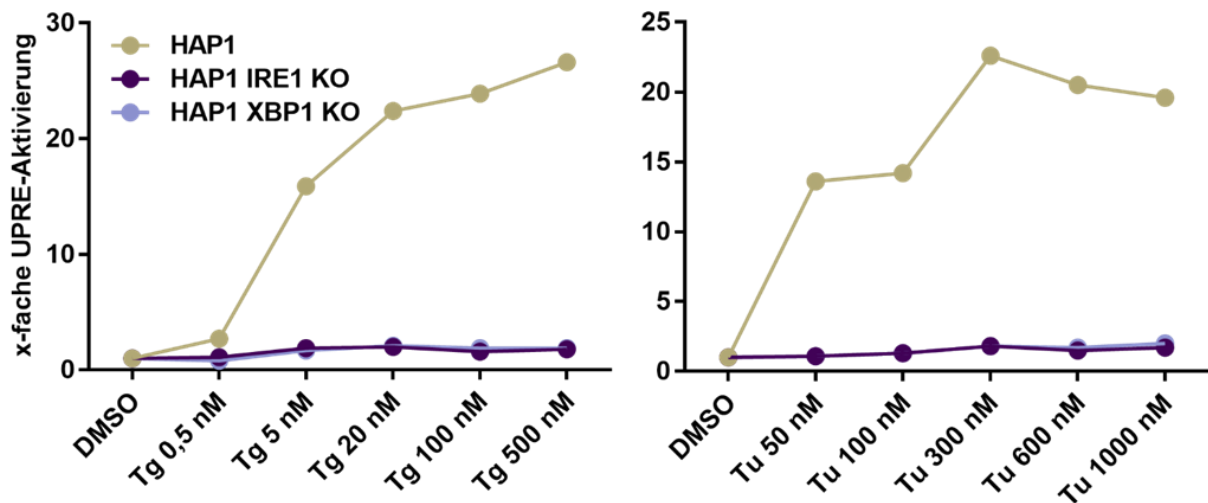


Abb. 4.14: Titration von Thapsigargin und Tunicamycin in HAP1 (KO) Zellen

HAP1 (Knock-out, KO) Zellen (6×10^5 Zellen/6-well) wurden wie in 4.1 beschrieben transfiziert, stimuliert und ausgewertet.

4.3.4.2 Analyse von VP30 im UPRE-Assay in HAP1 Zellen

Im Weiteren sollte analysiert werden, ob der KO von IRE1 oder XBP1 in den HAP1 Zellen und der damit verbundene Funktionsverlust durch die Transfektion des jeweiligen Expressionsplasmids im UPRE-Assay (3.2.2.5) komplementiert werden kann.

HAP1, HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen wurden, wie in 3.2.2.6 beschrieben, transfiziert und analysiert (Abb. 4.15). Zusätzlich wurden 100 ng des IRE1 – (Abb. 4.15 B) oder XBP1 Expressionsplasmids (Abb. 4.15 D) bzw. LV transfiziert (Abb. 4.15 A, C). Abb. 4.15 A und Abb. 4.15 B, bzw. Abb. 4.15 C und Abb. 4.15 D entstammen jeweils einer Versuchsreihe.

Wie bereits in vorangegangenen Versuchen (Abb. 4.14), führte die Tg-Stimulation der HAP1 Zellen, nicht jedoch die der beiden HAP1 KO Zelllinien zu einer Aktivierung des UPRE-Promotors (Abb. 4.15 A und C). Durch die Transfektion des IRE1 Expressionsplasmids konnte die Aktivierung des UPRE-Promotors in den HAP1 IRE1 KO Zellen, jedoch nicht in den HAP1 XBP1 KO Zellen, wiederhergestellt werden (Abb. 4.15 B). Darüber hinaus konnte durch die Transfektion des XBP1 Expressionsplasmids der Phänotyp der parentalen HAP1 Zellen in den HAP1 XBP1 KO Zellen, jedoch nicht in den HAP1 IRE1 KO Zellen, wiederhergestellt werden (Abb. 4.15 D). Wurden XBP1 oder IRE1 in parentalen HAP1 Zellen ektopisch exprimiert, führte

dies zu einer Aktivierung des UPRE-Promotors (Abb. 4.15 B, D). Unter allen Bedingungen (LV, IRE1 oder XBP1 Überexpression) führte die Expression von VP30 in Tg-stimulierten Zellen zu einer Reduktion der UPRE-Promotor Aktivierung (Abb. 4.15).

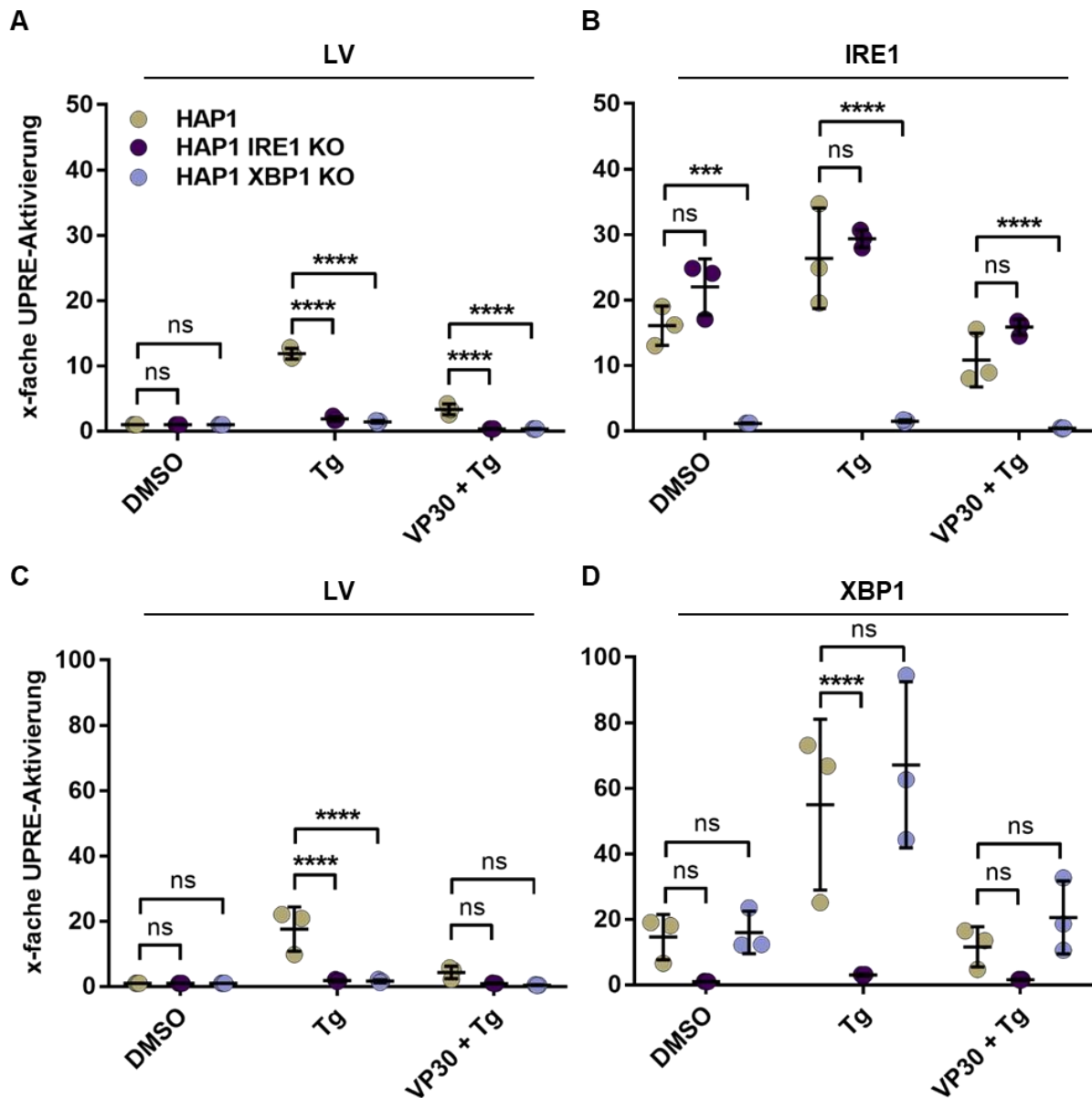


Abb. 4.15: UPRE-Aktivierung in HAP1 (KO) Zellen in Anwesenheit von IRE1 oder XBP1

HAP1 (Knock-out, KO) Zellen (6×10^5 Zellen/6-well) wurden mit $1 \mu\text{g}$ des MARV VP30 Expressionsplasmids, dem UPRE-abhängigen Firefly-Luziferase Reporter-Plasmid und pGL4.73 (Renilla-Luziferase) zur Normalisierung, wie in 3.2.2.6 beschrieben, transfiziert. Zusätzlich wurden die Proben mit 100 ng des IRE1 (B) - oder XBP1 (D) Expressionsplasmids bzw. LV transfiziert (A, C). Positiv-(Tg) und Negativ-Kontrollen (DMSO) wurden mit $1 \mu\text{g}$ LV transfiziert. 32 Std p.t. wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder mit DMSO stimuliert. Die Analyse der Reporteraktivität erfolgte 48 Std p.t. Es folgte die Normalisierung der Werte anhand der Transfektionseffizienz-Kontrolle. Die Negativ-Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Die Versuche wurden je drei Mal durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, *** p-Wert ≤ 0.001 , **** p-Wert ≤ 0.0001 , ns = nicht signifikant).

4.3.5 Zusammenfassung: Der Einfluss von VP30 auf die ER-Stress-Antwort

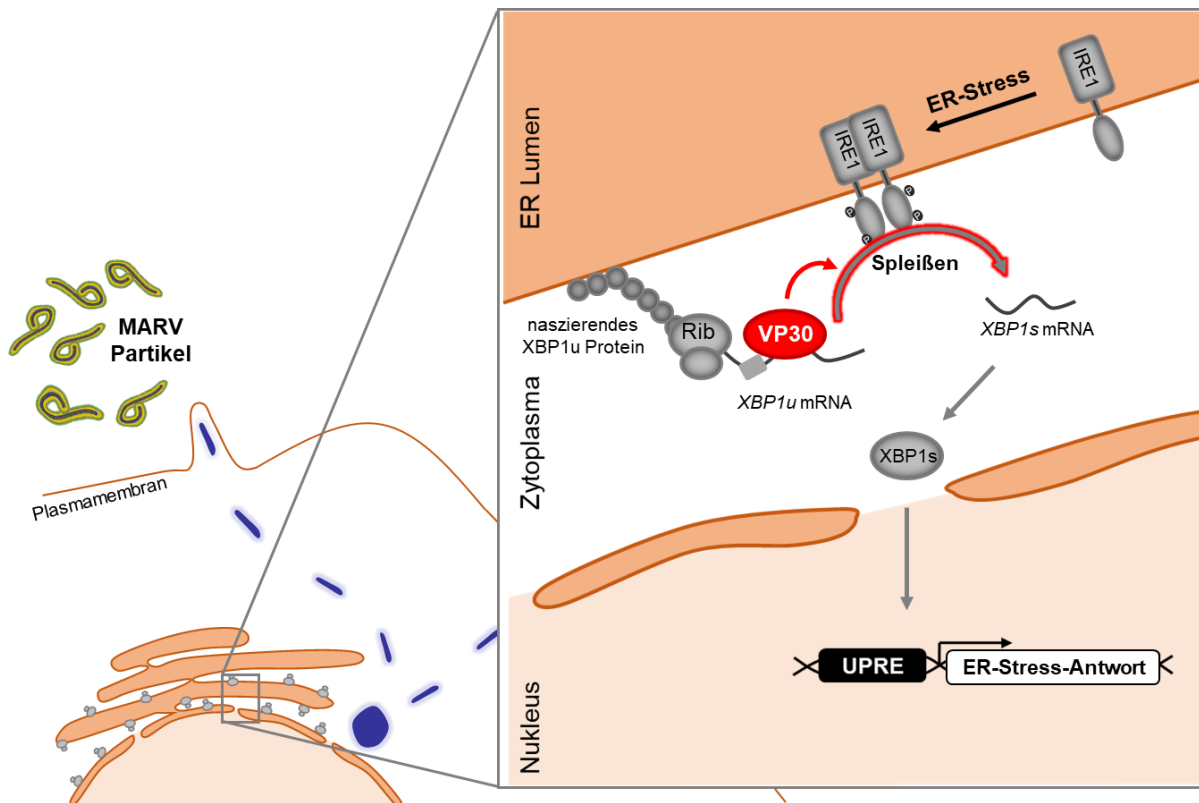


Abb. Z.2: VP30 reguliert die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort

MARV VP30 reduziert die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort, indem es RNA-abhängig mit dem XBP1u Protein interagiert.

Die Regulation der IRE1 Signalkaskade durch VP30 konnte weiter charakterisiert werden. Im UPRE-Assay war VP30 in der Lage die Tg-abhängige ER-Stress-Antwort in HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen zu regulieren, wenn die Signalkaskade durch die rekombinante Expression von IRE1 oder XBP1 komplementiert wurde (Abb. 4.14). Die Koexpression von GP, VP30 und jeweils einem weiteren MARV Protein (VP24, VP35, VP40, NP, L) bestätigte, dass VP30 die GP-abhängige ER-Stress-Antwort reduzieren kann. Die Expression eines einzelnen weiteren MARV Proteins (VP24, VP35, VP40, NP, L) konnte diesen Effekt nicht verstärken. Im Gegenteil steigerte die Koexpression von VP30 mit VP24 die ER-Stress-Antwort (Abb. 4.8). In Vorversuchen führte die solitäre Expression von VP24 ebenfalls zu einer Aktivität der ER-Stress-Antwort, was möglicherweise durch die VP24-abhängige Induktion der Oxidativen-Stress-Antwort bedingt ist (2.7.3)¹⁴². Weiter konnte gezeigt werden, dass VP30 RNA-abhängig mit dem XBP1u Protein interagiert (Abb. 4.9 und Abb. 4.10). Die Analyse der VP30 Mutanten (Abb. 4.11), die potentiell schlechter die virale RNA binden können, zeigte wie erwartet, dass diese Mutanten die Transkription und Replikation im MG-Assay nicht mehr

effizient unterstützen konnten (Abb. 4.12). Im UPRE-Assay waren jedoch alle Mutanten noch in der Lage die GP-abhängige ER-Stress-Antwort zu reduzieren (Abb. 4.13). Das zeigt, dass die hier untersuchten VP30 Motive keine Rolle für die Regulation der ER-Stress-Antwort spielen.

4.4 Der Einfluss der ER-Stress-Antwort auf den Marburg Virus Replikationszyklus

4.4.1 Die Analyse der viralen Replikation und Transkription in Anwesenheit von Thapsigargin

Die MARV Replikation (2.6) beansprucht die Wirtszelle stark. Insbesondere das GP (2.5.1.1), welches im ER akkumuliert¹⁰, führt zur Induktion der ER-Stress-Antwort (2.7.3, 4.2)¹⁴². Eine Regulation der ER-Stress-Antwort durch das virale Protein VP30 (2.5.2) scheint essenziell zu sein (2.7.3, 4.3)¹⁴² für den viralen Replikationszyklus, da eine zusätzliche Tg-induzierte Stimulation der ER-Stress-Antwort während einer MARV Infektion zu signifikant reduzierten Titern führte (2.7.3)¹⁴². Um den Einfluss von Tg auf die Replikation und Transkription von MARV zu untersuchen, wurde dieser im, in 4.3.3 beschriebenen, MG-Assay (3.2.2.7) untersucht.

Hierfür wurden HuH7 Zellen, wie in 3.2.2.7 beschrieben, transfiziert und analysiert. Jeder Ansatz wurde doppelt transfiziert und 32 Std p.t. mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder mit DMSO behandelt (Abb. 4.16 A). Die Positiv-Kontrolle (VP30 + DMSO) wurde auf 100% gesetzt und die Luziferase-Aktivität als relative Replikations- und Transkriptionsaktivität in Relation zur Positiv-Kontrolle dargestellt.

Tg führte zu einer verstärkten Replikation und Transkription (Abb. 4.16 B, VP30, anthrazit) im Vergleich zur entsprechenden, DMSO-behandelten Probe (Abb. 4.16 B, VP30, grau). In Abwesenheit von VP30 (Abb. 4.16 B, -VP30) war die Replikations- und Transkriptionsaktivität im Vergleich zur jeweiligen Positiv-Kontrolle (Abb. 4.16 B, VP30) reduziert, unabhängig davon, ob die Proben mit Tg oder DMSO stimuliert wurden. In Abwesenheit der Polymerase L (-L) war erwartungsgemäß weder im Tg- noch im DMSO-stimulierten Ansatz Reporteraktivität nachweisbar.

Die Kontrolle der Expression der viralen Proteine und des zellulären Proteins Tubulin ergab keine Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Proben (Abb. 4.16 C).

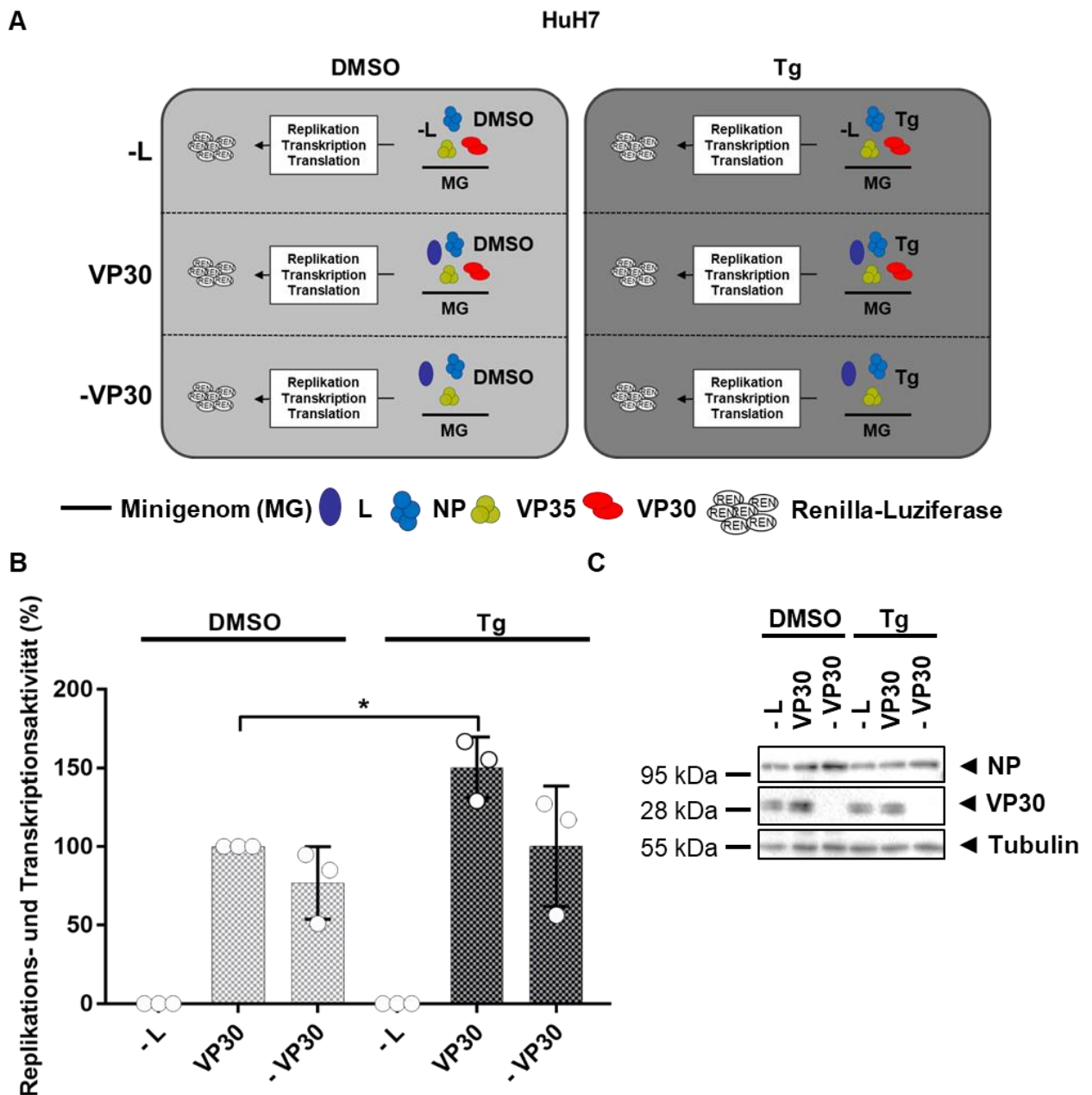


Abb. 4.16: Einfluss von Tg auf die Reporteraktivität im MG-Assay

A: Schematische Darstellung des Versuchs (B). **B:** HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit den entsprechenden MARV Expressionsplasmiden (L, NP, VP35, VP30), dem Minigenom Reporter-Plasmid (Renilla-Luziferase) und pGL4 (Firefly-Luziferase) zur Normalisierung, wie in 3.2.2.7 beschrieben, transfiziert. Alle Proben wurden mit LV auf die gleiche Gesamt-DNA-Menge aufgefüllt. 32 Std p.t. wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder mit DMSO stimuliert. Die Analyse der Reporteraktivität erfolgte 48 Std p.t. Die Werte wurden anhand der Transfektionseffizienz normalisiert. Die Positivkontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, * p-Wert ≤ 0.05). **C:** Die Proben (B) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) analysiert. Färbung: GP: α GP (50-6-10) (Maus, 1:100) und α Maus, HRP, IgG (Ziege, 1:40000); NP: α NP (59-9-10) (Maus, 1:4000) und α Maus, HRP, IgG (Ziege, 1:40000); VP30: α VP30 (11-6-11) (Maus, 1:40000) und α Maus, HRP, IgG (Ziege, 1:40000); Tubulin: α Tubulin (Maus, 1:1000) und α Maus, HRP, IgG (Ziege, 1:40000). Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt (n = 3).

4.4.2 Der Einfluss von Thapsigargin auf den viralen Replikationszyklus im infektiösen Virus-ähnliche Partikel-Assay

In früheren Versuchen führte Tg zu einer Reduktion der Freisetzung von MARV Partikeln (2.7.3)¹⁴², die vermutlich, wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, unabhängig von der Replikation und Transkription von MARV ist (4.4.1). Um zu überprüfen, ob andere Prozesse des viralen Replikationszyklus, wie die Freisetzung oder die Infektiosität von MARV Partikel durch die Stimulation von Zellen mit Tg beeinflusst wird, wurden iVLP-Assays (3.2.2.8) in An- und Abwesenheit von Tg durchgeführt.

Der iVLP-Assay ermöglicht es neben Transkription und Replikation von MARV auch die Freisetzung und Infektiosität von MARV-spezifischen iVLP unter BSL 1 Bedingungen zu untersuchen. Hierfür wurden P0 und P1 HuH7 Zellen, wie in 3.2.2.8 beschrieben, transfiziert, infiziert und analysiert. In der P0 wurde jeder Ansatz doppelt transfiziert und 32 Std p.t. mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder mit DMSO behandelt (Abb. 4.16 A).

Die Zugabe von Tg zu den P0 Zellen führte, wie bereits in Abb. 4.17 B, auch hier zu einer leichten Steigerung der Luziferase-Aktivität. Ohne die virale Polymerase L (-L) war keine Reporteraktivität mehr nachzuweisen. In der P1 führte die Infektion mit den iVLP, die aus dem Überstand der DMSO-stimulierten Zellen stammten, zu einer signifikant erhöhten Transkriptions- und Replikationsaktivität im Vergleich zu den iVLP aus Tg-stimulierten Proben. Die Infektion mit iVLP aus dem Überstand der Zellen der Negativ-Kontrolle (-L) führte zu keiner Reporteraktivität.

Die Expression der viralen Proteine GP, NP (P0, iVLP, P1), VP40 (iVLP), sowie dem zellulären Protein Tubulin (P0, P1) wurde untersucht. In der P0 waren die Tubulin-Mengen in allen Zelllysaten vergleichbar (Abb. 4.17 C, P0). Im Gegensatz dazu war die Expression von NP und GP in den Tg-stimulierten Proben leicht reduziert (Abb. 4.17 C, P0). In den iVLP Proben waren die Proteinmengen von GP, NP und VP40 reduziert im Vergleich zu den Kontrollen (-L, DMSO) (Abb. 4.17 C, iVLP). In den Zelllysaten der P1 waren die Tubulin und NP Proteinmengen in den drei Versuchen vergleichbar (Abb. 4.17 C, P1). Die Quantifizierung der iVLP WB-Daten (Abb. 4.17 C, iVLP) zeigte, dass die Proteinmenge von GP im Verhältnis zur Proteinmenge von VP40 in Tg-stimulierten Proben nicht signifikant reduziert war im Vergleich zu DMSO-stimulierten Proben, was darauf hindeutet, dass die absolute Menge an freigesetzten iVLP reduziert war, der Prozess der Freisetzung jedoch davon nicht betroffen war.

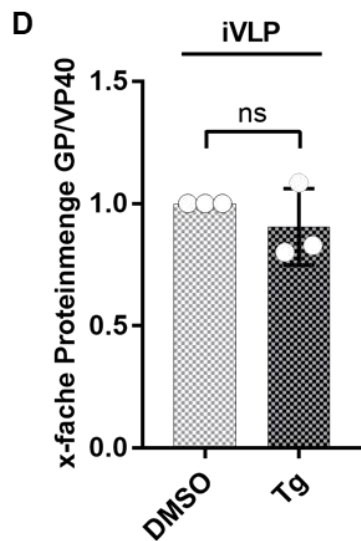
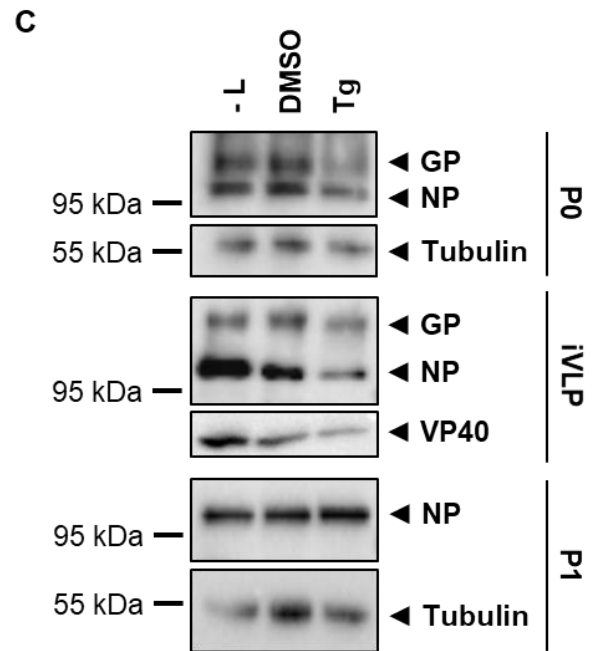
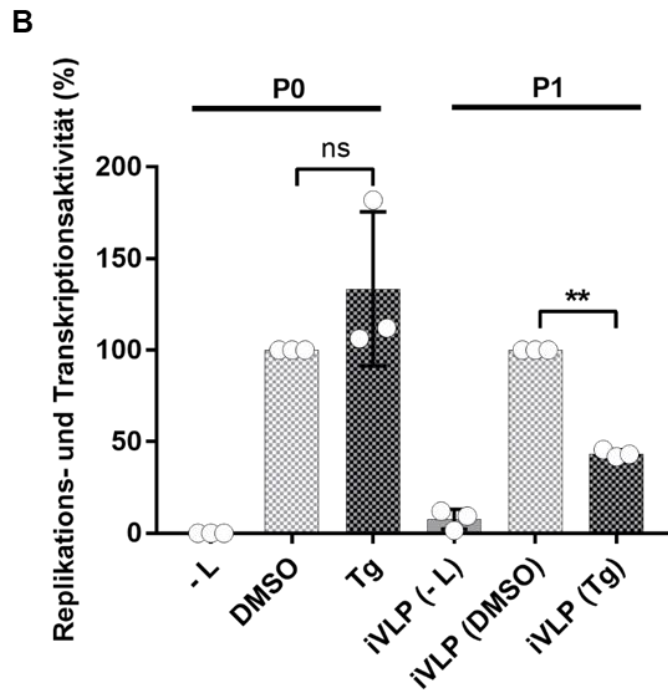
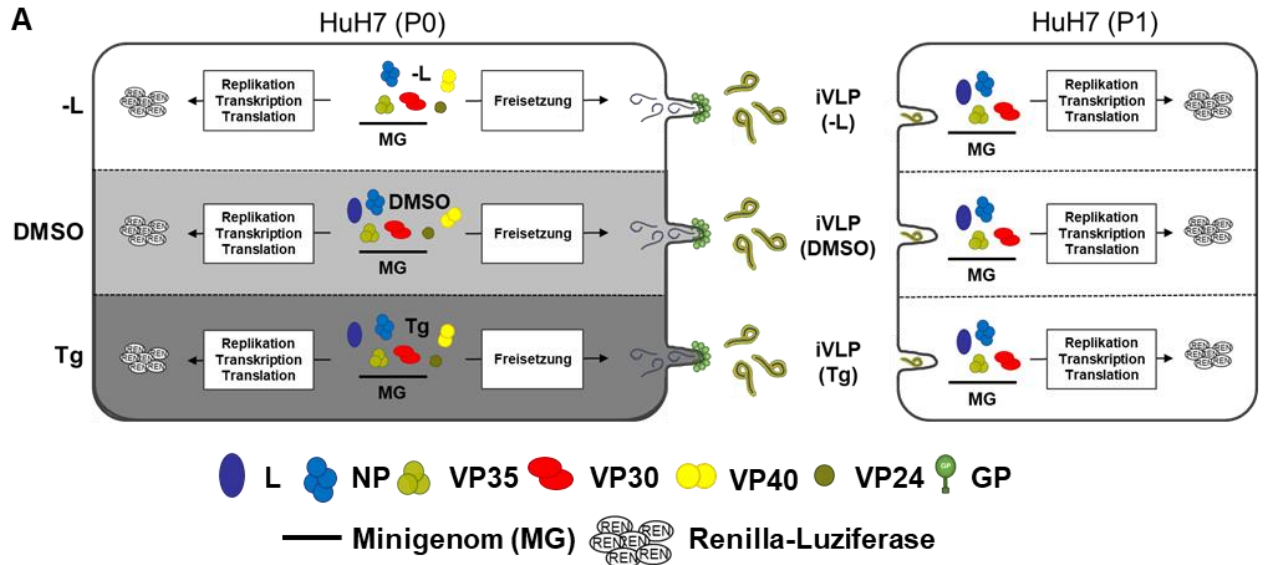


Abb. 4.17: Einfluss von Tg auf die Reporteraktivität im iVLP-Assay

A: Schematische Darstellung des Versuchs (**B**). **B:** P0: HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit den entsprechenden MARV Expressionsplasmiden (L, NP, VP35, VP30, VP24, VP40, GP), dem Minigenom Reporter-Plasmid (Renilla-Luziferase) und pGL4 (Firefly-Luziferase) zur Normalisierung, wie in 3.2.2.8 beschrieben, transfiziert. Die Negativ-Kontrollen (- L) wurden mit $1 \mu\text{g}$ LV, statt dem MARV L Expressionsplasmid transfiziert. 32 Std p.t. wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder mit DMSO behandelt. Die Aufreinigung der iVLP und die Analyse der Reporteraktivität erfolgte 48 Std p.t. Es folgte die Normalisierung der Werte anhand der Transfektionseffizienz. Die Positiv-Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. P1: HuH7 Zellen (2×10^5 Zellen/6-well) wurden mit den entsprechenden MARV Expressionsplasmiden (L, NP, VP35, VP30) und pGL4 (Firefly-Luziferase) zur Normalisierung, wie in 3.2.2.8 beschrieben, transfiziert und 16 Std p.t. mit den aufgereinigten iVLP infiziert. Die Analyse der Reporteraktivität erfolgte 72 Std nach der iVLP Infektion durch Messung der Lysate am Luminometer. Es folgte die Normalisierung der Werte. Und die Positiv-Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt. **C:** Die Zellysate (**B**) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE (3.2.3.1), WB (3.2.3.2) und Antikörperfärbung (3.2.3.3) analysiert. Färbung: αGP (50-6-10) (Maus, 1:100) und αMaus , HRP, IgG (Ziege, 1:40000); NP: αNP (59-9-10) (Maus, 1:4000) und αMaus , HRP, IgG (Ziege, 1:40000); αVP40 (40-2-2) (Maus, 1:4000) und αMaus , HRP, IgG (Ziege, 1:40000); Tubulin: $\alpha\text{Tubulin}$ (Maus, 1:1000) und αMaus , HRP, IgG (Ziege, 1:40000). Ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt ($n = 3$). **D:** Quantifizierung der Proteinexpression aus C (iVLP) von GP im Verhältnis zu VP40. Die Proteinmenge der DMSO-stimulierten Probe wurde jeweils auf 1 gesetzt. Dargestellt ist die x-fache Proteinmenge im Vergleich zur jeweiligen DMSO-stimulierten Probe. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, ns: nicht signifikant, ** p-Wert ≤ 0.01).

4.4.3 Die Analyse der Marburg Virus Replikation in HAP1 (Knock-out) Zellen

Um zu analysieren, ob IRE1 oder XBP1 einen positiven oder negativen Einfluss auf die Replikation und Freisetzung von MARV hat, wurden HAP1, HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen (4.3.6) mit MARV infiziert (3.2.4.2) und der Titer der freigesetzten, infektiösen Viren bestimmt.

Hierfür wurden HAP1, HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen (3.2.2.1), wie in 3.2.4.2 beschrieben, mit MARV (MOI 0.1) infiziert. 24 Std, 48 Std, 72 Std und 144 Std nach der Infektion (p.i.) wurde jeweils ÜS der gleichen Zellen genommen und mittels TCID₅₀ Assay (3.2.4.4) der MARV Titer bestimmt (Abb. 4.18 A). Die Versuche wurden von Dr. Verena Krähling im BSL 4 Labor des Instituts für Virologie, Marburg durchgeführt.

24 Std p.i. war der MARV Titer aus dem Überstand der beiden KO Zelllinien niedriger im Vergleich zur parentalen HAP1 Zelllinie. Im Gegensatz dazu war der MARV Titer 72-144 Std p.i. in den HAP1 XBP1 KO Zellen etwas höher und in den HAP1 IRE1 KO Zellen signifikant höher im Vergleich zur parentalen HAP1 Zelllinie.

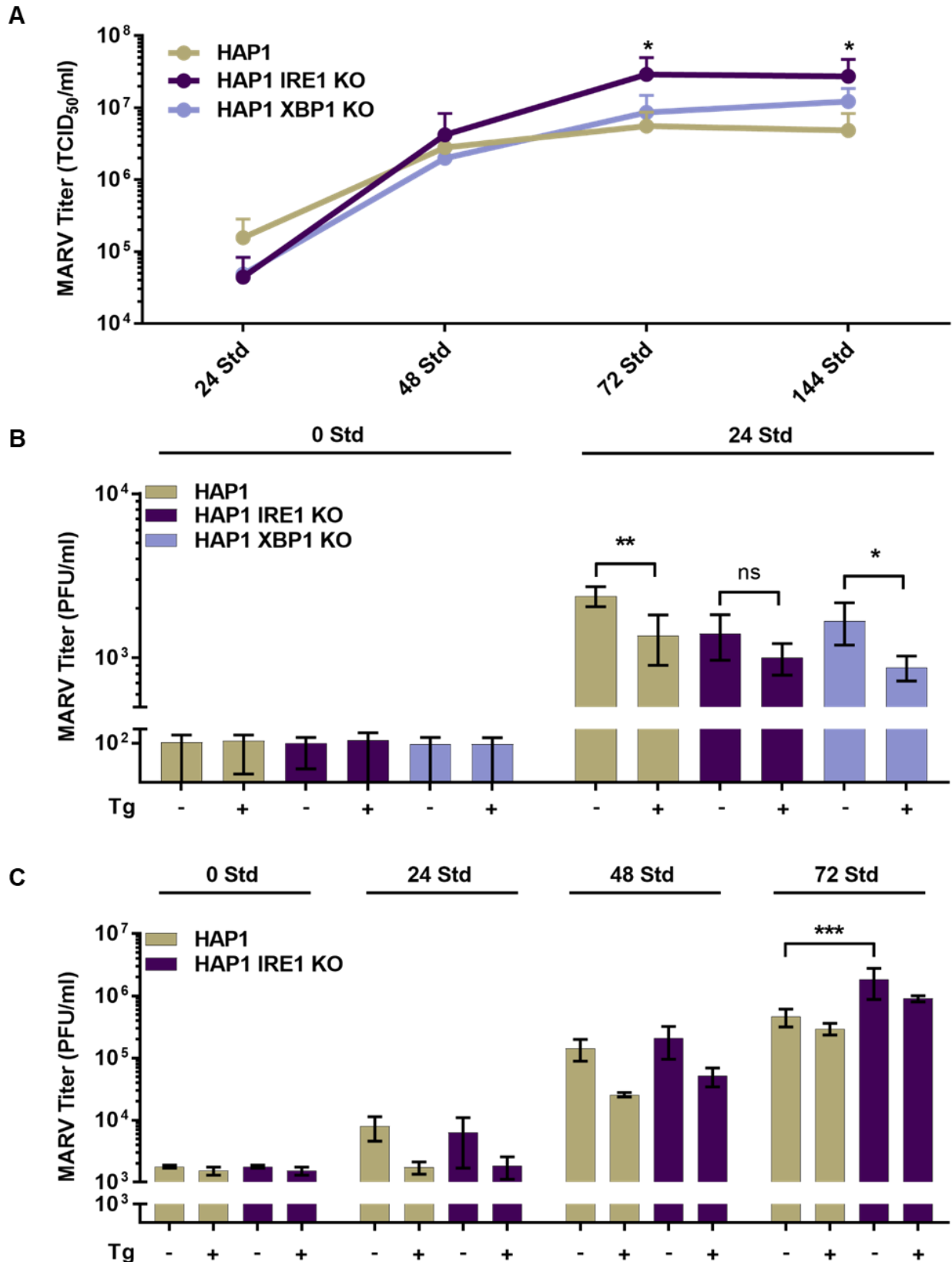


Abb. 4.18: Einfluss von Tg auf die MARV Replikation in HAP1 (KO) Zellen

A: HAP1 (Knock-out, KO) Zellen (6×10^5 Zellen/6-well) wurden mit MARV (MOI 0.1) infiziert (3.2.4.2). 24, 48, 72 und 144 Std p.i. wurde ÜS abgenommen (3.2.4.3) und anschließend der MARV Titer mittels TCID₅₀ Analyse bestimmt (3.2.4.4). Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede in Bezug zur parentalen HAP1 Zelllinie zum gleichen Zeitpunkt sind gezeigt (3.2.5, * p-

Wert ≤ 0.05). B: A: HAP1 (KO) Zellen (6×10^5 Zellen/6-well) wurden mit MARV (MOI 0.1) infiziert (3.2.4.2). 0 Std p.i. wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder mit DMSO stimuliert. 0 Std und 24 Std p.i. wurde ÜS abgenommen (3.2.4.3) und anschließend der MARV Titer mittels Immuno-Plaque Assay bestimmt (3.2.4.5). Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede sind markiert (3.2.5, * p-Wert ≤ 0.05 , ** p-Wert ≤ 0.01 , ns = nicht signifikant). C: HAP1 (KO) Zellen (6×10^5 Zellen/6-well) wurden mit MARV (MOI 0.1) infiziert (3.2.4.2). 24 Std vor der jeweiligen Zellernte und Analyse wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder mit DMSO stimuliert. 0, 24, 48 und 72 Std p.i. wurde ÜS abgenommen (3.2.4.3) und anschließend der MARV Titer mittels Immuno-Plaque Assay bestimmt (3.2.4.5). Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind gezeigt (3.2.5, *** p-Wert ≤ 0.001).

4.4.4 Der Einfluss von Thapsigargin auf Marburg Viren in HAP1 (Knock-out) Zellen

In Vorversuchen führte die Stimulation von MARV-infizierten HuH7 Zellen mit Tg zu einer reduzierten Virus Freisetzung (2.7.3)¹⁴². Weitere Untersuchungen in HuH7 Zellen zeigten jedoch, dass die Stimulation mit Tg einen positiven Einfluss auf die MARV Replikation und Transkription im MG-Assay und in der P0 des iVLP Assays hat (4.4.1-2), bei gleichzeitig verminderter Produktion und Freisetzung von iVLP (4.4.2). Um den Einfluss der Stimulation mit Tg in Abhängigkeit der IRE1-vermittelten ER-Stress-Antwort auf MARV weiter zu charakterisieren, wurden HAP1 parental, HAP1 IRE1 KO oder HAP1 XBP1 KO Zellen mit MARV infiziert (3.2.4.2) und die Anzahl freigesetzter, infektiöser MARV Partikel aus Tg- bzw. DMSO-stimulierten Zellen bestimmt.

Die drei HAP1 Zelllinien wurden mit MARV (MOI 0.1) infiziert (3.2.4.2) und direkt nach der Infektion (0 Std p.i.) mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder mit DMSO stimuliert. 0 Std und 24 Std p.i. wurde jeweils ÜS von der gleichen Probe genommen und der MARV Titer mittels Immuno-Plaque Assay (3.2.4.5) bestimmt (Abb. 4.18 B).

Die Menge der infektiösen MARV Partikel, die direkt nach der Infektion (0 Std p.i.) im Überstand nachgewiesen werden konnten, war bei allen Zelllinien gleich. Ohne Stimulation durch Tg wurden im Überstand der beiden HAP1 KO Zelllinien nach einem Replikationszyklus des MARV (24 Std p.i.) weniger MARV detektiert, als bei den parentalen HAP1 Zellen. Die Tg-Stimulation führte im Vergleich zu der jeweiligen DMSO-stimulierten Probe in allen drei Zelllinien zu einer Reduktion des MARV Titers. Die Unterschiede waren bei HAP1 und HAP1 XBP1 KO Zellen statistisch signifikant (Abb. 4.18 B).

In einem weiteren, unabhängigen Versuch (Abb. 4.18 C) wurden parentale HAP1 und HAP1 IRE1 KO Zellen wie zuvor beschrieben mit MARV infiziert, mit Tg behandelt und über 72 Std analysiert. Hierzu wurde jeder Ansatz vier Mal angesetzt und nach 0 Std, 24 Std, 48 Std und 72 Std p.i. jeweils einer der Ansätze geerntet (3.2.4.3) und der MARV Titer im Überstand der Zellen mittels Immuno-Plaque Assay (3.2.4.5) analysiert. Jeweils 24 Std vor der Zellernte (außer 0 Std) wurden die Proben mit 5 nM Tg (2.7.2.1) oder mit DMSO stimuliert.

Die Anzahl infektiöser MARV Partikel im Überstand aller drei Zelllinien war 0 Std p.i. vergleichbar (Abb. 4.18 C). 24 Std p.i. war der Titer aus DMSO-stimulierten HAP1 IRE1 KO Zellen im Vergleich zu den DMSO-stimulierten HAP1 parental Zellen reduziert (Abb. 4.19 A-B). Nach 72 Std p.i. hingegen war der MARV Titer in den DMSO-stimulierten HAP1 IRE1 KO Zellen signifikant höher als bei den parental HAP1 Zellen. Die Tg-Stimulation führte in beiden Zelllinien zu jedem Zeitpunkt (24 Std, 48 Std, 72 Std) zu einer Reduktion des Titers im Vergleich zu der jeweiligen DMSO-stimulierten Probe. Der Versuch bestätigte nochmals die zuvor erhaltenen Ergebnisse.

4.4.5 Zusammenfassung: Der Einfluss der ER-Stress-Antwort auf den Marburg Virus Replikationszyklus

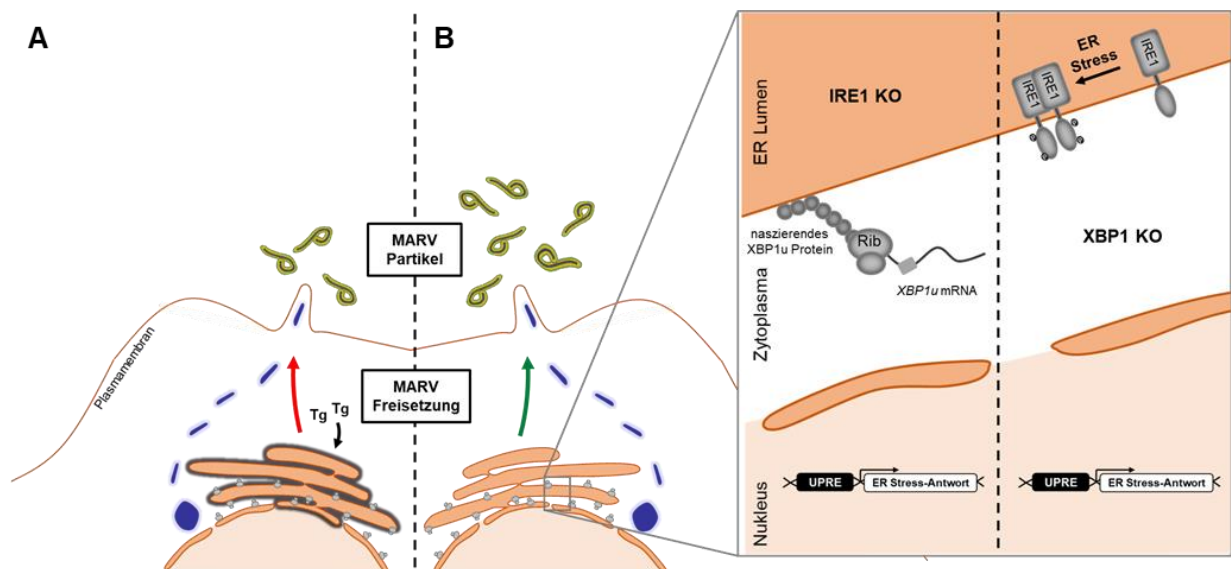


Abb. Z.3: Die MARV Freisetzung in Abhängigkeit der ER Homöostase

A: Tg reduziert die MARV Freisetzung unabhängig von der ER-Stress-Antwort. **B:** Infizierte IRE1 KO- oder XBP1 KO Zellen, in denen die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort unterbunden ist, zeigen eine verstärkte MARV Freisetzung.

Der Einfluss von Tg auf den MARV Replikationszyklus, sowie die Relevanz der MARV-vermittelten Regulation der IRE1 Signalkaskade konnte weiter charakterisiert werden. Tg führte in HAP1, HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen, unabhängig von der IRE1 Signalkaskade, zu einer reduzierten MARV Freisetzung (Abb. 4. 18 B und 4.18 C), wie dies bereits in HuH7 Zellen gezeigt wurde (2.7.3)¹⁴². Interessanterweise konnte in Abb. 4.16 B und Abb. 4.17 B (P0) gezeigt werden, dass Tg die Transkription und Replikation von MARV verstärkt. Im Gegensatz dazu wurden, gemessen an den Proteinmengen der iVLP (Abb. 4.17 C), nach einer Tg-Stimulation weniger Partikel freigesetzt, was eine reduzierte Infektiosität zur Folge hatte (Abb. 4.17 B, P1). Dabei war das Verhältnis von GP zu VP40, welches maßgeblich

für den Freisetzungsprozess verantwortlich ist^{37-39,168,169}, vergleichbar (Abb. 4.17 D). Unabhängig von Tg war die MARV Freisetzung in HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen, im Vergleich zu HAP1 Zellen, 24 Std p.i. reduziert (Abb. 4.18) und 72-144 Std p.i. verstärkt (Abb. 4.18 A und 4.18 C).

5. Diskussion

Die Infektion mit dem MARV verursacht im Menschen ein schweres Fieber, das mit einer Letalitätsrate von bis zu 90% einhergeht^{60,155,128,193,165,88,129,2,178,163}. Auf Grund der hohen Letalitätsrate und fehlender, zugelassener Therapeutika oder Impfstoffe¹³⁸ wird das MARV in die höchste biologische Sicherheitsstufe 4 eingestuft. Experimente mit dem MARV müssen dementsprechend in BSL 4-Laboren durchgeführt werden. Für neue Therapieansätze ist die genaue Charakterisierung des viralen Replikationszyklus und der Interaktionen von Virus und Wirt essentiell. Bislang sind jedoch nicht alle Aspekte einer MARV Infektion verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Erkenntnisse zur Regulation der ER-Stress-Antwort durch die MARV Proteine GP und VP30 gewonnen.

5.1 Der Einfluss der ER-Stress-Aktivatoren Thapsigargin und Tunicamycin in HuH7 und HAP1 Zelllinien

Mit Hilfe des in Wang *et al.*, 2000¹⁷⁷ beschriebenen UPRE-Assays kann die Aktivierung des UPRE-Promotors untersucht werden. Um den Einfluss der ER-Stress-Aktivatoren Tg^{161,172,149} und Tu^{45,31} auf die ER-Stress-Antwort in HuH7, HAP1, HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen zu charakterisieren, wurde die Menge der Substanzen im UPRE-Assay titriert. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (DMSO), dass die Zugabe von Tg (0,5-500 nM) und Tu (50-1000 nM) zu einer Dosis-abhängigen Aktivierung des UPRE-Promotors in HuH7 und HAP1 Zellen führte (Abb. 4.1 A, Abb. 4.14). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen anderer Studien. So konnte z.B. auch für HeLa Zellen (humane Zervix-Karzinom Zelllinie) gezeigt werden, dass eine zwölfstündige Tu-Stimulation zu einer Aktivierung des UPRE-Promotors führt¹⁷⁷. Im Gegensatz zu wildtypischen HAP1 Zellen konnte in HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen bei keiner der getesteten Konzentrationen eine Aktivität gemessen werden (Abb. 4.14). Das zeigt, dass in diesem Zellsystem maßgeblich die IRE1 Signalkaskade für die Induktion des UPRE-Promotors verantwortlich ist. Auch in anderen Studien konnte keine Aktivierung des UPRE-Promotors in IRE1 KO Zellen nachgewiesen werden¹⁸⁵. Neben dem Transkriptionsfaktor XBP1s kann auch ATF6 den UPRE-Promotor binden^{160,177}. Es ist gezeigt, dass ATF6 und XBP1s als Heterodimer an den Promotor UPRE binden, was zu einer verstärkten Aktivität des Promotors führt¹⁵⁴. Da XBP1s in den HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zelllinien jedoch nicht exprimiert wird, reicht die ATF6-abhängige Aktivierung des Promotors anscheinend im UPRE-Assay nicht aus.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Tg-Stimulation auch in HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen zu einer Aktivierung der IRE1-abhängigen ER-Stress-

Antwort führen kann, sofern die Signalkaskade durch die rekombinante Expression von IRE1 oder XBP1 komplementiert wird. Ektopisch exprimiertes IRE1 konnte die IRE1 Signalkaskade in den HAP1 IRE1 KO Zellen, jedoch nicht in den HAP1 XBP1 KO Zellen, komplementieren (Abb. 4.15 B). Ohne die rekombinante Expression von IRE1 kann die *XBP1u* mRNA nicht gespleißt werden, sodass nur XBP1u, jedoch nicht XBP1s translatiert und die IRE1-abhängige Signalkaskade unterbrochen wird. Die rekombinante Expression von XBP1 konnte hingegen die IRE1 Signalkaskade in den HAP1 XBP1 KO Zellen, jedoch nicht in den HAP1 IRE1 KO Zellen, komplementieren (Abb. 4.15 D). Ohne IRE1 kann auch die ektopisch exprimierte *XBP1u* mRNA nicht gespleißt werden, wodurch die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort unterbunden wird. Die rekombinante Expression von IRE1 oder XBP1 führte in allen HAP1 Zelllinien zu einem erhöhten Grundlevel der ER-Stress-Antwort, sofern die Signalkaskade vollständig war. Möglicherweise führt hierbei die Überexpression des ER-residenten IRE1 selbst zu ER-Stress. Die ER-Stress-Antwort konnte dennoch durch eine zusätzliche Stimulation mit Tg noch gesteigert werden (Abb. 4.15 B und Abb. 4.15 D). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bereits eine enge räumliche Nähe von zwei IRE1 Proteinen ausreicht, um die IRE1 Dimer-abhängige Endoribonukleasaktivität BiP-unabhängig zu induzieren⁶⁶. Zusätzlich führt die verstärkte Expression von IRE1 oder XBP1 auch zu einer so deutlichen Verstärkung der ER-Stress-Antwort in Zellen, in denen spontan, ohne äußeren Einfluss, die ER-Stress-Antwort induziert wird, sodass sich dies im UPRE-Assay widerspiegelt. Dass die rekombinante Expression von IRE1 zu einem erhöhten Grundlevel der ER-Stress-Aktivität führt, wurde auch schon in anderen Arbeiten beschrieben¹⁷⁷. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse, dass die beiden HAP1 KO Zelllinien IRE1- bzw. XBP1-defizient sind.

Um den Einfluss von 5 nM Tg und 300 nM Tu auf die Zellviabilität von HuH7 Zellen zu testen, wurden diese Konzentrationen in einem Zellproliferations-Assay untersucht. Im Vergleich zu DMSO-stimulierten Zellen proliferierten nach Tg-Stimulation durchschnittlich nur noch 80-89% der Zellen, nach Tu-Stimulation durchschnittlich nur noch 68-69% der Zellen (Abb. 4.1 B). Dies zeigt, dass die Tg- oder Tu-Stimulation zu einer starken ER-Stress-Antwort führt, die die ER Homöostase stört und zur Apoptose der Zelle führen kann. Dies konnte für Tg¹⁴⁹ und Tu¹⁸⁹ auch schon in anderen Studien beschrieben werden und verdeutlicht, dass Tg und Tu vermutlich auch die terminale ER-Stress-Antwort induzieren.

5.2 Das Marburg Virus GP aktiviert die IRE1-abhängige Stress-Antwort

5.2.1 Das Marburg Virus GP führt zu einer Aktivierung von IRE1, XBP1s und UPRE

Bereits in Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die solitäre Expression des wildtypischen GP zu einer ATF6-unabhängigen Aktivierung des ER-Stress-responsiven UPRE-Promotors

führt. Im Gegensatz dazu führte die Expression von NP und VP35 zu keiner Aktivierung¹⁴². Da neben ER-residenten Proteinen auch zytosolische Proteine, wie MARV VP24¹⁴² oder das zelluläre *carboxyl terminus of HSC70-interacting protein* (CHIP)¹⁹⁶ die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort beeinflussen können, sollte sichergestellt werden, dass die Ergebnisse der verschiedenen viralen Proteine nicht auf unterschiedlich starke Expressionslevel der solitär exprimierten GP, NP oder VP35 Proteine zurückzuführen ist. Dafür wurden diese mit einer zusätzlichen HA-Epitop-Markierung exprimiert. Dies ermöglichte es, die Protein-Expression mittels In-Gel Western, ohne WB Transfer, zwischen GP-HA, HA-NP und HA-VP35 zu vergleichen, da die Detektion mit dem gleichen Antikörper erfolgen kann. Parallel dazu wurde die Expression der wildtypischen MARV Proteine mit der jeweiligen HA-Epitop-markierten Varianten mittels WB verglichen. Hier zeigte sich, dass die Proteinmengen der wildtypischen Proteine vergleichbar zu den Mengen der jeweiligen HA-Epitop-markierten Proteine war (Abb. 4.2 C). Im In-Gel Western zeigte sich, dass HA-NP und HA-VP35 stärker exprimiert wurden als GP-HA (Abb. 4.2 C). Dies verdeutlicht, dass die Aktivierung der ER-Stress-Antwort nicht ausschließlich durch die Proteinmenge induziert wird, die die Wirtszelle generieren muss. Folglich wurden NP oder VP35 als Negativ-Kontrolle genutzt.

Bisher war für MARV GP nicht bekannt, ob dessen solitäre Expression neben dem UPRE-Promotor auch die vorgeschalteten Proteine der IRE1-abhängigen Signalkaskade (Abb. 2.5), aktivieren kann¹⁴². In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von GP zu einer Aktivierung des ER-residenten Transmembranproteins IRE1 (Abb. 4.7) und zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors XBP1s führt. Für XBP1s konnte dies auf Einzelzellebene (Abb. 4.6) als auch für die Gesamtheit der im Versuch befindlichen Zellen gezeigt werden (Abb. 4.5). Diese Ergebnisse bestätigen die bisherigen Daten¹⁴². Ein Grund für die IRE1 Aktivierung könnte sein, dass GP sehr lange im ER akkumuliert bevor es an die Plasmamembran transportiert wird¹⁰. Dass die Expression viraler Glykoproteine das ER überlasten und in der Folge die ER-Stress-Antwort aktivieren kann, konnte u.a. auch bereits für das Tollwut Virus¹³, das Varicella-zoster Virus²⁶ und das Canine Distemper Virus²² gezeigt werden. Die Aktivierung der ER-Stress-Antwort verstärkt die Varicella-zoster Virus Replikation, indem es zur Erweiterung der ER Kapazitäten führt, was vermutlich zu einer optimierten Glykoprotein Expression beiträgt²⁶. Die Canine Distemper Virus-induzierte ER-Stress-Antwort führt vermutlich während der Infektion zur vermehrten Apoptose von Neuronen, was eine Erklärung für neurologische Schäden des Zentralen-Nervensystem sein könnte²². Insgesamt verdeutlicht dies, wie komplex die Folgen einer Virus-induzierten ER-Stress-Antwort sein können. Die ER-Stress-Antwort kann sowohl pro- als auch antiviral wirken, da die Erhöhung der Faltungsfaktorenkonzentration durch den ER-Stress die Transportkapazität des ER für virale Proteine zwar erhöht¹⁷⁴, die schließlich ausgelöste terminale Apoptose die Virusvermehrung aber eindämmt^{174,153,145}.

5.2.2 Die Aktivierung der ER-Stress-Antwort durch das Marburg Virus GP auf Grund posttranslationaler Modifikationen

Das wildtypische GP akkumuliert im ER bevor es an die Plasmamembran transportiert wird¹⁰. Ein Grund hierfür sind die zahlreichen posttranslationalen Modifikationen des GP^{63,50,59,144}. Es ist daher naheliegend, dass die posttranslationalen Modifikationen und die damit verbundene Akkumulation des GP im ER dessen Kapazitäten überlasten und somit die zelluläre ER-Stress-Antwort aktiviert wird. Die meisten der N- und O-Glykosylierungsstellen von GP befinden sich innerhalb der MLD (Abb. 2.4), wobei die N-Glykosylierungen im ER stattfinden¹⁴⁸. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass GP_{dMLD}, welches keine MLD besitzt, verglichen mit wildtypischen GP, trotz stärkerer Expression zu einer reduzierten ER-Stress-Antwort führt¹⁴². Um weiter zu charakterisieren, ob bei vergleichbaren Proteinmengen von GP und GP_{dMLD} eine Aktivierung der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort stattfindet, wurde die Menge des GP_{dMLD} titriert. Bei vergleichbaren Expressionsmengen von GP_{dMLD} und GP (Abb. 4.3 B und Abb. 4.3 C), aktivierte GP_{dMLD} den ER-Stress-responsiven UPRE-Promotor (Abb. 4.3 A) und den Transkriptionsfaktor XBP1s nicht mehr (Abb. 4.5 und Abb. 4.6). Dies legt nahe, dass spezifisch die Aminosäuresequenz der MLD mit den beinhalteten N-Glykosylierungsstellen zu einer Überlastung des ER beiträgt. Für die Aktivierung der ER-Stress-Antwort sind jedoch vermutlich nicht ausschließlich die posttranslationalen Modifikationen innerhalb der MLD verantwortlich, was die Vorversuche mit einer größeren Plasmidmenge von GP_{dMLD} verdeutlichen. Hier führte die gesteigerte Expression von GP_{dMLD} auch zu ER-Stress, wobei die Proteinmenge deutlich stärker war im Vergleich zur GP Proteinmenge¹⁴². Die zusätzliche Belastung des ER durch die ektopische Expression von Glykoproteinen, wie das MARV GP, führt vermutlich ab einem gewissen Punkt immer zu einer Überlastung und ER-Stress. Dieser Punkt wird bei GP_{dMLD} scheinbar erst später erreicht, da es möglicherweise effektiver aus dem ER transportiert werden kann, wodurch dieses entlastet wird. Die in der MLD befindlichen Glykosylierungsstellen scheinen dabei keinen negativen Effekt auf den GP Transport zu haben, da GP_{dMLD} weiter an die Plasmamembran transportiert wird (Abb. 4.3 C) und während einer MARV Infektion *in vitro* nicht essenziell für die MARV_{dMLD} Freisetzung ist¹²¹. Im Gegensatz dazu konnte für das Influenza Glykoprotein Hämagglutinin¹⁴⁰ und das VSV Glykoprotein G⁴⁰ gezeigt werden, dass fehlende, konservierte N-Glykosylierungsstellen zu einem schlechteren Transport und einer fehlerhaften Faltung des jeweiligen Glykoproteins führten. Für EBOV GP konnte bereits gezeigt werden, dass N-Glykosylierungsstellen in GP₂, jedoch nicht in GP₁ eine Rolle für den GP Transport spielen^{107,175}, was die Daten aus dieser Arbeit bestätigt. Die genaue Funktion der MLD ist noch nicht vollständig geklärt. Sie übernimmt vermutlich Funktionen der Immun-Evasion, indem sie essenzielle Domänen des MARV GP maskiert^{54,68}.

5.3 Die Marburg Virus VP30 Expression reduziert die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort

Die durch MARV GP aktivierte IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort¹⁴² führt zur Regulation verschiedener Gene und Proteine, die die Homöostase des ER wiederherstellen¹⁷⁴. Darüber hinaus wird XBP1s-vermittelt auch die MHC-I-abhängige Antigenpräsentation reguliert⁷⁵. Lässt sich die Homöostase im ER nicht wiederherstellen, so führt die langanhaltende oder starke IRE1-Aktivierung zur Apoptose der Zelle^{174,153,145}. Das multifunktionale MARV Protein VP30 ist in der Lage die GP-induzierte ER-Stress-Antwort zu reduzieren¹⁴². Damit würde MARV auf der einen Seite die Vorteile der ER-Stress Antwort, die initiale, vermehrte Bildung von Faltungskatalysatoren im ER ausnutzen¹⁷⁴ und gleichzeitig die antiviralen Folgen der ER-Stress Antwort durch VP30 verringern^{174,153,145}. Auch für andere Viren konnte bereits gezeigt werden, dass sie die IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort zu ihrem Vorteil regulieren (2.7.4). Für SARS ist bekannt, dass das Hüllprotein E, ähnlich wie MARV VP30, in der Lage ist die induzierte ER-Stress-Antwort zu reduzieren. Der genaue Mechanismus, wie E die ER-Stress-Antwort reguliert ist, wie bei VP30 noch nicht geklärt³³. Eine Infektion von Zellen mit CHIKV führt zu keiner Aktivierung der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort, wohingegen die Überexpression der Hüllproteine von CHIKV die ER-Stress-Antwort aktiviert. Hierfür ist das CHIKV Protein nsP2 verantwortlich, welches die zelluläre Translation blockiert und somit indirekt die ER-Stress-Antwort unterbinden kann. Im Gegensatz zu nsP2 ist für VP30 bisher kein Effekt auf die Wirtszell-Translation beschrieben⁵⁸. Das HSV-1 degradiert durch die Ribonukleaseaktivität des viralen Proteins UL41 die *XBP1* mRNA und wirkt somit einer Aktivierung der ER-Stress-Antwort entgegen. Im Gegensatz zu UL41, besitzt VP30 jedoch keine Ribonukleaseaktivität¹⁹⁴. Für das HCMV Protein UL50 und das homologe MCMV Protein M50 konnte gezeigt werden, dass sie IRE1 degradieren und somit ein Spleißen der *XBP1u* mRNA unterbinden¹⁵⁶. VP30 liegt im Zytosol der Wirtszelle vor und könnte möglicherweise hier mit IRE1 interagieren. All diese Beispiele verdeutlichen, dass Viren die ER-Stress-Antwort modulieren, so wie in dieser Arbeit auch für MARV VP30 gezeigt. Im Gegensatz zu den viralen Proteinen HSV-1 UL41, HCMV UL50 und MCMV M50, ist für MARV VP30 bisher noch nicht vollständig geklärt wo es in die IRE1 Signalkaskade eingreift und diese reguliert (Abb. 2.6).

5.3.1 Das Marburg Virus VP30 reguliert die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort

VP30 ist in der Lage, neben der GP-abhängigen ER-Stress-Antwort, auch die Tg- und Tu-abhängige ER-Stress-Antwort zu reduzieren¹⁴². Um weiter zu charakterisieren, ob VP30 spezifisch die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort reguliert, wurde die VP30-vermittelte Regulation der ER-Stress-Antwort in Zellen untersucht, die entweder das IRE1 - (HAP1 IRE1

KO Zellen) oder das XBP1 Gen (HAP1 XBP1 KO Zellen) nicht mehr exprimieren. VP30 konnte die Tg-induzierte ER-Stress-Antwort in den parentalen HAP1 Zellen reduzieren (Abb. 4.15). In den HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zelllinien war das jeweils nur möglich, sofern die Signalkaskade in den KO Zelllinien durch die rekombinante Expression von IRE1 bzw. XBP1 komplettiert wurde (Abb. 4.15 B und Abb. 4.15 D). Dies verdeutlicht, dass VP30 die ER-Stress-Antwort IRE1-abhängig regulieren kann. Eine VP30-abhängige Regulation der ATF6-abhängigen ER-Stress-Antwort^{71,160,185,184} kann hier nicht ausgeschlossen werden, da ATF6 alleine zu keiner ausreichenden Aktivierung des UPRE-Promotors führt¹⁹⁰. Der Grund hierfür ist, dass ATF6 als Heterodimer mit XBP1s an UPRE bindet, was die Aktivierung des UPRE-Promotors im Vergleich zur alleinigen Aktivierung durch XBP1s¹⁸⁴ verstärkt. XBP1s wird jedoch in den HAP1 IRE1 KO Zellen nicht exprimiert, da ohne IRE1 die *XBP1u* mRNA nicht gespleißt werden kann, wodurch XBP1s nicht translatiert wird. Auch in den HAP1 XBP1 KO Zelllinien wird XBP1s nicht exprimiert.

5.3.2 Die RNA-abhängige Interaktion des Marburg Virus VP30 mit dem XBP1u Protein

Bislang war unklar, wie VP30 die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort reguliert (Abb. 2.6)¹⁴². In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass VP30 mit dem zellulären Protein XBP1u, nicht jedoch mit XBP1s interagiert (Abb. 4.9). Weiter konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion RNA-abhängig ist (Abb. 4.10). Als Kontrolle für die RNA-abhängige VP30/XBP1u Interaktion wurde die Interaktion von VP30 mit sich selbst analysiert (Abb. 4.10). Für EBOV VP30 konnte bereits gezeigt werden, dass diese Interaktion RNA-unabhängig ist¹⁹. Das konnte in dieser Arbeit auch für MARV VP30 bestätigt werden. Dies verdeutlicht, dass VP30 neben RBBP6⁷ mit weiteren zellulären Proteinen interagiert, was dessen Multifunktionalität unterstreicht. Vermutlich reguliert VP30 über die Interaktion mit dem XBP1u Protein die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort. Für das XBP1u Protein ist bekannt, dass es während seiner Synthese am Ribosom die eigene mRNA an das ER rekrutiert^{186,152,187,85,134,157}. Das lässt die Vermutung zu, dass VP30 über die *XBP1u* mRNA mit dem *XBP1u* mRNA/XBP1u Protein Komplex interagiert. Denkbar wäre, dass der Komplex durch die Bindung von VP30 maskiert oder relokalisiert wird, sodass die *XBP1u* mRNA nicht mehr durch IRE1 gespleißt werden kann, was dann zu einer Reduktion der ER-Stress-Antwort führen würde. Diese Thesen müssen in weiteren Versuchen überprüft werden.

Für die Bindung viraler RNA durch das EBOV VP30 sind bereits einige Motive wie das Zink-Finger-Motiv, das Poly-Serin-Motiv und das Poly-Leucin-Motiv näher charakterisiert worden¹⁹. Diese Motive sind innerhalb der filoviralen VP30 Proteine (MARV, EBOV, RESTV) hoch konserviert. Für das MARV VP30 Poly-Serin-Motiv¹⁶², das Zink-Finger-Motiv⁴⁷ und das Poly-Leucin-Motiv⁶⁷ ist bekannt, dass sie ähnliche Funktionen wie die entsprechenden Motive

innerhalb des EBOV VP30 haben. Jedoch konnte bislang keine direkte Bindung an RNA gezeigt werden, wie für das EBOV VP30¹⁹. Darüber hinaus besitzen die filoviralen VP30 (MARV, EBOV, RESTV) ein konserviertes Poly-Prolin-Motiv. Poly-Prolin-Motive können Protein/Protein Interaktionen vermitteln^{135,32}, dies konnte bislang jedoch noch nicht für die filoviralen VP30 Proteine bestätigt werden.

Um zu überprüfen, ob die EBOV VP30 Motive, die essenziell für die RNA Interaktion sind¹⁹, auch im MARV VP30 eine Rolle bezüglich der Regulation der ER-Stress-Antwort spielen, wurden diese Motive mutiert (Abb. 4.11, HA-VP30 C92S H96L, HA-VP30 4LA, HA-VP30 DD, HA-VP30 AA). Zusätzlich wurde das bisher nicht weiter charakterisierte, konservierte Poly-Prolin-Motiv im MARV VP30 mutiert (Abb. 4.11, HA-VP30 4PA).

Zunächst wurden die MARV VP30 Mutanten im MG-Assay charakterisiert und überprüft, ob sie den erwarteten Phänotyp hinsichtlich Transkription und Replikation zeigen^{162,47,67}. Hierbei ist zunächst festzuhalten, dass bereits die Verwendung einer HA-Markierung des VP30 Proteins zu einer reduzierten RT-Aktivität in diesem Assay, verglichen mit dem wildtypischen Protein, führte. Die HA-Markierung war allerdings notwendig, da nicht alle Mutanten mit dem vorhandenen monoklonalen Antikörper gegen das VP30 Protein nachweisbar waren. Daher wird im Folgenden die Aktivität der einzelnen Mutanten mit der des HA-VP30 verglichen. In MG-Assay wurde bestätigt, dass die Expression von HA-VP30 C92S, H96L oder HA-VP30 4LA zu einer reduzierten Reporteraktivität und somit einer reduzierten Transkription und Replikation führten. Auch HA-VP30 4PA führte zu einer signifikant reduzierten Aktivität im MG-Assay (Abb. 4.12 A). Dies lässt sich möglicherweise auf eine veränderte Sekundärstruktur zurückführen, da Poly-Prolin Motive oft maßgeblich zur Proteinstruktur beitragen^{135,32}. HA-VP30 DD führte zu einer vergleichbaren Aktivität wie HA-VP30, wohingegen HA-VP30 AA die Reporteraktivität steigerte (Abb. 4.12 A). Dies entspricht bereits publizierten Daten¹⁶². Die Kontrolle der Proteinexpression im WB zeigte jedoch, dass die VP30 Mutanten sich in ihrer Expression deutlich von HA-VP30 unterschieden (Abb. 4.12 B). Um eine eindeutige Aussage zu treffen, müsste eine stabile Expression der MARV VP30 Mutanten gewährleistet werden.

Dennoch wurden, um einen ersten Eindruck bezüglich des Einflusses der HA-VP30 Mutanten auf die GP-induzierte, IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort zu erhalten, diese im UPRE-Assay in der Koexpression mit MARV GP untersucht (Abb. 4.11 C). Hier zeigte sich, dass erstaunlicherweise alle Mutanten (HA-VP30 C92S H96L, HA-VP30 4LA, HA-VP30 DD, HA-VP30 AA) in der Lage waren, die GP-induzierte ER-Stress-Antwort zu reduzieren. Das lässt vermuten, dass die RNA-abhängige HA-VP30/XBP1u Interaktion unabhängig von den bekannten VP30 Motiven stattfindet, die die Bindung mit der MARV RNA vermitteln. Durch die schwache Expression der VP30 Mutanten (Abb. 4.12 B) waren Interaktionsstudien mit XBP1u

nicht möglich. Um diese Versuche durchzuführen, müsste eine stabile Expression der MARV VP30 Mutanten gewährleistet werden.

5.3.3 Der Einfluss anderer Marburg Virus Proteine auf die Regulation der ER-Stress-Antwort

Um zu überprüfen, ob neben VP30 weitere MARV Proteine an der Regulation der GP-abhängigen ER-Stress-Antwort beteiligt sind, wurden Koexpressionsstudien von GP und VP30 mit VP24, VP35, VP40 oder NP im UPRE-Assay durchgeführt. Hier zeigte sich, dass VP35 und VP40 keinen zusätzlichen Effekt auf die VP30-vermittelte IRE1-Regulation besitzen (Abb. 4.8). Für VP40 ist bekannt, dass es GP intrazellulär relokalisieren kann⁹⁹, was möglicherweise zu einer geringeren Belastung des ER führen könnte. Allerdings hatte die zusätzliche VP40 Expression keinen Einfluss auf die GP-induzierte ER-Stress-Antwort. Das multifunktionale VP35 ist wichtig für die Immun-Evasion von MARV, da es eine Aktivierung von RIG-I, MDA5 oder PKR verhindert^{137,44,188,79}. VP35 zeigte jedoch keinen zusätzlichen Einfluss auf die VP30-abhängige ER-Stress-Regulation. Dies zeigt, dass die Regulation der ER-Stress-Antwort unabhängig von den bekannten VP35-vermittelten Regulationen stattfindet. Die zusätzliche Expression von VP24, welches auch die ER-Stress-Antwort induzieren kann¹⁴², führte zu einer Steigerung der UPRE-Reporter Aktivität (Abb. 4.8). VP30 ist nicht in der Lage, neben der GP-induzierten auch die VP24-abhängige ER-Stress-Antwort zu reduzieren. Für VP24 ist bekannt, dass es die Oxidative-Stress-Antwort induziert^{43,42,83,133,132}, was möglicherweise auch zu einer Aktivierung der ER-Stress-Antwort führen könnte¹⁰⁵. Auch die Koexpression von NP führt dazu, dass die ER-Stress-Antwort durch VP30 nicht mehr effektiv reduziert werden kann. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass VP30 in NP-induzierte Einschlusskörper rekrutiert wird^{162,122} und somit nicht mehr effektiv mit dem *XBP1u* mRNA/XBP1u Protein Komplex interagieren kann. Dies legt die Vermutung nahe, dass die VP30/XBP1u Interaktion außerhalb der NP Einschlusskörper stattfindet und NP und XBP1u bezüglich der Interaktion mit VP30 in Konkurrenz stehen, so wie dies für die Interaktion von VP30 mit RBBP6 postuliert wird⁷. Dementsprechend würde die Expression anderer MARV Proteine, die mit NP interagieren (L, VP35, VP24, VP40), die Bindung von VP30 mit NP reduzieren und somit den regulatorischen Effekt von VP30 trotz der Anwesenheit von NP ermöglichen. Dass weitere MARV Proteine den VP30-vermittelten Effekt auf die Regulation der GP-induzierten ER-Stress-Antwort beeinflussen, lassen Daten aus Vorarbeiten vermuten¹⁴². Zellen, die mit allen MARV Expressionsplasmiden transfiziert wurden, zeigten, wie auch MARV-infizierte Zellen, keine Aktivierung des UPRE-Promotors¹⁴². Möglicherweise ist für diese Regulation das Zusammenspiel von mindestens vier MARV Proteinen notwendig. Dies muss in weiteren Versuchen charakterisiert werden.

5.4 Der Einfluss der ER-Stress-Antwort auf den Marburg Virus Replikationszyklus

5.4.1 Die Freisetzung von Marburg Virus in Abwesenheit von IRE1 oder XBP1

In HAP1 IRE1 KO Zellen wird das IRE1 Protein und in den HAP1 XBP1 KO Zellen die Proteine XBP1u und XBP1s nicht exprimiert. Dies hat zur Folge, dass in beiden Zelllinien die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort nicht funktionell ist. Dieser Phänotyp konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Um zu überprüfen, ob sich die Freisetzung von MARV verändert, wenn die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort unterbrochen ist, wurden die parentalen HAP1, sowie die HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen infiziert und analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die MARV Freisetzung aus den beiden KO Zelllinien nach 24 Std p.i. reduziert, aber nach 72-144 Std verbessert war verglichen zu den parentalen HAP1 Zellen (Abb. 4.18). Daher wird vermutet, dass die ER-Stress-Antwort zunächst einen positiven und im weiteren Verlauf der Infektion dann einen negativen Einfluss auf den viralen Replikationszyklus hat. Möglicherweise ist eine leichte Aktivierung der ER-Stress-Antwort ein Vorteil für die virale Replikation, da hier insbesondere Proteine reguliert werden, die die ER Kapazitäten verbessern^{1,106,185}. Zu einem späteren Zeitpunkt während der MARV Replikation ist die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort restriktiv für die MARV Freisetzung, was die verbesserte Freisetzung in den HAP1 IRE1 KO oder HAP1 XBP1 KO Zelllinien verdeutlicht. Vermutlich kann MARV die GP-abhängige ER-Stress-Antwort des ER zu diesen Zeitpunkten nicht vollständig regulieren, wie dies in den KO Zelllinien der Fall ist. Dass dieser Effekt abhängig von anderen Signalkaskaden ist, die durch IRE1 initiiert werden können⁷⁵, ist unwahrscheinlich, da der Virus Titer in den HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen höher ist. Das verdeutlicht, dass eine enge Regulation der ER-Stress-Antwort wichtig für den MARV Replikationszyklus ist. Auch für andere Viren wurde gezeigt, dass die Regulation der ER-Stress-Antwort essenziell für eine optimale virale Replikation ist^{33,58,53,194,156,41}. Für MCMV und HCMV ist eine aktive IRE1-vermittelte ER-Stress-Antwort restriktiv und wird durch die Degradation von IRE1 durch MCMV M50 bzw. HCMV UL50 reguliert¹⁵⁶. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten (Abb. 4.18 A), ist jedoch auch der vollständige KO von XBP1 restriktiv für MCMV, was eine Rolle von XBP1u im MCMV Replikationszyklus vermuten lässt⁴¹. Für SARS konnte z.B. gezeigt werden, dass das Hüllprotein E die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort reguliert, um die Induktion von Apoptose zu verhindern³³. Für MARV ist gezeigt, dass eine RNAi-vermittelte Degradation der VP30 mRNA zu einer reduzierten MARV Freisetzung führt⁵⁵. Ein Grund für die Beobachtung der reduzierten Freisetzung könnte sein, dass die VP30-vermittelte Regulation der GP-induzierten ER-Stress-Antwort fehlt.

5.4.2 Thapsigargin beeinflusst den Marburg Virus Replikationszyklus IRE1-unabhängig

Tg inhibiert SERCA, wodurch der Ca^{2+} -Import in das ER unterbunden wird. Die Anwesenheit von Ca^{2+} ist essenziell für die Funktionen des ER, weswegen ein gestörter Ca^{2+} -Haushalt zu ER-Stress führt und zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, wie der ER-Stress-Antwort^{161,149,172}. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tg auch die Viabilität von HuH7 Zellen negativ beeinflusst (Abb. 4.1 B). Der Einfluss von Tg auf Viren wurde z.B. für RSV gezeigt. Hier führte eine Tg-Stimulation während der Infektion zu einer reduzierten Freisetzung der Viren¹⁴⁶. Dies konnte, in dieser Arbeit vorangegangenen Experimenten, auch für MARV in HuH7 Zellen gezeigt werden¹⁴².

Um genauer zu untersuchen, ob eine Stimulation der ER-Stress-Antwort durch Tg den MARV Replikationszyklus beeinflusst, wurden HAP1, sowie HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen infiziert. In Anwesenheit von Tg war der MARV Titer in allen Zelllinien reduziert (Abb. 4.18 B und Abb. 4.18 C), was zum einen zeigt, dass die Homöostase des ER essenziell für eine effiziente MARV Vermehrung ist und zum anderen, dass Tg die MARV Replikation und Freisetzung IRE1-unabhängig negativ beeinflusst. Durch Tg können neben der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort viele weitere zelluläre Prozesse aktiviert werden^{161,149,172}. Um im Detail zu klären, ob durch die Behandlung der Zellen mit Tg allgemein die Viabilität der Zellen reduziert und damit auch die virale Transkription und Replikation inhibiert wird, oder ob Tg spezifisch die Transkription und Replikation oder die Freisetzung und Infektiosität der Viren beeinflusst, wurden MG-Assays und iVLP-Assays in der Anwesenheit von Tg untersucht. Hier zeigte sich, dass die RT-Aktivität des MARV in Anwesenheit von Tg sogar gesteigert wird (Abb. 4.16 B und Abb. 4.17 B, P0), obwohl für HuH7 Zellen gezeigt werden konnte, dass die Viabilität der Zellen durch die Gabe von 5 nM Tg deutlich reduziert wird (Abb. 4.1 B). Das legt nahe, dass die reduzierte Viabilität der Zellen durch Tg für die virale Transkription und Replikation keine entscheidende Rolle spielt, sondern im Gegenteil die virale Transkription und Replikation durch Tg positiv beeinflusst werden. Dass dieser Effekt im MG-Assay (Abb. 4.16 B) stärker zu sehen ist als im iVLP-Assay (Abb. 4.17 B, P0) liegt vermutlich daran, dass VP40 und VP24, die im MG-Assay nicht exprimiert werden, insgesamt die Replikation und Transkription negativ beeinflussen^{90,179}. Für GP konnte bereits gezeigt werden, dass es keinen Einfluss auf die Transkription und Replikation hat¹⁷⁹. Im Gegensatz zum positiven Einfluss von Tg auf die virale Transkription und Replikation, wurden im iVLP-Assay in Anwesenheit von Tg weniger iVLP freigesetzt (Abb. 4.17 C), was zu einer reduzierten Reporteraktivität in P1 Zellen im iVLP-Assay führte (Abb. 4.17 B, P1). Darüber hinaus waren die exprimierten Proteinmengen von NP und GP in den P0-Zellen reduziert, was zeigt, dass die gestörte Homöostase des ER durch Tg die Proteinexpression der MARV Proteine beeinflusst und in der Folge weniger iVLP

freigesetzt werden. Dass der Freisetzungsprozess selbst nicht beeinflusst wird, zeigt das Verhältnis von GP zu VP40 in den iVLP, welches vergleichbar ist zwischen DMSO- und Tg-stimulierten Proben (Abb. 4.17 D). VP40 ist maßgeblich für die Freisetzung der viralen Partikel verantwortlich^{168,169,37-39}. Die bisherigen Daten können nicht im Detail aufklären welcher Prozess des viralen Replikationszyklus durch Tg beeinflusst wird. Dass Tg die zelluläre Translation durch PERK und den *Eukaryotic translation initiation factor 2A* (eIF2A) reduziert⁷⁵ ist unwahrscheinlich, da dies auch einen negativen Einfluss auf die Translation des MG Reportergens gehabt hätte, was hier nicht gezeigt werden konnte (Abb. 4.17 B, P0). Möglich wäre auch, dass die Behandlung mit Tg dazu führt, dass der intrazelluläre Transport beeinflusst wird, wie dies kürzlich gezeigt werden konnte¹⁶⁷. Hier müssen weitere Versuche durchgeführt werden um im Detail klären zu können, welchen Prozess des MARV Replikationszyklus Tg beeinflusst.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass die Behandlung von Zellen mit Tg die Freisetzung von MARV Partikeln negativ beeinflusst, nicht jedoch die MARV Transkription und Replikation. Die Ergebnisse des iVLP-Assays bestätigen hierbei die Infektionsdaten in HuH7¹⁴² und in HAP1, HAP1 IRE1 KO und HAP1 XBP1 KO Zellen. Der genaue Einfluss von Tg muss noch weiter charakterisiert werden.

5.5 Arbeitsmodell

Für neue Therapieansätze ist die genaue Charakterisierung des viralen Replikationszyklus und der Interaktionen von Virus und Wirt essentiell. Bislang sind jedoch nicht alle Aspekte einer Marburg Virus (MARV) Infektion verstanden. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Analyse des Einflusses des MARV auf die zelluläre Endoplasmatischen Retikulum (ER)-Stress-Antwort, die als Folge einer Überlastung des ER aktiviert wird und entweder zur Wiederherstellung der Homöostase im ER oder zur Apoptose der Zelle führen kann. Beides kann für die Vermehrung von Viren von Vor- oder Nachteil sein.

MARV ist für seine Vermehrung auf die Wirtszelle angewiesen, was eine Belastung für die Zelle darstellen kann. Im ER wird das Glykoprotein GP des MARV in großen Mengen produziert, gefaltet und prozessiert bevor es an die Plasmamembran transportiert wird. Das GP besitzt eine Mucin-ähnliche Domäne, die stark glykosyliert ist^{63,50,59,144}. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Domäne mit ihren posttranslationalen Modifikationen zu einer Überlastung der Kapazität des ER führt (4.2.2). In der Folge aktiviert die Zelle die ER-Stress-Antwort über die IRE1-abhängige Signalkaskade (4.2). Hier konnte eine GP-abhängige Aktivierung des *inositol-requiring enzyme 1 α* , (IRE1, 4.2.4), des Transkriptionsfaktors *X-box binding protein 1 spliced* (XBP1s, 4.2.3) und des XBP1s-spezifischen Promotors *unfolded*

protein response element (UPRE, 4.2.1) gezeigt werden (Abb. Z.4, GP). Überraschenderweise konnte keine Aktivierung der ER-Stress-Antwort während einer MARV Infektion nachgewiesen werden, obwohl die solitäre Expression von GP diese induziert¹⁴². Der Grund hierfür ist, dass das virale Protein VP30 die GP-abhängige IRE1-vermittelte ER-Stress-Antwort reduzieren kann (4.3.1, 4.3.4)¹⁴². Bisher war der Mechanismus, wie VP30 die ER-Stress-Antwort reguliert, unklar. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass VP30 RNA-abhängig mit dem *X-box binding protein 1 unspliced* (XBP1u) Protein interagiert (4.3.2). XBP1u rekrutiert seine eigene mRNA spezifisch an die ER-Membran, sodass sich diese in räumlicher Nähe zu IRE1 befindet^{186,152,187,85,134,157}. Dies lässt vermuten, dass VP30 mit dem *XBP1u* mRNA/XBP1u Protein Komplex interagiert und somit das Spleißen der *XBP1u* mRNA reduziert (Abb. Z.4, VP30). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von IRE1- und XBP1-defizienten Zellen gezeigt werden, dass die Regulation der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort wichtig für den MARV Replikationszyklus ist (4.4.3). Dabei profitiert MARV zunächst von einer intakten IRE1-Signalkaskade, vermutlich, da durch die ER-Stress-Antwort zunächst Gene reguliert werden, die die Homöostase im ER wiederherstellen und dessen Kapazität erhöhen^{1,106,185}. Zu späteren Zeitpunkten der Infektion führt die Unterbrechung der IRE1-Signalkaskade jedoch zu höheren MARV Titern, was unterstreicht, dass eine enge Regulation der ER-Stress-Antwort durch MARV essentiell ist für dessen Vermehrung. Darüber hinaus führte eine zusätzliche Stimulation der ER-Stress-Antwort zu einer Reduktion des Virus Titers (4.4.4). Dies scheint unabhängig von der Transkription und Replikation des MARV (4.4.1, 4.4.2) und verdeutlicht, dass ein intaktes ER essentiell für eine optimale Vermehrung des MARV ist.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass das GP des MARV die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort aktiviert. Der Ablauf der Signalkaskade wird jedoch durch die Interaktion von VP30 mit dem *XBP1u* mRNA/XBP1u Protein Komplex unterbrochen, sodass keine Aktivierung der ER-Stress-Antwort während einer MARV Infektion nachweisbar ist.

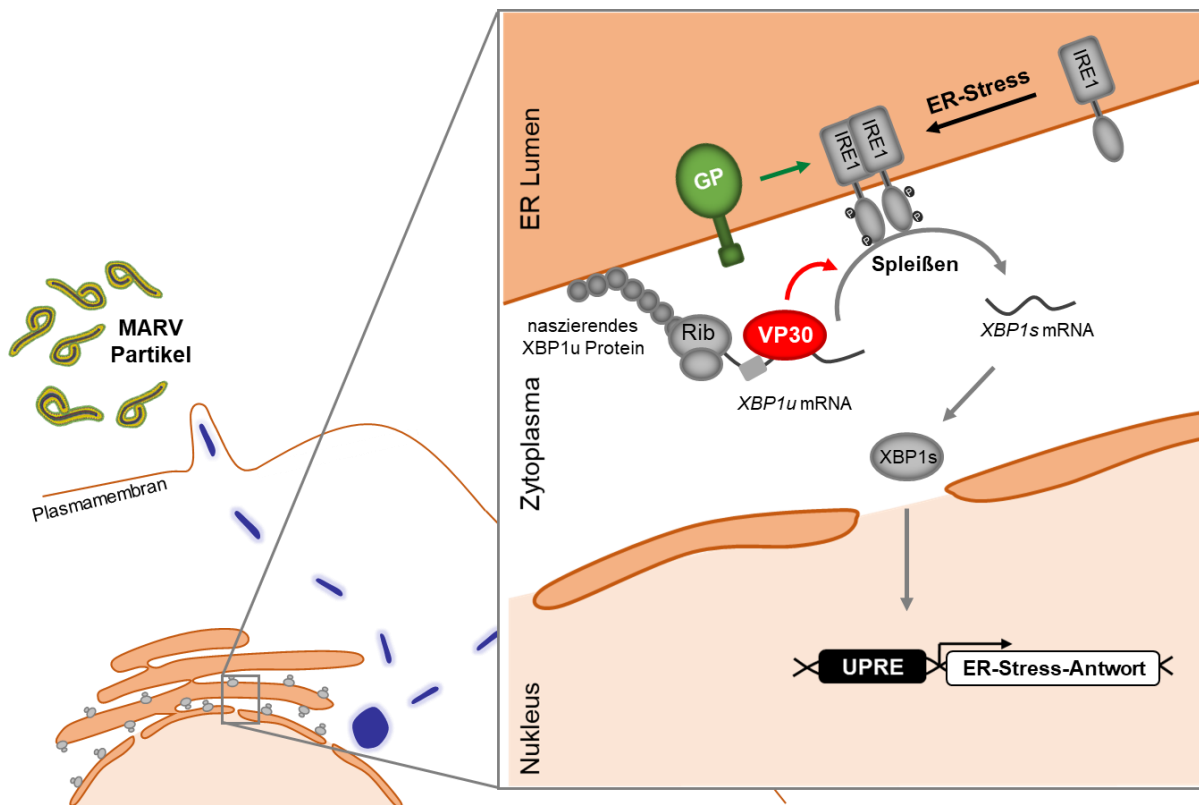


Abb. Z.4: Arbeitsmodell - MARV GP und VP30 regulieren die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort

MARV GP führt, auf Grund der im ER stattfindenden posttranslationalen Modifikationen, zu einer Aktivierung der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort (Abb. 2.5). Im Gegensatz dazu reduziert VP30 die IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort, indem es RNA-abhängig mit dem XBP1u mRNA/XBP1u Protein Komplex interagiert.

6. Zusammenfassung/Summary

6.1 Zusammenfassung

Das Marburg Virus (MARV) gehört, wie das Ebola Virus (EBOV), zur Familie der *Filoviridae*. Im Menschen führt eine Infektion mit dem MARV häufig zu schweren Fiebererkrankungen mit einer Letalitätsrate von bis zu 90%. Aufgrund dieser hohen Letalitätsrate, und da bisher keine Impfstoffe oder Therapiemöglichkeiten zugelassen sind, werden Filoviren in die höchste biologische Sicherheitsstufe 4 eingestuft. Um neue Ansatzpunkte für Therapeutika zu finden, ist es essentiell die Interaktionen zwischen dem MARV und der Wirtszelle genau zu charakterisieren.

Für seine Replikation ist das MARV, wie alle Viren, vollständig auf die Wirtszelle angewiesen, und die Infektion bedeutet eine Belastung für die Ressourcen der Zelle.

Während der Infektion wird das MARV Oberflächenprotein, das Glykoprotein GP, am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, im Lumen des ER gefaltet und posttranslational stark glykosyliert. Diese Prozesse verzögern den Transport des GP, wodurch es im ER akkumuliert, bevor es an die Plasmamembran transportiert wird. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die transiente Expression des MARV GP zu einer Überlastung des ER führt (ER-Stress) und eine *Inositol-requiring enzyme 1 α* (IRE1)-abhängigen ER-Stress-Antwort führt. Wird IRE1 aktiviert, ist es durch eine Ribonuklease-Aktivität in der Lage die *X-box binding protein 1 unspliced (XBP1u)* mRNA zu spleißen. Der dadurch entstehende Transkriptionsfaktor *X-box binding protein 1 spliced (XBP1s)* migriert in den Zellkern und aktiviert über die Promotoren *unfolded protein response element (UPRE)* und *ER stress element (ERSE)* viele verschiedene Gene, um die Homöostase im ER wiederzuerlangen. Eine langanhaltende Aktivierung von IRE1 hingegen führt zur Apoptose. Die ER-Stress-Antwort kann somit von Vor- oder Nachteil für die virale Replikation sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte die GP-abhängige Aktivierung der ER-Stress-Antwort im Detail charakterisiert werden. Die Expression des GP führt zu einer Aktivierung von IRE1, des Transkriptionsfaktors XBP1s und in der Folge auch des Promotors UPRE. Verantwortlich für diese Aktivierung sind die voraussichtlich die molekulare Größe des GP und die vielen Glykosylierungen innerhalb der Mucin-ähnlichen Domäne des GP.

In Vorarbeiten zeigte sich, dass die ER-Stress-Antwort während einer MARV Infektion nicht aktiviert wird. Der Grund hierfür ist das virale Protein VP30, welches ein multifunktionales Protein und viraler Transkriptionsfaktor ist und eine Reduktion der IRE1-abhängigen ER-Stress-Antwort vermitteln kann. Der genaue Mechanismus war bislang unklar. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass VP30 RNA-abhängig mit dem XBP1u Protein

interagiert. XBP1u rekrutiert seine eigene mRNA an die ER-Membran, sodass sich diese in räumlicher Nähe zu IRE1 befindet. Folglich könnte die Interaktion von VP30 mit dem *XBP1u* mRNA/XBP1u Protein Komplex die *XBP1u* mRNA für IRE1 unzugänglich machen und somit das Spleißen unterbinden. Weiter konnte hier gezeigt werden, dass eine präzise Regulation der ER-Stress-Antwort wichtig für die virale Vermehrung des MARV ist, da sowohl eine aktivierte, als auch eine unterbundene IRE1-abhängige ER-Stress-Antwort, die Vermehrung des Virus beeinflusst.

Der aktuelle Forschungsstand zeigt, dass die Regulation der ER-Stress-Antwort wichtig ist, um eine effiziente MARV Freisetzung zu gewährleisten. Dies ist somit ein interessanter Ansatzpunkt für neue Therapeutika.

6.2 Summary

Marburg virus (MARV) and Ebola virus (EBOV) belong to the family *filoviridae*. A MARV infection can cause a severe fever disease in humans with a lethality rate of up to 90%. Therefore and as there are no licensed therapeutics or vaccines available against filoviruses, they are classified as biosafety level 4 pathogens. It is essential to characterize the MARV-host interactions to find new targets for therapeutics.

Like all viruses MARV depends on the host cell machinery for its replication. For that reason an infection is an additional burden for the cell. The only surface protein of MARV is the glycoprotein GP which is synthesized at the rough ER and folded and glycosylated within the lumen of the endoplasmic reticulum (ER). This process fosters GP to accumulate in the ER before it is transported to the plasma membrane. Previous studies revealed that the ectopic expression of GP overwhelmed the ER (ER stress) and thereby activated the inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1)-dependent unfolded protein response (UPR). The active IRE1 splices the *X-box binding protein 1 unspliced (XBP1u)* mRNA whereby the transcription factor X-box binding protein 1 spliced (XBP1s) is translated. XBP1s binds to the promoters UPR element (UPRE) and ER stress element (ERSE) in the nucleus by what different genes are regulated to restore the ER homeostasis. In contrast prolonged IRE1 activation induces apoptosis. Therefore the UPR can be pro- or antiviral.

In this thesis the GP-dependent activation of the UPR was elucidated in detail. The expression of GP activates IRE1, the transcription factor XBP1s as well as the promoter UPRE. GP activates the UPR because of its molecular mass and the many posttranslational modifications, which are mainly located within the mucin-like domain. However, during a MARV infection there is no UPR activation detectable. The reason for that is that the multifunctional viral

transcriptionfactor VP30 is able to counteract the IRE1-dependent UPR. Here it was shown for the first time that VP30 interacts RNA-dependent with the XBP1u Protein. XBP1u recruits its own mRNA to the ER membrane to bring it into close proximity to IRE1. Potentially VP30 interacts with the *XBP1u* mRNA/XBP1u protein complex whereby the *XBP1u* mRNA is no longer accessible for IRE1. Further experiments showed that the regulation of the UPR is urgent for the MARV replication as either the stimulated - or blocked UPR influences the viral release.

Our current knowledge underlines that tight regulations of the UPR are essential for a proper MARV replication which makes it an interesting target for new therapeutics.

7. Referenzen

1. Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, Lennon CJ, Kluger Y, Dynlacht BD. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell*. 2007;27(1):53-66.
2. Albarino CG, Shoemaker T, Khristova ML, Wamala JF, Muyembe JJ, Balinandi S, Tumusiime A, Campbell S, Cannon D, Gibbons A, Bergeron E, Bird B, Dodd K, Spiropoulou C, Erickson BR, Guerrero L, Knust B, Nichol ST, Rollin PE, Stroher U. Genomic analysis of filoviruses associated with four viral hemorrhagic fever outbreaks in Uganda and the Democratic Republic of the Congo in 2012. *Virology*. 2013;442(2):97-100.
3. Albarino CG, Uebelhoer LS, Vincent JP, Khristova ML, Chakrabarti AK, McElroy A, Nichol ST, Towner JS. Development of a reverse genetics system to generate recombinant Marburg virus derived from a bat isolate. *Virology*. 2013;446(1-2):230-237.
4. Amarasinghe GK, Bao Y, Basler CF, Bavari S, Beer M, Bejerman N, Blasdel KR, Bochnowski A, Briese T, Bukreyev A, Calisher CH, Chandran K, Collins PL, Dietzgen RG, Dolnik O, Durrwald R, Dye JM, Easton AJ, Ebihara H, Fang Q, Formenty P, Fouchier RAM, Ghedin E, Harding RM, Hewson R, Higgins CM, Hong J, Horie M, James AP, Jiang D, Kobinger GP, Kondo H, Kurath G, Lamb RA, Lee B, Leroy EM, Li M, Maisner A, Muhlberger E, Netesov SV, Nowotny N, Patterson JL, Payne SL, Paweska JT, Pearson MN, Randall RE, Revill PA, Rima BK, Rota P, Rubbenstroth D, Schwemmler M, Smither SJ, Song Q, Stone DM, Takada A, Terregino C, Tesh RB, Tomonaga K, Tordo N, Towner JS, Vasilakis N, Volchkov VE, Wahl-Jensen V, Walker PJ, Wang B, Wang D, Wang F, Wang LF, Werren JH, Whitfield AE, Yan Z, Ye G, Kuhn JH. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2017. *Arch Virol*. 2017;162(8):2493-2504.
5. Amman BR, Carroll SA, Reed ZD, Sealy TK, Balinandi S, Swanepoel R, Kemp A, Erickson BR, Comer JA, Campbell S, Cannon DL, Khristova ML, Atimnedi P, Paddock CD, Crockett RJ, Flietstra TD, Warfield KL, Unfer R, Katongole-Mbidde E, Downing R, Tappero JW, Zaki SR, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST, Towner JS. Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile *Rousettus aegyptiacus* bats coincide with periods of increased risk of human infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(10):e1002877.
6. Bamberg S, Kolesnikova L, Moller P, Klenk HD, Becker S. VP24 of Marburg virus influences formation of infectious particles. *J Virol*. 2005;79(21):13421-13433.
7. Batra J, Hultquist JF, Liu D, Shtanko O, Von Dollen J, Satkamp L, Jang GM, Luthra P, Schwarz TM, Small GI, Arnett E, Anantpadma M, Reyes A, Leung DW, Kaake R, Haas P, Schmidt CB, Schlesinger LS, LaCount DJ, Davey RA, Amarasinghe GK, Basler CF, Krogan NJ. Protein Interaction Mapping Identifies RBBP6 as a Negative Regulator of Ebola Virus Replication. *Cell*. 2018;175(7):1917-1930.e1913.
8. Bausch DG, Borchert M, Grein T, Roth C, Swanepoel R, Libande ML, Talarmin A, Bertherat E, Muyembe-Tamfum JJ, Tugume B, Colebunders R, Konde KM, Pirad P, Olinda LL, Rodier GR, Campbell P, Tomori O, Ksiazek TG, Rollin PE. Risk factors for Marburg hemorrhagic fever, Democratic Republic of the Congo. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(12):1531-1537.

9. Becker S, Huppertz S, Klenk HD, Feldmann H. The nucleoprotein of Marburg virus is phosphorylated. *J Gen Virol.* 1994;75 (Pt 4):809-818.
10. Becker S, Klenk HD, Muhlberger E. Intracellular transport and processing of the Marburg virus surface protein in vertebrate and insect cells. *Virology.* 1996;225(1):145-155.
11. Becker S, Rinne C, Hofsass U, Klenk HD, Muhlberger E. Interactions of Marburg virus nucleocapsid proteins. *Virology.* 1998;249(2):406-417.
12. Becker S, Spiess M, Klenk HD. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 2):393-399.
13. Ben Azoun S, Ben Zakour M, Sghaier S, Kallel H. Expression of rabies virus glycoprotein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem.* 2017;64(1):50-61.
14. Bharat TA, Riches JD, Kolesnikova L, Welsch S, Krahling V, Davey N, Parsy ML, Becker S, Briggs JA. Cryo-electron tomography of Marburg virus particles and their morphogenesis within infected cells. *PLoS Biol.* 2011;9(11):e1001196.
15. Bhattacharyya S, Hope TJ, Young JA. Differential requirements for clathrin endocytic pathway components in cellular entry by Ebola and Marburg glycoprotein pseudovirions. *Virology.* 2011;419(1):1-9.
16. Bhattacharyya S, Sen U, Vрати S. Regulated IRE1-dependent decay pathway is activated during Japanese encephalitis virus-induced unfolded protein response and benefits viral replication. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 1):71-79.
17. Biedenkopf N, Hartlieb B, Hoenen T, Becker S. Phosphorylation of Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex: impact on viral transcription and replication. *J Biol Chem.* 2013;288(16):11165-11174.
18. Biedenkopf N, Lier C, Becker S. Dynamic Phosphorylation of VP30 Is Essential for Ebola Virus Life Cycle. *J Virol.* 2016;90(10):4914-4925.
19. Biedenkopf N, Schlereth J, Grunweller A, Becker S, Hartmann RK. RNA Binding of Ebola Virus VP30 Is Essential for Activating Viral Transcription. *J Virol.* 2016;90(16):7481-7496.
20. Bosio CM, Aman MJ, Grogan C, Hogan R, Ruthel G, Negley D, Mohamadzadeh M, Bavari S, Schmaljohn A. Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation. *J Infect Dis.* 2003;188(11):1630-1638.
21. Bruhn JF, Kirchdoerfer RN, Urata SM, Li S, Tickle IJ, Bricogne G, Saphire EO. Crystal Structure of the Marburg Virus VP35 Oligomerization Domain. *J Virol.* Volume 91, 2. 2017.
22. Brunner JM, Plattet P, Doucey MA, Rosso L, Curie T, Montagner A, Wittek R, Vanderveelde M, Zurbriggen A, Hirling H, Desvergne B. Morbillivirus glycoprotein expression

induces ER stress, alters Ca²⁺ homeostasis and results in the release of vasostatin. *PLoS One*. 2012;7(3):e32803.

23. Bukreyev AA, Belanov EF, Blinov VM, Netesov SV. Complete nucleotide sequences of Marburg virus genes 5 and 6 encoding VP30 and VP24 proteins. *Biochem Mol Biol Int*. 1995;35(3):605-613.

24. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002;415(6867):92-96.

25. Carette JE, Raaben M, Wong AC, Herbert AS, Obernosterer G, Mulherkar N, Kuehne AI, Kranzusch PJ, Griffin AM, Ruthel G, Dal Cin P, Dye JM, Whelan SP, Chandran K, Brummelkamp TR. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature*. 2011;477(7364):340-343.

26. Carpenter JE, Grose C. Varicella-zoster virus glycoprotein expression differentially induces the unfolded protein response in infected cells. *Front Microbiol*. 2014;5:322.

27. Chan SY, Empig CJ, Welte FJ, Speck RF, Schmaljohn A, Kreisberg JF, Goldsmith MA. Folate receptor-alpha is a cofactor for cellular entry by Marburg and Ebola viruses. *Cell*. 2001;106(1):117-126.

28. Chen CY, Malchus NS, Hehn B, Stelzer W, Avci D, Langosch D, Lemberg MK. Signal peptide peptidase functions in ERAD to cleave the unfolded protein response regulator XBP1u. *Embo j*. 2014;33(21):2492-2506.

29. Connor JH, Yen J, Caballero IS, Garamszegi S, Malhotra S, Lin K, Hensley L, Goff AJ. Transcriptional Profiling of the Immune Response to Marburg Virus Infection. *J Virol*. 2015;89(19):9865-9874.

30. Cote M, Misasi J, Ren T, Bruchez A, Lee K, Filone CM, Hensley L, Li Q, Ory D, Chandran K, Cunningham J. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature*. 2011;477(7364):344-348.

31. Criscuolo BA, Krag SS. Selection of tunicamycin-resistant Chinese hamster ovary cells with increased N-acetylglucosaminyltransferase activity. *J Cell Biol*. 1982;94(3):586-591.

32. Cubellis MV, Cailleux F, Blundell TL, Lovell SC. Properties of polyproline II, a secondary structure element implicated in protein-protein interactions. *Proteins*. 2005;58(4):880-892.

33. DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Jimenez-Guardeno JM, Regla-Nava JA, Alvarez E, Oliveros JC, Zhao J, Fett C, Perlman S, Enjuanes L. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. *PLoS Pathog*. 2011;7(10):e1002315.

34. DiCarlo A, Biedenkopf N, Hartlieb B, Klussmeier A, Becker S. Phosphorylation of Marburg virus NP region II modulates viral RNA synthesis. *J Infect Dis*. 2011;204 Suppl 3:S927-933.

35. DiCarlo A, Moller P, Lander A, Kolesnikova L, Becker S. Nucleocapsid formation and RNA synthesis of Marburg virus is dependent on two coiled coil motifs in the nucleoprotein. *Virology*. 2007;4:105.
36. Dolnik O, Kolesnikova L, Becker S. Filoviruses: Interactions with the host cell. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(5):756-776.
37. Dolnik O, Kolesnikova L, Stevermann L, Becker S. Tsg101 is recruited by a late domain of the nucleocapsid protein to support budding of Marburg virus-like particles. *J Virol*. 2010;84(15):7847-7856.
38. Dolnik O, Kolesnikova L, Welsch S, Strecker T, Schudt G, Becker S. Interaction with Tsg101 is necessary for the efficient transport and release of nucleocapsids in marburg virus-infected cells. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004463.
39. Dolnik O, Stevermann L, Kolesnikova L, Becker S. Marburg virus inclusions: A virus-induced microcompartment and interface to multivesicular bodies and the late endosomal compartment. *Eur J Cell Biol*. 2015;94(7-9):323-331.
40. Doms RW, Ruusala A, Machamer C, Helenius J, Helenius A, Rose JK. Differential effects of mutations in three domains on folding, quaternary structure, and intracellular transport of vesicular stomatitis virus G protein. *J Cell Biol*. 1988;107(1):89-99.
41. Drori A, Messerle M, Brune W, Tirosh B. Lack of XBP-1 impedes murine cytomegalovirus gene expression. *PLoS One*. 2014;9(10):e110942.
42. Edwards MR, Basler CF. Marburg Virus VP24 Protein Relieves Suppression of the NF-kappaB Pathway Through Interaction With Kelch-like ECH-Associated Protein 1. *J Infect Dis*. 2015;212 Suppl 2:S154-159.
43. Edwards MR, Johnson B, Mire CE, Xu W, Shabman RS, Speller LN, Leung DW, Geisbert TW, Amarasinghe GK, Basler CF. The Marburg virus VP24 protein interacts with Keap1 to activate the cytoprotective antioxidant response pathway. *Cell Rep*. 2014;6(6):1017-1025.
44. Edwards MR, Liu G, Mire CE, Sureshchandra S, Luthra P, Yen B, Shabman RS, Leung DW, Messaoudi I, Geisbert TW, Amarasinghe GK, Basler CF. Differential Regulation of Interferon Responses by Ebola and Marburg Virus VP35 Proteins. *Cell Rep*. 2016;14(7):1632-1640.
45. Elbein AD. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. *CRC Crit Rev Biochem*. 1984;16(1):21-49.
46. Enterlein S, Schmidt KM, Schumann M, Conrad D, Kraehling V, Olejnik J, Muhlberger E. The marburg virus 3' noncoding region structurally and functionally differs from that of ebola virus. *J Virol*. 2009;83(9):4508-4519.
47. Enterlein S, Volchkov V, Weik M, Kolesnikova L, Volchkova V, Klenk HD, Muhlberger E. Rescue of recombinant Marburg virus from cDNA is dependent on nucleocapsid protein VP30. *J Virol*. 2006;80(2):1038-1043.

48. Feldmann H, Bugany H, Mahner F, Klenk HD, Drenckhahn D, Schnittler HJ. Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages. *J Virol.* 1996;70(4):2208-2214.
49. Feldmann H, Muhlberger E, Randolph A, Will C, Kiley MP, Sanchez A, Klenk HD. Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Res.* 1992;24(1):1-19.
50. Feldmann H, Nichol ST, Klenk HD, Peters CJ, Sanchez A. Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein. *Virology.* 1994;199(2):469-473.
51. Feldmann H, Will C, Schikore M, Slenczka W, Klenk HD. Glycosylation and oligomerization of the spike protein of Marburg virus. *Virology.* 1991;182(1):353-356.
52. Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, Lerner RA, Wigler M. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol.* 1988;8(5):2159-2165.
53. Fink SL, Jayewickreme TR, Molony RD, Iwawaki T, Landis CS, Lindenbach BD, Iwasaki A. IRE1 α promotes viral infection by conferring resistance to apoptosis. *Sci Signal.* 2017;10(482).
54. Flyak AI, Ilinykh PA, Murin CD, Garron T, Shen X, Fusco ML, Hashiguchi T, Bornholdt ZA, Slaughter JC, Sapparapu G, Klages C, Ksiazek TG, Ward AB, Saphire EO, Bukreyev A, Crowe JE, Jr. Mechanism of human antibody-mediated neutralization of Marburg virus. *Cell.* 2015;160(5):893-903.
55. Fowler T, Bamberg S, Moller P, Klenk HD, Meyer TF, Becker S, Rudel T. Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNA interference. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 4):1181-1188.
56. Freiling C. Die Induktion der ER-Stressantwort durch die HA-markierten MARV Proteine HA-NP und GP-HA. Philipps-University Marburg.
57. Fritz EA, Geisbert JB, Geisbert TW, Hensley LE, Reed DS. Cellular immune response to Marburg virus infection in cynomolgus macaques. *Viral Immunol.* 2008;21(3):355-363.
58. Fros JJ, Major LD, Scholte FEM, Gardner J, van Hemert MJ, Suhrbier A, Pijlman GP. Chikungunya virus non-structural protein 2-mediated host shut-off disables the unfolded protein response. *J Gen Virol.* 2015;96(Pt 3):580-589.
59. Funke C, Becker S, Dartsch H, Klenk HD, Muhlberger E. Acylation of the Marburg virus glycoprotein. *Virology.* 1995;208(1):289-297.
60. Gear JH. Hemorrhagic fevers, with special reference to recent outbreaks in southern Africa. *Rev Infect Dis.* 1979;1(4):571-591.

61. Gear JS, Cassel GA, Gear AJ, Trappler B, Clausen L, Meyers AM, Kew MC, Bothwell TH, Sher R, Miller GB, Schneider J, Koornhof HJ, Gomperts ED, Isaacson M, Gear JH. Outbreak of Marburg virus disease in Johannesburg. *Br Med J*. 1975;4(5995):489-493.
62. Geisbert TW, Jaax NK. Marburg hemorrhagic fever: report of a case studied by immunohistochemistry and electron microscopy. *Ultrastruct Pathol*. 1998;22(1):3-17.
63. Geyer H, Will C, Feldmann H, Klenk HD, Geyer R. Carbohydrate structure of Marburg virus glycoprotein. *Glycobiology*. 1992;2(4):299-312.
64. Gnirß K, Fiedler M, Krämer-Kühl A, Bolduan S, Mittler E, Becker S, Schindler M, Pöhlmann S. Analysis of Determinants in Filovirus Glycoproteins Required for Tetherin Antagonism. *Viruses*. 2014;6(4):1654-1671.
65. Gramberg T, Hofmann H, Moller P, Lalor PF, Marzi A, Geier M, Krumbiegel M, Winkler T, Kirchhoff F, Adams DH, Becker S, Munch J, Pöhlmann S. LSECtin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus. *Virology*. 2005;340(2):224-236.
66. Halbleib K, Pesek K, Covino R, Hofbauer HF, Wunnicke D, Hanelt I, Hummer G, Ernst R. Activation of the Unfolded Protein Response by Lipid Bilayer Stress. *Mol Cell*. 2017;67(4):673-684.e678.
67. Hartlieb B, Modrof J, Muhlberger E, Klenk HD, Becker S. Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide. *J Biol Chem*. 2003;278(43):41830-41836.
68. Hashiguchi T, Fusco ML, Bornholdt ZA, Lee JE, Flyak AI, Matsuoka R, Kohda D, Yanagi Y, Hammel M, Crowe JE, Jr., Saphire EO. Structural basis for Marburg virus neutralization by a cross-reactive human antibody. *Cell*. 2015;160(5):904-912.
69. Hassan I, Gaines KS, Hottel WJ, Wishy RM, Miller SE, Powers LS, Rutkowski DT, Monick MM. Inositol-requiring enzyme 1 inhibits respiratory syncytial virus replication. *J Biol Chem*. 2014;289(11):7537-7546.
70. Hassan IH, Zhang MS, Powers LS, Shao JQ, Baltrusaitis J, Rutkowski DT, Legge K, Monick MM. Influenza A viral replication is blocked by inhibition of the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) stress pathway. *J Biol Chem*. 2012;287(7):4679-4689.
71. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell*. 1999;10(11):3787-3799.
72. Hernandez-Elvira M, Torres-Quiroz F, Escamilla-Ayala A, Dominguez-Martin E, Escalante R, Kawasaki L, Ongay-Larios L, Coria R. The Unfolded Protein Response Pathway in the Yeast *Kluyveromyces lactis*. A Comparative View among Yeast Species. *Cells*. 2018;7(8).
73. Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(9):703-719.

74. Hetz C, Mollereau B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(4):233-249.
75. Hetz C, Papa FR. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell*. 2018;69(2):169-181.
76. Hoenen T, Groseth A, de Kok-Mercado F, Kuhn JH, Wahl-Jensen V. Minigenomes, transcription and replication competent virus-like particles and beyond: reverse genetics systems for filoviruses and other negative stranded hemorrhagic fever viruses. *Antiviral Res*. 2011;91(2):195-208.
77. Hoenen T, Jung S, Herwig A, Groseth A, Becker S. Both matrix proteins of Ebola virus contribute to the regulation of viral genome replication and transcription. *Virology*. 2010;403(1):56-66.
78. Holzer M, Krahling V, Amman F, Barth E, Bernhart SH, Carmelo VA, Collatz M, Doose G, Eggenhofer F, Ewald J, Fallmann J, Feldhahn LM, Fricke M, Gebauer J, Gruber AJ, Hufsky F, Indrischek H, Kanton S, Linde J, Mostajo N, Ochsenreiter R, Riege K, Rivarola-Duarte L, Sahyoun AH, Saunders SJ, Seemann SE, Tanzer A, Vogel B, Wehner S, Wolfinger MT, Backofen R, Gorodkin J, Grosse I, Hofacker I, Hoffmann S, Kaleta C, Stadler PF, Becker S, Marz M. Differential transcriptional responses to Ebola and Marburg virus infection in bat and human cells. *Sci Rep*. 2016;6:34589.
79. Hume A, Department of Microbiology BUSoM, National Emerging Infectious Diseases Laboratories BU, Massachusetts, Mühlberger E, Department of Microbiology BUSoM, National Emerging Infectious Diseases Laboratories BU, Massachusetts. Marburg Virus Viral Protein 35 Inhibits Protein Kinase R Activation in a Cell Type–Specific Manner. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018;218(suppl_5).
80. Hunt CL, Lennemann NJ, Maury W. Filovirus entry: a novelty in the viral fusion world. *Viruses*. 2012;4(2):258-275.
81. Ilinykh PA, Tigabu B, Ivanov A, Ammosova T, Obukhov Y, Garron T, Kumari N, Kovalskyy D, Platonov MO, Naumchik VS, Freiberg AN, Nekhai S, Bukreyev A. Role of protein phosphatase 1 in dephosphorylation of Ebola virus VP30 protein and its targeting for the inhibition of viral transcription. *J Biol Chem*. 2014;289(33):22723-22738.
82. Iwawaki T, Akai R, Kohno K, Miura M. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat Med*. 2004;10(1):98-102.
83. Johnson B, Li J, Adhikari J, Edwards MR, Zhang H, Schwarz T, Leung DW, Basler CF, Gross ML, Amarasinghe GK. Dimerization Controls Marburg Virus VP24-dependent Modulation of Host Antioxidative Stress Responses. *J Mol Biol*. 2016;428(17):3483-3494.
84. Jurkin J, Henkel T, Nielsen AF, Minnich M, Popow J, Kaufmann T, Heindl K, Hoffmann T, Busslinger M, Martinez J. The mammalian tRNA ligase complex mediates splicing of XBP1 mRNA and controls antibody secretion in plasma cells. *Embo j*. 2014;33(24):2922-2936.

85. Kanda S, Yanagitani K, Yokota Y, Esaki Y, Kohno K. Autonomous translational pausing is required for XBP1u mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(40):E5886-e5895.
86. Kiley MP, Bowen ET, Eddy GA, Isaacson M, Johnson KM, McCormick JB, Murphy FA, Pattyn SR, Peters D, Prozesky OW, Regnery RL, Simpson DI, Slenczka W, Sureau P, van der Groen G, Webb PA, Wulff H. Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? *Intervirology*. 1982;18(1-2):24-32.
87. Kirchdoerfer RN, Moyer CL, Abelson DM, Saphire EO. The Ebola Virus VP30-NP Interaction Is a Regulator of Viral RNA Synthesis. *PLoS Pathog*. 2016;12(10):e1005937.
88. Knust B, Schafer IJ, Wamala J, Nyakarahuka L, Okot C, Shoemaker T, Dodd K, Gibbons A, Balinandi S, Tumusiime A, Campbell S, Newman E, Lasry E, DeClerck H, Boum Y, Makumbi I, Bosa HK, Mbonye A, Aceng JR, Nichol ST, Stroher U, Rollin PE. Multidistrict Outbreak of Marburg Virus Disease-Uganda, 2012. *J Infect Dis*. 2015;212 Suppl 2:S119-128.
89. Koehler A, Kolesnikova L, Becker S. An active site mutation increases the polymerase activity of the guinea pig-lethal Marburg virus. *J Gen Virol*. 2016;97(10):2494-2500.
90. Koehler A, Kolesnikova L, Welzel U, Schudt G, Herwig A, Becker S. A Single Amino Acid Change in the Marburg Virus Matrix Protein VP40 Provides a Replicative Advantage in a Species-Specific Manner. *J Virol*. 2016;90(3):1444-1454.
91. Koehler A, Pfeiffer S, Kolesnikova L, Becker S. Analysis of the multifunctionality of Marburg virus VP40. *J Gen Virol*. 2018;99(12):1614-1620.
92. Koellhoffer JF, Malashkevich VN, Harrison JS, Toro R, Bhosle RC, Chandran K, Almo SC, Lai JR. Crystal structure of the Marburg virus GP2 core domain in its postfusion conformation. *Biochemistry*. 2012;51(39):7665-7675.
93. Kolesnikova L, Bamberg S, Berghofer B, Becker S. The matrix protein of Marburg virus is transported to the plasma membrane along cellular membranes: exploiting the retrograde late endosomal pathway. *J Virol*. 2004;78(5):2382-2393.
94. Kolesnikova L, Berghofer B, Bamberg S, Becker S. Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope. *J Virol*. 2004;78(22):12277-12287.
95. Kolesnikova L, Bohil AB, Cheney RE, Becker S. Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cell Microbiol*. 2007;9(4):939-951.
96. Kolesnikova L, Bugany H, Klenk HD, Becker S. VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment. *J Virol*. 2002;76(4):1825-1838.
97. Kolesnikova L, Mittler E, Schudt G, Shams-Eldin H, Becker S. Phosphorylation of Marburg virus matrix protein VP40 triggers assembly of nucleocapsids with the viral envelope at the plasma membrane. *Cell Microbiol*. 2012;14(2):182-197.

98. Kolesnikova L, Muhlberger E, Ryabchikova E, Becker S. Ultrastructural organization of recombinant Marburg virus nucleoprotein: comparison with Marburg virus inclusions. *J Virol.* 2000;74(8):3899-3904.
99. Kolesnikova L, Ryabchikova E, Shestopalov A, Becker S. Basolateral budding of Marburg virus: VP40 retargets viral glycoprotein GP to the basolateral surface. *J Infect Dis.* 2007;196 Suppl 2:S232-236.
100. Kondratowicz AS, Lennemann NJ, Sinn PL, Davey RA, Hunt CL, Moller-Tank S, Meyerholz DK, Rennert P, Mullins RF, Brindley M, Sandersfeld LM, Quinn K, Weller M, McCray PB, Jr., Chiorini J, Maury W. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(20):8426-8431.
101. Kruse T, Biedenkopf N, Hertz EPT, Dietzel E, Stalman G, Lopez-Mendez B, Davey NE, Nilsson J, Becker S. The Ebola Virus Nucleoprotein Recruits the Host PP2A-B56 Phosphatase to Activate Transcriptional Support Activity of VP30. *Mol Cell.* 2018;69(1):136-145.e136.
102. Kuhn JH, Becker S, Ebihara H, Geisbert TW, Johnson KM, Kawaoka Y, Lipkin WI, Negrodo AI, Netesov SV, Nichol ST, Palacios G, Peters CJ, Tenorio A, Volchkov VE, Jahrling PB. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Arch Virol.* 2010;155(12):2083-2103.
103. Kuhn JH, Radoshitzky SR, Guth AC, Warfield KL, Li W, Vincent MJ, Towner JS, Nichol ST, Bavari S, Choe H, Aman MJ, Farzan M. Conserved receptor-binding domains of Lake Victoria marburgvirus and Zaire ebolavirus bind a common receptor. *J Biol Chem.* 2006;281(23):15951-15958.
104. Kuroda M, Fujikura D, Nanbo A, Marzi A, Noyori O, Kajihara M, Maruyama J, Matsuno K, Miyamoto H, Yoshida R, Feldmann H, Takada A. Interaction between TIM-1 and NPC1 Is Important for Cellular Entry of Ebola Virus. *J Virol.* 2015;89(12):6481-6493.
105. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8135-8145.
106. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2003;23(21):7448-7459.
107. Lennemann NJ, Walkner M, Berkebile AR, Patel N, Maury W. The Role of Conserved N-Linked Glycans on Ebola Virus Glycoprotein 2. *J Infect Dis.* 2015;212 Suppl 2:S204-209.
108. Lier C, Becker S, Biedenkopf N. Dynamic phosphorylation of Ebola virus VP30 in NP-induced inclusion bodies. *Virology.* 2017;512:39-47.

109. Liu B, Dong S, Li G, Wang W, Liu X, Wang Y, Yang C, Rao Z, Guo Y. Structural Insight into Nucleoprotein Conformation Change Chaperoned by VP35 Peptide in Marburg Virus. *J Virol.* 2017;91(16).
110. Liu Y, Stone S, Harty RN. Characterization of filovirus protein-protein interactions in mammalian cells using bimolecular complementation. *J Infect Dis.* 2011;204 Suppl 3:S817-824.
111. Mahanty S, Bray M. Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(8):487-498.
112. Martini GA. Marburg virus disease. *Postgrad Med J.* 1973;49(574):542-546.
113. Martini GA, Schmidt HA. [Spermatogenic transmission of the "Marburg virus". (Causes of "Marburg simian disease")]. *Klin Wochenschr.* 1968;46(7):398-400.
114. Marzi A, Gramberg T, Simmons G, Moller P, Rennekamp AJ, Krumbiegel M, Geier M, Eisemann J, Turza N, Saunier B, Steinkasserer A, Becker S, Bates P, Hofmann H, Pohlmann S. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* 2004;78(21):12090-12095.
115. Matsuno K, Kishida N, Usami K, Igarashi M, Yoshida R, Nakayama E, Shimojima M, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y, Takada A. Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains. *J Virol.* 2010;84(10):5140-5147.
116. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(5):245-254.
117. Misasi J, Chandran K, Yang JY, Considine B, Filone CM, Cote M, Sullivan N, Fabozzi G, Hensley L, Cunningham J. Filoviruses require endosomal cysteine proteases for entry but exhibit distinct protease preferences. *J Virol.* 2012;86(6):3284-3292.
118. Mittler E, Kolesnikova L, Hartlieb B, Davey R, Becker S. The cytoplasmic domain of Marburg virus GP modulates early steps of viral infection. *J Virol.* 2011;85(16):8188-8196.
119. Mittler E, Kolesnikova L, Herwig A, Dolnik O, Becker S. Assembly of the Marburg virus envelope. *Cell Microbiol.* 2013;15(2):270-284.
120. Mittler E, Kolesnikova L, Strecker T, Garten W, Becker S. Role of the transmembrane domain of marburg virus surface protein GP in assembly of the viral envelope. *J Virol.* 2007;81(8):3942-3948.
121. Mittler E, Schudt G, Halwe S, Rohde C, Becker S. A Fluorescently Labeled Marburg Virus Glycoprotein as a New Tool to Study Viral Transport and Assembly. *J Infect Dis.* 2018.
122. Modrof J, Moritz C, Kolesnikova L, Konakova T, Hartlieb B, Randolph A, Muhlberger E, Becker S. Phosphorylation of Marburg virus VP30 at serines 40 and 42 is critical for its interaction with NP inclusions. *Virology.* 2001;287(1):171-182.

123. Moller P, Pariente N, Klenk HD, Becker S. Homo-oligomerization of Marburgvirus VP35 is essential for its function in replication and transcription. *J Virol.* 2005;79(23):14876-14886.
124. Mori K, Ma W, Gething MJ, Sambrook J. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell.* 1993;74(4):743-756.
125. Muhlberger E, Lotfering B, Klenk HD, Becker S. 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.* 1998;72(11):8756-8764.
126. Muhlberger E, Sanchez A, Randolph A, Will C, Kiley MP, Klenk HD, Feldmann H. The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses. *Virology.* 1992;187(2):534-547.
127. Muhlberger E, Weik M, Volchkov VE, Klenk HD, Becker S. Comparison of the transcription and replication strategies of marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems. *J Virol.* 1999;73(3):2333-2342.
128. Nikiforov VV, Turovskii Iu I, Kalinin PP, Akinfeeva LA, Katkova LR, Barmin VS, Riabchikova EI, Popkova NI, Shestopalov AM, Nazarov VP, et al. [A case of a laboratory infection with Marburg fever]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1994;(3):104-106.
129. Nyakarahuka L, Ojwang J, Tumusiime A, Balinandi S, Whitmer S, Kyazze S, Kasozi S, Wetaka M, Makumbi I, Dahlke M, Borchert J, Lutwama J, Stroher U, Rollin PE, Nichol ST, Shoemaker TR. Isolated Case of Marburg Virus Disease, Kampala, Uganda, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(6):1001-1004.
130. Oda S, Noda T, Wijesinghe KJ, Halfmann P, Bornholdt ZA, Abelson DM, Armbrust T, Stahelin RV, Kawaoka Y, Saphire EO. Crystal Structure of Marburg Virus VP40 Reveals a Broad, Basic Patch for Matrix Assembly and a Requirement of the N-Terminal Domain for Immunosuppression. *J Virol.* 2016;90(4):1839-1848.
131. Osorio F, Lambrecht BN, Janssens S. Antigen presentation unfolded: identifying convergence points between the UPR and antigen presentation pathways. *Curr Opin Immunol.* 2018;52:100-107.
132. Page A, Volchkova VA, Reid SP, Mateo M, Bagnaud-Baule A, Nemirov K, Shurtleff AC, Lawrence P, Reynard O, Ottmann M, Lotteau V, Biswal SS, Thimmulappa RK, Bavari S, Volchkov VE. Marburgvirus hijacks nrf2-dependent pathway by targeting nrf2-negative regulator keap1. *Cell Rep.* 2014;6(6):1026-1036.
133. Pichlmair A, Kandasamy K, Alvisi G, Mulhern O, Sacco R, Habjan M, Binder M, Stefanovic A, Eberle CA, Goncalves A, Burckstummer T, Muller AC, Fauster A, Holze C, Lindsten K, Goodbourn S, Kochs G, Weber F, Bartenschlager R, Bowie AG, Bennett KL, Colinge J, Superti-Furga G. Viral immune modulators perturb the human molecular network by common and unique strategies. *Nature.* 2012;487(7408):486-490.

134. Plumb R, Zhang ZR, Appathurai S, Mariappan M. A functional link between the co-translational protein translocation pathway and the UPR. *Elife*. 2015;4.
135. Prehoda KE, Lee DJ, Lim WA. Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell*. 1999;97(4):471-480.
136. Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016;5(2):85-86.
137. Ramanan P, Edwards MR, Shabman RS, Leung DW, Endlich-Frazier AC, Borek DM, Otwinowski Z, Liu G, Huh J, Basler CF, Amarasinghe GK. Structural basis for Marburg virus VP35-mediated immune evasion mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(50):20661-20666.
138. Reynolds P, Marzi A. Ebola and Marburg virus vaccines. *Virus Genes*. 2017;53(4):501-515.
139. Rivas A, Vidal RL, Hetz C. Targeting the unfolded protein response for disease intervention. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(9):1203-1218.
140. Roberts PC, Garten W, Klenk HD. Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. *J Virol*. 1993;67(6):3048-3060.
141. Rohde C. Etablierung eines Marburg-Virus Leiden spezifischen Minigenom Systems. Philipps-Universität Marburg.
142. Rohde C. Marburg Virus im Kontext der Endoplasmatischen Retikulum-Stress-Antwort. MSc thesis. Philipps-Universität Marburg.
143. Sanchez A, Kiley MP, Klenk HD, Feldmann H. Sequence analysis of the Marburg virus nucleoprotein gene: comparison to Ebola virus and other non-segmented negative-strand RNA viruses. *J Gen Virol*. 1992;73 (Pt 2):347-357.
144. Sanger C, Muhlberger E, Lotfering B, Klenk HD, Becker S. The Marburg virus surface protein GP is phosphorylated at its ectodomain. *Virology*. 2002;295(1):20-29.
145. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):3460-3470.
146. Schogler A, Caliaro O, Brugger M, Oliveira Esteves BI, Nita I, Gazdhar A, Geiser T, Alves MP. Modulation of the unfolded protein response pathway as an antiviral approach in airway epithelial cells. *Antiviral Res*. 2018;162:44-50.
147. Schudt G, Kolesnikova L, Dolnik O, Sodeik B, Becker S. Live-cell imaging of Marburg virus-infected cells uncovers actin-dependent transport of nucleocapsids over long distances. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(35):14402-14407.
148. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(1):79-94.

149. Sehgal P, Szalai P, Olesen C, Praetorius HA, Nissen P, Christensen SB, Engedal N, Moller JV. Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum (ER) Ca(2+)-ATPase by thapsigargin analogs induces cell death via ER Ca(2+) depletion and the unfolded protein response. *J Biol Chem*. 2017;292(48):19656-19673.
150. Shabman RS, Jabado OJ, Mire CE, Stockwell TB, Edwards M, Mahajan M, Geisbert TW, Basler CF. Deep sequencing identifies noncanonical editing of Ebola and Marburg virus RNAs in infected cells. *MBio*. 2014;5(6):e02011.
151. Shimojima M, Takada A, Ebihara H, Neumann G, Fujioka K, Irimura T, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol*. 2006;80(20):10109-10116.
152. Shinya S, Kadokura H, Imagawa Y, Inoue M, Yanagitani K, Kohno K. Reconstitution and characterization of the unconventional splicing of XBP1u mRNA in vitro. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(12):5245-5254.
153. Shore GC, Papa FR, Oakes SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(2):143-149.
154. Shoulders MD, Ryno LM, Genereux JC, Moresco JJ, Tu PG, Wu C, Yates JR, 3rd, Su AI, Kelly JW, Wiseman RL. Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell Rep*. 2013;3(4):1279-1292.
155. Smith DH, Johnson BK, Isaacson M, Swanapoel R, Johnson KM, Killey M, Bagshawe A, Siongok T, Keruga WK. Marburg-virus disease in Kenya. *Lancet*. 1982;1(8276):816-820.
156. Stahl S, Burkhart JM, Hinte F, Tirosh B, Mohr H, Zahedi RP, Sickmann A, Ruzsics Z, Budt M, Brune W. Cytomegalovirus downregulates IRE1 to repress the unfolded protein response. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003544.
157. Sundaram A, Plumb R, Appathurai S, Mariappan M. The Sec61 translocon limits IRE1alpha signaling during the unfolded protein response. *Elife*. 2017;6.
158. Swanepoel R, Smit SB, Rollin PE, Formenty P, Leman PA, Kemp A, Burt FJ, Grobbelaar AA, Croft J, Bausch DG, Zeller H, Leirs H, Braack LE, Libande ML, Zaki S, Nichol ST, Ksiazek TG, Paweska JT. Studies of reservoir hosts for Marburg virus. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(12):1847-1851.
159. Takada A, Fujioka K, Tsuiji M, Morikawa A, Higashi N, Ebihara H, Kobasa D, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol*. 2004;78(6):2943-2947.
160. Takayanagi S, Fukuda R, Takeuchi Y, Tsukada S, Yoshida K. Gene regulatory network of unfolded protein response genes in endoplasmic reticulum stress. *Cell Stress Chaperones*. 2013;18(1):11-23.
161. Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(7):2466-2470.

162. Tigabu B, Ramanathan P, Ivanov A, Lin X, Ilinykh PA, Parry CS, Freiberg AN, Nekhai S, Bukreyev A, Dermody TS. Phosphorylated VP30 of Marburg Virus Is a Repressor of Transcription. 2018.
163. Timen A, Koopmans MP, Vossen AC, van Doornum GJ, Gunther S, van den Berkmortel F, Verduin KM, Dittrich S, Emmerich P, Osterhaus AD, van Dissel JT, Coutinho RA. Response to imported case of Marburg hemorrhagic fever, the Netherland. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(8):1171-1175.
164. Towner JS, Amman BR, Sealy TK, Carroll SA, Comer JA, Kemp A, Swanepoel R, Paddock CD, Balinandi S, Khristova ML, Formenty PB, Albarino CG, Miller DM, Reed ZD, Kayiwa JT, Mills JN, Cannon DL, Greer PW, Byaruhanga E, Farnon EC, Atimnedi P, Okware S, Katongole-Mbidde E, Downing R, Tappero JW, Zaki SR, Ksiazek TG, Nichol ST, Rollin PE. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog.* 2009;5(7):e1000536.
165. Towner JS, Khristova ML, Sealy TK, Vincent MJ, Erickson BR, Bawiec DA, Hartman AL, Comer JA, Zaki SR, Stroher U, Gomes da Silva F, del Castillo F, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J Virol.* 2006;80(13):6497-6516.
166. Towner JS, Pourrut X, Albarino CG, Nkogue CN, Bird BH, Grard G, Ksiazek TG, Gonzalez JP, Nichol ST, Leroy EM. Marburg virus infection detected in a common African bat. *PLoS One.* 2007;2(8):e764.
167. Trychta KA, Back S, Henderson MJ, Harvey BK. KDEL Receptors Are Differentially Regulated to Maintain the ER Proteome under Calcium Deficiency. *Cell Rep.* 2018;25(7):1829-1840.e1826.
168. Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa S, Yokosawa H, Yasuda J. 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.* 2007;81(9):4895-4899.
169. Urata S, Yasuda J. Regulation of Marburg virus (MARV) budding by Nedd4.1: a different WW domain of Nedd4.1 is critical for binding to MARV and Ebola virus VP40. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 1):228-234.
170. Valmas C, Basler CF. Marburg virus VP40 antagonizes interferon signaling in a species-specific manner. *J Virol.* 2011;85(9):4309-4317.
171. Valmas C, Grosch MN, Schumann M, Olejnik J, Martinez O, Best SM, Krahling V, Basler CF, Muhlberger E. Marburg virus evades interferon responses by a mechanism distinct from ebola virus. *PLoS Pathog.* 2010;6(1):e1000721.
172. van Anken E, Braakman I. Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005;40(4):191-228.
173. Volchkov VE, Volchkova VA, Stroher U, Becker S, Dolnik O, Cieplik M, Garten W, Klenk HD, Feldmann H. Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology.* 2000;268(1):1-6.

174. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081-1086.
175. Wang B, Wang Y, Frabutt DA, Zhang X, Yao X, Hu D, Zhang Z, Liu C, Zheng S, Xiang SH, Zheng YH. Mechanistic understanding of N-glycosylation in Ebola virus glycoprotein maturation and function. *J Biol Chem*. 2017;292(14):5860-5870.
176. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*. 2016;529(7586):326-335.
177. Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem*. 2000;275(35):27013-27020.
178. Wasswa H. Uganda grapples with new Marburg disease outbreak. *Bmj*. 2017;359:j5252.
179. Wenigenrath J, Kolesnikova L, Hoenen T, Mittler E, Becker S. Establishment and application of an infectious virus-like particle system for Marburg virus. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 5):1325-1334.
180. Whelan SP, Barr JN, Wertz GW. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004;283:61-119.
181. Wijesinghe KJ, Urata S, Bhattarai N, Kooijman EE, Gerstman BS, Chapagain PP, Li S, Stahelin RV. Detection of lipid-induced structural changes of the Marburg virus matrix protein VP40 using hydrogen/deuterium exchange-mass spectrometry. *J Biol Chem*. 2017;292(15):6108-6122.
182. Will C, Muhlberger E, Linder D, Slenczka W, Klenk HD, Feldmann H. Marburg virus gene 4 encodes the virion membrane protein, a type I transmembrane glycoprotein. *J Virol*. 1993;67(3):1203-1210.
183. Wilson IA, Niman HL, Houghten RA, Cherenson AR, Connolly ML, Lerner RA. The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell*. 1984;37(3):767-778.
184. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell*. 2007;13(3):365-376.
185. Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J Biochem*. 2004;136(3):343-350.
186. Yanagitani K, Imagawa Y, Iwawaki T, Hosoda A, Saito M, Kimata Y, Kohno K. Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Mol Cell*. 2009;34(2):191-200.

187. Yanagitani K, Kimata Y, Kadokura H, Kohno K. Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA. *Science*. 2011;331(6017):586-589.
188. Yen BC, Basler CF. Effects of Filovirus Interferon Antagonists on Responses of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells to RNA Virus Infection. *J Virol*. 2016;90(10):5108-5118.
189. Yen JH, Wu PS, Chen SF, Wu MJ. Fisetin Protects PC12 Cells from Tunicamycin-Mediated Cell Death via Reactive Oxygen Species Scavenging and Modulation of Nrf2-Driven Gene Expression, SIRT1 and MAPK Signaling in PC12 Cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4).
190. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001;107(7):881-891.
191. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol*. 2006;172(4):565-575.
192. Zapata JC, Cox D, Salvato MS. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(6):e2858.
193. Zeller H. [Lessons from the Marburg virus epidemic in Durba, Democratic Republic of the Congo (1998-2000)]. *Med Trop (Mars)*. 2000;60(2 Suppl):23-26.
194. Zhang P, Su C, Jiang Z, Zheng C. Herpes Simplex Virus 1 UL41 Protein Suppresses the IRE1/XBP1 Signal Pathway of the Unfolded Protein Response via Its RNase Activity. *J Virol*. 2017;91(4).
195. Zhu T, Song H, Peng R, Shi Y, Qi J, Gao GF. Crystal Structure of the Marburg Virus Nucleoprotein Core Domain Chaperoned by a VP35 Peptide Reveals a Conserved Drug Target for Filovirus. *J Virol*. 2017;91(18).
196. Zhu X, Zhang J, Sun H, Jiang C, Dong Y, Shan Q, Su S, Xie Y, Xu N, Lou X, Liu S. Ubiquitination of inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) by the E3 ligase CHIP mediates the IRE1/TRAF2/JNK pathway. *J Biol Chem*. 2014;289(44):30567-30577.

8. Lebenslauf

9. Veröffentlichungen

9.1 Publikationen

Krähling, V., Becker, D., **Rohde, C.**, Eickmann, M., Eroglu, Y., Herwig, A., . . . consortium, E. M. (2016). Development of an antibody capture ELISA using inactivated Ebola Zaire Makona virus. *Med Microbiol Immunol*.

Mittler, E., Schudt, G., Halwe, S., **Rohde, C.**, & Becker, S. (2018). A Fluorescently Labeled Marburg Virus Glycoprotein as a New Tool to Study Viral Transport and Assembly. *Journal Infectious Disease*.

9.2 Kongressbeiträge

03.2015 Bochum Gesellschaft für Virologie (GfV) Posterpräsentation
„Antagonistic effects of Marburg virus proteins balance the cellular unfolded protein response“
C. Rohde, S. Becker, V. Krähling

06.2015 Paris Targeting Ebola 2015 Conference Posterpräsentation
„Antagonistic effects of Marburg virus proteins balance the cellular unfolded protein response“
C. Rohde, S. Becker, V. Krähling

09.2015 Schöntal Cell Biology of Viral Infections (GfV) Vortrag
„Antagonistic effects of Marburg virus proteins balance the cellular unfolded protein response“
C. Rohde, S. Becker, V. Krähling
 Ausgezeichnet mit dem **„Award for the best presentation“**

04.2016 Münster Gesellschaft für Virologie (GfV) Posterpräsentation
„Marburg Virus VP30 counteracts the induction of the unfolded protein response“
C. Rohde, S. Becker, V. Krähling

04.2016 Münster Gesellschaft für Virologie (GfV) Vortrag
„Development of an antibody capture ELISA using inactivated Ebola Zaire Makona virus“
V. Krähling, D. Becker, C. Rohde, M. Eickmann, Y. Eroglu, A. Herwig, R. Kerber, K. Kowalski, J. Vergara-Alert, S. Becker

- 11.2016 Schöntal Cell Biology of Viral Infections (GfV) Vortrag
“Marburg Virus VP30 balances the XBP1s-dependent unfolded protein response”
C. Rohde, S. Becker, V. Krähling
- 03.2017 Marburg Gesellschaft für Virologie (GfV) Vortrag
“Marburg Virus VP30 balances the XBP1-dependent unfolded protein response”
C. Rohde, S. Becker, V. Krähling
- 03.2017 Marburg Gesellschaft für Virologie (GfV) Posterpräsentation
„Induction of the unfolded protein response by henipavirus glycoproteins”
J. Hüther, L. Behner, C. Rohde, V. Krähling, M. Ringel, A. Maisner
- 04.2017 Mosbach 68. Mosbacher Kolloquium (GBM) Posterpräsentation
“Henipavirus glycoproteins induce the unfolded protein response”
J. Hüther, L. Behner, C. Rohde, V. Krähling, M. Ringel, A. Maisner
- 06.2017 Madison (USA) American Society of Virology (ASV) Vortrag
“Marburg Virus VP30 balances the XBP1-dependent unfolded protein response”
C. Rohde, S. Becker, V. Krähling
- 08.2017 Turku (Finnland) Society of Unfolded Protein Response Posterpräsentation
Marburg Virus VP30 balances the XBP1-dependent unfolded protein response
C. Rohde, S. Becker, V. Krähling
09. 2017 Marburg 9th international Symposium on filoviruses Vortrag
Same story, different versions - the interplay of Marburg and Ebolavirus with the unfolded protein response
V. Krähling, C. Rohde, S. Becker
- 03.2018 Würzburg Gesellschaft für Virologie (GfV) Posterpräsentation
“Marburg virus VP30 alleviates the unfolded protein response by interacting with the XBP1u protein/XBP1u mRNA complex”
C. Rohde, S. Becker, V. Krähling
- 03.2018 Würzburg Gesellschaft für Virologie (GfV) Posterpräsentation
“Influence of cell-cell fusion on the unfolded protein response activation by measles virus glycoproteins”
L. Zimmermann, L. Behner, J. Hüther, C. Rohde, A. Maisner

03.2018 Würzburg Gesellschaft für Virologie (GfV) Posterpräsentation
“The MARPHILI simulation: A scenario-based educational tool to sensitize high school students to infectious disease epidemics”

C. Rohde, M. Fligge, S. Halwe, M. Klüver, A. Koehler, M. Ringel, M. Elvert, H. Müller, J. Westmeier, N. Biedenkopf, T. Freitag, B. Lamp, G. Schudt, J. Scholten, M. Gollwitzer, S. Becker

06.2018 Siena Negative Strand Virus meeting (NSV) Vortrag
“MARBURG VIRUS PROTEIN VP30 REGULATES THE IRE1/XBP1-DEPENDENT UNFOLDED PROTEIN RESPONSE TO ENSURE EFFICIENT VIRAL REPLICATION”

C. Rohde, S. Becker, V. Krähling

06.2018 Siena Negative Strand Virus meeting (NSV) Posterpräsentation
“ROLE OF HOST PHOSPHATASE PP2A IN FILOVIRUS REPLICATION CYCLE”

N. Biedenkopf, C. Rohde, T. Kruse, E. T. Peter, J. Nilsson, S. Becker

12.2018 Heidelberg DZIF Jahrestagung Vortrag
“The clinical phase 1 MVA-MERS-S vaccine trial shows the vaccine to be safe, well-tolerated and eliciting immune responses”

A. Fathi, T. Koch, C. Dahlke, V. Krähling, A. Kupke, S. Halwe, C. Rohde, M. Eickmann, A. Volz, T. Hestekamp, A. Jambrecina, L. Kaltenberg, S. Borregard, M. L. Ly, M. Zinser, E. Bartels, J. Poetsch, R. Neumann, R. Fux, S. Schmiedel, F. Stahl, A. Lohse, G. Sutter, S. Becker, M. Addo

03.2019 Düsseldorf Gesellschaft für Virologie (GfV) Vortrag
“First-In-Man trial: An MVA-vectored vaccine candidate for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus is safe and immunogenic”

C. Dahlke, T. Koch, A. Fathi, V. Krähling, A. Kupke, S. Halwe, C. Rohde, M. Eickmann, A. Volz, T. Hestekamp, S. Borregard, M. L. Ly, M. Zinser, E. Bartels, J. Poetsch, R. Neumann, R. Fux, N. Okba, B. L. Haagmans, S. Schmiedel, A. Lohse, G. Sutter, S. Becker, M. Addo

03.2019 Düsseldorf Gesellschaft für Virologie (GfV) Posterpräsentation
“Role of cellular phosphatase PP2A-dependent dephosphorylation of filoviral VP30s for viral transcription and replication”

C. Rohde, I. von Creyzt, T. Tharra, N. Mostajo-Berrosipi, T., E. T. Peter, J. Nilsson, S. Becker, N. Biedenkopf

10. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Gert Bange, Stefan Bauer, Anke Becker, Stephan Becker, Michael Bölker, Roland Brandl, Eberhard Bremer, Detlev Buttgereit, Markus Eickmann, Nina Farwig, Beate Feuser, Paul Galland, Peter Graumann, Monika Hassel, Johann Heider, Uwe Homberg, Regine Kahrmann, Gerhard Kost, Klaus Lingelbach, Uwe Maier, Andrea Maisner, Diethart Matthies, Hans-Ulrich Mösch, Renate Renkawitz-Pohl, Joachim Schachtner, Lotte Sogaard-Andersen, Martin Thanbichler, Thorsten Waldminghaus, Hans Christian Weber, Birgit Ziegenhagen

11. Ehrenwörtliche Erklärung

12. Danksagung

Zum Schluss möchte ich noch all denen danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Diejenigen, die mich erst seit kurzem oder auch schon länger begleitet haben und mich in meinen Zielen auf ihre Weise unterstützen.

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Stephan Becker bedanken, der mich in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit hat anfertigen lassen und der mich dabei immer sehr unterstützt und gefördert hat. Lieber Stephan, vielen Dank für die letzten Jahre in deiner Arbeitsgruppe. Ich habe die vielen Freiheiten, die du mir hier ermöglicht hast, sehr genossen. Insbesondere die Möglichkeit mein Projekt nach meinen Vorstellungen zu bearbeiten, im BSL 4 Labor arbeiten zu dürfen, das EM Lab Training zu machen, die Bundeskanzlerin zu interviewen und vieles mehr haben diese Zeit sehr besonders gemacht.

Der größte Dank geht an Dr. Verena Krähling. Liebe Verena, vielen lieben Dank, dass du mich seit Jahren im Labor betreust, unterstützt und immer wieder pusht auch noch den nächsten Schritt zu erreichen! Vielen Dank, dass du dir immer die Zeit genommen hast über meine Daten zu diskutieren, Arbeiten zu lesen, meine Vorträge zu optimieren und insbesondere mich ins BSL 4 Labor eingearbeitet hast. Es ist sehr schön zu wissen, dass du dem Institut noch sehr lange erhalten bleiben wirst und hoffentlich noch dem einen oder anderen Studenten die gleiche Aufmerksamkeit und beste Betreuung zukommen lassen wirst wie mir.

Diese Arbeit wäre auch nicht möglich gewesen ohne das Stipendium der Jürgen Manchot Stiftung.

Die Zeit im virologischen Institut wäre nicht so familiär und einzigartig gewesen ohne die vielen Kollegen, die eigentlich mehr Freunde sind. Hier möchte ich mich vor allem beim „Mittagstisch“ bedanken. Diese initiale Mittagsessensrunde mit Katharina, Sandro, Nelly und Jaana, die inzwischen mit der halben AG Becker fortgeführt wird, hat stets einen wunderbaren Ausgleich im Alltag geschaffen. Bei Sandro möchte ich mich insbesondere für die gemeinsamen Jahre bedanken, die wir in der Virologie hatten und haben werden. Vielen Dank für deine stets direkte Diskussionsbereitschaft, die gemeinsamen Projekte, wie BSL 4, EM Lab, YSS oder Tierkurse, die Leidenschaft für den Fußball, die geschwollenen Hände, Berry White, GfV Dinner und vieles mehr. Vielen lieben Dank auch an Katharina, dass du bei jeder Lage stets ein offenes Ohr hattest. Danke für deine Hilfsbereitschaft im Labor und darüber hinaus. Ich wüsste nicht so recht was ich ohne dich neben mir beim Mittagessen machen würde. Liebe Nelly, (heute ist Freitag, deswegen auf Deutsch) vielen Dank für deine small questions, die mich immer zum Lachen gebracht haben und deinen stets anderen Blick auf Sachen. Liebe Jaana, vielen Dank, dass du mit mir das Altherren lab immer aufgemischt hast

und viel Leben in unsere kleines Labor gebracht hast. Dass das Altherren lab stets ein lebendiger Ort war, ist auch Gordian, Michael, Charlotte, Isabel und Yuki geschuldet. Vielen Dank euch!

Natürlich würde die ganze Arbeitsgruppe nicht funktionieren ohne unsere tollen TAs: Astrid, Dirk, Katharina, Susanne, Martina und Yonca. Ohne euch hätten wir keine Chance im Laboralltag! Vielen lieben Dank!

Vielen Dank auch allen anderen (ehemaligen) Mitgliedern der AG Becker: Alex I, Alex II, Erik, Hosam, Lucie, Larissa, Olga, Anke, Kathi, Clemens, Gertrud, Helen, Anne, Nadine, Sabine und all den Studenten.

Ich möchte mich auch bei allen Studenten bedanken, die mich bei meiner Forschung unterstützt haben: Cedrik, Sophia, Tabea und Isabel.

Diese Arbeit wäre auch nicht möglich gewesen ohne das Team des BSL 4 Labors: Vielen Dank an Markus, Olga, Michael und Gotthardt!

Weiter möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus Lingelbach dafür bedanken, dass er mich als Biologen in die Virologie vermittelt und mich bereits früh im Studium mit seinen Vorlesungen für die Infektionsbiologie begeistert hat.

Natürlich möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken. Insbesondere meine Eltern, Lea & Malte, sowie Umpi haben mich während meiner Doktorarbeit stets begleitet, gefördert, unterstützt und abgelenkt. Vielen lieben Dank euch! Es wäre einfach nicht möglich gewesen das hier ohne euch zu realisieren und ich bin sehr froh und stolz, dass ich eine so tolle Familie hinter mir habe.

Zum Schluss möchte ich mich auch bei Svenja bedanken: Vielen tausend Dank, dass du mich immer bei allem so stark unterstützt und förderst. Vielen Dank, dass du mein Leben zu dem machst was es ist und ich voller Vorfreude in die Zukunft gehen kann.