

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl: Virologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: **Prof Dr. Ulrich Koszinowski**

**Subzelluläre Lokalisation und
Interaktionen der Offenen Leserahmen
des SARS-Coronavirus**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Carola Teepe

aus
Aachen

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Haas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Kai Hell
Prof. Dr. Christoph Nerl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. A. von Brunn

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2010

Teile dieser Doktorarbeit wurden veröffentlicht unter:

von Brunn, A., Teepe, C., Simpson, J.C., Pepperkok, R., Friedel, C.C., Zimmer, R.,
Roberts, R., Baric, R., Haas, J. (2007) Analysis of Intraviral Protein-Protein Interactions of
the SARS Coronavirus ORFeome. PloS ONE 2(5): e459

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	4
1.1 Epidemiologie des SARS-Ausbruches.....	4
1.2 Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom.....	6
1.2.1 Klinik.....	6
1.2.2 Transmission.....	7
1.3 Ursprung und Phylogenese.....	8
1.4 Allgemeines über Coronaviridae.....	11
1.4.1 Coronaviren als Pathogene.....	11
1.4.2 Allgemeiner Aufbau von Coronaviren	11
1.4.3 Morphologie der Coronaviren.....	12
1.4.4 Replikation der Coronaviren.....	13
1.5 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus.....	15
1.5.1 Genom.....	15
1.5.2 Proteom.....	18
1.5.2.1 Replikationsproteine.....	18
1.5.2.2 Strukturproteine.....	19
1.5.2.3 Akzessorische Proteine.....	21
1.6 Lokalisom.....	28
2 Zielsetzung.....	31
3 Material und Methoden.....	32
3.1 Material.....	32
3.1.1 cDNA, Plasmide und synthetische Oligonukleotide.....	32
3.1.2 Antikörper und Restriktionsenzyme.....	35
3.1.3 Zelllinien, Bakterien und Viren.....	36
3.1.4 Chemikalien und Marker.....	36
3.1.5 Kits, Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	37
3.2 Methoden.....	39
3.2.1 Molekularbiologische Arbeitsweisen.....	39

3.2.1.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	39
3.2.1.2 Spalten von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	40
3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung.....	40
3.2.1.4 Plasmidisolierung.....	41
3.2.1.5 Sequenzierungen.....	42
3.2.1.6 Die Gateway Technologie.....	42
3.2.1.7 BP-Rekombinationsreaktion.....	44
3.2.1.8 LR-Rekombinationsreaktion.....	44
3.2.2 Zellkultur.....	45
3.2.2.1 Bakterien.....	45
3.2.2.2 Eukaryotische Zellen.....	46
3.2.3 Zellbiologische und biochemische Arbeitsweisen.....	47
3.2.3.1 Immunfluoreszenzfärbungen.....	47
3.2.3.2 Konfokalmikroskop.....	50
3.2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
3.2.3.4 Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blot).....	52
3.2.3.5 Co-Immunopräzipitation.....	53
4 Ergebnisse.....	55
4.1 Klonierung der ORFs in Expressionsplasmide.....	55
4.1.1 PCR und BP Rekombinationsreaktion.....	55
4.1.2 pDEST-ORF-N, pDEST-ORF-C, pGADT7-ORF und pGBKT7-ORF.....	57
4.2 Immunfluoreszenzen.....	60
4.2.1 pDEST-eGFP-N.....	61
4.2.2 Envelope- und Membranprotein.....	62
4.2.3 Akzessorische Proteine.....	63
4.2.3.1 TO-PRO3-Kernfärbung.....	65
4.2.3.2 Calnexin.....	66
4.2.3.3 Lamin B1.....	67
4.2.4 Einzelne pGADT7 und pGBKT7 Immunfluoreszenzen.....	68
4.2.5 Zusammenfassung der Immunfluoreszenzen.....	70
4.3 Protein-Protein-Interaktion.....	71
4.3.1 Yeast-Two-Hybrid Screening.....	71

4.3.2 Co-Immunopräzipitation.....	73
5 Diskussion.....	75
5.1 Lokalisations- und Interaktionsstudien.....	75
5.2 Proteine des Endoplasmatischen Retikulums.....	77
5.2.1 Envelopeprotein.....	77
5.2.2 ORF 7b.....	78
5.2.3 ORF 6.....	79
5.2.4 ORF 8a.....	81
5.2.5 Proteine des Golgi-Apparates.....	82
5.2.6 Membranprotein.....	82
5.2.7 ORF 3a.....	83
5.2.8 ORF 7a.....	85
5.3 Vesikuläre Strukturen.....	86
5.3.1 ORF 8b.....	86
5.3.2 ORF 9b.....	86
5.3.3 ORF 14.....	87
5.4 Proteine des Nukleus.....	88
5.4.1 ORF 3b.....	88
6 Zusammenfassung und Ausblick.....	89
7 Anhang.....	91
7.1 Abkürzungen.....	91
7.2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	93
7.2.1 Abbildungen.....	93
7.2.2 Tabellen.....	95
7.3 Literaturverzeichnis.....	95
7.4 Danksagung.....	109
7.5 Lebenslauf.....	109

1 Einleitung

"Severe acute respiratory syndrome is
the plague of the new millennium."

So fasste Thomas Abrahams in seinem Werk "Twenty-First Century Plague: The Story of SARS" die Pandemie Anfang 2003 zusammen. Ende 2002/Anfang 2003 brach in Süd-Ost-Asien eine atypische Pneumonie, das "Schwere Akute Respiratorische Syndrom" (SARS) aus. In den folgenden Monaten kam es zur weltweiten Verbreitung der Erkrankung und zu etwa 800 SARS-assoziierten Todesfällen. Der SARS-Erreger, ein Coronavirus, wurde rasch als Ursache der Pneumonie identifiziert.

Im alltäglichen Leben kümmerten uns Coronaviren in der Regel nicht mehr als den winterlichen Schnupfen, den sie auslösen können. Das SARS-Coronavirus führte hier plötzlich zum Wandel. Die Coronaviren wurden nicht nur reißerisch in den Medien besprochen, sondern ebenfalls wieder Interessensmittelpunkt in der Forschung.

1.1 Epidemiologie des SARS-Ausbruches

In der chinesischen Provinz Guangdong kam es erstmals im November 2002 zum Ausbruch einer atypischen Pneumonie mit hoher Letalität, die sich in den folgenden drei Monaten über 27 Länder ausbreitete und zur ersten Pandemie des 21. Jahrhunderts führte [130].

Die Pneumonie häufte sich bei Krankenhausangestellten und deren Familienmitgliedern. Diesen Fällen folgten Krankheitsfälle in Hong-Kong, Singapur, Vietnam und Toronto. Übertragungsketten konnten die Erkrankungsfälle miteinander in Verbindung bringen. Viele der Infektionen konnten auf einen einzigen Bediensteten des Gesundheitssystems der Provinz Guangdong zurückgeführt werden. Nachträglich stellte sich heraus, dass dieser Mann Hong-Kong besuchte, wegen einer Pneumonie hospitalisiert wurde und dort verstarb.

Carlo Urbani, WHO-Spezialist für Infektionskrankheiten, war der Erste, der erkannte, dass das Krankheitsbild untypisch war und eine Gefahr für die Gesundheit der Allgemeinheit darstellte

[132]. Die WHO initiierte aufgrund der schnellen Ausbreitung der Pneumonie im März 2003 eine globale Warnung (vgl. Abbildung 1).

Das Krankheitsbild wurde "Severe Acute Respiratory Syndrome" (SARS) genannt [59].

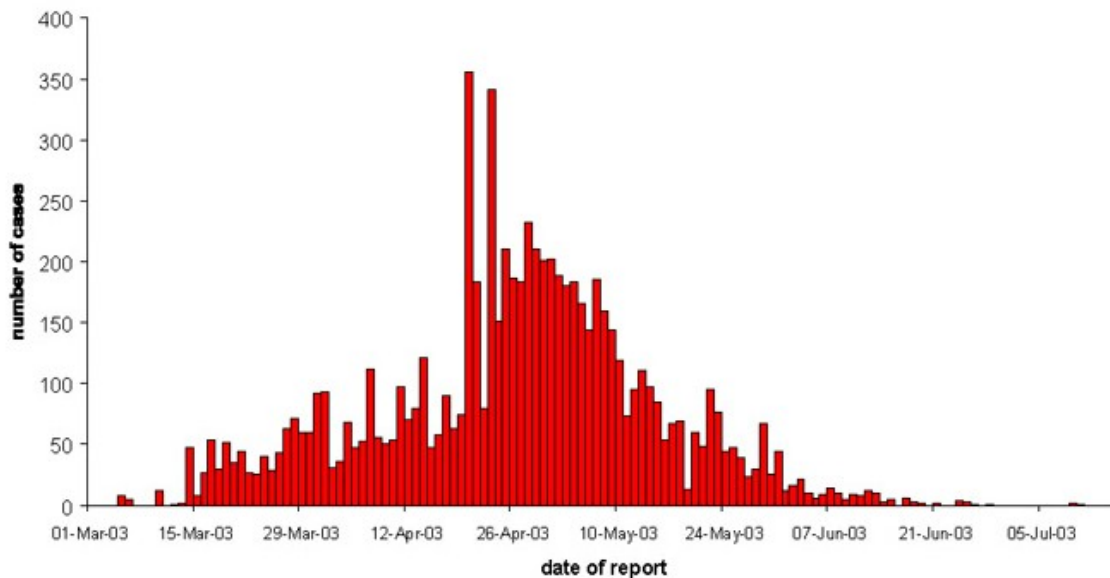


Abbildung 1: Weltweite Neuinfektionen während der SARS-Epidemie von Frühjahr bis Sommer 2003.

Quelle: WHO [131].

Die Transmissionsraten verminderten sich während der Epidemie rasch durch verminderte Kontakte in der Bevölkerung, verbesserte Kontrollen und erhöhter Wachsamkeit in Krankenhäusern sowie schnellerer Hospitalisation symptomatischer Patienten [98].

Bis zum Ende des Ausbruchs im August 2003 berichtete die WHO von 8096 Erkrankungen mit 774 SARS-bedingten Todesfällen [130].

Ein Jahr später, im Winter 2003 und Frühjahr 2004, wurden erneut einige sporadische SARS-Fälle in derselben Region gemeldet ([74], [112]).

Innerhalb von kurzer Zeit wurde von verschiedenen Laboratorien der auslösende Erreger von SARS entdeckt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen, Immunfluoreszenzfärbungen und immunhistochemische Färbungen wiesen auf ein Virus aus der Familie der Coronaviridae hin. In manchen Fällen konnte das Virus in Sekreten des oberen Atemtraktes nachgewiesen und von dort aus kultiviert werden. Im Serum von Patienten waren immunologische Reaktionen gegen das

Coronavirus nachweisbar ([59], [76]). Virale Antigene wurden im respiratorischen, alveolären und intestinalen Epithel sowie in Milz, Lymphknoten, Leber, Herz, Niere, ZNS und Skelettmuskulatur bestätigt (Review vgl. [32], [66]).

Nach seiner Entdeckung und der Klärung seiner ätiopathologischen Rolle wurde der neue Erreger als SARS-Coronavirus (SARS-CoV) bekannt ([21], [59], [94], [96]). Die Koch Postulate, von Rivers modifiziert, wurden erfüllt: Isolation des Virus aus dem Wirt, Kultivierung in Wirtszellen, Filterbarkeit, Induktion einer vergleichbaren Erkrankung im ursprünglichen Wirtsorganismus oder einem verwandten Organismus, Reisolation und Beweis einer spezifischen Immunantwort gegen das Virus [91].

1.2 Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom

1.2.1 Klinik

Die WHO unterscheidet zwischen "vermuteten" und "wahrscheinlichen" SARS-Fällen. Ein "vermuteter SARS-Fall" liegt vor, wenn eine Person fiebert ($>38^{\circ}$ C), Symptome des unteren Respirationstraktes aufweist und darüber hinaus ein Kontakt zu einer Person, die unter SARS-Verdacht steht oder in der Vorgeschichte eine Reise in eine geographische Region mit bekannten Transmissionen unternommen hat, besteht. Ein "wahrscheinlicher Fall" erfüllt zusätzlich folgende Kriterien: radiologische Hinweise auf eine Pneumonie, ARDS („*Acute Respiratory Distress Syndrome*“) oder ungeklärte tödliche respiratorische Erkrankung, bei der die Autopsie des Patienten die Pathologie eines ARDS zeigt [152].

Initial äußert sich SARS durch persistierendes Fieber, trockenen Husten, Schüttelfrost, Myalgien und Übelkeit ([20], [96]). Später kommt es zu progressiver Dyspnoe, Tachypnoe und Pleuritiden. In wenigen Fällen äußern sich Symptome des oberen Respirationstraktes wie Rhinorrhoe oder Halsschmerzen. Teilweise wurde eine wässrige Diarrhoe beobachtet ([94], [96]).

Als Komplikation der Erkrankung kann es zu einem Pneumomediastinum kommen. 20-30% der Patienten bedürfen der Intensivüberwachung mit Einsatz von Beatmungsgeräten ([94], [96]).

Die Prognose hängt von zeitgleich bestehenden medizinischen Problemen sowie vorbestehenden Grunderkrankungen des Patienten ab. Besondere Risikofaktoren sind hohes Alter, Neutrophilie,

Neutropenie, schwere Lymphozytopenie, initial verminderte Anzahl von CD4(+)- und CD8(+)-Lymphozyten, hohes LDH, erhöhte ALT, späte Gabe von Ribavirin und Steroiden, chronische Hepatitis B, Diabetes Mellitus und Herzerkrankungen ([70], [94], [133]).

Die Mortalitätsrate von SARS beträgt pauschal etwa 10% : <1% bei unter 24-jährigen, 6% bei 15- bis 44-jährigen, 15% bei 45- bis 64-jährigen. Bei über 65-jährigen Patienten liegt die Mortalität über 50% ([37], [94], [150]). Todesursache ist meist ein progressives respiratorisches Versagen, welches eher durch die immunologische Reaktion als durch eine unkontrollierte Virusreplikation bedingt ist. Bei Kindern unter 12 Jahren ist der Verlauf rückblickend benigne und hat eine gute Prognose. Ein asymptomatischer oder milder Verlauf ist bei Infektion mit SARS-Coronaviren untypisch und leistet keinen Beitrag zur Ausbreitung des Virus. Eine Virusisolation ist bei solchen Personen nicht möglich [94].

Histologisch dominiert ein diffuser alveolärer Schaden [7]. Es kommt zu einer entzündlichen Exsudation in die Alveolen und den Interstitialraum mit Fibrosierung ([59], [60]). Weiterhin tritt ein Verlust von Zilien und eine Plattenepithelmetaplasie auf. Es wurden Riesenzellinfiltrate sowie eine Anhäufung von Makrophagen in den Alveoli und im Interstitium beobachtet. Das Bild ähnelt dem des ARDS [87]. SARS-Coronavirus-Proteine lassen sich in Pneumozyten der Lungenperipherie nachweisen [141]. Die Infektionsherde sind plaqueförmig verteilt [141].

1.2.2 Transmission

Die SARS-Coronavirus-Infektion kann im Serum durch Antikörper, in Sputum, bronchioalveolärer Flüssigkeit, Urin und Stuhl durch PCR nachgewiesen werden ([76], [94], [96]). Es handelt sich überwiegend um eine Tröpfcheninfektion ([21], [96]). Zur Infektion kommt es auch bei direktem oder indirektem Kontakt von Schleimhäuten mit dem Erreger ([94], [96]). Da das Virus im Stuhl nachweisbar ist, kann die Möglichkeit einer fäkal-oralen Übertragung nicht ausgeschlossen werden ([21], [76]). Dieser Weg sowie der direkte Luftweg spielen allerdings eine untergeordnete Rolle bei der Erregerausbreitung. Übertragungen über Nahrungsmittel oder Wasser sind nicht bekannt [94].

Die Inkubationszeit beträgt 2 bis 10 Tage, maximal 14 Tage. Die mittlere Inkubationszeit wird mit 6 Tagen angegeben. Es ist nicht klar, ob der Infektionsweg die Inkubationszeit beeinflusst. Die Viruslast ist mit Beginn der Symptome im Respirationstrakt niedrig. Ein Maximum wird um den 10. Tag erreicht, ein Abfall auf das Ausgangsniveau am 15. Tag. Die Viruslast im Stuhl ist am 13.

bis 14. Tag maximal ([94], [96]).

Die Transmissionseffizienz ist abhängig von der Viruslast und dem Abstand zum infektiösen Patienten. Das SARS-Coronavirus gilt als mäßig kontagiös. Unter den Infizierten gibt es allerdings sogenannte "Superspreeder", die eine besonders hohe Transmissionsrate aufweisen [98]. Ohne sie wäre es wahrscheinlich nicht zu der globalen Ausbreitung des SARS-Coronavirus gekommen [2]. Dieses Phänomen ist nicht durch virale Faktoren bedingt, da Menschen, die über "Superspreeder" infiziert wurden, nicht selbst "Superspreeder" wurden. Wahrscheinlich spielen biologische Faktoren des Wirtes sowie Umweltfaktoren wie aerosol-produzierende Interventionen, zum Beispiel bei der Bronchoskopie, die größere Rolle [94].

Das SARS-Coronavirus ist ein bis zwei Tage in Faeces oder Urin bei Raumtemperatur stabil. Bei alkalischem pH sowie im Stuhl von Patienten mit Diarrhoe bleibt das SARS-Coronavirus bis zu 4 Tage infektiös. Das Virus ist üblichen Desinfektionsmitteln gegenüber empfindlich [129].

Eine Eradikation des Virus wäre grundsätzlich möglich, wenn es (1) eine Vaccine gäbe, (2) gute diagnostische Möglichkeiten, um die Infektion mit dem Virus zu sichern und wenn (3) der Mensch zur Replikation unentbehrlich wäre. Da im Falle des SARS-Coronavirus ein Tierreservoir vorhanden ist, erscheint dies unmöglich. Die Prävention einer weiteren Ausbreitung steht also im Vordergrund der Bemühungen. Die Eingrenzung der Verbreitung geschieht durch (1) frühzeitige Diagnose der ersten Krankheitsfälle, (2) Isolation und Quarantäne der Erkrankten und (3) Überwachung von fieberigen Patienten während Epidemien.

1.3 Ursprung und Phylogenese

Coronaviren gehören zur Familie der Coronaviridae, Ordnung der Nidovirales. Sie werden nach serologischen und molekularen Charakteristika in drei Gruppen aufgeteilt (vgl. Abbildung 2).

In Gruppe 1 und 2 werden die Säugetierviren zusammengefasst, darunter auch die humanpathogenen Viren HCoV-229E (Gruppe 1) und HCoV-OC43 (Gruppe 2). Viren der Gruppe 2 besitzen eine Hämagglutininesterase, ähnlich der des Influenza C-Virus. Gruppe 3 beinhaltet nur IPV ([39], [80], [81]).

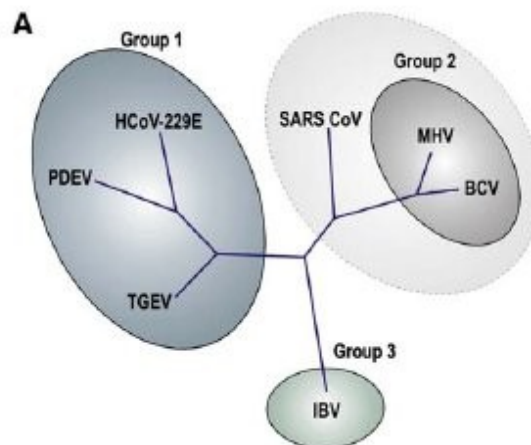


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum des SARS-Coronavirus.

SARS-CoV wird in Subgruppe 2a klassifiziert. Gruppe 1 enthält HCoV-229E (Humanes Coronavirus 229E), PDEV (Porcine Diarrhoea Epidemic Virus), TGEV (Transmissible Gastroenteritis Virus). Gruppe 2 enthält MHV (Mouse Hepatitis Virus), BCV (Bovine Coronavirus). Gruppe 3 enthält IBV (Infectious Bronchitis Virus). Quelle: Meier et al., 2006 [81].

Zunächst wurde angenommen, dass es sich beim SARS-Coronavirus um einen Vertreter einer neuen Gruppe, der Gruppe 4, handelt ([80], [99]). Aber Analysen von Snijder et al. [111] klassifizieren das SARS-Coronavirus in eine frühe Abspaltung der Gruppe 2, in die sogenannte Subgruppe 2a (vgl. Abbildung 2). Zwischen dem SARS-Coronavirus und den Coronaviren der Gruppe 2 gibt es keine Kreuzreaktivität [111].

Der Ausbruch eines Virus aus seinem angestammten Reservoir benötigt mehrere Voraussetzungen: Kontakt zwischen den verschiedenen Spezies, Übertragung des Virus über die Speziesgrenze hinaus sowie Transmission und Adaptierung des Virus an die neue Spezies [13]. Prädispositionsfaktoren zum Interspeziestransfer können in Charakteristika des Pathogens liegen (zum Beispiel Mutation, Rekombination), beim Wirt (zum Beispiel Immunsuppression), bei der Population des Wirtes (zum Beispiel Größe, Verhalten, Bewegung) oder in ökologischen Faktoren (zum Beispiel Landbewirtschaftung, Städteausdehnung, Benutzung des Landes) (Review vgl. [82]).

Insbesondere RNA-Viren haben ein höheres Risiko, Krankheitserreger für den Menschen zu werden, da sie über eine hohe Mutationsrate und kurze Generationszeit verfügen [15]. Pathogene, die mehr als eine Spezies erreichen, haben mehr Chancen weitere Speziesbarrieren zu überwinden als solche, die auf eine Spezies spezialisiert sind. Besonders Coronaviren sind in der Lage, sich

Einleitung

durch episodische Evolution und positive Selektion schnell zu adaptieren [3]. Molekulare epidemiologische Studien zeigen, dass die SARS-Coronaviren der zwei Ausbrüche 2003 und 2004 nicht dieselben waren [112]. Dies deutet auf eine unabhängige Überwindung der Speziesgrenze hin [128].

Ein zoonotischer Ursprung des SARS-Coronavirus wird von mehreren Arbeitsgruppen vermutet. Genomvergleiche zeigen nur spärliche Ähnlichkeiten zwischen dem SARS-Coronavirus und anderen humanpathogenen Coronaviren ([80], [99]). In retrospektiven Studien konnten Antikörper gegen das SARS-Coronavirus oder gegen verwandte Viren nicht in der Bevölkerung nachgewiesen werden [59]. Aber in serologischen Untersuchungen bei Tierhändlern während der Epidemie 2002/2003 wurden vermehrt SARS-Coronavirus-Antikörper nachgewiesen ([33], [136]). Patienten der frühen Phase der Epidemie kamen statistisch vermehrt mit exotischen Tieren in Kontakt [136]. Zudem waren die zoonotischen Viren der chinesischen Märkte mit den SARS-Coronaviren der Epidemie fast identisch (Review vgl. [33], [128]). Molekular-epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass man die SARS-Coronaviren in drei Gruppen einteilen kann: Die Gruppe der frühen, der mittleren und der späten Epidemie. Die Virusisolate der frühen Epidemie zeigen die größte Ähnlichkeit zu den zoonotischen Viren [120].

Es konnten Coronaviren aus Larvenrollern (*Paguma Larvata* aus der Familie der *Viverridae*) und Marderhunden (*Nyctereutes Procyonoides* aus der Familie der *Canidae*) isoliert werden, deren Sequenzen denen des humanpathogenen SARS-Coronavirus sehr ähnelten ([33], [112]). Vermutlich stellen diese Tiere eine direkte Infektionsquelle für den Menschen dar [128]. Unklar ist, ob sie dabei die einzige Infektionsquelle, intermediäre Wirte oder das natürliche Reservoir der SARS-Coronaviren sind.

Eine Untersuchung von Fledermäusen (Genus *Rhinolophus*) zeigte, dass viele Spezies Hinweise auf Infektionen mit SARS-ähnlichen Coronaviren aufwiesen [72]. Ferner wurde im wildlebenden chinesischen *Rhinolophus sinicus* genetisches Material gefunden, welches mit SARS-Coronaviren eng verwandt ist. Es kann also angenommen werden, dass die Fledermäuse *Rhinolophus sinicus* das natürliche Reservoir der SARS-Coronaviren sind und dass das SARS-Coronavirus von diesem Reservoir auf den Menschen übergegangen ist [65].

Die Möglichkeit einer direkten Transmission von Fledermäusen auf den Menschen kann nicht ausgeschlossen werden (Review vgl. [128]). Untersuchungen der Bindung verschiedener Coronavirus-Spikeproteine an den humanen Zellrezeptor ACE 2 zeigen jedoch, dass nur SARS-

Coronavirus-Isolate der 2002/2003-Epidemie effektiv an humanes ACE 2 binden [73]. Um diese Affinität zu erreichen, wird diskutiert, ob eine rapide Evolution in einem intermediären Wirt (hier eventuell *Paguma Larvata*) nötig ist, um eine Infektiosität von Coronaviren beim Menschen zu erreichen [128].

1.4 Allgemeines über Coronaviridae

1.4.1 Coronaviren als Pathogene

RNA-Viren gehören zu den häufigsten Erregern von Schnupfen, einer selbstlimitierenden Erkrankung des oberen Respirationstraktes. Bei Erwachsenen sind Coronaviren in 7-18% der Fälle bei Erkrankungen des oberen Respirationstraktes nachweisbar (Review vgl. [40]).

Coronaviren sind weltweit verbreitet und können sowohl Tiere als auch Menschen infizieren. Die tierpathogenen Viren sind meist Ursache hochvirulenter Infektionen des Gastrointestinal- und Respirationstraktes. Sie können ebenfalls hepatische und neurologische Infektionen verursachen ([39], [80]).

Es wurden einige wichtige humanpathogene Coronaviren identifiziert. HCoV-229E und HCoV-OC43 verursachen ungefährliche Infektionen des oberen Respirationstraktes. HCoV-NL63 wurde als Ursache von Infektionen des unteren Respirationstraktes ausfindig gemacht [124]. Vor kurzem wurde HKU1 als weiteres Coronavirus charakterisiert, welches ebenfalls Pneumonien verursachen kann [134]. Die größte Inzidenz an coronavirus-bedingten Erkrankungen findet man im Winter [39]. Nach einer abgelaufenen Infektion bildet sich keine dauerhafte Immunität aus.

Das SARS-Coronavirus ist das einzig bekannte Coronavirus, das beim Menschen zu einem lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf führen kann [39].

1.4.2 Allgemeiner Aufbau von Coronaviren

Coronaviren sind die größten bekannten RNA-Viren. Ihr einzelsträngiges Plus-Strang-Genom beträgt 27 bis 32 kb [39]. Kennzeichnend für ein Plus-Strang-RNA-Genom ist, dass die genomische RNA direkt als mRNA fungiert. Vom 5'-Ende ausgehend nimmt ein großes Replikasegen etwa zwei

Einleitung

Drittel der Gesamtinformation des Genoms ein. Am 3'-Ende befinden sich die Gene der Struktur- und der gruppen-spezifischen Proteine, auch akzessorische Proteine genannt. Die Genome der Coronaviren und ihrer Verwandten vom Order der Nidovirales sind polycistronisch aufgebaut [111].

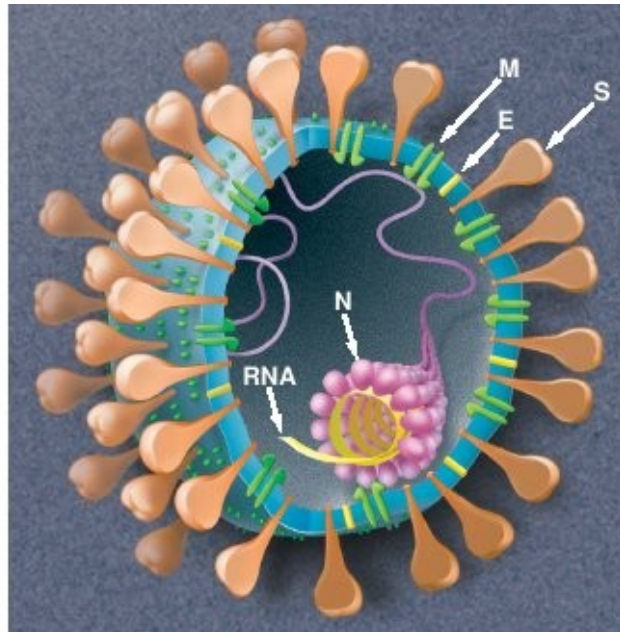


Abbildung 3: Coronavirusaufbau mit Nukleokapsid, Lipidhülle und den wichtigen Strukturproteinen.

N: Nukleokapsidprotein, M: Membranprotein, E: Envelopeprotein, S: Spikeprotein. Quelle: Holmes und Enjuanes, 2003 [44].

Das Nukleokapsidprotein packt die virale genomische RNA zu einer helikalen Struktur zusammen und bildet somit den Kern des Virions. Dieser ist von einer Lipidhülle umgeben, die der Wirtszelle entstammt und in der das Membranprotein vorkommt (vgl. Abbildung 3). Mit dem Membranprotein assoziiert sind das Envelope- und das Spikeprotein. Letzteres bildet Oligomere in der Virushülle, die für die Bindung des Virus an den Zellrezeptor zuständig sind. Die Gene dieser strukturellen Proteine kommen invariabel in derselben Reihenfolge vor: 5'-S-E-M-N-3' [63].

1.4.3 Morphologie der Coronaviren

Unter dem Elektronenmikroskop ist die charakteristische Morphologie der Coronaviren gut zu

Einleitung

erkennen. Die keulenartige Oberflächenausbuchtungen, die den Partikel umgeben, geben der Virusfamilie ihren Namen. Es handelt sich dabei um das Spikeprotein, das aus der Lipidhülle der Viren hervorsticht, und dem Partikel sein typisches Aussehen verleiht (vgl. Abbildung 4).

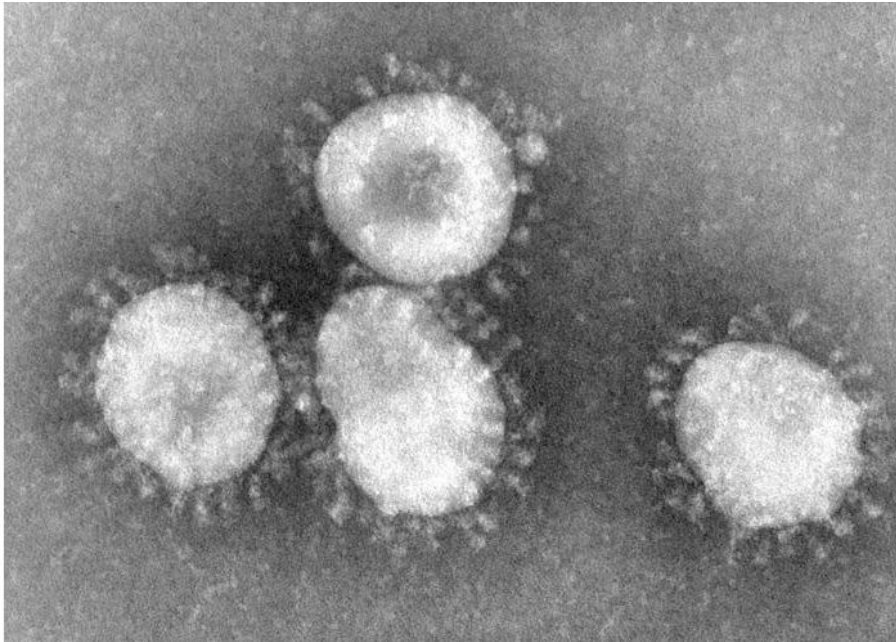


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Coronaviren.

Die Ausbuchtungen um die Partikel werden vom Spikeprotein gebildet. Der Durchmesser der Partikel variiert zwischen 60 und 130 nm ([59], [94]). Quelle: Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), identification number #4814.

1.4.4 Replikation der Coronaviren

Die Adhäsion des Virus an die Wirtszelle geschieht durch Interaktion des Spikeproteins mit seinem Rezeptor. Der Eintritt des Virus in die Zelle setzt die Fusion von Virushülle und Zellmembran voraus. Die Fusion der Membranen findet nach Konformationsänderung des Spikeproteins statt. Ursache hierfür kann zum einen die Interaktion mit dem Zellrezeptor sein, zum anderen kann der erniedrigte pH innerhalb der Endozytosevesikel die Fusion triggern. Ob beim SARS-Coronavirus der Eintritt des Virus pH-abhängig ist oder nicht, ist noch nicht geklärt. Das virale Genom wird ins Zytoplasma freigesetzt (Review vgl. [43], [138]).

Plus-Strang-RNA-Viren packen ihre RNA-Abhängige-RNA-Polymerase (RdRp) nicht in das Virion ein. Deshalb muss die RdRp erst synthetisiert werden, bevor sie die Replikation der genomischen RNA und die Synthese von subgenomischen mRNAs katalysieren kann ([1], [43]). Die nicht-

strukturellen Proteine des Replikationskomplexes, zu denen auch die RdRp gehört, entstehen indem ORF 1a und 1b direkt von Enzymen der Wirtszelle translatiert werden [43].

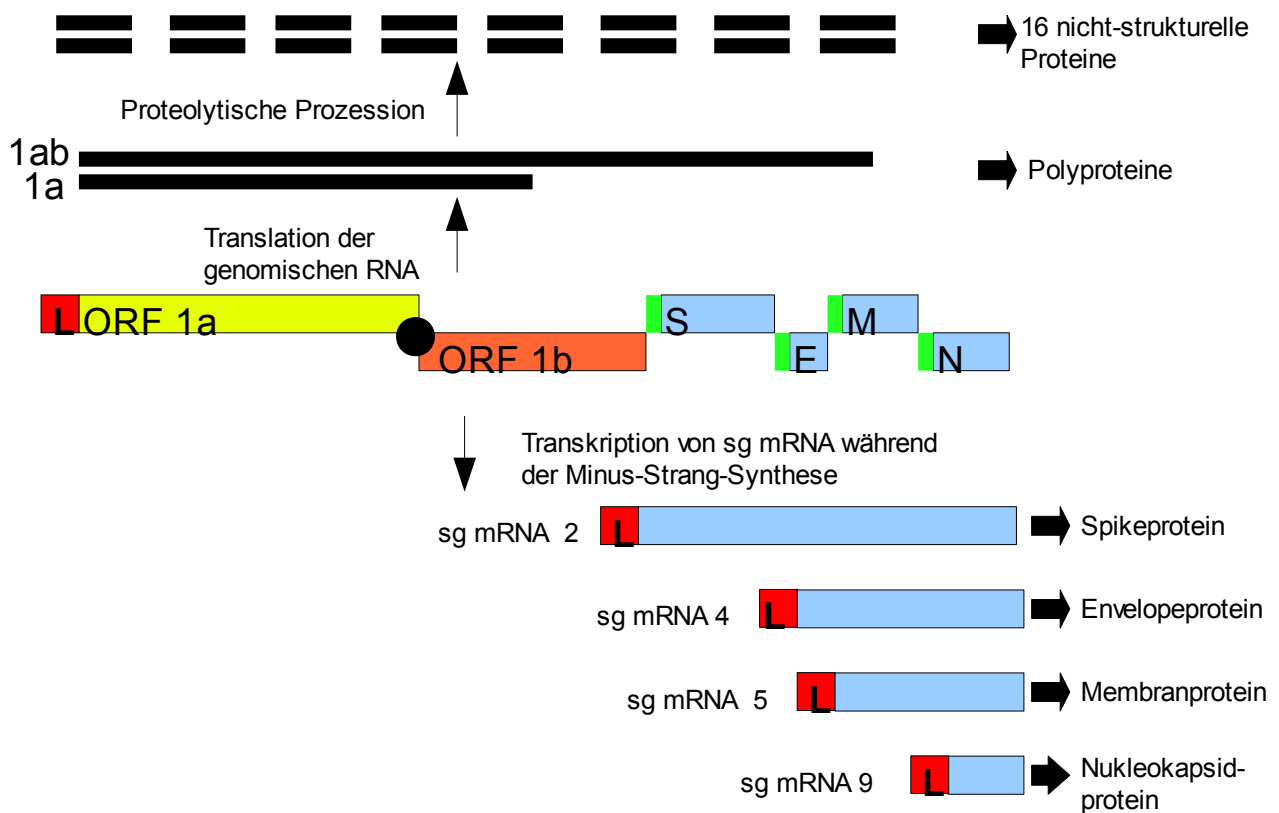


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Replikationsmechanismus von Coronaviren.

Durch ribosomales Frameshifting wird die Sequenz von ORF 1a um die Sequenz von ORF 1b verlängert. Schwarzer Punkt: Vorgesehene ribosomale Frameshifting Sequenz. Es entstehen zwei Polyproteine (pp1a und pp1ab), deren Mengen zueinander in fester Relation stehen. Die Polyproteine werden durch viruseigene Proteinasen in 16 nsps prozessiert. Aus einem Großteil dieser nsps entsteht der Replikationskomplex. Subgenomische mRNAs entstehen durch Unterbrechung der Minus-Strang-Synthese bei einer transkriptionsregulierenden Sequenz (TRS) (grüner Balken) und Translokation des Stranges zur Leader-TRS (L im roten Kasten). Diese subgenomischen mRNAs kodieren für die strukturellen und akzessorischen Proteine. Beispielhaft sind lediglich die subgenomischen mRNAs der Strukturproteine dargestellt. Verändert nach Ziebuhr et al, 2000 [151] und Sawicki et al, 2007 [101].

Das entstehende Polyprotein 1a (pp1a) kann auf kodierende Sequenzen von ORF 1b verlängert werden, um pp1ab zu bilden ([22], [54], [150]). Dazu wird kurz vor Ende des ORFs 1a ein ribosomales Frameshifting in den -1 Leserahmen benötigt, um das Stopkodon von ORF 1a zu unterdrücken ([6], [121], [150]). Die so entstandenen Polyproteine 1a und 1ab werden von viralen Proteinasen prozessiert (vgl. Abbildung 5), um die funktionalen Elemente des Replikationskomplexes freizusetzen ([111], [151]).

Der RNA-Strang wechselt im Laufe des Replikationszyklus seine Funktion von „mRNA“ zu „Matrize zur Genomreplikation“ (Review vgl. [1]). Es kommt zur Synthese von mehreren Minus-Strang-RNAs genomischer und subgenomischer Länge. Die subgenomischen (sg) mRNAs kodieren für strukturelle und akzessorische ORFs am 3'-Ende des Genoms.

Coronaviren und Arteriviren haben eine einzigartige Strategie, um mRNAs subgenomischer Größe zu synthetisieren (Review vgl. [101]). Während der Synthese des Minus-Stranges vom 3'-Ende aus trifft der Replikationskomplex auf eine transkriptionsregulierende Sequenz (TRS). TRS sind in der Leadersequenz und am 5'-Ende von Genen vorhanden (vgl. Abbildung 5). Eine bestimmte Fraktion der Replikationskomplexe ignoriert die TRS und führt die Synthese fort. Die andere unterbricht die Synthese des Minus-Stranges, um sie nach einer Translokation bei der Leader-TRS fortzusetzen. Jede sg mRNA enthält also eine Leadersequenz, die vom 5'-Ende des Genoms abstammt sowie ein Ende, welches vom 3'-Poly-(A)-Schwanz bis zu einer TRS oberhalb von bestimmten strukturellen und akzessorischen ORFs reicht. Die so diskontinuierlich synthetisierte Minus-Strang-RNA dient als Matrize für die sg mRNA-Synthese.

Die Strukturproteine finden im Ausknospungskompartiment (*Budding Site*) zueinander [43]. Im intermediären Kompartiment, einer spezialisierten Domäne des Endoplasmatischen Retikulums die sich bis in die erste Cis-Zisterne des Golgi-Apparates ausdehnt [57], befinden sich die Replikations-/Transkriptionskomplexe (RTC), die hauptsächlich aus nicht-strukturellen Proteinen bestehen und für die Virusreplikation und -zusammensetzung zuständig sind. Die RTCs befinden sich auf *double-membrane vesicles* (DMV) [125]. Hierbei handelt es sich um gepaarte Membranen, die wahrscheinlich aus Membranen des Endoplasmatischen Retikulums entstehen. Die Hüllen der Coronaviren bilden sich aus Prä-Golgi-Membranen ([18], [53], [57]). Die Virionen werden durch Exozytose freigesetzt [43].

1.5 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus

1.5.1 Genom

Das Genom des SARS-Coronavirus wurde etwa zeitgleich im März 2003 von Marra et al. [80], Rota et al. [99] und Drosten et al. [21] sequenziert. Es handelt sich um ein einzelsträngiges Plus-Strang-RNA-Genom von etwa 29 727 bp (den Poly-(A)-Schwanz nicht eingerechnet) ([80], [99]).

Einleitung

Das Genom kodiert für insgesamt 15 offene Leserahmen (ORFs). Am 5'-Ende befindet sich eine Cap-Struktur, am 3'-Ende ein Poly-(A)-Schwanz. Die 5'-, beziehungsweise 3'- nicht-translatierten Regionen, bestehen jeweils aus 265, beziehungsweise 342 Nukleotiden ([111], [149]).

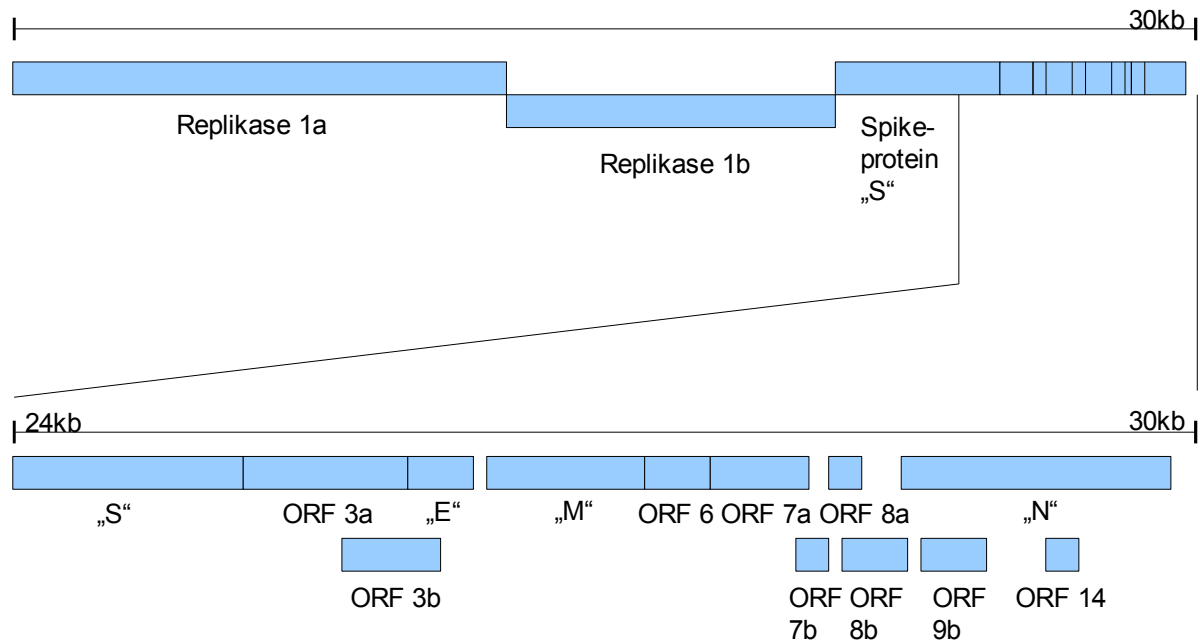


Abbildung 6: Genomaufbau des SARS-Coronavirus.

Der untere Anteil stellt das 3'-Ende des Genoms detailliert dar. Die vier Strukturproteine sind invariabel in der Reihenfolge 5'-S-E-M-N-3' zu finden. Dazwischen befinden sich die überlappenden gruppenspezifischen Gene des SARS-Coronavirus. Verändert nach Marra et al., 2003 [80].

Coronaviren exprimieren polycistronische Gene [121], das heißt eine einzelne mRNA enthält die Information zur Synthese mehrerer Proteine.

Das SARS-Coronavirus synthetisiert acht subgenomische mRNAs verschiedener Länge [111]. Vier der acht subgenomischen mRNAs sind bicistronisch [111]. Die vorgeschlagene Kernsequenz der transkriptionsregulierenden Sequenz, die zur Transkription der subgenomischen mRNAs unentbehrlich ist, variiert in der Literatur. Marra et al. [80] schlagen 5'-CUAAAC-3' vor, während Rota et al. [99] 5'-AAACGAAC-3' vorschlagen.

Das große 5'-terminale ORF 1 bildet das bicistronische Replikasegen (vgl. Abbildung 5 und Abbildung 6). Das Gen ist unterteilt in einen 1a- und 1b-Leserahmen. Diese zeigen in Länge und Sequenz Homologien zu Replikaseproteinen anderer Coronaviren.

Snijder et al.	Marra et al.	Rota et al.	Nukleotide	Größe (bp)	Größe (AS)
1	1a		265 - 13,398	13,15	4,38
nsp1					180 (Met1-Gly180)
nsp2					638 (Ala181-Gly818)
nsp3					1,922 (Ala819-Gly2740)
nsp4					500 (Lys2741-Gln3240)
nsp5					306 (Ser3241-Gln3546)
nsp6					290 (Gly3547-Gln3836)
nsp7					83 (Ser3837-Gln3919)
nsp8					198 (Ala3920-Gln4117)
nsp9					113 (Asn4118-Gln4230)
nsp10					139 (Ala4231-Gln4369)
nsp11					13 (Ser4370-Val4382)
1	1b		13,398 - 21,485	7,89	2,63
nsp12					932 (Ser4370-Gln5301)
nsp13					601 (Ala5302-Gln5902)
nsp14					527 (Ala5903-Gln6429)
nsp15					346 (Ser6430-Gln6775)
nsp16					298 (Ala6776-Asn7073)
2	S	S	21,492 - 25,259	3,77	1,26
3a	3	X1	25,268 - 26,092	825	274
3b	4	X2	25,689 - 26,153	465	154
4	E	E	26,117 - 26,347	228	76
5	M	M	26,398 - 27,063	666	221
6	7	X3	27,074 - 27,265	192	63
7a	8	X4	27,273 - 27,641	369	122
8b	11	X5	27,864 - 28,118	255	84
9a	N	N	28,120 - 29,388	1,27	422
7b	9		27,638 - 27,772	135	44
8a	10		27,779 - 27,898	120	39
9b	13		28,130 - 28,426	297	98
	14		28,583 - 28,795	213	70

Tabelle 1: Verschiedene Nomenklaturen in der Literatur.

Die fett hervorgehobene Nomenklatur wurde in dieser Arbeit bevorzugt verwendet.

Die kleineren 13 ORFs, die sich 3'-wärts des Replikasegens befinden, kodieren für vier Strukturproteine und neun akzessorische Proteine (vgl. Abbildung 6 und Tabelle 1). Bei den Strukturproteinen handelt es sich um das Spike- (S), Membran- (M), Nukleokapsid- (N) und Envelopeprotein (E).

Zwischen diesen Genen sind acht, beziehungsweise neun akzessorische ORFs angeordnet: ORF 3a, ORF 3b, ORF 6, ORF 7a, ORF 7b, ORF 8a, ORF 8b und ORF 9b. Marra et al. [80] beschreiben zusätzlich ein ORF 14 (vgl. Abbildung 6 und Tabelle 1). Bei letzterem ist unklar, ob es in virus-infizierten Zellen exprimiert wird.

1.5.2 Proteom

Man kann drei Hauptaufgaben von viralen Proteinen unterscheiden: (1) Replikation, beziehungsweise Transkription, (2) Strukturgebung und (3) Infektionsmodulation. Letztere interagieren meist mit zellulären Prozessen oder modulieren die Interaktion des Virus mit dem gesamten Wirtsorganismus.

1.5.2.1 Replikationsproteine

Das große Replikasegene am 5'-Ende des Coronavirusgenoms ist gut erforscht. Aus Analogie zu nicht-strukturellen Proteinen (nsps) anderer Coronaviren kann man auf Funktionen und Charakteristika einiger nsps des SARS-Coronavirus schließen.

Die Synthese diverser RNA-Moleküle verlangt eine hohe Komplexität der replikativen Proteine. Die 5'-terminalen ORFs 1a und 1b werden, wie weiter oben bereits besprochen, zu zwei Proteinen translatiert: (1) pp1a mit einer Größe von 486 kDa und (2) pp1ab, das mit 790 kDa entsprechend größer als pp1a ist. Beide werden direkt von der genomischen RNA translatiert. Es entsteht ein spezifisches Verhältnis zwischen ORF 1a und ORF 1b kodierten Proteinen. Posttranslational werden die Polyproteine durch viruseigene Proteasen in 16 nsps gespalten (vgl. Abbildung 5). Enzymatische Aktivitäten der nsps beinhalten unter anderem - wie bei vielen Plus-Strang-RNA-Viren - mehrere Proteinasen, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase sowie eine Helikase ([101], [111], [149]).

Die zentralen und C-terminalen Regionen von pp1a und pp1ab werden von einer chymotrypsin-ähnlichen Protease, 3C-like Protease (3CL^{pro}) gespalten. Diese wird auch *Coronavirus Main Protease* genannt (M^{pro}). Sie spielt eine Schlüsselrolle bei der Prozessierung der Polyproteine und damit für die Replikation [149]. Nsp 3 enthält mehrere Domänen mit unterschiedlichen Funktionen: Die PL2^{pro} Proteaseaktivität sowie die Funktion eines deubiquitinierenden Enzyms. Es kann die Konjugation von Proteinen mit ISG15 (Interferon-stimulated Gene 15) rückgängig machen, und es besitzt eine ADP-Ribose 1"-Phosphatase (ADRP) [101].

Die Replikationsproteine sind in intrazellulären Membranen verankert ([101], [149]). So bildet der membrangebundene Replikationskomplex eine „virus-spezifische Organelle“ [1]. Die Komplexe kommen in der perinukleären Region vor und sind mit Doppelmembranvesikeln, sogenannten

DMVs (*double-membrane vesicles*) assoziiert [101].

1.5.2.2 Strukturproteine

Die strukturellen Proteine besitzen Funktionen, die der Adhäsion, Fusion, Morphogenese und Freisetzung der Viren dienen. Epitope struktureller Proteine konnten im Überstand infizierter Zellkulturen nachgewiesen werden [7].

Das Spikeprotein

Das Spikeprotein ist mit 1255 Aminosäuren das größte Strukturprotein des Virus. Drei Spikeproteine bilden das charakteristische Peplomer, welches für das coronaartige Aussehen der Virusfamilie verantwortlich ist.

Es handelt sich um ein Typ I-Membran-Glykoprotein [99]. Der Aminoterminus auf der Außenseite der Zelle, beziehungsweise des Viruspartikels, ist durch eine einzige Transmembrandomäne mit dem kurzen zytoplasmatischen Carboxyterminus verbunden [150]. Das S-Protein des SARS-Coronavirus besitzt nur geringe Ähnlichkeiten mit den S-Proteinen anderer Coronaviren, verfügt aber über ähnliche Untereinheiten wie seine Verwandten ([99], Review vgl. [43]). Die S1-Untereinheit ist für die Bindung an den Zellrezeptor zuständig. Die S2-Untereinheit, eine Transmembranregion, ist für die Fusion der viralen und zellulären Membranen verantwortlich. Es ist bekannt, dass Modifikationen des S-Proteins die Virulenz und auch den *in vitro* Zelltropismus verändern können [99].

Das humane Rezeptormolekül des SARS-Coronavirus ist Angiotensin-Converting Enzym 2 (ACE 2) [71]. Humanes ACE 2 (hACE 2) ist durchgehend im menschlichen Respirationstrakt vorhanden [49]. Antikörper gegen hACE 2 inhibieren effizient die Infektion, Replikation und Verbreitung von SARS-Coronaviren [109]. Allerdings kann die Verteilung von ACE 2 den Gewebetropismus des Virus nicht allein erklären. So ist zum Beispiel nicht beschrieben worden, dass SARS-Coronaviren Endothelzellen infizieren, obwohl sie den Rezeptor ACE 2 in hoher Konzentration exprimieren [122]. Ein weiterer möglicher Zellrezeptor ist das humane zelluläre Glykoprotein CD209L. CD209L wird in Alveolarzellen Typ II und in Endothelzellen der menschlichen Lunge exprimiert [48].

Protein S induziert im Wirtsorganismus neutralisierende Antikörper [80]. Small interfering RNA (siRNA) kann effektiv und spezifisch die Expression des S-Proteins in SARS-Coronavirus infizierten Zellen hemmen [148]. Dies stellt eine potentielle therapeutische Methode dar, um SARS-Coronavirus Infektionen zu inhibieren [148].

Das Membranprotein

Das Membranprotein hat eine Größe von 221 Aminosäuren. Zwischen dem M-Protein des SARS-Coronavirus und denen einer Vielzahl anderer Coronaviren bestehen signifikante Ähnlichkeiten. Das aminoternale Ende ragt aus der viralen Oberfläche heraus, während der Carboxyterminus ins Virionlumen ragt. Die N-terminale Hälfte beinhaltet drei hydrophobe Transmembranregionen [99].

Das M-Protein wurde bereits in anderen Coronavirusgruppen charakterisiert. Es ist ein elementarer Bestandteil der Virushülle und nimmt den größten Anteil der Hüllproteine ein [86].

M ist wichtig für die Morphogenese des Virions, denn seine Assoziation mit dem Envelopeprotein ist ein essentieller Schritt zur Bildung der viralen Hülle ([86], [126]). Die Interaktion von Protein M mit Protein S führt zu dessen Inkorporation in die Hülle ([126], Review vgl. [29]). Die Assoziation dieser Strukturproteine findet auch in Abwesenheit weiterer viraler Komponenten statt [86]. Das Nukleokapsid wird ebenfalls durch Interaktion mit Protein M in das Virion inkorporiert ([43], [84], [86]).

Das Nukleokapsidprotein

Das Nukleokapsidprotein hat eine Größe von 422 Aminosäuren. Obwohl es insgesamt wenig Ähnlichkeiten zu anderen N-Proteinen aufweist, ist die aminoternale Region in allen Coronaviren gut konserviert [99].

Protein N ist mit der genomischen RNA assoziiert. Während der Zusammensetzung des Virions bindet Protein N das Packaging-Signal der viralen genomischen RNA. Dies führt zur Bildung eines helikalen Nukleokapsids ([80], [99], vgl. Abbildung 3).

Es wurden immunhistochemische Nachweise dieses Proteins im Lungengewebe und in Dünndarmschnitten SARS-infizierter Patienten geführt [7]. In infizierten Zellen wird Protein N im Zytoplasma lokalisiert [139]. In wenigen Zellen kommt es zur Anreicherung des Proteins im

Nukleus [139]. Es soll ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) enthalten [80].

Das Envelopeprotein

Das Envelopeprotein wurde erst spät als drittes Protein der Virushülle entdeckt, da es mit 76 Aminosäuren relativ klein ist ([80], [99]) und nur in geringen Mengen vorkommt [78]. E-Proteine sind innerhalb der Coronavirusgruppen gut konserviert, besitzen aber außerhalb ihrer Gruppen wenig Homologien. Die aminoterminal Homologie ist am schwächsten [106]. Protein E ist ein integrales Membranprotein [126]. Es besteht aus einem hydrophilen luminalen Aminoterminus, einer hydrophoben Region und einem großen hydrophilen zytoplasmatischen Carboxyterminus [16].

In einigen Coronaviren, wie im Transmissible Gastroenteritisvirus (TGEV), ist Protein E essentiell für die Virusreplikation. Dagegen führt im Mouse Hepatitis Virus (MHV) die Deletion des Gens nur zu einer starken Abnahme der Replikation, ohne sie vollkommen zu verhindern [62].

Die zelluläre Expression von Protein M und Protein E führt zur Bildung und Freisetzung von virusähnlichen Partikeln, die morphologisch identisch zu Virionen ohne Spikeproteine sind [126]. Sogar alleinige Expression von Protein E aus cDNA führt zur Freisetzung von Partikeln der Größe von Coronaviren [17]. Bei Koexpression von Protein M wird dieses in die Partikel mitinkorporiert [17]. Trotzdem ist Protein E entbehrlich für das Virusüberleben: Es wurden MHV-Mutanten gezüchtet, in denen Protein E komplett fehlte [62]. Diese Viren sind zwar defekt, aber lebensfähig und infektiös [62].

1.5.2.3 Akzessorische Proteine

Von primärer Bedeutung für Viren sind Replikations- und Strukturgene. Neben diesen vitalen Funktionen verfügen sie aber auch über Gene, die für Virusreplikation und -vermehrung *in vivo* von Vorteil sind [19].

Coronaviren der Gruppe 1 wie das Feline Infectious Peritonitis Virus (FIPV) besitzen drei gruppenspezifische Gene zwischen dem S- und E-Gen und zwei 3'-wärts des N-Gens. In Gruppe 2-Viren wie MHV sind zwei gruppenspezifische Gene zwischen ORF 1a und S sowie zwei weitere zwischen S und E vorhanden. Gruppe 3-Viren wie IBV besitzen zwei gruppenspezifische Gene

zwischen S und E und zwei zwischen M und N [19].

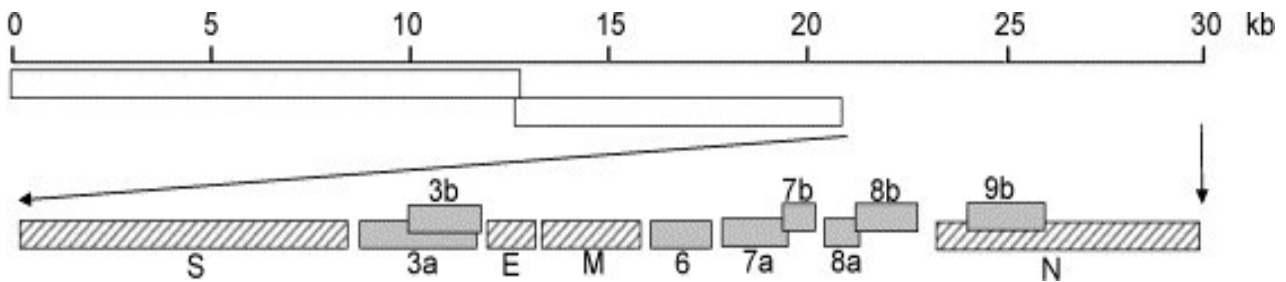


Abbildung 7: Aufbau des 3'-Endes des Genoms mit acht akzessorischen und vier strukturellen ORFs.

Die Strukturproteine sind schraffiert dargestellt: S: Spikeprotein, E: Envelopeprotein, M: Membranprotein, N: Nukleokapsidprotein. Die erhöht dargestellten ORFs werden als zweites Protein von einer bicistronischen sg mRNA exprimiert. ORF 14, ein 213 bp langes potentielles Gen, ist nicht dargestellt, da es von vielen Autoren nicht berücksichtigt wird. Quelle: Tan et al, 2006 [117].

Ungewöhnlicherweise besitzen SARS-Coronaviren eine unvergleichbar höhere Anzahl an akzessorischen Proteinen: Am 3'-Ende des Genoms befinden sich neun potentielle ORFs, deren Längen von 39 bis 274 Aminosäuren variieren ([80], [99], [111], vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7). Diese ORFs zeigen keine Homologien zu bekannten zellulären oder viralen Proteinen ([80], [99], [150]). Sie sind für die Virusreplikation entbehrlich und besitzen Funktionen, die seit kurzem erforscht werden.

In der Zellkultur nicht essentiell, bringen diese gruppenspezifischen Gene *in vivo* einen Vorteil bei der Selektion ([19], [118], [150]). Zum Beispiel sind die akzessorischen Gene des MHV (2a, HE, 4, und 5a) nicht essentiell für das Überleben des Virus, führen aber bei Deletion zu einer signifikanten Attenuierung des Virus in seinem Wirt [19]. Ferner führen Veränderungen des Gens 7b in Felinen Coronaviren [41], des Gens 3 des Swine Enteric and Respiratory Coronavirus [92] oder Deletionen von gruppenspezifischen Genen des FIPV [36] zu einer reduzierten Virulenz der Viren *in vivo*. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Funktionen der spezifischen ORFs in der Virus-Zell-, beziehungsweise Virus-Immunsystem-Interaktion liegen. Wenn man zusätzlich die hohe Mutations- und Rekombinationsrate von RNA-Viren in Betracht zieht, ist es unwahrscheinlich, dass funktionslose akzessorische ORFs dem Genom erhalten bleiben [19].

ORF 3a

ORF 3a hat eine Größe von 274 Aminosäuren und ist somit das größte der akzessorischen ORFs ([80], [99], [118]). ORF 3a liegt zwischen Protein S und Protein E und besitzt eine minimale transkriptionsregulierende Sequenz vor seinem ORF: 5'- ACGAAC -3' (nt 25260-25265) [141]. ORF 3a wird aus der 4,5 kbp subgenomischen mRNA 3 translatiert [99]. Sequenzanalysen zeigen keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen. Weitere Analysen deuten auf ein Signalpeptid hin und sagen drei Transmembrandomänen voraus ([67], [80], [147]). Die carboxyterminale Domäne ist im Zytosol lokalisiert, die aminotermine Domäne im Lumen ([146], vgl. Abbildung 8).

ORF 3a konnte in SARS-Coronavirus-Partikeln nachgewiesen werden und wird in virus-ähnliche Partikel eingepackt. Es ist ein neu-entdecktes strukturelles Protein ([47], [147]) und führt zur Apoptoseinduktion in Vero-E6-Zellen [67]. ORF 3a ist in SARS-Coronavirus infizierten Zellen nachweisbar [47]. Es wurde immunhistochemisch in Lungengewebe und in Dünndarmschnitten nachgewiesen ([7], [67], [141]). Im Serum infizierter Patienten finden sich regelmäßig Antikörper gegen ORF 3a ([141], [147]). Ebenso wurden B-Zellen, die auf die aminotermine Domäne des Proteins reagieren, nachgewiesen.

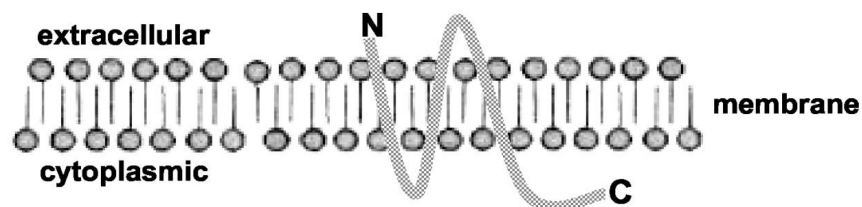


Abbildung 8: Schematische Darstellung von ORF 3a.

Der Aminoterminus von ORF 3a befindet sich im Lumen, der Carboxyterminus im Zytosol. Quelle: Tan et al., 2004 [118].

ORF 3b

ORF 3b beinhaltet 154 Aminosäuren und überlappt als Ganzes mit ORF 3a und Protein E ([80], [99]). ORF 3a wird von der subgenomischen mRNA 3 durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle translatiert, da sein Initiationskodon AUG nicht das erste der subgenomischen mRNA 3 ist ([80], [111]). Sequenzanalytisch wurden keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen und keine Signalpeptide oder Transmembranregionen entdeckt [143].

Das Protein ist nicht essentiell für das SARS-Coronavirus. Viren mit Deletion von ORF 3b replizieren *in vivo* zu ähnlichen Titern wie die des Wild-Typ-Virus [140]. Trotzdem wird es exprimiert: ORF 3b wurde in infizierten Zellen sowie in Geweben von SARS-CoV-infizierten Patienten nachgewiesen [7]. Antikörper gegen das Protein wurden im Serum von SARS-Patienten ausfindig gemacht [34].

ORF 6

ORF 6 hat eine Länge von 63 Aminosäuren ([80], [99]). Sequenzuntersuchungen ergeben keinen Hinweis auf die Funktion des Proteins, sagen aber eine Transmembranhelix voraus, dessen Aminoterminus außerhalb des Viruspartikels lokalisiert ist [80].

Bei Viren mit einer ORF 6-Deletion ist die Replikation unbeeinträchtigt [140]. Das Protein ist also nicht essentiell für die Replikation. Interessanterweise zeigt ein MHV-Rekombinant (rJ.6), der für ein normales Spektrum an MHV Proteinen kodiert und nur zusätzlich Protein 6 exprimiert, einen einzigartigen hypervirulenten Charakter [95]. Dies lässt auf eine wichtige Rolle des Proteins *in vivo* schließen. In der Tat finden sich fünf bis sechs mal höhere RNA-Spiegel in Zellen, die mit rJ.6 Stämmen infiziert wurden [119]. Gleichermäßen weisen Zellen, die erst mit ORF 6 transfiziert und anschließend mit MHV infiziert wurden, einen höheren Virustiter auf [46].

ORF 7a

ORF 7a hat eine Größe von 122 Aminosäuren [80]. Eine transkriptionsregulierende Sequenz ist direkt oberhalb von ORF 7a lokalisiert. Es ist das erste ORF, welches von der bicistronischen subgenomischen mRNA 7 translatiert wird [99]. Es bestehen keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen. Analysen der Sequenz deuten sowohl auf eine Signalsequenz mit Schnittstelle zwischen den Aminosäuren 15 und 16 hin, als auch auf eine Transmembranhelix [38]. 15 Aminosäuren bilden das Signalpeptid, 81 die luminale Domäne, 21 das Transmembransegment und 5 den zytoplasmatischen Schwanz [85]. Es handelt sich also um ein Typ I-Membranprotein mit dem größten Teil des hydrophilen Abschnittes und dem aminoterminalen Ende auf der Innenseite des Endoplasmatischen Retikulums, beziehungsweise des Golgi-Apparates ([12], [26], [80], [85], vgl. Abbildung 9).

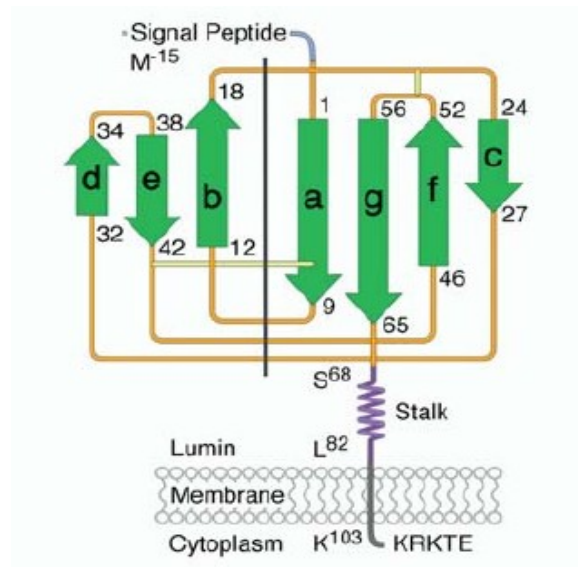


Abbildung 9: Struktur von ORF 7a.

ORF 7a besitzt eine große luminal Domäne und einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz. Quelle: Nelson et al., 2005 [85].

Die Struktur der luminalen Domäne entspricht einer β -Sandwich Faltung ([38], [85]) und erinnert an die Faltung der Immunglobuline [38]. Sequenzanalysen zeigen allerdings keine Ähnlichkeiten zu der Ig-Superfamilie [85]. Eine solche Faltung wird bei Proteinen der extrazellulären Matrix, bei Muskelproteinen, im Immunsystem, bei Zelloberflächenrezeptoren, Enzymen und Transkriptionsfaktoren vorgefunden [85].

ORF 7a wird in infizierten Zellkulturen exprimiert und wurde im Lungengewebe, genauer in Bronchialepithel, Leukozyten und Erythrozyten nachgewiesen ([7], [12], [85]).

Die Deletion von ORF 7 aus dem SARS-Genom bleibt ohne Auswirkung auf die Replikation *in vitro* [109]. Bei Überexpression des Proteins wird Apoptose induziert ([56], [116]).

ORF 7b

ORF 7b hat eine Länge von 44 Aminosäuren und ist hochgradig hydrophob ([80], [102]). Es wird durch ribosomales "leaky scanning" als zweites Protein von der bicistronischen subgenomischen mRNA 7 translatiert [102]. Es besitzt keine Homologien zu bekannten viralen oder zellulären

Proteinen [102]. Sequenzanalysen sagen eine einzelne Transmembranhelix voraus [80]. ORF 7b ist ein Typ-III integrales Membranprotein, dessen Carboxyterminus dem Zytoplasma zugewandt ist [102].

Nach ORF 3a ([47], [105]) und ORF 7a [45] ist auch ORF 7b mit intrazellulären Viruspartikeln assoziiert. Es lässt sich in aufgereinigten Viruspartikeln nachweisen und ist somit ebenfalls ein neu entdecktes Strukturprotein [102].

Die Deletion von ORF 7a/7b beeinträchtigt die effiziente Replikation des Virus in infizierten Zellen nicht [110]. Trotzdem ist die Region, die für ORF 7b kodiert, in SARS-Coronavirus-Isolaten hochgradig konserviert [121]. In Isolaten, die *in vitro* mehrere Zellkulturen durchlaufen, kommt es allerdings zu einer 29-nt Deletion in ORF 7b [121]. ORF 7b ist also für die Replikation *in vitro* nicht essentiell, steht aber anscheinend *in vivo* unter einem Selektionsdruck [121]. Dies könnte mit einer wichtigen Funktion des Proteins *in vivo* korreliert sein.

ORF 8a und ORF 8b

Vergleichende Sequenzen zeigen, dass zoonotische SARS-Coronaviren und frühe humane Isolate nur über ein monocistronisches ORF 8 verfügen (auch ORF 8a/b genannt). ORF 8a/b wurde in Isolaten der späteren Epidemie durch eine Deletion von 29-nt in zwei ORFs (ORF 8a und ORF 8b) gespalten ([33], [65], [120]).

Da in späteren Stadien der Epidemie ausschließlich Viren ohne ORF 8a/b isoliert wurden, wird vermutet, dass sich nur solche Viren effizient von Mensch zu Mensch übertragen lassen [90]. Wenn ein Virus sein Wirtsspektrum verändert, wie in diesem Fall das SARS-Coronavirus, kann dies auch zu Funktionsänderungen der gruppenspezifischen ORFs führen. Diese These wird durch eine Reihe von Zusammenhängen, die in letzter Zeit über Protein 8a bekannt wurden, unterstützt: In Virusklonen mit funktionellem ORF 8a ist die Viruslast höher als in Kontrollen ohne ORF 8a. Small interfering RNA gegen ORF 8a inhibiert die Replikation von SARS-Coronaviren und ORF 8a führt zur Apoptose in transfizierten Zellen [11].

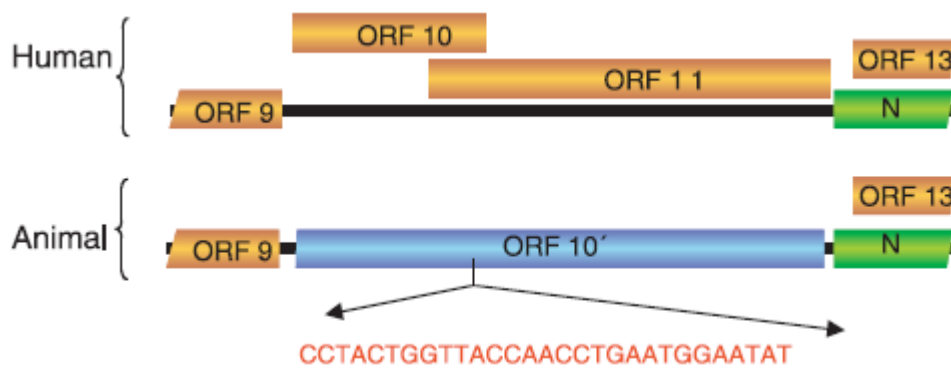


Abbildung 10: Schematische Darstellung von ORF 8a/b, ORF 8a und ORF 8b.

Durch eine Deletion von 29 Nukleotiden kommt es zur Entstehung eines zusätzlichen ORFs. ORF 10', ORF 10 und ORF 11 entsprechen jeweils ORF 8a/b, ORF 8a und ORF 8b. Siehe auch Tabelle 1. Quelle: Guan et al., 2003 [33].

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu der Vermutung, dass Veränderungen des mutierten Virus eher durch das Fehlen von ORF 8a/b bedingt sind als durch das Erlangen neuer Funktionen von ORF 8a und ORF 8b [90]. *In vivo* scheint die Virulenz des Virus nicht durch ORF 8a/b gesteigert zu werden. Im Wirt *Paguma larvata* weichen die klinischen Krankheitssymptome einer SARS-Coronavirus-Infektion durch das Fehlen oder Vorhandensein von ORF 8a/b nicht signifikant voneinander ab [135].

ORF 8a hat eine Größe von 39 Aminosäuren und ist somit das kleinste ORF des Virus [80]. Sequenzanalytisch wird eine Transmembranhelix, bei der das aminoternale Ende innerhalb des Viruspartikels lokalisiert ist, vorausgesagt.

Antikörper gegen ORF 8a wurden bei einem kleinen Teil SARS-erkrankter Patienten nachgewiesen [11].

ORF 8b hat eine Größe von 84 Aminosäuren [80]. Es besitzt entfernte Homologien zum HCoV-Glykoproteinvorläufer E2 [99]. Weiterhin handelt es sich um ein lösliches Protein. Theoretisch wird ORF 8b als zweites Protein von der subgenomischen mRNA 8 translatiert. Allerdings konnte es nicht in SARS-Coronavirus-infizierten Zellen nachgewiesen werden [90]. Bei Transfektion von Zellen mit ORF 8a/b wird nur ORF 8a exprimiert [69]. Das theoretische ORF 8b wird nur exprimiert, wenn das Konstrukt ORF 8b isoliert in Zellen transfiziert wird [69].

ORF 9b

ORF 9b hat eine Länge von 98 Aminosäuren [80]. Sequenzanalysen ergeben keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten zellulären oder viralen Proteinen [80].

ORF 9b ist in SARS-Coronavirus-infizierten Zellen nachweisbar [83]. Es wurden Antikörper gegen ORF 9b in Sera von SARS-erkrankten Patienten gefunden [34].

ORF 9b wird von einem alternativen ORF auf der subgenomischen mRNA 9, die auch für das N-Protein kodiert, abgelesen. Eine ähnliche Situation kommt beim BCV [104] und MHV [28] vor. Im MHV ist das entsprechende Protein ein strukturelles Protein des Virions. Für die Replikation von MHV *in vivo* und *in vitro* ist es nicht essentiell [28], ebensowenig ist ORF 9b für die Replikation von SARS-Coronaviren *in vitro* essentiell [127]. ORF 9b des SARS-Coronavirus könnte eine ähnliche Funktion besitzen wie sein Gegenüber im MHV. Allerdings ist es nur etwa halb so lang wie sein Verwandter. ORF 9b soll eine Rolle bei Membraninteraktionen spielen und als Fixpunkt für andere virale Proteine dienen, zum Beispiel für das N-Protein [81].

ORF 14

ORF 14 hat eine Größe von 70 Aminosäuren. Das ORF überlappt, wie bei ORF 9b, komplett mit dem Nukleokapsidgen [80]. Viele Autoren berücksichtigen ORF 14 nicht als potentielles Gen, da es unwahrscheinlich erscheint, dass es translatiert wird [99]. Sequenzanalysen sagen eine einzelne Transmembranhelix voraus [80].

1.6 Lokalisom

Proteine sind der Schlüssel, um biologische Vorgänge der Zelle zu verstehen. Die Integrität und Funktionalität der biologischen Reaktionswege werden durch Proteine aufrechterhalten, die zur richtigen Zeit am richtigen Ort miteinander interagieren. In eukaryontischen Zellen sind zu diesem Zweck intrazelluläre Kompartimente mit spezifischen Aufgaben vorhanden. Eukaryontische Zellen enthalten viele Kompartimente und die Lokalisation eines Proteins ist meist eng mit seiner Funktion verbunden. Befinden sich also verschiedene Proteine in denselben zellulären Strukturen, kann man eher davon ausgehen, dass sie interagieren [108].

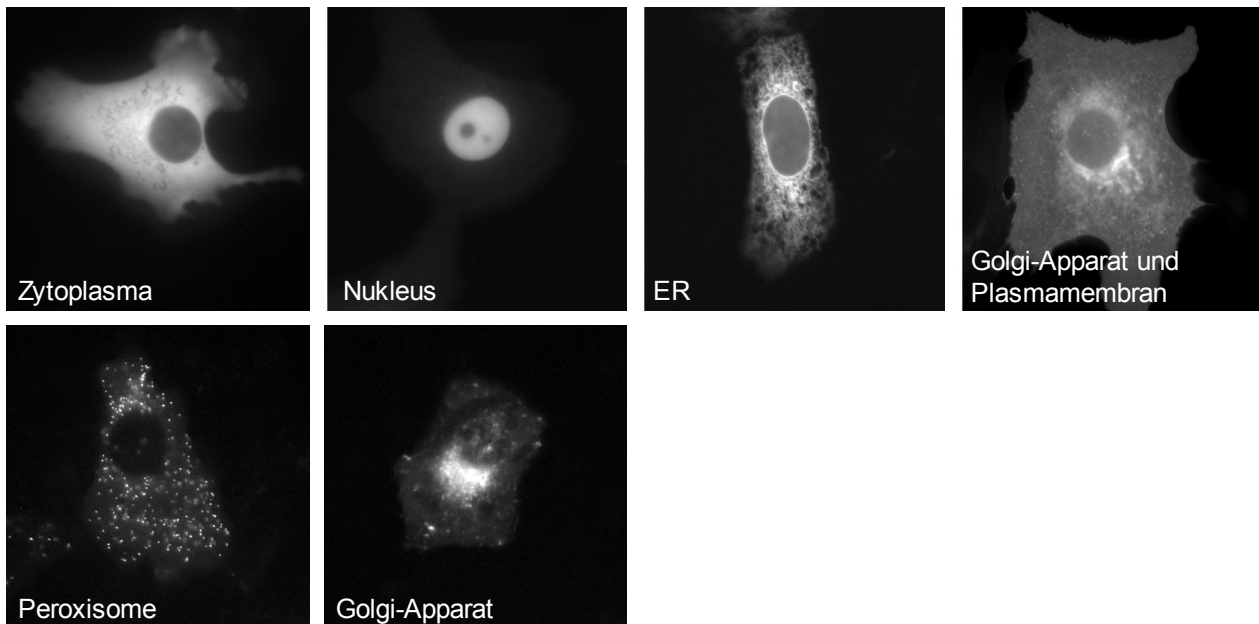


Abbildung 11: Beispiele für subzelluläre Strukturen.

Zytoplasma: cDNA ID: AL118986, Clone ID: hamy2_121g5; Nukleus: Swissprot ID: Q9NW29, cDNA ID: AL136547, Clone ID: hamy2_121f19; ER: Swissprot ID: Q9H0V9, cDNA ID: AL136617, Clone ID: hfbr2_23124; Golgi und Plasmamembran: Swissprot ID: Q9NY72, cDNA ID: AL136589, Clone ID: hamy2_2f18; Peroxisom: Swissprot ID: Q9Y6I8, cDNA ID: AL136648, Clone ID: hfbr2_62f21; Golgi-Apparat: Swissprot ID: Q9BQG3, cDNA ID: AL136588, Clone ID: hamy2_2d11. Quelle: Human Protein Localisation / Localization Project of EMBL & DKFZGFP- tagged ORFs localised by Jeremy Simpson & Rainer Pepperkok.

Das Endoplasmatische Retikulum wird in einen rauen und glatten Teil unterteilt [42]. Es besteht aus einem Kanalsystem von Membranen. Aufgaben des Endoplasmatischen Retikulums sind die Synthese von Proteinen und Lipiden, der Transport von Proteinen und Membranteilen zum Golgi-Apparat sowie die Bildung von Vesikeln. Der Golgi-Apparat besteht aus übereinander gestapelten, membranumgebenen Hohlräumen. Die Cis-Seite ist die Regenerationsseite, die Trans-Seite die Sekretionsseite. Die Proteine des Golgi-Apparates wandern von der Cis- zur Trans-Seite durch die Organelle. Zu den Aufgaben dieses Komplexes gehören die posttranslationalen Proteinmodifikationen wie Glykosylierung, Sulfatierung oder Phosphorylierung. Sekretorische Proteine, Membranproteine und lysosomale Proteine nehmen ihren Weg durch den Golgi-Apparat. Desweiteren bildet der Golgi-Apparat Vesikel. Diese wiederum dienen der Speicherung, dem Transport oder der Sekretion von Proteinen.

Welche Möglichkeiten stehen uns zur Verfügung um Proteine in großem Maßstab zu analysieren?

Zum besseren Verständnis von Proteinkomplexen und von Zellkompartimenten werden Proteome

Einleitung

erstellt. Dabei werden Organellen isoliert und deren Konstituenten mittels Massenspektroskopie identifiziert.

Systemische bioinformatische Informationen erwartet man von großen Sequenzierungsprogrammen. Durch Analyse und Vergleich von Gensequenzen ist es möglich, Aussagen über Funktionen und Strukturen von Proteinen zu treffen. Spezifische Signalsequenzen oder Lokalisationssignale ordnen das Protein einer Organelle, beziehungsweise einem Zellkompartiment zu.

Ein anderer Ansatz ist die Analyse der Proteinstruktur und damit die Aufschlüsselung ihrer molekularen Basis [4].

Eine weitere Methode ist die systematische subzelluläre Lokalisation von Proteinen. Systematische Lokalisationen von Proteinen wurden schon in großem Maßstab durchgeführt [107]. Bei der Charakterisierung von unbekanntem Proteinen können sich Lokalisationstudien und Sequenzanalysen gegenseitig ergänzen. Die subzelluläre Lokalisation unterstützt die Prädiktion der bioinformatischen Analysen in 75% der Fälle und erbringt bei unvollständigen Sequenzdatenbanken erste Informationen über das Protein [108].

Verschiedene subzelluläre Strukturen sind in der Immunfluoreszenz häufig an ihrem charakteristischen Muster zu erkennen (vgl. Abbildung 11).

2 Zielsetzung

Ein neuartiges Coronavirus wurde als Erreger einer atypischen Pneumonie, die erstmals im November 2002 in der Provinz Gunangdong in China auftrat, entdeckt. Das Virus wurde SARS-Coronavirus benannt und lässt sich der Gruppe 2 der Familie der Coronaviren zuordnen. Bei dem SARS-Coronavirus handelt es sich um das erste Coronavirus, das stark humanpathogen ist und eine Gesamtmortalität von ca. 10% aufweist.

Trotz des offensichtlich ähnlichen Aufbaus des SARS-Coronavirus Genoms und der Ähnlichkeiten seiner strukturellen und nicht-strukturellen Proteine zu Proteinen anderer Coronaviren, besitzt das SARS-Coronavirus einzigartige Charakteristika, unter anderem eine ungewöhnliche Vielzahl an akzessorischen Proteinen [99].

Die offenen Leserahmen, die für die akzessorischen Proteine kodieren, zeigen keine Homologien zu bekannten zellulären oder viralen Proteinen. Ihre Größe beträgt zwischen 120 und 825 bp. Sie werden von acht, teilweise bicistronischen, subgenomischen mRNAs translatiert und besitzen Funktionen, die momentan erforscht werden. Für die Virusreplikation entbehrlich, bringen die akzessorischen Proteine allerdings *in vivo* Vorteile mit sich ([118], [149]). Es wird angenommen, dass gerade diese offenen Leserahmen mit der Wirtszelle und dem Immunsystem des Wirtsorganismus interagieren, um das Milieu der Zelle für das Virus zu optimieren. Aus diesem Grund sind sie für die Erforschung der Pathogenese des SARS-Coronavirus besonders interessant.

Da Sequenzanalysen keine weiteren Informationen liefern, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Alternative zur Charakterisierung der offenen Leserahmen gewählt. Wir untersuchten zum ersten Mal systematisch die Lokalisation aller akzessorischen Proteine. Um die molekularen Mechanismen während der Replikation und der Zusammensetzung des Virions besser zu verstehen, wurden die Protein-Protein-Interaktionen des gesamten ORFeoms durch ein *Yeast-Two-Hybrid*-Screening analysiert [127].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 cDNA, Plasmide und synthetische Oligonukleotide

Plasmid	Antibiotikumresistenz	Bezogen von
pDONR207	Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
pDONR221	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe
pGADT7	Ampicillin	Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pGBKT7	Kanamycin	Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
pCR3	Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 2: Plasmide

Sequenzierungsprimer	Sequenz
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
SP6	5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'
M13 Forward	5'-ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG-3'
M13 Reverse	5'-TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

Tabelle 3: Sequenzierungsprimer

HindIII-HIS-FLAG-EcoRV –stop N-term
5'-ttagtcaagcttgaaggagatagagccacc- ATGGCACACCATCACCATCACCATGACTACAAGGACGACGATGACAAG-gcgatatcttaacttagatgata-3'
5'-aatcagttcgaacttctctatctcggtgg- TACCGTGTGGTAGTGGTAGTGGTACTGATGTTCCCTGCTGCTACTGTTT-cgctatagaattagatctactat-3'

Tabelle 4: Sequenz des N-terminalen Flag-His₆-Ankers.

In Großbuchstaben ist die endgültige Anker-Sequenz dargestellt.

EcoRV-FLAG-HIS-XhoI C-term
5'-tttatgatatac-GACTACAAGGACGACGATGACAAGGCACACCATCACCATCACCAT-taactcgagattaata-3'
5'-taatatactatag-CTGATGTTCCCTGCTGCTACTGTTCCGTGTGGTAGTGGTAGTGGTA-attgagctctaattat-3'

Tabelle 5: Sequenz des C-terminalen Flag-His₆-Ankers.

In Großbuchstaben ist die endgültige Anker-Sequenz dargestellt.

ORF	Primer	Sequenz
3a	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG GATTTGTTTATGAG -3'
3a	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C CAAAGGCACGCTAG -3'
3b	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG CCAACTACTTTGTTTGCTG -3'
3b	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C ACGTACCTGTTTCTTCC -3'
6	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG TTTTCATCTTGTTGACTTCCAG -3'
6	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C TGGATAATCTAACTCCATAG -3'
7a	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG AAAATTATTCTTCTCCTGAC -3'
7a	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C TTCTGTCTTCTCTTAATGG -3'
8b	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG TGCTTGAAGATCCTTGTAAGG -3'
8b	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C ATTTGTTGTTTTATTTAAAC -3'
7b	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG AATGAGCTCAC -3'
7b	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C GACTTTGGTACAAGG?TTC? -3'
8a	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG AAATTCTCATTG -3'
8a	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C GTGTTGTACCTTACAAGG -3'
9b	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG GACCCCAATCAAACC -3'

ORF	Primer	Sequenz
9b	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C TTTTGCCGTCACC -3'
14	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG CTGCCACCGTGCTAC -3'
14	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C GCAGCAATAGCGCGAGG -3'
E	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG TACTCATTCTTTTCGG -3'
E	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C GACCAGAAGATCAGGAACTC -3'
M	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG GCAGACAACGGTACTATTACCG -3'
M	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C CTGTACTAGCAAAGC -3'
S	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG TTTATTTTCTTATTATTTCTACTCTC -3'
S	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C TGTGTAATGTAATTTGACACA -3'
N	Forward	5'- AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG TCTGATAATGGACC -3'
N	Reverse	5'- AGAAAGCTGGGT C TGCCTGAGTTGAATCAG -3'

Tabelle 6: Sequenzen der Forward- und Reverseprimer für die primäre PCR.

Alle synthetisierten Oligonukleotide wurden von Metabion, Martinsried bezogen. Fett hervorgehoben ist die *attachment-site* Sequenz.

Externe Primer	Sequenz
Forward	5'- GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCT -3'
Reverse	5'- GGGGACCACTTTGTACA AGAAAGCTGGGT -3'
Verlängert S- und N-Forward	5'- GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCT CCGC - 3'
Verlängert S-Reverse	5'- GGGGACCACTTTGTACA AGAAAGCTGGGT C TG -3'
Verlängert N-Reverse	5'- GGGGACCACTTTGTACA AGAAAGCTGGGT C TGCCTG -3'
Kompletter Primer S-Forward	5'- GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG TTTATTTTCTTATTATTTCTACTCTC - 3'
Kompletter Primer S-Reverse	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT C TGTGTAATGTAATTTGACACC -3'
Kompletter Primer N-Forward	5'- GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCT CCGCC ATG TCTGATAATGGACC -3'
Kompletter Primer N-Reverse	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT C TGCCTGAGTTGAATCAG -3'

Tabelle 7: Sequenz der externen Primer und der kompletten Primer für das N- und S-Gen.

Alle synthetisierten Oligonukleotide wurden von Metabion, Martinsried bezogen. Fett hervorgehoben ist die Sequenz, die mit den internen Primern überlappt. Bei den kompletten Primern ist die ganze *attachment-site* fett hervorgehoben.

3.1.2 Antikörper und Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	NEB-Puffer	Inkubationstemperatur
Apa I	4	25°C
Bam HI	2	37°C
Ban II	4	37°C
EcoR I	2	37°C
EcoR V	2	37°C
Hind III	2	37°C
Sma I	4	25°C
Xba I	2	37°C
Xho I	2	37°C

Tabelle 8: Restriktionsenzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs, Frankfurt am Main bezogen.

Primärer Antikörper	Wirt	Verdünnung	Bezogen von
Anti-Flag M2 FITC Konjuguiert	Mouse	1:100	Sigma, München
Anti-Flag M2	Mouse	1:200	Sigma, München
Anti-His ₆	Mouse	1:100	Roche
Anti-Calnexin	Rabbit	1:200	Stressgen, Victoria, Canada
Anti-Lamin B1	Goat	1:300	Santa Cruz, USA
Anti-HA	Rat	1:1000	E. Kremmer, SSF
Anti-c-myc	Mouse	1:1000	Santa Cruz, USA
Sekundärer Antikörper			
Alexa Fluor® 633 Anti- Rabbit	Goat	1:200	Invitrogen, Karlsruhe
FITC Anti-Rat			Dianova, Hamburg
FITC Anti-Mouse			Dianova, Hamburg

Tabelle 9: Antikörper

3.1.3 Zelllinien, Bakterien und Viren

Die Transformation von pCR3-rfB Plasmiden erfolgte in DH5- α -Stämme, die Transformation aller anderen Plasmide in DH10B-Bakterienstämme.

Zur Expression der ORFs in pGADT7 und pGBKT7 wurden *Vaccinia Viren vTF-7* verwendet.

Zelllinie	Verwendungszweck
Human Embryonic Kidney (HEK)-293T	Co-IP und Immunfluoreszenz
Human Embryonic Kidney (HEK)-293	Co-IP und Immunfluoreszenz
Vero-E6	Immunfluoreszenz
HeLa	Immunfluoreszenz

Tabelle 10: Zelllinien

3.1.4 Chemikalien und Marker

Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen, Karlsruhe
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco BRL, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat Natriumsalz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Riedel-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Deisenhofen
Histogel	Linaris, Wertheim-Bettingen
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Riedel-de Haen, Seelze
L-Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe

Material und Methoden

Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumhydroxyd (NaOH)	J.T.Baker B.V., Deventer, Holland
10x NEB-Puffer 1-4	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NP40 = IGEPAL CA650	Sigma, Deisenhofen
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco BRL, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Gibco BRL, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Vectashield HardSet Mounting Medium	Alexis Biochemicals, Lörrach

Marker

GeneRuler TM 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
MassRuler TM DNA Ladder #SM0403	Fermentas, St. Leon-Rot
SeeBlue Plus2	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.5 Kits, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Kits

GFX Micro Plasmid Prep Kit	Amersham, Freiburg
Quiafilter Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Hilden
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
TransFectin Lipid Reagent	Bio Rad, München
Big Dye Terminator v3.0	Applied Biosystems Inc, USA
Ready Reaction Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems Inc, USA
CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing	Beckman Coulter, Krefeld

Material und Methoden

ECL Entwicklerlösung für WB
Fast Start High Fidelity PCR System

Vent DNA Polymerase

Nucleospin Extraction Kit

Amersham-Pharmacia, Freiburg

Roche Applied Science,
Mannheim

New England BioLabs,
Frankfurt am Main

Macherey & Nagel, Düren

Geräte

Photometer Gene Quant II

Pipetten

Mikroskope: Axiovert S100, Axiovert 25

Konfokales Mikroskop: Axiovert 200M

Lasermodule: LSM 510 Laser Module, Argon-Laser 488nm,

Helium-Neon-Laser 633nm, Helium-Neon-Laser 543nm

Zentrifuge 5417R

Laboratory Centrifuge 6K15

Thermocycler Gene Amp PCR System 2400

Inkubator für Zellkultur (37°C) Hepa Filter

Electrophoresis Power Supply EPS 600

Electrophoresis Power Supply E443, E833, E455

Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator

Shaker ISF-1-W

Innova 4000 Incubator Shaker

Rotormixer Heidolph REAX 2

pH-Meter

Thermomixer 5436

Thermomixer Comfort

Waage CP 4202S

Sterilbench

Magnetrührer

+4°C Kühlschranks Liebherr

-20°C Gefrierschranks Liebherr

Pharmacia/LKB

Eppendorf, Hamburg

Zeiss, Jena

Zeiss, Jena

Zeiss, Oberkochen

Eppendorf, Hamburg

Sigma, Osterode am Harz

Applied Biosystems, USA

ThermoForma, Marietta, USA

Pharmacia Biotech,
Wien, Österreich

Consort, Turnhout, Belgien

Herolab, Wiesloch

Kühner, Birsfelden, Schweiz

New Brunswick Scientific,
Nürtingen

Sigma-Aldrich, München

WTW, Weilheim

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

SartoriusAG, Göttingen

BDK Luft- und Reinraumtechnik
GmbH, Sonnenbühl

IKA Labortechnik, Staufen

Ochsenhausen, Deutschland

Ochsenhausen, Deutschland

Material und Methoden

-80°C Gefrierschrank Forma Scientific	Marietta, USA
Vakuumpumpe Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Western Blot Technik	BioRad, München
Mikrowelle	AEG
Röntgenfilmentwickler Optimax TypTR	MS Laborgeräte, Wiesloch

Verbrauchsmaterialien

Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Sterilfilter (0,2 und 0,4 µm)	Millipore, Schwalbach/Ts.
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Glasplättchen	Marienfeld, Bad Mergentheim
Objektträger	Marienfeld, Bad Mergentheim
Falcon Tubes	Becton Dickinson, Heidelberg
Serological Pipette	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	Kodak GmbH, Stuttgart
Nitrocellulose Papier	Schleicher & Schuell, Dassel

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Arbeitsweisen

3.2.1.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen. Die klassische PCR wird in mehreren (circa 25 bis 30) Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus beinhaltet drei Phasen. Zuerst wird bei 94 bis 96°C die DNA denaturiert, um die zwei Stränge zu trennen. Dann hybridisieren die Primer an die DNA-Einzelstränge (sogenanntes Primer-Annealing). Die Temperatur dieser Phase hängt von den Primern ab. Sie variiert meist zwischen 50° und 65°C. Daran schließt sich zuletzt die Elongationsphase an, bei der die hitzeresistente DNA-abhängige-DNA-Polymerase die komplementären Stränge synthetisiert. Die optimale Temperatur liegt hier zwischen 68° und 72°C, je nach Art der

Material und Methoden

Polymerase. Nach Abschluß der letzten Phase kann der nächste Zyklus beginnen.

Folgende Reagenzien wurden auf Eis gemischt: je 5 µl Forward- und Reverseprimer (10 pmol/µl), 1 µl DNA (50-150 ng), 5 µl polymerasenspezifischer 10x-Puffer, 5 µl dNTPs (10 mM), ad 50 µl Aqua Dest., Taq-Polymerase. Das Gemisch wurde in den vorgeheizten Thermocycler gestellt. Bei Hotstart-Programmen wurde die Taq-Polymerase erst nach der ersten Denaturierungsphase des ersten Zyklus hinzugegeben. Die Amplifikation der Gene erfolgte je nach Länge der Sequenzen oder zur eventuellen Optimierung der Reaktion auf der Basis folgender PCR-Programmen:

Programm 1: 94°C für 5 Min,
30 Zyklen: 94°C für 90 Sec, 52°C für 90 Sec, 68°C für 210 Sec,
72°C für 7 Min,
4°C bis Entnahme.

Touch-Down: 94°C für 4 Min,
10 Zyklen: 94°C für 30 Sec, 55°C (bei jedem Zyklus 1 Grad niedriger) für 30 Sec, 72°C für 90 Sec,
30 Zyklen: 94°C für 30 Sec, 50°C für 30 Sec, 72°C für 90 Sec,
72°C für 7 Min,
4°C bis Entnahme.

3.2.1.2 Spalten von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen dienen der sequenzspezifischen Restriktion von Nukleinsäuren.

Es wurden folgende Reagenzien auf Eis gemischt: 1-2 µg DNA, 2 µl enzyspezifischer 10x NEB-Puffer, 1-2 U Restriktionsenzym, ad 20 µl Aqua Dest. Nach Abzentrifugation wurde der Verdau 1 Stunde je nach Enzymspezifikation bei Raumtemperatur (25°C) oder bei 37°C inkubiert.

3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größen.

Material und Methoden

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung werden die Fragmente der Größe nach getrennt. Kleine Fragmente wandern schneller durch das Gel als große Fragmente. Durch Vergleich mit einem Marker wird die Größe der Fragmente abgeschätzt.

Zur Agarosegelelektrophorese wurden 1%-ige Gele verwendet, zur Auftrennung kürzerer Fragmente 2%-ige Gele. Ein Agarosegel mit 30 Taschen bestand aus 4 g Agarose und 200 ml 1x-TAE Puffer (10 mM Tris, 5 mM Eisessig, 0,5 mM EDTA). Ethidiumbromid wurde nach dem Aufkochen zu einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml hinzugefügt. Die Taschen wurden mit Probe und Ladepuffer (4% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylenzyanolblau) im Verhältnis 5:1 gefüllt. Kleine Gele wurden 30 bis 45 Minuten bei 95 V, große Gele 60 bis 90 Minuten bei 200 V getrennt. Die Fragmente wurden bei UV-Licht detektiert.

Die Elution der DNA aus dem Agarosegel erfolgte nach Herstellerangaben des *Nucleospin Extraction Kit*.

3.2.1.4 Plasmidisolierung

Eine 1,5 ml Übernachtskultur wurde 1 Minute bei 14000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl Lösung I (10 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 10 mg/ml RNase) resuspendiert. Danach wurde die Mischung durch vorsichtiges Hin- und Herwiegen mit 100 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1% SDS) vermischt. Nach 3 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden 100 µl der Lösung III (5 M Kaliumazetat oder 3 M Natriumazetat, pH 4,8-5,2) hinzugefügt, die ausfallenden bakteriellen Proteine und die chromosomale DNA bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 14 000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch die Zugabe der 2,5-fachen Menge an 100%-igem Ethanol gefällt. Nach Abzentrifugation wurde die ausgefällte DNA mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und 10 Minuten bei 14000 rpm erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet bei 37°C getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 50 bis 80 µl Aqua Dest.

Die Plasmidisolierung für Midi- und Maxipräps erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *Quiafilter Plasmid Maxi Kit*.

Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte in einer Verdünnung von 1:50 bei der Wellenlänge 260 nm nach Angaben des Geräteherstellers.

3.2.1.5 Sequenzierungen

Big Dye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing

Der Sequenzierungsmix mit einem Endvolumen von 10 µl bestand aus Primer, DNA, Aqua Dest., *Terminator Ready Reaction Mix* nach Herstellerangaben.

Sequenzprogramm: 25 Zyklen: 96°C für 10 Sec, 50°C für 5 Sec, 60°C für 4 Min, abschließend 4°C bis Entnahme.

Zum Ausfällen der DNA wurden gemischt: 10 µl Sequenzreaktion, 35 µl H₂O, 5 µl 3 M NaAc, 125 µl 100%-iges Ethanol. Das Pellet wurde nach Abzentrifugation mit 100 µl 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach weiterem Zentrifugieren wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und eingeschickt.

CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing

Die Sequenzierungsreaktionen wurden nach Herstellerangaben ausgeführt, die Mengenangaben halbiert. Die Template-DNA wurde für 1 Minute bei 96°C im Thermoblock hitzebehandelt. Der Sequenzierungsmix bestand aus: 0,8 µM Sequenzierungsprimer, 50 fmol ds-DNA/24 fmol PCR-Produkt, 4 µl *DTCS Quick Starter Master Mix*, ad 10 µl Aqua Dest.

Sequenzierungsprogramm: 30 Zyklen: 96°C für 20 Sec, 50°C für 20 Sec, 60°C für 4 Min, abschließend 4°C bis Probenentnahme.

Zur Fällungsreaktion wurden 1 µl 3 M NaAc (pH 5,2), 1 µl 100 mM Na₂-EDTA (pH 8,0) und 0,5 µl 200 mg/ml Glycogen hinzugefügt und nach dem Vermischen 30 µl 95%-iges und -20°C kaltes Ethanol hinzupipettiert. Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 100 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, abschließend getrocknet, in 25 µl *Sample Loading Solution* resuspendiert und zum Sequenzieren eingeschickt.

3.2.1.6 Die Gateway Technologie

Mit der Gateway®-Technologie (Invitrogen) ist es möglich, DNA-Sequenzen schnell in verschiedene Vektorsysteme zu klonieren (vgl. Abbildung 12). Es handelt sich um eine Klonierungsmethode, die auf die sequenzspezifischen Rekombinationseigenschaften des Bakteriophagen Lambda zurückgreift. Durch Rekombinationsenzyme kann die DNA des

Material und Methoden

Bakteriophagen in das *E. Coli*-Chromosom integriert werden. Voraussetzungen für diese Reaktion sind spezifische Rekombinationssequenzen, sogenannte „*Attachment sites*“ (*att*-sites). Es handelt sich dabei um Bindungsstellen für die Rekombinationsenzyme. Das eigentliche Crossover geschieht in einer 15 bp langen Region. Die umgebenden Sequenzen sind für die Bindung der Proteine ebenso unerlässlich. Während der Rekombination kommt es weder zu Verlust noch zum Zugewinn von DNA. Die *att*-site-Sequenzen werden während der Reaktion verändert, sodass die neu entstandenen *att*-sites Hybride der beiden elterlichen *att*-sites darstellen. Bei der Integration des Lambda-Chromosoms zwischen *attB* und *attP* kommt es zur Bildung von *attL* und *attR* ([64], vgl. Abbildung 13).

BP-Reaktion: $attB \times attP \rightarrow attL \times attR$

LR-Reaktion: $attL \times attR \rightarrow attB \times attP$

Ausgehend von einem PCR-Fragment sind zwei Rekombinationsschritte nötig, um die Sequenz in einen Destinationsvektor zu klonieren (vgl. Abbildung 12).

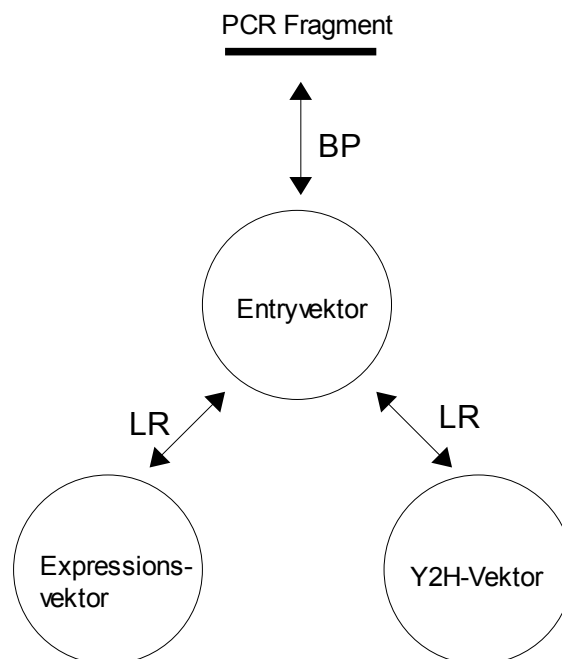


Abbildung 12: Übersicht über die Funktionsweise des Gateway®-Systems.

Der erste Schritt ist die BP-Reaktion, also die Rekombination eines *attB*-Substrates (PCR-Produkt) mit einem *attP*-Substrat (Donorvektor). Es entsteht ein *attL*-Produkt (Entryvektor) und ein *attR*-

Nebenprodukt (vgl. Abbildung 13). Der zweite Schritt ist die LR-Reaktion. Das *attL*-Substrat (Entryvektor) reagiert mit einem *attR*-Substrat (Destinationsvektor), um ein *attB*-Produkt (Expressionsvektor) und *attP*-Nebenprodukt zu bilden.

3.2.1.7 BP-Rekombinationsreaktion

Während der BP-Rekombinationsreaktion wurden unsere PCR-Produkte in den Entryvektor pDONR 221 beziehungsweise pDONR 207 rekombiniert (vgl. Abbildung 13).

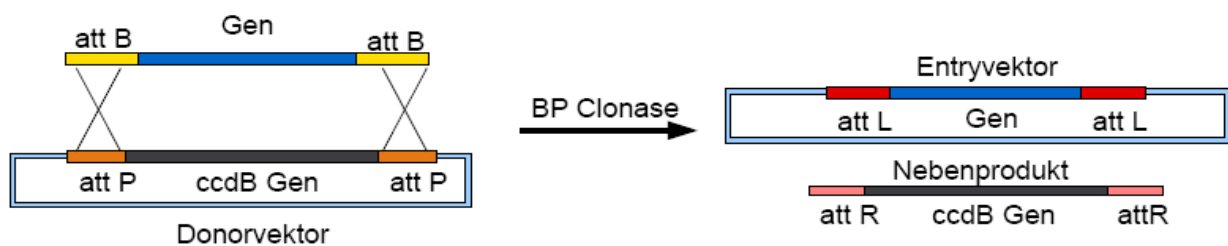


Abbildung 13: Schematische Darstellung der BP-Reaktion.

Die Reaktion wurde nach Protokollangaben des Herstellers durchgeführt, die Mengenangaben halbiert: 20-50 fmol PCR Produkt (etwa 2 μ l), 150 ng Donorvektor (etwa 2 μ l), 2 μ l 5x-BP-Puffer, 2 μ l *BP-Clonase-Enzym-Mix*, ad 8 μ l Aqua Dest. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 25°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 10 Minuten mit 2 μ g Proteinase K bei 37°C inkubiert. Die Rekombinationsprodukte wurden elektrisch in DH10B-Bakterienstämme transformiert.

3.2.1.8 LR-Rekombinationsreaktion

Die LR-Rekombinationsreaktion katalysiert die Rekombination eines Fragmentes vom Entryvektor (pDONR 221 und pDONR 207) in den Destinationvektor. Als Destinationvektoren verwendeten wir pCR3-rfB-N, pCR3-rfB-C, pGADT7 und pGBKT7.

Die Reaktion wurde nach Protokollangaben des Herstellers durchgeführt, die Mengenangaben

Material und Methoden

halbiert: 50-150 ng Entryvektor, 150 ng Destinationsvektor, 2 µl 5x-LR-Clonase-Reaktionspuffer, 2 µl *LR-Clonase-Enzym-Mix*, ad 8 µl Aqua Dest. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 1 Stunde bei 25°C, nach Zugabe von 2 µg Proteinase K 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Das entstandene Rekombinationsplasmid wurde elektrisch in DH10B-Stämme transformiert.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Bakterien

Animpfen einer Bakterienkultur in Flüssigmedium und Kryokonservierung

Antibiotikumhaltiges LB-Medium (10 g NaCl, 10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Hefeextrakt, ad 1 l H₂O) wurde steril mit einer Bakterienkolonie versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Schüttler. Eine 2 ml Übernachtskultur wurde 5 Minuten bei 14000 rpm pelletiert, in 0,5 ml 20%-igem Glycerin resuspendiert und bei -80°C schockgefroren.

Selektion positiver Klone mittels Antibiotika

Die Antibiotikumkonzentrationen des LB-Agar (10 g NaCl, 10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 15 g Bacto-Agar, ad 1 l H₂O) wurden wie folgt gewählt:

- 200 µg/ml Ampicillin für pCR3-Plasmide und pGADT7,
- 50 µg/ml Kanamycin für pDONR 221 und pGBKT7,
- 2 µg/ml Gentamycin für pDONR 207.

Herstellung elektrokompetenter Bakterien und Elektroporation

Alle Schritte zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden, wenn nicht anders spezifiziert, auf Eis ausgeführt. Mit 2 ml einer Vorkultur über Nacht wurden 200 ml LB-Medium angeimpft. Das Medium wurde 2 Stunden schüttelnd bei 37°C inkubiert. Regelmäßig wurde die OD₆₀₀ gemessen, bis die exponentielle Wachstumsphase der Bakterien erreicht wurde (Wert zwischen 0,5 und 0,6). Nach 15-minütiger Lagerung auf Eis und 15-minütiger Abzentrifugation bei 4°C und 4000 rpm wurde das Pellet in 200 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert und erneut 15 Minuten unter den

gleichen Bedingungen pelletiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 1,5 ml 10%-igem Glycerin aufgenommen, in 50 µl-Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Bei der elektrischen Transformation entstehen durch hohe kurze Spannungen Poren in der Bakterienmembran. Dadurch kann DNA in die Zellen eintreten. Auf Eis wurde ein 50 µl-Aliquot elektrokompenter Bakterien mit 1 µl einer BP-, beziehungsweise LR-Reaktion gemischt. Die Bakterien wurden mit 2500 V elektroporiert und in 1 ml antibiotikumfreien LB-Medium 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde das Medium auf Antibiotikumhaltige LB-Agar-Platten ausgestrichen.

3.2.2.2 Eukaryotische Zellen

Kultivieren und Kryokonservierung

Die Zellen wurden in komplettem DMEM kultiviert mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und bei 37°C in feuchter Atmosphäre und 5% CO₂ inkubiert. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen bei 1100 rpm für 5 Minuten bei 4°C in der Zytofuge abzentrifugiert und anschließend in 1,5 ml FCS mit 10% DMSO resuspendiert. Nach 24 bis 48 Stunden Zwischenlagerung im -80°C Gefrierschrank wurden die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gefrorene Aliquots wurden bei 37°C im Wasserbad erwärmt, mit DMEM gewaschen und abschließend in komplettem DMEM resuspendiert.

Transiente Transfektion von Vero-E6-Zellen

Die Transfektionen mit *Lipofectamine 2000* wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Vero-E6-Zellen wurden in 6 well-Platten, in denen sterile Glasplättchen ausgelegt waren, kultiviert. Die *Transfektionslösung 1* (4 µl *Lipofectamine 2000*, 100 µl DMEM Medium ohne Zusätze) und die *Transfektionslösung 2* (1,6 µg Plasmid-DNA, 100 µl DMEM Medium ohne Zusätze) wurden nach 5-minütiger Inkubation vermischt und 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde in die Kulturschalen getropft. Die weitere Inkubation erfolgte über 24 bis 48 Stunden.

Als Alternative zu *Lipofectamine 2000* wurde auch das *TransFectin Lipid Reagent* benutzt. Der

Material und Methoden

TransFectin Lipid Reagent Mix bestand aus 4 µg Plasmid, 10 µl *TransFectin Lipid Reagent* und 250 µl reinem Medium und wurde nach 20-minütiger Inkubation zu den Zellen getropft. Die weitere Inkubation erfolgte über 24 bis 48 Stunden.

Transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Die Transfektionen mit *Effectene* wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die HeLa-Zellen wurden in 12 well-Platten kultiviert, in denen Glasplättchen ausgelegt waren. Der Transfektionsmix bestand aus 0,3 µg Plasmid-DNA, 75 µl Puffer und 2,4 µl Enhancer. Nach 3- bis 5-minütiger Inkubation wurden 6 µl *Effectene* hinzugefügt und der Ansatz 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden 400 µl komplettes Medium in den Transfektionsansatz pipettiert und auf die Zellen getropft. Die Inkubation erfolgte über 48 Stunden bei 37°C.

Transiente Transfektion von HEK-293, beziehungsweise HEK-293T Zellen

Die Zelllinien HEK-293 und HEK-293T wurden mit Calciumchlorid transfiziert.

Die HEK-293-Zellen wurden in 6 well-Platten kultiviert, in denen Glasplättchen ausgelegt waren. Der Transfektionsmix bestand aus 4 µg Plasmid-DNA, 100 µl 0,25 M CaCl₂ und 100 µl HEPES-Puffer (16 g/l NaCl, 0,72 g/l KCl, 0,25 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O, 10 g/l HEPES, 2 g/l Glucose, pH 7,05, sterilfiltriert). Der HEPES-Puffer wurde unter dauerndem Vortexen langsam zum Ansatz hinzugeträufelt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 ml komplettes Medium zugegeben und direkt auf die Zellen getropft. Die weitere Inkubation erfolgte über Nacht und bis 24 Stunden.

3.2.3 Zellbiologische und biochemische Arbeitsweisen

3.2.3.1 Immunfluoreszenzfärbungen

Die indirekte Immunfluoreszenz erlaubt eine präzise Darstellung von intrazellulären Strukturen, beziehungsweise Antigenen. Sie ist deshalb optimal geeignet zur Darstellung von Proteinen in einer Zelle. Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden mit Hilfe eines spezifischen und eines unspezifischen Antikörpers bestimmte Zellstrukturen oder Proteine markiert und sichtbar gemacht.

Material und Methoden

Im ersten Schritt erfolgt die Bindung des primären Antikörpers an das Antigen. Der sekundäre Antikörper richtet sich gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers und ist mit einem Fluorochrom gekoppelt (vgl. Abbildung 14). Fluorochrome können durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Die Elektronen des Moleküls werden auf ein höheres Energieniveau gebracht. Bei der Rückkehr zum ursprünglichen Energielevel wird Energie in Form von längerwelligerem Licht freigesetzt. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) besitzt eine Excitationswellenlänge von 488 nm und emittiert Licht einer Wellenlänge von 530 nm. TO-PRO3 hat eine Excitationswellenlänge von 633 nm und eine Emissionswellenlänge von 657 nm.

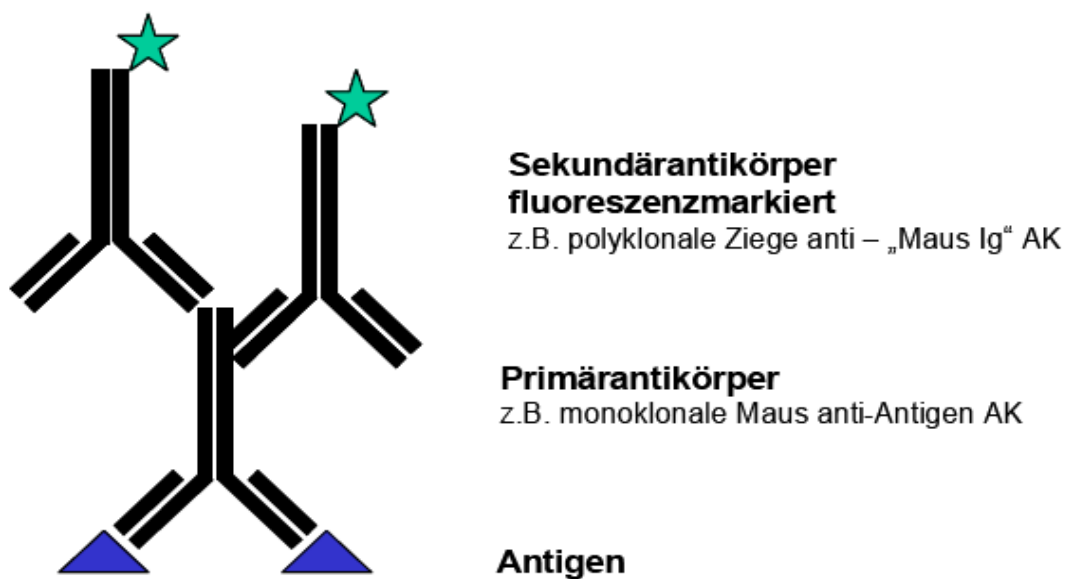


Abbildung 14: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz.

Quelle: Ruggieri, Heisel [100].

Paraformaldehyd-Methode

Bei HEK-293- und HeLa-Zellen wurde die Paraformaldehyd-Methode (PFA-Methode) verwendet. Die Zellen wurden mit 600 µl 4°C kaltem 3%-igem PFA 20 Minuten fixiert und 10 Minuten in 4 ml NH₄Cl/Glycin-Puffer (50 mM NH₄Cl, 20 mM Glycin, in PBS) zur Sättigung freier Aminogruppen gequentscht. Die Permeabilisation erfolgte über 10 Minuten in 0,15%-igem Triton X-100. Danach wurden die Zellen 10 Minuten mit 0,2%-iger Gelatine blockiert. Der primäre Antikörper wurde mit PBS zu einem Endvolumen von 25 µl verdünnt. Die Zellen wurden 1 Stunde mit diesem Ansatz inkubiert und danach erneut mit 0,2%-iger Gelatine 10 Minuten blockiert. Der sekundären Antikörper wurde zu einem Endvolumen von 25 µl verdünnt. Die Zellen wurden 2 Stunden im

Material und Methoden

Dunkeln (Lichtempfindlichkeit der Fluorochrome) inkubiert. Abschließend wurden die Zellen gewaschen und mit *HistoGel* auf einen Objektträger fixiert.

Aceton 80%-Methode

Die Aceton 80%-Methode wurde bei Vero-E6-Zellen benutzt sowie bei Kernfärbungen mit TO-PRO3. Die Zellen wurden mit 4°C kaltem 80%-igem Aceton gewaschen und 20 Minuten in frischem 80%-igem Aceton bei 4°C im Kühlschrank fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden 15 Minuten bei 4°C in 2,5%-igem Milchpulver blockiert. Der primäre Antikörper wurde mit PBS zu einem Endvolumen von 25 µl verdünnt. Die Zellen wurden mit diesem Ansatz 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Kernfärbung TO-PRO3 in PBS verdünnt und eine Stunde bei 37°C mit den Zellen inkubiert. Abschließend wurden die Zellen gewaschen und mit *Mounting Medium* auf einen Objektträger fixiert.

Methanol/Aceton-Methode

Die Methanol/Aceton-Methode wurde bei Immunfluoreszenzen mit dem FITC-gekoppelten Anti-Flag-Antikörper nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden 2 x mit TBS (0,05 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4) gewaschen, dann mit einer frischen Aceton/Methanol-Mischung (Verhältnis 1:1) 1 Minute bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit 25 µl des in TBS verdünnten Antikörpers über 1 Stunde im Dunkeln. Nach weiteren Waschschriften wurden die Zellen mit *Mounting Medium* eingedeckt und auf einem Objektträger fixiert.

Methode für Doppelfärbungen bei verschiedenen Puffern

Diese Methode wurde verwendet, um Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern, die verschiedene Puffer benötigen, durchzuführen. Der FITC-gekoppelte Anti-Flag-Antikörper benötigt einen TBS-Puffer, der Anti-Calnexin-Antikörper einen PBS-Puffer. Es wurden Vero-E6-Zellen verwendet. Die Fixation und Permeabilisation der Zellen geschah mit 80%-igem Aceton wie oben beschrieben. Mit 2,5%-igem Milchpulver wurde über 15 Minuten bei 4°C blockiert. Die primären und sekundären Antikörper wurden wie oben beschrieben verwendet. Daraufhin wurden die Zellen ein zweites Mal 10 Minuten mit 3%-igem PFA fixiert. Nach Quenschen mit NH₄Cl und Glycin über

30 Minuten wurden die Zellen mit TBS gewaschen (Puffer-Wechsel) und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem 3. Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden abschließend gewaschen, in *Mounting Medium* eingedeckt und auf einen Objektträger fixiert.

3.2.3.2 Konfokalmikroskop

Das Prinzip der Konfokalmikroskopie wurde 1957 von Marvin Minsky entdeckt. Das Konfokalmikroskop ist eine Variante des Lichtmikroskops, bei dem sich das Bild nicht aus einer Überlagerung mehrerer Ebenen ergibt, sondern virtuelle optische Schnitte durch das Objekt entstehen. Der Vorteile der Konfokalmikroskopie ist die Elimination von bildverschlechternden Informationen, die außerhalb des Fokusses liegen. Bei den Aufnahmen ist es möglich, die Tiefe des Fokusses festzulegen und eine Serie von optischen Schnitten durch das Objekt zu machen.

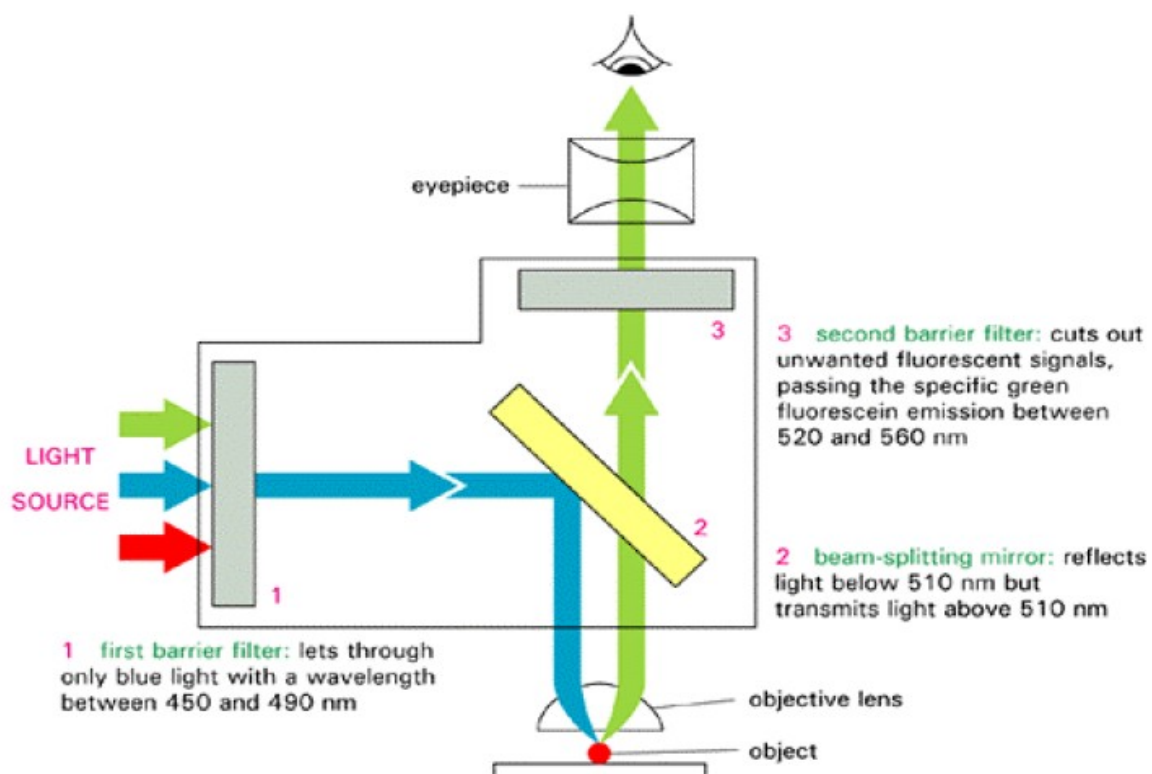


Abbildung 15: Prinzip der Konfokalmikroskopie.

Am Beispiel der Filter für das Fluorochrom FITC sind die Strahlengänge dargestellt. Quelle: Ruggieri, Heisel [100].

Das Anregungslicht wird auf einen Punkt der Probe fokussiert. Das zurückkommende Signal

gelangt durch das gleiche Objektiv zurück und wird mit einem Splitter durch eine Lochblende zu einem Detektor geleitet. Dadurch wird eine maximale Ausblendung von angrenzenden Signalen aus anderen Ebenen erreicht (vgl. Abbildung 15). Da nur ein Punkt auf einmal analysiert werden kann, muss die Probe entsprechend abgerastert und digital zu einem Bild zusammengesetzt werden. In dieser Arbeit wurden ein Helium-Neon-Laser mit einer Exzitationswellenlänge von 633 nm und ein Argon-Laser mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm verwendet.

3.2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Ermittlung des Molekulargewichtes von Proteinen, beziehungsweise der Auftrennung eines Proteingemisches. Die stark negativ geladenen SDS-Moleküle lagern sich an Proteine an, welche dadurch denaturieren. Gleichzeitig wird die proteineigene Ladung verdeckt und ist dadurch vernachlässigbar. Je größer ein Protein, desto mehr SDS-Moleküle lagern sich an und desto stärker ist die negative Ladung. Durch Anlegen einer Spannung kommt es zur Trennung der Proteine nach Stärke ihrer Ladung. Das Gel, in dem die Proteine sich auftrennen, besteht aus Sammel- und Trenngel. Das Sammelgel dient der Konzentration der Probe am Übergang zum Trenngel. In der Matrix des Trenngels werden die Proteine größenabhängig voneinander getrennt.

Die Proteingelelektrophorese wurde mit 12- bis 15%-igen Gelen durchgeführt. Es wurde das *Bio-Rad-System* verwendet. Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Oberfläche durch hinzufügen von Isopropanol geglättet. Nach Verfestigung des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Die Proteinproben wurden in 20 bis 50 µl 2 x SDS-Ladepuffer über 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurden die Proben 2 Minuten bei 14000 rpm abzentrifugiert und in die Taschen geladen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 160 V und 400 mA über 2 Stunden.

12%-iges Trenngel: 8,04 ml Aqua Dest., 6 ml 1,5 M Tris pH 8,8 , 240 µl 10% SDS-Stammlösung, 9,6 ml 30% Bisacrylamid (37,5:1) (Rotiphorese Gel 30), 120 µl 10% APS, 12 µl TEMED.

15%-iges Trenngel: 5,64 ml Aqua Dest., 6 ml 1,5 M Tris, pH 8,8, 100 µl 10% SDS-Stammlösung, 12 ml 30% Bisacrylamid (37,5:1) (Rotiphorese Gel 30), 50 µl 10% APS, 5 µl TEMED.

5%-iges Sammelgel: 3,05 ml Aqua Dest., 1,25 ml 0,5 M Tris, pH 6,5, 50 µl 10% SDS-Stammlösung, 650 µl 30% Bisacrylamid (37,5:1) (Rotiphorese Gel 30), 25 µl 10% APS, 5µl TEMED.

4x SDS Ladepuffer: 0,5 M Tris (pH 6,8), 6% SDS, 40% Glycerol, 0,2% Bromophenolblau, 4% Mercaptoethanol.

10x Elektrophoresepuffer: 50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1% SDS.

3.2.3.4 Elektrotransfer und Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)

Eine immunologische Charakterisierung kann mit Proteinen durchgeführt werden, die auf einer Nitrocellulose-Membran fixiert sind. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Proteine nach der SDS-PAGE von dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Zur Immunodetektion von bestimmten Antigenen wird die Membran mit spezifischen Antikörpern inkubiert. In einem zweiten Schritt werden die Antigene durch ein Antikörper-gekoppeltes Peroxidase-Färbeverfahren sichtbar gemacht.

Die SDS-PAGE-Gele wurden auf Nitrocellulose-Membranen geblottet. Der Aufbau des Blots war der Folgende: Anode / Schwamm / 3x Whatmann Papier / Nitrocellulose-Membran / SDS-PAGE-Gel / 3x Whatmann Papier / Schwamm / Kathode.

Der Elektrotransfer erfolgte über Nacht bei 400 mA und 40 V. Am nächsten Tag wurden die Membranen mit 5%-igem Milchpulver in TBST (10 mM pH 8,0 Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% TWEEN, ad 1 l Aqua Dest.) 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Der primäre Antikörper wurde über Nacht in 4 ml 0,05%-igem TBST hinzugegeben, am folgenden Tag die Membranen mit TBST-Puffer gewaschen, der sekundäre Antikörper in ein Gesamtvolumen von 4 ml verdünnt, auf die Membran gegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut gewaschen.

Die geblotteten Proteine wurden mittels des *ECL Western Blotting Detection Systems* nach Herstellerangaben detektiert, die Membranen über variable Zeiträume gegenüber BIOMAX-MR Röntgenfilmen exponiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in der Dunkelkammer über eine automatische Entwicklungsmaschine.

Blottingpuffer: 9 g Tris-HCl, 43,2 g Glycin, 600 ml Methanol, ad 3 l Aqua Dest.

3.2.3.5 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation exploriert Protein-Protein-Interaktionen. Durch Kotransfektion von zwei Plasmiden in eine Zelle werden ein Bait- und ein Prey-Protein gleichzeitig exprimiert. Das Bait-Protein ist durch das Plasmidkonstrukt mit einem c-myc-Epitop fusioniert, das Prey-Protein seinerseits mit einem HA-Epitop. Interagiert das Proteinpaar, so entsteht ein Proteinkomplex der ein c-myc- und ein HA-Epitop besitzt. Das Experiment basiert darauf, dass man das Bait-Protein durch sein c-myc-Epitop aus einem Proteingemisch co-immunopräzipitieren kann. Interagiert das Bait-Protein mit dem Prey-Protein, so wird der gesamte Proteinkomplex isoliert und das Prey-Protein kann in dem Isolat durch sein HA-Epitop nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 16).

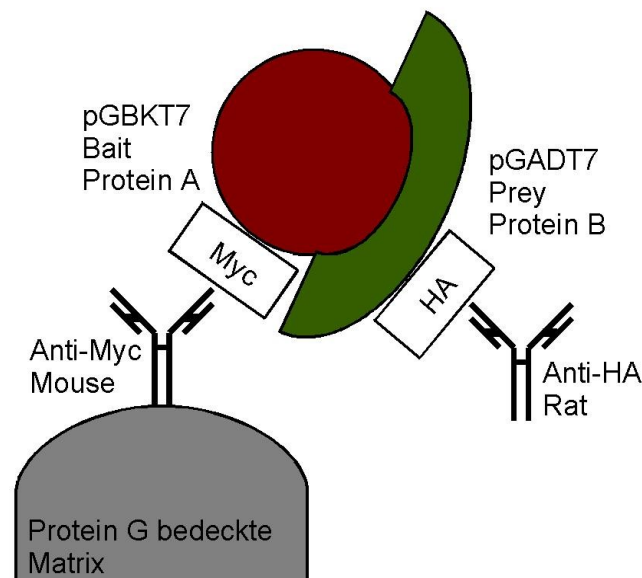


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Bindungsverhältnisse während der Co-IP.

Zur Expression der ORFs in den pGADT7 (Prey) und pGBKT7 (Bait) Vektoren wurden HEK-293-Zellen mit dem Vaccinia Virus *vTF-7* infiziert. Bait- und Prey- Plasmide besitzen einen T7-Promoter. Das Vaccinia-Virus verfügt über eine T7-Polymerase. Somit wird eine starke Expression der Proteine gewährleistet. Das Vaccinia-Virus (90 µl) wurde in 60 ml Medium (DMEM, 1% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) resuspendiert und mit den Zellen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Transfektionsmix bestand aus folgenden Bestandteilen: 10 µg DNA des Prey-Vektors, 10 µg DNA des Bait-Vektors, 250 µl 250 mM CaCl₂ und 250 µl HEBS-Puffer. Der HEBS-Puffer wurde unter ständigem Vortexen tropfenweise hinzugegeben. Der Ansatz

Material und Methoden

wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert und für 24 bis 48 Stunden inkubiert. Zur Herstellung der Lysate wurden die Zellen 4 Minuten mit 1100 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde gewaschen, in 2 ml Lysis-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1% NP₄O oder 1% Triton X-100, ad 100 ml Aqua Dest.) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Protein G-Beads wurden vorbereitet (Pre-Clear), indem sie mit NP40-Puffer (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% NP40=IGEPAL CA650) gewaschen und 1 Minute bei 14000 rpm abzentrifugiert wurden. Das Verhältnis von gewaschenen Proteinbeads zum Puffer war 1:1. Das Lysat wurde 5 Minuten bei 14000 rpm abzentrifugiert, der Überstand mit 50 µl gewaschenem Protein G gemischt und 1 Stunde bei 4°C über Kopf geschüttelt, um die Proteine, die unspezifisch an Protein G banden, zu eliminieren. Nach kurzem Abzentrifugieren, um die Beads zu verwerfen, wurde das Lysat auf 2 x 1 ml aufgeteilt. Es wurden jeweils 50 µl Protein G und 10 µl HA-Antikörper sowie 50 µl Protein G und 5 µl c-myc-Antikörper zu den Ansätzen gegeben. Die Lysate wurden mit den Antikörpern über Nacht auf dem Schüttler bei 4°C immunpräzipitiert. Nach Abzentrifugation bei 14000 rpm für 1 Minute wurden die Beads mit 500 µl NP40-Puffer gewaschen, abschließend die Beads in 50 µl 2 x SDS-Puffer aufgenommen. Die Proteine wurden denaturiert und von ihren Bindungen gelöst, indem sie 10 Minuten bei 99°C aufgeköcht wurden. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt.

4 Ergebnisse

"der Kliniker unserer Tage [muss] nicht bloß ein wissenschaftlicher Praktiker, sondern auch ein Forscher, ein Beobachter [...] sein."

[R. Virchow]

4.1 Klonierung der ORFs in Expressionsplasmide

4.1.1 PCR und BP Rekombinationsreaktion

Ausgehend von der cDNA wurden die akzessorischen ORFs mittels PCR amplifiziert und für das Gateway®-Rekombinationssystem kompatibel gemacht. Die Fragmente wurden in zwei Schritten durch eine primäre und eine *nested PCR*, jeweils am 5'- und 3'-Ende, um die *attachment*-sites ergänzt.

Die Forward- und Reverseprimer der primären PCR bestanden aus einem spezifischen und einem unspezifischen Teil: 15 bis 20 Nukleotide hybridisierten mit den ORFs, während 12, beziehungsweise 17 Nukleotide komplementär zu den *attachment*B-sites (*att*B-sites) waren (vgl. Abbildung 17).

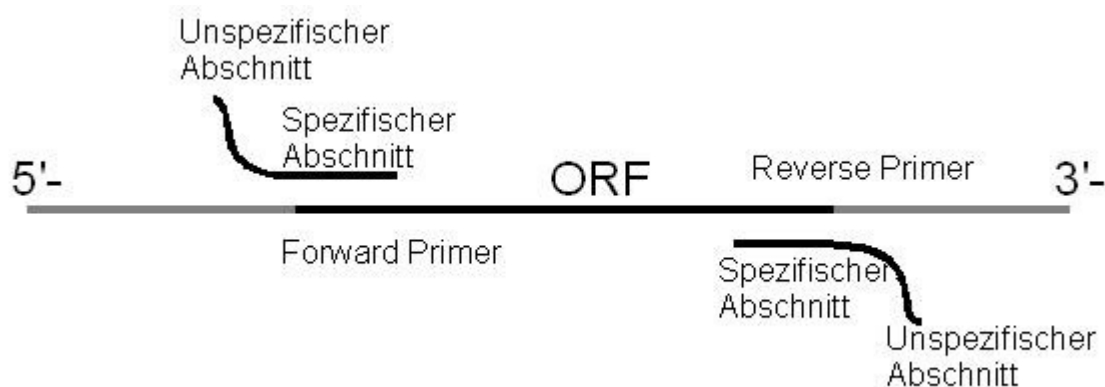


Abbildung 17: Primer-Annealing der internen Forward- und Reverseprimer.

Während der PCR mit den internen Primern wurden die ORFs von der cDNA ausgehend amplifiziert und um die *att*B-sites verlängert. Der unspezifische Abschnitt enthielt bei allen Primern die gleiche *att*B-site-Sequenz. Der spezifische Abschnitt besaß komplementäre Sequenzen zu denen der ORFs.

Die Reverseprimer wurden so konzipiert, dass es am 3'-Ende jeden ORFs zur Deletion des Stopkodons kam. Somit wurde später ein Translationsstop an dieser Stelle verhindert und die Ergänzung des ORFs mit einem Anker ermöglicht. Um den richtigen Leserahmen zu gewährleisten, wurde bei den Reverseprimern ein Cytosin-Nukleotid eingefügt (siehe Tabelle 6).

Während der darauffolgenden, der sogenannten *nested PCR*, wurden die *attB*-sites komplettiert. Die Länge der Primer betrug 29 Nukleotide, wovon 12 zum Primerannealing führten. Die übrigen Nukleotide dienten der Ergänzung des *attB*-site (vgl. Abbildung 18).

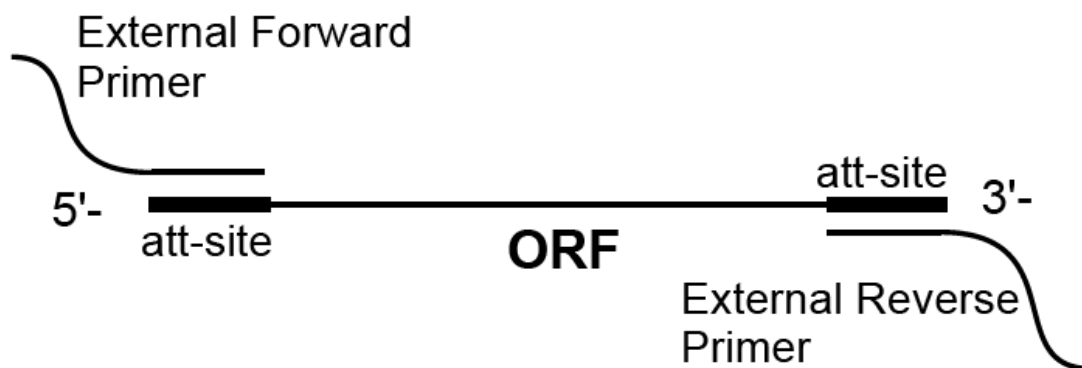


Abbildung 18: Primer-Annealing der *nested PCR* mit externen Forward- und Reverseprimern.

Während der *nested PCR* wurden die akzessorischen ORFs um *attB*-sites ergänzt.

Bei dem Spike- und Nukleokapsidgen gelang das Klonieren mit den herkömmlichen Primern nicht. Im Spikegen fanden wir eine Komplementarität von neun Nukleotiden (bp 1914-1922) zu Sequenzen des externen und internen Forwardprimers. Im Nukleokapsidgen fanden wir ebenfalls eine Sequenz, die auf kurzem Abschnitt (14 bp) mehrere Komplementaritäten zum externen Reverseprimer zeigte (bp 686 und 712). Es wurden entsprechend verlängerte Primer entworfen, um die Hybridisierung spezifischer zu gestalten (siehe Tabelle 7).

Die ORFs wurden in den Entryvektor pDONR 221 und zusätzlich in den Entryvektor pDONR 207 rekombiniert. pDONR 221 besitzt ein Kanamycinresistenzgen, während pDONR 207 ein Gentamycinresistenzgen besitzt. Der blande Donorvektor wurde in *E. Coli*-Stämmen durch sein *ccdB*-Gen negativ selektioniert. Die Plasmide wurden durch Restriktionsverdau kontrolliert.

4.1.2 pDEST-ORF-N, pDEST-ORF-C, pGADT7-ORF und pGBKT7-ORF

Um eine einfache Durchführung der Immunfluoreszenzen zu gewährleisten, kennzeichneten wir jedes ORF mit einem Anker. Dieser beinhaltet das Antigen für die Immunfluoreszenzen. Jedes ORF sollte einmal am Amino- sowie am Carboxyterminus durch einen solchen Anker ergänzt werden. Es wurden zwei entsprechende eukaryotische Expressionsvektoren entworfen: pDEST-rfB-N mit einem aminoterminalen und pDEST-rfB-C mit einem carboxyterminalen Anker.

pDEST-rfB-N

Der Anker wurde getrennt als kodierender und komplementärer Strang synthetisiert, die Stränge hybridisiert und durch ein Agarosegel aufgereinigt. Es entstand ein etwa 60 bp langes doppelsträngiges Oligonukleotid, entsprechend einem circa 20 Aminosäuren langem Oligopeptid (siehe Abbildung 19). Der Anker kodierte sowohl für eine Abfolge von 6 Histidin-Aminosäuren (-CAC CAT CAC CAT CAC CAT-), als auch für das Epitop Flag (-GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG-). Aminoterminal besaß er eine Hind III-Restriktionsschnittstelle und carboxyterminal eine EcoR V- und Xba I-Restriktionsschnittstelle. Zwischen letzteren befand sich ein Stopkodon. Dieses Stopkodon ersetzte das endogene Stopkodon der ORFs, welches während der PCR deletiert worden war. Die Shine-Dalgarno- und Kozak-Sequenz dienten der Bindung von Ribosomen.

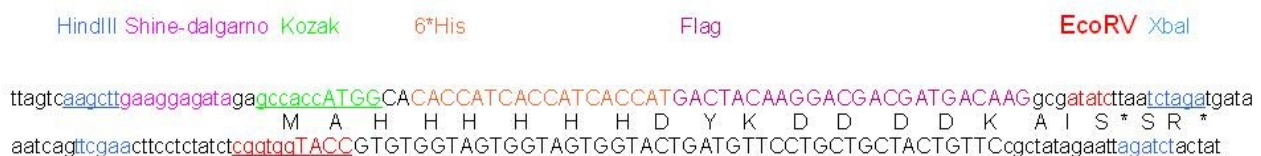


Abbildung 19: Aminoterminaler Anker für das Expressionsplasmid pDEST-rfB-N.

6xHis, Flag: Antigene; Hind III, EcoR V, Xba I: Restriktionsschnittstellen; *: Stopkodon; Shine-Dalgarno-, Kozak-Sequenzen: ribosomale Bindungsstellen. Quelle: Albrecht von Brunn.

Die Enden des Oligonukleotids wurden mit Hind III und Xba I geschnitten. Als Grundgerüst für die Destinationsvektoren wurde ein pCR3-Vektor verwendet, welcher ebenfalls mit Hind III und Xba I geschnitten wurde. Das doppelsträngige Oligonukleotid wurde hineinligiert. So entstand das pCR3-HIS-Flag/N-term Plasmid. Dieses wurde mit dem Restriktionsenzym EcoR V als Einzelschnitt geöffnet. Aus einem anderweitig vorhandenen pCR3-rfB Vektor wurde mit EcoR V das rfB-

Fragment mitsamt den *attachment*-sites *attR1* und *attR2* ausgeschnitten und in das pCR3-HIS-Flag/N-term Plasmid hineinligiert (siehe Abbildung 20), die Ausrichtung des *rfB*-Fragmentes im Plasmid durch Restriktionsverdau überprüft.

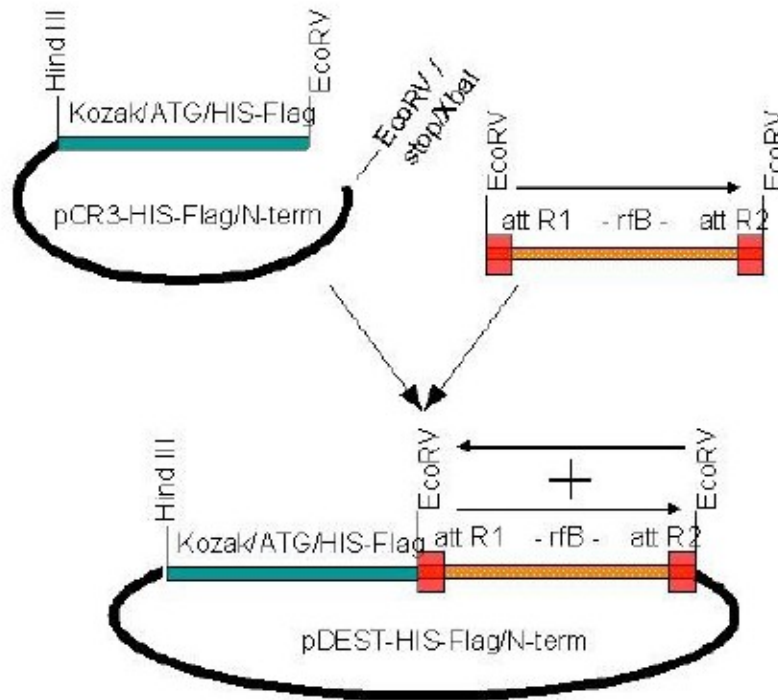


Abbildung 20: Schema der Synthese des Expressionsplasmids pDEST-rfB-N.

Kozak/ATG/HIS-Flag: N-terminaler Anker; *attR1* und *attR2*: *att*-sites; EcoR V, Hind III, Xba I: Restriktionsschnittstellen; pDEST-HIS-Flag/N-term: N-terminaler Destinationsvektor pDEST-rfB-N. Quelle: Albrecht von Brunn.

pDEST-rfB-C

Mit dem carboxyterminalen Anker wurde so verfahren wie mit dem aminoterminalen. Dieser Anker kodierte ebenfalls für eine Abfolge von 6 Histidinen (-CAC CAT CAC CAT CAC CAT-) und für einen Flag (-GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG-). Aminoterminal besaß er eine EcoR V-, carboxyterminal eine Xho I-Restriktionsschnittstelle. Vor dieser letzten Restriktionsstelle befand sich ein Stopkodon (vgl. Abbildung 21).



Abbildung 21: Carboxyterminaler Anker für das Expressionsplasmid pDEST-rfB-C.

6*His und Flag: Antigene; EcoR V und Xho I: Restriktionsschnittstellen; *: Stopkodon. Quelle: Albrecht von Brunn.

Das doppelsträngige Oligonukleotid wurde mit EcoR V und Xho I geschnitten. Ein pCR3 Vektor wurde ebenfalls mit denselben Restriktionsenzymen geöffnet und das doppelsträngige Nukleotid hineinligiert. Das entstandene Plasmid wurde mit EcoR V geöffnet, ein rfB-Fragment samt attR1 und attR2 hineinligiert, dann die Ausrichtung des rfB-Fragmentes durch Restriktionsverdau überprüft.

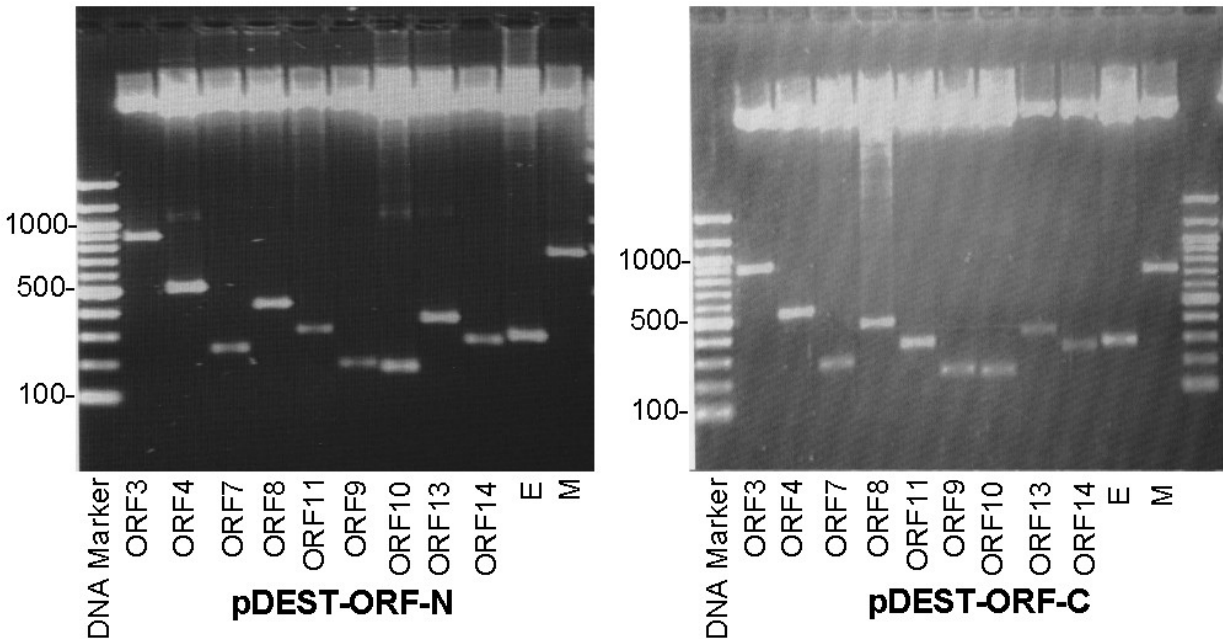


Abbildung 22: EcoR V- Restriktionsverdau von pDEST-ORF-N und pDEST-ORF-C.

Der Restriktionsverdau wurde in 2%-igem Agarosegel getrennt. Als DNA Marker wurde Gene Ruler™ 1000 bp Ladder Plus verwendet.

Abschließend wurden die ORFs in pDEST-rfB-N und pDEST-rfB-C rekombiniert. Die Plasmide wurden in *E. Coli*-Stämmen mittels antibiotikumhaltigen Medien selektiert, die Expressionsplasmide durch Restriktionsverdau kontrolliert (vgl. Abbildung 22).

pGADT7 und pGBKT7

Im Fokus stand auch die Protein-Protein-Interaktionsanalyse des SARS-Coronavirus-ORFeoms mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-System [127]. Alle positiven Hefe-Interaktionen des Screenings wurden zur Kontrolle einer Co-Immunopräzipitation (Co-IP) unterzogen [127]. Die ORFs wurden von pDONR 207-ORF in zwei Destinationsvektoren rekombiniert. Für jedes ORF entstand ein Bait- (pGBKT7-ORF) und ein Prey-Vektor (pGADT7-ORF). Nach Transformation in DH10B-Bakterienstämme wurden die Plasmide in antibiotikumhaltigen Medien selektioniert.

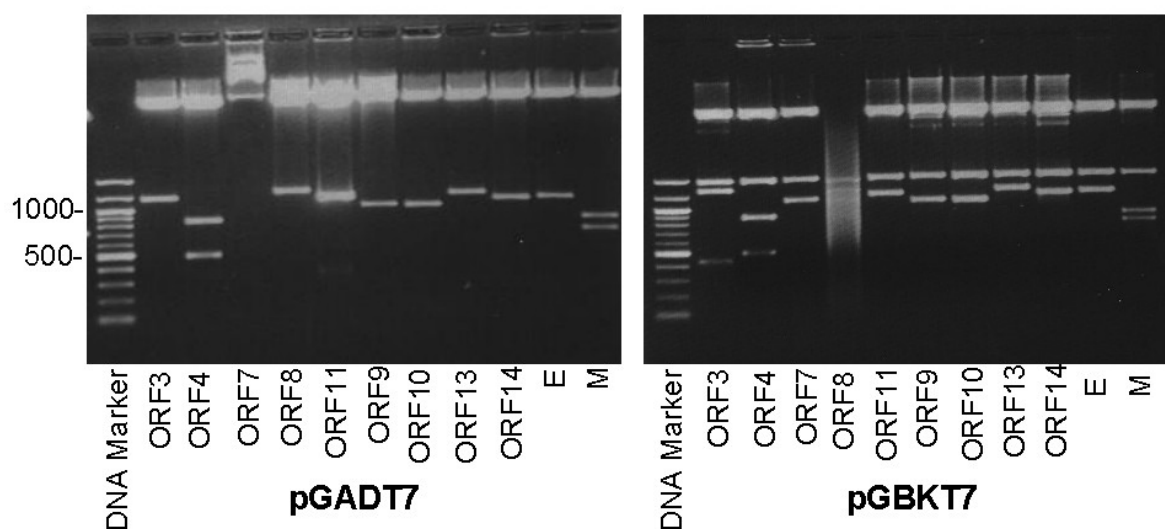


Abbildung 23: Agarosegel des Restriktionsverdaus mit Hind III von pGADT7-ORF und pGBKT7-ORF.

Der Restriktionsverdau wurde in 2%-igem Agarosegel getrennt. Als DNA Marker wurde Gene Ruler™ 1000 bp Ladder Plus verwendet.

4.2 Immunfluoreszenzen

Nach dem Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) handelt sich beim SARS-Coronavirus um das zweite Coronavirus, welches in Vero-E6-Zellen (*African Green Monkey Kidney Cells*) kultivierbar ist [59]. So wurden zum Beispiel zytopathologische Veränderungen in infizierten Vero-E6-Zellen

nachgewiesen [59]. Für die Immunfluoreszenzen wurden die Expressionsvektoren pDEST-ORF-N und pDEST-ORF-C daher in Vero-E6-Zellen transfiziert.

4.2.1 pDEST-eGFP-N

Als Transfektionskontrolle für die Immunfluoreszenzen sowie zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde pDEST-eGFP-N kloniert. Das *Green Fluorescent Protein* ist in vielen eukaryontischen Zellen als nicht-toxisch eingestuft. Es besitzt ein Anregungsmaximum bei 475 nm und emittiert Licht einer Wellenlänge von 509 nm. Es ist daher leicht unter einem UV-Mikroskop lokalisierbar.

Die Funktionalität des Ankers wurde ebenfalls mit diesem Expressionsplamid sichergestellt. Die Transfektionseffizienz von pDEST-eGFP-N betrug 10 bis 40%. Als Negativkontrolle wurde ein ccdB-Gen enthaltende pCR3 Vektor verwendet.

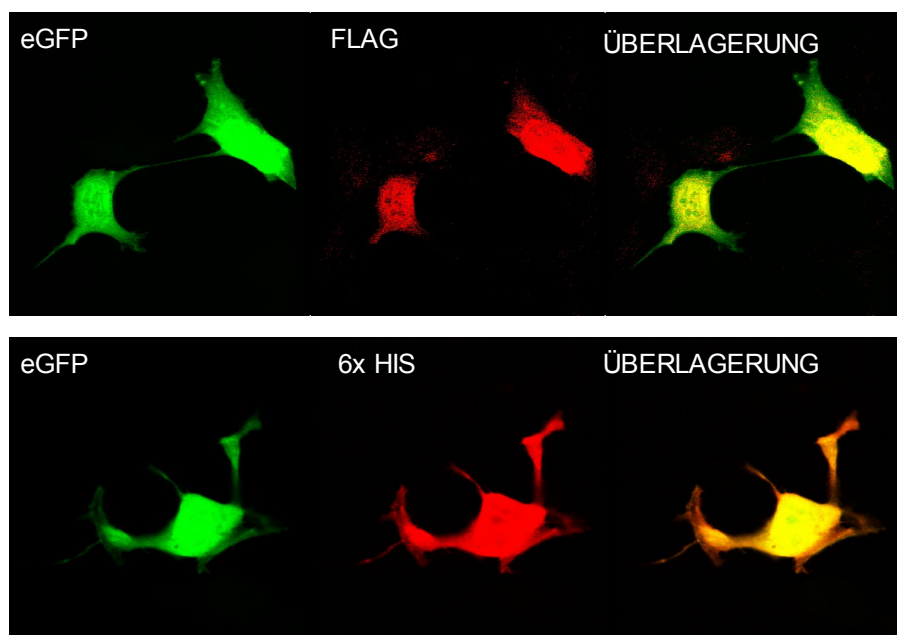


Abbildung 24: Kontrolle der Funktionalität der Flag- und His₆-Antigene im Expressionsplasmid pDEST-eGFP-N.

Es wurden HEK-293-Zellen mit dem Expressionsplasmid pDEST-eGFP-N transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Fixierung der Zellen. Als primäre Antikörper gegen den aminoterminalen Anker des eGFP wurden die Antikörper Anti-Flag und Anti-His verwendet. Der sekundäre Antikörper war mit Texas Red gekoppelt. Quelle: Albrecht von Brunn

Das eGFP und die Signale des Flag- und His₆-Antigens befanden sich jeweils diffus im Zytoplasma und im Nukleus. Bei der digitalen Überlagerung der Signale zeigte sich eine Kongruenz beider Signale (vgl. Abbildung 24). Weiterhin besaß eGFP seine typische subzelluläre Lokalisation im Zytoplasma und Nukleus. Es bestand kein Anhalt für eine Änderung der subzellulären Lokalisation durch den Anker. In der Negativkontrolle wurden keine signifikanten Immunfluoreszenzsignale ausgemacht.

4.2.2 Envelope- und Membranprotein

Für die Immunfluoreszenzen mit dem Membran- und Envelopeprotein wurden Vero-E6-Zellen jeweils mit pDEST-E-C, pDEST-E-N, pDEST-M-C und pDEST-M-N transfiziert und nach 24 Stunden nach der Methanol/Aceton-Methode fixiert und permeabilisiert. Es wurde der Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelte Flag-Antikörper verwendet. Die Verwendung eines sekundären Antikörpers erübrigte sich. Die Exzitationswellenlänge unter dem Konfokalmikroskop betrug entsprechend 488 nm.

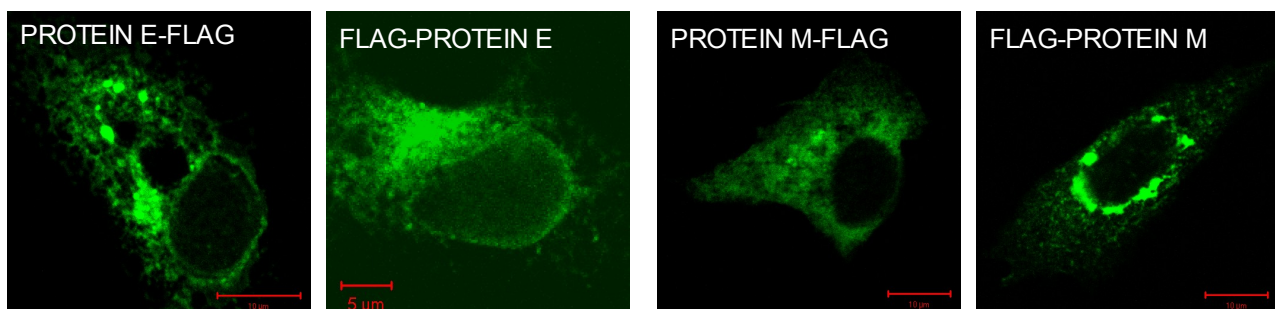


Abbildung 25: Immunfluoreszenzen des Membran- und Envelopeproteins mit dem FITC-gekoppelten Antikörper gegen das Flag-Antigen.

Expressionsplasmide mit den C- und N-terminal markierten Genen wurden in Vero-E6-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden mit dem Flag-Antikörper analysiert.

Protein E-C und Protein E-N wurden in morphologisch ähnlichen subzellulären Strukturen lokalisiert. Die Proteine wurden perinukleär sowie fleckförmig im Zytoplasma beobachtet. Diese Verteilung ist typisch für Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (vgl. Abbildung 25). Dagegen bildeten Protein M-C und Protein M-N unterschiedliche intrazelluläre Muster. Protein M-C befand sich bevorzugt perinukleär, in Golgi-Apparat ähnlichen Strukturen. Protein M-N war dafür schuppig im Zytoplasma der Zellen verteilt und ähnelte der Verteilung des

Endoplasmatischen Retikulums (siehe Abbildung 25). In der Negativkontrolle mit dem pCR3-rfB Konstrukt wurden keine signifikanten Immunfluoreszenzsignale ausgemacht.

4.2.3 Akzessorische Proteine

Für die Immunfluoreszenzen mit den akzessorischen ORFs wurden Vero-E6-Zellen mit pDEST-ORF-C und pDEST-ORF-N von jeweils ORF 3a, ORF 3b, ORF 6, ORF 7a, ORF 8b, ORF 7b, ORF 8a, ORF 9b und ORF 14 transfiziert und nach 24 Stunden mit der Methanol/Aceton-Methode fixiert und permeabilisiert. Als Antikörper wurde, wie bei den Strukturproteinen, der direkte FITC-gekoppelte Antikörper gegen das Flag-Antigen verwendet. Die Exzitationswellenlänge von FITC beträgt 488 nm.

ORF 3a-C und ORF 7a-N wurden bevorzugt perinukleär in Golgi-Apparat-ähnlichen Strukturen vorgefunden. ORF 3a-N, ORF 6-C, ORF 6-N, ORF 7a-C und ORF 8a-C verteilten sich morphologisch wie das Endoplasmatische Retikulum (ER): Sie bildeten fleckförmige Strukturen im zytoplasmatischen Bereich der Zellen. Die Signale von ORF 7b-C und ORF 7b-N bildeten ebenfalls ER-artige Strukturen. Bei diesen Proteinen stellte sich zusätzlich die Kernmembran außergewöhnlich stark dar. ORF 3b-C und ORF 3b-N wurden im Nukleus lokalisiert. Rein vesikuläre Strukturen konnten bei ORF 8b-C und ORF 14-C beobachtet werden. Bei ORF 8b-N, ORF 9b-N und ORF 14-N fand sich, zusätzlich zu den vesikulären Strukturen, eine diffuse Anfärbung von Zytoplasma und Kern. ORF 9b-C konnte in Zytoplasma und Kern lokalisiert werden, während sich ORF 8a-N nicht darstellen ließ (vgl. Abbildung 26).

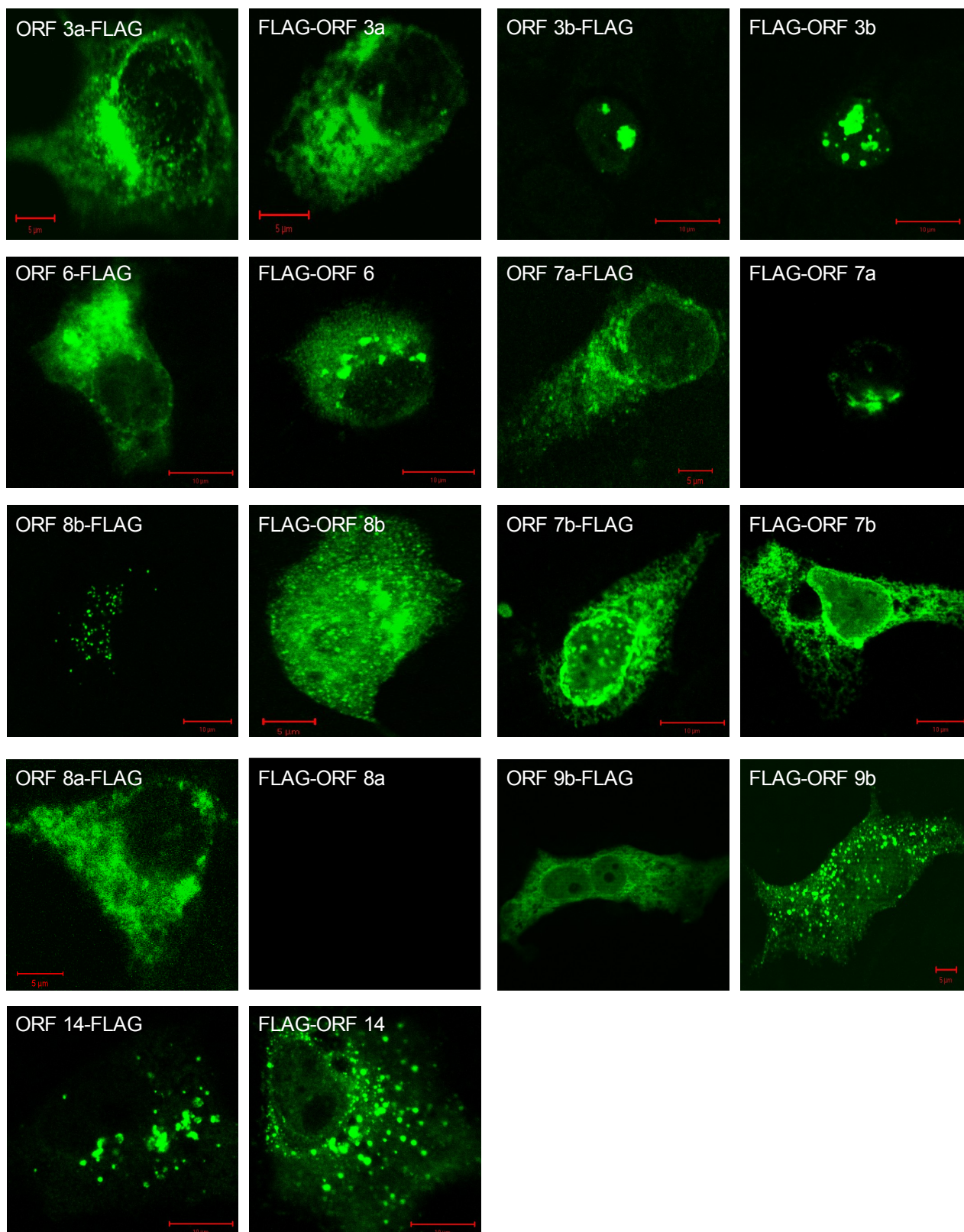


Abbildung 26: Immunfluoreszenzen der akzessorischen Proteine mit dem FITC-gekoppelten Antikörper gegen das Flag-Antigen.

Expressionsplasmide mit den C- und N-terminal markierten ORFs wurden in Vero-E6-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden mit dem Flag-Antikörper analysiert.

4.2.3.1 TO-PRO3-Kernfärbung

Um die Lokalisation der ORFs zu erleichtern und insbesondere das Verhältnis der ORFs zum Zellkern zu spezifizieren, wurden weitere Immunfloreszenzen mit TO-PRO3 durchgeführt. TO-PRO3 ist kein Antikörper, besitzt aber die Eigenschaft Chromatin anzufärben. Unter einer Exzitationswellenlänge von 642 nm kommt es zur Emission von rotem Licht der Wellenlänge 660 nm.

Die Expressionsvektoren wurden in Vero-E6-Zellen transfiziert, nach 24 Stunden mit 80%-igem Aceton fixiert und permeabilisiert. Als primärer Antikörper wurde der FITC-gekoppelte Flag-Antikörper verwendet. Das Chromatin wurde mit TO-PRO3 gefärbt. Durch die TO-PRO3 Färbung bestätigte sich die nukleäre Lokalisation von ORF 3b-C und ORF 3b-N (hier nicht gezeigt). Die beiden ORFs konnten im Nucleus zwischen den Chromatinstrukturen lokalisiert werden (vgl. Abbildung 27). Ob es sich hierbei um eine Lokalisation im Nucleolus handelt, bleibt fraglich.

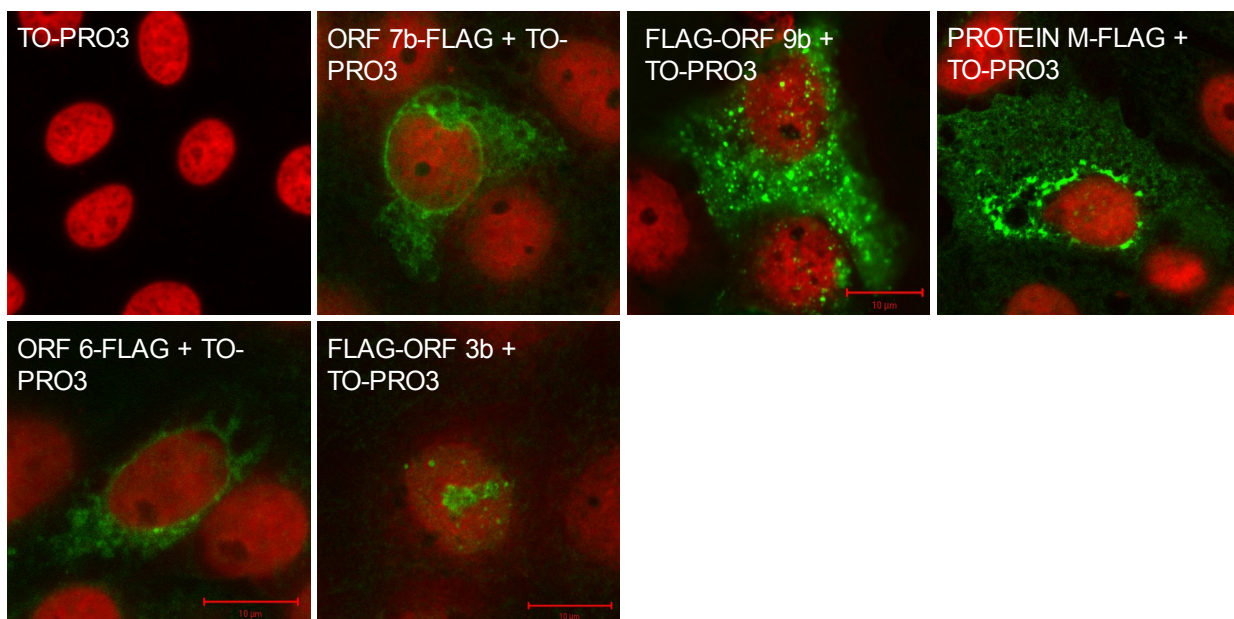


Abbildung 27: Immunfluoreszenzen mit dem Flag-Antikörper zur Darstellung der ORFs und einer TO-PRO3-Chromatinfärbung zur Darstellung des Nucleus.

Vero-E6-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden der ORFs transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem FITC-gekoppelten Flag-Antikörper sowie der Chromatinfärbung behandelt.

4.2.3.2 Calnexin

Um die genaue Lokalisation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu sichern, wurden Doppelfärbungen mit digitaler Überlagerungen beider Signale durchgeführt. Zur Darstellung des ER wurde ein Antikörper gegen Calnexin verwendet.

Die Expressionsplasmide wurden in Vero-E6-Zellen transfiziert, nach 24 Stunden fixiert und permeabilisiert. Zur Darstellung der ORFs und des Endoplasmatischen Retikulums wurden respektive der FITC-gekoppelte Flag-Antikörper und der Calnexin-Antikörper aus Kaninchen verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa-Fluor-633 Anti-Rabbit verwendet.

Das Signal von ORF 3a-C ähnelt morphologisch dem des Golgi-Apparates. Um eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum auszuschließen, wurden Koloalisationsstudien mit Anti-Calnexin durchgeführt. Bei Markierung des Proteins sowohl mit Anti-Flag und Anti-His₆ zeigt sich keine Überlagerung des Signals mit dem ER-Marker. ORF 3a-C reichert sich demzufolge nicht im Endoplasmatischen Retikulum, sondern eher im Golgi-Apparat an (vgl. Abbildung 28).

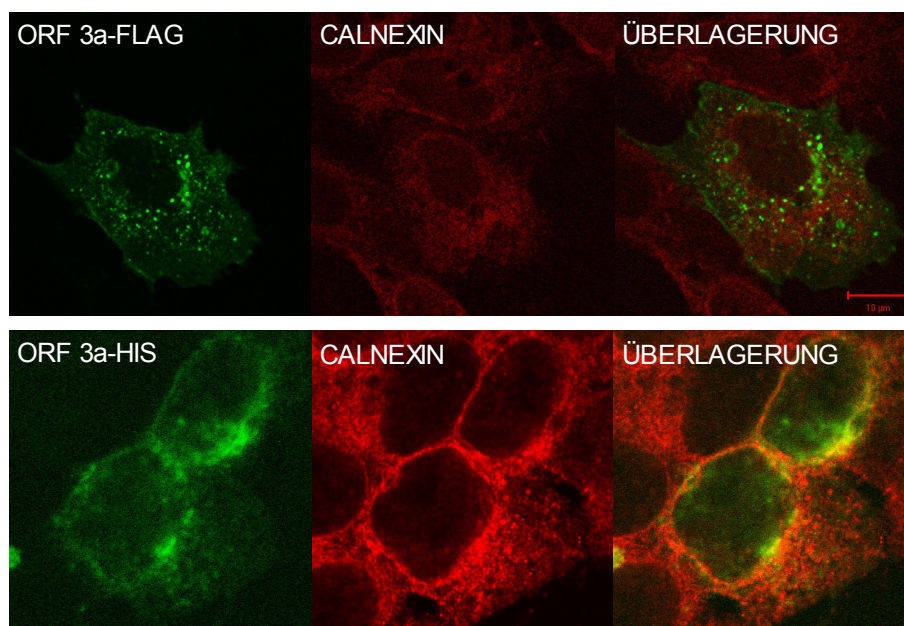


Abbildung 28: Koloalisationsstudien von ORF 3a-C mit dem Endoplasmatischen Retikulum.

Vero-E6-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid ORF 3a-C transfiziert. Nach 24 Stunden wurde mit dem FITC-gekoppelten Flag-Antikörper und einem His₆-Antikörper das Expressionsprodukt dargestellt. Das ER wurde mit einem Antikörper gegen Calnexin dargestellt. Es erfolgte eine digitale Überlagerung der Bilder.

Im Gegensatz dazu konnte eine Kolokalisation von ORF 7b-N, ORF 7b-C, Protein E-N, Protein E-C, ORF 6-N, ORF 6-C und Protein M-N mit dem ER-Marker Anti-Calnexin gesichert werden (vgl. Abbildung 29; ORF 6-C, ORF 7b-N, Protein E-N und M-N werden hier nicht gezeigt).

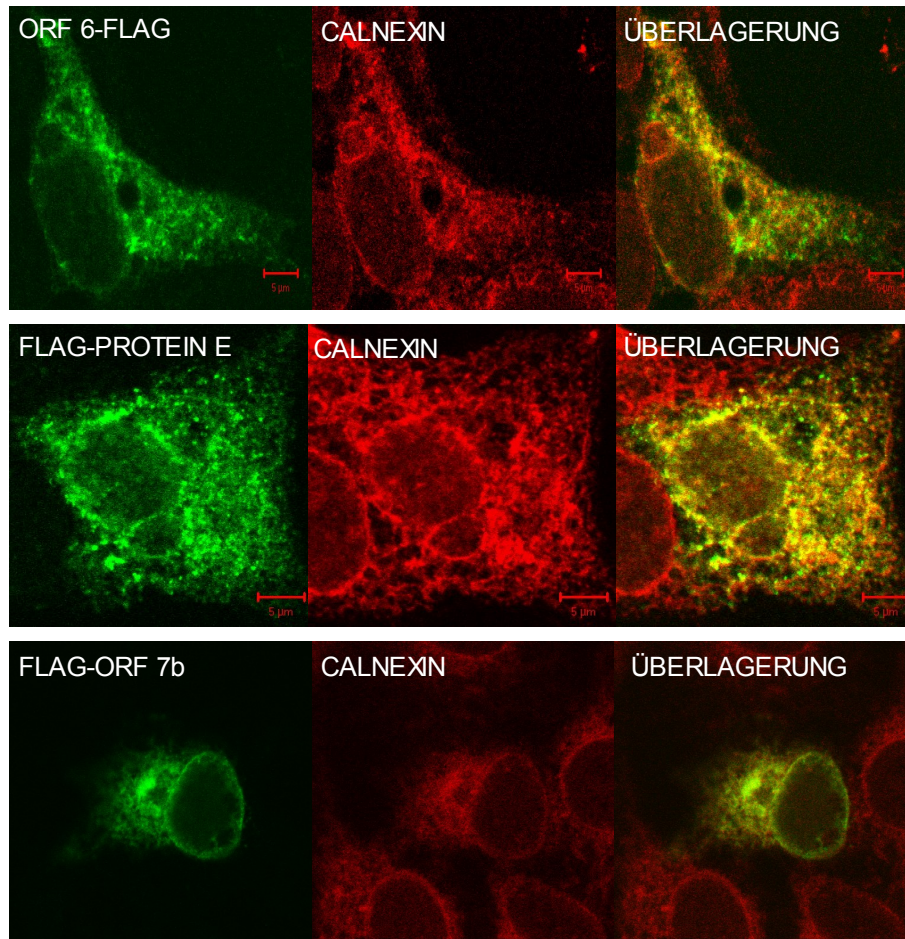


Abbildung 29: Kolokalisationsstudien von ORF 6-C, Protein E-N und ORF 7b-N mit dem Endoplasmatischen Retikulum.

Vero-E6-Zellen wurden mit den Expressionsplamiden der ORFs transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die ORFs mit dem FITC-gekoppelten Flag-Antikörper und das ER mit einem Antikörper gegen Calnexin dargestellt. Es erfolgte eine digitale Überlagerung der Bilder.

4.2.3.3 Lamin B1

ORF 7b besaß im Gegensatz zu anderen Proteinen mit ER-Lokalisation zusätzlich ein starkes perinukleäres Signal. Um die Frage zu klären, ob das Protein zusätzlich an der Kernmembran lokalisiert ist, wurden Kolokalisationsstudien mit Anti-Lamin B1 durchgeführt. Der Antikörper richtet sich gegen den Lamin B-Rezeptor, der sich in der nukleären Membran befindet.

Vero-E6-Zellen wurden mit pDEST-ORF 7b-N und pDEST-ORF 7b-C transfiziert, dann fixiert und permeabilisiert. Als Primärantikörper wurden der FITC-gekoppelte Flag-Antikörper und ein Antikörper gegen Lamin B verwendet.

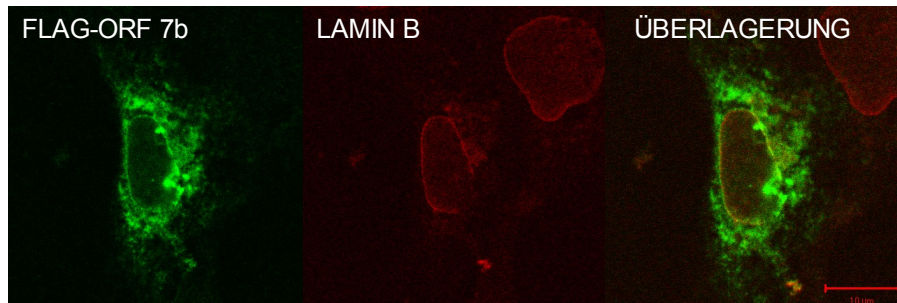


Abbildung 30: Kolokalisationsstudien von ORF 7b-N mit der Kernmembran.

Vero-E6-Zellen wurden mit dem Expressionsplamid pDEST ORF 7b-N transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das ORF mit dem FITC-gekoppelten Flag-Antikörper und die Zellkernmembran mit einem Antikörper gegen Lamin B dargestellt. Die Bilder wurden digital überlagert.

Die Immunfluoreszenzen von ORF 7b-N und ORF 7b-C mit Lamin B1 zeigten eine Kolokalisation der Signale. ORF 7b-N und ORF 7b-C waren unter anderem in der Kernmembran lokalisiert (vgl. Abbildung 30).

4.2.4 Einzelne pGADT7 und pGBKT7 Immunfluoreszenzen

Zur Kontrolle von einigen Lokalisationsergebnissen wurden auch Immunfluoreszenzfärbungen nach Transfektion mit den Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 durchgeführt. Andere Arbeitsgruppen verwendeten ebenfalls die Antigene HA und c-myc, um die Lokalisation der ORFs aufzuschlüsseln. Interessanterweise ergaben sich bei diesen Experimenten in einigen Fällen Unterschiede zu den Lokalisationen mit dem Flag-His₆-Anker.

Die Vektoren pGADT7 und pGBKT7 besaßen keinen Transkriptionpromoter für Vero-E6- oder HeLa-Zellen. Daher wurden HEK-293-Zellen verwendet, die vor der Transfektion mit dem Vaccinia T7-Virus, welches den T7-Promoters enthält, infiziert wurden. Somit kam es zu einer starken Transkription der ORFs. Es wurden ausschließlich ORF 7b, ORF 6 und Protein E

Ergebnisse

transfiziert. HEK-293-Zellen wurden mit Vaccinia T7 infiziert, dann mit den Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Als Primärantikörper wurde Anti-c-myc, beziehungsweise Anti-HA verwendet, als zweiter Antikörper ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper.

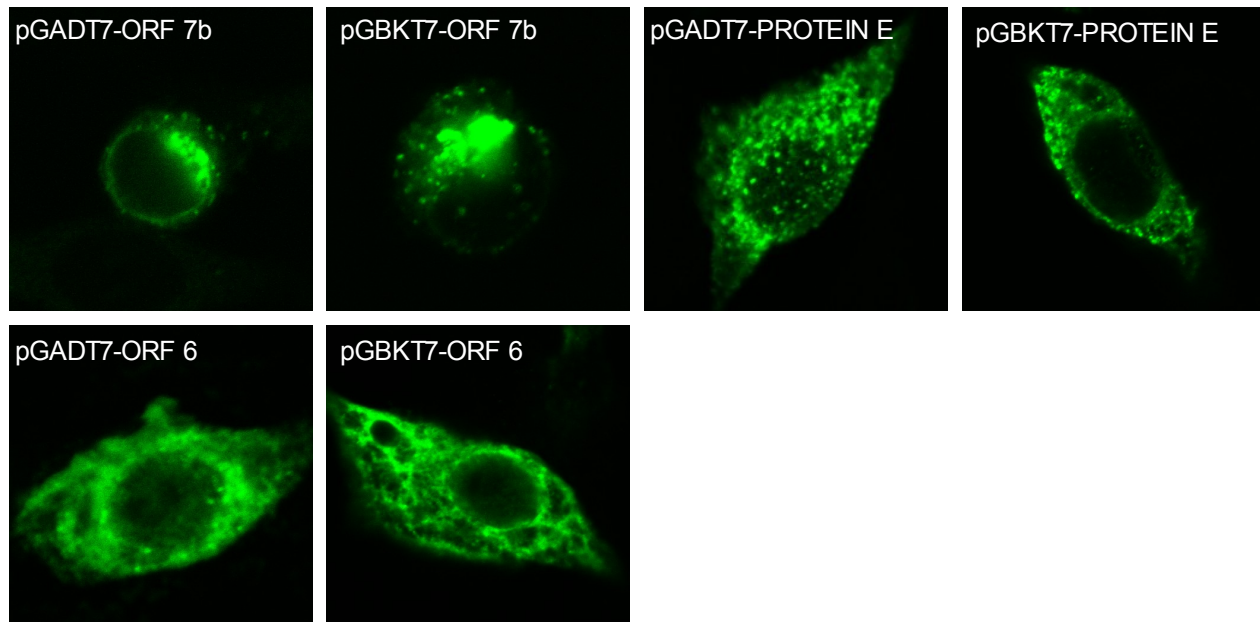


Abbildung 31: Immunfluoreszenzen von ORF 7b, ORF 6 und Protein E aus den Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7.

HEK-293-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pGADT7 und pGBKT7 von ORF 7b, ORF 6 und Protein E transfiziert. Die ORFs wurden mit den Antikörpern gegen c-myc und HA dargestellt.

ORF 6 und Protein E zeigten ein ER-typisches Verteilungsmuster im Zytoplasma der Zellen. Das gleiche Muster hatte sich schon bei den Lokalisationsstudien mit dem Flag-His₆-Anker ergeben.

Es stellte sich heraus, dass ORF 7b-HA und ORF 7b-c-myc sich in Golgi-Apparat ähnlichen Strukturen anreicherten (vgl. Abbildung 31). Allerdings zeigte sich, dass Zellen, welche mit pGADT7-ORF 7b und pGBKT7-ORF 7b transfiziert wurden, eine rundliche Morphologie besaßen. Je nach Infektionsgrad der Zellen mit dem Vaccinia-Virus runden sich diese ab, schrumpfen (vgl. pGADT7-ORF 7b und pGBKT7-ORF 7b in Abbildung 31) und sterben schließlich ab. Die Aussagekraft dieser Färbungen muss daher in Frage gestellt werden.

4.2.5 Zusammenfassung der Immunfluoreszenzen

Wir untersuchten die Lokalisation von insgesamt 11 ORFs mit den jeweiligen Ankern am Amino- und Carboxyterminus. Insgesamt wurden 22 Lokalisationen bestimmt.

Zusammenfassend wurden die meisten ORFs im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Häufig kam es ebenfalls zu Signalen im Golgi-Apparat oder in vesikulären Strukturen.

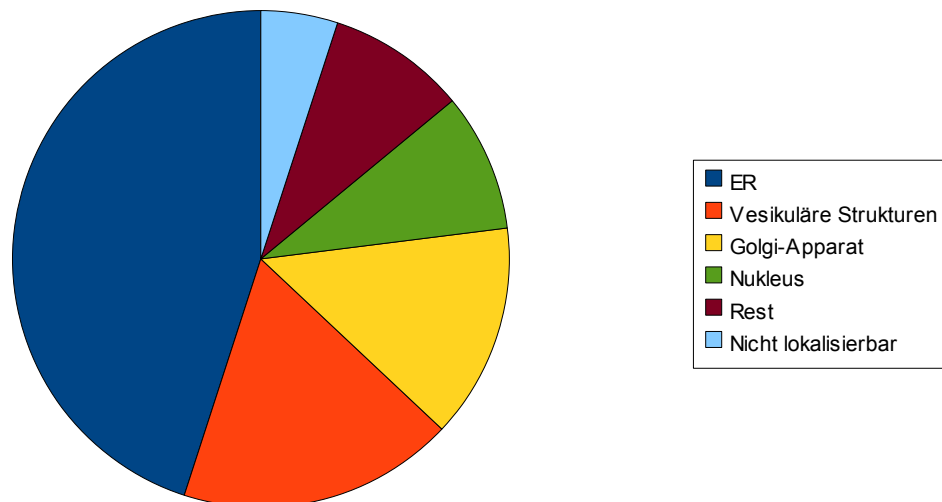


Abbildung 32: Verteilung der Proteine über die Zellkompartimente.

Endoplasmatisches Retikulum (ER) 45%: E-N und -C, ORF 6-N und -C, ORF 7a-C, ORF 7b-N und -C, M-N, ORF 3a-N, ORF 8a-C; Vesikuläre Strukturen 18%: ORF 8b-C, ORF 9b-N, ORF 14-N und -C; Golgi-Apparat 14%: M-C, ORF 3a-C, ORF 7a-N; Nukleus 9%: ORF 3b-N und -C; Rest 9%: ORF 8b-N, ORF 9b-C; Nicht lokalisierbar 5%: ORF 8a-N.

Durchgehend konnte beobachtet werden, dass es in keinem Fall zu einer Übereinstimmung der Lokalisation der C- und N-terminal markierten ORFs kam, wenn bei einem der beiden ORFs eine Anreicherung im Golgi-Apparat beobachtet werden konnte.

Die ER-Lokalisation war im Gegensatz dazu sehr kongruent. Eine nukleäre Lokalisation kam bei einem ORF vor. In einem Fall war die Lokalisation eines aminoterminal markierten ORFs nicht erfolgreich. Die carboxyterminale Variante erlaubte in diesem Fall Aufschluss über die subzelluläre Lokalisation des Expressionsproduktes (vgl. Tabelle 11).

Protein	Lokalisation Protein-N	Lokalisation Protein-C
Protein 3a	ER	Golgi-Apparat
Protein 3b	Nukleus	Nukleus
Protein 6	ER	ER
Protein 7a	Golgi-Apparat	ER
Protein 8b	Vesikel, Zytoplasma, Kern	Vesikel
Protein 7b	ER	ER
Protein 8a	---	ER
Protein 9b	Vesikel, Zytoplasma	Zytoplasma
Protein 14	Vesikel	Vesikel
Envelopeprotein	ER	ER
Membranprotein	ER	Golgi-Apparat

Tabelle 11: Immunfluoreszenzerggebnisse der akzessorischen Proteine sowie des Membran- und Envelopeproteins.

4.3 Protein-Protein-Interaktion

4.3.1 Yeast-Two-Hybrid Screening

In einem parallelen Projekt wurde die Protein-Protein-Interaktionsanalyse des ORFeoms mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-System (Y2H) durchgeführt. Das Y2H-System ist eine Methode zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen. Ursprünglich wurde sie von Fields & Song beschrieben [27]. Sie wird in Hefe-Zellen durchgeführt und basiert auf der Funktionalität eines Transkriptionsfaktors. Der Transkriptionsfaktor wiederum kann nur tätig werden, wenn es zu einer Interaktion zwischen zwei Proteinen kommt.

Das SARS-Coronavirus besitzt 16 nsps, vier Strukturproteine und neun akzessorische Proteine. Da nsp 3 nicht als Volllängen amplifiziert werden konnte, wurde es künstlich in einen C- und einen N-terminalen Teil unterteilt, die jeweils die ADP-Ribose-1" Monophosphatase sowie die Papain-like Protease Untereinheiten enthielten. Somit ergaben sich 30 Expressionsprodukte und 900 mögliche Protein-Protein-Interaktionen. Albrecht von Brunn führte das *Yeast-Two-Hybrid*-Screening durch. Die Bait- und Prey-Vektoren wurden in die haploiden Hefe-Stämme AH109 und Y187 transformiert, gemated und nachfolgend auf Medien selektiert. Es kam zu 65 Protein-Protein-

Interaktionen.

Ein Vorteil des Y2H-Systems liegt darin, dass es sich um ein *in vivo* Model handelt. Allerdings ist die Methode Fehlern gegenüber sehr anfällig. Es kommt sowohl zu falsch-positiven als auch zu falsch-negativen Ergebnissen. Nach der Literatur können etwa 30% der Interaktionen, die mit dem Y2H-System erfasst werden, durch weitere Interaktionsanalysen bestätigt werden. Jede positive Interaktion des *Yeast-Two-Hybrid*-Screenings wurde durch eine Co-Immunopräzipitation kontrolliert.

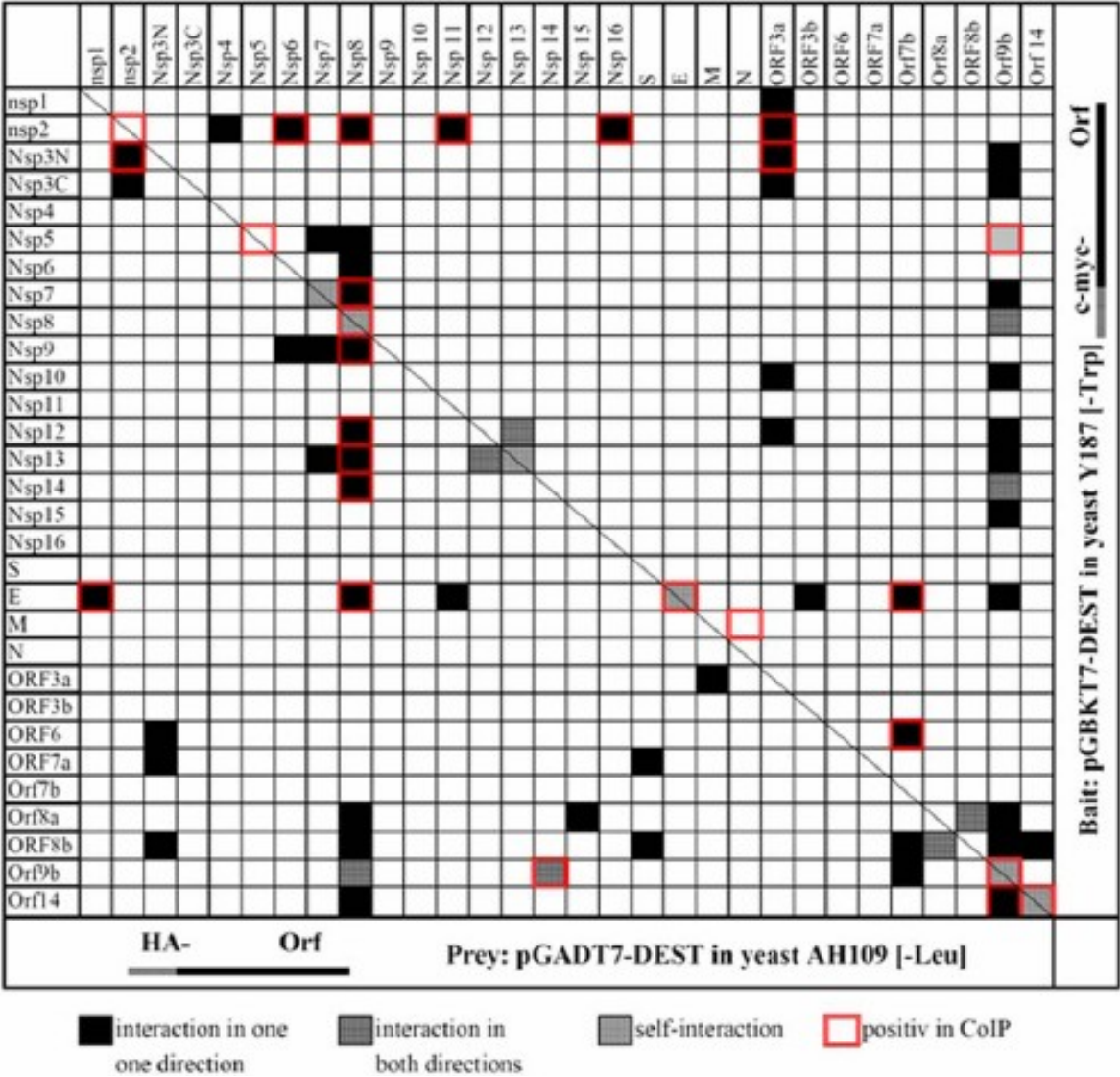


Abbildung 33: Analyse der Protein-Interaktionen des SARS-Coronavirus ORFeoms im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening und Co-Immunopräzipitation in HEK-293-Zellen.

Quelle: von Brunn et al., 2007 [127].

4.3.2 Co-Immunopräzipitation

Es konnten 38% aller Hefeinteraktionen durch Co-Immunopräzipitation in HEK-293-Zellen bestätigt werden. HEK-293-Zellen wurden nach Infektion mit Vaccinia vTF-7 mit den Bait- und Prey-Vektoren kotransfiziert. Die Lysate wurden aufgeteilt und mit Anti-HA und Anti-c-myc immunpräzipitiert. Die gebundenen Proteine wurden durch eine 15%-ige SDS-PAGE getrennt und elektrisch auf Nitrozellulose-Papier transferiert. Die Proben wurden jeweils mit Anti-HA und Anti-c-myc inkubiert [127]. Als Negativkontrollen wurden pGADT7(-) und pGBKT7(-) verwendet, als Positivkontrollen die Plasmide pGADT7-Max und pGBKT7-c-myc herangezogen. Von den 65 Interaktionen im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening konnten 25 mittels Co-Immunopräzipitation bestätigt werden.

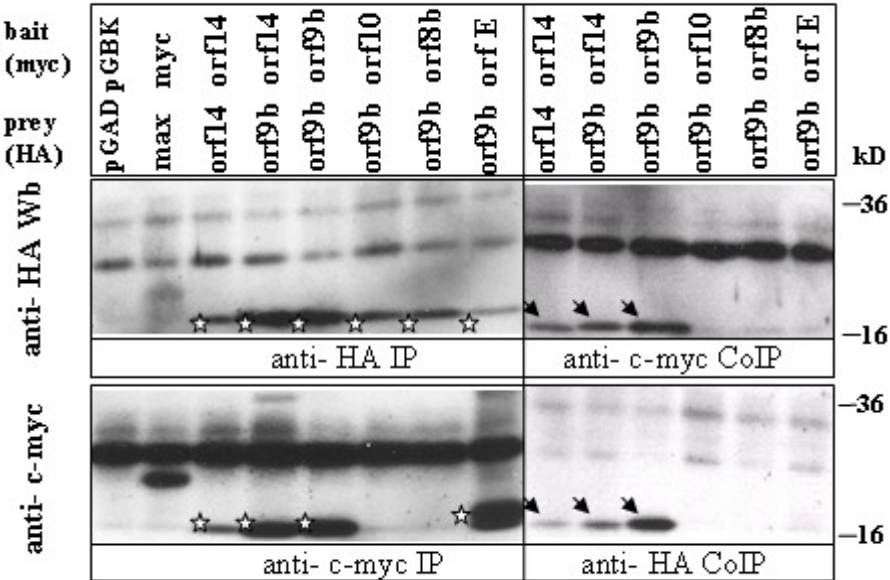


Abbildung 34: Co-Immunopräzipitation von akzessorischen Proteinen.

HEK-293-Zellen wurden mit Vacciniavirus infiziert und mit HA- und c-myc markierten Plasmiden kotransfiziert. Nach 20 Stunden wurde die Hälfte der Zelllysate mit Anti-HA, beziehungsweise Anti-c-myc, immunpräzipitiert (vgl. linker Kasten). Co-präzipitierte Proteine sind im rechten Kasten dargestellt. Quelle: von Brunn et al. [127]

Im Folgenden werden lediglich die Interaktionen der akzessorischen ORFs beschrieben.

ORF 9b stellte sich als ein wichtiger Interaktionspartner dar: Von 16 Interaktionen konnten vier in der Co-Immunopräzipitation (Co-IP) bestätigt werden. Selbstinteraktionen konnten bei ORF 9b und

Ergebnisse

ORF 14 sowohl im *Yeast-Two-Hybrid* (Y2H)-Screening als auch in der Co-IP festgestellt werden. Es kam zudem zu einer Interaktion zwischen den beiden ORFs, die sowohl im Y2H-Screening als auch in der Co-IP bestätigt wurde. Weiterhin interagierte ORF 7b mit Protein E und ORF 6. Diese Interaktionen konnten in der Co-IP konfirmiert werden. Das Envelopeprotein interagiert mit den nicht-strukturellen Proteinen nsp1, nsp 8 und nsp 11 sowie mit den akzessorischen Proteinen ORF 3b, ORF 7b und ORF 9b. Das Membranprotein interagiert mit dem neuen Strukturprotein ORF 3a. Dieses ORF interagiert wiederum in Co-IP und Y2H-Screening mit nsp 2 und nsp 3N. Letztlich kam es im Bereich der akzessorischen Proteine zu einer Interaktion von ORF 8a mit ORF 8b [127] (vgl. Abbildung 33).

5 Diskussion

5.1 Lokalisations- und Interaktionsstudien

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen sowie die Erfassung seiner Interaktionspartner kann, zusätzlich zu Sequenzanalysen, relevante Informationen über die Eigenschaften von Proteinen liefern. Durch eine alleinige komparative Sequenzanalyse ist, im Falle des SARS-Coronavirus, kein Aufschluss über die Funktion der meisten akzessorischen Proteine möglich. Gerade diese Proteine erscheinen aber durch ihre Einzigartigkeit mit der ungewöhnlichen Pathogenität des SARS-Coronavirus in Zusammenhang zu stehen. Eine systematische Lokalisations- und Interaktionsstudie soll hier Einblicke in die metabolischen Wege gewähren, bei denen die akzessorischen Proteine des Virus mitwirken.

In 70% der Fälle ist es möglich, die subzelluläre Lokalisation von Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz aufzuklären [107]. Doch wie zuverlässig ist diese Bestimmung? Besonders durch die Einführung eines Peptidankers fallen Fehlerquellen an. Durch ihn entstehen Abweichungen in der Größe, der Faltung, der Funktion und der Prozessierung des Proteins. Subzelluläre Lokalisationen in großem Maßstab wurden bereits im Jahr 2000 von Simpson et al. [108] durchgeführt. Bei Kontrolltransfektionen von GFP-markierten ORFs mit bekannter subzellulärer Lokalisation zeigte sich hier eine Übereinstimmung der Ergebnisse in sieben von neun Fällen. Bei der Bestimmung des Lokalisoms der Hefezelle *S. cerevisiae* wurden ebenfalls GFP-markierte Proteine verwendet. 80% der Lokalisationen, die in der *Saccharomyces*-Genomdatenbank vorhanden waren, stimmten mit denen der untersuchten Proteine überein [107].

In unserer Arbeit umfasste der Anker ein Flag und ein His₆. In Analogie zu den Resultaten von Simpson et al. ([107], [108]) nahmen wir an, dass der Flag-His₆-Anker nur bei einer Minderzahl von Proteinen zu Interferenzen mit Signalpeptiden und damit zur Verfälschung von subzellulären Lokalisationen führen würde, insbesondere da der Anker lediglich eine Länge von 20 Aminosäuren aufwies, wohingegen der GFP-Anker von Simpson et al. ein Molekül von 238 Aminosäuren Länge ist.

Es ist zu berücksichtigen, dass eine transiente Transfektion eine artifizielle Situation im Metabolismus einer Zelle darstellt. Hier wird *in vitro* ein einzelnes Protein exprimiert, dass in *in vivo* ein Element eines Stoffwechselprozesses ist. Dadurch ist es nicht ausgeschlossen, dass das

Protein durch die Abwesenheit natürlicher Interaktionspartner seine Funktion nicht adäquat erfüllen kann oder dass es durch fehlende posttranslationale Veränderungen eine falsche Lokalisation in der Zelle aufweist.

Lokalisome, die in größerem Maßstab durchgeführt wurden, zeigen andere Verteilungsmuster über die Zellkompartimente als unser Lokalisom [108]. Bei Simpson et al. war das Zytoplasol als Lokalisation mit 18% stark vertreten. Mitochondriale Strukturen konnten in 5% nachgewiesen werden [108]. Der prozentuale Anteil an Proteinen im Kern stimmte mit unserer Angabe von 9% überein. Proteine des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates kamen, mit jeweils 17% und 5%, weniger häufig als bei den offenen Leserahmen des SARS-Coronavirus vor [108].

Diese Verteilungsunterschiede über die zellulären Strukturen kann zum einem an der geringen Anzahl von SARS-Coronavirus-ORFs liegen. Dass GFP physiologischerweise im Kern und Zytoplasma vorkommt, könnte den großen Anteil der im Zytoplasma lokalisierten Proteine erklären, der bei Simpson et al. [108] zu finden war und der in unseren Experimenten fehlte. Zum anderen wiederum erstellten wir das Lokalisom viraler und nicht zellulärer Proteine. Bei viralen Proteinen wird antizipiert, sie im Fokus der Virusreplikation und -zusammensetzung zu finden. Schon die nicht-strukturellen Proteine des SARS-Coronavirus sind überwiegend perinukleär, im Endoplasmatischen Retikulum und in vesikulären Strukturen lokalisiert [97].

Viren besitzen vergleichsweise wenig Gene. Daher spielen für Infektion und Replikation Protein-Protein-Interaktionen mit viralen und zellulären Proteinen eine wichtige Rolle (Review vgl. [1]). Zusätzlich zu den Struktur- und Replikasegenen sind bei Coronaviren subgruppenspezifische Proteine vorhanden. Für die Replikation abkömmlisch, spielen diese eine Rolle bei der Virus-Wirt-Interaktion [118] und tragen zu einer gesteigerten Virulenz *in vivo* bei [19]. Da es an dieser Stelle auch zur Interaktionen mit dem Immunsystem kommt, sind sie besonders interessant.

Zusätzlich zu den subzellulären Lokalisationsstudien wurden daher die Protein-Protein-Interaktionen des SARS-Coronavirus ORFeoms mit Hilfe des *Yeast-Two-Hybrid*-Systems untersucht. Die Interaktionen, die im Screening positiv waren, wurden durch eine Co-Immunopräzipitation gegengetestet. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise war, dass durch möglicherweise falsch-negative Ergebnisse des Screenings Interaktionen verpasst wurden. Dies ist allerdings bei der beschriebenen ersten *Yeast-Two-Hybrid*-Interaktionsanalyse durchaus zu erwarten, da die Transmembranregionen der SARS-Proteine noch nicht entfernt worden sind: Die Proteininteraktionen und die darauf basierende Transkription der Selektionsgene findet im Kern der

Hefezelle statt. Da die Transmembranregionen toxisch wirken, können sie zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

Insgesamt zeigte sich, dass Proteine innerhalb eines gleichen Kompartimentes eher dazu tendieren miteinander interagieren als Proteine unterschiedlicher Kompartimente. So interagierte zum Beispiel ORF 9b mit ORF 14. Beide ORFs sind in vesikulären Strukturen vorhanden. Protein E und ORF 6 interagierten mit ORF 7b. Alle drei Proteine sind im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert.

5.2 Proteine des Endoplasmatischen Retikulums

5.2.1 Envelopeprotein

Das SARS-Coronavirus Envelopeprotein besitzt konservierte Strukturen im Vergleich zu E-Proteinen anderer Coronaviren [106]. Daher ist anzunehmen, dass ähnliche Funktionen wie in anderen Coronaviren erfüllt. Seine Anwesenheit im Ausknospungskompartiment (*Budding* Kompartiment), am Ort der Virionzusammensetzung, ist deshalb wahrscheinlich von großer Relevanz. Das *Budding*-Kompartiment befindet sich im Intermediärkompartiment zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat.

Wir lokalisierten das Envelopeprotein konsistent im Endoplasmatischen Retikulum: Sowohl mit dem C- als auch mit dem N-terminalen Anker kam es zu einer Kolokalisation mit dem ER-Marker Anti-Calnexin. Auch bei Immunfluoreszenzen mit den Expressionsplasmiden pGADT7-E und pGBKT7-E befand sich das Protein beständig im Endoplasmatischen Retikulum. Das IBV-E-Protein dagegen wird im Golgi-Apparat lokalisiert [17], vermutlich bedingt durch ein Signal in seinem zytoplasmatischen Schwanz [16]. Es kolokalisiert dort mit dem Membranprotein [17]. In der Tat ist bekannt, dass die Interaktion dieser beiden Proteine zur Bildung von virus-ähnlichen Partikeln und zur Inkorporation von Protein M in die Virushülle führt [126].

Im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening interagierte Protein E mit ORF 3a, ORF 7b und ORF 9b. Bei diesen ORFs handelt es sich um neu-entdeckte Strukturproteine des SARS-Coronavirus ([28], [47], [102], [147]). Diese Interaktion von akzessorischen Proteinen mit dem Strukturprotein E könnte, in Analogie zu der Interaktion mit Protein M, zur Inkorporation der ORFs in die Virushülle führen.

5.2.2 ORF 7b

Wie das Envelopeprotein ließen sich ORF 7b-N und ORF 7b-C im Endoplasmatischen Retikulum lokalisieren und mit dem ER-Marker Anti-Calnexin und einem Marker der nukleären Membran, Anti-Lamin B, kolokalisieren. Dadurch, dass sich das raue Endoplasmatische Retikulum auf die äußere Kernmembran ausdehnt, sind die Ergebnisse kongruent. Im Gegensatz dazu bildeten aber ORF 7b-HA und ORF 7b-c-myc aus den pGBKT7- und pGADT7-Vektoren Golgi-ähnliche Strukturen. Letzteres Ergebnis passt zu anderen Arbeiten, die ORF 7b ebenfalls im Golgi-Apparat lokalisieren [102]. Insbesondere bei bestimmten Proteinklassen führt die Insertion eines Ankers zur inkorrekten subzellulären Lokalisation. Proteine des Endoplasmatischen Retikulums, die ein carboxyterminales KDEL- oder KKXX-Motiv benötigen, werden, wenn das Signal durch ein Peptid gestört wird, im späteren sekretorischen Weg dargestellt [107]. Die Störung eines solchen Signals könnte den Unterschied zwischen den Lokalisationsergebnissen erklären.

Störungen bei der subzellulären Lokalisation der ORFs sollten durch die doppelte Vorgehensweise mit dem N- und C- terminalen Ankern möglichst offenbart werden. Es zeigte sich aber sowohl bei der Expression des ORFs mit dem Flag-His₆-Anker, als auch bei der Verwendung des HA- und c-myc-Ankers, eine Konkordanz der Ergebnisse. Eine Diskordanz der Ergebnisse stellte sich nur beim Vergleich mit dem jeweils anderen Expressionsplasmid heraus. Wie ist das zu erklären? Die Diskordanz ist wahrscheinlich nicht durch die verschiedenen Zelllinien bedingt, da in der Arbeit von Schaecher et al. HEK-293T- und Vero-E6-Zellen mit demselben Ergebnis verwendet wurden [102]. Zudem zeigten auch schon Simpson et al., dass Proteinlokalisationen in verschiedenen Zelllinien untereinander konsistent sind [108]. So war die subzelluläre Lokalisation von Proteinen, die sowohl in HeLa- und als auch in Vero-Zellen exprimiert wurden, identisch. Proteininteraktionen als Ursache der Diskordanz erscheinen ebenfalls unwahrscheinlich, da schon bei Schaecher et al. in transfizierten und infizierten Zellen die gleichen Resultate entstanden [102]. Allerdings könnte durch die Vaccinia-Virus-Infektion bei pGADT7-ORF 7b und pGBKT7-ORF 7b das Expressionsprodukt anderen Einflüssen unterlegen sein, die den Unterschied erklären könnten. Zudem kommt es, je nach Infektionsgrad, zunächst zu einer Abrundung, dann zum Absterben der infizierten Zellen. Zu diesem Zeitpunkt ist es kaum noch möglich, morphologisch Zellorganellen zu unterscheiden. Daher sind Vaccinia-infizierte Zellen nur unter Vorbehalt für Immunfluoreszenzfärbungen geeignet.

Im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening und in der Co-Immunoprecipitation interagierte ORF 7b mit ORF

6 und dem Envelopeprotein [127]. Beide Proteine befinden sich im Endoplasmatischen Retikulum. Eine Interaktion wäre in diesem Fall räumlich gut möglich. Durch die Diskrepanz zwischen unseren Ergebnissen und denen der Literatur bleibt die Frage, ob ORF 7b im Endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi-Apparat oder beiden lokalisiert ist, offen.

Letztendlich stellt ORF 7b ein neu-entdecktes Strukturprotein des Virus dar. Wie schon besprochen, könnte Protein E die Integration von ORF 7b in die Virushülle erleichtern. Alle bis jetzt neu-entdeckten Strukturproteine, also ORF 3a, ORF 7a und ORF 7b, reichern sich im Golgi-Apparat in der Nähe des Ausknospungskompartimentes an [102]. Es ist allerdings noch nicht klar, ob die ORFs zielgerichtet durch Packaging-Signale in die Virushülle eingepackt werden, oder ob sie durch ihre hohe Konzentration vor Ort lediglich passiv inkorporiert werden [102].

5.2.3 ORF 6

ORF 6-C sowie ORF 6-N kolokalisieren im Endoplasmatischen Retikulum mit Anti-Calnexin. Dies bestätigt sich in der Literatur. Sowohl ORF 6 ohne Anker als auch ORF 6-RFP (Red Fluorescent Protein) wurden im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ([68], [30]). Auch in den Immunfluoreszenzfärbungen mit ORF 6-HA und ORF 6-c-myc zeigte sich diese Lokalisation. Dagegen wurde ORF 6-HA von einer anderen Arbeitsgruppe zusätzlich im Golgi-Apparat vorgefunden [95]. Der Unterschied könnte darin begründet sein, dass in unseren Experimenten ORF 6-HA in Vaccinia-infizierten Zellen exprimiert wurde.

Im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening interagiert das ORF mit nsp 3N und ORF 7b [127]. Letztere Interaktion wurde in der Co-Immunopräzipitation bestätigt [127]. Nsp 3 des murinen MHV-Coronavirus ist wiederum im Intermediärkompartiment, am Ort der viralen RNA-Synthese, lokalisiert [31]. ORF 7b, ein neu-entdecktes Strukturprotein, ist unter anderem im Endoplasmatischen Retikulum vorhanden. Eine Interaktion zwischen den Proteinen wäre also räumlich gut möglich. ORF 6 könnte als Vermittler zwischen viraler Genomsynthese und Hüllenbildung mitwirken. Tangudu et al. zeigten in der Tat, dass ORF 6 mit nsp 3 und dem intrazellulären Ort der viralen RNA-Synthese kolokalisiert [119]. Zusätzlich ist bekannt, dass ORF 6-HA mit viraler RNA co-immunopräzipitiert [119]. Es wurde schon vorgeschlagen, dass ORF 6 die Replikation und Zusammensetzung des Virions fördert, da sich außerdem eine Kolokalisation mit den Strukturproteinen M und N zeigt [95]. Vom porcinen TGEV-ORF 7 wurde angenommen,

dass es virale Replikasen an die Membranen des Intermediärkompartimentes bindet [123]. Eine ähnliche Funktion könnte ORF 6 des SARS-Coronavirus innehaben [119].

Virusinfektionen von Zellen führen zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems des Wirtsorganismus. Infizierte Zellen synthetisieren und sezernieren IFN- α und IFN- β , die wiederum Nachbarzellen dazu stimulieren, antivirale Faktoren zu produzieren, um so die Ausbreitung des Virus zu hemmen (Review vgl. [115]). Auch die SARS-Coronavirus-Replikation in Zellkulturen ist sensitiv gegenüber exogen zugefügtem Interferon- β ([14], [35], [114]). Aber im Gegensatz zur starken Interferon- α -Induktion bei anderen Coronaviren wie TGEV ([5], [8]) inhibiert das SARS-Coronavirus die β -Interferon-Antwort infizierter Zellen [113]. Wie ist dies zu erklären? *Interferon Regulatory Factor 3* (IRF3) und NF- κ B sind zelluläre Transkriptionsfaktoren, die nach Virusinfektion aktiviert werden und zur Transkription des IFN- β -Gens führen. Interferone führen zur Aktivierung einer JAK/STAT-Kaskade, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt, welche Gene mit einem interferonstimulierendem Responseelement (ISRE) aktivieren. Diese führen schließlich zur Viruselimination in der Zelle. IRF3 ist normalerweise in Zellen inaktiv und im Zytoplasma lokalisiert [113]. Es wird bei seiner Aktivierung durch ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) vom Zytoplasma in den Kern transloziert [61]. Interessanterweise hemmt ORF 6 die Expression von kotransfizierten Plasmiden, die einen Transport in den Kern benötigen um dort transkribiert zu werden [46]. Anscheinend interferiert ORF 6 mit dem nukleären Import von NLS-tragenden Proteinen [46]. ORF 6 hat die Möglichkeit, die Aktivierung von IRF3 zu hemmen. ORF 6 stört auch die Translokation von STAT1 in den Nukleus. STAT1 ist zuständig für die Aktivierung eines ISRE-Promoters.

Auch anderweitig wurden interferonantagonistische Funktionen von mehreren SARS-Coronavirus-Proteinen festgestellt. In der Tat führen auch ORF 3b und Protein N zur Inhibition von IRF 3 [55]. ORF 3b ist im Kern lokalisiert und besitzt dadurch die Möglichkeit mit nukleären Transkriptionsfaktoren zu interagieren. Das Nukleokapsidprotein führt zusätzlich zur Inhibition von NF- κ B.

Durch die Kombination verschiedener Mechanismen und durch deren additiven Effekt kommt es bei einer SARS-Coronavirus-Infektion zu einer effektiven Hemmung der Interferonantwort [55]. Dies könnte unter anderem die hohe Pathogenität des SARS-Coronavirus erklären.

5.2.4 ORF 8a

Unsere Experimente konnten ORF 8a-C im Endoplasmatischen Retikulum lokalisieren. Keng et al. stellten ORF 8a als eine gepunktete Struktur im Zytoplasma dar [51], welche dem Endoplasmatischen Retikulum entsprechen könnte. Andererseits ließ sich ORF 8a in SARS-Coronavirus infizierten Zellen im Zytoplasma darstellen [51]. In Konkordanz zur zytoplasmatischen Lokalisation von ORF 8a in infizierten Zellen lässt sich das Fusionsprotein ORF 8a-eGFP ebenfalls im Zytoplasma darstellen [11]. Fraglich erscheint hier, ob der relativ große Anker eGFP nicht die Lokalisation des lediglich 39 Aminosäuren langen ORFs 8a verfälscht. Vermutlich ist die Diskordanz dieser Ergebnisse aber durch den Unterschied zwischen einer Infektion und einer transienten Transfektion der Zellen bedingt: Das Fehlen viraler Interaktionspartner im Fall der alleinigen Transfektion kann die unterschiedliche Lokalisation erklären.

ORF 8a ist sehr kurz und wird wahrscheinlich schon vom Ribosom ins Zytoplasma freigesetzt, bevor die aminoternale Sequenz des *Signal Recognition Particle* (SRP) erkannt wird [90]. Zusätzlich zur zytoplasmatischen Lokalisation fand eine Arbeitsgruppe eine mitochondriale Lokalisation des ORFs in einem Teil der SARS-Coronavirus infizierten Vero-E6-Zellen [11].

Interaktionen im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening wurden mit nsp 8, nsp 15 und ORF 8b sowie ORF 9b gefunden [127]. Durch Co-Immunopräzipitation konnte keine der Interaktionen bestätigt werden [127]. In weiteren Co-Immunopräzipitationen einer anderen Arbeitsgruppe interagiert ORF 8a allerdings mit Protein S [51].

ORF 8a-N war das einzige ORF, welches nicht mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden konnte. Wie kommt es, dass sich einige Proteine nicht darstellen lassen? Manche kommen nur in spezifischen Zellstadien und/oder durch externe Stimuli zur Expression. Möglicherweise es handelt sich um regulatorische Proteine, die nur in geringen Mengen produziert werden und daher durch diese Methode nicht nachweisbar sind [107]. Bei einer transienten Transfektion sollten diese Umstände allerdings ausgeschlossen sein. Das Optimum der Expressionszeit verschiedener Proteine variiert zwischen 12 und 48 Stunden. Die Expressionsrate kann in diesem Zeitraum bis um den Faktor 10 variieren [75]. In diesem Fall wurde das ORF 8a eventuell durch seine geringe Größe früh degradiert, sodass es für uns unterhalb der Nachweisgrenze lag.

5.2.5 Proteine des Golgi-Apparates

5.2.6 Membranprotein

Bei vielen Coronaviren konnte das Membranprotein in Strukturen zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat lokalisiert werden. Dort befindet sich das sogenannte *Budding*-Kompartiment, in der das Protein eine Schlüsselrolle bei der Bildung der Virushülle und bei der Akkumulation weiterer viraler Proteine am Situs der Viruszusammensetzung spielt [86]. Das M-Protein besitzt eine ER/Golgi-Trafficking Sequenz in der ersten Transmembranregion [53]. In der Tat besitzen alle Coronavirus-M-Proteine vier Stunden nach Synthese Oligosaccharidketten mit Golgi-spezifischen Modifikationen [53]. Konkordant dazu zeigen Immunfluoreszenzfärbungen von infizierten und transfizierten Zellen, dass das M-Protein in der perinukleären Region akkumuliert ([53], [79]).

Unsere Immunfluoreszenzfärbungen bestätigen, dass auch im SARS-Coronavirus das M-Protein im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Protein M-C reichert perinukleär an. Eine Kolo-kalisation von Protein M-C mit dem ER-Marker Anti-Calnexin konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde Protein M-N im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Da Sequenzanalysen des Proteins mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid voraussagen, ist es möglich, dass es in diesem Fall zur Interferenz zwischen dem aminoterminalen Flag-His₆-Anker und der dahinterliegenden Signalsequenz kam, welche zu einer Fehllokalisation von Protein M-N führte.

Kein Protein M von Coronaviren wird effektiv im *Budding*-Kompartiment, also im Prä-Golgi, retiniert [53]. Alle werden jenseits dieses Kompartimentes transportiert, nämlich bis in den Golgi-Apparat [53]. Protein M ist also nicht der virale Marker, der das Ausknospungskompartiment bestimmt, sondern dazu werden andere virale Faktoren benötigt [53]. Mittels Co-Immunopräzipitation wurde nachgewiesen, dass unglykosyliertes Protein M mit dem Nukleokapsidprotein im Prä-Golgi von infizierten Zellen interagiert [84]. Außerdem interagiert Protein M mit genomischer MHV-RNA [84]. Daher wurde angenommen, dass Protein M mit dem Nukleokapsid des Virus interagiert [84]. Eine Interaktion zwischen diesen Proteinen im MHV findet aber in Zellen, die ohne weitere virale Komponenten beide Proteine koexprimieren, nicht statt [84]. Das heißt, die Initiation der Interaktion braucht mindestens eine weitere virale Komponente, hier eventuell die virale RNA [84]. *In vivo* findet die Interaktion wohl beim Einfügen des Nukleokapsids in den Partikel statt [84]. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu unseren Resultaten, in denen in der

Co-Immunopräzipitation Protein M tatsächlich mit dem N-Protein interagiert. Eventuell ist die direkte Interaktion von M mit N im SARS-Coronavirus möglich, während in anderen Coronaviren weitere virale Faktoren benötigt werden.

Im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening interagiert Protein M mit ORF 3a, das ebenfalls ein Protein des Golgi-Apparates und gleichzeitig ein neu-entdecktes Strukturprotein ist. So wie Protein M zur viralen Inkorporation des Spikeproteins führt [86], könnte diese Interaktion die Inkorporation von ORF 3a in die Virushülle erleichtern.

5.2.7 ORF 3a

ORF 3a-C wurde im Golgi-Apparat von Vero-E6-Zellen lokalisiert. ORF 3a mit dem C- oder N-terminalen Anker wies jeweils ein analoges Lokalisationsmuster zu dem von Protein M und ORF 7a auf: Das ORF mit dem C-terminalen Anker befand sich in diesen drei Fällen im Golgi-Apparat, das ORF mit dem N-terminalen Anker im Endoplasmatischen Retikulum. Bei ORF 3a-N zeigte sich eine Kolokalisation mit Anti-Calnexin. Auch in der Literatur wurde eine Kolokalisation von ORF 3a mit ER-spezifischen Proteinen beschrieben [67]. Allerdings beschreiben mehrere Veröffentlichungen übereinstimmend mit der Lokalisation von ORF 3a-C eine perinukleäre Anreicherung des ORFs ([118], [141], [142]). Diese entspricht der Lokalisation des Golgi-Apparates. Die zweite oder dritte Transmembranregion von ORF 3a soll für die Lokalisation im Golgi-Apparat zuständig sein [142]. Diese Diskordanz der Ergebnisse könnte daran liegen, dass ORF 3a während der Reifung des Virions durch mehrere Kompartimente wandert. Zusätzlich wurde das Protein im Zytoplasma gefunden ([47], [141]). Teilweise wurde wiederum eine Anreicherung des ORFs in der zellulären Plasmamembran festgestellt ([47], [80], [118]). Die Lokalisation des ORFs ist dieselbe, sowohl in einzeln transfizierten Zellen als auch in infizierten Zellen [141].

ORF 3a besitzt, genau wie das Spikeprotein [99], eine cysteinreiche Region und bildet Disulfidbrücken [147]. Es wurde spekuliert, dass ORF 3a sich durch diese Fähigkeit mit dem S-Protein an der Innenseite des Virions über Disulfidbrücken verbinden könnte [147]. Im Widerspruch zu dieser Hypothese fanden wir im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening keine Interaktion zwischen diesen Proteinen, obwohl anderweitig eine solche Interaktion beschrieben wurde [118].

Im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening interagiert ORF 3a mit nsp 1, nsp 2, nsp 3N, nsp 3C, nsp 10 und nsp 12. Sämtliche dieser Proteine gehören zum Replikasekomplex. Zudem wurde beim Screening

eine Interaktion mit dem Membranprotein nachgewiesen [127]. Diese Interaktion wiederum wurde in der Co-Immunopräzipitation nicht von uns, aber anderweitig bestätigt [118]. Es wurde an dieser Stelle vorgeschlagen, dass ORF 3a sich durch seine Interaktion mit dem Membranprotein mit der Reifung des Virions befasst.

In der Literatur lassen sich zusätzliche Co-IP Interaktionen von ORF 3a mit ORF 7a finden [118]. ORF 7a ist ebenfalls ein Protein des Golgi-Apparates und ein neu-entdecktes Strukturprotein. Es greift zudem in dieselben zellulären Prozesse ein wie ORF 3a.

Die Expression von ORF 3a und ORF 7a führt zu einer vermehrten NF- κ B vermittelten Transkription [50]. NF- κ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Pathologie des “Acute Respiratory Distress Syndrome” (ARDS) (Review vgl. [24]). Auch die Aktivität des IL-8-Promoters wird durch ORF 3a und ORF 7a gesteigert [50]. IL-8 kommt ebenfalls bei ARDS vor [93] und wurde bei SARS-Patienten in erhöhter Konzentration festgestellt.

Außerdem induzieren beide ORFs die Apoptose ihrer Wirtszelle ([56], [67], [116]). Vorausgegangene Untersuchungen zeigen, dass andere Coronaviren, wie MHV, IBV oder TGEV, ebenfalls über die Möglichkeit verfügen, den Zelltod ihrer Wirtszellen zu induzieren ([10], [23], [77]). Höhere Organismen haben zwei Hauptmöglichkeiten, um virale Infektionen per Apoptose zu kontrollieren. Erstens: Indem virale Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert werden, werden sie durch zytotoxische T-Lymphozyten erkannt, die das Signal zum Zelltod geben. Ein zweiter Abwehrmechanismus ist zellintern: Die infizierte Zelle erkennt die unzeitgemäße Aktivierung des Zellzyklus und induziert selbst Apoptose [88]. Die Induktion der Apoptose durch eine virale Infektion hat großen Einfluss auf die Antwort des Immunsystems. Makrophagen sind die Schlüsselfiguren bei der Beseitigung der apoptotischen Zellen und reagieren unterschiedlich auf verschiedene Arten von Zelltod (Review vgl. [58]). Auf der einen Seite scheinen Viren die Apoptose zu hemmen, um den vorzeitigen Zelltod zu vermeiden und um so ein Maximum an Nachkommenschaft zu produzieren. Auf der anderen Seite fördern viele Viren im Gegenteil die Apoptose, um die Verbreitung der Virionen auf benachbarte Zelle zu erleichtern und gleichzeitig die Entzündungsreaktion des Immunsystems zu unterdrücken (Review vgl. [88]). In der Tat wurde ein zytopathischer Effekt auch bei der SARS-Coronavirus-Infektion von Vero-E6-Zellen bemerkt ([96], [137]). Dieser Effekt ist durch Apoptoseinduktion zu erklären [137]. Apoptose wurde bei auch bei SARS-Coronavirus-infizierten Patienten in Hepatozyten [9] und in Lymphozyten, hier in Form einer Lymphopenie [89], beobachtet.

5.2.8 ORF 7a

Unsere Immunfluoreszenzen zeigen, dass sich ORF 7a-N im Golgi-Apparat anreichert, während sich ORF 7a-C im Endoplasmatischen Retikulum befindet. Der kurze zytoplasmatische Schwanz (-KRRKTE-) am Carboxyterminus von ORF 7a besitzt ein ER-Exportsignal, ähnlich den Sequenzen für den Export von Golgi-residenten Glykosyltransferasen ([85], [103]). Mutationen dieses Signals führen zum Verlust der Golgi-Lokalisation und zu einer Zunahme der Kolo-kalisation mit Anti-Calnexin [103]. Dies suggeriert, dass der zytoplasmatische Schwanz wichtig für den Export von ORF 7a aus dem Endoplasmatischen Retikulum ist [103]. Dies könnte auch erklären, warum ORF 7a-C nicht im Golgi-Apparat lokalisiert wurde. Durch den Flag-His₆-Anker am C-Terminus wurde das ER-Exportsignal nicht erkannt.

Die Unsicherheit in der Differenzierung zwischen einer Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat spiegelt sich auch in der Literatur wieder: Laut Fielding et al. soll ORF 7a sich im Endoplasmatischen Retikulum befinden und ein typisches ER-Retrieval-Motif besitzen [26]. In anderen Arbeiten jedoch wurde ORF 7a im Golgi-Apparat lokalisiert [85]. Varianten des Proteins (unter anderem ORF 7a mit GFP-Anker, ORF 7a mit HA-Anker und ein unmarkiertes ORF 7a) reichern im Golgi-Apparat an und kolo-kalisieren dort mit einem Golgi-Marker ([25], [56]). Zusätzlich konnte ORF 7a auf der Plasmamembran SARS-Coronavirus infizierter Vero-E6-Zellen nachgewiesen werden [12].

Im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening zeigte sich eine einseitige Interaktion mit nsp 3N und dem Spikeprotein [127]. Es wurde auch eine Interaktion mit ORF 3a festgestellt, die weiter oben besprochen wurde [118]. Bei der letzten Interaktion ist interessant, dass ORF 7a und ORF 3a beide mit nsp 3N interagieren [127]. Nsp 3N ist ein Protein des Replikasekomplexes. Eine solche Interaktion könnte darauf hinweisen, dass beide Proteine zwischen Struktur- und Replikaseproteinen vermitteln. Weitere Interaktionspartner sind umstritten. In der Co-Immunopräzipitation von Fielding et al. interagierte ORF 7a mit Protein M und Protein E [25], während dies bei Huang et al. nicht geschah [45]. Dafür erfolgten dort eine Selbstinteraktion und Interaktionen mit dem Spikeprotein. Interaktionen mit strukturellen Proteinen sind zu erwarten, da ORF 7a in SARS-Coronavirus-Partikeln vorkommt und somit ein strukturelles Protein ist. Auch wenn ORF 7a mit Protein E allein exprimiert wird, kommt es zum extrazellulären Nachweis beider Proteine [45].

Bei Analyse der Struktur von ORF 7a offenbarte sich eine Ähnlichkeit zu den Molekülen ICAM-1

und ICAM-2, die ihrerseits Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche von Endothelzellen sind [38]. ORF 7a könnte durch diese Ähnlichkeit zum Immunescape des Virus beitragen.

5.3 Vesikuläre Strukturen

5.3.1 ORF 8b

ORF 8b-N und ORF 8b-C sind in vesikulären Strukturen lokalisiert. Bei ORF 8b-N ergibt sich zusätzlich eine Anfärbung von Zytoplasma und Kern. Dies stimmt überein mit Angaben aus der Literatur: Immunfluoreszenzen mit ORF 8b zeigen eine Lokalisation im Zytoplasma infizierter Zellen [51]. In transfizierten Zellen allerdings reichert sich ORF 8b in Form eines gepunkteten Musters im Zytoplasma an [51]. ORF 8b mit einer eGFP-Fusion ist - wie bei unseren Ergebnissen - wiederum ebenfalls im Nukleus und im Zytoplasma lokalisiert worden [68].

Auch die in der Literatur wiederkehrende zytoplasmatische Lokalisation ist durch das Fehlen eines Signalpeptids zu erklären. Das ORF wird also ins Zytoplasma freigesetzt, wo es allerdings nicht oligomerisiert und reift, sondern direkt zu Proteasomen geleitet wird: In der Tat ist das eGFP-markierte ORF 8b sehr instabil und wird innerhalb von zwei Stunden degradiert [90]. Experimentelle Hemmung der Proteasomfunktion führt zum Erhalt von ORF 8b und interessanterweise auch von Protein E, welches durch ORF 8b der Degradation zugeführt wird [69].

5.3.2 ORF 9b

ORF 9b-C reichert sich im Zytoplasma an, während das ORF 9b-N-Signal unter dem Mikroskop zusätzlich vesikuläre Strukturen bildet. In der Literatur variieren die Angaben über die subzelluläre Lokalisation von ORF 9b ebenfalls. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde das ORF 9b ohne Anker im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, das ORF 9b mit einer eYFP-Fusion dagegen im Zytoplasma mit einer perinukleären Verdichtung [83]. ORF 9b-eYFP überlappt hier teilweise mit einem Golgi-Marker, während das Signal von ORF 9b-Flag mit einem Marker des Endoplasmatischen Retikulums kolokalisiert [83]. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnten wiederum Meier et al. [81] das ORF 9b ebenfalls mit zellulären Vesikeln kolokalisieren.

Proteine unterliegen dem zellulären Stoffwechsel und wandern im Verlauf ihrer Synthese, im

Rahmen ihrer Funktion und bei ihrem Abbau durch verschiedene Zellkompartimente. Die unterschiedlichen Ergebnisse der vielen Lokalisationsstudien können einerseits dadurch entstehen, dass ORF 9b in verschiedenen Stufen seines Stoffwechselweges dargestellt wurde, andererseits illustrieren sie aber auch die Einflüsse verschiedener Anker auf die Lokalisation des ORFs.

Im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening zeigten sich zahlreiche Interaktionen mit ORF 9b [127]. Die Hälfte aller getesteten Proteine interagierten mit ORF 9b. Es ließen sich in der Co-Immunopräzipitation die Interaktionen mit nsp 14, nsp 5 und die Selbstinteraktion bestätigen. In Hinsicht auf diese multiplen Interaktionen besitzt ORF 9b eine molekulare Struktur, die dafür sehr geeignet scheint. Es handelt sich um ein lipidbindendes Protein mit neuartiger Faltung. Das ORF besteht aus einem symmetrischen Dimer, das aus zwei benachbarten β -Faltblättern entsteht und eine hydrophobe Tasche bildet [81]. Es wurde daher vorgeschlagen, dass ORF 9b eine Rolle bei der Viruszusammensetzung spielen könnte und mit Hilfe seiner vielfältigen Bindungsmöglichkeiten virale Proteine an Golgi-, beziehungsweise ER-Membranen bindet [81].

5.3.3 ORF 14

In der Literatur wird ORF 14 häufig nicht berücksichtigt, da seine Sequenz komplett in der des Nukleokapsidproteins integriert ist. Trotzdem konnten Antikörper gegen dieses ORF im Serum infizierter Patienten nachgewiesen werden [34]. An diesem Punkt ist allerdings zu hinterfragen, ob die nachgewiesenen Antikörper nicht ursprünglich gegen das N-Protein gerichtet waren und lediglich mit ORF 14, exprimiert als Teil des N-Proteins, kreuzreagierten.

ORF 14-C und ORF 14-N reicherten sich beide in vesikulären Strukturen im Zytoplasma der Zellen an. Im *Yeast-Two-Hybrid*-Screening interagierte ORF 14 mit mehreren Proteinen, von denen sich nur die Interaktion mit ORF 9b und die Selbstinteraktion mittels Co-Immunopräzipitation bestätigte. ORF 14 und ORF 9b sind beide in vesikulären Strukturen vorhanden, die sich bildmorphologisch ähneln. Eine Interaktion ist daher *in vivo* räumlich möglich. Beide ORFs könnten sich bei ihrer Interaktion in ihren Funktionen ergänzen. Wie schon für ORF 9b spekuliert, könnte somit auch ORF 14 modulierend auf Membranen wirken und die Bildung von Vesikeln zur Exozytose des Virus erleichtern [81].

5.4 Proteine des Nukleus

5.4.1 ORF 3b

ORF 3b-N und ORF 3b-C konnten im Nukleus von transfizierten Vero-E6-Zellen lokalisiert werden. Bildmorphologisch entsprach die Lokalisation der ORFs den chromatin-freien Strukturen des Kerns, also den Nukleoli. Die Kernlokalisierung von ORF 3b wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt ([52], [143], [144]). In der Tat kolokalisiert ORF 3b mit nukleolären Proteinen wie C23 [145]. Sequenzanalytisch beinhaltet ORF 3b zwei potentielle nukleäre Lokalisationssignale (NLS) [144]. Ein funktionsfähiges NLS befindet sich in der carboxyterminalen Region zwischen den Aminosäuren 134 und 154 [145]. Dementsprechend wurde ein ORF 3b mit Deletion im Bereich des C-Terminus (ORF 3b Δ 124-154) nicht im Nukleus, sondern in perinukleären Regionen lokalisiert [52].

Überexpression von ORF 3b-eGFP induziert Zellzyklusarrest und Apoptose der transfizierten Zelle ([116], [144]). Obwohl es naheliegend scheint, hängt die Induktion der Apoptose nicht mit der nukleären Lokalisation zusammen. Die Apoptoseinduktion ist unabhängig von der Funktionalität des C-Terminus, die wiederum für die nukleäre Lokalisation zuständig ist [52]. Daher ist anzunehmen, dass die Funktion von ORF 3b unabhängig von seiner Lokalisation in der Zelle ist [52]. ORF 3b-eGFP und ORF eGFP-3b wurden von Yuan et al., zusätzlich zu der nukleären Lokalisation, vereinzelt in mitochondrialen Strukturen nachgewiesen. In diesen Zellen bestand eine Kolokalisation des ORFs mit einem mitochondrialen Marker. Allerdings wurden diese Ergebnisse nicht von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Die mitochondriale Lokalisation könnte jedoch mit der Induktion sowohl des Zellzyklusarrestes als auch der Apoptose zu tun haben [143].

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das kürzlich entdeckte SARS-Coronavirus ist der Erreger des sogenannten „Severe Acute Respiratory Syndrome“, einer atypischen Pneumonie, die mit hoher Letalität assoziiert ist. Zweimal innerhalb von zwei Jahren kam es zum Übertritt des Virus aus seinem ursprünglichen zoonotischen Reservoirs und zur Übertragung des SARS-Coronavirus auf den Menschen. 2002/2003 kam es in diesem Zusammenhang zu einer weltweiten Epidemie mit circa 8000 Erkrankungen und 800 Todesfällen.

Das Virus besitzt den typischen Aufbau der *Coronaviridae* mit einem großen Replikasegen am 5'-Ende und Struktur- und akzessorischen Proteinen am 3'-Ende des Genoms. Im Vergleich zu anderen Coronaviren besitzt das SARS-Coronavirus eine größere Anzahl dieser akzessorischen ORFs. Gerade sie könnten eine Mitursache für die außerordentliche Pathogenität des Virus sein.

Nach der Entschlüsselung des Genoms konnten bioinformatische Analysen nur wenig Erkenntnisse über Aufbau und Funktion der akzessorischen ORFs liefern, da viele ORFs keine Homologien zu bekannten Proteinen aufwiesen. Um über die intrazelluläre Lokalisation der akzessorischen ORFs erste Einblicke in deren mögliche Funktionen zu erlangen, erstellten wir das Lokalisom dieser ORFs. Zu diesem Zweck wurden die ORFs jeweils mit einem amino- und einem carboxyterminalen Flag-His₆-Anker markiert. Es wurden einfache Lokalisationsstudien sowie Kolokalisationsstudien mit Chromatinfärbung und Markern des Endoplasmatischen Retikulums durchgeführt. Ein Großteil der ORFs wurde im Endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat und vesikulären Strukturen des Zytoplasmas dargestellt und ist somit membran-assoziiert. Diese Ergebnisse passen zu den Erkenntnissen, dass die Replikations und -Translationsmaschinerie des Virus ebenfalls mit Membranen assoziiert ist. Eine Protein-Protein-Interaktionsanalyse des gesamten ORFoms wurde mittels *Yeast-Two-Hybrid*-System und gezielter Co-Immunopräzipitation durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass Interaktionen zwischen den akzessorischen ORFs sich konsequenterweise dann abspielten, wenn sich eine Kolokalisation im gleichen subzellulären Kompartiment ergab. Einige ORFs interagierten mit nicht-strukturellen Proteinen des Virus und könnten somit die Replikation erleichtern.

Nächste Schritte zum verbesserten Verständnis der Interaktionen zwischen Virus und Wirtszelle, beziehungsweise Virus und Wirtsorganismus, sollen Interaktionsstudien zwischen viralen und humanen Proteinen sein. Die Lokalisation humaner Proteine ist eine schwierige Aufgabe, da neben

Zusammenfassung und Ausblick

Splice-Varianten von Genen eine Vielzahl unterschiedlicher Zellarten mit spezialisierten Funktionen und individuellen Proteomen berücksichtigt werden müssen [107]. Durch *Yeast-Two-Hybrid*-Analysen in großem Maßstab könnten sich vielversprechende Proteininteraktionen herauskristallisieren. In einem weiteren Schritt könnten sodann Mutations- und Funktionsanalysen durchgeführt werden. Die Durchwanderung verschiedener Organellen, die Analyse von posttranslationalen Modifikationen sowie die Identifizierung von interagierenden Molekülen sollen Angriffstellen für die Entwicklung antiviraler Substanzen bieten.

Seit der Epidemie 2002/2003 wurde aktiv mit und am SARS-Coronavirus geforscht. In atemberaubendem Tempo sind SARS-Proteine charakterisiert und Zusammenhänge beschrieben worden, die auch Einblicke in die Pathologie und Pathogenese der gesamten Plus-Strang RNA-Viren gewähren. Weitere Coronaviren wie HCoV-NL63, ein wichtiger Verursacher von Infektionen des unteren Respirationstraktes bei Kindern, und HCoV-HKU1, ein Pneumonieerreger des Erwachsenen, konnten durch eine erhöhte Vigilanz von Klinikern und Forschern entdeckt werden. Die SARS-Epidemie und die Coronaviren haben zudem auch neues Interesse für den gesamten Themenkomplex der RNA-Viren geweckt, die durch ihre hohe Mutationsrate prädestiniert sind, auch in Zukunft Speziesgrenzen zu überwinden und neue Herausforderungen an Forschung und Klinik zu stellen.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

3CL ^{pro}	Chymotrypsin-ähnliche Protease
ACE 2	Angiotensin Converting Enzyme 2
AK	Antikörper
ALT	Alaninaminotransferase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AS	Aminosäure
<i>att</i> -site	Attachement site
Aqua Dest.	Destilliertes reines Wasser
BCV	Bovine Coronavirus
bp	Basenpaar
cDNA	Reverses Transkript der Boten Ribonukleinsäure
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CoV	Coronavirus
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DMV	Double Membrane Vesicles
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
E-Protein	Envelopeprotein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Modifiziertes grün-fluoreszierendes Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
eYFP	Modifiziertes gelb-fluoreszierendes Protein
FIPV	Feline Infectious Peritonitis Virus
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FCS	Fetales Rinderserum
fmol	femtomol (10^{-15} Mol)
g	Gramm

GFP	Green Fluorescent Protein
hACE 2	Humanes Angiotensin-Converting Enzym 2
HCoV	Humanes Coronavirus
IBV	Infectious Bronchitis Virus
IFN	Interferon
IP	Immunopräzipitation
kbp	Kilo-Basenpaare
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
μmol	Mikromol (10^{-6} Mol)
μl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
M	Mol
M-Protein	Membranprotein
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
MHV	Mouse Hepatitis Virus
mM	Millimol (10^{-3} Mol)
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
M ^{pro}	Coronavirus Main Protease
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NF-κB	Nuclear Factor 'Kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
N-Protein	Nukleokapsidprotein
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
nt	Nukleotid
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer (10^{-9} Meter)
nsp	Nicht-Strukturelles Protein
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	Offener Leserahmen (Open Reading Frame)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDEV	Porcine Diarrhoea Epidemic Virus
pH	Potentia Hydrogenii
PL1 ^{pro} , PL2 ^{pro}	Papain-ähnliche Protease 1 bzw. 2
Primer	Nukleotid für PCR Reaktion
RdRp	RNA-abhängige RNA Polymerase
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
RTC	Replikations-/Transkriptionskomplex
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
POX	Peroxidase
P/S	Penicillin/ Streptomycin
Q	L-Glutamin
rpm	Round per Minute (Umdrehung pro Minute)
S-Protein	Spikeprotein
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SARS-CoV	SARS- Coronavirus
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	Small Interfering RNA
sg mRNA	Subgenomische messenger RNA
Std	Stunde
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGEV	Transmissible Gastroenteritis Virus
TM	Transmembranregion
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRS	Transkriptionsregulierende Sequenz
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
Y2H	Yeast-Two-Hybrid
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

7.2.1 Abbildungen

Abbildung 1: Weltweite Neuinfektionen während der SARS-Epidemie von Frühjahr bis Sommer 2003.....	5
Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum des SARS-Coronavirus.....	9
Abbildung 3: Coronavirusaufbau mit Nukleokapsid, Lipidhülle und den wichtigen Strukturproteinen.....	12

Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Coronaviren.....	13
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Replikationsmechanismus von Coronaviren.....	14
Abbildung 6: Genomaufbau des SARS-Coronavirus.....	16
Abbildung 7: Aufbau des 3'-Endes des Genoms mit acht akzessorischen und vier strukturellen ORFs.....	22
Abbildung 8: Schematische Darstellung von ORF 3a.....	23
Abbildung 9: Struktur von ORF 7a.....	25
Abbildung 10: Schematische Darstellung von ORF 8a/b, ORF 8a und ORF 8b.....	27
Abbildung 11: Beispiele für subzelluläre Strukturen.....	29
Abbildung 12: Übersicht über die Funktionsweise des Gateway®-Systems.....	43
Abbildung 13: Schematische Darstellung der BP-Reaktion.....	44
Abbildung 14: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz.....	48
Abbildung 15: Prinzip der Konfokalmikroskopie.	50
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Bindungsverhältnisse während der Co-IP.....	53
Abbildung 17: Primer-Annealing der internen Forward- und Reverseprimer.....	55
Abbildung 18: Primer-Annealing der nested PCR mit externen Forward- und Reverseprimern.....	56
Abbildung 19: Aminoterminaler Anker für das Expressionsplasmid pDEST-rfB-N.....	57
Abbildung 20: Schema der Synthese des Expressionsplasmids pDEST-rfB-N.....	58
Abbildung 21: Carboxyterminaler Anker für das Expressionsplasmid pDEST-rfB-C.....	59
Abbildung 22: EcoR V- Restriktionsverdau von pDEST-ORF-N und pDEST-ORF-C.....	59
Abbildung 23: Agarosegel des Restriktionsverdaus mit Hind III von pGADT7-ORF und pGBKT7-ORF.....	60
Abbildung 24: Kontrolle der Funktionalität der Flag- und His6-Antigene im Expressionsplasmid pDEST-eGFP-N.....	61
Abbildung 25: Immunfluoreszenzen des Membran- und Envelopeproteins mit dem FITC-gekoppelten Antikörper gegen das Flag-Antigen.....	62
Abbildung 26: Immunfluoreszenzen der akzessorischen Proteine mit dem FITC-gekoppelten Antikörper gegen das Flag-Antigen.....	64
Abbildung 27: Immunfluoreszenzen mit dem Flag-Antikörper zur Darstellung der ORFs und einer TO-PRO3-Chromatinfärbung zur Darstellung des Nukleus.....	65
Abbildung 28: Kolokalisationsstudien von ORF 3a-C mit dem Endoplasmatischen Retikulum.....	66
Abbildung 29: Kolokalisationsstudien von ORF 6-C, Protein E-N und ORF 7b-N mit dem	

Endoplasmatischen Retikulum.....	67
Abbildung 30: Kolokalisationstudien von ORF 7b-N mit der Kernmembran.....	68
Abbildung 31: Immunfluoreszenzen von ORF 7b, ORF 6 und Protein E aus den Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7.....	69
Abbildung 32: Verteilung der Proteine über die Zellkompartimente.....	70
Abbildung 33: Analyse der Protein-Interaktionen des SARS-Coronavirus ORFeoms im Yeast-Two- Hybrid-Screening und Co-Immunopräzipitation in HEK-293-Zellen.....	72
Abbildung 34: Co-Immunopräzipitation von akzessorischen Proteinen.....	73

7.2.2 Tabellen

Tabelle 1: Verschiedene Nomenklaturen in der Literatur.....	17
Tabelle 2: Plasmide.....	32
Tabelle 3: Sequenzierungsprimer.....	32
Tabelle 4: Sequenz des N-terminalen Flag-His6-Ankers.	33
Tabelle 5: Sequenz des C-terminalen Flag-His6-Ankers.	33
Tabelle 6: Sequenzen der Forward- und Reverseprimer für die primäre PCR.....	34
Tabelle 7: Sequenz der externen Primer und der kompletten Primer für das N- und S-Gen.....	34
Tabelle 8: Restriktionsenzyme.....	35
Tabelle 9: Antikörper.....	35
Tabelle 10: Zelllinien.....	36
Tabelle 11: Immunfluoreszenzerggebnisse der akzessorischen Proteine sowie des Membran- und Envelopeproteins.....	71

7.3 Literaturverzeichnis

- [1] Ahlquist, P., Noueir, A.O., Lee, W.-M., Kushner, D.B., Dye, B.T. (2003) Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J. Virol.* 77(15): 8181-8186.
- [2] Baric, R.S. (2008) SARS-CoV: lessons for global health. *Virus Research* 133(1): 1-3.
- [3] Baric, R.S., Yount, B., Hensley, L., Peel, S.A., Chen, W. (1997) Episodic evolution mediates interspecies transfer of a murine coronavirus. *J. Virol.* 71(3): 1946-1955.
- [4] Bartlam, M., Xu, Y., Rao, Z. (2007) Structural proteomics of the SARS coronavirus: a model

- response to emerging infectious diseases. *J. Struct. Funct. Genomics* 8: 85-97.
- [5] Baudoux, P., Carrat, C., Besnardeau, L., Charley, B., Laude, H. (1998) Coronavirus pseudoparticles formed with recombinant M and E proteins induce alpha interferon synthesis by leukocytes. *J. of Virology* 72(11): 8636-8643.
- [6] Brierley, I., Digard, P., Inglis, S.C. (1989) Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* 57: 537-547.
- [7] Chan, W.S., Wu, C., Chow, S.C.S., Cheung, T., To, K.-F., Leung, W.-K., Chan, P.K.S., Lee, K.C., Ng, H.-K., Au, D.M.Y. et al. (2005) Coronaviral hypothetical and structural proteins were found in the intestinal surface enterocytes and pneumocytes of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Modern Pathology* 18(11): 1432-1439.
- [8] Charley, B., Laude H. (1988) Induction of alpha interferon by Transmissible Gastroenteritis Coronavirus: role of transmembrane glycoprotein E1. *J. of Virology* 62(1): 8-11.
- [9] Chau, T.N., Lee, K.C., Yao, H., Tsang, T.Y., Chow, T.C., Yeung, Y.C., Choi, K.W., Tso, Y.K., Lau, T., Lai, S.T., Lai, C.L. (2004) SARS-associated viral hepatitis caused by a novel coronavirus: report of three cases. *Hepatology* 39(2): 302-310.
- [10] Chen, C.-J., Makino, S. (2002) Murine coronavirus-induced apoptosis in 17Cl-1 cells involves a mitochondria-mediated pathway and its downstream caspase-8 activation and bid cleavage. *Virology* 302: 321-332.
- [11] Chen, C.-Y., Ping, Y.-H., Lee, H.-C., Chen, K.-H., Lee, Y.-M., Chan, Y.-J., Lien, T.-C., Jap, T.-S., Lin, C.-H., Kao, L.S. et al. (2007) Open reading frame 8a of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus not only promotes viral replication but also induces apoptosis. *The Journal of Infectious Diseases* 196: 405-415.
- [12] Chen, Y.-Y., Shuang, B., Tan, Y.-X., Meng, M.-J., Han, P., Mo, X.-N., Song, Q.-S., Qiu, X.-Y., Luo, X., Gan, Q.-N. et al. (2005) The protein X4 of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus is expressed on both virus-infected cells and lung tissue of severe acute respiratory syndrome patients and inhibits growth of Balb/c 3T3 cell line. *Chinese Medical Journal* 118(4): 267-274.
- [13] Childs, J.E. (2004) Zoonotic viruses of wildlife: hither from yon. *Arch. Virol. Suppl.* (18): 1-11.
- [14] Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H., Doerr, H.W. (2003) Treatment of SARS with human interferons. *Lancet* 362: 293-294.
- [15] Cleaveland, S., Laurenson, M.K., Taylor, M.K. (2001) Diseases of humans and their domestic

- mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356(1411): 991-999.
- [16] Corse, E., Machamer, C. E. (2002) The cytoplasmic tail of infectious bronchitis virus E protein directs Golgi targeting. *J. Virol.* 76(3): 1273-1284.
- [17] Corse, E., Machamer, C.E. (2000) Infectious Bronchitis Virus E protein is targeted to the golgi complex and directs release of virus-like particles. *J. of Virology* 74(9): 4319-4326.
- [18] de Haan, C.A., Rottier, P.J. (2005) Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 64: 165-230.
- [19] de Haan, C.A.M., Masters, P.S., Shen, X., Weiss, S., Rottier, P.J.M. (2002) The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology* 296(1): 177-189.
- [20] Donnelly, C.A., Ghani, A.C., Leung, G.M., Hedley, A.J., Fraser, C., Riley, S., Abu-Raddad, L.J., Ho, L.-M., Thach, T.-Q., Chau, P. et al. (2003) Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* 361(9371): 1761-1766.
- [21] Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R.A.M. et al. (2003) Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348(20): 1967-1976.
- [22] Eleouet, J.-F., Rasschaert, D., Lambert, P., Levy, L., Vende, P., Laude, H. (1995) Complete sequence (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of Transmissible Gastroenteritis Virus. *Virology* 206: 817-822.
- [23] Eleouet, J.-F., Slee, E.A., Saurini, F., Castagne, N., Poncet, D., Garrido, C., Solary, E., Martin, S.J. (2000) The viral nucleocapsid protein of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) is cleaved by caspase-6 and -7 during TGEV-induced apoptosis. *J. Virol.* 74(9): 3975-3983.
- [24] Fan, J., Ye, R.D., Malik, A.B. (2001) Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. mol. Physiol.* 281: L1037-L1050.
- [25] Fielding, B.C., Gunalan, V., Tan, T.H.P., Chou, C.-F., Shen, S., Khan, S., Lim, S.G., Hong, W., Tan, Y.-J. (2006) Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 7a interacts with hSGT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343(4): 1201-1208.
- [26] Fielding, B.C., Tan, Y.-J., Shuo, S., Tan, T.H.P., Ooi, E.-E., Lim, S.G., Hong, W., Goh, P.-Y.

- (2004) Characterization of a unique group-specific protein (U122) of the severe acute respiratory coronavirus. *J. Virol.* 78(14): 7311-7318.
- [27] Fields, S., Song, O. (1989) A Novel Genetic System to Detect Protein-Protein Interactions. *Nature* 340(6230): 245-246.
- [28] Fischer, F., Peng, D., Hingley, S.T., Weiss, S.R., Masters, P.S. (1997) The internal open reading frame within the nucleokapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication. *J. Virol.* 71(2): 996-1003.
- [29] Garoff, H., Hewson, R., Opstelten, D.-J. E. (1998) Virus maturation by budding. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(4): 1171-1190.
- [30] Geng, H., Liu, Y.M., Chan, W.S., Lo, A.W., Au, D.M., Waye, M.M., Ho, Y.Y. (2005) The putative protein 6 of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus: expression and functional characterization. *FEBS Lett.* 579: 6763-6768.
- [31] Gosert, R., Kanjanahaluethai, A., Egger, D., Bienz, K., Baker, S.C. (2002) RNA replication of mouse hepatitis virus takes place at double-membrane vesicles. *J. Virol.* 76(8): 3697-3708.
- [32] Gu, J., Korteweg, C. (2007) Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *The American Journal of Pathology* 170(4): 1136-1147.
- [33] Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., Luo, S.W., Li, P.H., Zhang, L.J., Guan, Y.J. et al. (2003) Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302: 276-278.
- [34] Guo, J.-P., Petric, M., Campbell, W., McGeer, P.L. (2004) SARS corona virus peptides recognized by antibodies in the sera of convalescent cases. *Virology* 324(2): 251-256.
- [35] Haagmans, B.L., Kuiken, T., Martina, B.E., Fouchier, R.A.M., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G., van Riel, D., de Jong, T., Itamura, S., Chan, K.H. et al. (2004) Pegylated interferon- α protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nature Medicine* 10(3): 290-293.
- [36] Haijema, B.J., Volders, H., Rottier, P.J.M. (2004) Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J. of Virology* 78(8): 3863-3871.
- [37] Han, Y., Geng, H., Feng, W., Tang, X., Ou, A., Lao, Y., Xu, Y., Lin, H., Liu, H., Li, Y. (2003) A follow-up study of 69 discharged SARS patients. *J. Tradit. Chin. Med.* 23(3): 214-217.
- [38] Hänel, K., Stangler, T., Stoldt, M., Willbold, D. (2006) Solution structure of the X4 protein

coded by the SARS related coronavirus reveals an immunoglobulin like fold and suggests a binding activity to integrin I domains. *Journal of Biomedical Science* 13: 281-293.

- [39] Hay, C.M. (2006) Coronaviruses. http://www.utdol.com/online/content/topic.do?topicKey=viral_in/19088&selectedTitle=1~17&source=search_result Up to Date Version 15.3: .
- [40] Heikkinen, T., Järvinen, A. (2003) The common cold. *Lancet* 361: 51-59.
- [41] Herrewegh, A.A.P.M., Vennema, H., Horzinek, M.C., Rottier, P.J.M., de Groot, R.J. (1995) The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF 7a/7b transcription unit of different biotypes. *Virology* 212: 622-631.
- [42] Hirsch-Kauffmann, M., Schweiger, M. (2000) *Biologie für Mediziner und naturwissenschaftler*. Thieme 4. Aufl. Stuttgart; New York: .
- [43] Hofmann, H., Pöhlmann, S. (2004) Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends Microbiol.* 12(10): 466-472.
- [44] Holmes, K.V., Enjuanes, L. (2003) The SARS Coronavirus: A Postgenomic Era. *Science* 300: 1377-1378.
- [45] Huang, C., Ito, N., Tseng, C.-T. K., Makino, S. (2006) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J. Virol.* 80(15): 7287-7294.
- [46] Hussain, S., Perlman, S., Gallagher, T.M. (2008) Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 accelerates murine hepatitis virus infection by more than one mechanism. *J. Virol.* 82(14): 7212-7222.
- [47] Ito, N., Mossel, E.C., Narayanan, K., Popov, V.L., Huang, C., Inoue, T., Peters, C.J., Makino, S. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. *J. Virol.* 79(5): 3182-3186.
- [48] Jeffers, S.A., Tusell, S.M., Gillim-Ross, L., Hemmila, E.M., Achenbach, J.E., Babcock, G.J., Thomas, W.D., Thackray, L.B., Young, M.D., Mason, R.J. et al. (2004) CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *PNAS* 101(44): 15748-15753.
- [49] Jia, H.P., Look, D.C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., Farzan, M., Wohlford-Lenane, C., Perlman, S., McCray, P.B. (2005) ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. *J. Virol.* 79(23): 14614-14621.
- [50] Kanzawa, N., Nishigaki, K., Hayashi, T., Ishii, Y., Furukawa, S., Niino, A., Yasui, F., Kohara, M., Morita K., Matsushima, K. et al. (2006) Augmentation of chemokine production by

severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 and 7a/X4 proteins through NF-kB activation . FEBS Letters 580: 6807-6812.

- [51] Keng, C.-T., Choi, Y.-W., Welkers, M.R.A., Chan, D.Z.L., Shen, S., Lim, S.G., Hong, W., Tan, Y.-J. (2006) The human severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) 8b protein is distinct from its counterpart in animal SARS-CoV and down-regulates the expression of the envelope protein in infected cells. *Virology* 354: 132-142.
- [52] Khan, S., Fielding, B.C., Tan, T.H.P., Chou, C.-F., Shen, S., Lim, S.G., Hong, W., Tan, Y.-J. (2006) Over-expression of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3b protein induces both apoptosis and necrosis in vero E6 cells. *Virus Res.* 122(1-2): 20-27.
- [53] Klumperman, J., Krijnse-Locker, J., Meijer, A., Horzinek, M.C., Geuze, H.J., Rottier, P.J.M. (1994) Coronavirus M protein accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J. Virol.* 68(10): 6523-6534.
- [54] Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M., Tobler, K. (2001) Completion of the Porcine Epidemic Diarrhoea Coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* 23(2): 137-144.
- [55] Kopecky-Bromberg, S.A., Martinez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R.A., Palese, P. (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J. Virol.* 81(2): 548-557.
- [56] Kopecky-Bromberg, S.A., Martinez-Sobrido, L., Palese, P. (2006) 7a protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cellular protein synthesis and activates p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Virol.* 80(2): 785-793.
- [57] Krijnse-Locker, J., Ericsson, M., Rottier P.J.M., Griffiths, G. (1994) Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J. Cell. Biol.* 124(1-2): 55-70.
- [58] Krysko, D.V., D'Herde, K., Vandenabeele, P. (2006) Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis* 11: 1709-1926.
- [59] Ksiazek, T.G., Erdman, D., Goldsmith, C.S., Zaki, S.R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J.A., Lim, W. et al. (2003) A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348(20): 1953-1966.
- [60] Kuiken, T., Fouchier, R.A., Schutten, M., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G., van Riel, D., Laman, J.D., de Jong, T., van Doornum, G., Lim, W. et al. (2003) Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 362(9380): 263-270.

- [61] Kumar, K.P., McBride, K.M., Weaver, B.K., Dingwall, C., Reich, N.C. (2000) Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 20(11): 4159-4168.
- [62] Kuo, M., Masters, P.S. (2003) The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J. Virol.* 77(8): 4597-4608.
- [63] Lai, M.M., Cavanagh, D. (1997) The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 48: 1-100.
- [64] Landy, A. (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 913-949.
- [65] Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., Li, K.S.M., Huang, Y., Tsoi, H.-W., Wong, B.H.L., Wong, S.S.Y., Leung, S.-Y., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *PNAS* 102(39): 14040-14045.
- [66] Lau, Y.L., Peiris, J.S. (2005) Pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Curr. Opin. Immunol.* 17(4): 404-410.
- [67] Law, P.T.W., Wong, C.-H., Au, T.C.C., Chuck, C.-P., Kong, S.-K., Chan, P.K.S., To, K.-F., Lo, A.W.I., Chan, J.Y.W., Suen, Y.-K. et al. (2005) The 3a protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus induces apoptosis in vero E6 cells. *J. of General Virology* 86: 1921-1930.
- [68] Law, P.Y.P., Liu, Y.-M., Geng, H., Kwan, K.H., Wayne, M.M.-Y., Ho, Y.-Y. (2006) Expression and functional characterization of the putative protein 8b of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *FEBS Letters* 580: 3643-3648.
- [69] Le, T.M., Wong, H.H., Tay, F.P.L., Fang, S., Keng, C.-T., Tan, Y.J., Liu, D.X. (2007) Expression, post-translational modification and biochemical characterization of proteins encoded by subgenomic mRNA8 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *FEBS Journal* 274: 4211-4222.
- [70] Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G.M., Ahuja, A., Yung, M.Y., Leung, C.B., To, K.F. et al. (2004) A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* 348: 1986-1994.
- [71] Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C. et al. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426(6965): 450-454.
- [72] Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., Wang, H., Cramer, G., Hu, Z.,

- Zhang, H. et al. (2005) Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310: 676-679.
- [73] Li, W., Zhang, C., Sui, J., Kuhn, J.H., Moore, M.J., Luo, S., Wong, S.-K., Huang, I.-C., Xu, K., Vasilieva, N. et al. (2005) Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *The EMBO Journal* 24: 1534-1643.
- [74] Liang, G., Chen, Q., Xu, J., Liu, Y., Lim, W., Peiris, J.S.M., Anderson, L.J., Ruan, L., Li, H., Kan, B. et al. (2004) Laboratory diagnosis of four recent sporadic cases of community-acquired SARS, Guangdong Province, China. *Emerging Infectious Diseases* 10(10): 1774-1781.
- [75] Liebel, U., Starkuviene, V., Erfle, H., Simpson, J.C., Poustka, A., Wiemann, S., Pepperkok, R. (2003) A microscope-based screening platform for large-scale functional protein analysis in intact cells. *FEBS Letters* 554(3): 394-398.
- [76] Lim, P.L., Kurup, A., Gopalakrishna, G., Chan, K.P., Wong, C.W., Ng, L.C., Se-Thoe, S.Y., Oon, L., Bai, X., Stanton, L.W. et al. (2004) Laboratory-acquired severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 350: 1740-1745.
- [77] Liu, C., Xu, H.Y., Liu, D.X. (2001) Induction of caspase-dependent apoptosis in cultured cells by the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J. Virol.* 75(14): 6402-6409.
- [78] Liu, D.X., Inglis, S.C. (1991) Association of the Infectious Bronchitis Virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* 185: 911-917.
- [79] Machamer, C.E., Mentone, S.A., Rose, J.K., Farquhar, M.G. (1990) The E1 glycoprotein of an avian coronavirus is targeted to the cis Golgi complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87(18): 6944-6948.
- [80] Marra, M.A., Jones, S.J.M., Astell, C.R., Holt, R.A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y.S.N., Khattra, J., asano, J.K., Barber, S.A., Chan, S.Y. et al. (2003) The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300: 1399-1404.
- [81] Meier, C., Aricescu, A.R., Assenberg, R., Aplin, R.T., Gilbert, R.J.C., Grimes, J.M., Stuart, D.I. (2006) The crystal structure of ORF-9b, a lipid binding protein from the SARS coronavirus. *Structure* 14: 1157-1165.
- [82] Morse, S.S. (1995) Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 1(1): 7-15.
- [83] Moshinsky, I., Viswanathan, S., Vasilenko, N., Lobanov, V., Petric, M., Babiuk, L.A., Zakhartchouk, A.N. (2007) Intracellular localization of the SARS coronavirus protein 9b:

- evidence of active export from the nucleus. *Virus Research* 127: 116-121.
- [84] Narayanan, K., Maeda, A., Maeda, J., Makino, S. (2000) Characterisation of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J. Virol.* 74(17): 8127-8134.
- [85] Nelson, C.A., Pekosz, A., Lee, C.A., Diamond, M.S., Fremont, D.H. (2005) Structure and intracellular targeting of the SARS-coronavirus ORF 7a accessory protein. *Structure* 13: 75-85.
- [86] Nguyen, V.-P., Hogue, B.G. (1997) Protein interactions during coronavirus assembly. *J. Virol.* 71(12): 9278-9284.
- [87] Nicholls, J.M., Poon, L.L.M., Lee, K.C., Ng, W.F., Lai, S.T., Leung, C.Y., Chu, C.M., Hui, P.K., Mak, K.L., Lim, W. et al. (2003) Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361(9371): 1773-1778.
- [88] O'Brien, V. (1998) Viruses and Apoptosis. *Journal of General Virology* 79: 1833-1845.
- [89] O'Donnell, R., Tasker, R.C., Roe, M.F.E. (2003) Apoptosis may explain lymphopenia of SARS. *BMJ* 327: 620.
- [90] Oostra, M., de Haan, C.A.M., Rottier, P.J.M. (2007) The 29-nucleotide deletion present in human but not in animal severe acute respiratory syndrome coronaviruses disrupts the functional expression of open reading frame 8. *J. Virol.* 81(24): 13876-13888.
- [91] Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., Kuiken, T. (2004) The aetiology of SARS: Koch's postulates fulfilled. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 359: 1081-1082.
- [92] Paul, P.S., Vaughn, E.M., Halbur, P.G. (1997) Pathogenicity and sequence analysis studies suggest potential role of gene 3 in virulence of swine enteric and respiratory coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412: 317-321.
- [93] Pease, J.E., Sabroe, I. (2002) The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. *Am. J. Resp. Med.* 1(1): 19-25.
- [94] Peiris, J.S.M., Chu, C.M., Cheng, V.C.C., Chan, K.S., Hung, I.F.N., Poon, L.L.M., Law, K.I., Tang, B.S.F., Hon, T.Y.W., Chan, C.S. et al. (2003) Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361(9371): 1767-1772.
- [95] Pewe, L., Zhou, H., Netland, J., Tangudu, C., Olivares, H., Shi, L., Look, D., Gallagher, T., Perlman, S. (2005) A severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-specific protein enhances virulence of an attenuated murine coronavirus. *J. Virol.* 79(17): 11335-11342.

- [96] Poutanen, S.M., Low, D.E., Henry, B., Finkelstein, S., Rose, D., Green, K., Tellier, R., Draker, R., Adachi, D., Ayers, M. et al. (2003) Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N. Engl. J. Med.* 348(20): 1995-2005.
- [97] Prentice, E., McAuliffe, J., Lu, X., Subbaro, K., Denison, M.R. (2004) Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *J. Virol.* 78(18): 9977-9986.
- [98] Riley, S., Fraser, C., Donnelly, C.A., Ghani, A.C., Abu-Raddad, L.J., Hedley, A.J., Leung, G.M., Ho, L.M., Lam, T.-H., Thach, T.Q et al. (2003) Transmission dynamics of the etiological agent of SARS in Hong Kong: Impact of public health interventions. *Science* 300: 1961-1966.
- [99] Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., Nix, W.A., Campagnoli, R., Icenogle, J.P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M.-H. et al. (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300: 1394-1399.
- [100] Ruggieri, A., Heisel, S. (2009) Fluoreszenz-Mikroskopie/Zellstruktur. Institut für Humangenetik, Universität des Saarlandes : .
- [101] Sawicki, S.G., Sawicki, D.L., Siddell, S.G. (2007) A contemporary view of coronavirus transcription. *J. of Virology* 81(1): 20-29.
- [102] Schaecher, S.R., Mackenzie, J.M., Pekosz, A. (2007) The ORF 7b protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is expressed in virus-infected cells and incorporated into SARS-CoV particles. *J. Virol.* 81(2): 718-731.
- [103] Schaecher, S.R., Touchette, E., Schriewer, J., Buller, R.M., Pekosz, A. (2007) Severe acute respiratory coronavirus gene 7 products contribute to virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 81(20): 11054-11068.
- [104] Senanayake, S.D., Brian, D.A. (1997) Bovine coronavirus I protein synthesis follows ribosomal scanning on the bicistronic N mRNA. *Virus Research* 48: 101-105.
- [105] Shen, S., Lin, P.-S., Chao, Y.-C., Zhang, A., Yang, X., Lim, S.G., Hong, W., Tan, Y.-J. (2005) The severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a is a novel structural protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330: 286-292.
- [106] Shen, W., Xue J.H., Yu, C.Y., Luo, H.B., Qin, L., Yu, X.J., Chen, J., Chen, L.L., Xiong, B., Yue, L.D. et al. (2003) Small envelope protein E of SARS: cloning, expression, purification, CD determination, and bioinformatics analysis. *Acta. Pharmacol. Sin.* 24(6): 505-511.
- [107] Simpson, J.C., Pepperkok, R. (2003) Localizing the proteome. *Genome Biology* 4(12): 240.

- [108] Simpson, J.C., Wellenreuther, R., Poustka, A., Pepperkok, R. and Wiemann, S. (2000) Systematic subcellular localisation of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO Reports* 1(3): 287-292.
- [109] Sims, A.C., Baric, R.S., Yount, B., Burkett, S.E., Collins, P.L., Pickles, R.J. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. *J. Virol.* 79(24): 15511-15524.
- [110] Sims, A.C., Burkett, S.E., Yount, B., Pickels, R.J. (2008) SARS-CoV replication and pathogenesis in an in vitro model of the human conducting airway epithelium. *Virus Res.* 133(1): 33-44.
- [111] Snijder, E.J., Bredenbeek, P.J., Dobbe, J.C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L.L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W.J., Gorbalenya, A.E. (2003) Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J. Mol. Biol.* 331: 991-1004.
- [112] Song, H.-D., Tu, C.-C., Zhang, G.-W., Wang, S.-Y., Zheng, K., Lei, L.-C., Chen, Q.-X., Gao, Y.-W., Zhou, H.-Q., Xiang, H. et al. (2005) Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *PNAS* 102(7): 2430-2435.
- [113] Spiegel, M., Pichlmair, A., Martinez-Sobrido, L., Cros, J., Garcia-Sastre, A., Haller, O., Weber, F. (2005) Inhibition of β interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* 79(4): 2079-2086.
- [114] Spiegel, M., Pichlmair, A., Mühlberger, E., Haller, O., Weber, F. (2004) The antiviral effect of interferon-beta against SARS-coronavirus is not mediated by MxA protein. *Journal of Clinical Virology* 30: 211-213.
- [115] Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R.G., Silverman, R.H., Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 227-264.
- [116] Tan, Y.-J., Fielding, B.C., Goh, P.-Y., Shen, S., Tan, T.H.P., Lim, S.G., Hong, W. (2004) Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway. *J. Virol.* 78(24): 14043-14047.
- [117] Tan, Y.-J., Lim, S.G., Hong, W. (2006) Understanding the accessory viral proteins unique to the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Antiviral Research* 72: 78-88.

- [118] Tan, Y.-J., Teng, E., Shen, S., Tan, T.H.P., Goh, P.-Y., Fielding, B.C., Ooi, E.-E., Tan, H.-C., Lim, S.G., Hong, W. (2004) A novel severe acute respiratory syndrome coronavirus protein, U274, is transported to the cell surface and undergoes endocytosis. *J. of Virology* 78(13): 6723-6734.
- [119] Tangudu, C., Olivares, H., Netland, J., Perlman, S., Gallagher, T. (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 accelerates murine coronavirus infections. *J. Virol.* 81(3): 1220-1229.
- [120] The Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium (2004) Molecular evolution of the SARS coronavirus during the course of the SARS epidemic in China. *Science* 303: 1666-1669.
- [121] Thiel, V., Ivanov, K.A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weißbrich, B., Snijder, E.J., Rabenau, H., Doerr, H.W. et al. (2003) Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. of General Virology* 84: 2305-2315.
- [122] To, K.F., Lo, A.W.I. (2004) Exploring the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS): the tissue distribution of the coronavirus (SARS-CoV) and its putative receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). *J. of Pathology* 203: 740-743.
- [123] Tung, F.Y., Abraham, S., Sethna, M., Hung, S.L., Sethna, P., Hogue, B.G., Brian, D.A. (1992) The 9-kDa hydrophobic protein encoded at the 3' end of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus genome is membrane associated. *Virology* 186(2): 676-683.
- [124] van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B. (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* 10(4): 368-373.
- [125] Van Hemert et al (2008) SARS-Coronavirus replication/Transcription Complexes Are Membrane-Protected and Need a Host Factor for Activity In Vitro. *PLoS Pathogens* 4 (5): e1000054.
- [126] Vennema, H., Godeke, G.-J., Rossen, J.W.A., Voorhout, W.F., Horzinek, M.C., Opstelten, D.-J.E., Rottier, P.J.M. (1996) Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.* 15(8): 2020-2028.
- [127] von Brunn, A., Teepe, C., Simpson, J.C., Pepperkok, R., Friedel, C.C., Zimmer, R., Roberts, R., Baric, R., Haas, J. (2007) Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFome. *PLoS ONE* 5: e459.
- [128] Wang, L.-F., Shi, Z., Zhang, S., Field, H., Daszak, P., Eaton, B.T. (2006) Review of bats and

SARS. *Emerging Infectious Diseases* 12(12): 1834-1840.

- [129] WHO (2003) First data on stability and resistance of SARS coronavirus compiled by members of WHO laboratory network.
www.who.int/csr/sars/survival_2003_05_04/en/index.html : .
- [130] WHO (2003) Summary table of SARS cases by country, 1 November 2002-26 September 2003. www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html : .
- [131] WHO (2003) Probable cases of SARS by date of report worldwide (n=7,588), 1 March-10 July 2003. <http://www.who.int/csr/sars/epicurve/en/> : .
- [132] WHO (2003) Dr. Carlo Urbani of the World Health Organization dies of SARS. <http://www.who.int/csr/sars/urbani/en/> : .
- [133] Wong, R.S.M., Wu, A., To, K.F., Lee, N., Lam, C.W.K., Wong, C.K., Chan, P.K.S., Ng, M.H.L., Yu, L.M., Hui, D.S. et al. (2003) Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: retrospective analysis. *BMJ* 326: 1358-1362.
- [134] Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Chu, C.-M., Chan, K.-H., Tsoi, H.-W., Huang, Y., Wong, B.H.L., Poon, R.W.S., Cai, J.J., Luk, W.-K. et al. (2005) Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* 79(2): 884-895.
- [135] Wu, D., Tu, C., Xin, C., Xuan, H., Meng, Q., Liu, Y., Yu, Y., Guan, Y., Jiang, Y., Yin, X. et al. (2005) Civets are equally susceptible to experimental infection by two different severe acute respiratory syndrome coronavirus isolates. *J. Virol.* 79(4): 2620-2625.
- [136] Xu, R.-H., He, J.-F., Evans, M.R., Peng, G.-W., Field, H.E., Yu, D.-W., Lee, C.-K., Luo, H.-M., Lin, W.-S., Lin, P. et al. (2004) Epidemiological clues to SARS origin in China. *Emerging Infectious Diseases* 10(6): 1030-1037.
- [137] Yan, H., Xiao, G., Zhang, J., Hu, Y., Yuan, F., Cole, D.K., Zheng, C., Gao, G.F. (2004) SARS coronavirus induces apoptosis in vero E6 cells. *Journal of Medical Virology* 73: 323-331.
- [138] Yeung, K.-S., Yamanaka, G.A., Meanwell, N. A. (2006) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry into Host Cells: Opportunities for Therapeutic Intervention. *Medicinal Research Reviews* (4)26: 414-433.
- [139] You, J., Dove, B.K., Enjuanes, L., DeDiego, M.L., Alvarez, E., Howell, G., Heinen, P., Zambon, M., Hiscox, J.A. (2005) Subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *J. Gen. Virol.* 86(Pt12): 3303-3310.

- [140] Yount, B., Roberts, R.S., Sims, A.C., Deming, D., Frieman, M.B., Sparks, J., Denison, M.R., Davis, N., Baric, R.S. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open Reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *J. Virol.* 79(23): 14909-14922.
- [141] Yu, C.-J., Chen, Y.-C., Hsiao, C.-H., Kuo, T.-C., Chang, S.C., Lu, C.-Y., Wei, W.-C., Lee, C.-H., Huang, L.-M., Chang, M.-F. et al. (2004) Identification of a novel protein 3a from severe acute respiratory syndrome coronavirus. *FEBS Lett.* 565(1-3): 111-116.
- [142] Yuan, X., Li, J., Shan, Y., Yang, Z., Zhao, Z., Chen, B., Yao, Z., Dong, B., Wang, S., Chen, J. et al. (2005) Subcellular localization and membrane association of SARS-CoV 3a protein. *Virus Research* 109: 191-202.
- [143] Yuan, X., Shan, Y., Yao, Z., Li, J., Zhao, Z., Chen, J., Cong, Y. (2005) Mitochondrial location of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3b protein. *Mol. Cells* 21(2): 186-191.
- [144] Yuan, X., Shan, Y., Zhao, Z., Chen, J., Cong, Y. (2005) G0/G1 arrest and apoptosis induced by SARS-CoV 3b protein in transfected cells. *Viol. J.* 2: 66.
- [145] Yuan, X., Yao, Z., Shan, Y., Chen, B., Yang, Z., Wu, J., Zhao, Z., Chen, J., Cong, Y. (2005) Nucleolar localization of non-structural protein 3b, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Virus Research* 114: 70-79.
- [146] Yuan, X., Yao, Z., Wu, J., Zhou, Y., Shan, Y., Dong, B., Zhao, Z., Hua, P., Chen, J., Cong, Y. (2007) G1 phase cell cycle arrest induced by SARS-CoV 3a protein via the cyclin D3/pRb pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 37(1): 9-19.
- [147] Zeng, R., Yang, R.-F., Shi, M.-D., Jiang, M.-R., Xie, Y.-H., Ruan, H.-Q., Jiang, X.-S., Shi, L., Zhou, H., Zhang, L. et al. (2004) Characterization of the 3a protein of SARS-associated coronavirus in infected vero E6 cells and SARS patients. *J. Mol. Biol.* 341: 271-279.
- [148] Zhang, Y., Li, T., Fu, L., Yu, C., Li, Y., Xu, X., Wang, Y., Ning, H., Zhang, S., Chen, W. et al. (2004) Silencing SARS-CoV Spike protein expression in cultured cells by RNA interference. *FEBS Lett.* 560(1-3): 141-146.
- [149] Ziebuhr, J. (2004) Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Current Opinion in Microbiology* 7: 412-419.
- [150] Ziebuhr, J. (2004) Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Current Opinion in Microbiology* 7: 412-419.
- [151] Ziebuhr, J., Snijder, E.J., Gorbalenya, A.E. (2000) Virus-encoded proteinases and proteolytic

processing in the nidovirales. J. Gen. Virol. 81(Pt4): 853-879.

[152] (2003) Severe acute respiratory syndrome (SARS). Wkly Epidemiol. Rec. 78(12): 81-83.

7.4 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Haas für seine hervorragende Unterstützung, ständige Ansprechbarkeit und guten Ratschläge aufrichtig bedanken.

Großen Dank schulde ich meinem Betreuer, Dr. Albrecht von Brunn, der mir durch sein außergewöhnliches Engagement und seine Hilfsbereitschaft bei allen Problemen fördernd zur Seite stand.

Prof. Dr. Ulrich Koszinowski möchte ich herzlich für seine exzellente Unterstützung danken.

Das FöFoLe-Programm unter der Leitung von Prof. Dr. Heesemann finanzierte Teile dieser Arbeit und zeichnete sich durch großes Engagement aus.

7.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Carola Teepe
Adresse	Drachenseestr. 12a 81373 München
Emailadresse	carola.teepe@med.uni-muenchen.de
Geburtsdatum	29.01.1983
Geburtsort	Aachen
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1989 - 1991	École des Charmilles, Genf
1991 - 1996	Europäische Schule, München
1996 - 1997	Collège Le Caousou, Toulouse
1997 - 2001	Europäische Schule, München
	Abschluss: Europäisches Abitur

Hochschulbildung

10/01 - 10/03	LMU, Studiengang Medizin, vorklinischer Abschnitt
10/03	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/03 - 04/08	LMU, Studiengang Medizin, klinischer Abschnitt
04/08	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

11/08 – 02/09	Medizinische Klinik-Innenstadt, Klinikum der Universität München
Seit 03/09	Medizinische Klinik und Poliklinik III, Klinikum der Universität München-Großhadern

Fremdsprachen

Französisch	muttersprachlich
Englisch	sehr gut in Schrift und Sprache
Spanisch	Grundkenntnisse