

Glykosylierung und intrazellulärer Transport des SARS-Coronavirus Membranproteins

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

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Daniel Voß
aus Paderborn

Marburg/Lahn, 2007

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 26. November 2007
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach
Zweitgutachter: Prof. Dr. Stephan Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2007

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	Einführung	2
2.2	Taxonomie	3
2.3	Epidemiologie und Pathogenese	4
2.4	Lebenszyklus der Coronaviren	6
2.5	Morphologie der Coronaviren	7
2.6	Zelluläre und virale Membranproteine	10
2.6.1	Synthese und Topologie von Membranproteinen	10
2.6.2	Glykosylierung	12
2.6.3	N-Glykolysierung	13
2.6.4	Proteintransport über den sekretorischen Weg	14
2.7	Fragestellung	16
3	MATERIAL	17
3.1	Geräte	17
3.2	Chemikalien	17
3.3	Verbrauchsmaterialien	19
3.4	Kits	19
3.5	Puffer und Lösungen	20
3.5.1	Puffer	20
3.5.2	Lösungen	21
3.6	Wachstumsmedien	22
3.6.1	Wachstumsmedien für Bakterien	22
3.6.2	Wachstumsmedien für Säugerzellen	22
3.7	Nukleinsäuren und Nukleotide	22
3.7.1	Nukleinsäuren	22
3.7.2	Nukleotide	22
3.7.3	DNA-Oligonukleotide	23
3.7.4	Vektorspezifische Primer	24
3.7.5	Vektoren und rekombinante Plasmide	24
3.7.6	Vektoren (Marker zellulärer Kompartimente)	25
3.8	Proteine	25
3.8.1	Enzyme	25
3.8.2	Primäre Antikörper	25
3.8.3	Sekundäre Antikörper	26
3.8.4	Proteinmarker	26
3.9	Radioaktiv markierte Substanzen	26
3.10	Zellen und Viren	26
3.10.1	Prokaryotische Zellen	26
3.10.2	Eukaryotische Zellen	27
3.10.3	Viren	27
4	METHODEN	28

4.1	Molekularbiologische Methoden	28
4.1.1	Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Ketten-Reaktion	28
4.1.2	Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA	28
4.1.3	Quantitative Echtzeit-RT-PCR (engl.: real-time RT-PCR)	29
4.1.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren	30
4.1.5	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	30
4.1.6	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	31
4.1.7	Isolierung von viraler RNA aus dem Überstand SARS-CoV infizierter Zellen	31
4.1.8	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	31
4.1.9	Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA	32
4.1.10	Reinigung von DNA-Fragmenten	32
4.1.11	Ethanol-fällung von DNA-Fragmenten	32
4.1.12	Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren	32
4.1.13	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	33
4.1.14	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen mittels Elektroporation	33
4.1.15	Plasmidpräparationen kleinen Maßstabes	33
4.1.16	Plasmidpräparationen großen Maßstabes	34
4.1.17	Herstellung eines infektiösen SARS-CoV cDNA-Klons	34
4.1.18	Klonierung der rekombinanten adenoviralen Konstrukte	34
4.2	Zellbiologische Methoden	36
4.2.1	Kultivierung von Vero-, Huh7-, HER 911-, HEK 293- und HeLa-Zellen	36
4.2.2	Kultivierung von BHK-T7-Zellen	36
4.2.3	Transiente Transfektion von BHK-T7-Zellen mit Lipofectamine® Plus	36
4.2.4	Transiente Transfektion von Huh7-Zellen mit Fugene®	37
4.2.5	Transiente Transfektion von HER 911- oder HEK 293-Zellen mit Lipofectamine® Plus	37
4.2.6	Transiente Transfektion von BHK-T7-Zellen mittels Elektroporation	38
4.3	Virologische Methoden	39
4.3.1	Arbeiten mit SARS-Coronavirus	39
4.3.2	Arbeiten mit rekombinantem SARS-Coronavirus	39
4.3.3	Plaque-Aufreinigung von rekombinantem SARS-CoV	39
4.3.4	Titration einer Virussuspension mittels Kristallviolett-Färbung	39
4.3.5	Infektion von Zellen mit rekombinantem SARS-CoV	40
4.3.6	Ernte von infizierten Zellen für anschließende SDS-PAGE	40
4.3.7	Präparation von infizierten Zellen für elektronenmikroskopische Studien	40
4.3.8	Herstellung rekombinanter Adenoviren	41
4.3.9	Infektion von Zellen mit rekombinanten Adenoviren	41
4.3.10	Titration einer Adenovirussuspension mittels Immunfluoreszenz	41
4.4	Proteinbiochemische und Immunologische Methoden	42
4.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
4.4.2	Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot – wet blot-Methode)	42
4.4.3	Immunfärbung von Proteinen	43
4.4.4	Antikörper-Aufnahme Assay – SDS-PAGE	44
4.4.5	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	44
4.4.6	Antikörper-Aufnahme Assay - Immunfluoreszenz	45
4.4.7	<i>In vitro</i> -Translation	45
4.4.8	Immunpräzipitation aus <i>in vitro</i> -Translat	46
4.4.9	Endoglykosidase H- (Endo H-) Behandlung	47
4.4.10	Peptid-N-Glykosidase F- (PNGase F-) Behandlung	47

4.4.11	Proteinase K-Behandlung	48
4.4.12	Autoradiographie und Bio-Imager-Analyse	48
5	ERGEBNISSE	50
5.1	Charakterisierung des M-Proteins	50
5.2	Analyse der Membrantopologie des M-Proteins	54
5.3	Identifizierung der Bindungsstelle des α-M S30-Antikörpers	57
5.4	Analyse der intrazellulären Verteilung des M-Proteins	59
5.5	Untersuchungen zum Oberflächentransport des M-Proteins	62
5.6	Untersuchungen zur Endozytose des M-Proteins	64
5.6.1	Immunfluoreszenz-Analyse	64
5.6.2	Western Blot-Analyse	65
5.7	Untersuchungen zur N-Glykosylierung des M-Proteins	69
5.8	Koexpression des M- und S-Proteins	73
5.9	Studien zur adenoviralen Expression von Strukturproteinen des SARS-CoV	75
5.10	Untersuchungen zur Bedeutung der N-Glykosylierung des M-Proteins im viralen Kontext mithilfe eines rekombinanten SARS-CoV	78
6	DISKUSSION	83
6.1	Synthese, Topologie und Prozessierung des SARS-CoV M-Proteins	83
6.2	Transport des SARS-CoV M-Proteins innerhalb des zellulären sekretorischen Weges	86
6.3	Einfluss der N-Glykosylierung des SARS-CoV M-Proteins auf den Proteintransport und den Lebenszyklus eines rekombinanten SARS-CoV	90
7	LITERATUR	93

1 Zusammenfassung

Respiratorische Infektionskrankheiten sind weltweit stark verbreitet und werden u. a. durch Rhino-, Influenza-, Adeno- oder Coronaviren, aber auch durch bakterielle Keime wie Mycoplasmen und Chlamydien ausgelöst. Im Winter 2002/2003 kam es in der südchinesischen Provinz Guangdong zum Ausbruch einer schweren Lungenerkrankung, die mit einer hohen Mortalität von ca. 10 % einherging und aufgrund ihres schweren Krankheitsbildes „severe acute respiratory syndrome“ (SARS) genannt wurde. Der ursächliche Erreger konnte der Virusfamilie *Coronaviridae* zugeordnet werden (SARS-CoV). Das Membran- oder M-Protein der Coronaviren ist das in der Virushülle am häufigsten vorkommende Protein und dient durch die Interaktion mit allen viralen Strukturproteinen als Gerüst für die Assemblierung neuer Virionen im ER-Golgi-intermediären Kompartiment (ERGIC). In der vorliegenden Arbeit wurde die Topologie, die Prozessierung und der intrazelluläre Transport des SARS-CoV M-Proteins charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass das M-Protein eine kurze N-terminale Ektodomäne, drei transmembranale Segmente und eine C-terminale Endodomäne besitzt. Nach rekombinanter Expression und in SARS-CoV infizierten Zellen lag das M-Protein sowohl in unmodifizierter Form als auch N-glykosyliert vor. Nach Mutation der N-Glykosylierungsstelle des M-Proteins innerhalb eines infektiösen cDNA-Klons des SARS-CoV konnten rekombinante Viren gewonnen werden, die hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften und ihrer Morphologie dem Wildtyp-Virus glichen (Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. C. Drosten, Bernhard-Nocht Institut Hamburg). In Immunfluoreszenzanalysen wurde eine glykosylierungsunabhängige Akkumulation des M-Proteins im ERGIC und im Golgi-Komplex beobachtet. Ein Teil des M-Proteins konnte nach rekombinanter Expression an der Plasmamembran und in endozytierten Vesikeln detektiert werden. Die Re-Endozytose des M-Proteins wird durch den C-Terminus des Proteins vermittelt und ist vermutlich nicht mit der Anreicherung des Proteins im ERGIC/Golgi-Komplex assoziiert. Ferner konnte in Koexpressionsstudien gezeigt werden, dass das M-Protein die intrazelluläre Lokalisation des an der Oberfläche exprimierten Spike-Proteins beeinflusst und in perinukleären Bereichen zurückhält.

Die in dieser Arbeit untersuchte N-Glykosylierung des SARS-CoV M-Proteins und der Einfluss des Proteins auf den unterdrückten Transport des hochimmunogenen Spike-Proteins an die Zelloberfläche könnten einen modulatorischen Effekt auf die Viruspathogenese und die Immunantwort des Wirtes ausüben.

2 Einleitung

2.1 Einführung

Virale respiratorische Erkrankungen treten meist saisonal auf und können sowohl lokal begrenzte Endemien als auch globale Pandemien auslösen. Außer der durch Influenza-Viren verursachten pandemischen Grippe, die allein im Jahr 1918 Millionen von Menschen das Leben kostete, verlaufen die unter „grippalen Infekten“ zusammengefassten Erkältungskrankheiten meist inapparent oder subklinisch (Taubenberger & Morens, 2006). Auslöser hierfür sind überwiegend humanpathogene Vertreter der Adeno- oder Coronaviren (Tyrrell et al., 1993).

Der Ausbruch atypischer Pneumonien in der südchinesischen Provinz Guangdong im November und Dezember 2002 erzeugte zunächst kaum öffentliches Interesse. Innerhalb weniger Wochen erhöhte sich jedoch die Anzahl an Patienten mit hohem Fieber, Atemnot und trockenem Husten sowohl in den ländlichen Gebieten als auch in der nahe gelegenen Metropole Hongkong dramatisch (Lee et al., 2003). Anfang März 2003 wurden zudem erste Verdachtsfälle betroffener Personen in Kanada registriert (Poutanen et al., 2003). Schätzungsweise 20 bis 30 % der Patienten benötigten eine intensiv-medizinische Behandlung, und die Letalitätsrate lag bei ca. 10 % (Booth et al., 2003; Lee et al., 2003; WHO, 2003b). Die Befürchtung des Auftretens einer Pandemie, verursacht durch eine unbekannte und hochinfektiöse respiratorische Erkrankung, veranlasste die Weltgesundheitsorganisation (WHO) am 12. März 2003 erstmals in ihrer 60-jährigen Geschichte eine globale Warnung vor einer Infektionskrankheit auszusprechen. Die Erkrankung wurde aufgrund ihres schweren Krankheitsbildes „severe acute respiratory syndrome – SARS“ benannt (WHO, 2003b).

Innerhalb kürzester Zeit wurden die klinischen Symptome vollständig beschrieben (Lee et al., 2003; Peiris et al., 2003), das Genom komplett sequenziert (Marra et al., 2003; Rota et al., 2003) und der Erreger identifiziert (Drosten et al., 2003; Fouchier et al., 2003; Ksiazek et al., 2003). Aufgrund molekularbiologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde das analysierte Virus der Familie der *Coronaviridae* zugeordnet. Bis zum erklärten Ende des SARS-Ausbruchs am 5. Juli 2003 wurden weltweit mehr als 8000 Fälle von SARS-assoziierten Coronavirus (SARS-CoV) Infektionen dokumentiert.

2.2 Taxonomie

Die Coronaviren bilden zusammen mit den Toroviren die Familie der *Coronaviridae*, die mit den *Arteriviridae* und den *Roniviridae* zur Ordnung der Nidovirales gehören.

Aktuell werden die Coronaviren in drei Gruppen unterteilt. Charakteristische Vertreter ihrer jeweiligen Gruppe sind das transmissible Gastroenteritis Virus der Schweine (TGEV – Gruppe 1), das Maus Hepatitis Virus (MHV – Gruppe 2) und das aviäre infektiöse Bronchitis Virus (IBV – Gruppe 3), die nach Infektion ihrer spezifischen Wirte Atemwegs- und Durchfallerkrankungen zur Folge haben. Abhängig vom Virusstamm zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede im Schweregrad des Krankheitsverlaufes. Das TGEV verursacht eine schwere klinische Symptomatik des respiratorischen Traktes und des Darms von Ferkeln und führt aufgrund der hohen Mortalitätsrate zu großen ökonomischen Verlusten in der Fleischindustrie (Enjuanes et al., 1995; Weiss & Navas-Martin, 2005). Das humane Coronavirus 229E (HCoV-229E – Gruppe 1) wird für ein Drittel der Erkältungserkrankungen im Winter verantwortlich gemacht (Monto & Lim, 1974; Tyrrell et al., 1993). Erst kürzlich wurden zwei weitere humane Coronaviren identifiziert (HCoV-HKU1 und HCoV-NL63), von denen das HCoV-NL63 mit schweren Atemwegserkrankungen und Krupp assoziiert zu sein scheint (van der Hoek et al., 2004; van der Hoek et al., 2005; Woo et al., 2005). Das SARS-CoV wurde phylogenetisch zunächst als frühe Abspaltung der Gruppe 2 eingestuft (Eickmann et al., 2003). Diese Einteilung wird vom Internationalen Komitee zur Virustaxonomie unterstützt (ICTVdB, 2006). Neuere Stammbaumanalysen lassen hingegen vermuten, dass das SARS-CoV zusammen mit einigen Fledermaus-Coronaviren der Familie *Rhinolophidae* einer neuen vierten Gruppe der Coronaviren zuzuordnen ist (Tang et al., 2006). Die potentielle fünfte Gruppe wird ausschließlich von Fledermaus-Coronaviren unterschiedlicher Spezies konstituiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Phylogenetische Einordnung der bekannten humanen und animalen Coronaviren (Tang et al., 2006)

Gruppe 1	Humanes Coronavirus 229E (HCoV-229E) Felines Coronavirus (FCoV) transmissibles Gastroenteritis Virus der Schweine (TGEV) epidemisches Diarrhö Virus der Schweine (PEDV) Humanes Coronavirus NL63 (HCoV-NL63) Fledermaus-Coronaviren (Bt-CoV) verschiedener Spezies
Gruppe 2	Humanes Coronavirus OC43 (HCoV-OC43) Bovines Coronavirus (BCoV) Maus Hepatitis Virus (MHV) Humanes Coronavirus HKU1 (HCoV-HKU1)
Gruppe 3	Infektiöses Bronchitis Virus der Vögel (IBV) Truthahn Coronavirus (TCoV)
Potentielle Gruppe 4	SARS-CoV Fledermaus-SARS-CoV (bat-SARS-CoV) Fledermaus-Coronaviren (Bt-CoV) verschiedener Spezies
Potentielle Gruppe 5	Fledermaus-Coronaviren (Bt-CoV) verschiedener Spezies

2.3 Epidemiologie und Pathogenese

Die Mehrzahl der in den letzten Jahrzehnten neu aufgetretenden Infektionskrankheiten beim Menschen, wie z.B. AIDS (HIV), hämorrhagische Fiebererkrankungen (Ebola-Virus) oder die Grippe (aviäre Influenza-Viren H5N1), resultierte aus der Übertragung zoonotischer RNA-Viren vom Tier auf den Menschen (Keele et al., 2006; Subbarao et al., 1998). Hierbei spielen vor allem Fledertiere eine entscheidende Rolle, da sie als einzige Wirbeltiere fliegen können und geographisch weit verbreitet sind. Für einige hochpathogene Viren wurde gezeigt, dass Fledertiere das natürliche Reservoir darstellen (Calisher et al., 2006; Leroy et al., 2005). Nach Ausbruch der SARS-Epidemie im Jahre 2002 konnte mittels epidemiologischer Untersuchungen gezeigt werden, dass die meisten der in der frühen Phase des Ausbruchs erkrankten Personen engen Kontakt zu exotischen Tieren auf Märkten in der südchinesischen Provinz Guangdong hatten (WHO, 2003a; Zhong et al., 2003). Die Suche nach dem möglichen Träger des SARS-CoV konzentrierte sich zunächst auf die zu den Schleichkatzen gehörenden Larvenroller (*Paguma larvata*), die chinesischen Sonnendachse (*Melogale moschata*) und die Marderhunde (*Nyctereutes procyonoides*), da aus ihnen ein

dem Erreger ähnliches Virus isoliert werden konnte (Guan et al., 2003; Kan et al., 2005). Zur Eindämmung des SARS-Ausbruchs wurden die genannten Tierarten von den Märkten in der Provinz Guangdong verbannt und größtenteils vernichtet (Watts, 2004). Spätere experimentelle Infektionen von Sonnendachsen und Larvenrollern mit humanen Isolaten des SARS-CoV führten jedoch zu offensichtlichen klinischen Symptomen. (Martina et al., 2003; Wu et al., 2005). Diese Tatsache lässt es unwahrscheinlich erscheinen, dass diese Tiere das natürliche Reservoir des SARS-CoV darstellen. Neuere Studien zeigen, dass ein phylogenetischer Vorgänger des SARS-CoV sein natürliches Reservoir in den zu den Fledermäusen gehörenden Hufeisennasen (*Rhinolophidae*) hat (Lau et al., 2005; Li et al., 2005; Tang et al., 2006). Vermutlich übertrug sich dieses Fledermaus-Coronavirus zunächst auf Larvenroller und Sonnendachse („Zwischenwirte“), in denen es zirkulierte und sich über die Exkremente auf den Tiermärkten ausbreitete (Song et al., 2005). Durch engen Kontakt zwischen infizierten Tieren und Menschen kam es zu ersten, vermutlich sehr ineffizienten Übertragungen des SARS-ähnlichen Virus, die sporadische Erkrankungen beim Menschen zur Folge hatten (Peiris et al., 2004). Als Resultat eines einzigartigen Replikationsprozesses ist bei Coronaviren eine hohe Mutationsrate zu beobachten, was den Viren eine schnelle Anpassung an neue Wirte und ökologische Nischen ermöglicht (Siddell, 1995). So konnte sich das SARS-CoV bis zur zweiten Ausbruchswelle im Januar 2003 an den Menschen adaptieren und das Potential für eine direkte Übertragung von Mensch-zu-Mensch erlangen (Holmes, 2005).

Obwohl die Immunpathogenese der SARS-CoV Infektion noch zum größten Teil unverstanden ist, weisen *in vitro*-Studien infizierter Makrophagen und dendritischer Zellen auf eine schwache oder ineffiziente Induktion antiviraler Cytokine (Interferon- α und - β) hin (Cheung et al., 2005; Ziegler et al., 2005). Diese induzierbaren Cytokine stellen die erste unspezifische und nichtadaptive Abwehrreaktion eines Organismus auf eine Infektion dar. Interferon (IFN)- α und - β (Typ I Interferone) werden von den infizierten Zellen synthetisiert und in den extrazellulären Raum abgegeben (Übersichtsartikel: (Haller et al., 2006). Ausschlaggebend für einen schweren und tödlichen Verlauf von SARS scheint neben einem fehlerhaften Zusammenspiel der angeborenen und erworbenen Immunität, das Alter und die Morbidität des Patienten zu sein (Cameron et al., 2007; Huang et al., 2005; Wong et al., 2004a).

Derzeit existiert keine spezifische Therapie gegen SARS. Die Behandlung der unter Quarantäne stehenden Patienten erfolgte durch eine Kombination von Ribavirin, Oseltamir und Antibiotika, wodurch insbesondere die Gefahr einer sekundären bakteriellen oder viralen Infektion minimiert werden sollte (Lee et al., 2003; Peiris et al., 2003). Eine zusätzliche Kortikosteroid-Behandlung diente der Immunsuppression, da die Lungenschäden zumindest teilweise auf der übermäßigen Freisetzung proinflammatorischer Zytokine beruhten (Nicholls

et al., 2003). *In vitro*-Studien zeigten, dass Interferon- α im Gegensatz zum Nukleosidanalogen Ribavirin eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum des SARS-CoV besitzt (Cinatl et al., 2003; Leong et al., 2004).

Eine effektive Impfung gegen SARS-CoV ist zurzeit nicht verfügbar, allerdings konnten erste Erfolge mit neu entwickelten Impfstrategien erzielt werden. Die Verwendung einer DNA-Vakzine, die für ein virales Strukturprotein kodiert, führte zur Reduktion der viralen Replikation in infizierten Mäusen (Yang et al., 2004). In Kleintiermodellen konnte eine aktive Immunisierung durch die Gabe eines inaktivierten SARS-CoV (Tang et al., 2004) oder eines rekombinanten Vaccinia- (Bisht et al., 2004) oder Parainfluenza-Virus (Bukreyev et al., 2004) erzielt werden. Die daraus resultierende Immunantwort induziert die Bildung neutralisierender Antikörper, die eine SARS-CoV Infektion unterdrücken können. Durch eine passive Immunisierung mittels humaner monoklonaler Antikörper konnte in Mäusen (Traggiati et al., 2004) und Frettchen (ter Meulen et al., 2004) eine Reduktion der Viruslast in der Lunge der infizierten Tiere nachgewiesen werden. Inwieweit all diese Strategien zu einer sicheren und wirkungsvollen SARS-Impfung beim Menschen führen, ist bis jetzt noch nicht abzusehen.

2.4 Lebenszyklus der Coronaviren

Die Übertragung von Coronaviren erfolgt über Tröpfcheninfektion, bei der virushaltige Aerosole auf die Epithelien des oberen respiratorischen Traktes gelangen (Seto et al., 2003; Siddell, 1995). Der virale Replikationszyklus beginnt mit der Anlagerung des Virus an die Zelloberfläche. Das virale Spike-Protein interagiert hierbei mit dem zellulären Rezeptor, wodurch eine Änderung der Protein-Rezeptor-Konformation die Fusion der viralen mit der zellulären Membran vermittelt (Matsuyama & Taguchi, 2002). Für das TGEV und das humane HCoV-229E wird postuliert, dass die Fusion von Virushülle und zellulärer Membran im Endosom der Zielzelle erfolgt (Hansen et al., 1998; Nomura et al., 2004). Virale Partikel des MHV scheinen hingegen direkt mit der Plasmamembran zu verschmelzen (Zelus et al., 2003). Für das SARS-CoV ist neben dem endosomalen auch der sehr effiziente nicht-endosomale Eintritt in die Zelle beschrieben (Matsuyama et al., 2005; Simmons et al., 2005; Simmons et al., 2004). Nach der Freisetzung des 27 kb-großen RNA-Genoms positiver Polarität in das Zytoplasma der infizierten Zelle übernimmt die zelluläre Translationsmaschinerie zunächst die Synthese von Proteinen, die für die virale Replikation und Transkription essentiell sind. Der erste offene Leserahmen (engl.: open reading frame = ORF) 1a des RNA-Genoms kodiert für ein ca. 4400 Aminosäuren großes Vorläuferprotein. In 20-30 % der Translationsvorgänge induziert eine Pseudoknotenstruktur der viralen RNA und eine sogenannte „slippery sequence“ eine ribosomale Leserasterverschiebung kurz oberhalb

des ORF1a Stopp-Kodons. Die zusätzliche Translation des ORF1b resultiert in der Synthese des ca. 7000 Aminosäure großen Polyproteins 1a/b (Ziebuhr et al., 2000; Ziebuhr et al., 2001). Die aus der Prozessierung der Polyproteine 1a und 1a/b hervorgehenden viralen Faktoren, wie z.B. Proteasen, Helikasen und die RNA-abhängige RNA-Polymerase, lagern sich an zelluläre Membranen an (engl.: double-membraned vesicles = DMV) und konstituieren den Replikase-Transkriptase-Komplex (Ziebuhr, 2005). Sowohl die Replikation des viralen Genoms als auch die Transkription subgenomischer mRNAs wird durch die Aktivität dieses Komplexes reguliert (Thiel et al., 2003). Die subgenomischen mRNAs besitzen identische 5'- und 3'-Enden und sind ein Resultat der für die Coronaviren charakteristischen diskontinuierlichen Transkriptionsstrategie (Siddell, 1995). Die Polymerase wird hierbei durch die Anwesenheit von transkriptionsregulierenden Sequenzen am jeweiligen 5'-Ende gesteuert. Von den unterschiedlich langen subgenomischen mRNAs wird jeweils nur der erste ORF des 5'-Endes in ein Protein übersetzt (Siddell, 1995; Snijder et al., 2003). Nach der Synthese einer ausreichenden Anzahl an Genom-Kopien und viralen Proteinen bildet sich im Zytoplasma der infizierten Zelle das helikale Nukleokapsid. Die Zusammenführung aller viralen Strukturproteine mit dem Nukleokapsid und der Zusammenbau neuer Viren erfolgt an intrazellulären Membranen im ER-Golgi-intermediären Kompartiment (ERGIC; Klumperman et al., 1994; Tooze et al., 1984). Nach der Morphogenese neuer Viren im ERGIC gelangen diese in den Golgi-Komplex, in dem es zu weiteren Reifungs- und Modifizierungsschritten der Virionen kommt (Risco et al., 1998; Tooze et al., 1987). Im Anschluss werden die Viruspartikel durch einen vesikulären Transport zur Plasmamembran geschleust. Durch die Fusion der mit Virionen-beladenen Vesikel mit der Plasmamembran gelangen die Viruspartikel in den extrazellulären Raum und sind in der Lage neue, benachbarte Zellen zu infizieren.

2.5 Morphologie der Coronaviren

Der Name Coronavirus wurde Mitte der sechziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts geprägt und steht für das charakteristische Erscheinungsbild dieser Viren in elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Es handelt sich um die einer „Krone“ (lat. *Corona*) ähnelnden Anordnung viraler Membranproteine um das elektronendichte Kapsid des Virus (Abb. 1; Almeida & Tyrrell, 1967).

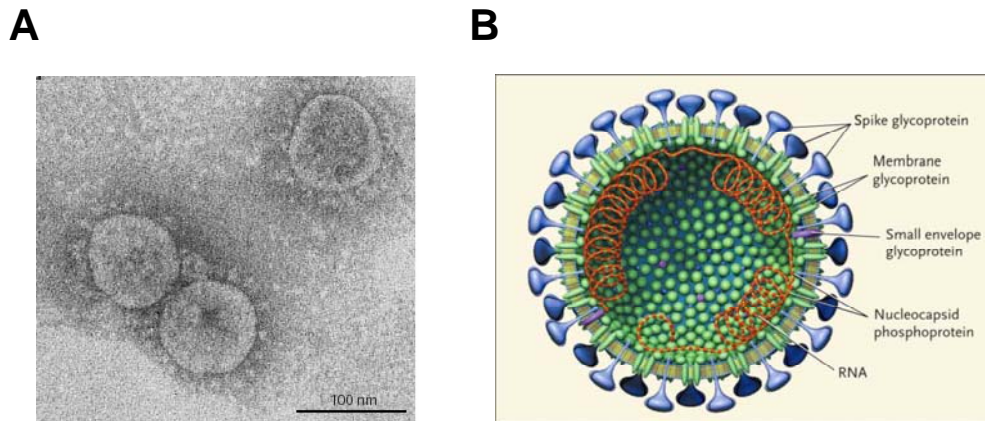


Abbildung 1: Morphologie des SARS-CoV.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von SARS-CoV Partikeln (zur Verfügung gestellt von Dr. L. Kolesnikova). (B) Schematische Darstellung des Virus (Stadler et al., 2003)

Nucleokapsid-Protein (N) - Das RNA-Genom der Coronaviren ist mit dem N-Protein komplexiert. Durch die Bildung von Dimeren und die Assoziation N-terminaler Proteindomänen mit der RNA entsteht eine helikale Struktur innerhalb des Virions (He et al., 2004a; Huang et al., 2004a; Yu et al., 2005). Neben seiner Funktion als Strukturprotein wird ein regulatorischer Einfluss des N-Proteins auf den Zellzyklus vermutet (Wurm et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das N-Protein für die Replikation und die Generierung des SARS-CoV von einem infektiösen cDNA-Klon entscheidend ist (Almazan et al., 2004; Yount et al., 2003). Das N-Protein ist phosphoryliert und im Zytoplasma der infizierten Zelle lokalisiert (Surjit et al., 2005).

Spike-Protein (S) - Das coronavirale S-Protein ist ein Typ I Glykoprotein, welches N-terminal im ER durch Zuckerseitenketten modifiziert wird und Trimere bildet (Delmas & Laude, 1990). Die in der Virusmembran inkorporierten Komplexe verleihen dem Partikel seine charakteristische „Krone“ (Almeida & Tyrrell, 1967). Funktionell ist das S-Protein für die Interaktion des Virus mit dem Rezeptor der Plasmamembran und somit für das Eindringen in die Wirtszelle verantwortlich. Die Rezeptorspezifität der verschiedenen Coronaviren resultiert in der Wirtsspezifität und dem Zell- und Organtropismus. Bislang konnten die Rezeptoren mehrerer Coronaviren identifiziert werden (Delmas et al., 1992; Tresnan et al., 1996; Yeager et al., 1992). Der spezifische Rezeptor des HCoV-NL63 und des SARS-CoV ist die Metalloproteinase Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2; Hofmann et al., 2005; Li et al., 2003). Die Aminosäuren zwischen Position 318 und 510 des SARS-CoV S-Proteins sind für die Rezeptorerkennung entscheidend (Wong et al., 2004b). Bei einigen Coronaviren wird das S-Protein im Laufe der Prozessierung durch eine enzymatische Reaktion in die extrazelluläre S1- und die für die Membranfusion essentielle S2-Untereinheit gespalten und dadurch

aktiviert (Cavanagh et al., 1986; Frana et al., 1985; Gallagher & Buchmeier, 2001). Eine Spaltung des SARS-CoV S-Proteins konnte nicht nachgewiesen werden, so dass sowohl die Membranfusion als auch die Konformationsänderung des S-Proteins unabhängig von der proteolytischen Aktivierung zu sein scheint (Follis et al., 2006; Simmons et al., 2004). Im Laufe der Infektion eines Wirtsorganismus induziert das S-Protein die Bildung neutralisierender Antikörper, die bei der passiven Immunisierung eine entscheidende Rolle spielen (Traggiai et al., 2004). Nach rekombinanter Expression reichert sich das S-Protein des IBV und des TGEV vollständig im perinukleären Raum an (Lontok et al., 2004; Schwegmann-Wessels et al., 2004). Das S-Protein des SARS-CoV kann hingegen an der Plasmamembran S-exprimierender Zellen detektiert werden (McBride et al., 2007; Schwegmann-Wessels et al., 2004; Simmons et al., 2004).

Envelope-Protein (E) - Das E-Protein besteht aus 76 Aminosäuren und ist ein integrales Membranprotein, welches über das ER und den Golgi-Komplex bis an die Plasmamembran infizierter Zellen transportiert wird (Corse & Machamer, 2000; Raamsman et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass das SARS-CoV E-Protein die Membran zweimal durchspannt, sodass die Termini im Zytoplasma lokalisiert sind ($N_{\text{endo}}\text{-}C_{\text{endo}}$ -Topologie). Für einen geringen Anteil der E-Moleküle wird hingegen auch eine Topologie vermutet, bei der der C-Terminus der luminalen Seite bzw. dem extrazellulären Raum und der N-Terminus dem Zytoplasma zugewandt sind ($N_{\text{endo}}\text{-}C_{\text{exo}}$ -Topologie; Yuan et al., 2006). Homooligomere des SARS-CoV E-Proteins sind in der Lage Ionenkanäle zu bilden, deren Bedeutung für den viralen Lebenszyklus jedoch unbekannt ist (Wilson et al., 2004). Obwohl das coronavirale E-Protein nur in geringer Kopienzahl im Viruspartikel vertreten ist, werden ihm bei verschiedenen Coronaviren zentrale Funktionen bei dem Zusammenbau neuer Viren und der Generierung Virus-ähnlicher Partikel (engl.: virus like particles = VLPs) zugeschrieben (Corse & Machamer, 2000; Vennema et al., 1996). Auch für das SARS-CoV E-Protein wurde diese Rolle zunächst postuliert (Mortola & Roy, 2004). Neuere Studien zeigen jedoch, dass ein E-deletiertes rekombinantes SARS-CoV replikationsfähig ist (DeDiego et al., 2007).

Membran-Protein (M) - Das M-Protein der Coronaviren bildet den Hauptbestandteil der viralen Hülle und besitzt somit eine herausragende Stellung im viralen Lebenszyklus. Es interagiert mit allen bis jetzt bekannten Komponenten des Virions und dient somit bei der Assemblierung neuer Viren im ERGIC als „Gerüst“ (de Haan et al., 1998a; de Haan et al., 2000; He et al., 2004b; Narayanan et al., 2000; Nguyen & Hogue, 1997; Opstelten et al., 1995). Bei einigen Coronaviren ist die Koexpression des M- und E-Proteins für die Bildung von VLPs ausreichend (Corse & Machamer, 2000; Vennema et al., 1996). Der Budding-

Prozess des SARS-CoV scheint hingegen durch die Präsenz der beiden viralen Genprodukte M und N determiniert zu werden (Huang et al., 2004b).

Das coronavirale M-Protein ist ein Glykoprotein und lässt sich in drei Domänen unterteilen: eine kurze N-terminale Ektodomäne, drei hydrophobe, transmembranale Segmente und eine lange Endodomäne (Armstrong et al., 1984; Rottier et al., 1986). Eine Ausnahme stellt das TGEV M-Protein dar, dessen C-Terminus sowohl dem Zytoplasma als auch dem ER-Lumen zugewandt sein kann (Risco et al., 1995). Während die M-Proteine der Gruppe 2-Coronaviren an Serin- bzw. Threoninresten des Proteins modifiziert werden (O-Glykosylierung), weisen die M-Proteine der Gruppen 1 und 3 die Glykosylierung von definierten Asparaginresten auf (N-Glykosylierung; de Haan et al., 2003; de Haan et al., 2002). Obwohl das M-Protein des MHV in Pulse-Chase-Analysen nach weniger als drei Stunden überwiegend in glykosylierter Form vorliegt, scheint diese Modifizierung weder einen Einfluss auf die Bildung von VLPs (de Haan et al., 1998a; de Haan et al., 1998b; Klumperman et al., 1994) noch auf die Interaktion mit anderen viralen Proteinen zu besitzen (de Haan et al., 1999; Stern & Sefton, 1982). Nach transienter Einzelexpression bildet das M-Protein des MHV Homooligomere und akkumuliert im Golgi-Komplex (Klumperman et al., 1994; Locker et al., 1995; Rottier & Rose, 1987). Das M-Protein des TGEV und des feline Coronavirus ist hingegen auch an der Oberfläche infizierter Zellen detektierbar (Jacobse-Geels & Horzinek, 1983; Laviada et al., 1990).

Neben den Hauptstrukturproteinen S, E, M und N kodiert das SARS-CoV noch für eine undefinierte Anzahl an zusätzlichen Strukturproteinen, deren Funktion meist unbekannt ist und deren Aminosäuresequenzen keine Ähnlichkeiten mit anderen coronaviralen Proteinen aufweisen (Marra et al., 2003). Für das ORF3a-Protein konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es ebenso wie das M-Protein in die Membran integriert ist und durch die Bildung von Ionenkanälen die Virusfreisetzung fördert (Ito et al., 2005; Lu et al., 2006).

2.6 Zelluläre und virale Membranproteine

2.6.1 Synthese und Topologie von Membranproteinen

Der klassische Syntheseweg für zelluläre und virale Glykoproteine beginnt mit dem zielgerichteten Transport des wachsenden Polypeptids zum ER (Abb. 2). Hierbei spielen hydrophobe Signalpeptide innerhalb des Proteins eine entscheidende Rolle. Die Peptidsequenzen werden von Signalerkennungspartikeln (engl.: signal recognition particle = SRP) gebunden und die entstehenden Komplexe an spezifische Rezeptoren (engl.: SRP receptor) der äußeren ER-Membran angelagert. Das Signalpeptid interagiert dort mit dem Sec61p-Komplex, der eine äußerst dynamische Struktur innerhalb der Membran darstellt und

die kotranslationale Translokation sowie die Membranintegration des Proteins ermöglicht (Rapoport, 1991; Rapoport et al., 1996).

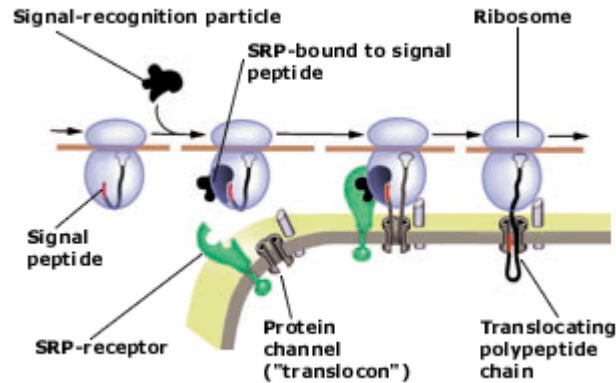


Abbildung 2: Synthese und Insertion eines Proteins in die ER-Membran.

Das Signalpeptid eines an den Ribosomen neusynthetisierten Polypeptids wird durch den Signalerkennungspartikel (SRP) gebunden. Durch die Interaktion mit dem Rezeptor (SRP-Rezeptor) gelangt das Polypeptid in den Proteinkanal (Translokon) und wird kotranslational in die Membran des ER eingebaut (www.nobelprize.org).

Neben dem Signalpeptid des Proteins sind eine Vielzahl an zellulären Faktoren und Komplexen an der Translokation und Membraninsertion beteiligt (Gorlich & Rapoport, 1993). Für Proteine mit mehreren Membrandurchgängen wird angenommen, dass die erste hydrophobe Transmembrandomäne des naszierenden Proteins ausschlaggebend für die Initiation der Translokation und der Verankerung des Proteins in der Membran des ER ist (Hessa et al., 2005; Rapoport, 1991). Die Topologie der wachsenden Polypeptidkette innerhalb der ER-Membran wird von positiven und negativen Ladungen der Aminosäurereste in Nachbarschaft des Transmembranankers bestimmt. Die die Transmembrandomänen flankierenden Proteinsegmente mit der größeren positiven Ladung sind dem Zytoplasma zugewandt - „positive-inside-Regel“ (Goder & Spiess, 2001; von Heijne, 1989). Ob alle folgenden transmembranalen Helices sich alternierend in die Membran einlagern (Blobel, 1980) oder jede einzelne, interne Transmembrandomäne der Ladungsregel folgt (Gafvelin et al., 1997) ist bislang nicht vollständig bekannt. Ferner wird ein Einfluss möglicher Proteinmodifikationen, wie z.B. der Glykosylierung, auf die Stabilität bestimmter Topologien und die Funktion des Proteins diskutiert. Außerdem scheint die Interaktion mit weiteren Proteinen sowohl für die korrekte Topologie als auch für die Faltung des Proteins eine wichtige und oft noch nicht charakterisierte Rolle zu spielen (Goder & Spiess, 2001). Membranproteine werden unabhängig von der Anzahl ihrer Transmembrandomänen in drei Gruppen unterteilt. Die Vertreter der Gruppe I besitzen eine charakteristische spaltbare

Signalsequenz, während diese in den Membranproteinen der Gruppe II und III nicht vorliegt. Unterschieden werden die Vertreter der letzteren beiden Gruppen anhand der Lokalisation ihres jeweiligen N-Terminus im Zytoplasma (Gruppe II) oder im ER-Lumen (Gruppe III). Für das M-Protein des MHV wurde gezeigt, dass es ein typisches Typ III Membranprotein mit einem zytoplasmatischen C-Terminus und einem luminalen N-Terminus (sogenannte „N_{exo}-C_{endo}-Topologie“) darstellt. Die Transmembrandomänen des Proteins generieren jeweils eigenständig ihre Insertion und Membranverankerung (Armstrong et al., 1984; Locker et al., 1992). Das homologe Protein des TGEV zeigt interessanterweise sowohl eine N_{exo}-C_{endo}- als auch eine N_{exo}-C_{exo}-Topologie mit einer N-terminalen Signalsequenz (Kapke et al., 1988; Risco et al., 1995; Risco et al., 1998). Für das SARS-CoV M-Protein ist weder dessen Topologie identifiziert noch der Einfluss kotranslationaler Modifikationen analysiert worden.

2.6.2 Glykosylierung

Die Verknüpfung mit Zuckerresten ist vermutlich die aufwendigste ko- und posttranslationale Modifizierung von Proteinen und beeinflusst sowohl die Faltung und Stabilität als auch die spätere Funktion des neusynthetisierten Proteins (Abe et al., 2004; Helenius & Aebi, 2001; Skehel et al., 1984; Wei et al., 2003). Die Bildung von Glykopeptidbindungen ist in allen lebenden Organismen beschrieben und spiegelt die besondere Bedeutung dieses Prozesses wieder. Es wurden bis zu 16 Enzyme identifiziert, die an der Synthese von mindestens 41 unterschiedlichen Glykopeptidbindungen beteiligt sind (Spiro, 2002). Die Produkte dieser enzymatischen Reaktionen lassen sich in fünf Gruppen unterteilen. Bei der Mehrzahl der eukaryotischen Glykoproteine sind die Zuckerreste entweder mit der Aminogruppe von Asparaginresten (N-Glykosylierung) oder mit der Hydroxylgruppe von Serinen oder Threoninen (O-Glykosylierung) kovalent verknüpft. Über die vor einigen Jahren identifizierte Proteinmodifizierung durch die Übertragung eines α -Mannoserestes auf ein Kohlenstoffatom eines Tryptophans (C-Mannosyl-Verknüpfung) und die Glykosylierung eines Proteins über eine Phosphodiester-Brücke (Phosphoglycosyl-Verknüpfung) ist bis jetzt wenig bekannt. Die Modifizierung mittels Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) hingegen ist sowohl für parasitäre Proteine als auch für Membranproteine höherer Eukaryoten vielfach beschrieben. Hierbei wird ein Mannoserest mit dem Phosphoethanolamin verbunden, welches wiederum die Verbindung zur terminalen Carboxylgruppe des Proteins herstellt. Es wird vermutet, dass die Verknüpfung mit einem GPI-Anker einen Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse ausübt, wie z.B. auf den intrazellulären Transport und die Endozytose von Proteinen von der Plasmamembran (McConville & Ferguson, 1993).

2.6.3 N-Glykosylierung

Die N-Glykosylierung von zellulären und viralen Glykoproteinen ist eine ubiquitäre Proteinmodifikation, die kotranslational im ER stattfindet. Die potentiellen Empfänger der Glykane sind Asparagine innerhalb der Konsensussequenz Asparagin – X – Serin/Threonin, wobei X als Synonym für eine beliebige Aminosäure außer Prolin steht (Welply et al., 1983). Es wird vermutet, dass 90 % aller potentiellen Glykosylierungsstellen genutzt werden, so lange diese den Glykosylierungsenzymen zugänglich sind (Gavel & von Heijne, 1990; Nilsson & von Heijne, 1993; Petrescu et al., 2004).

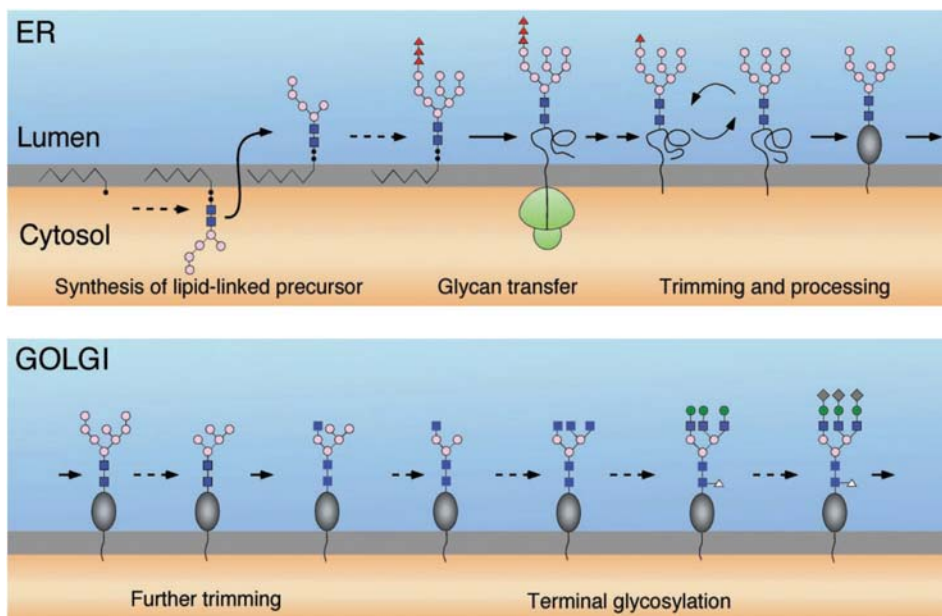


Abbildung 3: N-Glykosylierung von Membranproteinen.

Im ER kommt es ko- und posttranslational zur Übertragung und Modifizierung von Glykanstrukturen an Konsensussequenzen neusynthetisierter Peptidketten. In der schematischen Darstellung ist eine von vielen möglichen terminalen Glykosylierungsschritten im Golgi-Komplex wiedergeben. Mannose (*helle Kreise*); Glukose (*rote Dreiecke*); N-Acetylglucosamin (*blaue Quadrate*); Galaktose (*grüne Kreise*); Sialinsäure (*graue Raute*; Helenius & Aebi, 2001)

Der Biosyntheseweg der N-verknüpften Glykanstrukturen beginnt mit dem Aufbau eines vorwiegend aus Mannoseresten bestehenden Vorläuferoligosaccharides an der zytoplasmatischen Seite der Membran des rauhen ER (Abb. 3). Diese Oligosaccharidstruktur gelangt in das ER-Lumen und wird dort mithilfe des Enzyms Oligosaccharyltransferase auf Asparaginreste einer wachsenden Polypeptidkette übertragen. Die Enzyme Glucosidase I und II und das Enzym ER-Mannosidase katalysieren weitere Prozessierungsschritte, so dass glykosylierte Proteine mit einer mannosereichen Glykanstruktur in den Golgi-Komplex eintreten. In diesem Kompartiment werden Mannose-Moleküle entfernt und N-Acetylglucosamine mit der Oligosaccharidstruktur verknüpft. Die Anwesenheit von zwei N-

Acetylglucosaminen an terminalen Positionen der Oligosaccharidstruktur definiert das Protein als komplex glykosyliert. Diese komplexe Reifung wird durch das Hinzufügen von Galaktose- und Sialinsäure-Molekülen abgeschlossen (Helenius & Aebi, 2001). Die Vielfalt der an der Glykosylierung beteiligten Enzyme lässt eine besondere Bedeutung dieses Prozesses für die Synthese und die spätere Funktion neuer Proteine vermuten. Die N-Glykosylierung viraler Proteine kann neben der Stabilisierung und der Membranintegration auch für dessen intrazelluläre Verteilung und für die Immunantwort des Wirtes entscheidend sein (Laude et al., 1992; Shi & Elliott, 2004; Spiro, 2002; Wei et al., 2003). Für das SARS-CoV M-Protein war vor Beginn dieser Doktorarbeit weder die Glykosylierungsstelle identifiziert noch waren die Auswirkungen der Glykosylierung auf den Transport des Proteins beschrieben worden.

2.6.4 Proteintransport über den sekretorischen Weg

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht vollständig verstanden, wie Membranproteine ihren Weg aus dem ER durch die gestapelte Anordnung von Golgi-Zisternen finden. Es wird vermutet, dass neu synthetisierte Proteine zunächst an spezialisierten Exportregionen der ER-Membran in Vesikeln aufgenommen werden (Nishimura & Balch, 1997; Rothman & Wieland, 1996). Der Membrantransport und die Integration der Membranproteine in spezifische Vesikel (engl.: coat protein complex = COP I und II-Vesikel) wird hierbei von einer Vielzahl zellulärer Faktoren moduliert und kontrolliert, wie z.B. den Rab-GTPasen und SNARE-Komplexen (engl.: soluble NSF attachment receptor = SNARE). Die Vesikel gelangen anschließend in einen tubulären-vesikulären Transportkomplex (ERGIC), der möglicherweise wichtige Funktionen in der Qualitätskontrolle der Proteinfaltung, sowie der Proteinkonzentration und dem -transport ausübt. Innerhalb der Golgi-Zisternen erfahren die Membranproteine oft komplexe Modifizierungen, bevor sie über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) ihr endgültiges Ziel, wie z.B. die Plasmamembran, erreichen (Abb. 4) oder retrograd in das ERGIC oder ER transportiert werden (Byland & Marsh, 2005; Cole et al., 1998). Der komplexe Mechanismus des zielgerichteten Transports eines Membranproteins in definierte zelluläre Organellen ist oft noch nicht bis ins Detail verstanden. Es ist bekannt, dass neben intrinsischen Signalen wie z.B. Peptidsequenzen oder -domänen auch die Bildung von Protein-Homooligomeren für die Retention von Membranproteinen im ER oder Golgi-Komplex ausschlaggebend ist (Jackson et al., 1990; Locker et al., 1995; Weisz et al., 1993). Ein weiteres Model postuliert, dass die Dicke der Lipidschicht des jeweiligen zellulären Kompartimentes für die spezifische Lokalisation integraler Membranproteine entscheidend ist (Bretscher & Munro, 1993).

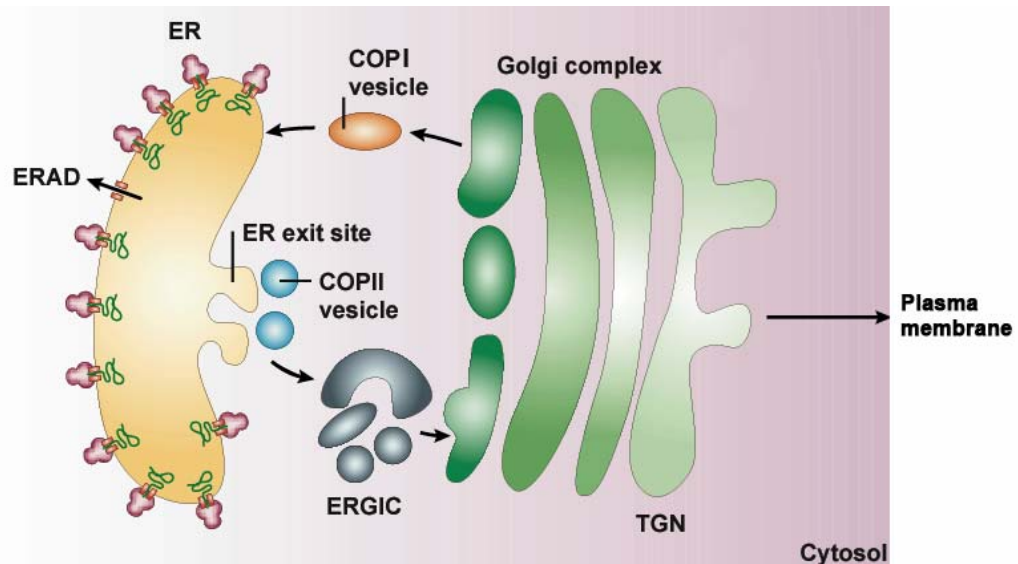


Abbildung 4: Zelluläre Kompartimente des sekretorischen Weges.

Nach der Synthese einer neuen Polypeptidkette am rauhen ER entscheidet die korrekte Faltung des Proteins über den proteasomalen Abbau im Zytoplasma oder den Eintritt in den sekretorischen Weg. Gefaltete Proteine gelangen über spezifische Export-Regionen in Transportvesikel, durch die sie zunächst zum ERGIC und Golgi-Komplex und dann über das Trans-Golgi-Netzwerk an die Oberfläche der Zelle gelangen. ERAD = ER-assoziiierter Abbau (Abbildung modifiziert aus (Eilgaard & Helenius, 2003))

Für den viralen Lebenszyklus ist die Anreicherung der viralen Strukturkomponenten am Ort der Virusmorphogenese essentiell. Bei den M-Proteinen der Coronaviren MHV und IBV sind hydrophobe Transmembrandomänen für deren vollständige Retention im Golgi-Komplex verantwortlich (Armstrong & Patel, 1991; Klumperman et al., 1994; Locker et al., 1994; Swift & Machamer, 1991). Diese Lokalisation stimmt jedoch nicht mit dem Ort der Virusfreisetzung neuer Coronaviren überein, die im ERGIC stattfindet. Dies macht deutlich, dass weitere virale Proteine benötigt werden, um das M-Protein zur Ausschleusungsstelle zu rekrutieren und den Zusammenbau neuer Viren zu initiieren. Auch der Transport zur Zelloberfläche ist für viele virale Proteine, wie z.B. für die M-Proteine des TGEV und des feline Coronavirus, beschrieben (Jacobse-Geels & Horzinek, 1983; Laviada et al., 1990). Während einige virale Membranproteine von der Plasmamembran in den Überstand abgegeben werden, gelangen andere durch Re-Endozytose in das endosomale Kompartiment und werden von dort weiter verteilt (Huang et al., 2006; Li et al., 1995; Marie et al., 2004; Radsak et al., 1996; Tirabassi & Enquist, 1998, 1999). Die Re-Endozytose wird meist durch die Interaktion spezifischer Tyrosin- oder Di-Leucin-Motive im zytoplasmatischen Bereich des viralen Proteins mit der Clathrin-vermittelten Endozytosemaschinerie induziert und besitzt wichtige Funktionen im viralen Replikationszyklus und der Regulation der Immunantwort des Wirtes (Bonifacino & Dell'Angelica, 1999; Bonifacino & Traub, 2003; Marks et al., 1996; Marsh & Pelchen-Matthews, 2000; Radsak et al., 1996).

2.7 Fragestellung

Die besondere humanpathogene Relevanz der in den letzten Jahren neu identifizierten Coronaviren (HCoV-HKU1, HCoV-NL63 und SARS-CoV) führte zu einer ungewöhnlich schnellen molekularbiologischen und proteinbiochemischen Charakterisierung der Erreger. Frühere Studien an dem gut untersuchten MHV waren hierbei von großem Wert, da diese wichtige Vergleichsdaten und experimentelle Ansätze lieferten. Obwohl das SARS-CoV eine für die Virusfamilie charakteristische Genomorganisation besitzt, weist die Aminosäuresequenz der viralen Strukturproteine nur eine geringe Homologie von 30 % auf (Stadler et al., 2003).

Das M-Protein des SARS-CoV ist die am stärksten vertretene Strukturkomponente der Virushülle. Von anderen Coronaviren ist bekannt, dass das M-Protein eine entscheidende Rolle im viralen Vermehrungszyklus spielt, indem es den Zusammenbau neuer viraler Partikel dirigiert (de Haan et al., 1998a; de Haan et al., 2000; Nguyen & Hogue, 1997; Opstelten et al., 1995). Über die Membrantopologie, die ko- und posttranslationalen Modifikationen und den Transport des SARS-CoV M-Proteins ist bislang nur wenig bekannt. Ziel dieser Doktorarbeit war es daher mithilfe eines spezifischen humanen monoklonalen Antikörpers und durch den Einsatz von Substitutionsmutanten des M-Proteins potentielle Proteinmodifizierungen zu untersuchen. Des Weiteren sollte die Membranintegration analysiert und die Determinanten der intrazellulären Verteilung und des Transports des M-Proteins aufgeklärt werden. Außerdem war es von Interesse, die Interaktion des M- und S-Proteins zu untersuchen, die möglicherweise die Lokalisation des S-Proteins beeinflusst (McBride et al., 2007; Schwegmann-Wessels et al., 2004; Simmons et al., 2004).

3 Material

3.1 Geräte

Biofuge 13	Heraeus Sepatech
Bio-Imager Analyzer BAS-1000	Fuji
Branson Sonifier 450	Heinemann
Brutschrank 6000	Heraeus Instruments
Elektroporator Gene pulser Xcell	Biorad
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Geiger-Müller-Zähler	Berthold
GelDoc 2000	Biorad
Genequant II DNA / RNA Calculator	Amersham Pharmacia Biotech
Horizontalschüttler HS 250 Basis	IKA Labortechnik
J2 21 Zentrifuge	Beckmann
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Laser-scanning Mikroskop 510 Meta	Zeiss
LiCor Odyssey Infrared Imaging System	Biosciences
Light Cycler 2.0	Roche
Liquid Scintillation System LS1801	Beckmann
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCO	IKA Labortechnik
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments
Metallblockthermostat TCS	Lab Tech Barkey
Minifuge RF	Heraeus Sepatech
pH-Meter CG 832	Schott Laborgeräte
Pipetus® Akku	Hirschmann Laborgeräte
Power Supply EV231	Consort
Primus Thermocycler	MWG Biotech
Protean II Gelkammer	Biorad
Research®-Pipetten (0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100- 1.000 µl)	Eppendorf
Sequenzierer MegaBACE 500 DNA	Amersham Pharmacia Biotech
Analysis System	
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Spot Kamera, Version 3.1.2	Diagnostic Instruments
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge 5145	Eppendorf
Transmissionselektronenmikroskop 109	Zeiss
Überkopffrotierer	Heidolph Instruments
UV-Schirm 302 nm	Bachofer
Vakuum-Geltrockner	von Keutz
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments

3.2 Chemikalien

Aceton	Merck Eurolab
Agarose, ultrarein	Gibco BRL

Agarose, NA	Amersham Pharmacia Biotech
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Bromphenolblau (BPB)	Serva
1, 4 Diazabicyclo-[2.2.2]-oktan (DABCO)	Sigma
DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich
Deconex	Bohrer Chemie
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Eurolab
Dinatriummethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Biorad
Epon	Roth
Essigsäure (HAc)	Riedel-de-Haën
Ethanol (abs.) EtOH	Riedel-de-Haën
Ethidiumbromid	Roche
Fluoprep	bioMérieux
Formaldehyd min 37 %	Merck Eurolab
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche
Geneticin (50 mg/ml)	Gibco BRL
L-Glutamin 200 mM (100×)	Gibco BRL
Glycerol	Gibco BRL
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Merck Eurolab
Kristallviolett	Roth
Lipofectamine™ Plus	Invitrogen
Magermilchpulver	Töpfer
β-Mercaptoethanol	Serva
Methanol (MeOH)	Riedel-de-Haën
Natriumacetat (NaOAc)	Merck Eurolab
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck Eurolab
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Eurolab
N(onidet)P40	Amersham Pharmacia Biotech
Osmiumtetroxid	Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Eurolab
Plaque-Agarose	Biozym
Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco BRL
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche
Plus™-Reagenz	Invitrogen
Polyacrylamid-Lösung (29:1)	Biorad
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich
rotiphorese® Gel 30	Roth
Sephadex® G-50 Superfine	Amersham Pharmacia Biotech
N, N, N', N', -	Biorad
Tetramethylethylethylendiamin (TEMED)	
Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Base)	Roth
Triton X-100	Serva
Tween 20	Serva

3.3 Verbrauchsmaterialien

4-Kammer-Objektträger	Nalge Nunc
5 cm-Zellkulturplatten	Greiner
6 well-Zellkulturplatten	Greiner
25 cm ² Zellkulturflaschen	Costar
75 cm ² Zellkulturflaschen	Costar
Bio-Image Screen: Imaging plate 2040S	Fuji
Blottingpapier GB 002 (Whatman 3MM)	Whatman
Glaskapillaren für Light Cycler	Roche
Gewebekulturröhrchen (Polystyrol)	Greiner
Immobilon™ P, PVDF-Membran	Millipore
Kapillarspitzen 200 µl	Biozym Diagnostik
Nitrozellulose Membran Protran	Whatman® Schleicher & Schuell
Objektträger	Menzel
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
PCR-tubes, 0,2 ml	Biozym
Petrischalen	Greiner
Pipetten 2 + 10 ml, Cellstar® bio-one	Greiner
Pipetten 5 ml, serological pipette	Sarstedt
Pipettenspitzen, oberflächenoptimiert	Nerbe Plus
Polypropylen-Reaktionsgefäße	Greiner
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf
Präzisions-Küvetten aus Quarzglas	Hellma
Röntgenfilme (Biomax™ MR)	Kodak
Zellschaber	Sarstedt

3.4 Kits

E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab
DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit	Amersham Pharmacia Biotech
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Mikrosomale Membranen	Promega
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen
SuperSignal Ultra® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kit	Promega

3.5 Puffer und Lösungen

3.5.1 Puffer

Blockierungspuffer für Immunfluoreszenzanalysen	2 % 5 % 0,2 % 0,05 % in	BSA Glycerol Tween 20 NaN ₃ PBSdef
Blockierungspuffer für Western Blot-Analysen	10 g ad 100 ml	Magermilchpulver PBSdef
6 x DNA-Probenpuffer	0,25 % 40 % 10 %	Bromphenolblau Saccharose Glycerol
HEPES-Puffer	50 mM 100 mM 1 mM 1 %	HEPES NaCl β-Mercaptoethanol NP40
KoIP-Puffer (Koimmunpräzipitations-Puffer)	20 mM 100 mM 5 mM 1 % 1 mM 1 mM 1 mM	Tris/HCl, pH 7,6 NaCl EDTA NP40 PMSF DTT PMSF
PBSdef, pH 7,5 (Phosphatpuffer deficient)	8 g 0,2 g 1,15 g 0,2 g ad 1 l	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ dH ₂ O
10 × Proteingellaufpuffer	10 g 30 g 250 g ad 1 l	SDS Tris-Base Glycin dH ₂ O
4 × Proteinprobenpuffer	10 ml 10 ml 15 ml 12,5 ml 1,25 ml ad 50 ml	Glycin β-Mercaptoethanol 40 % SDS 3 M Tris-Base gesättigte BPB-Lösung in dH ₂ O dH ₂ O
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	2,5 ml 0,1 ml	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 10 % SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	2,5 ml 0,1 ml	2,5 M Tris/HCl, pH 8,8 10 % SDS

Stripping-Puffer für Western- Blot	62,5 mM 2 % 682 µl	Tris/HCl pH 6,8 SDS Mercaptoethanol auf 100 ml
50 × TAE, pH 8,0	242 g 57,1 g 100 ml ad 1 l	Tris-Base Essigsäure 0,5 M EDTA, pH 8,0 dH ₂ O
10 × TBE, pH 8,0	108 g 55 g 40 ml ad 1 l	Tris-Base Borsäure 0,5 M EDTA, pH 8,0 dH ₂ O
Transferpuffer, alkalisch	3 M 8 mM	NaCl NaOH
Tris/KCl-Puffer	10 mM 150 mM 0,1 % 3 %	Tris/HCl, pH 8,0 KCl NP40 BSA
Western Blot-Antikörper- Verdünnungspuffer	1 % 0,1 % in	Magermilchpulver Tween 20 PBSdef

3.5.2 Lösungen

Ampicillin-Stammlösung	100 mg ad 1 ml	Ampicillin dH ₂ O
Fixierer/Entfärber für Proteingele	300 ml 100 ml 600 ml	Ethanol Essigsäure dH ₂ O
100 mM PMSF	360 mg ad 21 ml	PMSF Isopropanol
10 % SDS	100 g ad 1 l	SDS H ₂ O

3.6 Wachstumsmedien

3.6.1 Wachstumsmedien für Bakterien

LB-Agar (1,5 %)	3,75 g ad 250 ml	Bacto-Agar LB-Medium
LB-Medium	10 g 5 g 10 g ad 1 l	NaCl Hefeextrakt Pepton dH ₂ O

3.6.2 Wachstumsmedien für Säugerzellen

BHK-21 Medium		Gibco BRL
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)		Gibco BRL
Fetales Kälberserum (FCS)		Gibco BRL
Opti-MEM® I		Gibco BRL
Trypsin/EDTA		Gibco BRL
DMEM(+++)	500 ml 50 ml 5 ml 5 ml	DMEM FCS (Fetales Kälberserum) L-Glutamin 200 mM (100x) Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml
DMEM(++)	500 ml 5 ml 5 ml	DMEM L-Glutamin 200 mM (100x) Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml

3.7 Nukleinsäuren und Nukleotide

3.7.1 Nukleinsäuren

DNA Größenmarker III (λ -DNA EcoRI, HindIII verdaut)	Roche
1 kB DNA Ladder, 500 – 1002 bp	New England Biolabs
100 bp DNA Ladder, 100 – 1517 bp	New England Biolabs
MassRuler™ DNA-ladder High range	MBI-Fermentas

3.7.2 Nukleotide

dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat	10 mM	New England Biolabs
dCTP	2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat	10 mM	New England Biolabs
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat	10 mM	New England Biolabs
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat	10 mM	New England Biolabs

3.7.3 DNA-Oligonukleotide

alle Primer wurden von Invitrogen synthetisiert (Orientierung 5'→3')

SARS-CoV-spezifische Vorwärtsprimer

Nr.	Name	Sequenz
1311	NCoV EcoFlag f	CAGGAATTCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGTCTG ATAATGGACCCCAA
1551	SARS E Eco f	CCGGAATTCATGTACTCATTTCGTTTCGGAAGAAACAGG
1722	SARS-M EcoRI fw	CGGAATTCATGGCAGACAACGGTACTATTACCG
1872	M-NFlag fw	CCGGAATTCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGCA GACAACGGTACTATTACCGTTG
1976	M N4Q NFlag	CCGGAATTCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGCA GACCAAGGTACTATTACCG
2028	mut M glyco site aa185	GGAGCGTCGCAGCGTAACGGCACTGATTCAGGT
2038	mut M glyco site aa205	GGAAACTATAAAAACAATACAGACCACGCCG
2078	M N4Q EcoRI fw	CATGGGAATTCATGGCAGACCAAGGTACTATTACCG
2090	M glyco aa72 fw	GCTGTTGTCTACAGAAATAATTTCGGTGACTGGCGGGATTG
2111	M N4Q inf clone fw	GCTTATCATGGCAGACCAAGGTACTATTACCG
2139	SARS-M epitope- S30 fw	TACGCATACAACCGCTACCGTATTGGAAACTATAAATTA TACAAC TATTAAGGACCTGGACTACAAGGAC

SARS-CoV-spezifische Rückwärtsprimer

1420	CoV N Bam rev	CGAGGATCCTTATGCCTGAGTTGAATCAGCAGAAG
1723	SARS-M BanHI rev	CGAGGATCCTTACTGTACTAGCAAAGCAATATTG
1829	M 1-107 rev	CGAGGATCCTTATGAGCGGGTACGAGC
1873	M-CFlag 1-134 rev	CGAGGATCCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTTCC ATGAGCGGTCTGGTCAC
1874	M-CFlag 1-159 rev	CGAGGATCCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGTCA CAGCGCCCTAGGGAGTG
1875	M-Cflag 1-189 rev	CGAGGATCCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCATCA GTGCCTACACGCTGCGAC
1880	M-CFlag rev	CGAGGATCCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCTGT ACTAGCAAAGCAATATTGTTCGTTGC
2009	E CFlag BamHI rev	CGAGGATCCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGACC AGAAGATCAGGAACTCC
2029	mut M glyco site aa185 rev	ACCTGAATCAGTGCCGTTACGCTGCGACGCTCC
2039	mut M glyco site aa205 rev	CGGCGTGGTCTGTATTGTTTTTATAGTTTCC
2040	M-CFlag 1-196 rev	CGAGGATCCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTAGTTG TATGCAGCAAACCTGAATCAGTGCC
2041	M-CFlag 1-212 rev	CGAGGATCCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGCTA CCGGCGTGGTCTGTATTTAATTTATAG
2042	M-CFlag 1-207 rev	CGAGGATCCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTGTAT TTAATTTATAGTTTCCAATACGGTAGCGG
2043	M-CFlag 1-201 rev	CGAGGATCCTTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCTCCA ATACGGTAGCGGTTGTATGCAGC
2079	M N4Q BamHI rev	CGGTAATAGTACCTTGGTCTGCCATGAATCCCATG
2091	M glycol aa72 rev	CAATCCC GCCAGTCACCGAATTATTTCTGTAGACAACAGC
2112	M N4Q inf clone rev	CGGTAATAGTACCTTGGTCTGCCATGATAAGC
2140	SARS-M epitope- Flag rev	CTCTTTTGGCTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCAGGTCC TTAATAGTTGTATTTAATTTATAGTTTCC

pAd-GFP N	pAdTrack N _N + pAdEasy1	Rekombination in BJ5183- AD1-Zellen
pAd-GFP E _C	pAdTrack E _C + pAdEasy1	Rekombination in BJ5183- AD1-Zellen
pAd-GFP M _N	pAdTrack M _N + pAdEasy1	Rekombination in BJ5183- AD1-Zellen
pAd-GFP M _{N4Q N}	pAdTrack M _{N4Q N} + pAdEasy1	Rekombination in BJ5183- AD1-Zellen
pAd-GFP M _{107 N}	pAdTrack M _{107 N} + pAdEasy1	Rekombination in BJ5183- AD1-Zellen

3.7.6 Vektoren (Marker zellulärer Kompartimente)

pECFP-Endo	Endozytierte Vesikel	LivingColors, Clontech
pECFP-ER	Endoplasmatisches Retikulum	LivingColors, Clontech
pECFP-Golgi	Trans-mediale Golgi-Region	LivingColors, Clontech

3.8 Proteine

3.8.1 Enzyme

Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal Phosphatase (CIP; 10 U/μl)	New England Biolabs
Endo H	New England Biolabs
PNGase F	New England Biolabs
Proteinase K	Fermentas
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNase A	Qiagen
SAWADY PWO DNA-Polymerase (1 U/μl)	Peqlab Biotechnologie
T4 DNA Ligase (4 U / μl)	New England Biolabs
PfuTurboTM DNA-Polymerase (2.5 U/μl)	Stratagene

3.8.2 Primäre Antikörper

α-Flag [®] M2 monoklonaler AK	Sigma-Aldrich
α-Flag [®] polyklonaler AK aus dem Kaninchen	Sigma-Aldrich
α-M humaner monoklonaler AK S30	Institut für Virologie, Marburg
SARS-CoV Serum "Leong" (Human) 01.04.2003	Institut für Virologie, Marburg
α-S polyklonaler AK S1S2 aus dem Kaninchen	Institut für Virologie, Marburg
α-ERGIC-53 (G1/93)	Alexis
α-Giantin (G1/133)	Alexis

3.10.2 Eukaryotische Zellen

BHK21-T7	Nierenzelllinie des syrischen Goldhamsters mit stabiler Expression der T7 RNA-Polymerase
FRHK4	Fötale Epithelzelllinie aus der Niere des Rhesusaffen
HEK 293	Humane embryonale Nierenzelllinie transformiert mit adenoviraler (Ad5)–DNA
HeLa	Humane Zervixkarzinomzelllinie
HER 911	Humane Retinazelllinie
Huh7-Zellen	humane Hepatomazelllinie
Vero-Zellen	Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze

3.10.3 Viren

SARS-CoV (Frankfurt)	Institut für Virologie, Marburg
rek. wt SARS-CoV	Bernhard-Nocht Institut, Hamburg
rek. M _{N4Q} SARS-CoV	Bernhard-Nocht Institut, Hamburg

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen durch Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro*. Der hierfür notwendige Vorwärts- und Rückwärts-Primer besteht aus 15 bis 25 Nukleotiden, die das 5'- bzw. das 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments definieren. Entsprechend der Klonierungsstrategie können die Primer im 5'-Bereich zusätzliche Sequenzen für Schnittstellen von Restriktionsenzymen enthalten.

Ein Reaktionszyklus besteht aus drei verschiedenen Temperaturstufen. Zuerst wird die doppelsträngige DNA-Matrize durch Erhitzen (*Denaturierung*) in Einzelstränge überführt. Anschließend wird der Reaktionsansatz auf eine durch die Basensequenz der Primer festgelegte Temperatur abgekühlt, damit diese an die komplementären Sequenzabschnitte der einzelsträngigen DNA-Matrize binden können (*Annealing*). Nach Hybridisierung der Primer erfolgt ausgehend vom 3'-Ende des jeweiligen Primers die Synthese des Doppelstranges (*Extension*). Hierzu wird die Temperatur auf das Aktivitätsoptimum der hitzestabilen Pwo DNA Polymerase erhöht, die neben ihrer Polymeraseaktivität über eine Korrekturlesefunktion (3'-5'-Exonukleaseaktivität) verfügt. Der Reaktionszyklus wird mehrfach wiederholt, wobei die zu amplifizierende DNA im Reaktionsgemisch exponentiell angereichert wird.

Die beiden Reaktionsansätze werden auf Eis angesetzt und erst kurz vor der eigentlichen PCR-Reaktion zusammengefügt, um unspezifische Amplifikate zu verhindern.

Ansatz A:	40 ng	DNA
	30 pmol	Vorwärts-Primer
	30 pmol	Rückwärts-Primer
	je 1 µl	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	ad 50 µl	dH ₂ O
Ansatz B:	10 µl	10x PCR Puffer (20 mM MgSO ₄)
	1 µl	Pwo DNA Polymerase (1 U/µl)
	ad 50 µl	dH ₂ O

4.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Punktmutationen, Deletionen und Insertionen können mittels *in vitro*-Mutagenese in Plasmid-DNA eingebracht werden. Diese Methode basiert auf einer PCR mit spezifischen, zueinander komplementären Primern, die die gewünschte Mutation enthalten. Die Amplifikation erfolgt

mithilfe der rekombinanten PfuTurbo DNA Polymerase. Anschließend wird der Ansatz mit 1 µl der Restriktionsendonuklease DpnI versetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das methylierte Template wird enzymatisch verdaut und die neu synthetisierten, nicht methylierten Amplifikate können für folgende Analysen verwendet werden.

Ansatz:	10 ng	DNA
	100 pmol	Vorwärts-Primer
	100 pmol	Rückwärts-Primer
	je 1 µl	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	10 µl	10 x PCR Puffer (20 mM MgSO ₄)
	ad 99 µl	dH ₂ O
	1 µl	PfuTurbo [®] DNA Polymerase (2.5 U/µl)

Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1	95 °C	30 sec
Denaturierung	16	95 °C	30 sec
Annealing		55 °C	1 min
Synthese		68 °C	2 min/kb Plasmidlänge

4.1.3 Quantitative Echtzeit-RT-PCR (engl.: real-time RT-PCR)

Für die quantitative Bestimmung viraler Genom-Kopien im Überstand SARS-CoV infizierter Zellen wurde das Prinzip der Echtzeit-RT-PCR verwendet. Diese Methode beruht auf der Amplifikation von Nukleinsäuren mittels herkömmlicher RT-PCR und zusätzlicher Quantifizierung der Amplifikate. Die Amplifikation der Proben erfolgt hier in Glaskapillaren, die ein günstiges Oberfläche-Volumen Verhältnis besitzen und somit schnelle Temperaturänderungen ermöglichen. Der verwendete Enzym-Mix beinhaltet neben der Reversen Transkriptase auch die DNA-Polymerase, sodass die cDNA-Synthese und die Amplifikation des viralen Polymerase-Gens mittels PCR direkt aufeinanderfolgend in einem Reaktionsgefäß stattfinden kann (engl.: One-step-RT-PCR). Durch Zugabe einer fluoreszierenden sequenzspezifischen Sonde ist es möglich, die Entstehung der Produkte in Echtzeit zu verfolgen und in Anlehnung an einen Standard zu quantifizieren (quantitative Echtzeit-RT-PCR). Ein typischer Amplifikationszyklus dauert maximal 60 Sekunden, so dass eine komplette Amplifikationsreaktion von 30 Zyklen ca. 30 Minuten dauert.

Ansatz:	5 µl	Gereinigte RNA (4.1.7)
	12,5 µl	10 x SPL Reaktionspuffer
	1,2 µl	50 mM MgSO ₄
	1µl	10 x BSA (1 mg/ml)
	0,5 µl	Vorwärtsprimer („TMSAR S1“)
	0,5 µl	Rückwärtsprimer („TMSARA S2“)
	0,6 µl	Sonde („TMSARP1“)
	0,6 µl	Superscript II/ Platinum Taq Mix
	3,1 µl	H ₂ O

Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
cDNA-Synthese	1	45 °C	15 min
Denaturierung	1	95 °C	3 min
Denaturierung	40	95 °C	15 sec
Synthese		60 °C	45 sec

4.1.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung lässt sich in einer Quarzküvette photometrisch bestimmen. Die Optische Dichte (OD) der Lösung ist bei der Wellenlänge 260 nm direkt proportional zu ihrem Nukleinsäuregehalt.

Konzentration = Absorption bei 260 nm x Faktor x Verdünnung in H₂O

Faktor für dsDNA = 50 µg / ml bzw. Faktor für ssDNA oder RNA = 40 µg / ml

Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung lässt sich durch die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm abschätzen. Reine Lösungen besitzen einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert von 1,8. Durch Proteinkontaminationen ergeben sich kleinerer Werte, wobei Verunreinigungen durch Phenol oder RNA in einem deutlich höheren Quotienten resultieren.

4.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Agarosegel: 1 – 1,5 % (w/v) Agarose NA in 1 x TAE-Puffer

Laufpuffer: 1 x TAE-Puffer, pH 8,0

Zunächst werden die zu analysierenden Proben mit 6 x Probenpuffer versetzt. Dieser Auftragspuffer erhöht die Dichte der DNA-Probe und erleichtert somit das Beladen der

Geltaschen. Zur Größenbestimmung wird ein DNA-Längenstandard auf dem Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 – 120 mA. Anschließend wird das Gel für 20 Minuten in wässriger Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert. Mithilfe des Geldokumentationssystems GelDoc2000 bzw. einer Exposition des Gels unter UV-Licht der Wellenlängen 302 nm wird die DNA sichtbar gemacht.

4.1.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus präparativen DNA-Agarosegelen erfolgt mithilfe des QIAquick® Gel Extraktionskits entsprechend der Herstellerangaben. Die DNA wird nach Reinigung über eine Säulenmatrix in 35 µl dH₂O eluiert.

4.1.7 Isolierung von viraler RNA aus dem Überstand SARS-CoV infizierter Zellen

Zur Extraktion viraler RNA werden 140 µl Zellüberstand von SARS-CoV infizierten Zellen (MOI 0,05) mit 560 µl AVL-Puffer (inklusive Carrier RNA, die eine mögliche Degradation der RNA verhindern soll) aus dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit versetzt. Nach Zugabe von 100 %igem Ethanol werden die Proben über eine Säule gereinigt, in 60 µl erwärmten Elutionspuffer aufgenommen und die Anzahl viraler Genomkopien mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt (4.1.3).

4.1.8 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA-Moleküle können mithilfe von Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungsstellen gespalten werden. Der Restriktionsansatz wird, je nach verwendetem Enzym, mit 10 x BSA (1 mg/ml) komplementiert und beim jeweiligen Temperaturoptimum für eine Stunde inkubiert.

Ansatz für analytischen Verdau:	0,5 µg	DNA
	1 µl	10 x Puffer (nukleasespezifisch)
	1 µl	10 x BSA, falls erforderlich
	1 U	Restriktionsendonuklease
	ad 10 µl	dH ₂ O

Ansatz für präparativen Verdau:	5 µg	DNA
	5 µl	10 x Puffer (nukleasespezifisch)
	5 µl	10 x BSA, falls erforderlich
	5 U	Restriktionsendonuklease
	ad 50 µl	dH ₂ O

Die DNA kann gleichzeitig mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten werden, sofern diese hinsichtlich der Temperatur- und Reaktionsbedingungen kompatibel sind. Um für weitere Reaktionen störende Enzym- und Pufferrückstände zu entfernen bzw. die DNA mit der spezifischen Größe zu isolieren, wird der Restriktionsansatz über ein DNA-Agarosegel aufgereinigt und die DNA in 50 µl dH₂O eluiert (4.1.5, 4.1.6).

4.1.9 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Zur Vermeidung einer Religation oder Oligomerisierung von Vektoren, die nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen kompatible Enden besitzen, werden die Phosphate des 5'-Endes der linearisierten Plasmide durch eine alkalische Phosphatase (engl.: calf intestine phosphatase, CIP) entfernt. Dazu wird dem Restriktionsansatz 1 µl CIP (10 U/µl) zugesetzt und für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Die DNA wird anschließend gereinigt (4.1.10).

4.1.10 Reinigung von DNA-Fragmenten

Saubere Nukleinsäurepräparationen sind für molekularbiologische Experimente essentiell. Verunreinigungen wie Phenol, Ethanol, Salze, Detergenzien oder Proteine haben einen negativen Einfluss auf nachfolgende Experimente und werden mithilfe des QIAquick® PCR Purification Kits nach Herstellerangaben entfernt. Die DNA adsorbiert hierbei an eine Säulenmatrix und wird in einer entsprechenden Menge dH₂O (30 bis 50 µl) eluiert.

4.1.11 Ethanolfällung von DNA-Fragmenten

DNA lässt sich aus wässriger Lösung durch Zugabe von Natriumacetat und Ethanol präzipitieren.

Ansatz:	1 Vol.	DNA-Lösung
	0,1 Vol.	3 M Natriumacetatlösung
	2,5 Vol.	100 % Ethanol

Die DNA wird durch einen 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 14.000 UpM gefällt und anschließend bei RT getrocknet. Das Pellet wird in einem geeigneten Volumen (z.B. 10 µl dH₂O bei einem eingesetzten DNA-Volumen von 10 µl) gelöst.

4.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verknüpft freie Phosphate und Hydroxylgruppen von DNA-Molekülen durch Bildung einer Phosphodiesterbindung unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP). Auf diese Weise kann z.B. ein DNA-Abschnitt in einen

vorhandenen, „leeren“ Vektor eingebracht werden. Das molare Verhältnis der verschiedenen DNA-Moleküle wird bei der Ligation zu Gunsten des Inserts verschoben.

Ansatz:	20 – 200 ng	verdaute, gereinigte Insert-DNA
	25 – 50 ng	linearisierte, gereinigte Vektor-DNA
	1 µl	10 x Ligationspuffer mit rATP
	0,5 µl	T4 DNA Ligase (4 U/µl)
	ad 10 µl	dH ₂ O

Als Religationskontrolle dient ein Ansatz, bei dem die gereinigte Insert-DNA durch dH₂O ersetzt wurde. Die Ligationsansätze werden für eine Stunde bei RT inkubiert und im Anschluss vollständig in Z-kompetente XL1-Blue-Zellen transformiert (4.1.13). Für die Elektroporation von kompetenten *E. coli* Zellen ist es erforderlich die DNA im Ligationsansatz mittels Ethanolfällung zu reinigen (4.1.11). 1 µl des gelösten Präzipitates wird für die Elektroporation eingesetzt (4.1.14).

4.1.13 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Rekombinante Plasmide werden zur Vermehrung in Bakterienzellen eingeführt. Zur Aufnahme fremder Plasmid-DNA müssen die Zellen zunächst kompetent gemacht werden. Die Bakterien der Wahl werden mit dem Z-Competent *E. coli* Transformation Kit™[®] entsprechend den Herstellerangaben behandelt, aliquotiert und bei –80 °C gelagert. Die aufgetauten Bakterien werden mit der DNA-Lösung (15 µl Ligationsansatz, 10 bis 20 ng Plasmid-DNA) vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Anschließend werden die Ansätze auf selektiven Agarplatten ausgestrichen (Endkonz.: Antibiotikum 100 µg/ml) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.14 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen mittels Elektroporation

Die elektrokompetenten DH 10 B Bakterien (ElectroShox) bzw. BJ5183-AD1 Bakterien werden mit 1 µl gefällter DNA (4.1.11) und 25 µl dH₂O gemischt und kurz auf Eis vorgekühlt. Der Ansatz wird in eine ebenfalls gekühlte Elektroporationsküvette (2 mm) überführt. Die Elektroporation erfolgt mit dem Gene Pulser Xcell System bei 2,2 kV, 200 Ω und 25 µF. Nach dem elektrischen Puls werden 200 µl LB-Medium zugesetzt und die Suspension auf zwei bis drei selektiven Agarplatten ausplattiert (Endkonz.: Antibiotikum 100 µg/ml).

4.1.15 Plasmidpräparationen kleinen Maßstabes

Mit dem E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I werden Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Isolierung von Plasmid-DNA werden einzeln

gewachsene Bakterienkolonien in jeweils 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum (Endkonz.: 100 µg/ml) übertragen und über Nacht auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Hälfte der Bakteriensuspension wird pelletiert, lysiert und die DNA extrahiert. Die Plasmid-DNA bindet an die in einer Säule enthaltene Silikamembran und wird nach mehreren Waschschritten in 50 µl dH₂O eluiert. Zur Überprüfung, ob das durch die Bakterien amplifizierte Plasmid die gewünschten DNA-Sequenzen beinhaltet, werden 2 µl des gewonnenen Eluates mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut und mithilfe eines analytischen DNA-Agarosegels analysiert (4.1.5, 4.1.8).

4.1.16 Plasmidpräparationen großen Maßstabes

Auf der Basis eines positiven Bakterienklons wird unter Verwendung des HiSpeed Plasmid Maxi Kits eine Plasmidpräparation großen Maßstabes angefertigt. Zur Anzucht werden 100 ml antibiotikumhaltiges (Endkonz.: 100 µg/ml) LB-Medium mit 100 µl einer Bakterienkultur des gewünschten Klons inokuliert und bei 37 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die DNA-Extraktion basiert auf einer alkalischen Lyse von Bakterienzellen mit anschließender Adsorption der Plasmid-DNA an eine Anionenaustauscher-Matrix. Nach mehrmaligem Waschen wird die DNA in 700 µl dH₂O aufgenommen und der Konzentrationsgehalt der DNA photometrisch bestimmt (4.1.4).

4.1.17 Herstellung eines infektiösen SARS-CoV cDNA-Klons

Die Klonierung des SARS-CoV Genoms (Isolat Frankfurt 1, Genbank Nr. AY291315) in einen BAC-Vektor unter die Kontrolle eines T7-Promotors wurde von Susanne Pfefferle aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Drosten am Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg durchgeführt (Pfefferle et al., 2007).

4.1.18 Klonierung der rekombinanten adenoviralen Konstrukte

Die Herstellung rekombinanter Adenoviren erfolgt in Anlehnung an das AdEasy-System (Abb. 5; He et al., 1998) und basiert auf der Konstruktion replikationsdefizienter Viren.

Ein detailliertes Protokoll wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Vogelstein (Howard Hughes Medical Institute, USA) unter www.coloncancer.org veröffentlicht und ist in dieser Arbeit unverändert übernommen worden. Zur Klonierung rekombinanter adenoviraler Konstrukte werden zunächst die SARS-CoV Gene der viralen Strukturproteine M, E und N separat über die Restriktionsstellen KpnI und XhoI in einen Shuttle-Vektor (pAdTrack CMV) unter die Kontrolle des Zytomegalievirus (CMV) - Promotors kloniert (4.1.8 - 4.1.15). Die richtige Orientierung des Transgens im Vektor wird anhand einer Sequenzierungsanalyse überprüft. Der Vektor kodiert ebenso für das grünfluoreszierende Protein (GFP), wodurch eine schnelle Evaluation der Transfektions- bzw. Infektionseffizienz möglich ist. Die

Rekombination des Shuttle-Vektors mit dem adenoviralen Plasmid pAdEasy-1, welches das virale Ad5-Genom mit deletiertem E1- und E3-Gen trägt, erfolgt in rekombinationskompetenten BJ5183-AD1 Bakterien, die mit dem pAdEasy-1 Plasmid bereits vortransformiert sind. Es werden 0,5 µg des Shuttle-Vektors (pAdTrack CMV-M_N, M_{N4Q}, M_{aa1-107}, E_C oder N_N) mit dem Restriktionsenzym PmeI linearisiert, mit Ethanol gefällt und in 6 µl dH₂O aufgenommen (4.1.8, 4.1.11).

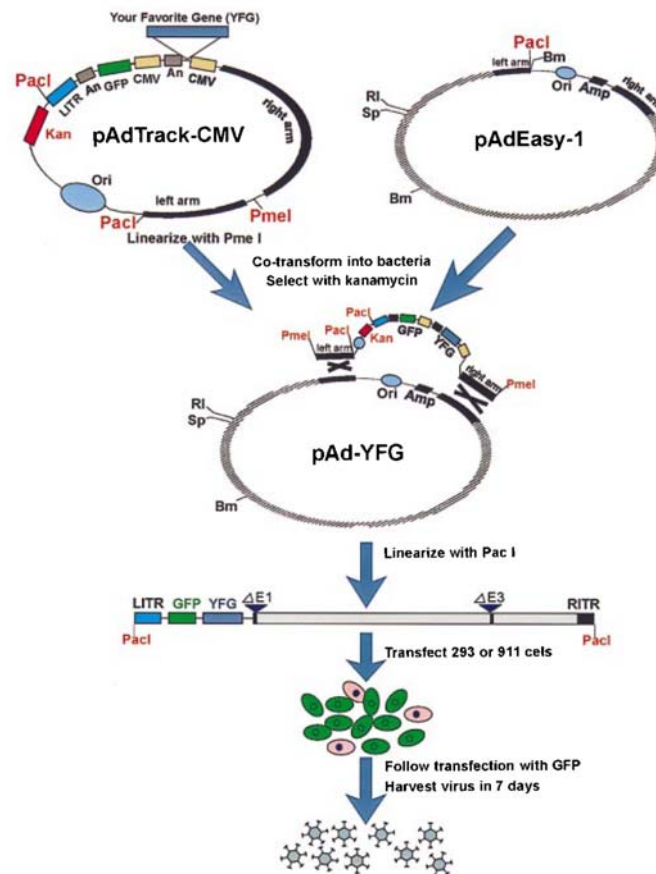


Abbildung 5: Schematische Darstellung des AdEasy-Systems zur Herstellung rekombinanter Adenoviren.

Das gewünschte Gen (YFG engl.: your favorite gene) wird zunächst in einen Shuttle-Vektor (pAdTrack-CMV) unter die Kontrolle des CMV-Promotors kloniert. Durch die Rekombination homologer Sequenzen des Shuttle- und des pAdEasy-1-Vektors in BJ5183-AD1 Zellen entstehen rekombinante adenovirale Konstrukte. Die Transfektion von HEK 293 Zellen mit diesen Plasmiden resultiert in der Produktion rekombinanter Adenoviren. LITR (engl.: left-hand ITR); RITR (engl.: right-hand ITR); An (engl.: polyadenylation site) (He et al., 1998)

Die Rekombination des Shuttle-Vektors mit dem pAdEasy-1 Vektor erfolgt in den BJ5183-AD1 Zellen (4.1.14). Bakterien, die das ca. 36 kbp-große Plasmid tragen, besitzen einen Wachstumsnachteil, sodass am Tag nach der Elektroporation die 20 kleinsten Kolonien von der Agarplatte gepickt und in 3 ml LB-Medium (inklusive Kanamycin) amplifiziert werden. Die

Plasmide werden mithilfe des E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit I gereinigt (4.1.15). Nach erfolgreicher Rekombination besitzt das Plasmid zwei Restriktionsstellen des Enzyms PacI, sodass nach elektrophoretischer Auftrennung ein 4,5 kbp-großes und ein ungefähr 30 kbp-großes Fragment nachzuweisen sind (4.1.5, 4.1.8). Da die BJ5183-AD1 nicht für eine effiziente Vermehrung von Plasmiden ausgelegt sind, werden die positiven rekombinanten Konstrukte in elektrokompente Bakterien (ElectroShox-Zellen) transformiert und amplifiziert (4.1.14, 4.1.15).

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von Vero-, Huh7-, HER 911-, HEK 293- und HeLa-Zellen

Die Zelllinien werden in 75 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und unter CO₂-Begasung (5 %) kultiviert. Die zur Passage von Zellen verwendeten Medien und Substanzen werden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Als Wachstumsmedium wird DMEM(+++) verwendet. Die Passage der Zellen erfolgt unter einer Sicherheitswerkbank im Abstand von drei bis vier Tagen. Der konfluente Zellrasen wird zunächst mit 10 ml PBSdef gewaschen und anschließend zum Ablösen der Zellen mit 2 ml Trypsin/ EDTA für einige Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 8 ml DMEM(+++) wird die Trypsin-Reaktion gestoppt. Die abgelösten Zellen werden durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturflaschen oder -platten ausgesät.

4.2.2 Kultivierung von BHK-T7-Zellen

Baby Hamster Kidney- (BHK-) T7-Zellen werden wie unter 4.2.1 beschrieben kultiviert. Allerdings wird für diese Zelllinie BHK-21-Medium mit 1 mg/ml Geneticin als Wachstumsmedium verwendet. BHK-T7-Zellen sind stabil mit einem für die T7-Polymerase kodierenden Plasmid transfiziert. Geneticin dient als Selektionsmarker der transformierten Zellen.

4.2.3 Transiente Transfektion von BHK-T7-Zellen mit Lipofectamine[®] Plus

Das Transfektionsreagenz Lipofectamine[®] Plus maskiert das negativgeladene Phosphatrückgrat der DNA durch kationische Lipide. Die zu exprimierenden Gene stehen in den pTM1-Vektoren unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Die zusätzliche Bereitstellung der T7-RNA-Polymerase erfolgt durch die Kotransfektion des Plasmides pCAGGS-T7 (Neumann et al., 2002). In diesem Konstrukt steht das T7-Gen unter der Kontrolle des eukaryotischen β -chicken-fibroblast-Promotors (Niwa et al., 1991).

Zur Transfektion einer Zellkulturplatte mit einem Durchmesser von 5 cm werden folgende Komponenten eingesetzt:

Ansatz A:	600 µl Optimem	Ansatz B:	600 µl Optimem
	4 µg DNA		24 µl Lipofectamin®
	1 µg pCAGGS-T7		
	12 µl Plus™-Reagenz		

Nach einer 15-minütigen Inkubation der Ansätze A und B bei RT werden diese vereinigt, gründlich gemischt und nochmals für 15 Minuten bei RT inkubiert. Vor Zugabe des Transfektionsansatzes werden die BHK-T7-Zellen einmal mit Optimem gewaschen und pro well der 6 well-Zellkulturplatte werden 1,5 ml Medium vorgelegt. Es werden 1,2 ml der vereinigten Transfektionslösung zugegeben und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung inkubiert. Nach drei Stunden wird das Transfektionsmedium abgenommen, einmal mit DMEM (+++) gewaschen. Die Zellen werden mit 5 ml dieses Mediums versetzt und für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

4.2.4 Transiente Transfektion von Huh7-Zellen mit Fugene®

Für Immunfluoreszenzanalysen werden Huh7-Zellen auf runden Deckgläschen (12 mm) in 6 well-Zellkulturplatten ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70 % aufweisen. Der lipidbasierte DNA-Transfer mittels Fugene® erfolgt nach Angaben des Herstellers in einem Fugene-DNA Verhältnis von 3:1. Zunächst wird das Fugene-Reagenz in 100 µl Optimem vorgelegt und nach fünfminütiger Inkubation die DNA hinzupipettiert. Pro well werden 2,5 ml Optimem vorgelegt und nach einer weiteren Inkubationszeit von fünf Minuten kann das DNA-Transfektionsreagenz-Gemisch auf die Zellen gegeben werden. Da das Fugene®-Reagenz nicht toxisch für die Zellen ist, kann das DNA-Transfektionsgemisch für längere Inkubationszeiten auf den Zellen verbleiben.

Ansatz:	2 µg	DNA
	0,5 µg	pCAGGS-T7
	6 µl	Fugene

4.2.5 Transiente Transfektion von HER 911- oder HEK 293-Zellen mit Lipofectamine® Plus

Die Transfektion von HER 911- bzw. HEK 293-Zellen mit adenoviralen Konstrukten zur Herstellung rekombinanter Adenoviren erfolgt entsprechend der Transfektion von BHK-T7-Zellen mit dem Lipofectamine® Plus-Reagenz (4.2.3). Um die terminalen Verpackungssignale und die für die virale Replikation essentiellen „inverted terminal repeats“ ITR freizulegen, wird das rekombinante Plasmid mithilfe der Restriktionsendonuklease PacI linearisiert (4.1.8, 4.1.18).

Die Deletion des viralen E1-Gens in den rekombinanten Adenoviren verhindert die Replikation und Produktion infektiöser Virionen in Zellen, die das E1 Protein *in trans* nicht zur Verfügung stellen. Die verwendeten HER 911- und HEK 293-Zellen exprimieren das E1-Protein konstitutiv und kompensieren somit diesen Defekt. Aus diesem Grund kann in diesen Zellen das virale Genom replizieren und das rekombinante Virus amplifiziert werden kann. Für subkonfluente Zellen einer 25 cm²-Zellkulturflasche werden folgende Mengen der einzelnen Komponenten eingesetzt:

Ansatz A:	0,5 ml Optimem	Ansatz B:	0,5 ml Optimem
	4 µg DNA		20 µl Lipofectamin®
	10 µl Plus™-Reagenz		

Die Ansätze A und B werden nach einer 15-minütigen Inkubation vereinigt, gründlich gemischt und nochmals für 15 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen mit Optimem gewaschen und 3 ml Optimem auf die Zellen gegeben. Der Transfektionsansatzes wird nun zum Überstand zugefügt und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung für drei Stunden inkubiert. Das Medium wird abgenommen, die Zellen mit 10 ml DMEM(+++) versetzt und für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

4.2.6 Transiente Transfektion von BHK-T7-Zellen mittels Elektroporation

Zur Herstellung rekombinanter, infektiöser SARS-Coronaviren wird das rekombinante Plasmid *in vitro*-transkribiert und die entstehende RNA mittels Elektroporation in BHK-T7-Zellen übertragen. Hierzu werden konfluente BHK-T7-Zellen in 2 ml Trypsin vom Boden gelöst und mit PBSdef gewaschen. Das Pellet wird in PBSdef aufgenommen und die Zellzahl auf 2×10^7 Zellen pro ml eingestellt. Anschließend werden 10 µg der viralen RNA und 5 µg der RNA des viralen N-Gens mit 400 µl Zellsuspension vermischt und in eine gekühlte 2 mm-Küvette transferiert. Die zweimalige Elektroporation erfolgt im Gene Pulser bei 1,5 kV, 25 µF und $\infty\Omega$. Nach erfolgreicher Durchführung (Zeitkonstante = 0,7 ms) verbleibt die Suspension bei RT für 10 Minuten in der Küvette bevor sie in zwei neue 75 cm²-Zellkulturflaschen überführt wird. Nach 24 Stunden wird der Überstand der transfizierten Zellen auf subkonfluente Vero-Zellen übertragen, die eine effiziente Anzucht des Virus ermöglichen. Nach ca. 1-3 Tagen ist ein durch die rekombinanten SARS-CoV erzeugter zytopathischer Effekt der Zellen zu beobachten. Der Überstand wird abgenommen, aliquotiert und für spätere Studien bei -80 °C gelagert.

4.3 Virologische Methoden

4.3.1 Arbeiten mit SARS-Coronavirus

Alle Arbeiten mit dem SARS-Coronavirus – Isolat FRA (Genbank Nr. AY310120) wurden in einem Sicherheitslabor der Stufe 4 (BSL-4-Labor) am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

4.3.2 Arbeiten mit rekombinantem SARS-Coronavirus

Alle Arbeiten mit rekombinanten SARS-Coronaviren (Isolat Frankfurt 1, Genbank Nr. AY291315) wurden in einem Sicherheitslabor der Stufe 4 (BSL-4-Labor) während eines Forschungsaufenthaltes am Bernhard-Nocht-Institut in Hamburg in Zusammenarbeit mit S. Pfefferle und Prof. C. Drosten im Zeitraum von Juni bis Juli 2007 durchgeführt.

4.3.3 Plaque-Aufreinigung von rekombinantem SARS-CoV

Nach der SARS-CoV Infektion bilden sich aufgrund des zytopathischen Effektes makroskopisch sichtbare Areale lytischer Zellen, sogenannte Plaques, im Zellrasen. Bei ausreichender Verdünnung der Virussuspension kann man davon ausgehen, dass ein virales Partikel einen Plaque generiert. Durch die Isolierung und daran anschließende Amplifikation der in diesem begrenzten Bereich entstandenen Viruspartikel lassen sich mögliche Kontaminationen der generierten Virussuspensionen unterbinden.

Für eine „Plaque-Aufreinigung“ wird zunächst eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} – 10^{-5} einer Virussuspension angesetzt und subkonfluente Vero-Zellen in 6 well-Zellkulturplatten hiermit infiziert. Nach einer Stunde werden die Inokula abgenommen und die Zellen mit 2 ml eines 1:1-Gemisches einer 2 %igen Plaque-Agarose / PBSdef-Lösung und (2 x) DMEM(+++) überschichtet. Etwa drei Tage später sind die Plaques mithilfe eines Lichtmikroskopes sichtbar. Unter der Sicherheitswerkbank wird mit einer sterilen Pipettenspitze in die Agarose oberhalb der Plaques hineingestochen und ein Teil der lytischen Zellen in eine Zellkulturflasche mit frischen Vero-Zellen übertragen. Nach etwa zwei Tagen wird der Überstand der infizierten Zellen abgenommen. Dieser Vorgang der Isolierung und anschließenden Amplifikation des Virus wird zweimal wiederholt.

4.3.4 Titration einer Virussuspension mittels Kristallviolett-Färbung

Zur Bestimmung des Titers einer Virussuspension werden subkonfluente Vero-Zellen in einer 6 well-Zellkulturplatte mit unterschiedlichen Virusverdünnungen in DMEM(++) infiziert. Der Einsatz von Serum-defizientem DMEM soll die Anzahl der Proteine, die um Bindungsstellen auf der Zelloberfläche kompetitieren verringern und eine effiziente Infektion ermöglichen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C werden die einzelnen Inokula abgenommen und die Zellen in DMEM(+++) für zwei weitere Tage inkubiert. Anschließend

werden die Zellen in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 30 Minuten fixiert. Der zytopathische Effekt der Zellen lässt sich durch eine 15-minütige Kristallviolett-Färbung sichtbar machen. Adhärenz, uninfizierte Zellen nehmen den Farbstoff auf, während durch infizierte und sich vom Boden gelöste Zellen ungefärbte Areale entstehen (4.3.3). Die Anzahl der Plaques in den einzelnen Vertiefungen der Zellkulturplatte gibt nach Einbeziehen des Verdünnungsfaktors und des eingesetzten Volumens Auskunft über die *plaque-forming-unit* (PFU)-Konzentration der Virussuspension. Ausgehend von der Annahme, dass ein infektiöser Viruspartikel für die Bildung eines Plaques ausreicht, ist die Einheit PFU ein relatives Maß für die Anzahl infektiöser Partikel. Eine Virusinfektion hängt jedoch von der zufälligen Interaktion von Viruspartikel und Zelle ab. Demnach steigt mit zunehmender Anzahl von infektiösen Partikeln die Wahrscheinlichkeit, dass alle Zellen in der Zellkulturschale infiziert werden. Darauf basierend entstand der Begriff MOI – „multiplicity of infection“, der die Anzahl der Viruspartikel pro Zelle wiedergibt.

4.3.5 Infektion von Zellen mit rekombinantem SARS-CoV

Am Tag vor der Infektion werden Vero- oder FRHK4-Zellen in 6 well-Zellkulturplatten oder 25 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät, sodass sie am Tag der Infektion eine Konfluenz von etwa 80 % aufweisen. Das Medium DMEM(++) wird auf ein minimales Volumen von 1 ml (6 well-Zellkulturplatte) bzw. 3 ml (25 cm²-Zellkulturflasche) reduziert und die Zellen mit der gewünschten MOI infiziert. Nach einer einstündigen Inkubationsdauer bei 37 °C wird das Inokulum entfernt und die Zellen mit frischem DMEM(+++) versetzt.

4.3.6 Ernte von infizierten Zellen für anschließende SDS-PAGE

24 Stunden nach der Infektion werden SARS-CoV infizierte Zellen zunächst in PBSdef aufgenommen und bei 1500 UpM für zwei Minuten pelletiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in ColP lysiert (4.4.1). Zur Virusinaktivierung wird die Suspension mit 1 % SDS (Endkonzentration) versetzt und für folgende Analysen verwendet.

4.3.7 Präparation von infizierten Zellen für elektronenmikroskopische Studien

SARS-CoV- oder Adenovirus-infizierte Zellen werden 24 Stunden nach der Infektion mit PBSdef gewaschen und mit einem Zellschaber vom Boden gelöst (4.3.5, 4.3.9). Die Zellen werden bei 1500 UpM zentrifugiert und das Pellet mit 4 % PFA vorsichtig überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 Stunden bei 4 °C wird der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 % Osmiumtetroxid nachfixiert (unter dem Abzug!). Die Proben werden in Lösungen mit aufsteigenden Ethanol-Konzentrationen dehydriert und das dunkle Zellpellet in eine Kapsel mit einem Epon-Aceton-(1:1)-Gemisch eingebettet. Nachdem

das Gemisch bei 60 °C ausgehärtet ist, können Ultradünnschnitte angefertigt und die Auswertung am Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt werden.

Für eine „Negativ-Färbung“ von viralen Partikeln wird 24 Stunden nach der Infektion der Zellkulturüberstand in einer 37 %igen PFA-Lösung (Endkonzentration: 4 %) und einer 25 %igen Glutaraldehyd-Lösung (Endkonzentration: 0,1 %) aufgenommen und die Viren somit inaktiviert. Die viralen Partikel gelangen durch einen Zentrifugationsschritt in einer Vakuum-Zentrifuge bei 100.000 g auf ein Gitterplättchen. Die Behandlung mit 2 % Phosphotungstic-Säure macht die Partikel mittels Elektronenmikroskopie sichtbar.

4.3.8 Herstellung rekombinanten Adenoviren

Die Bildung rekombinanter Adenoviren kann indirekt über die GFP-Expression verfolgt werden (He et al., 1998). Etwa eine Woche nach der Transfektion der Zielzellen mit dem rekombinanten Adenovirus-Genom sind typische Adenovirus-induzierte Foci zu beobachten, die durch den zytopathischen Effekt replizierender Viren entstehen. Die Zellen werden mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und diese Suspension für 5 Minuten bei 1.500 UpM zentrifugiert. Das Pellet wird in sterilem PBSdef gewaschen und die Zellwände werden durch vier Einfrieren-Auftauen-Zyklen (flüssiger Stickstoff / 37 °C-Wasserbad) aufgebrochen. Die Zelltrümmer werden durch einen hochtourigen Zentrifugationsschritt entfernt und der geklärte Überstand für die Infektion frischer HEK 293-Zellen eingesetzt oder bei -80 °C aliquotiert gelagert. Nach jeder weiteren Amplifikationsrunde erhöht sich der Virustiter um etwa das 10-fache.

4.3.9 Infektion von Zellen mit rekombinanten Adenoviren

Am Tag vor der Infektion werden HeLa- oder Vero-Zellen in 6 well Zellkulturplatten oder Zellkulturflaschen ausgesät, sodass sie am Tag der Infektion eine Konfluenz von ca. 80 % aufweisen. Zunächst werden die Zellen mit sterilem PBSdef gewaschen und anschließend mit der gewünschten MOI in DMEM(++) infiziert. Um eine gleichmäßige Infektion der Zellen zu gewährleisten, werden die Zellen auf der Schwenkplattform im Brutschrank für eine Stunde inkubiert. Danach wird das Inokulum entfernt und gegen DMEM(+++) ersetzt.

4.3.10 Titration einer Adenovirussuspension mittels Immunfluoreszenz

HeLa-Zellen werden am Tag vor der Infektion auf 4-Kammer-Objektträgern zu 50.000 Zellen pro Kammer ausgesät. Zur Infektion der Zellen wird die Virussuspension zunächst 1:100 und 1:10.000 in sterilem PBSdef verdünnt. Die Zellen werden mit je 1 µl bzw. 10 µl der zwei Verdünnungsstufen in DMEM(++) infiziert. Die Objektträger werden für drei Stunden im 37 °C-Brutschrank auf der Schwenkplattform inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit sterilem PBSdef gewaschen und in DMEM(+++) inkubiert. Am nächsten Tag werden die

fixierten und permeabilisierten Zellen gegen das adenovirale E2A-Protein gefärbt und der Anteil der E2A-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl mittels Immunfluoreszenzanalyse bestimmt (DAPI-Färbung).

$$\frac{\text{Anzahl der E2A-positiven Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl}} = \text{Positive Zellen [\%]}$$

$$\frac{\text{Positive Zellen [\%]} \times 50.000 \text{ ausgesäte Zellen}}{100} = \text{Anzahl der infizierten Zellen}$$

$$\text{Titer} = \frac{\text{Anzahl der infizierten Zellen}}{\text{Virussuspension (in ml)} \times \text{Virusverd\u00fcnnung}} = \text{Fluorescence forming unit (ffu) / ml}$$

4.4 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden

4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Zellkultur\u00fcberstand wird 24 Stunden nach der Transfektion vollst\u00e4ndig abgenommen und die Zellen mit PBSdef gewaschen. Anschlie\u00dfend werden die Zellen in 150 \u00b5l CoIP (1 mM DTT, 1 mM PMSF) lysiert und zus\u00e4tzlich mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale gel\u00f6st. Um die zellul\u00e4re DNA zu entfernen wird das Lysat f\u00fcr zwei Minuten sonifiziert und bei 6000 UpM gekl\u00e4rt. Der \u00dcberstand wird bei 4 \u00b0C gelagert bzw. mit SDS-Probenpuffer versetzt. SDS (Natriumdodecylsulfat) \u00fcberdeckt die Eigenladung von Proteinen, so dass negativ geladene SDS-Protein-Komplexe entstehen. Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) k\u00f6nnen Proteine \u00fcber diese unterschiedlichen negativen Ladungen aufgetrennt werden. Das Gelsystem besteht aus einem 4 %igen Sammelgel und einem Trenngel, dessen Prozentigkeit von der Gr\u00f6\u00dfe der aufzutrennenden Proteine abh\u00e4ngt. Die Proteingemische werden mit 4 x Proteinprobenpuffer versetzt und im Fall des SARS-CoV M-Proteins nicht erhitzt aufgetragen. Durch das Mitf\u00fchren von Proteinmarkern lassen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln. Die Gelelektrophorese erfolgt in einer Minigelkammer mit Proteingellaufpuffer bei einer Stromst\u00e4rke von 25 mA pro Gel.

Nach *In vitro*-Translation und SDS-PAGE wird das Gel in Fixierer/Entf\u00e4rber-L\u00f6sung inkubiert, kurz in Wasser gesp\u00fclt und f\u00fcr 30 Minuten auf Whatmann-Papier mithilfe eines Vakuumm-Geltrockners getrocknet. Die Analyse der Signale erfolgt \u00fcber den Bio-Imager.

4.4.2 Elektrotransfer von Proteinen (Western Blot – wet blot-Methode)

Die \u00fcber SDS-PAGE aufgetrennten Proteine k\u00f6nnen spezifisch durch Immunf\u00e4rbung sichtbar gemacht werden. Hierzu ist der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran essentiell. Die einzelnen Komponenten der Western Blot-Analyse wie Blot-Schw\u00e4mme,

Whatman-Papier und Nitrozellulosemembran werden zunächst in Blot-Puffer getränkt. Der Aufbau der Apparatur ist wie folgt:

Anode (+ Pol)
 Blot-Schwamm
 1 x Whatman-Papier
 Nitrozellulosemembran
 SDS-Gel
 1 x Whatman-Papier
 Blot-Schwamm
Katode (- Pol)

Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten des Blots müssen durch vorsichtiges Ausstreichen entfernt werden. Der Transfer erfolgt in der Blot-Kammer bei 60 V für zwei Stunden.

4.4.3 Immunfärbung von Proteinen

Nach dem Elektrotransfer werden unspezifische Proteinbindungsstellen durch eine einstündige Inkubation der Membran in einer 10 %igen Milchpulver/PBSdef-Lösung inkubiert. Im Anschluss wird die Membran kurz in PBSdef gewaschen und für eine Stunde mit einem spezifischen Erstantikörper bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach drei Waschschritten von je zehn Minuten in PBSdef/0,1 % Tween wird die Membran für eine Stunde mit AF680- bzw. IRDye800-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Im Gegensatz zu den traditionellen HRP-gekoppelten Antikörpern sind die hier verwendeten Zweitantikörper mit Infrarotfarbstoffen (Alexa680 oder IRDye800) konjugiert. Um überschüssige und unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen wird die Membran dreimal je zehn Minuten in 0,1 % Tween/PBSdef sowie einmal zehn Minuten mit PBSdef gewaschen. Die Lichtsignale der gebundenen Zweitantikörper lassen sich mithilfe des Odyssey[®] Infrared Imaging Systems über einen langen Zeitraum stabil detektieren und digital dokumentieren.

Verdünnungsverhältnisse der eingesetzten Antikörper in 1 % Milchpulver / PBS-T-Lösung:

α -M S30 monoklonaler Antikörper (Human)	1:10
α -Flag M2 monoklonaler Antikörper (Maus)	1:4000
α -S S1S2 polyklonaler Antikörper (Kaninchen)	1:100
Serum eines SARS-Patienten „Leong“	1:100

4.4.4 Antikörper-Aufnahme Assay – SDS-PAGE

Mithilfe des Antikörper-Aufnahme Assays lässt sich die Internalisierung von Oberflächenproteinen in intrazelluläre Vesikel untersuchen (Haigler et al., 1980; Tan et al., 2004). Zunächst werden transfizierte BHK-T7-Zellen mit einer 1 %igen BSA/PBSdef-Lösung gewaschen, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation der Zellen mit 0,5 ml des α -Flag M2 Antikörpers [2,5 μ g / ml] für 15 Minuten bei 37 °C ermöglicht die Bildung und potentielle Endozytose der Protein-Antikörper Komplexe von der Plasmamembran in das Zytosol. Ein Ansatz wird nur mit PBSdef und ein zweiter mit Essigsäure für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Essigsäurebehandlung entfernt alle oberflächengebundenen Antikörper, wohingegen die internalisierten Protein-Antikörper Komplexe geschützt sind. Es folgen drei Waschschrte mit PBSdef. Die Zellen werden anschließend in 200 μ l CoIP (1 mM PMSF; 1 mM DTT) lysiert, zwei Minuten sonifiziert und der geklärte Überstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt (4.4.1). Zur Trennung der Protein-Antikörper-Komplexe werden die Proben für fünf Minuten bei 96 °C aufgeköcht. Die schwere und leichte Kette des eingesetzten Antikörpers wird auf der Membran nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 10 % Milchpulver-PBSdef-Lösung mit einem sekundären AF680-gekoppelten Antikörper nachgewiesen (4.4.2, 4.4.3). Der Nachweis der Endozytose des Proteins erfolgt somit *indirekt* über die Detektion der internalisierten (nach Essigsäurebehandlung) oder der internalisierten *und* an der Oberfläche gebundenen (nach PBSdef-Behandlung) schweren und leichten Kette des Erstantikörpers.

4.4.5 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Die Immunfluoreszenzanalyse ermöglicht die intrazelluläre Lokalisation zellulärer und viraler Proteine. Die transfizierten Zellen werden zunächst mit kaltem PBSdef gewaschen und mit 4 %igem PFA für 15 Minuten bei RT fixiert. Um alle zellulären Kompartimente für den Antikörper zugänglich zu machen, werden die Membranen durch die Behandlung mit 0,1 % Triton X-100 / PBSdef für zehn Minuten bei RT permeabilisiert. Das Detergenz wird vollständig entfernt, die Zellen mit PBSdef gewaschen und mit Blockierungspuffer für 30 Minuten überschichtet. 20 μ l des verdünnten Erstantikörpers werden auf Parafilm gegeben, das Deckglas mit der zellbewachsenen Seite darauf platziert und in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBSdef werden die Deckgläser mit einem spezifischen Zweitantikörper für eine Stunde im Dunkeln behandelt. Die Deckgläser werden anschließend dreimal mit PBSdef gewaschen, kurz in dH₂O gespült und mit Fluoprep auf einem Objektträger eingedeckt. Nach dem Trocknen der Eindeckflüssigkeit können die gefärbten Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Der an den Zweitantikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff wird hierbei durch das monochromatische Licht des Mikroskops angeregt woraufhin das emittierte Licht einer bestimmten Wellenlänge visuell beobachtet oder digital dokumentiert werden kann.

Verdünnungsverhältnisse der verwendeten Antikörper im Blockierungspuffer:

α -Flag polyklonaler Antikörper (Kaninchen)	1:200
α -M S30 monoklonaler Antikörper (Human)	1:5
α -ERGIC monoklonaler Antikörper (Maus)	1:400
α -Giantin monoklonaler Antikörper (Maus)	1:400
α -E2A (Klon B6-8) monoklonaler Antikörper (Maus)	1:20

4.4.6 Antikörper-Aufnahme Assay - Immunfluoreszenz

Neben der unter 4.4.4 dargestellten Methode lässt sich die Endozytose von transient exprimierten Proteinen auch über den direkten, fluoreszenzbasierten Nachweis des aufgenommenen Proteins durchführen (Vogt et al., 2005). Hierzu werden transfizierte Huh7-Zellen, die ein Flag-markiertes rekombinantes Protein an der Oberfläche exprimieren, mit dem polyklonalen α -Flag Antikörper (1:200 in 1 % BSA in PBSdef) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und im Anschluss auf 37 °C erwärmt, um den Prozess der Endozytose zu ermöglichen. Die noch an der Oberfläche gebundenen Antikörper werden mit einem Texas Red-gekoppelten Zweitantikörper abgesättigt. Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Membran werden die internalisierten Protein-Erstantikörper-Komplexe mithilfe eines FITC-gekoppelten Zweitantikörpers sichtbar gemacht. Im Gegensatz zur proteinbiochemischen Methode (4.4.4) wird das endozytierte Protein *direkt* nachgewiesen.

4.4.7 *In vitro*-Translation

Der Einsatz des „TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/ Translation Kits“ erlaubt sowohl die Transkription als auch die Translation von Genen, die unter der Kontrolle des T7- oder des SP6-RNA-Polymerase-Promotor stehen. Durch die Zugabe von Mikrosomen können Modifikationen von [³⁵S]-markierten Proteinen, wie z.B. das Entfernen des Signalpeptids oder die Membraninsertion und Glykosylierung, im zellfreien System untersucht werden.

Die Reaktionsansätze werden auf Eis pipettiert und für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert. Das *in vitro*-Translat wird in 500 μ l PBSdef / 5 mM EDTA aufgenommen und für 15 Minuten bei 4 °C und 13000 UpM zentrifugiert, wodurch die Mikrosomen mit den integrierten Membranproteinen pelletiert und von löslichen Proteinen getrennt werden. Das Pellet wird in 50 μ l PBSdef gelöst und die radioaktiv markierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt oder einem enzymatischen Verdau zugeführt (4.4.1).

Ansatz:	1.5 µg	Plasmid-DNA mit T7-Promotor
	40 µl	TNT [®] T7 Quick Master Mix
	3 µl	[³⁵ S] Promix Cell-labelling Mix
	1,5 µl	Mikrosomen
	ad 50 µl	nukleasefreies dH ₂ O

4.4.8 Immunpräzipitation aus *in vitro*-Translat

Die Methode der Immunpräzipitation dient der Fällung von Proteinen aus einem Proteingemisch mithilfe von spezifischen Antikörpern. Bei dieser Methode bindet der konstante F_C-Teil des Antikörpers an das Protein A (*Staphylococcus aureus*), das seinerseits an Sepharose gekoppelt ist. Nach Interaktion des variablen F_Y-Teils des Antikörpers mit dem spezifischen Epitop und Inkubation mit der Protein-A-Sepharose bildet sich ein Komplex, der präzipitiert werden kann.

Äquilibrierung von Protein-A-Sepharose - 250 mg Protein-A-Sepharose werden in 4 ml Tris/KCl-Puffer aufgenommen, gemischt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die gequollene Sepharose wird anschließend eine Minute bei 5000 UpM pelletiert und dreimal mit je 1 ml Tris/KCl-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird die Protein-A-Sepharose in 1 Volumenteil (VT) Tris/KCl-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

Präadsorption - Ein Zehntel des *in vitro*-Translats wird mit 500 µl Tris/KCl-Puffer (inkl. 3 % BSA) versetzt und zunächst für 30 Minuten bei 4 °C und 5000 UpM zentrifugiert, wodurch die Bindung unspezifischer Proteine reduziert wird. Nach der Zentrifugation wird der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und 20 µl Protein-A-Sepharose werden hinzugefügt. Die Präinkubation erfolgt bei 4 °C für eine Stunde auf einem Überkopfrötierer (ÜKR). Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 5000 UpM werden die Überstände wiederum in neue Reaktionsgefäße überführt.

Spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion - Die Überstände werden bei 4 °C für eine Stunde mit dem spezifischen Antikörper (α -M S30-Antikörper 1:10) auf dem ÜKR inkubiert.

Präzipitation der Antigen-Antikörper-Komplexe durch Kopplung an Protein-A-Sepharose - Den Ansätzen werden erneut 20 µl Protein-A-Sepharose zugesetzt und anschließend für eine Stunde auf dem ÜKR bei 4 °C inkubiert. Die an Protein-A-Sepharose gebundenen Immunkomplexe werden für zwei Minuten bei 5000 UpM abzentrifugiert. Die Überstände werden verworfen und die Sepharose-Pellets dreimal mit 800 µl Tris/KCl-Puffer (mit 3 %

BSA) gewaschen, wobei für den letzten Waschschrift ein Tris/KCl-Puffer ohne BSA verwendet wird. Die verbleibenden Protein-A-Sepharose-Pellets werden mit 20 µl 2 x Probenpuffer versetzt. Die Analyse der Immunpräzipitate erfolgt mittels SDS-PAGE und dem Bio-Imager.

4.4.9 Endoglykosidase H- (Endo H-) Behandlung

Die Übertragung von Glykanen an definierte Aminosäurereste eines wachsenden Polypeptids beginnt im ER. Im weiteren Verlauf der Proteinreifung im ER und dem Golgi-Komplex werden zusätzliche Oligosaccharide angehängt und vorhandene modifiziert. Um den Glykosylierungsstatus von Proteinen zu bestimmen, werden Endoglykosidasen eingesetzt, die die unterschiedlichen Glykanstrukturen erkennen und eine Aussage über die Lokalisation der Proteine in den verschiedenen zellulären Kompartimenten zulassen.

Die rekombinante Endo H katalysiert die Spaltung zwischen dem ersten Glukosamindimer mannosereicher Oligosaccharidketten, die im ER an das Protein übertragen werden. Mit Erreichen des Golgi-Apparates erfahren diese N-glykosidisch gebundenen Zucker eine weitere, komplexere Modifizierung und sind dann für Endo H unangreifbar.

Ansatz:	5 µl	Probe (<i>in vitro</i> -Translat, 4.4.7)
	1 µl	G5-Puffer
	0,5 µl	Endo H
	ad 10 µl	dH ₂ O

Die Proteine im Reaktionsansatz werden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

4.4.10 Peptid-N-Glykosidase F- (PNGase F-) Behandlung

Die Endoglykosidase PNGase F entfernt alle Formen der N-Glykosylierung, sowohl die mannosereiche, als auch die komplexe N-glykosidische Modifizierung von Proteinen, die im Golgi-Apparat erzielt wird. Hierbei wird die Zuckerkette vom Asparaginrest des Proteins gespalten, unabhängig davon ob das Protein im ER N-glykosyliert oder im Golgi-Apparat komplex glykosyliert wurde.

Der Ansatz wird für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle dient eine Probe, die an Stelle des Enzyms mit dH₂O versetzt wird.

Ansatz:	5 µl	Probe (<i>in vitro</i> -Translat, 4.4.7)
	1 µl	NP 40
	1 µl	G7-Puffer
	0,5 µl	PNGase F
	ad 10 µl	dH ₂ O

4.4.11 Proteinase K-Behandlung

Die Serinprotease Proteinase K spaltet Peptidbindungen von aliphatischen, aromatischen und hydrophoben Aminosäuren, die zugänglich und nicht durch eine Membraninsertion oder –anlagerung vor einem Abbau geschützt sind.

Nach der *in vitro*-Translation werden die das ER-imitierenden mikrosomalen Vesikel abzentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen PBSdef (bei einem 50 µl Translationsansatz 50 µl PBSdef) aufgenommen. Je 5 µl des Ansatzes werden für den Proteinase K-Verdau verwendet.

Ansatz I	Ansatz II	Ansatz III
5 µl <i>in vitro</i> -Translat ad 20 µl PBSdef.	5 µl <i>in vitro</i> -Translat ad 20 µl PBSdef.	5 µl <i>in vitro</i> -Translat ad 20 µl PBSdef.
4,6 µl PBSdef.	2,2 µl PBSdef. 2,4 µl Proteinase K (c = 1,5 µg/µl)	2,2 µl PBSdef. / 1 % Triton X-100 2,4 µl Proteinase K (c = 1,5 µg/µl)

Ansatz I dient als Kontrolle, bei der kein Enzym zugefügt wird. Die Ansätze II und III werden hingegen mit Proteinase K behandelt, wobei in Ansatz II ausschließlich freie Proteine bzw. zugängliche Proteindomänen angreifbar sind. In Ansatz III werden die mikrosomalen Vesikel durch Zugabe des Detergenz Triton X-100 zerstört, sodass Membranproteine nun der Proteinase zugänglich sind und abgebaut werden. Alle drei Ansätze wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Proteinase K wird anschließend durch 1 µl PMSF (100 mM) inaktiviert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der Bio-Imager-Analyse ausgewertet.

4.4.12 Autoradiographie und Bio-Imager-Analyse

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten radioaktiv markierten Proteine werden mit dem Bio-Imager Analyzer BAS-1000 visualisiert. Die radioaktive Strahlung versetzt Elektronen in der Bio-Imagingplatte in einen angeregten Zustand. Beim Einlesen im Biolumineszenz Analyzer wird

die Platte mit einem Helium-Neon-Laser abgetastet, wodurch die bereits angeregten Elektronen zusätzlich angeregt werden und dann unter Emission von Licht in ihren ursprünglichen Energiezustand zurückfallen. Die Daten werden digitalisiert und am Computer mithilfe der Software TINA2.0 ausgewertet.

5 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, das M-Protein des SARS-CoV zu charakterisieren. Neben der Beschreibung der intrazellulären Verteilung stand die Identifizierung ko- und posttranslativ Modifikationen im Vordergrund. Mithilfe von Deletionsmutanten sollten Bereiche innerhalb des M-Proteins ermittelt werden, die einen Einfluss auf den Transport sowie auf die Interaktion mit dem S-Protein besitzen. Mithilfe eines infektiösen cDNA-Klons des SARS-CoV sollten erste Einblicke in mögliche Funktionen der N-Glykosylierung des M-Proteins auf das Wachstum, die Morphologie und die Assemblierung neuer Viren gewonnen werden.

5.1 Charakterisierung des M-Proteins

Eine wichtige Voraussetzung für den zuverlässigen Nachweis des M-Proteins war der Einsatz spezifischer Antikörper. Mithilfe von Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisierten B-Zellen eines an SARS erkrankten Patienten ist es in vorangegangenen Studien gelungen, SARS-CoV spezifische, humane monoklonale Antikörper herzustellen (Traggiai et al., 2004). Aus diesem Pool wurden uns Zellkulturüberstände mit Antikörpern gegen virale Strukturproteine des SARS-CoV von E. Traggiai und A. Lanzavecchia zur Verfügung gestellt. In einer Western Blot-Analyse mit gereinigtem SARS-CoV konnte nach Inkubation der Membran mit dem Serum eines an SARS erkrankten Patienten die Hauptstrukturproteine der Virionen (S-, N-, M- und E-Protein) nachgewiesen werden (Abb. 6 A, Spur 1). Ein monoklonaler Antikörper, der von einem B-Zell Klon (S30) sezerniert wurde, detektierte zwei virale Proteine mit einem Molekulargewicht von 22 bzw. 27 kDa (Abb. 6 A, Spur 2). Der Vergleich mit dem berechneten Molekulargewicht des viralen M-Proteins ließ auf dieses Protein hindeuten. Das Laufmuster und die Molekulargewichtsanalyse der beiden detektierten Proteine entsprachen dem Laufverhalten des M-Proteins in der Western Blot-Analyse und der anschließenden Färbung mit dem humanen Serum (Abb. 6 A, Spur 1). Um zu untersuchen, ob es sich bei diesen viralen Proteinen möglicherweise um eine modifizierte und eine unmodifizierte Form des M-Proteins handelt, wurde gereinigtes SARS-CoV mit Endo H bzw. PNGase F enzymatisch verdaut (Abb. 6 B; Voss et al., 2006). Während Endo H die Spaltung von mannosereichen Oligosacchariden eines Proteins katalysiert, entfernt PNGase F neben mannosereichen auch komplexe N-glykosidische Zuckerseitenketten von Proteinen. Mithilfe des S30-Antikörpers konnten in den Western Blot-Analysen der unbehandelten Probe wiederum zwei Proteine nachgewiesen werden. Sowohl der Endo H- als auch der PNGase F-Verdau führte hingegen zur Reduktion der molekularen Masse des 27 kDa-Proteins, sodass nur noch ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 22 kDa detektiert werden konnte (Abb. 6 B, Spur 2 und 3). Dieses Resultat zeigt zum einen, dass es sich bei der höhermolekularen Bande um eine N-glykosylierte Form des M-Proteins handelt.

Zum anderen ist hieraus zu schließen, dass die Glykanstrukturen mannosereich sind und keine weitere komplexe N-Glykosylierung im Golgi-Komplex erfahren. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass sowohl die N-glykosylierte als auch die unglykosylierte Form des M-Proteins in das Viruspartikel eingebaut wird.

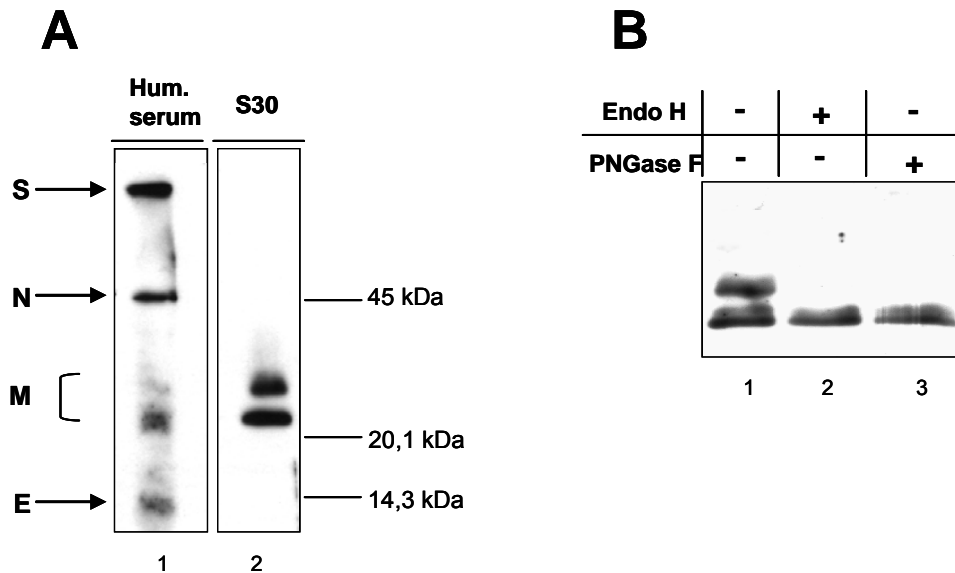


Abbildung 6: Nachweis des SARS-CoV M-Proteins in aufgereinigten Viruspartikeln.

(A) Freigesetzte Partikel von SARS-CoV infizierten Vero-Zellen wurden mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt, die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Zur Detektion der viralen Strukturproteine wurde Serum eines SARS-infizierten Patienten (Spur 1) oder ein humaner monoklonaler α -M S30-Antikörper (Spur 2) und ein sekundärer POD-gekoppelter α -human Antikörper verwendet. Rechtsseitig sind die Positionen des mitgeführten Größenmarkers dargestellt. Auf der linken Seite wurden die Abkürzungen der Hauptstrukturproteine des SARS-CoV den spezifischen Banden zugeordnet. (B) Zur Analyse der Proteinmodifikationen des M-Proteins wurden die aufgereinigten viralen Proteine (siehe oben) mit Endo H (Spur 2) oder mit PNGase F (Spur 3) behandelt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Western Blot-Analyse erfolgte mit dem α -M S30-Antikörper und einem sekundären POD-gekoppelten α -human Antikörper. Die Behandlung der Proteine mit Endo H bzw. PNGase F ist jeweils mit einem + oberhalb der Abbildung dargestellt (Kern, 2004; Voss et al., 2006).

Die rekombinante Expression des M-Proteins von dem Plasmid pTM1-M sollte diese Hypothese bestätigen. Das M-Protein wurde mittels „TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System“ in An- oder Abwesenheit von Mikrosomen *in vitro*-translatiert. Die Mikrosomen imitieren das zelluläre ER und ermöglichen somit eine mannosereiche Glykosylierung von Membranproteinen (Abb. 7 A und B). Die verschiedenen Ansätze wurden entweder direkt über SDS-PAGE und Bioimager-Analyse ausgewertet oder zuvor mit dem S30-Antikörper immunpräzipitiert.

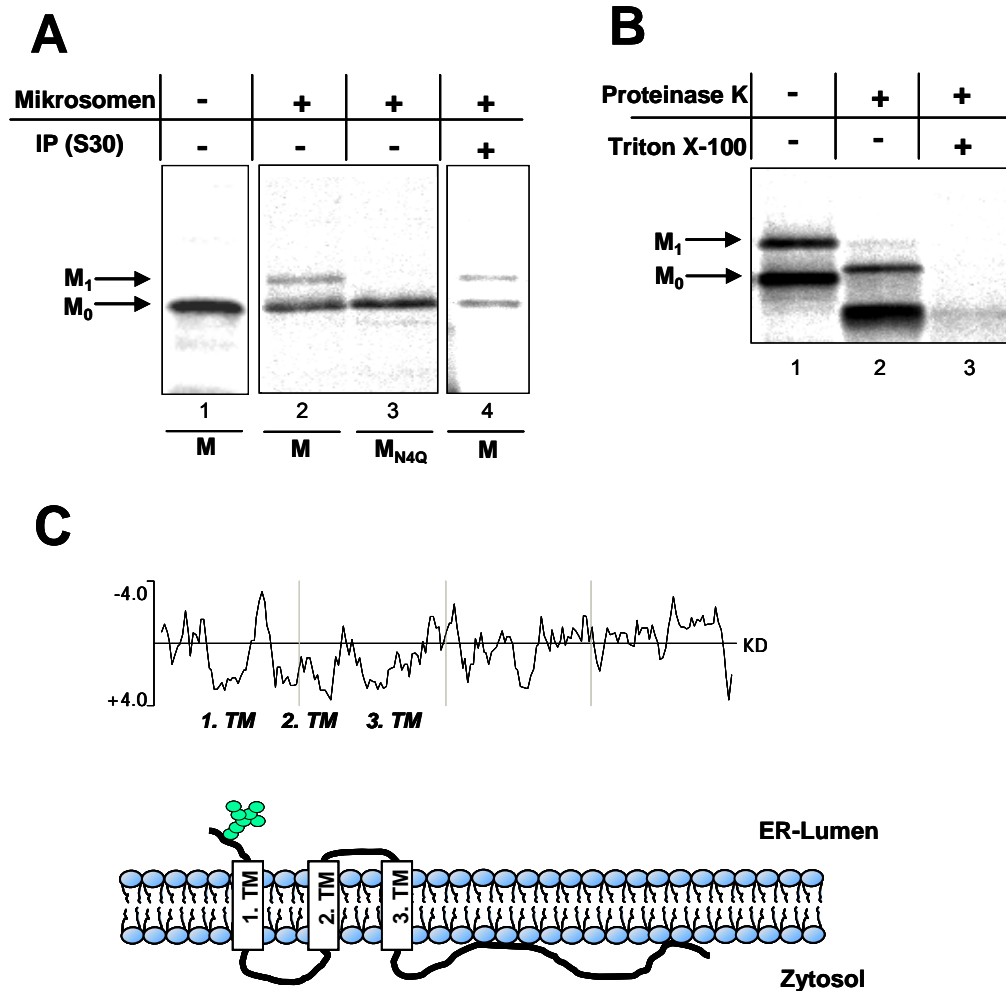


Abbildung 7: Charakterisierung des SARS-CoV M-Proteins.

(A) Das M-Protein und die glykosylierungsdefiziente Mutante M_{N4Q} wurde jeweils mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kit in An- oder Abwesenheit von Mikrosomen *in vitro*-exprimiert und dabei metabolisch radioaktiv markiert. Das M-Protein wurde aus dem Translat mithilfe des α -M S30-Antikörpers immunpräzipitiert. Die *in vitro*-Translate bzw. die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Bioimager ausgewertet. Die unglykosylierte Form des M-Proteins ist mit M_0 und die mannosereiche, glykosylierte Form mit M_1 gekennzeichnet. Die Synthese der Proteine in Anwesenheit von Mikrosomen bzw. die Durchführung einer Immunpräzipitation ist jeweils mit einem + oberhalb der Abbildung dargestellt. (B) Das M-Protein wurde in Anwesenheit von Mikrosomen *in vitro*-exprimiert. Die Translate wurden in drei Teile geteilt und einem Proteinase K-Verdau in An- oder Abwesenheit des Detergenz Triton x-100 unterzogen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Bioimager ausgewertet. Die Behandlung der Translate mit Proteinase K in An- oder Abwesenheit von Triton x-100 ist jeweils mit einem + bzw. - oberhalb der Abbildung dargestellt. (C) *In silico*-Analyse der Aminosäuresequenz des M-Proteins. Die „Kyte-Doolittle-Analyse“ stellt die Aminosäurereste des zu untersuchenden Proteins abhängig von ihrer Hydrophobizität als negative bzw. positive Werte dar und gibt somit Auskunft über mögliche Transmembrandomänen des Proteins. Die Analyse sagt im Fall des M-Proteins drei Transmembrandomänen (hier markiert als 1. bis 3. TM) voraus. Die vermutete Topologie des M-Proteins innerhalb der Membran mit der N-terminalen Glykosylierungsstelle, den drei Transmembrandomänen und einer langen zytoplasmatischen Domäne ist im Schema zusammengefasst.

Während in Abwesenheit von Mikrosomen ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 22 kDa (M_0) exprimiert wurde (Abb. 7 A, Spur 1), konnte nach Zugabe von Mikrosomen ein weiteres Protein mit einem Gewicht von 27 kDa (M_1) nachgewiesen werden (Abb. 7 A, Spur 2). Es lag nahe, dass es sich hierbei um die N-glykosylierte Form des M-Proteins handelte. Beide Proteine konnten durch den S30-Antikörper immunpräzipitiert werden, wodurch die Bindungsspezifität des S30-Antikörpers für das M-Protein des SARS-CoV bestätigt werden konnte (Abb. 7 A, Spur 4). *In silico*-Analysen der Aminosäuresequenz des M-Proteins sagen eine einzelne N-Glykosylierungsstelle am N-terminalen Ende des Proteins voraus. Um diese potentielle N-Glykosylierungsstelle zu verifizieren, wurde eine Substitutionsmutante hergestellt, bei der das Asparagin an Position vier durch ein Glutamin ersetzt wurde. Die *in vitro*-Translation des entstandenen Plasmides pTM1-M_{N4Q} in Gegenwart von Mikrosomen resultierte in der Expression eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 22 kDa, das die unglykosylierte Form des M-Proteins repräsentiert (Abb. 7 A, Spur 3). Durch die Mutation konnte demnach die N-Glykosylierung des Proteins vollständig unterbunden werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das M-Protein des SARS-CoV ausschließlich an Asparagin vier N-glykosyliert wird.

Um zu untersuchen, ob beide Proteinformen in der Virusmembran inkorporiert sind, wurde das M-Protein in Anwesenheit von Mikrosomen *in vitro*-translatiert, pelletiert und im Anschluss einem Proteinase K-Verdau unterzogen (Abb. 7 B). In der unbehandelten Probe wurde die unglykosylierte (M_0) und die glykosylierte Form (M_1) des Proteins nachgewiesen (Abb. 7 B, Spur 1). Die Zugabe von Proteinase K führte zu einer Veränderung des Laufverhaltens der Proteine in der SDS-PAGE (Abb. 7 B, Spur 2). Für beide Proteine erhöhte sich die Laufgeschwindigkeit im Gel, was auf eine terminale Verkürzung der Proteine hindeutet. Das molekulare Gewicht dieser beiden proteolytisch verdauten Proteine lag jedoch über dem theoretischen Molekulargewicht eines Proteins, bei dem der zugängliche zytoplasmatische C-Terminus von 11 kDa vollständig entfernt werden würde. Aus diesen Resultaten lässt sich folgern, dass beide Formen des M-Proteins membranassoziiert sind und durch ihre Inkorporation in die Membran partiell vor einem enzymatischen Verdau geschützt sind. Durch das Herauslösen des Proteins aus der Membran mittels Triton x-100 und Zugabe von Proteinase K wurde wie erwartet kein Protein detektiert (Abb. 7 B, Spur 3). Basierend auf diesen ersten Studien und einer *in silico*-Vorhersage hydrophober Domänen des Proteins konnte ein vorläufiges Modell der Topologie des M-Proteins aufgestellt werden (Abb. 7 C). Das M-Protein besitzt eine N-terminale Ektodomäne, drei Transmembrandomänen und eine lange C-terminale Endodomäne. Die einzige N-Glykosylierungsstelle des Protein ist in der Ektodomäne an Position vier lokalisiert.

5.2 Analyse der Membrantopologie des M-Proteins

Während das Programm HMMTOP eine Topologie des M-Proteins mit einer N-terminalen Ektodomäne und einer C-terminalen Endodomäne (N_{exo} - C_{endo} Topologie) vorhersagt (Tusnady & Simon, 1998), prognostiziert das Programm PRODIV-TMHMM eine N_{endo} - C_{exo} Topologie, bei der der C-Terminus dem ER-Lumen zugewandt ist (Viklund & Elofsson, 2004). Zum Nachweis einer dieser beiden theoretischen Vorhersagen über die Topologie des SARS-CoV M-Proteins wurden Substitutionsmutanten hergestellt, bei denen N-Glykosylierungsstellen an unterschiedlichen Bereichen des Proteins hinzugefügt wurden bzw. die ursprüngliche Glykosylierungsstelle an der Aminosäureposition vier entfernt wurde. Eine Übersicht und schematische Darstellung der untersuchten Mutanten ist in Abbildung 8 A wiedergegeben. Während die ursprüngliche Glykosylierungsstelle an Position vier bei den Mutanten M_{N4Q} , M_{V186N} , M_{L205N} und M_{I172N} zerstört wurde, weisen die Mutanten M_{V186N} , M_{L205N} und M_{I172N} stattdessen eine neue N-Glykosylierungsstelle an Aminosäureposition 186, 205 bzw. 74 auf. Die Expression und Analyse der N-Glykosylierung dieser Mutanten sollte den Nachweis einer definierten Topologie des SARS-CoV M-Proteins erbringen. Die potentielle N-Glykosylierung der Mutanten M_{V186N} und M_{L205N} würde eine luminalen Orientierung des C-Terminus signalisieren. Zur Expression der Proteine wurden die jeweiligen Plasmide in den *in vitro*-Translationsassay eingesetzt, die Translate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die getrockneten Gele mit dem Bioimager ausgewertet (Abb. 8 B). Für das Wildtyp M-Protein mit einem C-terminalen Flag-Epitop (M_C) konnte sowohl die glykosylierte (M_1) als auch die unglykosylierte (M_0) Proteinform detektiert werden (Abb. 8 B, Spur 1 und 8). Die Substitutionsmutanten M_{V186N} und M_{L205N} zeigten wie die glykosylierungsdefiziente Mutante M_{N4Q} eine einzige nicht-modifizierte Proteinform mit einem molekularen Gewicht von ca. 22 kDa (Abb. 8 B, Spur 2-4). Das etwas unterschiedliche Laufverhalten der Substitutionsmutanten in der SDS-PAGE kann möglicherweise durch unvollständige Denaturierung der Proteine erklärt werden. Aus diesen ersten Resultaten lässt sich schließen, dass der extreme C-Terminus des Proteins nicht der luminalen Seite des ER zugewandt ist und somit den Glykosyltransferasen nicht zugänglich ist.

A

SARS-CoV M

M_{N4Q}

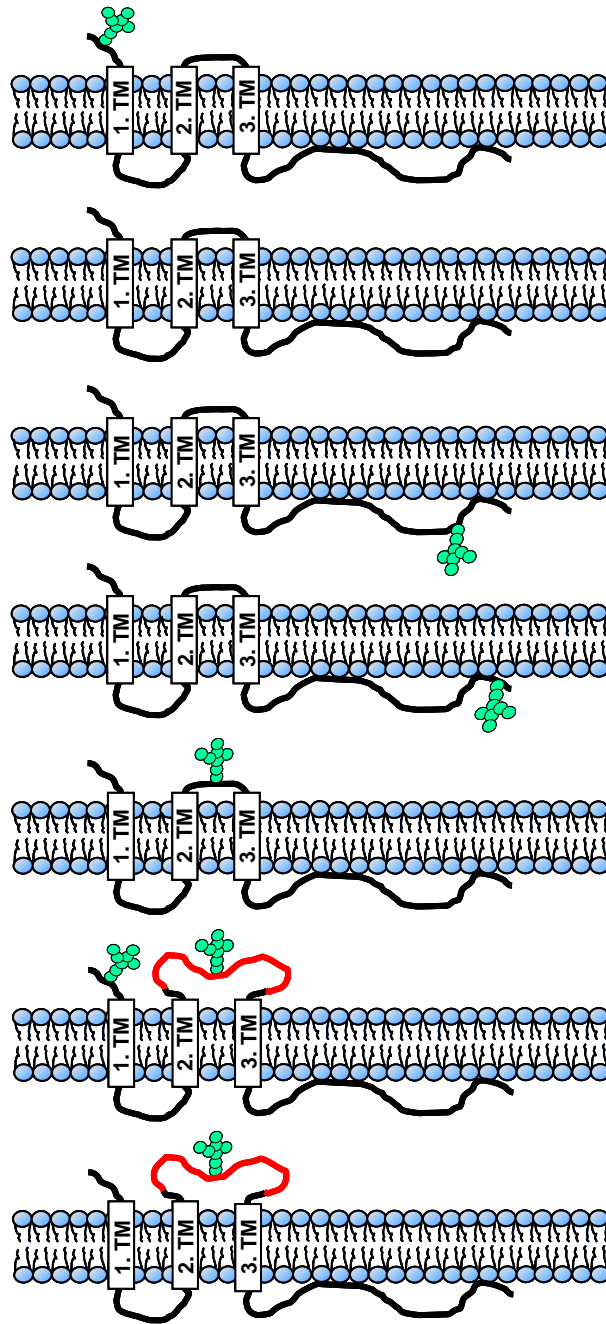
M_{V186N}

M_{L205N}

M_{I72N}

M_{insert}

M_{N4Q insert}



B

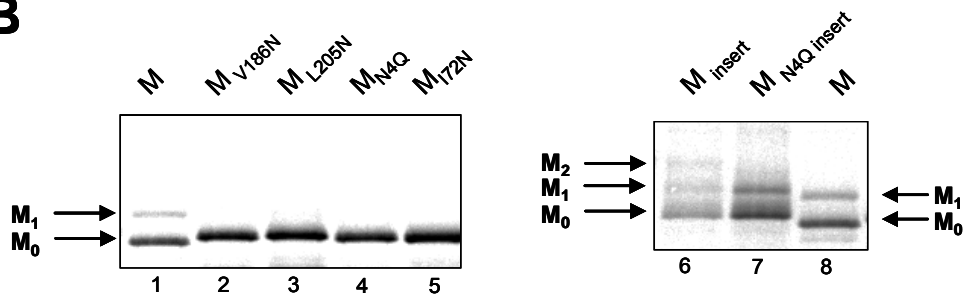


Abbildung 8: Das SARS-CoV M-Protein besitzt eine N_{exo} – C_{endo} Topologie.

(A) Schematische Darstellung der verwendeten Substitutionsmutanten. Glykosylierungsstellen wurden durch eine ortsgerichtete Mutagenese entfernt, versetzt oder hinzugefügt. Bei den Mutanten M_{insert} und M_{N4Q insert} wurde eine Sequenz von ca. 30 Aminosäuren (rot) mit einer zentralen Glykosylierungsstelle zwischen die zweite und dritte Transmembrandomäne inseriert. (B) Das M-Protein und die Substitutionsmutanten wurden mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kit in Anwesenheit von Mikrosomen *in vitro*-exprimiert. Die Translate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Bioimager ausgewertet. Die unglykosylierte Form der Proteine ist mit M₀ und die mannosereiche, N-glykosylierte Form mit M₁ gekennzeichnet. M₂ symbolisiert das Protein, welches an zwei Stellen N-glykosyliert wurde. Die exprimierten Proteine sind oberhalb der Abbildung dargestellt.

Die Expression der Substitutionsmutante M_{I72N} resultierte ebenso in einer einzigen nicht-modifizierten Proteinform, was auf eine fehlende N-Glykosylierung hindeutete (Abb. 8 B, Spur 5). Dieses Ergebnis stand zunächst im Widerspruch zu den Resultaten des vorangegangenen Experimentes, die eine luminale Orientierung des Proteinabschnittes zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomänen und somit eine potentielle N-Glykosylierung postulierten. In den folgenden Analysen sollte eine mögliche Anlagerung dieser Linker-Domäne an die Membran verhindert und der Zugang der Glykosyltransferasen gewährleistet werden. Hierzu wurden bei den Mutanten M_{insert} und M_{N4Q-insert} 31 hydrophile Aminosäuren zwischen die zweite und dritte Transmembrandomäne inseriert, wodurch eine Flag-Tag Sequenz und eine zentrale N-Glykosylierungsstelle eingefügt wurde. Nach Expression der Mutante M_{insert} wurden drei Proteinformen nachgewiesen, die als unglykosyliertes (M₀), einfach (M₁) und zweifach glykosyliertes (M₂) M-Protein zu deuten sind (Abb. 8 B, Spur 6). Eine zweifache mannosereiche N-Glykosylierung konnte bei der M_{N4Q insert} Mutante nicht detektiert werden, da die N-terminale Glykosylierungsstelle zerstört wurde (Abb. 8 B, Spur 7). Somit konnte unser postuliertes Topologie-Modell des SARS-CoV M-Proteins (Abb. 7 C) bestätigt werden. Dies besagt, dass der Linker-Bereich zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne ebenso wie der N-Terminus des Proteins im Lumen des ER liegt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass für eine effiziente N-Glykosylierung ein Abstand von ca. 15 Aminosäuren zur ER-Membran notwendig und ausreichend ist.

5.3 Identifizierung der Bindungsstelle des α -M S30-Antikörpers

Der Nachweis des M-Proteins unter den denaturierenden Bedingungen der Western Blot-Analysen mithilfe des S30-Antikörpers deutete darauf hin, dass der S30-Antikörper ein lineares Epitop erkennt. In den folgenden Analysen sollte das Epitop des S30-Antikörpers genau bestimmt werden.

In früheren Studien konnte ein immundominantes Epitop in der C-terminalen Region des M-Proteins zwischen Aminosäure 132 und 161 lokalisiert werden (He et al., 2005). Um zu prüfen, inwieweit diese Region auch für die Erkennung des S30-Antikörpers eine Rolle spielt, wurden C-terminal verkürzte Formen des M-Proteins konstruiert, die am absoluten C-Terminus mit einem Flag-Epitop versehen waren. In Abbildung 9 A ist exemplarisch für die verwendeten Deletionsmutanten das Peptid M_{C1-134} schematisch dargestellt. Zunächst wurden die M-Mutanten *in vitro*-translatiert (Abb. 9 B, Spur 1-4) und im Anschluss mit dem S30-Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 9 B, Spur 5-8). Während das Wildtyp M-Protein durch den S30-Antikörper präzipitiert wurde, konnten die verkürzten Formen $M_C 1-134$, $M_C 1-159$, $M_C 1-189$ mit dem S30-Antikörper nicht gefällt werden. Zur weiteren Eingrenzung des S30-Epitops wurden die Genprodukte der in einem pTM1-Vektor unter der Kontrolle eines T7-Promotor stehenden Gene M_{C1-212} , $M_C 1-207$, $M_C 1-201$, $M_C 1-196$ bzw. $M_{C/N 1-189}$ in BHK-T7-Zellen rekombinant exprimiert. Die T7-RNA-Polymerase wurde zusätzlich durch die Kotransfektion des Konstruktes pCAGGS-T7 bereitgestellt. Die Mutante $M_C 1-189$ konnte erst nach Hinzufügen eines weiteren Flag-Epitops am N-Terminus des Proteins stabilisiert und transient exprimiert werden (Abb. 9 C, Spur 7). Alle beschriebenen Mutanten konnten mit einem α -Flag Antikörper in der Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 9 C). Die Inkubation der Membran mit dem S30-Antikörper führte zur Detektion der Mutanten $M_C 1-212$, $M_C 1-207$ und $M_C 1-201$, jedoch nicht der Mutanten $M_C 1-196$ bzw. $M_{C/N 1-189}$ (Abb. 9 D). Diese Daten zeigen, dass die Bindungsstelle des S30-Antikörpers am extremen C-Terminus zwischen den Aminosäuren 196 bis 201 des M-Proteins lokalisiert ist. Die unabhängig von dieser Studie durchgeführte erfolgreich Produktion von Peptidantikörper gegen das SARS-CoV M-Protein durch den Einsatz des extremen C-Terminus als Immunogen unterstreicht die hohe Immunogenität dieses Proteinabschnittes (Rockland Kat-Nr. 100-401-A55; Imgenex Kat-Nr. IMG-5125A).

In dieser Arbeit konnten außerdem neben den jeweiligen unglykosylierten und N-glykosylierten Formen auch höhermolekulare Formen des M-Proteins detektiert werden (Abb. 9 C+D; M_{k-g} = „M komplex-glykosyliert“). Diese Endo H-resistenten und PNGase F-sensitiven Formen deuten auf eine komplexe Glykosylierung des M-Proteins nach rekombinanter Expression hin (Voss et al., 2006).

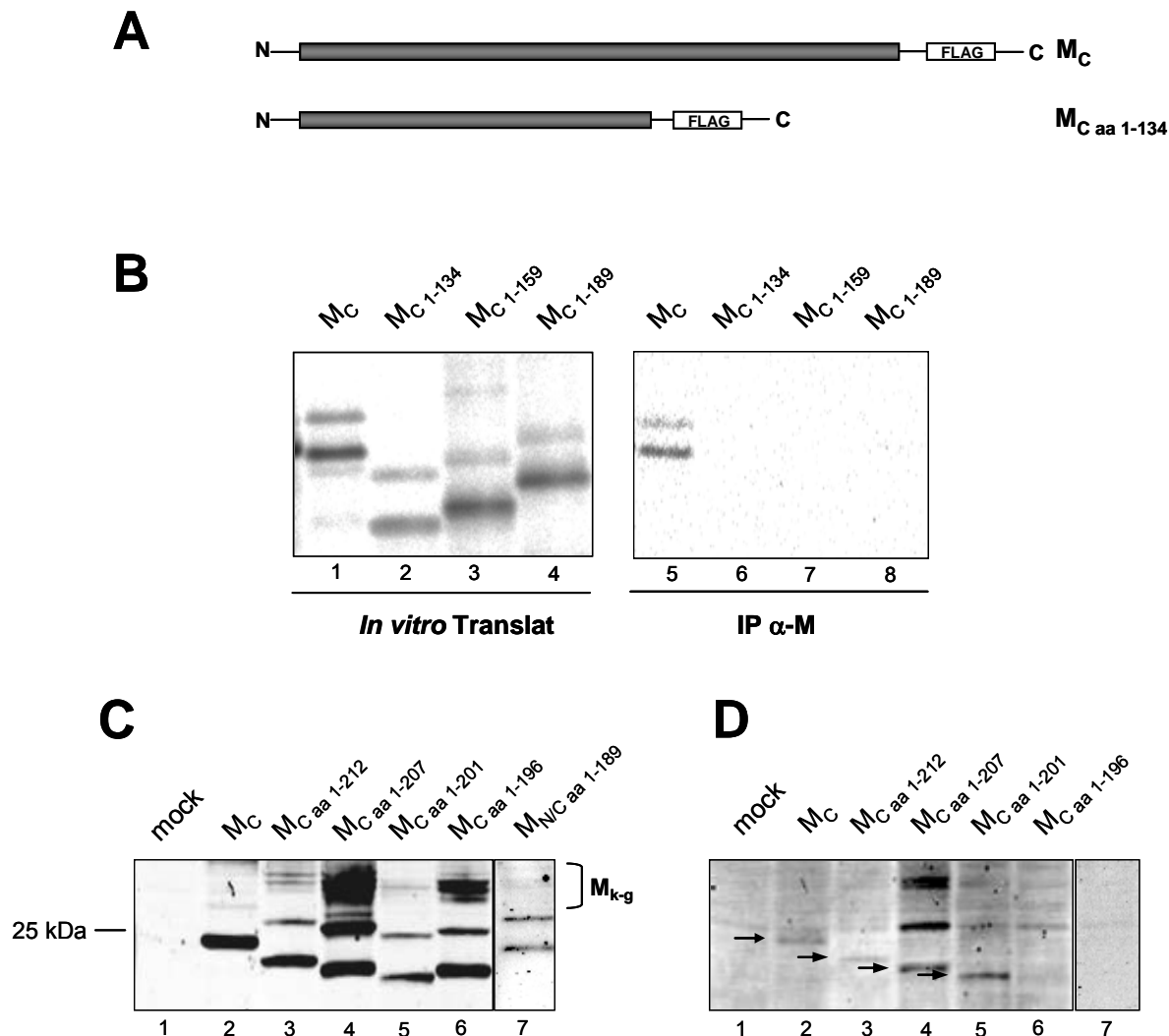


Abbildung 9: Die Bindungsstelle des α -M S30-Antikörpers liegt zwischen aa 196 und 201 des M-Proteins.

(A) Schematische Darstellung des M-Proteins und einer C-terminal verkürzten Form (z.B. $M_{aa1-134}$), die beide am C-Terminus mit einem Flag-Tag versehen wurden. Alle weiteren untersuchten Deletionsmutanten sind dem Schema entsprechend konstruiert worden. (B) Das M-Protein und die Deletionsmutanten wurden mit dem TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation Kit in Anwesenheit von Mikrosomen *in vitro*-exprimiert. Zur Immunpräzipitation der Translate wurde der α -M S30-Antikörper verwendet. Die Analyse der Präzipitate erfolgte über SDS-PAGE und Bioimager. (C und D) BHK-T7-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für das M-Protein oder die C-terminal verkürzten Formen des Proteins kodieren. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurde der monoklonale α -Flag M2 Antikörper (C) und der monoklonale, humane α -M S30-Antikörper (D), sowie ein Alexa-Fluor 680-gekoppelter α -Maus und ein IRDye 800-gekoppelter α -human Antikörper eingesetzt. Die Auswertung erfolgte über das Odyssey[®] Infrarot Detektionssystem. Die Position eines Größenmarkers ist linksseitig und die exprimierten Proteine oberhalb der Abbildung dargestellt (M_{k-g} = *M* komplex-glykosyliert). In Abbildung D sind Positionen der unglykosylierten Formen der Proteine zusätzlich mit einem Pfeil hervorgehoben.

5.4 Analyse der intrazellulären Verteilung des M-Proteins

Die biochemischen Untersuchungen des Glykosylierungsstatus des M-Proteins deuteten auf ein unterschiedliches Modifizierungsmuster des Proteins nach rekombinanter Expression und nach SARS-CoV-Infektion hin. In Zelllysaten M-exprimierender Zellen konnten neben der unglykosylierten und der Endo H-sensitiven mannosereichen Form zusätzlich weitere Endo H-resistente Formen des Proteins detektiert werden, die im zeitlichen Verlauf eines Pulse-Chase-Experimentes an Intensität zunahmen. Diese Formen der komplexen N-Glykosylierung konnten hingegen in Lysaten SARS-CoV infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden (Voss et al., 2006).

Um die intrazelluläre Verteilung des M-Proteins in diesen unterschiedlichen Kontexten zu studieren, wurden Immunfluoreszenzstudien von rekombinantem M- und dem M-Protein in SARS-CoV infizierten Zellen durchgeführt (Abb. 10).

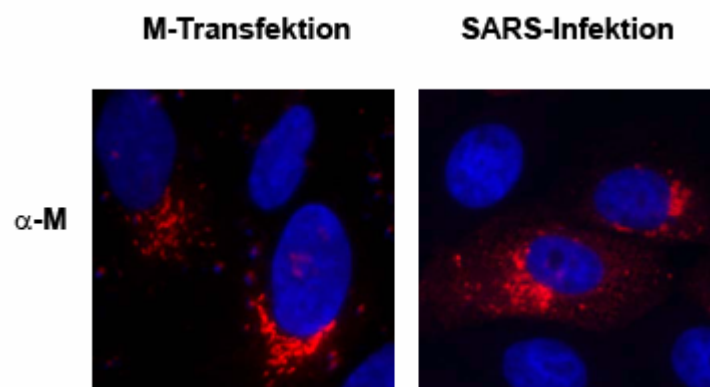


Abbildung 10: Das M-Protein akkumuliert im perinukleären Raum von transfizierten und SARS-CoV infizierten Zellen.

Zur Einzelexpression des M-Proteins wurden subkonfluente Vero-Zellen mit dem Plasmid pTM1-M transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem humanen monoklonalen α -M S30-Antikörper und einem Rhodamin Red-X-gekoppelten α -human Antikörper gefärbt (linkes Bild). SARS-CoV infizierte Vero-Zellen wurden 24 h nach Infektion fixiert, permeabilisiert und wie oben geschildert mit dem α -M S30-Antikörper gefärbt (rechtes Bild).

24 Stunden nach der Transfektion bzw. Infektion wurden die Vero-Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem α -M S30-Antikörper und einem sekundären Rhodamin Red-X-gekoppelten Antikörper angefärbt. Das M-Protein war sowohl nach rekombinanter Einzelexpression als auch in den SARS-CoV infizierten Zellen perinukleär verteilt. Der unterschiedliche Glykosylierungsstatus des Proteins während der Infektion im Vergleich zum rekombinanten M-Protein schien demnach nicht auf ein verändertes Transportverhalten des Proteins zurückzuführen sein.

Die Koexpression des M-Proteins mit Markerproteinen, bei denen das Cyan-fluoreszierende Protein mit ER-, Golgi- bzw. Endosomen-spezifischen Transportsequenzen fusioniert wurde, sollte Aufschluss über die exakte Lokalisation des M-Proteins innerhalb der zellulären Kompartimente liefern (Abb. 11 A).

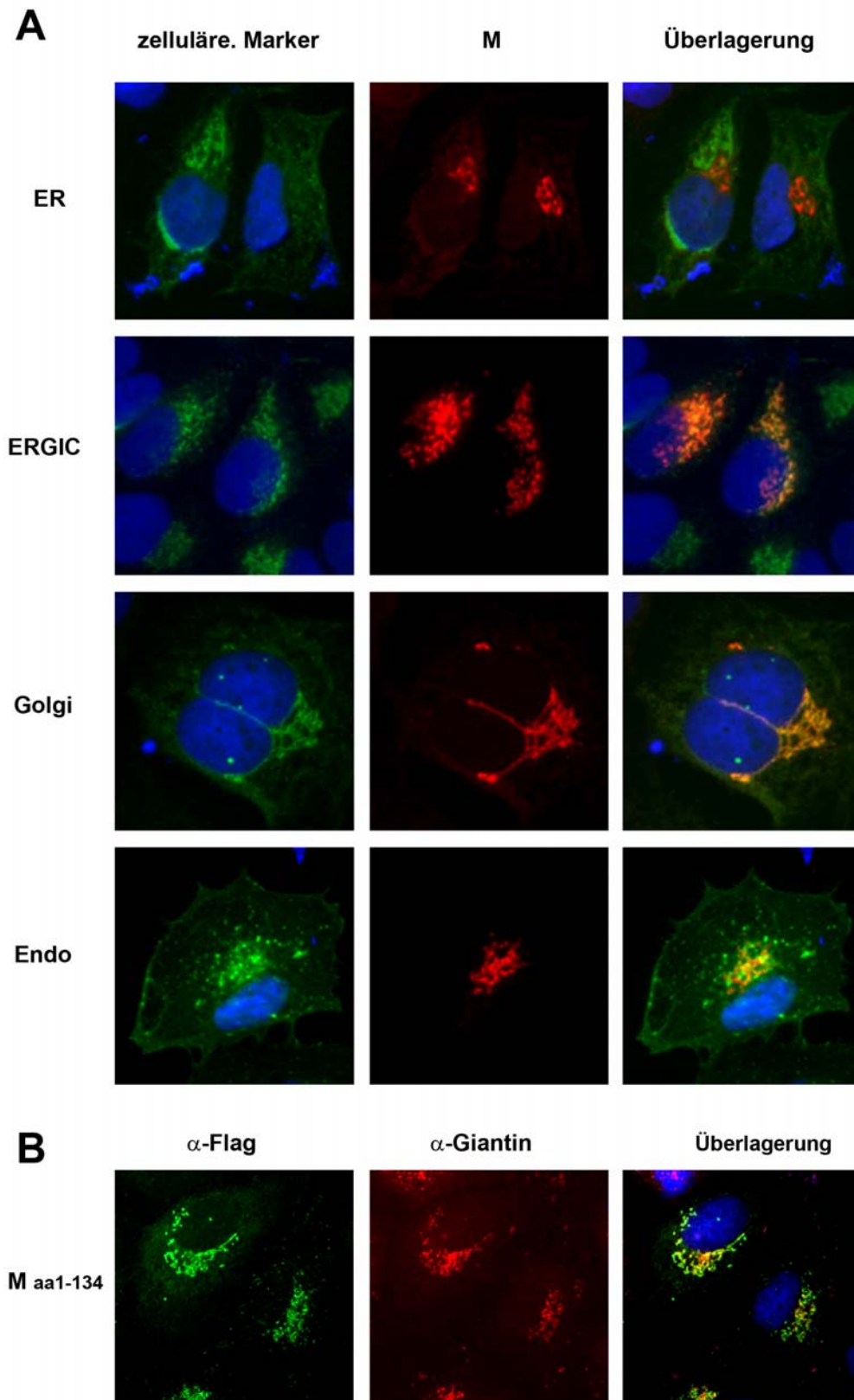


Abbildung 11: Der hydrophobe N-terminale Bereich des M-Proteins ist essentiell und ausreichend für dessen Anreicherung im Golgi-Komplex.

(A) Subkonfluente Huh7-Zellen wurden mit dem Plasmid pTM1-M entweder einzeln oder zusammen mit jeweils einem ein fluoreszierendes Marker-Protein kodierenden Plasmid (living colors™ pCFP-ER; pCFP-Golgi oder pCFP-Endo) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Das M-Protein wurde mithilfe des S30-Antikörpers und einem sekundären Rhodamin Red-X-gekoppelten α -human Antikörpers nachgewiesen. Das ERGIC wurde mit dem monoklonalen α -ERGIC-53 Antikörper und einem sekundären FITC-gekoppelten α -Maus Antikörper gefärbt. Die zellulären Kompartimente, in denen sich die Markerproteine anreichern, sind linksseitig angezeigt. (B) Die C-terminal verkürzte Form M_{aa1-134} wurde in Huh7-Zellen transient exprimiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem polyklonalen α -Flag und einem monoklonalen α -Giantin Antikörper, sowie einem FITC-gekoppelten α -Kaninchen und einem Rhodamin-gekoppelten α -Maus Antikörper gefärbt. Das exprimierte Protein ist linksseitig dargestellt.

Huh7-Zellen wurden mit den entsprechenden pTM1-Plasmiden und dem Plasmid pCAGGS-T7 transfiziert, 24 Stunden später fixiert, permeabilisiert und mittels Immunfluoreszenz studiert. Das M-Protein wurde mit dem S30-Antikörper und das ERGIC mit einem monoklonalen α -ERGIC 53 Antikörper nachgewiesen. Hierbei zeigte sich, dass das M-Protein mit dem Golgi- und dem ERGIC-Markerprotein kolokalisierte, was durch die Überlagerung beider Signale deutlich zu erkennen war. Nach Koexpression des M-Proteins mit dem ER- bzw. Endosomen-spezifischen Protein konnte keine bzw. nur eine partielle Überlagerung der Fluoreszenzen beobachtet werden. Um den Einfluss der zytosplasmatischen Domäne des M-Proteins auf die zelluläre Lokalisation zu untersuchen, wurde die Deletionsmutante M_{C1-134} in Huh7-Zellen exprimiert und deren zelluläre Verteilung mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht (Abb. 11 B). Die transfizierten Zellen wurden 24 Stunden später fixiert, permeabilisiert und mit einem polyklonalen α -Flag und einem monoklonalen α -Giantin Antikörper inkubiert. Es zeigte sich eine starke Überlagerung der Signale des M-Proteins und des angefärbten Golgi-Kompartimentes. Diese Daten verdeutlichen, dass das M-Protein im ERGIC und dem Golgi-Komplex akkumuliert und für diese Lokalisation die N-terminalen hydrophoben Transmembrandomänen entscheidend sind.

5.5 Untersuchungen zum Oberflächentransport des M-Proteins

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob das M-Protein vollständig in dem ERGIC / Golgi-Komplex, in dem auch die Assemblierung neuer Coronaviren stattfindet, zurückgehalten wird oder darüber hinaus an die Plasmamembran der Zelle gelangt. Hierzu wurden Huh7-Zellen mit den Plasmiden pTM1-M_{N-Flag}, pTM1-M_{C-Flag} bzw. pTM1-M_{1-107 N-Flag} transfiziert. Die T7-RNA-Polymerase wurde durch Kotransfektion des Konstruktes pCAGGS-T7 bereitgestellt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die nativen Zellen mit einem polyklonalen α -Flag Antikörper und einem sekundären Texas Red-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper bei 4 °C inkubiert. Der Texas Red-gekoppelte α -Kaninchen Antikörper wurde anschließend im Überschuss zugegeben, um alle an das M-Protein gebundenen Primärantikörper abzusättigen. Danach wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das M-Protein bzw. dessen Mutanten mit einem polyklonalem α -Flag Antikörper und einem sekundären FITC-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper intrazellulär nachgewiesen. Die Analyse erfolgte mittels konfokaler Lasermikroskopie (Abb. 12). Das N-terminal mit einem Flag-Epitop versehene M-Protein (M_{N-Flag}) konnte sowohl an der Plasmamembran als auch intrazellulär in typischen perinukleären Strukturen detektiert werden (Abb. 12, obere Reihe). Das C-terminal mit einem Flag-Epitop markierte M-Protein (M_{C-Flag}) war hingegen nur in permeabilisierten Zellen in der perinukleären Region zu detektieren und nicht an der Plasmamembran nativer Zellen (Abb. 12, mittlere Reihe). Das bis auf die ersten 107 Aminosäuren verkürzte M-Protein war ebenfalls an der Plasmamembran sowie in perinukleären Strukturen lokalisiert (Abb. 12, untere Reihe). Diese Ergebnisse bestätigen die Studien zur Topologie des M-Proteins (Abb. 8), die einen zytoplasmatischen und somit von dem extrazellulären Raum nicht zugänglichen C-Terminus des M-Proteins vermuten ließen. Außerdem konnte hier gezeigt werden, dass das M-Protein sich zwar im ERGIC / Golgi-Kompartiment anreichert, jedoch auch das Potential zum Transport zur Plasmamembran besitzt. Die Deletion des C-Terminus zeigte keinerlei Auswirkungen auf die Akkumulation im Golgi-Komplex (Abb. 11 B) noch auf die Expression an der Plasmamembran der transfizierten Zelle (Abb. 12, untere Reihe).

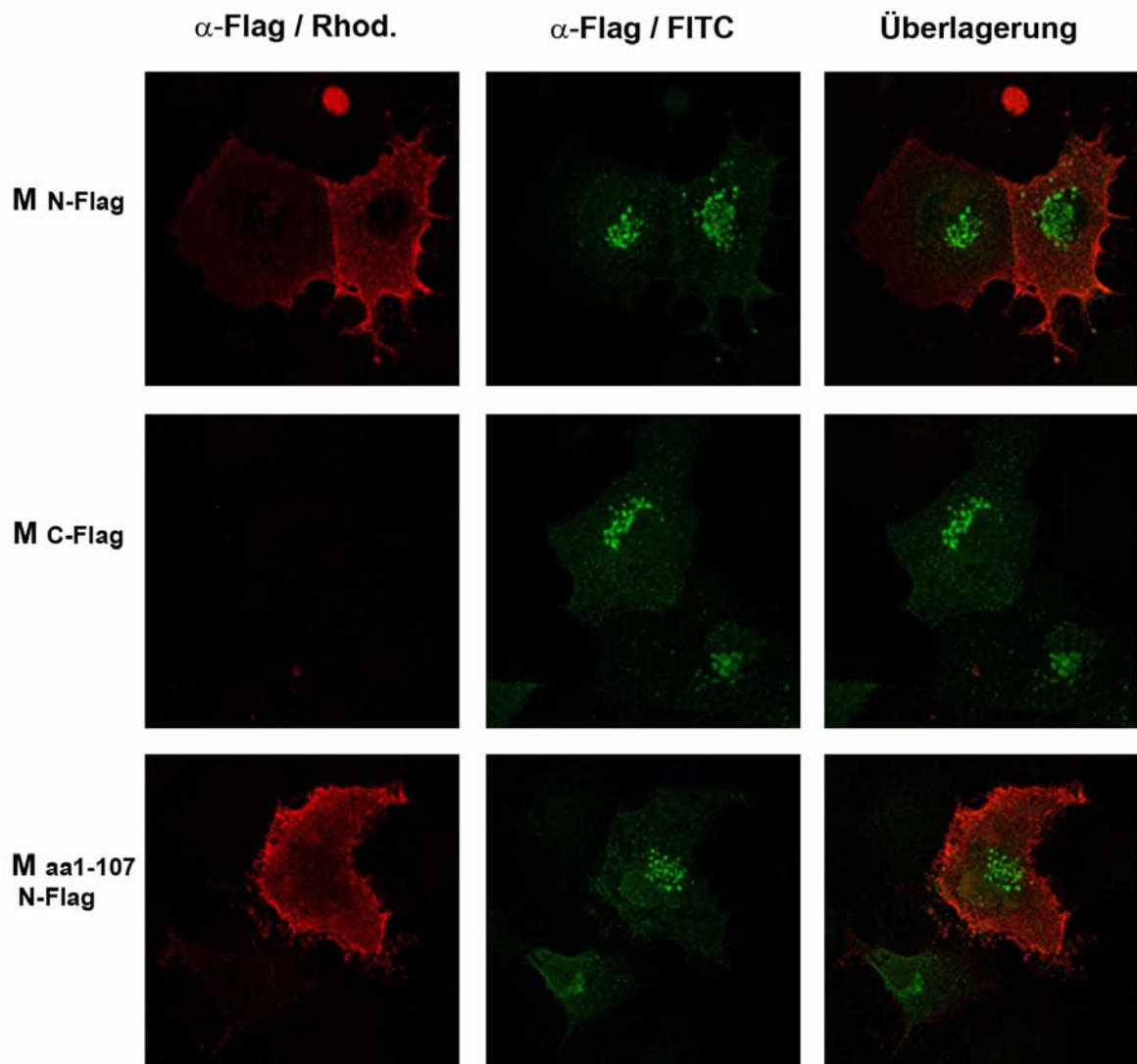


Abbildung 12: Rekombinant exprimiertes M-Protein wird zur Zelloberfläche transportiert.

Subkonfluente Huh7-Zellen wurden mit dem Plasmid pTM1-M_{N-Flag}, pTM1-M_{aa1-107 N-Flag} bzw. mit dem Plasmid pTM1-M_{C-Flag} transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die nativen Zellen mit dem polyklonale α -Flag Antikörper und einem sekundären Rhodamin-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem polyklonalen α -Flag Antikörper und einem sekundären FITC-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta). Die exprimierten Proteine sind linksseitig angezeigt.

5.6 Untersuchungen zur Endozytose des M-Proteins

5.6.1 Immunfluoreszenz-Analyse

Es wurde nun der Frage nachgegangen, inwieweit das M-Protein des SARS-CoV von der Plasmamembran zurück zum Ort der Assemblierung neuer Coronaviren, dem ERGIC, gelangt. Hierzu wurden Antikörper-Aufnahme Studien von transient exprimierten Formen des M-Proteins durchgeführt (Vogt et al., 2005). Huh7-Zellen wurden mit dem Plasmid pTM1-M_{N-Flag} bzw. der verkürzten Mutante pTM1-M_{1-107 N-Flag} transfiziert und 24 Stunden später im nativen Zustand mit einem polyklonalen α -Flag Antikörper bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, um den Prozess der Endozytose zu ermöglichen. Die an der Oberfläche gebundenen Antikörper wurden mit einem Texas-Red-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper bei 4 °C abgesättigt. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und die in das Zytoplasma aufgenommenen Erstantikörper-M-Komplexe mit einem FITC-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper detektiert (Abb. 13).

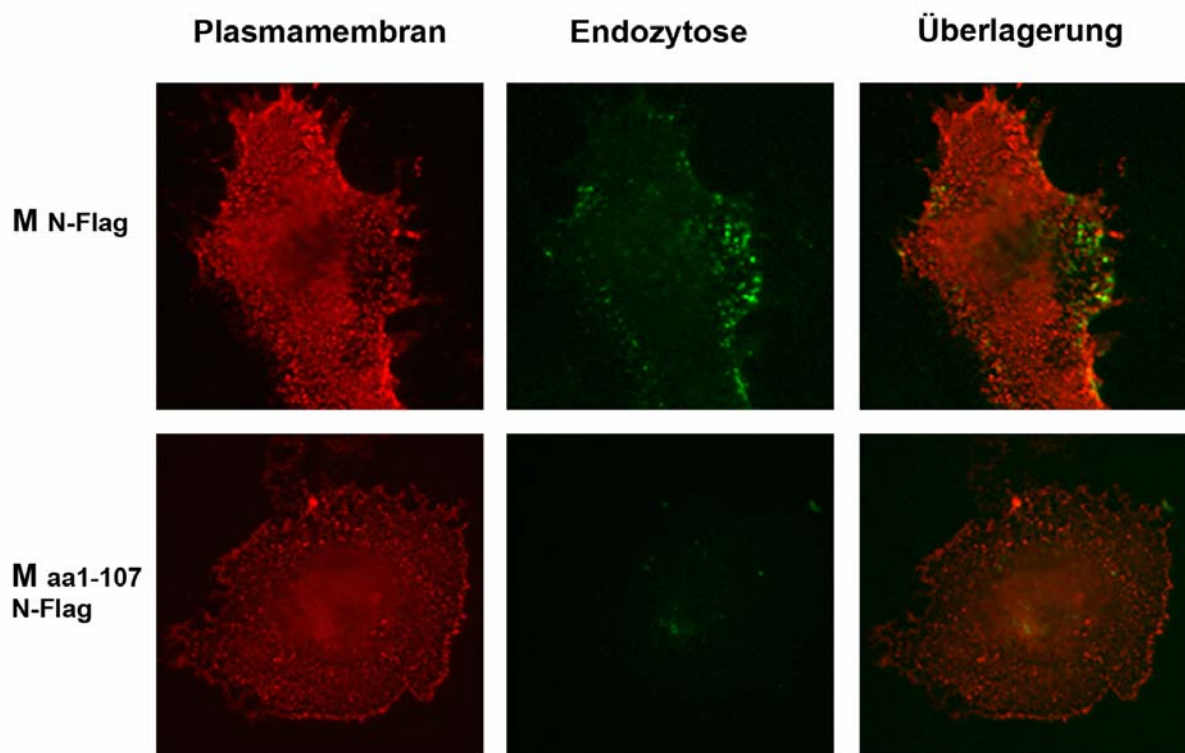


Abbildung 13: Das M-Protein gelangt mittels Endozytose von der Plasmamembran in zytoplasmatische Vesikel – Immunfluoreszenzanalyse.

Das Plasmid pTM1-M_{N-Flag} bzw. pTM1-M_{1-107 N-Flag} wurde in subkonfluente Huh7-Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die nativen Zellen mit dem polyklonalen α -Flag Antikörper bei 4 °C inkubiert. Nach einer Inkubation der Zellen bei 37 °C wurden die an der Oberfläche gebundenen Antikörper mit einem sekundären Rhodamin-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper abgesättigt (*Plasmamembran*). Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert und die aufgenommenen Erstantikörper-M-Komplexe mit einem sekundären FITC-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper detektiert (*Endozytose*; Vogt et al. 2005). Die exprimierten Proteine sind linksseitig angezeigt.

Das M-Protein konnte an der Oberfläche und in einigen wenigen peripheren Vesikeln im Zytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 13, obere Reihe). Das M-Protein mit einem deletierten C-Terminus ($M_{1-107-N-Flag}$) konnte zwar an der Plasmamembran, hingegen nicht in intra-zellulären vesikulären Strukturen beobachtet werden (Abb. 13, untere Reihe). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Endozytose des M-Proteins stattfindet, die spezifisch von dem C-Terminus vermittelt wird. Die Endozytose des M-Proteins scheint jedoch nicht zu einer Akkumulation des Proteins im Golgi-Komplex zu führen.

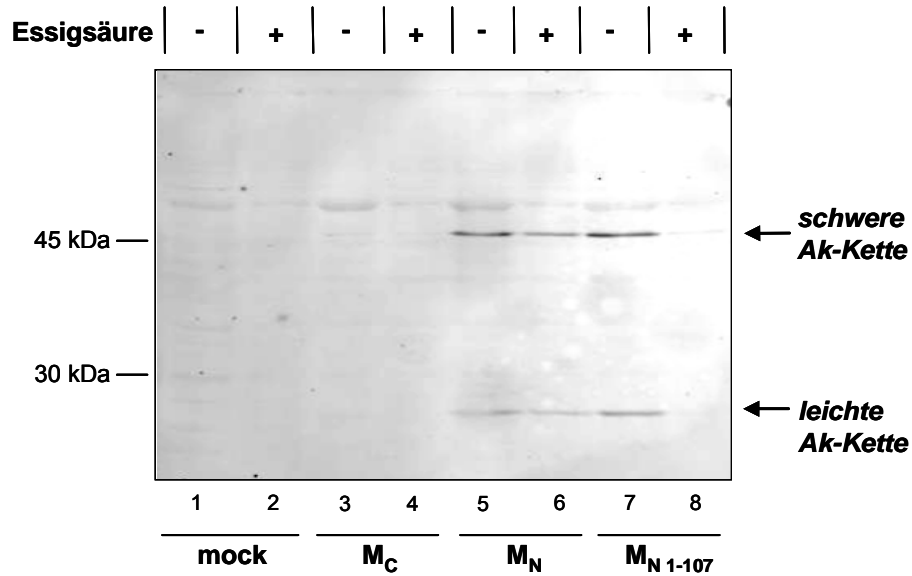
5.6.2 Western Blot-Analyse

Die unter 5.6.1 dargestellten Ergebnisse sollten durch weitere biochemische Analysen verifiziert werden. M-exprimierenden Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion im nativen Zustand mit dem monoklonalen α -Flag M2 Antikörper bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C mit PBS oder mit schwacher Essigsäure behandelt, wodurch die an der Oberfläche gebundenen Antikörper entfernt wurden. Die Zellen wurden im Anschluss lysiert und im SDS-Probenpuffer bei 96 °C aufgeköcht, wodurch die Antikörper-Protein Bindung getrennt wurde. In der Western Blot-Analyse wurden die an der Oberfläche gebundenen bzw. die endozytierten und somit vor der Essigsäure geschützten Antikörper mithilfe eines sekundären AF680-gekoppelten α -Maus Antikörpers auf der Nitrozellulosemembran detektiert. Der Nachweis des endozytierten M-Proteins erfolgte in diesem Versuchsansatz nicht über den direkten Nachweis des M-Proteins (5.6.1), sondern indirekt über die Detektion des gebundenen und „ko-endozytierten“ Antikörpers.

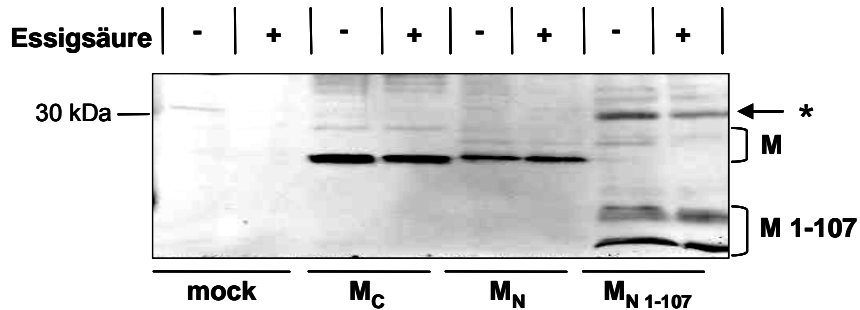
Wie in Abbildung 14 A dargestellt, war M_N in der Lage den α -Flag Antikörper an der Zelloberfläche zu binden (Abb. 14 A, Spur 5) und in die Zelle aufzunehmen. Dies konnte durch die Detektion der schweren (50 kDa) und leichten (25 kDa) Antikörperkette nach PBS- bzw. nach Essigsäureinkubation gezeigt werden (Abb. 14 A, Spur 5 und 6). Die C-terminal deletierte Form von M (M_{N1-107}) konnte ebenso den Antikörper an der Oberfläche der transfizierten Zellen binden (Abb. 14 A, Spur 7). Diese gebundenen Antikörper konnten jedoch nahezu vollständig mit Essigsäure entfernt werden, woraus sich schließen lässt, dass keine bzw. nur eine schwache Endozytose stattgefunden hat (Abb. 14 A, Spur 8). Um die Funktionalität des experimentellen Ansatzes zu demonstrieren, wurde als Negativkontrolle ein M-Konstrukt gewählt, das C-terminal mit einem Flag-Epitop versehen war (M_C). Aufgrund der hieraus folgenden zytoplasmatischen Lokalisation des Flag-Tags war keine Antikörperbindung an der Zelloberfläche zu beobachten (Abb. 14 A, Spur 3 und 4). Das intrazelluläre Expressionsniveau war bei allen eingesetzten Konstrukten vergleichbar (Abb. 14 B). In Abbildung 14 C ist eine quantitative Auswertung des Endozytose-Experimentes dargestellt. Es wurde der Anteil der endozytierten Antikörper im Verhältnis zur Gesamtmenge an gebundenem Antikörper anhand der Intensität der schweren

Antikörperkette im Western Blot bestimmt. Während 72 % des Wildtyp Proteins (M), das an die Oberfläche gelangt, wieder endozytiert wird, ist dieser Wert nach Deletion des C-Terminus ($M_{aa1-107}$) deutlich verringert (28 %). Diese Ergebnisse zeigen, dass das M-Protein mittels Endozytose von der Plasmamembran in das Zytoplasma aufgenommen wird und dass für diesen Prozess der C-terminale Bereich des Proteins essentiell ist.

A



B



C

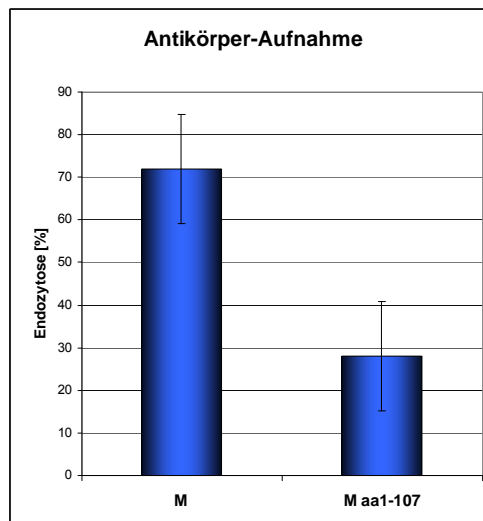
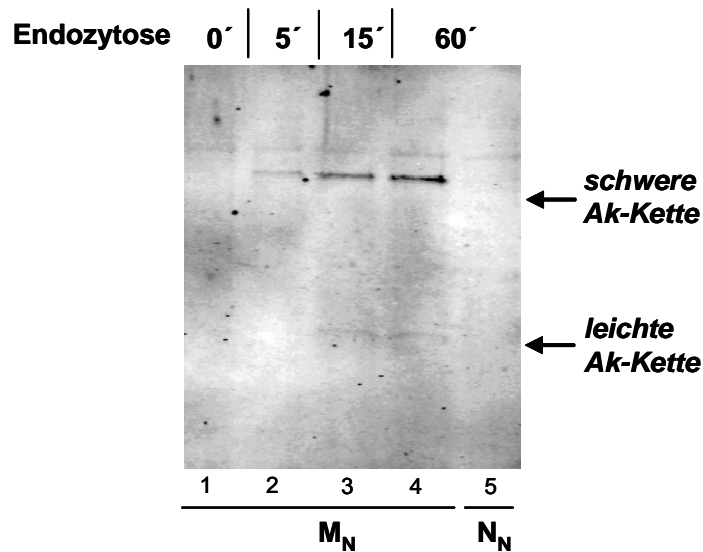
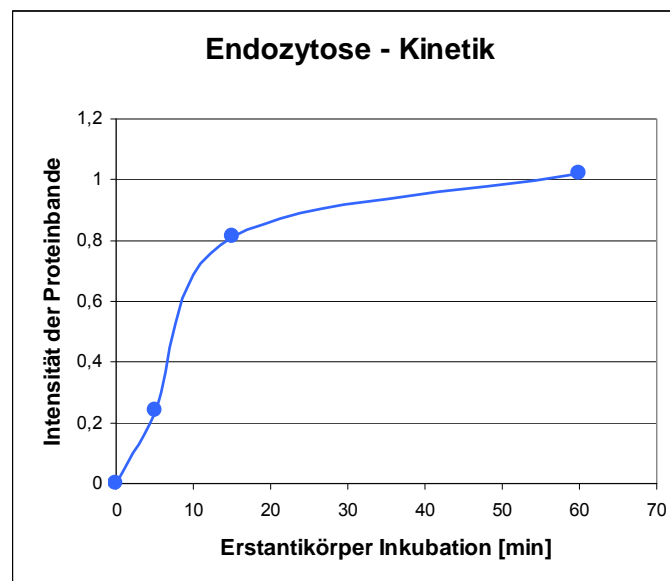


Abbildung 14: Das M-Protein wird von der Plasmamembran endozytiert –Western Blot-Analyse.

Das Plasmid pTM1-M_{C-Flag}, pTM1-M_{N-Flag} bzw. pTM1-M_{1-107 N-Flag} wurde in subkonfluente BHK-T7-Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die nativen Zellen mit dem monoklonalen α -Flag M2 für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C mit PBS oder schwacher Essigsäure behandelt (Haigler et al., 1980; Tan et al. 2004). **(A)** Die Zellen wurden lysiert, bei 95 °C aufgekocht und die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion der mit dem M-Protein endozytierten Antikörper wurde ein Alexa-Fluor 680-gekoppelter α -Maus Antikörper eingesetzt. **(B)** Die Zellen wurden lysiert und die Proteine direkt ohne Aufkochen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Das M-Protein bzw. dessen verkürzte Form wurde durch einen α -Flag M2 Antikörper und einen Alexa-Fluor 680-gekoppelter α -Maus Antikörper nachgewiesen. Auf der rechten Seite sind die Positionen der schweren und leichten Antikörperkette bzw. der viralen Proteine aufgeführt. Linksseitig sind die Positionen des Größenmarkers dargestellt. Bei den mit (*) gekennzeichneten Banden handelt es sich vermutlich um unspezifische zelluläre Proteine. **(C)** Die Proteinbanden der schweren Kette des an der Oberfläche gebundenen und endozytierten Antikörpers wurden mit der Odyssey[®] Software quantifiziert und graphisch dargestellt. Im Diagramm ist der jeweilige Anteil des aufgenommenen Antikörpers an der Gesamtmenge des oberflächengebundenen **und** endozytierten Antikörpers prozentual wiedergegeben. Die exprimierten Proteine sind unterhalb und die Behandlung der Zellen mit Essigsäure durch ein + oberhalb der Abbildung dargestellt.

Um die Aufnahmegeschwindigkeit des M-Proteins zu untersuchen, wurde im Folgenden eine Kinetik durchgeführt (Abb. 15). Hierzu wurden BHK-T7-Zellen mit dem Konstrukt pTM1-M_N transfiziert und 24 Stunden später im nativen Zustand mit einem monoklonalen α -Flag M2 Antikörper bei 37 °C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Im Anschluss wurden die oberflächengebundenen Antikörper bei 4 °C mit Essigsäure entfernt, die Zellen lysiert und die aufgekochten Proben mittels SDS-PAGE analysiert. Schon nach fünfminütiger Erstantikörper-Inkubation konnte die schwere Kette endozytierter Antikörper in den Zelllysaten detektiert werden (Abb. 15 A, Spur 2). Nach 60-minütiger Antikörperinkubation konnte hingegen eine sehr viel prominentere Proteinbande nachgewiesen werden (Abb. 15 A, Spur 4). Die Expression des intrazellulär lokalisierten SARS-CoV N-Proteins diente als Negativkontrolle. Es konnte keine unspezifische Antikörperbindung an der Oberfläche transfizierter Zellen beobachtet werden (Abb. 15 A, Spur 5).

Eine quantitative Auswertung der Kinetik-Studie ist in Abbildung 15 B dargestellt. Während bis ca. 15 Minuten nach Antikörperzugabe eine nahezu lineare Zunahme endozytierter Antikörper zu verzeichnen war, stellte sich in der folgenden halben Stunde ein Maximum ein, welches sich im Diagramm als Plateau widerspiegelt.

A**B****Abbildung 15: Endozytosekinetik des SARS-CoV M-Proteins.**

(A) Das Plasmid pTM1-M_{N-Flag} bzw. pTM1-N_N wurde in subkonfluente BHK-T7-Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die nativen Zellen mit dem monoklonalen α -Flag M2 für die angegebenen Zeiten bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C mit schwacher Essigsäure behandelt. Die Zellen wurden lysiert, bei 95 °C aufgekocht und die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion der mit dem M-Protein endozytierten Antikörper wurde ein Alexa-Fluor 680-gekoppelter α -Maus Antikörper eingesetzt. Auf der rechten Seite sind die Positionen der schweren und leichten Antikörperkette aufgeführt. Die exprimierten Proteine sind unterhalb und die Inkubationszeiten bei 37 °C oberhalb der Abbildung dargestellt. (B) Die Intensität der Antikörperbande der Western Blot-Analyse (Abb. 15 A) wurde quantifiziert und graphisch dargestellt.

5.7 Untersuchungen zur N-Glykosylierung des M-Proteins

Der Vergleich der N-Glykosylierungsrate des M-Proteins unterschiedlicher Coronaviren verdeutlicht, dass das M-Protein des SARS-CoV ungewöhnlich ineffizient modifiziert wird (Klumperman et al., 1994; Voss et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass rekombinantes M-Protein des MHV und des TGEV zu 100 % N-glykosyliert vorliegt (Klumperman et al., 1994). Das M-Protein des SARS-CoV hingegen war in gereinigtem Virus, in Pulse-Chase-Analysen und in *in vitro*-Translationsassays in der unglykosylierten Form (M_0) und der Endo H-sensitiven, mannosereichen Form (M_1) zu etwa gleichen Teilen nachweisbar (Abb. 7; Voss et al., 2006). Die *in vitro*-Expression des M-Proteins des humanen Coronavirus-NL63 (HCoV-NL63) und des SARS-CoV sollte die Glykosylierungseffizienz der beiden Membranproteine unter gleichen Bedingungen gegenüberstellen (Abb. 16).

Während das M-Protein des SARS-CoV in der unglykosylierten (M_0) und der glykosylierten (M_1) Form zu ungefähr gleichen Teilen zu erkennen war, resultierte die Expression des M-Proteins des HCoV-NL63 in der Detektion von drei unterschiedlichen Formen M_0 , M_1 und M_2 . Während die Endo H-sensitive, mannosereiche M_1 -Form am stärksten exprimiert wurde, zeigte sich jeweils nur ein schwaches Signal für die leichtere M_0 - bzw. höhermolekulare M_2 -Form des M-Proteins (Abb. 16 A). Es zeigte sich somit auch hier eine stärkere N-Glykosylierung des M-Proteins des HCoV-NL63 im Vergleich zum homologen Protein des SARS-CoV. Das Auftreten einer schwereren, Endo H-sensitiven Form (M_2) lässt vermuten, dass das M-Protein des HCoV-NL63 an zwei der drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen modifiziert wird (Müller et al., 2007; van der Hoek et al., 2004). Bisherige *in silico*-Vorhersagen der Topologie des verwandten HCoV-NL63 M-Proteins und die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Analysen lassen eine dem TGEV M-Protein vergleichbare Topologie vermuten (Müller et al., 2007; Pyrc et al., 2006; Risco et al., 1995). Mithilfe von Substitutionsmutanten ließen sich in zukünftigen Untersuchungen aktive N-Glykosylierungsstellen der drei potentiellen Konsensussequenzen identifizieren und die vermutete $N_{\text{exo}}\text{-}C_{\text{exo}}$ -Topologie des HCoV-NL63 M-Proteins verifizieren.

In weiteren Analysen sollte nun der Einfluss benachbarter und möglicherweise interagierender Moleküle des SARS-CoV M-Proteins untersucht werden (siehe schematische Darstellung in Abbildung 16 B). Der Nachweis von Homooligomeren des MHV M-Proteins führte zu der Vermutung, dass die Glykosylierung eines M-Proteins durch die Glykanstrukturen benachbarter Moleküle des Proteins inhibiert werden könnte, wie es auch für das Glykoprotein des Tollwutvirus postuliert wird (de Haan et al., 2000; Wojczyk et al., 2005). Diesen negativen sterischen Einfluss vorausgesetzt, sollte sich die Glykosylierungsrate des SARS-CoV M-Proteins erhöhen, je weniger benachbarte Glykanstrukturen vorhanden sind. Hierzu wurde das M-Protein mit einem C-terminalen Flag-Epitop (M_C) einzeln bzw. zusammen mit der glykosylierungsdefizienten Mutante M_{N4Q} in

Während die Expression des M-Proteins wie erwartet zu zwei Proteinformen führte (Abb. 16 C, Spur 1), war bei der Expression der glykosylierungsdefizienten Mutante nur die unglykosylierte Form des Proteins detektierbar (Abb. 16 C, Spur 2). Die Menge des N-glykosylierten M-Proteins zeigte nach Einzel- und nach Koexpression mit der Mutante M_{N4Q} keinerlei Unterschiede (Abb. 16 C, obere Bande in Spur 1 und 3). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die unterdrückte N-Glykosylierung eines Moleküls keinen stimulierenden Einfluss auf die Glykosylierung interagierender Moleküle des M-Proteins ausübt und die unvollständige Glykosylierung des M-Proteins somit wahrscheinlich nicht durch sterische Hinderungen zu erklären ist.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, welche Bedeutung die N-Glykosylierung für den intrazellulären Transport des M-Proteins hat. In Abbildung 17 A ist die Einzelexpression der Flag-markierten Substitutionsmutante $M_{N4Q-N-Flag}$ mittels Immunfluoreszenzanalyse dargestellt. Die Anfärbung erfolgte mit einem gegen das Flag-Epitop gerichteten polyklonalen α -Flag Antikörper und einem spezifisch das ERGIC markierenden α -ERGIC Antikörper. Die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale machte eine Lokalisation der M-Mutante in dem ERGIC im perinukleären Raum sichtbar. Um zu untersuchen, ob die N-Glykosylierung des M-Proteins einen Einfluss auf dessen Transport zur Plasmamembran hat (siehe auch Abb. 12), wurden Huh7-Zellen mit dem Plasmid $pTM1-M_{N4Q-N-Flag}$ bzw. $pTM1-M_{N-Flag}$ transfiziert und die Zelloberfläche im nativen Zustand mit einem polyklonalen α -Flag Antikörper inkubiert und vollständig abgesättigt (Abb. 17 B). Nach Inkubation mit einem Texas Red-gekoppelten Zweitantikörper wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das intrazelluläre M-Protein mit einem polyklonalen α -Flag und einem FITC-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper nachgewiesen. Im Vergleich von Wildtyp M-Protein und der glykosylierungsdefizienten Mutante M_{N4Q} (Abb. 17 B, linkes Bild) zeigen sich weder in der intrazellulären Verteilung, noch im Oberflächentransport Unterschiede. Dies bedeutet, dass die N-Glykosylierung des SARS-CoV M-Proteins keinen Einfluss auf den intrazellulären Transport ausübt.

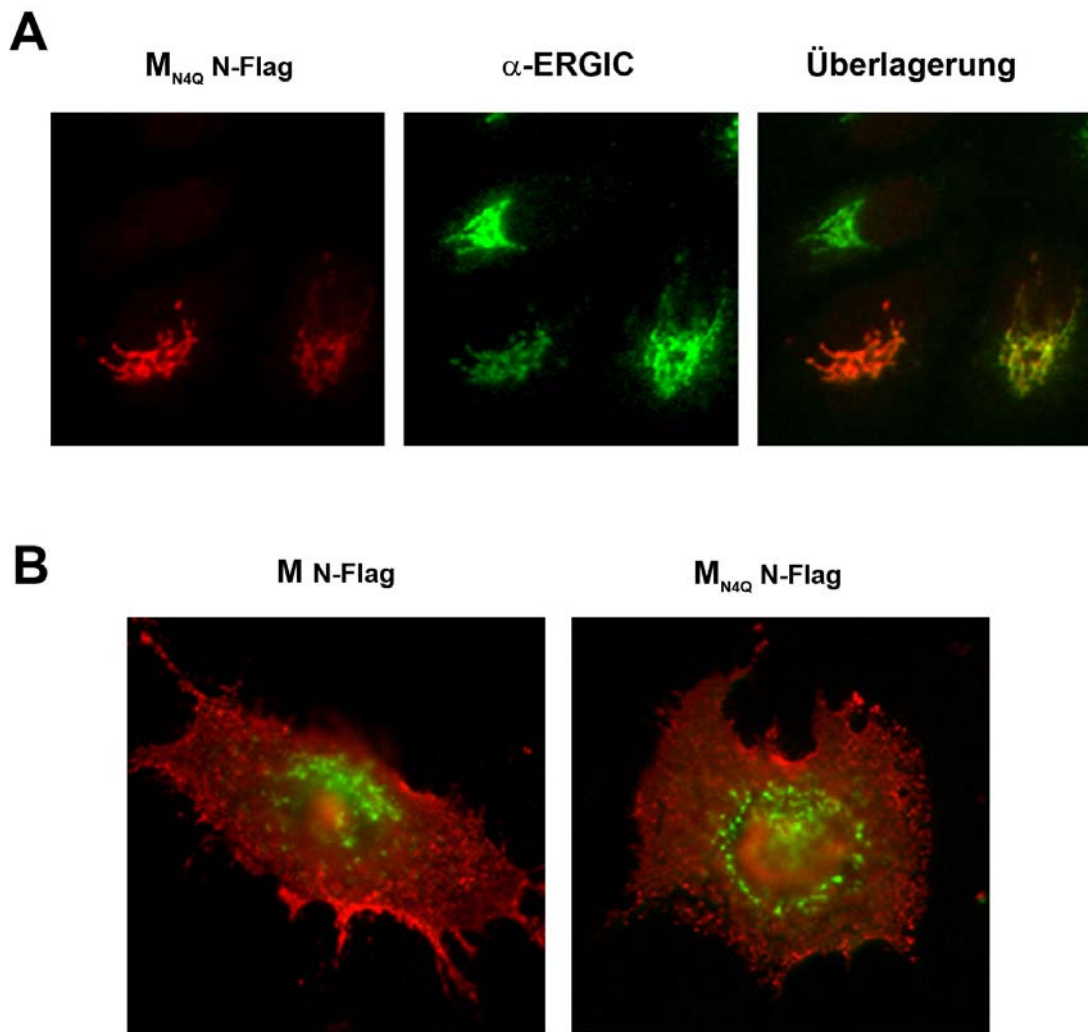


Abbildung 17: Die N-Glykosylierung des M-Proteins hat keinen Einfluss auf den intrazellulären Transport des Proteins.

(A) Zur Einzelexpression des M_{N4Q} -Proteins wurden subkonfluente Huh7-Zellen mit dem Plasmid pTM1- M_{N4Q} N-Flag transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem polyklonalen α -Flag Antikörper und einem α -ERGIC 53 Antikörper sowie einem Rhodamin-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper und einem FITC-gekoppelten α -Maus Antikörper gefärbt. (B) Die Plasmide p-TM1- M_{N-Flag} und pTM1- M_{N4Q} N-Flag wurden einzeln in subkonfluenten Huh7-Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die nativen Zellen mit dem polyklonalen α -Flag Antikörper und einem sekundären Rhodamin-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem polyklonalen α -Flag Antikörper und einem sekundären FITC-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper gefärbt. Die exprimierten Proteine sind jeweils oberhalb der Bilder angezeigt.

5.8 Koexpression des M- und S-Proteins

Das M-Protein der Coronaviren übt im Assemblierungsprozess zentrale Funktionen aus, indem es selektiv das virale RNA-Genom innerhalb des Nukleokapsids mit weiteren viralen Strukturkomponenten zusammenführt. Auch das für die Bindung des zellulären Rezeptors und somit für die Infektiosität des Virus essentielle S-Protein wird durch das M-Protein in die Membran des viralen Partikels eingebaut (Huang et al., 2004b; Nguyen & Hogue, 1997; Opstelten et al., 1993). Untersuchungen zur Morphogenese des MHV konnten zeigen, dass schon sehr früh innerhalb des sekretorischen Weges in prä-Golgi-Kompartimenten M-S-Komplexe nachweisbar waren (Opstelten et al., 1993; Opstelten et al., 1995). Das S-Protein der meisten Coronaviren (wie z.B. BCoV, IBV, MHV und TGEV) wird aufgrund eines Retentionssignales in der zytoplasmatischen Domäne nicht zur Plasmamembran transportiert, sondern im Zytoplasma zurückgehalten (Lontok et al., 2004; Schwegmann-Wessels et al., 2004). Das S-Protein des SARS-CoV konnte hingegen nach transients Expression an der Zelloberfläche detektiert werden (Hofmann et al., 2004; Schwegmann-Wessels et al., 2004; Simmons et al., 2004).

Es war nun von Interesse, inwieweit sich die intrazelluläre Verteilung des SARS-CoV S-Proteins in Anwesenheit des M-Proteins verändert. Hierzu wurde zunächst die Lokalisation des S-Proteins während transients Expression im Vergleich zu einer SARS-CoV Infektion untersucht (Abb. 18 A). Es wurden Huh7-Zellen mit dem Plasmid pcDNA3.1-S transfiziert und 24 Stunden später fixiert und permeabilisiert. Das rekombinante S-Protein wurde mit einem polyklonalen α -S Antikörper sowie einem Rhodamin-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper nachgewiesen (Abb. 18 A, linkes Bild). Die SARS-CoV infizierten Vero-Zellen wurden einen Tag nach der Infektion fixiert, permeabilisiert und mit einem humanen monoklonalen α -S Antikörper und einem FITC-gekoppelten α -human Antikörper inkubiert (Abb. 18 A, rechtes Bild). Während das rekombinante S-Protein granulär an der Plasmamembran und an intrazellulären Membranen assoziiert vorlag, war das S-Protein in der infizierten Zelle hauptsächlich im perinukleären Raum lokalisiert. Dieses Ergebnis deutet auf einen veränderten Transportweg des S-Proteins in Anwesenheit weiterer viraler Proteine, wie z.B. dem M-Protein, im Vergleich zur transients Einzelexpression des Proteins hin. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass nach Koexpression das S-Protein des SARS-CoV durch das M-Protein vermehrt in den perinukleären Raum rekrutiert wird (McBride et al., 2007).

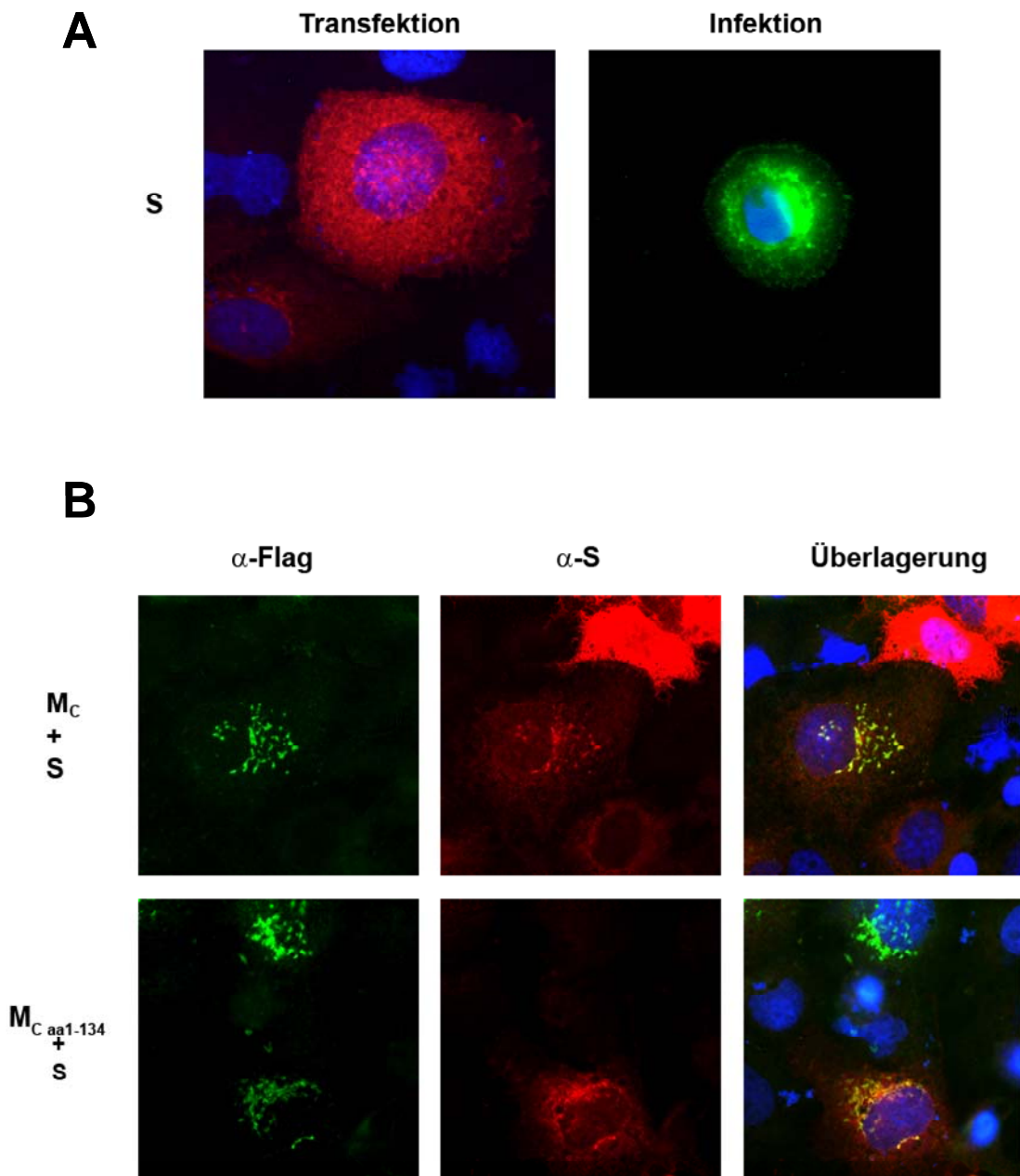


Abbildung 18: Koexpression des M-Proteins führt zu einer veränderten Lokalisation des S-Proteins.

(A) Zur Einzeldisplay des S-Proteins wurden subkonfluente Huh7-Zellen mit dem Plasmid pcDNA3.1-S transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem polyklonalen α -S S1S2 Antikörper und einem Rhodamin-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper gefärbt (linkes Bild). SARS-CoV infizierte Vero-Zellen wurden 24 h nach Infektion fixiert, permeabilisiert und mit dem polyklonalen α -S S1S2-Antikörper und einem FITC-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper inkubiert. (B) Subkonfluente Huh7-Zellen wurden mit den Plasmiden pTM1-M_C-Flag bzw. M_{1-134 C}-Flag und pcDNA3.1-S koexprimiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen α -Flag M2 Antikörper und einem polyklonalen α -S S1S2 Antikörper sowie einem sekundären FITC-gekoppelten α -Maus und einem Rhodamin-gekoppelten α -Kaninchen Antikörper gefärbt.

Ergänzend sollte nun der Einfluss der zytoplasmatischen Domäne des M-Proteins auf die Interaktion mit dem S-Protein untersucht werden. Hierzu wurden Huh7-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3.1-S und pTM1-M_C bzw. pTM1-M_C 1-134 kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die rekombinanten Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert (Abb. 18 B). Nach Expression des Wildtyp M-Proteins konnte wie erwartet eine perinukleäre Färbung des M-Proteins beobachtet werden (Abb. 18 B, obere Reihe, linkes Bild). In dieser exemplarisch ausgewählten M-exprimierenden Zelle konnte außerdem das S-Protein in denselben Strukturen detektiert werden, was durch die Überlagerung der beiden Signale deutlich wurde (Abb. 18 B, obere Reihe, rechtes Bild). Im Bildausschnitt ist weiterhin die typische Verteilung einer nur S-exprimierenden Zelle, welches sich durch eine prominente Oberflächenfärbung äußerte, dargestellt. In dieser Zelle fand sich keine spezifische Färbung für das M-Protein (Abb. 18 B, obere Reihe, linkes Bild).

Die Überlagerung der Signale der Koexpressionsstudien des C-terminal verkürzten M-Proteins mit dem S-Protein spiegelt ebenso eine Rekrutierung des S-Proteins in perinukleäre Bereiche durch das verkürzte M-Protein wieder (Abb. 18 B, untere Reihe). Diese Ergebnisse stützen die Resultate früherer Analysen, die einen Einfluss des M-Proteins auf die intrazelluläre Verteilung des S-Proteins entdecken konnten (McBride et al., 2007). Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Deletion des zytoplasmatischen Bereiches des M-Proteins keine Auswirkungen auf dessen Interaktion mit dem S-Protein besitzt.

5.9 Studien zur adenoviralen Expression von Strukturproteinen des SARS-CoV

Im Folgenden sollte ein möglicher Einfluss der Glykosylierung des M-Proteins auf die Assemblierung neuer Viren mithilfe von VLPs untersucht werden. In der Literatur sind unterschiedliche Angaben über die für die Bildung der VLPs essentiellen SARS-CoV Proteine vertreten. Sowohl die beiden Membranproteine M und E (Hsieh et al., 2005; Mortola & Roy, 2004) als auch M- und das Nukleokapsidprotein (N) gelten als minimale und ausreichende virale Bausteine für die Generierung von VLPs des SARS-CoV (Huang et al., 2004b). Ein Grund für die kontroversen Resultate könnte in den unterschiedlichen Expressionssystemen und somit möglicherweise verschiedenen Assemblierungsmechanismen zu finden sein. Aufgrund eines schwachen Expressionsniveaus konnten in dieser Arbeit mittels eines Plasmid-gestützten Koexpressionsansatzes keine VLPs generiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen von Huang et al., die aus dem Überstand M- und N-exprimierender Zellen nur eine geringe Menge an VLPs gewinnen konnten (Huang et al., 2004b). Zur Erhöhung sowohl der Expressionsrate der SARS-CoV spezifischen Proteine als auch der Effizienz des

Gentransfers in die Zellen, wurden rekombinante Adenoviren hergestellt (Abb. 5). Das hierzu verwendete „AdEasy™ Adenovirale Vektor System“ beruht auf der Konstruktion replikationsdefizienter rekombinanter Adenoviren (He et al., 1998).

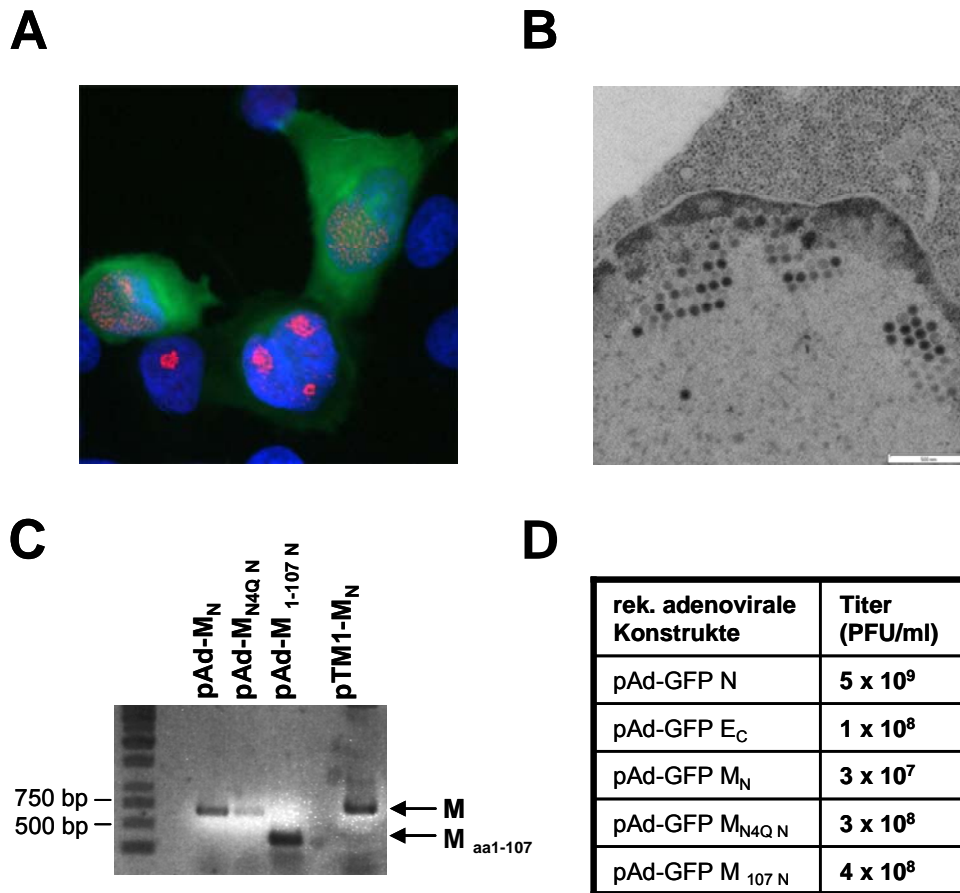


Abbildung 19: Charakterisierung rekombinanter Adenoviren zur Expression viraler Strukturproteine des SARS-CoV.

(A) HER 911-Zellen wurden mit dem rekombinanten Adenovirus pAd-GFP M_{N4Q} infiziert und 24 h später fixiert, permeabilisiert und das adenovirale E2A-Protein mit einem monoklonalen α -E2A Antikörper gefärbt. (B) Für elektronenmikroskopische Analysen wurden HER 911-Zellen mit dem rekombinanten Adenovirus pAd-GFP M_{N4Q} mit einer MOI von 5 infiziert und 24 h später mit PFA und Osmiumtetroxid fixiert. Die dehydrierten Proben wurden in einem Epon-Aceton Gemisch eingebettet und einzelne Schnitte mittels Transmissionselektronenmikroskopie ausgewertet. (C) Zum Nachweis der in das adenovirale Genom integrierten SARS-CoV ORFs wurden jeweils 5 μ l der Virussuspensionen mit Proteinase K bei 55 °C inkubiert. Mittels PCR und durch den Einsatz von genspezifischen Primern wurden die spezifischen Fragmente amplifiziert und in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Oberhalb der Abbildung sind die jeweils eingesetzten Templates (adenovirale DNA) dargestellt und rechtsseitig die Abkürzungen der spezifischen Genprodukte den DNA-Banden zugeordnet. (D) HeLa-Zellen wurden auf 4-Kammer-Objektträger ausgesät und am darauf folgenden Tag mit unterschiedlichen Virusverdünnungen der zu titrierenden Virussuspension infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen α -E2A Antikörper gefärbt. Die Auswertung der Titrierung der einzelnen rekombinanten Adenoviren ist in einer Tabelle wiedergegeben.

Der offene Leserahmen des zu exprimierenden Proteins, in diesem Fall das SARS-CoV N-, E-, M- sowie die mutierte Form des M-Proteins, wurde zunächst in einen Shuttle-Vektor (pAdTrack-CMV) unter der Kontrolle des Zytomegalievirus (CMV) Promotors kloniert. Definierte Sequenzen dieses resultierenden Konstruktes wurden über homologe Rekombination in den adenoviralen Vektor pAdEasy-1 integriert. Das resultierende, ca. 36 kbp große Konstrukt trug die gesamte genetische Information des Adenovirus des Serotyps 5 (Ad5) außer dem E1-Gen, welches für eine effiziente Replikation des viralen Genoms essentiell ist. Zusätzlich kodiert der Vektor für das GFP-Gen und für jeweils ein SARS-CoV spezifisches Gen. Es wurden nun HEK 293 Zellen, die den Defekt im viralen Genom durch die konstitutive Expression des E1 Proteins kompensieren, mit dem rekombinanten adenoviralen Konstruktes transfiziert. In diesen Zellen konnte das virale Genom replizieren und das neue rekombinante Adenovirus amplifiziert werden. Drei Tage nach der Transfektion konnten vereinzelt GFP-fluoreszierende Zellen beobachtet werden, was ein Indikator für die Bildung rekombinanter Adenoviren war. Die für Adenoviren typischen nukleären Replikationszentren konnten zu diesem Zeitpunkt durch die Anfärbung mit einem Antikörper gegen das adenovirale E2A-Protein sichtbar gemacht werden (Abb. 19 A). 8 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen durch drei Zyklen Einfrieren/Auftauen in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und der Überstand für weitere Amplifikationsschritte bzw. für Infektionsstudien verwendet. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von infizierten Zellen konnten die schon erwähnten nukleären adenoviralen Replikationszentren sichtbar machen (Abb. 19 B). Es konnten keine morphologischen Unterschiede nach Infektion der einzelnen rekombinanten Adenoviren mit den verschiedenen SARS-CoV Genen entdeckt werden. Zur Verifizierung der SARS-CoV spezifischen Gene in den rekombinanten Adenoviren wurden unterschiedlichen Virusinokula mit Proteinase K versetzt, aufgeköcht und in einem PCR-Ansatz mit genspezifischen Primern analysiert. Als Kontrolle diente das Konstrukt pTM1-M_N. In Abbildung 19 C sind die im Agarose-Gel aufgetrennten PCR-Produkte dargestellt und die SARS-CoV spezifischen Banden mit einem Pfeil markiert. In allen Virusstocks konnte das jeweils integrierte Gen des SARS-CoV detektiert werden. Zur Bestimmung des Titers wurden die rekombinanten Virusstocks sequenziell verdünnt und mit den Virusverdünnungen HeLa-Zellen infiziert. Einen Tag nach der Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen das adenovirale E2A-Protein gefärbt. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurden E2A-positive Zellen ausgezählt und die Anzahl abhängig von dem jeweiligen Verdünnungsfaktor in das Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt. Die quantitative Auswertung der unterschiedlichen Adenovirus-Konstrukte ergab Virustiter zwischen 3×10^7 bis 5×10^9 (Abb. 19 D).

Zur Expression der SARS-CoV Proteine wurden HeLa-Zellen mit den rekombinanten Adenoviren mit einer MOI von 5 infiziert und die Zellysate einen Tag nach der Infektion

geerntet. Eine erfolgreiche Infektion wurde durch die GFP-Expression infizierter Zellen verfolgt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Membran in der Western Blot-Analyse mit einem monoklonalen α -Flag Antikörper sowie einem AF680-gekoppelter α -Maus Antikörper inkubiert. Während das in dem pAd-GFP Konstrukt integrierte N in den infizierten Zellen exprimiert wurde, war das M-Protein und auch die glykosylierungsdefiziente Mutante M_{N4Q} nicht in den Zelllysaten nachweisbar.

Zusammenfassend kann sagen, dass SARS-CoV spezifische Gene in rekombinante Adenoviren integriert werden konnten und diese Adenoviren sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrem Wachstumsverhalten keine atypischen Auffälligkeiten zeigten. Eine Expression der SARS-CoV Proteine M und E konnte hingegen in diesem System nicht erzielt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Expression der coronaviralen Proteine in diesem System durch den Zytomegalievirus (CMV)-Promotor reguliert und die synthetisierte RNA nukleären Prozessierungsmechanismen ausgesetzt ist. Mithilfe des Programms GENSCAN konnte eine potentielle Splice-Site innerhalb der viralen Nukleotidsequenz identifiziert werden, die für das M-Protein kodiert (Burge & Karlin, 1997). Das Produkt dieser katalytischen Reaktion wäre eine ca. 170 bp-große Deletion innerhalb der mRNA und somit ein stark verkürztes M-Protein mit nur einer Transmembrandomäne und unbekannter Stabilität. Eine schwache bzw. vollständig unterdrückte Expression von SARS-CoV und TGEV Proteinen unter der Kontrolle des CMV-Promotors konnte auch in anderen Arbeiten beobachtet werden (Schwegmann-Wessels et al., 2004; Simmons et al., 2004).

5.10 Untersuchungen zur Bedeutung der N-Glykosylierung des M-Proteins im viralen Kontext mithilfe eines rekombinanten SARS-CoV

Um den Einfluss der N-Glykosylierung des M-Proteins auf die Assemblierung neuer Virionen zu untersuchen, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Drosten (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg) ein infektiöser cDNA-Klon des SARS-CoV mit einer mutierten Glykosylierungsstelle im M-Protein hergestellt. Die Schwierigkeiten bei der Konstruktion eines cDNA-Klons der Coronaviren liegen insbesondere in der enormen Größe des viralen Genoms und der Instabilität coronaviraler Gensequenzen in Bakterien. Diese Hindernisse konnten durch den Einsatz von Bac-Vektoren und durch die *in vitro*-Ligation von viralen cDNA-Fragmenten überwunden werden. In den letzten Jahren konnten cDNA-Klone von IBV, TGEV und MHV synthetisiert werden (Almazan et al., 2000; Casais et al., 2001; Yount et al., 2000; Yount et al., 2002). Erst kürzlich wurde die Herstellung eines cDNA-Klons des SARS-CoV basierend auf einem Bac-Vektor veröffentlicht (Almazan et al., 2006).

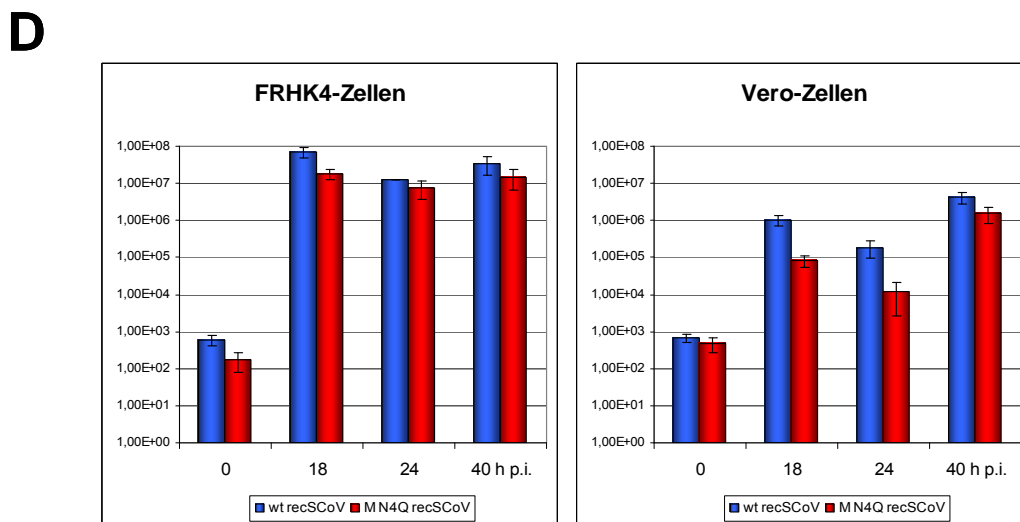
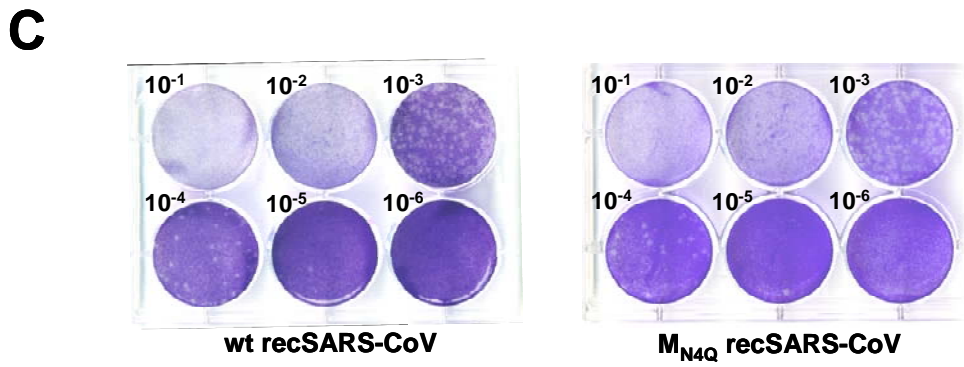
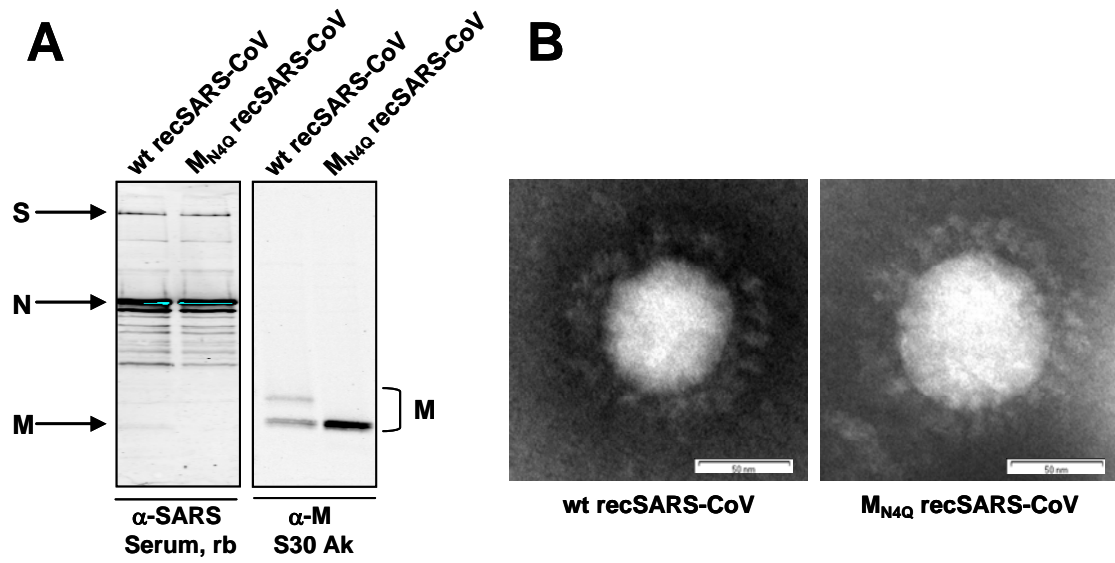


Abbildung 20: Ein rekombinantes SARS-CoV mit einem glykosylierungsdefizientem M-Protein repliziert und zeigt keine morphologischen Unterschiede zum Wildtyp-Virus.

(A) Vero-Zellen wurden mit dem Wildtyp rekombinanten SARS-CoV bzw. dem mutierten Virus (M_{N4Q}) mit einer MOI von 3 infiziert und das Zelllysate 24 h später in CoIP-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden zur Inaktivierung mit SDS versetzt, auf 96 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Zum Nachweis der viralen Strukturproteine wurde die Membran mit dem Serum eines immunisierten Kaninchens inkubiert. Zur Detektion des M-Proteins wurde der humane monoklonale S30-Antikörper eingesetzt. Auf der linken und rechten Seite wurden die Abkürzungen der Hauptstrukturproteine des SARS-CoV den spezifischen Banden zugeordnet. Oberhalb sind die Abkürzungen der eingesetzten rekombinanten Viren und unterhalb die verwendeten Erstantikörper dargestellt. (B) Vero-Zellen wurden mit einer MOI von 1 mit dem rekombinanten Wildtyp Virus bzw. dem mutierten rekombinanten Virus infiziert und 24 h später die Viren im Zellüberstand mit 4 % PFA und 0,1 % Glutaraldehyd fixiert. Die Proben wurden nach dem Prinzip der Negativ-Färbung mit Phosphotungstic-Säure gefärbt und im Elektronenmikroskop ausgewertet. (C) Die Virussuspension der beiden rekombinanten Viren wurde seriell verdünnt und Vero-Zellen hiermit infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und anschließend die adhärenenten, lebenden Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Somit konnten die zytopathischen Zellen (Plaques) sichtbar gemacht werden. (D) FRHK4- bzw. Vero-Zellen wurden mit einer MOI von 0,05 mit dem rekombinanten Wildtyp-Virus bzw. dem mutierten rekombinanten Virus infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde 100 µl des Zellüberstandes abgenommen und die Anzahl viraler Genomkopien mittels Echtzeit-RT-PCR und Amplifizierung des viralen Polymerase-Gens im Lightcycler quantifiziert. Die Auswertung des Experimentes ist graphisch dargestellt.

Nachdem der volle Länge Klon des SARS-CoV mit einem mutierten M-Protein zur Verfügung stand (M_{N4Q} recSARS-CoV), wurde das Konstrukt enzymatisch linearisiert und die cDNA *in vitro*-transkribiert. Anschließend wurde die virale RNA in BHK-T7-Zellen mittels Elektroporation transferiert und der Überstand nach 24 Stunden auf suszeptible Zellen (Vero-Zellen) übertragen. Um mögliche Kontaminationen der Virussuspensionen auszuschließen, wurden das Wildtyp-Virus und das rekombinante mutierte Virus einer zweimaligen Plaque-Aufreinigung unterzogen. Zum Nachweis der viralen Strukturproteine wurden subkonfluente Vero-Zellen mit dem aufgereinigten Wildtyp-Virus bzw. dem mutierten Virus infiziert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand verworfen und die Zellen in CoIP-Puffer und SDS lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE analysiert. Die Membran wurde mit dem Serum eines mit inaktiviertem SARS-CoV immunisierten Kaninchens inkubiert (Abb. 20 A, linke Seite). Das N-Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 46 kDa ist durch eine prominente Proteinbande repräsentiert. Außerdem konnte das 180 kDa große S-Protein und eine schwache Proteinbande, die vermutlich das M-Protein darstellt, detektiert werden. Der Einsatz des spezifischen monoklonalen α -M S30-Antikörpers konnte diese Vermutung bestätigt werden (Abb. 20 A, rechte Seite). Im Zelllysate der mit dem rekombinanten Wildtyp-Virus infizierten Zellen konnte sowohl die unglykosylierte als auch die N-glykosylierte Form des M-Proteins nachgewiesen werden. Nach der Infektion der Zellen mit dem rekombinanten mutierten Virus (M_{N4Q} recSARS-CoV) wurde hingegen wie erwartet nur das unglykosylierte M-Protein detektiert. Dieses Ergebnis und eine Sequenzierungsanalyse konnte die erfolgreiche Konstruktion eines replizierenden, rekombinanten SARS-CoV mit einem

glykosylierungsdefizienten M-Protein verifizieren. Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen sollte die Morphologie der beiden unterschiedlichen rekombinanten Viren miteinander verglichen werden. Hierzu wurden Vero-Zellen mit den beiden unterschiedlichen rekombinanten Viren mit einer MOI von 1 infiziert und 24 Stunden später wurde der Zellüberstand mit PFA und Glutaraldehyd fixiert. Nach der Negativ-Färbe-Methode wurden die viralen Partikel mithilfe der Elektronenmikroskopie ausgewertet (Abb. 20 B). Die Größe der Partikel des rekombinanten Wildtyp und des rekombinanten mutierten SARS-CoV betrug im Durchschnitt ca. 85 nm (exklusive S-Protein) und unterschied sich somit nicht von der Größe authentischer Virionen. Es waren außerdem keine morphologischen Unterschiede in der charakteristischen „Kronenähnlichen“ Anordnung des S-Proteins der rekombinanten SARS-Coronaviren zu erkennen. Die Analyse der Plaquemorphologie infizierte Zellen sollte erste Hinweise auf mögliche Unterschiede in der Infektion und der Ausbreitung der unterschiedlichen rekombinanten Viren in einem Zellrasen liefern (Abb. 20 C). Die Infektion subkonfluenter Vero-Zellen erfolgte in 6 well-Zellkulturplatten nach serieller Verdünnung der Virussuspensionen der beiden rekombinanten Viren. Nach einer Stunde wurde das Inokulum abgenommen und die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mit PFA fixiert und adhärente, lebende Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Die Infektion mit beiden rekombinanten Viren führte zur Ausbildung von kleinen runden Plaques, die bei der Infektion mit den Virusverdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} vereinzelt und gut zu erkennen waren. Sowohl die Anzahl der Plaques als auch deren Form unterschied sich nach Infektion mit dem rekombinanten mutierten SARS-CoV (M_{N4Q} recSARS-CoV) bzw. dem rekombinanten Wildtyp SARS-CoV (wt recSARS-CoV) nicht. Für beide Virussuspensionen konnte ein Titer von ca. 2×10^6 pro ml bestimmt werden (zwei Plaques nach Infektion mit 100 μ l der Virusverdünnung 10^{-5}).

Mithilfe einer Wachstumskinetik sollte die Replikation der rekombinanten Viren auf zwei unterschiedlichen Zelllinien (Vero- und FRHK4-Zellen) untersucht werden (Abb. 20 D). Hierzu wurden subkonfluente Vero- bzw. FRHK4-Zellen mit einer MOI von 0,05 mit dem mutierten bzw. dem Wildtyp rekombinanten SARS-CoV infiziert. Nach einer Stunde wurde das Inokulum abgenommen, die Zellen mit sterilem PBSdef gewaschen und die RNA aus einer Probe des frischen Zellüberstandes isoliert (0 h-Wert). Zu den angegebenen Zeitwerten wurden weitere Proben genommen und die RNA extrahiert. Durch die anschließende Echtzeit-RT-PCR des viralen Polymerase-Gens konnte die Anzahl viraler Genomkopien im Überstand infizierter Zellen zu den definierten Zeitpunkten bestimmt werden. Eine schematische Auswertung des Experimentes ist in Abbildung 20 D wiedergegeben. Die Infektion mit dem rekombinanten Wildtyp SARS-CoV führte in FRHK4-Zellen innerhalb von 18 Stunden zu einer Zunahme viraler Genomkopien um fünf bzw. sechs log-Stufen. In den Proben folgender Zeitwerte kam es nur zu geringfügigen Veränderungen dieses Virustiters

von ca. 8×10^7 (Abb. 20 D, linkes Schema, blaue Balken). Die Auswertung der PCR-Proben nach Infektion mit dem rekombinanten mutierten SARS-CoV brachte ähnliche Ergebnisse. Nach 40 Stunden wurde ein Virustiter von ca. 2×10^7 gemessen (Abb. 20 D, linkes Schema, rote Balken). Es konnten demnach keine signifikanten Unterschiede im Virustiter nach Infektion von FRHK4-Zellen mit den unterschiedlichen rekombinanten Viren beobachtet werden.

Durch die Infektion von Vero-Zellen mit den rekombinanten Viren sollten die gewonnenen Erkenntnisse überprüft werden (Abb. 20 D, rechtes Schema). Während beim „Viruseinsatz“ (0 h-Wert) keine Unterschiede nach der Infektion der beiden rekombinanten Viren detektiert werden konnten, zeigte sich 18 Stunden bzw. 24 Stunden nach der Infektion ein um das zehnfache höherer Titer des rekombinanten Wildtyp-Virus (Abb. 20 D, rechtes Schema, blaue Balken) im Vergleich zum rekombinanten mutierten SARS-CoV (Abb. 20 D, rechtes Schema, rote Balken). Dieser Unterschied in der Anzahl viraler Genomkopien konnte hingegen in der späten Phase der Infektion (40 h-Wert) nicht mehr nachgewiesen werden. Der in der frühen Phase beobachtete schnelle Zuwachs viraler Genomkopien war in infizierten Vero-Zellen im Vergleich mit den infizierten FRHK4-Zellen weniger prominent. 18 Stunden nach der Infektion lag der Wert des Virustiters infizierter Vero-Zellen mit 3×10^6 um 2 log-Stufen unter dem Wert des Titers infizierter FRHK4-Zellen.

Es lässt sich somit feststellen, dass das rekombinante Wildtyp SARS-CoV und das rekombinante mutierte SARS-CoV zu gleichen Virustitern heranwachsen. In infizierten Vero-Zellen konnte in der frühen Infektionsphase eine verzögerte Replikation viraler Partikel des mutierten SARS-CoV beobachtet werden.

6 Diskussion

In den vergangenen fünf Jahren konnten drei bislang unbekannte humanpathogene Coronaviren, das HCoV-NL63, das HCoV-HKU1 und das SARS-CoV, identifiziert werden. Das SARS-CoV stellt durch eine Mortalitätsrate von bis zu 10 % ein erhebliches gesundheitspolitisches Gefährdungspotential für den Menschen dar (Drosten et al., 2003; van der Hoek et al., 2004; Woo et al., 2005). Die hohe Rekombinationsrate und ein breites Wirtsspektrum begünstigen die Coronaviren durch einen Wirtswechsel vom Tier auf den Menschen überzugehen und, wie bei SARS eindrücklich gezeigt, in der menschlichen Population Epidemien auszulösen. Eine Voraussetzung für die Entwicklung eines modernen Impfstoffes ist die Erforschung der Synthese, der Prozessierung und der Funktion viraler Proteine innerhalb des viralen Lebenszyklus.

Das M-Protein der Coronaviren spielt eine Schlüsselrolle in der Virusmorphogenese, indem es durch Interaktionen mit allen viralen Strukturproteinen die Funktionen eines charakteristischen Matrixproteins übernimmt. Es dirigiert die Zusammenführung aller viraler Faktoren an intrazellulären Membranen und induziert die Bildung neuer Viren im ERGIC (Klumperman et al., 1994; Opstelten et al., 1995; Tooze et al., 1984). Alle coronaviralen M-Proteine sind Glykoproteine und entweder N- oder O-glykosidisch mit Oligosacchariden verknüpft (de Haan et al., 2003; de Haan et al., 2002; Klumperman et al., 1994). Welche Bedeutung diese ko- bzw. posttranslationale Modifikation für die Funktion des M-Proteins hat, ist bisher nicht bekannt.

Ziel dieser Doktorarbeit war die Charakterisierung des SARS-CoV M-Proteins bezüglich dessen Glykosylierung und intrazellulären Transports.

6.1 Synthese, Topologie und Prozessierung des SARS-CoV M-Proteins

Die Synthese der coronaviralen M-Proteine beginnt an freien Ribosomen im Zytoplasma der Zelle. Für die Translokation des Protein-Ribosom-Komplexes an die ER-Membran sind intrinsische Signale der wachsenden Peptidkette ausschlaggebend. Während das M-Protein des Coronavirus der Schweine eine spaltbare, N-terminale Signalsequenz besitzt, liegt solch ein Erkennungssignal innerhalb der Aminosäuresequenz des SARS-CoV M-Proteins nicht vor (Kapke et al., 1988; Marra et al., 2003). Es wird allgemein angenommen, dass dieser Typ von Membranproteinen durch die Interaktion hydrophober Proteindomänen mit dem Signalerkennungspartikel (SRP) zum SRP-Rezeptor in der ER-Membran rekrutiert wird (Hessa et al., 2005; Rapoport, 1991). Die anschließende kotranslationale Integration und Verankerung der ersten Transmembrandomäne des Membranproteins in der ER-Membran wird vermutlich von unterschiedlichen Determinanten moduliert (Übersichtsartikel: (Goder & Spiess, 2001). Das SARS-CoV M-Protein besitzt an Aminosäureposition 41 und 43 zwei positiv-geladene Argininreste, die, der „positive-inside“-Regel folgend, dem Zytoplasma

zugewandt sind und somit dem N-Terminus des M-Proteins eine luminaire Lokalisation zuweisen (von Heijne, 1989).

Die Hydrophobizität der Transmembrandomäne als auch die Faltung des N-terminalen Bereichs der naszierenden Peptidkette können einen zusätzlichen Einfluss auf die Topologie des Membranproteins ausüben. Der N-Terminus des SARS-CoV M-Proteins hingegen ist mit 15 – 20 Aminosäuren sehr kurz und liegt vermutlich für die Zeit der Translokation des Komplexes zum ER mit zytoplasmatischen Chaperonen assoziiert vor und gelangt ungefaltet in das ER-Lumen (Goder & Spiess, 2001).

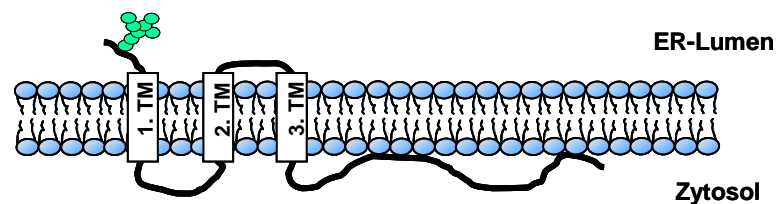


Abbildung 21: Postulierte Topologie des SARS-CoV M-Proteins.

Schematische Darstellung des M-Proteins mit einer N-terminalen Ektodomäne, drei Transmembrandomänen und einer C-terminalen Endodomäne ($N_{\text{exo}}-C_{\text{endo}}$). Die Zuckerreste der N-Glykosylierung an Position vier des Proteins sind durch grüne Kreise gekennzeichnet.

Die postulierte Topologie des SARS-CoV M-Proteins konnte in dieser Arbeit experimentell bestätigt werden. Der Proteinase K-Verdau des *in vitro*-translatierten M-Proteins in Anwesenheit von Mikrosomen führte zu einer Reduzierung des molekularen Proteingewichtes um ca. fünf kDa. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der C-Terminus des M-Proteins aus den Mikrosomen herausragt und zumindest teilweise für das Enzym zugänglich ist. Es scheinen jedoch hydrophobe Aminosäurereste nahe der dritten Transmembrandomäne an die Membran angelagert und somit, wie auch die hydrophoben Transmembrandomänen und der luminaire N-Terminus, vor einem enzymatischen Verdau geschützt zu sein (Abb. 21). Ähnliche Beobachtungen konnten in früheren Studien mit den M-Proteinen des MHV und des IBV gemacht werden (Rottier et al., 1986). Diese Ergebnisse legen nahe, dass der N-Terminus des SARS-CoV M-Proteins dem ER-Lumen und der C-Terminus dem Zytoplasma zugewandt ist (Abb. 21).

Die Analyse der Glykosylierung und der Einsatz von Substitutionsmutanten des M-Proteins konnten diese Resultate zur Topologie des Proteins bekräftigen. Die kotranslationale N-Glykosylierung des SARS-CoV M-Proteins wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen zeitgleich untersucht (Nal et al., 2005; Voss et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig die Glykosylierungsstelle des M-Proteins identifiziert werden. Die Substitution der *in silico* vorhergesagten einzigen N-Glykosylierungsstelle an Position vier des M-Proteins

unterdrückte dessen Glykosylierung vollständig. Frühere Untersuchungen zur Aktivität der Oligosaccharyltransferase konnten für die effiziente N-Glykosylierung einen minimalen Abstand zwischen N-Glykosylierungsstelle und der ER-Membran von 12-14 Aminosäuren determinieren, was einem Abstand von ca. 40 Ångström oder 4 nm entspricht (Nilsson & von Heijne, 1993). Die N-Glykosylierungsstelle des SARS-CoV M-Proteins ist ca. 15 Aminosäurereste von der ersten hydrophoben Aminosäure der ersten Transmembrandomäne entfernt und erfüllt somit das postulierte Kriterium für einen effizienten Zugang der Glykosyltransferasen (Nilsson & von Heijne, 1993). Der minimale Abstand einer N-Glykosylierungsstelle zur Transmembrandomäne konnte durch die Untersuchungen der Substitutionsmutanten M_{I72N} , M_{Insert} und $M_{N4Q Insert}$ bestätigt werden. Die einzige N-Glykosylierungsstelle der Substitutionsmutante M_{I72N} zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne war für die Glykosylierungsenzyme nicht zugänglich, obwohl diese Aminosäuresequenz laut unserer Topologie-Vorhersage dem ER-Lumen zugewandt ist (Abb. 21). Erst die Insertion von jeweils 15 hydrophilen Aminosäuren auf beiden Seiten der N-Glykosylierungsstelle führte zu einer effizienten Glykosylierung (M_{Insert} und $M_{N4Q Insert}$). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die N-terminale Ektodomäne und der Proteinabschnitt zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne dem ER-Lumen zugewandt ist. Es konnte ein Topologiemodell des M-Proteins bestätigt werden, dass eine N-terminale Ektodomäne, drei transmembranale Segmente und eine C-terminale Endodomäne vorsieht. Diese Topologie wird mit N_{exo} - C_{endo} bezeichnet (Escors et al., 2001).

Eine weitere Charakterisierung der N-Glykosylierung des M-Proteins wurde mithilfe von Pulse-Chase-Analysen durchgeführt. Rekombinantes M-Protein war in einer unglykosylierten und einer Endo H-sensitiven Form nachweisbar. Zusätzlich traten Endo H-resistente Formen auf, deren Intensität im zeitlichen Verlauf deutlich zunahm (Voss et al., 2006). Die Resistenz gegenüber Endo H lässt vermuten, dass die Zuckerseitenkette des M-Proteins eine komplexe Glykosylierung im Golgi-Komplex durchläuft. Ähnliche Resultate konnten nach Expression eines Flag-markierten M-Proteins gewonnen werden (Nal et al., 2005). Ergänzend wurde der Glykosylierungsstatus des M-Proteins in SARS-CoV infizierten Zellen und in aufgereinigtem Virus untersucht. Auch hier wurde neben einer unglykosylierten eine N-glykosylierte Form des M-Proteins nachgewiesen. Im Pulse-Chase-Versuch SARS-CoV infizierter Zellen blieb das Verhältnis der zwei Proteinformen hingegen konstant und es waren keine Endo H-resistenten Formen des SARS-CoV M-Proteins detektierbar (Voss et al., 2006). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine komplexe Glykosylierung des M-Proteins im Golgi-Komplex durch die Anwesenheit interagierender viraler Faktoren aus bisher unbekanntem Grund unterbunden wird. Die frühe Assemblierung neuer Viren in prä-Golgi-Kompartimenten könnte eine weitere Modifizierung des M-Proteins unterbinden. Diese

Beobachtungen stimmen mit den Daten anderer Untersuchungen überein, in denen keine komplexe Glykosylierung des M-Proteins in aufgereinigten SARS-CoV-Partikeln detektiert wurde (Ito et al., 2005).

6.2 Transport des SARS-CoV M-Proteins innerhalb des zellulären sekretorischen Weges

Obwohl das SARS-CoV M-Protein am rauen ER synthetisiert und N-glykosyliert wird, konnte es mittels Immunfluoreszenzanalysen in diesem Kompartiment nicht nachgewiesen werden (Nal et al., 2005; Voss et al., 2006). Diese Ergebnisse deuten auf einen schnellen Transport des M-Proteins zum ERGIC/Golgi-Komplex hin. Eine mögliche Determinante eines selektiven ER-Exportes könnte ein spezifisches Aminosäuremotiv innerhalb des C-Terminus des M-Proteins darstellen. Die zytoplasmatischen, sauren Glutaminsäurereste an Position 134 und 136 könnten die Rekrutierung des M-Proteins in COPII Vesikeln vermitteln und einen schnellen, effizienten Transport in das ERGIC generieren (Nishimura & Balch, 1997). Der Nachweis einer komplexen N-Glykosylierung des rekombinanten M-Proteins lässt vermuten, dass das Protein die hierfür spezifischen Kompartimente der medialen- und trans-Golgi-Zisternen durchläuft. In Immunfluoreszenzstudien konnte diese Hypothese bestätigt werden. Das M-Protein lokalisierte im ERGIC und Golgi-Komplex nahe des Budding-Kompartimentes (Nal et al., 2005; Voss et al., 2006). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen früherer Studien, in denen dem M-Protein des IBV mittels Endo H-Verdau eine komplexe Glykosylierung und eine Akkumulation in cis-Golgi-Zisternen nachgewiesen wurde (Klumperman et al., 1994; Machamer et al., 1990). Auch für das M-Protein des TGEV und des MHV wurde nach rekombinanter Expression eine Anreicherung des Proteins im Golgi-Komplex beobachtet (Klumperman et al., 1994; Risco et al., 1998). Untersuchungen dieser Doktorarbeit machen deutlich, dass die ersten 107 Aminosäuren des SARS-CoV M-Proteins, die den N-Terminus und die drei hydrophoben Transmembrandomänen umfassen, für den definierten Transport des Proteins zum Golgi-Komplex entscheidend sind. Während die Aminosäurereste an Position 134 und 136 vermutlich keine oder nur eine untergeordnete Rolle für den Proteintransport besitzen, weisen diese Daten auf essentielle intrinsische Transportsignale innerhalb der hydrophoben Transmembrandomänen des SARS-CoV M-Proteins hin. Ähnliche Untersuchungen wurden für das M-Protein verwandter Coronaviren durchgeführt. Das IBV M-Protein wird durch Signale innerhalb dessen erster Transmembrandomäne im Golgi-Komplex zurückgehalten (Swift & Machamer, 1991). Für das M-Protein des MHV hingegen werden zwei für den Transport notwendige Signaldomänen postuliert, von denen sich eine im zytoplasmatischen C-Terminus befindet und die andere durch die erste Transmembrandomäne determiniert wird (Locker et al., 1994). Das Phänomen mehrerer unterschiedlicher Transportsignale ist in vielen viralen

Membranproteinen zu beobachten. Es wird vermutet, dass das Protein hierdurch in komplexe zelluläre Transportrouten eingreifen und eine Vielzahl an Funktionen ausüben kann (Byland & Marsh, 2005).

Da keines der bisher untersuchten M-Proteine der bekannten Coronaviren vollständig im Budding-Kompartiment zurückgehalten wird, sind offensichtlich weitere bis jetzt unbekannte Faktoren und/oder Protein-Protein-Interaktionen hierfür ausschlaggebend (Klumperman et al., 1994). Ein retrograder Proteintransport vom Golgi-Komplex in vorgelagerte zelluläre Kompartimente ist bei vielen zellulären und viralen Proteinen beschrieben und verhindert eine Sättigung des Golgi-Komplexes durch neu synthetisierte Proteine (Cole et al., 1998; de Haan et al., 2000). Des Weiteren wird postuliert, dass beispielsweise Ceramide (eine Untergruppe der Sphingolipide) entweder direkt oder über ihre Funktion als sekundäre Botenstoffe die Lokalisation des viralen M-Proteins des IBV beeinflussen (Maceyka & Machamer, 1997). Für das MHV M-Protein konnte durch die Interaktion von ER-Export Mutanten mit im Golgi-Komplex modifizierten O-glykosylierten Formen des M-Proteins die Existenz von Homooligomeren des M-Proteins bewiesen werden. Es wird vermutet, dass M-M-Proteinkomplexe die Lokalisation des M-Proteins beeinflussen und die treibende Kraft bei der Virusmorphogenese sind (de Haan et al., 1998a; de Haan et al., 2000; Locker et al., 1995; Weisz et al., 1993).

Es stellte sich die Frage, ob das SARS-CoV M-Protein über die Golgi-Zisternen hinaus transportiert und zwischen der Plasmamembran und dem ERGIC/Golgi-Komplex zirkuliert. Mittels biochemischer und konfokaler mikroskopischer Analysen M-exprimierender Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine Plasmamembranlokalisierung des SARS-CoV M-Proteins beobachtet werden. Basierend auf mikroskopischen Zeitraffer-Analysen wurde von einer anderen Arbeitsgruppe von einem dynamischen Austausch des M-Proteins zwischen dem trans-Golgi-Netzwerk und Transportvesikeln im Zytoplasma der Zelle berichtet. Mithilfe von GFP-Fusionsproteinen konnte hierbei jedoch kein Transport des M-Proteins an die Zelloberfläche beobachtet werden. Ein Plasmamembrantransport des Wildtyp Proteins mit anschließender Re-Endozytose und Akkumulation im perinukleären Raum wurde jedoch nicht ausgeschlossen (Nal et al., 2005). Während das M-Protein von MHV und IBV nicht an die Zelloberfläche M-exprimierender Zellen gelangt (Klumperman et al., 1994), zeigen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, dass das M-Protein des SARS-CoV zur Plasmamembran transportiert wird. Obwohl die Lokalisation an der Zelloberfläche auch von M-Proteinen anderer Coronaviren beschrieben ist (Jacobse-Geels & Horzinek, 1983; Laviada et al., 1990), konnte die funktionelle Bedeutung dieses Transports bis jetzt nicht geklärt werden.

Es lassen sich zwei Hypothesen aufstellen:

1. Das SARS-CoV M-Protein wird in den Überstand M-exprimierender Zellen abgegeben und moduliert zelluläre Signalwege benachbarter Zellen, wie es für virale Proteine des HIV, des Masernvirus und auch des SARS-CoV gezeigt werden konnte (Huang et al., 2006; Li et al., 1995; Marie et al., 2004). – Der Nachweis geringer Mengen sedimentierbarer Partikel im Überstand M-exprimierender Zellen scheint diese Hypothese zunächst zu unterstützen. In der Studie von Hsieh et al. wurden virale Proteine des SARS-CoV mit einem V5His-Tag markiert, rekombinant exprimiert und vier Tage nach der Transfektion im Zellüberstand mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen (Hsieh et al., 2005). Inwieweit es sich hier um eine zielgerichtete, aktive Sekretion des SARS-CoV M-Proteins handelt, wird nicht deutlich. Der Nachweis des M-Proteins im Überstand transfizierter Zellen könnte auch auf die Apoptose-Induktion nach M-Expression und die passive Freisetzung des viralen Proteins zurückzuführen sein (Lai et al., 2006). In der vorliegenden Doktorarbeit konnte das M-Protein zwei Tage nach transienter Expression im Zellüberstand nicht nachgewiesen und diese Hypothese somit nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).
2. Das M-Protein zirkuliert zwischen der Zelloberfläche und intrazellulären Kompartimenten. – Der Prozess der Re-Endozytose ist für eine Vielzahl viraler Membranproteine beschrieben worden und spielt für den viralen Replikationszyklus eine wichtige Rolle (Marsh & Pelchen-Matthews, 2000; Radsak et al., 1996; Tirabassi & Enquist, 1998, 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals in einem biochemischen und einem immunologischen Ansatz mit unterschiedlichen Erstantikörpern die spezifische Re-Endozytose des SARS-CoV M-Proteins von der Plasmamembran in intrazelluläre Vesikel beobachtet werden. Mehr als 70 % des an der Oberfläche gebundenen Antikörpers wurde internalisiert. Es sind zwei Haupttypen zytoplasmatischer Endozytosesignale bekannt: zum einen das Di-Leucin Motiv und zum anderen das auf Tyrosinreste basierte Yxx Φ –Motiv, wobei Φ für eine Aminosäure mit einer hydrophoben Gruppe steht (Bonifacino & Dell'Angelica, 1999; Marks et al., 1996). Letztere Sequenz ist im zytoplasmatischen C-Terminus des SARS-CoV M-Proteins an Position 177-181 zu finden und könnte eine Interaktion mit dem Adapter-Protein 2 (engl. Adaptor protein complex 2 = AP2) eingehen und eine Re-Endozytose in Clathrin-umhüllte Vesikel induzieren (Bonifacino & Traub, 2003). Das C-terminal verkürzte M-Protein (M_{N1-107}) wurde im Vergleich zu dem wildtypischen M-Protein in wesentlich geringerem Maße endozytiert. Wahrscheinlich repräsentiert die Aufnahme des verkürzten M_{N1-107}-Proteins die basale, unspezifische Aufnahme von Membranproteinen in

das Zytoplasma (Vogt et al., 2005). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass im C-Terminus des M-Proteins Signale für eine spezifische Endozytose enthalten sind. Die Endozytose des wildtypischen M-Proteins war nach ca. 15-20 Minuten gesättigt. Diese Daten deuten darauf hin, dass das Protein intrazellulär nicht akkumuliert, sondern möglicherweise aufgrund fehlender Interaktionspartner langsam abgebaut oder zurück zu Plasmamembran gelangt, wie es für das G-Protein des Nipah-Virus postuliert wird (Vogt et al., 2005). Immunfluoreszenzanalysen konnten die spezifische Re-Endozytose des M-Proteins von der Plasmamembran bestätigen. Ein Transport in den perinukleären Raum in die Nähe des Budding-Kompartimentes konnte nicht beobachtet werden. Die fehlende Detektierbarkeit der Protein-Antikörper Komplexe im Golgi-Komplex könnte durch die Trennung der Protein-Antikörper Bindung im sauren Milieu der endosomalen Vesikel zu erklären sein. Ähnliche Ergebnisse sind jedoch auch für virale Membranproteine von Alphaherpesviren beschrieben. Es wurde gezeigt, dass ein viraler Proteinkomplex in peripher lokalisierten Recycling-Vesikeln aufgenommen und nicht in die Golgi-Zisternen gelangt. Außerdem wurde eine geringe Inkorporationsrate dieser Proteine in neue Virionen gemessen (Tirabassi & Enquist, 1998). Im Gegensatz hierzu wird das gB-Protein des humane Zytomegalievirus HCMV nach erfolgter Re-Endozytose sehr effizient in die Virusmembran eingebaut (Radsak et al., 1996). In wieweit re-endozytiertes SARS-CoV M-Protein an der Virusmorphogenese beteiligt ist, bleibt zu untersuchen.

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das SARS-CoV M-Protein neben einer dominierenden Akkumulation im Golgi-Komplex auch an der Plasmamembran lokalisiert und von dort spezifisch in endosomale Vesikel aufgenommen wird. Die Identifizierung zytoplasmatischer Endozytoseignale, sowie die Charakterisierung der funktionellen Bedeutung der Re-Endozytose des M-Proteins innerhalb des viralen Lebenszyklus sind zwei wichtige Schwerpunkte zukünftiger Studien.

Mithilfe von Immunfluoreszenzanalysen sollte ein möglicher Einfluss des M-Proteins auf die Lokalisation des S-Proteins untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass nach rekombinanter Einzelexpression das SARS-CoV S-Protein an der Plasmamembran detektierbar ist (McBride et al., 2007; Schwegmann-Wessels et al., 2004; Simmons et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich eine ausgeprägte Akkumulation des S-Proteins im perinukleären Raum SARS-CoV infizierter Zellen nachgewiesen werden. Die Interaktion des M- und S-Proteins der Coronaviren und deren Bedeutung für die Virusmorphogenese ist insbesondere durch die Analysen der MHV Proteine gut untersucht (de Haan et al., 1999; Nguyen & Hogue, 1997; Opstelten et al., 1993; Opstelten et al., 1995). Es wurde nachgewiesen, dass die Deletion amphipathischer C-terminaler Bereiche (aa121-195) des M-Proteins die Ausbildung von M-S-Komplexen vollständig unterdrückt. Außerdem scheinen

kritische Aminosäurereste am extremen C-Terminus des M-Proteins modulatorisch auf die M-S-Interaktion zu wirken (de Haan et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Deletion großer Bereiche des amphipathischen C-Terminus des SARS-CoV M-Proteins keine Auswirkungen auf die Interaktion mit dem S-Protein hat. Diese Daten weisen darauf hin, dass das SARS-CoV M-Protein als auch dessen verkürzte Form M_{C1-134} in der Lage sind das S-Protein in frühen Kompartimenten des sekretorischen Weges zurückzuhalten.

6.3 Einfluss der N-Glykosylierung des SARS-CoV M-Proteins auf den Proteintransport und den Lebenszyklus eines rekombinanten SARS-CoV

Die Glykosylierung des M-Proteins aller bekannten Coronaviren und die starke Konservierung essentieller Glykosylierungsstellen deuten auf eine für die Funktion des M-Proteins entscheidende Modifizierung hin. Überraschenderweise wurde in dieser Arbeit jedoch in aufgereinigten Viruspartikeln, in SARS-CoV infizierten Zellen und nach rekombinanter Expression eine große Menge an unglykosyliertem M-Protein detektiert. Während *in vitro*-exprimiertes M-Protein des HCoV-NL63 überwiegend in N-glykosylierter Form nachweisbar war, zeigte sich für das M-Protein des SARS-CoV eine N-Glykosylierungsrate von ca. 50 %. Diese Daten konnten nach rekombinanter Expression und anschließender Pulse-Chase-Analysen bestätigt werden. Die Menge unmodifizierten M-Proteins blieb im Laufe des Experimentes konstant (Voss et al., 2006). Insbesondere im Vergleich mit einer nahezu vollständigen Glykosylierungsrate des M-Proteins des MHV, IBV und TGEV wird die ungewöhnliche Ineffizienz der kotranslationalen Prozessierung des SARS-CoV M-Proteins sichtbar (Klumperman et al., 1994).

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit eine fehlende N-Glykosylierung des M-Proteins einen modulierenden oder gar inhibierenden Effekt auf den Proteintransport besitzt. Eine Möglichkeit den Einfluss der Glykosylierung auf die intrazelluläre Verteilung zu untersuchen ist der Einsatz von Glykosylierungsinhibitoren, wie z.B. Tunicamycin, die jedoch ebenso die Funktion zellulärer Glykoproteine beeinflussen und somit weitreichende negative Effekte auf die zelluläre Synthese- und Transportmaschinerie ausüben können. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Substitutionsmutante des M-Proteins mit einer fehlenden N-Glykosylierungsstelle hergestellt, dessen Einsatz eine zuverlässige und bewährte Methode darstellt, die Proteinmodifizierung zu studieren. Nach rekombinanter Expression der glykosylierungsdefizienten Mutante (M_{N4Q}) wurde in Western Blot-Analysen wie erwartet nur noch eine prominente Proteinbande detektiert, die der unmodifizierten Form des M-Proteins entsprach. In Immunfluoreszenzanalysen wurde wie auch für das wildtypische M-Protein eine Anreicherung der Substitutionsmutante im ERGIC beobachtet. Außerdem konnte die glykosylierungsdefiziente Mutante an der Zelloberfläche detektiert werden. Diese Daten

weisen darauf hin, dass die N-Glykosylierung des SARS-CoV M-Proteins für dessen Stabilität, Transport und Akkumulation im ERGIC keine Rolle spielt. Ähnliche Befunde sind z.B. beim Glykoprotein des Hantaan-Virus beschrieben, bei dem die Deletion der einzigen N-Glykosylierungsstelle nicht ausreichend ist, um den intrazellulären Transport oder die korrekte Faltung des Proteins zu beeinflussen. Gleichzeitig wird vermutet, dass die fehlende Glykosylierung durch benachbarte Glykanstrukturen interagierender Proteine kompensiert werden könnte (Shi & Elliott, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte hingegen kein Einfluss der Hauptstrukturproteine M, N und S auf die Glykosylierung des rekombinant exprimierten M-Proteins beobachtet werden (Daten nicht gezeigt.) Inwieweit bisher nicht identifizierte virale oder zelluläre Faktoren die Prozessierung des SARS-CoV M-Proteins regulieren, stellt einen interessanten Forschungsgegenstand zukünftiger Analysen dar.

Die rekombinante Expression viraler Proteine erlaubt nur einen begrenzten Einblick in die Funktionsweise der Proteine und der Morphogenese des Virus. In dieser Arbeit sollte durch den Einsatz eines infektiösen und molekularbiologisch manipulierbaren cDNA-Klons des SARS-CoV die funktionelle Bedeutung der N-Glykosylierung auf die Morphologie, den Lebenszyklus und die Infektiosität des Virus bestimmt werden. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. C. Drosten, Bernhard Nocht-Institut Hamburg, eine Mutation des viralen Genoms durchgeführt, die zum Austausch einer essentiellen Aminosäure innerhalb der einzigen N-Glykosylierungsstelle des SARS-CoV M-Proteins führte. Das Genom wurde in Coronavirus susceptible Zellen transfiziert und es konnte ein rekombinantes Virus gewonnen werden, dessen M-Protein glykosylierungsdefizient war. Da sich das Virus vermehren konnte, kann man daraus schließen, dass die Glykosylierung des M-Proteins für das Wachstum und die Infektiosität des Virus nicht entscheidend ist. Elektronenmikroskopische und virologische Untersuchungen des rekombinanten mutierten SARS-CoV zeigten, dass die fehlende Modifizierung des M-Proteins keine signifikanten Unterschiede in der Morphologie und der Wachstumskinetik des Virus verursachte. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Ergebnissen früherer Studien, in denen gezeigt wurde, dass eine vollständige Unterdrückung der O-Glykosylierung des MHV M-Proteins keinen Effekt auf die Assemblierung von VLPs und das Wachstum des rekombinanten Virus ausübt (de Haan et al., 2003; de Haan et al., 1998a). Es ist hingegen vielfach gezeigt worden, dass eine veränderte oder gänzlich fehlende Glykosylierung unterschiedlicher viraler Strukturproteine einen Einfluss auf die Immunreaktivität besitzt (Abe et al., 2004; Shi & Elliott, 2004; Skehel et al., 1984; Wei et al., 2003). Auch bei einigen Coronaviren konnte der Einfluss der Glykosylierung des M-Proteins auf die Interferon-Induktion nachgewiesen werden. Für das TGEV wird ein direkter Einfluss der N-Glykane des M-Proteins auf die Immunantwort vermutet (Laude et al., 1992). Der Austausch der O-Glykosylierung des MHV M-Proteins zu einer N-Glykosylierung führte zu einer stärkeren Induktion von Interferon- α .

und $-\beta$. Die Infektion eines rekombinanten MHV mit einem glykosylierungsdefizienten M resultierte hingegen in einer schwachen Interferon-Induktion (de Haan et al., 2003). Nach SARS-CoV Infektion sind sowohl erhöhte Mengen von Interferon- γ und Interleukinen als auch eine Inhibition der Typ-I-Interferon-Synthese in *in vitro*-Experimenten nachgewiesen worden (Cheung et al., 2005; Huang et al., 2005; Wong et al., 2004a; Ziegler et al., 2005). Ein erster Erklärungsansatz für diese unverhältnismäßige Immunantwort nach SARS-CoV Infektion könnte die schwache Glykosylierungseffizienz des M-Proteins sein. Mithilfe des erstmalig hergestellten rekombinanten mutierten SARS-CoV (M_{N4Q} recSARS-CoV) könnte in zukünftigen Studien der Einfluss der N-Glykosylierung des M-Proteins auf die Induktion von Interferon- α und $-\beta$ und deren zellulären Signalwege detailliert untersucht werden. Da jedoch *in vitro*-Studien nicht automatisch die immunologische Situation im Organismus widerspiegeln, wäre der Einsatz des mutierten SARS-CoV auch im Tiermodell ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Analyse der Immunpathogenese des SARS-CoV. Des Weiteren könnten durch den Einsatz des infektiösen cDNA-Klons interessante Einblicke in die funktionelle Bedeutung einzelner Aminosäuren oder Proteindomänen des M-Proteins und anderer viraler Faktoren für den viralen Lebenszyklus gewonnen werden.

7 Literatur

- Abe, Y., Takashita, E., Sugawara, K., Matsuzaki, Y., Muraki, Y., & Hongo, S. (2004). Effect of the addition of oligosaccharides on the biological activities and antigenicity of influenza A/H3N2 virus hemagglutinin. *J Virol*, **78**(18), 9605-9611.
- Almazan, F., Dediego, M. L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuniga, S., Alonso, S., Moreno, J. L., Nogales, A., Capiscol, C., & Enjuanes, L. (2006). Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol*, **80**(21), 10900-10906.
- Almazan, F., Galan, C., & Enjuanes, L. (2004). The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol*, **78**(22), 12683-12688.
- Almazan, F., Gonzalez, J. M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J., & Enjuanes, L. (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(10), 5516-5521.
- Almeida, J. D., & Tyrrell, D. A. (1967). The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture. *J Gen Virol*, **1**(2), 175-178.
- Armstrong, J., Niemann, H., Smeekens, S., Rottier, P., & Warren, G. (1984). Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. *Nature*, **308**(5961), 751-752.
- Armstrong, J., & Patel, S. (1991). The Golgi sorting domain of coronavirus E1 protein. *J Cell Sci*, **98** (Pt 4), 567-575.
- Bisht, H., Roberts, A., Vogel, L., Bukreyev, A., Collins, P. L., Murphy, B. R., Subbarao, K., & Moss, B. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(17), 6641-6646.
- Blobel, G. (1980). Intracellular protein topogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**(3), 1496-1500.
- Bonifacino, J. S., & Dell'Angelica, E. C. (1999). Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol*, **145**(5), 923-926.
- Bonifacino, J. S., & Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, **72**, 395-447.
- Booth, C. M., Matukas, L. M., Tomlinson, G. A., Rachlis, A. R., Rose, D. B., Dwosh, H. A., Walmsley, S. L., Mazzulli, T., Avendano, M., Derkach, P., Ephtimios, I. E., Kitai, I., Mederski, B. D., Shadowitz, S. B., Gold, W. L., Hawryluck, L. A., Rea, E., Chenkin, J. S., Cescon, D. W., Poutanen, S. M., & Detsky, A. S. (2003). Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *Jama*, **289**(21), 2801-2809.
- Bretscher, M. S., & Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*, **261**(5126), 1280-1281.
- Bukreyev, A., Lamirande, E. W., Buchholz, U. J., Vogel, L. N., Elkins, W. R., St Claire, M., Murphy, B. R., Subbarao, K., & Collins, P. L. (2004). Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS. *Lancet*, **363**(9427), 2122-2127.
- Burge, C., & Karlin, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol*, **268**(1), 78-94.
- Byland, R., & Marsh, M. (2005). Trafficking of viral membrane proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, **285**, 219-254.
- Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V., & Schountz, T. (2006). Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev*, **19**(3), 531-545.
- Cameron, M. J., Ran, L., Xu, L., Danesh, A., Bermejo-Martin, J. F., Cameron, C. M., Muller, M. P., Gold, W. L., Richardson, S. E., Poutanen, S. M., Willey, B. M., DeVries, M. E., Fang, Y., Seneviratne, C., Bosinger, S. E., Persad, D., Wilkinson, P., Greller, L. D., Somogyi, R., Humar, A., Keshavjee, S., Louie, M., Loeb, M. B., Brunton, J., McGeer, A. J., & Kelvin, D. J. (2007). Interferon-mediated immunopathological events are associated with atypical innate and adaptive immune responses in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Virol*, **81**(16), 8692-8706.
- Casais, R., Thiel, V., Siddell, S. G., Cavanagh, D., & Britton, P. (2001). Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol*, **75**(24), 12359-12369.

- Cavanagh, D., Davis, P. J., Pappin, D. J., Binns, M. M., Bournsnel, M. E., & Brown, T. D. (1986). Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res*, **4**(2), 133-143.
- Cheung, C. Y., Poon, L. L., Ng, I. H., Luk, W., Sia, S. F., Wu, M. H., Chan, K. H., Yuen, K. Y., Gordon, S., Guan, Y., & Peiris, J. S. (2005). Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. *J Virol*, **79**(12), 7819-7826.
- Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H., & Doerr, H. W. (2003). Treatment of SARS with human interferons. *Lancet*, **362**(9380), 293-294.
- Cole, N. B., Ellenberg, J., Song, J., DiEuliis, D., & Lippincott-Schwartz, J. (1998). Retrograde transport of Golgi-localized proteins to the ER. *J Cell Biol*, **140**(1), 1-15.
- 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 Virol*, **74**(9), 4319-4326.
- de Haan, C., Smeets, M., Vernooij, F., Vennema, H., & Rottier, P. (1999). Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein. *J Virol*, **73**(9), 7441-7452.
- de Haan, C. A., de Wit, M., Kuo, L., Montalto-Morrison, C., Haagmans, B. L., Weiss, S. R., Masters, P. S., & Rottier, P. J. (2003). The glycosylation status of the murine hepatitis coronavirus M protein affects the interferogenic capacity of the virus in vitro and its ability to replicate in the liver but not the brain. *Virology*, **312**(2), 395-406.
- de Haan, C. A., de Wit, M., Kuo, L., Montalto, C., Masters, P. S., Weiss, S. R., & Rottier, P. J. (2002). O-glycosylation of the mouse hepatitis coronavirus membrane protein. *Virus Res*, **82**(1-2), 77-81.
- de Haan, C. A., Kuo, L., Masters, P. S., Vennema, H., & Rottier, P. J. (1998a). Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein. *J Virol*, **72**(8), 6838-6850.
- de Haan, C. A., Roestenberg, P., de Wit, M., de Vries, A. A., Nilsson, T., Vennema, H., & Rottier, P. J. (1998b). Structural requirements for O-glycosylation of the mouse hepatitis virus membrane protein. *J Biol Chem*, **273**(45), 29905-29914.
- de Haan, C. A., Vennema, H., & Rottier, P. J. (2000). Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *J Virol*, **74**(11), 4967-4978.
- DeDiego, M. L., Alvarez, E., Almazan, F., Rejas, M. T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh, W. J., Zaki, S. R., Subbarao, K., & Enjuanes, L. (2007). A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol*, **81**(4), 1701-1713.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjostrom, H., Noren, O., & Laude, H. (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, **357**(6377), 417-420.
- Delmas, B., & Laude, H. (1990). Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol*, **64**(11), 5367-5375.
- Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguiere, A. M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Muller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H. D., Osterhaus, A. D., Schmitz, H., & Doerr, H. W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, **348**(20), 1967-1976.
- Eickmann, M., Becker, S., Klenk, H. D., Doerr, H. W., Stadler, K., Censini, S., Guidotti, S., Massignani, V., Scarselli, M., Mora, M., Donati, C., Han, J. H., Song, H. C., Abrignani, S., Covacci, A., & Rappuoli, R. (2003). Phylogeny of the SARS coronavirus. *Science*, **302**(5650), 1504-1505.
- Ellgaard, L., & Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**(3), 181-191.
- Enjuanes, L., Smerdou, C., Castilla, J., Anton, I. M., Torres, J. M., Sola, I., Golvano, J., Sanchez, J. M., & Pintado, B. (1995). Development of protection against coronavirus induced diseases. A review. *Adv Exp Med Biol*, **380**, 197-211.
- Escors, D., Camafeita, E., Ortego, J., Laude, H., & Enjuanes, L. (2001). Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *J Virol*, **75**(24), 12228-12240.

- Follis, K. E., York, J., & Nunberg, J. H. (2006). Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. *Virology*, **350**(2), 358-369.
- Fouchier, R. A., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G. J., van den Hoogen, B. G., Peiris, M., Lim, W., Stohr, K., & Osterhaus, A. D. (2003). Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature*, **423**(6937), 240.
- Frana, M. F., Behnke, J. N., Sturman, L. S., & Holmes, K. V. (1985). Proteolytic cleavage of the E2 glycoprotein of murine coronavirus: host-dependent differences in proteolytic cleavage and cell fusion. *J Virol*, **56**(3), 912-920.
- Gafvelin, G., Sakaguchi, M., Andersson, H., & von Heijne, G. (1997). Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells. *J Biol Chem*, **272**(10), 6119-6127.
- Gallagher, T. M., & Buchmeier, M. J. (2001). Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology*, **279**(2), 371-374.
- Gavel, Y., & von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng*, **3**(5), 433-442.
- Goder, V., & Spiess, M. (2001). Topogenesis of membrane proteins: determinants and dynamics. *FEBS Lett*, **504**(3), 87-93.
- Gorlich, D., & Rapoport, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **75**(4), 615-630.
- 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., Butt, K. M., Wong, K. L., Chan, K. W., Lim, W., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Peiris, J. S., & Poon, L. L. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, **302**(5643), 276-278.
- Haigler, H. T., Maxfield, F. R., Willingham, M. C., & Pastan, I. (1980). Dansylcadaverine inhibits internalization of 125I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells. *J Biol Chem*, **255**(4), 1239-1241.
- Haller, O., Kochs, G., & Weber, F. (2006). The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*, **344**(1), 119-130.
- Hansen, G. H., Delmas, B., Besnardeau, L., Vogel, L. K., Laude, H., Sjostrom, H., & Noren, O. (1998). The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. *J Virol*, **72**(1), 527-534.
- He, R., Dobie, F., Ballantine, M., Leeson, A., Li, Y., Bastien, N., Cutts, T., Andonov, A., Cao, J., Booth, T. F., Plummer, F. A., Tyler, S., Baker, L., & Li, X. (2004a). Analysis of multimerization of the SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **316**(2), 476-483.
- He, R., Leeson, A., Ballantine, M., Andonov, A., Baker, L., Dobie, F., Li, Y., Bastien, N., Feldmann, H., Strocher, U., Theriault, S., Cutts, T., Cao, J., Booth, T. F., Plummer, F. A., Tyler, S., & Li, X. (2004b). Characterization of protein-protein interactions between the nucleocapsid protein and membrane protein of the SARS coronavirus. *Virus Res*, **105**(2), 121-125.
- He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(5), 2509-2514.
- He, Y., Zhou, Y., Siddiqui, P., Niu, J., & Jiang, S. (2005). Identification of immunodominant epitopes on the membrane protein of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J Clin Microbiol*, **43**(8), 3718-3726.
- Helenius, A., & Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, **291**(5512), 2364-2369.
- Hessa, T., Kim, H., Bihlmaier, K., Lundin, C., Boekel, J., Andersson, H., Nilsson, I., White, S. H., & von Heijne, G. (2005). Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature*, **433**(7024), 377-381.
- Hofmann, H., Hattermann, K., Marzi, A., Gramberg, T., Geier, M., Krumbiegel, M., Kuate, S., Uberla, K., Niedrig, M., & Pohlmann, S. (2004). S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients. *J Virol*, **78**(12), 6134-6142.
- Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geier, M., Berkhout, B., & Pohlmann, S. (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(22), 7988-7993.

- Holmes, K. V. (2005). Structural biology. Adaptation of SARS coronavirus to humans. *Science*, **309**(5742), 1822-1823.
- Hsieh, P. K., Chang, S. C., Huang, C. C., Lee, T. T., Hsiao, C. W., Kou, Y. H., Chen, I. Y., Chang, C. K., Huang, T. H., & Chang, M. F. (2005). Assembly of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA packaging signal into virus-like particles is nucleocapsid dependent. *J Virol*, **79**(22), 13848-13855.
- Huang, C., Narayanan, K., Ito, N., Peters, C. J., & Makino, S. (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is released in membranous structures from 3a protein-expressing cells and infected cells. *J Virol*, **80**(1), 210-217.
- Huang, K. J., Su, I. J., Theron, M., Wu, Y. C., Lai, S. K., Liu, C. C., & Lei, H. Y. (2005). An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients. *J Med Virol*, **75**(2), 185-194.
- Huang, Q., Yu, L., Petros, A. M., Gunasekera, A., Liu, Z., Xu, N., Hajduk, P., Mack, J., Fesik, S. W., & Olejniczak, E. T. (2004a). Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry*, **43**(20), 6059-6063.
- Huang, Y., Yang, Z. Y., Kong, W. P., & Nabel, G. J. (2004b). Generation of synthetic severe acute respiratory syndrome coronavirus pseudoparticles: implications for assembly and vaccine production. *J Virol*, **78**(22), 12557-12565.
- ICTVdB. (2006). Index of Viruses - Coronaviridae. In C. Büchen-Osmond (Ed.), *ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4*. Columbia University, New York, USA.
- 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.
- Jackson, M. R., Nilsson, T., & Peterson, P. A. (1990). Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J*, **9**(10), 3153-3162.
- Jacobse-Geels, H. E., & Horzinek, M. C. (1983). Expression of feline infectious peritonitis coronavirus antigens on the surface of feline macrophage-like cells. *J Gen Virol*, **64** (Pt 9), 1859-1866.
- Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., Liang, W., Zheng, H., Wan, K., Liu, Q., Cui, B., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Qi, X., Chen, K., Du, L., Gao, K., Zhao, Y. T., Zou, X. Z., Feng, Y. J., Gao, Y. F., Hai, R., Yu, D., Guan, Y., & Xu, J. (2005). Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *J Virol*, **79**(18), 11892-11900.
- Kapke, P. A., Tung, F. Y., Hogue, B. G., Brian, D. A., Woods, R. D., & Wesley, R. (1988). The amino-terminal signal peptide on the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus matrix protein is not an absolute requirement for membrane translocation and glycosylation. *Virology*, **165**(2), 367-376.
- Keele, B. F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J. F., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M., & Hahn, B. H. (2006). Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*, **313**(5786), 523-526.
- Kern, A. (2004). *Posttranslationale Modifikationen des SARS-Coronavirus Membranproteins*. Unpublished Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Klumperman, J., Locker, J. K., Meijer, A., Horzinek, M. C., Geuze, H. J., & Rottier, P. J. (1994). Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J Virol*, **68**(10), 6523-6534.
- Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., Yang, J. Y., Cox, N., Hughes, J. M., LeDuc, J. W., Bellini, W. J., Anderson, L. J., & SARS-Working-Group. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, **348**(20), 1953-1966.
- Lai, C. W., Chan, Z. R., Yang, D. G., Lo, W. H., Lai, Y. K., Chang, M. D., & Hu, Y. C. (2006). Accelerated induction of apoptosis in insect cells by baculovirus-expressed SARS-CoV membrane protein. *FEBS Lett*, **580**(16), 3829-3834.
- Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H., Wong, S. S., Leung, S. Y., Chan, K. H., & Yuen, K. Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(39), 14040-14045.

- Laude, H., Gelfi, J., Lavenant, L., & Charley, B. (1992). Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Virol.*, **66**(2), 743-749.
- Laviada, M. D., Videgain, S. P., Moreno, L., Alonso, F., Enjuanes, L., & Escribano, J. M. (1990). Expression of swine transmissible gastroenteritis virus envelope antigens on the surface of infected cells: epitopes externally exposed. *Virus Res.*, **16**(3), 247-254.
- Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G. M., Ahuja, A., Yung, M. Y., Leung, C. B., To, K. F., Lui, S. F., Szeto, C. C., Chung, S., & Sung, J. J. (2003). A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med*, **348**(20), 1986-1994.
- Leong, H. N., Ang, B., Earnest, A., Teoh, C., Xu, W., & Leo, Y. S. (2004). Investigational use of ribavirin in the treatment of severe acute respiratory syndrome, Singapore, 2003. *Trop Med Int Health*, **9**(8), 923-927.
- Leroy, E. M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Delicat, A., Paweska, J. T., Gonzalez, J. P., & Swanepoel, R. (2005). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, **438**(7068), 575-576.
- Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V., & Pardee, A. B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science*, **268**(5209), 429-431.
- 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., Choe, H., & Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, **426**(6965), 450-454.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang, S., & Wang, L. F. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*, **310**(5748), 676-679.
- Locker, J. K., Klumperman, J., Oorschot, V., Horzinek, M. C., Geuze, H. J., & Rottier, P. J. (1994). The cytoplasmic tail of mouse hepatitis virus M protein is essential but not sufficient for its retention in the Golgi complex. *J Biol Chem.*, **269**(45), 28263-28269.
- Locker, J. K., Opstelten, D. J., Ericsson, M., Horzinek, M. C., & Rottier, P. J. (1995). Oligomerization of a trans-Golgi/trans-Golgi network retained protein occurs in the Golgi complex and may be part of its retention. *J Biol Chem*, **270**(15), 8815-8821.
- Locker, J. K., Rose, J. K., Horzinek, M. C., & Rottier, P. J. (1992). Membrane assembly of the triple-spanning coronavirus M protein. Individual transmembrane domains show preferred orientation. *J Biol Chem*, **267**(30), 21911-21918.
- Lontok, E., Corse, E., & Machamer, C. E. (2004). Intracellular targeting signals contribute to localization of coronavirus spike proteins near the virus assembly site. *J Virol*, **78**(11), 5913-5922.
- Lu, W., Zheng, B. J., Xu, K., Schwarz, W., Du, L., Wong, C. K., Chen, J., Duan, S., Deubel, V., & Sun, B. (2006). Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(33), 12540-12545.
- Maceyka, M., & Machamer, C. E. (1997). Ceramide accumulation uncovers a cycling pathway for the cis-Golgi network marker, infectious bronchitis virus M protein. *J Cell Biol.*, **139**(6), 1411-1418.
- 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.
- Marie, J. C., Saltel, F., Escola, J. M., Jurdic, P., Wild, T. F., & Horvat, B. (2004). Cell surface delivery of the measles virus nucleoprotein: a viral strategy to induce immunosuppression. *J Virol*, **78**(21), 11952-11961.
- Marks, M. S., Woodruff, L., Ohno, H., & Bonifacino, J. S. (1996). Protein targeting by tyrosine- and dileucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol*, **135**(2), 341-354.
- Marra, M. A., Jones, S. J., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y. S., Khattri, J., Asano, J. K., Barber, S. A., Chan, S. Y., Cloutier, A., Coughlin, S. M., Freeman, D., Girn, N., Griffith, O. L., Leach, S. R., Mayo, M., McDonald, H., Montgomery, S. B., Pandoh, P. K., Petrescu, A. S., Robertson, A. G., Schein, J. E., Siddiqui, A., Smailus, D. E., Stott, J. M., Yang, G. S., Plummer, F., Andonov, A., Artsob, H., Bastien, N., Bernard, K., Booth, T. F., Bowness, D., Czub, M., Drebot, M., Fernando, L., Flick, R., Garbutt, M., Gray, M., Grolla, A., Jones, S., Feldmann, H., Meyers, A., Kabani, A., Li, Y., Normand, S., Stroher, U., Tipples, G. A., Tyler, S., Vogrig, R., Ward, D., Watson, B., Brunham, R. C., Kraiden, M., Petric, M.,

- Skowronski, D. M., Upton, C., & Roper, R. L. (2003). The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, **300**(5624), 1399-1404.
- Marsh, M., & Pelchen-Matthews, A. (2000). Endocytosis in viral replication. *Traffic*, **1**(7), 525-532.
- Martina, B. E., Haagmans, B. L., Kuiken, T., Fouchier, R. A., Rimmelzwaan, G. F., Van Amerongen, G., Peiris, J. S., Lim, W., & Osterhaus, A. D. (2003). Virology: SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature*, **425**(6961), 915.
- Matsuyama, S., & Taguchi, F. (2002). Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein. *J Virol*, **76**(23), 11819-11826.
- Matsuyama, S., Ujike, M., Morikawa, S., Tashiro, M., & Taguchi, F. (2005). Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(35), 12543-12547.
- McBride, C. E., Li, J., & Machamer, C. E. (2007). The cytoplasmic tail of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein contains a novel endoplasmic reticulum retrieval signal that binds COPI and promotes interaction with membrane protein. *J Virol*, **81**(5), 2418-2428.
- McConville, M. J., & Ferguson, M. A. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J*, **294** (Pt 2), 305-324.
- Monto, A. S., & Lim, S. K. (1974). The Tecumseh study of respiratory illness. VI. Frequency of and relationship between outbreaks of coronavirus infection. *J Infect Dis*, **129**(3), 271-276.
- Mortola, E., & Roy, P. (2004). Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett.*, **576**(1-2), 174-178.
- Müller, M. A., Van der Hoek, L., Voss, D., Kallies, R., Bader, O., Nitsche, A., Lehmann, D., Schulz, A. R., Kallies, S., & Niedrig, M. (2007). Characterization of Novel Human Coronavirus NL63 Open Reading Frame 3 Protein. *submitted*.
- Nal, B., Chan, C., Kien, F., Siu, L., Tse, J., Chu, K., Kam, J., Staropoli, I., Crescenzo-Chaigne, B., Escriou, N., van der Werf, S., Yuen, K. Y., & Altmeyer, R. (2005). Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J Gen Virol.*, **86**(5), 1423-1434.
- Narayanan, K., Maeda, A., Maeda, J., & Makino, S. (2000). Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J Virol.*, **74**(17), 8127-8134.
- Neumann, G., Feldmann, H., Watanabe, S., Lukashevich, I., & Kawaoka, Y. (2002). Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol*, **76**(1), 406-410.
- Nguyen, V.-P., & Hogue, B. G. (1997). Protein interactions during coronavirus assembly. *J. Virol.*, **71**, 9278-9284.
- Nicholls, J. M., Poon, L. L., Lee, K. C., Ng, W. F., Lai, S. T., Leung, C. Y., Chu, C. M., Hui, P. K., Mak, K. L., Lim, W., Yan, K. W., Chan, K. H., Tsang, N. C., Guan, Y., Yuen, K. Y., & Peiris, J. S. (2003). Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, **361**(9371), 1773-1778.
- Nilsson, I. M., & von Heijne, G. (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, **268**(8), 5798-5801.
- Nishimura, N., & Balch, W. E. (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science*, **277**(5325), 556-558.
- Niwa, H., Yamamura, K., & Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, **108**(2), 193-199.
- Nomura, R., Kiyota, A., Suzaki, E., Kataoka, K., Ohe, Y., Miyamoto, K., Senda, T., & Fujimoto, T. (2004). Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J Virol*, **78**(16), 8701-8708.
- Opstelten, D. J., Horzinek, M. C., & Rottier, P. J. (1993). Complex formation between the spike protein and the membrane protein during mouse hepatitis virus assembly. *Adv Exp Med Biol*, **342**, 189-195.
- Opstelten, D. J., Raamsman, M. J., Wolfs, K., Horzinek, M. C., & Rottier, P. J. (1995). Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J Cell Biol.*, **131**(2), 339-349.
- Peiris, J. S., Guan, Y., & Yuen, K. Y. (2004). Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med*, **10**(12 Suppl), S88-97.

- Peiris, J. S., Lai, S. T., Poon, L. L., Guan, Y., Yam, L. Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W. K., Yan, W. W., Cheung, M. T., Cheng, V. C., Chan, K. H., Tsang, D. N., Yung, R. W., Ng, T. K., & Yuen, K. Y. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, **361**(9366), 1319-1325.
- Petrescu, A. J., Milac, A. L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A., & Wormald, M. R. (2004). Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*, **14**(2), 103-114.
- Pfefferle, S., Grywna, K., & Drosten, C. (2007). *Characterisation of a patient-derived mutant of SARS-CoV by a novel T7 promotor-driven infectious cDNA clone*. Paper presented at the Third European Congress of Virology, Nürnberg.
- Poutanen, S. M., Low, D. E., Henry, B., Finkelstein, S., Rose, D., Green, K., Tellier, R., Draker, R., Adachi, D., Ayers, M., Chan, A. K., Skowronski, D. M., Salit, I., Simor, A. E., Slutsky, A. S., Doyle, P. W., Krajden, M., Petric, M., Brunham, R. C., & McGeer, A. J. (2003). Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med*, **348**(20), 1995-2005.
- Pyrce, K., Dijkman, R., Deng, L., Jebbink, M. F., Ross, H. A., Berkhout, B., & van der Hoek, L. (2006). Mosaic structure of human coronavirus NL63, one thousand years of evolution. *J Mol Biol*, **364**(5), 964-973.
- Raamsman, M. J., Locker, J. K., de Hooge, A., de Vries, A. A., Griffiths, G., Vennema, H., & Rottier, P. J. (2000). Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. *J Virol*, **74**(5), 2333-2342.
- Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hubinger, A., & Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol*, **141**(3-4), 557-572.
- Rapoport, T. A. (1991). Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane: facts, models, mysteries. *Faseb J*, **5**(13), 2792-2798.
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B., & Kutay, U. (1996). Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu Rev Biochem*, **65**, 271-303.
- Risco, C., Anton, I. M., Sune, C., Pedregosa, A. M., Martin-Alonso, J. M., Parra, F., Carrascosa, J. L., & Enjuanes, L. (1995). Membrane protein molecules of transmissible gastroenteritis coronavirus also expose the carboxy-terminal region on the external surface of the virion. *J Virol.*, **69**(9), 5269-5277.
- Risco, C., Muntion, M., Enjuanes, L., & Carrascosa, J. L. (1998). Two types of virus-related particles are found during transmissible gastroenteritis virus morphogenesis. *J Virol*, **72**(5), 4022-4031.
- 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., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C., Burns, C., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A. D., Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J., & Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *science*, **300**(5624), 1394-1399.
- Rothman, J. E., & Wieland, F. T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science*, **272**(5259), 227-234.
- Rottier, P. J., & Rose, J. K. (1987). Coronavirus E1 glycoprotein expressed from cloned cDNA localizes in the Golgi region. *J Virol*, **61**(6), 2042-2045.
- Rottier, P. J., Welling, G. W., Welling-Wester, S., Niesters, H. G., Lenstra, J. A., & Van der Zeijst, B. A. (1986). Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1. *Biochemistry*, **25**(6), 1335-1339.
- Schwegmann-Wessels, C., Al-Falah, M., Escors, D., Wang, Z., Zimmer, G., Deng, H., Enjuanes, L., Naim, H. Y., & Herrler, G. (2004). A novel sorting signal for intracellular localization is present in the S protein of a porcine coronavirus but absent from severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J Biol Chem*, **279**(42), 43661-43666.
- Seto, W. H., Tsang, D., Yung, R. W., Ching, T. Y., Ng, T. K., Ho, M., Ho, L. M., & Peiris, J. S. (2003). Effectiveness of precautions against droplets and contact in prevention of nosocomial transmission of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Lancet*, **361**(9368), 1519-1520.
- Shi, X., & Elliott, R. M. (2004). Analysis of N-linked glycosylation of hantaan virus glycoproteins and the role of oligosaccharide side chains in protein folding and intracellular trafficking. *J Virol*, **78**(10), 5414-5422.

- Siddell, S. (1995). *The coronaviridae*. New York: Plenum Press.
- Simmons, G., Gosalia, D. N., Rennekamp, A. J., Reeves, J. D., Diamond, S. L., & Bates, P. (2005). Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(33), 11876-11881.
- Simmons, G., Reeves, J. D., Rennekamp, A. J., Amberg, S. M., Piefer, A. J., & Bates, P. (2004). Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(12), 4240-4245.
- Skehel, J. J., Stevens, D. J., Daniels, R. S., Douglas, A. R., Knossow, M., Wilson, I. A., & Wiley, D. C. (1984). A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**(6), 1779-1783.
- 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**(5), 991-1004.
- 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., Zheng, H. J., Chern, S. W., Cheng, F., Pan, C. M., Xuan, H., Chen, S. J., Luo, H. M., Zhou, D. H., Liu, Y. F., He, J. F., Qin, P. Z., Li, L. H., Ren, Y. Q., Liang, W. J., Yu, Y. D., Anderson, L., Wang, M., Xu, R. H., Wu, X. W., Zheng, H. Y., Chen, J. D., Liang, G., Gao, Y., Liao, M., Fang, L., Jiang, L. Y., Li, H., Chen, F., Di, B., He, L. J., Lin, J. Y., Tong, S., Kong, X., Du, L., Hao, P., Tang, H., Bernini, A., Yu, X. J., Spiga, O., Guo, Z. M., Pan, H. Y., He, W. Z., Manuguerra, J. C., Fontanet, A., Danchin, A., Niccolai, N., Li, Y. X., Wu, C. I., & Zhao, G. P. (2005). Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(7), 2430-2435.
- Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, **12**(4), 43R-56R.
- Stadler, K., Massignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H. D., & Rappuoli, R. (2003). SARS--beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol*, **1**(3), 209-218.
- Stern, D. F., & Sefton, B. M. (1982). Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins. *J Virol*, **44**(3), 804-812.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K., & Cox, N. (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, **279**(5349), 393-396.
- Surjit, M., Kumar, R., Mishra, R. N., Reddy, M. K., Chow, V. T., & Lal, S. K. (2005). The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3-mediated translocation. *J Virol*, **79**(17), 11476-11486.
- Swift, A. M., & Machamer, C. E. (1991). A Golgi retention signal in a membrane-spanning domain of coronavirus E1 protein. *J Cell Biol*, **115**(1), 19-30.
- Tan, Y. J., Teng, E., Shen, S., Tan, T. H., 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 Virol*, **78**(13), 6723-6734.
- Tang, L., Zhu, Q., Qin, E., Yu, M., Ding, Z., Shi, H., Cheng, X., Wang, C., Chang, G., Zhu, Q., Fang, F., Chang, H., Li, S., Zhang, X., Chen, X., Yu, J., Wang, J., & Chen, Z. (2004). Inactivated SARS-CoV vaccine prepared from whole virus induces a high level of neutralizing antibodies in BALB/c mice. *DNA Cell Biol*, **23**(6), 391-394.
- Tang, X. C., Zhang, J. X., Zhang, S. Y., Wang, P., Fan, X. H., Li, L. F., Li, G., Dong, B. Q., Liu, W., Cheung, C. L., Xu, K. M., Song, W. J., Vijaykrishna, D., Poon, L. L., Peiris, J. S., Smith, G. J., Chen, H., & Guan, Y. (2006). Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J Virol*, **80**(15), 7481-7490.
- Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2006). 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis*, **12**(1), 15-22.
- ter Meulen, J., Bakker, A. B., van den Brink, E. N., Weverling, G. J., Martina, B. E., Haagmans, B. L., Kuiken, T., de Kruijff, J., Preiser, W., Spaan, W., Gelderblom, H. R., Goudsmit, J., & Osterhaus, A. D. (2004). Human monoclonal antibody as prophylaxis for SARS coronavirus infection in ferrets. *Lancet*, **363**(9427), 2139-2141.

- Thiel, V., Ivanov, K. A., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weissbrich, B., Snijder, E. J., Rabenau, H., Doerr, H. W., Gorbalenya, A. E., & Ziebuhr, J. (2003). Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol*, **84**(Pt 9), 2305-2315.
- Tirabassi, R. S., & Enquist, L. W. (1998). Role of envelope protein gE endocytosis in the pseudorabies virus life cycle. *J Virol*, **72**(6), 4571-4579.
- Tirabassi, R. S., & Enquist, L. W. (1999). Mutation of the YXXL endocytosis motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus gE. *J Virol*, **73**(4), 2717-2728.
- Tooze, J., Tooze, S., & Warren, G. (1984). Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur J Cell Biol*, **33**(2), 281-293.
- Tooze, J., Tooze, S. A., & Fuller, S. D. (1987). Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells. *J Cell Biol*, **105**(3), 1215-1226.
- Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M. R., Murphy, B. R., Rappuoli, R., & Lanzavecchia, A. (2004). An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med*, **10**(8), 871-875.
- Tresnan, D. B., Levis, R., & Holmes, K. V. (1996). Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol*, **70**(12), 8669-8674.
- Tusnady, G. E., & Simon, I. (1998). Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol*, **283**(2), 489-506.
- Tyrrell, D. A., Cohen, S., & Schlarb, J. E. (1993). Signs and symptoms in common colds. *Epidemiol Infect*, **111**(1), 143-156.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J., & Berkhout, B. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*, **10**(4), 368-373.
- van der Hoek, L., Sure, K., Ihorst, G., Stang, A., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Petersen, G., Forster, J., Berkhout, B., & Uberla, K. (2005). Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med*, **2**(8), e240.
- Vennema, H., Godeke, G. J., Rossen, J. W., Voorhout, W. F., Horzinek, M. C., Opstelten, D. J., & Rottier, P. J. (1996). Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *Embo J*, **15**(8), 2020-2028.
- Viklund, H., & Elofsson, A. (2004). Best alpha-helical transmembrane protein topology predictions are achieved using hidden Markov models and evolutionary information. *Protein Sci*, **13**(7), 1908-1917.
- Vogt, C., Eickmann, M., Diederich, S., Moll, M., & Maisner, A. (2005). Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins. *J Virol*, **79**(6), 3865-3872.
- von Heijne, G. (1989). Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature*, **341**(6241), 456-458.
- Voss, D., Kern, A., Traggiai, E., Eickmann, M., Stadler, K., Lanzavecchia, A., & Becker, S. (2006). Characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus membrane protein. *FEBS Lett*, **580**(3), 968-973.
- Watts, J. (2004). China culls wild animals to prevent new SARS threat. *Lancet*, **363**(9403), 134.
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D., & Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, **422**(6929), 307-312.
- Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev*, **69**(4), 635-664.
- Weisz, O. A., Swift, A. M., & Machamer, C. E. (1993). Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J Cell Biol*, **122**(6), 1185-1196.
- Welply, J. K., Shenbagamurthi, P., Lennarz, W. J., & Naider, F. (1983). Substrate recognition by oligosaccharyltransferase. Studies on glycosylation of modified Asn-X-Thr/Ser tripeptides. *J Biol Chem*, **258**(19), 11856-11863.
- WHO. (2003a). *Prevalence of IgG antibody to SARS-associated coronavirus in animal traders--Guangdong Province, China, 2003* (No. 1545-861X (Electronic)).

- WHO. (2003b). Update: Outbreak of severe acute respiratory syndrome--worldwide, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **52**(12), 241-246, 248.
- Wilson, L., McKinlay, C., Gage, P., & Ewart, G. (2004). SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology*, **330**(1), 322-331.
- Wojczyk, B. S., Takahashi, N., Levy, M. T., Andrews, D. W., Abrams, W. R., Wunner, W. H., & Spitalnik, S. L. (2005). N-glycosylation at one rabies virus glycoprotein sequon influences N-glycan processing at a distant sequon on the same molecule. *Glycobiology*, **15**(6), 655-666.
- Wong, C. K., Lam, C. W., Wu, A. K., Ip, W. K., Lee, N. L., Chan, I. H., Lit, L. C., Hui, D. S., Chan, M. H., Chung, S. S., & Sung, J. J. (2004a). Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol*, **136**(1), 95-103.
- Wong, S. K., Li, W., Moore, M. J., Choe, H., & Farzan, M. (2004b). A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem*, **279**(5), 3197-3201.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Chu, C. M., Chan, K. H., Tsoi, H. W., Huang, Y., Wong, B. H., Poon, R. W., Cai, J. J., Luk, W. K., Poon, L. L., Wong, S. S., Guan, Y., Peiris, J. S., & Yuen, K. Y. (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol*, **79**(2), 884-895.
- Wu, D., Tu, C., Xin, C., Xuan, H., Meng, Q., Liu, Y., Yu, Y., Guan, Y., Jiang, Y., Yin, X., Cramer, G., Wang, M., Li, C., Liu, S., Liao, M., Feng, L., Xiang, H., Sun, J., Chen, J., Sun, Y., Gu, S., Liu, N., Fu, D., Eaton, B. T., Wang, L. F., & Kong, X. (2005). Civets are equally susceptible to experimental infection by two different severe acute respiratory syndrome coronavirus isolates. *J Virol*, **79**(4), 2620-2625.
- Wurm, T., Chen, H., Hodgson, T., Britton, P., Brooks, G., & Hiscox, J. A. (2001). Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J Virol*, **75**(19), 9345-9356.
- Yang, Z. Y., Kong, W. P., Huang, Y., Roberts, A., Murphy, B. R., Subbarao, K., & Nabel, G. J. (2004). A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature*, **428**(6982), 561-564.
- Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellicchio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T., & Holmes, K. V. (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, **357**(6377), 420-422.
- Yount, B., Curtis, K. M., & Baric, R. S. (2000). Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol*, **74**(22), 10600-10611.
- Yount, B., Curtis, K. M., Fritz, E. A., Hensley, L. E., Jahrling, P. B., Prentice, E., Denison, M. R., Geisbert, T. W., & Baric, R. S. (2003). Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(22), 12995-13000.
- Yount, B., Denison, M. R., Weiss, S. R., & Baric, R. S. (2002). Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol*, **76**(21), 11065-11078.
- Yu, I. M., Gustafson, C. L., Diao, J., Burgner, J. W., 2nd, Li, Z., Zhang, J., & Chen, J. (2005). Recombinant severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein forms a dimer through its C-terminal domain. *J Biol Chem*, **280**(24), 23280-23286.
- Yuan, Q., Liao, Y., Torres, J., Tam, J. P., & Liu, D. X. (2006). Biochemical evidence for the presence of mixed membrane topologies of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein expressed in mammalian cells. *FEBS Lett*, **580**(13), 3192-3200.
- Zelus, B. D., Schickli, J. H., Blau, D. M., Weiss, S. R., & Holmes, K. V. (2003). Conformational changes in the spike glycoprotein of murine coronavirus are induced at 37 degrees C either by soluble murine CEACAM1 receptors or by pH 8. *J Virol*, **77**(2), 830-840.
- Zhong, N. S., Zheng, B. J., Li, Y. M., Poon, X. Z., Chan, K. H., Li, P. H., Tan, S. Y., Chang, Q., Xie, J. P., Liu, X. Q., Xu, J., Li, D. X., Yuen, K. Y., Peiris, J. S., & Guan, Y. (2003). Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*, **362**(9393), 1353-1358.
- Ziebuhr, J. (2005). The coronavirus replicase. *Curr Top Microbiol Immunol*, **287**, 57-94.
- Ziebuhr, J., Snijder, E. J., & Gorbalenya, A. E. (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol*, **81**(Pt 4), 853-879.

- Ziebuhr, J., Thiel, V., & Gorbalenya, A. E. (2001). The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond. *J Biol Chem*, **276**(35), 33220-33232.
- Ziegler, T., Matikainen, S., Ronkko, E., Osterlund, P., Sillanpaa, M., Siren, J., Fagerlund, R., Immonen, M., Melen, K., & Julkunen, I. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus fails to activate cytokine-mediated innate immune responses in cultured human monocyte-derived dendritic cells. *J Virol*, **79**(21), 13800-13805.

Abkürzungsverzeichnis

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

α	anti
aa	Aminosäure
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
COP	Coat protein complex
C-Terminus	Carboxyterminus
def	deficient
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi intermediäres Kompartiment
FCS	Fetales Kälberserum
ffu	Fluorescence forming unit
GlcNac	N-Acetylglucosamin
IBV	Infektiöses Bronchitis Virus der Vögel
IFN	Interferon
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Membranprotein
M ₀	Unglykosyliertes Membranprotein
M ₁	Glykosyliertes Membranprotein
MHV	Maus Hepatitis Virus
Mock	Scheinfektion
MOI	multiplicity of infection
N-Terminus	Aminoternus
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
POD	Peroxidase
P/S	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SARS-CoV	engl.: Severe acute respiratory syndrome-coronavirus - Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus
TGEV	Transmissibles Gastroenteritis Virus der Schweine
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
UpM	Umdrehungen pro Minute
VLP	Virus-like particles
WT	Wildtyp