

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel

**Molekulare Mechanismen des SARS-Coronavirus:  
Charakterisierung des akzessorischen 7a-Proteins und  
Effekt des proteasomalen Inhibitors MG-132  
auf die virale Replikation**

Martha Ilona Schneider

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. M. Schemann  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ. - Prof. Dr. D. Haller  
2. Univ. - Prof. Dr. H. Schätzl  
University of Wyoming, Laramie, USA

Die Dissertation wurde am 22. 03. 2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 14. 07. 2011 angenommen.

**Meinen Eltern**

## ZUSAMMENFASSUNG

Infolge einer zum Teil gering ausgeprägten Wirtsspezifität können tierische Coronaviren aerogen auf den Menschen übertragen werden. Die ausgeprägte genetische Variabilität, sowie kurze Generationszeiten befähigen Coronaviren zudem zur schnellen Adaptation an einen neuen Wirt. Die weltweite Verbreitung von Coronaviren in verschiedenen Tierpopulationen stellt somit ein Reservoir an auf den Menschen übertragbaren Viren dar, und das Risiko der Entstehung eines potentiell humanpathogenen Coronavirus durch Zoonose ist stets gegeben. So ist es im Jahre 2003, mittels zoonotischer Übertragung, zur Entstehung eines völlig neuartigen, hoch infektiösen und außerordentlich pathogenen Coronavirus gekommen. Bis zum Ende der SARS-Pandemie im Frühjahr 2004 waren 8096 Menschen an dem schweren akuten respiratorischen Syndrom – kurz SARS – erkrankt und 774 Patienten durch schwerste Verlaufsformen zu Tode gekommen. Auch wenn zahlreiche Maßnahmen eine Eliminierung des SARS-Coronavirus aus der Humanbevölkerung bewirken konnten, sind die zugrundeliegenden Mechanismen der außerordentlichen Pathogenität des SARS-CoV nicht hinreichend geklärt. Zur Aufklärung molekularer Mechanismen des SARS-CoV wurde hier das akzessorische Protein 7a untersucht. Obwohl das Protein für die virale Replikation nicht notwendig ist, wird ihm aufgrund seiner proapoptischen, zellwachstum-inhibierenden und proteintranslationshemmenden Wirkungen eine mögliche Funktion bei der viralen Pathogenese zugeschrieben. Eine mittels Yeast-2-Hybrid Screen identifizierte Interaktion des 7a-Proteins mit dem ER-Chaperon BiP in einer vorangegangenen Diplomarbeit konnte zunächst mittels Co-Immunopräzipitation in Säugetierzellen bestätigt werden. Aufgrund der Fähigkeit von BiP zur Initiierung der „unfolded protein response“ konzentrierten sich nachfolgende Untersuchungen auf entsprechende Signalwege. Die Expression des 7a-Proteins in VeroE6 Zellen führte aber weder zur Auslösung von ER-Stress noch zur nennenswerten Induktion oder Modulation von IRE1- bzw. PERK-abhängigen Signalwegen. Die weitere Charakterisierung des viralen Proteins konnte zeigen, dass es zur Ubiquitylierung und Degradation von 7a durch das Proteasom kommt. Mittels subzellulärer Lokalisierungsanalysen konnte der Lebensweg des viralen Proteins konstruiert werden. Nach Translokation in das Endoplasmatische Retikulum gelangt das 7a-Protein in den Golgi-Apparat. Mittels ER-Retentionssignal kann das Protein wieder zurück in das ER transportiert werden, von wo es entweder erneut in das Golgi-Kompartiment zurücktransportiert oder dem ER-abhängigen, proteasomalen Degradationsweg zugeführt wird. Die Hemmung des Golgi-ER-Transports führt zum Verbleib des Proteins im ER und erhöht so die Wahrscheinlichkeit der ERAD-abhängigen Degradation – eine Destabilisierung des 7a-Proteins war die Folge. Möglicherweise aufgrund fehlender viraler Interaktionspartner lokalisiert 7a in transfizierten Zellen vornehmlich im Golgi-Apparat, während in virus-infizierten Zellen vermehrt dessen ERGIC- und ER-Lokalisierung beobachtet werden konnte. In Zusammenschau dieser Daten ist anzunehmen, dass das akzessorische 7a-Protein beim Zusammenbau des Virions im Golgi-Apparat oder ERGIC eine Rolle spielt oder als

mögliches Transportprotein für virale Komponenten dient. Bei Infektionsversuchen mit SARS-CoV zur Bestätigung der oben gemachten Beobachtungen konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass die Behandlung infizierter Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 eine Reduktion der SARS-CoV Titer um 6 Logstufen zur Folge hat. Dabei inhibierte MG-132 einen initialen Schritt der viralen Replikation ohne jedoch Einfluss auf die Internalisierung des Virus zu nehmen. Weiterführende Analysen zeigten, dass die Hemmung der SARS-CoV Replikation durch MG-132 unabhängig von einer generellen proteasomalen Inhibition, der Auslösung von ER-Stress oder auch von der Induktion autophagolysosomaler Signalwege ist. Eine Abhängigkeit der SARS-CoV Replikation von einem funktionellen Autophagie-System konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Eine gleichermassen massive Reduktion der SARS-CoV Titer durch die spezifische Inhibition der Cystein-Protease m-Calpain, die neben der proteasomalen Inhibition ebenfalls durch MG-132 bewirkt werden kann, konnte abschließend klären, dass den inhibitorischen Effekten von MG-132 höchstwahrscheinlich die Hemmung von m-Calpain zu Grunde liegt. Somit scheinen intrazelluläre Calpaine oder mögliche calpain-ähnliche virale Proteaseaktivitäten von entscheidender Bedeutung für die initiale SARS-CoV Replikation zu sein. Bei Verbesserung der Wirksamkeit könnten Calpain-Inhibitoren somit ein effizientes Mittel zur Intervention bei einer möglichen SARS-Coronavirus Infektion sein.

## SUMMARY

A minor host specificity enables transmission of animal coronaviruses to humans. Their distinct genetic variability and short generation times facilitate then a fast adaptation to the new host. The worldwide distribution of *Coronaviridae* in animal populations is likely a reservoir of viruses that could infect humans. Therefore, the risk for the emergence of a potentially pathogenic human virus by zoonosis exists. In line with this, a new highly infectious and very pathogenic human virus emerged by zoonotic transmission in 2003, and soon reached pandemic levels. At the end of the pandemic in spring 2004 over 8096 patients were identified with the 'severe acute respiratory syndrome' (SARS), and 774 of them had fatal outcome. Although a combination of various efforts was able to totally eliminate the SARS-CoV in the human population, the molecular mechanisms underlying the extraordinary pathogenicity of this new human coronavirus are still not fully elucidated. Here, the SARS-CoV-specific accessory protein 7a was investigated. Although this protein is not needed for viral replication, it exerts proapoptotic, growth, and protein translation inhibitory functions and might therefore play a role in viral pathogenesis. The interaction of 7a protein with the ER chaperone BiP, which has been identified by a yeast-2-hybrid screen previously, was confirmed in mammalian cells. Because of BiP's ability to initiate the unfolded protein response (UPR), subsequent studies focused on implicated signal transduction pathways. Expression of 7a protein in VeroE6 cells neither induced ER stress nor resulted in detectable modification of or interference with IRE1 or PERK-dependent UPR pathways. Further characterization showed that the 7a protein is ubiquitinated and degraded by the proteasome. By analyzing its intracellular localization, the life cycle of 7a was elucidated. Upon translocation into the endoplasmic reticulum (ER) the viral protein reaches the Golgi apparatus. The protein can travel back to the ER where it is either retransported to the Golgi or subjected to ER-associated degradation (ERAD). The inhibition of ER-Golgi transport caused retention of 7a in ER, thereby increasing the probability of its degradation via ERAD. In fact, a massive destabilization of the 7a protein was observed. Due to the absence of virus-encoded interaction partners, 7a localized in transfected cells in the Golgi apparatus, whereas in SARS-CoV infected cells the dominant ERGIC and ER-localization of the viral protein was found. Based on this data, we assume that 7a might either take part in virion assembly in the Golgi apparatus or serve as a transport protein for viral components. Surprisingly, infection experiments with SARS-CoV showed that treatment of infected cells with the proteasomal inhibitor MG-132 led to a 6-log decrease of SARS-CoV titers. MG-132 inhibited early steps during viral replication without affecting viral internalization. Follow-up studies showed that inhibition of viral replication by MG-132 is independent of general proteasomal inhibition, induction of ER stress or autophagy. It was also shown that a functional autophagy system is not needed for efficient SARS-CoV replication in general. The likewise reduction of viral titers by specific inhibition of m-calpain, which is also affected by MG-132, eventually showed that inhibition of SARS-CoV

replication by MG-132 is most likely due to inhibition of m-calpain. Therefore, cellular m-calpain or a calpain-like viral protease activity is essential for SARS-CoV replication. Given that binding specificities can be optimized and bio-availability improved, calpain inhibitors might therefore represent a promising tool to fight SARS-CoV infection.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Das schwere akute respiratorische Syndrom - SARS</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Coronaviren</b>	<b>11</b>
<b>1.2.1 Coronaviren des Menschen</b>	<b>11</b>
1.2.1.1 HCoV-229E und HCoV-OC43	11
1.2.1.2 HCoV-NL63 und HCoV-HKU1	12
<b>1.2.2 Coronaviren des Tieres</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Das SARS-Coronavirus (SARS-CoV)</b>	<b>15</b>
<b>1.3.1 Aufbau</b>	<b>15</b>
<b>1.3.2 Genom und Genomreplikation</b>	<b>16</b>
<b>1.3.3 Replikation und Pathogenese</b>	<b>18</b>
1.3.3.1 Replikation	18
1.3.3.2 Pathogenese	19
<b>1.3.4 Akzessorische SARS-CoV Proteine</b>	<b>21</b>
Das akzessorische Protein 7a	22
<b>1.4 BiP/Grp78</b>	<b>23</b>
<b>1.4.1 ER-Stress</b>	<b>24</b>
<b>1.4.2 Unfolded protein response (UPR)</b>	<b>25</b>
<b>1.5 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)</b>	<b>27</b>
<b>1.6 Einflussnahme viraler Proteine auf die ER-Funktion und UPR</b>	<b>28</b>
<b>1.7 Zielsetzung</b>	<b>30</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>31</b>
<b>2.1.1 Chemikalien</b>	<b>31</b>
<b>2.1.2 Substanzen zur Behandlung von Säugetierzellen</b>	<b>32</b>
<b>2.1.3 Kits</b>	<b>33</b>
<b>2.1.4 Zelllinien</b>	<b>34</b>
<b>2.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze</b>	<b>34</b>
<b>2.1.6 Oligonukleotide</b>	<b>34</b>

<b>2.1.7</b>	<b>Enzyme und Antikörper</b>	<b>35</b>
2.1.7.1	Enzyme	35
2.1.7.2	Antikörper	35
<b>2.1.8</b>	<b>Plasmide und Bakterienstämme</b>	<b>37</b>
<b>2.1.9</b>	<b>Instrumente</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>40</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Biologische Sicherheit</b>	<b>40</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Photodensitometrie und Statistik</b>	<b>40</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>41</b>
2.2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.2.3.2	Agarosegelelektrophorese	42
2.2.3.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	42
2.2.3.4	Enzymatischer Verdau von DNA	42
2.2.3.5	Ligation	43
2.2.3.6	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i>	43
2.2.3.7	Plasmidisolation aus <i>E.coli</i> im präparativen Maßstab	43
2.2.3.8	Plasmidisolation aus <i>E.coli</i> im analytischen Maßstab	44
2.2.3.9	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	44
2.2.3.10	Sequenzierung von Nukleinsäuren	44
2.2.3.11	RNA Isolation	44
2.2.3.12	Reverse Transkription und cDNA-Synthese	45
<b>2.2.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>45</b>
2.2.4.1	Präparation von postnukleären Lysaten für die SDS-PAGE	45
2.2.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	46
2.2.4.3	Immunopräzipitation und Co-Immunopräzipitation	46
2.2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.2.4.5	Immunoblot	49
2.2.4.6	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse und konfokale Mikroskopie	50
<b>2.2.5</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>51</b>
2.2.5.1	Auftauen von Säugetierzellen	51
2.2.5.2	Kultivierung von Säugetierzellen	51
2.2.5.3	Einfrieren von Säugetierzellen	52
2.2.5.4	Bestimmung der Zellzahl	52
2.2.5.5	Transiente Transfektion von Säugetierzellen	52
2.2.5.6	Luciferase-Reporter-Gen-Assay	53
2.2.5.7	Viabilitäts-Assay (XTT)	54
<b>2.2.6</b>	<b>Virologische Methoden</b>	<b>55</b>
2.2.6.1	Anzucht des SARS-CoV (Produktion viraler Überstände)	55
2.2.6.2	Bestimmung der Virustiter (Plaque-Assay)	56
2.2.6.3	Infektion von Zellen mit SARS-CoV	57

2.2.6.4	Internalisierungsassay	58
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Bestätigung der 7a-BiP Interaktion in Säugetierzellen</b>	<b>59</b>
3.1.1	Untersuchung der BiP-Expression in verschiedenen Säugetierzelllinien	59
3.1.2	Klonierung eines BiP-Expressionskonstruktes und Bestätigung der Expression in VeroE6 Zellen	60
3.1.3	Bestätigung der 7a-BiP Interaktion mittels Co-Immunopräzipitation	60
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der 7a-BiP Interaktion</b>	<b>62</b>
3.2.1	Untersuchung der BiP-Expressionsmenge in 7a-exprimierenden VeroE6 Zellen	63
3.2.2	Untersuchung der Aktivierung von ER-Stress abhängigen Elementen durch das 7a-Protein	64
3.2.3	Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von eIF2alpha in 7a-exprimierenden Zellen	65
3.2.4	Untersuchung des Splicings des XBP1 in 7a-exprimierenden Zellen	66
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung des 7a-Proteins</b>	<b>68</b>
3.3.1	Stabilisierung des nativen 7a-Proteins durch proteasomale Hemmung	69
3.3.2	Untersuchung der 7a-Expressionsmenge bei ER-Stress	70
3.3.3	Bestimmung der Halbwertszeit des 7a-Proteins	71
3.3.4	Untersuchungen zur Ubiquitinylierung des 7a-Proteins	72
3.3.5	Charakterisierung der 7a-Lokalisierung in der Zelle	73
3.3.5.1	Lokalisierung des 7a-Proteins bei transienter Expression	73
3.3.5.2	Lokalisierung des 7a-Proteins während der SARS-CoV Infektion	77
3.3.6	Destabilisierung des 7a-Proteins durch Hemmung des ER-Golgi-Transports	79
<b>3.4</b>	<b>Untersuchung des Effektes von MG-132 auf die SARS-CoV Replikation</b>	<b>80</b>
3.4.1	Hemmung der SARS-CoV Replikation durch MG-132	81
3.4.1.1	Dosisabhängige Hemmung der SARS-CoV Titerproduktion durch MG-132	81
3.4.1.2	Einfluss von proteasomalen Inhibitoren auf die SARS-CoV Replikation	82
3.4.1.3	SARS-CoV Replikationskinetik in DMSO und MG-132-behandelten Zellen	84
3.4.1.4	Hemmung initialer SARS-CoV Replikationsschritte durch MG-132	85
3.4.2	Untersuchung der Abhängigkeit der SARS-CoV Replikation von Autophagie	88
3.4.2.1	SARS-CoV Replikation und Induktion von Autophagie	89
3.4.2.2	SARS-CoV Replikation und Inhibition der Virusreplikation durch MG-132 in autophagie-defizienten Zellen	90
3.4.3	Einfluss der Calpain-Aktivität auf die SARS-CoV Replikation	92
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>95</b>
<b>4.1</b>	<b>Bestätigung der 7a-BiP Interaktion</b>	<b>95</b>
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der 7a-BiP Interaktion</b>	<b>96</b>
4.2.1	Einflussnahme des 7a-Proteins auf ER-Stress und UPR	96

4.2.2	Alternative Wirkungsmechanismen des 7a-Proteins durch Interaktion mit BiP	99
4.3	Charakterisierung des 7a-Proteins	100
4.3.1	Proteasomale Degradation des 7a-Proteins	101
4.3.2	Lokalisierung des 7a-Proteins	102
4.4	Hemmung der SARS-CoV Replikation durch MG-132	108
4.4.1	Unabhängigkeit des MG-132-Effektes von der Auslösung von ER-Stress oder der UPR	110
4.4.2	Unabhängigkeit der SARS-CoV Replikation und des MG-132-Effektes vom autophagosomalen System	111
4.4.3	Einfluss von Calpain-Inhibitoren auf die SARS-CoV Replikation	113
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>116</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>138</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>140</b>
	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>141</b>
	<b>PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN</b>	<b>144</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>145</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DAS SCHWERE AKUTE RESPIRATORISCHE SYNDROM - SARS

Im November des Jahres 2002 wurde in der südchinesischen Provinz Guangdong erstmalig das Auftreten einer schweren atypischen Lungenentzündung beschrieben (WHOa, 2003). Die hohe Kontagiösität des unbekanntes Erregers und dessen sehr effiziente Übertragung durch Tröpfchen- und Schmierinfektion führte innerhalb weniger Monate zur rasanten Ausbreitung der schweren Infektionskrankheit in ganz Südchina und ausgehend von Honkong über infizierte Flugreisende weiter nach z. B. Vietnam, Singapur, Nordamerika und Europa. Am 12. März 2003 meldete die WHO rückwirkend das Auftreten einer epidemischen, atypischen Lungenentzündung durch einen unbekanntes respiratorischen Erreger im südchinesischen Raum (WHOa, 2003). Entsprechend der Symptomatik wurde die Erkrankung als schweres akutes respiratorisches Syndrom - kurz SARS - bezeichnet. Nach einer Inkubationszeit von 3-7 Tagen litten infizierte Personen an sehr hohem Fieber, Allgemeinsymptomen wie Kopfschmerzen, Gliederschmerzen und Halsschmerzen und respiratorischen Symptomen wie trockenem Husten und Kurzatmigkeit (WHOa, 2003;Groneberg *et al.*, 2005). In seltenen Fällen traten auch gastrointestinale Beschwerden wie eine wässrige Diarrhöe auf (Peiris *et al.*, 2003a). Ein Großteil der erkrankten Personen entwickelte eine schwere Lungenentzündung, in deren Verlauf es in 20 % der Fälle zum akuten respiratorischen Distress-Syndrom (ARDS) kam (Groneberg *et al.*, 2005). In 50 % der ARDS-Fälle führte akutes Lungenversagen innerhalb einer Woche zum Tod, in rekonvaleszenten Patienten traten komplikative Folgeschäden der Lunge und des Herzens auf (Han *et al.*, 2003). Aufgrund der hohen Infektiösität, Pathogenität und hohen Mortalität des Erregers, einem explosionsartigen Anstieg der SARS-Fälle auf 1804 und dessen Verbreitung auf 15 Länder weltweit wurde von der WHO der Pandemie-Status erklärt und weltweite wissenschaftliche Kollaborationen angestrengt um den SARS-Erreger schnellstmöglich zu identifizieren (WHOc, 2011). Drosten *et al.*, Ksiazek *et al.* und Peiris *et al.* konnten schließlich Ende März 2003 zeitgleich bestätigen, dass es sich bei dem SARS-Erreger um ein neuartiges Coronavirus handelt (Ksiazek *et al.*, 2003;Drosten *et al.*, 2003;Peiris *et al.*, 2003b;WHOd, 2011). Vergleichende Sequenzanalysen zeigten, dass wenig Homologien zu den bekannten humanen Coronaviren bestanden, und, dass es sich hierbei höchstwahrscheinlich um ein Coronavirus zoonotischen Ursprungs handeln musste (Rota *et al.*, 2003;Marra *et al.*, 2003). Weiterführende Untersuchungen führten zur Identifikation eines zu 99,9 % homologen Virus in einer normalerweise wildlebenden Marderart (Zibetkatze, *Paguma larvata*) (Guan *et al.*, 2003), deren Verzehr jedoch in südchinesischen Provinzen als Delikatesse angesehen wird. Bei Veräusserung und Verkauf von Zibetkatzen auf einem Wildtiermarkt der Provinz musste es durch den engen Kontakt der Tiere mit z.B. Händlern oder Pflegern zur Übertragung des tierischen Virus auf den Menschen gekommen sein.

Durch Keulung aller Tierbestände auf Märkten und Zuchtfarmen und gleichzeitiger, global organisierter, strenger Isolations- und Eindämmungsmassnahmen konnte die weitere Ausbreitung der SARS-Infektion und die Eliminierung des SARS-Coronavirus in der Humanbevölkerung erwirkt werden. Bis zum Ende der Pandemie im Juli des Jahres 2003 waren 8096 Menschen in 32 Ländern der Erde erkrankt und 774 Patienten in Folge des schweren akuten respiratorischen Syndroms durch das SARS-CoV zu Tode gekommen (WHOc, 2011). Die für humane Coronaviren untypisch hohe Pathogenität und hohe Mortalitätsrate von 10 %, die in immunsupprimierten oder älteren Personen auf 55 % ansteigen konnte (Donnelly *et al.*, 2003;WHOd, 2011), liess die eingehende wissenschaftliche Charakterisierung des neuartigen Coronavirus auch nach Eindämmung der Pandemie nicht abbrechen. Da aus Zibetkatzen von Zuchtfarmen und wildlebenden Populationen kein SARS-CoV und auch kein SARS-CoV ähnliches Virus isoliert werden konnte (Tu *et al.*, 2004;Kan *et al.*, 2005), war fraglich, ob es sich bei der Zibetkatze tatsächlich um den Ursprungswirt des SARS-CoV handelt. Aufgrund der Isolation von SARS-CoV ähnlichen viralen Partikeln aus Fledermäusen der Gattung *Rhinolophus* stellten Li *et al.* erstmalig die Hypothese auf, dass der Ursprung des SARS-CoV in Fledermäusen zu suchen sei (Lau *et al.*, 2005;Li *et al.*, 2005a). Tatsächlich konnte in den letzten Jahren durch verschiedene Forschergruppen das Vorhandensein sehr eng verwandter Viren in verschiedenen Fledermausarten mit weltweiter Verbreitung gezeigt werden (Quan *et al.*, 2010;Drexler *et al.*, 2010;Rihtaric *et al.*, 2010). Die Hypothese, dass die Übertragung eines SARS-CoV ähnlichen CoVs der Fledermausgattung Hufeisennasen (*Rhinolophidae*) über Zibetkatzen auf den Menschen und einer anschließenden Adaptation an den neuen Wirt zur Entstehung eines neuen, äusserst pathogenen humanen Coronavirus - des SARS-CoV - beigetragen hat, gilt heute als sehr wahrscheinlich.

Die fehlerbehaftete Replikation der viralen, RNA-abhängigen RNA Polymerase, die damit assoziierte hohe Mutationsrate und die kurzen Generationszeiten verleihen Coronaviren eine hohe genetische Variabilität (Holmes und Lai, 1996), die die schnelle Adaptation an einen alternativen Wirt ermöglichen kann. Die zudem hohe Infektiösität der Viren, die weite Verbreitung in vielen verschiedenen tierischen Populationen (Martina *et al.*, 2003;Guan *et al.*, 2003;Roberts *et al.*, 2005;Wu *et al.*, 2005) und eine teils nicht vorhandene Speziesbarriere verleihen dieser Virusfamilie ein hohes Potential zur zoonotischen Übertragung. Im zeitlichen Verlauf der SARS-Pandemie konnten verschiedene Deletionen oder einzelne Nukleotidvariationen im SARS-CoV Genom dokumentiert werden. Isolate der frühen Phase, die aus der Zibetkatze des Wildtiermarktes und dem ersten Patienten isoliert worden waren, zeigten milde SARS-Verlaufsformen. Virusisolate der mittleren Epidemie-Phase, die sich durch schwere Erkrankungen mit weitaus höherer Pathogenität auszeichneten, wiesen in ihrem Genom 14 einzelne Nukleotidvariationen auf, die zu einer Veränderung der Aminosäureabfolge in 11 Fällen führte. Virusisolate der letzten, epidemischen Phase unterschieden sich zu Isolaten der mittleren Phase wiederum um 6 Nukleotide (Cheng *et al.*, 2007). Die Nukleotidvariationen im Verlauf der Pandemie und die damit verbundene phänotypische Varianz, die

zu bestehenden Pathogenitätsunterschieden führte, macht die genotypische Variabilität von Coronaviren nochmals deutlich.

Die bestehende Zirkulation SARS-CoV-ähnlicher Viren in Populationen wildlebender Fledermäuse, die beschriebene genetische Variabilität und das sich daraus ergebende Zoonosepotential machen die weitere detaillierte Aufklärung molekularer Mechanismen während der SARS-Coronavirus-Infektion erforderlich. Dabei ist die Untersuchung und Charakterisierung von Abläufen während der SARS-CoV-Infektion ein geeignetes Mittel.

## 1.2 CORONAVIREN

Coronaviren bilden zusammen mit der Gattung *Arteriviridae* die Gruppe der *Nidovirales*, eine Virusfamilie, die über ein einzelsträngiges RNA-Genom in positiver Orientierung verfügt. Die einzigartige Transkriptionstrategie liegt der Namensgebung der Virusfamilie zu Grunde und leitet sich von dem lateinischen Wort „nidus“ für „Nest“ ab. Bei der Replikation dieser Viren entsteht eine Vielzahl subgenomischer, oftmals polycistronischer mRNA-Transkripte, die alle das gleiche 3'-Ende aufweisen, deren Startpunkte jedoch unterschiedlich sind. Trotz der unterschiedlichen Startpunkte verfügen sie jedoch alle über eine einheitliche 60-90 Nukleotide lange Sequenz: die Leader-RNA, die am 5'-Ende gecappt und komplementär zum 3'-Ende des Negativstranges ist. Die Ähnlichkeit des Erscheinungsbildes der viralen Partikel in elektronen-mikroskopischen Aufnahmen mit einem Strahlenkranz oder einer Krone (lat. „corona“) hat den Coronaviren ihren Namen verliehen. Coronaviren können im Menschen, aber auch in anderen Säugetieren und Vögeln hauptsächlich zu respiratorischen oder gastrointestinalen Erkrankungen führen. Während die bisher bekannten humanen Coronaviren (HCoV) zu meist milden, selbstlimitierenden Krankheitsverläufen mit einer lokal begrenzten Infektion des oberen respiratorischen Traktes und in seltenen Fällen des Gastrointestinaltraktes führen, sind tierische Coronaviren für meist systemische, schwere Erkrankungen mit oftmals fatalem Ausgang verantwortlich. Eine Auflistung der im Folgenden beschriebenen Coronaviren des Menschen und des Tieres und deren Einteilung in taxonomische Gruppen sind in **Tabelle 1** dargestellt.

### 1.2.1 CORONAVIREN DES MENSCHEN

#### 1.2.1.1 HCoV-229E und HCoV-OC43

Bereits in den 60er Jahren sind Infektionen mit den beiden humanen Coronaviren HCoV-OC43 und HCoV-229 beschrieben worden (Tyrrell und Bynoe, 1965). Durch Infektion freiwilliger, gesunder Personen konnte gezeigt werden, dass die Viren eine Erkrankung des oberen respiratorischen Traktes - eine gewöhnliche Erkältungskrankheit (*common cold*) - verursachen (van der Hoek *et al.*, 2004; Pyrc *et al.*, 2007). In den meisten Fällen verlaufen die Infektionen inapparent, manchmal kommt es zu

leichtem Schnupfen, Kopfweh, Halsweh, Husten und leichtem Fieber (Hendley *et al.*, 1972;van der Hoek *et al.*, 2004; Humanpathogene Coronaviren, Kapitel 14.8.5, Molekulare Virologie, Modrow *et al.*, 2010a). In sehr seltenen Fällen können auch leichte gastrointestinale Beschwerden auftreten (Modrow *et al.*, 2010a). Respiratorische Erkrankungen durch HCoV-229E und HCoV-OC43 treten vermehrt in den Wintermonaten auf und sind für etwa 10% aller leichten Erkältungskrankheiten verantwortlich (Larson *et al.*, 1980;Gaunt *et al.*, 2010; Humanpathogene Coronaviren, Kapitel 14.8.5, Molekulare Virologie, Modrow *et al.*, 2010a). Beide Viren sind in der Humanbevölkerung weit verbreitet, in etwa 90 % der Erwachsenen sind Antikörper gegen einen der beiden Humanerreger nachweisbar (Hovi *et al.*, 1979;Mathur *et al.*, 1982;Macnaughton, 1982). Die Infektion bleibt fast immer auf das Epithel des oberen respiratorischen Traktes beschränkt, kann sich in sehr seltenen Fällen aber auch auf das Epithel des Gastrointestinaltraktes ausweiten (van der Hoek *et al.*, 2004). Im gesunden Erwachsenen sind apparente Infektionen aufgrund der lokal begrenzten Infektion einzelner Organsysteme mit selbstlimitierendem Charakter und der schwachen Symptomatik unbedenklich (Pyrce *et al.*, 2007). Deshalb sind keine Therapieansätze oder Vakzine notwendig und vorhanden (Humanpathogene Coronaviren, Kapitel 14.8.5, Molekulare Virologie,Modrow *et al.*, 2010a). HCoV-Infektionen in Kindern, älteren Personen, immunsupprimierten Patienten oder Patienten mit einer gravierenden Grunderkrankung können jedoch etwas schwerer verlaufen (McIntosh *et al.*, 1973; Humanpathogene Coronaviren, Kapitel 14.8.5, Molekulare Virologie, Modrow *et al.*, 2010a).

#### 1.2.1.2 HCoV-NL63 und HCoV-HKU1

Im Jahr 2004 wurde in den Niederlanden ein neues humanes Coronavirus als Verursacher einer Bronchiolitis in einem kleinen Jungen identifiziert (van der Hoek *et al.*, 2004). Nach der erstmaligen Isolation des HCoV-NL63 in den Niederlanden konnte die weltweite Verbreitung des Virus festgestellt werden (Bastien *et al.*, 2005;Chiu *et al.*, 2005;Esper *et al.*, 2005;Ebihara *et al.*, 2005;Arden *et al.*, 2005). Phylogenetische Analysen konnten desweiteren zeigen, dass es sich bei HCoV-NL63 um ein sehr altes Virus handelt, dass sich vor etwa 1000 Jahren aus seinem nächsten Verwandten HCoV-229E entwickelt hat (Pyrce *et al.*, 2006). Die Symptomatik einer Erkrankung durch Infektion mit HCoV-NL63 entspricht der einer klassischen CoV-Infektion des Menschen, ist aber mit Fieber, Husten, Schnupfen oder einer möglichen Lungenentzündung oder Bronchiolitis meist deutlich schwerer (van der Hoek *et al.*, 2004;Chiu *et al.*, 2005). Besonders kleine Kinder sind davon betroffen (Bastien *et al.*, 2005;Chiu *et al.*, 2005;Esper *et al.*, 2005) und können einen schweren, kruppartigen Husten (Pseudo-Krupp) entwickeln (Chiu *et al.*, 2005;van der Hoek *et al.*, 2005;Pyrce *et al.*, 2007). Möglicherweise liegen den schweren Verlaufsformen auch Mischinfektionen mit anderen respiratorischen Viren wie dem Humanen Respiratorischen Syncytialvirus (HRSV) zu Grunde, die bei Infektion mit humanen Coronaviren häufig beobachtet werden können (Canducci *et al.*, 2008;Gaunt *et al.*, 2010). NL63 kann sowohl obere als auch untere Bereiche des respiratorischen Traktes infizieren und benutzt als funktionellen Rezeptor ebenso wie das SARS-CoV das ACE2-Protein („angiotensin

converting enzyme 2“) (van der Hoek *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2005). Da Mutationen des Rezeptors, die eine Bindung mit dem SARS-CoV negativ beeinträchtigen, keine Auswirkung auf die Bindung des NL63-Oberflächenproteins hat, ist anzunehmen, dass die beiden Viren zur Adsorption an unterschiedliche Bereiche des ACE2 binden (Hofmann *et al.*, 2006).

Gruppe	Mensch	Tier
1a		Coronavirus des Marderhunds, felines Coronavirus (FeCoV), porcines respiratorisches Virus (PRDV), Virus der transmissiblen Gastroenteritis der Schweine (TGEV)
1b	HCoV-229E HCoV-NL63	Coronavirus der Fledermaus HKU2,6,7,8
2a	HCoV - OC43 HCoV - HKU1	porcines hämagglutinierendes Enzephalomyelitisvirus (PHEV), Coronavirus des Rindes (BoCoV), murines Hepatitisvirus (MHV)
2b	SARS-CoV	SARS-Coronavirus der Fledermaus, SARS-Coronavirus der Zibetkatze
3		Virus der infektiösen Bronchitis der Vögel (IBV)

**Tabelle 1: Coronaviren und deren Einteilung in taxonomische Gruppen anhand der Helicase und Polymerase**

Kurz nach Identifikation des HCoV-NL63 in den Niederlanden konnte ein weiteres humanes Coronavirus aus einem älteren Patienten mit einer schweren Lungenentzündung in Hong Kong isoliert werden (Woo *et al.*, 2005). Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei wie auch bei HCoV-NL63 um ein lange in der Humanbevölkerung existentes Virus (Pyrce *et al.*, 2006), das jetzt erst isoliert wurde. Dementsprechend konnten neuere Studien eine weltweite Verbreitung des HCoV-HKU1 zeigen (Sloots *et al.*, 2006; Vabret *et al.*, 2006; Esper *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 2009). HCoV-HKU1 führt nur selten zur klinisch manifesten Infektion, die dann aber schwerer verläuft (Lau *et al.*, 2006; Pyrc *et al.*, 2007) und auch gastrointestinale Beschwerden zur Folge haben kann (Vabret *et al.*, 2006). Wie bei Infektionen mit den altbekannten humanen Coronaviren kommt es zum saisonalen Anstieg der HCoV-NL63 und HCoV-HKU1 Infektionen in den Wintermonaten (van der Hoek *et al.*, 2004; Bastien *et al.*, 2005; Gaunt *et al.*, 2010).

Vergleichbar mit anderen viralen Infektionen wird die Schwere der Erkrankung durch die Infektion mit einem humanen Coronavirus durch das Alter und dem damit unter Umständen korrelierenden Immunstatus eines Patienten entscheidend mitbestimmt (van der Hoek *et al.*, 2004; Pyrc *et al.*, 2007).

### 1.2.2 CORONAVIREN DES TIERES

Anders als im Menschen sind durch Coronaviren verursachte Erkrankungen des Tieres selten von milder Ausprägung. Aufgrund des ähnlichen Zelltropismus kommt es zwar ebenfalls zu respiratorischen und gastrointestinalen Beschwerden, die aber ungleich schwerer sind. Die Fähigkeit tierischer CoVs neben epitheliale Gewebe auch Zellen des Immunsystems wie Monocyten oder Makrophagen zu infizieren, ermöglicht die weite Ausbreitung des Virus im Wirt. Die Infektion verschiedener Organsysteme wie der Niere, der Leber oder sogar des zentralen Nervensystems (ZNS) sind daher möglich und führen zu schweren Erkrankungen, die im schlimmsten Fall zum Tod des infizierten Tieres führen. Bei Infektion von Schweinen mit dem Virus der transmissiblen Gastroenteritis (TGEV) kommt es zu schweren Darmentzündungen mit Erbrechen und Durchfall (Laude *et al.*, 1993; Saif, 1996), die Morbiditätsrate liegt bei 100% (Saif und Bohl, 1986). Die Mortalitätsrate ist relativ niedrig, kann aber in neonatalen Schweinen dramatisch ansteigen (Saif und Bohl, 1986; Garwes, 1988; Enjuanes, 1995). Dem TGEV sehr ähnliche Viren mit verändertem Zelltropismus sind das PHEV (porcines hämagglutinierendes Enzephalomyelitisvirus), das durch Weiterleitung über periphere Nervenbahnen das zentrale Nervensystem befällt und eine Enzephalitis in neugeborenen Ferkeln verursacht (Andries und Pensaert, 1980; Raihana *et al.*, 2009) und das PR-CoV (porcine respiratory virus), das zu erkältungsähnlichen Symptomen im Schwein führt (Rossow, 1998). Die Infektion des Rindes mit dem bovinen Coronavirus (Bo-CoV) bewirkt durch Infektion von Enterozyten den akuten Kälberdurchfall in den ersten Lebensstagen (Mebus *et al.*, 1973; Clark, 1993). Da die Möglichkeit zur effektiven Vakzinierung besteht, ist diese Erkrankung veterinärmedizinisch kontrollierbar. FeCoV - ein Coronavirus der Katze (Felines Coronavirus) - verursacht zumeist inapparente Infektionen oder eine milde Gastroenteritis mit leichtem Fieber und Durchfall (Olsen, 1993). Durch Mutation des FeCoV kann jedoch das weitaus virulentere Katzenvirus – das FIPV (felines Peritonitisvirus) entstehen (Vennema *et al.*, 1998). Die Infektion mit FIPV verursacht eine meist schwere Peritonitis mit Gewichtsverlust, Dehydration, Fieber und der typischen Wasseransammlung in der Bauchhöhle der Katze und verläuft vorallem in sehr jungen Katzen meist tödlich (Olsen, 1993). Obwohl zahlreiche Serotypen zirkulieren ist eine Vakzinierung gegen das FIP-Virus möglich, ist aber nur in sehr jungen Katzen effektiv. Problematisch für die Intensivtierhaltung ist im Besonderen der Erreger der infektiösen Bronchitis der Vögel. In ungeimpften Hühnerpopulationen kann die Morbidität durch Infektion mit IBV 100 % erreichen und äussert sich in respiratorischer Symptomatik wie Husten, Augen- und Nasenausfluss und der Einstellung der Eierlegetätigkeit (Cavanagh, 2007). Durch die Replikation in gastrointestinalen Epithelien wird das Virus auch über die Kloake ausgeschieden und ist neben dem aerogenen Weg auch durch Schmierinfektion übertragbar, was zur schnellen Durchseuchung eines Bestandes führt (Cavanagh, 2007). Einige Stämme des IBV können neuropathogen sein und neben der hohen Morbidität auch eine hohe Mortalitätsrate aufweisen (Cavanagh, 2007). Verschiedene Vakzinierungsmöglichkeiten gegen das IBV sind gegeben, sind aber

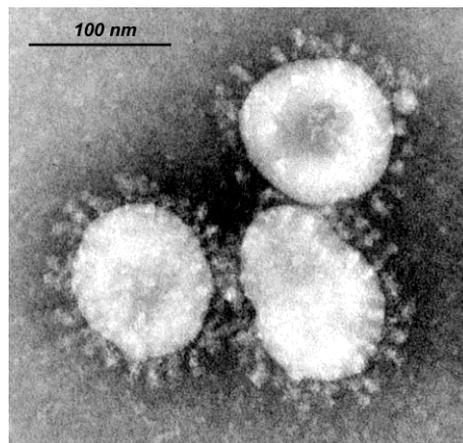
aufgrund der großen Variation der Serotypen, einer schlechten Praktikabilität und der nur kurzfristigen Wirkung meist wenig effektiv (Cavanagh, 2007). Das wichtigste Modellsystem zur Untersuchung molekularer Mechanismen von Coronavirus-Infektionen ist das, in Mäusepopulationen weit verbreitete Maus-Hepatitis-Virus (MHV). Die Infektion mit dem murinen Coronavirus verursacht ein breites Spektrum von klinischen Erscheinungsbildern, die sich abhängig vom jeweiligen Virusstamm in hepatischen, gastrointestinalen oder zentralnervösen Symptomen darstellen können (Haring und Perlman, 2001). Da die Mortalitätsrate bei neugeborenen Mäusen 100% beträgt und es keine Prophylaxe- oder Vakzinierungsmöglichkeiten gibt, stellt die Infektion mit MHV besonders in Mäusezuchtanlagen ein massives Problem dar, das im Falle einer Infektion meist nur durch Vernichtung des gesamten Koloniebestandes gelöst werden kann (Tierpathogene Coronaviren, Kapitel 14.8.6, Molekulare Virologie, Modrow *et al.*, 2010b). Weiterhin sind Coronaviren der Fledermaus (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005a), der Zibetkatze (Guan *et al.*, 2003), der Giraffe, der Antilope, des Waschbären und des Leopards beschrieben worden (Cheng *et al.*, 2007).

### 1.3 DAS SARS-CORONAVIRUS (SARS-CoV)

#### 1.3.1 AUFBAU

Coronaviren sind sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 80-160 nm, die durchschnittliche Größe des SARS-Partikels liegt bei etwa 100 nm (Zhang *et al.*, 2003) (**Abb. 1**). Durch die Fähigkeit zur Dimerisierung und RNA-Bindung assoziiert das N-Protein (nucleocapsid protein) des SARS-CoV mit dem viralen, einzelsträngigen Plusstrang-RNA-Genom und bildet so das helikale Nukleokapsid (Surjit *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004a). Das Nukleokapsid von Coronaviren ist von einer Membranhülle umgeben, in die das S-Protein (spike glykoprotein), das E-Protein (envelope protein) und das M-Protein (matrix protein) eingelagert sind (Holmes und Lai, 1996). Die externen Domänen des als Trimer vorliegenden S-Proteins ragen aus der Membranhülle und sind für das Corona-ähnliche Erscheinungsbild des Virus in elektronenmikroskopischen Aufnahmen verantwortlich. Neben der Bindung des funktionellen SARS-CoV Rezeptors – des ACE2-Proteins (angiotensin converting enzyme) (Li *et al.*, 2003) ist das SARS-CoV S-Protein während der Infektion auch für die Bildung von Syncytien verantwortlich (Ksiazek *et al.*, 2003). Die Exposition auf der Virusoberfläche verleiht dem S-Protein von Coronaviren ein hoch immunogenes Potential (Gallagher und Buchmeier, 2001; Ksiazek *et al.*, 2003; Buchholz *et al.*, 2004; Bisht *et al.*, 2004; Bukreyev *et al.*, 2004). Aus infizierten Patienten konnten so während der SARS-Infektion hauptsächlich Antikörper gegen das S-Protein nachgewiesen werden (Xu und Gao, 2004). Das ebenfalls in die Membranhülle eingelagerte M-Protein vermittelt durch Interaktion mit dem N-Protein während der Knospung die Umschließung des Nukleokapsids mit der Hüllmembran (He *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004b)

A.



B.

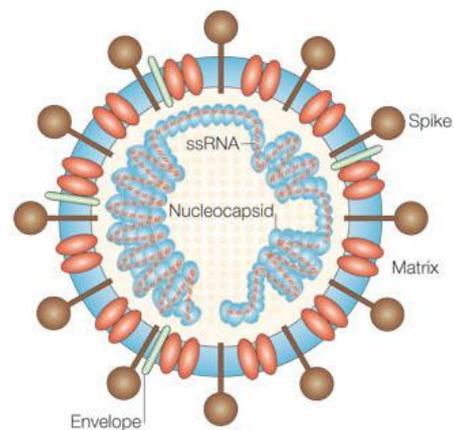


Abbildung 1: A.) Elektronenmikroskopische Aufnahme des SARS-CoV (CDC-Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Library, 2011) B.) schematische Darstellung des SARS-Coronavirus (Stadler *et al.*, 2003).

### 1.3.2 GENOM UND GENOMREPLIKATION

Coronaviren verfügen über die grössten Genome aller bekannten RNA-Viren, so besteht auch das SARS-CoV Genom aus ca. 27700 Basen (Rota *et al.*, 2003; Marra *et al.*, 2003). Es kodiert für 15 offene Leserahmen (ORF), die von kurzen untranslatierten Bereichen flankiert sind. Es liegt am 3'-Ende polyadenyliert und am 5'-Ende mit einer Cap-Gruppe modifiziert vor (Snijder *et al.*, 2003). Die Anordnung der offenen Leserahmen entspricht einer für Coronaviren charakteristischen Abfolge beginnend mit dem ORF1a, ORF1b am 5'-Ende, gefolgt von den Leserahmen für das S, E, M und N-Protein am 3'-Ende des Genoms. Inmitten der Leserahmen der Strukturproteine liegen 8 zusätzliche, kleine ORFS, die für SARS-CoV spezifische, akzessorische Proteine kodieren (**Abb. 2**) (Rota *et al.*, 2003; Marra *et al.*, 2003). Das RNA-Genom des SARS-CoV ist infektiös. Liegt die virale RNA im Zytoplasma der Zelle vor, kann sie als Matrize für die Proteintranslation durch zelluläre Ribosomen dienen, die mit der Translation des ORF1a initialisiert wird (Thiel *et al.*, 2003). In 70-80 % der Fälle wird die Bildung des 1a-Polyproteins durch Erreichen des Stopp-Codons abgeschlossen. In den restlichen 20-30 % der Fälle kommt es jedoch zu einem ribosomalen Leserastersprung durch eine Haarnadelschleife an dieser Stelle, die Translation wird fortgesetzt und das größere Polyprotein 1ab wird gebildet (Thiel *et al.*, 2003). Durch autoproteolytische Aktivität der viralen Cystein-Protease 3CL<sup>Pro</sup> und Papain-ähnlichen Protease PLP2<sup>Pro</sup> werden die beiden Polyproteine prozessiert und so die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) und eine Vielzahl an Nichtstrukturproteinen (nsp`s) gebildet (Thiel *et al.*, 2003; Ziebuhr, 2004).

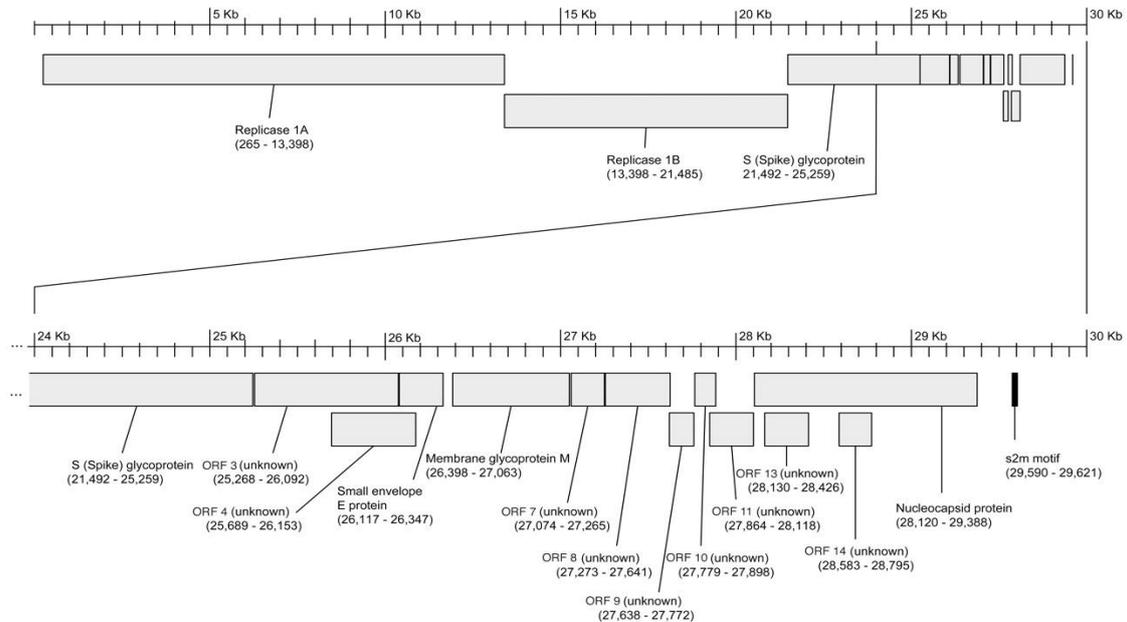


Abbildung 2: Darstellung des SARS-CoV-Genoms (Marra et al., 2003)

Durch Assoziation der Spaltprodukte kommt es zur Konstitution des Replikationskomplexes, der neben der Replikation des Virusgenoms auch für die Bildung der subgenomischen mRNAs (nested mRNAs, sgRNA) verantwortlich ist (Thiel *et al.*, 2003; Ziebuhr, 2004). Die Bildung der sgRNAs, die alle über das gleiche polyadenylierte 3'-Ende und über die identische Leader-Sequenz am 5'-Ende verfügen, erfolgt bei Coronaviren über eine diskontinuierliche, Leader-Sequenz vermittelte Transkription (Lai, 1990). Am 3'-Ende des Anti-Genoms wird zunächst die Leader-Sequenz transkribiert, die dann von der Matrize abdissoziiert und an komplementäre, transkriptionsregulierende Sequenzen (TRS) vor den jeweiligen Leserahmen bindet. Hier ermöglicht die Assoziation die Initialisierung der Transkription durch die RdRP ähnlich wie ein Primer während der Polymerasekettenreaktion (Lai, 1990; Holmes und Lai, 1996). Da es auch bei der SARS-CoV Replikation zur Bildung von mehreren subgenomischen mRNAs kommt, die alle über eine identische Leader-Sequenz verfügen, und desweiteren kurze TRS-Konsensussequenzen im Genom und in der Leader-Sequenz identifiziert werden konnten (Thiel *et al.*, 2003), ist anzunehmen, dass auch die Bildung der SARS-CoV sgRNAs durch eine Leader-Sequenz vermittelte Transkription erfolgt. Die sgRNA-Transkription von Coronaviren im allgemeinen wird u.a. durch verschiedene Bindungseffizienzen der Leader-Sequenz mit vorhandenen TRS reguliert. Bei der Regulation der Bildung der SARS-CoV sgRNAs hingegen scheinen andere Faktoren, wie assistierende Proteine oder auch die RNA-Struktur, eine Rolle zu spielen, da die Menge der jeweils gebildeten sgRNA nicht von der Komplementarität der Leader-Sequenz mit vorhandenen TRS abhängt (Thiel *et al.*, 2003).

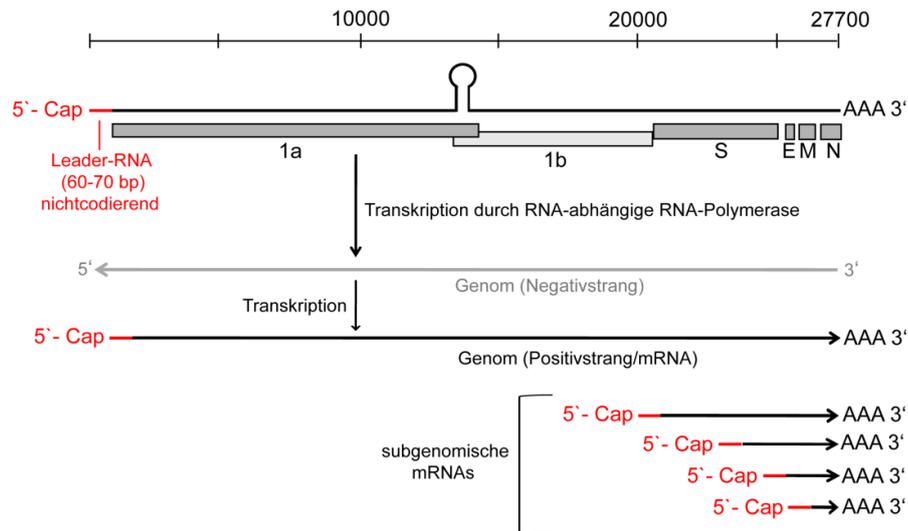


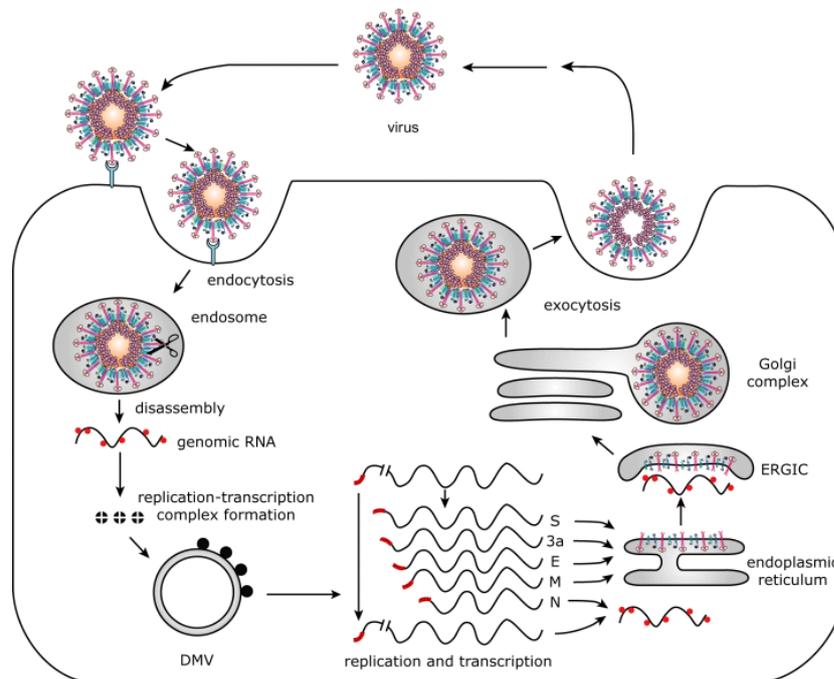
Abbildung 3: Genomreplikation von Coronaviren

### 1.3.3 REPLIKATION UND PATHOGENESE

#### 1.3.3.1 Replikation

Durch Aufnahme virushaltiger Aerosole gelangt das SARS-CoV zu alveolären Epithelien des oberen respiratorischen Traktes, wo durch Bindung des S-Proteins an den funktionellen Rezeptor (ACE2) das virale Partikel von Pneumozyten des Typs I und II internalisiert wird (Ding *et al.*, 2003; To *et al.*, 2004). Da lysosomotrophe Agenzien, die eine Ansäuerung von endosomalen Vesikeln verhindern, sowie Inhibitoren der Clathrin-vermittelten Endozytose die SARS-CoV Internalisierung verhindern können, liegt die Vermutung nahe, dass die Aufnahme des SARS-CoV Partikels hauptsächlich über den endozytotischen Weg erfolgt (Yang *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Nach Entlassung der viralen RNA aus dem Virion erfolgen alle weiteren Replikationsschritte im Zytosol der Zelle, so auch die Translation der beiden großen Polyproteine 1a und 1ab (Thiel *et al.*, 2003). Durch extensive autoproteolytische Spaltung werden aus ihnen neben der RNA-abhängigen RNA-Polymerase zahlreiche Nichtstrukturproteine (nsp) prozessiert, deren Organisation zur Bildung des Replikationskomplexes führt (Thiel *et al.*, 2003; Ziebuhr, 2004). Dieser liegt wie bei allen Coronaviren mit intrazellulären Membranen assoziiert vor (van Hemert *et al.*, 2008). Durch Bildung der charakteristischen Doppelmembranvesikel (double membrane vesicles, DMV), deren Ursprung Membransysteme des Endoplasmatischen Retikulums (ER) sind (Snijder *et al.*, 2006), kann das Virus ein replikationsfreundliches Milieu schaffen, dass zudem durch die Abgrenzung vom Zytosol eine Intervention durch zelluläre Abwehrsysteme verhindert (Salonen *et al.*, 2004; Snijder *et al.*, 2006). Wie das Virus die Bildung von DMVs induziert ist unklar, möglicherweise könnten wie beim murinen Hepatitisvirus einzelne Komponenten des autophagosomalen Systems involviert sein (Reggiori *et al.*, 2010). Durch Interaktion des im Zytosol gebildeten N-Proteins mit dem viralen Genom entsteht das

helikale Nukleokapsid. Die anderen Strukturproteine werden unterdessen an Ribosomen des rauhen ER gebildet und in das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) und den Golgi-Apparat (GA) transportiert. An deren Oberfläche kommt es durch Interaktion des transmembranen M-Proteins mit dem Nukleokapsid zur Knospung des viralen Partikels (Ng *et al.*, 2003; Stertz *et al.*, 2007). Durch Transport über Vesikel des sekretorischen Weges gelangt das SARS-CoV schließlich an die Zelloberfläche und wird mittels Exozytose aus der Zelle entlassen (Zhang *et al.*, 2004; Goldsmith *et al.*, 2004) (**Abb. 4**).



**Abbildung 4: SARS-CoV Replikation (de Haan und Rottier, 2006)**

### 1.3.3.2 Pathogenese

Durch Abgrenzung viraler Replikation vom Zytosol der Zellen in den DMVs und aktiver Inhibierung der antiviralen Interferon-Antwort (Spiegel *et al.*, 2005; Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007; Minakshi *et al.*, 2009) kann das SARS-CoV zellulären Abwehrmechanismen entgehen und in infizierten Pneumozyten des alveolären Epithels ungehindert replizieren (Gu und Korteweg, 2007; Guo *et al.*, 2008). Die lokale, massive Virusproduktion führt zu zytopathischen Effekten, infolgedessen es zur Infiltration von Makrophagen, sowie dendritischen Zellen kommt (Ding *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004a; Guo *et al.*, 2008). Obwohl diese Immunzellen nicht über den ACE2-Rezeptor verfügen, können sie mit dem SARS-CoV infiziert werden. Möglicherweise werden dazu alternative Rezeptoren wie die C-Typ Lektine DC-SIGN oder L-SIGN (CD209) verwendet (Jeffers *et al.*, 2004). Die Aktivierung der mononukleären Zellen durch die Infektion führt zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die eine Entzündungsreaktion im infizierten Gewebe verursachen (Nicholls *et al.*, 2003; Cheung *et al.*, 2005; Law *et al.*, 2005a). Ohne die effektive Replikation zu gewährleisten, transportieren dendritische

Zellen das SARS-CoV zu lymphatischen Organen, wo es ansässige und zirkulierende Lymphozyten infizieren und zerstören kann (Yilla *et al.*, 2005;Law *et al.*, 2005a). Die produktive Replikation des Virus in diesen Immunzellen führt neben der massiven Lymphozytopenie höchstwahrscheinlich auch zur systemischen Verbreitung des Virus durch zirkulierende Lymphozyten zu anderen Organen (O'Donnell *et al.*, 2003;Wong *et al.*, 2004b;Jiang *et al.*, 2005;Gu und Korteweg, 2007;Guo *et al.*, 2008). Neben Pneumozyten und Enterozyten verfügen u.a. auch Zellen des Nieren- und Leberepithels, sowie Endothelien der Blutgefäße und des Herzens über den ACE2-Rezeptor (Hamming *et al.*, 2004;To *et al.*, 2004) und können folglich mit dem SARS-CoV infiziert werden. Dementsprechend treten Schäden im infizierten Gewebe auf, die zur Beeinträchtigung der Leber- oder Nierenfunktion führen können (Wong *et al.*, 2003;Chan *et al.*, 2004a;Chu *et al.*, 2005;Farcas *et al.*, 2005). Warum in ebenfalls infizierbaren Enterozyten trotz Virusreplikation keine schweren zytopathischen Effekte zu beobachten waren (To *et al.*, 2004;Guo *et al.*, 2008), es lediglich oftmals zur wässrigen Diarrhöe kam (Booth *et al.*, 2003;Lee *et al.*, 2003;Peiris *et al.*, 2003a), ist noch unklar. Unterschiede der Zytokin- und Chemokin-Profile von HEK293-Zellen und der epithelialen Colonkrebszelllinie Caco-2 bei Infektion mit dem SARS-CoV (Spiegel und Weber, 2006) und die Entwicklung einer persistenten statt lytischen Infektion bei Inokulation von LoVo Zellen (epitheliale Colonadenokarzinomzellen) mit SARS-CoV (Chan *et al.*, 2004b) machen deutlich, dass die Expression des funktionellen Rezeptors ACE2 nicht das einzige Kriterium für eine lytische Infektion ist. Während verschiedene Studien zeigen konnten, dass es bei Infektion mit dem SARS-CoV in lytisch infizierten Zellen nur zur schwachen Induktion einer Typ-I Interferonantwort kommt (Cinatl *et al.*, 2004;Spiegel *et al.*, 2005), wird von Caco-2 Zellen bei Infektion mit SARS-CoV vermehrt IFN- $\alpha/\beta$  sekretiert (Okabayashi *et al.*, 2006). Möglicherweise kann in diesen Zellen die zelluläre Immunantwort oder virale Abwehrmechanismen durch eine effektive Interferon-Signalkaskade aktiviert werden und die Infektion mit SARS-CoV führt nicht zu schweren zytopathischen Effekten im gastrointestinalen Gewebe.

Die durch die massive Lymphozytopenie vermittelte Immundefizienz verschärft die Infektion im respiratorischen Trakt (Gu und Korteweg, 2007;Guo *et al.*, 2008). Eine daraus folgende, deregulierte Zytokinausschüttung (Zytokinsturm) und Hyperinflammation verursachen schwere immunpathogenetische Schäden der Lunge und so das akute respiratorische Distress-Syndrom (Huang *et al.*, 2005;Law *et al.*, 2005a;Cameron *et al.*, 2008;Guo *et al.*, 2008). Durch Beeinträchtigung des Immunsystems bei schweren Verlaufsformen ist möglicherweise die Rekrutierung und Aktivierung adaptiver Immuneffektoren gestört und die Elimination des Virus durch eine humorale Immunantwort nicht mehr möglich (Cameron *et al.*, 2008) – es kommt zum Tod des Patienten durch Lungenversagen. Wie bereits für die humanen CoVs beschrieben, ist auch bei einer Infektion mit dem SARS-CoV der Immunstatus eines Patienten für die Schwere des Krankheitsverlaufs von entscheidender Bedeutung (Gu und Korteweg, 2007;Guo *et al.*, 2008).

### 1.3.4 AKZESSORISCHE SARS-CoV PROTEINE

Neben den für Coronaviren charakteristischen Nichtstruktur – und Strukturproteinen kodiert das SARS-CoV Genom für 8 akzessorische Proteine (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b) (Snijder *et al.*, 2003; Thiel *et al.*, 2003). Diese gruppenspezifischen Proteine, die kaum Homologien zu anderen viralen Proteinen aufweisen (Rota *et al.*, 2003; Marra *et al.*, 2003), werden als akzessorisch bezeichnet, da deren Expression nicht essentiell für die effektive Replikation des SARS-CoV ist. Bei sequentieller Deletion der akzessorischen ORFs konnten keine Titerunterschiede der rekombinanten Deletionsviren mit dem Wildtyp-Virus im BALB/c -Mausmodell beobachtet werden (Yount *et al.*, 2005). Aufgrund einer wesentlich milderen Pathogenese und Symptomatik sind Mäuse jedoch kein optimales Tiermodell für das SARS-CoV (Subbarao *et al.*, 2004). Die Deletion gruppenspezifischer Gene des murinen Hepatitisvirus MHV führt zwar zu keiner Beeinträchtigung der MHV-Replikation jedoch zu einer Attenuierung des Virus im natürlichen Wirt (de Haan *et al.*, 2002). Aufgrund der Spezifität der akzessorischen Proteine und der außerordentlichen Pathogenität des SARS-CoV scheinen dessen akzessorische Proteine für die virale Reproduktion vielleicht nicht essentiell, könnten jedoch für die ausgeprägte Pathogenität des Virus im natürlichen Wirt verantwortlich sein. Tatsächlich konnten verschiedene Studien zeigen, dass die akzessorischen Proteine Funktionen in der Zelle ausüben, die einer erhöhten Pathogenität zuträglich wären. Die transiente Expression der Transmembranproteine 3a und 7a führt zur Auslösung von Apoptose u.a. durch Aktivierung der proapoptotischen p38 MAPK (p38 mitogen activated protein kinase) und zum Arrest des Zellzyklus in der G0/G1 Phase (Tan *et al.*, 2004a; Law *et al.*, 2005b; Kopecky-Bromberg *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007; Padhan *et al.*, 2008). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und JNK, entscheidende Faktoren bei der Aktivierung proinflammatorischer Zytokine, wurde bei Expression der beiden Proteine ebenfalls beschrieben (Kanzawa *et al.*, 2006). Neben einer Apoptose und Nekrose auslösenden Wirkung wird dem akzessorischen 3b-Protein auch die Fähigkeit der Inhibierung von Interferonsignalwegen zugeschrieben (Khan *et al.*, 2006). Bei zusätzlicher Expression des SARS-CoV ORF6-Proteins kann ein attenuiertes MHV zu weitaus höheren Titern in Zellen replizieren und die Infektion mit dem rekombinanten MHV-ORF6 führt zur gesteigerten Pathogenität in Mäusen (Pewe *et al.*, 2005). Neben der Funktion als Typ 1 IFN – Antagonist ist das ORF6-Protein zudem ein potenter Induktor von ER-Stress und der JNK (c-Jun-terminale Kinase) - abhängigen Apoptose (Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2008). Sowohl in SARS-CoV infizierten Zellen als auch in SARS-Patienten konnte die Aktivierung der p38 MAPK gezeigt werden (Mizutani *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Anders als bei einer Infektion mit RNA-Viren zu erwarten, konnte keine Induktion der IFN-alpha/beta Produktion in SARS-CoV infizierten Zellen gezeigt werden (Spiegel *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2005; Ziegler *et al.*, 2005; Spiegel und Weber, 2006). Da die Behandlung infizierter Zellen mit Interferonen des Typ-I zudem zur Reduktion der SARS-CoV Titer führt (Zheng *et al.*, 2004), scheint die Inhibition der Typ-I-Interferonantwort für die Umgehung der zellulären Immunantwort und somit für die Pathogenese des

SARS-CoV essentiell. Da die akzessorischen Proteine 3a, 7a und 6 gleichermaßen im Gewebe infizierter Patienten nachgewiesen werden konnten (Zeng *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2004b; Geng *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005), ist eine durch sie bewirkte Apoptose und vor allem Inhibition der Typ-I Interferonantwort und Induktion der p38-MAPK oder JNK auch während der Infektion wahrscheinlich.

#### Das akzessorische Protein 7a

Das Translationsprodukt des offenen Leserahmens 7a ist ein Transmembranprotein des Typ I und liegt über seine Transmembran-Domäne am Carboxyterminus mit einer zellulären Membran assoziiert vor (Snijder *et al.*, 2003; Fielding *et al.*, 2004). Neben einer Expression in transient transfizierten Zellen und infizierten Zellen konnte das Protein auch im Lungengewebe infizierter SARS-Patienten nachgewiesen werden (Tan *et al.*, 2004a; Chen *et al.*, 2005). Abhängig von der Abspaltung eines ER-Signalpeptids am N-Terminus ist das 7a-Protein zwischen 17,5 kDa und 15 kDa groß (Fielding *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2004a). Die intrazelluläre Lokalisierung des 122 Aminosäuren umspannenden 7a-Proteins ist nicht eindeutig geklärt. Während Fielding *et al.* dessen Co-Lokalisierung mit dem ER-Marker Grp94 und dem ERGIC-Marker Sec31 zeigen konnten (Fielding *et al.*, 2004; Fielding *et al.*, 2006), proklamieren Nelson *et al.* und Kopecky-Bromberg *et al.* hingegen die Lokalisierung des 7a-Proteins im Golgi-Apparat (Nelson *et al.*, 2005; Kopecky-Bromberg *et al.*, 2006). Da das Protein neben seinem ER-Signalpeptid auch über die kurze Konsensussequenz KRKTE am Carboxyterminus verfügt (Fielding *et al.*, 2004), die für den Rücktransport von Transmembranproteinen des Typ I in das ER verantwortlich ist, transloziert das Protein möglicherweise zwischen beiden Kompartimenten. Obwohl das Protein keine eindeutigen Homologien mit anderen bekannten Proteinen aufweist, haben strukturelle Analysen ergeben, dass das 7a-Protein mit seiner Topologie und der kompakten „ $\beta$ -Sandwich“-Faltung eine gewisse Ähnlichkeit mit Proteinen der Immunglobulin-Familie aufweist (Hanel *et al.*, 2006). Neben der Interaktion des 7a-Proteins mit der humanen Ap<sub>4</sub>A-Hydrolase, dem humanen LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) und dem humanen SGT-Protein (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein) ist auch die Interaktion mit dem viralen akzessorischen Protein 3a beschrieben (Tan *et al.*, 2004c; Fielding *et al.*, 2006; Hanel und Willbold, 2007; Vasilenko *et al.*, 2010). Durch die zusätzliche Assoziation mit den viralen Proteinen M, E und S wird das 7a-Protein möglicherweise in das SARS-Virion verpackt (Tan *et al.*, 2004c; Fielding *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). Tatsächlich konnten Huang *et al.* die Assoziation des 7a-Proteins mit dem viralen Partikel bestätigen, demnach könnte es sich bei 7a auch um ein SARS-Partikel-assoziiertes Protein handeln (Huang *et al.*, 2006).

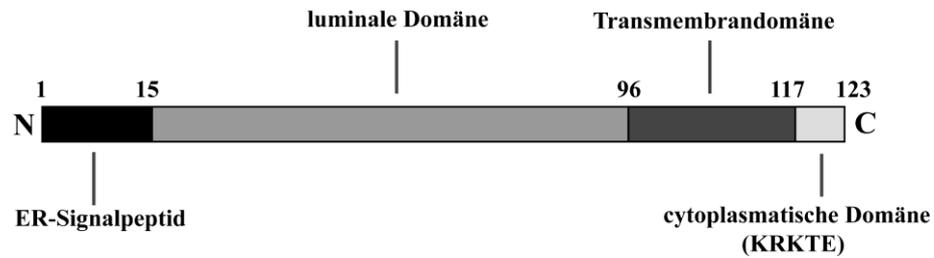


Abbildung 5: Schematische Darstellung des 7a-Proteins

Die Überexpression des 7a-Proteins führt in verschiedenen Zelllinien zur Auslösung von Apoptose über einen Caspase-3 abhängigen Weg (Tan *et al.*, 2004a), zur Inhibition der Proteinbiosynthese und zur Aktivierung der p38-MAPK (Kopecky-Bromberg *et al.*, 2006). Die Fähigkeit der Auslösung der Apoptose ist dabei abhängig von der Interaktion des akzessorischen Proteins mit antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie (Tan *et al.*, 2007). Bei Transfektion mit dem 7a-Protein wurde zudem eine Verlangsamung des Zellwachstums beobachtet, die durch Arrest des Zellzyklus in der G1/G0 Phase über einen Cyclin D3/pRb-abhängigen Weg bewirkt wird (Yuan *et al.*, 2006). Das 7a-Protein kann eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B und JNK *in vitro* auslösen (Kanzawa *et al.*, 2006) und Schaecher *et al.* konnten zeigen, dass die Fähigkeit zur DNA-Fragmentierung eines rekombinanten SARS-CoV, dessen Genom eine Deletion des ORF7 aufweist, in infizierten Zellen im Vergleich zum Wiltypvirus beeinträchtigt ist (Schaecher *et al.*, 2007). Trotz der Studien von Yount *et al.*, die eine Funktion der akzessorischen Proteine während der SARS-CoV Replikation im Mäusen ausschließt (Yount *et al.*, 2005), kommt es bei Ausschaltung des ORF7 durch siRNA bei Infektion von VeroE6 Zellen zur Reduktion der SARS-CoV Titer (Akerstrom *et al.*, 2007). Eine Funktion des 7a-Proteins während der Pathogenese sowohl auch bei der Replikation ist folglich nicht auszuschließen.

#### 1.4 BiP/GRP78

BiP oder Grp78 ist der wichtigste molekulare Faltungshelfer (Chaperon) im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Wie das homologe Protein Hsp70 im Zytoplasma der Zelle bindet BiP an ungefaltete oder fehlgefaltete Proteine im ER und bewahrt so einen Konformationsstatus, der die korrekte Faltung und Oligomerisierung der gebundenen Proteine gewährleistet. Da die unter normalen Bedingungen schwache Expression des Chaperons bei Glucosemangel stark induziert wird und es an die schwere Kette von Immunglobulinen binden kann, wird es als Glucose-reguliertes Protein der Größe 78 kDa (glucose regulated protein, Grp78) oder als Immunglobulin-bindendes Protein (immunoglobulin binding protein, BiP) bezeichnet (Pouyssegur *et al.*, 1977; Haas und Wabl, 1983; Munro und Pelham, 1986). Neben seiner Aufgabe als Faltungsassistent ist BiP auch eine essentielle Komponente der ER-Translokationsmaschinerie und des ER-abhängigen Degradationsweges (ERAD) (Gething, 1999; Jin *et al.*, 2000; Brostrom und Brostrom, 2003). Proteine des

sekretorischen Weges werden co-translational in das Lumen des ER eingeschleust. Nach angemessener Faltung, möglicher Glykosylierung, post-translationaler Maturierung oder Oligomerisierung werden die Proteine durch vesikulären Transport über das ERGIC und den Golgi Apparat ihrem Bestimmungsort zugeführt. Die Signalsequenz vermittelte Translokation aus dem Zytoplasma in das Lumen des ER erfolgt durch die Sec61-Pore in der ER-Membran (Gorlich *et al.*, 1992;Beckmann *et al.*, 1997). Durch den Verschluss der Sec61 Pore auf der luminalen Seite des Translationskomplexes wird neben dem Ionenfluss des Organells auch die Translokation von Polypeptiden durch BiP reguliert (Sanders *et al.*, 1992;Matlack *et al.*, 1998;Hamman *et al.*, 1998). Da die Translokation durch die Sec61 Pore ein reversibler Prozess ist, fungiert BiP durch die luminalen Bindung an Sec61 als eine Art molekulare Rastung, die eine Rückschleusung des Polypeptids durch den Translokationskanal verhindert (Nicchitta und Blobel, 1993;Matlack *et al.*, 1999). Durch einen ATP-abhängigen Translokationsprozess wird das Polypeptid durch die Pore transportiert und durch Bindung mit BiP in einer faltungskompetenten Konformation behalten. Durch Bindung hydrophober Bereiche, die nur bei ungefalteten Proteinen an der Oberfläche exponiert sind, ist BiP auch in gewissem Maße für die Auswahl von zu degradierenden Proteinen zuständig (Flynn *et al.*, 1991). Ist die Faltung eines Polypeptids nicht möglich oder bleibt es zu lange mit Faltungshelfern wie BiP assoziiert, wird das Protein dem ER-assoziierten Degradationsweg (ERAD) zugeführt (Gething, 1999;Nakatsukasa und Brodsky, 2008). Dazu wird es durch BiP über die Sec61 Pore aus dem ER ins Zytosol retrotransloziert, hier polyubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut (Nakatsukasa und Brodsky, 2008). Neben seinen Faltungs- und Translokationsaufgaben übt BiP auch verschiedene antiapoptotische Funktionen in der Zelle aus. Durch Komplexierung mit der proapoptotischen Caspase-12 und Caspase-7 kann BiP die Freisetzung der Caspase-12 aus dem ER und eine Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade verhindern (Rao *et al.*, 2002;Reddy *et al.*, 2003). Eine weitere essentielle Funktion des molekularen Chaperons BiP ist die Vermittlung und Initiierung der „unfolded protein response“, eines zellulären Notfallprogramms um zellulären ER-Stress zu beseitigen.

#### **1.4.1 ER-STRESS**

Das Endoplasmatische Retikulum ist von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion. Alle Membranproteine und Proteine des sekretorischen Weges werden hier gefaltet, modifiziert, oligomerisiert und mittels Vesikeltransport über den sekretorischen Weg an ihren Bestimmungsort gebracht. Dabei erlaubt das hohe Oxidationspotential die Bildung von Disulfidbrücken und hohe Calcium-Konzentrationen gewährleisten die Aktivität der hier konzentrierten Faltungsassistenten wie BiP/Grp78 und Grp94, sowie Faltungsenzymen wie der Proteindisulfidisomerase (PDI). Die komplexen Qualitätskontrollsysteme des ER garantieren die korrekte Faltung von Polypeptiden und Retrotranslokationssysteme (ERAD) sichern den Abbau

aggregierter oder fehlgefalteter Proteine über das Proteasom. Neben seiner Funktion als Calcium-Speicher der Zelle werden im ER Membranen für Organellen, Vesikel oder Autophagosomen generiert (Tooze und Yoshimori, 2010) und Lipide und Sterole synthetisiert. Aufgrund der zentralen Rolle des ERs kann eine Beeinträchtigung der ER-Funktion somit schwerwiegende Folgen für die Zelle haben.

Die Ursachen für ER-Stress, einem Ungleichgewicht zwischen der Synthese neuer Proteine und der Fähigkeit diese korrekt zu falten, zu translozieren oder abzubauen, können dabei sehr vielfältig sein. Eine Veränderung der Calcium-Homöostase (Wong *et al.*, 1993), ein Glucosemangel, der die angemessene Glykosylierung von Proteinen erschwert, oder Veränderungen des Redoxpotentials des ER können die Aktivität von Chaperonen beeinträchtigen und so eine korrekte Faltung oder Modifizierung von Proteinen verhindern (Ma und Hendershot, 2002; Brostrom und Brostrom, 2003; Zhang und Kaufman, 2006). Eine Anhäufung ungefalteter, fehlgefalteter oder aggregierter Proteine ist dann unausweichlich (Brostrom und Brostrom, 2003). Bei Inhibition des Proteasoms, die die Entfernung von falsch- oder fehlgefalteten Proteinen über den ERAD blockiert, kommt es zur Anhäufung von abzubauenen Proteinen und ebenfalls zu ER-Stress (Bush *et al.*, 1997; Kostova und Wolf, 2003; Wang *et al.*, 2007). Aber auch eine virale Infektion, deren exzessive Proteinexpression, im Besonderen von großen, glykosylierten Oberflächenproteinen, eine übermäßige Beanspruchung der ER-Faltungsmaschinerie darstellt (Watowich *et al.*, 1991; Liberman *et al.*, 1999; Versteeg *et al.*, 2007), kann ein Auslöser für ER-Stress sein. In jedem Fall muss die Zelle eine Möglichkeit finden um bestehenden ER-Stress zu eliminieren und die ER-Funktion wiederherzustellen. Dies erfolgt durch die BiP-abhängige Initiation der UPR (Kozutsumi *et al.*, 1988).

#### **1.4.2 UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR)**

Die „unfolded protein response“ ist ein zelluläres Notfallprogramm um bestehenden ER-Stress abzubauen und die Zellen vor Apoptose durch verlängerten ER-Stress zu schützen (Schroder und Kaufman, 2005; Zhang und Kaufman, 2006). Der für die Initiation des Notfallprogramms entscheidende Faktor ist das ER-Chaperon BiP, das unter normalen Bedingungen die Aktivität von 3 UPR-Mediatoren (PERK, ATF6, IRE1) durch deren Bindung verhindert. Kommt es zur Anhäufung von ungefalteten Proteinen löst sich BiP von den Mediatoren und bindet aufgrund einer höheren Bindungsaffinität an die zu faltenden Proteine. Die Mediatoren werden frei und Signalwege des UPR werden initiiert (Liu und Kaufman, 2003).

Durch Dissoziation des BiP von PERK kann die membranständige PKR-ähnliche ER-Kinase dimerisieren und in diesem aktiven Konformationsstatus den Elongations-Initiationsfaktor eIF2alpha phosphorylieren (Harding *et al.*, 1999; Schroder und Kaufman, 2005). Diese Modifikation führt zur Inaktivierung des eIF2alpha und zum Stopp der mRNA-Translation (Brostrom *et al.*, 1996; Schroder und Kaufman, 2005). Eine weitere Überladung des ER durch die fortlaufende Proteinbiosynthese ist

somit verhindert. Da für die induzierte Expression von Chaperonen bei ER-Stress die effektive und vorallem funktionierende Proteintranslation essentiell ist, bleibt die Phosphorylierung und damit Inaktivierung des eIF2alpha nur transient bestehen (Novoa *et al.*, 2003). Während die globale Translationsinitiation durch Phosphorylierung des eIF2alpha gehemmt ist, kann der Transkriptionsfaktor ATF4, der unter normalen Bedingungen reprimiert ist, aktiviert werden. Durch ihn erfolgt die Expression des GADD43-Proteins (growth arrest und DNA damage incudible gene 43), das die Aufhebung des Translationsstopps durch Dephosphorylierung des eIF2alpha bewirkt (Novoa *et al.*, 2001). Neben der Aktivierung des GADD43 kommt es durch ATF4 auch zur Expression des GADD153 (growth arrest und DNA damage incudible gene 153) oder CHOP (C/EBP homologous protein), das bei verlängertem ER-Stress die Induktion von Apoptose bewirkt (Harding *et al.*, 2000;Ma *et al.*, 2002).

Die Freiwerdung der beiden anderen Mediatoren des UPR, IRE1 und ATF6 von BiP führt zur Induktion der Expression von Proteinen der ER-Faltungs- oder Degradationsmaschinerie und somit zur Erhöhung der Faltungs- und Degradationsleistung des ER. IRE1 (inositol-requiring enzyme 1), eine membranständige Endonuclease, kann nach Loslösung von BiP dimerisieren und autophosphorylieren (Schroder und Kaufman, 2005). Eine so aktivierte Endonukleaseaktivität bewirkt den Splicingprozess der XBP1-prä-mRNA in die XBP1-mRNA, die für den Transkriptionsfaktor XBP1 (x-Box binding protein) kodiert (Sidrauski und Walter, 1997;Ma und Hendershot, 2002). Das jetzt gebildete XBP1 transloziert in den Nukleus und bindet an promotorähnliche Sequenzen – die ERSE (ER stress response elements) oder UPRE (UPR response elements), kurze Konsensussequenzen, die innerhalb von Promotorregionen der Gene für u.a. BiP, Grp94, PDI, XBP1 selbst und Komponenten des ERAD liegen, und aktiviert so deren und die eigene Expression (Ma und Hendershot, 2002;Liu und Kaufman, 2003).

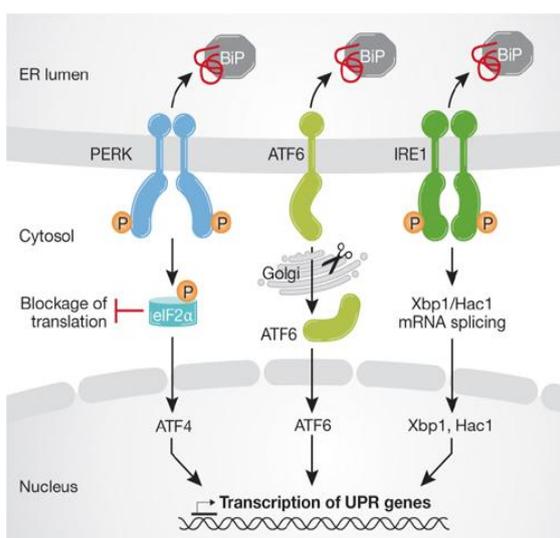


Abbildung 6: Abläufe beim UPR (Cyr *et al.* 2009)

Ebenso führt die Dissoziation des BiP vom Membranprotein ATF6 (activating transcription factor 6) zu dessen proteolytischer Spaltung (Ye *et al.*, 2000), die die Translokation dessen zytosolischer Domäne in den Nukleus und deren Bindung an ERSE oder UPR Sequenzen ermöglicht (Yoshida *et al.*, 2000) und so zur Expression UPR-abhängiger Gene führt. Kann das komplexe Signalnetzwerk des UPR die ER-Funktion nicht wiederherstellen, kommt es durch alternative Funktionen einzelner UPR-Mediatoren wie z.B. durch CHOP, der JNK (c-Jun N-terminale Kinase) oder durch Caspase-12 zur Auslösung von Apoptose (Zhang und Kaufman, 2006; Kim *et al.*, 2006).

## 1.5 DAS UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM (UPS)

Neben der Degradation von Proteinen, Aggresomen und Organellen durch das lysosomal-autophagosomale System ist das 26S Proteasom der wichtigste Degradationsapparat der Zelle. Der multikatalytische, zylinderförmige Proteinkomplex degradiert ungefaltete, fehlgefaltete oder unbenötigte Proteine im Zytoplasma und Nukleus der Zelle (Lee und Goldberg, 1998; Gao und Luo, 2006). Durch die selektive Degradation von Effektoren oder Mediatoren trägt das Proteasom auch massgeblich zur Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie des Zellzyklus, der Apoptose, der Transkription oder der DNA-Reparatur bei. (Ciechanover und Schwartz, 1994; Lee und Goldberg, 1998). Auch für das adaptive Immunsystem ist die proteasomale Aktivität essentiell, da es durch sie zur Degradation von Antigenen für die Antigenpräsentation auf MHC-Klasse I Molekülen kommt (Rock und Goldberg, 1999).

Das 2000 kDa große 26S Proteasom besteht aus dem 20S Proteasom und zwei regulatorischen 19S Einheiten, die zusammen einen tonnenartigen Proteinkomplex bilden (Coux *et al.*, 1996; Lee und Goldberg, 1998). Das 20S Proteasom stellt den katalytische Kernkomplex dar, der sich aus 4 übereinandergestapelten Heptamerringen zusammensetzt und über chymotrypsin-, trypsin-, und caspaseähnliche Aktivitäten den vollständigen proteolytischen Abbau eines Proteins in kleine Peptide von nur 3-20 Aminosäuren vermittelt (Lee und Goldberg, 1998). Von beiden Seiten umschlossen wird das 20S-Proteasom von den zwei 19S Einheiten. Diese auch als regulatorische Einheiten bezeichneten Proteinkomplexe bestehen u.a. aus ATP-Hydrolasen und deubiquitylierenden Enzymen, deren Hauptaufgabe die Erkennung von Substraten, deren Entfaltung und Deubiquitylierung und deren ATP-abhängige Einschleusung in den katalytischen Kernkomplex ist (Ciechanover und Schwartz, 1994; Naujokat und Hoffmann, 2002). Anders als beim lysosomal-autophagosomalen Abbau erfolgt die Degradation nicht unspezifisch, sondern wird durch die kovalente Modifikation des Substrates mit Ubiquitin streng reguliert (Ciechanover und Schwartz, 1994). Durch die Aktivität des E1-Proteins kommt es zunächst unter ATP-Hydrolyse zur Aktivierung des 8,5 kDa großen Ubiquitinmoleküls. Dieses wird in einem zweiten Schritt von dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen. Im Komplex mit einem dritten Enzym, der Ubiquitin-Ligase E3, wird das Ubiquitinmolekül von E2 auf ein zu degradierendes Protein übertragen. Dabei kommt es

zur kovalenten Bindung des Ubiquitins an einen Lysinrest des abzubauenen Proteins. Durch Wiederholung der Schritte zur kovalenten Modifikation durch E1, E2 und E3 erfolgt eine Polyubiquitinylierung des Substrates (Lee und Goldberg, 1998; Gao und Luo, 2006). Polyubiquitinylierte Proteine werden von der regulatorischen 19S Untereinheit erkannt, entfaltet, deubiquitinyliert und zur proteasomalen Degradation in das 20S Proteasom transloziert (Gao und Luo, 2006). Neben der Modifikation mit einem Polyubiquitinrest als Signal zur proteasomalen Degradation dient die Modifikation mit einem Ubiquitinrest der Regulation von zellulären Prozessen wie der Aktinreorganisation, der Kontrolle der Transkription (Histonen) oder der Biogenese von Ribosomen (Finley *et al.*, 1989; Hicke, 2001).

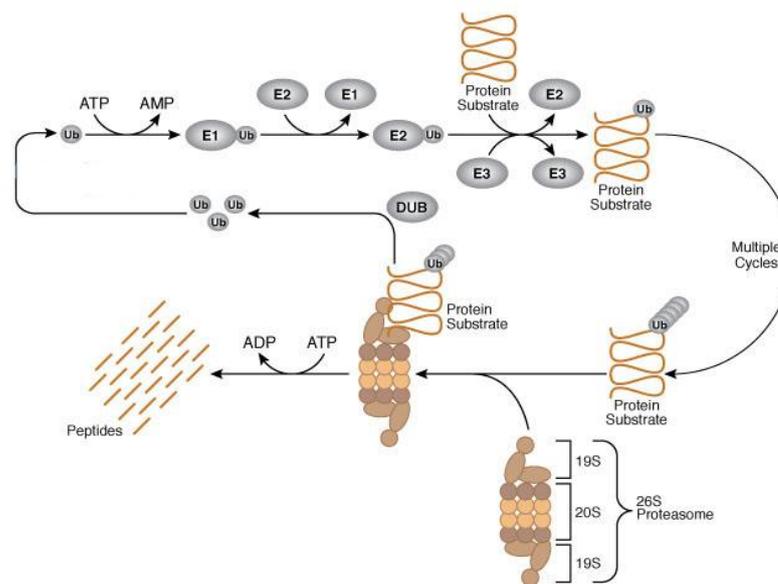


Abbildung 7: Ubiquitinylierung von Substraten für den proteasomalen Abbauweg (Cell Signaling Technologies, 2011)

## 1.6 EINFLUSSNAHME VIRALER PROTEINE AUF DIE ER-FUNKTION UND UPR

Bei Infektion der Zelle mit Viren, die die Proteinfaltungs- und Proteinmodifikationsfähigkeiten des ER zur effizienten Replikation benutzen, kann es zu ER-Stress kommen (Su *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 2002; Medigeshi *et al.*, 2007; Barry *et al.*, 2010). Neben einer Überbelastung des ER durch die Faltung viraler Proteine, kann auch die direkte Aktivierung von UPR-Mediatoren möglicherweise durch die Aktivität eines einzelnen viralen Proteins ursächlich für die Induktion von UPR-Signalwegen sein (Ye *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Besonders Herpesviren haben diesbezüglich verschiedenste Mechanismen entwickelt (Lee *et al.*, 2009). Das humane Cytomegalievirus induziert die Bildung von BiP, das sowohl für den Zusammenbau des viralen Partikels als auch für die virus-induzierte Degradation von MHC-Klasse-1 Proteinen benötigt wird (Lee *et al.*, 2009). Das Herpes-Simplex-Virus 1 hingegen garantiert durch Inhibition der PERK-Aktivität und zugleich Dephosphorylierung des, durch andere eIF2alpha-Kinasen phosphorylierten, eIF2alpha die effektive Expression viraler

Proteine (Lee *et al.*, 2009) und umgeht so die Inhibition der Proteintranslation. Kann ER-Stress durch die virale Infektion durch UPR-Signalwege nicht eliminiert werden, wird durch alternative Signalwege des UPR der programmierte Zelltod ausgelöst. So sind zytopathische Effekte in verschiedenen Gehirnarealen neonataler Mäuse bei Infektion mit dem Bornavirus auf ER-Stress und die Auslösung der UPR zurückzuführen (Williams und Lipkin, 2006). Bei Infektion mit dem Virus der Japanischen Enzephalitis kommt es durch Induktion von ER-Stress und der UPR über einen CHOP-abhängigen Weg ebenfalls zur Apoptose (Su *et al.*, 2002), während die Infektion mit dem Semliki-Forest-Virus hauptsächlich durch Aktivierung der ER-Caspase-12 zur Induktion von Apoptose führt (Barry *et al.*, 2010). Doch nicht nur bestehender ER-Stress, sondern auch die Modifizierung von UPR-Signalwegen, kann mittels direkter Aktivierung einzelner Mediatoren wie der Caspase-12 oder CHOP zu Apoptose führen (Jordan *et al.*, 2002; Medigeshi *et al.*, 2007). Ist die Auslösung der Apoptose oftmals ein Bestandteil des viralen Lebenszyklus, so kann die Induktion proapoptotischer Prozesse auch fatale Konsequenzen für das Virus haben. Der massive Anstieg der West-Nile-Virus-Produktion in CHOP-defizienten neuronalen Mauszellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Medigeshi *et al.*, 2007) macht deutlich, dass die Induktion des proapoptotischen UPR-Mediators CHOP der Infektion mit dem West-Nil-Virus entgegenwirkt und eine weitere Ausbreitung des Virus im Zellgewebe verhindert. Doch Viren haben Methoden entwickelt der vorzeitigen Eliminierung durch Auslösung von ER-Stress abhängiger Apoptose zu entgehen. So verhindert das pUL38-Protein des humanen Cytomegalievirus (HCMV) die Auslösung ER-Stress abhängiger Apoptose, indem es die IRE1 abhängige Phosphorylierung der proapoptischen JNK unterdrückt (Xuan *et al.*, 2009).

Viren können im Zuge ihres parasitären Daseins nicht nur zelluläre Funktionen wie Faltungsprozesse im ER oder die Translation durch Ribosomen nutzen und mögliche anti-virale Strategien wie die Auslösung von Apoptose verhindern, sondern haben zusätzlich Wege gefunden durch Modifikation von UPR-Signalwegen eigene Replikationsprozesse zu optimieren und gegenüber der zellulären Replikation zu favorisieren. Durch die virusinduzierte Phosphorylierung des eIF2alpha wird bei Infektion mit MHV oder dem Rotavirus die zelluläre Proteinbiosynthese inhibiert, die effektive Expression viraler Proteine kann jedoch weiter erfolgen (Bechill *et al.*, 2008; Montero *et al.*, 2008). Die Fähigkeit der MHV-Transkripte auch ohne funktionellen Elongationsfaktor translatiert zu werden, liegt möglicherweise dem Vorhandensein der Leader-Sequenz am 5'-Ende des Transkripts zugrunde (Tahara *et al.*, 1994). Durch selektive Induktion des ATF6/IRE1-Signalweges kann das West-Nile-Virus die Virusreplikation und Faltung viraler Proteine erleichtern, während PERK-abhängige Signalwege, die zur Hemmung der Proteintranslation oder Aktivierung des proapoptischen CHOP führen könnten, inaktiviert bleiben (Ambrose und Meckenzie, 2011).

In verschiedenen Studien konnte auch für Proteine des SARS-CoV eine Assoziation mit ER-Stress und den Signalwegen des UPR gezeigt werden. So führt die Expression des SARS-CoV Oberflächenproteins S zur Induktion des Grp78 und Grp94-Proteins (Versteeg *et al.*, 2007), sowie zur Aktivierung

von PERK (Jin und Zheng, 2009). Die Induktion der Grp94-Expression, sowie die Auslösung einer JNK-abhängigen Apoptose bei transienter Expression des ORF6-Proteins ist ebenfalls beschrieben (Ye *et al.*, 2008). Bei Überexpression des akzessorischen Proteins 3a kommt es zur PERK-abhängigen Induktion der CHOP-Expression (Minakshi *et al.*, 2009), die apoptotischen Effekten bei 3a-Expression in VeroE6 Zellen zu Grunde liegen könnte (Law *et al.*, 2005b). Möglicherweise könnte die Induktion proapoptotischer UPR-Effektoren durch bestehenden ER-Stress oder durch virale Proteine auch im Falle einer SARS-Infektion für beobachtete zytopathische Effekte im infizierten Gewebe verantwortlich sein. Das akzessorische Protein 8ab kann durch selektive Aktivierung des ATF6-Signalwegs die Expression von Faltungshelfern induzieren und so die Faltung viraler Proteine im ER erleichtern. In SARS-CoV-infizierten Zellen kommt es zur Aktivierung der PERK und so zum Translationsstopp, von dem die Produktion der viralen sgRNAs nicht betroffen ist (Krahling *et al.*, 2009). Wie im Falle des MHV scheint auch das SARS-CoV Mechanismen entwickelt zu haben die eigene Replikation zu ermöglichen während die zelluläre Translation blockiert ist. Durch Modifizierung des UPR könnte das SARS-CoV befähigt sein die eigene Replikation zu sichern und vielleicht durch das 8ab-Protein die Reifung viraler Proteine zu unterstützen.

## 1.7 ZIELSETZUNG

Trotz verschiedener Funktionen in transfizierten Zellen und einem nachgewiesenen Effekt auf apoptotische Signalwege während der Infektion sind relevante Wirkungsmechanismen des SARS-CoV spezifischen, akzessorischen 7a-Proteins für die Pathogenese des SARS-CoV nicht hinreichend geklärt. In einer vorrangegangenen Diplomarbeit hatte die Identifizierung des intrazellulären Interaktors BiP mittels eines Yeast-2-Hybrid Screens unter Verwendung einer cDNA-Bibliothek aus COS-7 Zellen einen weiteren Anhaltspunkt zur Aufklärung der 7a-Funktion liefern können. In der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst die Interaktion in kultivierten Zellen als auch in SARS-CoV-infizierten Zellen bestätigt werden. Anschließend sollte die 7a-BiP Interaktion weiter charakterisiert werden. Aufgrund der vielfältigen viralen Mechanismen zur Beeinflussung entsprechender ER-abhängiger Signalwege bzw. der Initiation und Regulation der UPR, sollten sich diese Untersuchungen im Speziellen auf eine mögliche Beeinträchtigung der ER-Homöostase oder die Auslösung bzw. Modifizierung der UPR durch die Interaktion des viralen Proteins mit BiP konzentrieren. Neben der Untersuchung ER-abhängiger Effekte, sollte eine allgemeine Charakterisierung des akzessorischen Proteins 7a in Bezug auf dessen Abbauwege und subzelluläre Lokalisierung erfolgen. Aufgrund fehlender Daten bezüglich der 7a-Lokalisierung während der Infektion sollten Immunfluoreszenzanalysen infizierter Zellen das 7a-Lokalisierungsprofil vervollständigen. Mittels SARS-CoV-Infektionsversuchen sollte abschließend die Relevanz der gemachten Beobachtungen, im Besonderen die möglicher BiP-abhängiger Effekte, im Kontext der SARS-CoV Infektion untersucht werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 CHEMIKALIEN

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bacillol Plus	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Bacto Agar	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Bacto Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Bacto Trypton	Becton Dickinson, Heidelberg, D
bisBenzimid (Hoechst 33342)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Di-thiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol p. a. 99 %	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Formaldehydlösung 37 %	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Gelatine 40 % Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Glycerol	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Glycin	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
HCl 37 % (w/w)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare, Freiburg, D
Isopropanol p. a.	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Kristallviolett	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Methanol p. a.	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Methylcellulose (4000 cP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
mi-100 bp+ DNA Marker Go	Metabion, Martinsried, D
mi-1 kb(-) DNA Marker Go	Metabion, Martinsried, D
Natriumfluorid	Roth GmbH Co, Karlsruhe, D
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, D
Pefabloc SC	Roche, Mannheim, D
Permafluor	Beckmann Coulter, Marseille, Frankreich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Poly-L-Lysin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, D
Protein A Sepharose	GE Healthcare, Freiburg, D
Protogel Ultra Pure 30 %, Acrylamid : Bisacrylamid 37,5:1	National Diagnostics, Atlanta, USA
Re-blot Plus Strong Solution	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Roti-Histofix	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Röntgenfilm Kodak™ Biomax® MS	PerkinElmer, Rodgau, D
Milchpulver	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Nariumdesoxycholat (DOC)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tris-(hydroxy-methyl)-aminomethan (Tris)	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Triton-X 100	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Tween 20	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D

### 2.1.2 SUBSTANZEN ZUR BEHANDLUNG VON SÄUGETIERZELLEN

Alle verwendeten Substanzen zur Behandlung von Säugetierzellen wurden in DMSO gelöst und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

	c (stock)	c (final)	Wirkung	Referenz
Brefeldin A (BFA)	10 mM	10 µM	Hemmung des ER-Golgi-Transports, Induktion des retrograden Transports	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Bortezomib (BZ)	250 mM	40 nM, 80 nM	Hemmung des 26S Proteasoms	Selleck, Houston, U.S.A
DTT	1 M	20 mM	Induktion von ER Stress durch Reduktion von Disulfidbrücken	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D

Glivec/ Imatinib	10 mM	10 µM	Induktion von Autophagie	Selleck, Houston, U.S.A
Lactacystin (Lac)	5 mM	5 µM, 10 µM	irreversible Hemmung des 26S Proteasoms	Calbiochem, Merck, Darmstadt, D
MDL28170	10 mM	10 µM	Hemmung des m-Calpains und µ-Calpains	Calbiochem, Merck, Darmstadt, D
MG-132	5 mM	0,5, 1,5, 2,5 und 5 µM	reversible Hemmung des Proteasoms, m-Calpain (Tsubuki <i>et al.</i> , 1996)	Calbiochem, Merck, Darmstadt, D
Staurosporin	1 mM	0,5 µM	Induktion von Apoptose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tunicamycin	2,5 mg/ml	2,5 µg/ml	Induktion von ER-Stress durch Inhibition der Glykoprotein- Biosynthese	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

**Tabelle 2: Verwendete Substanzen zur Behandlung von Säugetierzellen**

### 2.1.3 KITS

Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche, Mannheim, D
Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Schwerte, D
Dual-Luciferase Reporter <sup>®</sup> Assay System	Promega GmbH, Mannheim, D
ECL-Plus <sup>™</sup> Western Blotting detection System	GE Healthcare, Freiburg, D
Lipofectamine 2000 Transfection Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
mi-Gel Extraction Kit	Metabion, Martinsried, D
mi- <i>Pfu</i> Set	Metabion, Martinsried, D
mi-Plasmid Mini Prep Kit	Metabion, Martinsried, D
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAShredder	Qiagen, Hilden, D
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D

SuperScript® III First-Strand

Synthesis System for RT-PCR

Invitrogen, Karlsruhe, D

#### 2.1.4 ZELLINIEN

A549

humane, epitheliale Adenokarzinomzellen aus der Lunge (ATCC No. CCL-185)

Caco-2

humane, epitheliale Adenokarzinomzellen aus dem Colorectum (ATCC No. HTB-37)

COS-7

Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze

(*Cercopithecus aethiops*) (ATCC No. CRL-1651)

MEF

murine, embryonale Fibroblasten

(*Mus musculus*), (Kuma et al., 2004)

MEF ATG5 -/-

murine, embryonale Fibroblasten (*Mus musculus*), Deletion des ATG5 Gens (Kuma et al., 2004)

VeroE6

epitheliale Nierenzellen der grünen Meerkatze

(*Cercopithecus aethiops*) (ATCC No. CRL-1586)

#### 2.1.5 ZELLKULTURMEDIEN UND ZUSÄTZE

DMEM + GlutaMAX

Invitrogen, Karlsruhe, D

D-MEM (High Glucose, 25 mM HEPES)

Invitrogen, Karlsruhe, D

MEM

Invitrogen, Karlsruhe, D

Fötale Kälberserum (FCS)

PAA, Pasching, Österreich

MEM Non Essential Amino Acids (100X)

Invitrogen, Karlsruhe, D

OptiMEM + Glutamax

Invitrogen, Karlsruhe, D

Penicillin-Streptomycin

Invitrogen, Karlsruhe, D

#### 2.1.6 OLIGONUKLEOTIDE

Alle Oligonukleotide, in dieser Arbeit als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet, wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert, entsalzt und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst und bei -20 °C gelagert.

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')
huBiP forward	TAGGATCCATGAAGCTCTCCCTGGTGG
huBiP reverse	TATCTAGACTACAACCTCATCTTTTTCTGC
XBP1 forward	CCTTGTTAGTTGAGAACCAGG
XBP1 reverse	GGGCTTGGTATATATGTGG

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

## 2.1.7 ENZYME UND ANTIKÖRPER

### 2.1.7.1 Enzyme

BamHI	Metabion, Martinsried, D
XbaI	Metabion, Martinsried, D
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, D

### 2.1.7.2 Antikörper

Primär-antikörper	Spezifität	Ursprung	Anwend.	Verd.	Referenz
7a	SARS-CoV	monoklonal Maus	WB/IF IP	1:5000 1:500 1:500	(Tan <i>et al.</i> , 2004a)
N	SARS-CoV	polyklonal Kaninchen	WB	1:7500	(Diemer <i>et al.</i> , 2008)
LC3	Maus	Maus	WB	1:3000	nanoTools Antikörpertechnik GmbH & Co. KG, Teningen, D
GAPDH	versch. Spezies u.a. Mensch	monoklonal Maus	WB	1:10000	MAB374, Millipore GmbH, Schwalbach, D
β-Aktin	versch. Spezies u.a. Mensch	monoklonal Maus	WB	1:30000	A5441, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

HA-probe (F-7)	Hämagglutin Influenza- virus	monoklonal Maus	WB	1:1000	sc-7392, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, D
GRP78 (H-129)	Maus, Ratte, Mensch	polyklonal Kaninchen	WB IP	1:1000 1:100	sc-13968, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, D
Calnexin	Maus, Ratte, Mensch	polyklonal, Ziege	IF	1:100	sc-6465, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, D
Rab6	Maus, Ratte, Mensch	polyklonal, Kaninchen	IF	1:100	sc-310, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, D
ERGIC-53	Maus, Ratte, Mensch	polyklonal, Kaninchen	IF	1:100	sc-66880, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, D
<i>p</i> -eIF2 $\alpha$ (Ser51)	versch. Spezies u.a. Mensch, Affe	polyklonal Kaninchen	WB	1:1000	#9721, NEB GmbH, Frankfurt am Main, D
eIF2 $\alpha$ (L57A5)	versch. Spezies u.a. Mensch, Affe	monoklonal Maus	WB	1:1000	#2103, NEB GmbH, Frankfurt am Main, D
Ubiquitin Ub (P4D1)	versch. Spezies u.a. Mensch	monoklonal Maus	WB	1:1000	sc-8017, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, D
ACE2	Mensch	monoklonal Maus	WB	1:10000	AC18F, Enzo Life Science, Lörrach, D
<b>Sekundär- antikörper</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Anwend.</b>	<b>Verd.</b>	<b>Referenz</b>
Peroxidase- konjug.	Maus	Schaf	WB	1:10000	GE Healthcare, Freiburg, D

anti-IgG					
Peroxidase- konjug. anti-IgG	Kaninchen	Schaf	WB	1:7500	GE Healthcare, Freiburg, D
Cy2-konjug. anti-IgG	Maus	Esel	IF	1:100	Dianova, Hamburg, D
Cy3-konjug. anti-IgG	Kaninchen	Esel	IF	1:400	Dianova, Hamburg, D
Cy3-konjug. anti-IgG	Ziege	Esel	IF	1:400	Dianova, Hamburg, D

**Tabelle 4: Verwendete Antikörper (WB = Western Blot, IF = Immunofluoreszenz, IP = Immunopräzipitation)**

### 2.1.8 PLASMIDE UND BAKTERIENSTÄMME

Alle Plasmide wurden in *E. coli* XL-1 Blue (*SupE44, hsdR17, endA1, ecA1, gyrA46, thi-1, relA1, lac, F'(proABlacIq, lacZAM15, Tn10(terR))*) amplifiziert. Zur Expression des BiP in Säugetierzellen wurde das BiP-Gen aus COS-7 Zellen nach PCR Amplifikation über BamHI- und XbaI-Restriktionschnittstellen in die MCS (multiple cloning site) des Leervektors pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen, Karlsruhe, D) kloniert. Zur Expression rekombinanter Proteine in Säugetierzellen wurden folgende Plasmide verwendet:

Plasmid	rekombinantes Protein/Promotor	Referenz
pcDNA3.1 - huACE2 (Abb. 8)	humaner ACE2-Rezeptor, CMV-Promotor	Prof. Michael Farzan, Harvard Medical School, Cambridge, USA, (Li <i>et al.</i> , 2003)
pcDNA3.1-7a (Abb. 8)	ORF7a-Protein des SARS-CoV, CMV-Promotor	Claudia Diemer, Institut für Virologie, TU München
pcDNA3.1-7aHA (Abb. 8)	ORF7a-Protein des SARS-CoV in Fusion mit Hämagglutinin-Rest des Influenzavirus, CMV-Promotor	Claudia Diemer, Institut für Virologie, TU München
pMTWT-BiP (Abb. 8)	BiP des Hamsters	Dr. Linda Hendershot, St. Jude Children`s Research Hospital, Memphis, USA

pGL3-Luc3xERSE (Abb. 8)	<i>Firefly</i> -Luciferase, SV40 Promotor und (3x) <i>tandem repeats</i> der ERSE-Konsensussequenz (CCAAT(N9)CCACG)	Margit Miesbauer ehemals AG Tatzelt, Adolf Butenandt Institut, LMU München
pRL3-SV40 (Abb. 8)	Renilla Luciferase, SV40 Promotor	Promega GmbH, Mannheim, D

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

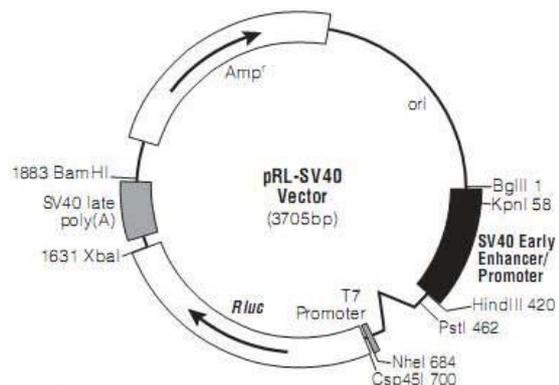
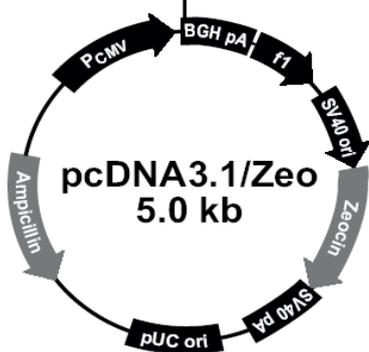
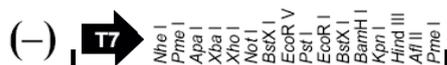
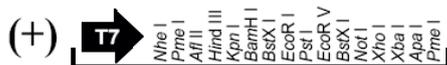
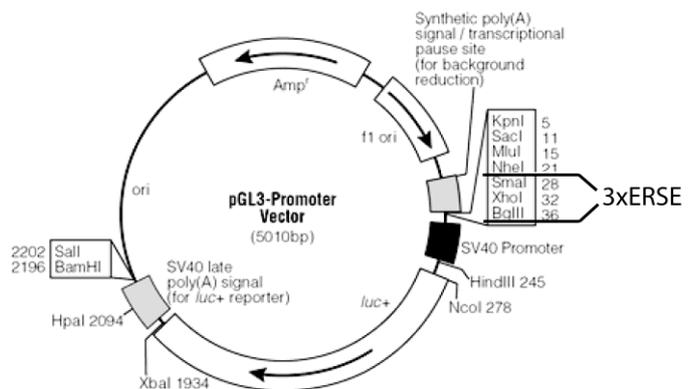
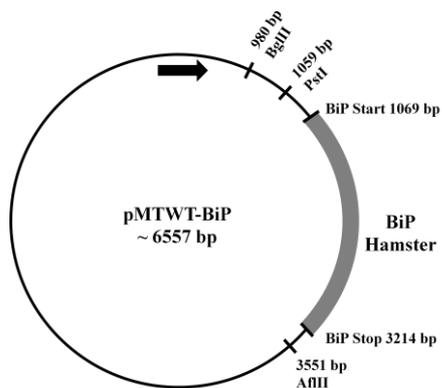


Abbildung 8: Vektorkarten der verwendeten Plasmide

**2.1.9 INSTRUMENTE**

Autoklav V95	Systec, Wettenberg, D
Axiovert 40C Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen, D
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
CO2 Inkubator	Heraeus GmbH, Hanau, D
Zentrifugen:	
- Eppendorf 5417C	Eppendorf-Nethaler-Hinz GmbH, Köln, D
- Sigma 4K15	Sigma-Aldrich, Schnellendorf, D
- Beckmann Avanti	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D
Deckgläschen und Objektträger	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Cryotubes	Corning Inc., USA
Einwegpipetten (5, 10, 25 ml)	Omnilab Schubert & Weiss, München, D
Eppendorf Reagenzgefäß (1,5 oder 2 ml)	Eppendorf-Nethaler-Hinz GmbH, Köln, D
Falcon Reagenzgefäße (15 oder 50 ml)	Falcon, Le Pont de Claix, France
Fusion FX7 Fluoreszenz,- und Chemolumineszenzsystem	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
FV10i FluoView Konfokales Mikroskop	Olympus, Hamburg, D
Gebläsefiltersystem (Respirator X-plore® 7500, Haube TH3, Filter)	Dräger, Lübeck, D
Gelkammer Minigelsystem	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Heizblock Thermomixer	Eppendorf-Nethaler-Hinz GmbH, Köln, D
Rotator	Roth GmbH Co, Karlsruhe, D
Infinite® 200 Pro Multiplate Reader	Tecan, Maennedorf, Schweiz
Netzgerät	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Optimax Röntgenfilmprozessor	PROTEC Medizintechnik GmbH & Co-KG, Oberestfeld, D
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin M	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D

Pipetten	
(0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf-Nethaler-Hinz GmbH, Köln, D
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, D
SafeSeal Pipettenspitzen (10, 100, 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
Sicherheitswerkbank BD-SK1500	BDK Luft – und Reinraumtechnik, Sonnenbühl, D
Spektrophotometer	GE Healthcare, Freiburg, Germany
Trans Blot SD Semi-dry Transfer Cell	Biorad Laboratories GmbH, München, D
Wasserbad	GFL, Burgwede, D
Zellkulturplatten und -schalen	Falcon, Le Pont de Claix, France
Zellkulturflaschen	Biochrom AG, Berlin, D

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 BIOLOGISCHE SICHERHEIT

Gentechnische Arbeiten erfolgten nach den Richtlinien des Gentechnikgesetzes vom 01.01.2004. Biologisch kontaminierte Materialien und Lösungen wurden getrennt gesammelt und gemäß den Bestimmungen inaktiviert und entsorgt. Arbeiten mit SARS-CoV wurden entsprechend der Biostoffverordnung und des Infektionsschutzgesetzes ausschließlich im S3-Sicherheitslabor durchgeführt (**siehe 2.2.6**).

### 2.2.2 PHOTODENSITOMETRIE UND STATISTIK

Photodensitometrische Analysen von Immunoblots wurden mit Hilfe der ImageQuant TL Software (GE Healthcare, Freiburg, D) durchgeführt. An die Bandenintensität der Ladungskontrolle angeglichenen Bandenintensitäten, sowie virale Titer wurden mit der GraphPad Prism Software statistisch ausgewertet. Dabei sind quantitative Daten als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurde der *paired t test* verwendet. *p*-Werte niedriger als 0,05 wurden als signifikant gewertet.

## 2.2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein hoch effizientes Verfahren zur spezifischen Amplifikation definierter DNA-Abschnitte unter Zuhilfenahme einer thermostabilen DNA-Polymerase wie z.B. der *Pfu*-Polymerase. Anders als die *Taq*-Polymerase, die erste in PCR Reaktionen verwendete hitzestabile Polymerase, besitzt die *Pfu*-Polymerase eine Korrekturlesefunktion („proof reading“), welche die Mutationsrate während der DNA-Amplifikation stark minimiert. Zur Durchführung der PCR wurde die zu amplifizierende DNA (Matrize) mit spezifischen Oligonukleotiden (Primer), Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und der *Pfu*-Polymerase gemischt und folgende Reaktionsschritte zyklisch wiederholt.

Denaturierung:	Thermische Denaturierung der zu amplifizierenden, doppelsträngigen DNA
Annealing:	Hybridisierung der Oligonukleotide (Primer) an die komplementären Zielsequenzen unter primerspezifischen Temperaturen
Elongation:	Verlängerung der Primer durch das Arbeitsenzym (DNA-Polymerase) in 5'-3' Richtung

Durch die Wiederverwendung der in einem Zyklus synthetisierten DNA-Fragmente als Matrize in einem neuen Zyklus wird eine exponentielle Vervielfältigung ermöglicht, die unter optimalen Bedingungen eine ca.  $10^{12}$ -fache Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes erreichen kann. Um eine unspezifische Bindung der Primer zu verringern wurde die Primerdissoziationstemperatur  $T_D$ , nach folgender Formel (Suggs *et al.*, 1981) berechnet:

$$T_D [ ^\circ\text{C} ] = 2 \times (A + T) + 4 \times (C+G)$$

(A, C, G, T = Anzahl der Nukleotide )

Zur Durchführung der PCR wurde ausschließlich das *mi-Pfu* Set (Metabion, Martinsried, D) verwendet.

<u>PCR Reaktionsgemisch:</u>	<u>Amplifikationsparameter:</u>
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> 37,5 µl	
10 x Pfu buffer 5 µl	94° C - 5 min
dNTP (5 mM) 4 µl	94° C - 1 min
Primer 5' (10 µM) 2 µl	55° - 58 °C - 1 min
Primer 3' (10 µM) 2 µl	72° C - 0,5 - 2 min
DNA-Matrize 1 µl (200 nM)	72° C - 7 min
Pfu Pol (5 U/µl) 1 µl	

} 30-40 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.3.2) analysiert und gegebenenfalls aus dem Agarosegel (2.2.3.3) extrahiert.

#### 2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine probate Methode Nukleinsäuren entsprechend ihrer Länge und linearen, helikalen oder superhelikalen Konformation innerhalb einer Agarosegelmatrix aufzutrennen. Die Nukleinsäuren wandern dabei im angelegten, elektrischen Feld zur Anode. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wird dem Gel Ethidiumbromid, einem mit DNA interkalierenden Farbstoff zugesetzt, dessen Fluoreszenz durch Exposition mit UV-Licht angeregt wird. Durch Verwendung von DNA-Längenstandards kann die Größe der analysierten Nukleinsäure bestimmt werden.

Der Länge des zu analysierenden DNA-Fragments entsprechend wurden 1-3% Agarose in 50 ml 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Zugabe von 3 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) und Polymerisation des Gels wurde der Gelschlitten in eine Gelelektrophoresekammer eingesetzt und mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Zu analysierende Proben und der Längenstandard wurden mit 1/3 Vol. DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 110 Volt für 30-60 min. Die Belichtung des Gels erfolgte im Anschluss mit dem Fusion FX7 Fluoreszenz- und Chemolumineszenzsystem.

#### 2.2.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Analyse von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese wurden gewünschte DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit dem mi-Gel Extraction Kit (Metabion, Martinsried, D) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Dazu wurde das Gelstück mit 3 Vol. Aufnahmepuffer versetzt und zur Auflösung für 10-15 min bei 55 °C im Heizblock inkubiert. Die Lösung wurde auf ein Säulchen des Kits übertragen und bei 14000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die an das Säulchen gebundene DNA durch Zugabe von Waschpuffer und Wiederholung des Zentrifugationsschrittes gewaschen. Zuletzt wurde die DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> eluiert und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.4 Enzymatischer Verdau von DNA

Der enzymatische Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Herstellerangaben (Metabion, Martinsried, D). 5 µg Plasmid-DNA oder 25 µl Eluat aus der Gelextraktion (2.2.3.3) wurden dazu mit 10 U des jeweiligen Enzyms und dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer versetzt und für mindestens 3 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Nach Analyse des Ansatzes mittels Agarosegelelektrophorese wurde die linearisierte DNA aus dem Gel extrahiert (2.2.3.3) und in eine Ligation (2.2.3.5) eingesetzt.

### 2.2.3.5 Ligation

Das linearisierte Empfängerplasmid (pcDNA3.1) und das amplifizierte DNA-Fragment wurden im molaren Verhältnis 1:7 gemischt und mit Ligasepuffer des Herstellers und der T4 Ligase in einem Endvolumen von 15 µl für 16 h bei 14 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz in chemokompetente *E.coli* transformiert (2.2.3.6) oder bei -20 °C gelagert.

### 2.2.3.6 Transformation chemokompetenter *E. coli*

Ein bei -80 °C gelagertes Aliquot chemokompetenter *E. coli* (100 µl XL-1 Blue) wurde für 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des kompletten Ligationsansatzes (2.2.3.5) oder 1 µg Plasmid-DNA wurde der Ansatz für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min im Heizblock wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 400 µl LB Medium bei 200 rpm und 37 °C für 1-2 h inkubiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes bei 2500 rpm für 5 min bei RT wurde der Überstand abgenommen, die sedimentierten Bakterien in 100 µl LB-Medium aufgenommen und der Ansatz auf Agarplatten ausgestrichen, denen zur Selektion positiv transformierter Klone das Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) beigefügt worden war. Beimpfte Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

LB (Luria-Bertani) Medium:	Bacto Trypton 10 g/l Bacto Hefeextrakt 5 g/l NaCl 10 g/l
LB-Agar:	wie LB Medium Bacto Agar 15 g/l in A. dest

### 2.2.3.7 Plasmidisolation aus *E.coli* im präparativen Maßstab

Zur Isolierung von bis zu 500 µg Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, D) nach Angaben des Herstellers verwendet. Von der Agarplatte der Bakterientransformation (2.2.3.6) wurde ein positiver Klon gepickt und damit 100 ml Ampicillin enthaltendes LB Medium (100 µg/ml) beimpft. Nach der Inkubation der Kultur über Nacht bei 200 rpm und 37 °C wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 3500 rpm (Sigma 4K15) und 4 °C für 15 min geerntet und anschließend mittels alkalischer Lyse aufgebrochen. Nach Abtrennung bakterieller Zellreste durch Zentrifugation (12000 rpm, Beckmann Avanti, JA25.50, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand auf Säulen des Kits übertragen und die DNA unter Niedrigsalzbedingungen an die Säule des Kits gebunden. Nach mehrfachen Waschschritten wurde die DNA eluiert und mit Isopropanol gefällt. Nach Präzipitation mittels Zentrifugation (12000 rpm, Beckmann Avanti, JA25.50, 4 °C, 30 min) wurde die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> resuspendiert. Die DNA-Konzentration der Suspension wurde

gemessen (**2.2.3.9**) und die Probe bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.8 Plasmidisolation aus *E.coli* im analytischen Maßstab

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* im kleinen Massstab wurde das mi-Plasmid Mini Prep Kit (Metabion, Martinsried, D) nach Herstellerangaben verwendet. 5 ml LB-Medium wurden dazu mit einem von einer Agarplatte gepickten Klon (**2.2.3.6**) beimpft und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Bakterienzellen aus 1,5 ml der Kultur wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 14000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) bei RT geerntet und nach Herstellerangaben lysiert. Nach Abtrennung bakterieller Zellreste durch Zentrifugation (14000 rpm, RT, 10 min) wurde der Überstand auf die Säulchen des Kits übertragen. Die durch Zentrifugation an das Säulchen gebundene DNA wurde mehrfach gewaschen und durch Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> eluiert.

#### 2.2.3.9 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Determinierung der DNA - oder RNA-Konzentrationen wurde die Absorption bei der Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm ( $A_{260}$ ) mit einem Spektrophotometer gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht die Absorption von 1 bei DNA einer Konzentration von 50 µg/ml und bei RNA 40 µg/ml sofern die Nukleinsäure in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst ist. DNA und RNA-Proben wurden zur Messung mit RNase-freiem Wasser 1:10 gemischt. Zur Feststellung der Reinheit der gemessenen Probe wurde zugleich die Absorption bei einer Wellenlänge  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm bestimmt. Da aromatische Aminosäuren, im speziellen Tryptophan, bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum haben, gibt die Messung bei 260 bzw. 280 nm Aufschluss darüber wieviel Protein in der Probe enthalten ist. Bei einem Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm von 2,0 (RNA) bzw. 1,8 (DNA) wurde bei der Aufreinigung ein hoher Reinheitsgrad erreicht.

Die Nukleinsäurekonzentration wurde dann wie folgt berechnet:

$$\text{DNA: } A_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{dilution factor} = c_{\text{DNA}} \text{ µg/ml}$$

$$\text{RNA: } A_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{dilution factor} = c_{\text{RNA}} \text{ µg/ml}$$

#### 2.2.3.10 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung von DNA-Plasmiden erfolgte mittels linearer Amplifikationssequenzierung ("Cycle-Sequenzierung") nach Murray (Murray, 1989) durch die Firma GATC (Konstanz, D).

#### 2.2.3.11 RNA Isolation

Zur Isolation von RNA aus Säugetierzellen wurde das QIASHredder und RNeasy Kit (beide von Qiagen, Hilden, D) nach Herstellerprotokoll verwendet. Zellen wurden auf 10 cm Schalen bis zur Konfluenz kultiviert und lysiert. Durch Auftragung des Lysats auf das QIASHredder Säulchen und folgende Zentrifugation kommt es zur optimalen Homogenisierung des Lysats. Das Eluat wurde auf

Säulchen des RNeasy Kits aufgetragen, hier ein DNA-Verdau mit dem RNasefreie DNase Kit (Qiagen, Hilden, D) durchgeführt und die RNA nach mehreren Waschschritten mit RNase-freiem  $H_2O_{dest.}$  eluiert. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration (2.2.3.9) wurden die Isolate bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um eine Kontamination mit RNase oder DNA zu verhindern, wurden alle Schritte der Isolation an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt und nur RNase-freie Materialien und aerosol-dichte, RNase-freie Spitzen verwendet.

#### 2.2.3.12 Reverse Transkription und cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus isolierter RNA wurde mit Hilfe des SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis Systems (Invitrogen, Karlsruhe, D) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden  $3\text{ }\mu\text{g}$  RNA durch die SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transkriptase des Kits, die eine synthetisierte Version der Reversen Transkriptase des Moloney Murinen Leukämievirus (M-MLV) ist, revers transkribiert und durch einen nachfolgenden RNase-H Verdau die RNA aus dem DNA-RNA Hybridstrang abgebaut. Die synthetisierte, einzelsträngige cDNA wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und gegebenenfalls als Matrize in eine PCR (2.2.3.1) eingesetzt.

### 2.2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

#### 2.2.4.1 Präparation von postnukleären Lysaten für die SDS-PAGE

Zur Präparation postnukleärer Lysate wurden Zellen mit PBS gewaschen und in  $500\text{ }\mu\text{l}$  bzw.  $1\text{ ml}$  postnukleärem Lysepuffer für  $10\text{ min}$  bei Raumtemperatur lysiert. Lysate wurden in  $1,5\text{ ml}$  Reaktionsgefäße übertragen,  $0,02\text{ }\%$  Pefabloc zugegeben und zur Abtrennung von Zellrückständen für  $1\text{ min}$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  bei  $14000\text{ rpm}$  (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) zentrifugiert. Zur Präzipitation der Proteine wurden die Überstände in  $5\text{ ml}$  Methanol über Nacht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und Präzipitate durch Zentrifugation für  $25\text{ min}$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  bei  $3500\text{ rpm}$  (Sigma 4K15) sedimentiert. Nach Verwerfen des Methanols und Lufttrocknen des Präzipitats bei Raumtemperatur für  $15\text{ min}$  wurden die Proteine in  $50\text{ }\mu\text{l}$ - $100\text{ }\mu\text{l}$  TNE-Puffer resuspendiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.2.4.2) wurde die Probe mit  $1/3\text{ Vol.}$   $3\text{ x}$  SDS-Auftragspuffer versetzt, für  $10\text{ min}$  bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Heizblock die Proteine denaturiert und die Probe dann bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Auftragung auf ein SDS-Gel gelagert.

Lysepuffer (PNL)	100 mM NaCl
	10 mM Tris/HCl, pH 7,5
	10 mM EDTA
	0,5 % (v/v) Triton-X
	0,5 % (w/v) DOC in $H_2O_{dest.}$

TNE-Puffer	0 nM Tris/HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
	5 mM EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
3 x SDS-Auftragspuffer	90 mM Tris/HCl, pH 6,8
	7 % (w/v) SDS
	0,01 % (w/v) Bromphenolblau
	30 % (v/v) Glycerol
	20 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

#### 2.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe wurde mit dem Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Schwerte, D) durchgeführt. Durch Bindung von, in einer Lösung vorhandenen Proteinen an das Coomassie-Reagenz kommt es zur Veränderung dessen Absorptionsmaximums von  $\lambda = 465$  nm zu  $\lambda = 595$ . Diese Absorptionsveränderungen sind mit einem Spektrophotometer messbar. Durch Verdünnung einer BSA (bovines Serumalbumin) - Stammlösung (2mg/ml) des Kits in 0, 50, 75, 150, 250, 500, 1000 und 1500 mg/ml Verdünnungen wurde eine Standardverdünnungsreihe erstellt. Vor der Messung wurden die Proben aus **2.2.4.1** mit TNE-Puffer 1:10 verdünnt und 5  $\mu$ l der Verdünnung und der Standards in eine 96 well Flachbodenplatte pipettiert. Nach Zugabe von 250  $\mu$ l Coomassie-Reagenz wurde die Absorption mit dem Infinite<sup>®</sup> 200 Pro Multiplate Reader gemessen und mit der Magellan Software (Tecan, Maennedorf, Schweiz) die Proteinkonzentrationen ermittelt.

#### 2.2.4.3 Immunopräzipitation und Co-Immunopräzipitation

Zellen einer 10 cm Schale wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und für 10 min auf Eis mit 1 ml Co-IP Lysepuffer und 0,5 % Pefabloc lysiert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 4 °C und 14000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) zur Abtrennung von Zellrückständen wurde der Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem entsprechenden Antikörper (7a oder BiP) 1:100 und erneut 0,1 % Pefabloc versetzt. Die Immunopräzipitation erfolgte dann in einem Vertikalschüttler für 3 h bei 4 °C. Nach Zugabe von 100  $\mu$ l Protein A Sepharose Beads und 0,1 % Pefabloc wurden die Proben nochmals unter gleichen Bedingungen für 90 min inkubiert. Durch Zentrifugation für 2 min bei 4 °C und 14000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) wurde die Sepharose und die daran gebundenen Immunkomplexe sedimentiert und durch Zugabe von eiskaltem Co-IP Waschpuffer mehrfach gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Pufferüberstand verworfen und die Sepharose in 60  $\mu$ l SDS-Auftragspuffer resuspendiert. Zur Ablösung der Immunkomplexe

von den Sepharose Beads wurden die Proben anschließend wie oben zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden zu gegebener Zeit komplett in einer SDS-PAGE (2.2.4.4) aufgetrennt und mittels Immunoblot (2.2.4.5) analysiert. Der Nachweis der Immunopräzipitation erfolgte durch Verwendung des gleichen, wie oben benutzten Antikörpers und die Co-Immunopräzipitation durch Verwendung eines Antikörpers gegen das potentiell co-immunopräzipitierte Protein.

IP/Co-IP Lysepuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
	0,5 mM EDTA
	1 mM NaF
	0,5 % (v/v) Triton-X
	1 % (v/v) Tween 20
	in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
IP/Co-IP Waschpuffer	0,5 % (v/v) Triton-X
	0,5 % (w/v) DOC
	1 % (w/v) SDS
	in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

#### 2.2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Makromoleküle wie Proteine ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt werden. Zuvor müssen jedoch Sekundär – und Tertiärstrukturen aufgelöst werden. Neben der Hitzedenaturierung bei 95 °C und der Denaturierung durch reduzierende Substanzen wie  $\beta$ -Mercaptothanol wird dem SDS-Auftragungspuffer zusätzlich Sodiumdodecylsulfat (SDS) zugegeben. Dieses anionische Detergenz lagert sich an das Peptidrückgrat von Proteinen an, wodurch es deren Ladungen nivelliert und ihnen eine insgesamt negative Nettoladung verleiht. Entsprechend seiner negativen Ladung, die so direkt proportional zu dessen Größe ist, wandert das Protein im elektrischen Feld durch die Polyacrylamidmatrix zur Anode. Die Größe der Poren ist dabei abhängig von der Konzentration des Acrylamids und des Verhältnisses von Acrylamid zu Bis-Acrylamid bei der Polymerisation des Gels, die durch die Zugabe von TEMED und APS initialisiert wird. Proteine einer kleineren molekularen Masse können die Poren schneller passieren als Proteine mit großem Molekulgewicht, wodurch es zur Auftrennung der Proteine kommt. Durch den Vergleich der Wanderungstrecken mit der von Proteinen bekannter Größe (Protein

Standard) kann das Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins bestätigt werden.

Die verwendeten diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gele nach Laemmli (1970) bestehen aus einem 2-Phasen-Gel, die sich in Porengröße und pH-Wert unterscheiden. Die Proteine werden auf das Sammelgel (Upper) aufgetragen, ein 5 % Polyacrylamid-Gel mit grösseren Poren, in dem es zur Konzentration der Proteine zu einer scharfen Bande kommt. Das daran anschließende Trenngel (Lower), eine zweite Gelphase, besitzt durch seinen höheren Anteil an Polyacrylamid (12,5%) kleinere Poren, die eine Auftrennung entsprechend des Molekulargewichts ermöglichen.

Zur Herstellung der vertikalen 2-Phasen-Gele wurden Glasplatten mit Ethanol gereinigt und durch einen Spacer getrennt in eine Gelgiesskammer eingespannt. Das Lower-Gelgemisch wurde zwischen die zwei Platten gegeben und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol vollständig abgenommen oder abgetrocknet, das Trenngel mit dem Upper-Gelgemisch überschichtet und zügig entsprechende Kämme eingesetzt. Nach endgültiger Polymerisation wurden die Kämme vorsichtig entfernt und das Gel in ein Doppelsystem (Elektrophoresekammer) eingespannt und grosszügig mit 1 x EP Puffer überschichtet. Die Proben aus 2.2.4.1 und die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Standard) wurden aufgetragen und die SDS-PAGE bei konstanten 30 mA durchgeführt. Der Fortschritt der Elektrophorese konnte durch das Bromphenolblau im Auftragungspuffer überwacht werden und erfolgte solange, bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hat. Die aufgetrennten Proteine wurden dann mittels Immunoblot (2.2.4.5) auf eine Membran übertragen.

4 x Upper Lösung	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
4 x Lower Lösung	0,5 M Tris pH 6,8 0,4 (w/v) SDS
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
10 x Elektrophoresepuffer	250 mM Tris 2,5 M Glycin 1 % (w/v) SDS
<b>Trenngel (4x)</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	40,6 ml
4 x Lower Lösung	30,8 ml
Acrylamidlösung	51,8 ml

TEMED	180 µl
APS	384 µl
<b>Sammelgel (4x)</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	19,8 ml
4 x Lower Lösung	8,4 ml
Acrylamidlösung	5,6 ml
TEMED	60 µl
APS	336 µl

#### 2.2.4.5 Immunoblot

Mittels Immunoblot, der auch als Western Blot bezeichnet wird, können aus dem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennte Proteine mit der „semi-dry“ Methode auf eine Membran übertragen und durch Inkubation mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Dazu wurden drei Lagen in Blotting Puffer getränktes, auf Gelgröße zugeschnittenes Whatman-Papier (Hartenstein GmbH, Würzburg, D) in die Blottingkammer (Trans Blot SD Semi-dry Transfer Cell) gelegt. Darauf wurde eine, zuvor in Methanol und H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> äquilibrierte Hybond-P PVDF Membran ebenfalls in Gelgröße platziert. Das SDS-Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen, von Glasplatten und Spacern befreit und bündig auf die Membran gelegt. Drei weitere Lagen feuchtes Whatman Papier wurden auf das Gel platziert und etwaige Luftblasen mit einem Plastikröllchen vorsichtig entfernt. Die Kammer wurde verschlossen und der dielektrische Proteintransfer auf die PVDF Membran bei 18 Volt für 30 min durchgeführt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 30 min bei RT in einer Magermilchlösung geschwenkt. Zur Detektion eines spezifischen Proteins wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Primärantikörper in 1 x TBST (**Tabelle 4**) auf einem Schüttler inkubiert. Der primäre Antikörper erkennt spezifisch ein oder mehrere Epitope des Proteins und wird seinerseits zur visuellen Detektion von einem sekundären, mit einer Peroxidase gekoppelten Antikörper gebunden. Dieser wurde nach 4-maligem Waschen der Membran für jeweils 10 min mit 1 x TBST für 45 min auf dem Schüttler bei RT mit der Membran inkubiert. Nach weiteren 4 Waschschrinen wurde die Membran getrocknet und für 2 min mit der ECL-Lösung (ECL-Plus™ Western Blotting Detection System), die nach Herstellerangaben angesetzt wurde, inkubiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase vermittelt jetzt die Umsetzung chemogener Substanzen der ECL-Lösung in ein chemolumineszierendes Signal, welches durch die Exposition eines Röntgenfilms auf die Membran sichtbar gemacht werden kann. Dazu wurde die Membran kurz getrocknet, in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine lichtdichte Filmklappe gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm für eine angebrachte Zeitspanne auf die Membran gelegt und

dieser schließlich in einer automatischen Röntgenfilmprozessormaschine entwickelt.

Blotting Puffer	20 % Methanol
	3 g Tris
	14,4 g Glycin
	ad. 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
10 x TBST	0,5 % Tween-20
	1,5 M NaCl
	100 mM Tris/HCl, pH 8,0
	in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Magermilchlösung	5 % (w/v) Magermilchpulver
	in 1 x TBST

#### 2.2.4.6 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse und konfokale Mikroskopie

Durch Inkubation fixierter Zellen mit einem Primärantikörper und mit einem entsprechenden, mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Sekundärantikörper, kann durch Anregung der Konjugate durch den Laser eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes die intrazelluläre Lokalisierung eines spezifischen Proteins dokumentiert werden. Dazu wurden Glasplättchen für 10 min bei RT mit Poly-L-Lysin beschichtet, mit PBS gewaschen und Zellen darauf ausplattiert. Nach Behandlung oder Transfektion wurden die Zellen zum gewünschten Zeitpunkt mit PBS gewaschen und für 30 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit Roti-Histofix fixiert. Die Fixierungslösung wurde entfernt, die Plättchen 4 x mit PBS gewaschen und für 10 min bei RT mit einer NH<sub>4</sub>/Cl-Glycin-Lösung überdeckt. Die „Quenching“-Lösung bewirkt dabei die Absättigung der Aldehydgruppen des Roti-Histofix um die unspezifische Bindung primärer Antikörper zu unterbinden. Nach erneuten 4 Waschschritten mit PBS wurde die Zellmembran und intrazelluläre Membranen durch Inkubation der Plättchen mit Triton-X permeabilisiert um den Durchtritt der Antikörper zu gewährleisten. Nach weiteren Waschschritten wurden die fixierten Zellen zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen für 10 min bei RT mit einer Gelatinelösung überschichtet und schließlich für 45 min bei RT in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper (in Gelatinelösung, **Tabelle 4**) inkubiert. Es erfolgten 4 Waschschrritte mit PBS bevor die Plättchen mit den Cy2- oder Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern (in Gelatinelösung, **Tabelle 4**) für 45 min bei RT in einer feuchten Kammern im Dunklen inkubiert wurden. Nachdem die Zellen erneut gewaschen worden waren, erfolgte die Färbung der Nuklei für 15 min bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln mit dem Hoechst-Reagenz (0,1% in Gelatine-

Lösung). Nach dem Waschschrift wurden die Plättchen vorsichtig mit der Permafluor-Lösung auf einem Objektträger eingedeckt und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Bis zur Analyse der Immunfluoreszenzfärbung mit dem vollautomatischen, konfokalen Laserscanning-Mikroskop Fluoview FV10i wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

„Quenching“-Lösung	50 mM NH <sub>4</sub> Cl
	20 mM Glycin
	in PBS
Permabilisierungslösung	0,1 % Triton-X
	in PBS
Gelatine-Lösung	0,2 % Gelatine
	in PBS

## 2.2.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Alle Arbeiten mit Säugetierzellen wurden in einem Sicherheitslabor der Stufe 2 (S2) an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Zur Vermeidung jedweder Kontamination wurden Handschuhe und Einwegplastikpipetten verwendet. Für die Arbeiten mit Flüssigstickstoff wurden ein Gesichtsschirm und spezielle Handschuhe getragen.

### 2.2.5.1 Auftauen von Säugetierzellen

In Flüssigstickstoff gelagerte Zellen wurden bei 37 °C im Inkubator aufgetaut und in 14 ml Medium überführt. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 25 °C und 1000 rpm (Sigma 4K15) wurde das Medium verworfen und die sedimentierten Zellen in 10 ml Medium resuspendiert. Nach Überführung der gesamten Zellsuspension in eine Zellkulturschale wurden die Zellen bis zur Passagierung kultiviert.

### 2.2.5.2 Kultivierung von Säugetierzellen

Zellen für S2-Arbeiten wurden auf Zellkulturschalen in einem 37 °C Inkubator, bei 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % inkubiert. Zellen für S3-Arbeiten wurden ebenfalls bei 37 °C in Zellkulturflaschen mit geschlossenem Deckel ohne CO<sub>2</sub> jedoch in Medium mit HEPES-Puffer kultiviert. Wie unten aufgeführt wurden für die verwendeten Zelllinien folgende Medien und Zusätze verwendet:

A549	DMEM + Glutamax + 10 % FCS + 1 % PenStrep
Caco2	MEM + 12 % FCS + 1,2 % NEAA + 1 % PenStrep
COS-7	DMEM + Glutamax + 10 % FCS + 1 % PenStrep
VeroE6 (S2)	DMEM + Glutamax + 10 % FCS + 1 % PenStrep
VeroE6 (S3)	DMEM + Glutamax + HEPES + 10 % FCS + 1 % PenStrep

Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und 0,5-1 ml Trypsin-EDTA zugegeben. Nach einer 2-3 minütigen Inkubation bei 37 °C im Inkubator wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 6-10 ml Medium abgestoppt, die Zellen sorgfältig von der Platte/Flasche abgelöst und homogenisiert. Entsprechende Volumina der Zellsuspension wurden abgenommen und in eine neue Zellschale/Flasche mit 6-20 ml vorgelegtem Medium überführt. 24 h nach Passagierung wurde bei Caco-2 Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt.

#### 2.2.5.3 Einfrieren von Säugetierzellen

Zur Lagerung von Säugetierzellen wurde die Zellsuspension nach der Trypsinierung (**2.2.5.2**) für 5 min bei 25 °C und 1000 rpm (Sigma 4K15) zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die sedimentierten Zellen in Medium mit 10 % DMSO und 20 % FCS resuspeniert. Die Zellsuspension wurde in Cryotubes zu 1 ml aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag erfolgte die Umlagerung der Zellen in den Stickstofftank (-169 °C).

#### 2.2.5.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde von dieser ein Aliquot abgenommen, mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt und in die Fuchs-Rosenthal-Kammer überführt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen in 4-16 kleinen Quadraten ausgezählt und ein Mittelwert berechnet. Die Fläche eines Quadrates bemisst 1 mm<sup>2</sup> und die Tiefe 0,2 mm, es ergibt sich somit ein Volumen von 0,2 mm<sup>3</sup> oder 1/5000 ml pro kleinem Quadrat. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte dann mit der Formel wie folgt:

Zellzahl/ml = mittlere Zellzahl pro Quadrat x 5000 x 10 (Verdünnungsfaktor)

#### 2.2.5.5 Transiente Transfektion von Säugetierzellen

Die transiente Transfektion von Säugetierzellen durch Lipofektion ermöglicht die Einschleusung fremder Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen und wurde mit Hilfe des Lipofectamine 2000 Transfection Kit (Invitrogen, Karlsruhe, D) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Verbindung von DNA mit kationischen Lipiden des Lipofectamine-Reagenz führt zur Bildung von Liposomen, die mit der Zellmembran fusionieren und so deren Inhalt in das Zytoplasma der Zelle entleeren können.

Zu transfizierende Zellen wurden im entsprechendem Format (6 cm, 6 well, 48 well) 24 h vor der Transfektion ausgesät. Nach einem Mediumwechsel wurden auf die Zellen 2,5 ml (6 cm), 1,75 ml (6 well) oder 300  $\mu$ l (12 well) Medium vorgelegt. 10  $\mu$ l Lipofectamine wurden in einem ersten Reaktionsansatz mit 240  $\mu$ l Opti-MEM versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. In einem zweiten Reaktionsansatz wurden 6  $\mu$ g DNA (**Tabelle 5**) mit 250  $\mu$ l Opti-MEM verdünnt und zu dem ersten Reaktionsansatz gegeben. Nach Inkubation des Transfektionsansatzes für 15 min bei RT wurde der gesamte Ansatz (6 cm), 250  $\mu$ l (6 well) oder 50  $\mu$ l (48 well) auf die Zellen gegeben und für 4-5 h bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden Zellen für gewünschte Zeiträume weiter kultiviert.

#### 2.2.5.6 Luciferase-Reportergen-Assay

Mit Hilfe des Luciferase-Reportergen-Assays kann indirekt die Aktivierung von Promotoren oder die Aktivität eines Transkriptionsfaktors in einer Zellpopulation bestimmt werden. In diesem Fall wurden Zellen mit dem Plasmid pGL3-Luc3xERSE und dem Plasmid pRL3-SV40 transfiziert und der Luciferase-Reportergen-Assay mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems (Promega, Mannheim, D) durchgeführt. Das Luciferasegen des pGL3-Luc3xERSE kodiert für ein, aus dem Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) isoliertes Luciferaseprotein (*Firefly*-Luciferase), dessen enzymatische Aktivität das Substrat Luciferin unter Freisetzung von Licht (Biolumineszenz) in Oxyluciferin umsetzt. Die Expression des Gens steht unter Kontrolle eines SV-40 Promotors und einer ERSE-Enhancer-Sequenz, die messbare Aktivität des Enzyms steht somit in proportionaler Relation zur Aktivierung des ERSE. Das pRL3-SV40-Plasmid, das als interne Transfektionskontrolle in dem Assay fungiert, exprimiert konstitutiv die Renilla-Luciferase. Dieses Enzym aus *Renilla reniformis*, einer zur Seefedern gehörenden Oktokorallenart, setzt hingegen das Substrat Coelenterazin in Coelenteramid unter Lichtemission um. Die unterschiedlichen Substratspezifitäten, die der unterschiedlichen biochemischen Struktur und dem evolutionärem Ursprung der Enzyme zu Grunde liegen, ermöglichen die sequentielle Detektion der produzierten Biolumineszenz beider Enzyme in einer Probe. Zunächst wird die Aktivität der *Firefly*-Luciferase in einer Probe durch Zugabe von Luciferin bestimmt. Nach Messung der Biolumineszenz ( $\lambda = 560$  nm) wird die Reaktion durch Zugabe des Stop & Glo<sup>®</sup> Reagenz abgebrochen und gleichzeitig die Umsetzung des Coelenterazin des Reagenz durch die Renilla-Luciferase initialisiert. Hier erfolgt die Messung der Biolumineszenz bei einer Wellenlänge von  $\lambda=480$  nm. Die Aktivität der Renilla-Luciferase gibt Aufschluss über die Transfektionseffizienz jeder Probe und muss daher bei der Auswertung der *Firefly*-Luciferase Aktivität berücksichtigt werden.

Zur Durchführung wurden VeroE6 Zellen in 48 well Platten ausgesät und nach 24h mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. Dabei wurden die Plasmide pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-7a, pGL3-Luc3xERSE und pRL3-SV40 im Verhältnis 4,5 : 4,5 : 1 eingesetzt. Zu gegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 60  $\mu$ l Rapid Lysis Puffer für 15 min unter leichtem Schütteln bei RT lysiert. 20  $\mu$ l der Lysate wurden in weiße 96-well Flachbodenplatten

überführt und 40 µl LARII (Luciferase Assay Reagent II) zugegeben. Nach Messung im Infinite<sup>®</sup> 200 Pro Multiplate Reader ( $\lambda = 560$  nm) (Tecan, Maennedorf, Schweiz) wurden den Proben 40 µl Stop & Glo<sup>®</sup> Reagenz zugegeben und die Emission bei  $\lambda=480$  nm gemessen.

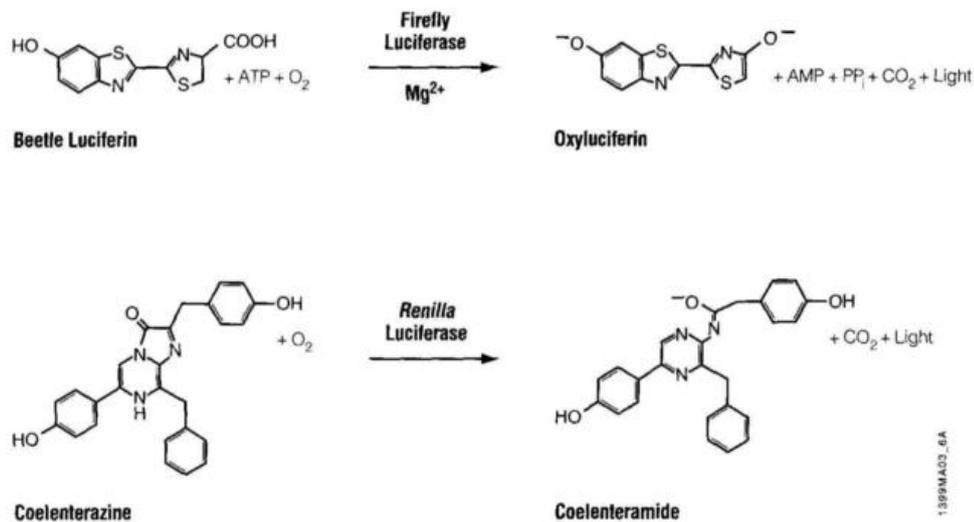


Abbildung 9: Umsetzungsreaktionen der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase (entnommen aus der technischen Anleitung des Dual-Luciferase Reporter Gene Assay Systems)

#### 2.2.5.7 Viabilitäts-Assay (XTT)

Mit dem XTT-Assay (Cell Proliferation Kit II, Roche, Mannheim, D) kann die Zellvitalität einer Zellpopulation mittels colorimetrischer Quantifikation u.a. bei Behandlung mit verschiedenen Substanzen ermittelt werden. Das Prinzip des Assays beruht auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalses XTT in das lösliche, orange Formazansalz durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender bzw. proliferierender Zellen (Abb. 10). Dabei korreliert die Menge an gebildeten Formazan, die durch die Absorptionmessung mit einem ELISA-Reader ermittelt werden kann, direkt mit der Anzahl lebender Zellen einer Zellpopulation.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität verwendeter Substanzen wurden VeroE6 Zellen im 96 well Format ausgesät (6000 c/well) und bei einer Konfluenz von 80 % für 16 h bei 37 °C im Inkubator mit angegebenen Substanzen und Konzentrationen behandelt. Zugleich mit der Zugabe der jeweiligen Substanz wurden pro Napf 50 µl des XTT-Reagenz zugegeben. Nach der Inkubation wurde die Absorption mit dem Infinite<sup>®</sup> 200 Pro Multiplate Reader bei einer Wellenlänge  $\lambda = 450$  nm ermittelt. Die mittlere Absorption von 6-12 Reaktionsansätzen unter DMSO-Behandlung wurde gleich 100 % Vitalität gesetzt und die Vitalitäten bei anderen Bedingungen in Bezug dazu berechnet.

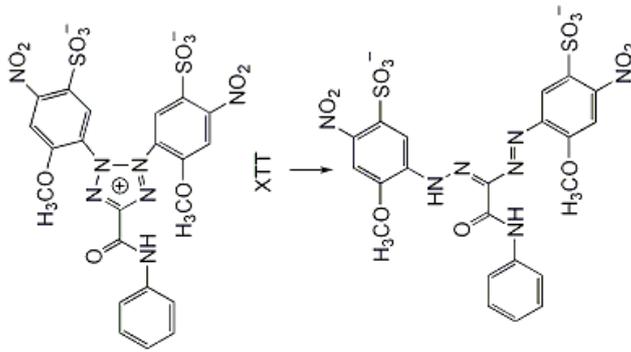


Abbildung 10: Umsetzung des Terazoliumsalses XTT zu Formazan

## 2.2.6 VIROLOGISCHE METHODEN

Alle Arbeiten mit dem SARS-Coronavirus erfolgten in einem Sicherheitslabor der Stufe 3 und unter Verwendung eines Respirators und Tragen von 2 Paar Handschuhen, 2 Paar Überschuhen und eines Schutzoveralls. Es wurden außerdem ausschließlich verschraubbare Reaktionsgefäße und aerosoldichte Spitzen verwendet. Bei Arbeiten unter der Sicherheitswerkbank wurden zusätzlich Ärmelschoner getragen. Jegliche Flüssigkeiten wurden vor dem Autoklavieren mit 100 % Inzidin inaktiviert. Alle Gebrauchsmaterialien oder kontaminiertes Material wurden vor dem Autoklavieren 1 h mit UV-Licht bestrahlt. Materialien oder Zellen, die aus dem S3-Labor transportiert wurden, wurden zuvor in 4 % Formalin (in PBS) für mindestens 30 min bei RT oder über Nacht bei 4° C eingelegt oder Zellen mit 4 % Formalin fixiert. Sämtliche Einweggebrauchsmaterialien des Personenschutzes, sowie Inzidin und Bacillol wurden von der Firma Roth GmbH & Ko, Karlsruhe, D bezogen.

### 2.2.6.1 Anzucht des SARS-CoV (Produktion viraler Überstände)

Zur Anzucht des SARS-CoV wurden VeroE6 Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit geschlossenem Deckel ausgesät. Bei Erreichen einer 80 % igen Konfluenz der Zellen wurde ein bei -80 °C gelagertes Cryotube mit SARS-CoV Überstand (niedriger Titer) bei 37 °C im Inkubator aufgetaut und in 2 ml Medium mit FCS und HEPES aufgenommen. Das Medium der Zellen wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und die 3 ml des verdünnten SARS-CoV Überstandes auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37 °C wurde der gesamte Überstand abgenommen und zur Entfernung toter Zellen oder Zelldebris für 5 min bei RT und 1000 rpm (Sigma 4K15) zentrifugiert. 2 ml des Überstandes wurden erneut mit 1 ml neuem Medium mit FCS versetzt, auf eine neue Flasche 80 % konfluenter Zellen gegeben und die Zellen erneut für 72 h bei 37 °C inkubiert. Beschriebene Schritte wurden solange wiederholt bis 24 h nach der Inokulation ein 100 % iger zytopathischer Effekt zu verzeichnen war. Jetzt wurden mehrere Flaschen mit den Überständen beimpft und so schrittweise virale Überstände in größeren Volumina generiert. 60 ml Virusüberstand wurden schließlich vereinigt,

zur Entfernung toter Zellen oder Zelldebris für 5 min bei RT und 1000 rpm (Sigma 4K15) zentrifugiert und die Überstände in vorbeschrifteten Cryotubes in Aliquots à 1 ml bei -80 °C gelagert. Durch einen nachfolgenden Plaque-Assay (2.2.6.2) wurde der Titer der Charge bestimmt.

#### 2.2.6.2 Bestimmung der Virustiter (Plaque-Assay)

Die Bestimmung viraler Titer einer Suspension wurde mittels Plaque-Assay durchgeführt. Diese Methode liegt der Fähigkeit lytischer Viren zu Grunde infizierte Zellen lysieren zu können. Zunächst wird ein geschlossener Zellrasen mit einer zu untersuchenden Virussuspension inokuliert. Durch Zugabe von beispielsweise Agarose oder Methylcellulose wird die Zähigkeit des Mediums stark erhöht und so die Immobilisierung des Virus bewirkt. Die Ausbreitung des Virus durch Diffusion im Zellmedium ist somit blockiert. Es können nur benachbarte Zellen infiziert werden, wodurch es zur Entstehung eines lokalen Lochs im Zellrasen - einem Plaque - kommt. Nach Fixierung und nachfolgender Färbung des Zellrasens werden die nicht anfärbbaren Plaques sichtbar und können ausgezählt werden (Abb. 11).

VeroE6 Zellen wurden im 12 well Format ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz konnte der Plaque-Assay wie folgt durchgeführt werden. Zunächst wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen mit einem zu untersuchenden viralen Überstand eine sechsfache Verdünnungsreihe mit dem Verdünnungsfaktor 1:20 in Medium ohne FCS hergestellt. Das Medium der Zellen wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen bevor sie für 1 h bei 37 °C mit 400 µl jeder Verdünnung im Doppelansatz inokuliert wurden. Schließlich wurden die Zellen mit 1,5 ml Methylcellulose-Medium überschichtet und für 72 h inkubiert. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die komplette 12 well Platte in 4 % Formalin (in PBS) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C eingelegt. Die Platten wurden unter einem chemischen Abzug getrocknet und der Zellrasen mit Kristallviolett-Gebrauchslösung für 30 min bei RT gefärbt. Nach Abnahme des Farbstoffs wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen, getrocknet und die Auswertung des Assays durch Zählen der Plaques durchgeführt.

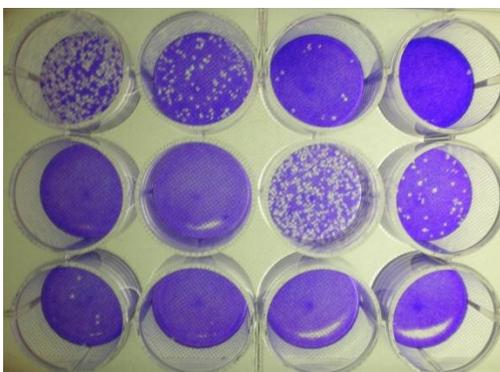


Abbildung 11: 12 well Platte eines Plaque-Assays. Von links oben beginnend sind in den folgenden nach rechts folgenden Näpfen die Verdünnungen (1:20, 1:400, 1:8000, 1:160000, 1:3200000, 1:64000000) pipettiert worden. Mit dem dritten Napf von links (mittlere Reihe) beginnend wurde der zweite Ansatz der Verdünnungsreihe pipettiert. Entsprechend der Verdünnungen nehmen die Anzahl der Plaques von links nach rechts ab.

Dazu wurden die Plaques der beiden letzten Nöpfe ausgezählt, in dem Plaques noch gut auszählbar waren (z.B. im dritten Napf von links, oberste Reihe, **Abb. 11**). Die Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten (plaque forming units, PFU) oder der viralen Titer pro ml wurden dann wie folgt berechnet:

$$\text{PFU/ml} = \text{mittlere Plaque-Anzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 2,5 \text{ (1 ml/400 } \mu\text{l)}$$

3 % Methylcellulose	18 g Methylcellulose in 600 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Methylcellulose-Medium	33 % (v/v) 3 % Methylcellulose (1% Methylcellulose) in Medium + FCS + HEPES
Kristallviolett-Stammlösung	2 % (w/v) Kristallviolett 10 % (v/v) 37 % Formaldehyd 20 % (v/v) Ethanol in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Kristallviolett-Gebrauchslösung	10 % (v/v) Kristallviolett-Stammlösung 10 % (v/v) 37 % Formaldehyd in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

### 2.2.6.3 Infektion von Zellen mit SARS-CoV

Für alle Infektionsversuche wurden 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit geschlossenem Deckel verwendet. 700 000 VeroE6 Zellen wurden pro Flasche ausgesät und für 24 h im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Die Zellen einer Flasche wurden wie unter Kultivierung von Säugetierzellen (**2.2.5.2**) beschrieben trypsinisiert und in 5 ml Medium resuspendiert. Mit einem Aliquot wurde die Gesamtzellzahl einer Flasche ermittelt und mit folgender Formel die in die Infektion einzusetzenden Volumina an Virusüberstand pro Flasche unter gegebener MOI berechnet:

$$V \text{ (}\mu\text{l)} = (\text{MOI} \times \text{Gesamtzellzahl einer Flasche}) / \text{Titer des Überstands} \times 1000$$

Während ein Aliquot des viralen Überstandes bei 37 °C im Inkubator auftaute, wurde das Medium der Zellen gewechselt. Bei n Zellkulturflaschen wurde das n-fache, berechnete Volumen des Überstandes mit n-fachen ml von Medium ohne FCS und gegebenenfalls mit einer Behandlungssubstanz verdünnt und die Zellen für 15-60 min mit dem SARS-CoV bei 37 °C inokuliert. Wenn nicht anders angegeben, wurde das Inokulum verworfen, in 100 % Inzidin inaktiviert und den Zellen 3 ml Medium mit FCS und gegebenenfalls Substanz zugegeben. Nach angegebenen Zeiträumen (8-24 h) wurden die viralen Überstände abgenommen und zur Entfernung toter Zellen oder Zelldebris für 5 min bei RT und 1000

rpm (Sigma 4K15) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann zu 1 ml in vorbeschriftete Cryotubes aliquotiert und bei -80 °C weggefroren. Zur Bestimmung der viralen Titer (**2.2.6.2**) wurde jeweils 1 Aliquot aus dem - 80 °C Schrank entnommen und aufgetaut.

#### 2.2.6.4 Internalisierungsassay

Wie unter **2.2.6.3** beschrieben, wurden VeroE6 Zellen nach gegebener Vorbehandlung mit SARS-CoV für 15 min bei 37 °C infiziert (MOI=2). Das Inokulum wurde verworfen und die Zellen 2 mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach einer 10 minütigen Inkubation der Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA zur Ablösung von gebundenem aber nicht internalisiertem Virus auf Eis wurden die Zellen zum Abstoppen der Trypsinierung mit 5 ml Medium und FCS von der Flasche gelöst und homogenisiert. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 4°C und 1000 rpm (Sigma 4K1) zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Medium mit FCS resuspendiert. Durch 3-maliges Aufziehen der Zellsuspension mit einer Spritze durch eine 19 mm Injektionsnadel wurden die Zellen aufgebrochen. Die entstandene Suspension wurde dann direkt zur Erstellung einer Verdünnungsreihe für den Plaque-Assay (**2.2.6.2**) zur Bestimmung der viralen Titer verwendet. Dabei wurde die Suspension unverdünnt oder in 5 weiteren Verdünnungen in einem 1:10 Verhältnis verwendet (unverduennt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000).

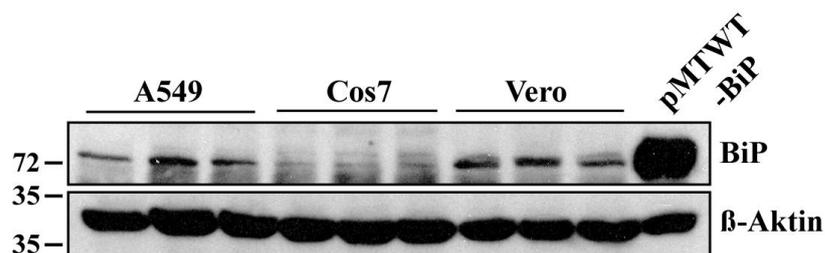
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 BESTÄTIGUNG DER 7A-BiP INTERAKTION IN SÄUGETIERZELLEN

In einer vorrangegangenen Diplomarbeit wurde mittels Yeast Two Hybrid Screen, der unter Verwendung einer cDNA-Bibliothek aus COS-7 Zellen (Nierenzellen der grünen Meerkatze, *Cercopithecus aethiops*) durchgeführt wurde, das Protein „BiP“ oder „Grp78“ als möglicher Interaktor des akzessorischen 7a-Proteins des SARS-CoV in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) identifiziert. Nach erfolgter Bestätigung der Interaktion in Hefezellen sollte die Interaktion der beiden Proteine in Säugetierzellen mittels Co-Immunopräzipitation (Co-IP) bestätigt werden.

##### 3.1.1 UNTERSUCHUNG DER BiP-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN SÄUGETIERZELLINIEN

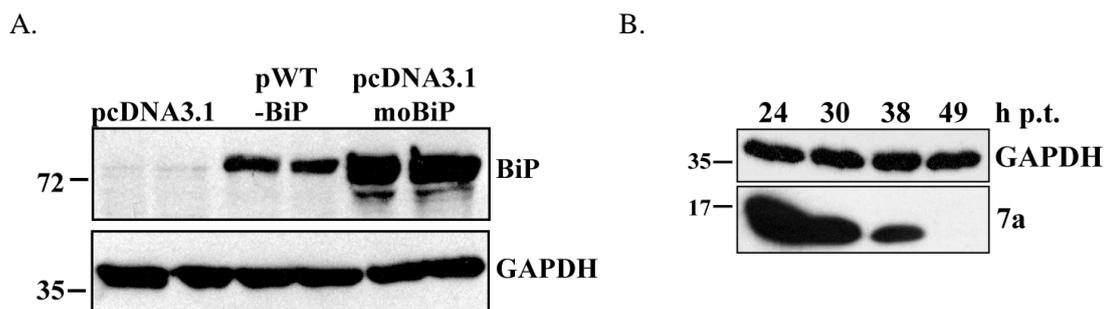
Zur erfolgreichen Durchführung einer Co-IP ist es unerlässlich, dass potentiell miteinander interagierende Proteine in ausreichender Menge in der Zelle exprimiert sind. In einem Vorversuch wurde daher die endogene Expression von BiP/Grp78 in verschiedenen relevanten Säugetierzelllinien untersucht. A549, COS-7 und VeroE6 wurden 24 h nach Aussaat lysiert, gleiche Proteinmengen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von BiP im Immunoblot analysiert. Als Positivkontrolle wurden VeroE6 mit pMTWT-BiP transfiziert. Die endogene BiP-Expression war in allen drei Zelllinien im Vergleich zur exogenen Expression des Hamster-BiP (pMTWT-BiP) sehr niedrig (**Abb. 12**). Da VeroE6 Zellen ebenfalls Nierenzellen der grünen Meerkatze und die gängige Produktionszelllinie für das SARS-CoV sind und ein vergleichbares endogenes BiP-Level wie COS-7 Zellen hatten, wurden für alle weiteren Versuche VeroE6 Zellen verwendet. Angesichts der insgesamt zu niedrigen endogenen BiP-Expression musste nichtsdestotrotz ein Konstrukt zur Überexpression von BiP in VeroE6 kloniert werden.



**Abbildung 12:** Endogene BiP-Expression in verschiedenen Säugetierzellen. A549, Cos-7, untransfizierte oder mit pMTWT-BiP transfizierte VeroE6 Zellen (Positivkontrolle) wurden 24 h nach Aussaat bzw. Transfektion lysiert. Nach Analyse der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem BiP-Antikörper im Immunoblot analysiert. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis des β-Aktin Proteins.

### 3.1.2 KLONIERUNG EINES BiP-EXPRESSIONSKONSTRUKTES UND BESTÄTIGUNG DER EXPRESSION IN VEROE6 ZELLEN

Zur Überexpression eines BiP aus der grünen Meerkatze in VeroE6 Zellen, wurde im Folgenden das pcDNA3.1-moBiP Konstrukt kloniert (mo=monkey). Dazu wurde aus COS-7 Zellen die totale RNA isoliert und unter Verwendung einer willkürlich zusammengestellten Oligonukleotidmischung („random primer“) die RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wurde als Matrize zur Amplifikation der spezifischen BiP-Gensequenz mittels PCR eingesetzt. Das PCR Produkt wurde in den Leervektor pcDNA3.1 kloniert und die Richtigkeit der BiP-Sequenz durch Sequenzierung überprüft. Um die Expression des BiP<sup>mo</sup> zu bestätigen, wurden VeroE6 Zellen mit dem Leervektor pcDNA3.1, mit pMTWT-BiP (Positivkontrolle) und dem neuklonierten pcDNA3.1-moBiP transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und gleiche Mengen an präzipitiertem Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die BiP-Expression im Immunoblot analysiert. Wie erhofft führte die Transfektion des klonierten pcDNA3.1-moBiP Konstruktes zur starken Überexpression des BiP<sup>mo</sup> in VeroE6 Zellen (**Abb. 13 A.**).

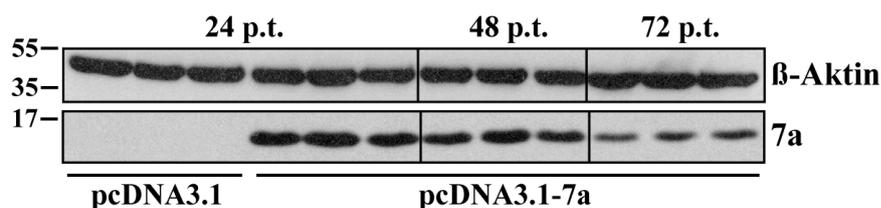


**Abbildung 13:** A.) Exogene BiP-Expression. VeroE6 Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit pcDNA3.1, pMTWT-BiP oder pcDNA3.1-moBiP lysiert. B.) Expression des 7a-HA Proteins. VeroE6 Zellen wurden zu angezeigten Zeitpunkten nach der Transfektion mit pcDNA3.1-7aHA lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinnengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem BiP bzw. HA-Antikörper im Immunoblot analysiert. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis des GAPDH Proteins.

### 3.1.3 BESTÄTIGUNG DER 7A-BiP INTERAKTION MITTELS CO-IMMUNOPRÄZIPITATION

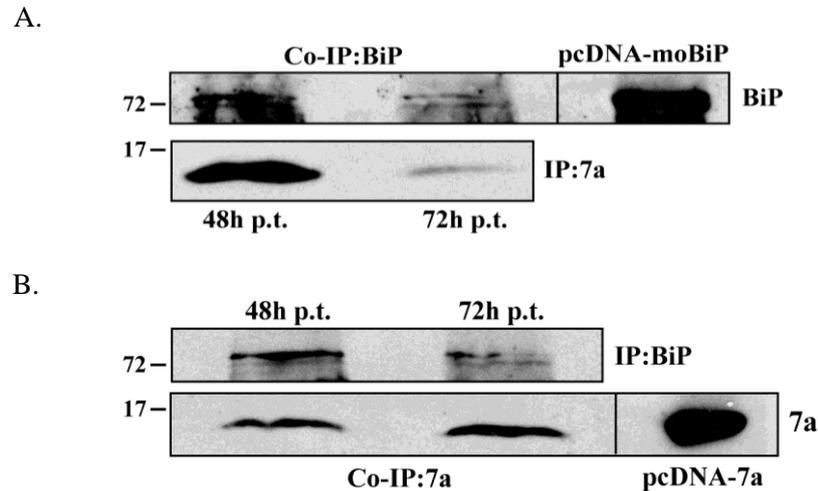
Um eine Co-Immunopräzipitation durchführen zu können, muss neben dem überexprimierten BiP<sup>mo</sup> auch das virale 7a-Protein ausreichend exprimiert sein. Da Versuche der Antikörperproduktion gegen das native 7a-Protein in vorherigen Arbeiten (Claudia Diemer) bisher leider gescheitert waren, wurde zur Expression und zum Nachweis des Proteins das pcDNA3.1-7aHA Plasmid (Claudia Diemer) verwendet. An die Gensequenz des ORF7a war hier die Sequenz eines Hämagglutinin (HA)-Restes angefügt worden um ein Fusionsprotein von 7a und HA exprimieren (getaggetes 7a) und unter Verwendung eines HA-Antikörpers im Immunoblot nachweisen zu können. Zum Nachweis der 7a-HA-Expression wurden VeroE6 Zellen mit pcDNA3.1-7aHA transfiziert und zu verschiedenen

Zeitpunkten nach der Transfektion lysiert. Die folgende Immunoblot-Analyse machte deutlich, dass die Expression des 7a-HA-Proteins nur in den ersten 24 h nach der Transfektion gesichert war, aber zu späteren Zeitpunkten stark abnahm (**Abb. 13 B.**). Da die Expression des 7a-HA-Proteins über den Zeitverlauf nicht sehr stabil und damit nicht optimal für weitergehende Experimente war, verliefen initiale Co-IP Studien zur Bestätigung der 7a-BiP Interaktion wenig erfolgreich. Durch Bereitstellung eines Antikörpers gegen das native 7a-Protein durch Professor Yee Joh Tan (Departement of Microbiology, National University of Singapur) sollte die Präzipitation und der Nachweis des nativen 7a-Proteins ermöglicht werden. Zur Bestätigung der Funktionalität des Antikörpers wurden VeroE6 Zellen mit dem Leervektor pcDNA3.1 oder dem pcDNA3.1-7a Konstrukt (Claudia Diemer), das nur für das native 7a-Protein codiert, transfiziert. An drei nachfolgenden Tagen wurden transfizierte Zellen lysiert, präzipitiertes Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von 7a im Immunoblot untersucht. Wie aus **Abb. 14** ersichtlich, war die Expression des 7a-Proteins an den ersten beiden Tagen nach der Transfektion zufriedenstellend und die spezifische Erkennung des nativen 7a-Proteins durch den Antikörper gewährleistet. Im weiteren Verlauf konnte daher von der Verwendung des 7a-HA Konstruktes und des Nachweises des Fusionsproteins 7a-HA abgesehen werden.



**Abbildung 14: Expression des 7a-Proteins.** VeroE6 Zellen wurden zu angezeigten Zeitpunkten nach der Transfektion mit pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-7a lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem BiP bzw. HA-Antikörper im Immunoblot analysiert. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis des  $\beta$ -Aktin Proteins.

Unter gegebenen Voraussetzungen konnten jetzt erneut Co-IP Studien durchgeführt werden. Dazu wurden VeroE6 Zellen mit pcDNA3.1-moBiP und pcDNA3.1-7a co-transfiziert und nach 72 h eine Co-IP durchgeführt. Die unspezifische Bindung der Antikörper oder der Proteine an die Sepharose konnte durch Kontrollversuche ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Tatsächlich konnte durch Verwendung spezifischer Antikörper sowohl BiP mit 7a als auch das 7a-Protein mit BiP co-immunopräzipitiert werden (**Abb. 15**). Durch Dehybridisierung der Antikörper („Strippen“) von der Membran und erneuter Inkubation mit den zur Immunopräzipitation (IP) verwendeten Antikörpern, konnte die zuvor erfolgte IP ebenfalls bestätigt werden (**Abb. 15**).



**Abbildung 15: Co-Immunopräzipitation von 7a und BiP.** A.) VeroE6 Zellen wurden mit pcDNA3.1-7a und pcDNA3.1-moBiP transfiziert und nach 48 h lysiert. Aus dem Lysat wurde mit dem 7a-Antikörper das 7a-Protein immunopräzipitiert (IP, unterer Teil) und Immunpräzipitate mit einem BiP-Antikörper im Immunoblot analysiert (Co-IP, oberer Teil). Zur Kontrolle der richtigen Laufhöhe wurde das Lysat von pcDNA3.1-moBiP transfizierten VeroE6 Zellen geladen (oberer Teil, rechts). B.) Wie A.) IP mit BiP-Antikörper (oberer Teil), Analyse im Immunoblot mit 7a-Antikörper (Co-IP, unterer Teil). Zur Kontrolle der richtigen Laufhöhe wurde das Lysat von pcDNA3.1-7a transfizierten VeroE6 Zellen geladen (unterer Teil, rechts).

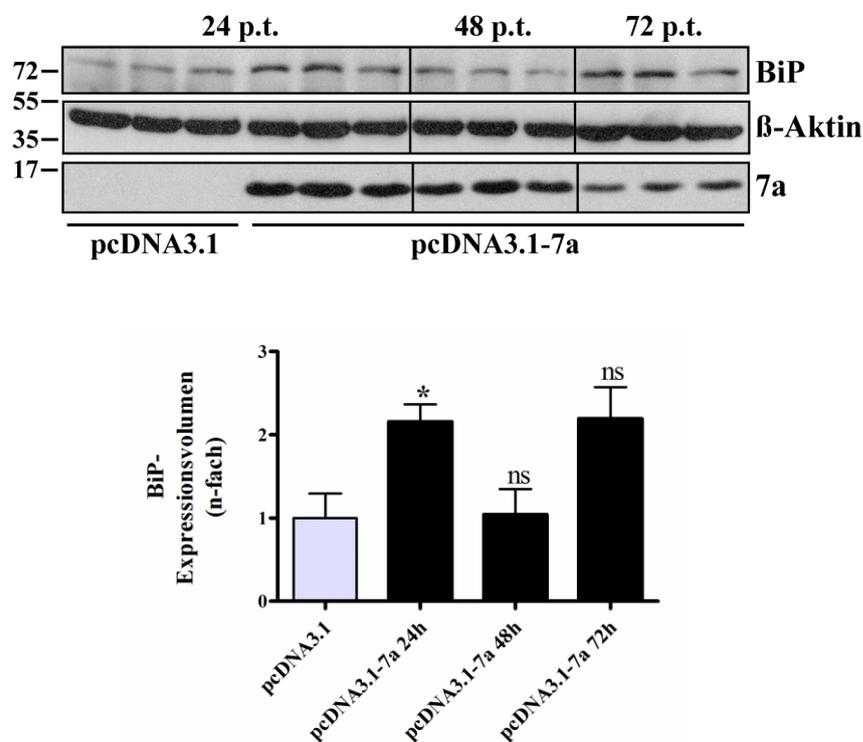
Nach Sicherstellung der ausreichenden Expression der beiden potentiell miteinander interagierenden Proteine 7a und BiP<sup>mo</sup> durch transiente Transfektion eines neuklonierten pcDNA3.1-moBiP Plasmids und des pcDNA3.1-7a Konstruktes und der Verwendung spezifischer Antikörper konnte per Co-Immunopräzipitationsstudien eine Interaktion des akzessorischen 7a-Proteins des SARS-CoV mit BiP in Säugetierzellen bestätigt werden.

### 3.2 CHARAKTERISIERUNG DER 7A-BiP INTERAKTION

Da die zunächst in Hefen beobachtete Interaktion des akzessorischen, viralen 7a-Proteins mit dem Chaperon BiP auch in Säugetierzellen bestätigt werden konnte, sollte nun die Charakterisierung dieser Interaktion erfolgen. Neben seinen Aufgaben als wichtigster Faltungshelfer im Lumen des ER, spielt BiP oder Grp78 zugleich bei ER-Stress-assoziierten Vorgängen wie der „unfolded protein response“ (UPR) eine übergeordnete Rolle. Infolge dessen wird die Bindung von BiP mit den Effektoren IRE1, ATF6 und PERK gelöst und ermöglicht so deren Aktivierung und die Initialisierung der UPR. Da die Prozesse während dieser Zellantwort zur Wiederherstellung der ER-Funktionalität an vielerlei Stationen sowohl negative als auch positive Auswirkung auf ein replizierendes Virus haben könnten, ist eine Beeinflussung der Signalwege durch ein virales Protein denkbar und auch für einige Viren bereits beschrieben (Tahara *et al.*, 1994; Montero *et al.*, 2008; Garrido *et al.*, 2009; Xuan *et al.*, 2009). Aus diesem Grund konzentrieren sich die folgenden Experimente auf die Untersuchung einer möglichen Einflussnahme des 7a-Proteins auf ER-Stress oder Signalwege der UPR.

### 3.2.1 UNTERSUCHUNG DER BiP-EXPRESSIONSMENGE IN 7A EXPRIMIERENDEN-VEROE6 ZELLEN

Wie in Vorversuchen zur Co-Immunopräzipitation gezeigt, wird unter normalen Bedingungen Grp78/BiP in der Zelle nicht sehr hoch exprimiert. Tritt jedoch ER-Stress auf, kommt es infolge der UPR zur Induktion der BiP-Expression. Zur Klärung ob die Expression des 7a-Proteins möglicherweise zu Veränderungen der BiP-Expressionsmenge führt, wurden VeroE6 Zellen mit pcDNA3.1 (mock) oder mit pcDNA3.1-7a transfiziert und nach 24, 48 und 72 h lysiert. Lysate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die BiP-Expression im Immunoblot untersucht. Bei Expression des 7a-Proteins kam es zu keiner bzw. lediglich nach 24 h zur leichten, aber signifikanten Erhöhung des BiP-Expressionslevels (**Abb. 16**). In weiterführenden Versuchen sollte daher eine mögliche ER-Stress auslösende Wirkung des 7a-Proteins geklärt werden.



**Abbildung 16: BiP-Expressionsmenge in 7a-exprimierenden VeroE6 Zellen.** VeroE6 Zellen wurden mit pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-7a transfiziert und zu angegebenen Zeitpunkten lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem BiP bzw. 7a-Antikörper im Immunoblot analysiert. Nach densitometrischer Analyse unter Abgleich der Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin erfolgte die statistische Auswertung mit dem *paired t-test* (rechts). Das mittlere Expressionsvolumen unter mock-Bedingungen wurde gleich 1 gesetzt und Volumina anderer Bedingungen in n-facher Relation dazu dargestellt. (*p*-Werte: \* =  $p \leq 0,05$ ; ns = nicht signifikant).

### 3.2.2 UNTERSUCHUNG DER AKTIVIERUNG VON ER-STRESS ABHÄNGIGEN ELEMENTEN DURCH DAS 7A-PROTEIN

Die UPR ist eine komplexe Abfolge verschiedener, miteinander verknüpfter Reaktionen, die in der Zelle zur Wiederherstellung der Funktionalität und der Faltungskapazität des ER führen sollen. Unabhängig von jeweiligen Mediatoren kommt es in dessen Verlauf zur Aktivierung sogenannter ER-Stress abhängiger Elemente (ER-stress response elements; ERSE). Mediatoren wie XBP1 binden an die promotorähnlichen Sequenzen im Nukleus und aktivieren so die Expression einer Vielzahl von UPR und ER-Stress abhängigen Proteinen. Mit Hilfe eines Luciferase-Reportergen-Assays sollte untersucht werden, ob die Expression des 7a-Proteins zur Aktivierung dieser ERSE-Elemente und folglich zu ER-Stress oder zur Auslösung des UPR führt. Dazu wurde der pGL3-3xERSE-Luc Vektor (Margit Miesbauer), dessen Luciferasegen ein ERSE-Element in dreifacher Ausführung vorgeschaltet ist, und der pGL3-Ren-Luc Vektor als Transfektionskontrolle verwendet. Zur Durchführung des Assays wurden VeroE6 mit pcDNA3.1, pGL3-RenLuc und pGL3-3xERSE-Luc (mock) oder mit pcDNA3.1-7a, pGL3-RenLuc und pGL3-3xERSE-Luc transfiziert. Nach Lyse der Zellen 24 h und 48 h nach der Transfektion wurde durch Zugabe der jeweiligen Luciferase-Substrate die Aktivität der beiden Enzyme bestimmt. Zur Dokumentation einer sicheren Aktivierung der ERSE-Elemente wurden mock-transfizierte Zellen mit dem ER-Stress Induktor Tunicamycin behandelt. Die Tunicamycin-Behandlung führte zu einem 2,25 (24 h) bzw. 6,5 (48 h) fachen Anstieg der Luciferase-Aktivität und somit zur Bestätigung der Funktionalität des Assays. Bei Expression des 7a-Proteins in VeroE6 Zellen kam es sowohl 24 h (1,75 fach) als auch nach 48 h zur schwachen, aber dennoch signifikanten Induktion der Luciferase-Expression (**Abb. 17**).

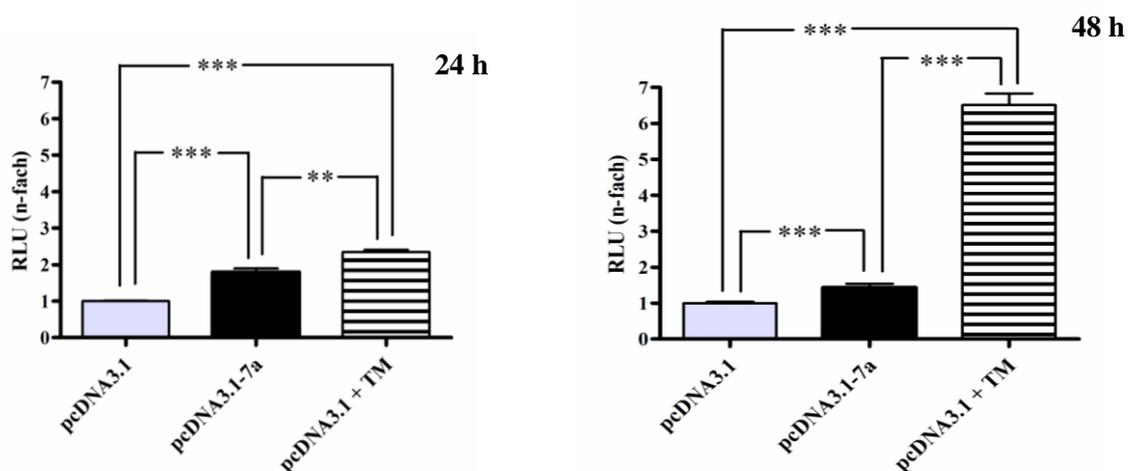
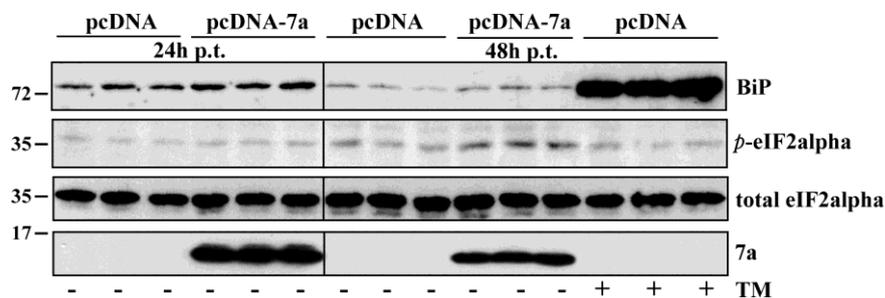


Abbildung 17: Aktivierung von ERSE-Elementen durch 7a. Vero Zellen wurden mit pcDNA3.1, pGL3-RenLuc und pGL3-3xERSE-Luc (mock) oder mit pcDNA3.1-7a, pGL3-RenLuc und pGL3-3xERSE-Luc transfiziert. Als Positivkontrolle wurden mock-transfizierte Zellen für 16 h mit 5  $\mu$ M Tunicamycin (TM) behandelt. Nach 24 h und 48 h wurden die Zellen lysiert und mittels Luciferase-Reportergen-Assay die Aktivierung von ERSE-Elementen bestimmt. *Firefly*-Luciferaseaktivitäten wurden an die *Renilla*-Luciferaseaktivität der gleichen Probe angeglichen (n = 14, n = 7 bei TM), die mittlere Aktivität unter mock-Bedingungen gleich 1 gesetzt und alle *Firefly*-Luciferaseaktivitäten in Relation dazu dargestellt. Es erfolgte eine statistische Auswertung mittels *paired t-test* (rechts). (p-Werte: \*\* = p  $\leq$  0,005, \*\*\* = p  $\leq$  0,0005).

### 3.2.3 UNTERSUCHUNG DES PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS VON EIF2ALPHA IN 7a-EXPRIMIERENDEN ZELLEN

Kommt es in der Zelle zur Störung der ER-Homöostase in dessen Folge fehl- oder ungefaltete Proteine akkumulieren, werden durch die Dissoziation von dem Faltungshelfer BiP die verschiedenen Mediatoren der UPR frei. Auch die membranständige Kinase PERK wird frei, kann dimerisieren und durch Autoaktivierung den Elongationsinitiationsfaktor eIF2alpha phosphorylieren. Um die mögliche Aktivierung von PERK bei Expression von 7a zu untersuchen wurden VeroE6 Zellen mit pcDNA3.1 (mock) und dem pcDNA3.1-7a transfiziert und die Zellen nach 24 und 48 h lysiert. Zur Induktion von ER-Stress als Positivkontrolle im Immunoblot wurden mock-transfizierte Zellen mit Tunicamycin behandelt. Lysate gleicher Proteinmengen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und der Phosphorylierungsstatus von eIF2alpha im Vergleich zur Expression des totalen eIF2alpha im Immunoblot analysiert. Zusätzlich wurde die Expression des BiP-Niveaus unter gegebenen Bedingungen erneut dokumentiert. Wie bereits gezeigt, führte die 7a-Expression zu keiner Veränderung der BiP-Expressionsmenge, die Behandlung mit Tunicamycin führte jedoch wie erwartet zur massiven Induktion der BiP-Expression. Der Phosphorylierungsstatus des eIF2alpha blieb bei Überexpression des 7a-Proteins 24 h nach der Transfektion im Vergleich zu mock-transfizierten Zellen unverändert (**Abb. 18**). Trotz einer schwächeren 7a-Expression kam es 48 h nach Transfektion zu einem marginalen Anstieg des Phosphorylierungsgrades des eIF2alpha. Durch die Behandlung mit Tunicamycin kam es zu keinem Anstieg der eIF2alpha Phosphorylierung. Da, wie durch die Induktion der BiP-Expression bestätigt, die Behandlung effektiv ER-Stress ausgelöst haben muss, ist davon auszugehen, dass Tunicamycin als Positivkontrolle für die eIF2alpha Phosphorylierung ungeeignet ist. Bei Reproduktionsversuchen unter Verwendung von DTT, einem anderen ER-Stress Induktor als Positivkontrolle, konnte aber der Anstieg der eIF2alpha-Phosphorylierung und damit die Funktionalität des Assays gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).



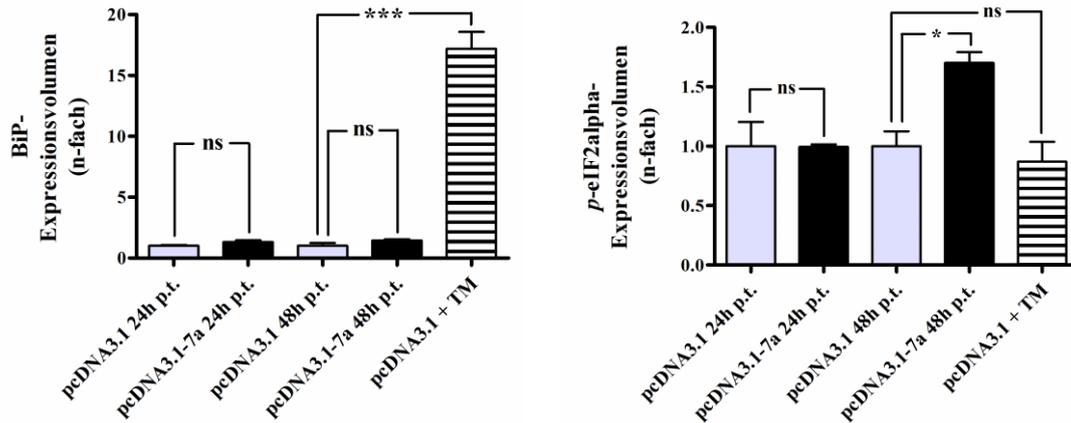


Abbildung 18: Phosphorylierung des eIF2alpha und BiP-Expression in 7a exprimierenden VeroE6. (A.) Vero Zellen wurden mit pcDNA3.1 (mock) oder mit pcDNA3.1-7a transfiziert und nach 24 h und 48 h lysiert. Als Positivkontrolle wurden mock-transfizierte Zellen für 16 h mit 5 µM Tunicamycin (TM) behandelt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem p-eIF2alpha, total eIF2alpha, 7a und BiP-AK im Immunoblot analysiert. Nach densitometrischer Analyse unter Abgleich der Ladungskontrolle des totalen eIF2alpha erfolgte die statistische Auswertung mit dem *paired t-test* (rechts). Das mittlere Expressionsvolumen unter mock-Bedingungen wurde gleich 1 gesetzt und Volumina anderer Bedingungen in n-facher Relation dazu dargestellt. (*p*-Werte: \* =  $p \leq 0,05$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0005$ , ns = nicht signifikant). (B.) Expressionsvolumen BiP (C.) Expressionsvolumen p-eIF2alpha

### 3.2.4 UNTERSUCHUNG DES SPLICINGS DES XBP1 IN 7A-EXPRIMIERENDEN ZELLEN

Ein weiterer Mediator des UPR der durch Dissoziation von BiP unter ER-Stress frei wird, ist die Kinase IRE1 (inositol requiring enzyme 1), die in ihrer so aktivierten Form ein Splicing der prä-mRNA des XBP1 bewirkt. Die um 26 Nucleotide verkürzte mRNA kann jetzt in den Transkriptionsfaktor XBP1 translatiert werden, der sowohl die Expression seines eigenen Gens, als auch die weiterer UPR-Proteine aktiviert. Durch Nachweis der gespligten Form der XBP1-mRNA sollte eine mögliche Aktivierung des IRE1 durch die 7a-Expression untersucht werden. Dazu wurde aus mock oder pcDNA3.1-7a transfizierten VeroE6 Zellen 24 und 48 h nach der Transfektion die totale RNA isoliert. Zur Kontrolle der effektiven Auslösung des XBP1-Splittings wurden mock-transfizierte Zellen mit DTT oder Tunicamycin behandelt. Die RNA wurde unter Verwendung einer willkürlich zusammengestellten Oligonukleotidmischung („random primer“ des SuperScript™ III First-Strand Synthesis System Kits) in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription) und diese als Matrize zur Amplifikation eines spezifischen XBP1-Fragments in die PCR eingesetzt. Dabei wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass es zur Amplifikation eines 266 bp-langen Fragments des XBP1 kam, der den Bereich der möglichen 26-bp Deletion abdeckt (Schema siehe **Abb. 19**). Amplifikate wurden in einer folgenden DNA-Agarosegelelektrophorese analysiert.

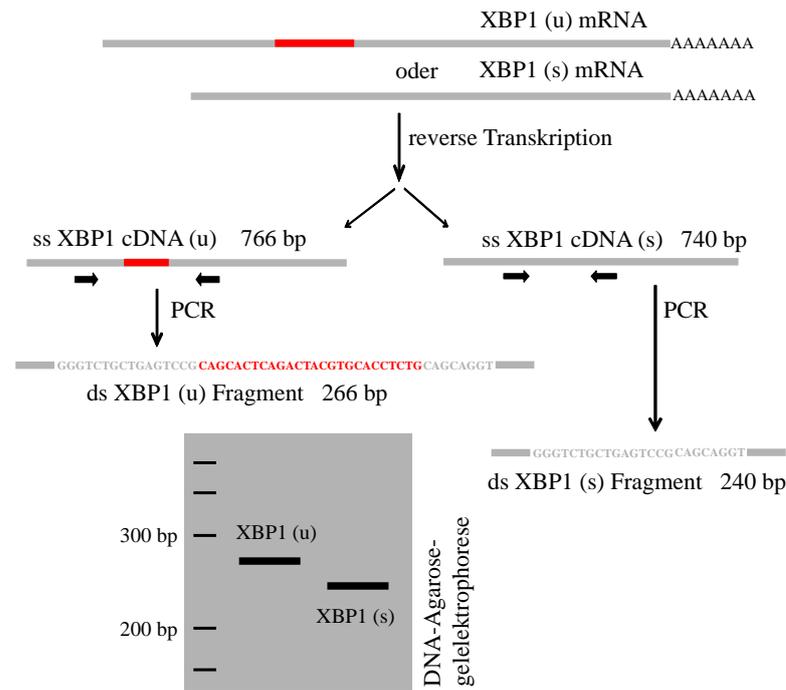


Abbildung 19: Schema zur Durchführung des Nachweises des XBP1-Splicing

Wie angenommen kam es bei Durchführung des Experiments nicht zu den deutlichen Ergebnissen wie im Schema aufgezeigt. Bei Transfektion mit dem Leervektor alleine (pcDNA3.1) war neben der ungespliced Variante des XBP1 (XBP1(u)) auch die schwache Bande des XBP1(s)-Fragments detektierbar. Bei Tunicamycin oder DTT Behandlung war demzufolge neben der starken Bande des gespliced XBP1 Fragments auch die schwache Bande des ungespliced XBP1(u)-Fragmentes sichtbar. Das Verhältnis der beiden Splicingvarianten zueinander war jedoch aussagekräftig und entspricht den gegebenen Bedingungen – die Funktionalität des Assays war somit gesichert. Im Vergleich zum Signalmuster mock-transfizierter VeroE6, konnte sowohl 24 h als auch 48 h nach der Transfektion von 7a kein Unterschied oder keine Anreicherung der gespliced XBP1-Variante verzeichnet werden (Abb. 20). Die Expression des 7a-Proteins in VeroE6 Zellen scheint somit zu keinem der beiden Zeitpunkte zu einem, ein Grundlevel übersteigendes, Splicing des XBP1 zu führen.

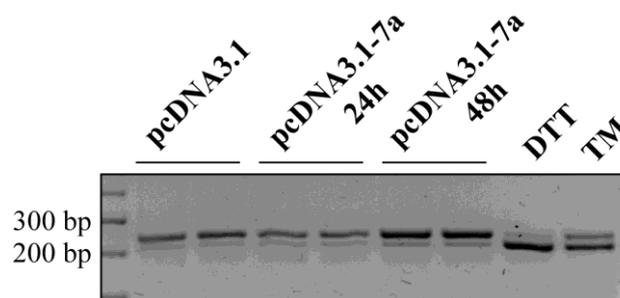


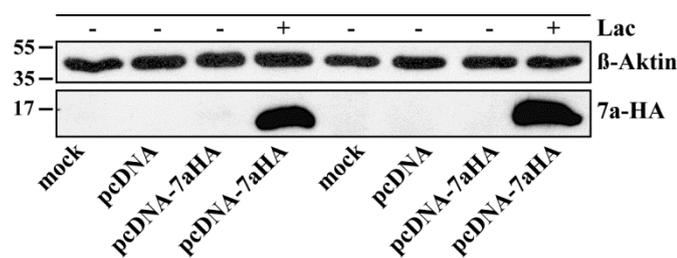
Abbildung 20: XBP1-Splicing in 7a exprimierenden VeroE6 Zellen. VeroE6 Zellen wurden mit pcDNA3.1 (mock) oder pcDNA3.1-7a transfiziert und nach 24 bzw. 48 h lysiert. Als Positivkontrolle wurden mock-transfizierte VeroE6 mit 20 mM DTT für 2 h oder mit 5 µM Tunicamycin (TM) über Nacht behandelt. Aus Lysaten wurde die totale RNA

isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR wurde ein spezifisches XBP1-Fragment amplifiziert und PCR Produkte in einem 3% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Obwohl die 7a-Expression in VeroE6 Zellen eine leichte Induktion von ER-Stress Elementen zur Folge hat, sind die Effekte auf die Induktion der BiP-Expression oder auf den Phosphorylierungsstatus von eIF2alpha nur schwach oder zeitlich inkonsistent. Eine Veränderung des Verhältnisses der ungesplittenen XBP1-Variante zur gesplittenen Variante durch die Expression des viralen Proteins konnte außerdem zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden. In Anbetracht der Daten scheint die Expression des viralen, akzessorischen 7a-Proteins nicht zur Auslösung von ER-Stress oder von UPR-Signalwegen zu führen. Weiterführende Experimente zur Untersuchung der Einflussnahme des 7a-Proteins auf die zelluläre Stressantwort „UPR“ oder auf die Auslösung von ER-Stress wurden daher eingestellt. Die folgenden Experimente befassen sich mit der allgemeineren Charakterisierung des 7a-Proteins und im Besonderen mit dem Lebenszyklus des Proteins in der Zelle.

### 3.3 CHARAKTERISIERUNG DES 7A-PROTEINS

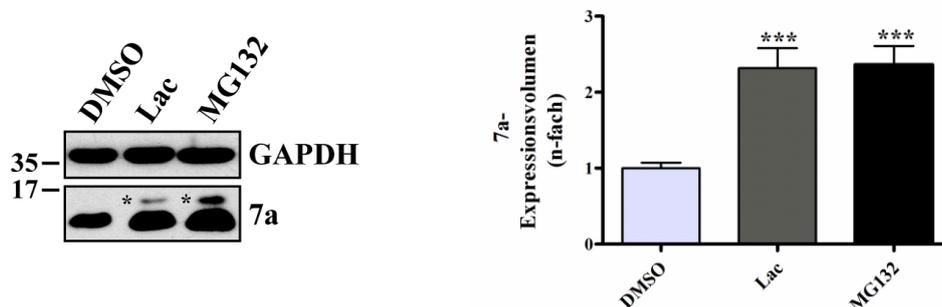
In initialen Expressionsanalysen des 7a-HA-Fusionsproteins unter Verwendung des pcDNA3.1-7aHA waren oftmals Schwierigkeiten aufgetreten das Fusionsprotein mit einem HA-Antikörper nachzuweisen. Bei Durchführung eines folgenden Experimentes trat dann ein unerwarteter, aber klärender Befund auf. Um eine mögliche Veränderung der 7a-HA-Expressionsmenge unter ER-Stress Bedingungen zu untersuchen, waren VeroE6 Zellen untransfiziert belassen oder mit pcDNA3.1 (mock) oder pcDNA3.1-7a-HA transfiziert worden. Die Zellen waren vor der Lyse mit Lactacystin behandelt worden um durch Akkumulation von proteasomal abzubauenden Proteinen im ER, ER-Stress auszulösen. Lysate gleicher Proteinmengen waren per SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression des 7a-HA im Immunoblot analysiert worden. Während 48 h nach der Transfektion das 7a-HA-Protein mit einem HA-Antikörper nicht mehr nachweisbar gewesen war, war es durch die proteasomale Hemmung zur massiven Stabilisierung des Fusionsproteins gekommen (**Abb. 21**). Wie bereits vermutet, kommt es offensichtlich durch proteasomale Aktivität zur frühzeitigen Abspaltung des HA-Restes von dem viralen Protein. Weitere Studien sollten daher klären, ob durch die Inhibition des Proteasoms lediglich die Abspaltung des HA-Restes verhindert wird oder ob das native 7a-Protein möglicherweise proteasomal abgebaut wird.



**Abbildung 21: Stabilisierung des 7a-HA-Fusionsproteins durch proteasomale Hemmung.** VeroE6 Zellen wurden untransfiziert belassen oder mit pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-7a-HA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Zur Hemmung des Proteasoms wurden die Zellen vor der Lyse für 16 h mit 10 µM Lactacystin behandelt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem HA-AK im Immunoblot analysiert. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis des β-Aktin Proteins.

### 3.3.1 STABILISIERUNG DES NATIVEN 7A-PROTEINS DURCH PROTEASOMALE HEMMUNG

Zur Feststellung ob das 7a-Protein durch die Hemmung der proteasomalen Degradierung ebenfalls stabilisiert werden kann, wurden VeroE6 Zellen mit pcDNA3.1-7a transfiziert und 48 h nach der Transfektion lysiert. Zur Hemmung des Proteasoms wurden 7a-exprimierende Zellen mit den Inhibitoren Lactacystin (Lac) und MG-132 behandelt. Lysate gleicher Gesamtproteinmengen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von 7a im Immunoblot analysiert. Tatsächlich führt die Inhibition der proteasomalen Aktivität auch zur Stabilisierung des nativen 7a-Proteins. Dabei konnte eine 2-fache Anreicherung des 7a-Proteins (15 kDa) als auch die Inhibition der Abspaltung des ER-Signalpeptids verzeichnet werden, da die unprozessierte Form des 7a-Proteins (17,5 kDa) ebenfalls nachgewiesen werden konnte. Beide proteasomale Inhibitoren zeigten vergleichbare Effekte (**Abb. 22**).



**Abbildung 22: Stabilisierung des 7a durch proteasomale Hemmung in VeroE6 Zellen.** VeroE6 Zellen wurden mit pcDNA3.1-7a transfiziert und 48 h nach der Transfektion lysiert. Zur Hemmung des Proteasoms wurden die Zellen vor der Lyse für 16 h mit DMSO (mock), 10 µM Lactacystin (Lac) oder 5 µM MG-132 behandelt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem 7a-AK im Immunoblot analysiert. Nach der densitometrischen Analyse unter Abgleich der Ladungskontrolle GAPDH erfolgte die statistische Auswertung mit dem *paired t-test* (rechts). Das mittlere Expressionsvolumen unter mock-Bedingungen wurde gleich 1 gesetzt und Volumina anderer Bedingungen in n-facher Relation dazu dargestellt. (*p*-Werte: \*\*\* =  $p \leq 0,0005$ ;  $n=3$ ).

Zur Bestätigung, dass es sich bei der Stabilisierung von 7a durch die proteasomale Inhibition nicht um einen zelltypspezifischen Effekt handelt, wurde der Versuch wie oben beschrieben in Caco-2 Zellen wiederholt. Auch hier führte die Hemmung der proteasomalen Aktivität durch MG-132 zu einer Erhöhung der 7a-Expression um das 2,5-fache (**Abb. 23**). Aufgrund der gezeigten Beobachtungen in VeroE6 und Caco-2 Zellen kann davon ausgegangen werden, dass 7a zelltypunspezifisch proteasomal abgebaut wird.

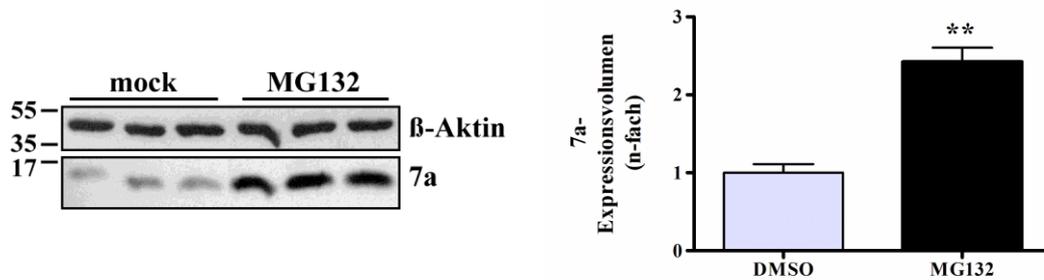
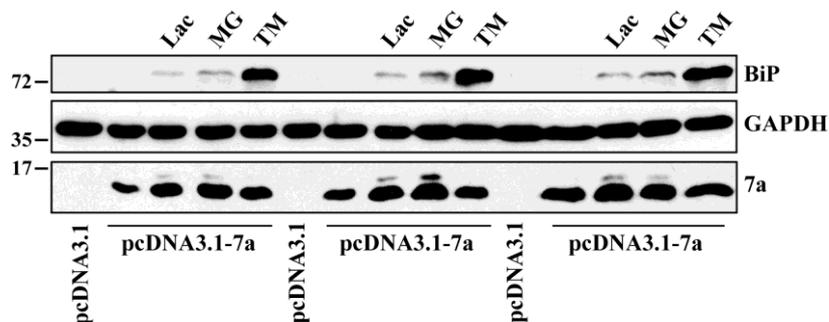


Abbildung 23: Stabilisierung des 7a durch proteasomale Hemmung in Caco-2 Zellen. Caco-2 Zellen wurden mit pcDNA3.1-7a transfiziert und 48 h nach der Transfektion lysiert. Zur Hemmung des Proteasoms wurden die Zellen vor der Lyse für 16 h mit DMSO (mock) oder 5 µM MG-132 behandelt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem 7a-AK im Immunoblot analysiert. Nach der densitometrischen Analyse unter Abgleich der Ladungskontrolle β-Aktin erfolgte die statistische Auswertung mit dem *paired t-test* (rechts). Das mittlere Expressionsvolumen unter mock-Bedingungen wurde gleich 1 gesetzt und Volumina anderer Bedingungen in n-facher Relation dazu dargestellt. (*p*-Werte: \*\* = *p* ≤ 0,005).

### 3.3.2 UNTERSUCHUNG DER 7A-EXPRESSIONSMENGE BEI ER-STRESS

Da die Hemmung des Proteasoms oder des ER-abhängigen Degradierungsweges ERAD auch zu ER-Stress führen kann, sollte in einem folgenden Versuch ausgeschlossen werden, dass die 7a-Stabilisierung möglicherweise einer Veränderung der ER-Homöostase durch ER-Stress zu Grunde liegt. Dazu wurden VeroE6 Zellen mit pcDNA3.1-7a transfiziert und nach 48 h lysiert. Vor der Lyse wurden die Zellen zur Hemmung des Proteasoms mit Lactacystin und MG-132 und zur Induktion von ER-Stress mit Tunicamycin behandelt. Lysate gleicher Proteinmengen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die 7a-Expression im Immunoblot analysiert. Wie erwartet kam es durch die proteasomalen Inhibitoren zur Stabilisierung des 7a-Proteins. Die Induktion von ER-Stress, die durch die Erhöhung der BiP-Expression gezeigt ist, hatte jedoch keinen signifikant stabilisierenden Effekt auf die 7a-Expression (Abb. 24). Wenngleich es auch durch die proteasomalen Inhibitoren zu einer marginalen Induktion der BiP-Expression gekommen ist, MG-132 und Lactacystin aber deutlich stärkere Effekte auf die Proteinstabilisierung hatten als der hoch effektive BiP-Induktor Tunicamycin, konnte folglich ausgeschlossen werden dass die Stabilisierung von 7a durch eine Induktion von ER-Stress vermittelt wird.



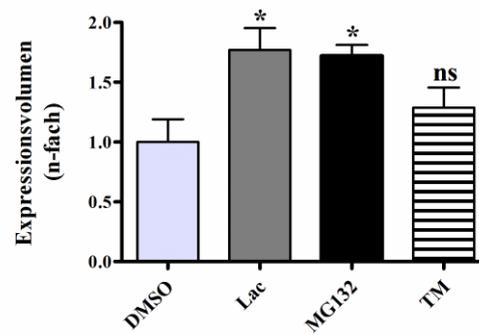
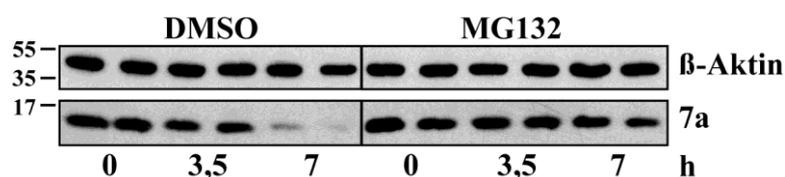


Abbildung 24: 7a-Expression bei Hemmung des Proteasoms und ER-Stress (A.) Vero Zellen wurden mit pcDNA3.1 oder mit pcDNA3.1-7a transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Zellen wurden für 16 h mit DMSO, 10 µM Lactacystin (Lac), 5 µM MG-132 oder 5 µM Tunicamycin (TM) behandelt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem 7a und BiP-AK im Western Blot analysiert. Nach densitometrischer Analyse unter Abgleich der Ladungskontrolle GAPDH erfolgte die statistische Auswertung mit dem *paired t-test* (rechts). Das mittlere Expressionsvolumen bei DMSO-Behandlung wurde gleich 1 gesetzt und Volumina anderer Bedingungen in n-facher Relation dazu dargestellt. (*p*-Werte: \* = *p* ≤ 0,05, \*\* = *p* ≤ 0,005, ns = nicht signifikant). Expressionsvolumen 7a (B.)

### 3.3.3 BESTIMMUNG DER HALBWERTSZEIT DES 7A-PROTEINS

Zur weiteren Untersuchung des stabilisierenden Effektes der proteasomalen Inhibition auf das 7a-Protein wurde dessen Halbwertszeit unter Behandlung mit DMSO (mock) und proteasomaler Hemmung mit MG-132 bestimmt. Dazu wurden VeroE6 Zellen für 16 h mit pcDNA3.1-7a transfiziert. Nach einer Vorbehandlung der Zellen für 1 h mit DMSO oder MG-132 wurde ein Teil der Zellen lysiert und zu den verbleibenden Zellen der Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) zugegeben, der eine weitere 7a-Expression verhindern sollte. Nach weiteren 3,5 und 7 h wurden nochmals Zellen lysiert. Anschließend wurden Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die 7a-Expression im Immunoblot analysiert. Wie erwartet konnten zum Zeitpunkt 0 h bei beiden Behandlungen vergleichbare Mengen an 7a-Protein detektiert werden. Während unter DMSO-Behandlung die 7a-Proteinmenge stetig abnahm und zum Zeitpunkt 7,5 h das Protein kaum mehr nachzuweisen war, blieb die Proteinmenge bei Hemmung des Proteasoms über den gesamten Zeitverlauf relativ konstant (**Abb. 25**). Nach Auswertung zweier unabhängiger Versuche wurde die Halbwertszeit des Proteins auf etwa 4 h festgesetzt. Da es bei MG-132 in dem Zeitrahmen zu keiner Reduktion der 7a-Proteinmenge um 50 % gekommen ist, konnte die Halbwertszeit hier nur annähernd kalkuliert werden und lag etwa bei 18-21 h. Ungeachtet dessen ist dennoch deutlich, dass es durch die proteasomale Hemmung zu einer massiven Verlängerung der Halbwertszeit des 7a-Proteins kommt.



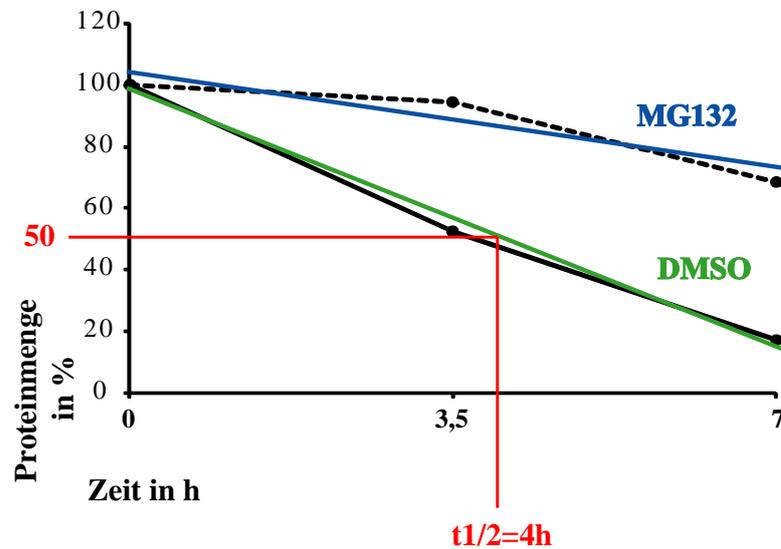


Abbildung 25: Halbwertszeitbestimmung des 7a-Proteins. VeroE6 Zellen wurden mit pcDNA3.1-7a transfiziert. 16 h nach der Transfektion wurden Zellen mit DMSO oder 5  $\mu$ M MG-132 1h vorbehandelt, dann gleiche Zellzahlen lysiert (0 h) oder zusätzlich mit 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid (CHX) behandelt. Nach weiteren 3,5 h und 7 h wurden erneut gleiche Zellzahlen lysiert. 10  $\mu$ l Lysat jeder Bedingung wurde mittels SDS-PAGE augetrennt und mit einem 7a-AK ein Immunoblot durchgeführt. Nach densitometrischer Analyse unter Abgleich mit der Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin erfolgte die Auswertung. Dabei wurde die mittlere Proteinmenge zum Zeitpunkt 0 jeder Behandlung gleich 100 % gesetzt, entsprechend kalkulierte Proteinmengen über die Zeit in einem Diagramm dargestellt und so die Halbwertszeit ermittelt.

### 3.3.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR UBIQUITINYLIERUNG DES 7A-PROTEINS

Proteine die für die proteasomale Degradierung vorgesehen sind, werden über das ER ins Zytoplasma retrotransloziert, hier kovalent durch Ubiquitin-Ligasen mit Polyubiquitin modifiziert und so für den Abbau durch das Proteasom markiert. Der Abbau polyubiquitinylierter Proteine erfolgt dabei so rasch, dass die mögliche Ubiquitinylierung eines Proteins im Immunoblot kaum nachweisbar ist. Bei Hemmung der proteasomalen Degradierung sollte es jedoch zur Anreicherung von Ubiquitin-modifizierten Proteinen kommen. Zum Nachweis der Polyubiquitinylierung des 7a-Proteins wurden VeroE6 Zellen mit pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-7a transfiziert und zur Hemmung des Proteasoms mit DMSO (mock) oder MG-132 behandelt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und das 7a-Protein aus dem Lysat immunopräzipitiert. Die Präzipitate wurden anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die erfolgte Präzipitierung und mögliche Ubiquitinylierung des 7a-Proteins mittels Immunoblot untersucht. Bei mock-Behandlung konnte das 7a-Protein erfolgreich immunopräzipitiert werden, im Ubiquitin-Blot hingegen konnten nur die leichten und schweren Antikörperketten des IP-Antikörpers durch den Sekundärantikörper detektiert werden. Da bei Transfektion mit dem Leervektor ebenfalls keine Ubiquitinleiter detektiert wurde, ist die unspezifische Bindung verwendeter Antikörper auszuschließen. Bei Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor war jedoch eine charakteristische Ubiquitinleiter detektierbar, es ist also davon auszugehen, dass das 7a-Protein vor der proteasomalen Degradierung kovalent mit Ubiquitin modifiziert wird (Abb. 26).

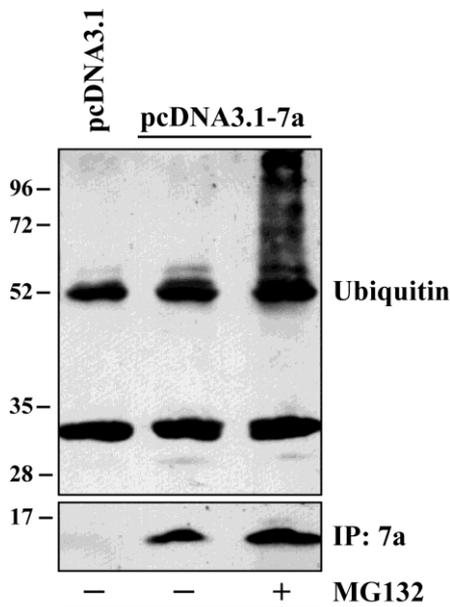


Abbildung 26: Ubiquitinylierung des 7a-Proteins. VeroE6 Zellen wurden mit pcDNA3.1 oder pcDNA3.1-7a transfiziert und 48 h nach der Transfektion gleiche Zellzahlen lysiert. Vor der Lyse wurden Zellen für 16 h mit DMSO oder 5 μM MG-132 behandelt. Aus dem Lysat wurde das 7a-Protein mit einem 7a-Antikörper immunopräzipitiert und Präzipitate per SDS-PAGE und unter Verwendung des gleichen 7a-AK (IP-Kontrolle) oder eines Ubiquitin-Antikörpers im Immunoblot analysiert.

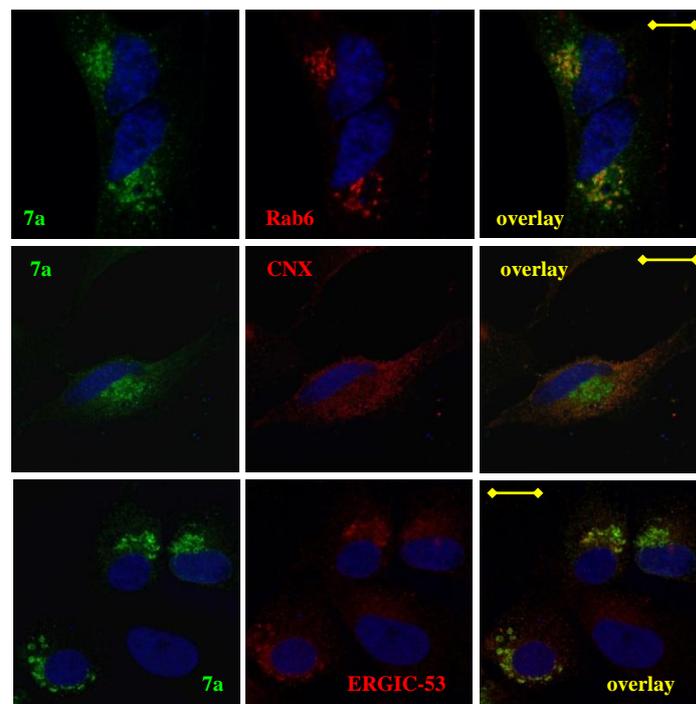
### 3.3.5 CHARAKTERISIERUNG DER 7A-LOKALISIERUNG IN DER ZELLE

Das akessorische 7a-Protein besitzt am N-Terminus ein Signalpeptid zur Translokation ins ER und ist ein Transmembranprotein des Typs I. Es liegt mit seiner Transmembrandomäne am C-Terminus in einer Membran eingelagert vor, der N-terminale Teil befindet sich luminal. Neben dem Signalpeptid besitzt es außerdem eine C-terminale Konsensussequenz (KRKTE), die den Rücktransport des Proteins ins ER vermittelt, eine ER-Lokalisierung des Proteins ist damit sehr wahrscheinlich. Wenngleich es Anhaltspunkte für eine tatsächliche ER-Lokalisierung des Proteins gibt (Fielding *et al.*, 2004; Fielding *et al.*, 2006), wurde in einigen Studien jedoch die Co-Lokalisierung des Proteins mit verschiedenen Golgi-Markern gezeigt (Nelson *et al.*, 2005; Kopecky-Bromberg *et al.*, 2006). Aufgrund dieser unterschiedlichen Beobachtungen sollte mittels Immunfluoreszenzanalysen die Lokalisierung des 7a-Proteins nochmals untersucht werden.

#### 3.3.5.1 Lokalisierung des 7a-Proteins bei transientser Expression

Da eine 7a-Lokalisierung in verschiedenen Kompartimenten gezeigt wurde, ist es denkbar, dass das 7a-Protein seine Lokalisierung im Verlauf seines Lebenszyklus ändert. Die Untersuchung möglicher Lokalisierungsveränderungen gestaltete sich im Rahmen einer transienter Transfektion jedoch schwierig, da es durch Expression des pcDNA3.1-7a Plasmids zur stetigen Neubildung und Einschleusung des Proteins in dessen Lebenszyklus kommt. Folgende Immunfluoreszenzanalysen wurden daher unter Zuhilfenahme von Cycloheximid (CHX) durchgeführt, ein Translationsinhibitor, der eine weitere Expression des 7a-Proteins verhindern sollte. Zur Untersuchung der intrazellulären

Lokalisierung des 7a-Proteins wurden Vero Zellen nach Aussaat auf Glasplättchen mit pcDNA3.1-7a transfiziert. 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen erstmalig fixiert (0 h) oder die Translation durch Behandlung mit CHX gestoppt. Weitere 3 h und 6 h nach Beginn der Behandlung wurden nochmals Zellen fixiert. Das 7a-Protein, der cis-Golgi-Apparat, das ER, das ERGIC (Rab6, Calnexin, ERGIC-53) und der Nukleus wurden in Immunfluoreszenzanalysen angefärbt und deren Co-Lokalisierung mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.



**Abbildung 27:** Lokalisierung des 7a-Proteins zum Zeitpunkt 0 h. VeroE6 wurden mit pcDNA3.1-7a transfiziert und nach 16 h fixiert. Zur Färbung des 7a-Proteins wurde ein 7a-AK und sekundärer Cy2-Antikörper verwendet. Zur Anfärbung der angegebenen Organellen wurde ein Rab-6, Calnexin (CNX) oder ERGIC-53-Antikörper und ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper und zur Anfärbung des Nukleus das Hoechst-Reagenz (blau) verwendet. Die Auswertung der Immunfluoreszenzanalysen wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop durchgeführt und in repräsentativen Bildern dargestellt. Der Overlay indiziert eine mögliche Co-Lokalisierung der angefärbten Proteine. Der Längenstandard gibt 20  $\mu\text{m}$  an.

Zu allen drei Zeitpunkten lokalisierte das 7a-Protein in vesikulären, perinukleären Strukturen, die relativ lokal an einer Seite des Nukleus zu finden waren. Die Ähnlichkeit mit dem zisternenartigen, an einer Seite des Kerns lokalisierten Golgi-Apparat und eine Co-Lokalisierung des 7a-Proteins mit dem *cis*-Golgi Marker Rab6 war augenscheinlich. Eine partielle Co-Lokalisierung mit dem ERGIC Marker ERGIC-53, vor allem zu späteren Zeitpunkten, konnte desweiteren gezeigt werden, jedoch keine Co-Lokalisierung mit dem ER-Marker Calnexin (CNX) (**Abb. 27**). Veränderungen des Färbungsmusters im Zeitverlauf waren nicht erkennbar, zu späteren Zeitpunkten konnte lediglich eine Ausbreitung der 7a-Färbung in die Zellperipherie und eine stärkere Co-Lokalisierung mit ERGIC-53 beobachtet werden (**Abb. 28+29**). Da sowohl ERGIC-53 als auch Rab6 mit dem vesikulären Transport vom ER zum Golgi-Apparat assoziierbar sind und beide mit 7a co-lokalisieren, ist anzunehmen, dass sich 7a hauptsächlich im *cis*-Golgi-Netzwerk oder in Vesikeln des ERGIC befindet.

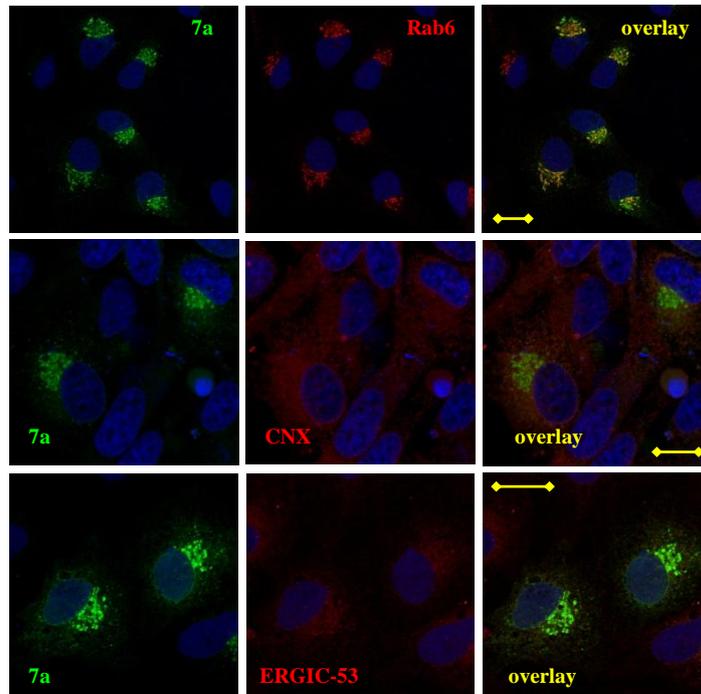


Abbildung 28: Lokalisierung des 7a-Proteins zum Zeitpunkt 3 h. VeroE6 wurden mit pcDNA3.1-7a transfiziert und nach 16 h fixiert. Zur Färbung des 7a-Proteins wurde ein 7a-AK und sekundärer Cy2-Antikörper verwendet. Zur Anfärbung der angegebenen Organelle wurde ein Rab-6, Calnexin (CNX) oder ERGIC-53-Antikörper und ein Cy3-konjugierter Sekundärantikörper und zur Anfärbung des Nukleus das Hoechst-Reagenz (blau) verwendet. Die Auswertung der Immunfluoreszenzanalysen wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop durchgeführt und in repräsentativen Bildern dargestellt. Der Overlay indiziert eine mögliche Co-Lokalisierung der angefärbten Proteine. Der Längensstandard gibt 20  $\mu$ m an.

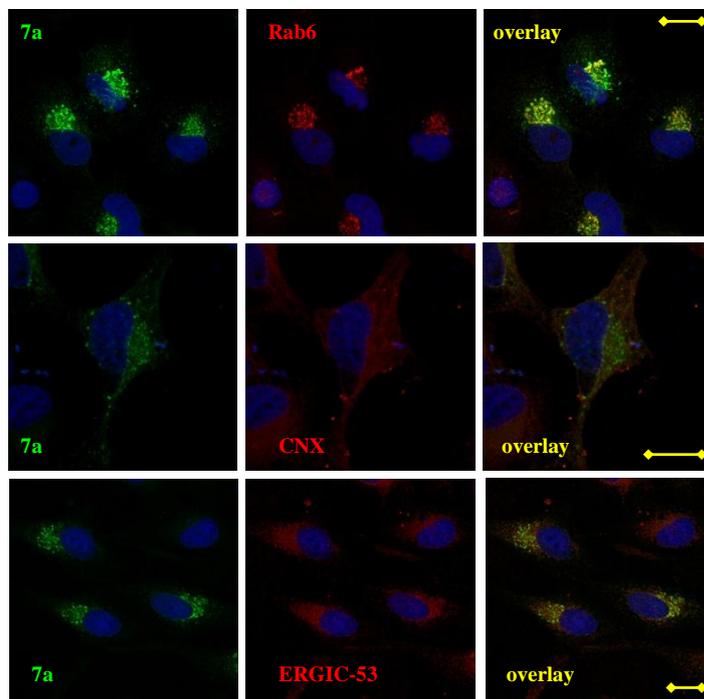
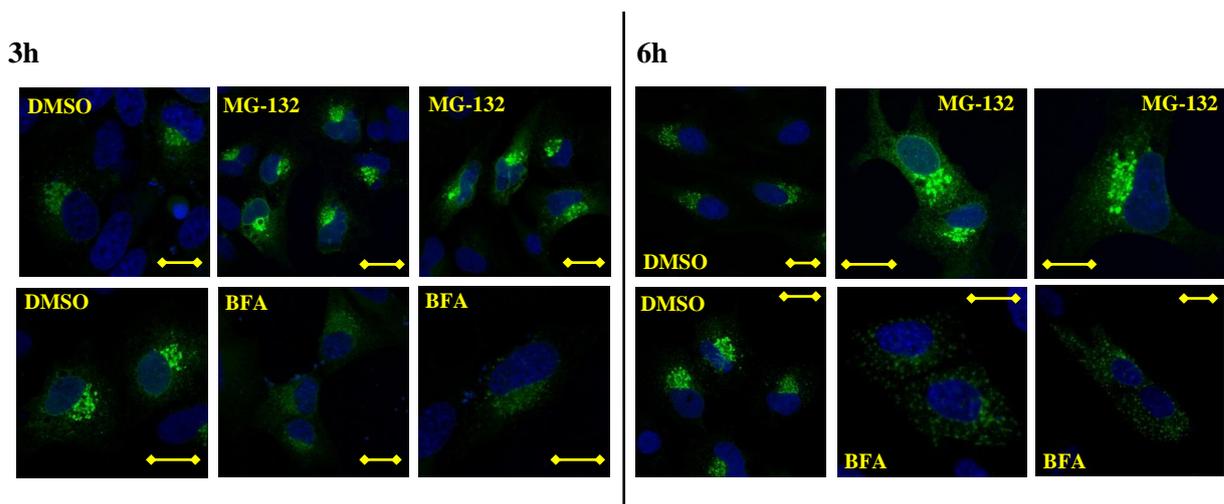


Abbildung 29: Lokalisierung des 7a-Proteins zum Zeitpunkt 6 h. VeroE6 wurden mit pcDNA3.1-7a transfiziert, nach 16 h mit 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid behandelt und nach 3 h fixiert. Die Färbung und Auswertung erfolgte wie unter Abb. 27 beschrieben. Der Längensstandard gibt 20  $\mu$ m an.

Zur Untersuchung der Stabilisierung oder möglichen Lokalisierungsveränderung durch Hemmung des Proteasoms wurde der oben beschriebene Versuch wiederholt und VeroE6 Zellen beginnend mit 1 h vor der CHX-Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 behandelt. Da in initialen Lokalisierungsstudien die Golgi- bzw. ERGIC-Lokalisierung von 7a gezeigt werden konnte, sollte außerdem untersucht werden, ob die Inhibition des ER-Golgi-Transports durch Brefeldin A einen Einfluss auf das 7a-Expressionsmuster hat. Dazu wurden die Zellen mit Brefeldin A (BFA) behandelt. Da sich das Expressionmuster zum Zeitpunkt 0 oder 1 h nach MG-132-, bzw. BFA-Behandlungsbeginn nicht von dem in DMSO behandelten Zellen unterscheidet (Daten nicht gezeigt), sind in **Abb. 30** nur Aufnahmen der Zeitpunkte 3 h und 6 h gezeigt.

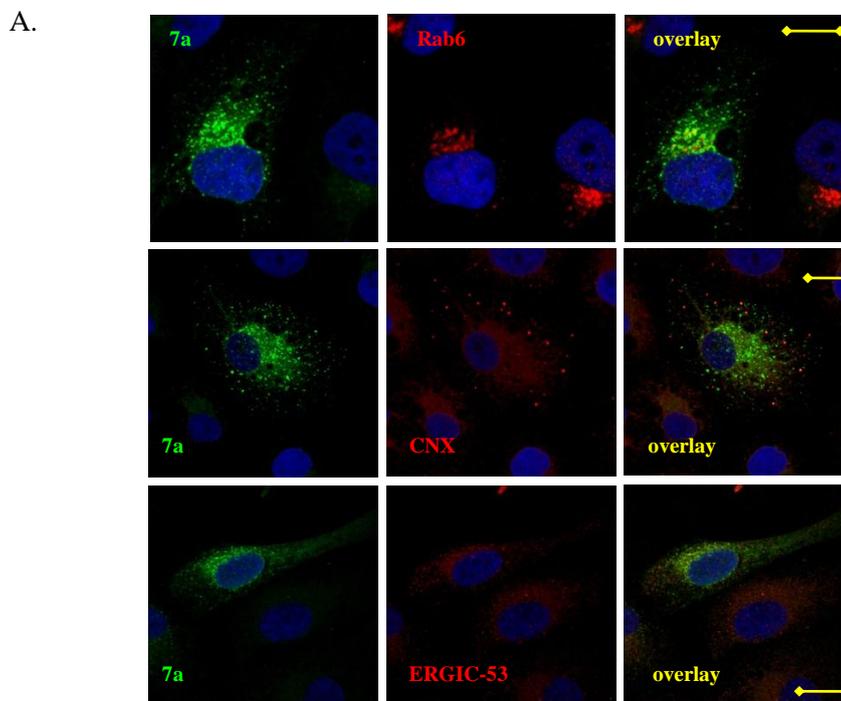
Wie erwartet führte die Behandlung mit MG-132 auch in der Immunfluoreszenz zu einer Stabilisierung des 7a-Signals, da trotz Zugabe des Translationsinhibitors CHX die Expression des Proteins über 6 h stabil blieb, während sie unter DMSO-Behandlung leicht abnahm. Unerwarteterweise kam es jedoch nicht zur deutlichen Verlagerung des 7a-Signals ins Zytoplasma. 7a sollte zur Ubiquitinylierung ins Zytoplasma translozieren und sich dort durch die Inhibition des Proteasoms anreichern, es kam jedoch zur teilweisen Anreicherung des Proteins in netzartigen, ER-ähnlichen Strukturen (**Abb. 30**). Bei Behandlung mit Brefeldin A waren kaum 7a-positive Zellen aufzufinden bzw. die Färbung war sehr schwach. Die Aufnahmen zeigen, dass es zu einer Abschwächung des 7a-Signals durch BFA im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen kam. Zu späteren Zeitpunkten waren nur noch wenige, teils vereinzelte Vesikel mit dem 7a-Protein anfärbbar. Die Behandlung mit Brefeldin A scheint somit eine erhebliche Destabilisierung des 7a-Proteins zur Folge zu haben.



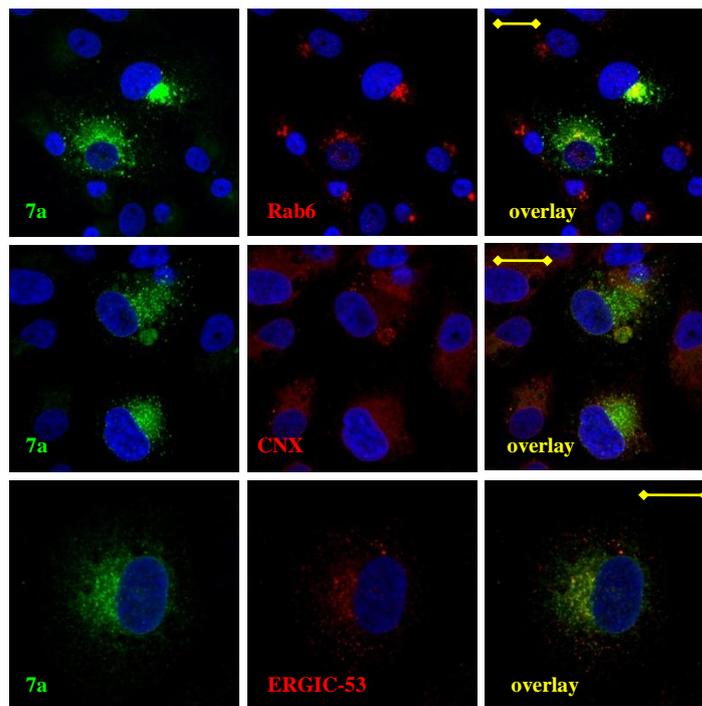
**Abbildung 30:** 7a-Expression bei MG-132 und BFA-Behandlung. VeroE6 wurden mit pcDNA3.1-7a transfiziert und nach 16 h mit DMSO, 5  $\mu$ M MG-132 oder 10  $\mu$ M BFA behandelt. Nach 1 h erfolgte die Zugabe von 50  $\mu$ g/ml CHX. Nach 3 bzw. 6 h wurden Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Zur Färbung des 7a-Proteins wurde ein 7a-AK und sekundärer Cy2-Antikörper und zur Anfärbung des Nukleus das Hoechst-Reagenz (blau) verwendet. Die Auswertung der Immunfluoreszenzanalysen wurde mit einem konfokalen Laser-scanning-Mikroskop durchgeführt und durch repräsentative Bilder dargestellt. Der Längenstandard gibt 20  $\mu$ m an.

### 3.3.5.2 Lokalisierung des 7a-Proteins während der SARS-CoV Infektion

Um in transient transfizierten Zellen gemachte Beobachtungen auch im Kontext der viralen Infektion zu verifizieren, wurde die Lokalisierung des 7a-Proteins mittels Immunfluoreszenz auch in SARS-CoV infizierten Zellen untersucht. Dazu wurden VeroE6 Zellen auf Glasplättchen ausgesät und mit dem SARS-CoV infiziert (MOI = 0,1). Beginnend mit 4 h nach der Inokulation und nach jeder weiteren Stunde wurden infizierte Zellen fixiert und die 7a-Lokalisierung mittels Immunfluoreszenzanalysen studiert. Erst 5-6 h nach der Infektion konnte erstmals die Expression des 7a-Proteins verlässlich nachgewiesen werden. Aufgrund allgemein zu schwacher 7a-Proteinexpression sind im Folgenden nur Analysen von 7, 8 und 9 h nach der Inokulation gezeigt (**Abb. 31**). Interessanterweise unterschied sich das Expressionsmuster des 7a-Proteins in infizierten Zellen von dem in transfizierten Zellen. Hier kam es nicht zur lokalen, an einer Seite des Kerns befindlichen Golgi-ähnlichen Färbung, das viruscodierte 7a-Protein lokalisierte mehr in vesikulären Strukturen, die um den ganzen Kern verteilt und teilweise auch in der Peripherie der Zelle zu finden waren. Obwohl eine Co-Lokalisierung einzelner Foci mit dem Golgi-Marker zu beobachten war, co-lokalisierte 7a während der Infektion hauptsächlich mit ERGIC-53 und dem ER-Marker CNX. Charakteristisch für infizierte Zellen war ein mehr diffuses, vesikuläres Expressionsmuster des 7a mit größerer Ausbreitung und einer spezifischen, kreisförmigen Färbung um den Nukleus. Während wie in transfizierten Zellen keine großen Lokalisierungsveränderungen im Zeitverlauf vermerkt werden konnten, so war doch eine Intensivierung des 7a-Signals zu beobachten.



B.



C.

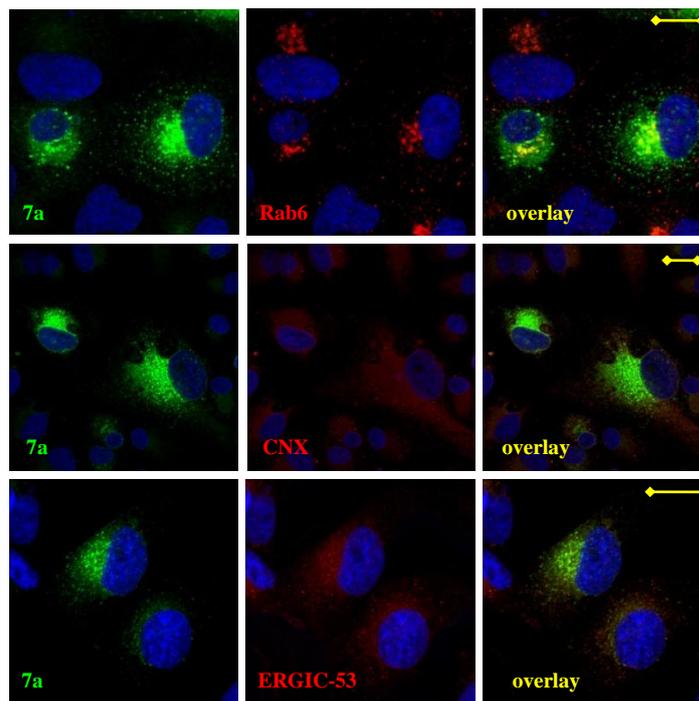
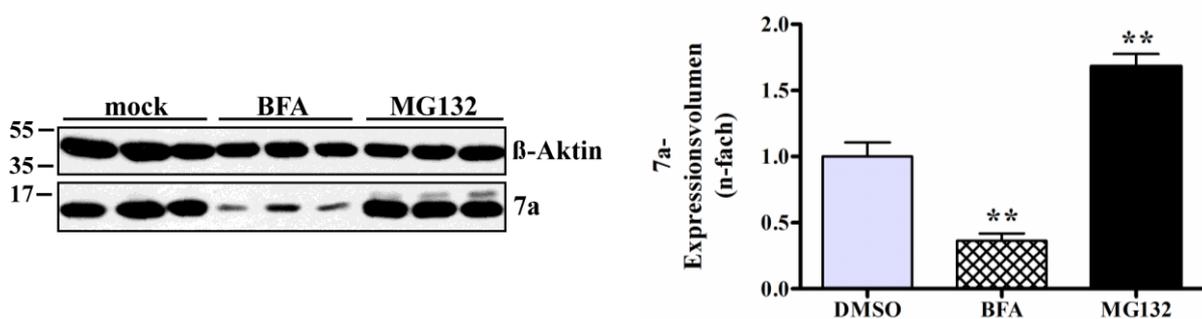


Abbildung 31: Lokalisierung des 7a-Proteins bei Infektion von VeroE6 mit SARS-CoV. VeroE6 wurden mit SARS-CoV infiziert (MOI=0,1) und 7 h (A.), 8 h (B.) und 9 h (C.) nach der Inokulation fixiert. Zur Färbung des 7a-Proteins wurde ein 7a-AK und sekundärer Cy2-AK verwendet. Zur Anfärbung der angegebenen Organelle wurde ein Rab-6, Calnexin (CNX) oder ERGIC-53-AK und der sekundäre Cy3-AK und zur Anfärbung des Nukleus das Hoechst-Reagenz (blau) verwendet. Die Auswertung der Immunfluoreszenzanalysen wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop durchgeführt und repräsentative Bildern dargestellt. Der Overlay indiziert eine mögliche Co-Lokalisierung der abgefärbten Proteine (rechts, gelb). Der Längenstandard gibt 20  $\mu$ m an.

Die durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen haben ergeben, dass in transfizierten Vero6 Zellen das 7a-Protein in sehr lokalen, perinukleären, vesikulären Strukturen anfärbbar war, die mit dem Golgi-Marker Rab6 und dem ERGIC-Marker ERGIC-53 co-lokalisieren. Infizierte Zellen zeigten ein anderes Expressionsmuster. Eine diffusere Ausbreitung der 7a-Färbung um den gesamten Kern und in der Zellperipherie war zu beobachten. Auffällig in infizierten Zellen war eine verstärkte Co-Lokalisierung mit dem ER-, und ERGIC-Marker. Immunfluoreszenzanalysen unter Zuhilfenahme von CHX bestätigten die Stabilisierung des Proteins durch proteasomale Hemmung und eine Destabilisierung des Proteins durch BFA in transient transfizierten Zellen. Anders als erwartet führte die Hemmung des Proteasoms nicht zur deutlichen Relokalisierung des Proteins ins Zytoplasma sondern zur Anreicherung in ER-ähnlichen Strukturen.

### 3.3.6 DESTABILISIERUNG DES 7A-PROTEINS DURCH HEMMUNG DES ER-GOLGI-TRANSPORTS

Wie in Immunfluoreszenzanalysen gezeigt, führt die Hemmung des ER-Golgi Transports und Induktion des retrograden Transports durch BFA zur Destabilisierung des 7a-Proteins. Zur Bestätigung dieser Beobachtung im Immunoblot wurden VeroE6 Zellen pcDNA3.1-7a transfiziert und nach 48 h lysiert. Zur Inhibition des ER-Golgi-Transports wurden die Zellen vor der Lyse für 16 h mit BFA behandelt, als Kontrolle der Stabilisierung durch Hemmung des Proteasoms wurden die Zellen ebenfalls mit MG-132 behandelt. Lysate gleicher Proteinmengen wurden anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt und die 7a-Expression im Immunoblot analysiert. Tatsächlich kommt es durch die BFA-Behandlung zur deutlichen Abnahme des 7a-Expressionsvolumens im Vergleich zur Mock-Behandlung (**Abb. 32**). Die Hemmung des ER-Golgi-Transports und Induktion des retrograden Transports durch BFA hat somit einen deutlich destabilisierenden Effekt auf die 7a-Expression.



**Abbildung 32:** Destabilisierung des 7a durch Behandlung mit BFA. VeroE6 Zellen wurden mit pcDNA3.1-7a transfiziert und 48 h nach der Transfektion lysiert. Vor der Lyse wurden die Zellen für 16 h mit DMSO (mock), 10  $\mu$ M Brefeldin (BFA) oder 5  $\mu$ M MG-132 behandelt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem 7a-AK im Immunoblot analysiert (links). Nach der densitometrischen Analyse unter Abgleich der Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin erfolgte die statistische Auswertung mit dem *paired t-test* (rechts). Das mittlere Expressionsvolumen unter mock-Bedingungen wurde gleich 1 gesetzt und Volumina anderer Bedingungen in n-facher Relation dazu dargestellt. ( $p$ -Werte: \*\* =  $p \leq 0,005$ ).

In den Versuchen zur Charakterisierung des 7a-Proteins konnten neue Aussagen bezüglich der Lokalisierung und des generellen Lebenszyklus des 7a-Proteins getroffen werden. Durch Verwendung proteasomaler Inhibitoren kommt es zur starken, zelltypunabhängigen Stabilisierung des nativen 7a-Proteins. Der Nachweis der verstärkten Ubiquitylierung und die deutlich verlängerte Halbwertszeit des Proteins konnten bestätigen, dass 7a durch die proteasomale Aktivität degradiert wird. Experimente unter Auslösung von ER-Stress konnten zudem zeigen, dass die ER-Homöostase keine grundlegenden Auswirkungen auf die Expression von 7a hat. Immunfluoreszenzanalysen haben gezeigt, dass das virale Protein in transient transfizierten Zellen vornehmlich im Golgi-Apparat, in Golgi-assoziierten Vesikeln und dem ERGIC, in infizierten Zellen jedoch hauptsächlich im ERGIC und ER lokalisiert. Dabei kommt es durch Hemmung des Proteasoms oder Hemmung des ER-Golgi Transports zu keinen massiven Lokalisierungsveränderungen, die Stabilisierung bzw. Destabilisierung des Proteins durch MG-132 bzw. Brefeldin A konnte jedoch bestätigt werden.

#### **3.4    UNTERSUCHUNG DES EFFEKTES VON MG-132 AUF DIE SARS-CoV REPLIKATION**

Da die proteasomale Hemmung zur massiven Stabilisierung des akzessorischen 7a-Proteins in transient transfizierten Zellen führt, stellte sich die Frage ob es während der Infektion von Zellen mit dem SARS-CoV ebenfalls zur proteasomalen Degradierung des Proteins kommt. Bei ersten Versuchen in infizierten Zellen kam es unerwarteterweise zur massiven Reduktion der viralen Gesamtproteinexpression durch den proteasomalen Inhibitor. VeroE6 Zellen waren nach einer 2stündigen Vorbehandlung mit DMSO (mock) oder MG-132 mit SARS-CoV infiziert (MOI = 2) und zu angegebenen Zeitpunkten lysiert worden. Gleiche Proteinmengen der Lysate waren im Anschluss mittels SDS-PAGE und Immunoblot auf die Expression von 7a, die des Nukleokapsidproteins N des SARS-CoV und zur Bestätigung der proteasomalen Hemmung auf die BiP-Expression analysiert worden. Anders als erwartet hatte die Behandlung der Zellen während der Infektion nicht zur Stabilisierung, sondern zur massiven Reduktion der 7a-Expression geführt (**Abb. 33**). Da aber die Expression des N-Proteins, das während der Infektion am stärksten vom Virus exprimiert wird, gleichermassen beeinträchtigt war, bestand die Möglichkeit dass MG-132 die virale Proteinexpression gehemmt oder die gesamte Virusreplikation inhibiert hat. Gesetzt des inhibitorischen Effektes von MG-132 auf die SARS-CoV Replikation war im Folgenden eine genauere, weiterführende Untersuchung der Beobachtungen geboten.

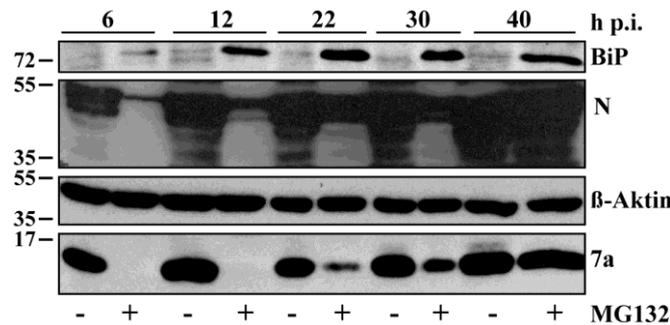


Abbildung 33: SARS-CoV Proteinexpression bei MG-132-Behandlung. VeroE6 Zellen wurden mit SARS-CoV infiziert (MOI=2) und beginnend mit 2 h vor der Inokulation mit DMSO oder 5  $\mu$ M MG-132 behandelt. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden infizierte Zellen lysiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay im Lysat gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Mit einem 7a-, N- und BiP Antikörper folgte eine Analyse im Immunoblot. Der Nachweis des  $\beta$ -Aktin dient dabei als Ladungskontrolle.

### 3.4.1 HEMMUNG DER SARS-COV REPLIKATION DURCH MG-132

#### 3.4.1.1 Dosisabhängige Hemmung der SARS-CoV Titerproduktion durch MG-132

Da die MG-132 Behandlung SARS-CoV infizierter Zellen zu einer starken Reduktion der viralen Proteinexpression führt, wurden in einem nächsten Infektionsexperiment die viralen Titer unter DMSO bzw. MG-132 Behandlung verglichen. VeroE6 Zellen wurden mit DMSO oder MG-132 1 h vorbehandelt, mit SARS-CoV infiziert und nach einer 16stündigen Inkubation mit oder ohne MG-132 die Titer der viralen Überstände mittels Plaque Assay bestimmt. Wie aus **Abb. 34** ersichtlich, kommt es durch die Behandlung mit MG-132 im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen zu einer Reduktion der Titer um 99,99% (6-log Stufen). Durch Wiederholung des Versuches und Verwendung steigender Konzentrationen an MG-132 konnte außerdem ein dosisabhängiger Effekt von MG-132 auf die SARS-CoV Replikation bestätigt werden. Bereits 0,5  $\mu$ M MG-132 erniedrigten die viralen Titer um ein 1000-faches und die Behandlung mit 2,5  $\mu$ M MG-132 führte erneut zur maximalen Titerreduktion um 6 Logstufen.

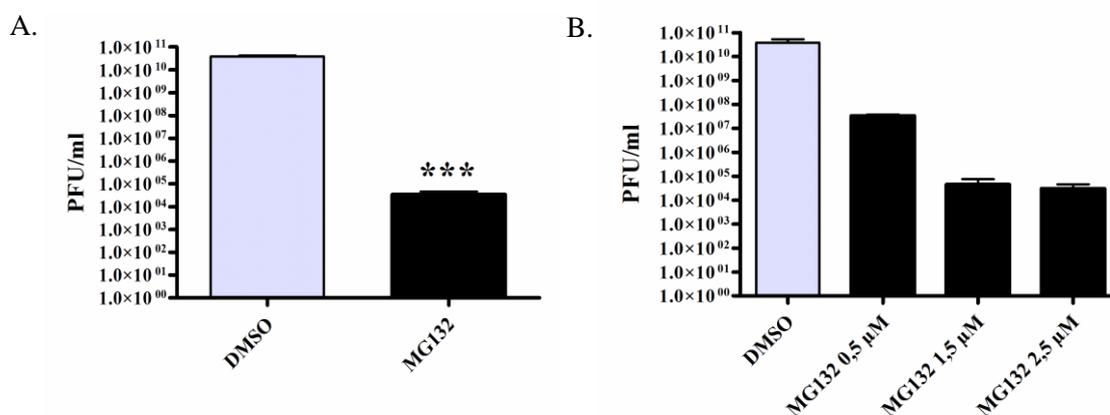


Abbildung 34: Dosisabhängige Reduktion von SARS-CoV-Titern durch MG-132. VeroE6 Zellen wurden nach 1 h Vorbehandlung mit DMSO und 5  $\mu$ M (A.) oder 0,5, 1,5 oder 2,5  $\mu$ M MG-132 (B.) mit SARS-CoV infiziert (MOI=0,5). Nach 16 h Inkubation mit durchgehender Behandlung wurden virale Überstände gesammelt und deren Titer mittels

**Plaque-Assay bestimmt. Zwei unabhängige Versuche (n=2) wurden durchgeführt und die statistische Auswertung mit dem *paired-t-test* durchgeführt. (*p*-Werte: \*\*\* =  $p \leq 0,00=5$ ).**

#### 3.4.1.2 Einfluss von proteasomalen Inhibitoren auf die SARS-CoV Replikation

Da das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) während der Infektion einer Vielzahl von Viren eine Rolle spielt und die Replikation eines SARS-CoV verwandten Virus – des murinen Hepatitisvirus (MHV) – durch proteasomale Inhibition gehemmt werden kann (Yu und Lai, 2005), sollte in einem folgenden Versuch die Bestätigung erbracht werden, dass auch im Falle des SARS-CoV die Hemmung des Proteasoms ursächlich für den inhibitorischen Effekt von MG-132 ist. Dazu wurde das Infektionsexperiment wie unter **3.4.1.1** beschrieben mit den proteasomalen Inhibitoren Lactacystin (Lac) und Bortezomib (BZ) in zwei verschiedenen Konzentrationen wiederholt. Dazu wurden VeroE6 mit dem SARS-CoV infiziert und nach einer Inkubation von 16 h virale Überstände gesammelt und deren Titer mittels Plaque-Assay ermittelt. Die Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren erfolgte beginnend mit 1 h vor der Inokulation bis zur Abnahme der Überstände. Wenngleich es zu leichten, aber dennoch signifikanten Reduktionen der viralen Titer bei 10  $\mu$ M Lac und 40 nM BZ kam, so war deren Wirkung nicht vergleichbar mit dem massiven Effekt von MG-132 (**Abb. 35 A.**). Um die effektive Hemmung der proteasomalen Aktivität unter gegebenen Bedingungen bestätigen zu können, wurden VeroE6 Zellen mit den Substanzen unter gleichen Bedingungen behandelt und nach 16 h lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und eine Induktion von BiP und die Anreicherung polyubiquitinylierter Proteine im Immunoblot untersucht. Bei Hemmung des Proteasoms kommt es zur Anhäufung von Proteinen des sekretorischen Weges im ER, die zur proteasomalen Degradierung bestimmt sind. Infolgedessen kommt es zur ER-Stress und zur Induktion des UPR. Dabei wird die Expression des wichtigsten Faltungshelfers im ER, BiP, ebenfalls induziert und kann als indirekter Indikator für die proteasomale Inhibition dienen. Desweiteren kommt es durch Hemmung des Proteasoms zur Akkumulation polyubiquitinylierter Proteine. Die Behandlung mit allen proteasomalen Inhibitoren führte zur signifikanten Induktion der BiP-Expression im Vergleich zu mock-behandelten Zellen, sogar ein dosisabhängiger Effekt von Lac und BZ konnte gezeigt werden. Dementsprechend kam es durch alle Inhibitoren auch zur vergleichbaren Anreicherung polyubiquitinylierter Proteine (**Abb. 35 B., C., D.**).

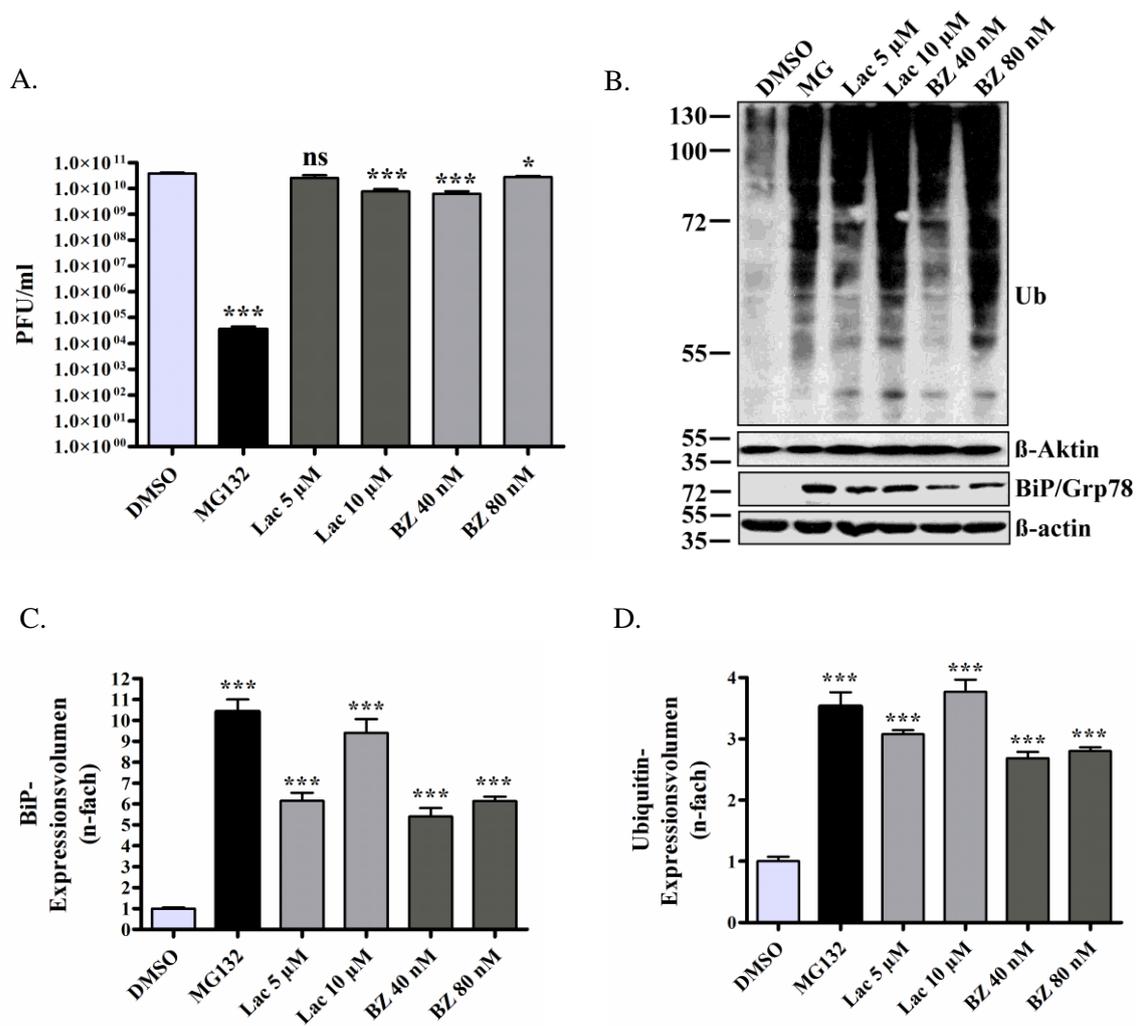
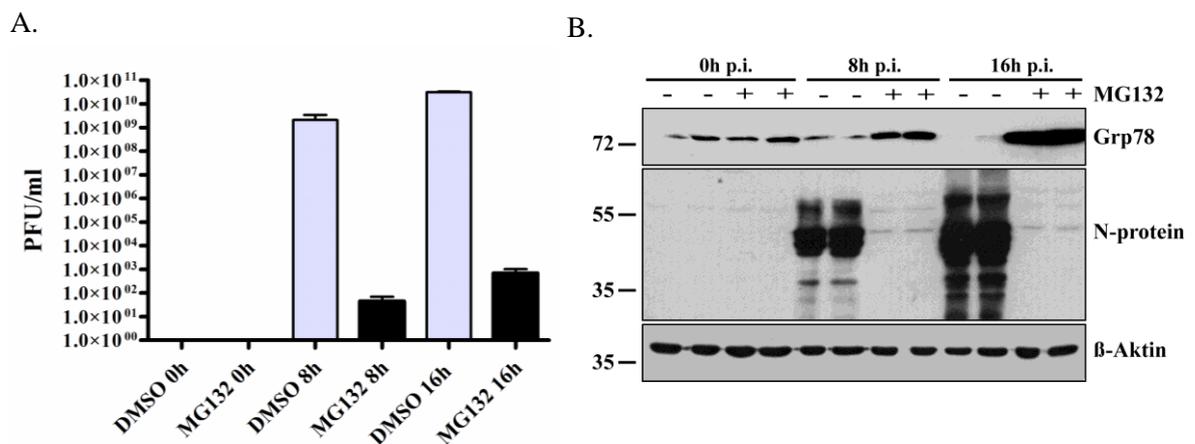


Abbildung 35: SARS-CoV Replikation bei Hemmung des Proteasoms. (A.) VeroE6 Zellen wurden nach 1 h Vorbehandlung mit DMSO, 2,5  $\mu$ M MG-132, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M Lac oder 40 nM und 80 nM BZ mit SARS-CoV infiziert (MOI=0,5). Nach 16 h Inkubation mit durchgehender Behandlung wurden virale Überstände gesammelt und deren Titer mittels Plaque-Assay bestimmt. Zwei unabhängige Versuche (n=2) wurden durchgeführt und die statistische Auswertung mit dem *paired-t-test* durchgeführt. (*p*-Werte: \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,0005$ , ns = nicht signifikant). (B.) VeroE6 Zellen wurden wie unter (A.) beschrieben für 16 h behandelt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Ubiquitin-AK und BiP-AK im Immunoblot analysiert. Nach der densitometrischen Analyse unter Abgleich der Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin erfolgte die statistische Auswertung mit dem *paired t-test* (C+D). Das mittlere Expressionsvolumen unter mock-Bedingungen wurde gleich 1 gesetzt und Volumina anderer Bedingungen in n-facher Relation dazu dargestellt. (*p*-Werte: \*\*\* =  $p \leq 0,0005$ ). (C.) Expressionsvolumen BiP. (D.) Expressionsvolumen Ubiquitin.

Wenngleich eine effektive und vergleichbare Hemmung der proteasomalen Aktivität für alle Inhibitoren bei den verwendeten Konzentrationen gezeigt werden konnte, so waren deutliche Effekte auf die SARS-CoV Replikation nur bei Behandlung mit MG-132 existent. MG-132 zeigt eine einmalige Fähigkeit der dosisabhängigen Inhibition der SARS-CoV Replikation, die höchstwahrscheinlich unabhängig von dem funktionellen Proteasom ist.

3.4.1.3 SARS-CoV Replikationskinetik in DMSO und MG-132-behandelten Zellen

Zur weiteren Charakterisierung des inhibitorischen Effektes von MG-132 auf die Virusreplikation im Zeitverlauf wurden VeroE6 Zellen wie oben vorbehandelt, infiziert und zu angegebenen Zeitpunkten virale Überstände gesammelt und infizierte Zellen lysiert. Die Titer wurden mittels Plaque-Assay bestimmt und Lysate gleicher Proteinmengen per SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression der viralen Proteine 7a und N im Immunoblot untersucht. Bei mock-Behandlung stiegen die viralen Titer exponentiell an und erreichten 16 h nach Infektion ein nahezu stationäres Niveau. In MG-132 behandelten Zellen war die Produktion viraler Partikel schwer beeinträchtigt und selbst nach 16 h wurden nur geringe Titer erreicht (**Abb. 36 A.**). Anders als in mock-behandelten Zellen verstärkte sich die N-Expression im Immunoblot bei MG-132-Behandlung nicht relativ zu viralen Titer über die Zeit, sondern war kaum nachweisbar. Um die effektive Inhibition des Proteasoms durch MG-132 zu gewährleisten, wurde die Expression des BiP-Proteins untersucht, die, wie bereits gezeigt, durch den proteasomalen Inhibitor stark induziert war (**Abb. 36 B.**). Interessanterweise und entgegen der Erwartungen, kam es bei DMSO-behandelten, infizierten Zellen nicht zur Induktion der BiP-Expression, sondern vielmehr zu einer leichten Reduktion der Proteinmenge. Wie zu bestätigen war, führte die Behandlung infizierter Zellen mit MG-132 nicht nur zur Reduktion viraler Titer, sondern auch zur massiven Reduktion der viralen Gesamtproteinexpression.

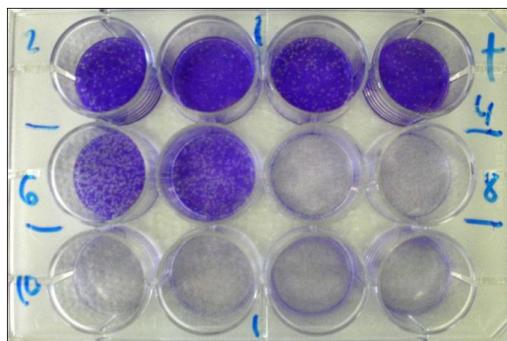


**Abbildung 36:** SARS-CoV Replikationskinetik bei MG-132-Behandlung. (A.) VeroE6 Zellen wurden mit SARS-CoV infiziert (MOI=0,5) und zu angegebenen Zeitpunkten virale Überstände gesammelt und deren Titer mittels Plaque-Assay bestimmt. Beginnend mit 1 h vor der Inokulation wurden infizierte Zellen durchgehend mit DMSO oder 5  $\mu$ M MG-132 behandelt (n=2 im Doppelansatz). (B.) VeroE6 Zellen wurden wie unter (A.) beschrieben infiziert und behandelt und zu angegebenen Zeitpunkten lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem N, BiP und  $\beta$ -Aktin (als Ladungskontrolle) Antikörper im Immunoblot analysiert.

#### 3.4.1.4 Hemmung initialer SARS-CoV Replikationsschritte durch MG-132

MG-132 ist ein reversibler, kompetitiver Hemmstoff des Proteasoms, durch Mediumwechsel behandelter Zellen kann somit eine Rekonstitution der proteasomalen Aktivität erreicht werden. Diese Tatsache ermöglichte die Applikation von MG-132 zu verschiedenen Zeitpunkten eines Infektionszyklus in einem Zeitfensterversuch und somit die Identifikation des behandelungssensiblen Schrittes während der SARS-CoV Replikation.

Zunächst musste jedoch in einem Vorversuch die ungefähre Dauer eines Replikationszyklus bestimmt werden. Die Dauer eines Zeitfensterversuches sollte die Dauer dieses Replikationszyklus nicht überschreiten, da MG-132-abhängige Titerreduktionen in einer ersten Replikationsphase durch eine hoch replikative, zweite Infektionsrunde möglicherweise kompensiert werden könnten. VeroE6 Zellen wurden daher mit SARS-CoV infiziert und das Inokulum vor Zugabe frischen Mediums durch mehrfache Waschschrte entfernt. Beginnend mit 2 h nach der Inokulation und nach jeden weiteren 2 h wurden virale Überstände gesammelt und damit ein Vero-E6 Zellrasen infiziert. Zur Immobilisation der Viren wurden die Zellen mit Methylcellulose überschichtet und die Zellen nach einer Inkubation von 72 h fixiert. Während zu den Zeitpunkten 2 – 6 h ein Zellrasen mit einzelnen kleinen Plaques mit Kristallviolett angefärbt werden konnte, ist zu späteren Zeitpunkten kein anfärbarer Zellrasen mehr vorhanden (**Abb. 37**). Daher musste es zwischen 6 und 8 h nach der Inokulation zur Freisetzung von Virionen gekommen sein, die Dauer eines Replikationszyklus wurde daher auf 8 h angesetzt.



**Abbildung 37: Bestimmung der Dauer eines SARS-CoV Replikationszyklus. VeroE6 Zellen wurden mit SARS-CoV infiziert (MOI = 0,5) und beginnend mit 2 h nach der Inokulation (2, 4, 6, 8 und 10 h) virale Überstände gesammelt. Ein VeroE6 Zellrasen wurde mit den viralen Überständen infiziert und nach Zugabe von Methylcellulose (1%) für 72 h inkubiert. Nach der Fixierung erfolgte die Färbung des Zellrasens mit Kristallviolett.**

Ein weiterer Vorversuch sollte klären wie lange das SARS-CoV zur Internalisierung benötigt. Dazu wurden VeroE6 Zellen sowohl für 15 min als auch für 1 h mit SARS-CoV inokuliert, die Zellen anschließend mehrfach gewaschen und 16 h nach der Infektion die Titer beider Ansätze ermittelt. Da keinerlei Titerunterschiede zu verzeichnen waren, ist anzunehmen, dass das Virus für die Aufnahme in die Zelle weniger als 15 min benötigt. Um im Zeitfensterversuch frühe Effekte von MG-132 dokumentieren zu können, wurde die Inokulationsphase in diesem Versuch daher auf 15 min reduziert.

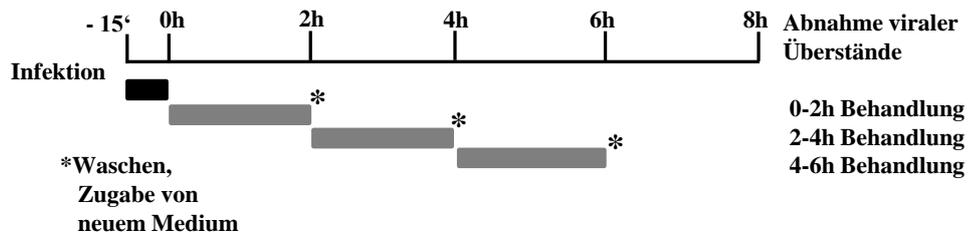


Abbildung 38: Schema des Zeitfensterversuchs

Nach Optimierung der Versuchsbedingungen wurde der Zeitfensterversuch wie folgt durchgeführt: VeroE6 Zellen wurden für 15 min mit SARS-CoV infiziert und anschließend das Inokulum durch mehrfache Waschstufen entfernt. Die Zellen wurden für 2stündige Zeitfenster mit DMSO (mock) oder MG-132 behandelt. Nach jedem Behandlungszeitraum wurden die Zellen gewaschen und mit normalem Medium weiterinkubiert. Nach einer insgesamten Inkubationszeit von 8 h wurden virale Überstände gesammelt und deren Titer mittels Plaque-Assay determiniert. Eine schematische Darstellung der Versuchsdurchführung ist in **Abb. 38** gezeigt. Während die Behandlung infizierter Zellen im ersten Zeitfenster (0-2 h) die virale Titerproduktion stark beeinträchtigte, kam es bei Behandlung der infizierten Zellen mit MG-132 zu späteren Zeitpunkten nur zu schwachen Effekten. Im letzten Zeitrahmen (4-6 h) blieb die Behandlung mit MG-132 im Vergleich zu mock-behandelten Zellen nahezu ohne Wirkung auf die Titerproduktion (**Abb. 39 A.**). Ein initialer Schritt der viralen Replikation scheint daher durch den proteasomalen Inhibitor beeinträchtigt.

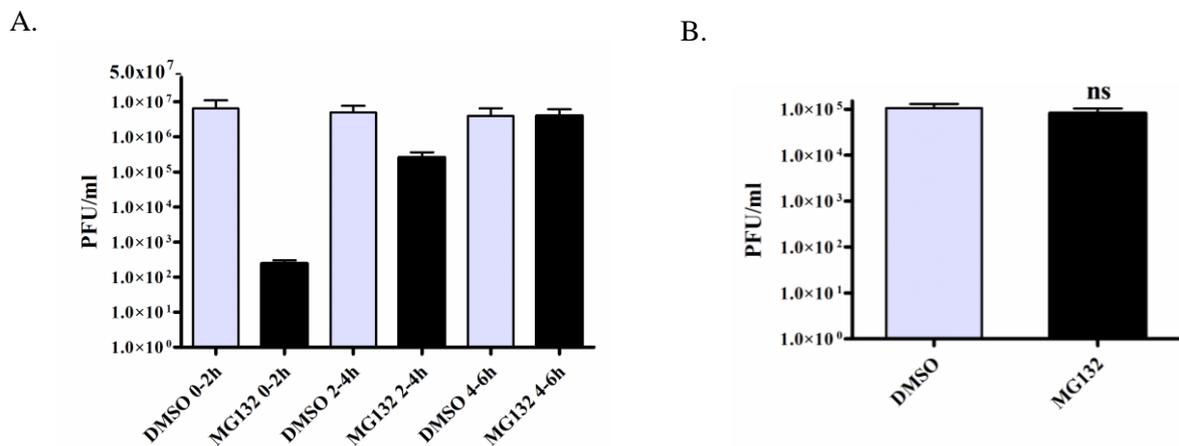
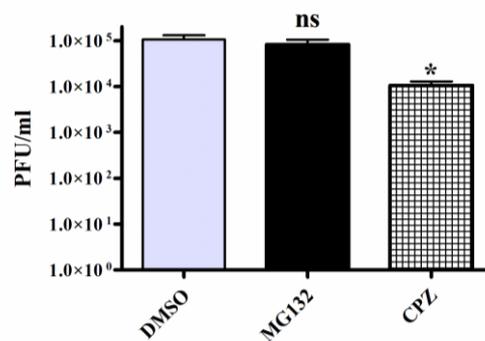


Abbildung 39: Zeitfensterversuch und Kontrollversuch. (A.) Vero E6 Zellen wurden für 15 min mit SARS-CoV und nach Entfernung des Inokulums für angegebene Zeiträume mit DMSO oder 2,5  $\mu$ M MG-132 behandelt. Nach der Behandlung erfolgte ein Waschen der Zellen und Zugabe von frischem Medium. Nach einer insgesamten Inkubationszeit von 8 h wurden virale Überstände gesammelt und deren Titer mittels Plaque-Assay bestimmt (n=2, Doppelansatz). (B.)  $1,7 \times 10^6$  PFU des SARS-CoV wurden für 2 h in zellfreiem Medium mit DMSO oder 2,5  $\mu$ M MG-132 inkubiert und im Anschluss die Titer des Ansatzes mittels Plaque Assay bestimmt (n=2, Doppelansatz).

Um auszuschließen, dass der chemische Wirkstoff die Viruspartikel schon vor der Adsorption schädigt wurde in einem folgenden Versuch zellfreies Medium mit DMSO oder MG-132 mit dem Virus für 2 h

inkubiert. Nachfolgende Titerbestimmung ergaben jedoch keinerlei Titerunterschiede (**Abb. 39 B.**). MG-132 hat somit keinen direkten Effekt auf die Vitalität des Virions vor der Adsorption.

Nach der Bindung an den funktionellen Rezeptor des SARS-CoV, dem ACE2-Protein, kommt es zu dessen Internalisierung. Zur Untersuchung einer möglichen Hemmung der Internalisierung durch MG-132 wurde daher ein Internalisierungsassay durchgeführt. Dazu wurden vorbehandelte VeroE6 in Anwesenheit von DMSO und MG-132 für 15 min mit SARS-CoV inokuliert (MOI=2). Durch mehrfache Waschschrte bzw. durch eine Trypsinierung der Zellen wurde anschließend das Inokulum und gebundenes, aber uninternalisiertes Virus entfernt. Nach Aufschluss der Zellen wurden aus den entstandenen Suspensionen direkt die viralen Titer mittels Plaque-Assay bestimmt. Da keine signifikanten Titerunterschiede zwischen DMSO oder MG-132-Behandlung zu verzeichnen waren, ist davon auszugehen, dass es während der Inokulationsphase zu keiner Beeinträchtigung der Virusinternalisierung durch MG-132 gekommen war. Um die Funktionalität des Assays zu bestätigen, wurden Zellen vor und während der Inokulationsphase mit Chlorpromazin (CPZ) behandelt. Bei CPZ handelt es sich um einen Inhibitor des Clathrin-vermittelten Endozytoseweges, der in gewissem Grade die Aufnahme des SARS-CoV in die Zelle hemmen kann (Inoue *et al.*, 2007). Obwohl es durch CPZ nicht zur totalen Hemmung der Internalisierung kam, möglicherweise werden auch andere Eintrittswege von SARS-CoV genutzt (Wang *et al.*, 2008), so kam es doch zur signifikanten Reduktion an internalisiertem Virus (**Abb. 40**). Mittels des damit funktionalen Internalisierungsassay konnte bestätigt werden, dass MG-132 keinen Effekt auf die Virusinternalisierung hat.



**Abbildung 40: Internalisierungsassay.** VeroE6 Zellen wurden vor und während einer 15minütigen Inokulation mit SARS-CoV (MOI = 2) mit DMSO, 2,5 µM MG-132 oder 20 µM CPZ behandelt. Nach der Inokulation wurden die Zellen mehrmals gewaschen und für 10 min auf Eis trypsiniert. Nach Aufbruch der Zellen durch Aufziehen der Zellsuspension durch eine 19 mm Injektionsnadel wurden die Titer der entstandenen Suspensionen mittels Plaque-Assay bestimmt. Der Versuch wurde im Dreifachansatz durchgeführt und die statistische Auswertung mit dem *paired-t-test* durchgeführt. (*p*-Werte: \* =  $p \leq 0,05$ ; ns = nicht signifikant).

Die Durchführung von Zeitfensterversuchen, eines Kontrollversuchs, der eine Wirkung von MG-132 auf das Virion ausschliessen konnte und der zuletzt beschriebene Internalisierungsversuch zeigen deutlich, dass MG-132 einen initialen Schritt der SARS-CoV Replikation hemmt, ohne dass es dabei zur Beeinflussung der Virusinternalisierung kommt.

### 3.4.2 UNTERSUCHUNG DER ABHÄNGIGKEIT DER SARS-CoV REPLIKATION VON AUTOPHAGIE

Bisherige Beobachtungen ließen darauf schließen, dass MG-132 Schritte der Virusreplikation nach dem Internalisierungsprozess inhibiert. Da proteasomale Inhibitoren wie MG-132 bekanntermaßen effektive Induktoren von Autophagie sind (Ding *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2008) und SARS-CoV höchstwahrscheinlich endozytotisch aufgenommen wird, könnte sich folgendes Szenario ergeben: Das Virus wird trotz MG-132 erfolgreich internalisiert und liegt im Endosom vor. Durch eine mögliche Induktion von Autophagie durch MG-132 kommt es jedoch zur erhöhten Fusionsrate von virushaltigen Endosomen mit vermehrt gebildeten Autophagosomen. Die anschließende Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen würde dann zur Degradierung des Virus führen und könnte für die massiven Titerreduktionen durch MG-132 verantwortlich sein. Die Analyse von Lysaten des initialen Infektionsversuchs (Abb. 33) konnte dazu bereits erste Anhaltspunkte liefern. Wie aus Abb. 41 ersichtlich führte die Behandlung mit MG-132 zur Induktion der LC3-II Bildung in infizierten Zellen. Die Konversion des unmodifizierten LC3-I Proteins zum lipidierten LC3-II dokumentiert die Bildung von Autophagosomen und kann als verlässlicher Marker für die Auslösung von Autophagie dienen (Kabeya *et al.*, 2000). Dass der Induktion nicht die virale Infektion zu Grunde liegt, war ebenfalls ersichtlich, da es in mock-behandelten, infizierten Zellen zu keinem vergleichbaren Effekt gekommen ist. Mehr noch war die Tendenz erkennbar, dass die Infektion mit SARS-CoV zur Reduktion der gesamten LC3-Menge und der Konversion von LC3-I zu LC3-II geführt hat. Möglicherweise erniedrigt das SARS-CoV die LC3-Menge und inhibiert die LC3-I Konversion, um einer Beeinträchtigung der viralen Replikation durch die Induktion von Autophagie zu entgehen. Folgende Experimente sollten daher klären, ob der inhibierende Effekt von MG-132 mit der Induktion von Autophagie assoziiert ist und ob die SARS-CoV Replikation von einem funktionierenden Autophagiesystem abhängig ist bzw. beeinflusst werden kann.

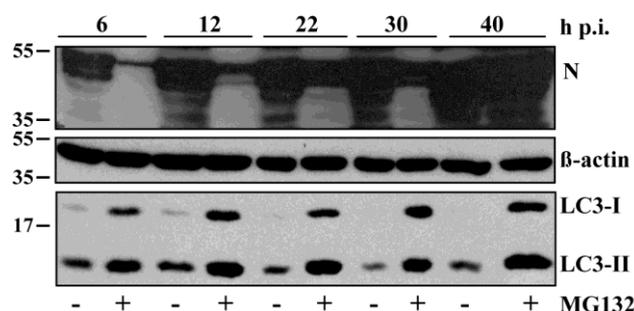
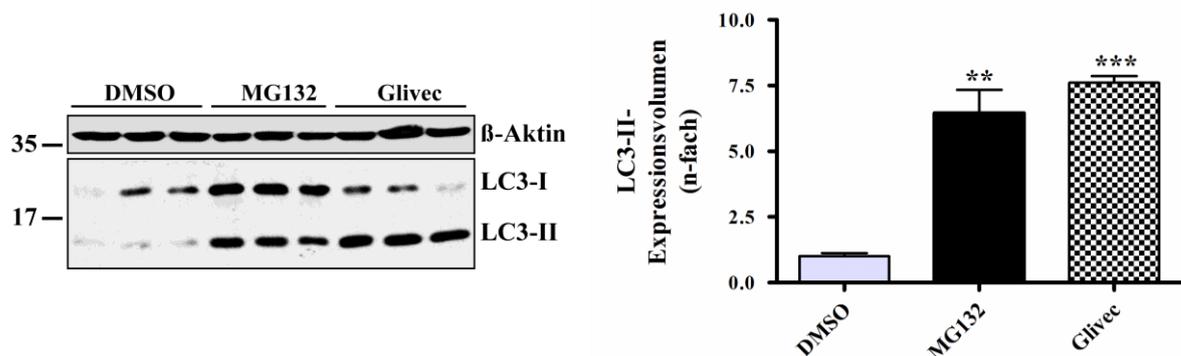


Abbildung 41: LC3-Konversion während der SARS-CoV Infektion. VeroE6 Zellen wurden mit SARS-CoV infiziert (MOI=2) und beginnend mit 2 h vor der Inokulation mit DMSO oder 5 µM MG-132 behandelt. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden infizierte Zellen lysiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay im Lysat gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt. Mit einem LC3-, und N-Antikörper folgte die Analyse im Immunoblot. Der Nachweis des β-Aktin dient dabei als Ladungskontrolle.

### 3.4.2.1 SARS-CoV Replikation und Induktion von Autophagie

Um feststellen zu können ob eine mögliche Induktion von Autophagie durch MG-132 Effekte auf die virale Replikation hat, musste in einem Vorversuch bestätigt werden, dass MG-132 in VeroE6 Zellen Autophagie induzieren kann. Dazu wurden VeroE6 Zellen für 16 h mit DMSO (mock), MG-132 oder als Positivkontrolle mit Imatinib/Glivec, einem beschriebenen Induktor von Autophagie (Ertmer *et al.*, 2007), behandelt. Nach Lyse der Zellen und Auftrennung des Gesamtproteins mittels SDS-PAGE wurde die Konversion des LC3-I Proteins im Immunoblot untersucht. Die Behandlung mit MG-132 induzierte die Konversion des LC3-I zu LC3-II und damit die Bildung von Autophagosomen im selben Maße wie die Positivkontrolle Imatinib (**Abb. 42**).



**Abbildung 42: Induktion von Autophagie in VeroE6 durch MG-132.** Vero E6 Zellen wurden für 16 h mit DMSO (mock), 5  $\mu$ M MG-132 oder 10  $\mu$ M Glivec behandelt und anschließend lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem LC3-AK im Immunoblot analysiert (links). Nach der densitometrischen Analyse unter Abgleich der Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin erfolgte die statistische Auswertung mit dem *paired t-test* (rechts). Das mittlere Expressionsvolumen unter mock-Bedingungen wurde gleich 1 gesetzt und Volumina anderer Bedingungen in n-facher Relation dazu dargestellt. (*p*-Werte: \*\* =  $p \leq 0,005$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0005$ ).

Um zu untersuchen ob ein beschriebener Autophagieinduktor wie Glivec gleiche Effekte auf die SARS-CoV Replikation hat wie das ebenfalls Autophagie induzierende MG-132, wurden VeroE6 Zellen nach einer Vorbehandlung mit DMSO (mock), MG-132 oder Glivec/Imatinib mit SARS-CoV infiziert und nach einer 16stündigen Inkubationszeit mit durchgehender Behandlung die Titer der gesammelten viralen Überstände analysiert. Entgegen aller Erwartungen kam es durch die Behandlung mit Imatinib zu keiner signifikanten Reduktion der Titer im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen, ein Effekt von Glivec auf die Virusreplikation ist damit nicht vorhanden (**Abb. 43**). Es ist somit anzunehmen, dass die Induktion von Autophagie nicht der massiven Titerreduktion durch MG-132 zu Grunde liegt und auch nicht zur Beeinträchtigung der Virusreplikation führt.

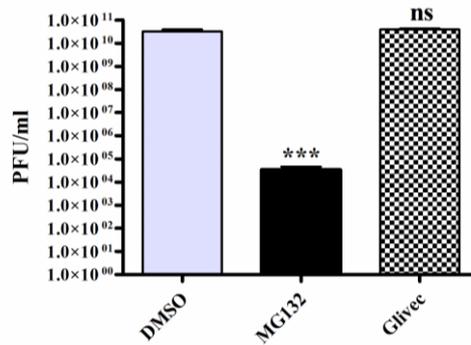
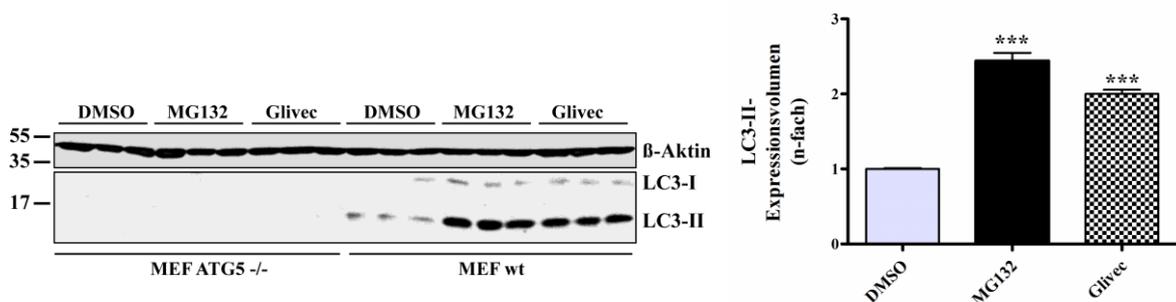


Abbildung 43: SARS-CoV Replikation bei Induktion von Autophagie. VeroE6 Zellen wurden nach 1 h Vorbehandlung mit DMSO, 5  $\mu$ M MG-132 und 10  $\mu$ M Glivec mit SARS-CoV infiziert (MOI=0,5). Nach 16 h Inkubation mit durchgehender Behandlung wurden virale Überstände gesammelt und deren Titer mittels Plaque-Assay bestimmt. Zwei unabhängige Versuche (n=2, Doppelansatz) wurden durchgeführt und die statistische Auswertung mit dem *paired-t-test* durchgeführt. (p-Werte: \*\*\* =  $p \leq 0,0005$ , ns = nicht signifikant).

### 3.4.2.2 SARS-CoV Replikation und Inhibition der Virusreplikation durch MG-132 in autophagie-defizienten Zellen

Zur endgültigen Bestätigung, dass dem MG-132-Effekt keine Veränderungen des Autophagiesignalweges zu Grunde liegen und zur Feststellung einer möglichen Abhängigkeit der SARS-CoV Replikation von Autophagie im allgemeinen wurden weitere Versuche mit embryonalen, autophagiedefizienten Mäusefibroblasten (MEF) durchgeführt. Im Genom dieser Zellen liegt im ATG5 Gen eine Deletion vor, folglich wird kein Atg5 Protein gebildet, welches zur Bildung von Autophagosomen und somit zur Auslösung von Autophagie essentiell ist (Kuma *et al.*, 2004). In einem Vorversuch sollte zunächst bestätigt werden, dass die Behandlung mit MG-132 auch in MEF-Wildtypzellen zur Induktion von Autophagie führt. Es wurden dazu MEF-WT und zur Kontrolle auch die autophagiedefizienten MEFs mit DMSO (mock), MG-132 und Imatinib/Glivec (Positivkontrolle) behandelt und nach 16 h Inkubation lysiert. Die Lysate wurden zu gleichen Proteinnengen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Konversion von LC3-I zu LC3-II im Immunoblot analysiert. Wie zu erwarten kam es in autophagiedefizienten Zellen weder durch MG-132 noch durch die Positivkontrolle Glivec zur Auslösung von Autophagie, in den WT-MEFs war MG-132 jedoch ebenso wie in VeroE6 Zellen ein potenter Auslöser von Autophagie (Abb. 44).



**Abbildung 44: Induktion von Autophagie in MEF-Zellen durch MG-132.** MEF WT und ATG5<sup>-/-</sup> Zellen wurden für 16 h mit DMSO (mock), 5  $\mu$ M MG-132 oder 10  $\mu$ M Glivec behandelt und anschließend lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem LC3-AK im Immunoblot analysiert (links). Nach der densitometrischen Analyse unter Abgleich der Ladungskontrolle  $\beta$ -Aktin erfolgte die statistische Auswertung mit dem *paired t-test* (rechts). Das mittlere Expressionsvolumen unter mock-Bedingungen wurde gleich 1 gesetzt und Volumina anderer Bedingungen in n-facher Relation dazu dargestellt. (*p*-Werte: \*\*\* =  $p \leq 0,0005$ ).

Da murine Zellen aufgrund des fehlenden funktionellen SARS-CoV Rezeptors ACE2 nicht empfänglich für eine SARS-CoV Infektion sind, mussten MEFs zur Verwendung in Infektionsversuchen mit dem humanen ACE2-Protein transient transfiziert werden. Zur Bestätigung der effektiven Expression wurden WT und ATG5<sup>-/-</sup> MEFs mit pcDNA3.1-huACE2 transfiziert und 24 und 48 h nach der Transfektion lysiert. In einer anschließenden SDS-PAGE wurden die Lysate aufgetrennt und im Immunoblot die Expression des ACE2-Proteins untersucht. Sowohl 24 h als auch 48 h nach der Transfektion konnte die effektive Expression von ACE2 in MEF Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 45A.**).

In den, für die Infektion mit dem SARS-CoV empfänglich gemachten MEFs konnte im Folgenden der MG-132-Effekt und die Abhängigkeit der Replikation von Autophagie untersucht werden. Dazu wurden WT und ATG5<sup>-/-</sup> MEFs mit dem pcDNA3.1-huACE2 für 24 h transfiziert und im Anschluss mit SARS-CoV infiziert. Wie in allen bisherigen Versuchen wurden die Zellen vor, während und nach der Inokulation mit DMSO (mock), MG-132 und Glivec (Positivkontrolle) behandelt. Nach der 16stündigen Inkubation wurden virale Überstände aller Bedingungen gesammelt und deren Titer in einem Plaque Assay bestimmt. Tatsächlich waren mit dem ACE2 transfizierte MEFs im Vergleich zu untransfizierten MEFs mit dem SARS-CoV infizierbar, wenn auch die Replikationseffizienz nicht mit Vero Zellen vergleichbar war. Die reproduktive Replikation des SARS-CoV in WT MEFs als auch in autophagiedefizienten ATG5<sup>-/-</sup> MEFs zeigte, dass die Replikation des SARS-CoV unabhängig von dem Vorhandensein des Atg5 Proteins bzw. eines funktionellen Autophagiesystems ist (**Abb. 45 B.**). Interessanterweise kam es durch die MG-132-Behandlung sowohl in ATG5<sup>-/-</sup> MEFs wie in WT MEFs zur Reduktion viraler Titer um 3 Logstufen, einer Titerproduktion die vergleichbar mit der in untransfizierten Zellen war. Die Induktion von Autophagie durch MG-132 kann somit nicht mit dessen Fähigkeit der massiven Inhibition der SARS-Replikation in Zusammenhang gebracht werden.

Zusammenfassend konnte durch die, in diesem Kapitel gemachten Beobachtungen gezeigt werden, dass die Funktionalität von Autophagiesignalwegen für eine effektive SARS-CoV Replikation nicht von Nöten ist und, dass auch der inhibitorische Effekt des MG-132 nicht einer Auslösung von Autophagie zu Grunde liegt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine, für die SARS-CoV Infektion unempfindliche Zelllinie murinen Ursprungs, durch exogene Expression des funktionellen SARS-Rezeptors infiziert werden kann.

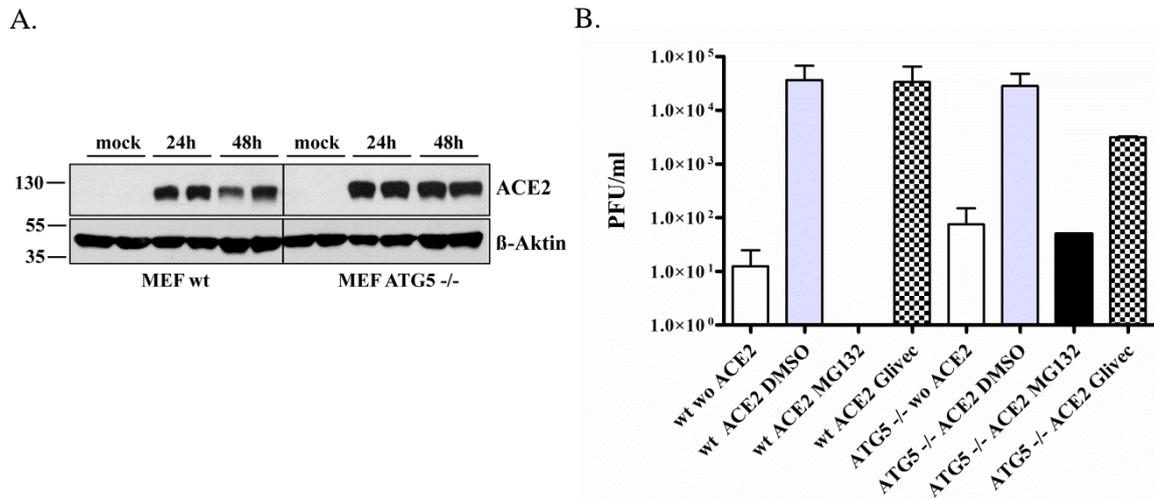


Abbildung 45: SARS-CoV Replikation in autophagiedefizienten MEF-Zellen. (A.) WT MEF und ATG5<sup>-/-</sup> Zellen wurden mit pcDNA3.1 (mock) und pcDNA3.1-huACE2 transfiziert und nach 24 h und 48 h lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurden gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem ACE2-AK im Immunoblot analysiert. Der Nachweis des β-Aktin diente dabei als Ladungskontrolle (links). (B.) WT MEF und ATG5<sup>-/-</sup> Zellen wurden untransfiziert belassen oder für 24 h mit pcDNA3.1-huACE2 transfiziert und anschließend mit SARS-CoV (MOI=0,2) infiziert. 1 h vor und während des gesamten Versuchszeitraums wurden die Zellen mit DMSO, 5 μM MG-132 oder 10 μM Glivec behandelt. 16 h nach Inokulation wurden virale Überstände gesammelt und die Titer mittels Plaque-Assay bestimmt. (n=2)

### 3.4.3 EINFLUSS DER CALPAIN-AKTIVITÄT AUF DIE SARS-COV REPLIKATION

Da sowohl die Hemmung des Proteasoms als auch jedwede Veränderung von Autophagiesignalwegen nicht für die massiven Effekte von MG-132 verantwortlich zu machen waren, muss MG-132 auf anderem Wege die Inhibition der viralen Titerproduktion bewirken. Da das Tripeptid MG-132 (Benzyloxycarbonyl-leucyl-leucyl-leucinal oder ZLLLal) zur Familie der Peptidaldehyde gehört, die verschiedene Proteasen wie Serin,- oder Cystein-Proteasen inhibieren können, besteht die Möglichkeit, dass die Hemmung einer anderen Protease durch MG-132 zur Reduktion der SARS-CoV Titer führt. Da MG-132 neben der proteasomalen Aktivität auch die Cystein-Protease m-Calpain hemmen kann (Tsubuki *et al.*, 1996), sollte in einem weiteren Versuch die Abhängigkeit der SARS-CoV Replikation von der Aktivität des Calpains untersucht werden. Dazu wurden die Calpain-Inhibitoren MDL28170/Calpain Inhibitor III (MDL28170) und SJA6017/Calpain Inhibitor VI (CI VI) verwendet. Um eine Zytotoxizität der beiden Substanzen und auch aller vorher verwendeten chemischen Inhibitoren auszuschliessen, wurden VeroE6 Zellen für 16 h mit allen Substanzen behandelt und nachfolgend ein XTT-Assay durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Staurosporin behandelt. Wie aus **Abb. 46** ersichtlich, kam es außer bei Staurosporin zu keiner Beeinträchtigung der Zellvitalität bzw. der Umsetzung des XTT-Substrates durch die verwendeten Substanzen.

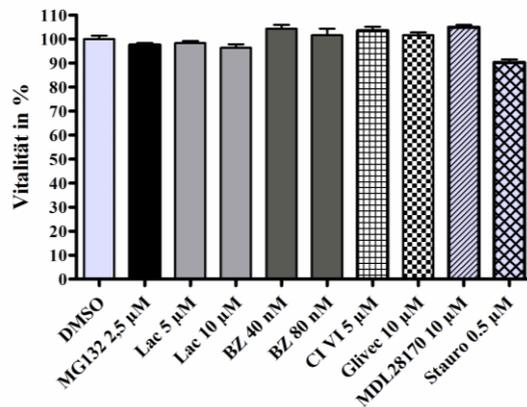


Abbildung 46: XTT-Assay bei verschiedenen Behandlungen. VeroE6 Zellen wurden mit den angegebenen Substanzen behandelt und nach 16 h ein XTT-Assay durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 0,5 µM Staurosporin behandelt. (n=12, Staurosporin n=6). Die mittlere Absorption unter DMSO-Behandlung wurde gleich 100 % Vitalität gesetzt und andere Absorptionen in Relation dazu berechnet und als Vitalität ebenfalls in Prozent dargestellt.

Nach Ausschluss einer möglichen Zytotoxizität der Calpain-Inhibitoren wurden VeroE6 Zellen mit DMSO (mock), MG-132 (Positivkontrolle) und den beiden Calpain-Inhibitoren 1 h vorbehandelt und anschließend mit dem SARS-CoV inokuliert. Nach insgesamt 16stündiger Inkubation mit durchgehender Behandlung wurden virale Überstände abgenommen und deren Titer mittels Plaque-Assay determiniert. Tatsächlich führte die Behandlung infizierter Zellen mit MDL28170 zu einer, im Vergleich mit MG-132, sogar noch massiveren Reduktion der SARS-CoV-Titer um 7 Logstufen (Abb. 47). Im Gegensatz dazu zeigt die Verwendung des CI IV keine starken Effekte auf die Replikation. Während CI VI hauptsächlich µ-Calpain inhibiert (Inoue *et al.*, 2003), kommt es durch MDL28170 sowohl zur Hemmung von µ-Calpain als auch zur Hemmung der m-Calpain Aktivität. Die Hemmung des m-Calpains durch MDL28170 ist daher höchstwahrscheinlich ursächlich für die massive Reduktion viraler Titer.

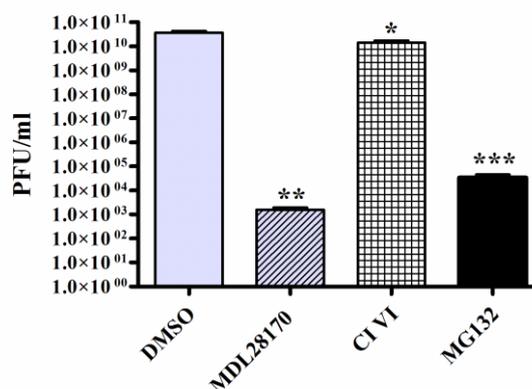


Abbildung 47: SARS-CoV Replikation bei Hemmung von Calpain. VeroE6 Zellen wurden nach 1 h Vorbehandlung mit DMSO, 5 µM MG-132, 10 µM MDL28170 und 5 µM CI VI mit SARS-CoV infiziert (MOI=0,5). Nach 16 h Inkubation mit durchgehender Behandlung wurden virale Überstände gesammelt und deren Titer mittels Plaque-Assay bestimmt. Zwei unabhängige Versuche (n=2, Doppelansatz) wurden durchgeführt und die statistische Auswertung mit dem *paired-t-test* durchgeführt. (p-Werte: \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,005$ , \*\*\* =  $p \leq 0,0005$ ).

Da MG-132 wie MDL28170 die Aktivität des m-Calpains inhibiert und für beide eine stark inhibitorische Wirkung auf die SARS-CoV Replikation gezeigt werden konnte, ist anzunehmen, dass MG-132 nicht durch Hemmung des Proteasoms, sondern durch Hemmung einer m-Calpain-Aktivität die SARS-CoV Replikation beeinträchtigt. Daraus resultierend ist der Protease m-Calpain oder einer m-Calpain ähnlichen, viralen Proteaseaktivität eine bislang nicht beschriebene entscheidende Rolle während der frühen Schritte der SARS-CoV Infektion zuzuschreiben.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 BESTÄTIGUNG DER 7A-BiP INTERAKTION

Mit dem Y2H-System können mögliche Proteininteraktionen in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) ermittelt werden. Bevor jedoch eine weitere Charakterisierung einer solchen Interaktion erfolgen kann, muss diese in einem anderen experimentellen System bzw. in Säugetierzellen bestätigt werden. Durch transiente Transfektion von teilweise selbst klonierten Expressionsvektoren konnten das BiP einer Affennierenzelle (VeroE6) und das akzessorische 7a-Protein des SARS-CoV in, mit SARS-CoV infizierbaren, VeroE6-Zellen hinreichend exprimiert und deren Interaktion durch Co-Immunopräzipitationsstudien gezeigt werden. In Abhängigkeit von der Expressionsmenge des 7a-Proteins ist die Co-IP von BiP zum Zeitpunkt 48 h besser geglückt. Anders als bei nachfolgenden Immunoblots sind bei den IP-Studien zwei Banden für BiP nachgewiesen worden (**Abb. 15**). Tatsächlich sind zwei BiP-Isoformen in der Zelle bekannt (Freiden *et al.*, 1992). Unter normalen Bedingungen liegt BiP posttranslational modifiziert vor. Kommt es aber zur Ansammlung ungefalteter Proteine, wird BiP deribosyliert und dephosphoryliert und so in die biologisch aktive Form einer ungefähren Größe von 72 kDa umgesetzt (Freiden *et al.*, 1992; Jordan *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2003; Branza-Nichita *et al.*, 2004; He, 2006; Medigeschi *et al.*, 2007). Ob es sich bei den beiden BiP-Banden tatsächlich um die erwähnten Isoformen handelt, und warum es nur bei IP-Versuchen zur Detektion einer zweiten BiP-Bande gekommen ist, bleibt unklar.

Da die Expression und Faltung viraler Proteine und im Besonderen die viraler Glykoproteine in den meisten Fällen zu ER-Stress und folglich zur Induktion von BiP führt (Jordan *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2003; Branza-Nichita *et al.*, 2004; He, 2006; Medigeschi *et al.*, 2007), und auch für verschiedene SARS-CoV Proteine dementsprechende Effekte bei deren Expression in Zellen beschrieben sind (Chan *et al.*, 2006; Versteeg *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2008; Minakshi *et al.*, 2009), sollte während der Infektion von VeroE6 ausreichend präzipitierbares 7a und BiP vorhanden sein. Dennoch konnte eine Interaktion des 7a-Proteins mit BiP in infizierten Zellen mittels Co-IP nicht nachgewiesen werden. Spätere Versuche konnten zeigen, dass es während der Infektion anstelle einer Induktion zur Reduktion der BiP-Expressionsmenge kommt (**Abb. 36**). Unter diesen Bedingungen ist zu wenig präzipitierbares BiP vorhanden, der Nachweis der Interaktion mit 7a durch eine Co-IP war somit in infizierten Zellen schwerlich zu erbringen.

## 4.2 CHARAKTERISIERUNG DER 7A-BiP INTERAKTION

Neben einer entscheidenden Funktion als wichtigster Faltungshelfer im ER und Assistenten der Translokation von Polypeptiden, obliegen BiP zellprotektive Aufgaben wie die Initiierung der UPR oder Inhibition der Caspasenaktivierung bei ER-Stress. Die Eingriffsmöglichkeiten des viralen Proteins 7a in Signalwege der Zelle sind durch eine Interaktion mit BiP demnach vielfältig. Da bei Infektion verschiedener Viren entsprechende Beobachtungen gemacht worden sind, oder ähnliche virale Strategien bereits beschrieben sind, war eine mögliche Auslösung von ER-Stress oder Aktivierung von UPR-Signalwegen durch das akzessorische 7a-Protein durch Interaktion mit BiP am naheliegendsten und daher Gegenstand der folgenden Experimente.

### 4.2.1 EINFLUSSNAHME DES 7A-PROTEINS AUF ER-STRESS UND UPR

Die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER führt zu ER-Stress und zur Auslösung der UPR, in dessen Folge die Expression verschiedener Faltungskomponenten wie u.a. BiP induziert wird. Ein deutlicher Anstieg der BiP-Expressionsmenge konnte in 7a-exprimierenden Zellen jedoch nicht festgestellt werden, lediglich 24 h nach der Transfektion kam es zur leichten, aber signifikanten Induktion. Der nicht signifikante Anstieg des BiP-Signals bei 72 h ist schwerlich mit der Expression des 7a-Proteins in Verbindung zu bringen, da diese im Vergleich zur Expressionsmenge bei 24 h deutlich erniedrigt war. Unabhängig der Stimuli kommt es in Folge von ER-Stress durch verschiedene UPR-Mediatoren wie IRE1 oder XBP1 zur Aktivierung von ER-Stress abhängigen Elementen (Schroder und Kaufman, 2005). In entsprechenden Luciferase-Reportergen-Assays konnte bei Expression des 7a-Proteins 24 und 48 h eine signifikante Induktion der Reportergen-Expression verzeichnet werden. Im Vergleich mit der ER-Stress Induktor vermittelten Aktivierung der Reportergen-Expression bei 48 h fiel sie jedoch sehr niedrig aus. Da Effekte auf die BiP-Expression und die Aktivierung von ER-Stress abhängigen Elementen nur schwach waren, ist davon auszugehen, dass die Expression des akzessorischen 7a-Proteins nicht zu ER-Stress führt. Demnach ist die Beeinträchtigung der Faltungstätigkeit durch eine mögliche sterische oder kompetitive Hemmung von BiP durch Interaktion mit dem 7a-Protein unwahrscheinlich. Möglicherweise sind die beobachteten schwachen Effekte der Überexpression eines zellfremden, viralen Proteins und so einer leichten Überbeanspruchung des ER zuzuschreiben.

Trotz des Ausschlusses einer ER-Stress auslösenden Funktion bleibt die Möglichkeit bestehen, dass 7a alleine oder durch eine Bindung an BiP eine ER-Stress unabhängige, direkte Aktivierung oder Modulation von UPR-Signalwegen bewirkt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der Phosphorylierungsgrad des Elongationsinitiationsfaktors eIF2alpha untersucht. Bei Expression des 7a-Proteins wurden jedoch nur schwache Effekte auf die eIF2alpha-Phosphorylierung und damit auf die Aktivität von PERK beobachtet. Lediglich 48 h nach der Transfektion kommt es zu einem leichten

Anstieg der eIF2alpha-Modifikation. Da zu diesem Zeitpunkt das 7a-Protein in geringerer Menge als bei 24 h vorhanden ist, sind auch diese Effekte kaum mit der Expression des 7a-Proteins in Verbindung zu bringen. Da die transfizierten Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits eine 100 % ige Konfluenz erreicht hatten, ist es denkbar, dass es im Medium zur Verknappung von Nährstoffen gekommen ist. Bei Mangel an Glucose kann durch erniedrigte ATP-Bildung oder verhinderte Glykosylierung die Faltung im ER erschwert sein, es kommt zur Aktivierung der PERK (Schroder und Kaufman, 2005). Die Phosphorylierung des eIF2alpha bei 48 h hängt somit möglicherweise nicht mit der Expression des 7a-Proteins zusammen, sondern könnte auf die Nährstoffmangel-abhängige Aktivierung der PERK zurückzuführen sein.

Die initiale Inhibierung der Proteintranslation durch Phosphorylierung des eIF2alpha durch PERK bei ER-Stress erfolgt nur transient (Novoa *et al.*, 2003), da zur späteren Expression von Faltungshelfern und Faltungsenzymen eine effektive Proteintranslation unerlässlich ist. Zum erfolgreichen Nachweis der Induktion der eIF2alpha-Phosphorylierung hätten die Zellen anstelle für 16 h möglicherweise für einen kürzeren Zeitraum mit Tunicamycin behandelt werden können. Bei Behandlung von Zellen mit den beiden ER-Stress Induktoren Tunicamycin und DTT für einen kürzeren Zeitraum konnte die Phosphorylierung des eIF2alpha aber bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Da im gezeigten Versuch die Behandlung zudem zur starken Induktion der BiP-Expression geführt hat, ist die effektive Auslösung von ER-Stress durch Tunicamycin gesichert und muss demnach zu einem früheren Zeitpunkt zur Phosphorylierung des eIF2alpha geführt haben. Aufgrund des begrenzten Zeitrahmens der Nachweisbarkeit der PERK-Aktivität sind Effekte der 7a-Expression auf den Phosphorylierungsgrad des eIF2alpha schwer zu ermitteln. Sinnvoll wäre die Zuhilfenahme eines induzierbaren Genexpressionssystems wie das Tet-on und Tet-off Systems gewesen, wodurch es erst durch Zugabe von Tetracyclin zur Induktion der 7a-Proteinexpression gekommen wäre. Eine Untersuchung des Phosphorylierungsgrades des eIF2alpha durch das 7a-Protein hätte dann kurz nach Induktion dessen Expression erfolgen können. Leider waren Versuche der lentiviralen Transduktion und stabilen Transfektion von VeroE6 Zellen mit 7a trotz Funktionalität der verwendeten Systeme ohne Erfolg. Eine konstante Inaktivierung der zellulären Proteintranslation durch persistente Phosphorylierung des eIF2alpha wie im Falle der Rotavirusinfektion und der Infektion mit dem Coronavirus MHV (Bechill *et al.*, 2008;Montero *et al.*, 2008) kann jedoch in jedem Fall ausgeschlossen werden.

Die beschriebene Hemmung der Proteintranslation und der Stopp der Zellzyklusprogression durch Inhibition der Bildung von Cyclinen und Cyclin/cdk-Komplexen durch das 7a-Protein (Kopecky-Bromberg *et al.*, 2006;Yuan *et al.*, 2006) kann demnach nicht der Phosphorylierung des Elongationsinitiationsfaktors zugeschrieben werden. Durch die eIF2alpha-abhängige Hemmung der Proteintranslation wird der NF-κB Inhibitor IκB nicht mehr gebildet, NF-κB kann folglich in den Nukleus der Zelle translozieren und die Expression einer Vielzahl von Genen u.a. die inflammatorischer Zytokine aktivieren (Jiang *et al.*, 2003;Deng *et al.*, 2004). Da keine Induktion der

eIF2alpha-Phosphorylierung gezeigt werden konnte, erfolgt somit auch die von Kanzawa *et al.* beschriebene Aktivierung des NF- $\kappa$ B durch Expression von 7a in HEK293T und A549 Zellen unabhängig von einer PERK-Aktivität (Kanzawa *et al.*, 2006).

Die Hemmung der generellen Proteintranslation durch *p*-eIF2alpha führt zur selektiven Aktivierung des ATF4 und kann so zur Induktion der Expression des proapoptotischen CHOP (c/ebp homologous protein) oder GADD153 (growth arrest und DNA damage inducible gene 153) führen (Schroder und Kaufman, 2005). Kann die Zelle bestehenden ER-Stress durch Signalwege des UPR nicht eliminieren, wird durch alternative UPR-Signalwege Apoptose ausgelöst. Oftmals ist die PERK-abhängige Induktion des proapoptotischen CHOP bei einer viralen Infektion der Zelle ursächlich für die Auslösung von Apoptose (Su *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005b; Medigeshi *et al.*, 2007). Da bei Expression des 7a-Proteins kein ER-Stress oder die Phosphorylierung des eIF2alpha beobachtet werden konnte, ist die Auslösung von Apoptose durch das 7a-Protein nicht mit der Aktivierung von PERK und dem phosphorylierten eIF2alpha in Zusammenhang zu bringen.

Anders als bei Behandlung mit den ER-Stress Induktoren DTT und Tunicamycin kommt es bei der Expression von 7a ebenfalls zu keinem Zeitpunkt zur verstärkten Prozessierung der XBP1-mRNA. Der leichte Anstieg der gesamten XBP1-Menge zum Zeitpunkt 48 h ist höchstwahrscheinlich auf eine gesteigerte RNA-Ausbeute durch die höhere Konfluenz der Zellen zu dem späteren Zeitpunkt zurückzuführen. Erst die Verwendung eines Referenzgens wie GAPDH bzw.  $\beta$ -Aktin könnte diese Annahme jedoch sicher bestätigen und quantitative Aussagen über die gesamte XBP1-Menge zulassen. Da in diesem Fall das Verhältnis der ungesplitten zur gesplitten mRNA-Variante entscheidend ist, und hier keine großen Effekte durch die 7a-Expression zu verzeichnen waren, wurde davon jedoch abgesehen. In 7a-exprimierenden Zellen kommt es im Vergleich zu mit dem Leervektor transfizierten Zellen zu keiner Erhöhung der gespleißten XBP1-mRNA, die Aktivierung der verantwortlichen IRE1 durch 7a kann somit ausgeschlossen werden.

Kanzawa *et al.* konnten zeigen, dass die transiente Expression des 7a-Proteins eine Phosphorylierung und somit Aktivierung der proapoptotischen JNK (c-Jun terminal kinase) in HEK293T zur Folge hat (Kanzawa *et al.*, 2006). JNK kann durch Phosphorylierung eine Deaktivierung von antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen und zugleich die Aktivitätssteigerung der proapoptotischen Bcl- bzw. BH3-Proteine und so die Auslösung von Apoptose bewirken (Urano *et al.*, 2000; Davis, 2000). Die Aktivierung der Kinase wird u.a. durch den UPR-Effektor IRE1 vermittelt (Urano *et al.*, 2000), der zugleich für die Prozessierung der XBP1-mRNA verantwortlich ist (Sidrauski und Walter, 1997). Da es bei Expression von 7a nicht zum übermäßigen Splicing der XBP1-mRNA gekommen ist, und folglich eine Aktivierung der IRE1 ausgeschlossen werden konnte, liegt die mögliche JNK-abhängige Auslösung von Apoptose durch 7a nicht der Aktivierung von IRE1 zu Grunde.

Durch Untersuchung des Expressionslevels des wichtigsten Faltungshelfers im ER, sowie Mediators des UPR und der Aktivierung ER-Stress abhängiger Promotorelemente im Nukleus der Zelle mittels Reporter-Gen-Assay konnte festgestellt werden, dass es bei Expression des 7a-Proteins nicht zu ER-Stress kommt. Eine Beeinflussung der Faltungsaktivitäten von BiP durch die Interaktion mit dem viralen Protein kann folglich ausgeschlossen werden. Durch Analyse des Phosphorylierungszustandes des eIF2alpha, sowie des Splicings der XBP1-mRNA konnte desweiteren eine Aktivierung von Signalwegen beschriebener UPR-Faktoren durch das akzessorische Protein des SARS-CoV ausgeschlossen werden. Zusammenfassend ist daher anzunehmen, dass beschriebene Effekte von 7a auf Proteintranslation, den Zellzyklus oder die Auslösung von Apoptose unabhängig von der Auslösung von ER-Stress oder der Initiation oder Beeinflussung von UPR-Signalwegen durch das Protein alleine oder durch eine Interaktion mit BiP sind.

#### **4.2.2 ALTERNATIVE WIRKUNGSMECHANISMEN DES 7A-PROTEINS DURCH INTERAKTION MIT BiP**

Die Auslösung von ER-Stress und Initiation oder Modulierung von UPR-Signalwegen von 7a durch Interaktion mit BiP konnte ausgeschlossen werden. Dennoch könnte die Assoziation des viralen Proteins mit BiP alternative Signalwege der Zelle beeinflussen oder von Bedeutung für die virale Replikation sein.

Ohne andere Caspasen massiv zu aktivieren, kommt es bei Infektion mit dem humanen respiratorischen Syncytialvirus (HRSV) zur Induktion der Apoptose durch die selektive Aktivierung der ER-assoziierten Caspase-12 (Bitko und Barik, 2001). Da die Aktivierung der Caspase durch Assoziation des Caspase-7/12-Komplexes mit BiP verhindert wird (Rao *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2003), ist es denkbar, dass die Bindung des membranständigen 7a-Proteins an BiP die Komplexbildung kompetitiv oder sterisch behindert. Folglich würde durch Initiation einer Caspasensignalkaskade die Auslösung von Apoptose bewirkt. Die Fähigkeit auf einem Caspasen-abhängigen Weg Apoptose in verschiedenen Zellen auslösen zu können wurde für das akzessorische 7a-Protein bereits gezeigt (Tan *et al.*, 2004a).

Durch die Interaktion des 7a mit BiP könnte es jedoch nicht nur zur Beeinflussung zellulärer Signalwege der Zelle, sondern auch zur gezielten Unterstützung der viralen Replikation kommen. So ist bei selektiver Degradation von BiP durch Subtilase-Cytotoxin zwar nicht die virale Proteinsynthese aber die Bildung von lebensfähigen HCMV-Virionen stark beeinträchtigt (Buchkovich *et al.*, 2008). Auch eine verhinderte Interaktion des Denguevirus Hüllproteins E mit BiP führt zur Reduktion viraler Titer (Limjindaporn *et al.*, 2009). Zugrunde liegende Mechanismen sind diesbezüglich zwar noch ungeklärt, eine entscheidende Funktion von BiP für eine virale Replikation ist aber nicht überraschend. So ist die effektive Faltung viraler Glykoproteine oftmals abhängig von der Interaktion mit dem Faltungshelfer BiP (Hammond und Helenius, 1994; Choukhi *et al.*, 1998; Tomita *et al.*,

1999;Knarr *et al.*, 1999;Cho *et al.*, 2003;Branza-Nichita *et al.*, 2004). Auch essentielle Aufgaben bei der Translokation von Polypeptiden in das ER machen BiP unerlässlich für die effektive virale Replikation. Erst die Translokation in das ER durch BiP ermöglicht neben der entsprechenden Faltung und Reifung den Transport viraler Proteine in ein entsprechendes Knospungskompartiment wie das ERGIC oder den Golgi-Apparat. Das 7a-Protein interagiert mit einem weiteren akzessorischen Protein 3a, sowie mit den Glykoproteinen S, M und E des SARS-CoV (Tan *et al.*, 2004c;Fielding *et al.*, 2006;Huang *et al.*, 2006), allesamt virale Proteine, die über den ER-abhängigen, sekretorischen Transport ihren Weg in das Knospungskompartiment finden (Yuan *et al.*, 2005;Nal *et al.*, 2005;Stertz *et al.*, 2007). Die Bildung eines Komplexes aus 7a, BiP und einem der viralen Proteine könnte möglicherweise deren Translokation und anschließende Faltung im ER erleichtern oder assistieren.

Durch Bindung an BiP könnte ein virales Protein auch die Retrotranslokation und so Degradation eines antiviralen Mediators bewirken. So kommt es durch Assoziation der beiden HCMV (humanes Cytomegalievirus) – Proteine US11 und US2 an BiP zur selektiven Retrotranslokation und zum proteasomalen Abbau von MHC Klasse 1 Molekülen (Wiertz *et al.*, 1996;Hegde *et al.*, 2006;Barel *et al.*, 2006), die entscheidend für die Antigenpräsentation sind. Da die fehlerhafte Ausführung einer adaptiven Immunantwort zur schweren Pathogenese fataler SARS-Fälle beigetragen hat (Cameron *et al.*, 2008), ist es denkbar, dass eine mögliche 7a-BiP-vermittelte Dislokation von antigenpräsentierenden Komponenten für eine Störung der Signaltransduktion der humoralen Immunantwort verantwortlich ist.

Die Interaktion des 7a-Proteins mit BiP könnte demnach die Auslösung von Apoptose über einen Caspasen-abhängigen Weg vermitteln, entscheidend für die Translokation oder Faltung viraler Proteine sein, die Eliminierung antiviraler Mediatoren der Zelle bewirken oder das SARS-CoV zur Umgehung der humoralen Immunantwort befähigen.

### 4.3 CHARAKTERISIERUNG DES 7A-PROTEINS

Die Identifikation eines zellulären Interaktors kann bei der Aufklärung der Funktion eines viralen Proteins in der infizierten Zelle hilfreich sein. Aber auch eine allgemeinere Charakterisierung durch beispielsweise Untersuchung von Abbauwegen oder der intrazellulären Lokalisierung kann Aufschluss über Aufgaben oder Funktionen eines viralen Proteins während der viralen Replikation geben. Da Untersuchungen, die mögliche Einflussnahme des viralen Proteins auf ER-Stress oder die UPR betreffend, zu keinen eindeutigen Aussagen geführt haben, wurde in weiterführenden Analysen eine eingehendere, allgemeine Charakterisierung des 7a-Proteins durchgeführt.

### 4.3.1 PROTEASOMALE DEGRADATION DES 7A-PROTEINS

Die beobachtete Instabilität eines 7a-HA Fusionsproteins legte die Vermutung nahe, dass das akzessorische 7a-Protein des SARS-CoV proteolytisch abgebaut wird. Versuche mit verschiedenen proteasomalen Inhibitoren konnten die proteasomale Degradation des viralen Proteins bestätigen. Expressionskinetiken unter Zuhilfenahme des Translationsinhibitors Cycloheximid konnten weiterführend zeigen, dass die Behandlung transfizierter Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 zur Verlängerung der 7a-Halbwertszeit von 4 h auf kalkulierte 18 – 21 h führt. Die Verwendung verschiedener Zelllinien machte zudem deutlich, dass die Stabilisierung des 7a-Proteins durch Hemmung des Proteasoms unabhängig vom Zelltyp ist.

Die Erkennung eines proteasomal abzubauenen Substrates durch die regulatorische Untereinheit des 26S Proteasoms erfolgt normalerweise durch die kovalente Modifikation mit Ubiquitin (Ciechanover und Schwartz, 1994). Neueste Studien zeigen, dass eine proteasomale Degradation auch unabhängig von der Polyubiquitylierung eines Substrates erfolgen kann (Orlowski und Wilk, 2003). So wird das zelluläre Tumorsuppressorgen p53 nicht ausschließlich über einen Ubiquitin-abhängigen Weg proteasomal degradiert und auch Proteine wie Calmodulin oder Troponin können ohne vorherige Ubiquitin-Modifikation vom Proteasom abgebaut werden (Asher *et al.*, 2002;Orlowski und Wilk, 2003). Auch für virale Proteine wie das adenovirale Daxx-Protein, das NS2-Protein des MMV (mice minute virus) und das F-Protein des Hepatitis-C-Virus ist eine proteasom-abhängige aber ubiquitin-unabhängige Degradation beschrieben (Miller und Pintel, 2001;Hwang und Kalejta, 2007;Yuksek *et al.*, 2009). Durch Immunopräzipitationsstudien bei proteasomaler Hemmung konnte jedoch die Akkumulation des polyubiquitylierten 7a-Proteins gezeigt und folglich bestätigt werden, dass die Markierung des 7a-Proteins zur proteasomalen Degradation über den klassischen Weg durch die Modifikation mit Ubiquitin erfolgt.

Durch Verwendung unterschiedlicher Inhibitoren und verschiedener Zelllinien, Durchführung einer Halbwertszeitbestimmung und dem Nachweis der Polyubiquitylierung des 7a-Proteins konnte verlässlich gezeigt werden, dass das 7a-Protein des SARS-CoV über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut wird. Aufgrund der wichtigen degradativen Funktion des UPS in der Zelle, haben Viren verschiedenste Strategien entwickelt, um sich diesen Abbauweg zum eigenen Vorteil zu Nutze zu machen (Gao und Luo, 2006). Eine Vielzahl von Viren induziert die proteasomale Degradation des IRF-3 Proteins (interferon regulatory factor 3) oder von STAT-Proteinen (signal transducer und activator of transcription), um die Entstehung eines anti-viralen Milieus in der Zelle durch Initiation der Interferon-Antwort zu verhindern (Bauhofer *et al.*, 2007;Chen *et al.*, 2007;Okumura *et al.*, 2008;Ashour *et al.*, 2009). Durch proteasomale Degradation von Komponenten des MHC-Komplexes (major histocompatibility complex) bzw. des CD4-Rezeptors können das humane Cytomegalievirus (HCMV) und das humane T-Zell-Leukämievirus 1 (HTLV-1) bzw. HIV-1 einer zellulären

Immunantwort entgehen (Wiertz *et al.*, 1996; Schubert *et al.*, 1998; Barel *et al.*, 2006). Dabei wird die Destabilisierung anti-viraler Proteine meist durch eine Virus-vermittelte Ubiquitylierung bewirkt (Viswanathan *et al.*, 2010). Aber auch die direkte Bindung an ein virales Protein wie im Falle der Interaktion des adenoviralen E1B-55K-Proteins mit dem apoptose-assoziierten Protein Daxx kann zu dessen proteasomaler Degradation führen (Schreiner *et al.*, 2010). Die Expression des p12-Protein des HTLV-1 ist gleichermassen instabil wie das 7a-Protein des SARS-CoV und wird nach entsprechender Ubiquitylierung proteasomal abgebaut (Trovato *et al.*, 1999). Gleichzeitig bindet es an die schweren Ketten von MHC-Klasse-1 Molekülen und bewirkt so deren gleichzeitige, rasche Retrotranslokation und Degradation durch das Proteasom (Johnson *et al.*, 2001). Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass auch das 7a-Protein durch Interaktion mit einer zellulären Komponente oder einem anti-viralen Protein und der folgenden gemeinsamen Degradation auf „altruistischem Wege“ dessen Destabilisierung bewirkt. Da eine Destabilisierung von BiP im Verlauf der Infektion mit dem SARS-CoV und die Interaktion des 7a-Proteins mit BiP in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist es denkbar, dass die Interaktion des viralen Proteins mit BiP dessen Degradation bewirkt. Obwohl keine bestechenden Homologien mit anderen viralen oder zellulären Proteinen in Strukturanalysen gefunden worden sind, so ähnelt die luminaire Domäne des 7a-Proteins mit seiner kompakten  $\beta$ -Sandwich Faltung Proteinen der Immunoglobulin-Familie (Hanel *et al.*, 2006). Das HCMV-Protein US2, das zur Degradation von MHC-Klasse 1 Proteinen führt (Wiertz *et al.*, 1996; Barel *et al.*, 2006), ist wie das 7a-Protein ein Transmembranprotein des Typ 1, das eine Immunoglobulin-ähnliche Faltung annimmt (Gewurz *et al.*, 2001). Folglich könnte das 7a-Protein ebenfalls durch Bindung und nachfolgender Degradation von MHC-Molekülen einen Beitrag zur Umgehung der Immunantwort während der SARS-Infektion leisten. In Betracht zu ziehen wäre jedoch auch die Möglichkeit, dass sich die Zelle aus zellprotektiven Gründen durch raschen proteasomalen Abbau des proapoptischen, zellwachstum-inhibierenden Proteins entledigt.

#### **4.3.2 LOKALISIERUNG DES 7A-PROTEINS**

Zur weiteren Charakterisierung des 7a-Proteins wurden eingehende Untersuchungen der 7a-Lokalisierung durchgeführt. In bisherigen Studien war sowohl die Lokalisierung des Proteins im ER, in Kompartimenten des ERGIC, sowie im Golgi-Apparat beschrieben worden (Fielding *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2005; Kopecky-Bromberg *et al.*, 2006). Das besondere Augenmerk der folgenden Immunfluoreszenzanalysen war somit auf eine mögliche Lokalisationsveränderung des 7a-Proteins im zeitlichen Verlauf der Expression gerichtet, die die bisher beschriebenen unterschiedlichen Lokalisierungen des Proteins erklären könnte. Desweiteren sollte die erwartete Akkumulation des 7a-Proteins im Zytosol der Zelle bei Inhibition des Proteasoms gezeigt werden. Durch konstante Neubildung des viralen Proteins durch Transkription des pcDNA3.1-7a Plasmids können intrazelluläre Lokalisierungsveränderungen nicht dokumentiert werden, da eine Unterscheidung von neugebildetem

und bereits transloziertem Protein nicht möglich ist. Wie bereits erwähnt, wäre auch in diesem Zusammenhang die Verwendung eines induzierbaren Genexpressionsystems von großem Vorteil gewesen. Nach kurzzeitiger Induktion der 7a-Genexpression und anschließender Abschaltung der Expression durch Entfernung des Induktors aus dem Kulturmedium hätte die Lokalisierung des Proteins, ähnlich wie in einem pulse-chase-Verfahren, verfolgt werden können. Bei Expression eines 7a-GFP Fusionsproteins wäre dies sogar in lebenden Zellen mittels Life-Cell-Imaging durchführbar gewesen. Da weder die Transduktion noch stabile Transfektion mit dem 7a-Protein erfolgreich durchgeführt werden konnte, mussten die Immunfluoreszenzanalysen unter Zuhilfenahme des Translationsinhibitors Cycloheximid durchgeführt werden. Die Inhibition der weiteren 7a-Proteinsynthese durch den Inhibitor sollte die Dokumentation der intrazellulären Lokalisierung ermöglichen oder Lokalisierungsveränderungen des bisher gebildeten 7a-Proteins zeigen.

In Übereinstimmung mit Studien von Nelson *et al.* und Kopecky-Bromberg *et al.* konnte in transfizierten Zellen eine deutlich perinukleäre, den Golgi-Zisternen entsprechende und mit dem Trans-Golgi-Marker Rab6 übereinstimmende Lokalisierung des 7a-Proteins beobachtet werden (Nelson *et al.*, 2005; Kopecky-Bromberg *et al.*, 2006). In transfizierten Zellen lokalisiert das 7a-Protein somit hauptsächlich im Golgi-Apparat. Da zu einem späteren Zeitpunkt die zusätzliche Co-Lokalisierung der 7a-Färbung mit dem ERGIC-Marker ERGIC-53, sowie in einzelnen Fällen mit dem ER-Marker Calnexin beobachtet werden konnte, ist anzunehmen, dass das Protein im Verlauf seines Lebenszyklus auch das ERGIC und ER frequenziert. Um in das Golgi-Kompartiment gelangen zu können, müssen Proteine das ER und später das Intermediärkompartiment passieren, die Lokalisierung des viralen Proteins im ERGIC oder ER war daher zu erwarten. Dass trotz Abbruch der weiteren Einschleusung neusynthetisierter Proteine durch Inhibition der Proteintranslation durch CHX das 7a-Protein sowohl im ER als auch im ERGIC angefärbt werden konnte, bedeutet, dass das 7a-Protein nicht im Golgi-Apparat verbleibt, sondern im Verlauf seines Lebenszyklus über ein ER-Retentions-signal in das ERGIC oder ER zurücktransportiert wird. Eine totale Lokalisierungsveränderung im Zeitverlauf des Experimentes konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei Hemmung der proteasomalen Degradation sollte es zur Retrotranslokation und Polyubiquitinylierung aber nicht zum proteasomalen Abbau eines Proteins im Zytosol kommen, folglich müsste die Behandlung der Zellen mit MG-132 zur Anreicherung des polyubiquitinylierten 7a-Proteins im Zytoplasma der Zelle führen. Die erwartete Ausbreitung der 7a-Färbung in die Peripherie bzw. ins Zytosol der Zelle konnte zwar beobachtet werden, erfolgte jedoch nicht in dem Maße wie erwartet. Vielmehr kam es durch die proteasomale Inhibition schon innerhalb der 6stündigen Versuchzeit zur deutlichen Intensivierung des 7a-Signals im Golgi-Apparat, die Stabilisierung des Proteins durch MG-132 konnte demnach erneut bestätigt werden. Neben der Anreicherung des Proteins im Golgi-Apparat konnte jedoch überraschenderweise auch eine massive Anreicherung des Proteins in ER-ähnlichen Strukturen verzeichnet werden. Die Anreicherung des 7a-

Proteins im Zytosol der Zelle setzt eine effektive Retrotranslokation voraus. Diese scheint jedoch bei proteasomaler Hemmung beeinträchtigt, da das Protein anstelle im Zytosol hauptsächlich im ER- und Golgi-Kompartiment akkumulierte.

Bei Inhibition des Proteasoms konnte neben dem verstärkten Signal der prozessierten Form auch das unprozessierte 7a-Protein mit ER-Signalpeptid im Western Blot nachgewiesen werden (**Abb. 22**). Nach Synthese des 7a-Proteins an Ribosomen des rauhen ERs kommt es durch das Signalpeptid am N-Terminus höchstwahrscheinlich zu dessen Translokation ins ER. Die 15 Aminosäuren umfassende Signalsequenz sollte dabei co-translational von Signalpeptidasen abgespalten und das Protein nach erfolgter Einschleusung ins ER gefaltet und an seinen Wirkungsort gebracht werden. Der Nachweis der unprozessierten Bande des 7a-Proteins im Western Blot, und eine kaum erfolgte Anreicherung des 7a-Proteins im Zytosol in IF-Analysen, lässt vermuten, dass bei MG-132-Behandlung eine weitere Einschleusung neusynthetisierter Proteine und folglich deren co-translationale Prozessierung (Kang *et al.*, 2006), sowie die effektive Retrotranslokation verhindert ist. Bei Inhibition des Proteasoms und folglich des ER-abhängigen Degradationsweges kommt es zur Ansammlung zu degradierender Proteine im ER und so zu ER-Stress. Möglicherweise werden, um eine weitere Überlastung zu verhindern, Translokationstätigkeiten eingeschränkt. So kommt es bei ER-Stress auch zur Attenuierung der Translokation des Prionproteins in das ER (Rane *et al.*, 2008). Möglicherweise wird bei proteasomaler Inhibition auch durch einfache mechanische Verstopfung der Sec61-Pore die Retrotranslokation verhindert. Gesetzt diesen Falls, müsste bei der direkten Induktion von ER-Stress der Nachweis der unprozessierten 7a-Form ebenfalls möglich sein. Bei Behandlung 7a-exprimierender Zellen mit dem ER-Stress Induktor Tunicamycin konnte jedoch trotz effektiver und deutlich massiverer Induktion von ER-Stress als bei proteasomaler Inhibition weder die Stabilisierung noch die unprozessierte Form des 7a-Proteins nachgewiesen werden. Die Translokation bzw. Prozessierung des 7a scheint somit trotz Störung der ER-Funktion zu erfolgen. Die Retrotranslokation muss bei ER-Stress funktionieren, da hierdurch die Proteinlast des ER durch Einschleusung akkumulierter Proteine in die ER-abhängige Degradation erniedrigt werden sollte.

Studien von Chillaron *et al.* zeigen, dass sowohl die Dissoziation eines unglykosylierten Proteins vom Retrotranslokator BiP als auch die Retrotranslokation selbst von der Funktionalität des Proteasoms abhängt (Chillaron und Haas, 2000). Auch bei Extraktion eines Transmembranproteins aus der ER-Membran zur Degradation scheint das Proteasom aktiv beteiligt (Mayer *et al.*, 1998). Dementsprechend konnte eine Assoziation verschiedener Proteasomkomponenten mit der ER-Membran als auch die physische Interaktion der Sec61 Pore mit der regulatorischen 19S Untereinheit des Proteasoms gezeigt werden (Brooks *et al.*, 2000; McCracken und Brodsky, 2003; Kalies *et al.*, 2005). In einem Modell von McCracken und Brodsky reguliert die Modifikation der Sec61-Pore, die sowohl zur Translokation als auch zur Retrotranslokation genutzt wird, ob durch Bindung von Ribosomen Polypeptide transloziert oder durch Bindung von Komponenten des Proteasoms Proteine

degradiert werden (McCracken und Brodsky, 2003). Bei Hemmung des Proteasoms könnte es auch durch die physische Interaktion der 19S-Untereinheit mit Sec61 zur Beeinflussung dessen Translokationsfunktion kommen, die sich im Folgenden auch auf die Translokation des 7a-Proteins auswirken könnte. Eine feine Justierung der proteasomalen Degradation durch die enge Kommunikation mit dem ER und der Translokationsmaschinerie auf noch ungeklärtem Wege ist sehr wahrscheinlich und scheint auch im Fall des 7a-Proteins für dessen eingeschränkte Translokation und co-translationale Prozessierung, sowie Retrotranslokation ins Zytosol während der proteasomalen Inhibition verantwortlich zu sein.

In Übereinstimmung mit der Literatur ließen bisherige Immunfluoreszenzanalysen schließen, dass sich das 7a-Protein zwischen den beiden Kompartimenten des ER und des Golgi-Apparates bewegt. Zum Transport vom ER in das Golgi-Kompartiment benötigen Proteine entsprechende Sortierungssignale oder Signalsequenzen, die eine Erkennung durch das COP II-Vesikeltransportsystem und so den Transport aus dem ER in den Golgi-Apparat ermöglichen. Tatsächlich verhindert die Mutation einer vermeintlichen Golgi-Signalsequenz am C-Terminus des 7a-Proteins ([Arg/Lys][X][Arg/Lys]) die Translokation des 7a-Proteins in den Golgi-Apparat und führt zur Verlagerung des rekombinanten Proteins ins ER (Nelson *et al.*, 2005). Auch bei Behandlung von Zellen mit Brefeldin A (BFA) kommt es zur vollständigen Umverteilung des normalerweise im Golgi-befindlichen Membran-Proteins des SARS-CoV in das ER (Nal *et al.*, 2005). Demzufolge müsste die Inhibierung des ER-Golgi-Transports durch BFA auch die Verlagerung ins oder Anhäufung des 7a-Proteins im ER zur Folge haben. Dementgegen wurde jedoch eine massive Destabilisierung des viralen Proteins bei Behandlung mit BFA beobachtet. Die Inhibition des ER-Golgi-Transports hat nicht die Akkumulation sondern möglicherweise die direkte Einschleusung des Proteins in den ER-abhängigen Degradationsweg zur Folge. Vielleicht bewirkt die Behandlung mit BFA anders als bei einer proteasomalen Inhibition keine Inhibition der Sec61 Pore durch Kommunikation zwischen ER und dem Proteasom, das 7a-Protein könnte folglich ungehindert retrotransloziert und degradiert werden. Bereits im Golgi-Apparat befindliches 7a-Protein scheint ebenfalls über das ER in das Zytosol retrotransloziert und hier abgebaut zu werden. So kommt es durch Brefeldin A innerhalb der kurzen Versuchszeitspanne zur deutlichen Destabilisierung des Proteins, die später mittels Immunoblotanalyse bestätigt werden konnte (**Abb. 32**). Zuletzt konnten nur noch einzelne vesikuläre Strukturen mit dem 7a-AK angefärbt werden. Hierbei handelt es sich möglicherweise um post-Golgi Vesikel, deren Proteine, darunter auch das 7a-Protein, nicht mehr oder zeitverzögert dem retrograden Transport zugeführt werden können.

Lokalisationsstudien im Zeitverlauf, sowie Untersuchungen der Lokalisierung bei Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren konnten die vornehmliche Golgi-Lokalisierung des 7a-Proteins zeigen. Untersuchungen bei proteasomaler Hemmung, sowie Hemmung des COPII-Vesikeltransports haben außerdem gezeigt, dass das 7a-Protein nicht ausschließlich im Golgi-Kompartiment vorliegt, sondern höchstwahrscheinlich durch ein ER-Retentionssignal an dessen C-Terminus in das ER zurückgelangen

kann. Der zwischenzeitliche Aufenthalt im ER scheint aber nur von kurzer Dauer zu sein, da die vornehmliche Lokalisierung im Golgi-Apparat den schnellstmöglichen Rücktransport des Proteins vom ER in den Golgi-Apparat wahrscheinlich macht.

Bei Expression eines zu untersuchenden viralen Proteins im Kontext der transienten Transfektion liegt das virale Protein alleine in der Zelle vor, mögliche virale Interaktionspartner fehlen. Auch wenn die Daten der 7a-Lokalisierung in transfizierten Zellen mit bisherigen Lokalisierungsstudien übereinstimmen, so gibt es bisher kaum Studien zur tatsächlichen 7a-Lokalisierung in infizierten Zellen. Aus diesem Grund sollte die Lokalisation des akzessorischen 7a-Proteins während der SARS-CoV Infektion dokumentiert werden. Das Protein konnte erstmalig 4-5 h nach Inokulation der Zellen mit SARS-CoV nachgewiesen werden. Da spätere Zeitkinetiken in infizierten Zellen gezeigt haben, dass das SARS-CoV sehr schnell repliziert und bereits nach 7-8 h ein Replikationszyklus beendet ist, ist anzunehmen, dass das 7a-Protein zu einem späten Zeitpunkt während der Infektion exprimiert und tatsächlich benötigt wird bzw. seine Funktion ausübt. Wenngleich eine Co-Lokalisierung des 7a-Proteins mit dem Golgi-Marker Rab6 auch in infizierten Zellen beobachtet werden konnte, so ist sie doch weniger ausgeprägt als in transfizierten Zellen. Ebenso kommt es zur leichten Veränderung des 7a-Expressionsmusters. Statt einer relativ lokal begrenzten, proximalen Golgi-Lokalisierung am Nukleus ist das Expressionsmuster des 7a-Proteins in infizierten Zellen von mehr diffuser, mehr in die Zellperipherie verbreiteter und vesikulärer Natur. Die deutliche Co-Lokalisierung mit dem ERGIC-Marker ERGIC-53, sowie dem ER-Marker Calnexin lassen annehmen, dass sich das 7a-Protein in infizierten Zellen vermehrt im ER und ERGIC aufhält. Leider war die 7a-Expression zu früheren Zeitpunkten zu schwach bzw. unterhalb der Nachweisgrenze, aussagekräftige Bilder konnten daher nicht aufgenommen werden. Das Expressionsmuster des Proteins unterschied sich jedoch nicht von der in gezeigten Aufnahmen (Daten nicht gezeigt).

Auch wenn eine grundsätzlich ähnliche Lokalisierung gezeigt werden konnte, erfolgt dennoch die überwiegende Lokalisierung des 7a-Proteins im Golgi-Apparat in transfizierten Zellen, während das Protein in infizierten Zellen hauptsächlich im ER und ERGIC verweilt. Wie eingangs angedeutet, sind die unterschiedlichen Expressionsmuster aber nicht unbedingt überraschend, sind doch während einer Infektion der Zelle mit dem SARS-CoV völlig andere Bedingungen gegeben als während der alleinigen Transfektion. 7a kann sowohl mit 3a, einem weiteren akzessorischen Transmembranprotein des SARS-CoV, mit dem E-Protein als auch mit den Glykoproteinen M und S interagieren (Tan *et al.*, 2004c;Fielding *et al.*, 2006;Huang *et al.*, 2006), die ebenfalls zur Faltung oder zur Einbettung in eine Membran das ER passieren oder zum Zusammenbau des Viruspartikels in das Intermediärkompartiment bzw. den Golgi-Apparat gelangen müssen (Yuan *et al.*, 2005;Nal *et al.*, 2005;Stertz *et al.*, 2007). Möglicherweise korreliert die Retrotranslokation des 7a-Proteins aus dem Golgi ins ER mit der dortigen Assoziation mit einem viralen Interaktionspartner. Auch die intrazelluläre Lokalisierung der Proteine S, M und E während der Infektion unterscheidet sich von der bei alleiniger Expression, da

scheinbar andere virale Faktoren fehlen, die für den koordinierten Transport der viralen Proteine von Bedeutung sind (Nal *et al.*, 2005). Unklar bleibt, welche Funktion das 7a im ER oder Golgi-Apparat ausübt. Im Zusammenhang einer Interaktion mit dem Faltungsassistenten BiP sind bereits einige Möglichkeiten aufgezeigt worden. Eine davon ist eine mögliche assistierende Funktion des 7a-Proteins bei der selektiven oder bevorzugten Translokation oder Faltung der viralen Interaktionspartner im ER im Komplex mit BiP. Da 7a neben einer Interaktion mit dem 3a-Protein auch sämtliche Komponenten des viralen Partikels binden kann, und sich alle beteiligten Proteine in entsprechenden Kompartimenten befinden, ist es nur wahrscheinlich, dass dem 7a-Protein Aufgaben während dem Zusammenbau des viralen Partikels obliegen. Doch wozu benötigt das 7a-Protein dann eine Signalsequenz, die dessen retrograden Transport vom Golgi-Apparat in das ER gewährleistet? Die Unklarheit darüber, wie die viralen Glykoproteine oder Strukturproteine in das Knospungskompartiment gelangen und die Tatsache, dass das akzessorische 7a-Protein mittels Signalsequenzen in der Lage scheint zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat zu „shutteln“, lässt vielmehr vermuten, dass es sich bei dem 7a-Protein möglicherweise um ein Transportprotein für virale Strukturproteine handeln könnte. So kommt es möglicherweise durch die Interaktion mit BiP zur Übertragung eines gefalteten, viralen Glykoproteins vom Faltungsassistenten auf das Transmembranprotein 7a und so zum Transport des viralen Cargoproteins in das ERGIC und/oder den Golgi-Apparat. Ist die Fracht abgeliefert, wandert 7a vermittelt durch sein ER-Retentions-Signal wieder zurück in das ER um ein weiteres Glykoprotein in das Knospungskompartiment zu transportieren. Möglicherweise fehlt in Ermangelung eines zu translozierenden, viralen Proteins in transfizierten Zellen der Impuls für die Retrotranslokation des 7a-Proteins vom Golgi-Apparat in das ER, was die hier beobachtete vorwiegende Lokalisierung des 7a-Proteins im Golgi-Apparat erklären würde. Huang *et al.* konnten zeigen, dass das 7a-Protein selbst Bestandteil des Virions ist (Huang *et al.*, 2006). Der Einbau des akzessorischen Proteins in Virus-ähnliche Partikel ist aber unabhängig von einer Interaktion mit dem 3a oder S-Protein (Huang *et al.*, 2006). Die Autoren schließen daraus, dass es sich bei dem akzessorischen 7a-Protein um ein weiteres Strukturprotein des SARS-CoV handelt. Müsste das 7a-Protein zum Einbau in das Viruspartikel in das Golgi-Kompartiment oder das ERGIC transloziert werden, wäre jedoch immer noch nicht erklärt, warum das Protein zwischen den Kompartimenten verkehrt und nach der Golgi-Lokalisierung wieder ins ER retrotransloziert.

In jedem Fall muss eine mögliche Transportleistung des 7a-Proteins durch ein anderes virales Protein assistiert werden oder parallel vollführt werden, da die Deletion der akzessorischen Proteine im Mausmodell keine drastischen Folgen für die effektive virale Replikation hat (Yount *et al.*, 2005). Wie eingangs beschrieben ist die Praktikabilität des klassischen Mausmodells für Untersuchungen molekularer Mechanismen des SARS-CoV umstritten. Eine deutliche Reduktion der SARS-CoV Titer bei Ausschaltung des ORF7 durch spezifische siRNA (small inhibiting RNA), und die beeinträchtigte DNA-Fragmentierung bei Auslösung der Apoptose (Akerstrom *et al.*, 2007; Schaecher *et al.*, 2007)

durch ein 7a-Deletionvirus lassen nichtsdestotrotz vermuten, dass dem akzessorischen 7a-Protein des SARS-CoV möglicherweise auch während der Replikation oder zumindest bei der Pathogenese des Virus eine Funktion zuzuschreiben ist. Die alleinige Untersuchung einer möglichen intrazellulären Funktion eines viralen Proteins im Kontext der transienten Transfektion kann nur begrenzt Auskunft über dessen Funktion oder Wirkungsweise während der Infektion geben. In diesem Zusammenhang wäre die Deletion des ORF7a im SARS-CoV Genom und eine anschließende Untersuchung der molekularen Mechanismen des Deletionsvirus mittels Reverser Genetik interessant gewesen. Auch wenn durch die vorgelegte Arbeit keine exakte Funktion des 7a-Proteins aufgezeigt werden konnte, so konnte doch die allgemeine Charakterisierung des viralen Proteins zum weiteren Verständnis seines Lebenswegs beitragen und dadurch die Grundlage für weiterführende Funktionsuntersuchungen des 7a-Proteins schaffen. Bereits vorgefasste Theorien in der Literatur bezüglich einer Transportfunktion des Proteins (Nelson *et al.*, 2005) oder der Beteiligung des akzessorischen 7a-Proteins an der Zusammensetzung des SARS-Partikels (Nelson *et al.*, 2005;Huang *et al.*, 2006) konnten zudem weiter bekräftigt werden.

#### **4.4 HEMMUNG DER SARS-COV REPLIKATION DURCH MG-132**

Zur Untersuchung einer möglichen Relevanz der Stabilisierung des 7a-Proteins während der Infektion wurden erste Infektionsversuche mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 durchgeführt. Entgegen aller Erwartung kam es in infizierten Zellen durch die MG-132-Behandlung jedoch zur Destabilisierung bzw. Unterbindung der Expression des akzessorischen 7a-Proteins. Weil die Expression des N-Proteins jedoch ebenfalls inhibiert war, war anzunehmen, dass der proteasomale Inhibitor die gesamte virale Proteinsynthese oder möglicherweise generell die virale Replikation beeinträchtigt. Tatsächlich führte die Behandlung infizierter Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor zur massiven, dosisabhängigen Reduktion viraler Titer. Dabei waren inhibitorische Effekte maximal wenn MG-132 während der Inokulation oder während der ersten beiden Stunden nach Inokulation im Medium vorhanden war. Durch Variation der Inokulationszeiten konnte festgestellt werden, dass das SARS-CoV innerhalb von 15 Minuten internalisiert wird. Bei Inokulation von Zellen mit SARS-CoV für 1 Stunde und erst nachfolgender Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor kam es nicht zur Reduktion viraler Titer (Daten nicht gezeigt), ein MG-132-sensitiver Schritt erfolgt somit zu einem frühen Zeitpunkt der viralen Replikation. Die Ergebnisse eines Zeitfensterversuchs und des Internalisierungsassays konnten letztendlich bestätigen, dass die Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 zur Inhibition initialer Replikationsschritte führt, ohne jedoch die Internalisierung zu beeinträchtigen. Obwohl bisherige Studien die Reduktion von MHV-Titern durch die generelle Inhibition des Proteasoms beschreiben (Yu und Lai, 2005;Ma *et al.*, 2010;Raaben *et al.*, 2010b), scheint der Effekt von MG-132 auf die SARS-CoV Replikation unabhängig von der Beeinträchtigung der proteasomalen Funktion zu sein. Trotz Verwendung in der Literatur beschriebener Inhibitor-

Konzentrationen und der Bestätigung der effektiven Hemmung des Proteasoms durch Nachweis polyubiquitinylierter Proteine und der Induktion der BiP-Expression kam es durch Behandlung infizierter Zellen mit den proteasomalen Inhibitoren Lactacystin und Bortezomib zu keinen nennenswerten, mit MG-132 vergleichbaren, Titerreduktionen. Das SARS-CoV wird in die Gruppe 2 der Coronaviren klassifiziert (Snijder *et al.*, 2003), ein gewisser Verwandtschaftsgrad zu dem murinen Hepatitisvirus ist somit gegeben. Nichtsdestotrotz handelt es sich bei beiden Viren um eigene Viruspezies. Die Infektion mit MHV führt in Mäusen abhängig vom Virus-Stamm zu Hepatitis, Gastroenteritis oder Enzephalitis (Haring und Perlman, 2001), in neugeborenen Mäusen verläuft die Infektion immer fatal. Das SARS-CoV infiziert demhingegen hauptsächlich Epithelien des respiratorischen oder gastrointestinalen Traktes, sowie Zellen des Immunsystems und verursacht im Menschen eine schwere atypische Lungenentzündung mit akuter Lymphozytopenie (Gu und Korteweg, 2007;Cameron *et al.*, 2008). Obwohl Mäuse mit dem SARS-CoV infizierbar sind (Subbarao *et al.*, 2004;Wentworth *et al.*, 2004), können bei der Infektion keine schweren histopathologischen Schäden oder eine entsprechende Symptomatik beobachtet werden (Subbarao *et al.*, 2004). Auch die Expression der zusätzlichen SARS-CoV spezifischen akzessorischen Proteine verdeutlicht die Unterscheidbarkeit des SARS-CoV von dem murinen Virus (Rota *et al.*, 2003;Marra *et al.*, 2003;Narayanan *et al.*, 2008). MG-132 verfügt im Vergleich zu anderen proteasomalen Inhibitoren über das größte Potential zur Hemmung der MHV-Replikation (Yu und Lai, 2005;Ma *et al.*, 2010). So führt eine Behandlung zur Linderung der zytopathischen Effekte im Lungengewebe MHV-1 infizierter A/J Mäuse (Ma *et al.*, 2010). Auch die Behandlung mit einem weiteren proteasomalen Inhibitor, Bortezomib, scheint eine positive Wirkung auf MHV-1 infizierte Mäuse zu haben (Ma *et al.*, 2010). Die Behandlung MHV-A59 infizierter C57B1/6 Mäuse mit Bortezomib führt hingegen zum Anstieg der viralen Titer und zur Verschlimmerung der Pathogenese (Raaben *et al.*, 2010a). Diese kontroversen *in vivo*-Daten stellen die Abhängigkeit der MHV-Replikation von der Funktionalität des Proteasoms in Frage. Möglicherweise ist die proteasomale Aktivität keine generelle Vorbedingung für eine effiziente Coronavirus-Replikation, sondern hängt vielmehr vom Virusstamm bzw. von der jeweiligen Viruspezies ab. In einer kürzlich veröffentlichten Studie postulieren Raaben *et al.* einen inhibitorischen Effekt verschiedener proteasomaler Inhibitoren auf die MHV, FIPV und SARS-CoV Replikation und schließen daraus eine grundlegende Abhängigkeit der effektiven Coronavirus-Replikation von der Funktion des Proteasoms (Raaben *et al.*, 2010b). Anders als in der hier vorliegenden Arbeit wird in dieser Studie nicht der Titer von neugebildeten, lebenden Viren bei unterschiedlichen Behandlungen ermittelt, sondern die Fluoreszenz von Zellen gemessen, die mit einem rekombinanten GFP-SARS-CoV infiziert wurden. Die Expression des, von einer subgenomischen RNA kodierten GFPs, bedeutet jedoch nicht dessen Einbau in das Virion und kann daher nicht mit der Produktion rekombinanter Viruspartikel gleichgesetzt werden. Zudem handelt es sich bei dem rekombinanten GFP-SARS-CoV um ein Deletionsvirus, da der gesamte ORF 7, der für

die akzessorischen Proteine 7a und 7b kodiert, mit der GFP-Sequenz ersetzt wurde (Sims *et al.*, 2005). Auch wenn die Deletion des ORF 7a im wenig vergleichbaren Mausmodell zu keiner drastischen Beeinträchtigung der viralen Replikation geführt hat (Yount *et al.*, 2005), so kommt es beim „knockdown“ des 7a/7b Proteins zur deutlichen SARS-CoV Titerreduktion in VeroE6 Zellen (Akerstrom *et al.*, 2007). Demnach sind Aussagen bezüglich möglicher Effekte der proteasomalen Hemmung auf ein Deletionsvirus nicht unbedingt auf das Wilytyp-Virus übertragbar. Auch die in der Studie verwendeten Konzentrationen von Bortezomib waren mit 1-50  $\mu\text{M}$  deutlich höher als die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen, da in eigenen Viabilitäts- und Vitalitätsassays die Behandlung von Vero Zellen für 16 h mit Konzentrationen über 80 nM schon starke zytotoxische Effekte zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt). Bei Behandlung SARS-CoV infizierter Zellen mit physiologischen und effektiv das Proteasom inhibierenden Konzentrationen von Lactacystin und Bortezomib konnte in der vorliegenden Arbeit kein Effekt beobachtet werden, eine Abhängigkeit der SARS-CoV Replikation von der Aktivität des Proteasoms ist daher unwahrscheinlich. Der oft verwendete Inhibitor MG-132 verfügt im Vergleich zu anderen proteasomalen Inhibitoren vielmehr über eine außergewöhnliche Fähigkeit, die Replikation des SARS-CoV zu verhindern.

#### **4.4.1 UNABHÄNGIGKEIT DES MG-132-EFFEKTES VON DER AUSLÖSUNG VON ER-STRESS ODER DER UPR**

Eine chemische Substanz kann die Replikation eines Virus in der Zelle auf unterschiedlichem Wege beeinflussen. Zum einen können intrazelluläre Prozesse, von denen die virale Replikation abhängt, wie die Proteintranslation oder der vesikuläre Transport beeinträchtigt sein oder es kann zur direkten Inhibition viraler Proteasen oder Polymerasen kommen. Andererseits könnte die Behandlung von MG-132 auch zu einer Form des zellulären Stresses führen, dessen Auswirkung der viralen Replikation zum Nachteil gereicht. Die Inhibition der proteasomalen Degradation durch MG-132 führt zur Anhäufung von Proteinen, die für die ER-abhängige Degradation bestimmt sind. Folglich kommt es zu ER-Stress und Initiation des UPR (Bush *et al.*, 1997; Lee und Goldberg, 1998; Obeng *et al.*, 2006). Alle verwendeten proteasomalen Inhibitoren verfügen jedoch über ein vergleichbares Potential die BiP-Expression zu induzieren, ER-Stress und die Initiation des UPR muss also in allen Fällen gleichermassen erfolgt sein. Da alleinig MG-132 über die Fähigkeit verfügt die SARS-CoV Replikation zu inhibieren, muss dessen potente Wirkung unabhängig von der Auslösung von ER-Stress oder des UPR sein.

Die massive Expression viraler Proteine durch das hoch-produktive und schnell replizierende SARS-CoV, deren Faltung und Reifung, im Besonderen von viralen Glykoproteinen, müsste zur Überbeanspruchung des ER führen. Dementsprechend führt die Expression des Glykoproteins S, sowie die Expression des 3a- und ORF6-Proteins in Zellkultur zur Auslösung von ER-Stress oder Induktion der BiP-Expression (Chan *et al.*, 2006; Versteeg *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2008).

Interessanterweise kam es bei mock-Behandlung SARS-CoV infizierter Zellen nicht zur Induktion, sondern vielmehr zur Reduktion der BiP-Expressionsmenge im Zeitverlauf. Obwohl die Ausweitung der Faltungskapazität des ER durch Induktion der Expression von Chaperonen förderlich für die virale Replikation wäre, könnten alternative Signalwege des UPR, wie die Auslösung der CHOP-abhängigen Apoptose, zu einem frühen Zeitpunkt der viralen Replikation schwerwiegende Konsequenzen für den Fortbestand des Virus haben. Tatsächlich haben verschiedene Viren Wege entwickelt Signalwege der UPR zu inhibieren oder zum eigenen Vorteil zu modifizieren (Isler *et al.*, 2005; Bechill *et al.*, 2008; Montero *et al.*, 2008; Xuan *et al.*, 2009). Eine Inhibierung des IRE1/XBP1-Signalweges wie im Falle des Hepatitis-C-Virus (Tardif *et al.*, 2004) könnte neben Auslösung der Apoptose durch die IRE1-abhängige Aktivierung der JNK auch die Aktivierung von XBP1-abhängigen Elementen (ERSE) und somit die Expression u.a. des BiP verhindern. Auch während der Infektion von COS-7 Zellen mit dem KOS-Stamm des Humanen Syncytialvirus 1 (HSV-1) kommt es zur Inhibierung der BiP-Synthese und zu dessen proteasomalen Abbaus (Mao *et al.*, 2001). Möglicherweise könnte die Inhibierung der BiP-mRNA-Synthese durch die Bindung eines viralen Proteins an dessen IRES-Sequenz vermittelt werden, wie bereits für das PTB-Protein (polypyrimidine tract-binding protein) des Japanischen Enzephalomyelitisvirus beschrieben (Kim *et al.*, 2000). Die Fähigkeit zur ähnlichen Inhibierung der BiP-Expression oder zur Beeinflussung von UPR-Signalwegen könnte daher auch dem SARS-CoV zugeschrieben werden. Da die alleinige Betrachtung der BiP-Expression jedoch nicht ausreicht, müsste in weiteren Analysen untersucht werden, ob das SARS-CoV tatsächlich über Fähigkeiten verfügt ER-Stress oder UPR-Signalwege aktiv zu modifizieren oder gar zu unterbinden.

#### **4.4.2 UNABHÄNGIGKEIT DER SARS-COV REPLIKATION UND DES MG-132-EFFEKTES VOM AUTOPHAGOSOMALEN SYSTEM**

Autophagie ist ein Prozess in allen eukaryotischen Zellen, bei dem es durch die Aufnahme langlebiger Proteine, Proteinaggregate oder sogar ganzer Organellen in Doppelmembranvesikel oder sogenannte Autophagosomen zu deren Transport zum Lysosom und durch Verschmelzung der beiden Vesikel zur Degradation des Vesikelinhalts durch lysosomale Proteasen kommt (Mizushima *et al.*, 2002; Kudchodkar und Levine, 2009). Neben der Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen wie Aufrechterhaltung der Zellhomöostase bei Nährstoffmangel (Kuma *et al.*, 2004; Mizushima, 2005), der Entwicklung (Melendez *et al.*, 2003; Levine und Klionsky, 2004; Qu *et al.*, 2007) oder an apoptotischen Prozessen (Mizushima *et al.*, 2008), ist Autophagie auch an einer intrinsischen Immunantwort beteiligt (Kudchodkar und Levine, 2009). So wird durch Autophagie-abhängige Signalwege nicht nur die Antigenpräsentation erleichtert, sondern auch die Produktion von Interferonen unterstützt (Dengjel *et al.*, 2005; Virgin und Levine, 2009). Durch autophagolysosomale Aufnahme und Degradation kann sich die Zelle direkt intrazellulärer Parasiten wie z.B. Viren,

jeglicher viraler Komponenten oder auch viraler, membranassoziierter Replikationsstätten entledigen – ein Prozess der als Xenophagie bezeichnet wird (Kudchodkar und Levine, 2009). Eine massive Induktion der Autophagosomenbildung durch MG-132, die hier in verschiedenen Zellen gezeigt werden konnte, und die sich daraus ergebende erhöhte Verschmelzungsrate von Autophagosomen mit endosomalen, Virus-enhaltenden Vesikeln könnte demzufolge zur Degradation der SARS-Partikel führen. Die mögliche antivirale Funktion des autophagosomalen Systems würde auch die Reduktion des LC3-Signals in SARS-CoV-infizierten Zellen im Zeitverlauf erklären. Möglicherweise verhindert das SARS-CoV durch Inhibierung der LC3-Expression die Bildung autophagosomaler Vesikel und so die eigene autophagosomale Degradation. Bei Behandlung der Zellen mit MG-132 würde der Inhibition von Autophagie durch das SARS-CoV jedoch massiv entgegengewirkt, Autophagie induziert und das Virus frühzeitig degradiert. Die Behandlung infizierter Zellen mit dem ausgewiesenen Autophagie-Induktor Glivec (Ertmer *et al.*, 2007) hatte jedoch unerwarteterweise keinen Einfluss auf die virale Replikation. Um die Beeinträchtigung autophagosomaler Wege durch MG-132 definitiv ausschließen zu können und auch eine mögliche Abhängigkeit der viralen Replikation von dem autophagosomalen Weg feststellen zu können, wurde in nachfolgenden Versuchen eine autophagiedefiziente Mauszelllinie verwendet (Kuma *et al.*, 2004). Die transiente Transfektion mit dem funktionellen Rezeptor des SARS-CoV, ACE2, ermöglichte in normalerweise nicht empfänglichen MEF-Zellen die effektive Virusreplikation und Virusproduktion. Da sowohl in WT als auch den autophagie-defizienten ATG5 *-/-* MEF das SARS-CoV gleichermaßen replizieren konnte, scheint das, für die Autophagosomenbildung essentielle Atg5-Protein, entbehrlich für die SARS-CoV Replikation. Während Komponenten des Autophagie-Systems wie das LC3-I Protein (non lipidated microtubule-associated protein 1 light chain 3) scheinbar essentiell für die Bildung der Doppelmembranvesikel bei Infektion mit MHV sind (Reggiori *et al.*, 2010), so scheint eine funktionale, autophagosomale Signalkaskade sowohl für die MHV- (Zhao *et al.*, 2007; Reggiori *et al.*, 2010), als auch für die SARS-CoV Replikation entbehrlich zu sein. Da das SARS-CoV in Autophagie-defizienten Zellen auch nicht in höherem Maße replizieren kann, kann eine antivirale Wirkung des autophagosomalen Systems auf die SARS-Replikation zudem ausgeschlossen werden. Die Behandlung der autophagiedefizienten MEF mit MG-132 hat ebenso wie in autophagiekompetenten WT MEF Zellen eine gleiche Reduktion viraler Titer zur Folge. Ungeachtet des hohen Potentials, sowohl in VeroE6 als auch in MEF-Zellen Autophagie auslösen zu können, ist der inhibitorische Effekt von MG-132 auf die SARS-CoV Replikation somit nicht mit der Beeinflussung des autophagosomalen Systems in Verbindung zu bringen.

#### 4.4.3 EINFLUSS VON CALPAIN-INHIBITOREN AUF DIE SARS-COV REPLIKATION

Ähnlich wie bei Ausschaltung eines Proteins durch Deletion der entsprechenden Sequenz im Genom der Zelle, oder durch Transfektion spezifischer siRNA und nachfolgender Untersuchung des Phenotyps, kann die Verwendung eines chemischen Inhibitors bei der Aufklärung der Funktion von intrazellulären Enzymen wie Proteasen dienen. Aufgrund enger Verwandtschaftsverhältnisse zellulärer Proteasen ist jedoch oftmals die Spezifität eines chemischen Inhibitors nicht zu garantieren und ein inhibitorischer Effekt kann möglicherweise auf die unspezifische Hemmung einer alternativen Protease beruhen. So hemmen die beiden Peptid-aldehyde ZLLaL und ALLN nicht nur effektiv die Aktivität von Calpainen, sondern inhibieren auch schwach andere Cystein-Proteasen wie die 20S-Untereinheit des Proteasoms (Vinitsky *et al.*, 1992; Tsubuki *et al.*, 1996). Das Tripeptid-aldehyd MG-132 (ZLLLal) ist ein weit verbreiteter, oft genutzter und effektiver Inhibitor des 20S-Proteasoms, inhibiert aber auch die Cystein-Protease m-Calpain (Tsubuki *et al.*, 1996). Da die Behandlung SARS-CoV infizierter Zellen mit dem Calpain-Inhibitor MDL28170 eine noch ausgeprägtere Reduktion viraler Titer als MG-132 bewirkt, ist davon auszugehen, dass MG-132 die SARS-CoV Replikation nicht durch Beeinträchtigung der proteasomalen Funktion, sondern durch Inhibition einer Calpain-Protease hemmt. Da MDL28170 beide Calpain-Isoformen (Mehdi, 1991) und MG-132 die m-Calpain-Protease hemmt, der Calpain-Inhibitor SJA6017, der vornehmlich  $\mu$ -Calpain hemmt (Inoue *et al.*, 2003), jedoch keinen Effekt auf die SARS-CoV Replikation hatte, scheint die Hemmung des m-Calpains für die massive Reduktion viraler Titer verantwortlich zu sein. Calpaine sind eine Klasse ubiquitär exprimierter Cystein-Proteasen, dessen spezifische Funktionen in der Zelle nicht vollständig aufgeklärt sind. Neben verschiedensten beschriebenen Funktionen sind sie an der Regulation von Zytoskelett-Membran-Interaktionen, an der Umstrukturierung des Zytoskeletts und somit auch am vesikulären Transport beteiligt (Beckerle *et al.*, 1987; Harris und Morrow, 1990; Huttenlocher *et al.*, 1997; Nixon, 2003). Während  $\mu$ -Calpain die zytosolische Fraktion der Calpain-Proteasen darstellt, liegt die m-Calpain Protease vornehmlich mit zellulären Membranen, Vesikelmembranen, intrazellulären Kompartimenten oder Lipid-Rafts assoziiert vor (Morford *et al.*, 2002; Kifor *et al.*, 2003; Upla *et al.*, 2008). Wie Coronaviren verfügen Picornaviren über ein einzelsträngiges RNA-Genom in positiver Orientierung und ihre Replikationsstätten liegen ebenfalls in Assoziation mit intrazellulären Membranstrukturen vor (Rueckert, 1996). Da die Konstitution des Replikationskomplexes des Picornavirus Echovirus-1 stark von der Aktivität der m-Calpain Protease abhängt, wäre es denkbar, dass die Protease ebenso unerlässlich für die Bildung des Replikationskomplexes des SARS-CoV an Doppelmembranvesikeln ist (Upla *et al.*, 2008). Interessanterweise hat die Behandlung infizierter Zellen mit den beiden Calpain-Inhibitoren unterschiedliche Effekte auf die virale Replikation. Die beiden heterodimeren Calpaine bestehen aus einer gleichen kleinen Untereinheit CAPNS1, unterscheiden sich jedoch in ihren großen Untereinheiten CAPN1 ( $\mu$ -Calpain) und CAPN2 (m-Calpain) (Melloni und Pontremoli, 1989; Saido *et al.*, 1994). Die großen katalytischen Untereinheiten

verfügen zwar über ähnliche Substratspezifitäten, unterscheiden sich jedoch in ihrer Anforderung an die benötigte Calcium-Konzentration (Melloni und Pontremoli, 1989; Saido *et al.*, 1994). Auch die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisierung der beiden Isoformen (Morford *et al.*, 2002; Kifor *et al.*, 2003; Upla *et al.*, 2008) könnte erklären, warum nur die Inhibition einer der beiden Calpain-Isoformen, nämlich diejenige, die an replikationsabhängigen Prozessen wie beispielsweise der Membranorganisation bei Bildung der Doppelmembranvesikel beteiligt ist, schwerwiegende Folgen für die Replikation des SARS-CoV hat. Dass es durch den Calpain-Inhibitor MDL28170 oder durch MG-132 auch zur Hemmung einer alternativen zellulären Cystein-Protease kommen könnte, ist letztlich nicht auszuschließen.

Neben inhibitorischen Effekten auf die zelluläre Cystein-Protease m-Calpain könnte MDL28170 oder MG-132 jedoch auch die Aktivität einer viralen Cystein-Protease beeinträchtigen. Das SARS-CoV verfügt anders als andere Coronaviren nicht über drei, sondern nur über zwei virale Proteasen, die chymotrypsin-ähnliche Cystein-Protease 3CL<sup>pro</sup>/M<sup>pro</sup> (main protease) und die papain-ähnliche Protease PLP<sup>pro</sup> (Thiel *et al.*, 2003; Ziebuhr, 2004). Durch autokatalytische Spaltung der großen Polyproteine 1a und 1ab kommt es zur Bildung der beiden Proteasen (Ziebuhr, 2004), die im Folgenden für die weitergehende Prozessierung der großen Polyproteine verantwortlich sind. Die so ermöglichte Bildung zahlreicher Nichtstrukturproteine (nsp), u. a. der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp), ermöglicht dann die Konstitution des SARS-CoV Replikationskomplexes (Ziebuhr, 2004). Da die Aktivität der Adenovirus-Protease durch MDL28170 gehemmt werden kann, oder Peptidaldehyde im allgemeinen die Wirkung der HIV-Protease beeinträchtigen können (Sarubbi *et al.*, 1993; Cotten und Weber, 1995), wäre auch eine Inhibition der viralen Proteasen durch MDL28170 und MG-132 denkbar. Die Expression eines nsp2-GFP-Fusionsproteins, das von einer subgenomischen RNA des rekombinanten MHV-nsp2-GFP kodiert wird, scheint durch die Behandlung infizierter Zellen mit MG-132 stärker beeinträchtigt zu sein als die Expression der viralen Proteasen (Raaben *et al.*, 2010b). Da die Expression einer subgenomischen RNA die effektive Transkription durch die virale RdRp voraussetzt, die Expression der viralen Proteasen aber nur von der Translation des viralen RNA-Genoms durch zelluläre Ribosomen und von autoproteolytischer Prozessierung abhängt, spricht dafür, dass es durch MG-132 zur Inhibition der RNA-Synthese kommen könnte. Ob MG-132 die Inhibition der effektiven Transkription durch eine Inhibition der Prozessierung der Polyproteine durch Hemmung der viralen Proteasen oder durch Störung der Doppelmembranvesikelbildung und Verhinderung der Konstitution des Replikationskomplexes bewirkt, bleibt unklar. Möglich sind auch inhibitorische Effekte von MG-132 oder MDL28170 auf die transkriptionelle Aktivität der viralen RdRp. Interessanterweise kommt es durch Bindung der Aurintricarboxysäure (ATA) an die virale RdRp zur Inhibition der SARS-CoV Replikation (Yap *et al.*, 2005). In der Studie von Yap *et al.* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass neben einer Bindungsaffinität für die virale Polymerase, ATA gleichermassen effektiv die Aktivität der Protease m-Calpain hemmt (Yap *et al.*, 2005). Da die SARS-CoV RdRp

demzufolge eine strukturelle Ähnlichkeit mit m-Calpain aufweisen muss, könnte die Reduktion der SARS-CoV Titer auch auf die Inhibition der RNA-Synthese durch Hemmung der viralen Polymerase zurückzuführen sein.

Die durchgeführten Infektionsversuche konnten zusammenfassend zeigen, dass die Behandlung von infizierten Zellen mit MG-132 zu einem frühen Zeitpunkt während der SARS-Replikation zur massiven Reduktion viraler Titer führt. Dabei sind inhibitorische Effekte nicht auf die Beeinträchtigung des proteasomalen oder autophagosomalen Systems, sondern auf Inhibition einer m-Calpain-Aktivität zurückzuführen. Ob die Aktivität einer zellulären m-Calpain-Protease oder einer viralen m-Calpain-Protease durch MG-132 betroffen ist, bleibt ungeklärt. Nichtsdestotrotz ist die Verwendung von Calpain-Inhibitoren ein probates Mittel zur Inhibition der SARS-CoV Replikation *in vitro* und könnte nach Verbesserung von Wirksamkeiten auch in der Behandlung einer SARS-CoV Infektion Anwendung finden.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Akerstrom,S., Mirazimi,A., Tan,Y.J. (2007). Inhibition of SARS-CoV replication cycle by small interference RNAs silencing specific SARS proteins, 7a/7b, 3a/3b and S. *Antiviral Research* 73, 219-227.
- Ambrose,R.L., Meckenzie,J.M. (2011). West nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion. *Journal of Virology* 85, 2723-2732.
- Andries,K., Pensaert,M.B. (1980). Immunofluorescence Studies on the Pathogenesis of Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus-Infection in Pigs After Oronasal Inoculation. *American Journal of Veterinary Research* 41, 1372-1378.
- Arden,K.E., Nissen,M.D., Sloots,T.P., Mackay,I.M. (2005). New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *Journal of Medical Virology* 75, 455-462.
- Asher,G., Lotem,J., Sachs,L., Kahana,C., Shaul,Y. (2002). Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13125-13130.
- Ashour,J., Laurent-Rolle,M., Shi,P.Y., Garcia-Sastre,A. (2009). NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation. *Journal of Virology* 83, 5408-5418.
- Barel,M.T., Hassink,G.C., van Voorden,S., Wiertz,E.J.H.J. (2006). Human cytomegalovirus-encoded US2 and US11 target unassembled MHC class I heavy chains for degradation. *Molecular Immunology* 43, 1258-1266.
- Barry,G., Fragkoudis,R., Ferguson,M.C., Lulla,A., Merits,A., Kohl,A., Fazakerley,J.K. (2010). Semliki Forest Virus-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Accelerates Apoptotic Death of Mammalian Cells. *Journal of Virology* 84, 7369-7377.
- Bastien,N., Anderson,K., Hart,L., Van Caesele,P., Brandt,K., Milley,D., Hatchette,T., Weiss,E.C., Li,Y. (2005). Human coronavirus NL63 infection in Canada. *Journal of Infectious Diseases* 191, 503-506.
- Bauhofer,O., Summerfield,A., Sakoda,Y., Tratschin,J.D., Hofmann,M.A., Ruggli,N. (2007). Classical swine fever virus N-pro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *Journal of Virology* 81, 3087-3096.
- Bechill,J., Chen,Z.B., Brewer,J.W., Baker,S.C. (2008). Coronavirus infection modulates the unfolded protein response and mediates sustained translational repression. *Journal of Virology* 82, 4492-4501.
- Beckerle,M.C., Burrige,K., Demartino,G.N., Croall,D.E. (1987). Colocalization of Calcium-Dependent Protease-Ii and One of Its Substrates at Sites of Cell-Adhesion. *Cell* 51, 569-577.
- Beckmann,R., Bubeck,D., Grassucci,R., Penczek,P., Verschoor,A., Blobel,G., Frank,J. (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the Ribosome-Sec61 complex. *Science* 278, 2123-2126.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 6641-6646.

Bitko, V., Barik, S. (2001). An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. *Journal of Cellular Biochemistry* *80*, 441-454.

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-Journal of the American Medical Association* *289*, 2801-2809.

Branza-Nichita, N., Lazar, C., Dwek, R.A., Zitzmann, N. (2004). Role of N-glycan trimming in the folding and secretion of the pestivirus protein E-rns. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *319*, 655-662.

Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G.F., Hendil, K.B., Rivett, A.J. (2000). Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal* *352*, 611-615.

Brostrom, C.O., Prostko, C.R., Kaufmann, R.J., Brostrom, M.A. (1996). Inhibition of translational initiation by activators of the glucose-regulated stress protein and heat shock protein stress response systems - Role of the interferon-inducible double-stranded RNA-activated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase. *Journal of Biological Chemistry* *271*, 24995-25002.

Brostrom, M.A., Brostrom, C.O. (2003). Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability. *Cell Calcium* *34*, 345-363.

Buchholz, U.J., Bukreyev, A., Yang, L.J., Lamirande, E.W., Murphy, B.R., Subbarao, K., Collins, P.L. (2004). Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 9804-9809.

Buchkovich, N.J., Maguire, T.G., Yu, Y., Paton, A.W., Paton, J.C., Alwine, J.C. (2008). Human cytomegalovirus specifically controls the levels of the endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78, which is required for virion assembly. *Journal of Virology* *82*, 31-39.

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*, 2122-2127.

Bush, K.T., Goldberg, A.L., Nigam, S.K. (1997). Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 9086-9092.

Cameron, M.J., Bermejo-Martin, J.F., Danesh, A., Muller, M.P., Kelvin, D.J. (2008). Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Virus Research* *133*, 13-19.

Canducci, F., Debiaggi, M., Sampaolo, M., Marinozzi, M.C., Berre, S., Terulla, C., Gargantini, G., Cambieri, P., Romero, E., Clementi, M. (2008). Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *Journal of Medical Virology* *80*, 716-723.

- Cavanagh,D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Research* 38, 281-297.
- Chan,C.P., Siu,K.L., Chin,K.T., Yuen,K.Y., Zheng,B.J., Jin,D.Y. (2006). Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of Virology* 80, 9279-9287.
- Chan,H.L.Y., Leung,W.K., To,K.F., Chan,P.K.S., Lee,N., Wu,A., Tam,J.S.L., Sung,J.J.Y. (2004a). Retrospective analysis of liver function derangement in severe acute respiratory syndrome. *American Journal of Medicine* 116, 566-567.
- Chan,P.K.S., To,K.F., Lo,A.W.I., Cheung,J.L.K., Chu,I., Au,F.W.L., Tong,J.H.M., Tam,J.S., Sung,J.J.Y., Ng,H.K. (2004b). Persistent infection of SARS coronavirus in colonic cells in vitro. *Journal of Medical Virology* 74, 1-7.
- Chen,Y.Y., Shuang,B., Tan,Y.X., Meng,M.J., Han,P., Mo,X.N., Song,Q.S., Qiu,X.Y., Luo,X., Gan,Q.N., Zhang,X., Zheng,Y., Liu,S.A., Wang,X.N., Zhong,N.S., Ma,D.L. (2005). The protein X4 of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus is expressed on both virus-infected cells and lung tissue of severe acute respiratory syndrome patients and inhibits growth of Balb/c 3T3 cell line. *Chinese Medical Journal* 118, 267-274.
- Chen,Z.H., Rijnbrand,R., Jangra,R.K., Devaraj,S.G., Qu,L., Ma,Y.H., Lemon,S.M., Li,K. (2007). Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhea virus. *Virology* 366, 277-292.
- Cheng,V.C.C., Lau,S.K.P., Woo,P.C.Y., Yuen,K.Y. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 660-+.
- Cheung,C.Y., Poon,L.L.M., Ng,I.H.Y., Luk,W., Sia,S.F., Wu,M.H.S., Chan,K.H., Yuen,K.Y., Gordon,S., Guan,Y., Peiris,J.S.M. (2005). Cytokine responses in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected macrophages in vitro: possible relevance to pathogenesis. *Journal of Virology* 79, 7819-7826.
- Chillaron,J., Haas,I.G. (2000). Dissociation from BiP and retrotranslocation of unassembled immunoglobulin light chains are tightly coupled to proteasome activity. *Molecular Biology of the Cell* 11, 217-226.
- Chiu,S.S., Chan,K.H., Chu,K.W., Kwan,S.W., Guan,Y., Poon,L.L.M., Peiris,J.S.M. (2005). Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong Kong, China. *Clinical Infectious Diseases* 40, 1721-1729.
- Cho,D.Y., Yang,G.H., Ryu,C.J., Hong,H.J. (2003). Molecular chaperone GRP78/BiP interacts with the large surface protein of hepatitis B virus in vitro and in vivo. *Journal of Virology* 77, 2784-2788.
- Choukhi,A., Ung,S., Wychowski,C., Dubuisson,J. (1998). Involvement of endoplasmic reticulum chaperones in the folding of hepatitis C virus glycoproteins. *Journal of Virology* 72, 3851-3858.
- Chu,K.H., Tsang,W.K., Tang,C.S., Lam,M.F., Lai,F.M., To,K.F., Fung,K.S., Tang,H.L., Yan,W.W., Chan,H.W.H., Lai,T.S.T., Tong,K.L., Lai,K.N. (2005). Acute renal impairment in coronavirus-associated severe acute respiratory syndrome. *Kidney International* 67, 698-705.
- Ciechanover,A., Schwartz,A.L. (1994). The Ubiquitin-Mediated Proteolytic Pathway - Mechanisms of Recognition of the Proteolytic Substrate and Involvement in the Degradation of Native Cellular Proteins. *Faseb Journal* 8, 182-191.

- Cinatl,J., Hoever,G., Morgenstern,B., Preiser,W., Vogel,J.U., Hofmann,W.K., Bauer,G., Michaelis,M., Rabenau,H.F., Doerr,H.W. (2004). Infection of cultured intestinal epithelial cells with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 2100-2112.
- Clark,M.A. (1993). Bovine Coronavirus. *British Veterinary Journal* 149, 51-70.
- Cotten,M., Weber,J.M. (1995). The Adenovirus Protease Is Required for Virus Entry Into Host-Cells. *Virology* 213, 494-502.
- Coux,O., Tanaka,K., Goldberg,A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry* 65, 801-847.
- Davis,R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.
- de Haan,C.A.M., Masters,P.S., Shen,X.L., Weiss,S., Rottier,P.J.M. (2002). The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology* 296, 177-189.
- de Haan,C.A.M., Rottier,P.J.M. (2006). Hosting the severe acute respiratory syndrome coronavirus: specific cell factors required for infection. *Cellular Microbiology* 8, 1211-1218.
- Deng,J., Lu,P.D., Zhang,Y.H., Scheuner,D., Kaufman,R.J., Sonenberg,N., Harding,H.P., Ron,D. (2004). Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Molecular and Cellular Biology* 24, 10161-10168.
- Dengjel,J., Schoor,O., Fischer,R., Reich,M., Kraus,M., Muller,M., Kreymborg,K., Altenberend,F., Brandenburg,J., Kalbacher,H., Brock,R., Driessen,C., Rammensee,H.G., Stevanovic,S. (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7922-7927.
- Diemer,C., Schneider,M., Seebach,J., Quaas,J., Frosner,G., Schatzl,H.M., Gilch,S. (2008). Cell type-specific cleavage of nucleocapsid protein by effector caspases during SARS coronavirus infection. *Journal of Molecular Biology* 376, 23-34.
- Ding,W.X., Ni,H.M., Gao,W.T., Yoshimori,T., Stolz,D.B., Ron,D., Yin,X.M. (2007). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *American Journal of Pathology* 171, 513-524.
- Ding,Y.Q., Wang,H.J., Shen,H., Li,Z.G., Geng,J., Han,H.X., Cai,J.J., Li,X., Kang,W., Weng,D.S., Lu,Y.D., Wu,D.H., He,L., Yao,K.T. (2003). The clinical pathology of severe acute respiratory syndrome (SARS): a report from China. *Journal of Pathology* 200, 282-289.
- Dominguez,S.R., Robinson,C.C., Holmes,K.V. (2009). Detection of Four Human Coronaviruses in Respiratory Infections in Children: A One-Year Study in Colorado. *Journal of Medical Virology* 81, 1597-1604.
- Donnelly,C.A., Ghani,A.C., Leung,G.M., Hedley,A.J., Fraser,C., Riley,S., Abu-Raddad,L.J., Ho,L.M., Thach,T.Q., Chau,P., Chan,K.P., Lam,T.H., Tse,L.Y., Tsang,T., Liu,S.H., Kong,J.H.B., Lau,E.M.C., Ferguson,N.M., Anderson,R.M. (2003). Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* 361, 1761-1766.
- Drexler,J.F., Gloza-Rausch,F., Glende,J., Corman,V.M., Muth,D., Goettsche,M., Seebens,A., Niedrig,M., Pfeifferle,S., Yordanov,S., Zhelyazkov,L., Hermanns,U., Vallo,P., Lukashev,A., Muller,M.A., Deng,H.K., Herrler,G., Drosten,C. (2010). Genomic Characterization of Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus in European Bats and Classification of Coronaviruses

- Based on Partial RNA-Dependent RNA Polymerase Gene Sequences. *Journal of Virology* 84, 11336-11349.
- Drosten,C., Gunther,S., Preiser,W., van der Werf,S., Brodt,H.R., Becker,S., Rabenau,H., Panning,M., Kolesnikova,L., Fouchier,R.A.M., 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.M.E., Schmitz,H., Doerr,H.W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine* 348, 1967-1976.
- Ebihara,T., Endo,R., Ma,X.M., Ishiguro,N., Kikuta,H. (2005). Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. *Journal of Medical Virology* 75, 463-465.
- Enjuanes, L. and van der Zeijst. Molecular basis of TGE coronavirus epidemiology. *The Coronaviridae* , 337-376. 1995.
- Ref Type: Magazine Article
- Ertmer,A., Huber,V., Gilch,S., Yoshimori,T., Erfle,V., Duyster,J., Elsasser,H.P., Schatzl,H.M. (2007). The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia* 21, 936-942.
- Esper,F., Weibel,C., Ferguson,D., Landry,M.L., Kahn,J.S. (2005). Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *Journal of Infectious Diseases* 191, 492-498.
- Esper,F., Weibel,C., Ferguson,D., Landry,M.L., Kahn,J.S. (2006). Coronavirus HKU1 infection in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 12, 775-779.
- Farcas,G.A., Poutanen,S.M., Mazzulli,T., Willey,B.M., Butany,J., Asa,S.L., Faure,P., Akhavan,P., Low,D.E., Kain,K.C. (2005). Fatal severe acute respiratory syndrome is associated with multiorgan involvement by coronavirus. *Journal of Infectious Diseases* 191, 193-197.
- Fielding,B.C., Gunalan,V., Tan,T.H.P., Chou,C.F., Shen,S., Khan,S., Lim,S.G., Hong,W., Tan,Y.J. (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 7a interacts with hSGT. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343, 1201-1208.
- Fielding,B.C., Tan,Y.J., Shuo,S., Tan,T.H.P., Ooi,E.E., Lim,S.G., Hong,W.J., Goh,P.Y. (2004). Characterization of a unique group-specific protein (U122) of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Virology* 78, 7311-7318.
- Finley,D., Bartel,B., Varshavsky,A. (1989). The Tails of Ubiquitin Precursors Are Ribosomal-Proteins Whose Fusion to Ubiquitin Facilitates Ribosome Biogenesis. *Nature* 338, 394-401.
- Flynn,G.C., Pohl,J., Flocco,M.T., Rothman,J.E. (1991). Peptide-Binding Specificity of the Molecular Chaperone Bip. *Nature* 353, 726-730.
- Freiden,P.J., Gaut,J.R., Hendershot,L.M. (1992). Interconversion of 3 Differentially Modified and Assembled Forms of Bip. *Embo Journal* 11, 63-70.
- Gallagher,T.M., Buchmeier,M.J. (2001). Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. *Virology* 279, 371-374.
- Gao,G., Luo,H.L. (2006). The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84, 5-14.
- Garrido,J.L., Maruo,S., Takada,K., Rosendorff,A. (2009). EBNA3C interacts with Gadd34 and counteracts the unfolded protein response. *Virology Journal* 6.

- Garwes,D.J. (1988). Transmissible Gastroenteritis. *Veterinary Record* 122, 462-463.
- Gaunt,E.R., Hardie,A., Claas,E.C.J., Simmonds,P., Templeton,K.E. (2010). Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 2940-2947.
- Geng,H., Liu,Y.M., Chan,W.S., Lo,A.W.I., Au,D.M.Y., Waye,M.M.Y., Ho,Y.Y. (2005). The putative protein 6 of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus: Expression and functional characterization. *Febs Letters* 579, 6763-6768.
- Gething,M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10, 465-472.
- Gewurz,B.E., Gaudet,R., Tortorella,D., Wang,E.W., Ploegh,H.L., Wiley,D.C. (2001). Antigen presentation subverted: Structure of the human cytomegalovirus protein US2 bound to the class I molecule HLA-A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6794-6799.
- Goldsmith,C.S., Tatti,K.M., Ksiazek,T.G., Rollin,P.E., Comer,J.A., Lee,W.W., Rota,P.A., Bankamp,B., Bellini,W.J., Zaki,S.R. (2004). Ultrastructural characterization of SARS coronavirus. *Emerging Infectious Diseases* 10, 320-326.
- Gorlich,D., Prehn,S., Hartmann,E., Kalies,K.U., Rapoport,T.A. (1992). A Mammalian Homolog of Sec61P and Secyp Is Associated with Ribosomes and Nascent Polypeptides During Translocation. *Cell* 71, 489-503.
- Groneberg,D.A., Hilgenfeld,R., Zabel,P. (2005). Molecular mechanisms of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Respiratory Research* 6.
- Gu,J., Korteweg,C. (2007). Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *American Journal of Pathology* 170, 1136-1147.
- 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.M., Poon,L.L.M. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science* 302, 276-278.
- Guo,Y., Korteweg,C., Mcnutt,M.A., Gu,J. (2008). Pathogenetic mechanisms of severe acute respiratory syndrome. *Virus Research* 133, 4-12.
- Haas,I.G., Wabl,M. (1983). Immunoglobulin Heavy-Chain Binding-Protein. *Nature* 306, 387-389.
- Hamman,B.D., Hendershot,L.M., Johnson,A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747-758.
- Hamming,I., Timens,W., Bulthuis,M.L.C., Lely,A.T., Navis,G.J., van Goor,H. (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *Journal of Pathology* 203, 631-637.
- Hammond,C., Helenius,A. (1994). Folding of Vsv G-Protein - Sequential Interaction with Bip and Calnexin. *Science* 266, 456-458.
- Han,Y., Geng,H., Teng,W., Tang,X., Ou,A., Lao,Y., Xu,Y., Lin,H., Liu,H., Li,Y. (2003). A follow-up

- study of 69 discharged SARS patients. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 23, 214-217.
- Hanel,K., Stangler,T., Stoldt,M., Willbold,D. (2006). Solution structure of the X4 protein coded by the SARS related coronavirus reveals an immunoglobulin like fold and suggests a binding activity to integrin I domains. *Journal of Biomedical Science* 13, 281-293.
- Hanel,K., Willbold,D. (2007). SARS-CoV accessory protein 7a directly interacts with human LFA-1. *Biological Chemistry* 388, 1325-1332.
- Harding,H.P., Novoa,I., Zhang,Y.H., Zeng,H.Q., Wek,R., Schapira,M., Ron,D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell* 6, 1099-1108.
- Harding,H.P., Zhang,Y.H., Ron,D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.
- Haring,J., Perlman,S. (2001). Mouse hepatitis virus. *Current Opinion in Microbiology* 4, 462-466.
- Harris,A.S., Morrow,J.S. (1990). Calmodulin and Calcium-Dependent Protease-I Coordinately Regulate the Interaction of Fodrin with Actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 3009-3013.
- He,B. (2006). Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death and Differentiation* 13, 393-403.
- He,R.T., Leeson,A., Ballantine,M., Andonov,A., Baker,L., Dobie,F., Li,Y., Bastien,N., Feldmann,H., Strocher,U., Theriault,S., Cutts,T., Cao,J.X., Booth,T.F., Plummer,F.A., Tyler,S., Li,X.G. (2004). Characterization of protein-protein interactions between the nucleocapsid protein and membrane protein of the SARS coronavirus. *Virus Research* 105, 121-125.
- Hegde,N.R., Chevalier,M.S., Wisner,T.W., Dentono,M.C., Shire,K., Frappier,L., Johnson,D.C. (2006). The role of BiP in endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain induced by cytomegalovirus proteins. *Journal of Biological Chemistry* 281, 20910-20919.
- Hendley,J.O., Gwaltney,J.M., FISHBURN,HB (1972). Coronavirus Infections in Working Adults 8-Year Study with 229 e and Oc 43. *American Review of Respiratory Disease* 105, 805-&.
- Hicke,L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 195-201.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7988-7993.
- Hofmann,H., Simmons,G., Rennekamp,A.J., Chaipan,C., Gramberg,T., Heck,E., Geier,M., Wegele,A., Marzi,A., Bates,P., Pohlmann,S. (2006). Highly conserved regions within the spike proteins of human coronaviruses 229E and NL63 determine recognition of their respective cellular receptors. *Journal of Virology* 80, 8639-8652.
- Holmes,K.V., Lai,M.M.C. (1996). Coronaviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields Virology*.
- Hovi,T., Kainulainen,H., Ziola,B., Salmi,A. (1979). Oc43 Strain-Related Coronavirus Antibodies in

- Different Age-Groups. *Journal of Medical Virology* 3, 313-320.
- Huang, C., Ito, N., Tseng, C.T.K., Makino, S. (2006). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *Journal of Virology* 80, 7287-7294.
- 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. *Journal of Medical Virology* 75, 185-194.
- Huang, Q.L., Yu, L.P., Petros, A.M., Gunasekera, A., Liu, Z.H., 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, 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. *Journal of Virology* 78, 12557-12565.
- Huttenlocher, A., Palecek, S.P., Lu, Q., Zhang, W.L., Mellgren, R.L., Lauffenburger, D.A., Ginsberg, M.H., Horwitz, A.F. (1997). Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32719-32722.
- Hwang, J.W., Kalejta, R.F. (2007). Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Virology* 367, 334-338.
- Inoue, J., Nakamura, M., Cui, Y.S., Sakai, Y., Sakai, O., Hill, J.R., Wang, K.K.W., Yuen, P.W. (2003). Structure-activity relationship study and drug profile of N-(4-fluorophenylsulfonyl)-L-valyl-L-leucinal (SJA6017) as a potent calpain inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* 46, 868-871.
- Inoue, Y., Tanaka, N., Tanaka, Y., Inoue, S., Morita, K., Zhuang, M., Hattori, T., Sugamura, K. (2007). Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted. *Journal of Virology* 81, 8722-8729.
- Isler, J.A., Skalet, A.H., Alwine, J.C. (2005). Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. *Journal of Virology* 79, 6890-6899.
- Jeffers, S.A., Tusell, S.M., Gillim-Ross, L., Hemmila, E.M., Achenbach, J.E., Babcock, G.J., Thomas, W.D., Thackray, L.B., Young, M.D., Mason, R.J., Ambrosino, D.M., Wentworth, D.E., DeMartini, J.C., Holmes, K.V. (2004). CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15748-15753.
- Jiang, H.Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Cavener, D.R., Wek, R.C. (2003). Phosphorylation of the  $\alpha$  subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF- $\kappa$ B in response to diverse cellular stresses. *Molecular and Cellular Biology* 23, 5651-5663.
- Jiang, Y., Xu, J., Zhou, C.Z., Wu, Z.G., Zhong, S.Q., Liu, J.H., Luo, W., Chen, T., Qin, Q.H., Deng, P. (2005). Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171, 850-857.
- Jin, D.Y., Zheng, B.J. (2009). Roles of Spike Glykoprotein in the pathogenesis of SARS coronavirus. *Hong Kong Medical Journal* 15, 37-40.
- Jin, T.C., Gu, Y.P., Zanusso, G., Sy, M.S., Kumar, A., Cohen, M., Gambetti, P., Singh, N. (2000). The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 275, 38699-38704.

- Johnson, J.M., Nicot, C., Fullen, J., Ciminale, V., Casareto, L., Mulloy, J.C., Jacobson, S., Franchini, G. (2001). Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12(I) protein. *Journal of Virology* 75, 6086-6094.
- Jordan, R., Wang, L.J., Graczyk, T.M., Block, T.M., Romano, P.R. (2002). Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *Journal of Virology* 76, 9588-9599.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo Journal* 19, 5720-5728.
- Kalies, K.U., Allan, S., Sergeyenko, T., Kroger, H., Romisch, K. (2005). The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *Embo Journal* 24, 2284-2293.
- Kan, B., Wang, M., Jing, H.Q., Xu, H.F., Jiang, X.G., Yan, M.Y., Liang, W.L., Zheng, H., Wan, K.L., Liu, Q.Y., Cui, B.Y., Xu, Y.M., Zhang, E.M., Wang, H.X., Ye, J.R., Li, G.H., Li, M.H., Cui, Z.G., Qi, X.B., Chen, K., Du, L., Gao, K., Zhao, Y.T., Zou, X.Z., Feng, Y.J., Gao, Y.F., Hai, R., Yu, D.Z., Guan, Y., Xu, J.G. (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. *Journal of Virology* 79, 11892-11900.
- Kang, S.W., Rane, N.S., Kim, S.J., Garrison, J.L., Taunton, J., Hegde, R.S. (2006). Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell* 127, 999-1013.
- Kanzawa, N., Nishigaki, K., Hayashi, T., Ishii, Y., Furukawa, S., Niino, A., Yasui, F., Kohara, M., Morita, K., Matsushima, K., Lee, M.Q., Masuda, T., Kannagi, M. (2006). Augmentation of chemokine production by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 and 7a/X4 proteins through NF-kappa B activation. *FEBS Letters* 580, 6807-6812.
- Khan, S., Fielding, B.C., Tan, T.H.P., Chou, C.F., Shen, S., Lim, S.G., Hong, W., Tan, Y.J. (2006). Overexpression of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3b protein induces both apoptosis and necrosis in Vero E6 cells. *Virus Research* 122, 20-27.
- Kifor, O., Kifor, I., Moore, F.D., Butters, R.R., Brown, E.M. (2003). m-Calpain colocalizes with the calcium-sensing receptor (CaR) in caveolae in parathyroid cells and participates in degradation of the CaR. *Journal of Biological Chemistry* 278, 31167-31176.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Murakami, S. (2006). Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis* 11, 5-13.
- Kim, Y.K., Hahm, B., Jang, S.K. (2000). Polypyrimidine tract-binding protein inhibits translation of Bip mRNA. *Journal of Molecular Biology* 304, 119-133.
- Knarr, G., Modrow, S., Todd, A., Gething, M.J., Buchner, J. (1999). BiP-binding sequences in HIV gp160 - Implications for the binding specificity of BiP. *Journal of Biological Chemistry* 274, 29850-29857.
- Kopecky-Bromberg, S.A., Martinez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R.A., Palese, P. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *Journal of Virology* 81, 548-557.
- Kopecky-Bromberg, S.A., Martinez-Sobrido, L., Palese, P. (2006). 7a protein of severe acute respiratory

syndrome coronavirus inhibits cellular protein synthesis and activates p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Virology* 80, 785-793.

Kostova,Z., Wolf,D.H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *Embo Journal* 22, 2309-2317.

Kozutsumi,Y., Segal,M., Normington,K., Gething,M.J., Sambrook,J. (1988). The Presence of Malfolded Proteins in the Endoplasmic-Reticulum Signals the Induction of Glucose-Regulated Proteins. *Nature* 332, 462-464.

Krahling,V., Stein,D.A., Spiegel,M., Weber,F., Muhlberger,E. (2009). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Triggers Apoptosis via Protein Kinase R but Is Resistant to Its Antiviral Activity. *Journal of Virology* 83, 2298-2309.

Ksiazek,T.G., Erdman,D., Goldsmith,C.S., Zaki,S.R., Peret,T., Emery,S., Tong,S.X., 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. (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine* 348, 1953-1966.

Kudchodkar,S.B., Levine,B. (2009). Viruses and autophagy. *Reviews in Medical Virology* 19, 359-378.

Kuma,A., Hatano,M., Matsui,M., Yamamoto,A., Nakaya,H., Yoshimori,T., Ohsumi,Y., Tokuhiya,T., Mizushima,N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.

Lai,M.M.C. (1990). Coronavirus - Organization, Replication and Expression of Genome. *Annual Review of Microbiology* 44, 303-333.

Larson,H.E., Reed,S.E., Tyrrell,D.A.J. (1980). Isolation of Rhinoviruses and Coronaviruses from 38 Colds in Adults. *Journal of Medical Virology* 5, 221-229.

Lau,S.K.P., Woo,P.C.Y., Li,K.S.M., Huang,Y., Tsoi,H.W., Wong,B.H.L., Wong,S.S.Y., Leung,S.Y., Chan,K.H., Yuen,K.Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14040-14045.

Lau,S.K.P., Woo,P.C.Y., Yip,C.C.Y., Tse,H., Tsoi,H.W., Cheng,V.C.C., Lee,P., Tang,B.S.F., Cheung,C.H.Y., Lee,R.A., So,L.Y., Lau,Y.L., Chan,K.H., Yuen,K.Y. (2006). Coronavirus HKU1 and other coronavirus infections in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 2063-2071.

Laude,H., Vanreeth,K., Pensaert,M. (1993). Porcine Respiratory Coronavirus - Molecular-Features and Virus Host Interactions. *Veterinary Research* 24, 125-150.

Law,H.K.W., Cheung,C.Y., Ng,H.Y., Sia,S.F., Chan,Y.O., Luk,W., Nicholls,J.M., Peiris,J.S.M., Lau,Y.L. (2005a). Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 106, 2366-2374.

Law,P.T.W., Wong,C.H., Au,T.C.C., Chuck,C.P., Kong,S.K., Chan,P.K.S., To,K.F., Lo,A.W.I., Chan,J.Y.W., Suen,Y.K., Chan,H.Y.E., Fung,K.P., Waye,M.M.Y., Sung,J.J.Y., Lo,Y.M.D., Tsui,S.K.W. (2005b). The 3a protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus induces apoptosis in Vero E6 cells. *Journal of General Virology* 86, 1921-1930.

Lee,C.H., Chen,R.F., Liu,J.W., Yeh,W.T., Chang,J.C., Liu,P.M., Eng,H.L., Lin,M.C., Yang,K.D.

- (2004). Altered p38 mitogen-activated protein kinase expression in different leukocytes with increment of immunosuppressive mediators in patients with severe acute respiratory syndrome. *Journal of Immunology* 172, 7841-7847.
- Lee,D.H., Goldberg,A.L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in Cell Biology* 8, 397-403.
- Lee,D.Y., Lee,J., Sugden,B. (2009). The Unfolded Protein Response and Autophagy: Herpesviruses Rule! *Journal of Virology* 83, 1168-1172.
- 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.Y. (2003). A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *New England Journal of Medicine* 348, 1986-1994.
- Levine,B., Klionsky,D.J. (2004). Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell* 6, 463-477.
- Li,W.D., Shi,Z.L., Yu,M., Ren,W.Z., Smith,C., Epstein,J.H., Wang,H.Z., Crameri,G., Hu,Z.H., Zhang,H.J., Zhang,J.H., McEachern,J., Field,H., Daszak,P., Eaton,B.T., Zhang,S.Y., Wang,L.F. (2005a). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 310, 676-679.
- Li,W.H., Moore,M.J., Vasilieva,N., Sui,J.H., 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, 450-454.
- Li,X.D., Lankinen,H., Putkuri,M., Vapalahti,O., Vaheri,A. (2005b). Tula hantavirus triggers pro-apoptotic signals of ER stress in Vero E6 cells. *Virology* 333, 180-189.
- Lieberman,E., Fong,Y.L., Selby,M.J., Choo,Q.L., Cousens,L., Houghton,M., Yen,T.S.B. (1999). Activation of the grp78 and grp94 promoters by hepatitis C virus E2 envelope protein. *Journal of Virology* 73, 3718-3722.
- Limjindaporn,T., Wongwiwat,W., Noisakran,S., Srisawat,C., Netsawang,J., Puttikhunt,C., Kasinrerak,W., Avirutnan,P., Thiemmecca,S., Sriburi,R., Sittisombut,N., Malasit,P., Yenchitsomanus,P.T. (2009). Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379, 196-200.
- Liu,C.Y., Kaufman,R.J. (2003). The unfolded protein response. *Journal of Cell Science* 116, 1861-1862.
- Ma,X.-Z., Bartczak,A., Zhang,J., Khattar,R., Chen,L., Liu,M.F., Edwards,A., Levy,G., McGilvray,I.D. (2010). Proteasome inhibition in vivo promotes survival in a lethal murine model of SARS. *Journal of Virology* 84, 12419-12428.
- Ma,Y.J., Brewer,J.W., Diehl,J.A., Hendershot,L.M. (2002). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *Journal of Molecular Biology* 318, 1351-1365.
- Ma,Y.J., Hendershot,L.M. (2002). The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress. *Cell Stress & Chaperones* 7, 222-229.
- Macnaughton,M.R. (1982). Occurrence and Frequency of Coronavirus Infections in Humans As Determined by Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay. *Infection and Immunity* 38, 419-423.

- Mao,H.W., Palmer,D., Rosenthal,K.S. (2001). Changes in BiP (GRP78) levels upon HSV-1 infection are strain dependent. *Virus Research* 76, 127-135.
- Marra,M.A., Jones,S.J.M., Astell,C.R., Holt,R.A., Brooks-Wilson,A., Butterfield,Y.S.N., Khattra,J., Asano,J.K., Barber,S.A., Chan,S.Y., 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.E., 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, 1399-1404.
- Martina,B.E.E., Haagmans,B.L., Kuiken,T., Fouchier,R.A.M., Rimmelzwaan,G.F., van Amerongen,G., Peiris,J.S.M., Lim,W., Osterhaus,A.D.M.E. (2003). SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature* 425, 915.
- Mathur,A., Arora,K.L., Rajvanshi,S., Chaturvedi,U.C. (1982). Coronavirus in Respiratory-Infection. *Indian Journal of Medical Research* 75, 323-328.
- Matlack,K.E.S., Misselwitz,B., Plath,K., Rapoport,T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, 553-564.
- Matlack,K.E.S., Mothes,W., Rapoport,T.A. (1998). Protein translocation: Tunnel vision. *Cell* 92, 381-390.
- Mayer,T.U., Braun,T., Jentsch,S. (1998). Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *Embo Journal* 17, 3251-3257.
- McCracken,A.A., Brodsky,J.L. (2003). Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). *Bioessays* 25, 868-877.
- McIntosh,K., Ellis,E.K., Hoffmann,L.S., Lybass,T.G., Eller,J.J., Fulginiti,V.A. (1973). The association of viral and bacterial respiratory infections with exacerbations of wheezing in young asthmatic children. *Journal of Pediatrics* 82, 578-593.
- Mebus,C.A., Stair,E.L., Rhodes,M.B., Twiehaus,M.J. (1973). Neonatal Calf Diarrhea - Propagation, Attenuation, and Characteristics of A Coronavirus-Like Agent. *American Journal of Veterinary Research* 34, 145-150.
- Medigeshi,G.R., Lancaster,A.M., Hirsch,A.J., Briese,T., Lipkin,W.I., DeFilippis,V., Fruh,M., Mason,P.W., Nikolich-Zugich,J., Nelson,J.A. (2007). West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *Journal of Virology* 81, 10849-10860.
- Mehdi,S. (1991). Cell-Penetrating Inhibitors of Calpain. *Trends in Biochemical Sciences* 16, 150-153.
- Melendez,A., Talloczy,Z., Seaman,M., Eskelinen,E.L., Hall,D.H., Levine,B. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C-elegans. *Science* 301, 1387-1391.
- Melloni,E., Pontremoli,S. (1989). The Calpains. *Trends in Neurosciences* 12, 438-444.
- Miller,C.L., Pintel,D.J. (2001). The NS2 protein generated by the parvovirus minute virus of mice is degraded by the proteasome in a manner independent of ubiquitin chain elongation or activation. *Virology* 285, 346-355.

- Minakshi,R., Padhan,K., Rani,M., Khan,N., Ahmad,F., Jameel,S. (2009). The SARS Coronavirus 3a Protein Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Induces Ligand-Independent Downregulation of the Type 1 Interferon Receptor. *Plos One* 4.
- Mizushima,N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death and Differentiation* 12, 1535-1541.
- Mizushima,N., Levine,B., Cuervo,A.M., Klionsky,D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Mizushima,N., Ohsumi,Y., Yoshimori,T. (2002). Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Structure and Function* 27, 421-429.
- Mizutani,T., Fukushi,S., Saijo,M., Kurane,I., Morikawa,S. (2004). Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319, 1228-1234.
- Modrow,S., Falke,D., Truyen,U., Schätzl,H. (2010a). Humanpathogene Coronaviren. In: *Molekulare Virologie Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, 255-258.
- Modrow,S., Falke,D., Truyen,U., Schätzl,H. (2010b). Tierpathogene Coronaviren. In: *Molekulare Virologie Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, 259-261.
- Montero,H., Rojas,M., Arias,C.F., Lopez,S. (2008). Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 alpha but prevents the formation of stress granules. *Journal of Virology* 82, 1496-1504.
- Morford,L.A., Forrest,K., Logan,B., Overstreet,L.K., Goebel,J., Brooks,W.H., Roszman,T.L. (2002). Calpain II colocalizes with detergent-insoluble rafts on human and Jurkat T-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295, 540-546.
- Munro,S., Pelham,H.R.B. (1986). An Hsp70-Like Protein in the Er - Identity with the 78 Kd Glucose-Regulated Protein and Immunoglobulin Heavy-Chain Binding-Protein. *Cell* 46, 291-300.
- Nakatsukasa,K., Brodsky,J.L. (2008). The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* 9, 861-870.
- Nal,B., Chan,C.M., Kien,F., Siu,L., Tse,J., Chu,K., Kam,J., Staropoli,I., Crescenzo-Chaigne,B., Escriou,I., 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. *Journal of General Virology* 86, 1423-1434.
- Narayanan,K., Huang,C., Makino,S. (2008). SARS coronavirus accessory proteins. *Virus Research* 133, 113-121.
- Naujokat,C., Hoffmann,S. (2002). Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Laboratory Investigation* 82, 965-980.
- Nelson,C.A., Pekosz,A., Lee,C.A., Diamond,M.S., Fremont,D.H. (2005). Structure and intracellular targeting of the SARS-coronavirus Orf7a accessory protein. *Structure* 13, 75-85.
- Ng,M.L., Tan,S.H., See,E.E., Oi,E.E., Ling,A.E. (2003). Proliferative growth of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *Journal of General Virology* 84, 3291-3303.
- Nicchitta,C.V., Blobel,G. (1993). Luminal Proteins of the Mammalian Endoplasmic-Reticulum Are Required to Complete Protein Translocation. *Cell* 73, 989-998.

- Nicholls,J.M., Poon,L.L.M., Lee,K.C., Ng,W.F., Lai,S.T., Leung,C.Y., Chu,C.M., Hui,P.K., Mak,K.L., Lim,W., Yan,K.W., Chan,K.H., Tsang,N.C., Guan,Y., Yuen,K.Y., Peiris,J.S.M. (2003). Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1773-1778.
- Nixon,R.A. (2003). The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Research Reviews* 2, 407-418.
- Novoa,I., Zeng,H.Q., Harding,H.P., Ron,D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 alpha. *Journal of Cell Biology* 153, 1011-1021.
- Novoa,I., Zhang,Y.H., Zeng,H.Q., Jungreis,R., Harding,H.P., Ron,D. (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *Embo Journal* 22, 1180-1187.
- O'Donnell,R., Tasker,R.C., Roe,M.F.E. (2003). SARS: understanding the coronavirus - Apoptosis may explain lymphopenia of SARS. *British Medical Journal* 327, 620.
- Obeng,E.A., Carlson,L.M., Gutman,D.M., Harrington,W.J., Lee,K.P., Boise,L.H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107, 4907-4916.
- Okabayashi,T., Kariwa,H., Yokota,S., Iki,S., Indoh,T., Yokosawa,N., Takashima,I., Tsutsumi,H., Fujii,N. (2006). Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections. *Journal of Medical Virology* 78, 417-424.
- Okumura,A., Alce,T., Lubyova,B., Ezelle,H., Strebel,K., Pitha,P.M. (2008). HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology* 373, 85-97.
- Olsen,C.W. (1993). A Review of Feline Infectious Peritonitis Virus - Molecular-Biology, Immunopathogenesis, Clinical Aspects, and Vaccination. *Veterinary Microbiology* 36, 1-37.
- Orlowski,M., Wilk,S. (2003). Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 415, 1-5.
- Padhan,K., Minakshi,R., Bin Towheed,M.A., Jameel,S. (2008). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein activates the mitochondrial death pathway through p38 MAP kinase activation. *Journal of General Virology* 89, 1960-1969.
- Peiris,J.S.M., Chu,C.M., Cheng,V.C.C., Chan,K.S., Hung,I.F.N., Poon,L.L.M., Law,K.I., Tang,B.S.F., Hon,T.Y.W., Chan,C.S., Chan,K.H., Ng,J.S.C., Zheng,B.J., Ng,W.L., Lai,R.W.M., Guan,Y., Yuen,K.Y. (2003a). Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361, 1767-1772.
- Peiris,J.S.M., Lai,S.T., Poon,L.L.M., Guan,Y., Yam,L.Y.C., Lim,W., Nicholls,J., Yee,W.K.S., Yan,W.W., Cheung,M.T., Cheng,V.C.C., Chan,K.H., Tsang,D.N.C., Yung,R.W.H., Ng,T.K., Yuen,K.Y. (2003b). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1319-1325.
- Pewe,L., Zhou,H.X., Netland,J., Tangudu,C., Olivares,H., Shi,L., Look,D., Gallagher,T., Perlman,S. (2005). Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-specific protein enhances virulence of an attenuated murine coronavirus. *Journal of Virology* 79, 11335-11342.
- Pouyssegur,J., Shiu,R.P.C., Pastan,I. (1977). Induction of 2 Transformation-Sensitive Membrane Polypeptides in Normal Fibroblasts by A Block in Glycoprotein Synthesis Or Glucose Deprivation. *Cell* 11, 941-947.

- Pyrk,K., Berkhout,B., van der Hoek,L. (2007). The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *Journal of Virology* 81, 3051-3057.
- Pyrk,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. *Journal of Molecular Biology* 364, 964-973.
- Qu,X.P., Zou,Z.J., Sun,Q.H., Luby-Phelps,K., Cheng,P.F., Hogan,R.N., Gilpin,C., Levine,B. (2007). Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128, 931-946.
- Quan,P.L., Firth,C., Street,C., Henriquez,J.A., Petrosov,A., Tashmukhamedova,A., Hutchison,S.K., Egholm,M., Osinubi,M.O.V., Niezgodka,M., Ogunkoya,A.B., Briese,T., Rupprecht,C.E., Lipkin,W.I. (2010). Identification of a Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Like Virus in a Leaf-Nosed Bat in Nigeria. *Mbio* 1.
- Raaben,M., Grinwis,G.C.M., Rottier,P.J.M., de Haan,C.A.M. (2010a). The Proteasome Inhibitor Velcade Enhances rather than Reduces Disease in Mouse Hepatitis Coronavirus-Infected Mice. *Journal of Virology* 84, 7880-7885.
- Raaben,M., Posthuma,C.C., Verheije,M.H., te Lintelo,E.G., Kikkert,M., Drijfhout,J.W., Snijder,E.J., Rottier,P.J.M., de Haan,C.A.M. (2010b). The Ubiquitin-Proteasome System Plays an Important Role during Various Stages of the Coronavirus Infection Cycle. *Journal of Virology* 84, 7869-7879.
- Raihana,R.R., Hayakawa,M., Sugiura,E., Sugiura,H., Hanaki,K.I., Taniguchi,T., Honda,E. (2009). Analysis of the Properties of Neutralizing Monoclonal Antibodies against the Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus and Inhibition of HEV Infection by Specific MAb. *Journal of Veterinary Medical Science* 71, 447-452.
- Rane,N.S., Kang,S.W., Chakrabarti,O., Feigenbaum,L., Hegde,R.S. (2008). Reduced translocation of nascent prion protein during ER stress contributes to neurodegeneration. *Developmental Cell* 15, 359-370.
- Rao,R.V., Peel,A., Logvinova,A., del Rio,G., Hermel,E., Yokota,T., Goldsmith,P.C., Ellerby,L.M., Ellerby,H.M., Bredesen,D.E. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *Febs Letters* 514, 122-128.
- Reddy,R.K., Mao,C.H., Baumeister,P., Austin,R.C., Kaufman,R.J., Lee,A.S. (2003). Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors - Role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 20915-20924.
- Reggiori,F., Monastyrska,I., Verheije,M.H., Cali,T., Ulasli,M., Bianchi,S., Bernasconi,R., de Haan,C.A.M., Molinari,M. (2010). Coronaviruses Hijack the LC3-I-Positive EDEMosomes, ER-Derived Vesicles Exporting Short-Lived ERAD Regulators, for Replication. *Cell Host & Microbe* 6, 500-508.
- Rihtaric,D., Hostnik,P., Steyer,A., Grom,J., Toplak,I. (2010). Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) in Slovenia. *Archives of Virology* 155, 507-514.
- Roberts,A., Vogel,L., Guarner,J., Hayes,N., Murphy,B., Zaki,S., Subbarao,K. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of Golden Syrian hamsters. *Journal of Virology* 79, 503-511.

- Rock, K.L., Goldberg, A.L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annual Review of Immunology* 17, 739-779.
- Rossow, K.D. (1998). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Pathology* 35, 1-20.
- 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.X., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., Derisi, J.L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D.D., Peret, T.C.T., 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.M.E., 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, 1394-1399.
- Rueckert, R.R. (1996). Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields Virology*.
- Saido, T.C., Sorimachi, H., Suzuki, K. (1994). Calpain - New Perspectives in Molecular Diversity and Physiological-Pathological Involvement. *Faseb Journal* 8, 814-822.
- Saif, L.J. (1996). Mucosal immunity: An overview and studies of enteric and respiratory coronavirus infections in a swine model of enteric disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54, 163-169.
- Saif, L.J., Bohl, E.H. (1986). Transmissible Gastroenteritis. In: *Diseases of Swine* 255-274.
- Salonen, A., Ahola, T., Kaariainen, L. (2004). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Membrane Trafficking in Viral Replication* 285, 139-173.
- Sanders, S.L., Whitfield, K.M., Vogel, J.P., Rose, M.D., Schekman, R.W. (1992). Sec61P and Bip Directly Facilitate Polypeptide Translocation Into the Er. *Cell* 69, 353-365.
- Sarubbi, E., Seneci, P.F., Angelastro, M.R., Peet, N.P., Denaro, M., Islam, K. (1993). Peptide Aldehydes As Inhibitors of Hiv Protease. *Febs Letters* 319, 253-256.
- Schaecher, S.R., Touchette, E., Schriewer, J., Buller, R.M., Pekosz, A. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus gene 7 products contribute to virus-induced apoptosis. *Journal of Virology* 81, 11054-11068.
- Schreiner, S., Wimmer, P., Sirma, H., Everett, R.D., Blanchette, P., Groitl, P., Dobner, T. (2010). Proteasome-Dependent Degradation of Daxx by the Viral E1B-55K Protein in Human Adenovirus-Infected Cells. *Journal of Virology* 84, 7029-7038.
- Schroder, M., Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry* 74, 739-789.
- Schubert, U., Anton, L.C., Bacik, I., Cox, J.H., Bour, S., Bennink, J.R., Orłowski, M., Strebel, K., Yewdell, J.W. (1998). CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *Journal of Virology* 72, 2280-2288.
- Sidrauski, C., Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 90, 1031-1039.
- Sims, A.C., Baric, R.S., Yount, B., Burkett, S.E., Collins, P.L., Pickles, R.J. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: Role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. *Journal of Virology* 79, 15511-15524.

- Sloots,T.P., McErlean,P., Speicher,D.J., Arden,K.E., Nissen,M.D., Mackay,I.M. (2006). Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *Journal of Clinical Virology* 35, 99-102.
- Snijder,E.J., Bredenbeek,P.J., Dobbe,J.C., Thiel,V., Ziebuhr,J., Poon,L.L.M., Guan,Y., Rozanov,M., Spaan,W.J.M., 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. *Journal of Molecular Biology* 331, 991-1004.
- Snijder,E.J., van der Meer,Y., Zevenhoven-Dobbe,J., Onderwater,J.J.M., van der Meulen,J., Koerten,H.K., Mommaas,A.M. (2006). Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *Journal of Virology* 80, 5927-5940.
- Spiegel,M., Pichlmair,A., Martinez-Sobrido,L., Cros,J., Garcia-Sastre,A., Haller,O., Weber,F. (2005). Inhibition of beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *Journal of Virology* 79, 2079-2086.
- Spiegel,M., Weber,F. (2006). Inhibition of cytokine gene expression and induction of chemokine genes in non-lymphatic cells infected with SARS coronavirus. *Virology Journal* 3.
- Stertz,S., Reichelt,M., Spiegel,M., Kuri,T., Martinez-Sobrido,L., Garcia-Sastre,A., Weber,F., Kochs,G. (2007). The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* 361, 304-315.
- Su,H.L., Liao,C.L., Lin,Y.L. (2002). Japanese encephalitis virus infection initiates endoplasmic reticulum stress and an unfolded protein response. *Journal of Virology* 76, 4162-4171.
- Subbarao,K., McAuliffe,J., Vogel,L., Fahle,G., Fischer,S., Tatti,K., Packard,M., Shieh,W.J., Zaki,S., Murphy,B. (2004). Prior infection and passive transfer of neutralizing antibody prevent replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in the respiratory tract of mice. *Journal of Virology* 78, 3572-3577.
- Suggs,S.V., Wallace,R.B., Hirose,T., Kawashima,E.H., Itakura,K. (1981). Use of Synthetic Oligonucleotides As Hybridization Probes .3. Isolation of Cloned Cdna Sequences for Human Beta-2-Microglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 78, 6613-6617.
- Surjit,M., Liu,B.P., Kumar,P., Chow,V.T.K., Lal,S.K. (2004). The nucleocapsid protein of the SARS coronavirus is capable of self-association through a C-terminal 209 amino acid interaction domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317, 1030-1036.
- Tahara,S.M., Dietlin,T.A., Bergmann,C.C., Nelson,G.W., Kyuwa,S., Anthony,R.P., Stohlman,S.A. (1994). Coronavirus Translational Regulation - Leader Affects Messenger-Rna Efficiency. *Virology* 202, 621-630.
- Tan,Y.J., Fielding,B.C., Goh,P.Y., Shen,S., Tan,T.H.P., Lim,S.G., Hong,W.J. (2004a). Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway. *Journal of Virology* 78, 14043-14047.
- Tan,Y.J., Goh,P.Y., Fielding,B.C., Shen,S., Chou,C.F., Fu,J.L., Leong,H.N., Leo,Y.S., Ooi,E.E., Ling,A.E., Lim,S.G., Hong,W.J. (2004b). Profiles of antibody responses against severe acute respiratory syndrome coronavirus recombinant proteins and their potential use as diagnostic markers. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 362-371.

- Tan, Y.J., Teng, E., Shen, S., Tan, T.H.P., Goh, P.Y., Fielding, B.C., Ooi, E.E., Tan, H.C., Lim, S.G., Hong, W.J. (2004c). A novel severe acute respiratory syndrome coronavirus protein U274, is transported to the cell surface and undergoes endocytosis. *Journal of Virology* 78, 6723-6734.
- Tan, Y.X., Tan, T.H.P., Lee, M.J.R., Tham, P.Y., Gunalan, V., Druce, J., Birch, C., Catton, M., Fu, N.Y., Yu, V.C., Tan, Y.J. (2007). Induction of apoptosis by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a protein is dependent on its interaction with the Bcl-X-L protein. *Journal of Virology* 81, 6346-6355.
- Tardif, K.D., Mori, K., Kaufman, R.J., Siddiqui, A. (2004). Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *Journal of Biological Chemistry* 279, 17158-17164.
- 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. *Journal of General Virology* 84, 2305-2315.
- To, K., Tong, J.H.M., Chan, P.K.S., Au, F.W.L., Chim, S.S.C., Chan, K.C.A., Cheung, J.L.K., Liu, E.Y.M., Tse, G.M.K., Lo, A.W.I., Lo, Y.M.D., Ng, H.K. (2004). Tissue and cellular tropism of the coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome: an in-situ hybridization study of fatal cases. *Journal of Pathology* 202, 157-163.
- Tomita, Y., Yamashita, T., Sato, H., Taira, H. (1999). Kinetics of interactions of sendai virus envelope glycoproteins, F and HN, with endoplasmic reticulum-resident molecular chaperones, BiP, calnexin, and calreticulin. *Journal of Biochemistry* 126, 1090-1100.
- Tooze, S.A., Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology* 12, 831-835.
- Trovato, R., Mulloy, J.C., Johnson, J.M., Takemoto, S., de Oliveira, M.P., Franchini, G. (1999). A lysine-to-arginine change found in natural alleles of the human T-cell lymphotropic leukemia virus type 1 p12 protein greatly influences its stability. *Journal of Virology* 73, 6460-6467.
- Tsubuki, S., Saito, Y., Tomioka, M., Ito, H., Kawashima, S. (1996). Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *Journal of Biochemistry* 119, 572-576.
- Tu, C.C., Cramer, G., Kong, X.G., Chen, J.D., Sun, Y.W., Yu, M., Xiang, H., Xia, X.Z., Liu, S.W., Ren, T., Yu, Y.D., Eaton, B.T., Xuan, H., Wang, L.F. (2004). Antibodies to SARS coronavirus in civets. *Emerging Infectious Diseases* 10, 2244-2248.
- Tyrrell, D.A.J., Bynoe, M.L. (1965). Cultivation of A Novel Type of Common-Cold Virus in Organ Cultures. *British Medical Journal* 1, 1467-&.
- Upla, P., Marjomaki, V., Nissinen, L., Nylund, C., Waris, M., Hyypia, T., Heino, J. (2008). Calpain 1 and 2 are required for RNA replication of echovirus 1. *Journal of Virology* 82, 1581-1590.
- Urano, F., Wang, X.Z., Bertolotti, A., Zhang, Y.H., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-666.
- Vabret, A., Dina, J., Gouarin, S., Petitjean, J., Corbet, S., Freymuth, F. (2006). Detection of the new human coronavirus HKU1: A report of 6 cases. *Clinical Infectious Diseases* 42, 634-639.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J.M., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M.E., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B. (2004). Identification of a new

human coronavirus. *Nature Medicine* 10, 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 Medicine* 2, 764-770.

van Hemert,M.J., van den Worm,S.H.E., Knoop,K., Mommaas,A.M., Gorbalenya,A.E., Snijder,E.J. (2008). SARS-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro. *Plos Pathogens* 4.

Vasilenko,N., Moshynskyy,I., Zakhartchouk,A. (2010). SARS coronavirus protein 7a interacts with human Ap(4)A-hydrolase. *Virology Journal* 7.

Vennema,H., Poland,A., Foley,J., Pedersen,N.C. (1998). Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology* 243, 150-157.

Versteeg,G.A., van de Nes,P.S., Bredenbeek,P.J., Spaan,W.J.M. (2007). The coronavirus spike protein induces endoplasmic reticulum stress and upregulation of intracellular chemokine mRNA concentrations. *Journal of Virology* 81, 10981-10990.

Vinitzky,A., Michaud,C., Powers,J.C., Orlowski,M. (1992). Inhibition of the Chymotrypsin-Like Activity of the Pituitary Multicatalytic Proteinase Complex. *Biochemistry* 31, 9421-9428.

Virgin,H.W., Levine,B. (2009). Autophagy genes in immunity. *Nature Immunology* 10, 461-470.

Viswanathan,K., Fruh,K., DeFilippis,V. (2010). Viral hijacking of the host ubiquitin system to evade interferon responses. *Current Opinion in Microbiology* 13, 517-523.

Wang,H.L., Yang,P., Liu,K.T., Guo,F., Zhang,Y.L., Zhang,G.Y., Jiang,C.Y. (2008). SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell Research* 18, 290-301.

Wang,H.Q., Du,Z.X., Zhang,H.Y., Gao,D.X. (2007). Different induction of GRP78 and CHOP as a predictor of sensitivity to proteasome inhibitors in thyroid cancer cells. *Endocrinology* 148, 3258-3270.

Watowich,S.S., Morimoto,R.I., Lamb,R.A. (1991). Flux of the Paramyxovirus Hemagglutinin-Neuraminidase Glycoprotein Through the Endoplasmic-Reticulum Activates Transcription of the Grp78-Bip Gene. *Journal of Virology* 65, 3590-3597.

Wentworth,D.E., Gillim-Ross,L., Espina,N., Bernard,K.A. (2004). Mice susceptible to SARS coronavirus. *Emerging Infectious Diseases* 10, 1293-1296.

WHOa. SARS - Chronology of a serial killer. 4-7-2003.

Ref Type: Internet Communication

WHOb. Severe acute respiratory syndrome - update. 2011.

Ref Type: Internet Communication

WHOc. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1. November 2003 to 31. July 2003. 2011.

Ref Type: Internet Communication

WHOd. Update 49 - SARS case fatality ratio, incubation period. 2011.

Ref Type: Internet Communication

Wiertz,E.J.H.J., Jones,T.R., Sun,L., Bogyo,M., Geuze,H.J., Ploegh,H.L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 84, 769-779.

Williams,B.L., Lipkin,W.I. (2006). Endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration in rats neonatally infected with Borna disease virus. *Journal of Virology* 80, 8613-8626.

Wong,C.K., Lam,C.W.K., Wu,A.K.L., Ip,W.K., Lee,N.L.S., Chan,I.H.S., Lit,L.C.W., Hui,D.S.C., Chan,M.H.M., Chung,S.S.C., Sung,J.J.Y. (2004a). Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clinical and Experimental Immunology* 136, 95-103.

Wong,R.S.M., Wu,A., To,K.F., Lee,N., Lam,C.W.K., Wong,C.K., Chan,P.K.S., Ng,M.H.L., Yu,L.M., Hui,D.S., Tam,J.S., Cheng,G., Sung,J.J.Y. (2003). Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome: retrospective analysis. *British Medical Journal* 326, 1358-1362.

Wong,W.L., Brostrom,M.A., Kuznetsov,G., Gmitteryellen,D., Brostrom,C.O. (1993). Inhibition of Protein-Synthesis and Early Protein Processing by Thapsigargin in Cultured-Cells. *Biochemical Journal* 289, 71-79.

Wong,W.M., Ho,J.C., Ooi, Mok, Chan, Hung, Ng, Lam,Y.M., Tam, Wong,B.C.Y., Wong,P.C., Ho,P.L., Lai, Lam,W.K., Lam,S.K., Tsang (2004b). Temporal patterns of hepatic dysfunction and disease severity in patients with SARS (vol 290, pg 2663, 2003). *Jama-Journal of the American Medical Association* 291, 426.

Woo,P.C.Y., Lau,S.K.P., Chu,C.M., Chan,K.H., Tsoi,H.W., Huang,Y., Wong,B.H.L., Wong,H.L., Poon,R.W.S., Cai,J.J., Luk,W.K., Poon,L.L.M., Wong,S.S.Y., Guan,Y., Peiris,J.S.M., Yuen,K.Y. (2005). Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *Journal of Virology* 79, 884-895.

Wu,D.L., Tu,C.C., Xin,C., Xuan,H., Meng,Q.W., Liu,Y.G., Yu,Y.D., Guan,Y.T., Jiang,Y., Yin,X.N., Cramer,G., Wang,M.P., Li,C.W., Liu,S.W., Liao,M., Feng,L., Xiang,H., Sun,J.F., Chen,J.D., Sun,Y.W., Gu,S.L., Liu,N.H., Fu,D.X., Eaton,B.T., Wang,L.F., Kong,X.G. (2005). Civets are equally susceptible to experimental infection by two different severe acute respiratory syndrome coronavirus isolates. *Journal of Virology* 79, 2620-2625.

Wu,W.K.K., Wu,Y.C., Yu,L., Li,Z.J., Sung,J.J.Y., Cho,C.H. (2008). Induction of autophagy by proteasome inhibitor is associated with proliferative arrest in colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374, 258-263.

Xu,X., Gao,X. (2004). Immunological responses against SARS-CoV infections in humans. *Cellular & Molecular Immunology* 1, 119-122.

Xuan,B.Q., Qian,Z.K., Torigoi,E., Yu,D. (2009). Human Cytomegalovirus Protein pUL38 Induces ATF4 Expression, Inhibits Persistent JNK Phosphorylation, and Suppresses Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Cell Death. *Journal of Virology* 83, 3463-3474.

Yang,Z.Y., Huang,Y., Ganesh,L., Leung,K., Kong,W.P., Schwartz,O., Subbarao,K., Nabel,G.J. (2004). pH-dependent entry of Severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *Journal of Virology* 78, 5642-5650.

Yap,Y.L., Zhang,X.W., Andonov,A., He,R.T. (2005). Structural analysis of inhibition mechanisms of Aurintricarboxylic Acid on SARS-CoV polymerase and other proteins. *Computational Biology and*

Chemistry 29, 212-219.

Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular Cell* 6, 1355-1364.

Ye, Z.D., Wong, C.K., Li, P., Xie, Y. (2008). A SARS-CoV protein, ORF-6, induces caspase-3 mediated, ER stress and JNK-dependent apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1780, 1383-1387.

Yilla, M., Harcourt, B.H., Hickman, C.J., McGrew, M., Tamin, A., Goldsmith, C.S., Bellini, W.J., Anderson, L.J. (2005). SARS-coronavirus replication in human peripheral monocytes/macrophages. *Virus Research* 107, 93-101.

Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., Mori, K. (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology* 20, 6755-6767.

Yount, B., Roberts, R.S., Sims, A.C., Deming, D., Frieman, M.B., Sparks, J., Denison, M.R., Davis, N., Baric, R.S. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. *Journal of Virology* 79, 14909-14922.

Yu, G.Y., Lai, M.A.C. (2005). The ubiquitin-proteasome system facilitates the transfer of murine coronavirus from endosome to cytoplasm during virus entry. *Journal of Virology* 79, 644-648.

Yuan, X.L., Li, J.Y., Shan, Y.J., Yang, Z., Zhao, Z.H., Chen, B., Yao, Z.Y., Dong, B., Wang, S.Q., Chen, J.P., Cong, Y.W. (2005). Subcellular localization and membrane association of SARS-CoV 3a protein. *Virus Research* 109, 191-202.

Yuan, X.L., Wu, J., Shan, Y.J., Yao, Z.Y., Dong, B., Chen, B., Zhao, Z.H., Wang, S.Q., Chen, J.P., Cong, Y.W. (2006). SARS coronavirus 7a protein blocks cell cycle progression at G0/G1 phase via the cyclin D3/pRb pathway. *Virology* 346, 74-85.

Yuan, X.L., Yao, Z.Y., Wu, J., Zhou, Y.S., Shan, Y.J., Dong, B., Zhao, Z.H., Hua, P., Chen, J.P., Cong, Y.W. (2007). G1 phase cell cycle arrest induced by SARS-CoV 3a protein via the cyclin D3/pRb pathway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 37, 9-19.

Yukse, K., Chen, W.L., Chien, D., Ou, J.H.J. (2009). Ubiquitin-Independent Degradation of Hepatitis C Virus F Protein. *Journal of Virology* 83, 612-621.

Zeng, R., Yang, R.F., Shi, M.D., Jiang, M.R., Xie, Y.H., Ruan, H.Q., Jiang, X.S., Shi, L., Zhou, H., Zhang, L., Wu, X.D., Lin, Y., Ji, Y.Y., Xiong, L., Jin, Y., Dai, E.H., Wang, X.Y., Si, B.Y., Wang, J., Wang, H.X., Wang, C.E., Gan, Y.H., Li, Y.C., Cao, J.T., Zuo, J.P., Shan, S.F., Xie, E., Chen, S.H., Jiang, Z.Q., Zhang, X., Wang, Y., Pei, G., Sun, B., Wu, J.R. (2004). Characterization of the 3a protein of SARS-associated coronavirus in infected Vero e6 cells and SARS patients. *Journal of Molecular Biology* 341, 271-279.

Zhang, H.F.M., Ye, X., Su, Y., Yuan, J., Liu, Z., Stein, D.A., Yang, D.C. (2010). Coxsackievirus B3 Infection Activates the Unfolded Protein Response and Induces Apoptosis through Downregulation of p58(IPK) and Activation of CHOP and SREBP1. *Journal of Virology* 84, 8446-8459.

Zhang, K.Z., Kaufman, R.J. (2006). The unfolded protein response - A stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66, S102-S109.

- Zhang,Q.F., Cui,J.M., Huan,X.J., Zheng,H.Y., Huang,J.H., Ling,F., Li,K.P., Zhang,J.Q. (2004). The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *Journal of Medical Virology* 73, 332-337.
- Zhang,Q.F., Cui,J.M., Huang,X.J., Lin,W., Tan,D.Y., Xu,J.W., Yang,Y.F., Zhang,J.Q., Zhang,X., Li,H., Zheng,H.Y., Chen,Q.X., Yan,X.G., Zheng,K., Wan,Z.Y., Huang,J.C. (2003). Morphology and morphogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated virus. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 35, 587-591.
- Zhao,Z.J., Thackray,L.B., Miller,B.C., Lynn,L.M., Becker,M.M., Ward,E., Mizushima,N.N., Denison,M.R., Virgin,H.W. (2007). Coronavirus replication does not require the autophagy gene ATG5. *Autophagy* 3, 581-585.
- Zheng,B.J., He,M.L., Wong,K.L., Lum,C.T., Poon,L.L.M., Peng,Y., Guan,Y., Lin,M.C.M., Kung,H.F. (2004). Potent inhibition of SARS-associated coronavirus (SCoV) infection and replication by type I interferons (IFN-alpha/beta) but not by type II interferon (IFN-gamma). *Journal of Interferon and Cytokine Research* 24, 388-390.
- Ziebuhr,J. (2004). Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Current Opinion in Microbiology* 7, 412-419.
- Ziegler,T., Matikainen,S., Ronkko,E., Osterlund,P., Sillanpaa,M., Siren,J., Fagerlund,R., Immonen,M., Melen,K., Julkunen,L. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus fails to activate cytokine-mediated innate immune responses in cultured human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Virology* 79, 13800-13805.

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: A.) Elektronenmikroskopische Aufnahme des SARS-CoV (CDC-Centers for Disease Control and Prevention`s Public Health Library, 2011) B.) schematische Darstellung des SARS-Coronavirus (Stadler et al., 2003). .....	16
Abbildung 2: Darstellung des SARS-CoV Genoms (Marra et al., 2003) .....	17
Abbildung 3: Genomreplikation des Coronavirus .....	18
Abbildung 4: SARS-CoV Replikation (Du et al., 2009).....	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung des 7a-Proteins.....	23
Abbildung 6: Abläufe beim UPR (Cyr et al. 2009) .....	26
Abbildung 7: Ubiquinylierung von Substraten für den proteasomalen Abbauweg (Cell Signaling Technologies, 2011) .....	28
Abbildung 8: Vektorkarten der verwendeten Plasmide .....	38
Abbildung 9: Umsetzungsreaktionen der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase.....	54
Abbildung 10: Umsetzung des Terazoliums Salzes XTT zu Formazan .....	55
Abbildung 11: 12 well Platte eines Plaque-Assays .....	56
Abbildung 12: Endogene BiP-Expression in verschiedenen Säugetierzellen .....	59
Abbildung 13: A.) Exogene BiP-Expression.....	60
Abbildung 14: Expression des 7a-Proteins.....	61
Abbildung 15: Co-Immunopräzipitation von 7a und BiP.....	62
Abbildung 16: BiP-Expressionsmenge in 7a-exprimierenden VeroE6 Zellen.....	63
Abbildung 17: Aktivierung von ERSE-Elementen durch 7a.....	64
Abbildung 18: Phosphorylierung des eIF2alpha und BiP-Expression in 7a exprimierenden VeroE6 .....	66
Abbildung 19: Schema zur Durchführung des Nachweises des XBP1-Splicing .....	67
Abbildung 20: XBP1-Splicing in 7a exprimierenden VeroE6 Zellen.....	67
Abbildung 21: Stabilisierung des 7a-HA-Fusionsproteins durch proteasomale Hemmung .....	69
Abbildung 22: Stabilisierung des 7a durch proteasomale Hemmung in VeroE6 Zellen .....	69
Abbildung 23: Stabilisierung des 7a durch proteasomale Hemmung in Caco-2 Zellen .....	70
Abbildung 24: 7a-Expression bei Hemmung des Proteasoms und ER-Stress.....	71
Abbildung 25: Halbwertszeitbestimmung des 7a-Proteins .....	72
Abbildung 26: Ubiquitinylierung des 7a-Proteins .....	73
Abbildung 27: Lokalisierung des 7a-Proteins zum Zeitpunkt 0 h .....	74
Abbildung 28: Lokalisierung des 7a-Proteins zum Zeitpunkt 3 h .....	75
Abbildung 29: Lokalisierung des 7a-Proteins zum Zeitpunkt 6 h .....	75
Abbildung 30: 7a-Expression bei MG-132 und BFA-Behandlung.....	76
Abbildung 31: Lokalisierung des 7a-Proteins bei Infektion von VeroE6 mit SARS-CoV .....	78
Abbildung 32: Destabilisierung des 7a durch Behandlung mit BFA .....	79
Abbildung 33: SARS-CoV Proteinexpression bei MG-132-Behandlung.....	81
Abbildung 34: Dosisabhängige Reduktion von SARS-CoV-Titern durch MG-132 .....	81

**Abbildung 35: SARS-CoV Replikation bei Hemmung des Proteasoms ..... 83**

**Abbildung 36: SARS-CoV Replikationskinetik bei MG-132-Behandlung ..... 84**

**Abbildung 37: Bestimmung der Dauer eines SARS-CoV Replikationszyklus ..... 85**

**Abbildung 38: Schema des Zeitfensterversuchs ..... 86**

**Abbildung 39: Zeitfensterversuch und Kontrollversuch ..... 86**

**Abbildung 40: Internalisierungsassay ..... 87**

**Abbildung 41: LC3-Konversion während der SARS-CoV Infektion ..... 88**

**Abbildung 42: Induktion von Autophagie in VeroE6 durch MG-132 ..... 89**

**Abbildung 43: SARS-CoV Replikation bei Induktion von Autophagie..... 90**

**Abbildung 44: Induktion von Autophagie in WT-MEF-Zellen durch MG-132 ..... 91**

**Abbildung 45: SARS-CoV Replikation in autophagiedefizienten MEF-Zellen ..... 92**

**Abbildung 46: XTT-Assay bei verschiedenen Behandlungen ..... 93**

**Abbildung 47: SARS-CoV Replikation bei Hemmung von Calpain ..... 93**

**TABELLENVERZEICHNIS**

<b>Tabelle 1: Coronaviren und deren Einteilung in taxonomische Gruppen anhand der Helicase und Polymerase .....</b>	<b>13</b>
<b>Tabelle 2: Verwendete Substanzen zur Behandlung von Säugetierzellen .....</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 4: Verwendete Antikörper .....</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 5: Verwendete Plasmide .....</b>	<b>38</b>

**ABKÜRZUNGEN**

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
ACE2	Angiotensin-Converting Enzyme 2
APS	Ammoniumpersulfat
ATF6	activating transcription factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BiP	immunoglobulin heavy chain binding protein
BFA	Brefeldin
BSA	Bovines Serumalbumin
BZ	Bortezomib
c	centi
C	Cytosin
CDC	Center for Disease Control
CHOP	C/EBP homologes Protein
CNX	Calnexin
CoV	Coronavirus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D	Deutschland
dest.	destilliert
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMV	Doppelmembranvesikel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Deoxycholol
DTT	Dithriothreitol
E	envelope
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
eIF2alpha	Elongations-Initiationsfaktor 2 alpha
EP	Elektrophoresepuffer
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERAD	ER-abhängige Degradation
ERSE	ER-Stress Element
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FECV	felines Coronavirus
FIPV	felines Peritonitisvirus
g	Gramm
G	Guanin
GADD153	growth arrest and DNA damage inducible gene 153
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
hu	human
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IRE1	inositol requiring enzyme 1
JNK	c-Jun terminal kinase
kDa	kilo Dalton
l	Liter
Lac	Lactacystin
LB	Luria-Bertrani
Luc	Luciferase
M	Molar, Matrix
m	milli, Meter
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MEM	Modified Eagle Medium
FCS	fötales Kälberserum
MHC	major histocompatibility complex
MHV	murines Hepatitisvirus
min	Minute
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
N	Nuleokapsid
NF	nuclear factor

n	nano
nsp	Nichtstrukturprotein
N-Terminus	Amino-Terminus
ORF	offener Leserahmen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PenStrep	Penicillin-Streptomycin
PERK	PKR-ähnliche ER-Kinase
PKR	Proteinkinase R
PNL	postnukleäre Lyse
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Spike, Svedberg
SARS	schweres akutes respiratorisches Syndrom
SDS	Natriumdodecylsulfat
sgRNA	subgenomsiche RNA
T	Thymidin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Tunicamycin
Ub	Ubiquitin
UPR	unfolded protein response
UPRE	UPR-Element
UV	ultraviolett
V	Volumen
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XBP1	X-Box binding protein
ZNS	zentrales Nervensystem

## PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

### Publikationen

**Schneider, M., Ackermann, K., Protzer, P., Schätzl, H.M., Gilch, S.: SARS-CoV replication is severely impaired by MG-132 due to proteasome-independent inhibition of calpain.** Journal of Virology. In Revision

Diemer, C., **Schneider, M.**, Seebach, J., Quaas, J., Frösner, G., Schätzl, H.M., Gilch, S. (2008): **Cell type-specific cleavage of nucleocapsid protein by effector caspases during SARS coronavirus infection.** Journal of Molecular Biology. 396, 23-34

Diemer, C., **Schneider, M.**, Schätzl, H.M., Gilch, S. (2010): **Modulation of Host Cell Death by SARS Coronavirus Proteins.** Molecular Biology of the SARS-Coronavirus (ed. Lal, S.K.). Chapter 14. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

### Poster-Präsentationen

**Schneider, M., Diemer, C., Schätzl, H.M., Gilch, S. (2008): SARS-CoV ORF7a protein interacts with GRP78, the signaling regulator of the unfolded stress response (UPR) in the endoplasmic reticulum.** Annual Meeting of the Society of Virology, Heidelberg.

**Schneider, M., Diemer, C., Schätzl, H.M., Gilch, S. (2009): SARS-CoV accessory protein 7a is strongly stabilized by inhibition of the proteasome.** Annual Meeting of the Society of Virology, Leipzig.

### Vortrag

**SARS-CoV accessory protein 7a: Interaction with Grp78/BiP and stabilization by proteasome inhibition.** Annual Meeting of the Institute of Virology of the TU Munich and the Helmholtz Association Munich 2009 (Auszeichnung für einen der 4 besten Vorträge)

## DANKSAGUNG

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Professor Hermann M. Schätzl, der es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und im Besonderen dafür, dass er trotz einiger Rückschläge an meinem Thema festgehalten und mich weiterhin unterstützt hat. Für ein immerzu offenes Ohr bei jeglichen wissenschaftlichen aber auch privaten Anliegen möchte ich mich außerdem sehr herzlich bedanken.

Meinen ebenso herzlichen wie tiefen Dank möchte ich Dr. Sabine Gilch für die wissenschaftliche Unterstützung, die liebe Betreuung und auch für die zeitintensiven Korrekturen aussprechen. Für ihre Hilfe als „wandelndes Laborlexikon“ und bei jedwedem Problem im Laboralltag bin ich sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Professor Ulrike Protzer für die finanzielle Unterstützung, die die Durchführung und Beendigung meiner Arbeit ermöglicht hat.

Bei Birgit Stark und Nicole Gröbl aus der Diagnostik möchte ich mich für die Bereitstellung von Zellen zu jedem benötigten Zeitpunkt und bei Kata Masic und Rezija Lutvica für den Ablauf eines reibungslosen Laboralltags auch herzlich bedanken.

Ich danke vielmals der guten Seele des Hauses – Frau Doris Pelz – für vergnügliche Gespräche, für die Organisation von Festivitäten und ihrer großen Hilfe bei jedwedem anfallendem „Papierkram“.

Für die sorgfältige und verlässliche Durchführung von Experimenten zur Unterstützung meiner Doktorarbeit bin ich auch Kerstin Ackermann zu großem Dank verpflichtet.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Professor Dirk Haller vom Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel für die bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Dissertation und Herrn Professor Michael Schemann vom Lehrstuhl für Humanbiologie für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission.

Mein ganz besonderer Dank geht an Yasmine Aguib, Hanna Wolf, Max Nunziante und Christian Bach für wissenschaftliche Diskussionen, Ihre Freundschaft, Ihre Hilfe und dafür, dass mit Ihnen die Arbeit einfach viel mehr Spass gemacht hat. Ganz besonders muss ich dabei nochmals Christian Bach für jedwede Hilfe bei computertechnischen Problemen danken.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppen Schätzl, Vorberg und Protzer, sowie allen Mitarbeitern der Diagnostik danke ich für das sehr gute, lockere Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.

Für jegliche Unterstützung, Hilfe, Motivation und für immer offene Ohren danke ich herzlichst allen meinen Freunden.

Zuletzt und zuerst möchte ich mich bei meinen Eltern und bei meiner Schwester für deren Unterstützung, Hilfe und Verständnis, für jegliche Annehmlichkeiten, also einfach für alles, in aller Liebe bedanken.