

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Tierhygiene

Entwicklung von therapeutischen Ansätzen gegen die SARS-Coronavirus Infektion

Mauricio D. Hipp

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. S. Scherer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer

2. Prof. Dr. H. Schätzl

(University of Wyoming, Laramie / USA)

Die Dissertation wurde am 13.03.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.05.2012 angenommen.

Gedruckt mit Unterstützung des
Deutschen Akademischen Austauschdienstes

Meiner Mutter

Zusammenfassung

Im Frühjahr 2003 wurde ein neues Coronavirus (CoV) als ätiologisches Agens des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS) identifiziert und als SARS-Coronavirus (SARS-CoV) bezeichnet. Ausgehend von der chinesischen Provinz Guangdong entwickelte sich innerhalb weniger Monate die SARS-Pandemie mit über 8000 Fällen in 29 Ländern, wobei etwa 10% der Patienten verstarben.

Das Virus hat ein positives, einzelsträngiges RNA-Genom mit einer Länge von etwa 30 kb. Neben Envelope- (E), Membran- (M) sowie Nucleocapsid- (N) Protein kodiert es auch das Spike- (S) Protein, welches für den ersten Schritt des viralen Vermehrungszyklus verantwortlich ist. Das S-Protein muss hierfür an den zellulären Rezeptor Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) binden, um so die Aufnahme des Virus in die Zelle zu vermitteln.

Das Ziel dieser Arbeit war die Hemmung der Interaktion zwischen dem S-Protein des Virus und der Wirtszelle, bzw. zwischen der Rezeptorbindedomäne (RBD) des S-Proteins und dem ACE2 Rezeptor. Für die potentielle Hemmung wurden rekombinante Peptid-Aptamere (PA) gewählt, die aus 16 randomisierten Aminosäuren bestehen und in ein Gerüstprotein (Thioredoxin A) eingebaut sind, das die Konformation stabilisieren soll. Eine Protein-Protein-Interaktionsanalyse von RBD mit den verschiedenen PA wurde mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems (Y2H) durchgeführt. Hierfür wurde eine Peptid-Aptamer-Bibliothek verwendet, welche einen Pool von ca. 1×10^6 unterschiedlichen Peptiden beinhaltet.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit ist es mittels Y2H gelungen, elf Peptid-Aptamere gegen das SARS-CoV S-Protein bzw. dessen RBD zu charakterisieren. Zur weiteren Analyse wurden die PA in einen pQE30-Vektor umkloniert und anschließend in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt.

Des Weiteren konnte ein optimiertes Expressionssystem für das S- und ACE2-Protein in Zellkultur hergestellt werden. Zur genaueren Untersuchung des Einflusses der einzelnen PA wurde einerseits untersucht, ob die Synzytien-Bildung, bedingt durch die Oberflächen-Expression und Interaktion von S mit hACE2 auf den Zellen, inhibiert werden kann. In einem zweiten Ansatz wurde getestet, ob durch Inkubation von SARS-CoV mit dem PA die Infektion von Vero-E6-Zellen verhindert werden kann. Aus den Ergebnissen dieser beiden Experimente kann abgelesen werden, dass mit PA1 nur eines der elf charakterisierten

Peptid-Aptamere eine deutliche Hemmung der Bindung zwischen SARS-S und ACE2-Protein aufweist.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass das gewählte rekombinante Peptid-Aptamer PA1 die ersten Schritte der Infektion hemmen kann. Derartige PA stellen damit Kandidaten dar, die in der Therapie der SARS-CoV Infektion potentiell angewendet werden können.

Abstract

In spring 2003 a novel coronavirus (CoV) was identified as the etiologic agent of the severe acute respiratory syndrome (SARS) and was later designated SARS coronavirus (SARS-CoV). Originating from the Chinese province Guangdong, the SARS pandemic with over 8000 cases spread on over 29 countries within a few months, causing death of 10% of infected persons.

The virus has a positive, single-stranded RNA genome with a length of 30 kb. Besides the envelope (E), membrane (M) and nucleocapsid (N) proteins it also encodes for the spike (S) protein, which is essential for initial steps of the viral replication cycle. Therefore, the S-protein has to bind the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in order to mediate uptake of the viral particle into the cell.

The aim of this study was to inhibit the interaction of the viral S protein with the host cell, more specifically, to inhibit the interaction of the receptor binding domain (RBD) of the S protein and the ACE2 receptor. To achieve this, recombinant peptide aptamers (PA) consisting of 16 randomized amino acids were selected from a combinatorial PA library consisting of a pool of 1×10^6 different peptides by using the yeast two hybrid system (Y2H). To stabilize conformation of the PA they were inserted into the scaffold protein thioredoxin A (trxA).

In this doctoral thesis 11 peptide aptamers which bind the SARS-CoV S protein RBD were characterized by Y2H. For further analysis the peptide aptamers were subcloned into the pQE30 plasmid for recombinant expression in, and subsequent purification from *E. coli*.

Furthermore, an optimized cell culture expression system for the S protein and the ACE2 protein was established. To investigate the effectivity of RBD-binding PAs in cell culture, their ability to inhibit the formation of syncytia, which is mediated by surface expression of the S protein and its interaction with ACE2 on the cell surface, was analysed. In a second approach, ability of the PAs to inhibit the infection of Vero-E6 cells with SARS-CoV was tested. Resulting data demonstrate that one of the characterized 11 peptide aptamers, PA1, was able to inhibit initial steps of SARS-CoV infection.

Thus, such peptide aptamers represent candidates which can be potentially used for an anti-SARS-CoV therapy.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	4
Abstract	6
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	12
Abkürzungsverzeichnis	13
Abkürzungsverzeichnis Aminosäuren	14
1 EINLEITUNG	15
1.1 Coronaviren	15
1.1.1 Taxonomie	15
1.1.2 Aufbau und Morphologie	17
1.2 SARS-CoV	18
1.2.1 Genom	18
1.2.2 Replikationszyklus	20
1.2.3 Strukturproteine des SARS-Coronavirus	23
1.2.4 ACE2, der zelluläre Rezeptor für SARS-CoV Infektion	26
1.2.5 Weitere Rezeptoren und Co-Rezeptoren von SARS-CoV	27
1.3 Schweres akutes respiratorisches Syndrom	29
1.3.1 Epidemiologie	29
1.3.2 Pathogenese und Klinik	31
1.4 Behandlung und Prophylaxe gegen SARS-CoV Infektion	31
1.5 Peptid-Aptamere (PA)	34
2 ZIELSETZUNG	36
3. MATERIAL	38
3.1 Geräte	38
3.2 Chemikalien und Marker	39
3.3 Kits	41
3.4 Verbrauchsmaterialien	41
3.5 Enzyme	42
3.6 Antikörper	42
3.7 Wachstumsmedien	43

3.7.1 Wachstumsmedien für Bakterien	43
3.7.2 Wachstumsmedien für Hefen	43
3.7.3 Wachstumsmedien für Säugetierzellen	44
3.8 Oligonukleotide	45
3.9 Vektoren und Konstrukte	46
3.10 Zelllinien, Bakterien, Hefen und Viren	51
3.11 Radioaktives Material	52
3.12 Puffer und Lösungen	52
4. METHODEN	58
4.1 Molekularbiologische Methoden	58
4.1.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR	58
4.1.2 PCR-Mutagenese	60
4.1.3 Agarosegelelektrophorese	61
4.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	61
4.1.5 Restriktionsverdau	62
4.1.6 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA	62
4.1.7 Ligation in pCR-Blunt II-TOPO	63
4.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten	63
4.2 Mikrobiologische Methoden	64
4.2.1 Methoden im Rahmen der Plasmid-DNA-Produktion	64
4.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	64
4.2.1.2 Transformation von Bakterien	64
4.2.1.3 Kultivierung von Bakterien	65
4.2.1.4 Plasmid-DNA-Isolierung im analytischen Maßstab	65
4.2.1.5 Plasmid-DNA-Isolierung im präparativen Maßstab	65
4.2.1.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung	66
4.2.1.7 Sequenzierung von DNA	66
4.2.2 Methoden im Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (Y2H)	66
4.2.2.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System	66
4.2.2.2 Anzucht von Hefezellen	68
4.2.2.3 Herstellung kompetenter Hefezellen	68
4.2.2.4 Transformation der Hefezellen	68
4.2.2.5 Transformation von Hefen in großem Maßstab	69
4.2.2.6 Plasmidisolierung aus Hefen	69
4.2.2.7 Kotransformation von Hefen	70

4.3 Biochemische Methoden	70
4.3.1 Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	70
4.3.2 Aufreinigung der His-Fusionsproteine	71
4.3.3 <i>In vitro</i> Transkription/Translation	72
4.3.4 Ko-Immunpräzipitation	73
4.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	73
4.3.6 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	74
4.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay	75
4.3.8 Herstellung von postnukleären Zelllysaten	75
4.3.9 Westernblot	75
4.4 Zellbiologische Methoden	76
4.4.1 Auftauen der Zellen	76
4.4.2 Kultivierung von Vero-E6-Zellen und HEK-293-Zellen	77
4.4.3 Einfrieren von Zellen	77
4.4.4 Zellzählung	77
4.4.5 Transiente Transfektion von Zellen mit <i>Lipofectamine 2000</i>	78
4.4.6 Zytotoxizitäts-Assay mittels Trypanblau-Färbung	78
4.4.7 Test zur Entwicklung von Synzytien	79
4.4.8 Infektion von Vero-E6-Zellen mit SARS-CoV und Behandlung mit Peptid-Aptameren	80
4.4.9 Plaque-Assay	81
5. ERGEBNISSE	82
5.1 Klonierungen der <i>Bait</i>-Proteine für Yeast-Two-Hybrid-Screenings	82
5.2 Yeast-Two-Hybrid Screen einer Peptid-Aptamer-Bibliothek gegen das S1-Protein	84
5.2.1 Sequentielle Kotransformation	84
5.2.2 Isolierung des <i>Prey</i> -Konstrukts	85
5.2.3 Sequenzierung des <i>Prey</i> -Konstrukts	86
5.2.2 Verifizierung der Interaktionen zwischen PA und dem SARS-CoV S1-Protein mittels Y2H und Ko-Immunpräzipitation	87
5.2.3 Mapping der Peptid-Aptamer-Bindungsregionen mittels Y2H	88
5.3 Protein-Expression in <i>E. coli</i> und Aufreinigung der PA	90
5.4 Erzeugung des Plasmids zur Expression von SARS-CoV-Spike in Säugerzellen	91

5.5 Expression des S-Proteins und des humanen SARS-CoV-Rezeptors hACE2	91
5.6 Einfluss der Peptid-Aptamere	95
5.6.1 Einfluss der Peptid-Aptamere auf die Vitalität der Zellen	95
5.6.2 Synzytien-Entwicklung in HEK-293-Zellen	96
5.6.3 Hemmung der Synzytien-Entwicklung in HEK-293-Zellen mittels PA	97
5.7 Inhibition der SARS-CoV-Infektion durch PA-Behandlung	100
6 DISKUSSION	102
7 AUSBLICK	109
Literaturverzeichnis	111
Danksagung	128

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme des Coronavirus	15
Abbildung 2:	Aufbau des Coronavirus	17
Abbildung 3:	Genomaufbau des SARS Coronavirus	19
Abbildung 4:	Organisation des Genoms sowie Darstellung des SARS-CoV verglichen mit dem Bovinen Coronavirus (BCoV)	20
Abbildung 5:	Replikationszyklus des SARS-CoV	22
Abbildung 6:	Rezeptorbindedomänen von Coronaviren	26
Abbildung 7:	SARS-Epidemie zwischen 2002-2003	30
Abbildung 8:	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) von <i>E. coli</i> , Thioredoxin A (TrxA)	35
Abbildung 9:	Verwendete Vektoren für die transiente Transfektion von Säugetierzellen	46
Abbildung 10:	Verwendete Vektoren für die Klonierung von PCR-Produkten	47
Abbildung 11:	Verwendete Vektoren für die Protein-Expression in <i>E. coli</i>	47
Abbildung 12:	Verwendete Vektoren für die Bestätigung der Effektivität der Transfektion	48
Abbildung 13:	Verwendete Vektoren für die Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine in <i>E. coli</i>	48
Abbildung 14:	Verwendete Vektoren für die Transformation der Hefen	49
Abbildung 15:	Auswertung des Plaque-Assay und MOI	81
Abbildung 16:	Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte	82
Abbildung 17:	Klonierung der Zielproteine in pGBK-T7 für die Y2H-Screenings	83
Abbildung 18:	Analytischer Restriktionsverdau der klonierten S-Protein-Fragmente	84
Abbildung 19:	Analytischer Restriktionsverdau der 11 Peptid-Aptamer-Klone	86
Abbildung 20:	Y2H-Screening der 11 selektionierten Peptid-Aptamere gegen S1-Protein	88
Abbildung 21:	Mapping der Peptid-Aptamer-Bindungs-Regionen mittels Y2H	89
Abbildung 22:	Analyse der rekombinanten Expression und der Aufreinigung der PA	91
Abbildung 23:	Expression des S-Proteins (pcDNA3.1-S)	93
Abbildung 24:	Expression des S-Proteins (pHCMV-SARS-CoV-SΔ19) in HEK-293-Zellen	93
Abbildung 25:	Expression des S-Proteins (pHCMV-SARS-CoV-SΔ19) in Vero-E6-Zellen	94
Abbildung 26:	Expression des hACE2-Proteins (pcDNA3.1-ACE2) in HEK-293-Zellen	94
Abbildung 27:	Expression des hACE2-Proteins (pcDNA3.1-ACE2) in Vero-E6-Zellen	95
Abbildung 28:	Ergebnisse der Vitalitätstests in Vero-E6-Zellen	96
Abbildung 29:	Entwicklung der Synzytien zwischen S-Protein- und ACE2-exprimierenden HEK-293-Zellen	97
Abbildung 30:	Hemmung der Entwicklung von Synzytien zwischen S-Protein und ACE2	98
Abbildung 31:	Hemmung der Entwicklung von Synzytien zwischen S-Protein und ACE2	98
Abbildung 32:	Hemmung der Entwicklung von Synzytien zwischen S-Protein und ACE2	99

Abbildung 33:	Ergebnisse der Auszählung der Synzytien [%]	99
Abbildung 34:	Titer des SARS-CoV nach der Behandlung mit PA	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung der charakteristischen Vertreter der Coronaviren in taxonomische Gruppen	16
Tabelle 2:	Verwendete Restriktionsenzyme	42
Tabelle 3:	Verwendete Primärantikörper	42
Tabelle 4:	Verwendete Sekundärantikörper	43
Tabelle 5:	Verwendete Oligonukleotide	45
Tabelle 6:	Liste der Konstrukte	50
Tabelle 7:	Verwendete Zelllinien	51
Tabelle 8:	Verwendete Bakterienstämme	51
Tabelle 9:	Verwendete Hefezelllinien	51
Tabelle 10:	Verwendete Viren	51
Tabelle 11:	Verwendete Chemikalien für die Gelherstellung	74
Tabelle 12:	Sequenzen der Peptid-Aptamere	87

Abkürzungsverzeichnis

AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
BD	DNA-Bindedomäne
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CD209	DC-SIGN = <i>dendritic cell specific ICAM-grabbing non integrin</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CoV	Coronavirus
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
FCS	fötale Kälberserum
Gal	Galaktosidase
hACE2	<i>Humanes Angiotensin converting enzyme 2</i>
g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
His	Histidin
Ig	Immunoglobulin
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani Medium
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
MOI	Multiplizität der Infektion
Mr	relatives Molekulargewicht
OD	optische Dichte
P	Penicillin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
Primer	Nukleotid für PCR Reaktion

RBD	Rezeptorbindedomäne
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SARS	<i>Severe acute respiratory syndrom</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Protein	Spike Protein
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Y2H	<i>Yeast-Two-Hybrid</i>
YPD	Yeast Peptone Dextrose
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3 indolyl- β -D

Abkürzungsverzeichnis Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 EINLEITUNG

1.1 Coronaviren

Mitte der sechziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts wurde das humane Coronavirus (CoV) entdeckt (Tyrell und Bynoe, 1965). In der Elektronen-mikroskopischen Aufnahme kann man sphärische Viruspartikel erkennen, die von einer Membranhülle mit eingelagerten Proteinen umgeben sind. Der Name leitet sich vom kranzförmigen Aussehen der Viren ab, wobei der Begriff „Corona“ aus dem Lateinischen kommt und als „Kranz“ oder „Krone“ übersetzt werden kann (Abbildung 1).

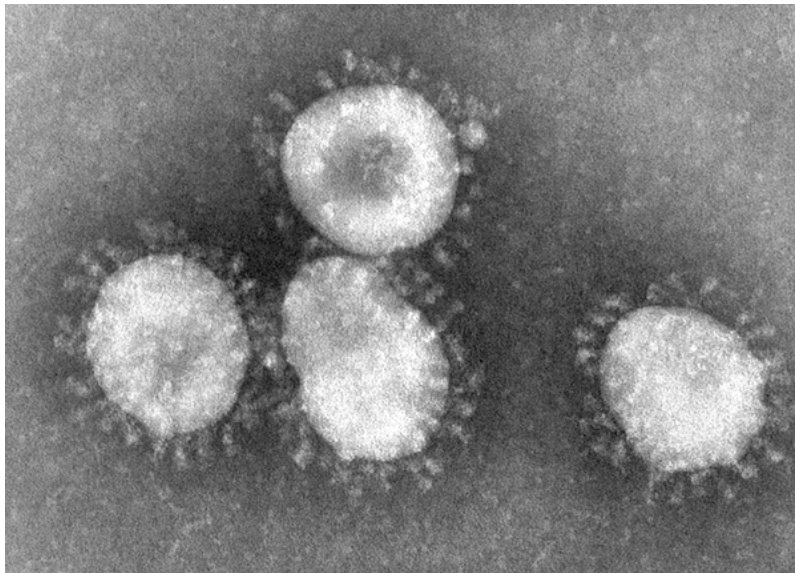


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Coronavirus
(CDC-Centers for Disease Control and Prevention`s Public Health Library, 2011)

1.1.1 Taxonomie

Schweres akutes respiratorisches Syndrom (SARS) war die erste neue Infektionskrankheit des 21. Jahrhunderts. Sie hatte ihren Ursprung im November 2002 in der chinesischen Provinz Guangdong (Zhong *et al.*, 2003). Mittels einer von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) initiierten globalen Zusammenarbeit konnte im April 2003 das neue Coronavirus identifiziert werden, das verantwortlich für den Ausbruch von SARS war (Drosten *et al.*, 2003; Kuiken *et al.*, 2003).

Das SARS-Coronavirus (SARS-CoV) gehört zur Gattung *Coronavirus* innerhalb der Familie *Coronaviridae*. Diese Viren-Familie wurde 1975 durch das Internationale Komitee für Virus-

Taxonomie eingeführt (Tyrrell *et al.*, 1975). Seit 2005 wird sie in die beiden Sub-Familien *Coronaviridae* und *Toroviridae* unterteilt. Letztere sind verantwortlich für enterische Krankheiten beim Rind, treten aber auch beim Menschen auf. Die *Coronaviridae*, *Arteviridae* und *Roniviridae* wurden zur Ordnung der *Nidovirales* zusammengefasst. Die Viren aus der Familie der *Arteviridae* treten typischerweise bei Schweinen und Pferden auf, Viren aus der Familie der *Roniviridae* bei Invertebraten (Weiss *et al.*, 2005). Coronaviren sind verantwortlich für die häufigsten Erkältungskrankheiten und Infektionen im oberen und seltener im unteren Respirationstrakt. Durch Studien konnte gezeigt werden, dass die SARS-CoV-Infektion in den meisten Fällen in den Atemwegen auftritt und eine hohe Morbidität aufzeigt. Der Atemwegstrakt ist auch der wichtigste Ort für die Replikation des Virus.

Die bereits zuvor bekannten humanen Coronaviren (HCoV) HCoV-OC43 und HCoV-229E sind Auslöser von circa 30% aller respiratorischen Infektionen. Desweiteren tritt HCoV-NL63 in Zusammenhang mit Bronchiolitis, HKU1 mit Pneumonie auf (Jia *et al.*, 2005). Alle vier gehören ebenfalls der Gruppe der humanen Coronaviren an.

Die Coronaviren wurden aufgrund phylogenetischer und serologischer Unterschiede in drei Gruppe (I-III) klassifiziert (Gorbalenya *et al.*, 2004; Modrow *et al.*, 2010a) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der charakteristischen Vertreter der Coronaviren in taxonomische Gruppen

Gruppe	Menschen	Tier
I	Humanes Coronavirus 229E	Virus der transmissiblen Gastroenteritis der Schweine (TGE-Virus)
	Humanes Coronavirus NL63	Felines Coronavirus (FeCoV, FIP-Virus)
		Fledermaus-Coronavirus-HKU2, 6-8
II	Humanes Coronavirus OC43	Maus-Hepatitis-Virus (MHV), Serotypen 1-3
	Humanes Coronavirus HKU1	Coronavirus des Rindes (BHV)
	SARS-Coronavirus	SARS-Coronavirus der Schleichkatze
		SARS-Coronavirus der Fledermaus
III		Virus der infektiösen Bronchitis des Huhns

In der letzten Zeit wird SARS-Coronavirus oftmals in einer weiteren phylogenetischen Gruppe IV reklassifiziert (Marra *et al.*, 2003). Jedoch zeigen neue Genomanalysen eine entfernte Verwandtschaft des SARS-CoV mit Coronaviren der Gruppe 2 (Berger *et al.*, 2004). Die Zugehörigkeit von SARS-CoV zu dieser Gruppe ist derzeit noch nicht eindeutig geklärt.

1.1.2 Aufbau und Morphologie

Das Coronavirus ist ein Mitglied der Familie der umhüllten Viren, die sich im Zytoplasma der tierischen Wirtszellen vermehren können. Es besitzt ein einzelsträngiges RNA-Genom in Plusstrangorientierung (ssRNA (+)) mit einer Länge von etwa 30 kb und weist damit das größte RNA-Genom aller RNA-Viren auf. Das Genom hat eine 5' Cap-Struktur sowie einen 3' Poly-A-Strang (Marra *et al.*, 2003). Der Durchmesser des Viruspartikels beträgt 80-160 nm. Der typische genomische Aufbau der Coronaviren beinhaltet im Innern des Partikels ein helikales Nucleokapsid, bestehend aus RNA und Nucleokapsid (N)-Proteinen. Das Partikel ist von einer Lipidmembran umhüllt, in die das Hauptprotein S (Surface oder Spike), das Matrixprotein M (Membran) sowie das Hüllprotein E (Envelope) eingelagert sind. Bei den meisten Viren der Gruppe II ist in der Hülle ebenfalls das Protein Hämagglutinin-Esterase (HE) zu finden, allerdings nicht bei dem SARS-CoV (Abbildung 2). Im Bereich der für die Strukturproteine kodierenden Genomhälfte finden sich zusätzlich kleine Leserahmen, die für die sog. akzessorischen Proteine mit teils unbekannter Funktion kodieren. Die meisten sind für die Virusreplikation nicht essentiell (Ziebuhr, 2004; Yu *et al.*, 2006).

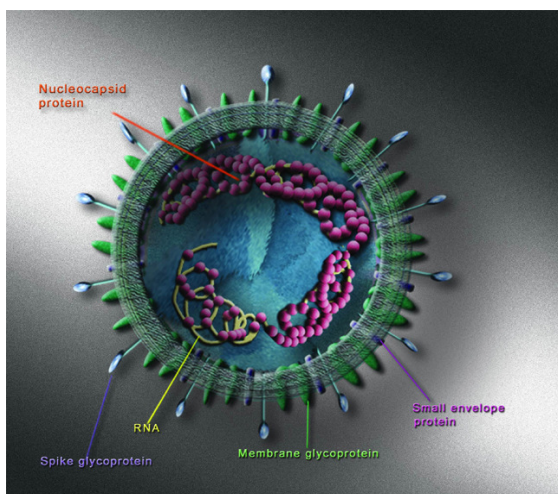


Abbildung 2: Aufbau des Coronavirus

(Quelle: Online: www.human-healths.com, 2011)

1.2 SARS-CoV

1.2.1 Genom

Im März 2003 wurde die Genom-Sequenz des SARS-CoV aufgeklärt. Es besitzt eine Nukleotidsequenz zwischen 29.727 und 29.751 bp. Die Genomsequenz zeigt, dass dieses Coronavirus nur wenig mit anderen Coronaviren, u. a. auch den menschlichen Coronaviren HCoV-OC43 und HCoV-229E, verwandt ist (Marra *et al.*, 2003, Rota *et al.*, 2003). Das Genom kodiert für 14 offene Leserahmen (ORFs), die in 3 Gruppen eingeordnet werden. Die erste Gruppe, ORF1, besteht aus zwei überlappenden ORFs (ORF1a und 1b) und wird als Replikase-Region bezeichnet. Diese Region kodiert für 16 Nichtstrukturproteine (nsp), darunter befinden sich mehrere Enzyme, bspw. Proteasen, Helikasen Methyltransferase und RNasen. Im Zytoplasma wird die Replikase-Region direkt von der genomischen RNA in zwei große Polypeptide (pp1a und pp1ab) translatiert. (Ziebuhr *et al.*, 2000; Zhai *et al.*, 2005; Putics *et al.*, 2005). Während der Translation wird durch einen ribosomalen Leserasterschub (*ribosomal Frameshifting*) das Überlesen eines Stopcodons am Ende des pp1a und damit die Proteinsynthese bis zum Ende von pp1ab ermöglicht (Weiss *et al.*, 2005). Das große Polyprotein wird dann durch virale Proteasen in die einzelnen nsp's gespalten (Groneberg *et al.*, 2005).

Die zweite Gruppe der Leserahmen bilden die strukturellen Proteine (Spike, Envelope, Matrix und Nukleokapsid), die eine wichtige Rolle beim viralen Aufbau (Groneberg *et al.*, 2005) spielen.

Bei der dritten Gruppe handelt es sich um akzessorische Proteine (z.B. ORF3a, 7a, 7b und 6). Vermutlich haben diese Proteine eine wichtige Funktion als Virulenzfaktoren (Sawicki *et al.*, 2007).

Wie bei allen derzeit bekannten Coronaviren befindet sich am 3'-Ende ein Poly-(A)-Schwanz und am 5'-Ende eine Cap-Struktur (Abbildung 3) (Marra *et al.*, 2003).

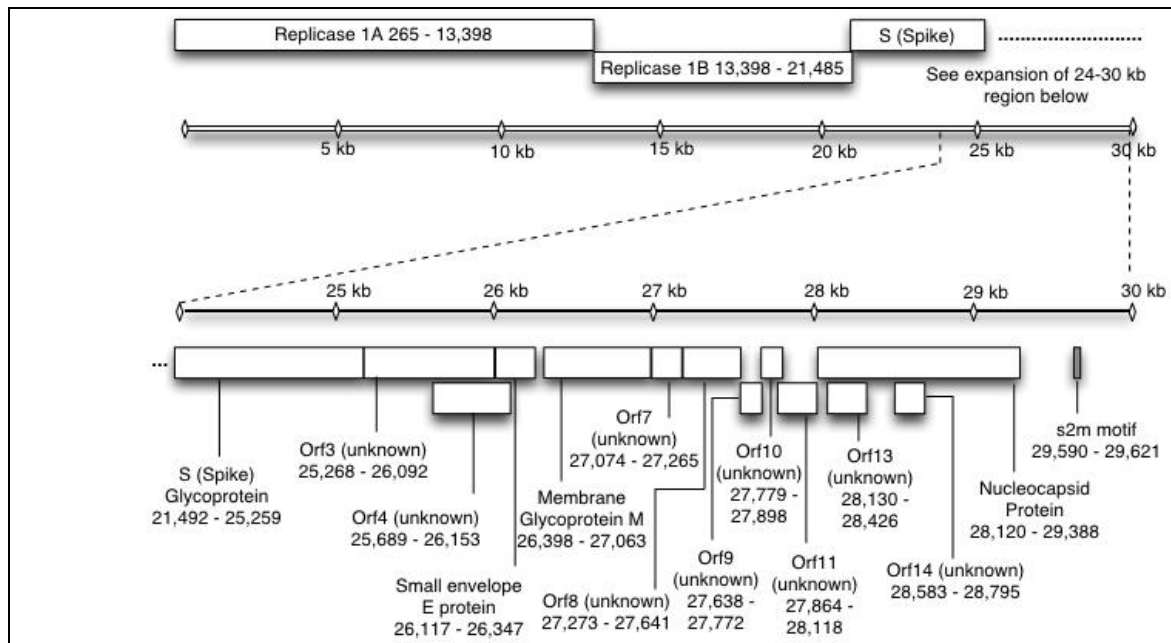


Abbildung 3: Genomaufbau des SARS Coronavirus

(Marra *et al.*, 2003)

Der auffälligste Unterschied zwischen den bekannten Gruppe-2-Coronaviren und dem SARS-CoV wurde in der größten Untereinheit nsp3 identifiziert (Abbildung 4). Im Gegensatz zu allen anderen Coronaviren hat SARS-CoV keine orthologisch ähnliche Papainprotease 1 (PL1^{pro}), welche wahrscheinlich im Laufe der Evolution verloren ging. Diese Beobachtung impliziert, dass die drei Spaltungen in der N-terminalen Hälfte des pp1a alle durch die konservierte PL2^{pro} entstehen, einer Protease, die stromabwärts liegt und ein Paralog zu PL1^{pro} darstellt. PL1^{pro} scheint in HCoV-229E zu dominieren und ist die einzig aktive PL^{pro} im aviären infektiösen Bronchitis Coronavirus (IBV). Unmittelbar stromaufwärts von PL2^{pro} wurde eine 375 Aminosäuren große "Orphan-Domain" gefunden, die auch als SARS-CoV Unique Domain (SUD) bezeichnet wird. Diese Domäne tritt bei keinen anderen Coronaviren auf. Die zugehörige ORF1a-Region unterscheidet sich grundlegend innerhalb der Gruppe-1-Coronaviren. Bei einem dieser Viren (TGEV) sowie in der Gruppe-3-IBV enthält diese Region nur sehr wenige Aminosäurereste. Im Gegensatz dazu teilen HCoV-229E und *porcine epidemic diarrhoea coronavirus* (PEDV) eine konservierte Domäne an dieser Position. Interessanterweise war nsp3 auch der wichtigste Bereich für die unterschiedlichen Replikasen zwischen den BCoV Varianten, die aus Atemwegs- und Darm-Proben eines Tieres stammen, das nach einer Lungenentzündung verstarb (*shipping pneumonia*) (Snijeder *et al.*, 2003).

Eine Besonderheit des SARS-Virus sind die neun akzessorischen ORFs, die keine Homologien mit anderen Coronaviren besitzen (Marra *et al.*, 2003) und deren Funktion bei der Replikation und Pathogenese grundsätzlich unbekannt sind (Snijder *et al.*, 2003; Yount *et al.*, 2005).

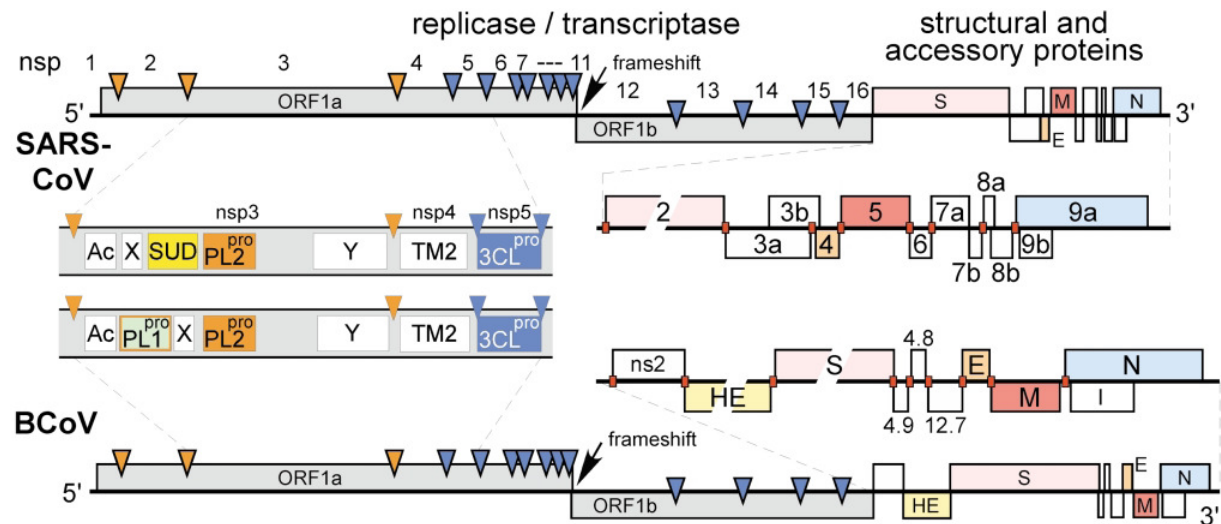


Abbildung 4: Organisation des Genoms sowie Darstellung des SARS-CoV verglichen mit dem Bovinen Coronavirus (BCoV)

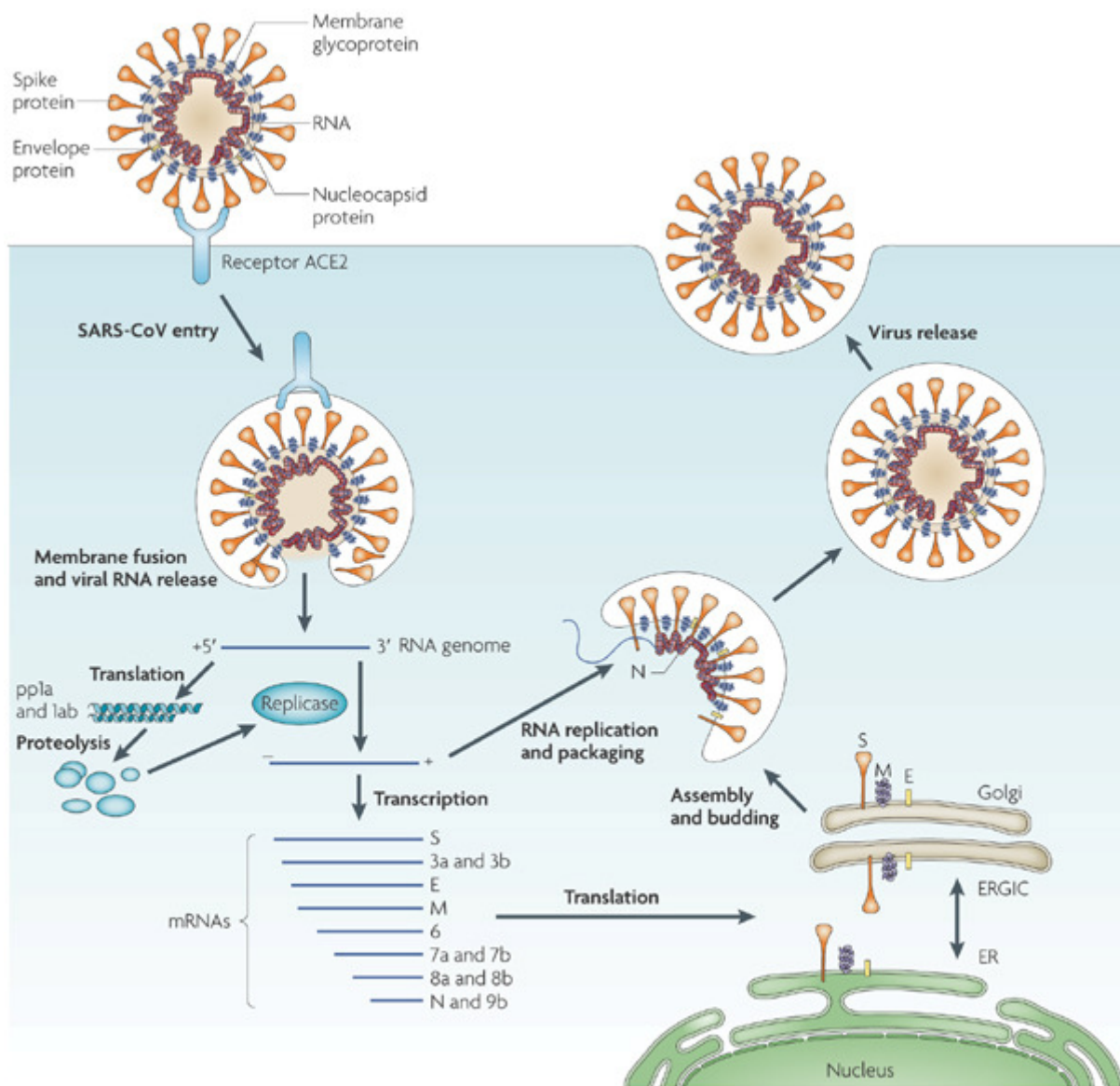
Es werden die Replikase-Gene von ORF1a und ORF1b sowie die Stelle des ribosomalen Leserasterschubs dargestellt. In der Mitte der N-terminalen Region von ORF1a des SARS-CoV fehlt die PL1^{pro}-Domäne, stattdessen findet sich dort die SARS-Unique Domain (SUD). Modifiziert nach Snijder *et al.*, 2003.

1.2.2 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus des SARS-CoV beginnt mit der Bindung des S-Proteins an den spezifischen Rezeptor in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Der wichtigste Rezeptor ist das *Angiotensin Converting Enzym* (ACE2) (Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde CD209L als alternativer Rezeptor identifiziert (Jeffers *et al.*, 2004). Die Bindung löst eine Konformationsänderung des Spike-Proteins aus, die die Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran fördert (Matsuyama *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006). Die Aufnahme der Viruspartikel scheint durch eine rezeptorvermittelte Endocytose und nachfolgende Fusion der Endosomen mit der Virusmembran zu erfolgen (Modrow *et al.*, 2010b). Die Fusion ermöglicht die Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma, in dem die Replikationsschritte stattfinden. Die genomische RNA dient als Matrize für die Translation des Polyproteins der Nichtstrukturproteine pp1ab, das die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) enthält (Thiel *et al.*, 2003). Dann erfolgt die Synthese einer Negativstrang-RNA an der genomischen Positivstrang-RNA.

Derzeit ist der Transkriptionsmechanismus von Coronaviren noch nicht eindeutig geklärt, es wird jedoch die Theorie der diskontinuierlichen Transkription befürwortet (Enjuan *et al.*, 2006, Sawicki *et al.*, 2007, Pasternak *et al.*, 2006). Hierbei wird basierend auf dem RNA-Genom eine Minusstrangsynthese wahrscheinlich mit Hilfe der viralen Proteine durchgeführt. Der Negativstrang dient als Matrize zum einem für die Genomreplikation und zum anderem für die Synthese der subgenomischen mRNAs (nested set sg mRNAs). Die Entstehung der sg mRNAs wird vermutlich durch die Signalsequenzen (TRS, *transcription regulatory sequence*) im Minusstrang vermittelt, die sich vor dem Startpunkt eines ORFs befinden und mit den komplementären Teil der Leadersequenz (ca. 70 Basen) hybridisiert werden. Dabei kommt es zu einem Matrizenwechsel der viralen Polymerase, und die 70 nichtkodierenden Basen des viralen Genoms werden an den Minusstrang fusioniert. Die so entstandenen sg mRNAs besitzen alle identische 5'- und 3'-Enden und dienen als Matrize für Positivstrangkopien. Nach der Fusion der Cap-Sequenz sind die mRNAs translationsfähig (Holmes, 2003). Diese mRNAs kodieren die strukturellen Proteine S, E, M und N sowie eine Reihe von akzessorischen Proteinen (Thiel *et al.*, 2003; Novoa *et al.*, 2005). Nach der Translation der Strukturproteine unterlaufen diese noch verschiedene posttranslationale Modifizierungen, wie Glycosylierung und Phosphorylierung. Diese Proteine werden am endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle mit der replizierten viralen RNA assoziiert und knospen dort in den sekretorischen Transportweg, woraufhin das neuentstandene Virus durch den Golgi-Komplex in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und dort per Exocytose freigesetzt wird (Novoa *et al.*, 2005) (Abbildung 5).

Während der Virusreplikation werden die Glycoproteine an die Oberfläche der infizierten Zellen transportiert. Die Expression des S-Proteins kann durch Bindung an ACE2 die Fusion von einer infizierten Zelle mit einer nicht infizierten Nachbarzelle ermöglichen, die zur Bildung von großen mehrkernigen Riesenzellen (Synzytien) führt (Li *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2004; Zhi *et al.*, 2005). Die Synzytien erlauben eine schnelle Ausbreitung der Infektion (Krueger *et al.*, 2001).



Nature Reviews | Microbiology

Abbildung 5: Replikationszyklus des SARS-CoV

Das Virus gelangt über rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle. Dabei bindet das S-Protein zuerst an den ACE2-Rezeptor, und der ACE2-Virus-Komplex wird zu Endosomen transloziert. Das virale Genom wird freigesetzt und die viralen Replikase-Polyproteine PP1a und PP1ab translatiert, die dann in kleine Produkte viraler Protease gespalten werden. Subgenomische Negativ-Strang-Templates werden durch diskontinuierliche Transkription des Plus-Strang-Genoms synthetisiert und dienen als Template für die mRNA-Synthese. Der full-length Negativ-Strang ist Template für die Herstellung der genomischen RNA. Die Viruspartikel werden im Zytoplasma aus genomischer RNA und N-Proteinen zusammgebaut, im Anschluss folgt das *Budding* in das Lumen des ERGIC (Endoplasmatisches Retikulum (ER) -Golgi Kompartiment). Schließlich werden die Virionen durch Exozytose freigesetzt (Du *et al.*, 2009).

1.2.3 Strukturproteine des SARS-Coronavirus

Bei allen Coronaviren finden sich insgesamt vier Strukturproteine (N-, M-, E- und S-Protein), welche zur Adhäsion, Fusion, Morphogenese sowie zur Freisetzung der Viren dienen.

Das Nukleokapsidprotein (N)

Das Nukleokapsidprotein (N-Protein) ist ein Phosphoprotein, das ein Molekulargewicht von etwa 46 kDa und eine Größe von 422 Aminosäuren besitzt. Es wird von dem neunten ORF des SARS-CoV kodiert, der auch für ein weiteres akzessorisches Protein mit dem Namen ORF9b kodiert, das bei keinem weiteren Coronavirus auftritt und dessen Funktion noch nicht definiert ist. Das N-Protein besteht überwiegend aus positiv geladenen Aminosäuren, die für die RNA-Bindung von Bedeutung sind (Surjit *et al.*, 2007).

Die Expression des N-Proteins spielt eine essentielle Rolle bei der Verpackung des viralen Genoms im Viruspartikel und interagiert mit dem Membranprotein (M). Neben der Aufgabe in der viralen Morphogenese scheint das N-Protein auch andere wichtige Funktionen im Lebenszyklus und in der Pathogenese von SARS zu erfüllen (Diemer *et al.*, 2007).

Das Membranprotein (M)

Das Membranprotein (M-Protein) besteht aus 221 Aminosäuren, das Molekulargewicht beträgt etwa 25 kDa. Es ist das wichtigste und mit einem Anteil von 40% auch das häufigste strukturelle Protein des SARS-CoV. Das M-Protein spielt auch eine Rolle bei der Zusammensetzung der Viruspartikel. Es enthält hoch konservierte, glykosylierte Sequenzen, deren Glykosylierung eine Rolle bei der Interaktion zwischen Virus und Wirtszelle spielen könnte. Zusätzlich zeigt das M-Protein drei Domänen; eine kurze aminoterminal Ektodomäne, drei Transmembrandomänen sowie eine carboxylterminale Endodomäne (Fang *et al.*, 2005; McBride *et al.*, 2010).

Während des gesamten Infektionszyklus bleibt das M-Protein in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Es rekrutiert alle strukturellen viralen Komponenten zum ER-Golgi-Intermediate Complex (ERGIC), wo der Zusammenbau viraler Partikel (*Assembly*) und die Knospung (*Budding*) erfolgt (Voß *et al.*, 2009).

Das Envelope-Protein (E)

Das Molekulargewicht des E-Proteins, bestehend aus 76 Aminosäuren, beträgt etwa 10 kDa (Kuo *et al.*, 2003). Das E-Protein ist als Transmembranprotein in einer geringen Kopienzahl im Viruspartikel vertreten. Es enthält eine kurze (7-9 Aminosäuren) hydrophile, aminoterminal Region gefolgt von einer langen (21-29 Aminosäuren) hydrophoben Region sowie eine hydrophile Carboxylterminal-Region (Kuo *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2006; DeDiego *et al.*, 2007). Es ist essentiell für den Zusammenbau viraler Partikel und die Morphologie der Coronaviren (Kuo *et al.*, 2003).

Wie die Proteine anderer Viren bildet das CoV E-Protein Ionenkanäle und verändert bei dem SARS-CoV sowie dem murinen Hepatitis-Virus (MHV) die Membranpermeabilität (DeDiego *et al.*, 2007). Des Weiteren besitzt es eine apoptotische Funktion (Torres *et al.*, 2006). Die Koexpression des E- und M-Proteins ist allein ausreichend und notwendig für die Produktion und Freisetzung von Virus-ähnlichen Partikeln (VLP) (Ye *et al.*, 2007).

Das Spike-Protein (S-Protein, S)

Das S-Protein ist ein typisches virales Transmembranprotein vom Typ I, zu dem auch das HIV Glykoprotein 160 (Env), Influenza Hämagglutinin (HA), Paramyxovirus F-Protein und Ebola-Virus Glycoprotein gehören. (Xu *et al.*, 2004; McReynolds *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2009). Das S-Protein ist an der Membran des Virus verankert. Ein Peplomer oder Oligomer von zwei oder drei Spike-Proteinen bildet die charakteristische Kranz-Form des Virus (Broer *et al.*, 2006). Das SARS-CoV S-Protein kodiert für ein Oberflächenglykoprotein und ist mit einer Länge von 1255 Aminosäuren und einem MW von 180-200 kDa das größte Strukturprotein des Virus (Giroglou *et al.*, 2004; Tripet *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2009). Es besteht aus einem Signalpeptid (AS 2-12) in der aminoterminalen Region, einer Ektodomäne (AS 13-1195), einer Transmembrandomäne (TMD) (AS 1196-1215) und einer kurzen Endodomäne (AS 1216-1255) (Babcock *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2009).

Zusätzlich besitzt es 23 mögliche N-Glykosylierungsstellen, von denen mindestens 12 verwendet werden (Babcock *et al.*, 2004; Simmos *et al.*, 2004). Insgesamt besteht zwischen dem S-Protein des SARS-CoV und dem anderer Coronaviren eine Homologie von 20-27% (Babcock *et al.*, 2004; Giroglou *et al.*, 2004; Simmos *et al.*, 2004). Das S-Protein der Gruppen II und III der CoV (Tabelle 1) wird durch eine enzymatische Reaktion in zwei nicht-kovalente Untereinheiten (S1, S2) gespalten (Babcock *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004).

Die aminoternale Region S1 formt einen kugelförmigen Kopf, welcher die Rezeptorbindedomäne (RBD) enthält, während die carboxylterminale Region S2 für die Verankerung in die Virusmembran verantwortlich ist (Bosch *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2004; Tripet *et al.*, 2004; Beniac *et al.*, 2007).

Die RBD liegt zwischen Position 318 und 510 des S-Proteins des SARS-CoV und besitzt sieben Cysteine. Hiervon sind fünf für die Verankerung des Virus an die Zielzelle notwendig, welches die Vorstufe für die Fusion bildet (Wong *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2007). Die RBD enthält zwei Subdomänen, den Kern und eine externe Schleife. Der Kern ist fünfsträngig, ein antiparalleles β -Faltblatt mit drei kurzen α -helikalen Verbindungssegmenten. Die Schleife liegt zwischen Position 424 und 494, einem Bereich, der auch Rezeptor-Bindungsmotiv (RBM) genannt wird und als einziger direkten Kontakt mit ACE2 hat. Obwohl die RBD eine Homologie mit ähnlichen Regionen anderer Gruppe-2-Coronaviren hat, kann das RBM ausschließlich im SARS-CoV gefunden werden (Li *et al.*, 2006) (Abbildung 6).

Die Untereinheit S2 besteht aus zwei Regionen mit hydrophoben *heptad repeats* (HR1 und HR2), welche auch in besonders hoher Ähnlichkeit bei anderen CoV auftreten (Yu *et al.*, 2004; Broer *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2008). HR1 liegt hinter dem putativen Fusionspeptid, HR2 kurz vor der Transmembrandomäne.

Nach Beginn der Fusion erfolgt eine Konformationsumwandlung im Spike-Oligomer, bei der die beiden HRs eine sog. „Sechs-Helix-Bündel“-Struktur ausbilden – drei α -Helices von HR1 und drei antiparallele α -Helices von HR2 – und so die enge Annäherung des Fusionspeptids und der TMD ermöglicht. Diese Struktur stellt die postfusionale Konformation dar. Die Affinität der beiden HRs füreinander stabilisiert die Konformation und sorgt für die Fusion des Virus mit der Zellmembran. Der Auslöser für diese Konformationsumwandlung des S-Proteins ist in der Regel die Interaktion mit dem Rezeptor (Broer *et al.*, 2006; McReynolds *et al.*, 2008).

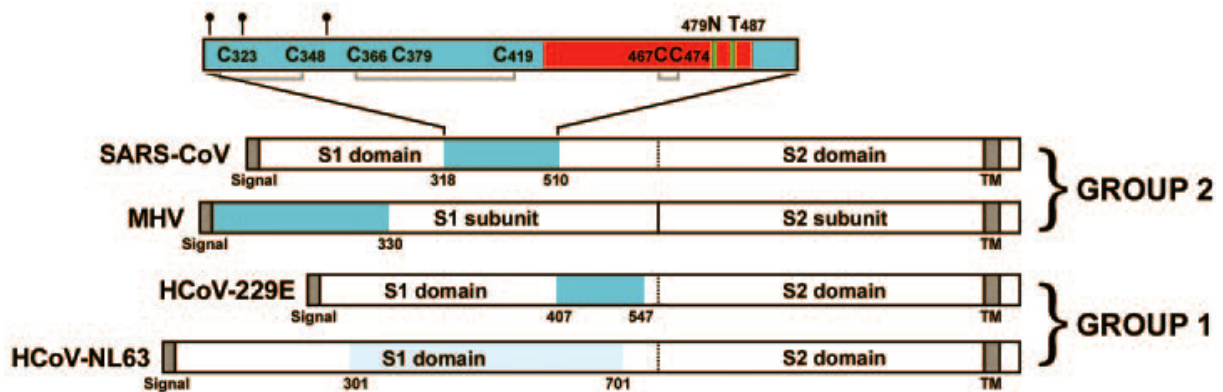


Abbildung 6: Rezeptorbindedomänen von Coronaviren

Es werden die primären Strukturen des SARS-CoV, des Maus Hepatitis Virus (MHV) sowie zwei Repräsentanten aus der Gruppe 1 der menschlichen Coronaviren (HCoV-NL63 und HCoV-229E) gezeigt. Die Rezeptorbindedomänen der einzelnen Coronaviren werden cyan dargestellt. Die RBD des SARS-CoV wird vergrößert mit Glykosylierungsstellen und Disulfidstruktur dargestellt. Das Rezeptor-Bindungs-Motiv (RBM) innerhalb der RBD ist rot markiert. Das RBM weist eine lange Schleife in direktem Kontakt mit ACE2 auf (Wong *et al.*, 2004).

Bei dem SARS-CoV sind derzeit zwei unterschiedliche Wege für den Zielzelleneintritt bekannt. Einerseits nutzt das Virus den endozytotischen Weg, andererseits einen direkten Eintritt über die Zelloberfläche. Bei dem endozytotischen Weg wird das an dem Rezeptor ACE2 verankerte Viruspartikel in ein Endosom gepackt. Im Anschluss wird das S-Protein an der Aminosäureposition 678 durch die endosomale Protease Cathepsin L (CPL) gespalten, die die Fusionsaktivität des S-Proteins aktiviert. Dies führt zu einer Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran und zur Internalisierung des Virus-Genoms in die Zelle. Bei dem direkten Eintritt wird die Fusion des an ACE2 gebundenen S-Proteins durch Proteasen wie Trypsin aktiviert. Es erfolgt eine Spaltung des S-Proteins an der Aminosäureposition 667, welche 11 Aminosäuren vor der CPL-Spaltstelle liegt. Die Folge ist die Verschmelzung der Virushülle mit der Plasmamembran und schließlich der Eintritt des Virus von der Zelloberfläche in die Zelle (Matzuyama *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2008).

1.2.4 ACE2, der zelluläre Rezeptor für SARS-CoV Infektion

Das *Angiotensin-Converting-Enzyme II* (ACE2) wurde im Jahr 2000 als ein Homolog der Zink-Metalloprotease des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) erkannt (Donoghue *et al.*, 2000). Es ist ein Typ1 Transmembranprotein, das vorwiegend auf dem Endothelium von Herz, Nieren, Hoden und darüber hinaus auch in geringerem Anteil im Magen-Darm-Trakt und den Lungen exprimiert wird (Harmer *et al.*, 2002; Peiris *et al.*, 2004). Mit seinen 805 Aminosäuren besitzt es ein Molekulargewicht von 120 kDa (Tipnis *et al.*, 2000).

Während ACE an der Bildung des gefäßverengenden Angiotensin II beteiligt ist, fördert ACE2 vermutlich die vermehrte Produktion von Angiotensin (1-7) und Angiotensin (1-9), die als blutdrucksenkende Mediatoren im Renin-Angiotensin-System (RAS) auftreten. ACE2 gilt neben ACE mittlerweile als wichtiger Regulator des Herz-Kreislauf-Systems (Crackower *et al.*, 2002).

Für die Bindung der verschiedenen humanen Coronaviren sind unterschiedliche zelluläre Rezeptoren verantwortlich. So benötigt das HCoV-229E den Rezeptor CD13, während HCoV-OC43 und HKU1 den Rezeptor Neu5, 9Ac2-c m benötigen. ACE2 wurde hingegen als Rezeptor sowohl für das SARS-CoV als auch für NL63 identifiziert. Eine extrazelluläre Region von ACE2 – bestehend aus einer α -Helix, einem Lysin (an Position 353), einer N-terminalen Domäne sowie einem β -Faltblatt – interagiert mit hoher Affinität mit der Rezeptorbindedomäne (RBD) des S-Glycoproteins des SARS-CoV, was Voraussetzung für die Infektion *in vivo* ist (Li *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2005).

Ein Fragment des S-Proteins des SARS-CoV mit einer Länge von 193 Aminosäuren kann Bindungen an ACE2 ausbilden. Bei der Bindung verschmilzt die Virushülle mit der zellulären Membran. In der Folge wird es dem Virusgenom ermöglicht, in die Zelle einzudringen und hier zu replizieren und so neue Viruspartikel zu erzeugen.

Studien zeigen eine molekulare Verbindung zwischen der Krankheitsentstehung von SARS und dem Defekt des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) in den Lungen. ACE2 ist somit nicht nur ein wichtiger Rezeptor für SARS sondern spielt auch eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des schweren akuten Lungenversagens, sobald der Krankheitsprozess eingeleitet wurde (Kuba *et al.*, 2005).

1.2.5 Weitere Rezeptoren und Co-Rezeptoren von SARS-CoV

Endothelzellen weisen eine hohe ACE2-Expression auf, zeigen aber keine Infektion mit dem SARS-CoV auf. Andere Zellen hingegen, die keine nachweisbare ACE2-Expression haben, können trotzdem mit dem Virus infiziert werden (To *et al.*, 2004). Die Ursache liegt vermutlich darin, dass das Virus bei den Endothelzellen einen anderen Rezeptor oder einen Co-Rezeptor für den Eintritt benötigt.

Hierfür kommt das humane CD290L in Frage, ein Lektin vom Typ-C (transmembranes Typ-II-Glycoprotein). Es wird auch als L-SIGN, DC-SIGNR oder SIGN2 bezeichnet (Jeffers *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu ACE2 entwickelt es Bindungen mit den Aminosäuren 1-590 der S1-

Domäne des S-Proteins. Mittels Immunohistochemie wurde gezeigt, dass CD209L in den Typ-II Alveolarzellen der menschlichen Lunge sowie in den Endothelzellen exprimiert wird. Diese Zellen sind damit Ziel für die Infektion mit dem SARS-CoV (Yeung *et al.*, 2006).

Zusätzlich wird das Rezeptorprotein CD290L auf der Oberfläche von dendritischen Zellen exprimiert. Die Viren infizieren jedoch nicht die Zellen, sondern lagern sich nur an und werden zusammen mit den dendritischen Zellen in die Lymphknoten und in andere Gewebe transportiert (Marzi *et al.*, 2004). Das Virus nutzt somit diesen Weg, um sich im Körper zu verbreiten (Peiris *et al.*, 2004).

Auch andere umhüllte Viren wie Ebola und Sindbis nutzen CD209L als Eintritt in die Zelle. Ebenso können HIV- und Hepatitis-C-Virus an die Zellmembran mittels CD209L binden, die Zellen allerdings wiederum nicht infizieren. Andere Daten deuten darauf hin, dass das S Glycoprotein des SARS-CoV beide Rezeptoren, ACE2 und CD209L, für die Virusinfektion und Pathogenese benötigt (Jeffers *et al.*, 2004).

Auch die menschliche Aminopeptidase N (hAPN bzw. CD13) wird als weiterer Rezeptor für SARS-CoV vermutet, auch wenn es im Allgemeinen als Rezeptor für Coronaviren der Gruppe I gilt. Sie ist eine Zink-Metalloprotease, die aus 967 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von etwa 150 kDa aufweist (Lachance *et al.*, 1998). Dieses Zelloberflächen-Glykoprotein wurde in menschlichen Geweben wie dem proximalen Nierentubulus, im Darmepithel, in Zellen der granulozytären und monozytären Linie sowie in der Lunge detektiert. hAPN hat eine starke Expression in Immunzellen und in dem aktivierten vaskulären Endothelium einer entzündeten Stelle, die potenzielle Eintrittsstellen für das Virus darstellen (Lachance *et al.*, 1998; Kontoyiannis *et al.*, 2003).

Auch andere Coronaviren, die die gleiche antigene Gruppe wie das HCV-229E zeigen, nutzen APNs als Rezeptoren. So wurde das porcine APN als wichtiger Rezeptor für das Virus der transmissiblen Gastroenteritis der Schweine (TGE-Virus) festgestellt. Obwohl Schwein und Mensch mehr als 80% Aminosäurehomologie der APN haben, kann das TGE-Virus nur die porcinen APN nutzen, nicht jedoch die hAPN. HCV-229E hingegen kann hAPN nutzen aber nicht die porcine APN. Das feline infektiöse Peritonitis-Virus (FIPV) und die feline enterale Viren (FeCV) verwenden eine Katzen-APN. Interessanterweise kann die Katzen-APN auch als funktioneller Rezeptor für HCV-229E dienen (Lachance *et al.*, 1998).

1.3 Schweres akutes respiratorisches Syndrom

1.3.1 Epidemiologie

Das Schwere Akute Respiratorische Syndrom (SARS) trat erstmals im November 2002 in Foshan und Heyuan in der südchinesischen Provinz Guangdong auf (Hui *et al.*, 2004). Die Krankheit wurde zunächst als "atypische infektiöse Pneumonie" beschrieben und konnte keinem bekannten Erreger zugeordnet werden (Peiris *et al.*, 2003a). Die Ursache für die Krankheit blieb über einen Zeitraum von 3 Monaten nicht erkannt (Sampathkumar *et al.*, 2003). Bis Februar 2003 breitete sich die Krankheit in den benachbarten Regionen und Nachbarländern aus (Zhong *et al.*, 2003).

Ein in Guangdong ansässiger Nephrologe hatte sich über einen seiner Patienten mit der neuen Krankheit infiziert. Bei einem Besuch in Hongkong Ende Februar infizierte er über Tröpfcheninfektion nachweislich mindestens 16 weitere Hotelgäste. Er verstarb kurze Zeit danach in einem lokalen Krankenhaus. Hierdurch war die globale Ausbreitung der Infektion in Gang gebracht (Hui *et al.*, 2004). In der Folge traten Erkrankungen in Vietnam, Singapur und Kanada auf, sowie in Taiwan und Südchina (Preiser *et al.*, 2004). Dabei handelte es sich neben den in Hongkong Infizierten auch um Personen, die in den zurückliegenden Wochen die Provinz Guangdong besucht hatten bzw. dort an der Pflege erkrankter Personen beteiligt waren.

Dr. Carlo Urbani, ein Experte für Infektionskrankheiten der WHO, erkannte als einer der ersten, dass es sich um eine ungewöhnliche und besonders gefährliche Form der Lungenentzündung handelte (WHO, 2003a). Die WHO bezeichnete am 10. März 2003 die neue Erkrankung als „*severe acute respiratory syndrom*“ (SARS; schweres akutes respiratorisches Syndrom). Zusammen mit der WHO gab Urbani am 12. März 2003 eine Warnmeldung über Krankheitsfälle heraus, die durch eine starke, atypische Pneumonie gekennzeichnet waren (Schrag *et al.*, 2004) und veranlasste erste Maßnahmen in den betroffenen Ländern. Er selbst hatte sich bei der Behandlung von SARS-Patienten infiziert und verstarb noch im März 2003 an den Folgen der Infektion.

Der erste Fall von SARS in Deutschland trat Mitte März auf. Ein Arzt, der in Singapur SARS-Patienten behandelt hatte, flog mit seiner Frau und deren Mutter aus Singapur nach New York und erkrankte dort so schwer, dass er sich kurzfristig zum Rückflug nach Singapur entschloss. Bei der Zwischenlandung in Frankfurt wurden die drei Personen am Flughafen in die Isolierstation mit dem Verdacht auf SARS aufgenommen (Preiser *et al.*, 2004).

Im März 2003 konnte aufgrund der schnellen, internationalen Zusammenarbeit und den beschlossenen Maßnahmen (wie z.B. eine globale Warnung und der Einführung einer Meldepflicht), die Ausbreitung der Krankheit eingeschränkt werden (Rota *et al.*, 2003). Bereits in der zweiten Märzhälfte 2003 konnte das verantwortliche Virus als ein neues Coronavirus identifiziert werden (Drosten *et al.*, 2003; Ksiazek *et al.*, 2003; Marra *et al.*, 2003; Rota *et al.*, 2003).

Nach längerer Wartezeit sowie zahlreichen Tests verkündete die WHO am 19. Mai, dass selbst in China keine weiteren SARS-Fälle aufgetreten sind. Am 5. Juli 2003 erklärte die WHO den Ausbruch für beendet. Von der Epidemie waren insgesamt 29 Länder betroffen, 8098 Menschen erkrankten und 744 Personen starben (Guan *et al.*, 2004) (Abbildung 7).

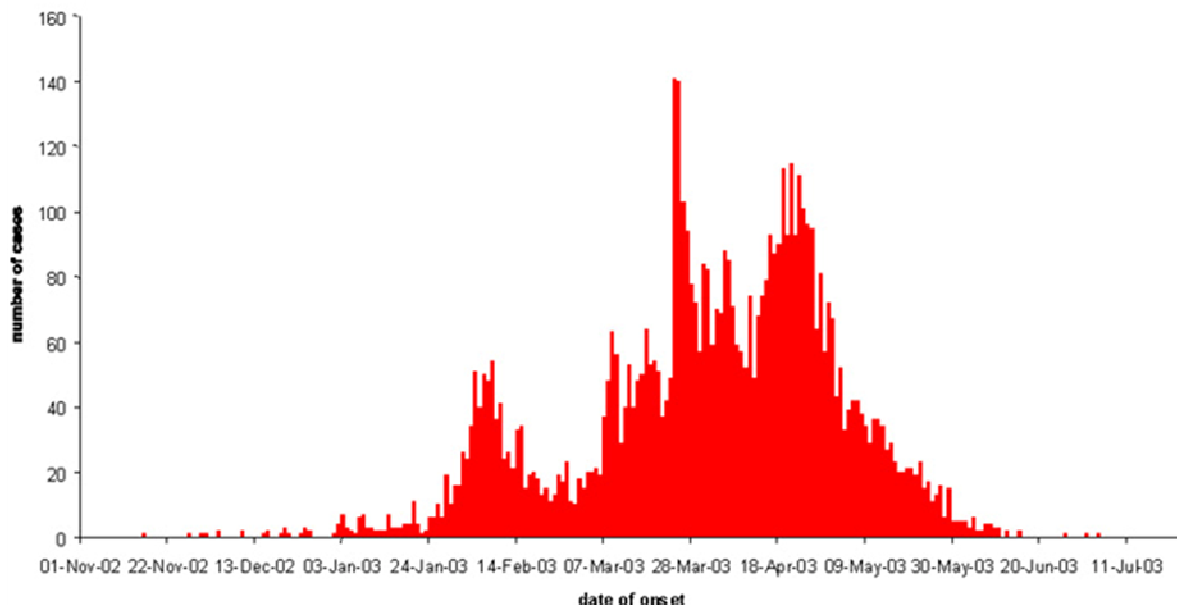


Abbildung 7: SARS-Epidemie zwischen 2002-2003
(WHO, 2003b)

Eine Forschungsgruppe in Hongkong und Shenzhen erkannte bei Tieren eines südchinesischen Marktes mehrere Coronaviren, die eine enge genetische Verwandtschaft mit dem SARS-Coronavirus hatten. Sie fanden das Virus u.a. bei einer Schleichkatzenart, der Zibetkatze (*Paguma larvata*), sowie bei Marderhunden (*Nyctereutes procyonides*). Diese Wildtiere gelten in der chinesische Provinz als Delikatesse und waren für den menschlichen Verzehr gedacht (Groneberg *et al.*, 2003). Die Studie lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass das SARS-Virus einen zoonotischen Ursprung hat (Preiser *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006; Tang *et al.* 2007). Als mögliches Reservoir gelten auch Fledermäuse, die zusätzlich als Reservoir von Nipah-, Hendra- und Ebolaviren anzusehen sind (Wang und Eaton, 2007).

Analysen zeigten, dass sich das Virus in Zibetkatzen soweit entwickeln konnte, dass es auch auf den Menschen übertragen werden konnte (Kan *et al.*, 2005). Entscheidend war eine molekulare Anpassung des Oberflächenglykoproteins (S-Protein) des SARS-CoV. Diese bildete das Fundament für die Übertragung von Tier zu Mensch und schließlich auch von Mensch zu Mensch und führte zu dem Ausbruch der Epidemie (He *et al.*, 2004; Holmes, 2005; Graham *et al.*, 2010).

Für die Virusübertragung kommen Tränenflüssigkeit oder Tröpfchen bzw. Aerosole aus dem Respirationstrakt in Betracht (Cheng *et al.*, 2007). Es gibt auch klare Hinweise, dass eine Verbreitung durch fäkal-orale Schmierinfektionen nicht ausgeschlossen werden kann (Drosten *et al.*, 2003).

1.3.2 Pathogenese und Klinik

Die Übertragung von Mensch zu Mensch wird durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion ermöglicht (Chan-Yeung *et al.*, 2003). Die Inkubationszeit beträgt bis zu 10 Tage, durchschnittlich 6-7 Tage (Chan-Yeung *et al.*, 2003). Die Patienten entwickeln Symptome ähnlich denen einer Grippe (z.B.: Halsentzündung, Husten, Schnupfen) sowie Lymphknotenschwellung, Malaise und Fieber (Peiris *et al.*, 2004). Weitere Symptome sind Durchfall, Myalgie und Schwindelgefühl (Chan *et al.*, 2003). Die Prognose hängt von zeitgleich bestehenden medizinischen Schwierigkeiten und auch vom Zustand des Patienten ab. Durchschnittlich 10% aller Patienten sterben. Ältere Leute sowie Personen mit Vorerkrankungen zeigen eine höhere Mortalität. Die Mortalitätsrate bei über 65-jährigen Patienten liegt bei bis zu 50% (Peiris *et al.*, 2003b). Im Gegenteil dazu wurden keine Todesfälle bei pädiatrischen SARS-Patienten und auch keine Übertragung zwischen Mutter und Neugeborenen berichtet (Li *et al.*, 2005).

1.4 Behandlung und Prophylaxe gegen SARS-CoV Infektion

Der weltweite Ausbruch des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS) im Jahre 2003 führte zu einer intensiven und wirksamen globalen Antwort, sodass die Ausbreitung der Krankheit bis Juli 2003 gestoppt werden konnte. Hiermit gingen auch intensive und sehr produktive Forschungsanstrengungen einher, um die Ätiopathogenese zu identifizieren, die klinischen und epidemiologischen Merkmale der Krankheit zu charakterisieren und die Pathogenese der Erkrankung zu verstehen. Mit der Beschreibung der Molekularbiologie der

Viren konnte das Design antiviraler Medikamente und Impfstoffe zur Behandlung und Vorbeugung der Krankheit angegangen werden.

Obwohl die Krankheit nicht mehr präsent ist, kann man einen erneuten Ausbruch der Krankheit für die Zukunft nicht ausschließen, da das Vorläufer-SARS-CoV nach weiterer Mutation ggf. erneut vom Tier auf den Menschen übertreten kann.

Die während der SARS-Epidemie entwickelten Behandlungsstrategien wurden ausschließlich auf theoretischen Grundlagen sowie klinischen Beobachtungen gewählt. In der Folge werden die Behandlungsmethoden beschrieben, die zum Einsatz kamen.

Bei einem Großteil der SARS-Patienten in Hong Kong wurde Ribavirin verordnet (Koren *et al.*, 2003); ein Guanosinnukleosidanalogue, das zum Triphosphatnukleotid metabolisiert wird. Es hemmt die Synthese von Guanosinmonophosphat und das Anfügen von modifiziertem Guanosin an die mRNA (mRNA-Verkappung), wodurch die Translation gehemmt wird (Burgis, 2005). Es besitzt eine Aktivität sowohl gegen DNA- als auch RNA-Viren *in vitro* und wird bei Infektion mit dem *Respiratory Syncytial Virus* (RSV), mit Influenza-Viren und mit Parainfluenzaviren verwendet. Es wurde auch häufig in Kombination mit Corticosteroiden für die Behandlung von SARS-Patienten herangezogen (Koren *et al.*, 2003; Chiou *et al.*, 2005). Die Hämoglobin-Werte sanken bei den Patienten um etwa 60% bei einer 2-wöchigen Therapie mit oralem Ribavirin. Die Anwendung von Ribavirin bei SARS wurde wie bei der Behandlung von hämorrhagischem Fieber mit erhöhter Dosierung durchgeführt. Dies führte allerdings sowohl zu höherer Toxizität wie auch zu erhöhten Transaminasewerten und Bradykardie. Zusätzlich hatte die Gabe von Ribavirin keinen nützlichen Effekt auf die Viruslast von SARS-CoV im Serum eines pädiatrischen SARS-Patienten (Sung *et al.*, 2004; Day *et al.*, 2009). Letztlich kann festgehalten werden, dass Ribavirin keine signifikante *in-vitro*-Aktivität gegen SARS-CoV besitzt (Sung *et al.*, 2004). Verschiedenen Berichten zufolge verhindert die Behandlung mit Ribavirin in Kombination mit Kortikoesteroiden, wie z.B. Methylprednison oder Prednison, eine übermäßige Schädigung der Lunge, indem die Entzündungsreaktion gedämpft wird (Nie *et al.*, 2003).

In einem anderen Fall wurde Lopinavir in Kombination mit Ritonavir verabreicht, welche als Proteaseinhibitoren zur Behandlung einer Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) zur Anwendung kommen. Beide Medikamente zeigen *in vitro* eine Hemmung des zytopathischen Effekts des SARS-CoV, wodurch vermutet werden konnte, dass diese Kombination auch einen synergistischen Effekt *in vivo* gegen das SARS-CoV hat (Chun *et al.*, 2004). In Vergleich zu Patienten, die nur Ribavirin bekommen haben, kam es bei der

Behandlung mit Lopinavir und Rotonavir zu einer Verringerung der Sterblichkeit und der Intubationsrate (Chan *et al.*, 2003).

Bei einer weiteren Behandlungsmethode kamen Interferone (IFNs) zum Einsatz. Interferone des Typ 1 werden zu Beginn einer Virusinfektion von den Zellen als Teil der angeborenen Immunantwort auf das Virus produziert und entfalten vor allem eine antivirale und antitumorale Wirkung (Cinatl *et al.*, 2003). Eine Studie zeigt, dass die Replikation von SARS-CoV in Zellkultur stark durch eine Vorbehandlung mit Interferon- β gehemmt werden kann. Interferon- α und Interferon- γ zeigten sich dagegen als weniger wirksam (Spiegel *et al.*, 2004).

Auch Antikörper wären ein wichtiges Instrument bei der Bekämpfung des SARS-CoV. Der humane monoklonale Antikörper HuMAb (auch 80R genannt) zeigte eine potente, neutralisierende Aktivität *in vitro* und *in vivo* gegen das S-Protein des SARS-CoV und hemmte die Synzytienbildung zwischen dem S-Protein und dem ACE2-Rezeptor (Sui *et al.*, 2004).

Zusätzlich gab es vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung mit einem adenoviral-basiertem Impfstoff, der bei Affen eine starke Immunantwort auf das SARS-CoV induziert (Gao *et al.*, 2003). Ein DNA-Impfstoff, der das S-Gen enthält und die Expression des S-Proteins ermöglicht, induziert in Mäusen eine spezifische humorale Immunantwort (IgG-Antikörper) gegen das S-Protein des SARS-CoV (Zhao *et al.*, 2004).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass man sich bei der Suche nach einer idealen Behandlung hauptsächlich auf die verschiedenen Schritte des viralen Replikationszyklus konzentrierte, wie etwa Expression des Polyproteins, Prozessierung oder Exozytose. Ein weiterer möglicher Behandlungsansatz besteht in der Unterbrechung der Bindung des Virus an den Zelloberflächenrezeptoren, was bspw. mittels Antikörper bzw. Peptid-Aptameren erlangt werden könnte.

1.5 Peptid-Aptamere (PA)

Das Wort „Aptamer“ leitet sich von dem lateinischen Begriff „aptus“ (passend) und dem griechischen Begriff „meros“ (Teil, Region) ab (Ellington *et al.*, 1990). Peptid-Aptamere (PA) sind kleine, künstliche Antikörper-ähnliche Proteine (Peptide). Sie bestehen zumeist aus 16-20 Aminosäuren (Borghouts *et al.*, 2008; Wickramasinghe *et al.*, 2010). Die Anordnung der einzelnen Aminosäuren in den PA ist zufällig, und sie werden anhand eines konstanten Gerüstproteins stabilisiert und präsentiert. (Gilch *et al.*, 2007; Colas 2008).

Dabei ist die Konformation der PA im Vergleich zu freien Peptiden oder terminal an ein Trägerprotein gebundene Peptide eingeschränkt. Dies führt zu einer stabileren Faltung, einer erhöhten Affinität für die Zielmoleküle sowie einer größeren Stabilität (Klevenz *et al.*, 2002; Gilch *et al.*, 2007).

Als Gerüstprotein wird das Escherichia coli (*E. coli*) Thioredoxin-A-Protein (TrxA) verwendet (Evans *et al.*, 2008). TrxA ist ein kleines cytosolisches Enzym mit einem Molekulargewicht von 12 kDa, das normalerweise an der Aufrechterhaltung des Thiol-Disulfid-Gleichgewichts innerhalb der Zelle beteiligt ist (Skerra, 2000). Es ist sehr gut löslich, starr und ein leichtes Protein, das in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt wird (Colas *et al.*, 1996). Im oxidierten Zustand bildet dessen kurze aktive Sequenz (Cys-Ser-Pro-Cys) eine dichte, disulfid-abhängige und potentiell zugängliche Schleife. Dieses Segment erlaubt die Integration unterschiedlicher Peptid-Sequenzen an der Oberfläche des Thioredoxin-Moleküls, wodurch die enzymatische Aktivität auf natürlichem Wege verloren geht. (Lu *et al.*, 1995; Kumar *et al.*, 2004; Nygren *et al.*, 2004) (Abbildung 8). In den letzten Jahren wurde noch eine Reihe weiterer Gerüstproteine wie z.B. *JIP-1/2*, *IB1*, *JSAP-1* und β *arrestin* (Jarvis, 2001), PDZ (Zhang, 2007) sowie NHERF2 (Filippov *et al.*, 2010) identifiziert.

Die wichtigste Eigenschaft von Peptid-Aptameren ist die Fähigkeit, gezielt die Funktion ihrer Zielproteine *in vitro* und *in vivo* zu blockieren.

Ähnlich wie Antikörper produzieren die Peptid-Aptamere *in vitro* Biopolymere, die die Zielmoleküle mit hoher Affinität und Spezifität binden (Xu *et al.*, 1996). Aufgrund der komplexen, dreidimensionalen Struktur dieser Aptamer-moleküle sind Interaktionen wie elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und Basen-Stapelung möglich. Dadurch können kleine Moleküle wie Theophyllin ($M_r = 120$) und große wie die ribosomale Untereinheit 30 S ($M_r > 10^6$) erkannt werden (Xu *et al.*, 1996; Menger, 2009).

Peptid-Aptamere leisten wie kaum eine andere Substanzklasse einen wichtigen Beitrag zum *Drug-Discovery*-Prozess (Hoppe-Seyler *et al.*, 2004; Mayer *et al.*, 2007). Dabei müssen weder die Struktur des Zielproteins noch ihre natürlichen Interaktionspartner bekannt sein, um hemmende Peptid-Aptamere zu generieren. Ein wichtiger Aspekt ist auch, dass während des Screenings die Peptid-Aptamere zusammen mit ihren kodierenden Sequenzen isoliert werden und damit sofort eine unbegrenzte Menge an Bindungsmolekülen zur Verfügung steht. Aus diesen Gründen besitzen Peptid-Aptamere ein großes Potenzial in den verschiedensten Aspekten der molekularen Medizin, von der funktionellen Analyse der gegebenen Zielproteine bis hin zu der Entwicklung neuer Therapien (Hoppe-Seyler *et al.*, 2004).

Die Selektion der Peptid-Aptamere erfolgt in der Regel durch Screening hoch komplexer Bibliotheken, entweder *in vitro* mit Phagen-Display oder *in vivo* mittels der "Yeast-two-hybrid"-Methode (Y2H) (Fields *et al.*, 1989; Borghouts *et al.*, 2005).

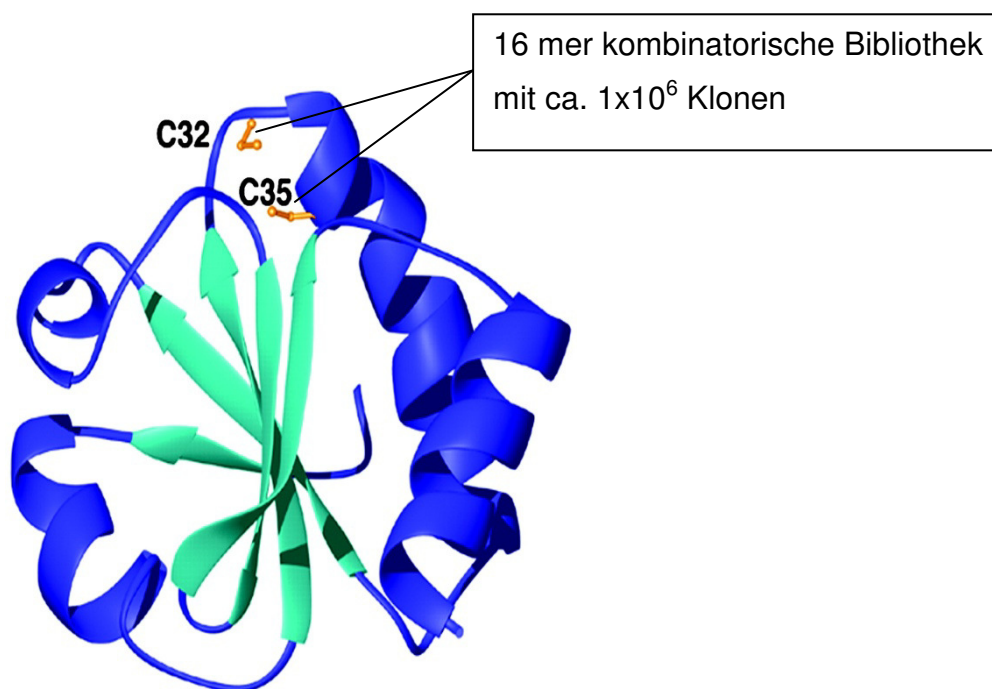


Abbildung 8: Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) von *E. coli*, Thioredoxin A (TrxA)

Das aktive Zentrum wurde in Gelb gekennzeichnet und befindet sich zwischen den Cysteinen C32 und C35. (Kumar *et al.*, 2004).

2 ZIELSETZUNG

Obwohl SARS seit Mai 2003 nicht mehr auftrat, kann ein erneuter pandemischer Ausbruch nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund ist es wichtig, eine effektive Therapie gegen diese virale Infektion zu entwickeln. Eine mögliche Variante, die bisher kaum verfolgt wurde, ist dabei die Verhinderung der Bindung zwischen dem SARS-CoV und seinem spezifischen Rezeptor ACE2 auf der Zytoplasmamembran der Wirtszelle (Li *et al.*, 2003, Wong *et al.*, 2004).

Auf diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit die Isolation von rekombinanten Peptid-Aptameren (PA), die an das S-Protein des Virus binden. Diese sollten die Interaktion mit ACE2 hemmen und so das Eindringen des Virus in die Zelle verhindern. Die Peptid-Aptamere sollten dazu mittels einer kombinatorischen Peptid-Aptamer-Bibliothek hergestellt und auf Bindung an das S-Protein bzw. dessen Rezeptorbindedomäne selektioniert werden. In der Arbeitsgruppe wurde bereits zuvor eine kombinatorische Peptid-Aptamer-Bibliothek hergestellt (Gilch *et al.*, 2007), die in die aktive Stelle des *E. coli* Proteins Thioredoxin A (TrxA) einkloniert war. Die Identifizierung potenzieller Peptid-Aptamere, die an das S-Protein binden, sollte mithilfe des Yeast-2-Hybrid-Systems (Y2H) durchgeführt werden.

Die potentiellen Peptid-Aptamere sollten in ihrer Bindefähigkeit an S bestätigt und weiter charakterisiert werden. Dazu sollten die Proteine zuerst in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden, damit sie in großen Mengen vorliegen und so den Einsatz in Zellkultur-Modellen ermöglichen.

In einem ersten Bindungstest sollte untersucht werden, ob durch die PA eine Synzytien-Bildung, resultierend aus der Interaktion von S und ACE2, verhindert werden kann. Dazu sollten mittels Transfektion S- oder hACE2-exprimierende Zellen produziert werden. Hierfür standen Vero-E6-Zellen und HEK-293-Zellen zur Verfügung. Gibt man die S- und hACE2-exprimierenden Zellen zusammen, sollte dies zu einer messbaren Fusion der Zellen und in der Folge zu deutlicher Synzytien-Bildung führen.

Um die Bindefähigkeit der rekombinanten Peptid-Aptamere zu bestätigen, sollten die S-exprimierenden Zellen mit den Peptid-Aptameren inkubiert, diese dann mit den hACE2-exprimierenden Zellen gemischt und für längere Zeit inkubiert werden, um so einen deutlichen Effekt der von der PA-Bindekapazität abhängigen Inhibition der Synzytien-Bildung

zu erreichen. Schließlich sollte die Bindungs-Interferenz der Peptid-Aptamere quantitativ verglichen werden.

Letztendlich war das Ziel der Arbeit, durch die Zugabe der PA die Infektion von Zellen mit dem SARS-CoV zu verhindern. Dazu sollten die rekombinanten Peptid-Aptamere zu SARS-CoV infizierten Vero-E6-Zellen gegeben und als *Read-out* der Effekt auf den Virustiter getestet werden, um so ihre post-expositionelle und therapeutische Kapazität im Viruskontext zu untersuchen.

Eine durch PA-Expression gezielt vermittelte Störung des Viruseintritts in die Zelle könnte in Zukunft therapeutisch zur Reduzierung der Infektion genutzt werden.

3. MATERIAL

3.1 Geräte

Analysewaage	Eppendorf GmbH, Köln
Laminar Flow	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl Genkingen
Brutschrank Hera Cell150	Thermo Scientific, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop CKX41	Olympus, Japan
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
FV10i FluoView Konfokales Mikroskop	Olympus, Hamburg
Chemilumineszenz-System Fusion Fx7	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gefrierschrank Heraeus	Thermo Scientific, Erlangen
Heizblock	Eppendorf GmbH, Köln
Horizontal Gel Systems	Daigger, USA
Inkubator	Heraeus Instruments, München
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Wert, Göttingen
Magnetrührer IKA MAG REO	IKA, Stauffen
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Nanovue	GE Healthcare, Schweden
Perfect Blue Double Gelsystem	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen
Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Supply Modell 200/2.0	Bio-Rad, USA
Röntgenfilmentwickler	Protec Medizintechnik, Oberstenfeld
ELISA-Reader TECAN Infinite F 200	Tecan, Mainz
Thermo Cycler T3000	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf GmbH, Köln,
Tischzentrifuge	Eppendorf GmbH, Köln,
Transblot Semi-Dry transfer cell	Bio-Rad Richmond, USA
Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge 4K15	Sigma, Taufkirchen

3.2 Chemikalien und Marker

Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) in N, N-Dimethylformamid	Glycosynth, Warrington, GB
Acrylamid, Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar Kobe I	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym LE, Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
Ampicillin (Natriumsalz)	Sigma, München
Brillant blau G250	Roth, Karlsruhe
Bacillol Plus	Roth, Karlsruhe
Coomassie Protein Assay	Thermo Scientific, Erlangen
DAPI (4, 6 Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco BRL, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat Natriumsalz (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a. 99%	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glucosemonohydrat	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Guanidin Hydrochloride	Sigma, München
HCl 37% (w/w)	Roth, Karlsruhe
Herring Testes Carrier DNA	Promega, Madison, USA
Imidazol 99%	Sigma, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin sulfate	Fluka, München
Leu-DO	Clontech, USA
Leu/Trp-DO	Clontech, USA
Lithiumacetat	Sigma, Deisenhofen

Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol (MeOH)	Roth, Karlsruhe
Minimal SD (Agar) Base-Medium	Clontech, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxyd (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Pefabloc SC (AEBSF)	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco BRL, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Gibco BRL, Karlsruhe
Pro Bond, Resin	Invitrogen, Darmstadt
Protein-A-Sepharose	GE Healthcare, Freiburg
Quadruple Dropout (-Ade/-His/-Leu/-Trp Supp.)	Clontech, USA
Tripe Dropout (-His/-Leu/-Trp Supplement)	Clontech, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trp-DO	Clontech, USA
Trypanblue solution	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Urea	Sigma, München
Yeast Extract	Becton Dickinson, Heidelberg

Marker

1 kB DNA Ladder 500-1002 bp	New England Biolabs, München
2-log Marker	Roche, Mannheim
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Metabion, München
PageRuler, Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot

3.3 Kits

ECL-Plus™ Western Blotting detection System	GE Healthcare, Freiburg
Grow 'n' Glow Yeast Plasmid Isolation Kit	MoBiTec, Göttingen
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
mi-Plasmid Mini Prep Kit	Metabion, München
mi-PCR Purification Kit	Metabion, München
mi-Gel Extraction Kit	Metabion, München
mi- <i>Pfu</i> Set	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
T4 DNA Ligase	Fermentas, St.Leon-Rot
TNT-T7 Quick Transcription/Translation	Promega, Mannheim
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Quiagen, Hilden
Zero Blunt TOPO PCR cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

3.4 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Eppendorf Tubes	Hamburg, Deutschland
Falcon Reagenzgefäße (15 oder 50 ml)	Falcon, Le Pont de Claix, France
Glasplättchen	Marienfeld, Bad Mergentheim
Hyperfilm	GE Healthcare, München
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	Structure Probe Inc., München
PCR-Tubes	Biozym D., Hess. Oldendorf
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf-Nethaler-Hinz, Köln
Poly-Prep Chromatography Columns	Bio-Rad, München
PVDF Membrane Hybond-P	Amersham, UK
Quarzküvetten	Eppendorf GmbH, München
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette	Thermo Scientific, USA
Spritzen	Braun, Melsungen
Zellzählkammer Fuchs-Rosenthal	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
Vivaspin 4	Sartorius, Göttingen
Whatman 3 MM-Filterpapier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen	Biochrom AG, Berlin
Zellkulturschalen, 10 cm	Falcon, Le Pont de Claix, France

3.5 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von Metabion, München bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Puffer	Inkubationstemperatur
BamHI	Buffer BamHI	37°C
CIP	Puffer 3	37°C
EcoRI	Buffer EcoRI	37°C
HindIII	B2	37°C
Sal I	B4	37°C
SphI	B4	37°C
Xba I	B2	37°C
XhoI	B4	37°C

3.6 Antikörper

Bei dieser Arbeit wurde mit folgenden primären und sekundären Antikörpern gearbeitet:

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung der Firma	Spezifität/ Epitop	Herkunft/ Isotyp	Verdünnung	Firma
Polyclonal Antibody to SARS-Spike protein	S-Protein SARS CoV Antigene	Kaninchen IgG	1:5000	IMGENEX IMG-557
Monoclonal Antibody to ACE2 (human) (AC384)	hACE2-Rezeptor	Maus IgG1	1:10000	ALEXIS AC384
Trx (K-20): sc-801	Thioredoxin	Kaninchen Polyclonal	1:000	Santa Cruz Sc-801

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Spezifität/ Konjugat	Herkunft/ Isotyp	Verdünnung	Firma
Peroxidase konjugierter Anti-IgG-AK	Kaninchen IgG	Anti-Kaninchen IgG	1:7500	Amersham Biosciendies, Freiburg
Peroxidase konjugierter Anti-IgG-AK	Maus IgG	Anti-Maus IgG (H+L)	1:10000	Dianova, Hamburg

3.7 Wachstumsmedien

3.7.1 Wachstumsmedien für Bakterien

Luria-Bertani (LB-Medium), pH 7.0:

Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
H ₂ O dest.	ad. 1 L

Agarplatten:

Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Agar-Agar	20 g
H ₂ O dest.	ad. 1 L

3.7.2 Wachstumsmedien für Hefen

YPD:

BactoTM Trypton	20 g
BactoTM Hefeextract	10 g
H ₂ O dest.	ad. 1 L

nach dem Autoklavieren auf ca. 50-55 °C abkühlen, Zugabe von 50 ml Glucoselösung (40%).

YPDA:

BactoTM Trypton	20 g
BactoTM Hefeextract	10 g
Adeninlösung	15 ml
H ₂ O dest.	ad. 1 L

nach dem Autoklavieren auf ca. 50-55°C abkühlen, Zugabe von 50 ml Glucoselösung (40%).

Selektionsmedien:

SD/-Leu	26,7 g SD Minimal Base 0,69 g -Leu DO Supplement ad. 1 L H ₂ O dest.
SD/-Trp	26,7 g SD Minimal Base 0,73 g -Trp DO Supplement ad. 1 L H ₂ O dest.
SD/-Leu/-Trp	26,7 g SD Minimal Base 0,64 g -Leu/-Trp DO Supplement ad. 1 L H ₂ O dest.
SD/TDO	26,7 g SD Minimal Base 0,62 g -His/-Leu/-Trp ad. 1 L H ₂ O dest.
SD/QDO	26,7 g SD Minimal Base 0,60 g -Ade/-His/-Leu/-Trp ad. 1 L H ₂ O dest.

3.7.3 Wachstumsmedien für Säugetierzellen

Dulbecco MEM (D-MEM)	Gibco, BRL
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, BRL
OptiMEM	Gibco, BRL

3.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Metabion synthetisiert (Orientierung 5' - 3').

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
ACE2 Fwd 57	AAACCATGGAGTCCACCATTGAGGAACAGGCCAAGAC
ACE2 Rev 1845	AAAGTCGACTTAGTCTGCATATGGACTCCAGTCCGGTAC
AD Fwd	CTATTCGATGATGAAGATACCCCACCAAACCC
AD Rev	GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT
308-BD Fwd	CAGGAATTCCCCTCAGGAGATGTTGTG
318-BD Fwd	CAGGAATTCTATTACAACTTGTGTCC
450-BD Rev	GTGGGATCCTTAGGGCCTAAGCTTGCCATG
510-BD Rev	GTGGGATCCTTAAACCGTGGCCGGTGCATT
pQE30-HindIII	TTTAAGCTTTTACGCCAGGTTAGCGTCCGAGG
pQE30-Sall	TTTGTGCGACTTACGCCAGGTTAGCGTCGAGG
pQE30-SphI	TTTGCATGCATGAGCGATAAAATTATTCACC
BD-SARS-CoV Fwd	GGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGCCG
BD-SARS-CoV Rev	CGCCCGGAATTAGCTTGGCTGCAAGCG
RT-SARS-CoV	GCCATCCGAAAGGGAGTGAGG
S Fwd 251	CAGGAATTCGCCTATTTTGTGGCTATTTAAAGC
S Rev 531	GTGGGATCCTTAATTAATAAATTAAATTGACAC
TrxA Fwd	GAATTCATGAGCGATAAAATTATTCACC
TrxA Rev	CTCGAGTTACGCCAGGTTAGCGTCGAGG
S Fwd 21492	CAGGGATCCATGTTTATTTTCTTATTATTTT
S Rev 25259	GTGCTCGAGTTATGTGTAATGTAATTTGACACCC
S Fwd Sall	CAGGTGCGACTCTTATGAGTGCGACATTCC
S Rev Sall	GTGCTCGAGGTCGACATGCTCAGCTCCTATAAGACAGC
Mut S Fwd 1729	GACATTTACCTTGCGCTTTTGGGGGTGTAAG
Mut S Rev 1729	CTTACACCCCCAAAAGCGCAAGGTGAAATGTC
Mut S Fwd 1103	TTTAAGTGCTATGGCGTTTCTGCCACTAAG
Mut S Rev 1103	CTTAGTGGCAGAAACGCCATAGCACTTAAA

3.9 Vektoren und Konstrukte

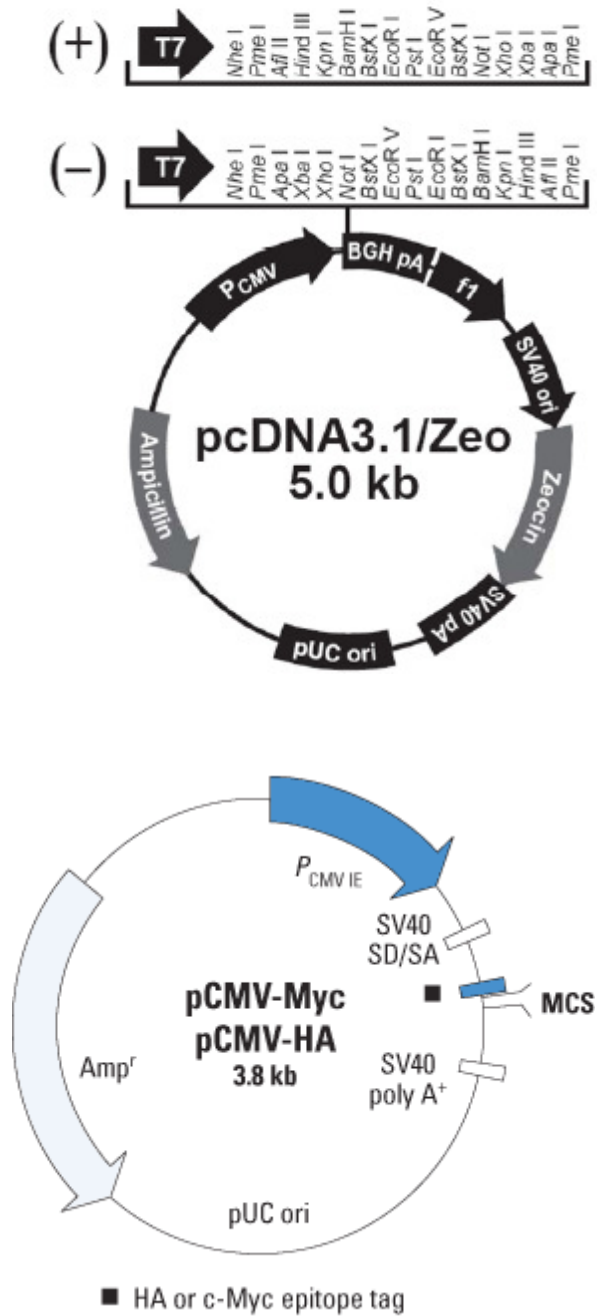


Abbildung 9: Verwendete Vektoren für die transiente Transfektion von Säugetierzellen

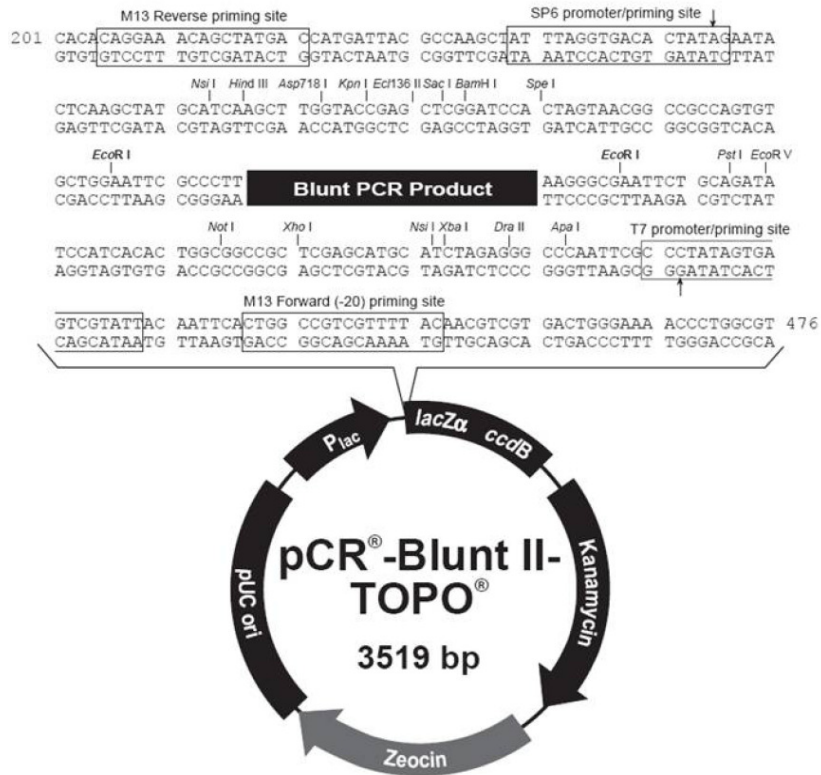


Abbildung 10: Verwendete Vektoren für die Klonierung von PCR-Produkten

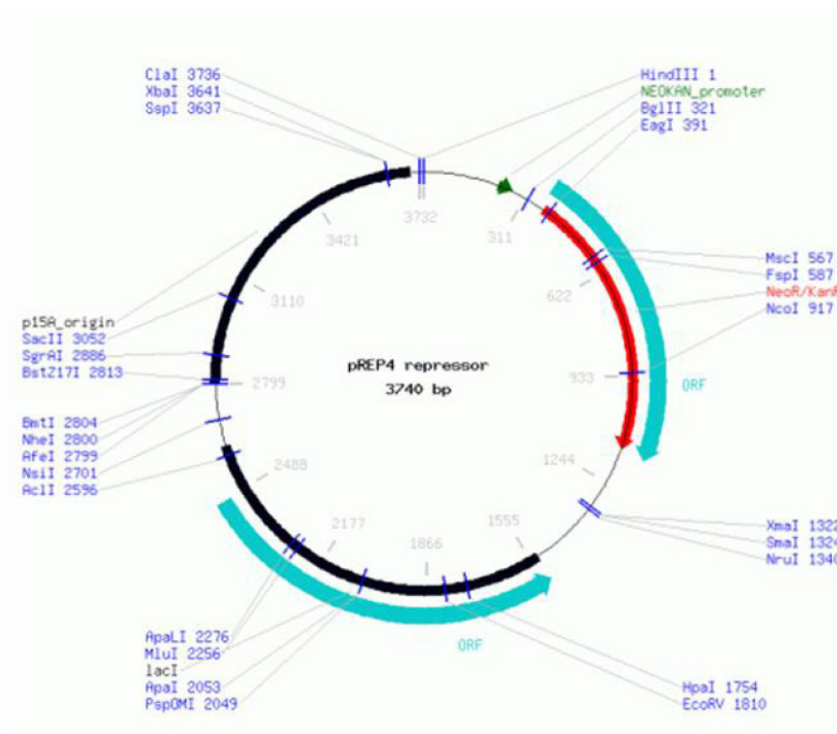


Abbildung 11: Verwendete Vektoren für die Protein-Expression in *E. coli*

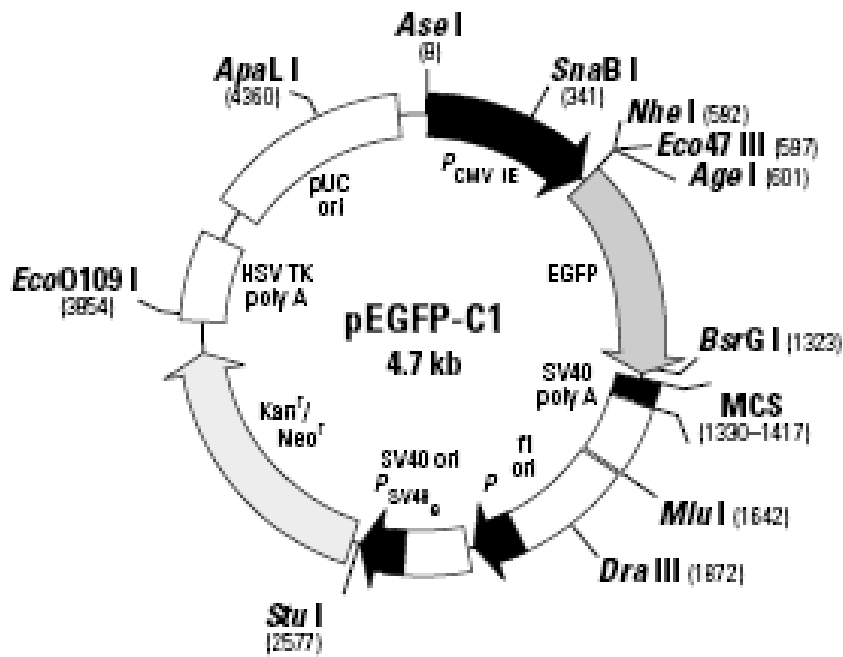


Abbildung 12: Verwendete Vektoren für die Bestätigung der Effektivität der Transfektion

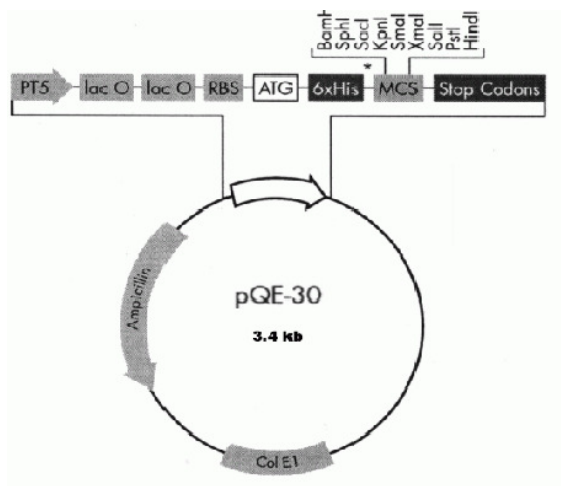


Abbildung 13: Verwendete Vektoren für die Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine in *E. coli*

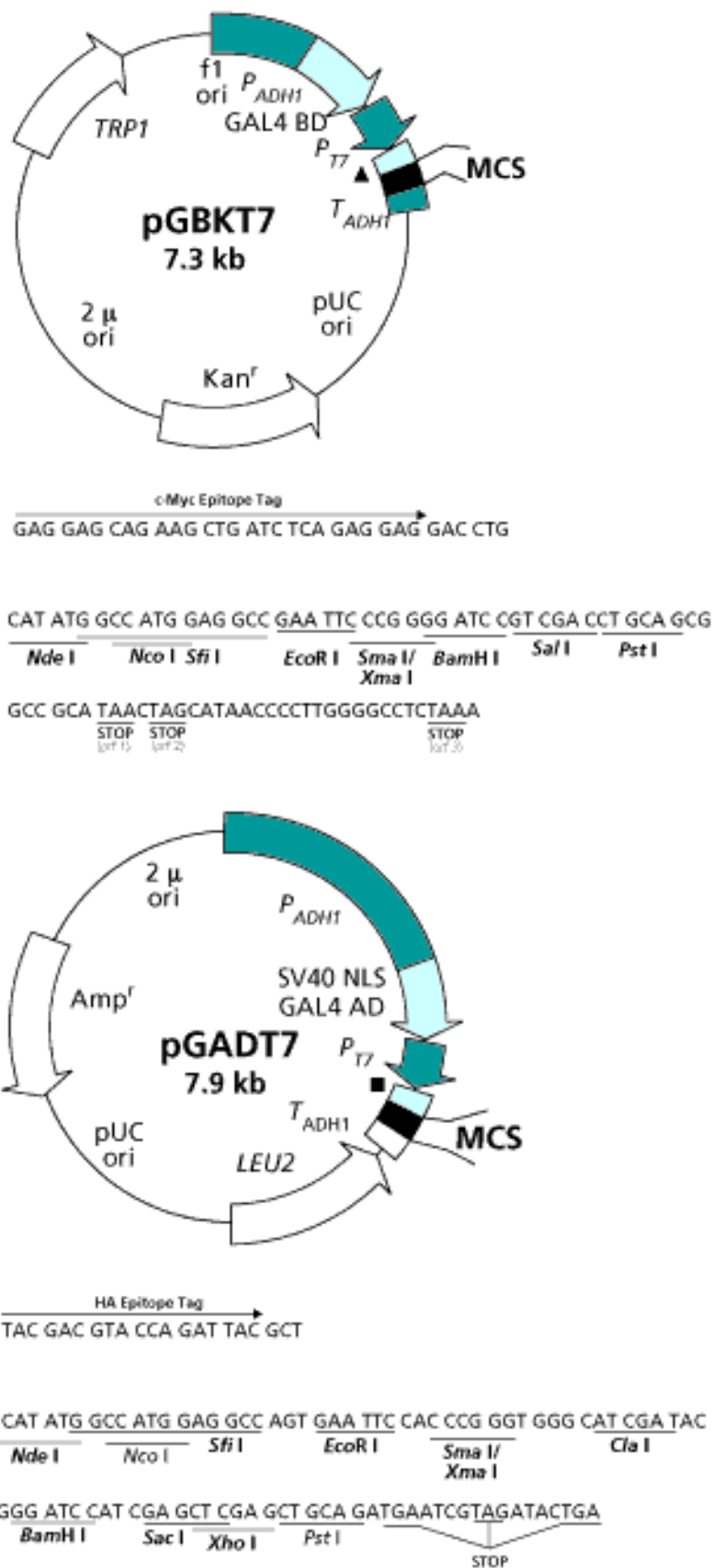


Abbildung 14: Verwendete Vektoren für die Transformation der Hefen

Tabelle 6: Liste der Konstrukte

Plasmid + Insert	Beschreibung	Verwendete Restriktionsenzyme
pCDNA3.1+ACE2	Humane-ACE2-cDNA	Nco I/Sall
pCDNA3.1+S	SARS-CoV-S-cDNA	BamHI/XhoI
pHCMV-SARS-CoV-SΔ19	pHCMV-Derivat, SARS-CoV-S-cDNA Deletion des C-Terminal 19 AS (AS 1237-1255) des SARS-CoV S-Proteins (SΔ19)	BamHI/XhoI
pGAD-T7-Peptid-Library	kombinatorische Peptid-Bibliothek eingeführt in TrxA-BamHI via BamHI Restriktionsenzyme	EcoRI/BamHI/XhoI
pGAD-T7-trxA	<i>E. coli</i> Wild-Typ TrxA	EcoRI/XhoI
pGBK-T7-BD	pGBKT7-Derivat, Rezeptorbindedomäne des SARS-S-Proteins	EcoRI/BamHI
pGBK-T7-BD-A	pGBKT7-Derivat, Rezeptorbindedomäne des SARS-S-Proteins (Fragment A)	EcoRI/BamHI
pGBK-T7-BD-B	pGBKT7-Derivat, Rezeptorbindedomäne des SARS-S-Proteins (Fragment B)	EcoRI/BamHI
pGBK-T7-BD-C	pGBKT7-Derivat, Rezeptorbindedomäne des SARS-S-Proteins (Fragment C)	EcoRI/BamHI
pGBK-T7-S1	pGBKT7-Derivat, S1-Fragment des SARS-S Protein	EcoRI/BamHI
pQE30-trxA	N-terminale Fusion von <i>E. coli</i> TrxA an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA1	N-terminale Fusion von PA1 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA2	N-terminale Fusion von PA2 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA3	N-terminale Fusion von PA3 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA4	N-terminale Fusion von PA4 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA5	N-terminale Fusion von PA5 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA6	N-terminale Fusion von PA6 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA7	N-terminale Fusion von PA7 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA8	N-terminale Fusion von PA8 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA9	N-terminale Fusion von PA9 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA10	N-terminale Fusion von PA10 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII
pQE30-PA11	N-terminale Fusion von PA11 an 6 x His-Reste	SphI/HindIII

3.10 Zelllinien, Bakterien, Hefen und Viren

Tabelle 7: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften
HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen
Vero-E6	Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze

Tabelle 8: Verwendete Bakterienstämme

Bakterien	Eigenschaften
XL-1 Blue Chemically Competent <i>E. coli</i>	supE44, hsdR17, endA1, recA1, endA1, gyrA46, thi-1, relA1, lac, F ⁻ [proABlacI ^q , lacZΔM15, Tn 10(ter ^R)]
One Shot TOP 10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	F ⁻ mcr AD (mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZD M15 DlacX74recA1 deoR araD139 D(araleu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG
BL21-Gold(DE3) strain	<i>E. coli</i> B F ⁻ ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tetr gal λ (DE3) endA Hte

Tabelle 9: Verwendete Hefezelllinien

Hefen	Eigenschaften
AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 :MEL1UAS-MEL1TATA -lacZ, MEL1

Tabelle 10: Verwendete Viren

Virus	Isolat
SARS-CoV	Isolat Frankfurt-1, Pubmed AY291315 (siehe unten)

3.11 Radioaktives Material

(³⁵S)-Met/Cys (Promix; 1000 Ci/mmol) GE Healthcare, Freiburg

3.12 Puffer und Lösungen

Puffer für die Herstellung des Agarosegels:

TAE-Puffer (10x)

TRIS	48,4 g
Essigsäure	11,4 ml
EDTA 0,5 M	20,0 ml
H ₂ O dest.	ad. 1 L

Ladder-Puffer

Glycerin	4%
Bromphenolblau	0,05%
Xylenzyanolblau	0,05%

Puffer für Western Blot:

TBST (10x)

Tween-20	0,5%
NaCl	100 mM
TRIS/HCl, pH 7,4	10 mM
H ₂ O dest.	ad. 1 L

Blotting Puffer

Methanol	20%
TRIS	3 g
Glycin	14,5 g
H ₂ O dest.	ad. 1 L

Elektrophoresepuffer (10x)

SDS	10,0 g
TRIS	30,0 g
Glycin	144,0 g
H ₂ O dest.	ad. 1 L

Magermilchlösung

5% Magermilchpulver in TBST-Puffer

Sammelgellösung

TRIS-HCl, pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4%

Trenngellösung

TRIS-HCl, pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4%

Probenpuffer (3x)

TRIS-HCl, pH 6,8 1M	0,25 ml
Glycerin	1 ml
SDS 20%	1 ml
Et-SH	0,5 ml
Bromphenolblau	
H ₂ O dest.	ad. 3 ml

Immunpräzipitations-Puffer:TNE-Puffer

TRIS-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM

Lysepuffer

NaCl	100 mM
TRIS-HCl	10 mM
EDTA	10 mM
Triton X-100	0,5%
DOC	0,5%

Co-IP Waschpuffer Tris-HCl, pH 7,5 (100 mM)

NaCl	200 mM
EDTA	0,5 mM
NaF	1 mM
Triton X-100	1%
Tween-20	2%

Dialysepuffer

NaAc pH 3.5	10 mM
-------------	-------

Puffer zur Aufreinigung von His-getagten Proteinen:Lysepuffer, pH 7,8 (100ml)

GdnHCl 6 M	57,30 g
Lösung A	0,58 ml
Lösung B	9,42 ml
H ₂ O dest.	ad. 100 ml

Bindepuffer, pH 7,8 (100 ml)

Harnstoff 8 M	48,10 g
Lösung A	0,58 ml
Lösung B	9,42 ml
H ₂ O dest.	ad. 100 ml

Waschpuffer, pH 6,3 (250 ml)

Harnstoff 8 M	120,25 g
Lösung A	15,30 ml
Lösung B	9,70 ml
Imidazol 80 mM	6,50 ml
H ₂ O dest.	ad. 250 ml

Elutionspuffer, pH 6,3 (50 ml)

Harnstoff 8 M	24,05 g
Lösung A	3,06 ml
Lösung B	1,90 ml
Imidazol 80 mM	8,3 ml
H ₂ O dest.	ad. 50 ml

Imidazol 3M, pH 6,0 (100ml)

Imidazol	20,60 g
Lösung A	8,77 ml
Lösung B	1,23 ml
H ₂ O dest.	ad. 100 ml

Lösung A

Monobasisches Natriumphosphat	200 mM
Natriumchlorid	5 M

Lösung B

Dibasisches Natriumphosphat	200 mM
Natriumchlorid	5 M

Lösung für die Herstellung kompetenter Hefenzellen mittels LiAc-Methode:LiAc 1M, pH 7,5 (10x)TE-Puffer (10x)

Tris/HCl	0,1 M
EDTA	10 mM, pH 7,5

PEG-Lösung 50%TE/LiAc-Puffer (1x)

TE (10x)	1/10 Vol.
LiAc (10x)	1/10 Vol.
H ₂ O dest.	8/10 Vol.

PEG/LiAc-Lösung

TE (10x)	1/10 Vol.
LiAc (10x)	1/10 Vol.
PEG-Lösung 50%	8/10 Vol.

Coomassie-Färbelösung:Coomassie-blau-Lösung

Brillant blau G250	0,18 g
Isopropanol	62,5 ml
Essigsäure 99%	25,0 ml
H ₂ O dest.	ad. 250 ml

Entfärbelösung

Methanol	350 ml
Essigsäure	100 ml
H ₂ O dest.	550 ml

Immunfluoreszenz-Puffer:Ammoniumchlorid 50 mM/Glycin 20 mM

NH ₄ Cl	267,45 mg
Glycin	150 mg
PBS	ad. 100 ml

Triton X-100, 0,1%

Triton X-100	100 µl
PBS	ad. 10 ml

Gelatine 0,2%

Gelatine	200 µl
PBS	45 ml

DAPI (1:1000 in PBS)

4. METHODEN

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode, um ein bestimmtes DNA-Fragment *in vitro* zu vervielfältigen. Die hierfür notwendigen Vorwärts- und Rückwärts-Primer bestehen aus 18-25 Nukleotiden, die das 5'- bzw. das 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragments definieren. Beide Primer dürfen an ihren 3'-Enden nicht komplementär sein, da sonst der eine Primer als Template des anderen dienen könnte und so die Gefahr besteht, unspezifische Amplifikationsprodukte zu erhalten. Die klassische PCR wird in mehreren (ca. 25-35) Zyklen durchgeführt. Ein Reaktionszyklus besteht aus drei verschiedenen Temperaturstufen. Zuerst wird bei 95°C die doppelsträngige DNA-Matrize denaturiert, um die zwei Stränge zu trennen (Denaturierung). Dann hybridisieren die Primer an die DNA-Einzelstränge. Die Temperatur dieser Phase hängt von den Primern ab. Sie variiert zwischen 50-60°C (*Annealing*). Nach Hybridisierung der Primer erfolgt ausgehend vom 3'-Ende des jeweiligen Primers die Synthese des Doppelstranges. Die optimale Temperatur liegt hier zwischen 68 und 72°C (*Elongation*). Hierzu wird die Temperatur auf das Aktivitätsoptimum der hitzestabilen DNA Polymerase erhöht, die neben ihrer Polymeraseaktivität über eine Korrekturlesefunktion verfügt. Nach Abschluss des letzten Reaktionszyklus kann der nächste Zyklus beginnen.

Nur unter optimalen Bedingungen, die quasi nur während der ersten Zyklen gegeben sind, folgt die Produktbildung einem exponentiellen Gesetz. Mit der Akkumulation des Reaktionsproduktes Pyrophosphat, der zunehmenden Konkurrenz zwischen Primer und komplementärem DNA-Strang um das Template, sowie der Konkurrenz der Template-Moleküle um die Polymerase und deren Denaturierung kommt es zu einer Reaktionsverlangsamung, bis in der Plateauphase kaum noch eine Amplifikation stattfinden kann (Saiki *et al.*, 1988).

Die Annealingtemperatur bestimmt die Spezifität der Anlagerung der Primer. In Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung der Primer kann eine optimale Annealingtemperatur nach der folgenden Formel berechnet werden (Suggs *et al.*, 1981).

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

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

PCR-Ansatz

DNA-Matrize	100-200 ng (1 µl)
10x PCR-Puffer	10% (v/v) (5 µl)
dNTP-Mix (5 mM)	2 µl
5' Primer (10 µM)	2 µl
3' Primer (10 µM)	2 µl
Polymerase	5 U (1 µl)
H ₂ O bidest.	Ad. 50 µl

Der PCR-Ansatz wurde in einem 200 µl Reaktionsgefäß angesetzt. Anschließend wurde die Reaktion in einem Thermo Cycler T3000 der Firma Biometra durchgeführt.

Amplifikationsparameter

Denaturierung	94 °C	5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung der DNA	94 °C	1 min	
Annealing der Primer	55 °C	1 min	
Elongation des Templates	72 °C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Kühlung (nach Bedarf)	4 °C	∞	

Das PCR-Produkt wurde zur Kontrolle der Amplifikation durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe 4.1.3), überprüft und das spezifische Produkt aufgereinigt (siehe 4.1.4).

Für den Nachweis der Genexpression wurde die RT-PCR-Methode (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) gewählt. Diese besteht aus zwei Schritten, wobei zuerst mittels reverser Transkriptase die cDNA aus der RNA synthetisiert und im zweiten Schritt die synthetisierte cDNA amplifiziert wird.

Reverse Transkription (RT)

5x RT-PCR-Puffer	4 μ l	Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 45°C inkubiert, anschließend wurde das Produkt für den PCR-Ansatz verwendet.
dNTP-Mix (5 mM)	2 μ l	
3' Primer (10 mM)	2 μ l	
DTT (100 mM)	2 μ l	
RNA-Matrize	10 μ l	
Reverse-Transkriptase (RT)	1 μ l	

4.1.2 PCR-Mutagenese

PCR-Mutagenese benennt eine Methode, die für das Einfügen von Punktmutationen in bekannten Genen während der Polymerase-Kettenreaktion genutzt wird. Hierfür werden zunächst zwei Oligonukleotide für das Gen verwendet, welche in ihrer Mitte die gewünschte Mutation tragen und so komplementär an die denaturierte Ausgangs-DNA binden können. Für die Mutagenese wird die *Pfu*-Polymerase eingesetzt, da diese im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine geringere Fehlerrate aufweist.

Um die Wildtyp-DNA nach der Amplifikation aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde diese einem Verdau mit einer Endonuclease (z.B. DpnI) unterzogen, die nur methylierte oder hemimethylierte DNA, aber keine unmethylierte DNA verdauen kann und so selektiv die Wildtyp-DNA entfernt.

PCR-Mutagenese-Parameter

Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	} 18 Zyklen
Denaturierung der DNA	95 °C	30 s	
Annealing der Primer	55 °C	1 min	
Elongation des Templates	68 °C	14 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Kühlung (nach Bedarf)	4 °C	∞	

Nach der Mutagenese wurden die Plasmide mit 1 μ l DpnI für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden 10 μ l des mutierenden Plasmids direkt in kompetente XL1-Zellen transformiert (4.2.1.2).

4.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung der DNA-Fragmente wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Unter Elektrophoresebedingungen sind die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren isoliert, und die Polydesoxynukleotide liegen als Polyanionen vor. Sie bewegen sich somit im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, wobei ihre Beweglichkeit weitgehend von der Molekülgröße und Konformation abhängt. Die auf ein Agarosegel aufgetragenen Proben werden unter elektrischer Spannung gebracht und können sich auf diese Weise trennen. Da das dem Gel zugesetzte bzw. im anschließenden Färbegrad enthaltene Ethidiumbromid in doppelsträngige DNA interkaliert, lassen sich die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar machen. Die Fragmentlängen der Banden und deren DNA-Menge können anhand der mitgeführten Längenstandards (Marker) abgeschätzt werden.

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde 0,5-2% (w/v) Agarose in 1x TAE Puffer aufgekocht und in den Gelschlitzen mit entsprechendem Kamm gegossen, der die Probetaschen frei von Agarose hält. Ethidiumbromid wurde nach dem Aufkochen zu einer Endkonzentration von 0,25 µg/ml hinzugefügt und die Taschen mit Probe und Ladepuffer im Verhältnis 5:1 gefüllt. Als Marker wurde der entsprechende Längenstandard verwendet. Die DNA wurde 25 bis 45 min bei 110 V aufgetrennt. Die Betrachtung und Dokumentation der DNA-Auftrennung erfolgte mithilfe von UV-Licht.

4.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Die Extraktion von DNA aus präparativen DNA-Agarosegelen erfolgte mithilfe des „mi-Gel Extraktion Kit“ nach den Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass DNA nach dem Aufschmelzen der Agarose unter hohen Salzkonzentrationen und einem pH von über 7,5 an eine Silikagel-Membran bindet. Verunreinigungen wie Salze und Enzyme sowie Oligonukleotide mit einer Größe von bis zu 100 bp binden unter diesen Bedingungen nicht und werden durch Waschschriffe mit ethanolhaltigem Waschpuffer entfernt. Anschließend wird die DNA mit 30-50 µl H₂O dest. eluiert. Die Proben wurden bei -20 °C weggefroren.

4.1.5 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die spezifische Basenpaare auf doppelsträngiger DNA erkennen und sie an definierten Stellen schneiden. Der Restriktionansatz wurde, je nach verwendetem Enzym, mit 10x BSA (1 mg/ml) komplementiert, bei jeweiligem Temperaturoptimum für drei Stunden inkubiert und danach in einer Agarosegelelektrophorese (4.1.3) analysiert.

a. Reaktionsansatz 1 (präparativ)

PCR-Produkt	30 µl
oder Plasmid-DNA	5 µg
Reaktionspuffer (10x)	5 µl
BSA (10x)	5 µl
Restriktionsendonuklease	1 µl (10 U) je Enzym
H ₂ O dest.	ad. 50 µl

b. Reaktionsansatz 2 (analytischer Verdau)

PCR-Produkt	6 µl
oder Plasmid-DNA	
Reaktionspuffer (10x)	1 µl
BSA (10x)	1 µl
Restriktionsendonuklease	0,5 µl (10 U) je Enzym
H ₂ O dest.	ad. 10 µl

4.1.6 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Zur Verhinderung einer Religation oder Oligomerisierung von Vektoren, die nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen kompatible Enden besitzen, wurden die Phosphate des 5`-Endes der linearisierten Plasmide durch eine alkalische Phosphatase (calf intestine phosphatasa, CIP) abgetrennt. Dazu wurde dem Restriktionsansatz 1 µl CIP (10 U/µl) zugesetzt und je nach Experiment für eine halbe bis eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend aufgetrennt und aufgereinigt (4.1.3, 4.1.4).

4.1.7 Ligation in pCR-Blunt II-TOPO

Die PCR-Produkte wurden mittels Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO kloniert. DNA-Fragmente mit einem einfachen Desoxyadenosin am 3'-Ende werden durch Katalyse der Topoisomerase I leicht kloniert.

Reaktionsansatz (TOPO-PCR cloning)

PCR-Produkte	2 µl
Salzlösung	1 µl
Steriles H ₂ O dest.	2 µl
TOPO-Vektor	1 µl

Die Reaktion wurde für 5 min bei Raumtemperatur (22°C) incubiert. Der komplette Ansatz wurde in TOP10-Bakterien transformiert (4.2.1.2).

4.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verknüpft freie Phosphate und Hydroxylgruppen von DNA-Molekülen zu Phosphordiesterbindungen. Daher eignet sie sich für die Ligation von Fremdgenen in Vektoren, wenn diese kompatible Enden in der korrekten Orientierung besitzen. Dabei kann es sich sowohl um überhängende als auch um glatte Enden handeln.

Vektor und DNA-Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt.

Reaktionsansatz

DNA-Vektor	1 µl
DNA-Insert	5 µl
Ligationspuffer (10x)	1,5 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
H ₂ O dest.	ad. 10 µl

Die Ligationsreaktion wurde für 5 min bei Raumtemperatur (22°C) incubiert. Als Religationskontrolle dient ein Ansatz, in dem die gereinigte Insert-DNA durch H₂O dest. ersetzt wurde. Der komplette Ansatz wurde in Bakterien transformiert (4.2.1.2).

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Methoden im Rahmen der Plasmid-DNA-Produktion

4.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Durch die Behandlung mit Calciumchlorid kann in *E. coli* XL1 Transformationskompetenz induziert werden. Dazu wurden auf 100 ml LB-Medium 1 ml einer Übernachtskultur der Stammbakterien-Zellen gegeben und diese bei 37°C für ca. 3 Stunde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde für 15 min bei 3500 rpm und 4°C (Sigma 4K15) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml steriler Magnesiumchloridlösung (100 mM) resuspendiert, anschließend für 30 min auf Eis platziert und erneut zentrifugiert. Darauf wurde das Pellet wieder in 50 ml eiskalter Calciumchloridlösung (100 mM) aufgenommen, für 30 min auf Eis gestellt und zentrifugiert. Die Bakterien wurden danach in 2 ml Calciumchloridlösung im Eisbehälter bei 4°C für 24 Stunde inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml eiskaltem Glycerin und 2,5 ml eiskalter 100 mM Calciumchloridlösung wurden die Zellen abschließend zu je 100 µl aliquotiert und direkt im Anschluss bei -80°C gelagert.

4.2.1.2 Transformation von Bakterien

Rekombinante Plasmide werden zur Vermehrung in Bakterienzellen eingeführt, welche zur Aufnahme fremder Plasmid-DNA zunächst kompetent gemacht werden müssen (4.2.1.1).

Der komplette Ligationsansatz wurde mit den kompetenten Bakterien vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert, für 45 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und im weiteren Verlauf für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 200 µl vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugefügt und das Reaktionsgefäß bei 37°C und 600 rpm für 30 min geschüttelt.

Anschließend wurden die Ansätze auf selektiven Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die bewachsenen Agarplatten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Als Kontrolle dienen

- kompetente Zellen ohne Vektor
- kompetente Zellen mit Expressionsvektor ohne Insert

4.2.1.3 Kultivierung von Bakterien

Alle benötigten Kulturen von *E. coli* wurden in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C und konstantem Schütteln (230 rpm) angezchtet.

4.2.1.4 Plasmid-DNA-Isolierung im analytischen Maßstab

Mit dem mi-Plasmid Mini Prep Kit wurden Plasmidpräparationen im analytischen Maßstab nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Anzucht einer Kultur wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einem Bakterienklon beimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Zwei ml dieser Übernachtskultur wurden für 2 min bei 14.000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet zur Zellwandlyse und zur enzymatischen Degradierung zellulärer RNA in 250 µl kaltem Resuspensionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl des zweiten Lysepuffers wurde das Gefäß mehrmals invertiert. Durch Zugabe von 350 µl DNA-Bindungspuffer wurde die Plasmid-DNA renaturiert und die genomische DNA sowie Proteine gefällt. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch eine 10-minütige Zentrifugation abgetrennt.

Achthundert µl des klaren, plasmidhaltigen Überstandes wurden auf eine Miniprep-Zentrifugensäule überführt, so dass die Plasmid-DNA während der darauffolgenden Zentrifugation an die Silikamatrix binden konnte. Die Säule wurde zur Beseitigung von Kontaminationen einmal mit 700 µl Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine einmalige Leerzentrifugation, um alle Pufferreste zu eliminieren. Die Plasmid-DNA wurde in 30-50 µl bidestilliertem Wasser eluiert.

4.2.1.5 Plasmid-DNA-Isolierung im präparativen Maßstab

Auf der Basis eines positiven Bakterienklons wurde unter Verwendung des Plasmid Maxi Kits (Qiagen) eine Plasmid-Präparation großen Maßstabs angefertigt.

Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Bakterienkultur des gewünschten Klons inokuliert und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Übernachtskultur wurde bei 3500 rpm (Sigma 4K15) für 10 min auf

4°C pelletiert und das Bakterienpellet in 10 ml kaltem Puffer 1 (mit RNase A) resuspendiert. Darauf folgte unter Beifügung von 10 ml des Puffers 2 eine alkalische Lyse der Zellen mit gleichzeitiger Denaturierung der chromosomalen DNA sowie der Proteine, die nach fünf min Inkubation durch Zugabe von 10 ml Puffer 3 gestoppt und neutralisiert wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand auf eine Qiaprep-Säule gegeben. Die Säule wurde zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert, damit die DNA an der Matrix haften bleibt. Mithilfe des Waschpuffers wurden Salze und restliche Verunreinigungen entfernt. Die DNA wurde anschließend mit 15 ml Puffer QF eluiert.

Die gelöste DNA wurde mit dem 0,7-fachen Volumen (10,5 ml) Isopropanol präzipitiert und abzentrifugiert. Nachdem die DNA mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet wurde, wurde sie mit 200 µl bidestilliertem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

4.2.1.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung

Mit dem Nanovue®-Spektrophotometer von GE Healthcare wurde die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wird die Lichtabsorption durch wässrige Lösungen von RNA und DNA bei 260 nm und von Proteinen und Phenolen bei 280 nm gemessen. Der Quotient aus $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ gibt den Grad der DNA-Reinheit an. Ab einem Verhältnis von 1,8 ist bei der DNA-Aufreinigung ein hoher Reinheitsgrad gegeben.

4.2.1.7 Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma GATC (Konstanz, D) durchgeführt und die fertigen Sequenzen von ihnen im Internet bereitgestellt. Diese wurden daraufhin mit Hilfe der Software Lalign aus der Biology WorkBench auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

4.2.2 Methoden im Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (Y2H)

4.2.2.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine *in-vivo*-Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in Hefe, in der Regel der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Es basiert auf dem Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4, dessen funktionelle Domänen von dem *Bait*-Vektor pGBK-T7 und dem *Prey*-Vektor pGAD-T7 kodiert werden. Ein Protein wird dabei an die DNA-Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors fusioniert (GAL4BD, enthalten in pGBK-T7), während das zweite Protein an die GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert wird (GAL4AD, enthalten in den pGAD-T7). Beide Plasmide werden in den Hefestamm AH109 transformiert.

Im Falle einer Interaktion der beiden eingebrachten Proteine kommen Aktivierungsdomäne und DNA-Bindedomäne in räumliche Nähe zueinander. Der GAL4-Transaktivator wird dadurch rekonstituiert, und die Reportergene des Hefestamms, die unter der Kontrolle eines GAL4 regulierbaren Promotors stehen, werden aktiviert. Hierüber ist es dann möglich, mittels Wachstumstests auf spezifischen Nährmedien die Interaktionen von Proteinen nachzuweisen.

Der Hefestamm AH109 kann essentielle Aminosäuren (z.B. Trp, Leu oder His) bzw. Basen (z.B. Ade) nicht selbständig synthetisieren. Leu- und Trp-Auxotrophie wird durch die Plasmid-Vektoren pGBK-T7 und pGAD-T7 ergänzt und dienen als Selektionsmarker für transformierte Hefezellen. Die Synthese von Ade und His wird von GAL4 im Falle einer positiven Protein-Protein-Interaktion aktiviert. Als zusätzliches Reportergen wird LacZ verwendet, welches für α -Galactosidase kodiert.

Als Selektionsmarker wurden folgende restriktive Medien verwendet:

1. Selektion des *Bait*-Proteins: Trp-freies Medium (SD/-Trp).
2. Selektion des *Prey*-Proteins: Leu-freies Medium (SD/-Leu).

Für die Expression und Interaktion der Fusionsproteine wurden folgende restriktive Medien verwendet:

1. Selektion auf Interaktion von *Bait*- und *Prey*-Protein: His-, Ade-, Leu-, Trp-freie Medien (SD/-QDO).
2. Detektion auf Interaktion von *Bait*- und *Prey*-Protein: Hydrolyse von X- β -Gal bzw. X- α -Gal zu einem blauen Farbstoff.

4.2.2.2 Anzucht von Hefezellen

Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Hefezellen wurden auf einer YPDA-Platte ausgestrichen. Die Agarplatte wurde bei 30°C für 3 bis 4 Tage inkubiert. Die so angezogenen Hefekolonien waren bei 4°C mehrere Wochen haltbar.

Zur Kultivierung wurde mittels einer Pipette eine Kolonie aus der Stammplatte selektiert, bei 30°C Wachstumstemperatur in Flüssigmedium (YPD) angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 230 rpm bis zum Erreichen der entsprechenden OD₆₀₀ inkubiert.

4.2.2.3 Herstellung kompetenter Hefezellen

Eine Kolonie des gewünschten Hefestamms (AH109) wurde in 100 ml Flüssig-YPDA angeimpft und für 14-22 Stunde bei 30°C und 230 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.4-0.5 wurde die Kultur bei RT und 700 rpm für 5 min zentrifugiert (Sigma 4K15), der Überstand verworfen, das Pellet in jeweils 30 ml sterilem, destilliertem Wasser in einem zweiten Zentrifugationsschritt gewaschen. Das Pellet wurde in 3 ml TE/LiAc-Puffer (1x) resuspendiert und die Suspension in zwei Reaktionsgefäße überführt. Die Zellsuspension wurde bei RT und 14.000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 600 µl TE/LiAc-Lösung (1x) resuspendiert.

4.2.2.4 Transformation der Hefezellen

Fünzig µl kompetenter Hefezellen wurden mit 5 µl Carrier-DNA (10 µg/µl), 1 µl Plasmid-DNA (250 ng/µl) und 500 µl PEG/LiAc für 30 min bei 30°C inkubiert, wobei alle 10 min vorsichtig gemischt wurde. Nach Zugabe von 20 µl DMSO folgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42°C, wobei erneut alle 5 min vorsichtig gemischt wurde. Anschließend wurden die Hefezellen bei 14.000 rpm und RT für 15 s (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) zentrifugiert. Das Pellet wurde in YPD resuspendiert, die Suspension bei 30°C für 90 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (Sigma 4K15). Nach Resuspension in 1 ml 0,9% NaCl Lösung wurden die Hefezellen auf das Selektionsmedium ausplattiert und bei 30°C inkubiert, bis Kolonien sichtbar waren.

4.2.2.5 Transformation von Hefen in großem Maßstab

Für die Transformation in großem Maßstab wurden 20 µg cDNA-Bank (pGADT7-Vektor, kodierend für kombinatorische Peptid-Aptamere), 20 µg des *Bait*-Plasmids (pGBKT7-S1), 2 mg Carrier-DNA, 1 ml kompetente Hefezellen und 6 ml PEG/LiAc gemischt und für 10 s geschüttelt. Die Mischung wurde 30 min bei 30°C und 230 rpm inkubiert. Um die Zellen für den Hitzeschock durchlässiger zu machen, wurden 700 µl DMSO zugegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz bei 42°C im Wasserbad für 15 min inkubiert. Dann wurden die Zellen für 1 min auf Eis gestellt und bei 1000 g für 5 min bei RT (Sigma 4K15) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml YPD resuspendiert und für 90 min bei 30°C im Schüttler bei 230 rpm inkubiert. Schließlich wurde die Probe (Sigma 4K15) abzentrifugiert, das Pellet in 5 ml TE-Lösung (1x) resuspendiert und jeweils 500 µl der transformierten Hefen auf SD/QDO-Platten mit X-Gal ausgestrichen. Die Platten wurden im Brutschrank bei 30°C bis 10 Tage lang inkubiert.

4.2.2.6 Plasmidisolierung aus Hefen

Nach Angaben des Herstellers (MoBiTec, Göttingen, Deutschland) wurden die Plasmide aus Hefen isoliert.

Eine Hefe-Kolonie wurde in 5 ml SD/QDO Flüssigmedium inokuliert und für 3 bis 5 Tage bei 30°C und 230 rpm im Schüttler inkubiert. Zwei ml der Übernachtskultur wurden bei 14.000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) für 30 s abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Hefe-Lysis-Puffer resuspendiert, außerdem wurden die Glaskügelchen aus dem Kit zur mechanischen Zerstörung der Zellwand zugegeben. Der Ansatz wurde für 5 min gemischt, mit einer Neutralisationslösung behandelt und bei 14.000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) für 2 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule des Kits überführt. Nach Zugabe von 250 µl Zentrifugationspuffer wurde mehrmals leicht gemischt und erneut bei 14.000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) für 1 min bei RT zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und die Plasmid-DNA in 50 µl H₂O dest. durch einen weiteren Zentrifugationsschritt eluiert.

4.2.2.7 Kotransformation von Hefen

Die Kotransformation von pGBKT7-S1 und der isolierten Plasmid-DNA der selektionierten Klone (pGADT7-Bibliothek) in dem Hefestamm AH109 sollte die Interaktion zwischen GAL4-DNA-BD/SARS S1-Protein und GAL4-AD/Peptid-Aptamer-Bankprotein verifizieren.

Für die Kotransformation von Plasmiden in Hefe wurden die Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode kompetent gemacht (4.2.2.3). Danach wurden die Hefezellen mit dem folgenden Ansatz transformiert.

Transformationsansatz:

- 5 µl Carrier-DNA
- 250 ng pGBKT7-S1 (*Bait*)
- 250 ng pGADT7-Peptid-Aptamer (*Prey*)
- 50 µl Hefezellen
- 500 µl PEG/LiAc

Der Ansatz wurde bei 30 °C für eine halbe Stunde inkubiert. Danach wurden 30 µl DMSO hinzugefügt und die Zellen für 15 min einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen, welcher die Aufnahme der DNA in die Zellen ermöglicht.

Die kotransformierten Zellen werden sowohl auf SD/-Leu/-Trp als auch auf SD/TDO- bzw. SD/QDO-Platten ausplattiert. Dabei werden mit SD/-Leu/-Trp kontrolliert, ob bei der vorgenommenen simultanen Kotransformation tatsächlich beide Plasmide in die Hefezellen gelangt sind. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Expression von Proteinen in *E. coli*

Für diese Arbeit wurden rekombinante His-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und daraufhin gereinigt.

Dafür wurde zunächst der entsprechende *E. coli*-Stamm BL21-Gold (DE3) mit dem Expressionsvektor pQE-30, der zwischen dem Startcodon und dem Polylinker eine Sequenz besitzt, die sechs Mal in Folge für die Aminosäure Histidin kodiert, sowie dem Plasmid

pREP4, das zur Unterdrückung der Expression ohne IPTG-Induktion benötigt wird, transformiert. Die Expression im Bakterienstamm fand unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren T5-Promotors statt. Durch Zugabe von IPTG wird auf dem Expressionsplasmid das *lac*-Repressorgen abgelöst, wodurch die Expression des Zielgens gestartet wird.

Fünfundzwanzig ml des LB-Selektivmediums wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 230 rpm kultiviert. Anschließend wurde 1 Liter des LB-Selektivmediums mit 50 ml der Übernachtskultur beimpft und solange bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht wurde.

Nach Zugabe von IPTG (1 mM) wurde die Vollkultur für 2 Stunden bei 37°C und 230 rpm inkubiert und anschließend bei 4500 rpm (Beckmann Coulter; rotor JA25.50) für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -20°C gelagert.

4.3.2 Aufreinigung der His-Fusionsproteine

Zur Aufreinigung des Fusionsproteins aus dem bakteriellen Lysat wurde die Metallaffinitätschromatographie eingesetzt (Hochuli *et al.*, 1987). Die Nickelionen des bei dieser Methode eingesetzten Säulenmaterials besitzen sechs Ligandenbindungsstellen, von denen vier durch das chelatierende NTA besetzt sind. Die verbleibenden beiden Bindungsstellen können hingegen mit dem 6xHis-tag des Fusionsproteins interagieren. Bei der Elution konkurrieren Imidazol und das 6xHis-tag des Proteins um die Bindung an die Ni-NTA-Matrix, was in der Folge zur Dissoziation der His-Fusionsproteine führt.

Für die Aufreinigung wurde das Pellet der unter (4.3.1) beschriebenen Expressionskultur in 10 ml Lysepuffer resuspendiert und bei 4°C für 30 min im Überkoprotator inkubiert. Danach wurde die Suspension für 30 min bei 6000 g (Beckmann Coulter; rotor JA25.50) und 4°C zentrifugiert. Während dieser Zeit wurde das Säulenmaterial (ProBond Nickel-Chelating Resin) gewaschen und mit Bindepuffer äquilibriert.

Der Zentrifugationsüberstand wurde mit 5 ml ProBond Nickel-Chelating Resin versetzt und 30 min bei 4°C im Überkoprotator inkubiert. Nachdem die Suspension zentrifugiert und dreimal mit Resuspensionspuffer gewaschen wurde, wurde die Suspension in eine Säule überführt und acht Mal mit Waschpuffer gewaschen, um die unspezifische Bindung von Proteinen mit einzelnen Histidinresten an die Ni-NTA-Matrix zu verhindern. Nach Zugabe von 8 ml Elutionspuffer wurden die Proteine in kleinen Fraktionen gesammelt. Die Protein-

Konzentration der einzelnen Fraktionen wurde mittels Bradford-Assay bestimmt und deren Reinheit über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Die Proben mit einer Proteinkonzentration von mehr als 0,5 mg/ml wurden zusammengeführt und bei -20°C gelagert.

Nach der Aufreinigung wurden alle Fraktionen einer Probe mit einer Konzentration von über 500 µg/ml zusammengefasst und 3 ml davon in eine Dialysekassette mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa gegeben und gegen NaAc 10mM, pH 3,5 dialysiert. Anschließend wurden die Protein-Lösungen über Vivaspin-Säulen aufkonzentriert und auf 4-5 mg/ml eingestellt.

4.3.3 *In vitro* Transkription/Translation

Um die Interaktion zwischen den 11 Peptid-Aptameren (pGAD-T7-PA1-11) und dem pGBK-T7-S1-Protein des SARS-CoV zu bestätigen, wurde das Verfahren einer *in vitro* Transkription/Translation mit anschließender Ko-Immunitätspräzipitation verwendet. Für die Expression der Proteine im zellfreien System wurde das TNT-T7 Quick Transkription/Translation Kit benutzt, das neben Retikulozytenlysat und T7 Polymerase auch einen Aminosäuremix beinhaltet. Die einzelnen Komponenten des Kits wurden gemischt und ³⁵S-markiertes Methionin zugesetzt, um die Translationsprodukte nachweisen zu können. Die Zielgene wurden mittels PCR amplifiziert und ebenfalls dem Gemisch zugeführt.

Für das System wurde folgender Ansatz verwendet:

TNT-Quick Master-Mix PCR	20 µl
³⁵ S-Cys/Met Promix (1000 Ci/mmol)	1 µl
PCR-Produkt	20-40 µl (0,9 µg)
H ₂ O dest.	ad. 50 µl

Die Reaktionsansätze wurden für 90 min bei 30°C inkubiert und die Reaktion im Anschluss durch Zugabe von Puromycin (1 µg/ml) gestoppt. Die Proteine wurden daraufhin in eine Ko-Immunitätspräzipitation eingesetzt.

Das SDS-Gel wurde im Vakuum getrocknet und mit zwei X-Lichtstrahl Filmen für 1 bzw. 2 Wochen im abgedunkelten Tiefkühlschrank bei -80°C belichtet. Abschließend wurden die Filme entwickelt, um eine Bestätigung der Interaktion zu erhalten.

4.3.4 Ko-Immunpräzipitation

Die Ko-Immunpräzipitation (Co-IP) ist eine Methode, um die Interaktion von Proteinen zu bestätigen.

Die in (4.3.3) transkribierten und translatierten Proteine wurden gemischt und zusammen mit dem Antikörper anti-HA (1:100) für 3 Stunden bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Protein A-Sepharose sowie 80 µl Pefabloc (1%) wurde das Gemisch erneut für 1,5 Stunden bei 4°C inkubiert, anschließend für 2 min bei 14.000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 Durchgängen mit Co-IP Waschpuffer gewaschen, bevor es in 3x SEB resuspendiert und auf 95°C denaturiert wurde. Der Immunkomplex wurde dann über SDS-PAGE und Immunoblot (4.3.5 und 4.3.9) weiteranalysiert.

4.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proteine werden mit SDS-Probenpuffer versetzt, wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt und ermöglicht wird, die Proteine nach Molekulargewicht aufzutrennen. Durch einen Vergleich der Wanderungstrecken von Standard-Proteinen bekannter Größe kann die Molekülmasse unbekannter Proteine bestimmt werden. Das Polyacrylamid-Gelsystem nach Laemmli (1970) besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Die Proben werden zunächst in einem 5%-igem Sammelgel mit großen Poren zu einer scharfen Bande konzentriert. Dies ermöglicht, dass alle Proteine das Trenngel gleichzeitig erreichen.

Das Trenngel besitzt durch seinen höheren Anteil an Acrylamid (7,5-20%) kleine Poren (Tabelle 11), die die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht ermöglichen. Im Gel können die aufgetrennten Proteine durch Coomassie-Blau detektiert werden. Die Proteine können des Weiteren durch Westernblot (4.3.9) auf eine geeignete Membran transferiert und mittels Antikörper immunchemisch nachgewiesen werden.

Herstellung der Gele

Folgende Chemikalien wurden für das Trenn- und Sammelgel verwendet:

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien für die Gelherstellung

	Trenngel 7,5%	Trenngel 20%	Sammelgel 5%
Acrylamidlösung 30%	15,5 ml	41,5 ml	2,8 ml
Trennpuffer	15,4 ml	15,4 ml	-
H ₂ O dest.	30,7 ml	15,5 ml	9,9 ml
TEMED	90 µl	90 µl	30 µl
APS (10%)	192 µl	192 µl	165 µl
Sammellösung	-	-	4,2 ml

Für die Herstellung der Gele wurden die Glasplatten mit Alkohol geputzt, Abstandhalter an den Rändern eingesetzt und mit einer Plastiktüte umhüllt in der Gießkammer eingespannt. Zuerst wurde die noch flüssige Trenngellösung zugegeben und mit Isopropanol überschichtet.

Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol vollständig entfernt, die Sammelgellösung hinzugefügt und sofort danach die Probenkämme eingesetzt. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, wurden die Glasplatten mit den Gelen in feuchte Papiertücher gewickelt und im Kühlschrank gelagert.

Probenaufbereitung

Die Zellysate (siehe 4.3.8) bzw. die Proteineluate wurden mit 1/3 Vol. SDS-Probenpuffer vermengt, für 5 min bei 95°C aufgekocht und auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden entweder sofort analysiert oder bei -20°C gelagert.

Gellauf

Von den Proben wurden 10-30 µl und 3,5 µl des Längenstandards in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 25-40 mA für ca. 3 Stunde

4.3.6 Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 verwendet, welcher als tiefblauer Komplex unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Die Nachweisgrenze der Färbung liegt bei 200-400 ng Protein pro Bande.

Zunächst wurde das Gel in einem Behälter mit 40 ml Coomassie-Lösung für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt und das Gel mit Entfärbelösung 3x in einem Intervall von 10 min gewaschen. Anschließend wurde das Gel fotografiert.

4.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte nach der Methode von Bradford. Jeweils 5 µl der Proteinlösung wurden in 250 µl Bradfordlösung vermischt, die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen und anhand einer Eichkurve quantifiziert.

4.3.8 Herstellung von postnukleären Zelllysaten

Zur Herstellung des postnukleären Lysats wurden die Zellen zunächst mit 5 ml kaltem PBS gewaschen. Danach wurde 1 ml Lysepuffer auf die Zellen gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und für 1 min bei 14.000 rpm (Eppendorf 5417C Tischzentrifuge) zentrifugiert, um Membranen und Kerne zu entfernen. Für die Präzipitation von Proteinen wurde der Überstand abgenommen und im Verhältnis von 1:5 mit Methanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach einer 25-minütigen Zentrifugation bei 3500 rpm (Sigma 4K15) und 4°C wurde das resultierende Proteinpellet an der Luft bei RT für 15 min getrocknet, anschließend in 50-100 µl TNE-Puffer resuspendiert und mit 3x SEB Probenpuffer versetzt. Nach der Denaturierung (für 5 min bei 95°C) wurde der Ansatz entweder direkt auf SDS-Gele (siehe 4.3.9) aufgetragen oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.3.9 Westernblot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können spezifisch durch Immunfärbung sichtbar gemacht werden. Hierzu werden die Proteine im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran bzw. auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) transferiert und mit Antikörper inkubiert. Der primäre Antikörper erkennt spezifisch ein oder mehrere Epitope im Zielprotein und wird seinerseits durch einen sekundären, mit einer Peroxidase gekoppelten Anti-Immunglobulin-G (IgG)-Antikörper spezifisch erkannt. Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung chromogener Substanzen. Die daraus resultierende Chemolumineszenz wird durch einen Röntgenfilm detektiert.

Der Aufbau der Apparatur ist wie folgt:

Anode (+ Pol)
3 x Whatman-Papier
PVDF-Membran
SDS-Gel
3 x Whatman-Papier
Kathode (- Pol)

Drei Lagen mit Blotting-Puffer getränktes, auf Gelgröße zugeschnittenes Whatman-Papier wurden in ein Transblot-Gerät gelegt. Darauf wurde die mit Methanol aktivierte und anschließend mit H₂O dest. äquilibrierte Hybond-P-PVDF-Membran passender Größe platziert. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel aus den Glasplatten genommen, auf die Membran gegeben und mit drei Lagen Whatman-Papier bedeckt.

Der Proteintransfer erfolgte bei konstanten 18 Volt für 30 min in einer *Transblot Semi-Dry transfer cell*. Dann wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 30 min in 5%-iger Magermilchlösung bei RT inkubiert und schließlich über Nacht in 1x TBST mit dem spezifischen Erstantikörper bei 4 °C geschwenkt.

Nachdem die Membran 5x für 5 min mit 1x TBST gewaschen wurde, folgte die Inkubation in 1x TBST mit dem Zweitantikörper für 30 min bei RT. Die Membran wurde anschließend 5x mit TBST gewaschen. Die Antikörper-Protein-Komplexe wurden mittels des *ECL Plus Western Blot Detection Kits* nachgewiesen. Hierzu wurde die Membran mit Whatman-Papier getrocknet, dann in ECL-Lösung für 5 min inkubiert, nochmals mit Whatman-Papier getrocknet und in Frischhaltefolie eingewickelt. Die Lumineszenz wurde durch Exposition auf einen Röntgenfilm visualisiert.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen, die dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, wurden bei 37°C aufgetaut. Nach Transfer der Zell-Suspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen und Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium wurde die Suspension bei 700 rpm (Sigma 4K15) für 10 min bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml

Zellkulturmedium (fötales Kälberserum, FCS) resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

4.4.2 Kultivierung von Vero-E6-Zellen und HEK-293-Zellen

Die Zelllinien (Vero-E6 und HEK-293) wurden in Standardmedium bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 90% im Zellkulturinkubator auf einer 10 cm bzw. 6 cm Schale kultiviert. Das Standardmedium setzte sich zusammen aus:

D-MEM + 10% (v/v) FCS + 1% (v/v) PS

Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellen bis zur passenden Konfluenz kultiviert. Dann wurden sie mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin-EDTA (0,5-1 ml, 5 min) von der Zellschale abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Standardmedium resuspendiert und die gewünschte Zellzahl auf neue Schalen ausgesät.

4.4.3 Einfrieren von Zellen

Bei 80%-iger Konfluenz (4.4.2) wurden die Zellen abgelöst und danach bei 1000 rpm (Sigma 4K15) für 5 min bei 20°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1ml-Aliquots in Kryoröhrchen überführt und zunächst bei -80°C für 24 Stunden gelagert. Die dauerhafte Lagerung erfolgte schließlich in der Gasphase über flüssigem Stickstoff.

4.4.4 Zellzählung

Zur Aussaat einer gleichmäßigen Zellmenge der verschiedenen stabilen Zelllinien wurde die Zellzahl nach der Resuspendierung in frischem Medium mittels Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellmenge anschließend ausgesät. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml frischem Medium resuspendiert, ein Aliquot wurde im Verhältnis 1:10 in PBS verdünnt und in die Zählkammer eingebracht.

Die Zählkammer ist in 16 große Quadrate aufgeteilt, wobei jedes dieser Quadrate aus 16 kleinen Quadraten mit einer Fläche von je 1 mm² und einer Tiefe von 0,2 mm besteht. Ein einzelnes kleines Quadrat kann somit 0,2 µl Volumen aufnehmen. Die Lösung wird über die

gesamte Kammer verteilt aufgetragen, die Zählung der Zellen findet jedoch nur in den 4 großen diagonalen Quadraten statt. Multipliziert man die Zellanzahl pro Quadrat mit 5000 sowie dem Verdünnungsfaktor, erhält man die Zellanzahl pro ml.

$$\text{Zellanzahl/ml} = \frac{\text{Zellanzahl} \times \text{Dilutionsfaktor} \times 5000}{\text{Anzahl an Quadraten}}$$

4.4.5 Transiente Transfektion von Zellen mit *Lipofectamine 2000*

Für die Transfektion der Vero-E6-Zellen und HEK-293-Zellen wurde die Lipofectamine 2000 Methode gewählt, eine Methode auf Basis kationischer Lipide, welche mit DNA Komplexe ausbilden und so durch die eukaryotische Zellmembran gelangen können. Als Vorbereitung wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion mit einer Zellzahl von $5-7 \times 10^5$ Zellen auf einer 6 cm-Petrischale ausgesät. Für den Transfektionsansatz wurden Lösung A (10 μ l Lipofectamine, 240 μ l OptiMEM Medium mit FCS ohne Antibiotika) mit Lösung B (4-8 μ g Plasmid-DNA, 250 μ l OptiMEM Medium ohne Zusätze) nach 5-minütiger Inkubation vermischt und 20 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend vorsichtig auf die Zellen in die Kulturschalen gegeben. Nach 5-6 Stunden Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einem Waschschrift mit PBS für weitere 24-48 Stunden mit frischem Medium im Brutschrank inkubiert.

Zur Kontrolle der prozentualen Transfektionseffizienz wurden die Zellen unter identischen Bedingungen mit dem Plasmid pEGFP-C1 (Abbildung 12), das für eine Variante von GFP kodiert, transfiziert. Der Anteil der transfizierten Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch bestimmt und die Expression des Proteins durch Westernblot untersucht (4.3.9).

4.4.6 Zytotoxizitäts-Assay mittels Trypanblau-Färbung

Trypanblau wird in der Mikrobiologie für die Vitalfärbung von Zellen verwendet. Die Substanz wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, abgestorbene Zellen nehmen dagegen den Farbstoff auf und werden dadurch dunkelblau angefärbt.

Für dieses Experiment wurden 7×10^5 Vero-E6-Zellen ausgesät. Einen Tag danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen nach Zugabe von 2,7 ml Medium ohne FCS mit den Peptid-Aptameren in verschieden hoher Konzentration (50, 100 und 200 μ g/ml) für 1 Stunde

bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden 0,3 ml FCS zugegeben und die Zellen für 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst und mit Trypanblau in folgender Zusammensetzung behandelt.

Probe = 50 µl Zellen + 40 µl PBS + 10 µl Trypanblau

Die angefärbte Suspension wurde in eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer gegeben. Es wurde die Gesamtzahl der Zellen sowie die Anzahl der blau gefärbten (toten) Zellen bestimmt. Den prozentualen Anteil der lebenden Zellen in einem Ansatz kann man dann nach folgender Gleichung errechnen:

$$\% \text{ Lebende Zellen} = \frac{\text{Ungefärbte Zellen} \times 100}{\text{Gesamtanzahl der Zellen}}$$

Jedes Experiment wurde im 3-fach-Ansatz durchgeführt.

4.4.7 Test zur Entwicklung von Synzytien

Zellen, die das SARS-CoV-S-Protein auf ihrer Oberfläche exprimieren, können mit ihren Nachbarzellen fusionieren, wenn diese den ACE2 Rezeptor tragen. Diese Fusion führt zur Bildung von mehrkernigen Zellen, sogenannten Synzytien. Diese können durch Verschmelzung von mehreren Einzelzellen oder durch Kernteilungen ohne anschließende Teilung des Zytoplasmas entstehen.

Die 40-50%-ig konfluenten HEK-293-Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1-ACE2, welches den hACE2 Rezeptor kodiert, auf einer 6 cm Schale transfiziert. Parallel dazu wurde auf weiteren Schalen eine Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem Plasmid pHCMV-SARS-CoV-SΔ19 durchgeführt, welches das S-Protein kodiert. Am Folgetag wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, für 3 min mit 400 µl Trypsin versetzt und in DMEM resuspendiert. Die beiden genannten Zellpopulationen (transfiziert mit S-Protein bzw. ACE2) wurden gezählt, im Verhältnis 1:1 gemischt und auf 24 Well-Platten für 24-48 Stunden inkubiert.

Im Falle einer Behandlung mit einem Peptid-Aptamer wurde ein Test auf Entwicklung von Synzytien durchgeführt. Hierbei wurden die transfizierten Zellen in einer Anzahl von 5×10^5 mit S-Proteinen und Peptid-Aptameren in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ vermischt und auf eine 24-Well-Platte aufgeteilt. Anschließend wurde die Platte für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit FCS behandelt, im Verhältnis 1:1 mit der ACE2-Gruppe gemischt und bei 37°C für 24-48 Stunden inkubiert.

Die Zellen wurden mit einem Lichtmikroskop betrachtet und zur Dokumentation und Auswertung fotografiert. Für eine bessere Darstellung der Synzytien wurden die Zellen zusätzlich mit PFA fixiert und mit DAPI (1:1000) gefärbt. Die Ergebnisse wurden im Olympus Mikroskop beobachtet und fotografiert. Anschließend wurden die Synzytien ausgezählt.

4.4.8 Infektion von Vero-E6-Zellen mit SARS-CoV und Behandlung mit Peptid-Aptameren

Am Tag vor der Infektion wurden 7×10^5 Vero-E6-Zellen in Flaschen mit einer Grundfläche von 25 cm^2 ausgesät, sodass sie am Tag der Infektion zu 90% konfluent waren. Das Medium DMEM (Gibco 42430) + FCS + PS (DMEM + 4,5 g/L Glucose, L-Glutamine, 25 mM HEPES, ohne Pyruvat) wurde auf ein Volumen von 3 ml angesetzt und die Zellen mit einer MOI von 0,5 infiziert.

Im Falle einer Behandlung mit einem Peptid-Aptamer wurde direkt vor der Infektion das Virus in Medium ohne FCS verdünnt und mit 100 $\mu\text{g/ml}$ PA für 30 min bei RT inkubiert. Als Kontrollen wurden TrxA, Virus unbehandelt und Virus mit entsprechendem Volumen Dialysepuffer verwendet. Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und mit der Aptamer-Virusmischung für 1 Stunde bei 37°C zu den Zellen gegeben. Dann wurde der Infektionsüberstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Medium + FCS + PA 100 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben und bei 37°C für 15 Stunden inkubiert.

Dann wurde der Überstand abgenommen und bei 1000 rpm (Sigma 4K15) für 5 min bei RT zentrifugiert. Schließlich wurden die Proben bei -80°C weggefroren.

4.4.9 Plaque-Assay

Um Effekte der PA-Behandlung zu testen, wurde ein Plaque-Assay durchgeführt. Mit diesem Test wird die Anzahl infektiöser Viruspartikel pro ml (PFU/ml) eines Virusüberstandes bestimmt.

Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Virusüberstände bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} hergestellt. Die Zellen wurden in einer Menge $1,5 \times 10^5$ pro Well einer 12-Well-Platte (Doppel Ansatz) ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit jeweils 400 μ l der verdünnten Virusüberstände überschichtet und 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach der Infektion der Zellen wurde jedes Well mit 1,5 ml Methylcellulose-Medium überschichtet. Der Methylcellulose-Anteil des Mediums (15 ml Methylcellulose und 35 ml Medium) bewirkt eine Verdichtung des Mediums, die eine Diffusion infektiöser Partikel verhindert.

Nach drei Tagen Inkubation wurde das Medium mit der Pipette abgenommen, der Zellrasen 1x mit PBS gewaschen und mit Formalin bedeckt, wodurch die Zellen fixiert und die infektiösen Viruspartikel deaktiviert werden. Die getrockneten Platten wurden mit Kristallviolett-Lösung für 30 min bei RT gefärbt.

Abschließend wurde die Lösung abgenommen und die Zellen 2x mit PBS gewaschen, bevor die Plaques ausgezählt wurden (Abbildung 15).

$$(\text{Anzahl Plaques}) \times d = \text{PFU} \left(\frac{1}{\text{ml}} \right)$$

$$\text{MOI} = \frac{\text{PFU}}{\text{Zahl ausgesäter Zellen}}$$

PFU = plaqueforming-units

d = Verdünnungsfaktor der Viruslösung

Abbildung 15: Auswertung des Plaque-Assay und MOI

5. ERGEBNISSE

5.1 Klonierungen der *Bait*-Proteine für Yeast-Two-Hybrid-Screenings

Unter Benutzung geeigneter Oligonukleotide (Tabelle 5) wurde das Gen des SARS-S-Proteins (SARS-CoV Isolat Frankfurt 1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Drosten vom Universitätsklinikum Bonn, Institut für Virologie) mittels PCR amplifiziert, um es später in die entsprechenden Expressionsvektoren ligieren zu können. In diesen Fall wurde ein die Rezeptorbindedomäne (RBD) enthaltendes Fragment der S1-Domäne (AS 251-531), die RBD (AS 318-510) und Fragmente der RBD, BDa (AS 379-517), BDb (AS 308-450) und BDc (AS 379-450) via PCR (4.1.1) amplifiziert. Fünfzig μL der PCR-Ansätze wurden zur Kontrolle und späteren Präparation in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt (4.1.3). Bei allen PCR-Ansätzen ist auf dem Agarosegel in verschiedenen Höhen eine scharfe Bande detektiert (Abbildung 16). Die Negativkontrollen weisen keine Banden auf (Daten nicht gezeigt). Anhand des 100 bp Markers wurde die Größe der Amplifikate abgeschätzt, und mit Hilfe der publizierten genomischen Sequenz konnte die genaue Größe des PCR-Produktes verglichen werden. Die gemessene Bandengröße wurde wie erwartet in Höhe von 840 bp für S1, für RBD in Höhe von 576 bp, für BDa in Höhe von 414 bp, für BDb in Höhe von 426 bp und für BDc in Höhe von 213 bp erkannt.

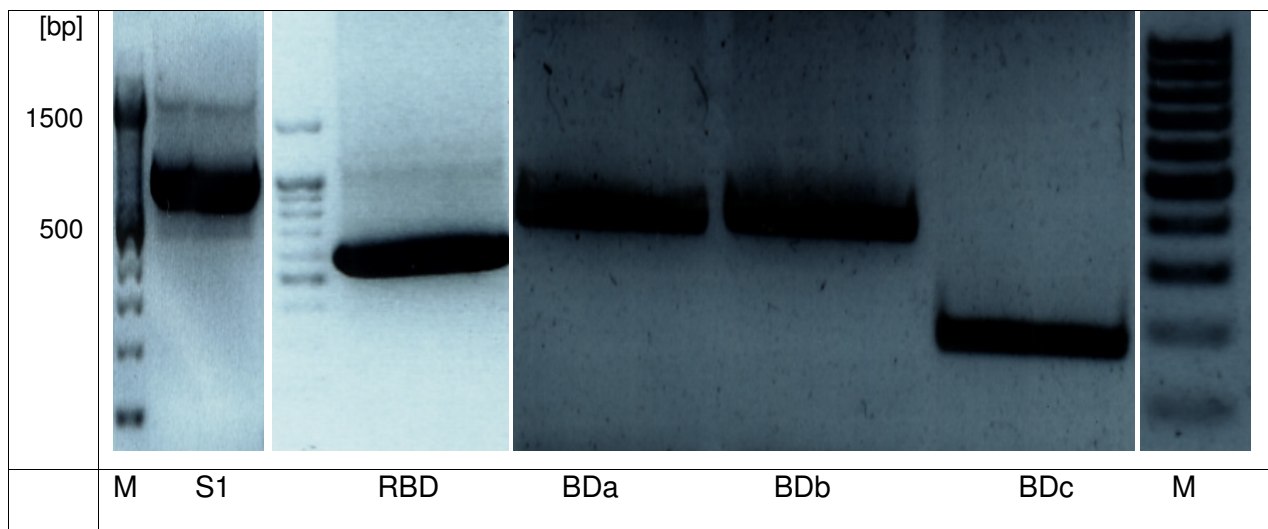


Abbildung 16: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte

1% Agarosegel, 110 Volt, 30 min, jeweils 50 μL Probe. Die Banden zeigen verschiedene Höhen in Proportion zu ihrer jeweiligen Größe: S1= 840 bp, RBD= 576 bp, BDa= 414 bp, BDb= 426 bp und BDc= 213 bp. M= 100 bp Marker.

Nach Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese (4.1.3), Aufreinigung aus dem Gel (4.1.4) und anschließendem Restriktionsverdau (4.1.5 a) wurden über den Zwischenschritt

der Klonierung in den pCR-Blunt-II-Topo-Vektor die Konstrukte S1, RBD, BDa, BDb und BDc in den Expressionsvektor pGBK-T7 (*Bait*-Konstrukte) umkloniert.

Der pGBKT7-Vektor enthält eine DNA-bindende Domäne (Gal4-DNA-Bindedomäne, BD), die bei der Klonierung mit dem *Bait*-Protein fusioniert wurde. Die Selektion erfolgte für das *Bait*-Plasmid in *E. coli* über Kanamycin-Resistenz und in AH109 über Tryptophan-Komplementierung (Trp1-Gen). Das rekombinante Fusionsprotein wurde durch den konstitutiven ADH1-Promotor (PADH1) in Hefen exprimiert. Der Vektor besitzt auch einen T7-Promotor, der für die *in vitro* Transkription/Translation des Epitop-markierten Fusionsproteins genutzt wird. Abbildung 17 zeigt schematisch den Aufbau der fünf erzeugten *Bait*-Konstrukte für die Y2H-Screenings.

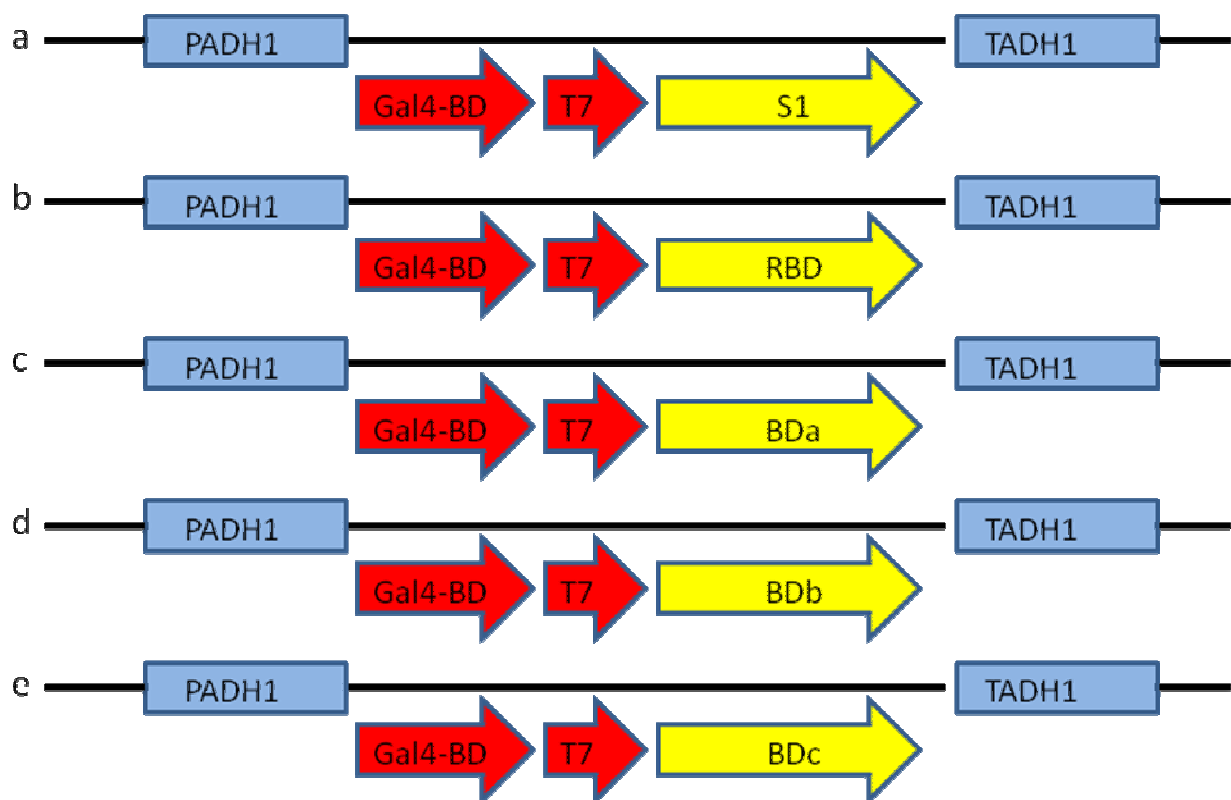


Abbildung 17: Klonierung der Zielproteine in pGBK-T7 für die Y2H-Screenings

Kloniert wurde a) S1; Teil des S-Proteins des SARS-CoV, mit 840 bp b) RBD; Rezeptorbindedomäne des SARS-CoV mit 576 bp und c-e) eine sub-Teilung der BD mit 213-426 bp, in N-terminaler Fusion mit der Gal4-BD. Die Expression in Hefe erfolgte über den ADH1-Promotor, abgeschlossen wurde die Expressionskassette mit dem ADH1-Terminator (TADH1).

Nach Plasmidisolierung (4.2.1.4) wurde bei einzelnen Klonen die Existenz des richtigen Inserts mittels analytischem Restriktionsverdau (4.1.5 b), (Abbildung 18), und Sequenzierung (4.2.1.7) festgestellt.

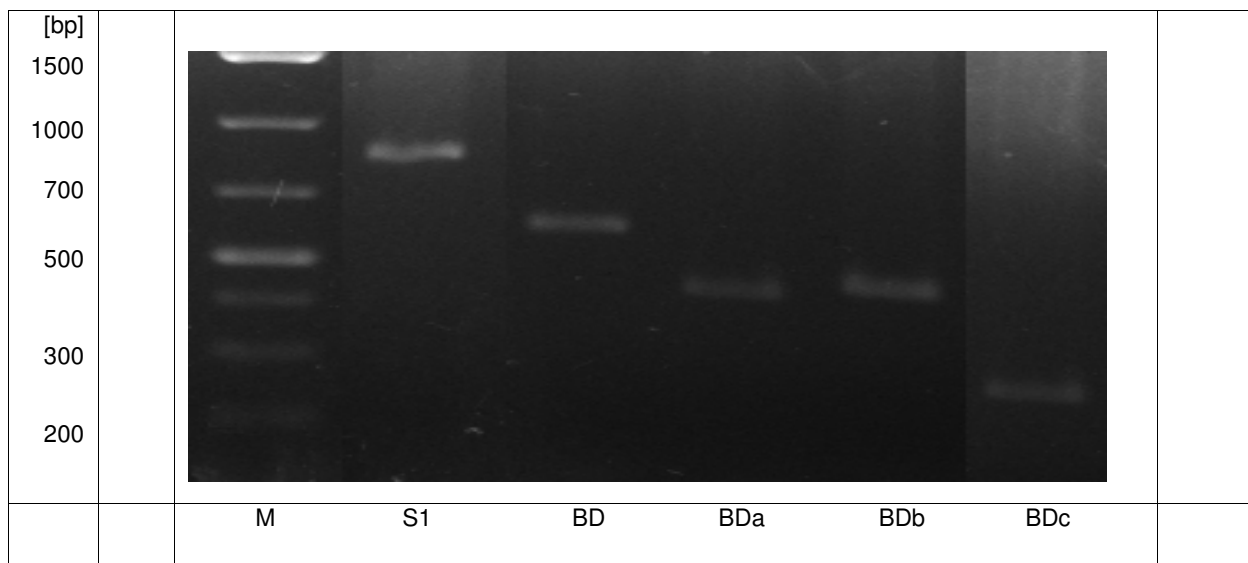


Abbildung 18: Analytischer Restriktionsverdau der klonierten S-Protein-Fragmente

2% Agarosegel, 110 Volt, 30 min, jeweils 50 µl Probe. Die Banden zeigen verschiedene Höhen in Proportion zu ihrer jeweiligen Größe: S1= 840 bp, RBD= 576 bp, BDa= 414 bp, BDb= 426 bp und BDc= 213 bp. M= 1 kb Marker.

5.2 Yeast-Two-Hybrid Screen einer Peptid-Aptamer-Bibliothek gegen das S1-Protein

5.2.1 Sequentielle Kotransformation

Bindende Peptid-Aptamere gegen das S1-Fragment des S-Proteins wurden mittels Yeast-Two-Hybrid Screen (Y2H) gefunden. Die Hefen AH109 wurden mittels LiAc-Methode mit dem hergestellten Konstrukt pGBK-T7-S1 (enthält die Rezeptorbindedomäne) transformiert. In einem zweiten Schritt wurde eine cDNA-Bibliothek (pGADT7-PA) (Gilch et al., 2007), die für ca. 1 Million unterschiedliche Peptid-Aptamer-Sequenzen kodiert, sequentiell in AH109-pGBK-T7-S1 Hefen transformiert (4.2.2.3-4.2.2.4).

Zur Selektion positiv transformierter AH109 Hefen wurden diese auf entsprechendes Selektivmedium ausgestrichen. Die mit den beiden Vektoren pGBK-T7-S1 und pGAD-T7-PA transformierten Hefen wurden sowohl auf einem Medium ohne Tryptophan und Leucin (SD/-Trp/-Leu) als auch auf einem Adenin/Histidin-freien Nährmedium (SD/-Ade/-His) angezüchtet. Das Wachstum zeigt, dass die beiden Konstrukte in Hefezellen transformiert (SD/-Trp/-Leu) wurden und es zu einer Interaktion zwischen dem *Bait*-S1-Protein und einem *Prey*-Konstrukt der cDNA-Bank kam (Wachstum auf SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade). Durch die Interaktion wurde der GAL4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert. Dies führte dann zur

Transkription der unter Kontrolle des GAL4-Transkriptionsfaktors stehenden Reportergene (Ade/His/X-Gal), und die Hefen ließen sich durch X-Gal blau anfärben.

Die hoch stringenten Bedingungen der Selektion von Klonen mit positiver Interaktion, wie z.B. beim Adenin/Histidin-freien Nährmedium, ermöglichen eine Minimierung von positiven Interaktionspartnern. Zunächst wurden 180 positive Klone auf den SD/QDO- α -Galactosidasen ermittelt. Alle Klone wurden für eine bessere Selektion der positiven Klone zweimal erneut auf SD/QDO-X-Gal ausgestrichen. Nach dieser Prozedur verblieben unter diesen hoch selektiven Bedingungen noch 55 positive Klone.

5.2.2 Isolierung des *Prey*-Konstrukts

Um die positiven Klone zu analysieren und verifizieren, wurden die 55 Klone zuerst in entsprechendem Adenin/Histidin-freiem Flüssigmedium angezogen. Alle Klone wurden dann einer Plasmidisolierung (4.2.2.6) unterzogen und mittels Restriktionsverdau analysiert (Abbildung 19). Anschließend wurden die Plasmide amplifiziert.

Für die Amplifikation der Plasmid-DNA wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen wurden die Plasmide in chemisch kompetente *E. coli* XL1 Bakterien transformiert und dadurch amplifiziert (4.2.1.2-4.2.1.4, 4.2.1.6-4.2.1.7). Da das aus den Hefen isolierte Plasmid (4.2.2.6) eine Mischung aus *Prey*- und *Bait*-Plasmid repräsentierte, enthielten die transformierten Bakterien entweder *Prey*- oder *Bait*-Plasmid. Da jedoch das *Prey*-Plasmid eine Ampicillinresistenz und das *Bait*-Plasmid eine Kanamycinresistenz vermitteln, ist so eine Selektion auf Bakterien möglich, die nur *Prey*-Plasmid beinhalten.

Jedoch enthielten nicht alle Plasmid-Präparationen genügend DNA für eine erfolgreiche Transformation. Deshalb wurde von diesen Präparationen das Insert des *Prey*-Plasmids über eine PCR (4.1.1, 4.1.3-4.1.5) amplifiziert und das Produkt dann entweder in einen TOPO-Vektor (4.1.7) oder direkt in den Ziel-Vektor (4.1.8) ligiert und schließlich in chemisch kompetente *E. coli* XL1 Bakterien transformiert (4.2.1.2-4.2.1.4). Auf diese Weise konnten 37 Plasmidproben amplifiziert werden.

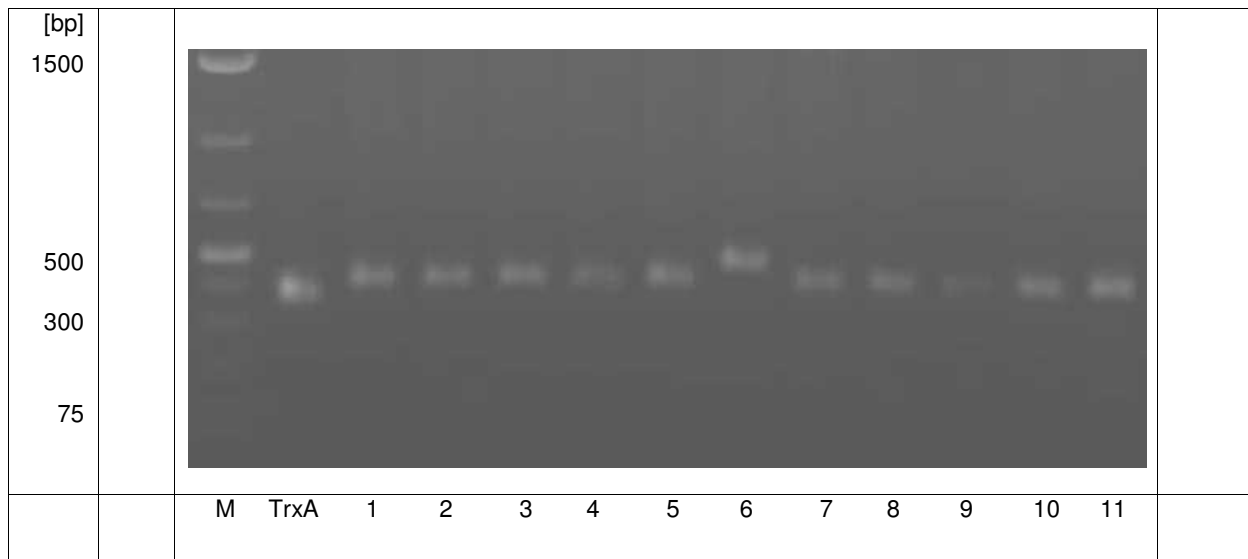


Abbildung 19: Analytischer Restriktionsverdau der 11 Peptid-Aptamer-Klone

Bei dem Verdau wurde EcoRI und XhoI verwendet. Die DNA wurde auf 1% Agarosegel aufgetragen. TrxA mit 330 bp dient als Kontrolle für den Längenvergleich des Inserts. M ist der 1 kb Marker. Das Insert zeigt eine Länge zwischen 380 und 430 bp.

5.2.3 Sequenzierung des *Prey*-Konstrukts

Die 37 positiven Plasmidproben wurden schließlich zur Sequenzierung geschickt (4.2.1.7) und die Ergebnisse mit dem NCBI Blast Programm auf Homologien mit bekannten Gensequenzen überprüft. Dabei konnte keine Homologie zu bekannten Sequenzen aufgezeigt werden.

Die Analyse der Sequenzen durch das Biological Workbench Programm zeigte, dass die meisten Inserts entweder eine Verschiebung des Leserasters der kodierenden Sequenz, wodurch sich ein Stopcodon im Protein entwickeln kann, oder eine Wiederholung der Sequenzen enthielten. Diese Fehler liegen darin begründet, dass durch Verwendung von nur einem Restriktionsenzym (BamHI) bei der Klonierung der PA-Bibliothek nicht nur eine kodierende Sequenz, sondern mehrere der 48 Nukleotid-Einheiten eingefügt wurden.

Insgesamt konnten im Rahmen der Arbeit die Sequenzen von 11 (Tabelle 12) verschiedenen Peptid-Aptameren ermittelt werden, bei denen dann eine Überprüfung der Protein-Protein-Interaktion zwischen PA und S1-Fragment durchgeführt wurde (4.2.2.7). Bei der Analyse der Sequenzen wurden mehrere PA mehrmals identifiziert. So konnte PA1 5x und PA5 und PA8 je 2x nachgewiesen werden. In PA6 wurde eine Duplizierung der Sequenz mit einer Länge von 35 AS detektiert.

Mit den identifizierten Peptid-Sequenzen wurde eine Sekundärstruktur-Analyse mit Hilfe des Gor4-Algorithmus durchgeführt. Bei allen Sequenzen wurden mögliche β -Stränge vorhergesagt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Sequenzen der Peptid-Aptamere

Die Aminosäuren (blau markiert) zeigen ein putatives β -Faltblatt. Bei der Analyse der Sequenzen wurden mehrere PA mehrmals identifiziert (PA1 5x, PA5 und PA8 je 2x). In PA6 liegt eine Duplizierung der Sequenz mit einer Länge von 35 AS vor.

PA	Sequenzen
1	PIVVPSFIGIYVLTQA (5)
2	PILVRIATRPQALHIN
3	YGLVLSTWRWATPLGL
4	SLLRLPLVRRLCFMPT
5	PRYLIKISHRQVRFLP (2)
6	PPQNPSRLIIKTTLRTHGSPYNVYVASKPHLSPRP
7	AGFVFSGSRMMLTVSS
8	ACLFFSPWAALASMFR (2)
9	RGMPGWSFLHSLFLRM
10	MLRRRTWVSFIHRCLV
11	GLSVIYYGLLRKHLLS

5.2.2 Verifizierung der Interaktionen zwischen PA und dem SARS-CoV S1-Protein mittels Y2H und Ko-Immunpräzipitation

Um die Interaktion zwischen den beiden Proteinen zu verifizieren (4.2.2.7), wurde eine Kotransformation zwischen pGBK-T7-S1 und der isolierten *Prey*-Plasmide (pGAD-T7-PA1-11) in dem Hefestamm AH109 angesetzt. Als Negativkontrolle wurde das *Bait*-Plasmid mit dem leeren *Prey*-Plasmid transformiert, um eine unspezifische Interaktion zwischen S1 und der GAL4-AD auszuschließen. Die kotransformierten Zellen wurden sowohl auf SD/-Leu/-Trp als auch auf SD/TDO- bzw. SD/QDO-Platten ausplattiert (Abbildung 20). Mit dem Medium SD/-Leu/-Trp wurde kontrolliert, ob bei der vorgenommenen simultanen Kotransformation tatsächlich beide Plasmide in die Hefezellen gelangt sind. Die Platten wurden bei 30°C solange inkubiert, bis Kolonien auftraten. Die Interaktion der 11 positiven Klone mit S1 war reproduzierbar, deshalb wurden diese in weiteren Untersuchungen verwendet.

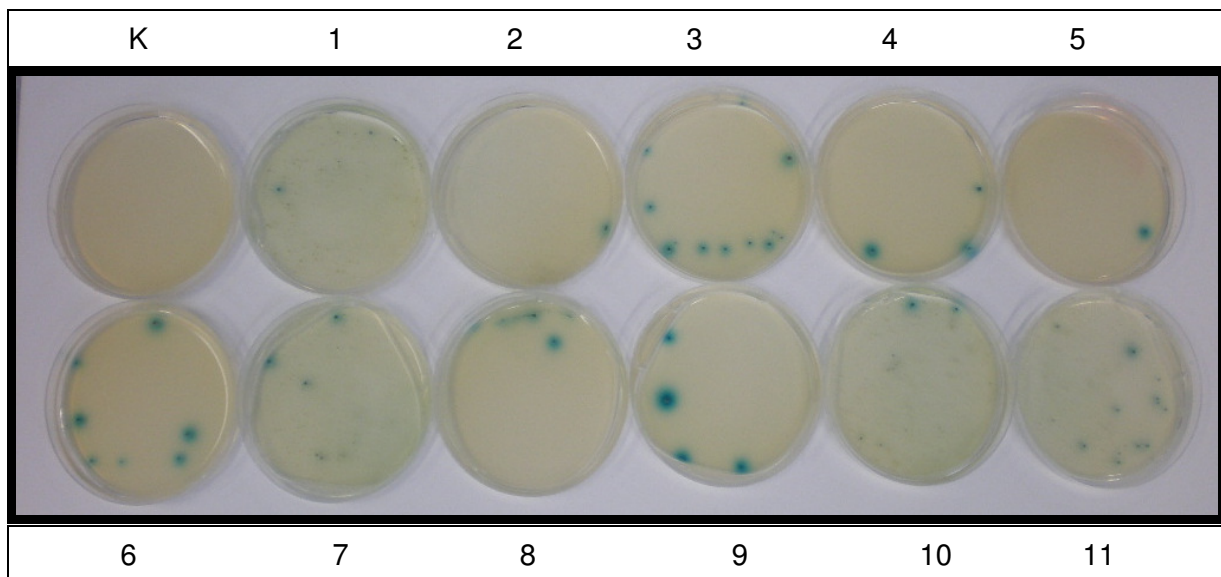


Abbildung 20: Y2H-Screening der 11 selektierten Peptid-Aptamere gegen S1-Protein

Das Screening erfolgte auf entsprechenden Selektionsmedien. Als Negativkontrolle (-K) dient pGAD-T7-TrxA. Die blauen Kolonien zeigen eine positive Interaktion zwischen den beiden Proteinen.

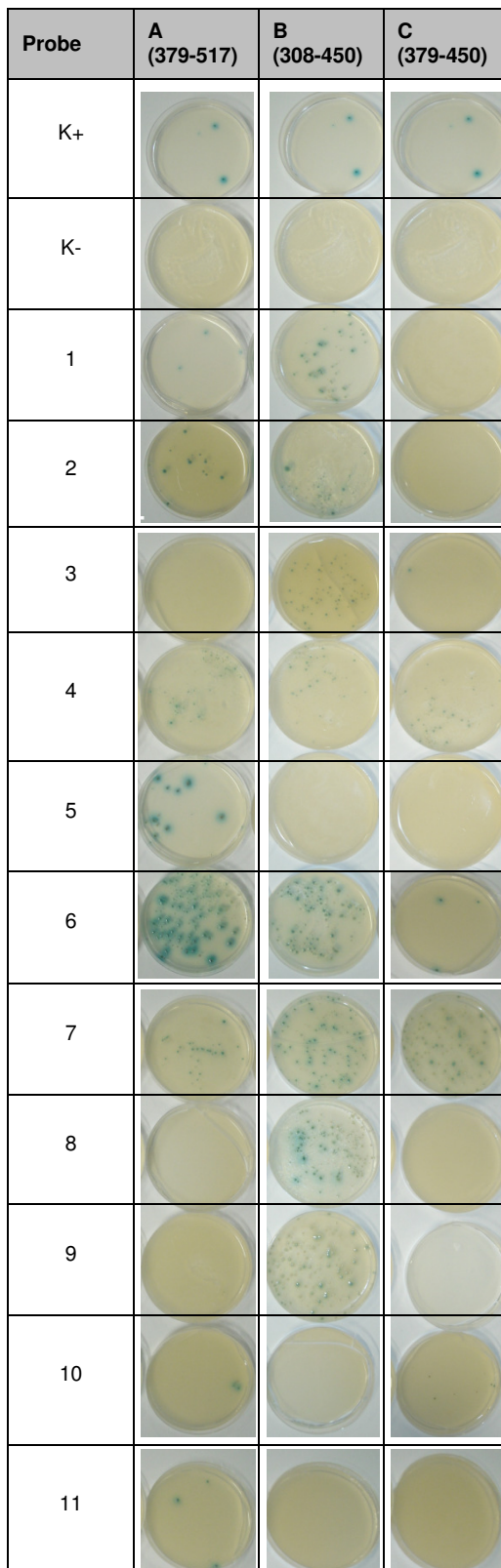
Weiterhin wurden die Interaktionen mittels Ko-Immunpräzipitation nach *in vitro* Transkription/Translation der *Bait*- und *Prey*-Proteine bestätigt (Daten nicht gezeigt).

5.2.3 Mapping der Peptid-Aptamer-Bindungsregionen mittels Y2H

Nachdem festgestellt wurde, dass PA1 bis PA11 mit dem S1-Fragment von SARS-CoV eine reproduzierbare Bindung aufzeigt, stellte sich die Aufgabe, welche Domäne des S1-Fragments die Peptid-Aptamere jeweils erkennen. Daher wurden Mapping-Studien mittels Y2H durchgeführt (4.2.2.1-4.2.2.5). Die S1-Region (AS 251-531) wurde in 4 Fragmente unterteilt: die RBD (AS 318-510), die für die Bindung des Virus an den ACE2-Rezeptor verantwortlich ist, und eine weitere Unterteilung dieser Region in die Fragmente BDa (AS 379-517), BDb (AS 308-450) und BDc (AS 379-450). pGBK-T7-53 wurde als Positivkontrolle, pGBK-T7-TrxA als Negativkontrolle verwendet.

Neun von 11 Klonen interagieren wie erwartet mit RBD, Klon 3 nur mit BD1 und Klon 11 mit BD3. Dies lässt darauf schließen, dass PA3 mit AS 308-318 und PA11 mit AS 510-517 interagieren. PA1 und PA2 binden zusätzlich zur RBD noch an BD1 und BD3. Alle weiteren PA weisen nur eine Bindung an eines der Sub-Fragmente BD1-BD3 auf (Abbildung 21a, 21b).

a)



b)

	PA	RBD (AS 318-510)	BD-1 (AS 308-379)	BD-2 (AS 379-450)	BD-3 (AS 450-517)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					

positive Interaktion zwischen PA und BD
 keine Interaktion zwischen PA und BD

Abbildung 21: Mapping der Peptid-Aptamer-Bindungs-Regionen mittels Y2H

- a) Die *Bait*-Konstrukte stehen oben, die *Prey*-Konstrukte auf der linken Seite. pGBK-T7-7 und pGADT-53 dienen als Positivkontrolle (K+), pGBK-T7-TrxA als Negativkontrolle (K-). Die blauen Kolonien zeigen eine positive Interaktion.
- b) Interpretation der Ergebnisse aus a)

5.3 Protein-Expression in *E. coli* und Aufreinigung der PA

Weitere Untersuchungen in Zellkulturen sollten zeigen, ob eine Behandlung mit PA1-PA11 die Bindung des S-Proteins des SARS-CoV an den Rezeptor ACE2 inhibieren und somit die Infektion mit SARS-CoV verhindern kann. Deshalb war es notwendig, die PA in *E. coli* zu exprimieren und über Affinitätschromatographie aufzureinigen.

Dazu wurden sowohl die entsprechenden Sequenzen als auch das TrxA in den pQE-30 Expressionsvektor umklontiert, der eine induzierbare Überexpression von Proteinen in *E. coli* unter der Kontrolle des lac-Promotor ermöglicht. Um sicherzustellen, dass sich die PA-TrxA im ORF hinter dem 6xHis-Epitop (NH₂-6X His-Tag-TrxA-PA-TrxA-COOH) befinden und keine ungewollten Mutationen in die PA-TrxA durch die Klonierungsarbeiten eingeführt werden, wurden die Proben sowohl mittels analytischem Verdau (4.1.5.b) als auch mittels Sequenzierung analysiert (4.2.1.7).

Die Expression der Peptid-Aptamere und TrxA wurde durch IPTG-Induktion der mit dem rekombinanten Vektor pQE-30 transformierten Bakterienzellen erreicht. Die Aufreinigung wurde mit Hilfe des His Tags mittels IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*) unter Verwendung von Harnstoff und Guanidiniumchlorid realisiert. Die Proteinkonzentration des eluierten Proteins wurde dann mittels *Bradford-Assay* ermittelt (4.3.7). Das gesamte Eluat wurde erneut unter Verwendung von Dialysekassetten mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa aufgereinigt (4.3.2), um den Harnstoff zu entfernen und eine Renaturierung der PA zu ermöglichen, mittels Vivaspin-Säulen aufkonzentriert und auf eine Konzentration von 4,5 mg/ml eingestellt.

Zur Überprüfung der Reinheit erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.3.5). Die Anfärbung der Proteinbanden im Gel erfolgte über Coomassie-Blau-Färbung (4.3.6, Abbildung 22). Wie hier zu sehen ist, weisen die Protein-Proben eine sehr hohe Reinheit auf, da nur die für die Peptid-Aptamere spezifischen Banden bei ca. 14 kDa angefärbt wurden.

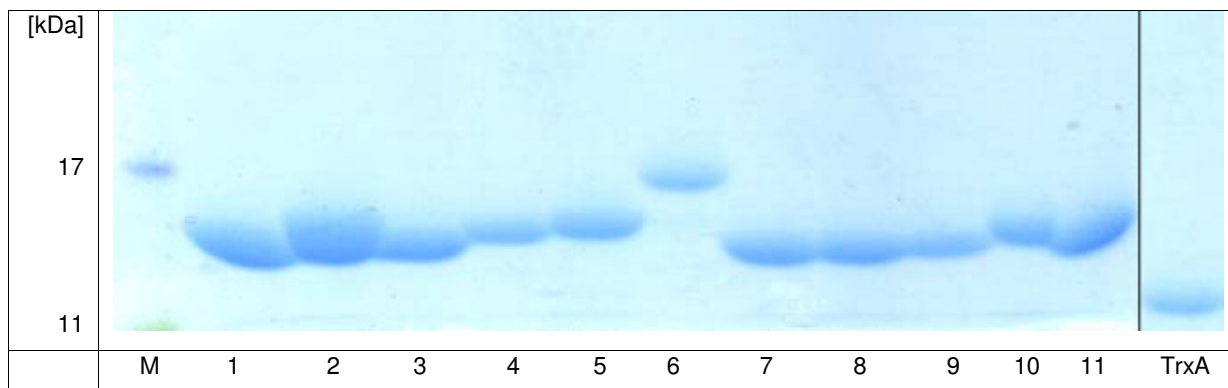


Abbildung 22: Analyse der rekombinanten Expression und der Aufreinigung der PA

Die Peptid-Aptamere und TrxA wurden in *E. coli* exprimiert und unter denaturierenden Konditionen aufgereinigt. Nach Dialyse und Einstellung der Konzentration wurden die Proben auf 20% SDS-PAGE aufgetragen und die Banden mit Coomassie-Blau gefärbt.

5.4 Erzeugung des Plasmids zur Expression von SARS-CoV-Spike in Säugerzellen

Zur Expression des SARS-CoV-Spike-Proteins in Säugerzellen wurde das pcDNA3.1-Plasmid verwendet (Abbildung 9). Die zu klonierende SARS-CoV-Sequenz, also die Nukleotide 21492 bis 25259 des SARS-CoV-Genoms, wurde mittels RT-PCR amplifiziert (4.1.1). Dann wurde erst das PCR-Produkt in den PCR-Blunt II-TOPO Vektor kloniert (4.1.7). Sowohl das S-Fragment als auch das pcDNA3.1-Plasmid wurden mit BamHI- und XhoI-Restriktionsendonuklease für 3 Stunden behandelt (4.1.5.a), dann auf dem Agarosegel aufgetragen, aufgereinigt (4.1.3-4.1.4) und mittels T4-DNA Ligase in pcDNA3.1+ ligiert (4.1.8). Das Ligationsprodukt wurde anschließend zur Transformation von *E. coli* Zellen verwendet (4.2.1.2). Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse (4.1.5.b) und Sequenzierung identifiziert (4.2.1.7).

Da das Produkt einige Mutationen in der Sequenz zeigte, wurde eine Korrektur über Mutagenese durchgeführt (4.1.2).

5.5 Expression des S-Proteins und des humanen SARS-CoV-Rezeptors hACE2

Für die weiteren Experimente zur Verifizierung der PA-Effekte war es nötig, sowohl das S-Protein als auch hACE2 in Säugerzellen zu exprimieren.

HEK-293-Zellen und Vero-E6-Zellen werden in der Zellbiologie seit vielen Jahren als vergleichsweise einfach zu handhabende Zelllinien eingesetzt. Das S-Protein des SARS-CoV wird mittels eines optimierten Expressionssystems sowohl in HEK-293-Zellen als auch in Vero-E6-Zellen exprimiert (4.4.5). Zur Untersuchung der Interaktion des S-Proteins mit dem humanen SARS-CoV-Rezeptor hACE2 wird ACE2 im selben Zelltyp exprimiert und beide Zellpopulationen dann unter definierten Bedingungen kokultiviert. Im Falle einer Interaktion der beiden Proteine sollte eine Synzytien-Bildung erfolgen (Li *et al.*, 2003).

Die Zellen wurden in 6 cm² Schalen ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 80% mit 4 oder 8 µg von pcDNA3.1-S, pHCMV-SARS-CoV-SΔ19 (freundlicherweise von der Gruppe um Frau Prof. v. Laer von der Medizinischen Universität, Sektion für Virologie, Innsbruck zur Verfügung gestellt) bzw. pcDNA3.1-ACE2 (freundlicherweise von Herr Dr. Michael Farzan, Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard University, Southborough, Massachusetts, zur Verfügung gestellt) transfiziert. Das SARS-CoV-SΔ19 Konstrukt hat die Besonderheit, dass die letzten 19 Aminosäuren (AS) des S-Proteins deletiert wurden, um so die Expression zu erhöhen (Giroglou *et al.*, 2004), da das S-Protein der vollen Länge (pcDNA3.1-S) sehr schlecht exprimiert wurde bzw. nicht nachweisbar war (Abbildung 23). Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die transfizierten Zellen geerntet, lysiert und im Immunoblot analysiert. Als Positiv-Kontrolle im Immunoblot diente das inaktivierte Lysat von SARS-CoV infizierten Vero-E6-Zellen. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, wird das S-19AS-Protein (pHCMV-SARS-SΔ19) in HEK-293-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion am stärksten exprimiert. Die Expression nimmt zu den späteren Zeitpunkten kontinuierlich ab. Wurden 4 µg Plasmid-DNA (A) eingesetzt, konnte mehr S-Protein nachgewiesen werden. Das S-Protein (pHCMV-SARS-CoV-SΔ19) in Vero-E6-Zellen zeigt eine gute Expression in den ersten 48 Stunden, welche nach 72 Stunden deutlich abnimmt (Abbildung 25). hACE2 hingegen wurde zu allen Zeitpunkten der Analyse sehr stark exprimiert, mit der höchsten Expressionsrate 48 Stunden nach der Transfektion (Abbildung 26 und 27).

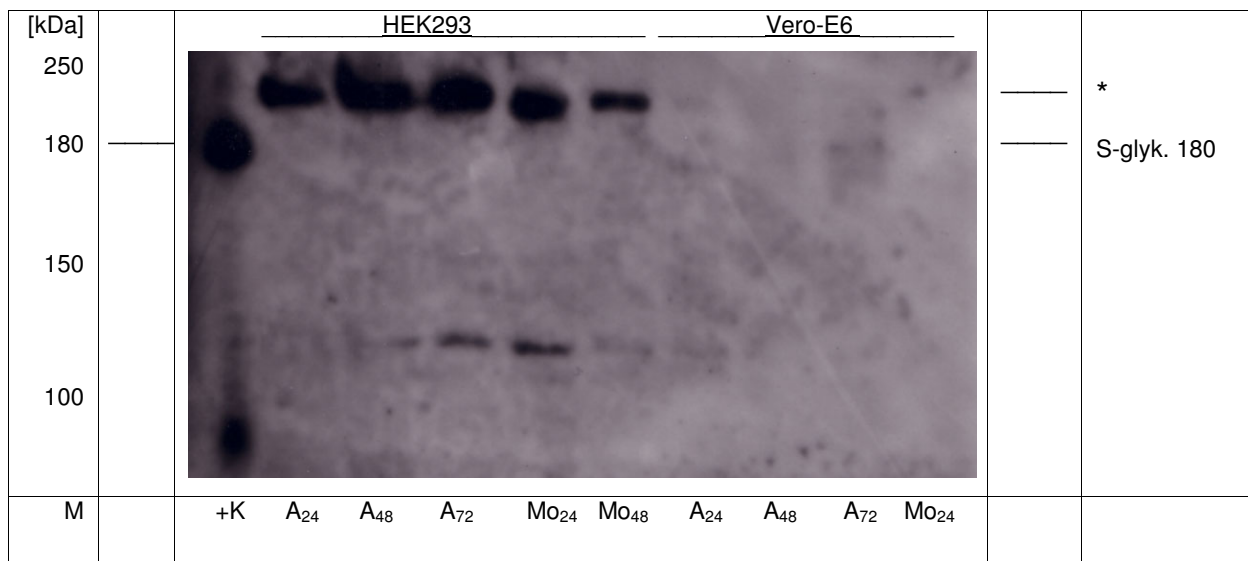


Abbildung 23: Expression des S-Proteins (pcDNA3.1-S)

Expression sowohl in HEK-293-Zellen als auch in Vero-E6-Zellen. Lyse der Zellen nach 24, 48 und 72 h. A= 6 µg Plasmid-DNA. Die Proteingemische wurden mittels SDS-PAGE (7,5%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Das S-Protein wurde mit einem polyklonalen Antikörper (erkennt AS 1124-1140) nachgewiesen. (M: Marker; +K: Positiv-Kontrolle; Mo: Mock nicht transfiziert nach 24 bzw. 48 h; * = unspezifische Bande).

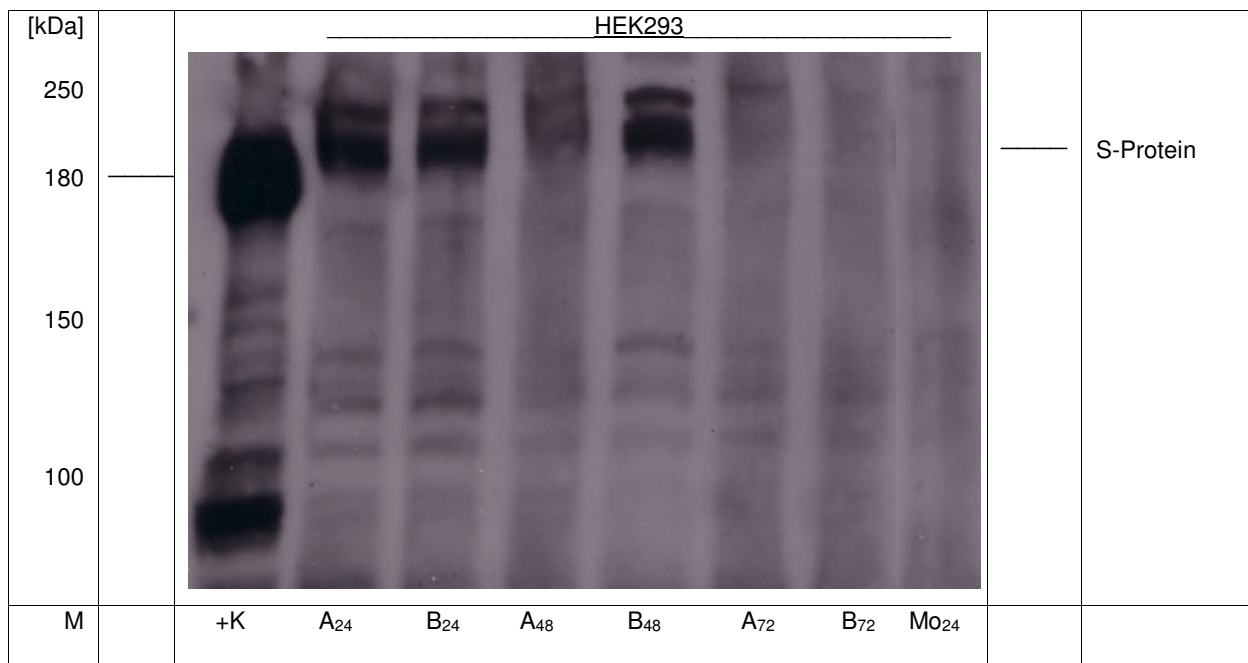


Abbildung 24: Expression des S-Proteins (pHCMV-SARS-CoV-Δ19) in HEK-293-Zellen

Lyse der Zellen nach 24, 48 und 72 h. A = 4 µg und B = 8 µg Plasmid-DNA. Die Proteingemische wurden mittels SDS-PAGE (7,5%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Das S-Protein wurde mit einem polyklonalen Antikörper (erkennt AS 1124-1140) nachgewiesen. (M: Marker; +K: Positiv-Kontrolle; Mo: Mock nach 24 h)

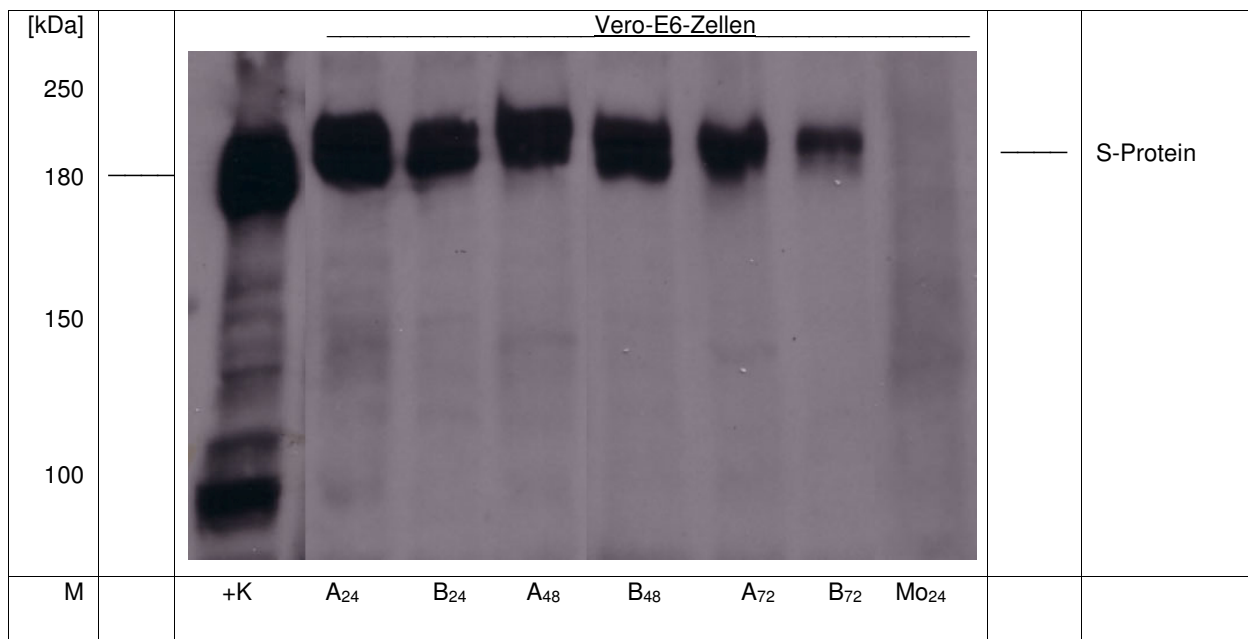


Abbildung 25: Expression des S-Proteins (pHCMV-SARS-CoV- Δ 19) in Vero-E6-Zellen

Lyse der Zellen nach 24, 48 und 72 h. A = 4 μ g und B = 8 μ g Plasmid-DNA. Die Proteingemische wurden mittels SDS-PAGE (7,5%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Das S-Protein wurde mit einem polyklonalen Antikörper (erkennt AS 1124-1140) nachgewiesen. (M: Marker; +K: Positiv-Kontrolle; Mo: Mock nach 24 h)

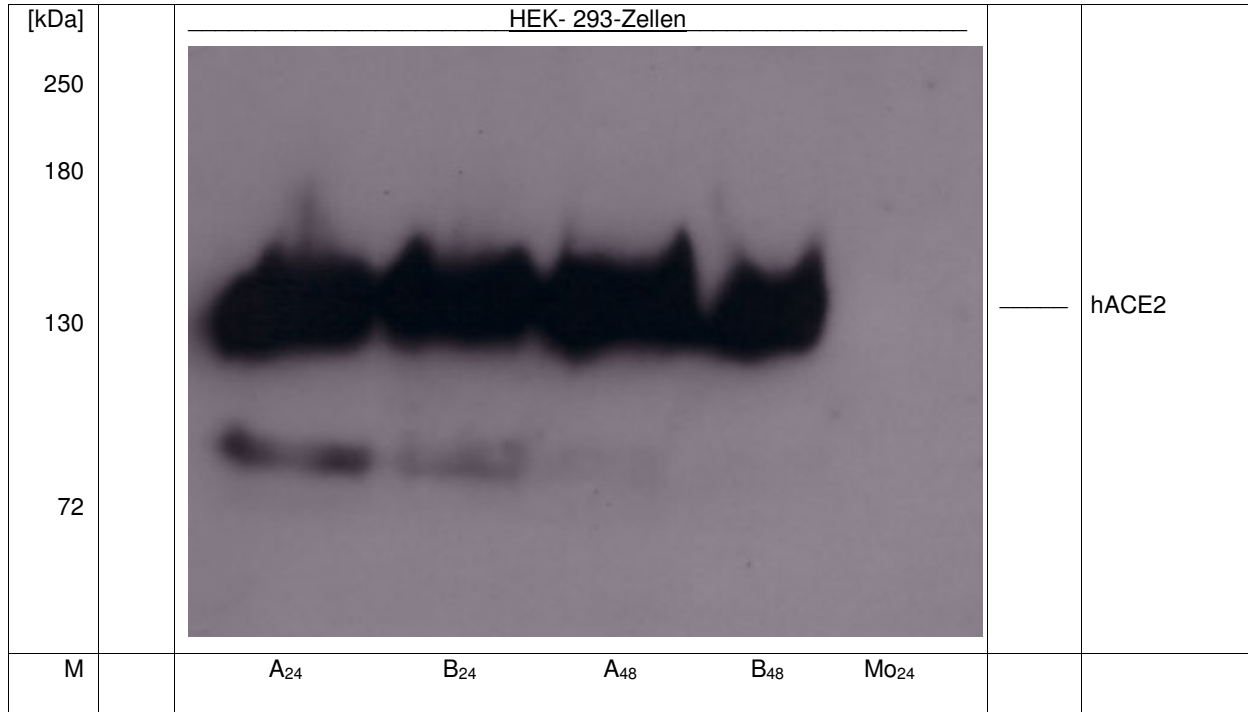


Abbildung 26: Expression des hACE2-Proteins (pcDNA3.1-ACE2) in HEK-293-Zellen

Lyse der Zellen nach 24 und 48 h. A = 1,3 μ g und B = 2,6 μ g Plasmid-DNA. Die Proteingemische wurden mittels SDS-PAGE (7,5%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Das ACE2 Protein wurde mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. (M: Marker; Mo: Mock nach 24 h)

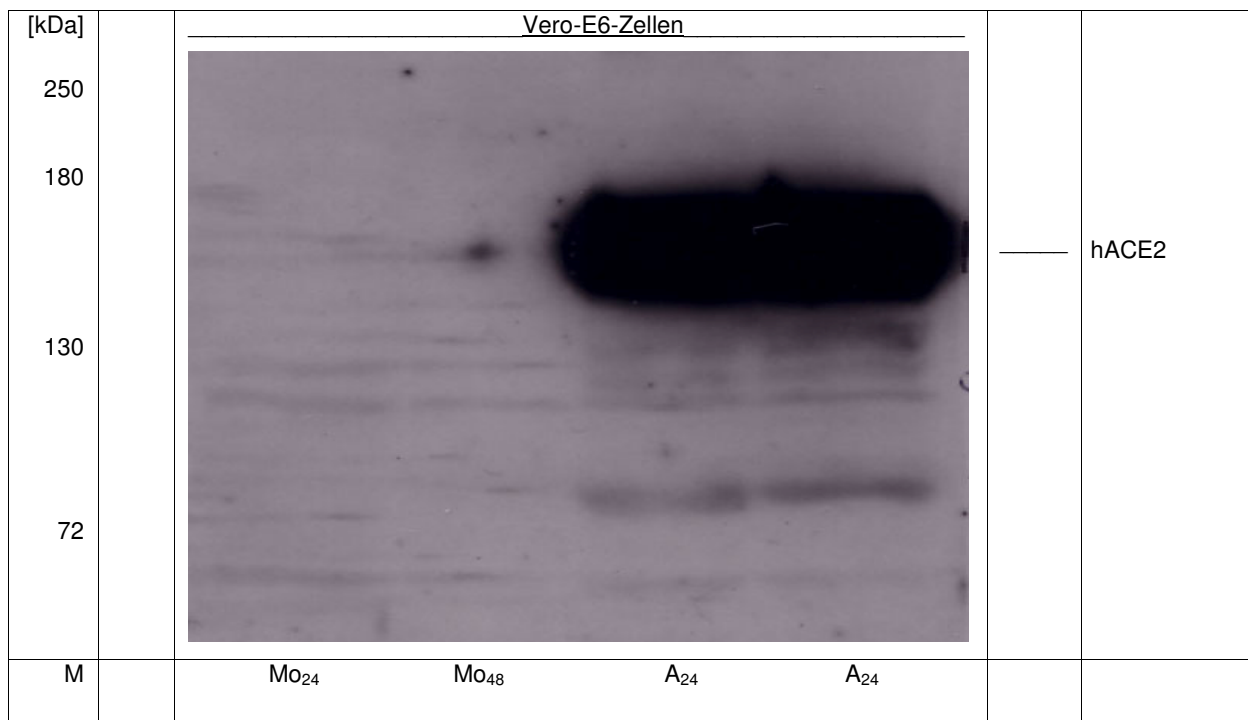


Abbildung 27: Expression des hACE2-Proteins (pcDNA3.1-ACE2) in Vero-E6-Zellen

Lyse der Zellen nach 24 und 48 h. A = 4 µg Plasmid-DNA. Die Proteingemische wurden mittels SDS-PAGE (7,5%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Das ACE2 Protein wurde mit einem monoklonalen Antikörper nachgewiesen. (M: Marker; Mo: Mock nach 24 bzw. 48 h)

5.6 Einfluss der Peptid-Aptamere

5.6.1 Einfluss der Peptid-Aptamere auf die Vitalität der Zellen

Die Toxizitätsdaten für die Peptid-Aptamere wurden mit dem Trypanblau Assay ermittelt (4.4.6). Trypanblau wird in der Mikrobiologie für die Vitalfärbung von Zellen verwendet. Die Substanz wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, abgestorbene Zellen nehmen dagegen den Farbstoff auf und werden dadurch dunkelblau angefärbt. Hier wurden Vero-E6-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (50, 100 und 200 µg/ml) von PA behandelt. Anschließend wurden die Proben in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt und der prozentuale Anteil blau gefärbter (toter) Zellen bestimmt. Dieses Experiment wurde im 3-fach-Ansatz durchgeführt. Sowohl nicht-behandelte Zellen als auch der NaAc-Puffer wurden als Kontrolle des Vitalitätstests in normalen Konditionen verwendet. Die Ergebnisse werden in Abbildung 28 dargestellt. Es wurde für keine der getesteten PA-Konzentrationen Toxizität festgestellt.

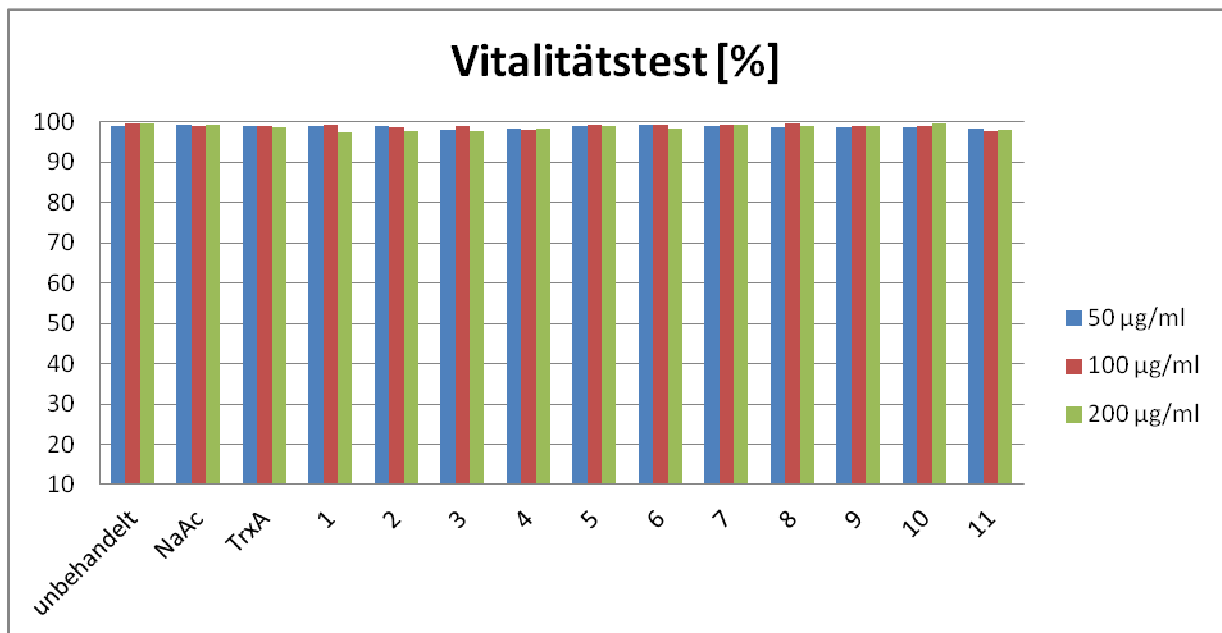


Abbildung 28: Ergebnisse der Vitalitätstests in Vero-E6-Zellen

Nach der Behandlung mit 3 Konzentrationen (50, 100 und 200 µg/ml) der PA nach Anwendung des Programms „GraphPad Prism“ in Prozent dargestellt

5.6.2 Synzytien-Entwicklung in HEK-293-Zellen

Zur Bestätigung der Bindung zwischen ACE2 und dem S-Protein des SARS-CoV und zur weiteren Analyse der Wirkung der Peptid-Aptamere wurde ein Zell-Zell-Fusionstest etabliert, mit dem die bei der Interaktion entstehenden Synzytien (Li *et al.*, 2003) nachgewiesen werden sollen (4.4.7).

Bei diesem Test wurden die in dieser Arbeit beschriebenen HEK-293-Zellen verwendet, die sowohl das SARS-CoV-S Δ 19-Protein als auch den Rezeptor ACE2 transient exprimieren. Diese wurden im Verhältnis 1:1 (HEK-S-Protein : HEK-ACE2) in einer 6 cm Schale gemischt und kultiviert, bis die Entwicklung von Synzytien nachweisbar war.

Um die Entwicklung der Synzytien besser erkennen zu können, wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der an zelluläre DNA bindet, gefärbt. Es entstehen dabei stark fluoreszierende Zellkerne, das Zytoplasma fluoresziert hingegen nur sehr schwach. Die Dokumentation erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 29).

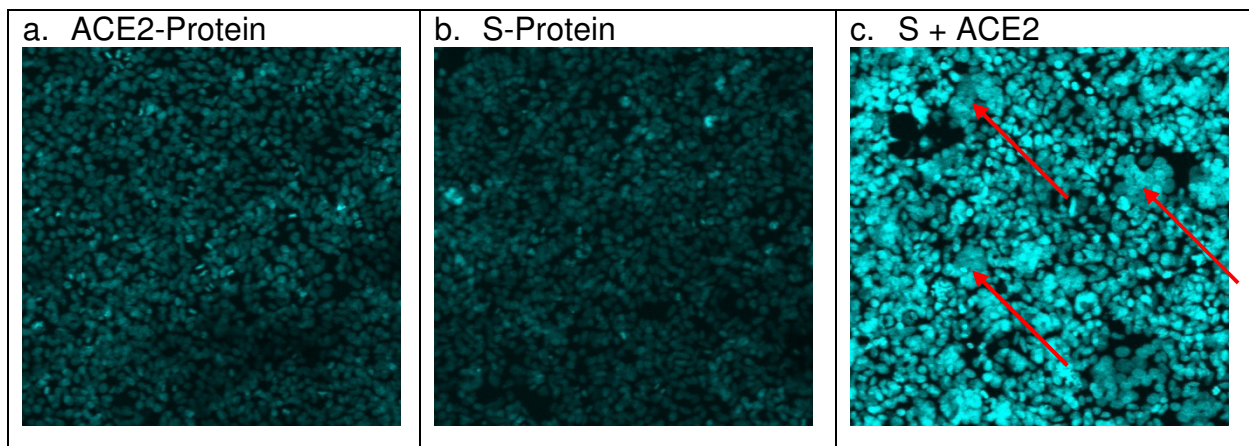


Abbildung 29: Entwicklung der Synzytien zwischen S-Protein- und ACE2-exprimierenden HEK-293-Zellen

Es wird die Entwicklung innerhalb der ersten 24 h bei 800.000 Zellen in 24-Well-Platten gezeigt. Ein Teil der HEK-293-Zellen wurde mit pcDNA3.1-ACE2, der andere Teil mit pHCMV-SARS-CoV-SΔ19 transfiziert. Die beiden Gruppen wurden anschließend im gleichen Verhältnis (Ratio 1:1) gemischt. a) zeigt die mit ACE2, b) die mit S-Protein transfizierten HEK-Zellen, c) zeigt die Entwicklung von Synzytien.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl im Falle der Zellen, die nur ACE2 oder SARS-CoV-S-Proteine exprimieren, keine Bildung von Synzytien zu beobachten ist. Liegt jedoch eine Mischung der beiden Zellkulturen in gleicher Ratio vor, kann man die Entwicklung von Synzytien unter dem Mikroskop feststellen. Dies zeigt, dass mit diesem Assay in weiteren Experimenten der Einfluss der PA auf die Interaktion von ACE2 und S-Protein untersucht werden kann.

5.6.3 Hemmung der Synzytien-Entwicklung in HEK-293-Zellen mittels PA

Zur Untersuchung des Einflusses der Peptid-Aptamere auf die Zell-Zell-Fusion (4.4.7) wurden die S-Protein exprimierenden HEK-293-Zellen mit den Peptid-Aptameren (100 µg/ml) behandelt und eine Stunde später im Verhältnis 1:1 mit den ACE2-exprimierenden HEK-293-Zellen gemischt. Das Gemisch wurde im ersten Ansatz für 48 Stunde, im zweiten Ansatz für 24 Stunde kultiviert. Anschließend wurden die Zellen jeweils fixiert, DAPI gefärbt und fotografiert. Die Ergebnisse sind bei beiden Ansätzen als identisch anzusehen. Als Beispiele werden Behandlungen mit PA1, PA2, PA3, PA9 und PA10 gezeigt (Abbildungen 30-32).

Die Auszählung der Synzytien erfolgte im Dreifach-Ansatz in je acht Bildausschnitten, und das Ergebnis wurde graphisch dargestellt (Abbildung 33). Es konnte nur für PA1 ein deutlicher Rückgang der Synzytienbildung festgestellt werden.

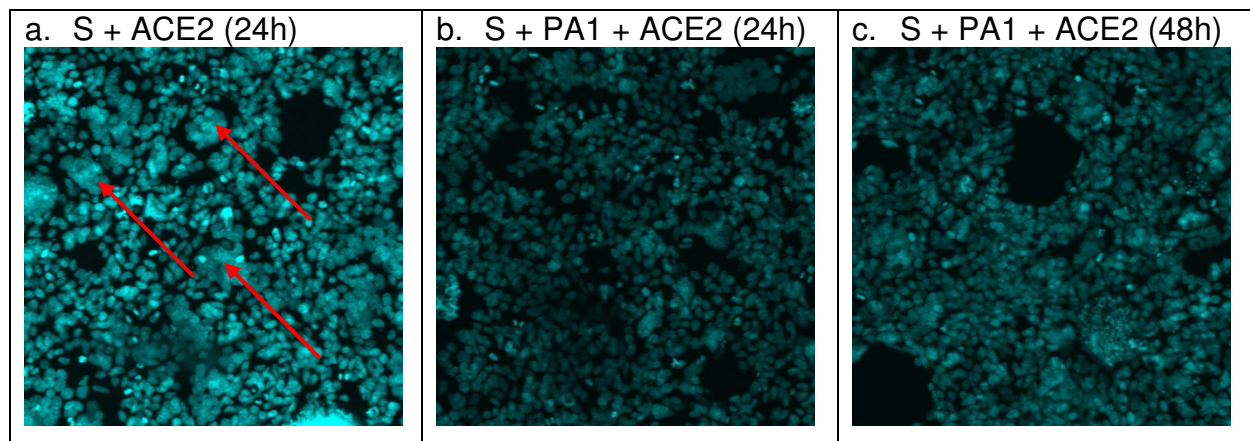


Abbildung 30: Hemmung der Entwicklung von Synzytium zwischen S-Protein und ACE2

800.000 Zellen in 24-Well-Platten. Ein Teil der HEK-293-Zellen wurde mit pcDNA3.1-ACE2, der andere Teil mit pHCMV-SARS-CoV-SΔ19 transfiziert. Die beiden Gruppen wurden im gleichen Verhältnis (Ratio 1:1) gemischt. a) Synzytium (Kontrolle), b) und c) zeigen die gehemmte Entwicklung der Synzytium (nach Behandlung von S1 mit PA).

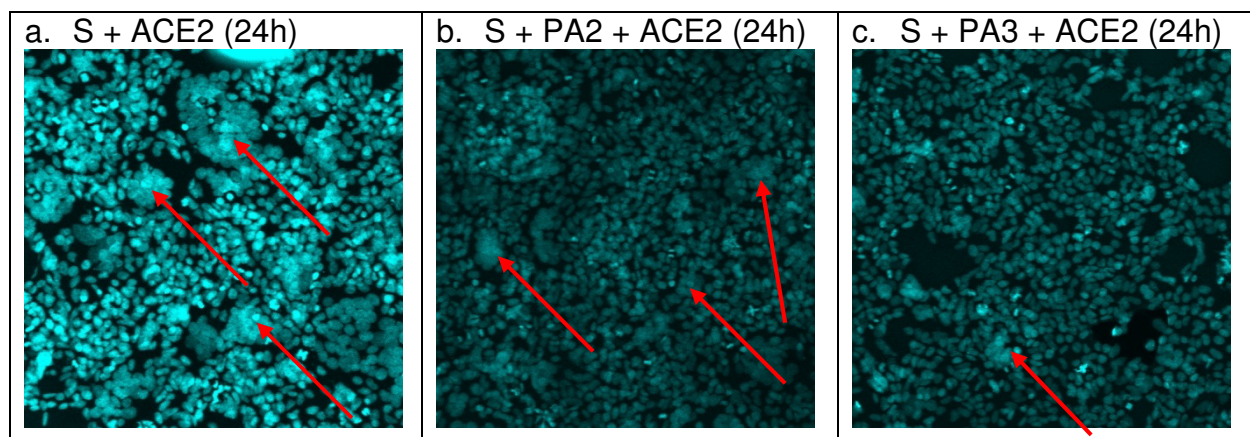


Abbildung 31: Hemmung der Entwicklung von Synzytium zwischen S-Protein und ACE2

800.000 Zellen in 24-Well-Platten. Ein Teil der HEK-293-Zellen wurde mit pcDNA3.1-ACE2, der andere Teil mit pHCMV-SARS-CoV-SΔ19 transfiziert. Die beiden Gruppen wurden im gleichen Verhältnis (Ratio 1:1) gemischt. a) Synzytium (Kontrolle), b) Behandlung mit PA2 und c) Behandlung mit PA3.

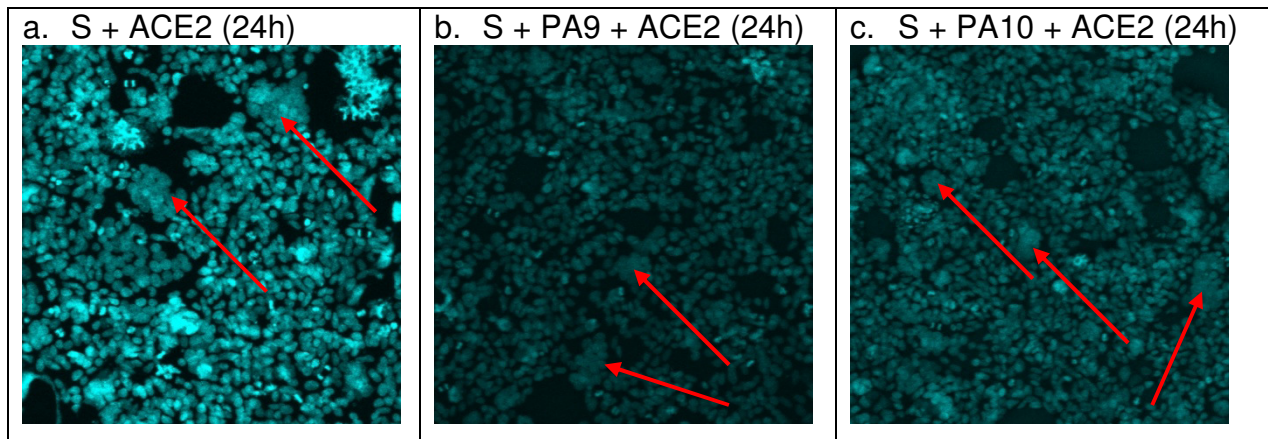


Abbildung 32: Hemmung der Entwicklung von Synzytien zwischen S-Protein und ACE2

800.000 Zellen in 24-Well-Platten. Ein Teil der HEK-293-Zellen wurde mit pcDNA3.1-ACE2, der andere Teil mit pHCMV-SARS-CoV-SΔ19 transfiziert. Die beiden Gruppen wurden im gleichen Verhältnis (Ratio 1:1) gemischt. a) Synzytien (Kontrolle), b) Behandlung mit PA9 und c) Behandlung mit PA10.

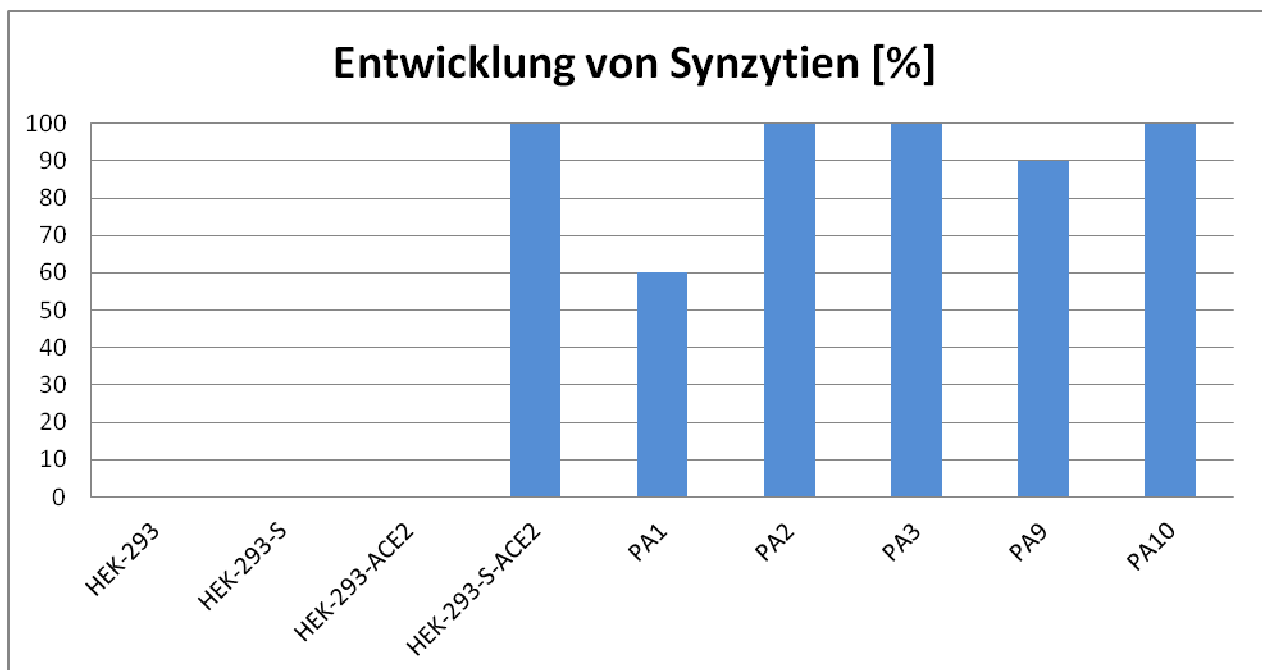


Abbildung 33: Ergebnisse der Auszählung der Synzytien [%]

Die ersten 3 Balken zeigen die Ergebnisse der Negativkontrollen, Balken 4 die Entwicklung von Synzytien bei Kokultivierung von Zellen, die den ACE2-Rezeptor bzw. das S-Protein exprimieren. Dieser Wert wird als 100% dargestellt (Positivkontrolle). Die restlichen Balken zeigen die Ergebnisse nach Behandlung mit verschiedenen Peptid-Aptameren im prozentualen Verhältnis zur Positivkontrolle.

Bei der Behandlung der Zellkulturen mit den verschiedenen Peptid-Aptameren ergab sich für PA1 sowohl bei der einfachen Betrachtung als auch bei der Auszählung der Synzytien in je acht Bildausschnitten im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine eindeutig inhibitorische Wirkung von etwa 40% auf die Zell-Zell-Fusion. Bei den restlichen 10 Peptid-Aptameren war keine Wirkung feststellbar.

5.7 Inhibition der SARS-CoV-Infektion durch PA-Behandlung

Die letztendlich entscheidende Frage war jedoch, ob durch die Behandlung mit S-bindenden PA die Infektion mit SARS-CoV-2 inhibiert werden kann. Hierbei wurden die Vero-E6-Zellen, die den Rezeptor ACE2 exprimieren und eine geeignete Wirtszelle für das SARS-CoV-2 darstellen, ausgesät und mit dem Virus infiziert. Direkt vor der Infektion wurde das Virus mit 100 µg/ml Peptid-Aptamer-Lösung inkubiert. Nach 16 Stunden wurde der Infektionsüberstand abgenommen und der Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt.

Nach der Überschichtung mit einem Methylcellulose-Medium wurden die Zellen 3 Tage stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit einer Kristallviolett-Lösung überschichtet. Das Auftreten von Löchern (Plaques) im Zellrasen zeigt eine Infektion der Zelle. Insbesondere bei der Infektion mit einer Virusverdünnung von 10^{-5} und 10^{-6} sind diese Löcher gut zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Die Plaques wurden makroskopisch ausgezählt (Abbildung 34).

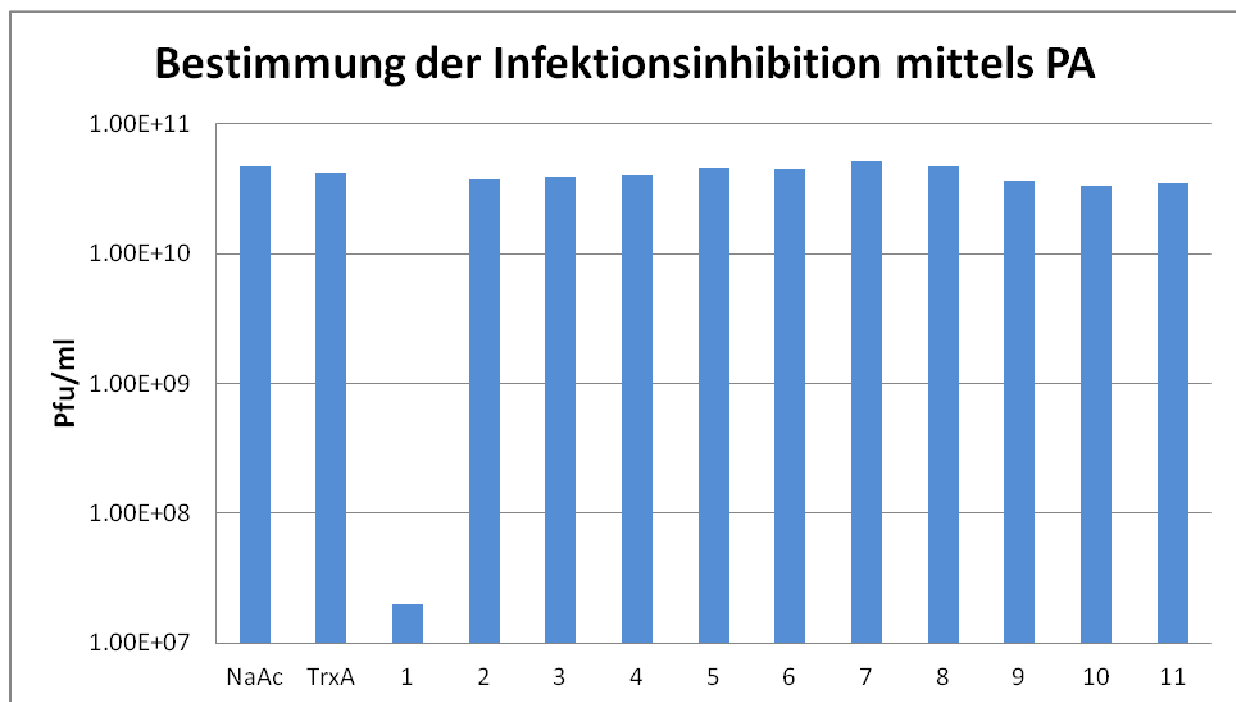


Abbildung 34: Titer des SARS-CoV nach der Behandlung mit PA

Vero-E6-Zellen wurden mit SARS-CoV infiziert, welches vorher mit PA inkubiert wurde. Als Kontrollen wurden TrxA, unbehandeltes Virus und Virus mit gleichem Volumen Dialysepuffer verwendet. 1-11 sind die entsprechenden Peptid-Aptamere. 15 Stunden nach Beginn der Infektion wurden die Zellüberstände gesammelt und die Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt.

Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass zumindest mit einem der elf selektionierten PA die Infektion von Vero-E6-Zellen mit SARS-CoV inhibiert werden kann.

6 DISKUSSION

Im Jahr 2002 wurde in der chinesischen Provinz Guangdong eine neue Form einer infektiösen Lungenentzündung erkannt, die in der Folge als SARS bezeichnet wurde. Untersuchungen führten zur Identifizierung eines neuen Coronavirus (CoV) als Auslöser der Krankheit, der daraufhin als SARS-CoV bezeichnet wurde. Nach Wirtswechsel vom Tier auf den Menschen und einer exponentiell wachsenden Verbreitung war das Virus für die erste Pandemie des 21. Jahrhundert verantwortlich (Hörmansdorfer *et al.*, 2008). Mit einer Mortalität von bis zu 10% (Drosten *et al.*, 2003) zeigte das Virus dabei ein besonders großes Gefährdungspotential.

Da bis heute keine spezifische Behandlung gegen eine Infektion mit dem SARS-CoV entwickelt wurde, sollte ein alternativer Weg zu der rein symptomatischen Behandlung bzw. der Behandlung aufgrund empirischer Erkenntnisse gefunden werden. Dazu wurden in einer Auswahl von Peptid-Aptameren diejenigen identifiziert, die eine gezielte Bindung an die Rezeptorbindedomäne des S1-Proteins aufweisen und so eine Bindung zwischen ACE2 und dem S-Protein verhindern können. Die so erlangte Unterbindung des Viruseintritts in die Zelle könnte in Zukunft therapeutisch zur Reduzierung der Infektion genutzt werden.

Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass durch eine Hemmung der Bindung von S an den zellulären Rezeptor der Eintritt des Virus in die Zelle verhindert werden kann. So konnte die Gruppe um Ho (Ho *et al.*, 2005) für kleine Peptide einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Bindung zwischen S und ACE2 nachweisen. Die Ergebnisse zeigten auch, dass die gefundenen Peptide an unterschiedliche Regionen des S-Proteins binden (AS 192-203, AS 483-494 bzw. AS 660-671) und deren Wirkung Dosis-abhängig ist. Dabei befindet sich lediglich der mittlere Bereich (AS 483-494) in der bisher durch mehrere Studien als RBD indentifizierten Region, wie durch die Gruppe um Xiao (Xiao *et al.*, 2003), die die RBD bei AS 203-537 definieren, die Gruppe um Wong (Wong *et al.*, 2004), die diesen Bereich auf AS 318-510 eingeschränkt sehen oder auch die Gruppe um Babcock (Babcock *et al.*, 2004), die die Region AS 270-510 benennen. Die Peptide, die bei AS 192-203 bzw. AS 660-671 Bindungen eingingen, spielten vermutlich keine aktive Rolle bei dem Vorgang der Bindung von S an ACE2. Stattdessen könnte durch die Peptid-Bindung an S der der Bindung von ACE2 und S folgende Fusionsprozess von Wirtszelle und Virus oder die korrekte Faltung und Gesamtkonformation des S-Proteins verhindert worden sein.

Auch Guo *et al.* (2009) haben die inhibitorische Wirkung einer ausgewählten Anzahl an Peptiden bei der Interaktion mit S untersucht und für eines dieser Peptide einen Dosis-abhängigen inhibitorischen Effekt nachgewiesen. Dieses Peptid bindet weder an der RBD noch an HR1 oder HR2 sondern in der Region AS 217-234 des S-Proteins, dort vermutlich an einen unbekanntem Co-Rezeptor.

Die Gruppe um Lu hatte zwei Peptide, Derivate des S-Proteins des SARS-CoV, identifizieren können, die eine besonders spezifische Bindung an das S-Protein des SARS-CoV aufweisen. Die Bindung wurde nicht wie in dieser Arbeit beschrieben für die RBD (AS 318-510) bestätigt, sondern für die C-terminale Domäne des S1-Proteins (AS 540-559) bzw. die N-terminale Domäne des S2-Proteins (AS 731-753). Es konnte dabei eine signifikante Hemmung der Synzytienbildung nachgewiesen werden. Die Autoren kommen auch zu dem Schluss, dass die beschriebenen Domänen ein neues Ziel für die Entwicklung von Arzneimitteln zur Behandlung von SARS-Infektionen darstellen könnten (Lu *et al.*, 2005).

Andere Strategien setzten bei der Blockierung der Fusion des Virus mit der Zellmembran an. Liu *et al.* (2004) berichten von Peptiden, die an HR2 binden, so den Vorgang der Konformationsumwandlung stören und letztendlich die Infektion unterbinden. Gleiches haben Ni *et al.* (2005) für Peptide nachgewiesen, die an HR1 binden.

Andere antivirale Peptide wie z.B. gegen HIV-1, gp40 des feline Immunodefizienz-Virus oder die Coiled-coil-Domäne des humanen T-Zell-Leukämie-Virus vom Typ-1 zeigen ebenfalls einen inhibitorischen Effekt der viralen Infektion, welcher durch Verhinderung der Fusion der Viruszellen mit der Zielzellmembran erreicht wird (Zheng *et al.*, 2005).

Auch wurde bereits ein Antikörper gegen das S-Protein entwickelt, der gegen AS 1029-1192 in HR2 gerichtet ist und eine signifikante Hemmung von Synzytienbildung bzw. eine effiziente Neutralisierung des SARS-CoV aufweist. (Keng *et al.*, 2005)

In dieser Arbeit wurde für die Selektion von Peptid-Aptameren, die an das S-Protein binden, das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H) gewählt, eine genetische *in vivo* Komplementierungsmethode (Fields *et al.*, 1989; Borghouts *et al.*, 2005), bei der mit dem Zielprotein als *Bait* nach geeigneten Bindungspartnern gesucht wird (Tomai *et al.*, 2006). Dabei wurde als Gerüstprotein Thioredoxin A (TrxA) für die *Prey*-Proteine verwendet, welches die kombinatorischen Peptid-Aptamere (16 Aminosäuren) in seinem aktiven Zentrum präsentiert. Dadurch wird eine stabilere Konformation der Peptid-Aptamere erreicht, was sich auch in einer erhöhten Affinität für die Zielmoleküle sowie einer niedrigeren Immunogenität zeigt

(Klevenz *et al.*, 2002; Gilch *et al.*, 2007). Als Negativkontrolle für die Interaktion wurde TrxA ohne Einbindung eines Peptid-Aptamers genutzt, da es nicht an das *Bait*-Protein bindet. Bei der Klonierung der Peptid-Aptamere in TrxA wurde nur über eine BamHI-Restriktionsstelle ligiert, wodurch nicht nur ein Monomer in dem aktiven Zentrum der TrxA eingefügt wurde sondern auch Duplikationen oder Triplikationen der Peptid-Sequenzen möglich waren. Die Affinität der Peptid-Aptamere wurde hierdurch jedoch nicht unbedingt modifiziert, stattdessen können durch eine Verschiebung des Leserasters der Sequenzen Stopcodon entstehen (Gilch *et al.*, 2007). Eine zukünftige Vermeidung dieser Problematik liegt darin, die Peptid-Aptamere zwischen zwei unterschiedlichen Restriktionsstellen zu ligieren.

Aus dem Y2H-Versuch geht hervor, dass von den zu Anfang über eine Million möglichen Interaktionspartnern aus der cDNA-Bibliothek 180 Klone, welche auf den SD/QDO- α -Galaktosidaseplatten gewachsen waren, für eine weitere Betrachtung in Frage kommen. Alle diese Klone wurden für eine bessere Trennung zweimal erneut ausgestrichen, um falsch positive Klone ausschließen und auf den Besitz des entscheidenden Plasmids selektionieren zu können. Nach dieser Prozedur verblieben noch 55 positive Klone, die nach der Plasmidisolierung und dem analytischen Verdau bzw. der alternativen Amplifikation des Inserts mittels PCR bei jeweils 1%-iger Agarosegel-Elektrophorese auf 37 reduziert werden konnten. Bei den restlichen 18 Klonen wurden keine Banden bzw. solche Banden gesichtet, die nicht mit der zu erwartenden Größe von etwa 380 bp eines Inserts aus dem Komplex von Peptid-Aptamer und TrxA-Protein übereinstimmen. Auch nach einem erneuten Verdau waren bei diesen Proben keine stimmigen Banden sichtbar. Um endgültig auszuschließen, dass ein falscher Verdau vorlag, wurden die Proben zur Sequenzierung gegeben, bei der gezeigt werden konnte, dass in den Plasmiden keine Inserts vorhanden waren.

Damit kann für diese 18 Klone festgehalten werden, dass es bei ihnen zu einer falsch positiven Interaktion gekommen ist, welche im Y2H-System trotz stringenter Konditionen aufgrund von insgesamt 3 Reporter genen möglich sind (Serebriiskii *et al.*, 2000). Daher sollten die im Y2H-Screen erkannten möglichen Bindungspartner in weiteren unabhängigen Methoden auf ihre Interaktion mit S1 untersucht werden.

Eine mögliche Erklärung für falsch positive Interaktionen liegt darin, dass die isolierten Hefeklone verschiedene *Prey*-Plasmide bei der Transformation aufgenommen haben, d.h. *Prey*-Konstrukte mit und ohne Insert. Bei der Rückisolierung des Plasmids wurde dann nur das Plasmid ohne Insert isoliert und sequenziert. Dies ist möglich, wenn die Qualität der Plasmid-Bibliothek nicht besonders hoch ist.

Eine weitere Möglichkeit liegt in einer zufälligen Mutation oder Rekombination im Genom der Hefezellen, wodurch es zu einer verstärkten Expression der Reportergene kommen kann.

Mittels Sequenzierung der 37 verbleibenden Klone wurde die Identität und korrekte Orientierung der Leserahmen überprüft. Bei den Inserts von 20 Klonen zeigten sich Duplikationen oder Triplikationen der Peptid-Aptamere, welche einen *Frameshift* im Leserahmen des Fusionsproteins und dadurch ein ungewolltes Stopcodon verursachten. Aus diesem Grund wurden diese Klone nicht weiter berücksichtigt. Bei dem späteren Peptid-Aptamer 6 lag zwar auch eine Duplizierung der Sequenz vor, allerdings ohne eine Verschiebung des Leserahmens, sodass dieser Klon nicht ausgeschlossen wurde.

Bei den verbliebenen 17 Konstrukten lagen zusätzlich mehrere Wiederholungen der Sequenzen vor. Die als Peptid-Aptamere 5 und 8 bezeichneten Sequenzen konnten jeweils zweimal identifiziert werden, für das spätere Peptid-Aptamer 1 konnten fünf identische Sequenzen gefunden werden. Nach Eliminierung der Wiederholungen blieben damit 11 Klone mit 11 unterschiedlichen Fusionsproteinen übrig (Tabelle 12). Insbesondere für die Fusionsproteine, die in Wiederholungen vorlagen, kann eine besondere Affinität gegenüber dem S1-Protein vermutet werden.

Um die Bindung der Peptid-Aptamere an das S1-Protein genauer untersuchen und die genaue Bindungsstelle identifizieren zu können, wurde im Anschluss eine Eingrenzung der Binderegion vorgenommen. Dies wurde durch ein Mapping der Rezeptorbindedomäne erreicht (Abbildung 21). Hierbei stellte sich heraus, dass zwei der Peptid-Aptamere (PA3 und PA11) außerhalb der Rezeptorbindedomäne an S1 binden, wodurch nur eine geringe Wahrscheinlichkeit besteht, dass diese Peptid-Aptamere eine inhibitorische Wirkung auf die SARS-CoV Infektion besitzen. Für die restlichen PA konnte hingegen eine Bindung innerhalb der Rezeptorbindedomäne ermittelt werden. Für PA1 und PA2 konnte sogar gezeigt werden, dass sie an mehreren Regionen innerhalb der Rezeptorbindedomäne binden. Neben der Bindung an sich erhöht auch gerade das Auftreten der Bindung an unterschiedlichen Regionen innerhalb der Rezeptorbindedomäne die Wahrscheinlichkeit einer Hemmung der Bindung des Virus an das ACE2-Protein.

Für eine bessere Beschreibung der Peptid-Aptamere wurden diese mittels des Blast-Tools von NCBI auf Homologien mit bekannten Gensequenzen geprüft. Dabei konnten jedoch keine Homologien mit bekannten Strukturen aufgezeigt werden, sodass geschlossen werden kann, dass entweder die zugrunde liegende Bibliothek nicht vollständig ist oder, was als wahrscheinlicher erachtet werden kann, die Sequenzen der Peptid-Aptamere so nicht in der Natur vorliegen.

Die weitere Analyse der Peptid-Aptamere zeigte bei allen 11 untersuchten Peptid-Aptameren eine putative β -Faltblatt-Region (Tabelle 12). Diese Struktur ermöglicht durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen eine stabilere Bindung der Peptid-Aptamere an die Rezeptorbindedomäne des S1-Proteins.

Des Weiteren präsentieren die Peptid-Aptamere in großer Anzahl aromatische Aminosäuren, die typischerweise in Regionen höherer Bindungsaktivität vorkommen, wie Tryptophan (Trp, W), Phenylalanin (Phe, F), Tyrosin (Tyr, Y). (Burgoyne and Jackson, 2006; Moreira *et al.*, 2007). Der hohe Prozentsatz aromatischer Aminosäuren in *Hot Spots* zeigt deutlich deren Bedeutung bei Protein-Interaktionen (Moreira *et al.*, 2007).

Dabei spielt Tryptophan aufgrund seiner Größe und aromatischen Struktur eine besonders große Rolle, da es als Wasserstoffdonator und mittels aromatischer π -Interaktionen das Entstehen von Bindungen unterstützt. Es besitzt eine große hydrophobe Oberfläche und kann mäßig starke Wasserstoffbrückenbindungen vor Wasser schützen (Moreira *et al.*, 2007).

Tyrosin besitzt die drittgrößte Erhaltungsneigung auf Bindungsstellen, da es eine hydrophobe Oberfläche und durch seine 4-Hydroxyl-Gruppe sowohl aromatische π -Interaktionen als auch Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann. Es ermöglicht mit einer dreifach höheren Wahrscheinlichkeit als Phenylalanin die Ausbildung von *Hot Spots*, vermutlich wegen der Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Zusätzlich zeigt sich die Aminosäure Arginin (Arg, R), die multiple Interaktionen entwickeln kann wie Strukturen mit bis zu 5 Wasserstoffbrückenbindungen sowie Ionenbindungen mit dem positiv geladenen Guanidinium-Motiv. Andere Aminosäuren wie Leucin, Serin, Threonin oder Valin, die ebenfalls in den Sequenzen vertreten sind, besitzen keine besondere Bedeutung für die Bindungsfähigkeit. Bei der Analyse verschiedener Komplexe konnte gezeigt werden, dass Asparagin und Asparaginsäure gegenüber Glutaminsäure und Glutamin bevorzugt werden, was vermutlich durch Unterschiede in der Konformationsentropie der Seitenketten erklärt werden kann (Moreira *et al.*, 2007).

Aus dem Ergebnis des Y2H-Experiments (Abbildung 21) geht eine Homologie zwischen PA1 und PA2 hervor. Beide binden in identischen Regionen der Rezeptorbindedomäne des SARS-CoV (AS 308-379 sowie AS 450-517). Li *et al.* konnten aufzeigen, dass sich drei der für die Bindung wichtigen Aminosäuren Leu (472), Asn (479) und Thr (487) genau in der zweiten Region befinden. Deshalb werden diese Aminosäuren und diese Region von

entscheidender Bedeutung für die Übertragung des SARS-CoV zwischen verschiedenen Spezies sowie auch für die Übertragung von Mensch zu Mensch gesehen (Li *et al.*, 2005).

Eine genauere Betrachtung des Aufbaus der entscheidenden Sequenzen der beiden PA ergeben sich jedoch auch signifikante Unterschiede. So findet sich in der Struktur von PA1 (PIVVPSFIGIYVLTQA) auch Tyrosin (Y), welche sich oft in der Interaktionsfläche von Proteinen befindet. PA2 (PILVRIATRPQALHIN) hingegen kann diese Aminosäure nicht aufweisen.

Des Weiteren kann auch eine Homologie zwischen PA1 und dem von Ho entwickelten Peptid SP8 (FYTTTGIGYQPY), das Dosis-abhängig die Interaktion zwischen S1-Protein und ACE2-Protein blockiert, gefunden werden (Ho *et al.*, 2005). In beiden Peptid-Aptameren präsentieren sich sowohl Phenylalanin als auch Tyrosin.

Aus dem beschriebenen strukturellen Aufbau sowie der festgestellten Homologien kann hier also bereits vermutet werden, dass insbesondere PA1 eine hohe Bindungsaffinität an das S1-Protein und somit eine hohe Hemmung der Bindung zwischen S-Protein und ACE2-Protein aufweisen wird.

Um später die Wirkung der Peptide in Zellkulturen testen zu können, wurden für die Expression von rekombinanten Proteinen die 11 Peptid-Aptamere in den Vektor pQE30 umklontiert. Die dabei entstehenden Poly-His-Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert und mithilfe einer His-Tag-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dabei besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Überexpression von rekombinanten Proteinen, wobei sich bis zu über 50% dieser Proteine als sphärische Einschlusskörper in *E. coli* akkumulieren können (Baneyx *et al.*, 2004). Um diese Einschlusskörper zu entfernen und die gewünschten Proteine in optimalen Bedingungen vorliegen zu haben, wurde die Proteinlösung mit einem 6 M Urea-Puffer aufgereinigt. Zur Eliminierung des Puffers wurde in NaAc-Puffer dialysiert. Die Dialyse wurde bei saurem pH-Wert durchgeführt, um eine Oxidation und/oder einen Disulfid-Austausch zu minimieren (Andreu *et al.*, 1994) und dadurch eine Präzipitation des Proteins bei der Dialyse zu verhindern.

Die Strategie zu Beginn dieser Arbeit war, die Expression des S-Proteins unter Verwendung des eigens klonierten Vektors pcDNA3.1-S durchzuführen. Hiermit konnte allerdings nur eine schwache Expression in Vero-E6-Zellen erreicht werden. Daher wurde für die Expression stattdessen das Plasmid pHCMV-SARS-CoV-SΔ19 verwendet, bei dem die letzten 19 AS der cytoplasmatischen Domäne des S-Proteins eliminiert wurden. Durch diese Eliminierung

konnte eine deutlich stärkere Expression erreicht werden, vermutlich weil das S-Protein in voller Länge im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird, am C-Terminal gekürzte Mutanten hingegen zur Zelloberfläche gelangen (Giroglou *et al.*, 2004).

Um den inhibitorischen Effekt der 11 Peptide, welche eine spezifische Bindung an das S-Protein aufweisen, auf die Interaktion zwischen S und ACE2 herauszufinden, wurde ein Assay zur Untersuchung der Hemmung der Synzytien-Entwicklung durchgeführt. Dazu wurden in getrennten HEK-293-Zellkulturen sowohl ACE2 als auch das S-Protein in gleicher Ratio exprimiert (Abbildungen 24-27). Nach Kokultivierung kann die Entwicklung von Synzytien beobachtet werden (Li *et al.*, 2003). Dabei konnte für PA1 eine signifikante Hemmung der Synzytien-Entwicklung beobachtet werden, woraus geschlossen werden kann, dass PA1 mit ACE2 um die Bindung an RBD kompetitiert.

Um die Hemmung der Synzytien-Entwicklung zu bestätigen, wurde ein Test zur Infektionsinhibition durchgeführt, bei dem das SARS-CoV vor der Infektion von Vero-E6-Zellen mit 100 µg/ml PA für 30 min inkubiert wurde. Die Konzentration der PA wurde in Abhängigkeit der Ergebnisse aus dem Trypanblau-Assay gewählt, aus denen hervorgeht, dass mindestens bis zu einer Konzentration der PA von 200 µg/ml keine toxische Wirkung auf die Vero-E6-Zellen vorliegt.

Nach der beschriebenen Inkubation wurde die Mischung aus PA und Virus für 1 Stunde auf Vero-E6-Zellen gegeben. Im Anschluss an die Infektion wurden die Vero-E6-Zellen für weitere 15 Stunden mit PA behandelt, um die Verbreitung der Infektion zu verhindern.

Mit der gewählten Peptidkonzentration von 100 µg/ml konnte die Infektion zwar nicht vollständig gehemmt werden, jedoch zeigt sich mit einer Viruskonzentration von ca. 1×10^7 Pfu/ml bei den mit PA1 behandelten Zellen eine Titerreduktion gegenüber unbehandelten Zellen (ca 5×10^{10} Pfu/ml) um den Faktor 5000.

Angesichts dieser Daten erscheinen die Ergebnisse sehr vielversprechend, es müssen aber noch verschiedene Verbesserungen vorgenommen werden. Zum einen sollte die Inkubationszeit von PA und Virus vor der Infektion variiert werden. So wählten bspw. Ho *et al.* (2005) eine Inkubationszeit von 2 Stunden. Andererseits sollte auch untersucht werden, wie sich die Behandlung mit PA in unterschiedlichen Konzentrationen auf die kompetitive Hemmung auswirkt, da auch bis mindestens zu einer Konzentration von 200 µg/ml eine toxische Reaktion ausgeschlossen werden kann. So konnten Guo *et al.* (2009) bereits eine von der Peptid-Konzentration abhängige Inhibition der Infektion mit SARS-CoV nachweisen.

7 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit generierten rekombinanten Peptid-Aptamere haben das Potential, die Infektiosität des SARS-CoV zu beeinträchtigen. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, wie z.B. Versuchsreihen mit unterschiedlichen PA Konzentrationen, um eine mögliche Abhängigkeit der Inhibition von der PA-Dosis zu bestimmen. Des Weiteren sollte getestet werden, ob eine kombinierte Anwendung einzelner Peptid-Aptamere einen additiven oder synergistischen Effekt aufweisen kann. Insbesondere sollte hier eine Kombination von PA1 und PA2 geprüft werden, da beide an derselben Domäne binden. Hierbei kann auf die Arbeit von Coughlin *et al.* verwiesen werden, deren Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern bereits aufgezeigt haben, dass eine Mischung von Antikörpern einen synergistischen Effekt in Bezug auf die Inhibition der SARS-CoV-Infektion in Vergleich mit der Behandlung mit nur einem einzelnen Antikörper haben kann. (Coughlin *et al.*, 2009)

Zusätzlich sollten für ausgewählte Peptid-Aptamere Mutationsstudien durchgeführt werden mit dem Ziel, deren Bindungsaffinität zu verbessern. Hierbei könnte vor allem die Einbindung aromatischer Aminosäuren eine besondere Rolle spielen, da Regionen mit einem erhöhten Prozentsatz an aromatischen Aminosäuren eine hohe Bindungsaktivität aufweisen.

Bestätigen sich die im Zuge dieser Arbeit gefundenen Zusammenhänge auch in den folgenden Experimenten, könnte die Entwicklung eines Medikaments gegen SARS folgen, beginnend mit der präklinischen Phase, bei der der PA-Kandidat an lebenden Tieren getestet wird. Dabei werden verschiedene Parameter untersucht, wie z.B. die Bioverfügbarkeit oder die Reaktion der einzelnen Organe auf die Peptid-Aptamere. Außerdem werden toxische Auswirkungen untersucht, so z.B. mögliche teratogene Auswirkungen der Peptid-Aptamere. Im Anschluss folgen die Phasen I-III bis hin zur Vermarktungsphase.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Ermittlung der Art der Verabreichung bzw. der Einnahme des möglichen Medikaments, mit der eine gezielte lokale oder systemische Wirkung des Medikaments unterstützt wird.

Das Peptid-Aptamer kann beispielsweise durch eine Verpackung in Liposomen oder durch eine chemische Modifikation vor einer Degradation im Organismus geschützt werden.

Eine mögliche Form der Einnahme ist über die Nasenschleimhaut gegeben, welche seit über 40 Jahren für Oligopeptide wie Vasopresin oder Oxytocin genutzt wird. Vorteil hierbei wäre

eine gute Permeabilität kleinerer Moleküle sowie aufgrund der guten Durchblutung der Nasenschleimhäute eine schnelle Abflutung und systematische Bereitstellung des Arzneistoffes. Ein weiterer Vorteil ist das Umgehen einer sofortigen Leberpassage sowie die Abwesenheit gastrointestinaler und pankreatischer Enzyme.

Eine weitere Möglichkeit der Einnahme wäre eine pulmonale Applikation, somit eine gezielt lokale Applikation. Das Peptid-Aptamer könnte hierfür als Aerosol vernebelt und vom Patienten eingeatmet werden.

Literaturverzeichnis

Andreu, D., Albericio, F., Solé, N. A., Munson, M. C., Ferrer, M. and Barany, G. (1994): *Methods in molecular Biology*, **35** (7), 91-169

Babcock, G. J., Eshaki, D. J., Thomas, W. D. Jr. and Ambros, D. (2004): Amino Acids 270 to 510 of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Are Required for Interaction with Receptor. *J. Virol.*, **78** (9), 4552-4560.

Baneyx, F. and Mujacic, M. (2004): Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, **22** (11), 1399-1408.

Beniac, D. R., deVarenes, S. L., Andonov, A., He, R., and Booth, T. F. (2007): Conformational Reorganization of the SARS Coronavirus Spike Following Receptor Binding: Implications for Membrane Fusion. *PLoS ONE*, **2** (10), e1082.

Berger, A., Drosten, C., Doerr, H. W. and Preiser, W. (2004): Das SARS-assoziierte Coronavirus-Die erste Pandemie des 21. Jahrhunderts. *J. Lab. Med.*, **28** (1), 42-55.

Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. M. and Rottier, P. J. M. (2003): The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J. Virol.*, **77** (16), 168801-168811.

Borghouts, C. Kunz, C. and Groner, B. (2005): Current strategies for the development of peptide-based anti-cancer therapeutics. *J. Pept. Sci.*, **11** (11), 713-726.

Borghouts, C., Kunz, C., Delis, N. Goner, B. (2008): Monomeric Recombinant Peptide Aptamers Are Required for Efficient Intracellular Uptake and Target Inhibition. *Mol. Cancer Res.*, **6** (2), 267-281.

Broer, R., Boson, B., Spann, W., Cosset, F-L. and Corver, J. (2006): Important Role for the Transmembrane Domain of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein during Entry. *J. Virol.*, **80** (3), 1302-1310.

Burgis, E. (2005): Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pharmakologie. 3. Auflage, Urban und Fischer Verlag, München-Jena, 540.

Burgoyne, N. J. and Jackson, R. M. (2006): Predicting protein interaction sites: binding hot-spots in protein-protein and protein-ligand interfaces. *Bioinformatics*, **22** (11), 1335-1342.

CDC (2011): Centers for Disease Control and Prevention`s Public Health Library. Online: Quelle: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/281151> (abgerufen am 10. Oktober 2011).

Chan, K. S., Lai, S. T., Chu, C. M., Tsui, E., Tam, C. Y., Wong, M. M., Tse, M. W., Que, T. L., Peiris, J. S., Sung, J., Wong, V. C. and Yuen, K. Y. (2003): Treatment of severe acute respiratory syndrome with lopinavir/ritonavir: a multicentre retrospective matched cohort study. *Hong Kong Med J.*, **9**, 399-406.

Chan-Yeung, M. and Yu, W. C. (2003a): Outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong Special Administrative Region: case report. *B. M. J.*, **326** (7394), 850-852.

Chan-Yeung, M. and Xu, R. H. (2003b): SARS: Epidemiology. *Respiratory*, **8**, 9-14.

Chan, P. K. S., Ip, M., Ng, K. C., Chan, R. C. W., Wu, A., Lee, N., Rainer, T. H., Joynt G. M., Sung, J. J. Y. and Tam, J. S. (2003): Severe Acute Respiratory Syndrome-associated Coronavirus Infection. *Emerging Infectious Diseases*, **9** (11), 1453-1454.

Cheng, V. C. C., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y. and Yuen, K. Y. (2007): Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**, 660-694.

Chiou, H-E., Liu, C-L., Buttrey, M. J., Kuo, H-P., Liu, H-W., Kuo, H-T., and Lu, Y-T. (2005): Adverse Effects of Ribavirin and Outcome in Severe Acute Respiratory Syndrome* Experience in Two Medical Centers. *Chest*, **128**; 263-272.

Chu, C. M., Cheng, V. C. C., Hung, I. F. N., Wong, M. M. L., Chan, K. H., Chan, K. S., Kao, R. Y. T., Poon, L. L. M., Wong, C. L. P., Guan, Y., Peiris J. S. M. and Yuen, K. Y. (2004): Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: initial virological and clinical findings. *Thorax*, **59**, 252-256.

Chu, L. H., Chan, S. H., Tsai, S. N., Wang, Y., Cheng, C. H., Wong, K. B., Wayne, M. M. and Ngai, S. M. (2008): Fusion core structure of the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV): in search of potent SARS-CoV entry inhibitors. *J. Cell Biochem.*, **104** (6), 2335-2347.

Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H. and Doerr, H. W. (2003): Treatment of SARS with human interferons. *Lancet*, **362**, 293-294.

Colas, P., Cohen, B., Jessen, T., Grishina, I., McCoy, J. and Brent, R. (1996): Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, **380**, 548-550.

Colas, P. (2008): The eleven-year switch of peptide aptamers. *J. Biol.*, **7**, 2.

Coughlin, M. M., Babcook, J and Prabhakar, B. S. (2009): Human monoclonal antibodies to SARS-coronavirus inhibit by different mechanisms. *Virology*, **394** (1), 39-46.

Crackower, M. A., Sarao, R., Oudit, G. Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S. E., Oliveira-dos-Santos, A. J., Costa J., Zhang, L., Pei, J., Scholey, J., Ferrario, C. M., Manoukian, A. S., Chappell, M. C., Backx, P. H., Yagil, Y. und Penninger, J. M. (2002): Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, **417**, 822-828.

Day, C. W., Baric, R., Cai, S. X., Frieman, M., Kumaki, Y., Morrey, J. D., Smee, D. F. and Barnard, D. L. (2009): A new mouse-adapted strain of SARS-CoV as a lethal model for evaluating antiviral agents in vitro and in vivo. *Virology*, **395** (2), 210-222.

DeDiego, M. L., Alvarez, E., Almaza F., Rejas, A. M., Lamirande, E., Roberts, R., Shieh, W-J., Zaki, S. R., Subbarao, K. and Enjuanes, L. (2007): A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo. *J. Virol.*, **81** (4), 1701-1713.

Diemer, C., Schneider, M., Seebach, J., Quaas, J., Frösner, G., Schätzl, H. M. Gilch, S. (2007): Cell Type-Specific cleavage of Nucleocapsid Protein by Effector Caspases during SARS Coronavirus Infection. *J. Mol. Biol.*, **376**, 23-34.

Donoghue, D., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E. and Acton S. (2000): A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circulation Research*, **87**, e1-e9.

Du, L., He, Y., Zhou, Y., Liu, S., Zheng, B-J. and Jiang, S. (2009): The spike protein of SARS-CoV a target for vaccine and therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, **7**, 226-236.

Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguiere, A.M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Müller, S., Rickerts, V., Sturmer, M., Vieth, S., Klenk, H. D., Osterhaus, A. D., Schmitz, H., Doerr, H-W. (2003): Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **348** (20), 1967-1976.

Ellington, A. D. and Szostak, J. W. (1990): In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346** (6287), 818-822.

Evans, D., Johnson, S., Laurenson, S., Davies, A. G., Ferrigno, P. K. and Wälti, C. (2008): Electrical protein detection in cell lysates using high-density peptide aptamer microarrays. *J. Biol.*, **7** (3).

Fang, X., Ye, L., Timani, K. A., Li, S., Zen, Y., Zhao, M., Zheng, H. Wu, Z. (2005): Peptide Domain Involved in the Interaction between Membrane Protein and Nucleocapsid Protein of SARS-associated Coronavirus. *J. Biochem. and Mol. Biol.*, **38** (4), 381-385.

Fields, S. and Song, O. (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.

Filippov, A. K., Simon, J., Barnard, E. A. and Brown, D. A. (2010): The Scaffold Protein NHERF2 Determines the Coupling of P2Y1 Nucleotide and mGluR5 Glutamate Receptor to Different Ion Channels in Neurons. *The Journal of Neuroscience*, **30** (33), 11068-11072.

Fourie, A. M., Sambrook, J. F. and Gething, M-J, H. (1994): Common and Divergent Peptide Binding specificities of hsp70 Molecular Chaperones. *J. Bio Chem.*, **269** (48), 30470-30478.

Gao, W., Tamin, A., Soloff, A., Dáiuo, L., Nwanegro, E., Robbins, P. D., Bellini, W. J., Barratt-Boyes, S. and Gambotto, A. (2003): Effects of a SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys. *Lancet*, **362** (9399), 1895-1896.

Gilch, S., Kehler, C., Schätzl, H. M. (2007): Peptide aptamers expressed in the secretory pathway interfere with cellular PrP^{Sc} formation. *J. Mol. Biol.*, **371**, 362-373.

Giroglou, T., Cinatl, J. Jr., Rabenau, H., Drosten, C., Schwalbe, H., Doerr, H. W. and von Laer, D. (2004): Retroviral Vectors Pseudotyped with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus S Protein. *J. Virol.*, **78** (17), 9007-9015.

Gorbalenya, A., Snijder, E. J. Spaan, W. J. M. (2004): Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Phylogeny: toward Consensus. *J. Virol.*, **78** (15), 7863-7866.

Graham, R. L. and Baric, R. S (2010): Recombination, Reservoirs, and the Modular Spike: Mechanisms of Coronavirus Cross-Species Transmission. *J. Virol.*, **84**, 3134-3146.

Groneberg, D. A., Zhang, L., Welte, T., Zabel, P. and Chung, K. F. (2003): Severe acute respiratory syndrome: global initiatives for disease diagnosis. *J. Med.*, **96**, 845-852.

Groneberg, D. A., Hilgenfeld, R. and Zabel, P. (2005): Molecular mechanisms of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Respiratory Research*, **6** (1), 1-16.

Guan, Y., Peiris, J. S. M., Zheng, B., Poon, L. L. M., Chan, K. H., Zeng, F. Y., Chan, C. W. M., Chan, M. N., Chen, J. D., Chow, K. Y. C., Hon, C. C., Hui, K. H., Li, J., Li, V. Y. Y., Wang, Y., Leung, S. W., Yuen, K. Y. and Leung, F. C. (2004): Molecular epidemiology of the novel coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*, **363**, 99-104.

Guo, Y., Tisoncik, J., McReynolds, S., Farzan, M., Prabhakar, B. S., Gallagher, T., Rong, L. and Caffrey, M. (2009): Identification of a New Region of SARS-CoV S Protein Critical for Viral Entry. *J. Mol. Biol.*, **394** (4), 600-605.

Harmer, D., Gilbert, M., Borman, R., and Clark, K. L. (2002): Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett.*, **532**, 107-110.

He, J-F., Peng, G-W., Min, J., Yu, D-W., Lian, W-J., Zhang, S-Y., Xu, R-H., Zheng, H-Y., Wu, X-W., Xu, J., Wang, Z-H., Fang, L., Zhang, X., Li, H., Yan, X-G., Lu, J-H., Hu, Z-H., Huang, J-C., Wan, Z-Y., Hou, J-L., Lin, J-Y., Song, H-D., Wang, S-Y., Zhou, X-J., Zhang, G-W., Gu, B-W., Zheng, H-J., Zhang X-L., He, M., Zheng, K., Wang, B. F., Fu, G., Wang,

X-N., Chen, S-J., Chen, Z., Hao, P., Tang, H., Ren, S-X., Zhong, Y., Guo, Z-M., Liu, Q., M. Y-G., Kong, X-Y., He, W-Z., Li, Y-X., Wu, Ch-l., Zhao G-P., Chiu R. W. K., Chim, S. S. C., Tong, Y-K., Chan, P. K. S., Tam, J. S. and Lo, M. D. (2004): Molecular Evolution of the SARS Coronavirus During the Course of the SARS Epidemic in China. *Science*, **303** (5664), 1666-1669.

Healths (2011): Online: <http://www.human-healths.com/wp-content/uploads/2011/08/SARS-coronavirus5.jpg> (abgerufen am 5. März 2012).

Ho, T-Y., Wu, S-L., Chen, J-C., Wei, Y-C., Cheng, S-E, Chang, Y-H., Liu, H-J. and Hsiang, C-Y. (2005): Design and biological activities of novel inhibitory peptides for SARS-CoV spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Research*, **69** (2), 70-76.

Hochuli, E., Döbeli, H. and Schacher, A. (1987): New metal chelate adsorbents selective for proteins and peptide containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatography*, **411**,177-184.

Hörmansdorfer, S., Campe, H. und Sing, A. (2008): SARS - Pandemie und Emerging Disease. *J. Verbr. Lebensm.*, **3**, 417-420.

Hofmann, H., Hattermann, K., Marzi, A., Gramberg, T., Geier, M., Krumbiegel, M., Kuate, S., Überla, K., Niedrig, M. and Pöhlmann S. (2004): S Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Mediates Entry into Hepatoma Cell Lines and Is Targeted by Neutralizing Antibodies in Infected Patients. *J. Virol.*, **78** (12), 6134-6142.

Holmes K. V. (2003): SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J. Clin. Invest.*, **111**, 1605-1609.

Holmes, K. V. (2005): Adaptation of SARS Coronavirus to Humanes. *Science*, **309**, 1822-1823.

Hoppe-Seyler, F., Crnkovic-Mertens, I., Tomai, E. and Butz, K. (2004): Peptide Aptamers: Specific Inhibitors of Protein Function. *Current Molecular Medicine*, **4**, 529-538.

Hu, Z. and Shi, Z. (2008): Investigation of Animal Reservoir (s) of SARS-CoV. *Emerging Infections in Asia*, 57-77.

Hui, D. S. C., Chan, M. C. H., Wu, A. K. and Ng, P. C. (2004): Severe acute respiratory syndrome (SARS): epidemiology and clinical features. *Postgrad Med. J.*, **80**, 373-381.

Imai, Y., Kuba, K. and Penninger, J. M. (2007): Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Cell Mol. Life Sci.*, **64**, 2006-2012.

Jarvis, B. W. (2001): Scaffold proteins in mammalian JNK signaling. *Cell notes issues*, **1**, 1-3.

Jeffers, S. A., Tusell, S. M., Gillim-Ross, L., Hemmila, E. M., Achenbach, J. E., Babcock G. J., Thomas, W. D. Jr., Thackray, L. B., Young, M. D., Mason, R. J., Ambrosino, D. M., Wentworth, D. E., DeMartini, J. C., Holmes, K. V. (2004): CD290L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 15748-15753.

Jia, H. P., Look, D. C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., Farzan, M., Wohlford-Lenane, C., Perlman, S. and McCray, P. B. Jr. (2005): ACE2 Receptor Expression and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Depend on Differentiation of Human airway Epithelia. *J. Virol.*, **79** (23), 14614-14621.

Kan, B., Wang, M., Jing, H., Xu, H., Jiang, X., Yan, M., Liang, W., Zheng H., Wan, K., Liu, Q., Cui, B., Xu, Y., Zhang, E., Wang, H., Ye, J., Li, G., Li, M., Cui, Z., Qi, X., Chen, K., Du, L., Gao, K., Zhao, Y-T., Zou X-Z., Feng, Y-J., Gao, Y-F., Hai, R., Yu, D., Guan, Y. and Xu, J. (2005): Molecular Evolution Analysis and Geographic Investigation of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Like Virus in Palm Civets at an Animal Market and on Farms. *J. Virol.*, **79** (18), 11892-11900.

Keng, Ch-T., Zhang, A., Shen, S., Lip, K-M., Fielding, B. C., Tan, T. H. P., Chou, C-F., Loh, Ch-B., Wang, S., Fu, J., Yang, X., Lim, S. G., Hong, W. and Tan, Y-J. (2005): Amino Acids 1055 to 1192 in the S2 Region of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus S Protein Induce Neutralizing Antibodies: Implications for the Development of Vaccines and Antiviral Agents *J. Virol.*, **79**(6), 3289-3296.

Klevenz, B., Butz, K and Hoppe-Seyler, F. (2002): Peptide aptamers: exchange of the thioredoxin-A scaffold by alternative platform proteins and its influence on target protein binding. *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1993-1998.

Kontoyiannis, D. P., Pasqualini, P. and Arap, W. (2003): Aminopeptidase N inhibitors and SARS. *Lancet*, **361**, 1558.

Koren, G., King, S., Knowles, S. and Phillips, E. (2003): Ribavirin in the treatment of SARS: A new trick for an old drug?. *CMAJ*, **168** (10), 1289-1292.

Krueger, D. K., Kelly, S. M., Lewicki, D. N., Ruffolo, R. and Gallagher, T. M. (2001): Variations in Disparate Regions of the Murine Coronavirus Spike Protein Impact the Initiation of Membrane Fusion. *J. Virol.*, **75** (6), 2792-2802.

Ksiazek, T. G., Erdmann, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guaner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fielda, B., DeRisi, J., Yang, J. Y., Cox, N., Hughes, J. M., LeDuc, J. W., Bellini, W. J., Anderson, L. J.; SARS Working Group (2003): A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome; *N. Engl. J. Med.*, **15**, 348 (20), 1953-1966.

Kuba, K., I, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., Bao, L., Zhang, B., Liu, G., Wang, Z., Chappell, M., Liu, Y., Zheng, D., Liebbrandt, A., Wada, T., Slutsky, A. S., Liu, D., Qin, C., Jiang, C. and Penninger, J. (2005): A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS Coronavirus-induced lung injury. *Nature Medicine*, **11** (8), 875-879.

Kuiken, T., Fouchier, R. A. M., Schutten, M., Rimmelzwaan, G. F., Van Amerongen, G., Debby, R., Laman, J. D., Van Doornum T. J. G., Lim, W., Ling, A. E., Chan, P. K. S., Tam, J. S., Zambon, M. C., Gopal, R., Drosten, C., Van der Werf, S., Escriou, N., Manuguerra, J-C., Stöhr, K., Peiris, J. S. M., Osterhaus, A. D. M. E. (2003): Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*, **362**, 263-270.

Kumar, J. K., Tabor, S. and Richardson, C. C. (2003): Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in Escherichia coli. *The National Academy of Sciences of the USA*. **101** (11), 3759-3764.

Kuo, L. and Masters P. S. (2003): The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J. Virol.*, **77**, 4597-4608.

Lachance, C., Arbour, N., Cashman, N. R. and Talbot, P. J. (1998): Involvement of Aminopeptidase N (CD13) in Infection of Human Neural Cells by Human Coronavirus 229E. *J. Virol.*, **72** (8), 6511-6519.

Li, W., M. J. Moore, N. Vasilieva, J. Sui, S. K. Wong, M. A. Berne, M. Somasundaran, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, T. C. Greenough, H. Choe, and Farzan M. (2003): Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, **426**, 450-454.

Li, A. M. and Ng, P. C. (2005): Severe acute respiratory syndrome (SARS) in neonates and children. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal*, **90**, F461-F465.

Li, W., Wong, S-K., Li, F., Kuhn, J. H., Chuang, I-C., Choe, H. and Farzan, M. (2006): Animal Origins of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus: Insight from ACE2-S-Protein Interactions. *J. Virol.*, **80** (9), 4211-4219.

Loughran, S. T. and Walls, D. (2011): Purification of Poly-Histidine-Tagged Proteins. *Methods Mol Biol*, **881**, 311-335.

Lu, Z., Murray K. S, Van Cleave, V., LaVallie, E. R., Stahl, M. L. and McCoy, J. M. (1995): Expression of thioredoxin random peptide libraries on the Escherichia coli cell surface as functional fusions to flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions. *Bio/Technology. Nature Publishing Company*, **13**, 366-372.

Marra, M. A., Jones, S. J., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y. S., 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. M., Yang, G. S., Plummer, F., Andonov, A., Artsob, H., Bastien, N., Bernard, K., Booth, T. F., Bowness, D., Czub, M., Drebot, M., Fernando, L., Flick, R., Garbutt, M., Gray, M., Grolla, A., Jones, S., Feldmann, H., Meyers, A., Kabani, A., Li, Y., Normand, S., Stroher, U., Tipples, G. A., Tyler, S., Vogrig, R., Ward, D., Watson, B., Brunham, R. C., Kraiden, M., Petric, M., Skowronski, D. M., Upton, C. and Roper, R. L. (2003): The Genome sequence of the SARS-associated Coronavirus. *Science*, **300**, 1399-1404.

Marzi, A., Gramberg, T., Simmons, G., Möller, P., Rennekamp, A. J., Krumbiegel, M., Geier, M., Eisemann, J., Turza, N., Saunier, B., Steinkasserer A., Becker, S., Bates, P., Hofmann, H. and Pöhlmann S. (2004): DC-SIGN and DC-SIGNR Interact with the Glycoprotein of Marburg Virus and the S Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.*, **78** (21), 12090-12095.

Matsuyama, S. and Taguchi, F. (2002): Receptor-Induced Conformational Changes of Murine Coronavirus Spike Protein. *J. Virol.*, **76** (23), 11819-11826.

Matsuyama, S., Ujike, M., Morikawa, S., Tashiro, M. and Taguchi, F. (2005): Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12543-12547.

Mayer, G. and Famulok, M. (2007): Aptamere als Therapeutika und als Werkzeuge zur Wirkstoffsuche. Nukleinsäuren im Drug Discovery Prozess. *Pharmazie in unserer Zeit*, **36** (6), 432-436.

McBride, C. E. and Machamer, C. E. (2010): A Single Tyrosine in the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Membrane Protein Cytoplasmic Tail Is Important for Efficient Interaction with Spike Protein. *J. Virol.*, **84** (4), 1891-1901.

McReynolds, S., Jiang, S., Guo, Y., Celigoy, J., Schar, C., Rong, L. and Caffrey, M. (2008): Characterization of the Prefusion and Transition States of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus S2-HR2. *Biochemistry*, **47** (26), 6802-6808.

Menger, M. (2009): Aptamere-Generierung und Applikation. *GENOMXPRESS* **1.09**, 17-19

Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. und Schätzl, H. (2010a): *Molekulare Virologie*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 247

Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. und Schätzl, H. (2010b): *Molekulare Virologie*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 254-255.

Kayser, O. (2002): *Grundwissen Pharmazeutische Biotechnologie*. 1 Auflage, Teubner Verlag, Stuttgart/Leipzig/Wiesbaden, 118-123

Moore, M. J., Dorfman, T., Li, W., Wong, S. K., Li, Y., Kuhn, J. H., Coderre, J., Vasilieva, N., Han, Z., Greenough, T. C., Farzan, M. and Choe, H. (2004): Retroviruses Pseudotyped

with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Efficiently Infect Cells Expressing Angiotensin-Converting Enzyme 2. *J. Virol.*, **78** (19), 10628-10635.

Moreira, I. S., Fernandes, P. A. and Ramos, M. J. (2007): Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins*, **68**, 803-812.

NCBI (2004): SARS coronavirus Frankfurt 1, complete genome. Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY291315.1> (abgerufen am 22. Oktober 2011).

Nie, Q-H., Luo, X-D. and Hui, W-L. (2003): Advances in clinical diagnosis and treatment of severe acute respiratory syndrome. *World J. Gastroenterol*, **9** (6), 1139-1143.

Novoa, R. R., Calderita, G., Arranz, R., Fontana, J., Granzow, H. and Risco, C. (2005): Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell*, **97**, 147-172.

Nygren, P-A, K. and Skerra, A. (2004): Binding proteins from alternative scaffolds. *Journal of Immunological Methods*, **290**, 3-28.

Peiris, J. S. M., Phil, D., Kwok, Y., Yuen, M. D., Osterhaus, A. D. M. E. and Stöhr, K. (2003a): The Severe Acute Respiratory Syndrome. *N Engl J Med.*, **349**, 2431-41.

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. and Yuen, K. Y. (2003b): Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory. *The Lancet*, **361**, 1319-1325.

Peiris J. S. M., Guan, Y. and Yuen, K. Y. (2004): Severe acute respiratory syndrome. *Nature Medicine*, **10** (12), 88-97.

Preiser, W., Drosten, C. (2003): SARS Reference **10**: 36-37. Online: <http://www.sarsreference.com/sarsref/epidem.htm>.

Preiser, W., Brodt, H., Gottschalk, R., Cinatl, J. and Doerr, W. (2004): SARS-Epidemie. *Forschung Frankfurt*, **2**, 15-21.

Putics, A., Filipowicz, W., Hall, J., Gorbalenya, A. E. and Ziebuhr, J. (2005): ADP-Ribose-1''-Monophosphatase: a Conserved Coronavirus Enzyme That Is Dispensable for Viral Replication in Tissue Culture. *J. Virol.*, **79** (20), 12721-12731.

Rota, P., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Peñaranda, S., Bankamp, B., Mahler, K., Chen, M-H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C. T., Burns, C., Ksiazek, P. E., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, L., McCaustlan, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Günther, S., Osterhaus, A. D. M. E., Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J. and Bellini W. J. (2003): Characterization of a Novel Coronavirus Associated with Severe Acute *Respiratory Syndrome Science*, **5624**, 1394-1399.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988): Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

Sampathkumar, P., Temesgen Z., Smith, T. and Thompson, R. (2003): SARS: Epidemiology, Clinical Presentation, Management, and Infection Control Measures *Mayo Clin Proc.*, **78**, 882-890.

Sawicki, S. G., Sawicki, D. L. and Siddell, S. G. (2007): A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.*, **81**, 20-29.

Schrag, S. J., Brooks, J. T., Van Beneden, C., Parashar, U. D., Griffin, P. M., Anderson, L. J., Bellini, W. J., Benson, R. F., Erdman D. D., Klimov, A., Ksiazek, T. G., Peret, T. C., Talkington, D. F., Thacker, W. L., Tondella, M. L., Sampson, J. S., Hightower, A. W., Nordenberg, D. F., Plikaytis, B. D., Khan, A.S., Rosenstein, N. E., Treadwell, T. A., Whitney, C. G., Fiore, A. E., Durant, T. M., Perz, J. F., Wasley, A., Feikin, D., Herndon, J. L., Bower, W. A., Klibourn, B. W., Levy, D. A., Coronado, V. G., Buffington, J., Dykewicz, C. A., Khabbaz, R. F. and Chamberland, M. E. (2004): SARS surveillance during emergency public health response, United States, March-July 2003. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 185-94.

Serebriiskii, I., Estojak, J., Golemis, B. and Golemis E. A. (2000): Approaches to Detecting False Positives in Yeast Two-Hybrid Systems. *BioTechniques* **28**, 328-336.

Simmons, G., Reeves, J. D., Rennekamp, A. J., Amberg, S. M., Piefer, A. J. and Bates, P. (2004): Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101** (12), 4240-4245.

Skerra, A. (2000): Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **13**, 167-187.

Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L. L., Guan, Y., Rozanov, M., Spann, W. J. M. and Gorbalenya, A. E. (2003): Unique and Conserved Features of Genome and Proteome of SARS-coronavirus, an Early Split-off From the Coronavirus Group 2 Lineage. *J. Mol. Biol.*, **331**, 991-1004.

Spiegel, M., A. Pichlmair, E. Muhlberger, O. Haller, and F. Weber. (2004): The antiviral effect of interferon-beta against SARS-coronavirus is not mediated by MxA protein. *J. Clin Virol.*, **30**, 211-213.

Suggs, S. V., Hirsoe, T., Miyake, T., Kawashima, E. H., Johnson, M. J., Ikatura, K., and Wallace, R. B. (1981): Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of specific cloned DNA sequences. In *D.D. Brown, and C. F. Fox (eds): Developmental biology using purified genes. Academic Press, New York*, 683-693

Sui, J., Li, W., Murakami, A., Tamin, A., Matthews, L. J., Wong, S. K., Moore, M. J., Tallarico, A. St. C., Olurinde, M., Choe, H., Anderson, L. J., Bellini, W. J., Farzan, M. and Marasco, W. A. (2004): Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAb to S1 protein that blocks receptor association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 2536-2541.

Sung, J. J. Y., Wu, A., Joynt, G. M., Yuen, K. Y., Lee, N., Chan, P. K. S., Cockram, C. S., Ahuja, A. T., Yu, L. M., Wong, V. W., Hui, D. S. C. (2004): Severe acute respiratory syndrome: report of treatment and outcome after a major outbreak. *Thorax*, **59**, 414-420.

Surji, M. and Lal, S. K. (2007): The SARS-CoV nucleocapsid protein: A protein with multifarious activities. *Infect. Gen. Evol.*, **358**, 1-9.

Tang, J. W., Cheung, J. L. K., Chu, I., Ip, M., Hui, M., Peiris, M. and Chan P. K. S. (2006): Characterizing 56 complete SARS-CoV S-gene sequences from Hong Kong. *J. of Clin. Virol.*, **38**, 19-26.

Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G. and Turner, A. J. (2000): A Human Homolog of Angiotensin-converting Enzyme. Cloning and Functional Expression as a Captopril Insensitive Carboxypeptidase. *J. of Biol. Chem.*, **275** (43), 33238-33243.

Thiel, V., Ivanov, K., Putics, A., Hertzog, T., Schelle, B., Bayer, S., Weißbrich, B., Snijder, E., Rabenau, H., Doerr, H. W., Gorbalenya, A. E., and Ziebuhr, J. (2003): Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J. Gen. Virol.*, **84**, 2305-2315.

To, K. F., Lo, A. W. I. (2004): Exploring the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS): The tissue distribution of the coronavirus (SARS-CoV) and its putative receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). *J. Pathol.*, **203**, 740-743.

Tomai, E., Butz, K., Lohrey C., von Weizsäcker, F., Zentgraf, H. and Hoppe-Seyler, F. (2006): Peptide-aptamer mediated inhibition of target proteins by sequestration into aggresomes. *J. of Biol. Chem.*, **22** (281), 21345-21352.

Torres, J., K. Parthasarathy, X. Lin, R. Saravanan, and D. X. Liu. (2006): Model of a putative pore: the pentameric {alpha}-helical bundle of SARS coronavirus E protein in lipid bilayers. *Biophys. J.*, **91**, 938-947.

Tripet, B., Howard, M. W., Jobling, M., Holmes, R. K., Holmes, K. V. and Hodges, R. S. (2004): Structural Characterization of the SARS-Coronavirus Spike S Fusion Protein Core. *J. Biol. Chem.*, **279** (20), 20836-20849.

Tyrrell, D. A. J. and Bynoe, M. L. (1965): Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. *British Medical Journal*, **1**, 1467-1470.

Tyrrell, D. A., Almeida, J. D., Cunningham, C. H., Dowdle, W. R., Hofstad, M. S., McIntosh, K., Tajima, M., Zakstelskaya, L. Y., Easterday, B. C., Kapikian, A. and Bingham, R. W. (1975): Coronaviridae. *Intervirology*, **5**, 76-82.

Van Hemert, M. J., van den Worm, S. H. E., Knoops, 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 Pathog.*, **4** (5), 1-10.

Voß, D., Pfefferle, S., Drosten, C., Stevermann, L., Traggiai, E., Lanzavecchia, A. Becker. S. (2009): Studies on membrane topology, N-glycosylation and functionality of SARS-CoV membrane protein. *Virology Journal*, **6** (79), 1-13.

Wang, L. and Eaton, B. (2007): Bats, civets and the emergence of SARS. *Curr Top Microbiol Immunol.*, **315**, 325-344.

Watanabe, R., Matsuyama, S., Shirato, K., Maejima, M., Fukushi, S., Morikawa, S. and Taguchi, F. (2008): Entry from the Cell Surface of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus with Cleaved S Protein as Revealed by Pseudotype Virus Bearing Cleaved S Protein. *J. Virol.*, **82** (23), 11985-11991.

Weiss, S. R. and Navas-Martin, S. (2005): Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiol. and Molec. Biol. Rev.*, **69** (4), 635-664.

WHO (2003a): Dr. Carlo Urbani of the World Health Organization dies of SARS. Online: <http://www.who.int/csr/sars/urbani/en/> (abgerufen am 10. Oktober 2011).

WHO (2003b): Probable cases of SARS by week of onset Worldwide (n=5,910), 1 November 2002-10 July 2003. Online: <http://www.who.int/csr/sars/epicurve/epiindex/en/index1.html> (abgerufen am 10. Oktober 2011).

Wickramasinghe, R. D., Ferrigno, P. K. and Roghi C. (2010): Peptide aptamers as new tools to modulate clathrin-mediated internalisation — inhibition of MT1-MMP internalization. *BMC Cell Biology*, **11**, 58.

Wong, S. K., Li, W., Moore, M. J., Choe, H. and Farzan, M. (2004): A 193-Amino Acid Fragment of the SARS Coronavirus S Protein Efficiently Binds Angiotensin-converting Enzyme 2. *J. Biol. Chem.*, **279** (5), 3197-3201.

Wu, X. D., Shang, B., Yang, R. F., Yu, H., Ma, Z. H., Shen, X., Yong, Y., Lin, Y., Wu, Y. D., Lin, G. M., Gan, X. Q., Yang, S., Jiang, W. H., Dai, E. H., Wang, X. Y., Jiang, H. L., Xie, Y.

H., Zhu, X. L., Pei, G., Li, L., Wu, J. R. and Sun, B. (2004): The spike protein of severe acute respiratory syndrome (SARS) is cleaved in virus infected Vero-E6 cells. *Cell Research*, **14**, 400-406.

Xiao, X., Chakraborti, S., Dimitrov, A. S., Gramatikoff, K. and Dimitrov, D. S. (2003): The SARS-CoV S glycoprotein: expression and functional characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1159-1164.

Xu, W. and Ellington, A. D. (1996): Anti-peptide aptamers recognize amino acid sequence and bind a protein epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7475-7480.

Xu, Y., Lou, Z., Liu, Y., Pang, H., Tien, P., Gao, G. F. and Rao, Z. (2004): Crystal Structure of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Fusion Core. *J. Biol. Chem.*, **279** (47), 49414-49419.

Ye, Y. and Hogue, B. G. (2007): Role of the Coronavirus E Viroporin Protein Transmembrane Domain in Virus Assembly. *J. Virol.*, **81** (7), 3597-3607.

Yeung, K-S., Yamanaka, G. A., Meanwell, N. A. (2006): Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry into Host Cells: Opportunities for Therapeutic Intervention. *Medical Research Reviews*, **26** (4), 414-433.

Yount, B., Roberts, R. S., Sims, A. C., Deming, D., Frieman, M. B., Sparks, J., Denison, M. R., Davis, N. and Baric, R. S. (2005): Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Group-Specific Open Reading Frames Encode Nonessential Functions for Replication in Cell Cultures and Mice. *J. Virol.*, **79** (23), 14909-14922.

Yu, I-M., Oldham, M, L., Zhang, J. and Chen, J. (2006): Crystal Structure of the Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein Dimerization Domain Reveals Evolutionary Linkage between *Corona*- and *Arteriviridae*. *J. Biol. Chem.*, **281** (25), 17134-17139.

Zhai, Y., Sun, F., Li, X., Pang, H., Xu, X., Bartlam, M. and Rao, Z. (2005): Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nature Structural and Molecular biology*, 1-7.

Zhang, M. (2007): Scaffold proteins as dynamic switches. *Nature Chemical Biology*, **3**, 1-3.

Zhao, P., Ke, J-S., Qin, Z-L., Ren, H., Zhao, L-J., Yu, J-G., Gao, J., Zhu, S-Y. and Qi, Z-T. (2004): DNA Vaccine of SARS-Cov S Gene Induces Antibody Response in Mice. *Acta Biochim et Biophysica Sinica*, **36** (1), 37-41.

Zheng, B. J., Guan, Y., Hez, M. L., Sun, H., Du, L., Zheng, Y., Wong, K. L., Chen, H., Chen, Y., Lu, L., Tanner, J. A., Watt, R. M., Niccolai, N., Bernini, A., Spiga, O., Woo, P. C., Kung, H. F., Yuen, K. Y., and Huang, J. D. (2005): Synthetic peptides outside the spike protein heptad repeat regions as potent inhibitors of SARS-associated coronavirus. *Antivir Ther* **10**, 393-403.

Zhi, Y., Wilson, J. M. and Shen, H. (2005) SARS Vaccine: Progress and Challenge. *Cellular & Molecular Immunolog*, **2** (2), 101-105.

Zhong, N. S., Zheng, B. J., Li, Y. M., Poon, L. L. M., Xie, Z. H., Chan, K. H., Li, P. H., Tan, S. Y., Chang, Q., Xie, J. P., Liu, X. Q., Xu, J., Li, D. X., Yuen, K. Y., Peiris, J. S. M. and Guan, Y. (2003): Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February. *The Lancet*, **362**, 1353-1358.

Ziebuhr, J., E. J. Snijder, and A. E. Gorbalenya (2000): Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.*, **81**, 853-879.

Ziebuhr, J. (2004): Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Curr. Opin. Microbiol.*, **7**, 412-419.

Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. H. M. Schätzl für die Möglichkeit, in seinem Labor als Doktorand zu arbeiten, seine wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung.

Frau Dr. Sabine Gilch für ihre hervorragende Betreuung und tolle Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. Dr. J. Bauer für seine freundliche Bereitschaft, die Betreuung meiner Promotion als Doktorvater zu übernehmen.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst sowie der Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Gobierno de Chile, für die Betreuung sowie die Finanzierung meines Stipendiums.

Martha Schneider für ihre unendliche Unterstützung im Labor.

Claudia Diemer und Dr. Max Nunziante für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Belangen.

Kerstin Ackermann für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor.

Allen Mitarbeitern und Kollegen, die mir bei den Laborarbeiten sowie der Anfertigung der schriftlichen Arbeit geholfen haben.

Andreas Weber für die außergewöhnliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft.