

Die Rolle des S-Proteins beim Eintritt des SARS-CoV in Zielzellen

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologe Jörg-Henning Glende

geboren am 27. Januar 1977 in Hannover

2008



Wissenschaftliche Betreuung: Univ.- Prof. Dr. Georg Herrler

Referent: Univ.- Prof. Dr. Georg Herrler

Korreferent: Univ.- Prof. Dr. Hassan Y. Naim

Tag der Disputation: 11. Februar 2008

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 745 durch die DFG gefördert.

Meiner Familie

ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle des S-Proteins beim Eintritt des SARS-CoV in Zielzellen

Das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) ist dem Genus *Coronavirus* innerhalb der Familie *Coronaviridae* zugeordnet und gehört zur Ordnung *Nidovirales*. Das S-Protein in der Virushülle des SARS-CoV ist verantwortlich für die Bindung an den zellulären Rezeptor Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (ACE2) und leitet die Fusion der Virushülle mit zellulären Membranen ein. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Infektion polarer Epithelzellen im Zellkultursystem untersucht, wobei replikationsdefekte Viren der vesikulären Stomatitis (VSV) verwendet wurden, die in der Virushülle das S-Protein des SARS-assoziierten Coronavirus enthalten (VSV-ΔG-S). Die Infektion der etablierten polarisierten Epithelzelllinien Calu-3, Caco-2 und Vero E6 mit den SARS-Pseudoviren wurde bei allen Zelllinien ausschließlich über die apikale Domäne vermittelt, wobei die Effizienz der Infektion bei den Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt war. Die Infektion der humanen Colonkarzinomazelllinie Caco-2 mit VSV-ΔG-S zeigt zudem, dass ein gastrointestinaler Infektionsweg nicht ausgeschlossen werden kann. Die Infektion der unterschiedlichen Zelltypen gibt Aufschluss über den Tropismus von SARS-CoV und demonstriert die Funktionalität der erzeugten Pseudoviren, wodurch ein besseres Verständnis der Pathogenese des SARS-assoziierten Coronavirus erzielt wurde. Als zentrales Ziel dieser Arbeit wurde die Bedeutung des zellulären Cholesterols während der S-vermittelten Infektion durch die SARS-Pseudoviren untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Entzug zellulären Cholesterols durch die Behandlung ACE2-exprimierender Zellen mit Methyl-β-Cyclodextrin zu einer reduzierten Infektion von VSV-ΔG-S führte und die Etablierung eines Zell-basierten Bindungstests zeigt zudem, dass Cholesterol wichtig für die Bindung des S-Proteins an ACE2 ist. In diesem Zusammenhang wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie und biochemische Analyse Triton-X-100-resistenter Membrandomänen festgestellt, dass ACE2 in den cholesterolreichen Domänen oder *lipid rafts* der Plasmamembran lokalisiert ist und die Anreicherung des Rezeptors in diesen Membrandomänen vermutlich notwendig für eine effiziente S-vermittelte Infektion ist. Die Ergebnisse zeigen, dass cholesterolreiche Membrandomänen eine entscheidende Rolle beim Eintritt des SARS-CoV in Zielzellen spielen.

Schlagwörter: SARS-Coronavirus, Angiotensin-konvertierendes Enzym 2, *lipid rafts*

ABSTRACT

The role of S protein during the entry process of SARS-CoV to target cells

The SARS-associated coronavirus (SARS-CoV) is a member of the genus *Coronavirus* within the family *Coronaviridae* and belongs to the order *Nidovirales*. The S protein in the viral envelope is responsible for binding to the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and initiates the fusion of the viral envelope with cellular membranes. In the present study one aim was to analyze the infection of polarized epithelial cells in a cell culture system by using replication-defective *Vesicular stomatitis virus* (VSV) bearing the S protein of SARS-associated coronavirus (VSV- Δ G-S). The infection of the established polarized epithelial cell lines Calu-3, Caco-2, and Vero E6 by SARS-CoV pseudotypes was exclusively mediated via the apical domain for all cell lines. The efficiency of infection varied from cell type to cell type. Moreover, the infection of the human coloncarcinoma cell line Caco-2 indicates that a gastrointestinal infection route cannot be excluded. The infection of the different cell types provides information about the tropism of SARS-CoV and demonstrates the functionality of the generated pseudoviruses. Therefore, this system can be used to get a better understanding of the pathogenesis of SARS-CoV. A pivotal aim of this thesis was the investigation of the importance of cellular cholesterol during the S-mediated infection with SARS pseudoviruses. It was shown that the depletion of cellular cholesterol from ACE2-expressing cells by methyl- β -cyclodextrin treatment results in a decreased infection by VSV- Δ G-S. The establishment of a cell-based binding assay demonstrates that cholesterol is important for the binding of S protein to ACE2. In this context it was shown by confocal microscopy and the analysis of Triton-X-100-resistant membrane domains that ACE2 is localized in cholesterol-enriched domains or lipid rafts in the plasma membrane and that the enrichment of the receptor in these domains is presumably crucial for efficient S-mediated infection. These results demonstrate that cholesterol-enriched membrane domains play an important role during the viral entry process of SARS-CoV.

Keywords: SARS-coronavirus, angiotensin-converting enzyme 2, lipid rafts

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	i
Abstract.....	iii
Inhaltsverzeichnis.....	v
Abbildungsverzeichnis.....	ix
Tabellenverzeichnis.....	x
Abkürzungsverzeichnis.....	xi
1 Einleitung.....	1
1.1 Coronaviren.....	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Virusmorphologie und Genomstruktur	4
1.1.3 Strukturproteine der Coronaviren.....	5
1.1.4 Replikationszyklus.....	10
1.2 Das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV).....	11
1.2.1 SARS: Ätiologie und Pathogenese.....	11
1.2.2 Das SARS-CoV S-Protein.....	13
1.2.3 Zelluläre Rezeptoren des SARS-CoV und Tropismus.....	15
1.3 Das Virus der vesikulären Stomatitis als Pseudovirus.....	16
1.4 Zellpolarität und Viruseintritt	18
1.5 Detergenz-resistente Membranen oder <i>lipid rafts</i>	20
1.5.1 <i>Lipid raft</i> - Konzept	21
1.5.2 Funktionelle Eigenschaften der <i>lipid rafts</i>	23
1.5.3 <i>Lipid rafts</i> und Viruseintritt.....	24
2 Zielsetzung.....	27
3 Material.....	29
3.1 Zelllinien	29
3.2 Viren.....	30
3.3 Bakterien	30

3.4	Plasmide	31
3.5	Antikörper.....	32
3.6	Zellkulturmedien	33
3.7	Bakterienkulturmedien.....	34
3.8	Puffer und Lösungen	35
3.9	Synthetische Oligonukleotide.....	38
3.10	Enzyme	39
3.11	Kits	39
3.12	Substrate	40
3.13	Transfektionsreagenzien	40
3.14	Technische Geräte und Software	40
3.15	Sonstige Reagenzien und Chemikalien.....	40
4	Methoden.....	43
4.1	Zellkultur.....	43
4.1.1	Zellkultur und Zellkulturmedien	43
4.1.2	Kultivierung von Zellen auf mikroporösen Membranfiltereinsätzen.....	43
4.1.3	Anlegen von Gefrierkulturen und Auftauen von Zellen.....	44
4.1.4	DAPI-Test	45
4.1.5	Transfektion eukaryotischer Zellen	45
4.1.6	Erzeugung der BHK-SΔ18-Zelllinie	45
4.2	Virologische Methoden	46
4.2.1	Erzeugung von VSV-ΔG-G	46
4.2.2	Erzeugung von VSV-ΔG-S Pseudoviren	47
4.2.3	IBV Beaudette-US Anzucht	48
4.2.4	Quantifizierung des Virusgehaltes und Nachweis infizierter Zellen	48
4.2.5	Infektionen von Deckglaskulturen und Bestimmung der Infektiösität nach Cyclodextrin- und Cholesterolbehandlung.....	49
4.3	Molekularbiologische Methoden	49
4.3.1	Klonierung von SARS-CoV-SΔ18 in pGene C	49
4.3.2	Reinigung von DNA-Fragmenten	51
4.3.3	Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	52
4.3.4	Agarose Gelelektrophorese	52
4.3.5	Elution von DNA aus Agarosegelen	53
4.3.6	Quantifizierung von DNA	53
4.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten	54

4.4	Mikrobiologische Methoden.....	54
4.4.1	Transformation chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> XL-1 Blue	54
4.4.2	Kolonie-PCR	55
4.4.3	Präparation von Plasmid-DNA	56
4.4.4	DNA-Sequenzierung.....	56
4.5	<i>Lipid rafts</i>	57
4.5.1	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie von ACE2-exprimierenden Verozellen.....	57
4.5.2	Methyl- β -Cyclodextrin-, α -Cyclodextrin- und Cholesterolbehandlung von Verozellen.....	58
4.5.3	Bestimmung des Cholesterolgehalts nach M β CD-Behandlung	58
4.5.4	Bestimmung der Zellviabilität nach M β CD-Behandlung	58
4.5.5	Zell-basierter Bindungstest zur Untersuchung der SARS-CoV-S-Protein-Interaktion mit ACE2.	59
4.5.6	Bindungstest mit löslichem SARS-CoV-S1-IgG Fusionsprotein	60
4.5.7	Kopatchinganalyse von ACE2 in Vero E6-Zellen	61
4.6	Biochemische Methoden	62
4.6.1	Isolierung Detergenz-resistenter Membranen von Vero E6-Zellen.....	62
4.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
4.6.3	Westernblot.....	63
4.6.4	Immunochemische Detektion von Proteinen.....	63
5	Ergebnisse	65
5.1	Eintritt von SARS-CoV-Pseudoviren in polarisierte Epithelzellen	65
5.1.1	Differenzierung von Epithelzellen auf Filtereinsätzen	65
5.1.2	Polarisierter Viruseintritt von SARS-CoV-Pseudoviren in Epithelzellen.....	67
5.2	Die Bedeutung von zellulärem Cholesterol für den SARS-CoV-S-Protein-vermittelten Viruseintritt	69
5.2.1	Untersuchung unterschiedlicher Vero-Zelllinien zur Oberflächenexpression von ACE2 und Empfänglichkeit für SARS-CoV-Pseudoviren	70
5.2.2	Effekt der M β CD-Behandlung auf den Cholesterolgehalt von Vero-Zellen.....	72
5.2.3	Einfluss der M β CD-Behandlung auf die Viabilität von Vero-Zellen	73
5.2.4	Die Infektion mit SARS-CoV-Pseudoviren erfordert Cholesterol in der Zielmembran.....	74
5.2.5	Untersuchungen zu Cholesterol-unabhängigen Effekten der Cyclodextrin-Behandlung	77
5.2.6	Der Effekt des Cholesterolentzugs auf die Infektion mit SARS-CoV-Pseudoviren ist reversibel.	78
5.2.7	Zell-basierter Bindungstest.....	79
5.2.8	Bindungstest mit SARS-CoV-S1-IgG Fusionsprotein.....	82
5.2.9	Kopatchinganalyse durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie	83
5.2.10	Isolierung Detergenz-resistenter Membranen (DRMs) und Analyse der ACE2-Verteilung	87
6	Diskussion.....	89
6.1	Untersuchungen zum SARS-CoV-S-Protein-vermittelten Viruseintritt in polarisierte Epithelzellen.....	89
6.2	Die Bedeutung zellulären Cholesterols für den S-Protein-vermittelten Viruseintritt.....	91

6.3	Bedeutung von cholesterolreichen Membrandomänen für die S-Protein-ACE2-Interaktion	94
6.4	ACE2 und <i>lipid rafts</i>	97
7	Literatur	101
8	Anhang	117
	Sequenzen	117
	Aminosäuren	120
	Lebenslauf	121
	Wissenschaftliche Beiträge	123
	Veröffentlichungen	123
	Kongressbeiträge	123
	Danksagung	125

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES CORONAVIRUSPARTIKELS.	5
ABB. 1-2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES CORONAVIRALEN SPIKE-PROTEINS.	9
ABB. 1-3: DARSTELLUNG DES VSV-GENOMS UND SCHEMA ZUR ERZEUGUNG VON PSEUDOVIREN, DIE DAS SARS-CoV-S-PROTEIN ENTHALTEN.	17
ABB. 1-4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER POLARISIERTEN EPITHELZELLE IM ZELLVERBUND.	19
ABB. 1-5: MODELL DER <i>LIPID RAFTS</i> IN DER ZELLMEMBRAN.	21
ABB. 5-1: TRANSEPITHELIALE ELEKTRISCHE WIDERSTÄNDE VON FILTERKULTUREN VERSCHIEDENER EPITHELZELLEN.	66
ABB. 5-2: INFESTION POLARISierter EPITHELZELLEN MIT SARS-CoV-S-HALTIGEN VSV-ΔG-PSEUDOVIREN.	68
ABB. 5-3: ACE2-EXPRESSION IN UNTERSCHIEDLICHEN ZELLINIEN.	71
ABB. 5-4: EFFEKT DER MβCD-BEHANDLUNG AUF DEN CHOLESTEROLGEGHALT VON VERO CCL-81- UND VERO E6-ZELLEN.	72
ABB. 5-5: EFFEKT DER MβCD-BEHANDLUNG AUF DIE ZELLVIABILITÄT VON VERO CCL-81- UND VERO E6-ZELLEN.	73
ABB. 5-6: EFFEKT DER MβCD-BEHANDLUNG AUF DIE INFESTIÖSITÄT VON VSV-ΔG-G UND TRANSKRIPTION DES VSV-ΔG-GENOMS.	75
ABB. 5-7: EFFEKT DES CHOLESTEROLENTZUGS AUF DIE VIRUSINFESTION.	76
ABB. 5-8: EFFEKT DER ACD-BEHANDLUNG VON VERO CCL-81-ZELLEN AUF DIE INFESTIÖSITÄT DER VSV-PSEUDOVIREN.	77
ABB. 5-9: QUANTIFIZIERUNG DER ACE2-OBERFLÄCHENEXPRESSION NACH MbCD-BEHANDLUNG.	78
ABB. 5-10: EFFEKT DER CHOLESTEROLZUGABE NACH MbCD-BEHANDLUNG AUF DIE INFESTIÖSITÄT DER PSEUDOVIREN.	79
ABB. 5-11: SPEZIFITÄT DES ZELL-BASIERTEN BINDUNGSTESTS.	80
ABB. 5-12: BEDEUTUNG VON CHOLESTEROL FÜR DIE BINDUNG VON BHK-SΔ18-ZELLEN AN VERO E6-ZELLEN.	81
ABB. 5-13: SARS-CoV-S1 INTERAKTION MIT MβCD/CHOLESTEROL-BEHANDELTEN VERO E6-ZELLEN.	83
ABB. 5-14: KOLOKALISATION VON ACE2 MIT DEM <i>RAFT</i> -MARKER GANGLIOSID GM1.	85
ABB. 5-15: KOLOKALISATION VON ACE2 MIT DEM NICHT- <i>RAFT</i> -MARKER TRANSFERRIN-REZEPTOR.	86
ABB. 5-16 ISOLIERUNG DETERGENZ-RESISTENTER MEMBRANEN VON VERO E6-ZELLEN.	88

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1-1: TAXONOMIE DER ORDNUNG <i>NIDOVIRALES</i>	2
TABELLE 1-2: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERTRETER UND SEROLOGISCHE UND PHYLOGENETISCHE VERWANDTSCHAFT DER CORONAVIREN	3
TABELLE 3-1: VERWENDETE ZELLINIEN	29
TABELLE 3-2: VERWENDETE PLASMIDE	31
TABELLE 3-3: PRIMÄRE ANTIKÖRPER.....	32
TABELLE 3-4: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	32
TABELLE 4-1: ZELLKULTURBEDINGUNGEN DER VERWENDETEN ZELLINIEN.....	44
TABELLE 4-2 : THERMOPROFIL FÜR PCR	51
TABELLE 4-3: THERMOPROFIL FÜR KOLONIE-PCR.....	56

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

αCD	α-Cyclodextrin
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
ATCC	„American Tissue Culture Collection“
Aqua bidest.	Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CoV	Coronavirus
CPE	zytopathischer Effekt
C-Terminus	Carboxyterminus
Ctx	Choleratoxin
Cy3	Carbocyanin-3
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DRM	Detergenz-resistente Membranen
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
env	<i>envelope</i>
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
et al.	und andere, (<i>et alli</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm (bezogen auf die Masse) <u>oder</u> Erdbeschleunigung
gag	Gruppen-spezifisches Antigen, (<i>group-specific antigen</i>)
G-Protein	Glykoprotein von VSV
HCoV	Humanes Coronavirus
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
h.p.i.	Stunden nach Infektion (<i>hours post-infection</i>)
IBV	<i>Infektiöses Brionchitisvirus</i>
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAMP-2	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein 2
l	Liter
LB	Luria Bertani
mA	Milliampere

M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
MHV	<i>Maus-Hepatitisvirus</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus
Ω	Ohm
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSM	PBS ohne Calcium und Magnesium
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
p.i.	nach der Infektion (<i>post-infection</i>)
pmol	Picomol
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SARS	schweres akutes Atemwegssyndrom
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFV	<i>Semliki Forest virus</i>
S-Protein	Spike- /Surface-Protein
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
TER	Transepithelialer Widerstand (<i>transepithelial resistance</i>)
TfR	Transferrin-Rezeptor
U	<i>unit</i> , Einheit
V	Volt
VSV	Virus der vesikulären Stomatitis
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1 EINLEITUNG

1.1 Coronaviren

1.1.1 Taxonomie

Das schwere akute Atemwegssyndrom (SARS, *severe acute respiratory syndrome*) ist eine Infektionskrankheit des Menschen, die erstmals im November 2002 in der chinesischen Provinz Guangdong beobachtet wurde. Als ätiologischer Auslöser von SARS wurde ein bis dahin unbekanntes Coronavirus (SARS-CoV) identifiziert und als SARS-assoziiertes Coronavirus (SARS-CoV) bezeichnet (Ksiazek et al., 2003; Drosten et al., 2003; Peiris et al., 2003a und Poutanen et al., 2003).

Das SARS-CoV gehört zur Familie *Coronaviridae*, Genus *Coronavirus*. Diese Virusfamilie wurde 1975 durch das internationale Komitee für Virus-Taxonomie (ICTV) eingeführt (Tyrrell et al., 1975). Humane Coronaviren wurden bereits 1965 bei Erkältungserkrankungen entdeckt. Aufgrund ihrer morphologischen Unterschiede zu anderen Viren, die im Elektronenmikroskop aufgedeckt wurden, konnte eine eigene Virusfamilie definiert werden (Tyrrell et al., 1968). Der Familie *Coronaviridae* werden zwei Genera, *Coronavirus* und *Torovirus*, zugeordnet (Pringle, 1992). Die beiden Genera haben Ähnlichkeiten in der Genomorganisation und Replikationsstrategie, sie unterscheiden sich jedoch in der Gestalt der Virionen und in der Größe ihres Genoms. Die Familien *Coronaviridae* und *Arteriviridae* wurden 1996 durch die ICTV zur Ordnung *Nidovirales* zusammengefasst (Cavanagh, 1997; Enjuanes et al., 2000). Seit 2003 wird auch die Familie *Roniviridae* in die Ordnung *Nidovirales* mit einbezogen (Übersichtsarbeit siehe Gonzalez et al., 2003). Ein Überblick ist in Tabelle 1-1 dargestellt. Die Mitglieder der Ordnung *Nidovirales* enthalten ein einzelsträngiges, unsegmentiertes RNA-Genom, welches in positiver Polarität vorliegt und von einer Membranhülle mit eingelagerten Proteinen umgeben ist.

Tabelle 1-1: Taxonomie der Ordnung *Nidovirales*

Familie	Genus
<i>Coronaviridae</i>	<i>Coronavirus</i> <i>Torovirus</i>
<i>Arteriviridae</i>	<i>Arterivirus</i>
<i>Roniviridae</i>	<i>Okavirus</i>

Die Bezeichnung Nidovirales (lat.: *nidus*; deutsch: Nest) leitet sich von der einzigartigen Replikationsstrategie ab, wodurch diese Ordnung charakterisiert ist. Während des Infektionsverlaufs werden bei der Transkription des Virusgenoms ein 3'-coterminales „nested set“ von subgenomischen mRNAs synthetisiert. Dies erfolgt durch eine diskontinuierliche Synthese der RNA (*template switch*) während der Verlängerung einer negativen Kopie der subgenomischen mRNAs. Von den synthetisierten subgenomischen mRNAs in positiver Orientierung wird nur das jeweilige 5'-Ende translatiert (Übersichtsarbeit siehe Enjuanes et al., 2006).

Coronaviren werden aufgrund phylogenetischer und serologischer Unterschiede in drei Gruppen unterteilt (Gonzalez et al., 2003; Gorbalenya et al., 2004). Bei den Vertretern der Gruppen 1 und 2 handelt es sich um Erreger, die Säugetiere infizieren, bei den Vertretern der Gruppe 3 handelt es sich ausschließlich um aviäre Viren (siehe Tabelle 1-2). Mit der Identifizierung des SARS-CoV wurde die Gruppierung der Coronaviren neu debattiert und die Einteilung des SARS-CoV kontrovers diskutiert. Die ersten phylogenetischen Vergleiche hinsichtlich interner Genomorganisation des SARS-CoV-Genoms mit anderen Coronaviren und die Identifizierung zusätzlicher kleinerer, offener Leserahmen (ORF, *open reading frame*), weisen auf einen Vertreter einer neuen, vierten Coronavirus-Gruppe hin (Marra et al., 2003; Rota et al., 2003). Spezielle phylogenetische Analysen des Replikase-Gens (ORF 1b), welches als der höchst-konservierte Abschnitt des Coronavirus-Genoms gilt (etwa 20 % des Virusgenoms), sprechen eher für eine Unterteilung der Gruppe 2. Dies umfasst die Aufspaltung in die Untergruppe 2A, welche die etablierten Gruppe 2-Coronaviren, wie das Maus-Hepatitisvirus (MHV) und das Bovine Coronavirus

(BCoV) beinhalten, und die Untergruppe 2B mit SARS-CoV als prototypischen Vertreter (Snijder et al., 2003; Gorbalenya et al., 2004). Seit der Identifizierung des SARS-CoV sind viele neuartige Coronaviren von verschiedenen Spezies, inklusive des Menschen, isoliert worden (van der Hoek et al., 2004; Lau et al., 2005; Poon et al., 2005; Woo et al., 2005; Dong et al., 2007).

Tabelle 1-2: Übersicht über die Vertreter und serologische und phylogenetische Verwandtschaft der Coronaviren^a

Gruppe	Speziesname (englisch)	Wirt
1	HCoV-229E (human coronavirus 229E)	Mensch
	HCoV-NL63 (human coronavirus NL93)	Mensch
	TGEV (porcine transmissible gastroenteritis virus)	Schwein
	PRCoV (porcine respiratory coronavirus)	Schwein
	PEDV (porcine epidemic diarrhea virus)	Schwein
	CCoV (canine coronavirus)	Hund
	FCoV (feline coronavirus)	Katze
	FIPV (feline infectious peritonitis virus)	Katze
	RbCoV (rabbit coronavirus)	Kaninchen
2A	HCoV-OC43 (human coronavirus OC43)	Mensch
	HCoV-HKU1 (human coronavirus HKU1)	Mensch
	HECoV (human enteric coronavirus)	Mensch
	HEV (porcine hemagglutinating encephalomyelitis coronavirus)	Schwein
	BCoV (bovine coronavirus)	Rind
	CRCoV (canine respiratory coronavirus)	Hund
	MHV (murine hepatitis virus)	Maus
	RtCoV (rat coronavirus)	Ratte
2B	SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus)	Mensch
	SL-CoV (SARS-like coronavirus)	Zibetkatze
3	IBV (avian infectious bronchitis virus)	Huhn
	TCoV (turkey coronavirus)	Truthahn
	PhCoV (pheasant coronavirus)	Fasan

^aEinige Vertreter wurden bislang nur molekularbiologisch nachgewiesen und nicht als vermehrungsfähige Viren isoliert. Darunter fallen Fledermauscoronaviren, die mit SARS-CoV verwandt sind und solche, die der Gruppe 1-Coronaviren zuzuordnen sind.

Der Nachweis von Viren mit hoher Sequenzhomologie zu SARS-CoV in exotischen Tieren, die auf chinesischen Lebensmittelmärkten oftmals als Delikatessen angeboten werden, deutet auf ein zoonotisches Ereignis, welches während der Entstehung der SARS-Epidemie stattgefunden hat (Guan et al., 2003). Es wird angenommen, dass die Zibetkatze (Familie *Viverridae*, Unterordnung *Fissipedia*), einem engen Verwandten der *Felidae*, als Zwischenwirt diente. Genetische Veränderungen des Virus in der Zibetkatze ermöglichten vermutlich die Übertragungen von Tier-zu-Tier und Mensch-zu-Mensch (Li et al., 2005a; Song et al., 2005). Mit dem Nachweis SARS-ähnlicher Coronaviren (SL-CoV) in chinesischen Hufeisenfledermäusen (*Rhinolophus sinicus*; Familie *Rhinolophidae*, Unterordnung *Microchiroptera*) ist ein natürlicher Wirt des SARS-CoV identifiziert worden. Diese Viren weisen im Vergleich zum SARS-CoV aus dem Menschen und der Zibetkatze eine größere genetische Variabilität auf und bilden ein eindeutiges phylogenetisches Cluster mit dem SARS-CoV in der Gruppe 2B-Coronaviren, die mit den bekannten Gruppe 2-Coronaviren entfernt verwandt sind. Fledermauscoronaviren wurden bislang nur molekularbiologisch nachgewiesen, nicht als vermehrungsfähige Viren. Unter den identifizierten Coronaviren sind auch Vertreter, die mit SARS-CoV nicht verwandt sind, sondern der Gruppe 1-Coronaviren zuzuordnen sind (Lau et al., 2005; Li et al., 2005b).

1.1.2 Virusmorphologie und Genomstruktur

Coronaviren sind behüllte, pleomorphe, meist sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 80-160 nm. Sie tragen charakteristische ca. 20 nm lange keulenförmige Oberflächenprojektionen, die die Viruspartikel im Elektronenmikroskop wie von einem Strahlenkranz (lat. Corona) umgeben erscheinen lassen (Siddell et al., 1983). Abb. 1-1 zeigt eine schematische Darstellung eines Coronaviruspartikels. Die Oberflächenprojektionen, die namensgebend für diese Virusfamilie waren, sind auf das glykosylierte Spike- oder Oberflächen (engl.: surface)-Protein (S-Protein) zurückzuführen, welches in die Virushülle eingebaut ist. Das Nukleokapsid-Protein (N-Protein) bildet zusammen mit der viralen RNA das Nukleokapsid und ist von der Virushülle umgeben. Das Nukleokapsid wurde als helikal beschrieben, allerdings wird auch eine ikosaedrische Form diskutiert (Risco et al., 1996; Lai und Cavanagh, 1997). In die Virusmembran sind neben dem S-Protein noch ein weiteres Glykoprotein – das Membranprotein M (M-Protein), und bei einigen Viren der Gruppe 2, das zusätzliche das Hämagglutinin-Esterase(HE)-Protein eingelagert. Ein weiteres Membranprotein ist das nicht-glykosylierte Membranprotein E (E-Protein), welches in

wesentlich geringerer Menge in der Hülle von Coronaviren vorkommt. (Strukturproteine der Coronaviren siehe 1.1.3). Das positiv-strängige, nicht-segmentierte RNA-Genom hat eine Größe von 27-32 kb und repräsentiert unter den RNA-Viren das bisher größte bekannte Genom. Es enthält einen ungewöhnlich großen offenen Leserahmen, aus dem die RNA-Polymerase und andere nicht-strukturelle Proteine hervorgehen (etwa 20 kb). Das RNA-Genom trägt eine CAP-Struktur und ist polyadenyliert. Die Reihenfolge der Gene, die für die Polymerase (*pol*) und die Strukturproteine kodieren, ist 5'-*pol*-S-E-M'-N-3' und diese Anordnung ist bei allen Coronaviren gleich. Daneben können aber eine Vielzahl von zusätzlichen Genen zwischen dem *pol*- und den Strukturgenen inseriert sein, die für weitere Struktur- und Nichtstrukturproteine mit zum Teil unbekannter Funktion kodieren (Siddell, 1995).

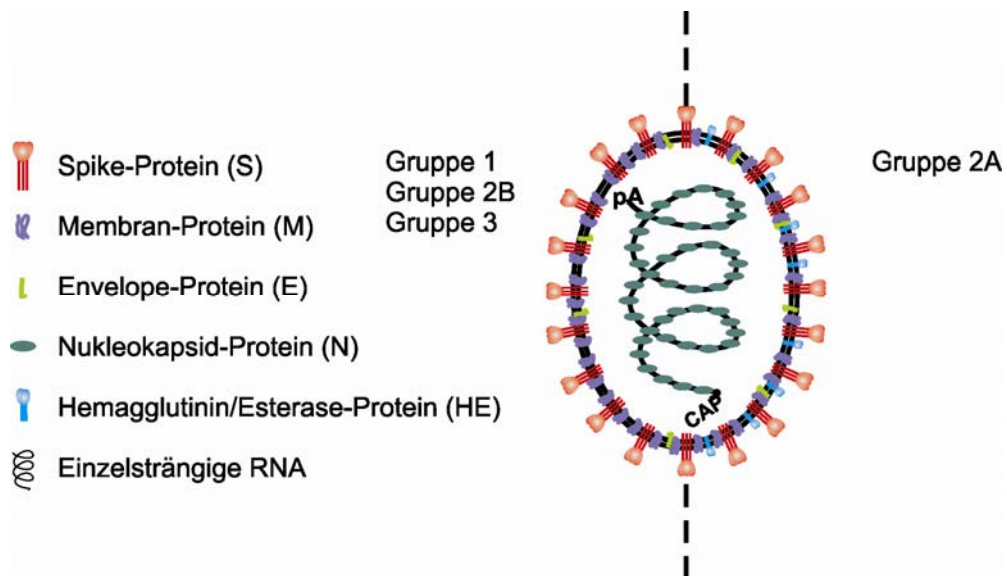


Abb. 1-1: Schematische Darstellung eines Coronaviruspartikels. Die rechte Hälfte stellt ein Viruspartikel der Gruppe 2A dar (siehe Tabelle 1-2), dessen Vertreter als zusätzliches Strukturprotein das HE-Protein besitzen.

1.1.3 Strukturproteine der Coronaviren

Die stark basischen N-Proteine der Coronaviren haben eine Länge von 377-455 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 45-63 kDa. Sie besitzen viele Serine (7-11 %), die posttranslational phosphoryliert werden (Laude und Masters, 1995). Trotz Ähnlichkeiten sind die N-Proteine der unterschiedlichen Coronaviren nur begrenzt homolog

(Lapps et al., 1987). Während des Replikationszyklus der Coronaviren wird das N-Protein in großen Mengen synthetisiert, wo es eine wichtige Rolle während der spezifischen Verpackung des viralen Genoms spielt. Dabei wird das Nukleokapsid mit einem Durchmesser von ~10-15 nm und einer Länge von mehreren 100 nm gebildet, dessen makromolekulare Struktur im Elektronenmikroskop sichtbar wird (de Haan und Rottier, 2005). Biochemische Studien haben gezeigt, dass das N-Protein RNA-bindende Eigenschaften in einem 55 Aminosäurelangen Abschnitt in der N-terminalen Hälfte besitzt und es enthält eine Domäne in der C-terminalen Hälfte des N-Proteins, die für eine Multimerisierung dieses Proteins verantwortlich ist (Nelson et al., 2000; Fan et al., 2005; Yu et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass das N-Protein einzelsträngige RNA unspezifisch binden kann, allerdings weist es eine stärkere Affinität zu viraler RNA auf (Cologna und Hogue, 1998). Die N- und M-Proteine interagieren über ihre Carboxytermini miteinander welches zu einer spezifischen Genom-Enkapsidierung im knospenden Viruspartikel führt (Kuo und Master, 2002). Neben der strukturellen Bedeutung ist das N-Protein bei der viralen RNA-Transkription, Replikation und Modulation des Wirtszellmetabolismus beteiligt. (Baric et al., 1988; Stohlman et al., 1988; Masters, 1992; Almazan et al., 2004; Surjit et al., 2004, 2006). Das N-Protein ist auch ein wichtiger diagnostischer Marker bei einer Coronavirus-Erkrankung und ein starkes Immunogen, welches eine schützende Immunantwort induziert (Leung et al., 2004).

Die M-Proteine der Coronaviren kommen im Viruspartikel in größter Kopienzahl vor und haben ein Molekulargewicht von 20-38 kDa (Übersichtsarbeit s. Rottier, 1995). Das M-Protein trägt entweder N- oder O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide und enthält 44-51 % hydrophobe Aminosäuren. Die Struktur der M-Proteine aller Coronaviren ist durch drei Domänen charakterisiert: Es hat eine kurze N-terminale Ektodomäne, drei Membrandomänen und eine große C-terminale Endodomäne. Das M-Protein ist das zentrale Protein, welches den Virusassembly-Prozess organisiert, in dem es mit sich selbst assoziiert (Klumperman et al., 1994; de Haan et al., 1998, 2000), das S- und HE-Protein zum Einbau in die Virionen bindet (Opstelten et al., 1995; Nguyen und Hogue, 1997) und den Anteil des N-Proteins für die Partikelbildung selektiert, der mit der genomischen Virus-RNA verknüpft ist (Narayanan et al., 2000). Wird das M-Protein nach Infektion in der Zelle exprimiert, wird es als einziges virales Protein nicht bis zur Plasmamembran transportiert, sondern akkumuliert an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und des intermediären Kompartiments. Auch in Einzelexpression wird das M-Protein nur bis zum Cis-Golgi- oder Trans-Golgi-Netzwerk

transportiert (Klumperman et al., 1994; Krijnse-Locker et al., 1994). Koexpressionsstudien mit dem M- und E-Protein haben gezeigt, dass diese zwei Proteine ausreichend sind für die Bildung und Freisetzung von Virus-ähnlichen Partikeln (Bos et al., 1996; Vennema et al., 1996; Kim et al., 1997).

Das E-Protein der Coronaviren ist ein integrales Membranprotein und wurde aufgrund seiner geringen Masse mit einem Molekulargewicht von 9,1-12,4 kDa und seiner geringen Kopienzahl im Viruspartikel, im Verhältnis zu den S-, M- und N-Proteinen, erst spät entdeckt (Siddell, 1995). Alle E-Proteine haben eine gemeinsame Struktur: einen kurzen (7-9 Aminosäuren) hydrophilen N-Terminus, eine lange (21-29 Aminosäuren) hydrophobe Region, gefolgt von einem großen hydrophilen C-Terminus, der etwa die Hälfte bis Zweidrittel der gesamten molekularen Masse des Proteins ausmacht (Liu und Inglis, 1991). Über die Topologie des E-Proteins innerhalb der Virusmembran wird kontrovers diskutiert. Frühere Arbeiten zeigen für IBV eine einfach-umspannende Topologie, mit einem, in das Golgi-Lumen gerichteten, N-Terminus und einem C-Terminus, der in das Zytoplasma gerichtet ist (Corse und Machamer, 2000). Bei MHV gibt es Hinweise, dass das E-Protein die Lipid-Doppelschicht zweimal durchquert, wobei sowohl der N- als auch der C-Terminus in Richtung Zytoplasma zeigt, welches topologisch äquivalent zu der Innenseite der Virusmembran ist (Maeda et al., 2001). Erst kürzlich wurde für das SARS-CoV E-Protein eine kurze palindromische Haarnadelstruktur (12 Aminosäuren), basierend auf *in vitro*-biophysikalischen Untersuchungen, als putative Transmembranaldomäne vorhergesagt, welche bisher einzigartig bei Coronaviren ist (Arbely et al., 2004). Das E-Protein wird posttranslational an Cystein-Resten acyliert (Yu et al., 1994; Corse und Machamer, 2002) und es wurde ebenfalls gezeigt, dass das E-Protein zu Multimeren aggregiert. Weiterhin wird vermutet, dass es bei der Modifizierung der Wirtszellmembran-Permeabilität und Ionene Kanal-Bildung eine Rolle spielt und somit wichtig für die Virusreifung ist (Torres et al., 2006). Die Koexpression von M- und E-Protein ist für die Bildung von Virus-ähnlichen Partikeln notwendig und ausreichend (Vennema et al., 1996). Neuere Untersuchungen an rekombinanten Coronaviren - bei denen das Gen für das E-Protein vollständig deletiert wurde - zeigen, dass das E-Protein entbehrlich für die Virusreifung ist, diese Viren jedoch erheblich attenuiert sind (Kuo und Masters., 2003; Dediego et al., 2007).

Die Spike- oder Surface(S)-Glykoproteine der Coronaviren formen die ca. 20 nm langen keulenförmigen Projektionen auf der Oberfläche der Virionen, die namensgebend für die Coronaviren waren. Es ist ein typisches Membranprotein vom Typ 1 und hat bei allen Coronaviren eine gemeinsame Struktur. Es besitzt nach der Neusynthese am N-Terminus

eine Signalsequenz, die nach der Translokation ins endoplasmatische Retikulum abgespalten wird. Das S-Protein kann in drei strukturelle Domänen unterteilt werden: Am N-Terminus befindet sich eine große Ektodomäne, die den größten Teil des S-Proteins ausmacht, gefolgt von einer Transmembranaldomäne, die das Protein in der Virushülle verankert, und von einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt am C-Terminus (siehe Abb. 1-2). Die Größe variiert zwischen 1160 Aminosäuren (IBV) und 1452 Aminosäuren (FIPV) und es hat ungespalten ein Molekulargewicht von 170-220 kDa. Das S-Protein der Coronaviren verfügt über zahlreiche potentielle N-Glykosylierungsstellen (bis zu 35). Die überwiegende Zahl dieser Glykosylierungsmotive (Asn-Xxx-Ser/Thr) werden nach der kotranslationalen Insertion des S-Proteins in das rER genutzt, um N-Glykane anzuhängen. Bei einigen Virustypen und -stämmen wird das S-Protein während oder nach der Virusreifung von zellulären Proteasen in eine S1- und S2-Untereinheit gespalten, die miteinander assoziiert bleiben, aber nicht kovalent verknüpft sind. Das Ausmaß der Spaltung des S-Proteins variiert unter den Coronaviren und hängt auch von der infizierten Zielzelle ab. Die S-Proteine der Coronaviren in Gruppe 1 werden nicht gespalten, wohingegen das S-Protein des bovinen Coronavirus (BCoV) und fast aller murinen Hepatitisvirusstämme (MHV) gespalten wird. Auch beim infektiösen Bronchitisvirus der Vögel (IBV) tritt überwiegend gespaltenes S-Protein auf. Die S1-Untereinheit enthält den N-terminalen Anteil des Moleküls und formt den globulären Teil des Virusspikes. Er enthält Aminosäuresequenzen, die verantwortlich sind für die Bindung an spezifische Rezeptoren in der Membran empfänglicher Zielzellen. Die S2-Untereinheit entspricht dem Anteil des S-Proteins, welcher für die Verankerung in die Virusmembran verantwortlich ist. Sie besitzt innerhalb der Virusfamilie die höchste Konservierung in Bezug auf die Aminosäuresequenz, im Gegensatz zur S1-Untereinheit, die wenig Aminosäureidentität aufweist (Übersichtsarbeit siehe Cavanagh, 1995). Die Ektodomäne der S2-Untereinheit enthält zwei Regionen mit einer 4,3-hydrophoben Wiederholung (*heptad repeat*), die auf eine α -helikale „*coiled-coil*“ Struktur hinweisen und u.a. in der Fusionsdomäne von MHV vorhanden sind (de Groot et al., 1987; Luo and Weiss, 1998). Untersuchungen weisen darauf hin, dass das S-Protein der Coronaviren als Oligomer vorliegt, höchstwahrscheinlich als Homotrimer (Delmas und Laude, 1990).

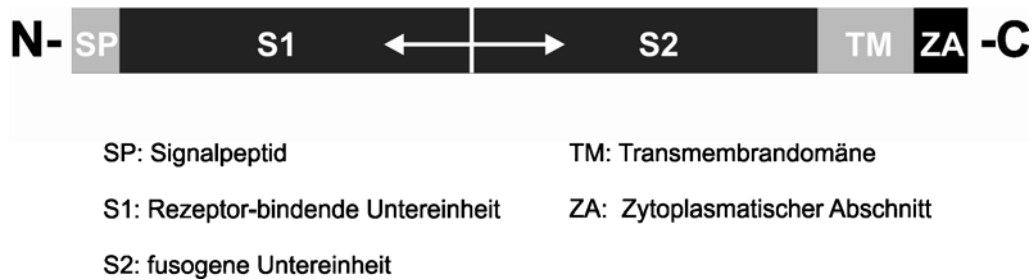


Abb. 1-2. Schematische Darstellung des coronavirusalen Spike-Proteins.

Neben der Bindung an einen zellulären Rezeptor induziert das S-Protein die darauffolgende Fusion der viralen Lipidhülle mit der Zellmembran. Die Entfaltung der Fusionsaktivität ist mit einer Konformationsänderung des S-Proteins verbunden (Sturman et al., 1990; Gallagher, 1997; Holmes et al., 2001). Durch Einzelexpression konnte gezeigt werden, dass das S-Protein ausreichend ist für eine Fusion mit Zellen, die auf ihrer Oberfläche passende Rezeptoren tragen. Die Fusion vieler Coronaviren erfolgt bei einem pH-Wert von 7 oder höher (Vennema et al., 1990). Neben der Bindung an spezifische Rezeptoren und der Membranfusionsaktivität während des Viruseintritts in Zellen ist das S-Protein das Hauptziel der humoralen und zellulären Immunantwort während einer Coronavirusinfektion (Collins et al., 1982; Williamson und Stohlman, 1990; Stohlman et al., 1995).

Ein weiteres Oberflächenprotein ist das HE-Protein bei einigen Vertretern der Gruppe 2-Coronaviren. Das HE-Protein ist ein Rezeptor-zerstörendes Enzym und besitzt wie das HEF-Protein der Influenza-C-Viren 9-O-Acetylerase-Aktivität (Vlasak et al., 1988a, b). Das HE-Protein ist ein N-glykosyliertes Typ I-Membranprotein, welches über Disulfidbrücken Homodimere bildet. Ein Monomer hat ein Molekulargewicht von 60-65 kDa, das Dimer etwa 130-140 kDa. Im Vergleich zum HEF-Protein weist es auf Aminosäureebene eine deutliche Homologie von 30 % auf. Vergleichende Untersuchungen zur Bindungsaktivität des S- bzw. HE-Proteins einiger Gruppe 2a Coronaviren zeigen, dass das HE-Protein eine geringere Bindungsaffinität zu Neu5,9Ac₂ aufweist als das S-Protein. Daher wird vermutet, dass die Funktion des HE-Proteins nicht in der Bindung an Zielzellen dient, sondern in der Inaktivierung der Rezeptor-Determinante N-Acetyl-9-O-Acetylneuraminsäure (Kunkel und Herrler, 1993; Schultze et al., 1991a, b). Ähnlich wie bei den Inflenzaviren wird dadurch die Bildung von Virusaggregaten verhindert und ein

Loslösen von Nachkommenviren von der infizierten Zelle ermöglicht, wodurch die Ausbreitung der Viren erleichtert wird.

1.1.4 Replikationszyklus

Coronaviren binden zunächst über das S-Protein an einen spezifischen zellulären Rezeptor. Die Bindung leitet eine Konformationsänderung im S-Protein ein, welches dann die Fusion zwischen der viralen Membran mit zellulären Membranen vermittelt, wodurch das Nukleokapsid in das Zytoplasma der Zelle entlassen wird. Hier findet die Replikation der Viren statt und ist gekennzeichnet durch einen einzigartigen diskontinuierlichen Transkriptionsmechanismus (Übersichtsarbeit siehe Sawicki et al., 2007). Dieser Mechanismus beinhaltet die Synthese mehrerer subgenomischer mRNAs mit terminalen Sequenzen, die den beiden Enden des Virusgenoms entsprechen. Die Expression der coronaviralen Replikase-Transkriptase Gene wird durch die Translation der genomischen RNA vermittelt. Die Replikase-Transkriptase-Proteine sind durch ORF1a und ORF1b kodiert und werden zunächst als zwei große Polyproteine, pp1a und pp1b synthetisiert. Die Synthese von pp1b beinhaltet eine ribosomale Rasterverschiebung während der Translation von ORF1a. Während oder nach der Synthese werden diese Polyproteine durch Virus-kodierte Papain-ähnliche (PL^{pro}) und Chymotrypsin-ähnliche Proteasen in 16 Proteine gespalten. Die Replikase-Transkriptase-Proteine, zusammen mit anderen viralen und möglicherweise auch zellulären Proteinen, setzen sich zu Membran-gebundenen Replikations-Transkriptionskomplexen (RTC) zusammen. Diese Komplexe akkumulieren an perinukleären Regionen und sind mit Doppel-Membran-Vesikeln assoziiert. An den RTCs werden sowohl genomische, als auch subgenomische RNAs synthetisiert. Die diskontinuierliche Transkription der subgenomischen RNAs wird durch transkriptionsregulierende Sequenzen (TRS) kontrolliert. Diese TRS befinden sich am 3'-Ende des Virusgenoms (*leader* TRS) und vor jedem ORF der subgenomischen RNAs, welche zur Translation bestimmt sind. Die subgenomischen RNAs bilden ein sog. „*nested set*“ und weisen alle das gleiche 3'-Ende auf, wobei nur die am 5'-Ende gelegene ORFs translatiert werden. Das N-Protein interagiert mit der genomischen RNA zu den Nukleokapsiden. Die translatierten M- und E-Proteine werden im Prä-Golgi Kompartiment zurückgehalten, wo sie miteinander interagieren (Lim und Liu, 2001). Hier kommt es zu einer Bindung an das N-Protein, die über die C-terminale Domäne des M-Proteins vermittelt wird. Die Virusfreisetzung erfolgt vermutlich am intermediären Kompartiment (ERGIC) zwischen

dem endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat (Tooze et al., 1984; Risco et al., 1998). Die Viruspartikel werden dann in das Lumen des ERGIC abgeschnürt und durch Transportvesikel über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert, wo sie anschließend in die Umgebung entlassen werden.

1.2 Das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV)

1.2.1 SARS: Ätiologie und Pathogenese

Vor dem Erscheinen des SARS-CoV sind die prototypischen humanen Coronaviren HCoV-229E und HCoV-OC43 besonders in den Wintermonaten die Hauptursache für mildere Erkrankungen der oberen Atemwege und nur gelegentlich mit schwerwiegenden Erkrankungen assoziiert (Makela et al., 1998). Das SARS-CoV ist das erste bekannte Coronavirus, welches für lebensbedrohende Erkrankungen im Menschen verantwortlich ist. Im Mai 2003 wurden für das SARS-CoV die Kochschen Postulate erfüllt. Die ersten drei Kriterien – Isolation des Virus aus erkrankten Wirten, Kultivierung in Wirtszellen und Beweis der Filtrierbarkeit wurde für das SARS-CoV durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt (Poutanen et al., 2003; Drosten et al., 2003, Ksiazek et al., 2003 und Peiris et al., 2003a). Die Erfüllung der letzten drei Kriterien – Herbeiführung einer vergleichbaren Krankheit in ursprünglichen oder verwandten Wirtsspezies, Reisolierung des Virus und Nachweis einer spezifischen Immunantwort gegen das Virus folgte (Fouchier et al., 2003). Durch internationalen Flugverkehr hatte sich eine schnell ausbreitende SARS-Epidemie entwickelt und mehr als 30 Länder meldeten Krankheitsfälle. Insgesamt wurden bis Juli 2003 ca. 8.100 wahrscheinliche SARS-Fälle berichtet. Am meisten betroffen waren asiatische Länder. Über $\frac{3}{4}$ aller SARS-Fälle wurden in China, Hong Kong und Taiwan gemeldet. Eine besondere Risikogruppe stellt das Krankenhauspersonal dar, mit ca. 20 % aller SARS-Fälle weltweit (Onlinebericht der World Health Organization, 2003a). Die Mortalitätsrate bei einer SARS-CoV Infektion lag durchschnittlich bei ca. 10 %, wobei in den unterschiedlichen Altersgruppen starke Schwankungen auftreten. Kinder waren eher selten betroffen und zeigten mildere Symptome. Bei alten Menschen lag die Mortalitätsrate bei bis zu 50 % (Peiris et al., 2003b). Durch geeignete Quarantänemaßnahmen und Einschränkungen im Reiseverkehr, besonders im Flugbereich, konnte die SARS-Epidemie bis Juli 2003 eingedämmt werden (Gerberding, 2003; World Health Organization, 2003b). Es wurde spekuliert, dass es sich bei SARS um eine saisonale Erkrankung handelt, weshalb ein

erneuter Ausbruch dieser Krankheit nicht ausgeschlossen werden kann (Normile und Enserink, 2003).

Obwohl der Übertragungsweg des SARS-CoV noch nicht vollständig geklärt ist, wird das Virus überwiegend durch Tröpfcheninfektion von infizierten Personen übertragen (Zhong et al., 2003). Die meisten Neuerkrankungen erfolgten bei Personen, die in direktem oder indirektem Kontakt zu infizierten Patienten standen, insbesondere Familienmitglieder und Krankenhauspersonal. Eine Übertragung des SARS-CoV durch die Luft scheint ebenso eine Rolle zu spielen, stellt aber ein eher geringeres Risiko der Übertragung dar. Der Nachweis von SARS-CoV-RNA in Fäzes von infizierten Personen lässt außerdem vermuten, dass eine Übertragung des Virus durch fäkale Verunreinigungen nicht ausgeschlossen werden kann (Leung et al., 2003).

Die Infektion mit SARS-CoV weist einen breiten klinischen Verlauf auf, welcher hauptsächlich durch Fieber, Atemnot, Lymphopenie und akute Atemwegsbeschwerden charakterisiert ist, die durch eine Pneumonie ausgelöst werden und besondere Behandlungsmaßnahmen erfordern (Peiris et al., 2003b). Bei einigen Patienten wurden neben den bisher erwähnten Symptomen auch gastrointestinale Erkrankungen mit einer SARS-CoV-Infektion in Verbindung gebracht und aktive Replikation des SARS-CoV wurde im Dick- und Dünndarm nachgewiesen (Peiris et al., 2003b; Hamming et al., 2004).

Ursachen für die schwerwiegenden Krankheitssymptome der Lunge und die hohe Mortalitätsrate im Vergleich zu anderen humanen Coronaviren werden derzeit diskutiert. Dabei wurde gezeigt, dass neben der Virusreplikation auch immunpathologische Konsequenzen durch die Wirtsantwort von Bedeutung sind (Übersichtsarbeit siehe Perlman und Dandekar, 2005). ACE2 und andere Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) spielen eine entscheidende Rolle bei dem Krankheitsverlauf des akuten progressiven Lungenversagens (ARDS; *Acute Respiratory Distress Syndrome*), einer entzündlichen Lungenerkrankung bei Erwachsenen, indem sie die Schwere der Krankheit kontrollieren. Für das ACE2 wurde gezeigt, dass es als negativer Regulator im RAS eine Rolle spielt, die der Funktion des Angiotensin-konvertierendem Enzyms (ACE) entgegenwirkt (Übersichtsarbeit siehe Kuba et al., 2006). Bei Wildtyp-Mäusen, die mit dem SARS-CoV infiziert wurden, konnte eine ausgeprägte Herabregulierung der ACE2-Expression in der Lunge nachgewiesen werden. Ebenso führte die Verabreichung von rekombinantem S-Protein zu einer Herabregulierung der ACE2-Expression *in vitro* und *in vivo*. Wildtyp-Mäuse, die mit dem SARS-CoV-S-Protein behandelt wurden, wiesen eine ähnlich akute Pathologie einer

schweren Lungenentzündung auf, die vergleichbar mit denen von *ace2-knockout*-Mäusen waren. Im Gegensatz dazu wurden keine Veränderungen der ARDS-Symptome bei *ace2-knockout*-Mäusen festgestellt, denen das S-Protein verabreicht wurde. Daher wird angenommen, dass die Herabregulierung der ACE2-Expression durch eine SARS-CoV Infektion eine ursächliche Rolle bei der SARS Pathologie und besonders beim Krankheitsverlauf zum ARDS spielt (Übersichtsarbeit siehe Kuba et al., 2006).

1.2.2 Das SARS-CoV S-Protein

Das Gen für das S-Protein des SARS-CoV kodiert für ein Polypeptid mit einer Länge von 1255 Aminosäuren. Am N-Terminus des S-Proteins befindet sich eine kurze Signalsequenz vom Typ-1, bestehend aus hydrophoben Aminosäuren, die sehr wahrscheinlich während der kotranslationalen Translokation durch das raue endoplasmatische Retikulum abgespalten wird (Rota et al., 2003). Es besitzt 23 potentielle N-verknüpfte Glykosylierungsstellen, die durch Sequenzanalysen vorhergesagt wurden und von denen mindestens 12 genutzt zu werden scheinen (Krokhin et al., 2003). Nach dem Transport des S-Proteins zum Golgi-Apparat und der Prozessierung zum reifen S-Protein (ca. 200 kDa) durch Modifizierung der N-Glykane zu komplexen Oligosacchariden, wird das S-Protein an die Oberfläche von transfizierten Zellen transportiert (Hofmann et al., 2004; Schwegmann-Weßels et al., 2004). Untersuchungen weisen daraufhin, dass das S-Protein einiger Coronaviren ein intrazelluläres Retentionssignal im zytoplasmatischen Abschnitt enthält und es durch den stark verlangsamten Transport im Golgi-Apparat zu einer Akkumulation von S-Protein in diesem Kompartiment kommt (Vennema et al., 1990). Ein solches Tyrosin-abhängiges Signal (YXXI) konnte im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins von TGEV nachgewiesen werden, welches jedoch in der korrespondierenden Region des SARS-CoV-S-Proteins nicht zu finden ist (Schwegmann-Weßels et al., 2004). Biochemische Untersuchungen von transfizierten Zellen zeigen, dass das S-Protein als ungespaltenes Homotrimer vorliegt und dies vermutlich auch der Fall im Viruspartikel ist (Song et al., 2004). Eine Spaltung des S-Proteins in die Untereinheiten S1 und S2 während einer Infektion wurde bisher nicht gezeigt, allerdings wird vermutet dass sie erfolgt und auch notwendig ist, um eine Fusions-kompetente Konformationsänderung von S2 zu ermöglichen (Li et al., 2006). Die Trypsin-Behandlung von rekombinantem S-Protein führte zur Spaltung des S-Proteins wobei eine Spaltstelle durch N-terminale Sequenzierung identifiziert wurde, die der von MHV entspricht (Li et al., 2006). Durch die Behandlung von

Zellen mit lysosomotropen Substanzen wie Ammoniumchlorid konnte eine Infektion nicht unterbunden werden, auch nicht, wenn Zell-gebundene SARS-Pseudoviren zusätzlich mit Trypsin, Thermolysin oder Elastase behandelt wurden (Matsuyama et al., 2005; Simmons et al., 2005). Desweiteren führte die Inhibierung von Cathepsin L zur Hemmung der SARS-CoV-Infektion weshalb angenommen wird, dass eine wichtige funktionelle Spaltung des S-Proteins im Endosom erfolgt (Simmons et al., 2005). Die Beobachtung, dass Trypsin-Spaltung die Fusion und den Viruseintritt nur fördert, wenn ACE2 gebunden ist, deutet zudem auf eine Rezeptor-vermittelte Konformationsänderung des S-Proteins (Simmons et al., 2004).

Das SARS-CoV S-Protein ist ein typisches Fusionsprotein vom Typ 1. In der C-terminalen Hälfte befinden sich zwei *heptad repeat* Sequenzen (HR1 und HR2), die ein hohes Maß an Sequenzkonservierung zu anderen Coronaviren aufweisen und durch eine Konformationsänderung für die Fusion der viralen Membran mit zellulären Membranen verantwortlich sind (Ingallinella et al., 2004). Für Typ-1-Fusionsproteine wird angenommen, dass ein Fusionspeptid in der N-terminalen Region die Interaktion zwischen der Virus- und Zellmembran vermittelt und die Fusion einleitet. Für das SARS-CoV S-Protein wird ein solches Fusionspeptid in der S2-Untereinheit vermutet, welches aus 19 hydrophoben Aminosäuren (Aminosäuren 770-788) besteht. Es wurde gezeigt, dass dieses Peptid in die Membran von großen unilamellaren Vesikeln (LUVs) integriert und zum Auslaufen des Vesikelinhalts führt (Sainz et al., 2005). Das SARS-CoV gelangt vermutlich über Endozytose in das Zytoplasma der Zelle (Simmons et al., 2005) und die Infektion lässt sich durch die Behandlung mit Chlorpromazin inhibieren, was auf einen Clathrin-vermittelten Mechanismus hindeutet (Inoue et al., 2007). Es wurde allerdings auch beschrieben, dass eine direkte Fusion mit der Plasmamembran erfolgt, wenn Zell-gebundenes Virus mit Proteasen, wie z.B. Trypsin, Thermolysin und Elastase behandelt wurde. Dieses Vorgehen führt im Vergleich zum endosomalen Weg zu einer 100- bis 1000-fach effizienteren Infektion. Das deutet daraufhin, dass das SARS-CoV zwei unterschiedliche Eintrittswege nutzen kann, um in die Zelle zu gelangen. Unter der Berücksichtigung, dass Elastase, ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunantwort der Lunge ist, kann möglicherweise die starke Vermehrung des SARS-CoV und die daraus resultierende Schädigung des Lungengewebes erklärt werden (Matsuyama et al., 2005).

1.2.3 Zelluläre Rezeptoren des SARS-CoV und Tropismus

Als funktioneller Rezeptor für das SARS-CoV wurde das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) unabhängig von zwei Arbeitsgruppen identifiziert (Li et al., 2003; Wang et al., 2004). ACE2 ist wie die Aminopetidase N (APN), der Rezeptor für die meisten Gruppe 1-Coronaviren, eine Zink-Metalloprotease. Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptor-Bindungsstelle, analog zu anderen Coronaviren, in der N-terminalen Hälfte des S-Proteins liegt. Der Bereich wurde auf die Aminosäuren 270-510 eingegrenzt und Fragmente mit einer Länge von 193 bzw. 240 Aminosäuren aus diesem Bereich der Ektodomäne des S-Proteins haben sehr effizient an ACE2-exprimierende Zellen gebunden (Babcock et al., 2004; Wong et al., 2004). Das humane SARS-CoV und das SARS-CoV aus der Zibetkatze unterscheiden sich nur in sechs Aminosäuren innerhalb der Rezeptor-bindenden Domäne (RBD) des S-Proteins. Über die Interaktion zwischen Rezeptor und S-Protein ist bekannt, dass die Aminosäuren 479 und 487 in der RBD des S-Proteins wichtig für die Interaktion mit ACE2 sind. Substitutionen dieser zwei Aminosäuren im humanen S-Protein mit solchen aus dem Zibetkatzen-S-Protein (N479K/T487S) hat eine Pseudovirus-Infektion von Zellen, die humanes ACE2-exprimieren, fast vollständig aufgehoben. Umgekehrt führte die Einführung dieser Aminosäuren in das S-Protein der Zibetkatze zu einer Infektion von Zellen, die das humane ACE2 exprimieren. Daher wird angenommen, dass die Aminosäuren 479 und 487 des S-Proteins wichtige Determinanten für den SARS-CoV Tropismus sind und Veränderungen an diesen Positionen auch entscheidend waren für die Übertragung von Tier auf den Menschen (Li et al., 2005a; Qu et al., 2005). Als weiterer Rezeptor wurde das humane CD209L, ein Lektin vom Typ-C (auch bezeichnet als L-SIGN, DC-SIGNR und DC-SIGN2), identifiziert (Jeffers et al., 2004). ACE2-negative Zellen, die mit CD209L transfiziert wurden, waren anschließend empfänglich für eine SARS-CoV Infektion, allerdings in erheblich geringerem Maße als eine ACE2-vermittelte Infektion (Jeffers et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass das S-Protein auch mit dem Lektin DC-SIGN interagieren kann. Allerdings ist es alleine nicht in der Lage eine Infektion zu vermitteln, führt aber zu einer verstärkten Infektion, wenn die Zielzellen ebenfalls den funktionellen Rezeptor ACE2 exprimieren. Es wurde auch gezeigt, dass dendritische Zellen in der Lage sind, die Übertragung des Virus in Zielzellen zu ermöglichen, wobei dafür vermutlich andere Faktoren als DC-SIGN verantwortlich sind (Übersichtsarbeit siehe Hofmann und Pöhlmann, 2004)

1.3 Das Virus der vesikulären Stomatitis als Pseudovirus

Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) ist ein prototypischer Vertreter der Familie *Rhabdoviridae*, Genus *Vesiculovirus*. VSV wurde in der Vergangenheit häufig als Modellsystem zur Untersuchung der Virusreplikation und Zusammensetzung behüllter RNA-Viren verwendet und ist daher ein gut charakterisierter Vertreter der behüllten RNA-Viren. VSV kann in vielen unterschiedlichen Zelltypen vermehrt werden, wobei häufig große Virusmengen freigesetzt werden (Rose und Whitt, 2001). 1995 ist es das erste Mal gelungen, rekombinantes VSV durch die Klonierung der vollständigen Nukleinsäuresequenz in Plasmiden zu erzeugen (Lawson et al., 1995; Whelan et al., 1995). In den folgenden Jahren wurde gezeigt, dass Fremdproteine durch rekombinantes VSV exprimiert werden können, und dass mehr oder weniger effizient eine Inkorporation der Fremdproteine in die Viruspartikel erfolgt. Dies wurde z.B. für zelluläres CD4 (Schnell et al., 1996), die *gag*- und *env*-Proteine des humanen Immundefizienzvirus (Johnson et al., 1997; Rose et al., 2000, 2001; Haglund et al., 2000, 2002) und das Hämagglutinin- und Neuraminidase-Protein des Influenza-A-Virus (Kretzschmar et al., 1997; Roberts et al., 1998, 1999) gezeigt. VSV besitzt neben der Eigenschaft als Targeting-Vektor außerdem ein Potential als Vakzinierungsvektor. So waren Mäuse nach einer intranasalen Inokulation mit rekombinantischem VSV, welches das Hämagglutinin des Influenza-A-Virus in der Virushülle enthält, vor einer Influenza-A-Virusinfektion geschützt (Roberts et al., 1999). Eine weitere Einsatzmöglichkeit stellt VSV bei der Untersuchung von Glykoproteinen anderer Viren dar, bei denen eine Virusanzucht bisher nicht möglich war oder mit einem besonderen Gefährdungspotential assoziiert ist. So wurde ein rekombinantisches VSV erzeugt, bei dem das Gen für das G-Protein durch das Gen für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) ersetzt wurde und mit dem Glykoprotein des Ebolavirus *in trans* komplementiert wurde (Takada et al., 1997). Diese Pseudoviren ermöglichten die Identifizierung von Determinanten der Zelloberfläche, die bei der Ebolavirusinfektion eine wichtige Rolle spielen. So konnte eine fusogene Domäne im Ebola-Glykoprotein unter Standardsicherheitsbedingungen identifiziert werden (Ito et al., 1999).

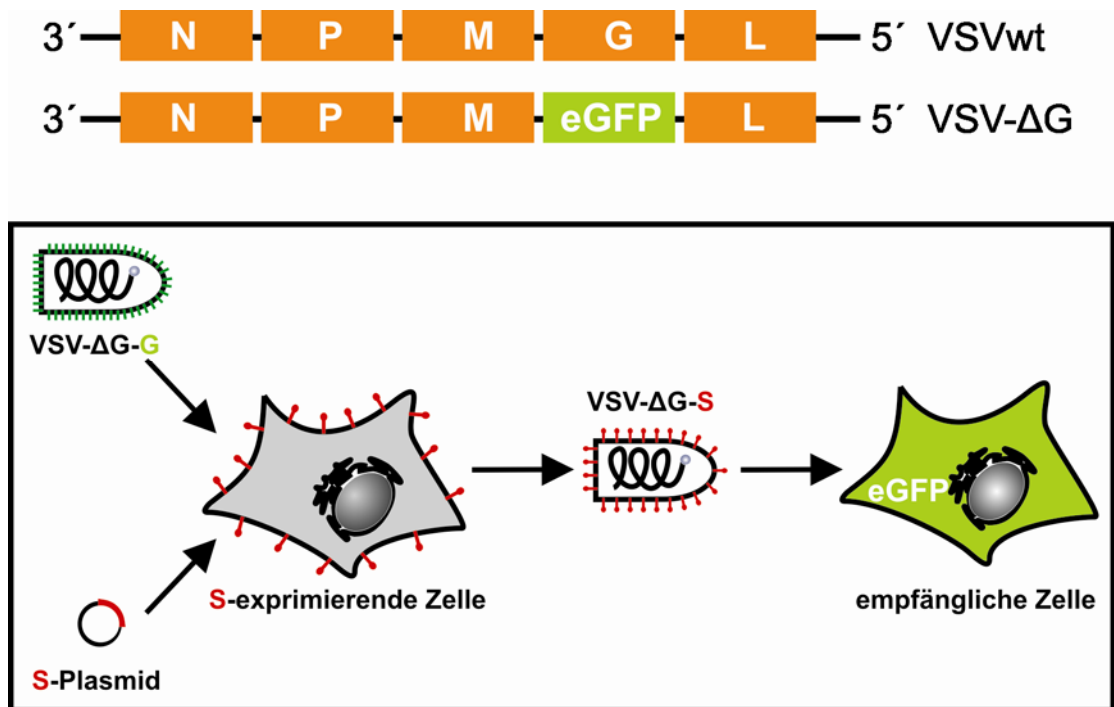


Abb. 1-3. Darstellung des VSV-Genoms und Schema zur Erzeugung von Pseudoviren, die das SARS-CoV-S-Protein enthalten. Zur Erzeugung der Pseudoviren werden BHK21-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für das SARS-CoV-S-Protein kodieren. Nach 24h werden die S-exprimierenden Zellen mit VSV-ΔG-G infiziert. Die S-haltigen Pseudoviren werden in den Überstand der infizierten Zellen abgegeben und stehen nach Reinigung für Infektionsversuche zur Verfügung. Empfängliche Zielzellen exprimieren nach der Infektion mit VSV-ΔG-S das grün-fluoreszierende Protein (eGFP).

In der Literatur wurden bereits SARS-Pseudoviren beschrieben, die das S-Protein in der Hülle des Viruspartikels tragen und sich von Lentiviren, bzw. von VSV ableiten (Simmons et al., 2004; Hofmann et al., 2004; Fukushi et al., 2005). Pseudoviren, die sich von Lentiviren ableiten lassen, haben den Nachteil, dass es während der Replikation zu einer Integration des Fremdgens in Zellen kommt. Dies ist ein wichtiger Sicherheitsaspekt, der berücksichtigt werden muss. Bei Pseudoviren, die sich von VSV ableiten lassen, spielt dieser Aspekt keine Rolle, wodurch die Verwendung von VSV-Pseudoviren sicherer ist. Ein weiterer Nachteil der lentiviralen SARS-Pseudoviren ist, dass nur relativ geringe Virustiter erreicht wurden (Simmons et al., 2004) im Vergleich zu dem System, welches in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde. Für VSV-Pseudoviren ist es sehr wahrscheinlich, dass durch die Etablierung einer Zelllinie, die stabil das SARS-CoV-S-Protein exprimiert, noch höhere

Titer erreicht werden könnten. So wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Zelllinie etabliert, die das VSV-G-Protein nach Induktion stabil exprimiert. Dadurch wurde gegenüber einer transienten Expression des G-Proteins ein 100-fach höherer Virustiter erreicht (Hanika et al., 2005). Arbeiten in unserer Gruppe haben gezeigt, dass S-haltige Pseudoviren, die sich von VSV ableiten lassen, für viele verschiedene Anwendungen geeignet sind. Abb. 1-3 zeigt schematisch die Erzeugung S-haltiger Pseudoviruspartikel, die sich von VSV ableiten lassen. Der Einsatz von replikationsdefekten, S-haltigen SARS-Pseudoviren erlaubt die Untersuchung der Rolle des S-Proteins in der Frühphase der Infektion unabhängig von anderen viralen Proteinen. Die funktionelle Charakterisierung von Mutationen des S-Proteins, die ein genaueres Bild über die Bindung an den Virusrezeptor ACE2 ergeben, ist nur ein Beispiel für eine Anwendungsmöglichkeit. S-Proteinvarianten können relativ leicht erzeugt werden, ohne die Notwendigkeit eines reversen genetischen Systems, dessen Etablierung sehr zeitaufwendig ist und die Sicherheitsstufe S-3 erfordert. Auch sind Untersuchungen zum Tropismus des SARS-CoV möglich und diese Viren können ebenso zur Identifizierung von Hemmstoffen und neutralisierenden Antikörpern herangezogen werden, die den S-vermittelten Eintritt des SARS-CoV beeinflussen.

1.4 Zellpolarität und Viruseintritt

Viren sind obligate, intrazelluläre Parasiten, deren Replikation entscheidend von der Übertragung des Virusgenoms von infizierten Organismen auf nicht-infizierte Organismen abhängt. Häufig erfolgt bei umhüllten Viren zunächst die spezifische Bindung an einen zellulären Rezeptor gefolgt von der direkten Fusion der viralen Membran mit der Plasmamembran von Epithelzellen oder nach Endozytose mit der endosomalen Membran. Daher ist die erste Hürde, die ein Viruspartikel überwinden muss, die Überwindung der zellulären Membran, um die Virusgene in das Zytoplasma oder den Zellkern zu entlassen (Übersichtsarbeit siehe Compans und Herrler, 2005). Bei dem Epithel handelt es sich um ein- oder mehrlagige Zellschichten, die fast alle inneren und äußeren Körperoberflächen vielzelliger tierischer Organismen bedecken. Differenzierte Epithelzellen liegen als dicht beieinander liegender Zellverbund vor, die durch Kontaktstrukturen (*tight junctions*) miteinander verbunden sind und durch eine polare Differenzierung funktionell unterschiedliche Membrandomänen aufweisen (siehe Abb. 1-4).

Die apikale Membran, die eine vergleichsweise starre Struktur aufweist, ist dem Lumen zugewandt und steht daher in Kontakt mit der äußeren Umgebung und dient als natürliche Barriere zum Schutz des Organismus. Die basolaterale Domäne steht in Verbindung mit dem inneren Milieu und wird von dieser Seite mit Nährstoffen versorgt. Zudem erfolgt über diese Domäne die Kommunikation mit benachbarten Zellen und Geweben. *Tight junctions* befinden sich in der Nähe der apikalen Domäne und verbinden angrenzende Epithelzellen dicht miteinander. Sie verhindern, dass sich Membranbestandteile, wie z.B. Lipide und Membranproteine der apikalen bzw. der basolaterale Domäne miteinander vermischen (Tsukita et al., 2001). Dies führt dazu, dass die beiden Membrandomänen unterschiedliche Protein- und Lipidzusammensetzung der beiden Membrandomänen aufrechterhalten werden und deshalb an unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt sein können (Simons und Fuller, 1985). Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der beiden Domänen wird durch die gerichtete Sortierung unterschiedlicher Transportvesikel bewirkt (Jacob und Naim, 2001).

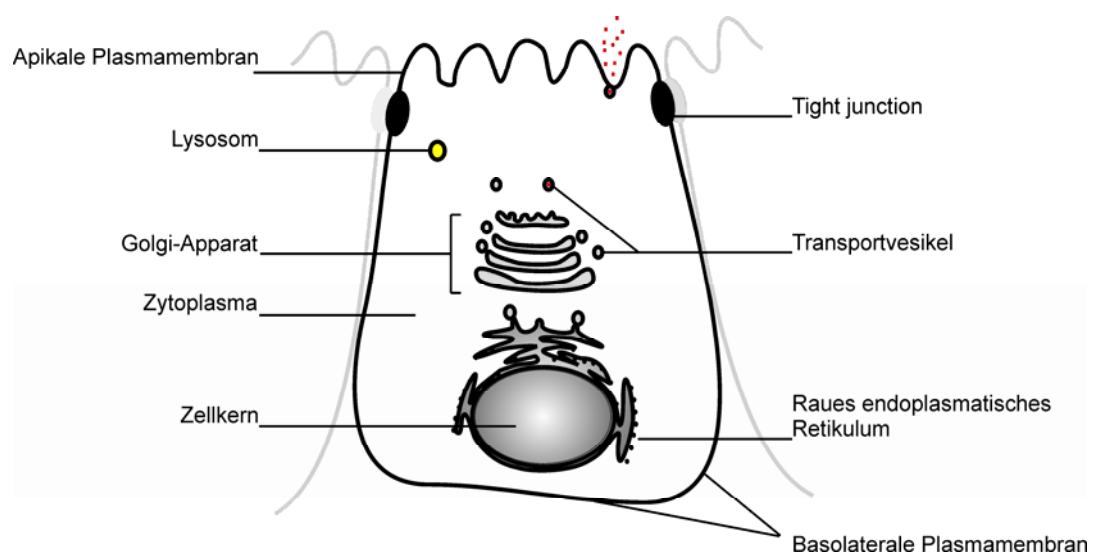


Abb. 1-4. Schematische Darstellung einer polarisierten Epithelzelle im Zellverbund.

Die Polarität dieser Zellen bestimmt sowohl die frühe als auch die späte Phase viraler Infektionen. Bei der frühen Phase spielt die An- bzw. Abwesenheit geeigneter Rezeptoren eine Rolle und die polarisierte Verteilung dieser Strukturen entscheidet, ob eine Zelle empfänglich oder resistent für eine Infektion ist (Übersichtsarbeit siehe Compans und Herrler, 2005). Die Infektion von Viren, die über den respiratorischen und

gastrointestinalen Weg Zellen infizieren, kann am besten erklärt werden, wenn geeignete Rezeptoren auf der apikalen Seite vorhanden sind. Beispiele für apikale Infektionen sind Influenzaviren, die Oberflächen-gebundene Sialinsäuren erkennen (Fuller et al., 1985; Schultze et al., 1996), und TGEV, welches an die porcine Aminopeptidase N bindet, welches auf der apikalen Seiten von Enterozyten vorkommt (Rossen et al., 1994; Hansen et al., 1998). Einige Viren, wie z.B. VSV und Herpes Simplex-Virus, infizieren überwiegend über die basolaterale Domäne, wobei diese Viren Mechanismen entwickelt haben müssen, um die epitheliale Barriere zu überwinden. Möglicherweise nutzen sie Läsionen des Epithels, wo die polare Differenzierung teilweise zerstört ist und zelluläre Strukturen dadurch zugänglich werden (Fuller et al., 1984; Schelhaas et al., 2003). Einige Viren, z.B. das Poliovirus, können Zellen über die serosale und lumenale Seite infizieren. Obwohl der Poliovirus-Rezeptor, ein strukturelles Homolog der Nektin-Familie von Adhäsionsmolekülen, überwiegend auf der basolateralen Seite von Epithelzellen vorkommt, ist ein geringer Anteil auch auf der apikalen Seite vorhanden und ausreichend für eine Infektion über diese Domäne (Tucker et al., 1993).

Die Bedeutung der polarisierten Differenzierung spielt auch eine wichtige Rolle bei der Reifung und Freisetzung von Nachkommenviren in Epithelzellen. Dabei ist besonders der gerichtete Transport neu-synthetisierter Glykoproteine behüllter Viren zu nennen, die sich an der Membran anreichern, wo sie mit viralen Kapsiden assoziieren und den Knospungsprozess einleiten (Übersichtsarbeit siehe Compans und Herrler, 2005)

1.5 Detergenz-resistente Membranen oder *lipid rafts*

Ausgehend von der Beobachtung, dass biologische Membranen keine starren Strukturen sind und Lipide und viele Membranproteine sich in permanenter lateraler Bewegung befinden, wurde das Modell zur Organisation der Plasmamembran, das flüssige Mosaik (*fluid mosaic*)-Modell, von Singer und Nicolson 1972 entwickelt. Dieses Modell beschreibt die Lipiddoppelschicht als eine zweidimensionale Lösung gerichteter Lipide und globulärer Proteine. Lipide und integrale Membranproteine können lateral ungehindert in der Lipidmatrix diffundieren (laterale Diffusion) und sind homogen über diese verteilt, sofern dies nicht durch spezifische Wechselwirkungen unterbunden wird (Singer und Nicolson, 1972). Aus heutiger Sicht müssen biologische Membranen jedoch als ein Mosaik mit unterschiedlichen Lipid-Domänen betrachtet werden.

1.5.1 Lipid raft- Konzept

In der Plasmamembran verschiedener eukaryotischer Zellen sind Membranbereiche, die sich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung von der restlichen Membran unterscheiden. Diese auch als *lipid rafts* bezeichneten Domänen weisen einen erhöhten Anteil an Cholesterolem und Sphingolipiden (Sphingomyelin und Glykosphingolipide) auf und sind im exoplasmatischen Teil der Lipid-Doppelschicht angereichert, im zytoplasmatischen Teil enthalten sie vermutlich überwiegend Phospholipide mit gesättigten Fettsäureketten und Cholesterolem (siehe Abb. 1-5; Übersichtsarbeiten über *lipid rafts* siehe Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998; Simons und Toomre, 2000).

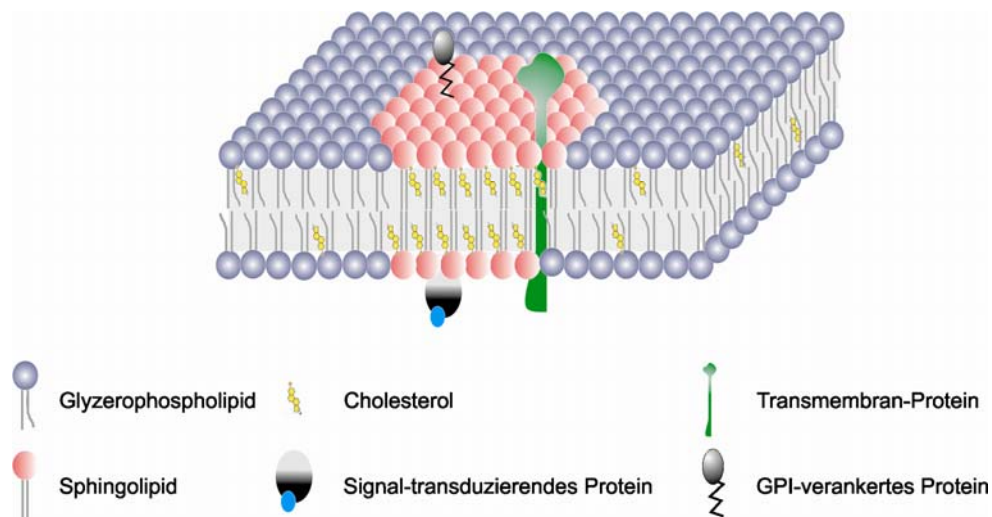


Abb. 1-5: Modell der *lipid rafts* in der Zellmembran.

Diese Domänen werden als *rafts* (engl.: *raft* = Floss) bezeichnet, da sie als schwimmende Inseln betrachtet werden können, die sich frei in der fluiden Mosaikstruktur der Lipiddoppelschicht nach dem Modell von Singer und Nicolson „bewegen“ können. Dabei können separate *rafts* sich zu größeren *rafts*-Clustern zusammensetzen bzw. voneinander separiert werden, wodurch die Größe dieser Membrandomänen äußerst dynamisch ist (Pralle et al., 2000).

Neben Cholesterol und Sphingolipiden enthalten *lipid rafts* Proteine mit *rafts*-Affinität. So sind in diesen Domänen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine (Chatterjee und Mayor, 2001), doppelt-acylierte Proteine wie Mitglieder aus der Familie der Src-Tyrosinkinasen (Simons und Toomre, 2000) und palmitoylierte und myristoylierte Proteine wie z.B. Flotilline (Rajendran et al., 2003) angereichert. GPI-verankerte Proteine interagieren über ihre langen Fettsäureketten des C-terminalen GPI-Ankers mit *lipid rafts* (Harder und Simons, 1997). Über die genauen Mechanismen, wie Transmembranproteine mit *lipid rafts* interagieren, ist wenig bekannt. Palmitoylierung kann die Affinität eines Membranproteins für *lipid rafts* erhöhen, allerdings ist dies nicht ausreichend für eine Assoziation mit diesen Domänen und nicht alle transmembranalen *rafts*-Proteine sind palmitoyliert (Melkonian et al., 1999). Vermutlich assoziieren Proteine mit *lipid rafts* in unterschiedlichem Ausmaß miteinander und monomere Membranproteine können eine geringe Affinität zu *lipid rafts* haben und sind überwiegend außerhalb der *rafts* anzutreffen. Wenn solch ein Protein allerdings durch einen Liganden kreuzvernetzt wird oder oligomerisiert, kann die Affinität für *rafts* erhöht werden (Harder et al., 1998). Obwohl die Existenz von *lipid rafts* in biologischen Membranen diskutiert wird, ist die Existenz von spezifischen Membran-Mikrodomänen allgemein anerkannt und hat das Verständnis der Membranorganisation nachhaltig geprägt. Viel zum Verständnis von *lipid rafts* haben Untersuchungen von Liposomen und Modellmembran-Systemen beigetragen, deren Lipidzusammensetzung frei definierbar ist (Übersichtsarbeiten siehe Edidin, 2003; Simons und Vaz, 2004; London, 2005). In Modellmembranen, die aus einer Phospholipid-Sphingolipid-Mischung bestehen, tendieren die Sphingolipide dazu sich von den Phospholipiden zu separieren und lagern sich zu dichten Mikrodomänen zusammen. In der Gegenwart von Cholesterol werden die Sphingolipide zu *rafts* kondensiert und bilden eine deutlich geordnete Phase (l_o), die von einer flexibleren und weniger geordneten Phase (l_d) umgeben ist und durch hohe laterale Mobilität gekennzeichnet ist (Crane und Tamm, 2004; Bacia et al., 2005). Im Gegensatz zur geordneten l_o -Phase enthält die ungeordnete l_d -Phase Glycerophospholipide mit überwiegend ungesättigten, abgeknickten Fettsäureketten. Die kompakte Organisation der l_o -Phase lässt sich durch die gesättigten Fettsäureketten der Sphingolipide und Phospholipide erklären, wodurch diese sich lateral dicht aneinanderlagern können und durch schwache Interaktionen zwischen den Kohlenhydrat-Kopfgruppen zusammengehalten werden. Obwohl die genaue Interaktion von Cholesterol mit Sphingolipiden ungeklärt ist, wird angenommen, dass Cholesterol die Sphingolipid-Interaktion stabilisiert, indem es sich bevorzugt in dem Raum zwischen den gesättigten Fettsäureketten der Sphingolipide einlagert (Übersichtsarbeit siehe Simons und Ikonen,

2000). Cholesterol wird dabei als wesentlicher Bestandteil zur Aufrechterhaltung der zwei Phasen angesehen und das Entfernen von Cholesterol aus *lipid rafts*, z.B. durch die Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD), führt zur Dissoziation von *rafts*-assoziierten Proteinen und Lipiden. Biologische Funktionen, die von intakten *rafts* abhängig sind, sind daraufhin blockiert.

Lipid rafts wurden ursprünglich auch als Detergenz-resistente Membranen (DRMs) bezeichnet. Andere Bezeichnungen für *rafts* sind Detergenz-unlösliche, Glykolipid-angereicherte Membranen (DIGs, *detergent-insoluble glycolipid-enriched membranes*) oder Triton-unlösliche, flotierende Fraktionen (TIFF). Diese Bezeichnungen basieren auf den biochemischen Eigenschaften der Membrandomäne, die relativ unlöslich in nicht-ionischen Detergenzien, wie z.B. Triton-X-100, bei niedrigen Temperaturen ist. Nach Behandlung mit kalten Detergenzien können die Lipide der geordnete l_o -Phase, aufgrund ihrer hohen Lipiddichte, und die mit ihr assoziierten Proteine aus den Fraktionen mit geringer Dichte isoliert werden und befinden sich nach Ultrazentrifugation in der oberen Hälfte eines 5-30 %-igen Saccharose-Dichtegradienten (Brown und Rose, 1992). Eine ähnliche, etwas vereinfachte Definition von *rafts* ist das 1 % Triton-X-100-unlösliche Material, welches sich nach Ultrazentrifugation an der Grenzfläche eines 5/30 %-igen Saccharose-Stufengradienten befindet (Hope und Pike, 1996). DRMs scheinen sich direkt von *rafts* ableiten zu lassen, da sie mit Sphingolipiden und Cholesterol angereichert sind und sich in der l_o -Phase befinden, wenn sie aus eukaryotischen Zellen isoliert werden. Obwohl die Isolierung von DRMs die häufigste biochemische Methode ist, um *lipid rafts* zu charakterisieren, unterliegt sie einigen Einschränkungen. Die DRM-Fraktionen sind Aggregate, die sämtliche zelluläre *raft*-Domänen enthält und daher nicht den natürlichen Zustand von *Lipid rafts* in Zellmembranen darstellt (Munro, 2003). Neuere Methoden erlauben die Analyse von *Lipid rafts* in lebenden Zellen. Mit Hilfe der *fluorescence resonance energy transfer* Technik (FRET) (Kenworthy et al., 2000), der *single molecule microscopy* (Schutz et al., 2000) und der *photonic force microscopy* (Pralle et al., 2000) konnten Fragen hinsichtlich der Größe und Struktur von nativen *rafts* an der Oberfläche von lebenden Zellen beantwortet werden.

1.5.2 Funktionelle Eigenschaften der *lipid rafts*

Der Nachweis, dass apikale Membrandomänen in polarisierten Epithelzellen im Vergleich zu basolateralen Membrandomänen stark mit Glykosphingolipiden angereichert

sind, führte zu den ersten funktionellen Untersuchungen von Membranmikrodomänen (Rodriguez-Boulán et al., 1978). Es wurde vermutet, dass die unterschiedliche Zusammensetzung der Membran auf die Sortierung von Lipiden und Proteinen in speziellen Mikrodomänen des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) und durch einen gerichteten Transport zur apikalen Membran zurückzuführen ist (Van Meer und Simons, 1988). *Lipid rafts* spielen eine wichtige Rolle bei der Sortierung von Proteinen (Übersichtsarbeit siehe Rajendran und Simons, 2005). Eine wesentliche Eigenschaft von *lipid rafts* ist die Dynamik dieser Domänen, die dazu führt, dass separate *rafts*-Domänen sich zu größeren Clustern zusammenlagern und auch wieder voneinander separiert werden können (Pralle et al., 2000). Dadurch werden sowohl Lipide, als auch Proteine selektiv eingeschlossen bzw. werden ausgegrenzt. Durch diese Eigenschaft nehmen *rafts* eine zentrale Rolle in vielen zellulären Prozessen ein. Eine wichtige Funktion ist die Regulation der Signaltransduktions-Kaskaden. Komplexe der Signaltransduktionskomponenten, die zuvor voneinander isoliert sind, werden durch Bindung an Liganden so in engen Kontakt miteinander gebracht, wodurch die Signalkaskade gestartet wird. Im Gegensatz dazu können Inhibitoren der Signaltransduktion selektiv ausgegrenzt werden. Funktionelle Eigenschaften der *rafts* wurden bei Signalwegen von Immunrezeptoren, wie z.B. dem IgE-Rezeptor (FcεRI), dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und B-Zell-Rezeptor (BCR) gezeigt (Übersichtsarbeit siehe Simons und Toomre, 2000). Caveolae, eine spezielle Form von *lipid rafts*, bei denen es sich um sackförmige Einbuchtungen der Plasmamembran handelt, die durch die Polymerisierung von Caveolin gebildet werden, sind an endozytotischen und transzytotischen Prozessen beteiligt (Schnitzer et al., 1994; Parton, 1996; Mukherjee et al., 1999). Des Weiteren scheint ein Zusammenhang zwischen *lipid rafts* und Morbus Alzheimer zu bestehen (Ehehalt et al., 2003) und viele Pathogene, wie Viren, Bakterien und Parasiten „missbrauchen“ *lipid rafts* als Eintrittspforte um in die Wirtszelle zu gelangen (Simons und Ehehalt, 2002).

1.5.3 *Lipid rafts* und Viruseintritt

Viren haben unterschiedliche Strategien entwickelt, um in Wirtszellen einzudringen und nutzen ebenfalls die heterogene Verteilung von Lipiden in der Plasmamembran, um in die Zielzelle zu gelangen. *Lipid rafts* stellen ein geeignetes Milieu bereit, um Proteine selektiv zu konzentrieren und somit Protein-Protein-Interaktionen zu erhöhen, die entscheidend für eine Virusinfektion und Replikation sein können. Eine Beteiligung von *lipid rafts* wurde ebenfalls bei unbehüllten Viren gezeigt. Im Gegensatz zu unbehüllten Viren, bei denen *lipid*

rafts nur auf zellulärer Seite beim Viruseintritt eine Rolle spielen, können bei behüllten Viren sowohl *raft*- Domänen auf zellulärer Seite, als auch in der Virusmembran von Bedeutung sein (Übersichtsarbeit siehe Chazal und Gerlier, 2003). Beim Mäuse-Leukämievirus wurde gezeigt, dass nur der Entzug von zellulärem Cholesterol die Infektion beeinträchtigt und Cholesterol in der Virusmembran unbedeutend ist (Lu et al., 2002). Der gegenteilige Fall liegt bei Influenzaviren und dem Hundestaube-Virus vor, bei dem nur das Cholesterol der Virusmembran für eine effiziente Infektion wichtig ist (Sieczkarski und Whittaker, 2002; Sun und Whittaker, 2003; Takeda et al., 2003; Imhoff et al., 2007). Einige Viren, z.B. das humane Immunodefizienzvirus (HIV) und das Herpes Simplex-Virus, benötigen Cholesterol in beiden Membranen (Liao et al., 2001, 2003; Graham et al., 2003; Bender et al., 2003; Lee et al., 2003) und im Gegensatz dazu weist das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) keine verminderte Infektiösität auf, wenn Cholesterol auf zellulärer oder viraler Seite entzogen wird (Popik et al., 2002; Thorp und Gallagher, 2004; Imhoff et al., 2007). Für einige Coronaviren - das Maus-Hepatitisvirus (MHV), das Virus der infektiösen Bronchitis (IBV) und das humane Coronavirus 229E (HCoV-229E) - wurde ebenfalls gezeigt, dass die Infektiösität nach Entzug von zellulärem Cholesterol beeinträchtigt ist (Nomura et al., 2004; Thorp und Gallagher, 2004; Imhoff et al., 2007).

Viren nutzen verschiedene endozytische Wege, um in die Wirtszelle zu gelangen. Neben der klassischen Clathrin-vermittelten (*lipid raft*-unabhängig) Endozytose werden Viruspartikeln unter Beteiligung von *lipid rafts* insbesondere über Caveolae-vermittelte, aber auch andere, bisher wenig charakterisierte Caveolae-unabhängige, *rafts*-assoziierte Mechanismen internalisiert (Pelkmans, 2005). Für das unbehüllte *Simian virus 40* (SV40) wurde gezeigt, dass es zunächst an Moleküle des *major histocompatibility complex* der Klasse 1 bindet, die nicht in DRMs vorkommen. Daraufhin werden Signale induziert, die eine Assoziation mit Caveolae in Detergenz-unlöslichen Domänen fördert, gefolgt von Caveolae-vermittelter Endozytose (Stang und Bakke, 1997; Anderson et al., 1998; Chen und Norkin, 1999). Das Humane Coronavirus 229E interagiert ebenfalls mit Caveolae und wird über diesen Weg internalisiert (Nomura et al., 2004). Die Eigenschaft, dass *lipid rafts* als Plattform dienen um Proteine zu konzentrieren ist ebenfalls von Bedeutung für den Eintritt von Viren. HIV infiziert empfängliche Zellen über die initiale Bindung an CD4 und eine sekundäre Assoziation mit den Korezeptoren CXCR4 oder CCR5, wobei durch die Bindung an die Korezeptoren eine Konformationsänderung des gp120 erfolgt und in der Exposition der fusogenen Domäne des transmembranalen Glykoproteins gp41 resultiert. Im Gegensatz zu CD4 und CCR5, die beide *rafts*-assoziiert sind, wurde gezeigt, dass CXCR4 kein *raft*-

Protein ist (Kozak et al., 2002; Popik et al., 2002). Vermutlich erfolgt nach der Bindung an CD4 eine Umverteilung der Proteine und assoziierter Lipide außerhalb der bevorzugten Membrenumgebung, gefolgt von der Assoziation mit CXCR5. Dies führt zu der Destabilisierung der Membran, wodurch vermutlich die nachfolgende Fusion erleichtert wird (Kozak et al., 2002). Cholesterol scheint für das Clustering und die nachfolgende korrekte Konformation der Rezeptor-Korezeptorkomplexe notwendig zu sein und der Entzug führt zu verminderter Membranfusion (Nguyen und Taub, 2002; Viard et al., 2002; Manes et al., 2003). Für das HA-Protein der Influenzaviren wurde gezeigt, dass *raft*-Domänen in der Virusmembran notwendig sind, um mehrere HA-Trimere zu konzentrieren, die für eine effiziente Membranfusion Voraussetzung ist (Takeda et al., 2003). Ein anderer Mechanismus für *raft*-vermittelte Fusion wurde für das *Semliki Forest virus* (SFV) gezeigt. Das Fusionspeptid des E1-Glykoproteins von SFV interagiert direkt mit Cholesterol-Sphingolipid-angereicherten Membrandomänen (Ahn et al., 2002) und eine direkte Interaktion des E1-Proteins mit Cholesterol konnte gezeigt werden (Klimjack et al., 1994)

Für einige Coronaviren wurde bereits gezeigt, dass zelluläres Cholesterol eine entscheidende Rolle während der Virusreplikation spielt, obwohl die genauen Mechanismen unbekannt sind (Nomura et al., 2004; Thorp und Gallagher, 2004). Der Rezeptor von MHV – das Zelladhäsionsmolekül aus der Familie der karzinoembryonalen Antigene (CEACAM) – ist größtenteils nicht mit *rafts* assoziiert und Zell-gebundenes Virus ist ebenfalls nicht in DRMs nachweisbar. Allerdings scheint eine Umverteilung der Membran zu erfolgen, da nach der Fusion sowohl das CEACAM als auch das MHV-S-Protein in DRMs lokalisiert ist. Vermutlich spielen bei dieser Umverteilung bisher unbekannt zelluläre Faktoren eine Rolle (Choi et al., 2005). Der molekulare Mechanismus und die Bedeutung von Cholesterol während der SARS-Infektion war bei Beginn der Doktorarbeit noch nicht untersucht worden. Neben dem Viruseintritt sind *lipid rafts* auch von Bedeutung für die Virusreifung und die Freisetzung von vielen behüllten Viren an der Plasmamembran infizierter Zellen. Eine Übersicht geben Chazal und Gerlier (2003).

2 ZIELSETZUNG

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des S-Proteins des SARS-CoV in den initialen Schritten der Infektion. Die Untersuchung des S-Proteins soll durch die Verwendung des replikationsdefekten Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) erfolgen. Diese sogenannten Pseudoviren enthalten in der Virushülle das S-Protein des SARS-assoziierten Coronavirus (VSV- Δ G-S) und erlauben funktionelle und strukturelle Untersuchungen des S-Proteins und des S-vermittelten Eintritts in Wirtszellen. Zunächst soll im Zellkultursystem die Infektion polarer Epithelzellen untersucht werden, um die Funktionalität der Pseudoviren zu überprüfen. Dazu werden Epithelzellen auf Zellkultureinsätzen kultiviert, wodurch eine Ausdifferenzierung *in vitro* ermöglicht wird. Die Infektion unterschiedlicher Zelltypen wird Aufschluss über den Tropismus von SARS-CoV geben und zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des SARS-assoziierten Coronavirus führen. Als zentrales Ziel dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Membrankomponenten der Zielzellen eine Rolle bei einer SARS-CoV-Infektion spielen. Für das murine Coronavirus Maus-Hepatitisvirus wurde gezeigt, dass die Infektion von zellulärem Cholesterol abhängt. Durch Behandlung von Zielzellen mit Methyl- β -cyclodextrin wurde zelluläres Cholesterol teilweise entzogen, wodurch diese Zellen weniger empfänglich für eine Infektion waren. Mit Hilfe der SARS-Pseudoviren soll nun untersucht werden, in welchem Ausmaß zelluläres Cholesterol beim Replikationszyklus von SARS-CoV eine Rolle spielt. Wenn eine Cholesterolabhängigkeit festgestellt wird, soll differenziert werden, ob bereits die Bindung des Virus an die Zellen beeinträchtigt ist, oder die anschließende Membranfusion betroffen ist. In diesem Zusammenhang soll ebenfalls untersucht werden in welche Membrandomäne das ACE2 sortiert wird, da für einige Viren ein Zusammenhang zwischen der Rezeptorlokalisierung und Cholesterol-angereicherten Membrandomänen, sog. *lipid rafts*, gezeigt werden konnte.

3 MATERIAL

3.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit folgenden adhärent wachsenden, permanenten Zelllinien gearbeitet:

Tabelle 3-1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Ursprung	Eigenschaften	Quelle
BHK21	Syrischer Goldhamster	Nierenepithel	Nicht-polar, fibroblastoid	DSMZ Nr. ACC 61
BHK-G43	Syrischer Goldhamster	Nierenepithel, modifiziert	BHK-21 Abkömmling, exprimiert das Glykoprotein G des Virus der Vesikulären Stomatitis in einem induzierbaren System	Dr. Schwegmann-Weßels, Institut für Virologie, TiHo Hannover (Hanika et al., 2005)
BHK-SΔ18	Syrischer Goldhamster	Nierenepithel, modifiziert	BHK21 Abkömmling, exprimiert das Glykoprotein S des SARS-CoV in einem induzierbaren System	Zelllinie wurde im Rahmen der Arbeit erzeugt. (siehe 4.1.6)
BHKswitch	Syrischer Goldhamster	Nierenepithel modifiziert	BHK21 Abkömmling, enthält das pSwitch-Plasmid des GeneSwitch System, Invitrogen	Dr. Schwegmann-Weßels, Institut für Virologie, TiHo Hannover
Vero CCL-81	Grüne Meerkatze	Nierenepithel	Nicht-polar, epithelial	ATCC Nr. CCL-81; PD Dr. Zimmer, Inst. f. Virologie, TiHo Hannover
Vero E6 (Vero C1008)	Grüne Meerkatze	Nierenepithel, Klon E6 von Vero 76 (ATCC Nr. CRL-1587)	Polar, epithelial	CCLV – Insel Riems; RIE 929
293T	Human	Nierenepithel	Nicht-polar, epithelial;	ATCC Nr. CRL-11268
Caco-2	Human	Kolon, Adenokarzinom	Polar, epithelial	ATCC Nr. HTB-37;
Calu-3	Human	Lunge, Adenokarzinom	Polar, epithelial	ATCC Nr. HTB-55;

3.2 Viren

VSV-ΔG-G

Dieses Virus wurde von Herrn Dr. Zimmer, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein rekombinantes Virus der vesikulären Stomatitis (VSV), bei welchem das Gen für das G-Protein durch das grün fluoreszierende Protein (eGFP) Gen ersetzt wurde (VSV-ΔG). Dieses Virus ist nicht infektiös, sofern nicht das VSV-G-Protein oder ein anderes fremdes Oberflächenglykoprotein *in trans* zur Verfügung gestellt wird, z.B. durch Transfektion von Zellen, welches Rezeptorbindung und Membranfusion vermittelt.

VSV-ΔG-S

Dieses Virus wurde durch Infektion SARS-CoV-S-Protein-exprimierender Zellen mit VSV-ΔG-G erzeugt. Ähnlich wie im lentiviralen Pseudovirussystem wurde die höchste Infektiösität dieser Viren erreicht, wenn der zytoplasmatische Abschnitt des S-Proteins teilweise verkürzt wurde (Nie et al., 2004). Dem verwendeten S-Protein fehlen 18 C-terminale Aminosäuren im zytoplasmatischen Abschnitt.

Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner (IBV)

Der apathogene IBV-Beaudette-Stamm (IBV Beaudette-US) wurde von Dr. Dave Cavanagh, Compton Laboratory, UK, zur Verfügung gestellt.

3.3 Bakterien

XL-1 Blue, *Escherichia coli* (*E.coli*) MRF'

XL-1 Blue, *E.coli* MRF' wurden von der Firma Stratagene erworben. Diese Bakterien wurden während dieser Arbeit chemisch kompetent gemacht und bei der Hitzeschocktransformation der aufgeführten Plasmide verwendet.

3.4 Plasmide

Tabelle 3-2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Insert	Quelle
pBabe-synS,	Synthetisches Kodon-optimiertes SARS-CoV S-Protein, Stamm BJ01;	Dr. Honkui Deng, Department of Cell Biology and Genetics, College of Life Sciences, Peking University, Peking, China
pGeneC-synSΔ18	Synthetisches Kodon-optimiertes SARS-CoV S-Protein, Stamm BJ01; 18-Aminosäure Deletion im zytoplasmatischen Abschnitt	Während dieser Arbeit erzeugtes Konstrukt. pGeneC – Vektor des GeneSwitch Systems, Firma Invitrogen
pCG1-SΔ18	SARS-CoV S-Protein, Stamm CUHK-W1; 18-Aminosäure Deletion im zytoplasmatischen Abschnitt	Selbst erzeugtes Konstrukt während der Diplomarbeit am Institut für Virologie, TiHo Hannover
pAB-SARS-CoV S1-IgG	SARS-CoV S1-IgG Fusionskonstrukt zur Expression eines löslichen S-Proteins	Dr. S. Pöhlmann, Abteilung Virologie der Medizinischen Hochschule Hannover
pcDNA.3.1-VSV-G	Glykoprotein des Virus der vesikulären Stomatitis (VSV)	Dr. Gert Zimmer, Institut für Virologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

3.5 Antikörper

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

Tabelle 3-3: Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezifität/ Epitop	Herkunft/ Isotyp	Verdünnung	Anwendung	Bezugsquelle/ Katalog-Nr.
anti-SARS	SARS-CoV Antigene	Kaninchen- serum	1:500	IF/WB/IP	Dr. Markus Eickmann Philips Universität Marburg
anti-IBV Bd.	IBV Bd. Antigene	Kaninchen- serum	1:200	IF	Dr. Christine Winter TiHo Hannover
anti-VSV	VSV Antigene	Kaninchen- serum	1:1000	VSV-ΔG-G Inaktivierung	Dr. Gert Zimmer TiHo Hannover
anti-ACE2	humanes ACE2	Ziege IgG gereinigt	1:50	IF/WB	R&D Systems Cat. AF933
anti-LAMP-2	humanes CD107b	Maus IgG monoklonal	1:2000	WB	BD Pharmingen Cat. 555803
anti-Flotillin-2	humanes Flotillin-2	Maus IgG monoklonal	1:2000	WB	BD Pharmingen Cat. 610383
anti-TfR	humaner TfR	Maus IgG monoklonal	1:500	IF	Zymed Laboratories Cat. 13-6800

Tabelle 3-4: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Spezifität/ Konjugat	Verdünnung	Anwendung	Bezugsquelle/ Katalog-Nr.
anti-Ziege FITC	Ziege IgG-FITC	1:200	IF	Sigma Cat. F7367
anti-Maus FITC	Maus IgG-FITC	1:200	IF	Sigma Cat. F0257
anti-Kaninchen FITC	Kaninchen IgG-FITC	1:200	IF	Sigma Cat. F9887
anti-Ziege Cy3	Ziege IgG-Cy3	1:500	IF	Abcam Cat. ab6949
anti-Maus Cy3	Maus IgG-Cy3	1:500	IF	Sigma Cat. C2181
anti-Maus HRP	Maus Peroxidase	1:1000	WB	DAKO Cat. P0260
anti-Ziege HRP	Ziege Peroxidase	1:1000	WB	DAKO Cat. P0449

3.6 Zellkulturmedien

Alle Medien, Puffer, Lösungen und Reagenzien wurden bei 4 °C gelagert, wenn nicht anders angegeben.

Medien

DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium), pH 6,9

EDulb-Fertigpulver	13,53 g	GIBCO/Invitrogen
NaHCO ₃	2,20 g	Merck
<i>Aqua bidest. ster.</i>	ad 1 l	

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), pH 7,0

EMEM-Fertigpulver	9,60 g	GIBCO/Invitrogen
NaHCO ₃	2,20 g	Merck
<i>Aqua bidest. ster.</i>	ad 1 l	

Bei Antibiotika-haltigem Medium wurde 0,06 g Penicillin und 0,05 g Streptomycin-Sulfat (beide von Sigma) pro Liter Medium zugesetzt. Der pH-Wert wurde durch CO₂-Begasung eingestellt.

Methylzellulose

Methylzellulose, 4000 centipoises	0,8 % (w/v)	Sigma
FKS	3,0 % (v/v)	Biochrom AG
In EMEM mit Standard-Antibiotika Cocktail (Sigma)		

Einfriermedium

FKS	20%	Biochrom AG
DMSO	10%	Merck

Versen-Trypsin 0,125%, pH 7,0

NaCl	8,00 g	Merck
KCl	0,20 g	AppliChem
Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O	2,31 g	Merck
KH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O	0,20 g	Merck

CaCl ₂	0,13 g	Merck
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,10 g	Merck
Trypsin (3 U/mg)	1,25 g	GIBCO/Invitrogen
Versen (Titrplex III)(EDTA)	1,25 g	Merck
Streptomycinsulfat	0,05 g	Sigma
Penicillin G	0,06 g	Sigma
<i>Aqua bidest. ster.</i>	ad 1 l	

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,0 eingestellt.

Alle Reagenzien für die Zellkultur wurden nach ihrer Herstellung durch 0,2 µm Filter steril filtriert.

Zellkulturzusätze

Fetales Kälberserum (FKS), auf Mykoplasmen getestet	Biochrom AG
Nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG
MEM Natriumpyruvat	GIBCO/Invitrogen
L-Glutamin	GibCO/Invitrogen

3.7 Bakterienkulturmedien

Luria-Bertani (LB-Medium), pH 7,0

Trypton	10 g	AppliChem
NaCl	10 g	AppliChem
Hefe-Extrakt	5 g	Roth
Reinstwasser	ad 1 l	

Bei Bedarf wurden 20 g Agar-Agar/l Medium hinzugefügt (Roth). Das LB-Medium wurde unter Rühren hergestellt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde das Medium in der Mikrowelle erhitzt und im Wasserbad auf ca. 48 °C abgekühlt. Unmittelbar vor dem Gießen in Petrischalen wurde dem Medium Ampicillin zugegeben (50 mg/l Medium; Roth).

3.8 Puffer und Lösungen

10 x TBE-Puffer, pH 8,0

TRIS	108 g	AppliChem
Borsäure	53,4 g	AppliChem
EDTA	7,4 g	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

10 x TAE-Puffer, pH 8,0

TRIS	48,4 g	Roth
Essigsäure	11,4 ml	Roth
EDTA, 0,5 M	20 ml	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

PBS, 1 x

NaCl	8,0 g	AppliChem
KCl	0,2 g	AppliChem
Na ₂ HPO ₄	1,15 g	Merck
KH ₂ PO ₄	0,2 g	Merck
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 g	Merck
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,13 g	Merck
<i>Aqua bidest</i> , pH 7,2	ad 1 l	

PBSM, 10 x

NaCl	80,0 g	AppliChem
KCl	2,0 g	AppliChem
Na ₂ HPO ₄	11,5 g	Merck
KH ₂ PO ₄	2,0 g	Merck
<i>Aqua bidest</i> , pH 7,2	ad 1 l	

PBSM 0,1% Tween 20

PBSM	1 l	
Tween	1 ml	Roth

TFB-I-Puffer

CaCl ₂	10 mM	Roth
Glycerin	15 % (v/v)	AppliChem
Kaliumacetat, pH 5,8	30 mM	Merck
Rubidiumchlorid	100 mM	Merck
Manganchlorid	50 mM	Merck

TFB-II-Puffer

MOPS, pH 7,0	10 mM	Sigma
Rubidiumchlorid	10 mM	Merck
Manganchlorid	50 mM	Merck
CaCl ₂	75 mM	Roth
Glycerin	15 % (v/v)	AppliChem

SDS-Laufpuffer, 10 x

SDS	10,0 g	Roth
TRIS	30,0 g	AppliChem
Glycin	44,0 g	AppliChem
H ₂ O	ad 1 l	

MOPS-Laufpuffer, 20 x, pH 7,0

MOPS	0,4 M	Sigma
Na-acetat	160 mM	Sigma
EDTA	20 mM	Roth
H ₂ O	ad 1 l	

Der MOPS-Puffer wurde anschließend autoklaviert.

Sammelgel, 2 ml-Ansatz

H ₂ O	1,4 ml	
TRIS/HCl (1M) pH 6,8	0,25 ml	AppliChem
Acrylamidlösung 30% rotiphorese Gel 30	0,33 ml	Roth
SDS 10% (in H ₂ O)	20 µl	Roth
APS 10% (in H ₂ O)	20 µl	AppliChem
TEMED	2 µl	AppliChem

Trenngellösung, 8%, 5 ml Ansatz

H ₂ O	2,3 ml	
TRIS/HCl (1M) pH 6,8	1,3 ml	AppliChem
Acrylamidlösung 30% rotiphorese Gel 30	1,3 ml	Roth
SDS 10% (in H ₂ O)	50 µl	Roth
APS 10% (in H ₂ O)	50 µl	AppliChem
TEMED	6 µl	AppliChem

SDS-Probenpuffer, 2 x

0,5 M TRIS/HCl (pH 6,8)	10 ml	AppliChem
10% SDS	20 ml	Roth
Glycerin	10 ml	AppliChem
2% Bromphenolblau (20 mg/ml in H ₂ O)	1 ml	Merck
H ₂ O	9 ml	

Anoden-Puffer I, pH 9,0

TRIS (1M)	300 ml	Roth
Ethanol	200 ml	AppliChem
H ₂ O	500 ml	
pH-Wert mit HCl einstellen		

Anoden-Puffer II, pH 7,4

TRIS (1 M)	25 ml	Roth
Ethanol	200 ml	AppliChem
H ₂ O	770 ml	
pH-Wert mit HCl einstellen		

Kathodenpuffer, pH 9,0

TRIS (1 M)	25 ml	Roth
Aminocaprinsäure	, 25 g	Sigma
Ethanol	200 ml	AppliChem
H ₂ O	770 ml	
pH-Wert mit HCl einstellen		

Paraformaldehyd, 3%, pH 7,4

Paraformaldehyd	3 g	AppliChem
PBSM	100 ml	
Paraformaldehyd unter Rühren bei 80°C lösen, steril filtrieren und Aliquots bei -20°C lagern.		

Mowiol, pH 8,5

Mowiol 4-88	12 %	Hoechst
Glycerin	30 %	Roth
1,4-Diazobicyclo-[2.2.2]-oktan (DABC)	2,5 %	Sigma
TRIS/HCl	0,12 M	

NP40-Lysispuffer für 50 ml, pH 7,5

Natriumdesoxycholat	0,5 %	Roth
Nonidet P40	1 %	Roche
TRIS HCl, pH 7,5	50 mM	Roth
NaCl	150 mM	Merck
Proteaseinhibitor "Complete"	1 Tablette	Roche

DAPI-Färbelösung

DAPI	10 µg	Sigma
Ethanol	ad 10 ml	AppliChem

3.9 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech AG in Ebersberg synthetisiert und mit einer Konzentration von 10 pmol/µl in der PCR eingesetzt.

Primer für die Klonierung von pGeneC-synSA18:

SynthS_S(BamHI): 5'-TTT TGG ATC CAT CAT GGA TGC AAT GAA GAG AGG GCT CTG-3'

SynSdel18_AS(EcoRI): 5'-TTT TGA ATT CTC ACT TCA GGC AGC TGC AGC AGC TGG TCA T-3'

Sequenzierprimer:

synS_AS800:	5'-.GGC GGG GCT GAA GGC GGT CA -3'
synS_AS1600:	5' - GCA GGA GCG TTC AGC AGC TCG-3'
synS_AS2400:	5' -TTG GGG TCT TGT ACA TCT GC-3'
synS_AS3200:	5' -GCC GTG GGG GGC GGC CTG GG-3'
pGeneA-S:	5' -CTG CTA TTC TGC TCA ACC T-3'

3.10 Enzyme

BamHI (10 U/μl)	MBI Fermentas
EcoRI (10 U/μl)	Gibco BRL
T4-DNA-Ligase (5 U/μl)	MBI Fermentas
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U /μl)	MBI Fermentas
Streptavidin-Peroxidase (HRP)-Komplex	Amersham/Pharmarcia

3.11 Kits

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid MIDI und MAXI Kit	Qiagen
QIAex II Gel Extraction Kit	Qiagen
Amplex Red Cholesterol Assay Kit	Invitrogen
BCA Protein Assay Kit	Pierce

3.12 Substrate

BM Chemoluminescence Blotting Substrate (POD)	Roche
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche

3.13 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Superfect	Qiagen

3.14 Technische Geräte und Software

TECAN GENios Pro mit Magellan Software V5.00	Tecan
BIO RAD Chemi Doc Imaging System mit Quantity One Analyse Software V4.4.0	BIO-RAD
Coulter Epics XL Durchflusszytometer mit Epics Analysesoftware	Beckman Coulter
Axiophot 2 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
IRM DB Confocal Lasermicroscope	Leica
Millicell-ERS Ohm meter	Millipore
Corel Draw V12	Corel Corporation
Adobe Photoshop CS	Adobe

3.15 Sonstige Reagenzien und Chemikalien

Accutase	PAA
Agarose	Biozym

Ampicillin	Roth
α -Cyclodextrin	Sigma
BODIPY FL C ₁₂	Invitrogen
Blocking-Reagenz	Roche
Bovines Serumalbumin	AppliChem
Complete, Proteaseinhibitorcocktail	Roche
Cholera Toxin B-Untereinheit, FITC-Konjugat	Sigma
Cholesterol:M β CD-wasserlöslicher Komplex	Sigma
DEPC-behandeltes Wasser	Roth
dNTP	MBI Fermentas
Ethidiumbromid	Sigma
Gene Ruler 100 bp Ladder Plus	MBI Fermentas
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
Hygromycin B	PAA Laboratories
Lipofectamine 2000 Transfektionsreagenz	Invitrogen
Methyl- β -Cyclodextrin	Sigma
Nonidet® P40 (4-Nonylphenolpolyethylenglykol)	Roche
OptiPrep, 60 %-ige Iodixanol-Lösung	Sigma
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	MBI Fermentas
2-Propanol (Isopropanol)	Roth
Saccharose	Roth
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce
Triton-X-100	Roth
Tween 20	Roth
Zeocin	InvivoGen

4 METHODEN

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zellkultur und Zellkulturmedien

Alle Zelllinien wurden als adhärenz Zellmonolayer in der Anwesenheit von 5-10 % Hitze-inaktiviertem foetalem Kälberserum (FKS) und entsprechenden Zellkulturzusätzen (Tabelle 4-1) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in 75 cm²-Zellkulturflaschen (Nunc) propagiert und 2-3 x wöchentlich passagiert. Die Zellen wurden dazu einmal kurz mit 10 ml V-Trypsin gewaschen und mit 1 ml V-Trypsin für 5-15 min im Brutschrank vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und im Verhältnis 1:10 bis 1:20 in einem Volumen von 20 ml Zellkulturmedium umgesetzt. Zellen, welche für Versuche benötigt waren, wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und ausgesät.

4.1.2 Kultivierung von Zellen auf mikroporösen Membranfiltereinsätzen

Calu-3-, Caco-2-, Vero E6- oder MDCKII-Zellen wurden auf mikroporösen Membranfiltereinsätzen kultiviert. Es wurden transluzente Filtereinsätze mit einer Porengröße von 1,0 µm und einem Durchmesser von 8,4 mm (24-Napf Einsätze) der Firma Greiner Bio-One verwendet. Pro cm² Filtermembran wurden 1,3 x 10⁵ Zellen in einem Volumen von 200 µl in die apikale Kammer überführt; in die basolaterale Kammer wurden 700 µl Zellkulturmedium vorgelegt. Die Filtereinsätze wurden für 4-5 Tage im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert, wobei jeden Tag das Medium der apikalen und basolateralen Kammer gewechselt wurde. Zur Bestimmung des polaren Differenzierungsgrades wurden täglich die transepithelialen Widerstände (TER) zwischen der apikalen und basolateralen Kammer gemessen.

Tabelle 4-1: Zellkulturbedingungen der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zellkulturmedium	Zellkulturzusätze	Selektive Antibiotika
BHK21	EMEM		
BHK-G43	EMEM		Zeocin (0,5 mg·ml ⁻¹); Hygromycin B (0,25 mg·ml ⁻¹)
BHK-SΔ18	EMEM		Zeocin (0,5 mg·ml ⁻¹); Hygromycin B (0,25 mg·ml ⁻¹)
BHKswitch	EMEM		Hygromycin B (0,25 mg·ml ⁻¹)
Vero CCL-81	DMEM		
Vero E6	EMEM		
293T	DMEM		
Caco-2	EMEM	2 mM L-Glutamin; 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren; 1,0 mM Na-Pyruvat	
Calu-3	EMEM	2 mM L-Glutamin; 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren; 1,0 mM Na-Pyruvat	
MDCK2	EMEM	2 mM L-glutamine	

4.1.3 Anlegen von Gefrierkulturen und Auftauen von Zellen

Zur Konservierung von Zelllinien wurden Gefrierkulturen angelegt, welche bei -80°C gelagert wurden. Subkonfluente Zellmonolayer wurden mit 1 ml V-Trypsin von dem

Gefäßboden gelöst, in 9 ml Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei 400 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach Verwerfen des Kulturüberstandes in 3 ml Einfriermedium resuspendiert und zu 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen portioniert. Um die Zellen kontinuierlich herunterzukühlen wurden sie in Isopropanol-gefüllten Gefrierbehältern bei -80°C eingefroren und gelagert. Zum Auftauen der Gefrierkulturen wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, mit 10 ml Medium versetzt und für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und die Zellen unter den angegebenen Bedingungen (Tabelle 4-1) kultiviert.

4.1.4 DAPI-Test

Die Zellen wurden alle 4-6 Wochen auf Mykoplasmenkontamination untersucht. Die zu untersuchenden Zellen wurden einige Stunden vor dem Test auf Deckgläschen in 24-Napf-Kulturschalen dünn ausgesät, so dass sie im Test vereinzelt vorlagen. Nach einer Inkubation von 3 – 4 Stunden wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und anschließend wurden 250 µl DAPI-Lösung zu den Zellen gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde die DAPI-Lösung abgenommen und die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Die zu untersuchenden Deckgläschen wurden auf Objektträger gebracht und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

4.1.5 Transfektion eukaryotischer Zellen

Unter Transfektion wird das Einführen von nackter DNA in eukaryotische Zellen verstanden. Die DNA wird in Form von Plasmiden unter Verwendung eines Transfektionsreagenz in die Zelle gebracht. Für die Transfektion von BHK-Zellen (BHK-SΔ18 und BHK21) wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) verwendet. Für die Erzeugung der BHK-SΔ18-Zelllinie wurde das Transfektionsreagenz Superfect (Qiagen) verwendet. Alle Transfektionen erfolgten nach den Protokollen der Hersteller in Serum-freiem Medium.

4.1.6 Erzeugung der BHK-SΔ18-Zelllinie

Es wurde eine Zelllinie erzeugt, die eine verkürzte Version des SARS-CoV S-Proteins konstitutiv exprimiert (Deletion von 18 C-terminalen Aminosäuren). Zur Erzeugung der

stabilen Zelllinie wurde das *GeneSwitch*[™] System der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden $7,5 \times 10^5$ BHKswitch-Zellen in einem Volumen von 5 ml in 60 mm Schalen ausgesät, so dass am folgenden Tag ein 90 % konfluenter Zellrasen vorlag. Die Zellen wurden mit 10 µg des Expressionsplasmids pGeneC-synSA18 und 20 µl Superfect (Qiagen) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit V-Trypsin abgelöst, 1:2 gesplittet und in eine 25 cm² Zellkulturflasche mit 5 ml Medium, 10 % FKS und zur Selektion Zeocin (1 mg·ml⁻¹) und Hygromycin B (0,5 mg·ml⁻¹) überführt. Die Zellen wurden für 14 Tage in Selektionsmedium gehalten, wobei sie alle 3-4 Tage in einem Verhältnis von 1:5 umgesetzt wurden. Einzelklone wurden durch limitierende Verdünnung isoliert. Dazu wurden die Zellen ausgezählt und auf 10 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurde in die Näpfe von 5 x 96-Napf Mikrotiterplatten überführt und anschließend wurde pro Napf 100 µl Selektionsmedium dazugegeben, so dass eine Endkonzentration von 5 % FCS, 0,5 mg·ml⁻¹ Zeocin und 0,25 mg·ml⁻¹ Hygromycin B vorlag. Die 96-Napf Mikrotiterplatten wurden nach 3-4 Tagen nach einzelnen Zellklonen untersucht und einzelne Klone wurden in 24-Napf Makrotiterplatten überführt. Es wurden sechs Klone ausgewählt, in 25 cm² Zellkulturflaschen überführt und auf die Expression des SARS-CoV S-Proteins durch Immunfluoreszenzmikroskopie und Oberflächenbiotinylierung untersucht. Desweiteren wurden die sechs Zellklone auf eine produktive Erzeugung von VSV-ΔG-S getestet (siehe 4.2.2). Ein positiver Klon wurde ausgewählt und in Kultur gehalten.

4.2 Virologische Methoden

4.2.1 Erzeugung von VSV-ΔG-G

Für die Herstellung von VSV-ΔG-G Viren wurden BHK-G43-Zellen genutzt (Hanika et al., 2005), die durch ein induzierbares Expressionssystem das Glykoprotein G von VSV nach Zugabe des Induktors Mifepriston exprimieren (*GeneSwitch*[™] System, Invitrogen). Die Herstellung erfolgte in 6-Napf-Kulturschalen wobei 6×10^5 Zellen in einem Volumen vom 3 ml/Napf ausgesät wurden, so dass sie nach 24 h zu 80 % konfluent waren. Zur Expression des G-Proteins wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und 10^{-8} M Mifepriston zugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen; anschließend wurde der Zellrasen mit 250 µl einer VSV-ΔG-G-Virussuspension infiziert. Die Infektion erfolgte für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ auf einem Schwenker, um eine gleichmäßige

Virusadsorption zu ermöglichen. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und jedem Napf 3 ml Medium + 3% Serum und 10^{-8} M Mifepriston zugegeben. Nach 24 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand der einzelnen Nöpfe abgenommen, gesammelt und die Zelltrümmer bei 2800 x g für 2 x 20 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in 1 ml Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.2 Erzeugung von VSV-ΔG-S Pseudoviren

Für die Herstellung von VSV-ΔG-S Pseudoviren wurden BHK-SΔ18-Zellen genutzt, die durch ein induzierbares Expressionssystem das SARS-CoV S-Protein nach Zugabe des Induktors Mifepriston exprimieren (*GeneSwitch™* System, Invitrogen). Die Erzeugung der BHK-SΔ18-Zelllinie ist unter 4.1.6 beschrieben. Da die Expression des S-Proteins nach Zugabe des Induktors im Vergleich zur transienten Expression nach Transfektion in BHK-21-Zellen verhältnismäßig gering war, wurde das SΔ18-Protein zusätzlich durch Transfektion des pCG1-SΔ18-Expressionsplasmids *in trans* zugegeben (4.1.5) um eine verstärkte Expression des SARS-CoV S-Proteins zu erzielen. Dazu wurden $4,5 \times 10^5$ BHK-SΔ18-Zellen in einem Volumen von 3 ml in 6-Napf Kulturplatten kultiviert. Nach Zugabe der Transfektionsansätze wurden zu jedem Ansatz noch 2 ml Medium, 3 % FKS und 10^{-8} M Mifepriston gegeben und für 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur Erzeugung der Pseudoviren wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl einer VSV-ΔG-G-Suspension (siehe 4.2.1) infiziert (MOI=3). Die Infektion erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für eine Stunde auf dem Schwenker. Nach dreimaligem Waschen mit vorgewärmten PBS wurde ungebundenes Virus durch Zugabe von 250 µl einer Verdünnung (1:1000 in Medium) eines gegen VSV gerichteten, polyklonalen Kaninchenserums inaktiviert. Die Inaktivierung erfolgte ebenfalls bei 37°C und 5 % CO₂ für eine Stunde auf dem Schwenker. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden 2,5 ml Medium, 3 % FKS und 10^{-8} M Mifepriston zu den Zellen gegeben. Am folgenden Tag wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zelltrümmer bei 2800 x g für 2 x 20 min bei 4°C abzentrifugiert. Die in den Überstand abgegebenen Pseudoviren wurden direkt für weitere Versuche verwendet oder in 1 ml Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Als negative bzw. positive Kontrolle wurden nicht-transfizierte und VSV-G-transfizierte Viruspräparationen mitgeführt.

4.2.3 IBV Beaudette-US Anzucht

Für die Anzucht des *Infektiösen Bronchitisvirus*, Stamm Beaudette-US, wurden Vero-Zellen (ATCC Nr. CCL-81) verwendet. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert, bis sie als 90 % konfluenter Zellrasen vorlagen. $1 \times 10^{4-5}$ Viren wurden in einem Volumen von 5 ml Serum-freiem Medium auf die Vero-Zellen gegeben und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ auf dem Schwenker inkubiert. Die Zellen wurden 1 x mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend 20 ml Medium und 3 % FKS zu den Zellen gegeben. Nach etwa 24 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen. Zu diesem Zeitpunkt war ein zytopathischer Effekt eindeutig erkennbar. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 2800 x g für 20 min bei 4 °C entfernt und die Überstände anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.4 Quantifizierung des Virusgehaltes und Nachweis infizierter Zellen

Die Quantifizierung der erzeugten Pseudoviren und von IBV erfolgte nach der Methode von Kärber (1931). Dabei handelt es sich um eine Endpunkt-Verdünnungsmethode zur Bestimmung der Virusverdünnung, in der bei 50 % der Probanden noch Infektiösität nachweisbar ist (KID₅₀) und basiert auf einer „Alles oder nichts“-Reaktion. Dazu wurden 2×10^4 Zielzellen in einem Volumen von 100 µl in 96-Napf Kulturschalen (Greiner) pro Napf ausgesät, so dass sich am folgenden Tag ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Für die Quantifizierung von VSV-ΔG-S und IBV Beaudette-US wurden Vero E6- bzw. Vero CCL-81-Zellen verwendet. Die Bestimmung des Virusgehaltes der VSV-ΔG-G-Präparation und die Auswertung der mitgeführten Kontrollen, erfolgten auf BHK-21-Zellen. Dazu wurden von den Viruspräparationen Verdünnungsreihen in 10er Schritten (10^0 - 10^{-10}) in Medium vorbereitet und anschließend 100 µl in die entsprechende Vertiefung gegeben. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen einmal gewaschen und erhielten 200 µl frisches Medium pro Napf. IBV-infizierte Zellen wurden nach dem Waschen mit 3% FKS-haltiger Methylzellulose überschichtet, um ein Diffundieren der Nachkommenviren zu unterbinden und eine eindeutige Plaquebildung zu ermöglichen. Die Zellen wurden 16 h.p.i mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 %-iger Paraformaldehyd-Lösung für 20 min RT fixiert. Die Auswertung von Pseudovirus-infizierten Zellen erfolgte durch Auszählung eGFP-exprimierender Zellen. Der Nachweis IBV-infizierter Zellen erfolgte durch die immunspezifische Färbung IBV-Antigen-exprimierender Zellen. Dazu wurden die fixierten Zellen für 5 min bei RT mit 0,2 %-iger Triton-X-100 permeabilisiert, mit PBS gewaschen und

für 5 min bei RT mit einer 0,1 molaren Glycin-PBS-Lösung inkubiert, um verbliebenes Paraformaldehyd zu deaktivieren. IBV-infizierte Zellen wurden mit 50 µl anti-IBV-Kaninchenserum, 1:200 verdünnt in PBS, für 1h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit 50 µl FITC-konjugiertem Sekundäntikörper aus der Ziege, 1:500 verdünnt in PBS, für 1h bei RT und nach erneutem waschen mit PBS und H₂O, erfolgte die Auszählung der gefärbten Plaques, bzw. Zellen im Fluoreszenzmikroskop.

4.2.5 Infektionen von Deckglaskulturen und Bestimmung der Infektiösität nach Cyclodextrin- und Cholesterolbehandlung

Vero CCL-81-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und wie unter 4.5.2 mit Cyclodextrinen oder Cholesterol behandelt. Für die Infektionen wurden die VSV-Pseudoviren oder IBV-Beaudette-US in Medium verdünnt und $\sim 10^2$ infektiöse Einheiten (IE) in einem Volumen von 100 µl auf die behandelten Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1h bei 37 °C auf einem Schwenker, um die gleichmäßige Anheftung der Viren an die Zellen zu gewährleisten. Die infizierten Zellen wurden anschließend 1 x mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Medium und 3 % FKS für weitere 8 h bei 37 °C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 100 µl einer 3 %-igen PFA-Lösung fixiert. Die Auswertung Pseudovirus-infizierter Zellen erfolgte wie unter 4.2.4 beschrieben. Der Nachweis von Zellen, die mit IBV infiziert wurden erfolgte analog zu 4.2.4 durch Inkubation der Deckglaskulturen in einer feuchten Kammer auf Parafilm. Dazu wurden die Zellen auf 25 µl der entsprechenden Antikörperverdünnungen inkubiert. Unbehandelte infizierte Kontrollzellen wurden einer Infektiösität von 100 % gleichgesetzt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Klonierung von SARS-CoV-SΔ18 in pGene C

Die PCR-Technik wurde zur Klonierung des offenen Leserahmens (ORF) für ein SARS-CoV-S mit verkürztem C-Terminus genutzt (18- C-terminale Aminosäuren wurden entfernt). Als *template*-DNA wurde ein Plasmid verwendet, das einen Kodon-optimierten ORF des S-Gens (Stamm BJ01) enthält, welcher synthetisch erzeugt wurde. Die Kodon-

optimierte Sequenz führt im Vergleich zur unveränderten Sequenz zu einer stärkeren Expression des S-Proteins über den Zellkern, wenn diese durch Transfektion entsprechender Expressionsplasmide in eukaryotische Zellen gebracht wurden. Die zur Herstellung der Konstrukte verwendeten Primer sind im Materialteil aufgeführt (3.9). Um die Möglichkeit von unerwünschten Mutationen zu verringern, wurde zur Amplifikation der DNA die *Pfu*-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) eingesetzt, welche über Korrekturmechanismen (3'-5'-Exonukleaseaktivität) verfügt und die Fehlerwahrscheinlichkeit gering hält (CLINE et al., 1996).

PCR-Ansatz zur Amplifikation von synSΔ18:

DEPC-H ₂ O	ad 50 µl	
<i>Pfu</i> -Puffer, 10x	50 µl	
dNTP	1,5 µl	10 µmolar
pBabe_synS(BJ01)	1 µl	50-100 ng
synS_S (BamHI)	2,5 µl	25 pmol
synSdel18_AS(EcoRI)	2,5 µl	25 pmol
<i>pfu</i> -Polymerase (2, 5 U)		1,0 µl

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 4-2 : Thermoprofil für PCR

Temp. [°C]	dT[°C]	Zeit	Zyklen
75°C		beliebig	
95°C		2 min	
95°C		30 s	} 10 x
56°C	-0,2	30 s	
72°C		8 min*	
95°C		30 s	} 15 x
54°C		30 s	
72°C		8 min*	
72°C		7 min	
4°C		beliebig	
Heizdeckel: 110°C			

*die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts.

Für die *Pfu*-Polymerase wurde mit 500 nt/min gerechnet.

4.3.2 Reinigung von DNA-Fragmenten

Nach der Amplifikation von *synSΔ18* war es erforderlich, die PCR-Produkte und Vektoren zu reinigen, um sie von Enzymen, Salzen, Primern und Nukleotiden zu befreien, damit nachfolgende enzymatische Reaktionen nicht beeinträchtigt wurden. Die Umpufferung erfolgte durch Verwendung des *QIAquick PCR Purification Kit* nach Angaben des Herstellers, wobei die Elution der DNA in 40 µl DEPC-Wasser erfolgte.

4.3.3 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurde DNA für anschließende Ligationen an den 3'/5'-Enden gespalten. Für einen analytischen Verdau wurden 0,5-1 µg DNA eingesetzt. Für einen präparativen Verdau zur Subklonierung wurden 5 µg DNA eingesetzt. Die Spaltung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit 20 U/Reaktion. Plasmid-DNA wurde für 1 h mit den Restriktionsendonukleasen inkubiert, während die Spaltung von PCR-Fragmenten über Nacht erfolgte.

Restriktionsverdau von pGene C:

pGene C (~5 µg DNA)	10 µl
Puffer 3 (10x)	2 µl
BamHI (20 U)	2 µl
EcoRI (20 U)	2 µl
BSA (10x)	2 µl
DEPC-H ₂ O	2 µl

Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 1 h. Anschließend wurde der Ansatz gereinigt (4.3.2).

Restriktionsverdau von synΔ18:

PCR-Produkt (siehe 4.3.1)	40 µl
Puffer 3 (10x)	6 µl
BamHI (20 U)	2 µl
EcoRI (20 U)	2 µl
BSA (10x)	6 µl
DEPC-H ₂ O ad 60 µl	4 µl

Der Verdau des PCR-Produkts erfolgte bei 37 °C über Nacht. Der Ansatz wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (4.3.4) und die DNA-Bande aus dem TAE-Gel isoliert (4.3.5).

4.3.4 Agarose Gelelektrophorese

Unter Elektrophoresebedingungen sind die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren ionisiert und die Polydesoxynukleotide liegen als Polyanionen vor. Sie bewegen sich somit im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und ihre Beweglichkeit hängt weitgehend von der Molekülgröße ab. Die Agarosegelelektrophorese wurde während dieser Arbeit

sowohl zu analytischen (unter Verwendung von TBE-Puffer) als auch zu präparativen Zwecken (unter Verwendung von TAE-Puffer) genutzt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5% (w/v) in TBE- oder TAE-1x Puffer eingewogen. Für die Elektrophorese wurde eine horizontale Gelkammer verwendet und eine Spannung von 13 V/cm Gellänge für analytische Gele und 8 V/cm für präparative Gele angelegt. Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und zur Abschätzung der Fragmentgrößen der zu isolierenden DNA, wurden Vergleichs-DNA-Moleküle mit aufgetrennt. Nach der Elektrophorese erfolgte der Nachweis der DNA-Banden durch Anfärben mit Ethidiumbromid (0,006%, w/v) für 10 min. Ethidiumbromid interkaliert als aromatisches Molekül zwischen Basenpaaren, so dass die Doppelhelix teilweise entwunden wird. Durch die aromatische Umgebung in der DNA erhöht sich das Fluoreszenzverhalten von Ethidiumbromid um ein Vielfaches, so dass die Banden durch Anregung mit ultraviolettem Licht (312 nm) zu erkennen sind (UV-Transilluminator). Die Dokumentation erfolgte photographisch.

4.3.5 Elution von DNA aus Agarosegelen

Definierte DNA-Fragmente nach präparativem Verdau (4.3.3) und Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese (4.3.4) wurden mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* nach den Angaben des Herstellers aus der Agarose eluiert. Um die zu präparierende DNA durch Anregung mit ultraviolettem Licht vor Schädigungen zu schützen, wurde für jede Probe jeweils nur ein Referenzstreifen nach der Gelelektrophorese im Ethidiumbromidbad gefärbt, der einen Teil der DNA-Probe und eine Marker-Spur enthielt. Der Referenzstreifen wurde von der eigentlichen Probe durch eine leere Tasche getrennt. An dieser Stelle wurde das Gel durch ein Skalpell geteilt. Die definierten DNA-Abschnitte auf dem Referenzstreifen wurden im UV-Licht durch Skalpelleinschnitte markiert und konnten auf den nicht gefärbten Anteil des Gels übertragen werden. Die Elution des DNA-Fragments erfolgte in 40 µl DEPC-H₂O.

4.3.6 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung lässt sich durch die Absorption (OD) bei 260 nm bestimmen. Dazu wurde die DNA-Lösung gegen einen

Blindwert von *aqua dest.* in einer Quarzküvette photometrisch gemessen (Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia). Eine $\Delta E_{260\text{nm}}$ von 1,0 entsprechen näherungsweise Konzentrationen von 50 $\mu\text{g/mL}$ für doppelsträngige DNA.

4.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels 10 U DNA-Ligase des Bakteriophagen T4, welche unter ATP-Verbrauch 3'-OH-Gruppen mit 5'-Phosphatresten verbindet. Linearisierte Plasmid-DNA (4.3.3) wurde in einem molaren Verhältnis von 1:6 zur Insert-DNA (4.3.5) in einem Gesamtvolumen von 25 μl eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14°C in einem Thermocycler.

Ligationsansatz für pGene-syn Δ 18:

Plasmid-DNA (~100 ng)	1 μl
Insert-DNA (~ 500 ng)	19 μl
T4-Ligase-Puffer, (10x)	2,5 μl
T4-DNA-Ligase (5 U/ μl)	2,5 μl

Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz ohne Insert-DNA.

4.4 Mikrobiologische Methoden

4.4.1 Transformation chemisch-kompetenter *E.coli* XL-1 Blue

Für die Transformation der ligierten Plasmide wurden 100 μl Aliquots mit chemisch kompetenten *E.coli* XL1-Blue (-80°C) auf Eis aufgetaut. Sofort nach dem Auftauen wurden 2,5 μl eines Ligationsansatzes zu den Bakterien pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock für 30 s bei 42°C im Wasserbad. Die Ansätze wurden nochmals für 3 min auf Eis inkubiert. Nach den Inkubationen wurde den Ansätzen jeweils 250 μl LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben und für 1 h bei 37°C im Heizblock geschüttelt. 35 μl der Transformationsansätze wurden anschließend auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und für 16 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.4.2 Kolonie-PCR

Um einen Bakterienklon zu identifizieren, der das gewünschte Insert trug, wurde die PCR-Technik eingesetzt. Mit einer 10 µl Pipettenspitze wurden die Bakterienzellen einer Kolonie erst in einem PCR-Reaktionsansatz, dann in LB-Ampicillin-Medium resuspendiert. Entsprechend der Anzahl der gepickten Kolonien wurden vorher die einzelnen PCR-Hütchen nummeriert. Anschließend wurden 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen mit jeweils 250 µl LB-Ampicillin-Medium vorbereitet und ebenfalls nummeriert. Die PCR wurde in einem Thermocycler mit dem in Tabelle 4-3 angegebenen Thermoprofil durchgeführt. Als Polymerase wurde in der Kolonie-PCR die *Taq*-Polymerase von *Thermus aquaticus* verwendet. Die Eppendorf-Röhrchen wurden mehrere Stunden bis zum Erhalt der PCR-Ergebnisse bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert (200 rpm) und wurden als Vorkultur zur Vermehrung positiver Klone verwendet (4.4.3). Dadurch stand im Fall einer Amplifikation des Inserts durch spezifische Primer ein Bakterienklon zur Vermehrung zur Verfügung. Als Positivkontrolle wurde 1 µl der Ligation in ein PCR-Hütchen gegeben, während die Negativkontrolle der Ligation auch hier als Negativkontrolle diente.

PCR-Ansatz für eine Kolonie:

DEPC-H ₂ O	11,0 µl	
<i>Taq</i> -Puffer, 10x	1,5 µl	
MgCl ₂	1,2 µl	25 mM
dNTP	0,3 µl	2,5 mM
pGeneA-S	0,45 µl	10 pmol/µl
synS_AS 800)	0,45 µl	10 pmol/µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5,0 U/µl)	0,1 µl	

Tabelle 4-3: Thermoprofil für Kolonie-PCR

Temp. [°C]	Zeit	Zyklen
95°C	2 min	
95°C	30 s	} 25 x
55°C	30 s	
72°C	x min*	
72°C	5 min	
4°C	beliebig	
Heizdeckel: 110°C		

*die Elongationszeiten richten sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte. Für die *Taq*-Polymerase wurde mit 2000 nt/min gerechnet.

4.4.3 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Anreicherung von reiner Plasmid-DNA wurden die Produkte der Firma Qiagen verwendet, wobei das Prinzip der alkalischen Lyse Anwendung findet. Für die Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA aus Bakterien wurde der *QIAprep Spin Miniprep KIT* verwendet und zur Isolierung von großen Mengen Plasmid-DNA wurde der *QIAfilter Plasmid MIDI* oder *MAXI Kit* nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

4.4.4 DNA-Sequenzierung

Die Plasmide wurden von der Firma *MWG Biotech AG* in Ebersberg, mit dem Programm „Value Read“ sequenziert. Das Umschreiben der Komplementärsequenzen wurde mit Hilfe der Online-Programme von BCM Searchlauncher durchgeführt.

(<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util.html>)

4.5 Lipid rafts

4.5.1 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie von ACE2-exprimierenden Verozellen

Für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie zur ACE2-Oberflächenexpression wurden Vero CCL-81-, Vero E6- und 293T- Zellen auf Deckgläsern zu konfluenten Zellmonolayern kultiviert, 1x mit PBS gewaschen und mit 3,0 %-igem Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei RT fixiert. Nach einmaligem Waschen und einer 5-minütigen Inkubation mit 0,1 M Glycin in PBS bei RT wurden die Zellen für 1 h bei RT mit einem ACE2-spezifischen Antikörper aus der Ziege (R&D Systems) inkubiert, der zuvor 1:50 in PBS 1,0 % BSA 1:50 verdünnt worden war. Nach drei Waschschrritten mit PBS, wurden die Zellen mit FITC-konjugiertem Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Antikörper (Sigma) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Deckglaskulturen wurden anschließend mit PBS und H₂O gewaschen, auf Objektträger mit Mowiol überführt und in einem Zeiss Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop analysiert. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Fotokamera aufgenommen. Kontrast und Intensität der Fluoreszenzaufnahmen wurden unter Berücksichtigung gleicher Einstellungen mit Adobe Photoshop CS grafisch bearbeitet. Für die quantitative Untersuchung der ACE2-Expression wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Die Zellen wurden in 24-Napf Kulturschalen über Nacht kultiviert und am folgenden Tag nach einmaligem Waschen mit PBS durch 20-minütige Behandlung mit 200 µl Accutase (PAA-Laboratories) bei 37 °C vom Boden der Zellkulturschale gelöst und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einem Sedimentationsschritt für 3 min bei 400 x g und RT wurden 1x10⁵ Zellen in 250 µl BSA 1,0 % in PBS resuspendiert, 1:50 mit anti-ACE2 Antikörper versetzt und 1 h bei 4 °C in einem Überkopf-Schwenker inkubiert. Die Zellen wurden 3 x mit 1,0 % BSA in PBS gewaschen und nach jedem Waschschrtritt bei 400 x g für 3 min sedimentiert. Nach der Inkubation mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper für 1h bei 4 °C wurden die Zellen erneut gewaschen und das Zellpellet in 0,5 ml 0,5 % BSA in PBS resuspendiert und direkt in einem Beckman Coulter Epics XL Durchflusszytometer untersucht und mit der EXPO32 Analysesoftware analysiert. Dazu wurden pro Messung 5 x 10³ Zellen berücksichtigt. Kontrollzellen wurden nur mit Sekundärantikörper inkubiert und dienten als Kontrolle zu Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz.

4.5.2 Methyl- β -Cyclodextrin-, α -Cyclodextrin- und Cholesterolbehandlung von Verozellen

Für Untersuchungen zur Bedeutung des zellulären Cholesterols wurden 2×10^5 Vero CCL-81- oder Vero E6-Zellen in 24-Napf-Kulturschalen ausgesät, so dass sie am folgenden Tag als konfluenter Zellrasen vorlagen. Für Infektionsversuche wurden die Zellen auf Deckgläsern kultiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C für 30 min mit unterschiedlichen M β CD-Konzentrationen oder 10 mM α -CD verdünnt in EMEM in einem Volumen von 150 μ l min inkubiert und anschließend 3x mit 1 ml PBS gewaschen. In Versuchen, wo Cholesterol zurückgeführt werden sollte, wurden die Zellen zunächst mit M β CD inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurde das Cholesterol in Serum-freiem Medium verdünnt und bei einer Konzentration von 100-400 μ g/ml mit den Zellen bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach weiterem Waschen standen die Zellen für nachfolgende Experimente zur Verfügung. In allen Experimenten wurden Kontrollzellen nur mit Medium inkubiert.

4.5.3 Bestimmung des Cholesterolgehalts nach M β CD-Behandlung

Zur Bestimmung des zellulären Cholesterolgehalts wurde der *Amplex Red Cholesterol Assay Kit* (Invitrogen) verwendet. 2×10^4 Vero CCL-81- bzw. Vero E6-Zellen wurden pro Napf in 96-Napf-Kulturschalen ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit unterschiedlichen M β CD-Konzentrationen, verdünnt in Medium, in einem Volumen von 50 μ l bei 37 °C für 30 min inkubiert. In allen Experimenten wurden Kontrollzellen nur mit Medium inkubiert. Nach drei PBS-Waschschritten wurden die Zellen mit 50 μ l NP-40-Lysispuffer für 30 min auf Eis lysiert und das Protokoll zur Bestimmung des Cholesterolgehalts nach Angaben des Herstellers befolgt. Die Auswertung erfolgte in einem Tecan GENios Pro Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegerät.

4.5.4 Bestimmung der Zellviabilität nach M β CD-Behandlung

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde das WST-1 Reagenz der Firma Roche verwendet. Das WST-1-Reagenz ist ein Wasser-lösliches Tetrazoliumsalz dessen Spaltung durch die zellulären mitochondrialen Dehydrogenasen mit der Anzahl der lebensfähigen Zellen korreliert. Vero CCL-81- bzw. Vero E6-Zellen wurden wie in 4.5.3 beschrieben in 96-Napf-Kulturschalen ausgesät und mit unterschiedlichen M β CD-Konzentrationen behandelt.

Nach drei Waschschrritten mit PBS wurde das WST-1-Reagenz 1:10 in Medium verdünnt und zu den Zellen gegeben. Nach Inkubation für 1h bei 37 °C wurde die Absorption bei 450 nm in einem ELISA-Lesegerät gemessen. Als Leerwert wurde die Absorption der WST-1-Lösung ohne Zellen von den einzelnen Werten abgezogen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle.

4.5.5 Zell-basierter Bindungstest zur Untersuchung der SARS-CoV-S-Protein-Interaktion mit ACE2.

BHK-SΔ18-Zellen wurden in 175 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert, bis sie zu 80 % konfluent waren. Das Zellkulturmedium wurde durch 20 ml frisches EMEM ersetzt, welches 0,25 µg/ml BODIPY FL C₁₂, 5 % FKS und 10⁻⁸ M Mifepriston zur Induktion der S-Proteinexpression enthält. Die Zellen wurden am folgenden Tag 1x mit PBS gewaschen und mit 3 ml Accutase für 20 min bei 37 °C inkubiert, um die Fluoreszenz-markierten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Nach der Resuspension in 10 ml EMEM wurden die Zellen in einer Neubauer Improved-Zählkammer gezählt und auf 3 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Dazu wurden sie bei 400 x g für 5 min bei 4 °C sedimentiert und in einem entsprechenden Volumen PBS resuspendiert. Vero E6-Zellen wurden über Nacht in 24-Napf-Kulturschalen inkubiert, so dass am nächsten Tag ein konfluent Zellerasen vorlag. Nach der Behandlung mit MβCD und Cholesterol wie unter 4.5.2 beschrieben wurden die Zellen mit 500 µl der BHK-SΔ18-Zellsuspension (1,5 x 10⁵ Zellen) überschichtet und für 2 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach drei Waschschrritten 0,5 M NaCl-haltigem PBS, wurde die Bindung der Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Für die Quantifizierung der Vero E6, BHK-SΔ18-Zellinteraktion, wurden die Zellen durch 20-minütige Behandlung mit Accutase PAA vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und bei 400 x g für 3 min sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml 1,0 % BSA in PBS resuspendiert und in einem Beckman Coulter Epics XL Durchflusszytometer untersucht. Zur Bestimmung der gebunden BHK-SΔ18-Zellen wurde die EXPO32-Analysesoftware verwendet und pro Messung wurden 5 x 10³ Zellen berücksichtigt. Um die Spezifität der Bindung zu untersuchen wurden 1,5 x 10⁵ BHK-SΔ18-Zellen mit einem anti-SARS-Serum aus Kaninchen, welches zuvor 1:50 in 250 µl PBS verdünnt wurde, resuspendiert, und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit PBS wurde der Bindungstest wie beschrieben durchgeführt. Als weitere Kontrolle wurden Fluoreszenz-markierte parentale BHK21-Zellen verwendet.

4.5.6 Bindungstest mit löslichem SARS-CoV-S1-IgG Fusionsprotein

Für den Bindungstest mit SARS-CoV-S1-IgG als Interaktionspartner wurde zunächst das lösliche Fusionsprotein in BHK21-Zellen exprimiert, worauf es anschließend konzentriert wurde und für den Bindungstest zur Verfügung stand. Dazu wurden BHK21-Zellen in 6-Napf-Kulturschalen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag zu 80 % konfluent gewachsen waren. Die Transfektion des Expressionsplasmids pAB6, welches den ORF des S1-IgG Fusionsproteins enthält, erfolgte mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in BHK21-Zellen mit Ausnahme, dass zu den Zellen nach der Transfektion Serum-freies Medium zugegeben wurde. 48 h nach der Transfektion wurden die Überstände gesammelt und Zelltrümmer bei 2800 x g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Überstände wurden durch 0,45 µm Filter filtriert und das lösliche S1-IgG-Fusionsprotein auf Centricon Plus-20 Ultracel PL-30 Säulen (Millipore) nach Angaben des Herstellers auf 1/10-Volumen konzentriert. Das lösliche S1-IgG-Fusionsprotein wurde direkt für weitere Versuche eingesetzt oder in Aliquots bei -20 °C eingefroren. Die Expression des S1-IgG-Fusionsproteins wurde durch Immunoblotting qualitativ untersucht. Für den Bindungstest von S1-IgG an ACE2 wurden Vero E6-Zellen in 24-Napf-Kulturschalen kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen wie unter 4.5.2 beschrieben mit MβCD oder Cholesterol behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und einer 20-minütigen Behandlung mit Accutase bei 37 °C wurden die Zellen vom Zellkulturboden abgelöst, in 1 ml PBS resuspendiert und bei 400 x g für 3 min bei 4 °C sedimentiert. Die Zellpellets (~1 x 10⁵ Zellen) wurden in 250 µl BSA 1,0 % in PBS resuspendiert und mit 10 µl des konzentrierten S1-IgG-Fusionsproteins versetzt. Nach einer Inkubation für 1 h bei 4 °C auf einem Überkopfschwenker wurden die Zellen dreimal mit BSA 1,0 % in PBS gewaschen und nach jedem Waschschrift bei 400 x g für 3 min bei 4 °C sedimentiert. Nach einer 1-stündigen Inkubation mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper bei 4 °C - 1:200 verdünnt in BSA 1,0 % in PBS – wurden die Zellen erneut gewaschen und für die Analyse im Durchflusszytometer in 1 ml BSA 0,5 % in PBS resuspendiert. Zur Quantifizierung des gebundenen S1-IgG-Fusionsproteins an ACE2-exprimierende Vero E6-Zellen wurde die EXPO32-Analysesoftware verwendet und pro Messung wurden 5 x 10³ Zellen berücksichtigt. Um die Spezifität der Bindung zu untersuchen wurden Zellen mit konzentrierten Überständen von mock-transfizierten BHK21-Zellen inkubiert, gefolgt von der Färbung mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper.

4.5.7 Kopatchinganalyse von ACE2 in Vero E6-Zellen

Für die Kopatchinganalyse von ACE2 mit dem *raft*-Marker Gangliosid GM1 und nicht-*raft*-Marker Transferrinrezeptor (TfR) wurden Vero E6-Zellen auf Deckgläsern kultiviert. Die Färbung der Zellen erfolgte auf Parafilm in einer feuchten Kammer. Dazu wurden die Deckglaskulturen mit der Zellseite auf einem 30 µl-Tropfen der Antikörperverdünnungen in 1,0 % BSA in PBS gelegt, welcher sich innerhalb einer feuchten Kammer auf einem Parafilmstreifen befand. Die Inkubation mit ACE2-spezifischem Antikörper aus der Ziege (1:50 verdünnt) erfolgte für 1 h auf Eis. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser in 24-Napf Kulturschalen überführt und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Für die Initiierung der Aggregatbildung wurde zu den Zellen warmes PBS gegeben, für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt um die Aggregation der Proteine zu stoppen. Kontrollzellen, die nicht bei 37 °C inkubiert wurden und ACE2-gepatchte Zellen wurden anschließend mit 250 µl Paraformaldehyd (3%) für 30 min auf Eis fixiert und mit einer Glycinlösung (0,1 M in PBS) einmal gewaschen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Glycinreste wurden mit PBS entfernt. Für die Kolokalisation mit Gangliosid GM1 wurden die Deckgläser mit Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper und FITC-konjugierter Cholera-Toxin B Untereinheit (1 µg/ml) für eine 1h bei RT im Dunkeln inkubiert. Für die Kolokalisation mit TfR wurden die Zellen zunächst mit 250 µl Triton-X-100 (0,2% in PBS) permeabilisiert, gefolgt von sequentiellen Inkubationen mit TfR-spezifischen Antikörper aus der Maus und Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern (anti-Ziege-FITC 1:500; anti-Maus-Cy3 1:200 beides in 1,0 % BSA in PBS verdünnt) für jeweils 1h bei RT im Dunkeln. Zwischen den einzelnen Antikörperinkubationen wurden die Zellen jeweils dreimal mit PBS gewaschen. Vor dem Überführen der Deckglaskulturen auf Objektträger mit Mowiol wurden die Zellen einmalig mit H₂O gewaschen, um verbliebene Salze zu entfernen. Die Auswertung erfolgte in einem Leica IRB DM konfokalen Lasermikroskop. Verwendet wurde ein 60-faches Objektiv mit Immersionsöl. Die grafische Bearbeitung der Fluoreszenzaufnahmen hinsichtlich Kontrast und Intensität und die Überlagerung der Aufnahmen wurde unter gleichen Bedingungen mit Adobe Photoshop CS durchgeführt.

4.6 Biochemische Methoden

4.6.1 Isolierung Detergenz-resistenter Membranen von Vero E6-Zellen

Für die Isolierung Detergenz-resistenter Membranen nach Triton-X-100-Behandlung wurden Vero E6-Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C unter Verwendung vorgekühlter Arbeitsmaterialien und Lösungen. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in 1 ml PBS mit 1,0 % (v/v) Triton-X-100 und „Complete“-Proteaseinhibitorcocktail (Roche Pharmaceuticals) abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Durch 20-faches Passagieren durch eine 20-gauge Injektionsnadel wurden die Zellen homogenisiert, gefolgt von einer 2-stündigen Inkubation. Anschließend wurden die Zellkerne durch 15-minütige Zentrifugation bei 7000 x g entfernt. Für die Isolierung der DRMs durch Stufengradienten-Zentrifugation wurden die Zellextrakte mit 1,5 Volumenanteilen 60 %-iger Iodixanol-Lösung (Sigma) und Proteaseinhibitoren (siehe oben) versetzt und 1 ml Aliquots in SW-41 Ultrazentrifugationsröhrchen überführt (Beckman). Nach der Überschichtung mit 40 %-iger Iodixanol-Lösung (8 ml) und 5 %-iger Iodixanol-Lösung (2ml) wurde der Iodixanol-Stufengradient bei 100.000 x g für 18 h in einem SW-41-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Die Triton-X-100-Konzentration betrug im gesamten Gradienten 1,0 % (w/v). Nach der Zentrifugation wurden 1 ml Fraktion von dem Gradienten abgenommen, mit jeweils 3 ml 96 %-igem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Fraktionen wurden bei 13.000 rpm für 15 min pelletiert, und die Pellets nach der Abnahme des Ethanols an der Luft getrocknet und mit 4 x LDS-Probenpuffer (Invitrogen) versetzt

Alternativ für die Isolierung von DRMs durch Pelletierung wurde 1 ml des post-nukleären Zellextraktes in SW-75 Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und für 1,5 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Die Überstände (Triton-X-100-lösliche Fraktion) wurden abgenommen und zunächst bei 4 °C gelagert. Das Pellet wurde in 1 ml NP-40-Lysispuffer aufgenommen und nach einer 3-stündigen Inkubation bei 4 °C erneut bei 13.000 rpm für 30 min zentrifugiert. Die Überstände (Triton-X-unlösliche und Triton-X-lösliche Fraktion) wurden mit jeweils drei Volumenanteilen 96 %-igem Ethanol vermischt und über Nacht gefällt. Die Fraktionen wurden nach dem Entfernen des Ethanols (siehe oben) mit 4 x LDS-Probenpuffer versetzt und standen für die Analyse im Westernblot bereit.

4.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus DRM-Präparationen nach ihrer molekularen Masse, wurden diese mit diskontinuierlichen 4-12 %-igen Bis-Tris Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidfertiggele (Invitrogen) oder kontinuierlichen 8 %-igen Gelen mit den Maßen 50 x 80 x 0,75 mm aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Proben wurden nach der Zugabe von LDS-Probenpuffer direkt aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine in kontinuierlichen Gelen erfolgte in NuPAGE-Gelkammern (Invitrogen) bei 200 V oder bei 8 %-igen Gelen in Miniproteingel-Kammern (Keutz) bis zum Einlaufen der Proben ins Trenngel bei 80 V, anschließend bei 140 V, bis der Farbstoff des Probenpuffers den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Als Marker zur Bestimmung der molekularen Masse wurde der PageRuler™ Prestained Protein Marker Plus (MBI Fermentas) verwendet.

4.6.3 Westernblot

Für den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell), wurde das Halbtrockenblot-Verfahren verwendet (Kyhse-Anderson, 1984).

Um die Transferbedingungen zu optimieren, wurden zwei Anodenpuffer eingesetzt, die sich im pH unterschieden. Auf die Graphitplatte (Anode) der Blotkammer (Keutz) wurden Filterpapier, Nitrozellulose und Gel in der folgenden Reihenfolge gelegt: 6 Blatt Filterpapier getränkt in Anodenpuffer I, 3 Blatt Filterpapier getränkt in Anodenpuffer II, Nitrozellulose getränkt in H₂O, Trenngel und 9 Blatt Filterpapier getränkt in Kathodenpuffer. Die Kammer wurde mit der anderen Graphitplatte (Kathode) geschlossen und der Transfer erfolgte für 60 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membran. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit Blocking Reagenz (Roche; angesetzt 0,5% in PBSM,) über Nacht bei 4°C abgesättigt.

4.6.4 Immunochemische Detektion von Proteinen

Die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine wurden mit einem indirekten immunologischen Nachweis mit Antikörpern detektiert. Die Inkubation der Membran mit Primärantikörper wurde bei 4°C für 1 h durchgeführt. Dazu wurde die

Antikörperverdünnung (in PBS) in einem Volumen von 1 ml auf der Membran gleichmäßig verteilt und mit Parafilm abgedeckt (Primärantikörper und Verdünnungen siehe Tabelle 3-3). Nach Inkubation mit der Verdünnung des Primärantikörpers erfolgte die Inkubation mit Immunglobulin-spezifischen, Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Inkubation mit sekundärem Antikörper erfolgte unter Schwenken in einem Verdünnungsvolumen von 10 ml (in PBS) bei 4°C. Die Nitrozellulosemembran wurde vor jeder Inkubation dreimal 10 min mit PBSM-0,1% Tween auf einem Schwenker gewaschen. Die an die Proteine gebundene Peroxidase konnte nach fünfminütiger Inkubation mit *Super Signal Dura Extend Blottingsubstrat* (Pierce), mit Hilfe eines Chemi Imagers (BIO-RAD) sichtbar gemacht werden.

5 ERGEBNISSE

5.1 Eintritt von SARS-CoV-Pseudoviren in polarisierte Epithelzellen

Einige Zellkulturlinien bilden einen hoch polarisierten einschichtigen Zellrasen aus, wenn sie auf mikroporösen Zellkultureinsätzen kultiviert werden. Solche Zelllinien formen ein dicht geschlossenes Epithel durch die Ausbildung von *tight junctions*. Die Differenzierung geht einher mit der Etablierung der Polarität der Zellen, die sich durch die Ausbildung eines transepithelialen elektrischen Widerstandes (TER) messen lässt (Rousset, 1986; Simons und Virta, 1987; Marozin et al., 2004). Daher wurden diese Zellen häufig als Modell für die Untersuchung zur epithelialen Differenzierung und für Infektionsstudien herangezogen (Übersichtsarbeit siehe Compans, 1995). Die Funktionalität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten SARS-CoV-Pseudoviren sollte getestet werden durch Infektionsversuche mit polarisierten Zellen. Die Untersuchungen sollten Calu-3-Zellen, humane Colonkarzinomazellen (Caco-2), die Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze (Vero E6) sowie die Madin-Darby Hundenierenzelllinie (MDCK2) einschließen.

5.1.1 Differenzierung von Epithelzellen auf Filtereinsätzen

Vero E6-, Caco-2-, Calu-3- und MDCKII-Zellen wurden auf mikroporösen Filtereinsätzen mit einer Porengröße von 1,0 μm ausgesät ($1,3 \times 10^5$ Zellen/ cm^2). Um das Ausmaß des Differenzierungsgrades festzustellen wurde der transepitheliale elektrische Widerstand über einen Zeitraum von acht Tagen fortwährend gemessen.

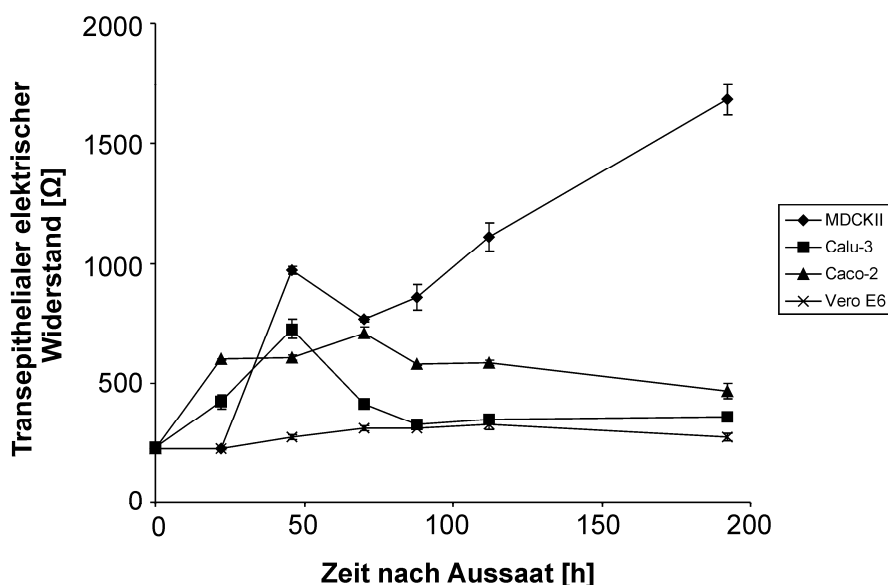


Abb. 5-1: Transepitheliale elektrische Widerstände von Filterkulturen verschiedener Epithelzellen. Vero E6- (X), Caco-2- (▲), Calu-3- (■), oder MDCK2-(♦)Zellen wurden auf 1,0 µm permeablen Polykarbonat-Membranfiltern ausgesät und erhielten Zellkulturmedium von der apikalen und basolateralen Seite. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) wurde über einen Zeitraum von acht Tagen gemessen.

Als Kontrolle wurde der TER direkt nach Aussaat der unterschiedlichen Zelllinien gemessen. Die höchsten Widerstände wurden bei MDCKII-Zellen festgestellt. Nach etwa 48 h wurde ein TER von etwa 1000 Ω gemessen, der im weiteren Verlauf etwas abfiel und bis zum Ende des Messzeitraums wieder zunahm und Höchstwerte von knapp 1700 Ω erreichte. Bei Calu-3-Zellen wurde der höchste TER von ca. 730 Ω nach 48 h Stunden gemessen und erreichte ein Plateau nach etwa 72 h von ca. 420 Ω, welches bis zum Tag 8 konstant blieb. Ein ähnlicher Verlauf wurde für Caco-2-Zellen festgestellt. Vero E6-Zellen entwickelten einen stabilen, aber geringen TER von etwa 320 Ω über den gesamten Zeitraum von acht Tagen. Geringe Widerstände der Vero E6-Zellen wurden bereits in einer früheren Untersuchung gezeigt (Blau und Compans, 1995).

5.1.2 Polarisierter Viruseintritt von SARS-CoV-Pseudoviren in Epithelzellen.

Um die Funktionalität der SARS-CoV-Pseudoviren zu überprüfen wurden Infektionsversuche mit polarisierten Epithelzellen durchgeführt. Bei den verwendeten Pseudoviren handelt es sich um replikationsdefekte Virionen, die vom Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) abgeleitet sind. Diesen Virionen fehlt das Gen für das VSV-Glykoprotein G (VSV-ΔG) und sie sind nur infektiös, wenn ihnen das G-Protein *in trans* zur Verfügung gestellt wird, z.B. durch Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid. Unter diesen Bedingungen werden Virionen gebildet (VSV-ΔG-G), die phänotypisch nicht zu unterscheiden sind von VSV und daher dasselbe Infektionsspektrum von Zielzellen aufweisen. Aufgrund des fehlenden G-Gens, werden nach einer Infektion mit VSV-ΔG-G keine infektiösen Nachkommenviren gebildet, es sei denn, die infizierten Zellen stellen das G-Protein zur Verfügung. Die Infektiosität der Pseudoviren kann allerdings auch beibehalten werden, wenn ein Glykoprotein eines heterologen Virus *in trans* zur Verfügung gestellt wird und dieses Glykoprotein in der Lage ist, die Anheftung an Zielzellen sowie die Fusion der Virusmembran mit zellulären Membranen vermitteln kann. Dieser Ansatz wurde verwendet, um VSV-Pseudoviren zu erzeugen, die das S-Protein des SARS-CoV in der Virusmembran enthalten (VSV-ΔG-S). Für die Untersuchung wurden Vero E6-, Caco-2-, Calu-3 und MDCKII- Zellen auf porösen Filtereinsätzen mit einem Membrandurchmesser von 12 mm und einer Porengröße von 1,0 μm kultiviert, so dass eine hochpolarisierte Einzellschicht ausgebildet wurde (siehe 5.1.1). Das Medium der apikalen und basolateralen Seite wurde jeden Tag gewechselt und fünf Tage nach Aussaat der Zellen, wurden 1×10^5 VSV-ΔG-S-Partikel in die apikale bzw. basolaterale Zellkulturkammer gegeben. Die Pseudoviren, die zu den Filterkulturen gegeben wurden entsprechen einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,25-0,5. Nach 16 h wurden die Zellen fixiert (3 %-ige PFA-Lösung, 20 min RT), permeabilisiert und auf Objektträgern eingedeckelt. Da der offene Leserahmen des VSV-G-Gens durch den offenen Leserahmen des grün-fluoreszierende Proteins (eGFP) ersetzt war, konnten infizierte Zellen durch die GFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

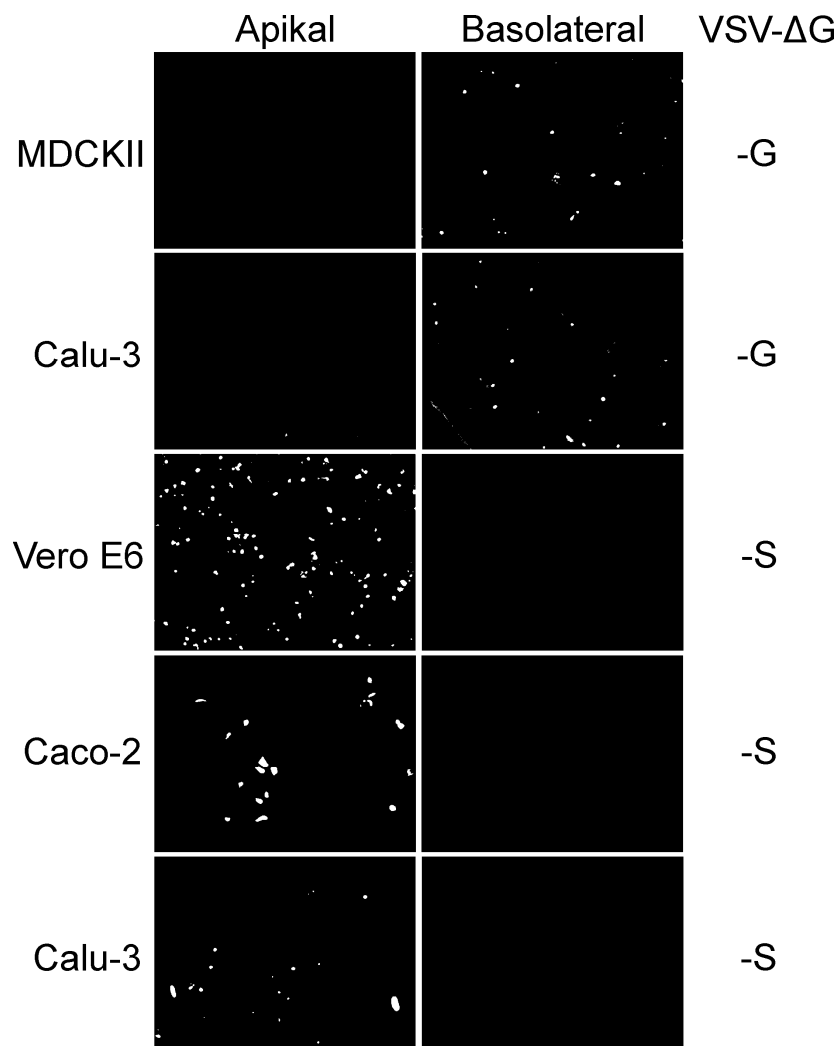


Abb. 5-2: Infektion polarisierter Epithelzellen mit SARS-CoV-S-haltigen VSV- Δ G-Pseudoviren. Vero E6-, Caco-2-, Calu-3- oder MDCKII-Zellen wurden auf 12 mm mikroporösen Polykarbonat-Filtereinsätzen mit einer Porengröße von 1,0 μ m kultiviert ($1,3 \times 10^5$ Zellen/ cm^2). Fünf Tage nach Aussaat der Zellen wurden die Zellen von der apikalen oder basolateralen Seite mit Viren, die das SARS-CoV-S-Protein (VSV- Δ G-S) oder das G-Protein von VSV (VSV- Δ G-G) enthielten, infiziert (1×10^5 infektiöse Einheiten; entspricht einer MOI von 0,25-0,5). Fluoreszenz von GFP, die von dem Pseudovirus-Genom exprimiert wurde, diente zum Nachweis infizierter Zellen. Dargestellt sind repräsentative Bilder von unabhängigen Versuchen.

Abb. 5-2 zeigt, dass Pseudoviren, die das G-Protein von VSV enthalten MDCKII-Zellen bevorzugt von der basolateralen Domäne infizieren. Dies entspricht den Untersuchungen zum polarisierten Zelleintritt von VSV in MDCKII-Zellen (Fuller et al., 1984). Ein ähnliches Ergebnis wurde mit Calu-3 Zellen erhalten. Diese Kontrollen zeigen, dass die Membranen der Filtereinsätze eine Infektion von der basolateralen Plasmamembran nicht verhindern. Wenn VSV-Pseudoviren für eine Infektion verwendet wurden, die das S-Protein des SARS-CoV in der Virusmembran enthalten, erfolgt die Infektion aller drei Zelllinien, Vero E6, Caco-2 und Calu-3, nur von der apikalen Domäne und nicht von der basolateralen (Abb. 5-2). Dabei ist die Infektion unterschiedlich effizient. Die meisten infizierten Zellen wurden bei Vero E6 festgestellt, gefolgt von Caco-2-Zellen. Am wenigsten effizient wurden Calu-3-Zellen mit VSV- Δ G-S infiziert. Zusammengefasst, infizieren S-haltige Pseudoviren alle drei Zelllinien über die apikale Domäne und dies ist in Übereinstimmung mit der apikalen Expression von ACE2, dem funktionellem Rezeptor des SARS-CoV.

5.2 Die Bedeutung von zellulärem Cholesterol für den SARS-CoV-S-Protein-vermittelten Viruseintritt

Zahlreiche Studien zum Viruseintritt behüllter Viren haben gezeigt, dass zelluläres Cholesterol erforderlich ist, um eine Infektion einzuleiten. Diese Untersuchungen basieren auf der Behandlung von empfänglichen Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD). Bei M β CD handelt es sich um ein zyklisches Oligosaccharid, welches aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen besteht und durch eine toroidale Struktur mit einem zentralen Hohlraum charakterisiert ist. β -Cyclodextrine binden Cholesterol ohne sich in die Plasmamembran einzulagern. Das Sterol wird in den zentralen, nicht-polaren Hohlraum eingeschlossen und dadurch aus der Plasmamembran extrahiert. Durch den Entzug von Cholesterol aus der Plasmamembran wird die Integrität der cholesterolhaltigen Mikrodomänen gestört und davon abhängige biologische Prozesse unterbunden. Bei zwei Vertretern der Familie *Coronaviridae*, dem Maus-Hepatitisvirus und dem humanen Coronavirus 229E, wurde bereits ein cholesterolabhängiger Viruseintritt gezeigt (Nomura et al., 2004; Choi et al., 2005). Zum Zeitpunkt der Doktorarbeit lagen keine Untersuchungen zur Bedeutung von zellulärem Cholesterol für den Eintritt von SARS-CoV vor. Daher sollte

untersucht werden, ob Cholesterol in der Plasmamembran von Zielzellen für den Viruseintritt von SARS-CoV eine Rolle spielt.

5.2.1 Untersuchung unterschiedlicher Vero-Zelllinien zur Oberflächenexpression von ACE2 und Empfänglichkeit für SARS-CoV-Pseudoviren

In die geplanten Untersuchungen sollte ein Coronavirus miteinbezogen werden, von dem man weiß, dass der Viruseintritt cholesterolabhängig ist. Maus-Hepatitisvirus eignete sich nicht, da es sich nicht in Verozellen vermehren lässt. Für den Beaudette-US Stamm von IBV wurde in Verozellen eine Cholesterolabhängigkeit gezeigt (Imhoff et al., 2007). Allerdings repliziert dieser Stamm nicht in der E6-Sublinie von Verozellen, welche gewöhnlich für die Anzucht von SARS-CoV in Zellkultur verwendet wird, da diesen Zellen α -2,3-gebundene Sialinsäuren, eine Rezeptordeterminante dieses Virus, fehlen und ist gegenüber einer IBV Beaudette-Infektion resistent (Winter et al., 2006). Die Vero-Zelllinie CCL-81, welche α -2,3-gebundene Sialinsäuren exprimiert, ist der IBV Beaudette-US-Infektion gegenüber permissiv (Winter et al., 2006). Zunächst sollte festgestellt werden, ob die CCL-81 Sublinie für die Infektionsversuche in dieser Arbeit geeignet ist. Daher wurden diese beiden Verozelllinien hinsichtlich der Oberflächenexpression von ACE2 untersucht. 293T-Zellen wurden als negative Kontrolle verwendet. Untersuchungen durch Oberflächen-Immunfluoreszenz zeigen, dass die CCL-81 Sublinie den Rezeptor für das SARS-CoV exprimiert, wenngleich die Anzahl ACE2-positiver Zellen im Vergleich zur E6-Sublinie geringer ist (Abb. 5-3 A). Durchflusszytometrische Untersuchungen bestätigten diese quantitativen Unterschiede sowohl in der Anzahl positiver Zellen als auch in der Expressionsstärke des SARS-CoV Rezeptors (Abb. 5-3 B). Die beiden Vero-Subzelllinien wurden auch hinsichtlich der Empfänglichkeit für VSV- Δ G-S verglichen. Der Nachweis der eGFP-Expression in Verozellen nach der Infektion mit VSV- Δ G-S zeigte, dass die Sublinie CCL-81 empfänglich für die Pseudoviren ist. Die Effizienz der Infektion ist dabei etwa 2-fach reduziert im Vergleich zu Vero E6-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Verozelllinie CCL-81 wurde daher für alle nachfolgenden Experimente verwendet, die Infektionen mit den Pseudoviren beinhalten.

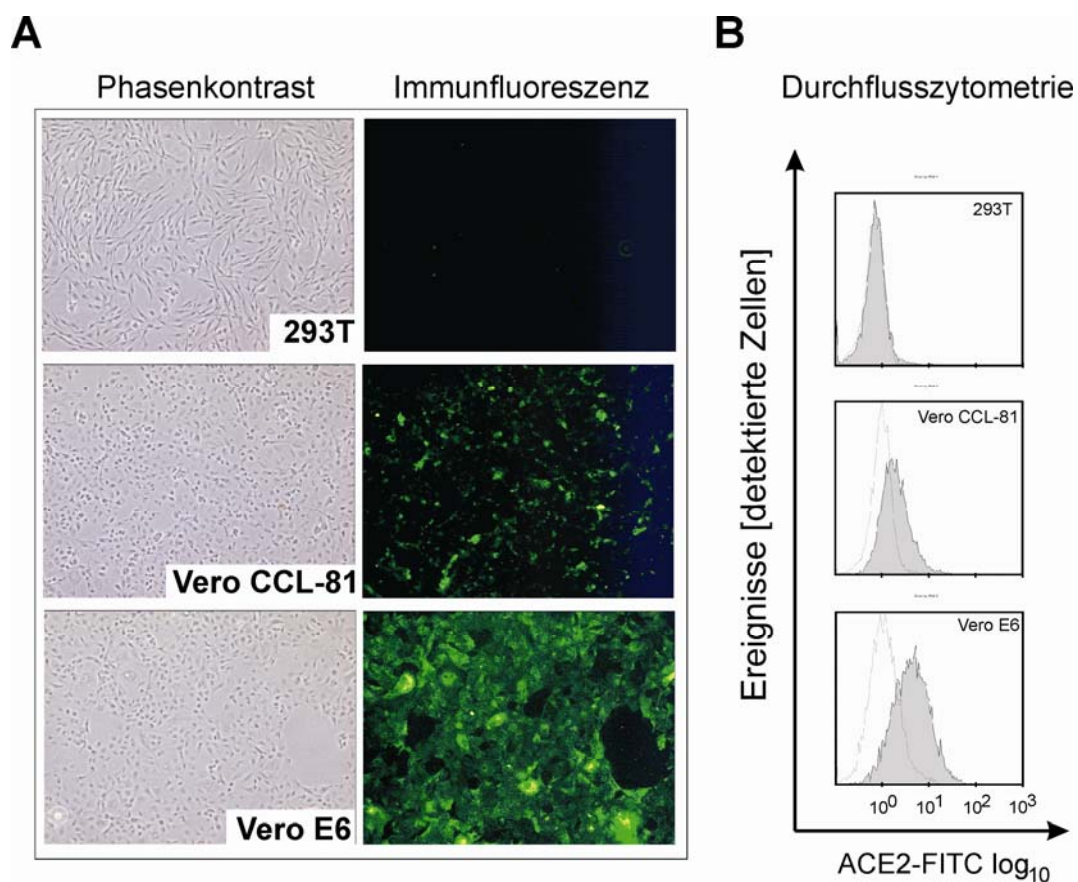


Abb. 5-3: ACE2-Expression in unterschiedlichen Zelllinien. **A)** Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von 293T-Zellen und zwei unterschiedlichen Verozelllinien, CCL-81 und E6. Die Zellen wurden auf Deckgläsern über Nacht bei 37 °C kultiviert. Auf der linken Seite sind Phasenkontrastaufnahmen der Zellen dargestellt. Die ACE2-Expression wurde durch Immunfärbung mit einem ACE2-spezifischen Antikörper und FITC-konjugiertem Sekundärantikörper nachgewiesen und ist auf der rechten Seite dargestellt. **B)** Durchflusszytometrische Untersuchung zur Quantifizierung der ACE2-Oberflächenexpression. Die Zellen wurden durch Accutase-Behandlung vom Zellkulturboden abgelöst. Die Quantifizierung der ACE2-Expression erfolgte nach Färbung der Suspensionszellen mit anti-ACE2-Antikörper und FITC-konjugiertem Sekundärantikörper. Der Graph für die ACE2-positiven Zellen ist grau dargestellt. Kontrollzellen wurden nur mit Sekundärantikörper inkubiert (gestrichelte Linie). Pro Messung wurden 5×10^3 Zellen berücksichtigt.

5.2.2 Effekt der M β CD-Behandlung auf den Cholesterolgehalt von Vero-Zellen

Um die Beteiligung des Cholesterols und eine mögliche Rolle von *lipid rafts* während der einleitenden SARS-CoV-Infektion zu untersuchen, wurden Zielzellen mit M β CD behandelt, um zelluläres Cholesterol aus der Plasmamembran zu entziehen. Zunächst wurden die Vero-Subzelllinien auf den Cholesterolgehalt nach M β CD-Behandlung untersucht (siehe Abb. 5-4).

Es wurde eine fluorometrische Methode, basierend auf einer Enzym-gekoppelten Reaktion, verwendet, die freies Cholesterol und Cholesterylester nachweist. Zellen die mit Medium inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Abb. 5-4 zeigt, dass nach einer M β CD-Behandlung bei 37 °C für 30 min mit unterschiedlichen Konzentrationen in beiden Vero-Zelllinien der gesamte zelluläre Cholesterolgehalt in ähnlichem Ausmaß abnimmt. Bei einer M β CD-Konzentration von 10-20 mM ist der Cholesterolgehalt bei den Vero-Zelllinien um ca. 45-50 % reduziert.

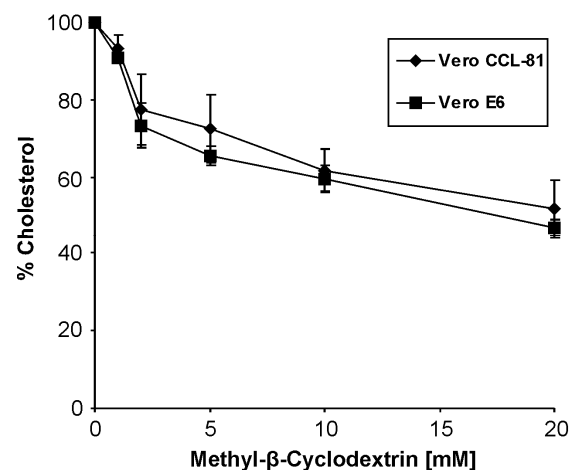


Abb. 5-4: Effekt der M β CD-Behandlung auf den Cholesterolgehalt von Vero CCL-81- und Vero E6-Zellen. Nach der Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen M β CD-Konzentrationen bei 37 °C für 30 min wurde der gesamte zelluläre Cholesterolgehalt in Zelllysaten mit dem *Amplex Red Cholesterol assay kit* (Invitrogen) untersucht. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. (Dargestellt sind die Mittelwerte unabhängiger Versuche, $n=3$)

5.2.3 Einfluss der M β CD-Behandlung auf die Viabilität von Vero-Zellen

Um auszuschließen, dass die Behandlung der Vero-Zellen mit M β CD toxische Effekte auf die Zellen ausübt, wurde die Zellviabilität nach M β CD-Behandlung untersucht. Die Behandlung beider Zelllinien mit einer M β CD-Konzentration bis zu 10 mM führte zu Zellviabilitätsraten ähnlich der unbehandelten Kontrollen (Abb. 5-5 B). M β CD-Konzentrationen von 20 mM hatte einen Einfluss auf die Adhärenz der Zellen, so dass die Zellen sich teilweise von der Oberfläche der Zellkulturschale ablösten (Abb. 5-5 A). Bei allen nachfolgenden Experimenten wurden daher die Zellen mit M β CD-Konzentration bis 10 mM behandelt.

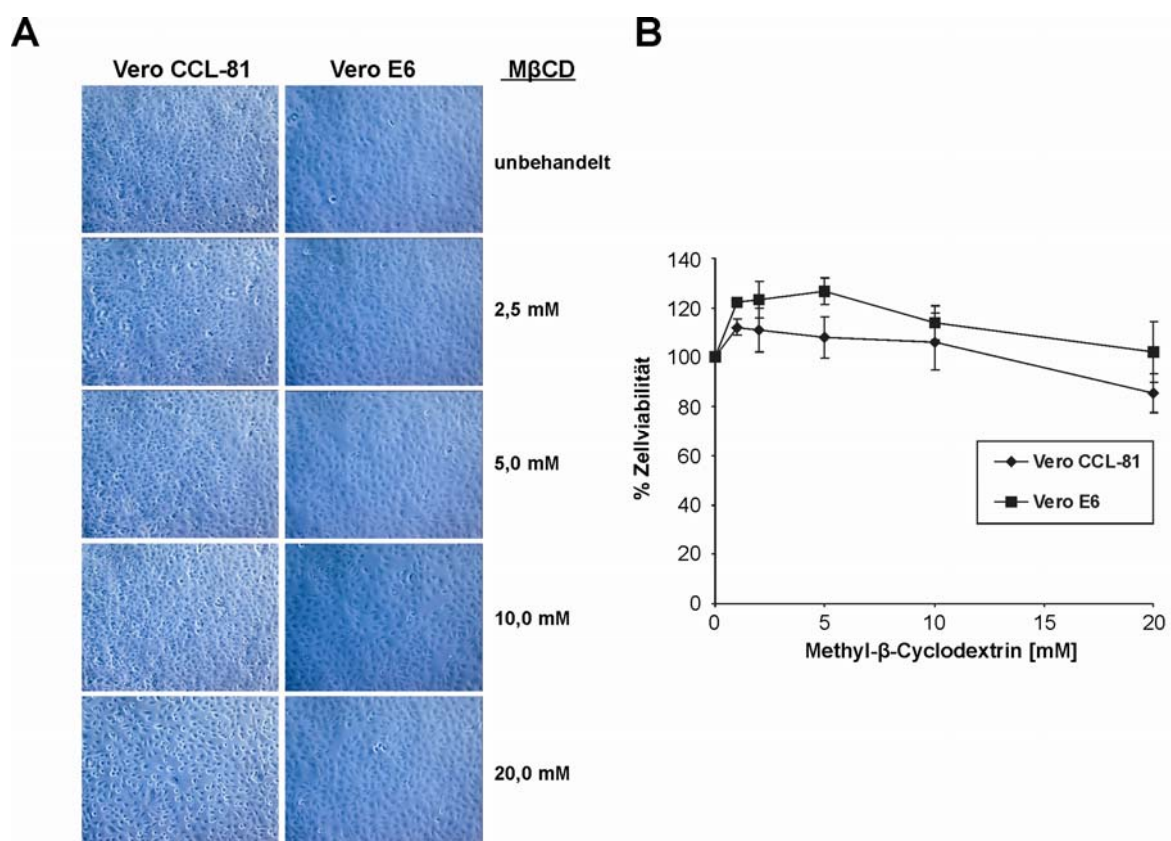


Abb. 5-5: Effekt der M β CD-Behandlung auf die Zellviabilität von Vero CCL-81- und Vero E6-Zellen. Nach der Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen M β CD-Konzentrationen bei 37 °C für 30 min wurden die Zellen im Phasenkontrast mikroskopisch beurteilt (**A**) und die Zellviabilität mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Roche WST-1) untersucht (**B**). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Dargestellt sind repräsentative mikroskopische Phasenkontrast-aufnahmen und Mittelwerte der Zellviabilität mit Standardabweichung unabhängiger Versuche, $n=3$)

5.2.4 Die Infektion mit SARS-CoV-Pseudoviren erfordert Cholesterin in der Zielmembran

Für die Untersuchung zur Rolle von zellulärem Cholesterin während der Einleitung einer SARS-CoV wurden replikationsdefekte Pseudoviren genutzt, die sich von VSV ableiten und das SARS-CoV-Spike-Protein in der Virushülle tragen (VSV- Δ G-S; siehe 1.3). Die Verwendung dieser Viren hat den Vorteil, dass Infektionsversuche unter reduzierten Sicherheitsbedingungen durchgeführt werden können. Außerdem können alle auftretenden Effekte dem S-Protein zugeordnet werden, da keine anderen Coronavirus-Proteine vorhanden sind. Es wurde ein experimenteller Versuchsaufbau etabliert, der Versuche mit Kontrollviren beinhaltet. Als negative Kontrolle wurden Pseudoviren genutzt, die das G-Protein von VSV in der Virusmembran enthalten (VSV- Δ G-G). Bei diesen Pseudoviren und bei VSV wurde gezeigt, dass die Infektion unabhängig von zellulärem Cholesterin der Zielzellen ist (Popik et al., 2002; Thorp und Gallagher, 2004). Um zu zeigen, dass eine Infektion mit den VSV- Δ G-G-Pseudoviren durch die M β CD-Behandlung nicht generell inhibiert wird und es zur Translation des VSV- Δ G-Genoms kommt, wurden Vero CCL-81-Zellen mit unterschiedlichen M β CD-Konzentrationen behandelt und anschließend infiziert. In allen Experimenten wurde das M β CD gründlich vor der Infektion entfernt, um zu vermeiden, dass M β CD einen direkten inaktivierenden Einfluss auf die Viruspartikel hat. Abb. 5-6 zeigt, dass die M β CD-Behandlung von Vero CCL-81-Zellen per se keinen Einfluss auf die Infektiosität von VSV- Δ G-G hat und die Translation des Pseudovirusgenoms unbeeinträchtigt war, unabhängig ob der Cholesterinabzug der Zellen durch M β CD-Behandlung vor oder nach der Infektion mit VSV- Δ G-G erfolgte. Bei abnehmendem Cholesterin Gehalt der Zielzellen blieb die Infektiosität unbeeinträchtigt was in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen ist (Popik et al., 2002; Thorp und Gallagher, 2004).

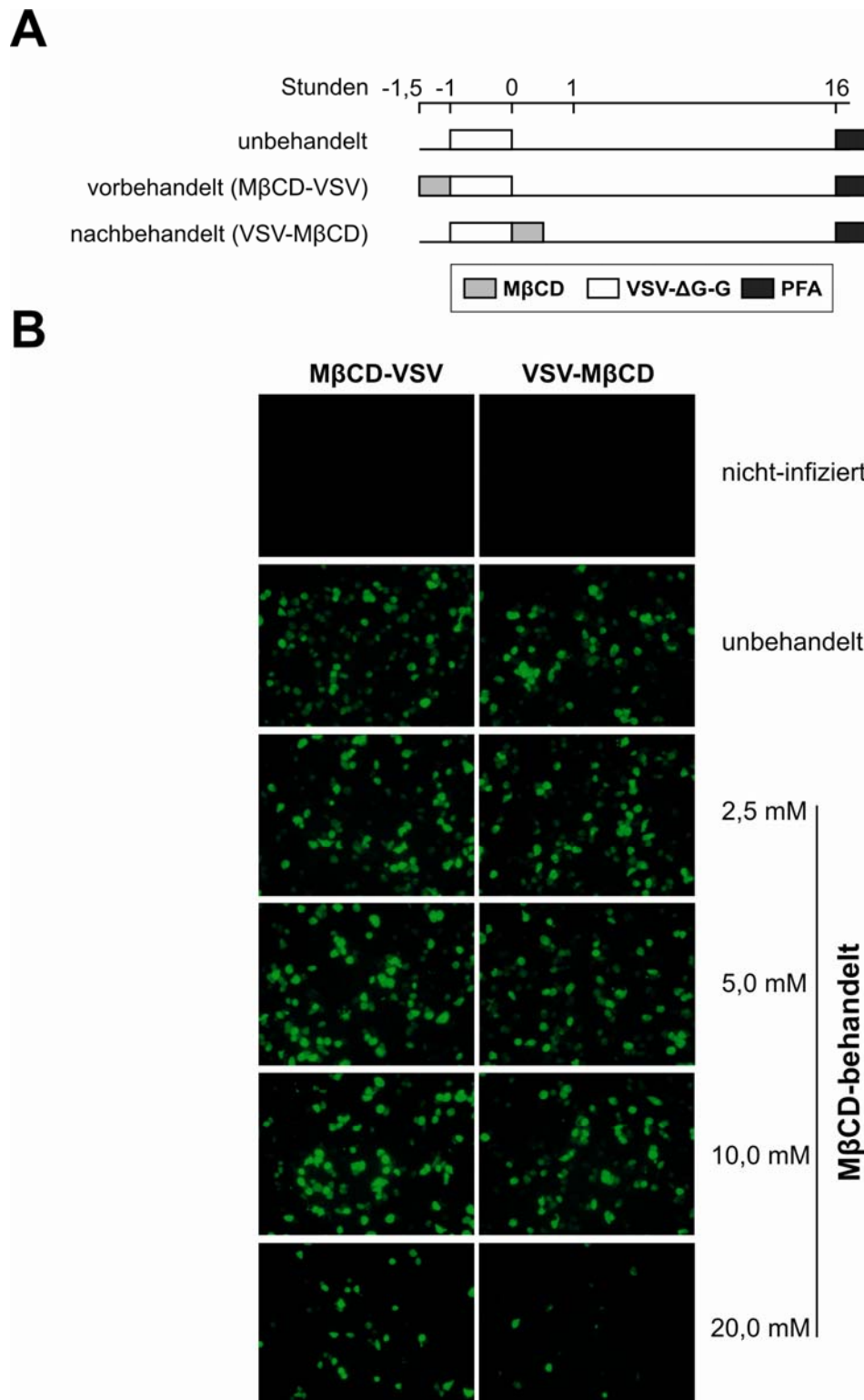


Abb. 5-6: Effekt der M β CD-Behandlung auf die Infektiosität von VSV- Δ G-G und Transkription des VSV- Δ G-Genoms. Vero CCL-81-Deckglaskulturen wurden vor bzw. nach Infektion mit VSV- Δ G-G mit unterschiedlichen M β CD-Konzentrationen behandelt (A). 16 h p.i. wurden die infizierten Zellen fixiert und die eGFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Als positive Kontrolle wurde das infektiöse Bronchitisvirus (IBV), ein aviäres Coronavirus herangezogen. Dieses Virus ist verwandt zu dem Maus-Hepatitisvirus (MHV) und für beide Viren wird eine Abhängigkeit von zellulärem Cholesterol beim Eintritt in empfängliche Zielzellen für dieses Virus gezeigt (Thorpe und Gallagher, 2004; Imhoff et al., 2007). Im Gegensatz zu MHV infiziert IBV Beaudette-US Vero CCL-81-Zellen.

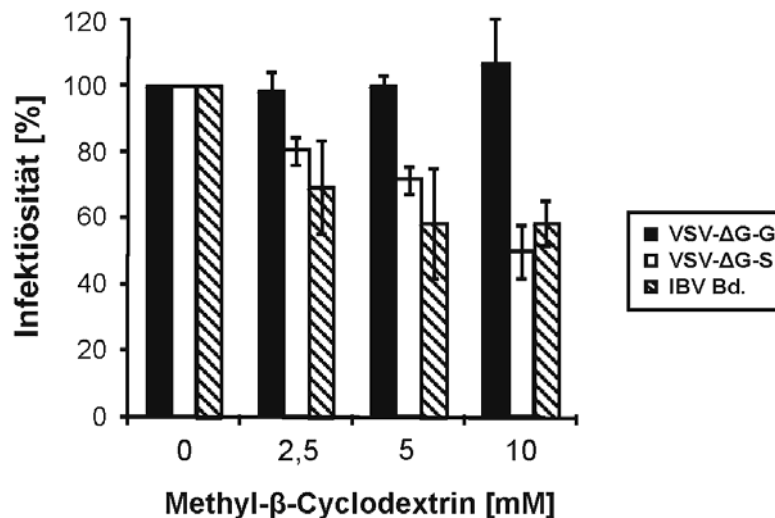


Abb. 5-7: Effekt des Cholesterolentzugs auf die Virusinfektion. Vero CCL-81-Zellen wurden mit unterschiedlichen MβCD-Konzentrationen für 30 min bei 37 °C behandelt und anschließend mit VSV-ΔG-S und den Kontrollviren VSV-ΔG-G und IBV Beaudette-US (IBV Bd) infiziert (MOI=0,001). Nach 8 h p.i. wurden die Zellen fixiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Bestimmung der Infektiösität erfolgte durch Auszählung GFP-exprimierender Zellen (bei den VSV-ΔG-Viren) und immungefärbter Zellen (IBV). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung unabhängiger Versuche, $n=4$.

Im Gegensatz zur Infektion mit VSV-ΔG-G führte die Behandlung der Vero CCL-81-Zellen mit zunehmenden MβCD-Konzentrationen zu einer dosis-abhängigen Inhibition der IBV-Infektion. Bei einer MβCD-Behandlung von 2,5 mM ist ein Rückgang der Infektiösität von etwa 30 % festgestellt worden. Bei 10 mM MβCD-Behandlung ist im Vergleich zu unbehandelten Zellen die Infektiösität um etwa 40 % reduziert (Abb. 5-7). Ähnlich wie bei der IBV-Infektion führte die VSV-ΔG-S-Infektion von MβCD-behandelten Vero CCL-81-Zellen

zu einer Dosis-abhängigen Reduktion der Infektiösität. Bei einer M β CD-Konzentration von 2,5 mM ist die Infektiösität der SARS-CoV-S-haltigen Pseudoviren um etwa 20 % zurückgegangen, bei einer M β CD-Konzentration von 10 mM war die Infektion um etwa die Hälfte reduziert. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus 5.2.2 kann gefolgert werden, dass eine 40-50 %-ige Reduktion des Cholesterolgehalts der Zielzellen eine Reduzierung der Infektiösität der S-haltigen Pseudoviren um etwa 50 % zur Folge hatte.

5.2.5 Untersuchungen zu Cholesterol-unabhängigen Effekten der Cyclodextrin-Behandlung

In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Behandlung eukaryotischer Zellen mit M β CD zu einer Reduzierung der lateralen Diffusionsrate von Membranproteinen zur Folge hatte, unabhängig davon ob die untersuchten Proteine, in *rafts*- oder *non-rafts*-Membranen angereichert waren. Dies deutet darauf hin, dass M β CD noch zusätzliche Auswirkungen auf die Membranorganisation haben könnte, die nichts mit der Reduzierung des Cholesterolgehalts zu tun haben (Shvartsman et al., 2006). Um zwischen cholesterolabhängigen und -unabhängigen Effekten der M β CD-Behandlung zu unterscheiden, wurden Zellen ebenfalls mit α -Cyclodextrin (α CD) behandelt und anschließend mit den VSV-Pseudoviren infiziert. Im Gegensatz zu M β CD wird durch die α CD-Behandlung der Plasmamembran kein Cholesterol entzogen. Ansonsten hat es eine ähnliche Wirkung auf einige Membranproteine wie M β CD (Shvartsman et al., 2006). Im Gegensatz zur M β CD-Behandlung führte die Infektion von Vero CCL-81-Zellen, die mit 10 mM α CD behandelt waren, nicht zu einem Rückgang der Infektiösität von VSV- Δ G-S (vgl. Abb. 5-7 mit Abb. 5-8). Dieses Ergebnis zeigt, dass eher cholesterolabhängige und weniger cholesterolunabhängige Effekte der M β CD-Behandlung für die reduzierte Infektiösität von VSV- Δ G-S verantwortlich sind.

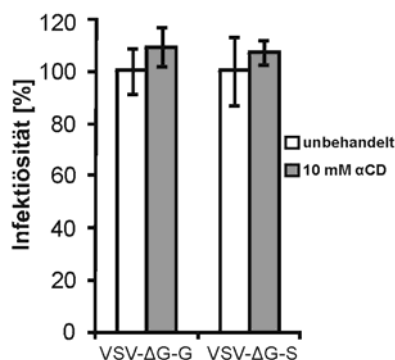


Abb. 5-8: Effekt der α CD-Behandlung von Vero CCL-81-Zellen auf die Infektiösität der VSV-Pseudoviren. Unbehandelte Zellen (weiße Balken) und α CD-behandelte Zellen (graue Balken) wurden mit VSV- Δ G-S und VSV- Δ G-G infiziert (MOI=0,001). Die Bestimmung der Infektiösität erfolgte durch Auszählung eGFP-exprimierender Zellen.

Es wurde außerdem untersucht, ob die Behandlung der Zellen mit M β CD sich auf das Expressionsniveau von ACE2 auf der Zelloberfläche von Vero E6-Zellen auswirkte. Abb. 5-9 zeigt, dass der Entzug von Cholesterol aus der Plasmamembran der Zellen keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression des SARS-CoV-Rezeptors hatte.

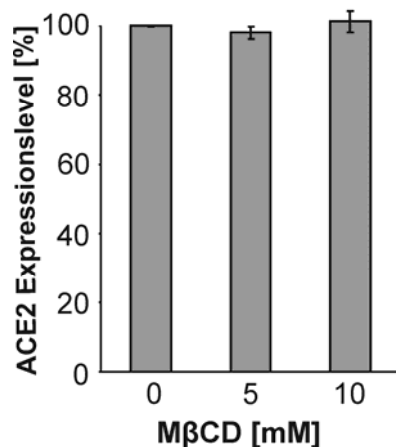


Abb. 5-9: Quantifizierung der ACE2-Oberflächenexpression nach M β CD-Behandlung. Vero E6-Zellen wurden mit anti-ACE2-Antikörper inkubiert anschließend mit unterschiedlichen M β CD-Konzentrationen behandelt. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Zellen wurden durch Accutase-Behandlung vom Zellkulturboden abgelöst, mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer quantitativ untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung unabhängiger Versuche, $n=3$.

5.2.6 Der Effekt des Cholesterolentzugs auf die Infektion mit SARS-CoV-Pseudoviren ist reversibel

Um festzustellen, ob der Effekt des Cholesterolentzugs aus der Plasmamembran von Vero CCL-81-Zellen durch Behandlung mit M β CD reversibel ist, wurden M β CD-behandelte Zellen mit exogenem Cholesterol inkubiert und nach anschließender Infektion mit den Pseudoviren die Wiedergewinnung der Infektiosität ausgewertet. Die Abb. 5-10 zeigt, dass die Zugabe von Cholesterol den inhibitorischen Effekt der M β CD-Behandlung bei der Infektion mit VSV- Δ G-S aufhebt. Die Infektionsraten überstiegen sogar die Werte der Zellen, die nicht mit M β CD behandelt wurden.

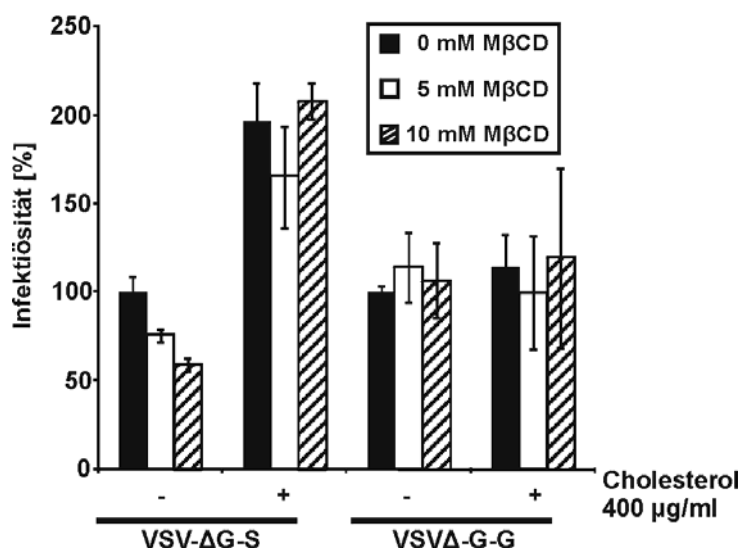


Abb. 5-10: Effekt der Cholesterolzugabe nach MβCD-Behandlung auf die Infektiösität der Pseudoviren. Unbehandelte und MβCD-behandelte Vero CCL-81-Zellen wurden in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von Wasser-löslichem Cholesterol, welches in Medium verdünnt wurde, inkubiert und anschließend mit den VSV-ΔG-Pseudoviren infiziert (MOI=0,001). Die Bestimmung der Infektiösität erfolgte durch Auszählung eGFP-exprimierender Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung unabhängiger Versuche, $n=3$.

Die Infektiösität von VSV-ΔG-G war durch die Zugabe von exogenem Cholesterol nicht beeinträchtigt und die Ergebnisse bestätigen, dass Cholesterol eine wichtige Rolle beim SARS-CoV-S-vermittelten Zelleintritt spielt.

5.2.7 Zell-basierter Bindungstest

Um den Mechanismus zu verstehen, mit dem der S-vermittelte Viruseintritt nach Entzug von zellulärem Cholesterol inhibiert wird, wurde ein Zell-basierter Bindungstest etabliert. Vero E6-Zellen wurden als konfluenter Zellrasen kultiviert. Als Bindungspartner wurde eine Zelllinie etabliert, die sich von *baby hamster kidney*-Zellen (BHK21) ableitet und konstitutiv das SARS-CoV-S-Protein exprimiert (BHK-SΔ18). Um die Anzahl der Zellen zu messen, die an ACE2-exprimierende Vero E6-Zellen binden, wurden BHK-SΔ18-Zellen mit der fluoreszierenden Fettsäure BODIPY FL C₁₂ inkubiert, die sich in die Plasmamembran der

Zellen einlagert. Fluoreszenz-markierte BHK-S Δ 18-Zellen wurden in Serum-freiem Medium resuspendiert und zu den konfluentgewachsenen Vero E6-Zellen in einem Verhältnis von 1:2 (BHK-S Δ 18-Vero E6) gegeben und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Ungebundene Zellen wurden durch Waschen mit PBS 0,5 M NaCl entfernt.

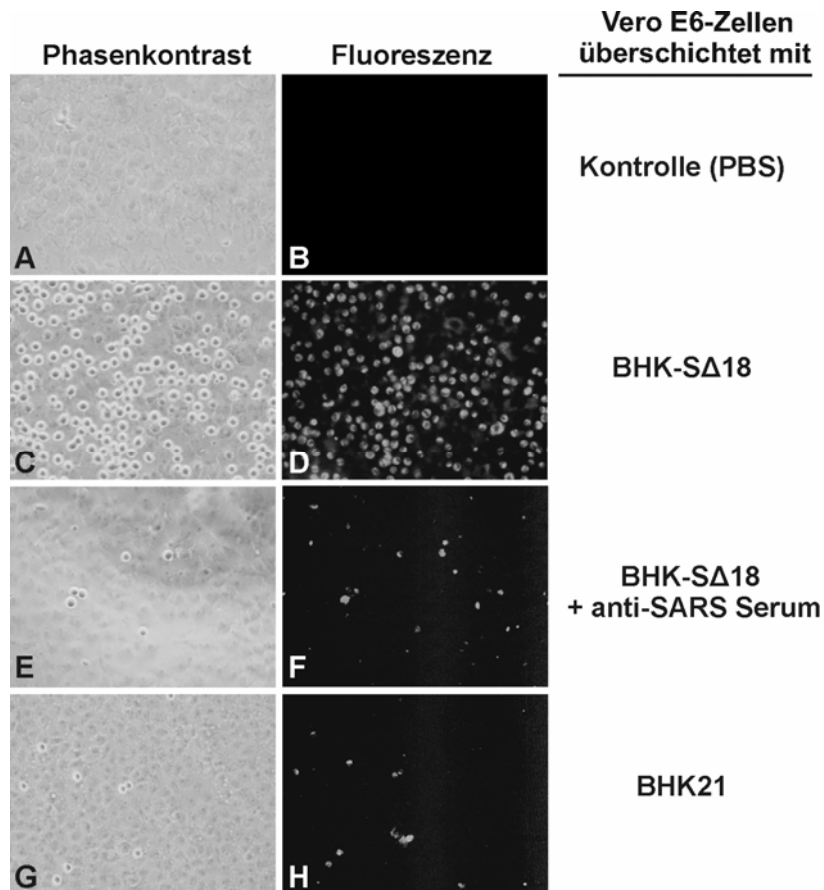


Abb. 5-11: Spezifität des Zell-basierten Bindungstests. BHK-S Δ 18-Zellen wurden mit der fluoreszierenden Fettsäure BODIPY FL C₁₂ und dem Induktor für die S-Proteinexpression inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale wurden die Zellen in Serum-freiem Medium resuspendiert und für den Bindungstest verwendet. Konfluente Vero E6-Zellen wurden mit PBS (A und B), BHK-S Δ 18-Zellen (C und D), BHK-S Δ 18-Zellen, die mit anti-SARS Serum vorbehandelt wurden (E und F) oder mit Fluoreszenz-markierten BHK21-Zellen überschichtet. Bilder im Phasenkontrast sind auf der linken Seite (A, C, E und G), Fluoreszenzbilder sind auf der rechten Seite dargestellt (B, D, F und H).

Abb. 5-11 zeigt, dass BHK-Zellen, die das S-Glykoprotein exprimieren, effizient an Vero E6-Zellen gebunden haben (C und D); im Gegensatz dazu konnten nur wenige der

ursprünglichen BHK21-Zellen nachgewiesen werden, die kein S-Protein exprimieren (G und H). Die Vorinkubation von BHK-SΔ18-Zellen mit anti-SARS Serum führte zu einer Reduzierung der Bindung an Vero E6-Zellen zu einem Maß, welches vergleichbar mit der Bindung von BHK21-Zellen ist (E und F). Die unspezifische Bindung von BHK21-Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt und lag bei etwa 3-5 % (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung der BHK-SΔ18-Zellen an Vero E6-Zellen durch das SARS-CoV-S-Protein vermittelt wird. Zur quantitativen Ermittlung der Bindung wurden die Zellen durch Trypsin-Behandlung vom Zellkulturboden abgelöst, im PBS 0,5 % BSA resuspendiert und im Durchflusszytometer untersucht. Unter Verwendung dieses Bindungsassays wurde die Bedeutung von zellulärem Cholesterol für die Bindung des S-Proteins an das ACE2 analysiert. Konfluentgewachsene Vero E6-Zellen wurden mit MβCD behandelt und anschließend mit BODIPY FL C₁₂-markierten BHK-SΔ18-Zellen überschichtet. Die Behandlung der Vero E6-Zellen mit MβCD inhibierte die Bindung der S-exprimierenden BHK21-Zellen in konzentrationsabhängiger Weise (Abb. 5-12).

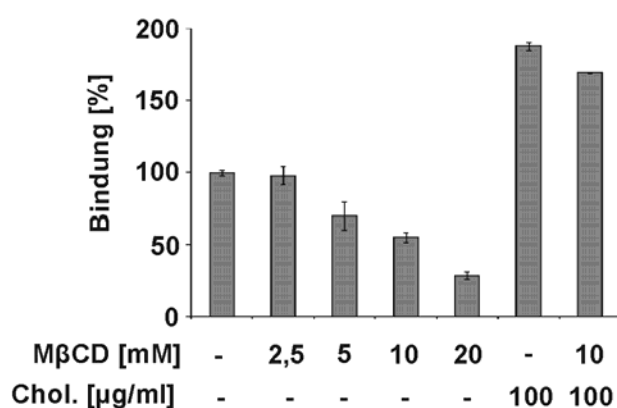


Abb. 5-12: Bedeutung von Cholesterol für die Bindung von BHK-SΔ18-Zellen an Vero E6-Zellen. Konfluente Vero E6-Zellen wurden mit unterschiedlichen MβCD-Konzentrationen behandelt. In Versuchen mit Cholesterolanreicherung wurden die Zellen in Gegenwart von exogenem Cholesterol inkubiert. Nach den Behandlungen wurden BODIPY FL C₁₂-markierte BHK-SΔ18-Zellen zugegeben und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Vero E6- und gebundene BHK-SΔ18-Zellen wurden durch Trypsin-Behandlung abgelöst, in PBS 0,5 % BSA resuspendiert und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen unabhängiger Versuche, *n*=4.

Bei einer M β CD-Konzentration von 10 mM war die Bindung um etwa 50 % reduziert. Dieser Wert ist vergleichbar mit der Reduzierung der Infektionsrate, die bei der Infektion mit VSV- Δ G-S bei der gleichen M β CD-Konzentration beobachtet wurde (vgl. Abb. 5-7). Der hemmende Effekt des Cholesterolzugs auf die Bindung von BHK-S Δ 18-Zellen an ACE2-exprimierende Vero E6-Zellen wurde durch Zugabe von exogenem Cholesterol aufgehoben (Abb. 5-12). Die Behandlung mit Cholesterol führte sogar zu einer 2-fachen Zunahme der Bindung von S-exprimierenden Zellen an Rezeptor-exprimierende Zellen. Die Behandlung von Vero E6-Zellen mit M β CD oder Cholesterol hatte keine Auswirkungen auf die unspezifische Bindung von parentalen BHK21-Zellen, die bei 3-5 % lag (Daten nicht gezeigt). Von diesen Ergebnissen kann darauf geschlossen werden, dass Cholesterol eine wichtige Rolle während der frühen Schritte der Virusreplikation spielt.

5.2.8 Bindungstest mit SARS-CoV-S1-IgG Fusionsprotein

Alternativ zum Zell-basierten Bindungstest mit BHK-S Δ 18-Zellen (siehe 5.2.7) als Bindungspartner wurden ein Bindungstest mit einem löslichen SARS-CoV-S1-IgG Fusionsprotein als Interaktionspartner durchgeführt. Vero E6-Zellen wurden mit unterschiedlichen M β CD-Konzentrationen oder Cholesterol behandelt und anschließend durch Accutase-Behandlung vom Boden der Zellkulturplatte gelöst. Die Zellen wurden mit S1-IgG Fusionsprotein für 1h bei 4 °C inkubiert und die Interaktion zwischen ACE2 und S1-IgG wurde nach Inkubation mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper im Durchflusszytometer quantifiziert. Im Vergleich zum Zell-basierten Bindungstest wurde bei diesem Assay keine signifikante cholesterolabhängige Bindung von S1-IgG an Vero E6-Zellen festgestellt (vgl. Abb. 5-12 mit Abb. 5-13). Die Behandlung von Vero E6-Zellen mit 5 bzw. 10 mM M β CD führte nicht zu einem Rückgang der Bindung der S-Proteinuntereinheit an Vero E6-Zellen und ist vergleichbar mit der Bindung an unbehandelte Kontrollzellen. Bei Cholesterol-behandelten Vero E6-Zellen konnte keine zunehmende Bindung festgestellt werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse beim Vergleich des Zell-basierten Bindungstest und der Inkubation mit S1-IgG hinsichtlich der Bindung des S-Proteins an ACE2 werden in Abschnitt 6.3 diskutiert.

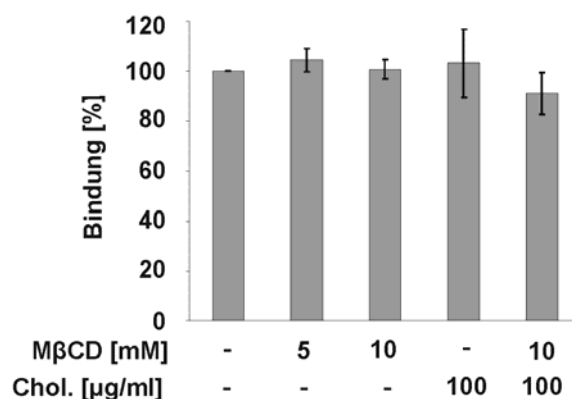


Abb. 5-13: SARS-CoV-S1 Interaktion mit MβCD/Cholesterol-behandelten Vero E6-Zellen. Vero E6-Zellen in Suspension wurden mit unterschiedlichen MβCD-Konzentrationen oder exogenem Cholesterol behandelt und anschließend mit SARS-CoV-S1-IgG Fusionsprotein inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen und nachfolgender Inkubation mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper, wurde die S1-ACE2-Interaktion im Durchflusszytometer quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von unabhängigen Versuchen, $n=3$)

5.2.9 Kopatchinganalyse durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie

Aufgrund des cholesterolabhängigen Viruseintritts von VSV-ΔG-S und der Anreicherung von Cholesterol in *lipid rafts* sollte untersucht werden, ob der SARS-CoV-Rezeptor, das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2), mit dem *lipid raft*-Marker Gangliosid GM1 kolokalisiert. Obwohl *lipid raft*-Mikrodomänen schwer zu visualisieren sind, kann dieses Problem bewältigt werden, indem Antikörper verwendet werden, die *raft*-assoziierte Proteine kreuzvernetzen, so dass *lipid rafts* als fluoreszierende Aggregate an der Zelloberfläche nachgewiesen werden können (Harder et., 1998; Nguyen und Taub, 2002). Um eine mögliche Assoziation von ACE2 mit Mikrodomänen auf der Plasmamembran von Vero E6-Zellen zu untersuchen, wurde konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie der Zellen durchgeführt (Abb. 5-14, Abb. 5-15). Vero E6-Zellen wurden auf Deckgläsern zu einem konfluenten Zellrasen kultiviert, mit anti-ACE2-Antikörper für 1 h auf Eis inkubiert und anschließend fixiert oder für 15 min mit warmem Medium bei 37 °C inkubiert, um die Aggregation von ACE2 zu initiieren. Um die Aggregation zu stoppen wurden die Zellen anschließend auf Eis gestellt, gefolgt von der Fixierung der Zellen. Die ACE2-Antikörperkomplexe wurden durch Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen. Da

Choleratoxin an das Gangliosid GM1 bindet, wurden GM1-haltige *rafts* durch FITC-gekoppelte Choleratoxin B-Untereinheit (Ctx-FITC) nachgewiesen. Die Zellen wurden mit einem konfokalen Immunfluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 5-14). Als nicht-*rafts*-Kontrolle wurden ACE2-FITC-markierte Zellen nach dem Aggregationsschritt mit einem monoklonalen, gegen den Transferrin-Rezeptor (TfR) gerichteten Antikörper inkubiert, gefolgt von der Inkubation mit sekundärem Cy3-gekoppelten Antikörper. (Abb. 5-15). ACE2 konnte als zufällig verteilte Fluoreszenz-Aggregate nachgewiesen werden, die keine Korrelation mit GM1 oder TfR aufwiesen, wenn die Zellen ausschließlich auf Eis inkubiert wurden (Abb. 5-14 A; Abb. 5-15 A). Nach der Erwärmung der Zellen kolokalisierte das ACE2 größtenteils mit dem *raft*-Marker GM1 (Abb. 5-14 B). Eine signifikante Kolokalisation von ACE2 mit dem nicht-*raft* Marker TfR wurde nach der Erwärmung der Zellen nicht festgestellt (Abb. 5-15 B).

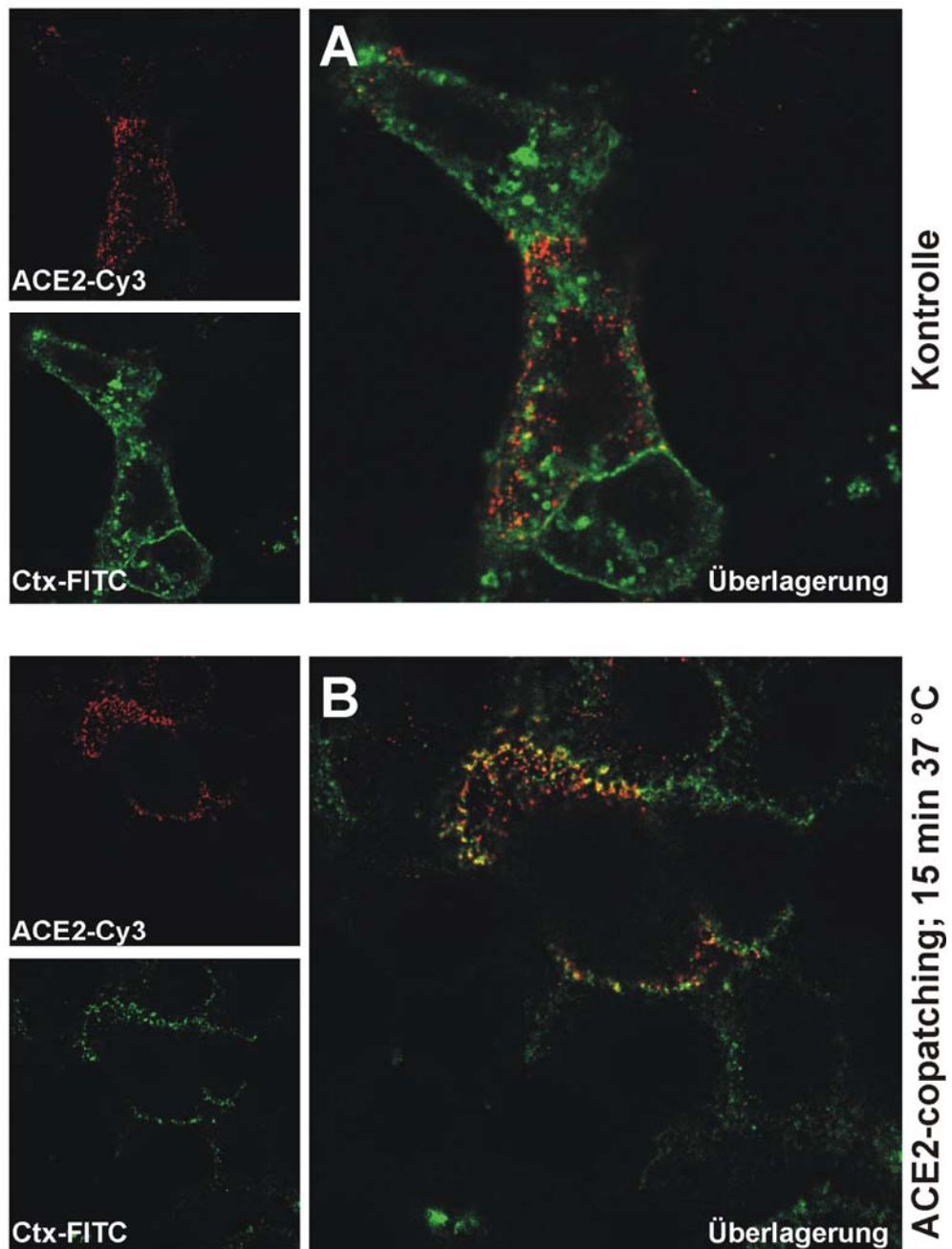


Abb. 5-14: Kolokalisation von ACE2 mit dem *raft*-Marker Gangliosid GM1. Vero E6-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und mit anti-ACE2-Antikörper auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert (A) oder für 15 min bei 37 °C inkubiert (B). Nach der Inkubation mit Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper und Ctx-FITC wurden die Zellen fixiert und im konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dargestellt sind repräsentative Bilder von unabhängigen Versuchen.

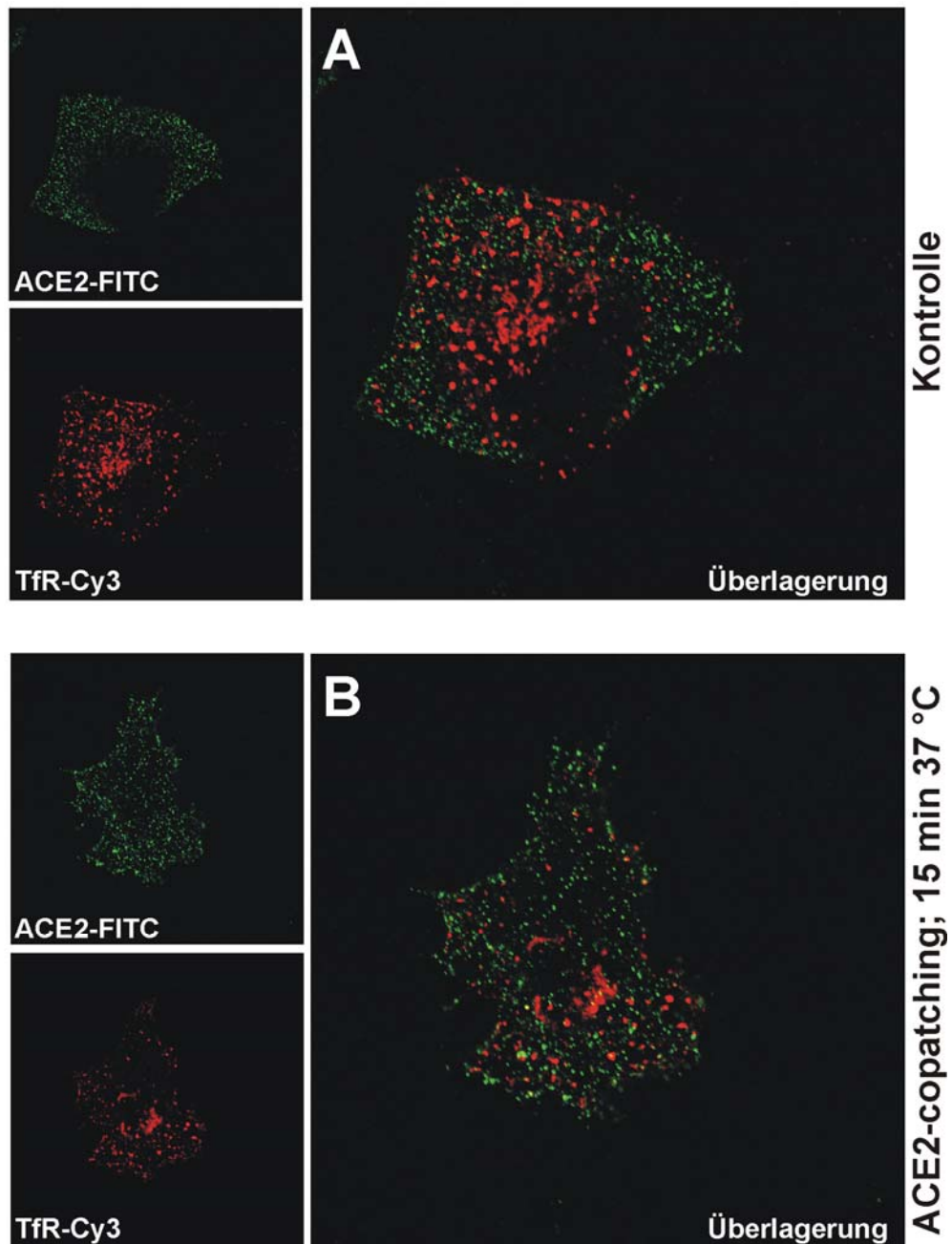


Abb. 5-15: Kolokalisation von ACE2 mit dem nicht-raft-Marker Transferrin-Rezeptor.

Vero E6-Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und mit anti-ACE2-Antikörper auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert (A) oder für 15 min bei 37 °C inkubiert (B). Nach der Inkubation mit FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von TfR erfolgte durch Inkubation mit einem monoklonalen anti-TfR-Antikörper und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte im konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Dargestellt sind repräsentative Bilder von unabhängigen Versuchen.

5.2.10 Isolierung Detergenz-resistenter Membranen (DRMs) und Analyse der ACE2-Verteilung

Eine weitere wichtige Methode, neben der Kopatchinganalyse, zur Untersuchung von *lipid rafts* basiert auf den biochemischen Eigenschaften der Membranzymdomäne, die in nicht-ionischen Detergenzien, wie z.B. Triton-X-100, bei niedrigen Temperaturen relativ unlöslich ist. Die Detergenzbehandlung führt zur Bildung von leichten Membranfraktionen, die Proteine von *lipid raft*-Domänen enthalten, welche miteinander aggregieren. Sie können aus den Fraktionen mit geringer Dichte isoliert werden. Nach Ultrazentrifugation befinden sich DRM-assoziierte Proteine in der oberen Hälfte eines 5-30 %-igen Saccharose-Dichtegradienten (Brown und Rose, 1992) oder an der Grenzfläche eines 5/30 %-igen Saccharose-Stufengradienten (Hope und Pike, 1996). Alternativ können DRMs durch Ultrazentrifugation pelletiert werden und somit von der Detergenz-löslichen Fraktion getrennt werden. Um die Assoziation von ACE2 mit *lipid rafts* zu bestätigen, sollte untersucht werden, ob ACE2 nach der Behandlung von Vero E6-Zellen mit Triton-X-100 bei 4 °C in den Detergenz-resistenten Membranen nachweisbar ist. Vero E6-Zelllysate wurden nach Triton-X-100-Behandlung auf 5/30 %-igen diskontinuierlichen Iodixanolgradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen wurden anschließend auf die Verteilung von ACE2 im Gradient untersucht (Abb. 5-16 A). Parallel wurde die Triton-X-100-unlösliche Membranfraktion durch Pelletierung in der Ultrazentrifuge von der Detergenz-löslichen Membranfraktion separiert (Abb. 5-16 B). Im 5/30 %-igen Stufengradient wurden beim Westernblot durch den ACE2-Antikörper zwei Banden mit einem Molekulargewicht von ~130 kDa bzw. ~250 kDa in der Detergenz-löslichen Fraktion nachgewiesen, die beide mit dem nicht-*rafts*-Marker LAMP-2 kolokalisierten (Abb. 5-16 A, Fraktionen 9-11). Im Gegensatz dazu flotierte der *raft*-Marker Flotillin-2 in die leichten Membranfraktionen und befindet sich an der Grenzfläche des 5/30 %-igen Iodixanol-Stufengradienten (Abb. 5-16 B, Fraktion 3). Die Akkumulierung von ACE2 in den schweren Fraktionen in denen LAMP-2 angereicht ist, führt zu der Annahme, dass der SARS-CoV-Rezeptor ACE2 nicht mit DRMs assoziiert ist. Bei der Pelletierungs-Methode ergibt sich jedoch eine andere Verteilung von ACE2. Hier tritt ebenfalls eine schwache Bande mit einem Molekulargewicht von ~250 kDa auf, die größtenteils mit dem *raft*-Marker Flotillin-2 kolokalisiert und nur schwach in der Detergenz-löslichen Membranfraktion ausgeprägt ist, in welcher der nicht-*rafts*-Marker LAMP-2 angereichert ist (Abb. 5-16 B). In der Triton-X-100-löslichen Fraktion ist überwiegend eine ACE2-Bande mit einem Molekulargewicht von

130 kDa nachweisbar. Diese Ergebnisse bestätigen, dass ACE2 mit DRM5 assoziiert ist und deuten darauf hin, dass vermutlich eine multimere Form des SARS-CoV-Rezeptors mit *lipid rafts* assoziiert ist. Die unterschiedliche Verteilung von ACE2 in den Membranfraktionen bei dem Vergleich der unterschiedlichen methodischen Ansätze wird in Abschnitt 6 diskutiert.

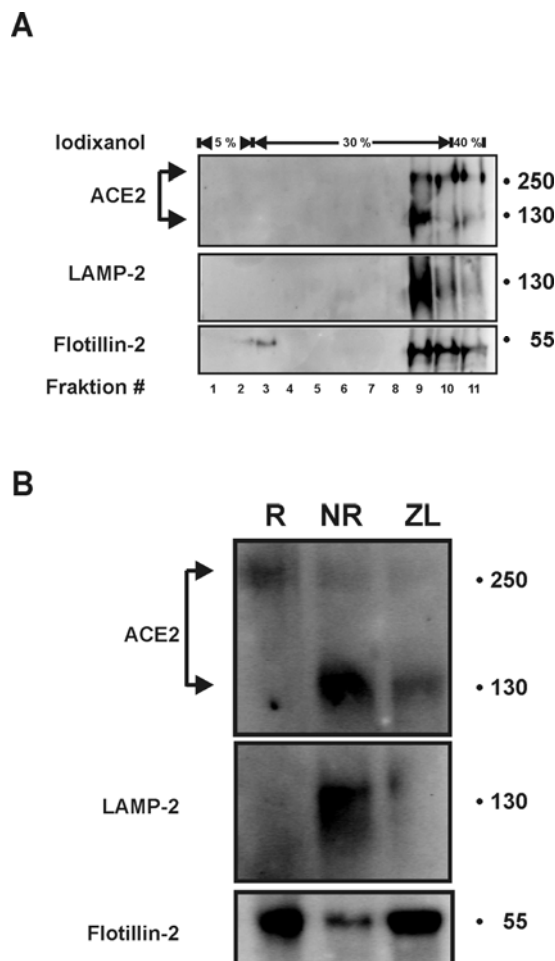


Abb. 5-16 Isolierung Detergenz-resistenter Membranen von Vero E6-Zellen. Vero E6-Zellen wurden in 1,0 % Triton-X-100 lysiert. Die Zelllysate wurden in einem 5-40 %-igen diskontinuierlichem Iodixanol-Gradient durch Ultrazentrifugation aufgetrennt und 1 ml Fraktionen wurden von oben (Fraktion Nr.1) bis unten (Fraktion Nr. 11) abgenommen und nach Ethanol-Fällung in einem 4-12 %-igen Bis-Tris SDS-Gel aufgetrennt (A). Alternativ wurden Triton-X-100- unlösliche Membranen (R) durch Pelletierung von der löslichen Membranfraktion (NR) separiert, in NP-40-Lysispuffer lysiert und nach Ethanol-Fällung in einem 8 %-igen SDS-Gel aufgetrennt (B). Die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen transferiert und anschließend durch Immunoblotting mit Antikörpern gegen ACE2, LAMP-2 und Flotillin-2 nachgewiesen.

6 DISKUSSION

6.1 Untersuchungen zum SARS-CoV-S-Protein-vermittelten Viruseintritt in polarisierte Epithelzellen

Die erste Hürde während der SARS-CoV-Infektion ist die Überwindung der zellulären Membran, um die Virusgene in das Zytosol zu entlassen. Das primäre Ziel einer SARS-CoV-Infektion ist dabei das respiratorische Epithel (Ksiazek et al., 2003; Nicholls et al., 2003; Chen und Hsiao, 2004) und das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) wurde als funktioneller Rezeptor identifiziert (Li et al., 2003; Wang et al., 2004). Differenzierte Epithelzellen liegen als polarisierter Zellverbund vor, welche die Separierung der Plasmamembran in eine apikale - der äußeren Umgebung - und eine basolaterale - dem inneren Milieu des Organismus zugewandte - Domäne beinhaltet. Für die Untersuchungen zum polarisierten Zelleintritt von SARS-CoV wurden in dieser Doktorarbeit Pseudoviren verwendet, die das S-Protein von SARS-CoV in der Virusmembran enthalten (VSV- Δ G-S). Diese Viren leiten sich vom Virus der vesikulären Stomatitis ab (VSV). Um die Funktionalität von VSV- Δ G-S zu überprüfen und die Untersuchungen zum polarisierten Zelleintritt auf Zellen aus unterschiedlichen Zellgeweben auszudehnen, wurden Infektionsversuche hochpolarisierter Filterkulturen durchgeführt. Die Infektion der etablierten polarisierten Epithelzelllinien Calu-3, Caco-2 und Vero E6 mit den SARS-Pseudoviren wurde bei allen Zelllinien ausschließlich über die apikale Domäne vermittelt, wobei die Effizienz der Infektion zwischen den Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß erfolgte. Bei Pseudoviren, die das VSV-G-Protein enthielten, erfolgte die Infektion von Calu-3- und MDCKII-Zellen überwiegend über die basolaterale Domäne und diese Kontrollen zeigen, dass die Membranfilter der Zellkultureinsätze eine basolaterale Infektion nicht generell inhibieren. Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein apikaler Zelleintritt von SARS-CoV von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. In der Arbeit von Tseng et al., (2005) wurde gezeigt, dass die Infektion von Calu-3-Zellen mit SARS-CoV überwiegend über die apikale Membrandomäne erfolgt. Die Infektion dieser Zellen verursachte zytopathische Effekte, die durch die Replikation des Virus hervorgerufen wurden und reflektiert den natürlichen Verlauf der Infektion in der Lunge. Auch bei primären Zellen, die aus humanem Lungengewebe isoliert wurden, wurde die Infektion über diese Domäne vermittelt (Jia et al., 2005; Sims et al., 2005). Am besten lässt sich die Infektion über die

apikale Domäne erklären, wenn der Rezeptor ebenfalls an dieser Domäne exprimiert wird. In Übereinstimmung mit der apikalen Infektion konnte gezeigt werden, dass der SARS-CoV-Rezeptor, das ACE2, überwiegend an der apikalen Domäne von Calu-3-Zellen und primären Lungenzellen exprimiert wird (Jia et al., 2005; Sims et al., 2005; Tseng et al., 2005) und die Expression von ACE2 auf der apikalen Seite wurde in unserer Arbeitsgruppe für Calu-3-, Caco-2- und Vero E6-Zellen bestätigt (Ren et al., 2005). Bei dieser Arbeit wurde durch Immunfluoreszenzanalysen des Weiteren gezeigt, dass die ACE2-Expression in den unterschiedlichen Zelllinien unterschiedlichen stark ausgeprägt ist und das Expressionsniveau mit der Empfänglichkeit der SARS-Pseudoviren korreliert. Vero E6-Zellen exprimierten am meisten ACE2 an der apikalen Membrandomäne und wurden am effizientesten mit VSV- Δ G-S infiziert, gefolgt von Caco-2- und Calu-3-Zellen. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen ACE2-Expressionsstärken an der apikalen Membrandomäne von Calu-3, Caco-2- und Vero E6-Zellen (Ren et al., 2005) und der korrelierenden Infektionseffizienz der SARS-Pseudoviren wird deutlich, dass eine kritische Rezeptordichte von Bedeutung für einen effizienten Viruseintritt sein muss. Das Ausbleiben der Infektion über die basolaterale Domäne kann durch das Fehlen oder durch geringe Expressionsstärken von ACE2 in dieser Domäne erklärt werden. Zusätzlich zur Bedeutung von ACE2 für eine apikale Infektion könnte das Fehlen oder die unzureichende Expression eines Korezeptors an der basolateralen Domäne für das Ausbleiben der Infektion über diese Domäne verantwortlich sein. Die Existenz eines Korezeptors wurde bislang aber noch nicht nachgewiesen. Neben respiratorischen Komplikationen sind bei einigen SARS-Patienten intestinale Symptome aufgetreten. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur das respiratorische Epithel, sondern auch das gastrointestinale Epithel für eine SARS-CoV-Infektion empfänglich ist (Leung et al., 2003). Die Infektion der humanen Colonkarzinomazelllinie Caco-2 mit VSV- Δ G-S zeigt, dass ein gastrointestinaler Infektionsweg nicht ausgeschlossen werden kann. Untersuchungen zur ACE2-Verteilung in unterschiedlichen humanen Zellgeweben haben gezeigt, dass der Rezeptor nicht in Enterozyten des Colons vorhanden zu sein scheint, jedoch reichlich in Enterozyten des Dünndarms vorkommt (Hamming et al., 2004). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die ACE2-Expression im Colon durch zelluläre oder umweltbedingte Stimuli induziert wird. Dies wird dadurch gestützt, dass intestinale Symptome durch eine SARS-CoV-Infektion nur bei einigen Patienten auftraten (Leung et al., 2003). Vermutlich ist die ACE2-Expression in unterschiedlichen Geweben sehr dynamisch und mit der zellulären Differenzierung assoziiert. Faktoren, die die ACE2-Expression regulieren, wurden bisher nicht identifiziert. Zukünftige Untersuchungen des ACE2-Promotors und ACE2-Genexpression in Assoziation mit der Zelldifferenzierung könnten Regulatoren der ACE2-Expression aufdecken und eine SARS-CoV-Infektion dieser Gewebe, als Konsequenz, besser erklären. Desweiteren

würden Untersuchungen an isoliertem Darmgewebe und primären Enterozyten zu einem besseren Verständnis der SARS-CoV-Infektion im gastrointestinalen Trakt führen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die apikale Zelloberfläche die Haupteintrittsstelle des SARS-CoV ist und übereinstimmt mit der Lokalisation des SARS-CoV-Rezeptors. Die Infektion über die apikale Membrandomäne ist auch für andere respiratorische Viren von Bedeutung. Das humane Coronavirus 229E und humanes Parainfluenzavirus infizieren Zielzellen über die apikale Domäne und dies scheint ein wiederkehrendes Muster respiratorischer Erreger zu sein (Wang et al., 2000; Bose et al., 2001). Für das SARS-CoV ist der gerichtete Viruseintritt allzu verständlich unter der Berücksichtigung, dass das Virus vermutlich primär über Tröpfcheninfektion und Einatmung Virus-haltiger Aerosole in Kontakt mit den Luftwegen kommt und anschließend in bronchialen Epithelzellen repliziert (Ksiazek et al., 2003; Nicholls et al., 2003; Chen und Hsiao, 2004). Es sollte auch erwähnt werden, dass das humane Coronavirus NL-63 ebenfalls ACE2 nutzt, um Zellen des respiratorischen Trakts zu infizieren (Hofmann et al., 2005). Daher ist anzunehmen, dass der polarisierte Viruseintritt dieses Virus in differenzierten Epithelzellen ebenfalls über die apikale Membrandomäne erfolgt. Abschließend kann gesagt werden, dass die verwendeten SARS-Pseudoviren Untersuchungen zum S-Protein-vermitteltem Zelleintritt ermöglichten und zu einem besseren Verständnis der initialen Schritte einer SARS-CoV-Infektion führten.

6.2 Die Bedeutung zellulären Cholesterols für den S-Protein-vermittelten Viruseintritt

Die Zellmembran eukaryotischer Zellen enthält unterschiedliche Lipide, die asymmetrisch über den exoplasmatischen und endoplasmatischen Anteil der Lipid-Doppelschicht verteilt sind (Übersichtsarbeit siehe van Meer, 1989). Die verschiedenen Lipide unterscheiden sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften und führen zu einer lateralen Heterogenität in der Membran, wodurch verschiedene Membrandomänen herausgebildet werden (Übersichtsarbeit siehe Rajendran und Simons, 2005). Eine dieser Domänen wird als *lipid rafts* bezeichnet und das Konzept zur Existenz von *lipid rafts* hat das Verständnis der Membranbiologie grundlegend geändert (Simons und Ikonen, 1997). *Lipid rafts* sind dadurch charakterisiert, dass sie überwiegend mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind (Übersichtsarbeiten siehe Simons und Ikonen, 1997; Brown und London 1998; Simons und Toomre, 2000). Für Cholesterol wird angenommen, dass es die kompakte Anordnung der Sphingolipide aufrechterhält, indem es die Zwischenräume der gesättigten

Fettsäureketten der Sphingolipide besetzt und der stabilisierende Effekt von Cholesterol innerhalb dieser Domäne ist allgemein anerkannt. Viele Untersuchungen zur Funktion von *lipid rafts* beinhalten den Entzug des zellulären Cholesterols durch Behandlung der Zellen mit Cholesterol-extrahierenden Substanzen oder durch Inhibition der Cholesterolsynthese. Allerdings hat der Entzug von Cholesterol auch Auswirkungen auf die Membranphysiologie, wie z.B. die Membranpermeabilität und daraus resultierende Effekte sind unabhängig von der Zerstörung der *lipid rafts* (Simons und Ikonen, 2000). Die in dieser Arbeit gezeigten Beobachtungen basieren auf den Cholesterolentzug durch Behandlung der Zellen mit Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD). Im Vergleich zu anderen Cholesterol-bindenden Substanzen, die sich in die Plasmamembran einlagern, hat M β CD ausschließlich eine Oberflächen-wirksame Aktivität und entzieht Cholesterol selektiv durch Einlagerung des Sterols in den zentralen, nicht-polaren Hohlraum des zyklischen Zuckeroligomers (Pitha et al., 1988). In der Literatur werden Effekte durch den Cholesterolentzug auf die teilweise Zerstörung der *lipid rafts* zurückgeführt. Allerdings kann dabei, wie bereits erwähnt, nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die auftretenden Effekte unabhängig von den Auswirkungen auf die Integrität der Cholesterol-angereicherten Mikrodomänen sind. In dem folgenden Abschnitt wird daher eher die Bedeutung von zellulärem Cholesterol für den SARS-CoV-S-Protein-vermittelten Zelleintritt diskutiert. Allerdings sollte der Zusammenhang mit der Funktion von *lipid rafts* für den Viruseintritt berücksichtigt werden.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Untersuchungen zur die Bedeutung von Cholesterol für die Replikation unterschiedlicher Viren durchgeführt. Beim Mäuse-Leukämievirus wurde gezeigt, dass der Entzug von zellulärem Cholesterol die Infektion beeinträchtigt und Cholesterol in der Virusmembran unbedeutend ist (Lu et al., 2002). Bei Influenzaviren und dem Hundestaube-Virus ist nur das Cholesterol der Virusmembran für eine effiziente Infektion wichtig ist (Sieczkarski und Whittaker, 2002; Sun und Whittaker, 2003; Takeda et al., 2003; Imhoff et al., 2007). Einige Viren, z.B. das humane Immunodefizienzvirus (HIV) und das Herpes Simplex-Virus, benötigen Cholesterol in beiden Membranen (Liao et al., 2001, 2003; Graham et al., 2003; Bender et al., 2003; Lee et al., 2003) und im Gegensatz dazu weist das Virus der vesikulären Stomatitis (VSV) keine verminderte Infektiösität auf, wenn Cholesterol auf zellulärer oder viraler Seite entzogen wird (Popik et al., 2002; Thorp und Gallagher, 2004; Imhoff et al., 2007). Für einige Coronaviren - das Maus-Hepatitisvirus (MHV), das Virus der infektiösen Bronchitis (IBV) und das humane Coronavirus 229E (HCoV-229E) - wurde ebenfalls gezeigt, dass die Infektiösität nach Entzug von zellulärem Cholesterol beeinträchtigt ist (Nomura et al., 2004; Thorp und Gallagher, 2004; Imhoff et al., 2007).

Bei den in dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die Bedeutung des zellulären Cholesterols für den SARS-CoV-S-Protein-vermittelten Zelleintritt S-haltiger Pseudoviren nach Behandlung von Zielzellen mit M β CD analysiert und die gezeigten Ergebnisse bestätigen einen cholesterolabhängigen Zelleintritt der S-haltigen Pseudoviren. Durch die Behandlung der Zellen mit M β CD konnte gezeigt werden, dass der Zelleintritt der SARS-Pseudoviren in konzentrationsabhängiger Weise inhibiert wurde. Bei einer Konzentration von 10 mM M β CD wurde ein Rückgang der Infektiösität von ca. 50 % festgestellt und durch die Zugabe von Cholesterol nach M β CD-Behandlung konnte der inhibitorische Effekt aufgehoben werden. Für die Infektionsversuche wurden zwei Kontrollviren einbezogen: Von VSV ist bekannt, dass die Infektiösität nach dem Entzug zellulären Cholesterols aus den Membranen von Zielzellen beibehalten wird (Thorp und Gallagher, 2004; Imhoff et al., 2007) und die Infektion mit Pseudoviren, die das VSV-G-Protein in der Virusmembran enthalten, war durch den Cholesterolentzug der Zielzellen nicht betroffen. Als positive Kontrolle wurden Infektionen mit IBV durchgeführt, da für dieses Virus ein cholesterolabhängiger Zelleintritt beschrieben wurde (Imhoff et al., 2007). Die Behandlung der Zellen mit 10 mM M β CD führte zu einer Reduzierung des gesamten zellulären Cholesterolgehalts um ca. 50 % in Übereinstimmung mit Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Keller und Simons, 1998; Thorp und Gallagher, 2004; Choi et al., 2005; Imhoff et al., 2007) und die Behandlung hatte keine Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen. Zusammen betrachtet weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Cholesterol eine wichtige Rolle beim SARS-CoV-S-vermittelten Zelleintritt spielt. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde ein cholesterolabhängiger Eintritt von SARS-CoV nach Behandlung von Vero E6-Zellen mit M β CD gezeigt und das Ausmaß der Inhibierung ist vergleichbar mit den bei dieser Arbeit verwendeten SARS-Pseudoviren (Li et al., 2007).

In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Behandlung eukaryotischer Zellen mit M β CD zu einer Reduzierung der lateralen Diffusionsrate von Membranproteinen zur Folge hatte. Dies deutet darauf hin, dass M β CD noch zusätzliche Auswirkungen auf die Membranorganisation haben könnte, die nichts mit der Reduzierung des Cholesterolgehalts zu tun haben (Shvartsman et al., 2006). Die Behandlung von Zellen mit α -Cyclodextrin, einem Zucker, der im Gegensatz zu M β CD kein Cholesterol entzieht, aber sonst eine ähnliche Wirkung auf einige Membranproteine wie M β CD hat (Shvartsman et al., 2006), führte nicht zu einem Rückgang der Infektiösität der SARS-Pseudoviren. Dieses Ergebnis zeigt, dass eher cholesterolabhängige und weniger cholesterolunabhängige Effekte durch die M β CD-Behandlung für die reduzierte Infektiösität von VSV- Δ G-S verantwortlich sind. Auch hatte die Behandlung der Zellen mit M β CD keinen Einfluss auf das Expressionsniveau von ACE2 auf der

Zelloberfläche. Dies steht im Widerspruch zu Beobachtungen einer anderen Arbeitsgruppe (Li et al., 2007). Die Unterschiede sind vermutlich auf unterschiedliche Färbeprotokolle zurückzuführen. Bei unseren Untersuchungen wurde der ACE2-Antikörper vor der M β CD-Behandlung dazugegeben wobei in der Arbeit von Li und Mitarbeitern der Antikörper nach dem Cholesterolentzug dazugegeben wurde. Die Ergebnisse können so interpretiert werden, dass das Cholesterol in der Plasmamembran die ACE2-Konformation und somit die Präsentation antigener Epitope verändert.

6.3 Bedeutung von cholesterolreichen Membrandomänen für die S-Protein-ACE2-Interaktion

Die Funktion des S-Proteins in der frühen Phase der SARS-CoV-Infektion ist zum einen die Bindung an den zellulären Rezeptor ACE2 an der Oberfläche von Zielzellen und zum anderen die Induktion der Fusion zwischen der viralen und zellulären Membranen. Um den molekularen Mechanismus zu verstehen, der nach Entzug von zellulärem Cholesterol inhibiert wurde, wurden zwei unterschiedliche Bindungstests etabliert. Der Zell-basierte Bindungstest zeigt, dass die S-vermittelte Bindung an ACE2-exprimierende Zielzellen, denen Cholesterol entzogen wurde, inhibiert ist. Die Behandlung der Vero E6-Zellen mit M β CD führte zu einer reduzierten Bindung der S-exprimierenden Zellen in konzentrationsabhängiger Weise. Der hemmende Effekt des Cholesterolentzugs konnte durch Zugabe von exogenem Cholesterol aufgehoben werden.

Alternativ wurde ein Bindungstest mit einem löslichen SARS-CoV-S1-IgG Fusionsprotein als Interaktionspartner durchgeführt. Im Vergleich zum Zell-basierten Bindungstest wurde bei diesem Assay keine signifikante cholesterolabhängige Bindung von S1-IgG an ACE2 festgestellt. Die Unterschiede können dadurch erklärt werden, dass in S-haltigen Zellen im Gegensatz zum S1-IgG-Fusionsprotein eine multivalente Bindung des S-Proteins möglich ist. In diesen Zellen liegt das S-Protein in hoher Kopienzahl vor und dadurch können mehrere simultane Kontakte zwischen den viralen Glykoproteinen mit Rezeptormolekülen zustande kommen. Beim S1-IgG-Fusionsprotein sind dagegen nur einzelne Kontakte mit ACE2-Molekülen möglich. Für den Zell-basierten Bindungstest könnte die Konzentrierung von ACE2 in bestimmten Bereichen der Membran dabei eine multivalente Bindung mit den S-haltigen Zellen begünstigen und cholesterolreiche Membrandomänen scheinen dafür ein geeignetes Milieu darzustellen. Dies würde auch die reduzierte Bindung nach Cholesterolentzug erklären, unter der Annahme, dass die Aggregation von ACE2 durch

den Cholesterolentzug inhibiert wird. Allerdings scheinen diese Domänen nicht ausschließlich für den Viruseintritt notwendig zu sein und dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass der Cholesterolentzug die Empfänglichkeit der SARS-Pseudoviren reduziert und nicht vollständig aufhebt: Die Infektionsraten der Pseudoviren waren nach Cholesterolentzug um 50-60 % reduziert. Die reduzierte Bindung der S-exprimierenden Zellen nach Cholesterolentzug ACE2-exprimierender Zellen wiederum bietet eine plausible Erklärung für die reduzierte Effizienz der S-vermittelten Infektion der SARS-Pseudoviren. Ein möglicher Mechanismus könnte sein, dass der Entzug des Cholesterols aus den Zielmembranen der ACE2-exprimierenden Zellen zur Dispersion der ACE2-Moleküle auf der Zelloberfläche führt, wodurch multivalente Protein-Protein-Interaktionen folglich beeinträchtigt sind. Diese führt zu der Vermutung, dass eine notwendige Voraussetzung für eine effiziente Interaktion mit mehrfachen Wechselwirkungen die räumliche Konzentrierung von ACE2 in der Plasmamembran ist. Für HIV-1 wurde gezeigt, dass die multivalenten gp120-haltigen Viruspartikel zunächst an CD4-haltige, cholesterolreiche Membrandomänen binden und eine Umverteilung der gp120-CD4-Korezeptorkomplexe nach Rekrutierung des CXCR4-Korezeptors aus der nicht-raft Membrandomäne erfolgt. Diese Umverteilung der Komplexe konnte durch Cholesterolentzug inhibiert werden und führte zu einer verringerten Infektion. Die Bindung von monomerem gp120 führte im Gegensatz dazu nicht zu einer Umverteilung von CD4 oder CXCR4 in der Plasmamembran (Kozak et al., 2002). Darüber hinaus wurde für HIV gezeigt, dass die Behandlung dendritischer Zellen (DC) mit M β CD in einer reduzierten Bindung der Viren an die behandelten Zellen resultiert und diese Beobachtungen wurden durch das Vorhandensein von DC-spezifischen HIV-Anheftungsfaktoren in cholesterolhaltigen Membrandomänen erklärt (Gummuluru et al., 2003). Für die Interaktion des S-Proteins mit ACE2 ist dieser Zusammenhang vergleichbar. Eine funktionelle Beteiligung von cholesterolangereicherten Domänen und die Konzentrierung spezifischer Anheftungsfaktoren in der Plasmamembran wurde u.a. auch für das *Semliki Forest virus*, *Simian virus 40*, Ebolavirus und Marburgvirus vermutet (Lu et al., 1999; Bavari et al., 2002; Pelkmans et al., 2002). Inwiefern der Cholesterolentzug sich auf die Bindung von SARS-CoV-Partikel auswirkt, lässt sich nur durch einen Virus-basierten Bindungstest mit Bestimmtheit sagen. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Bindungstests mit SARS-Pseudoviruspartikeln angestrebt, allerdings konnten keine verlässlichen Ergebnisse erzielt werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass für die Untersuchungen höhere Pseudovirustiter notwendig waren. Die Reinigung bzw. Konzentrierung der SARS-Pseudoviren durch Ultrazentrifugation war technisch nicht möglich, ohne einen massiven Verlust der Infektiosität der Viruspartikel. Vermutlich hielten die S-Proteine in der Virushülle den auftretenden Scherkräften während der Zentrifugation nicht stand und lösten sich während der Sedimentation von den

Viruspartikeln. Dadurch ist anzunehmen, dass auch die Bindung an Zielzellen nachhaltig beeinträchtigt war.

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich sagen, dass eine Cholesterolabhängigkeit für den S-vermittelten Viruseintritt vorliegt und die Abhängigkeit vermutlich während der frühen Phase der Infektion eine Rolle spielt, höchstwahrscheinlich während der Bindung der Viruspartikel an die Zellen. Für eine effiziente Infektion scheint dabei eine multivalente Interaktion der S-Proteine mit ACE2-Rezeptormolekülen notwendig zu sein, die durch die Anreicherung des Rezeptors in cholesterolreichen Membrandomänen ermöglicht wird. Die Cholesterolabhängigkeit kann dem S-Protein zugesprochen werden und scheint durch andere coronavirale Proteine unbeeinflusst zu sein. Derzeit kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich zum ACE2 andere bisher nichtidentifizierte Oberflächenkomponenten wichtig für die Bindung sind. Falls solch eine Komponente in cholesterolreichen Membrandomänen vorkommt, wäre dies eine weitere Erklärung für die Sensitivität hinsichtlich der Bindung nach Cholesterolentzug. Eine zusätzliche Möglichkeit besteht darin, dass Cholesterol einen direkten Interaktionspartner für das S-Protein darstellt. Dies würde den Effekt des Cholesterolentzugs im Zusammenhang mit der S-vermittelten Bindung beim Zell-basierten Bindungstest am einfachsten erklären und wäre mit dem Infektionsmodell der SARS-Pseudoviren vereinbar: Die Zugabe von Cholesterol zu M β CD-behandelten Zellen stellte die Infektiosität der S-haltigen Pseudoviren nicht nur wieder her, es wurde sogar eine 2-fache Zunahme im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt. Eine direkte Interaktion zwischen einem viralen Glykoprotein und Cholesterol wurde für das E1-Protein des *Semliki Forest virus* gezeigt (Klimjack et al., 1994). Inwieweit dies für das SARS-CoV-S-Protein zutrifft, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. An dieser Stelle sollte noch erwähnt werden, dass auch andere Prozesse, wie z.B. die Fusion der viralen Membran mit zellulären Membranen im Zusammenhang mit der Cholesterolabhängigkeit von Bedeutung sein könnten. Eine cholesterolabhängige Membranfusion wurde u.a. für das Maus-Hepatitisvirus, einem typischen Vertreter der Gruppe 2-Coronaviren, und für HIV gezeigt (Kozak et al., 2002; Choi et al., 2005). Bei diesen Arbeiten wurde vermutet, dass die Rekrutierung der zellulären Rezeptoren in cholesterolreiche Membrandomänen zu einer Destabilisierung der Plasmamembranumgebung führt, wodurch der Fusionsprozess erleichtert wird.

6.4 ACE2 und *lipid rafts*

Am besten kann der Effekt des Cholesterolentzugs hinsichtlich der S-vermittelten Bindung und Infektiösität erklärt werden, wenn das ACE2 in *lipid rafts* lokalisiert ist. Wenn *lipid rafts* in Zellen vorhanden sind, sollte es möglich sein, diese Domänen durch Mikroskopie zu visualisieren. Diese Methode ist allerdings dadurch limitiert, dass einige *raft*-Marker wie z.B. GPI-verankerte Proteine und Ganglioside gleichmäßig über die Plasmamembran verteilt sind bzw. dass diese Domänen sehr klein sein können (<70 nm) und sich somit dem Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie entziehen (Brown und London, 1998; Jacobson und Dietrich, 1999; Pike 2006). Dieses Problem kann jedoch bewältigt werden, indem *raft*-assoziierte Proteine durch die Inkubation mit spezifischen Antikörpern kreuzvernetzt werden, so dass diese Domänen als fluoreszierende Aggregate an der Zelloberfläche nachweisbar sind (Harder et., 1998; Nguyen und Taub, 2002). Durch die Aggregation von Proteinen oder Markern in cholesterolreichen Domänen wird auch die Umverteilung anderer Proteine oder Marker in diesen Domänen beeinflusst. Dies impliziert, dass zwei oder mehrere Marker kolokalisieren, wenn sie in derselben Domäne vorkommen (Brown und London, 1998; Harder et al., 1998; Schütz et al., 2000). In dieser Doktorarbeit wurden Kopatchingversuche mit ACE2-spezifischen Antikörpern durchgeführt und die Fluoreszenzdaten zeigen, dass der SARS-CoV-Rezeptor mit dem *raft*-Marker Gangliosid GM1 kolokalisiert. Die Inkubation führt vermutlich zu der Aggregation der ACE2-haltigen Membrandomäne und die Kolokalisation mit GM1 deutet darauf hin, dass ACE2 zumindest teilweise mit den cholesterolreichen Domänen assoziiert ist. Durch konfokale Lasermikroskopie wurde eine Assoziation anderer viraler Rezeptoren mit *lipid rafts* bereits gezeigt: Der HIV-Rezeptor CD4 und der Korezeptoren CCR5 kolokalisieren mit den *raft*-Markern GM1 und GPI-verankertem CD48 (Popik et al., 2002). Für CD13 bzw. Aminopeptidase N, den funktionellen Rezeptoren einiger Gruppe 1-Coronaviren, wie z.B. das humane Coronavirus 229E (Yeager et al., 1992), TGEV (Delmas et al., 1992) und die felines und caninen Coronaviren (Tresnan et al., 1996), wurde ebenfalls eine Assoziation mit cholesterolreichen Membrandomänen durch diese Methode nachgewiesen (Nomura et al., 2004). Nomura und Kollegen haben auch gezeigt, dass durch die Inkubation CD13-exprimierender Zellen mit dem humanem Coronavirus 229E die Aggregation von CD13 erzwungen werden kann und die Aggregate mit *raft*-assoziiertem Caveolin-1, eine Hauptkomponente der Caveolae, kolokalisierten. Die Inkubation mit Viren, in denen der Ligand in hoher Kopienzahl vorliegt, scheint einer Inkubation mit Antikörpern gegenüber vorteilhafter zu sein, weil dadurch eine multivalente Bindung möglich ist und die Aggregation vermutlich um ein vielfaches effizienter erfolgt. Während dieser Doktorarbeit wurde ebenfalls versucht eine Aggregation von ACE2 durch die Inkubation S-haltiger Pseudoviren zu

induzieren. Diese Versuche blieben jedoch erfolglos und sind vermutlich auf zu geringe Pseudovirustiter zurückzuführen. Eine Ursache dafür wurde bereits im oberen Abschnitt diskutiert.

Eine weitere wichtige Methode, neben der Kopatchinganalyse, zur Untersuchung von *lipid rafts* basiert auf den biochemischen Eigenschaften der Membranmikrodomänen, die in nicht-ionischen Detergenzien, wie z.B. Triton-X-100, bei niedrigen Temperaturen relativ unlöslich sind (Brown und Rose, 1992; Brown und London, 1998; Hope und Pike, 1996). Daher werden cholesterolreiche Domänen oder *lipid rafts* u.a. als Detergenz-resistente Membranen (DRMs) bezeichnet. Im Verlauf der Doktorarbeit wurden zwei Studien von anderen Gruppen veröffentlicht, bei denen die Assoziation von ACE2 mit cholesterolreichen Domänen durch die Analyse von DRMs in unterschiedlichen Zelllinien untersucht wurde. In beiden Veröffentlichungen wurde nach der kalten Behandlung der Zellen mit 1,0 %-igem Triton-X-100 und anschließender Dichtegradientenzentrifugation kein ACE2 in *lipid rafts* nachgewiesen (Warner et al., 2005; Li et al., 2007). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den konfokalen Fluoreszenzdaten dieser Doktorarbeit, die zeigen, dass ACE2 in *lipid rafts* zumindest teilweise vorkommt. Daher wurde die Verteilung des SARS-CoV-Rezeptors nach Triton-X-100-Behandlung mittels zweier unterschiedlicher DRM-Isolierungsmethoden untersucht, um die unterschiedlichen Ergebnisse aufzuklären. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Warner et al., (2005) und Li et al., (2007) war das ACE2 in den Detergenz-löslichen Fraktionen angereichert, wenn die Isolierung der DRMs durch einen Saccharosegradienten erfolgte. Bei der Isolierung der DRMs durch Ultrapelletierung zeigte sich jedoch eine andere Verteilung des Rezeptors und das ACE2 wurde in der Membranfraktion nachgewiesen, in der der *raft*-Marker Flotillin-2 angereichert war. Die Unterschiede hinsichtlich der ACE2-Verteilung können nur dadurch erklärt werden, dass die beiden Methoden unterschiedlich effizient hinsichtlich der Isolierung der DRMs sind. Bei der Pelletierungsmethode wird die gesamte DRM-Fraktion von der Detergenz-löslichen Fraktion getrennt und die Auftrennung erfolgt unabhängig von der Dichte der unterschiedlichen Membranfraktionen. Im Gegensatz dazu sammeln sich die DRMs an der Grenzfläche des 5/30 %-igen Saccharose-Stufengradienten, wie durch die Anreicherung von Flotillin-2 deutlich wird, müssen aber eine gewisse Strecke im Gradienten zurücklegen. Dies hat vermutlich zur Folge, dass nicht die gesamte DRM-Fraktion an der Grenzfläche angereichert ist und noch gewisse Anteile in anderen Fraktionen vorhanden sind, wodurch die Menge an ACE2 gewissermaßen aufgeteilt wird und sich auf die Nachweisgrenze auswirkt. Dies würde erklären, warum der ACE2-Nachweis in den leichteren Fraktionen des Stufengradienten ausblieb. Interessanterweise wurde bei der Pelletierungsmethode ausschließlich eine ACE2-

korrespondierende Bande mit einem Molekulargewicht von ~250 kDa in der Triton-X-100-unlöslichen Membranfraktion nachgewiesen und das Laufverhalten im SDS-Gel deutet darauf hin, dass es sich dabei um eine multimere Form, vermutlich um ein Dimer, von ACE2 handelt. Eine Multimerisierung von ACE2 wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Im Gegensatz dazu war in der Triton-X-löslichen Membranfraktion eine Bande mit einem Molekulargewicht von ~130 kDa nachweisbar, die spezifisch von dem ACE2-Antikörper erkannt wurde. Dies führt zu der Vermutung, dass das ACE2 in der Plasmamembran in unterschiedlichen Formen vorliegt und eventuell auch eine unterschiedliche Affinität zu cholesterolreichen Domänen besitzt. Dieser Zusammenhang könnte auch von Bedeutung für die physiologische Funktion von ACE2 sein und sollte in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden. Die Dimersierung ist ein häufiger Mechanismus, der durch Bindung an einen Liganden erst zu der Aktivierung vieler transmembranalen Rezeptoren führt (Übersichtsarbeit siehe Schlessinger, 2002). Als Beispiel sei der Urokinase-*plasminogen activator receptor* (uPAR/CD87) genannt, bei dem es sich um ein GPI-verankertes Membranprotein handelt. Es wurde gezeigt, dass uPAR an der Plasmamembran dimerisiert und die uPAR-Dimere bevorzugt in Detergenz-resistenten *lipid rafts* angereichert werden. Desweiteren wurde gezeigt, dass die Spaltung des Substrats von uPAR in *lipid rafts* erheblich schneller erfolgte und ein Interaktionspartner von uPAR, das Vitronectin, bevorzugt an uPAR-Dimere in *lipid rafts* bindet (Cunningham et al., 2003). Inwieweit ACE2 in einer multimeren Form in der Plasmamembran vorkommt und von Bedeutung für die Affinität zu cholesterolreichen Domänen ist, sollte daher Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. In diesem Zusammenhang wäre auch von Interesse zu untersuchen, an welche Form des ACE2 das S-Protein des SARS-CoV bevorzugt bindet.

Unter Berücksichtigung der konfokalen Fluoreszenzdaten und der biochemischen Untersuchungen kann zusammengefasst werden, dass es sich bei ACE2 um ein *raft*-assoziiertes Protein handelt, wobei zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig zu klären ist, zu welchem Anteil der Rezeptor in den unterschiedlichen Membrandomänen vorliegt. Hierfür bedarf es weiterer Untersuchungen. Letztlich sollte die Frage geklärt werden, ob durch die M β CD-Behandlung ACE2-exprimierender Zellen eine Änderung der ACE2-Verteilung erfolgt.

7 LITERATUR

Ahn, A., Gibbons, D. L., und Kielian, M. (2002) The fusion peptide of Semliki Forest virus associates with sterol-rich membrane domains. *J Virol* **76**: 3267-3275.

Almazan, F., Galan, C., und Enjuanes, L. (2004) The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol* **78**: 12683-12688.

Anderson, H. A., Chen, Y., und Norkin, L. C. (1998) MHC class I molecules are enriched in caveolae but do not enter with simian virus 40. *J Gen Virol* **79 (Pt 6)**: 1469-1477.

Arbely, E., Khattari, Z., Brotons, G., Akkawi, M., Salditt, T., und Arkin, I. T. (2004) A highly unusual palindromic transmembrane helical hairpin formed by SARS coronavirus E protein. *J Mol Biol* **341**: 769-779.

Babcock, G. J., Esshaki, D. J., Thomas, W. D., Jr., und Ambrosino, D. M. (2004) Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor. *J Virol* **78**: 4552-4560.

Bacia, K., Schwille, P., und Kurzchalia, T. (2005) Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3272-3277.

Baric, R. S., Nelson, G. W., Fleming, J. O., Deans, R. J., Keck, J. G., Casteel, N., und Stohlman, S. A. (1988) Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. *J Virol* **62**: 4280-4287.

Bavari, S., Bosio, C. M., Wiegand, E., Ruthel, G., Will, A. B., Geisbert, T. W., Hevey, M., Schmaljohn, C., Schmaljohn, A., und Aman, M. J. (2002) Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med* **195**: 593-602.

Bender, F. C., Whitbeck, J. C., Ponce, de Leon, Lou, H., Eisenberg, R. J., und Cohen, G. H. (2003) Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J Virol* **77**: 9542-9552.

Blau, D. M. und Compans, R. W. (1995) Entry and release of measles virus are polarized in epithelial cells. *Virology* **210**: 91-99.

Bos, E. C., Luytjes, W., van der Meulen, H. V., Koerten, H. K., und Spaan, W. J. (1996) The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. *Virology* **218**: 52-60.

Bose, S., Malur, A., und Banerjee, A. K. (2001) Polarity of human parainfluenza virus type 3 infection in polarized human lung epithelial A549 cells: role of microfilament and microtubule. *J Virol* **75**: 1984-1989.

Brown, D. A. und Rose, J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**: 533-544.

Brown, D. A. und London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 111-136.

- Cavanagh, D. (1995) The coronavirus surface glycoprotein. In: S. G. Siddell (Hrsg.) *The Coronaviridae*. Plenum Press, New York, S. 73-113
- Cavanagh, D. (1997) Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* **142**: 629-633.
- Chan, P. K., To, K. F., Lo, A. W., Cheung, J. L., Chu, I., Au, F. W., Tong, J. H., Tam, J. S., Sung, J. J., und Ng, H. K. (2004) Persistent infection of SARS coronavirus in colonic cells in vitro. *J Med Virol* **74**: 1-7.
- Chatterjee, S. und Mayor, S. (2001) The GPI-anchor and protein sorting. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1969-1987.
- Chazal, N. und Gerlier, D. (2003) Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 226-37, table.
- Chen, P. C. und Hsiao, C. H. (2004) Re: To KF, Tong JH, Chan PK, et al. Tissue and cellular tropism of the coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome: an in-situ hybridization study of fatal cases. *J Pathol* 2004; 202: 157-163. *J Pathol* **203**: 729-730.
- Chen, Y. und Norkin, L. C. (1999) Extracellular simian virus 40 transmits a signal that promotes virus enclosure within caveolae. *Exp Cell Res* **246**: 83-90.
- Choi, K. S., Aizaki, H., und Lai, M. M. (2005) Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release. *J Virol* **79**: 9862-9871.
- Cline, J., Braman, J. C. und Hogrefe, H. H. (1996) PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **24**: 3546-3551.
- Collins, A. R., Knobler, R. L., Powell, H., und Buchmeier, M. J. (1982) Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* **119**: 358-371.
- Cologna, R. und Hogue, B. G. (1998) Coronavirus nucleocapsid protein. RNA interactions. *Adv Exp Med Biol* **440**: 355-359.
- Compans, R. W. (1995) Virus entry and release in polarized epithelial cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **202**: 209-219.
- Compans, R. W. und Herrler, G. (2005). Virus infection of epithelial cells. In: J. Mestecky, J. Bienenstock, M. E. Lamm, L. Mayer, J. R. McGhee und W. Strober (Hrsg.) *Mucosal Immunology*, Dritte Edition, San Diego: Academic Press. S. 769-782
- Corse, E. und Machamer, C. E. (2000) Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi complex and directs release of virus-like particles. *J Virol* **74**: 4319-4326.
- Corse, E. und Machamer, C. E. (2002) The cytoplasmic tail of infectious bronchitis virus E protein directs Golgi targeting. *J Virol* **76**: 1273-1284.
- Crane, J. M. und Tamm, L. K. (2004) Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes. *Biophys J* **86**: 2965-2979.
- Cunningham, O., Andolfo, A., Santovito, M. L., Iuzzolino, L., Blasi, F., und Sidenius, N. (2003) Dimerization controls the lipid raft partitioning of uPAR/CD87 and regulates its biological functions. *EMBO J* **22**: 5994-6003.

de Groot, R. J., Luytjes, W., Horzinek, M. C., van der Zeijst, B. A., Spaan, W. J., und Lenstra, J. A. (1987) Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *J Mol Biol* **196**: 963-966.

de Haan, C. A., Kuo, L., Masters, P. S., Vennema, H., and Rottier, P. J. (1998) Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein. *J Virol* **72**: 6838-6850.

de Haan, C. A., Vennema, H., und Rottier, P. J. (2000) Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *J Virol* **74**: 4967-4978.

de Haan, C. A. und Rottier, P. J. (2005) Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Adv Virus Res* **64**: 165-230.

Dediego, M. L., Alvarez, E., Almazan, F., Rejas, M. T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh, W. J., Zaki, S. R., Subbarao, K., und Enjuanes, L. (2007) A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol* **81**: 1701-1713.

Delmas, B. und Laude, H. (1990) Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol* **64**: 5367-5375.

Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjoström, H., Noren, O., und Laude, H. (1992) Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* **357**: 417-420.

Dong, B. Q., Liu, W., Fan, X. H., Vijaykrishna, D., Tang, X. C., Gao, F., Li, L. F., Li, G. J., Zhang, J. X., Yang, L. Q., Poon, L. L., Zhang, S. Y., Peiris, J. S., Smith, G. J., Chen, H., und Guan, Y. (2007) Detection of a novel and highly divergent coronavirus from asian leopard cats and chinese ferret badgers in southern china. *J Virol* **81**: 6920-6926.

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

Eddin, M. (2003) The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**: 257-283.

Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., und Simons, K. (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* **160**: 113-123.

Enjuanes, L., Brian, D.A., Cavanagh, D., Holmes, K.V., Lai, M. M. C., Laude, H., Masters, P.S., Rottier, P. J., Siddell, S. G., Spaan, W. J., Taguchi, F. und Talbot, P. J. (2000) Coronaviridae. In: M.H. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H. Bishop, E.B. Carsten, M.K. Estes, S.M. Lemon, D.J. McGeoch, J. Maniloff, M.A. Mayo, C.R. Pringle und Wickner R.B. (Hrsg.) *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Academic Press, New York, S. 835-849

Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., und Zuniga, S. (2006) Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu Rev Microbiol* **60**: 211-230.

Fan, H., Ooi, A., Tan, Y. W., Wang, S., Fang, S., Liu, D. X., und Lescar, J. (2005) The nucleocapsid protein of coronavirus infectious bronchitis virus: crystal structure of its N-terminal domain and multimerization properties. *Structure* **13**: 1859-1868.

Fouchier, R. A., Kuiken, T., Schutten, M., Van Amerongen, G., van Doornum, G. J., van den Hoogen, B. G., Peiris, M., Lim, W., Stohr, K., und Osterhaus, A. D. (2003) Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* **423**: 240.

Fukushi, S., Mizutani, T., Saijo, M., Matsuyama, S., Miyajima, N., Taguchi, F., Itamura, S., Kurane, I., and Morikawa, S. (2005) Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Gen Virol* **86**: 2269-2274.

Fuller, S., von Bonsdorff, C. H. und Simons, K. (1984) Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. *Cell* **38**: 65-77.

Fuller, S. D., von Bonsdorff, C. H. und Simons, K. (1985) Cell surface influenza haemagglutinin can mediate infection by other animal viruses. *EMBO J* **4**: 2475-2485.

Gallagher, T. M. (1997) A role for naturally occurring variation of the murine coronavirus spike protein in stabilizing association with the cellular receptor. *J Virol* **71**: 3129-3137.

Gerberding, J. L. (2003) Faster... but fast enough? Responding to the epidemic of severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**: 2030-2031.

Gonzalez, J. M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A. E. und Enjuanes, L. (2003) A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Arch Virol* **148**: 2207-2235.

Gorbalenya, A. E., Snijder, E. J. und Spaan, W. J. (2004) Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *J Virol* **78**: 7863-7866.

Graham, D. R., Chertova, E., Hilburn, J. M., Arthur, L. O. und Hildreth, J. E. (2003) Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. *J Virol* **77**: 8237-8248.

Guan, Y., Zheng, B. J., He, Y. Q., Liu, X. L., Zhuang, Z. X., Cheung, C. L., Luo, S. W., Li, P. H., Zhang, L. J., Guan, Y. J., Butt, K. M., Wong, K. L., Chan, K. W., Lim, W., Shortridge, K. F., Yuen, K. Y., Peiris, J. S. und Poon, L. L. (2003) Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* **302**: 276-278.

Gummuluru, S., Rogel, M., Stamatatos, L. und Emerman, M. (2003) Binding of human immunodeficiency virus type 1 to immature dendritic cells can occur independently of DC-SIGN and mannose binding C-type lectin receptors via a cholesterol-dependent pathway. *J Virol* **77**: 12865-12874.

Haglund, K., Forman, J., Krausslich, H. G. und Rose, J. K. (2000) Expression of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein precursor and envelope proteins from a vesicular stomatitis virus recombinant: high-level production of virus-like particles containing HIV envelope. *Virology* **268**: 112-121.

Haglund, K., Leiner, I., Kerksiek, K., Buonocore, L., Pamer, E. und Rose, J. K. (2002) High-level primary CD8(+) T-cell response to human immunodeficiency virus type 1 gag and env generated by vaccination with recombinant vesicular stomatitis viruses. *J Virol* **76**: 2730-2738.

Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L., Lely, A. T., Navis, G. J. und van Goor, H. (2004) Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* **203**: 631-637.

Hanika, A., Larisch, B., Steinmann, E., Schwegmann-Wessels, C., Herrler, G. und Zimmer, G. (2005) Use of influenza C virus glycoprotein HEF for generation of vesicular stomatitis virus pseudotypes. *J Gen Virol* **86**: 1455-1465.

Hansen, G. H., Delmas, B., Besnardeau, L., Vogel, L. K., Laude, H., Sjostrom, H. und Noren, O. (1998) The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment. *J Virol* **72**: 527-534.

Harder, T. und Simons, K. (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 534-542.

Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. und Simons, K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* **141**: 929-942.

Hofmann, H., Hattermann, K., Marzi, A., Gramberg, T., Geier, M., Krumbiegel, M., Kuate, S., Uberla, K., Niedrig, M. und Pohlmann, S. (2004) S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients. *J Virol* **78**: 6134-6142.

Hofmann, H. und Pohlmann, S. (2004) Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends Microbiol* **12**: 466-472.

Hofmann, H., Pyrc, K., van der, Hoek L., Geier, M., Berkhout, B. und Pohlmann, S. (2005) Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7988-7993.

Holmes, K. V., Zelus, B. D., Schickli, J. H. und Weiss, S. R. (2001) Receptor specificity and receptor-induced conformational changes in mouse hepatitis virus spike glycoprotein. *Adv Exp Med Biol* **494**: 173-181.

Hope, H. R. und Pike, L. J. (1996) Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* **7**: 843-851.

Imhoff, H., von, Messling, V., Herrler, G. und Haas, L. (2007) Canine distemper virus infection requires cholesterol in the viral envelope. *J Virol* **81**: 4158-4165.

Ingallinella, P., Bianchi, E., Finotto, M., Cantoni, G., Eckert, D. M., Supekar, V. M., Bruckmann, C., Carfi, A. und Pessi, A. (2004) Structural characterization of the fusion-active complex of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 8709-8714.

Inoue, Y., Tanaka, N., Tanaka, Y., Inoue, S., Morita, K., Zhuang, M., Hattori, T. und Sugamura, K. (2007) Clathrin-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into target cells expressing ACE2 with the cytoplasmic tail deleted. *J Virol* **81**: 8722-8729.

Ito, H., Watanabe, S., Sanchez, A., Whitt, M. A. und Kawaoka, Y. (1999) Mutational analysis of the putative fusion domain of Ebola virus glycoprotein. *J Virol* **73**: 8907-8912.

Jacob, R. und Naim, H. Y. (2001) Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr Biol* **11**: 1444-1450.

Jacobson, K. und Dietrich, C. (1999) Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol* **9**: 87-91.

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. und Holmes, K. V. (2004) CD209L (L-SIGN) is a receptor for severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15748-15753.

Jia, H. P., Look, D. C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., Farzan, M., Wohlford-Lenane, C., Perlman, S. und 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**: 14614-14621.

Johnson, J. E., Schnell, M. J., Buonocore, L. und Rose, J. K. (1997) Specific targeting to CD4+ cells of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding human immunodeficiency virus envelope proteins. *J Virol* **71**: 5060-5068.

Keller, P. und Simons, K. (1998) Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* **140**: 1357-1367.

Kenworthy, A. K., Petranova, N. und Edidin, M. (2000) High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol Biol Cell* **11**: 1645-1655.

Kyhse-Anderson, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209

Kim, K. H., Narayanan, K. und Makino, S. (1997) Assembled coronavirus from complementation of two defective interfering RNAs. *J Virol* **71**: 3922-3931.

Klimjack, M. R., Jeffrey, S. und Kielian, M. (1994) Membrane and protein interactions of a soluble form of the Semliki Forest virus fusion protein. *J Virol* **68**: 6940-6946.

Klumperman, J., Locker, J. K., Meijer, A., Horzinek, M. C., Geuze, H. J. und Rottier, P. J. (1994) Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J Virol* **68**: 6523-6534.

Kozak, S. L., Heard, J. M. und Kabat, D. (2002) Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol* **76**: 1802-1815.

Kretzschmar, E., Buonocore, L., Schnell, M. J. und Rose, J. K. (1997) High-efficiency incorporation of functional influenza virus glycoproteins into recombinant vesicular stomatitis viruses. *J Virol* **71**: 5982-5989.

Krijnse-Locker, J., Ericsson, M., Rottier, P. J. und Griffiths, G. (1994) Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J Cell Biol* **124**: 55-70.

Krokhin, O., Li, Y., Andonov, A., Feldmann, H., Flick, R., Jones, S., Stroehrer, U., Bastien, N., Dasuri, K. V., Cheng, K., Simonsen, J. N., Perreault, H., Wilkins, J., Ens, W., Plummer, F. und Standing, K. G. (2003) Mass spectrometric characterization of proteins from the SARS virus: a preliminary report. *Mol Cell Proteomics* **2**: 346-356.

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

Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Jiang, C. und Penninger, J. M. (2006) Lessons from SARS: control of acute lung failure by the SARS receptor ACE2. *J Mol Med* **84**: 814-820.

Kunkel, F. und Herrler, G. (1993) Structural and functional analysis of the surface protein of human coronavirus OC43. *Virology* **195**: 195-202.

- Kuo, L. und Masters, P. S. (2002) Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus. *J Virol* **76**: 4987-4999.
- Kuo, L. und Masters, P. S. (2003) The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J Virol* **77**: 4597-4608.
- Lai, M. M. und Cavanagh, D. (1997) The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* **48**: 1-100.
- Lapps, W., Hogue, B. G. und Brian, D. A. (1987) Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. *Virology* **157**: 47-57.
- Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H., Wong, S. S., Leung, S. Y., Chan, K. H. und Yuen, K. Y. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14040-14045.
- Laude, H. und Masters, P. S. (1995) The coronavirus nucleocapsid protein. In: S. G. Siddell (Hrsg.) *The Coronaviridae*. Plenum Press, New York, S. 141-163
- Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A. und Rose, J. K. (1995) Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4477-4481.
- Lee, G. E., Church, G. A. und Wilson, D. W. (2003) A subpopulation of tegument protein vhs localizes to detergent-insoluble lipid rafts in herpes simplex virus-infected cells. *J Virol* **77**: 2038-2045.
- Leung, D. T., Tam, F. C., Ma, C. H., Chan, P. K., Cheung, J. L., Niu, H., Tam, J. S. und Lim, P. L. (2004) Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. *J Infect Dis* **190**: 379-386.
- Leung, W. K., To, K. F., Chan, P. K., Chan, H. L., Wu, A. K., Lee, N., Yuen, K. Y. und Sung, J. J. (2003) Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology* **125**: 1011-1017.
- Li, F., Berardi, M., Li, W., Farzan, M., Dormitzer, P. R. und Harrison, S. C. (2006) Conformational states of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein ectodomain. *J Virol* **80**: 6794-6800.
- Li, G. M., Li, Y. G., Yamate, M., Li, S. M. und Ikuta, K. (2007) Lipid rafts play an important role in the early stage of severe acute respiratory syndrome-coronavirus life cycle. *Microbes Infect* **9**: 96-102.
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H. und Farzan, M. (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**: 450-454.
- Li, W., Zhang, C., Sui, J., Kuhn, J. H., Moore, M. J., Luo, S., Wong, S. K., Huang, I. C., Xu, K., Vasilieva, N., Murakami, A., He, Y., Marasco, W. A., Guan, Y., Choe, H. und Farzan, M. (2005a) Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J* **24**: 1634-1643.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Cramer, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang, S. und Wang, L. F. (2005b) Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**: 676-679.

Liao, Z., Cimasky, L. M., Hampton, R., Nguyen, D. H. und Hildreth, J. E. (2001) Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**: 1009-1019.

Liao, Z., Graham, D. R. und Hildreth, J. E. (2003) Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**: 675-687.

Lim, K. P. und Liu, D. X. (2001) The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. *J Biol Chem* **276**: 17515-17523.

Liu, D. X. und Inglis, S. C. (1991) Association of the infectious bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. *Virology* **185**: 911-917.

London, E. (2005) How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochim Biophys Acta* **1746**: 203-220.

Lu, X., Xiong, Y. und Silver, J. (2002) Asymmetric requirement for cholesterol in receptor-bearing but not envelope-bearing membranes for fusion mediated by ecotropic murine leukemia virus. *J Virol* **76**: 6701-6709.

Lu, Y. E., Cassese, T. und Kielian, M. (1999) The cholesterol requirement for sindbis virus entry and exit and characterization of a spike protein region involved in cholesterol dependence. *J Virol* **73**: 4272-4278.

Luo, Z. und Weiss, S. R. (1998) Roles in cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein. *Virology* **244**: 483-494.

Maeda, J., Repass, J. F., Maeda, A. und Makino, S. (2001) Membrane topology of coronavirus E protein. *Virology* **281**: 163-169.

Makela, M. J., Puhakka, T., Ruuskanen, O., Leinonen, M., Saikku, P., Kimpimaki, M., Blomqvist, S., Hyypia, T. und Arstila, P. (1998) Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol* **36**: 539-542.

Manes, S., del Real, G. und Martinez, A. (2003) Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* **3**: 557-568.

Marozin, S., Prank, U. und Sodeik, B. (2004) Herpes simplex virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites. *J Gen Virol* **85**: 775-786.

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. und Roper, R. L. (2003) The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **300**: 1399-1404.

Marsh, M. und Helenius, A. (2006) Virus entry: open sesame. *Cell* **124**: 729-740.

- Masters, P. S. (1992) Localization of an RNA-binding domain in the nucleocapsid protein of the coronavirus mouse hepatitis virus. *Arch Virol* **125**: 141-160.
- Matsuyama, S., Ujike, M., Morikawa, S., Tashiro, M. und Taguchi, F. (2005) Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12543-12547.
- Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G. und Brown, D. A. (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* **274**: 3910-3917.
- Mukherjee, S., Soe, T. T. und Maxfield, F. R. (1999) Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J Cell Biol* **144**: 1271-1284.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**: 377-388.
- Narayanan, K., Maeda, A., Maeda, J. und Makino, S. (2000) Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J Virol* **74**: 8127-8134.
- Nelson, G. W., Stohlman, S. A. und Tahara, S. M. (2000) High affinity interaction between nucleocapsid protein and leader/intergenic sequence of mouse hepatitis virus RNA. *J Gen Virol* **81**: 181-188.
- Nguyen, D. H. und Taub, D. (2002) CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *J Immunol* **168**: 4121-4126.
- Nguyen, V. P. und Hogue, B. G. (1997) Protein interactions during coronavirus assembly. *J Virol* **71**: 9278-9284.
- Nicholls, J. M., Poon, L. L., Lee, K. C., Ng, W. F., Lai, S. T., Leung, C. Y., Chu, C. M., Hui, P. K., Mak, K. L., Lim, W., Yan, K. W., Chan, K. H., Tsang, N. C., Guan, Y., Yuen, K. Y. und Peiris, J. S. (2003) Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**: 1773-1778.
- Nie, Y., Wang, P., Shi, X., Wang, G., Chen, J., Zheng, A., Wang, W., Wang, Z., Qu, X., Luo, M., Tan, L., Song, X., Yin, X., Chen, J., Ding, M. und Deng, H. (2004) Highly infectious SARS-CoV pseudotyped virus reveals the cell tropism and its correlation with receptor expression. *Biochem Biophys Res Commun* **321**: 994-1000.
- Nomura, R., Kiyota, A., Suzuki, E., Kataoka, K., Ohe, Y., Miyamoto, K., Senda, T. und Fujimoto, T. (2004) Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. *J Virol* **78**: 8701-8708.
- Normile, D. und Enserink, M. (2003) SARS in China. Tracking the roots of a killer. *Science* **301**: 297-299.
- Opstelten, D. J., Raamsman, M. J., Wolfs, K., Horzinek, M. C. und Rottier, P. J. (1995) Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J Cell Biol* **131**: 339-349.
- Parton, R. G. (1996) Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 542-548.
- Peiris, J. S., Lai, S. T., Poon, L. L., Guan, Y., Yam, L. Y., Lim, W., Nicholls, J., Yee, W. K., Yan, W. W., Cheung, M. T., Cheng, V. C., Chan, K. H., Tsang, D. N., Yung, R. W., Ng, T. K. und Yuen, K. Y. (2003a) Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**: 1319-1325.

Peiris, J. S., Chu, C. M., Cheng, V. C., Chan, K. S., Hung, I. F., Poon, L. L., Law, K. I., Tang, B. S., Hon, T. Y., Chan, C. S., Chan, K. H., Ng, J. S., Zheng, B. J., Ng, W. L., Lai, R. W., Guan, Y. und Yuen, K. Y. (2003b) Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* **361**: 1767-1772.

Pelkmans, L., Puntener, D. und Helenius, A. (2002) Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**: 535-539.

Pelkmans, L. (2005) Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. *Biochim Biophys Acta* **1746**: 295-304.

Perlman, S. und Dandekar, A. A. (2005) Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat Rev Immunol* **5**: 917-927.

Pike, L. J. (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* **47**: 1597-1598.

Pitha, J., Irie, T., Sklar, P. B. und Nye, J. S. (1988) Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci* **43**: 493-502.

Poon, L. L., Chu, D. K., Chan, K. H., Wong, O. K., Ellis, T. M., Leung, Y. H., Lau, S. K., Woo, P. C., Suen, K. Y., Yuen, K. Y., Guan, Y. und Peiris, J. S. (2005) Identification of a novel coronavirus in bats. *J Virol* **79**: 2001-2009.

Popik, W., Alce, T. M. und Au, W. C. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-localized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol* **76**: 4709-4722.

Poutanen, S. M., Low, D. E., Henry, B., Finkelstein, S., Rose, D., Green, K., Tellier, R., Draker, R., Adachi, D., Ayers, M., Chan, A. K., Skowronski, D. M., Salit, I., Simor, A. E., Slutsky, A. S., Doyle, P. W., Krajden, M., Petric, M., Brunham, R. C. und McGeer, A. J. (2003) Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* **348**: 1995-2005.

Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K. und Horber, J. K. (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* **148**: 997-1008.

Pringle, D. A. (1992) Committee pursues medly of virus taxonomic issues. *ASM News* **58**, 475-476

Qu, X. X., Hao, P., Song, X. J., Jiang, S. M., Liu, Y. X., Wang, P. G., Rao, X., Song, H. D., Wang, S. Y., Zuo, Y., Zheng, A. H., Luo, M., Wang, H. L., Deng, F., Wang, H. Z., Hu, Z. H., Ding, M. X., Zhao, G. P. und Deng, H. K. (2005) Identification of two critical amino acid residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for its variation in zoonotic tropism transition via a double substitution strategy. *J Biol Chem* **280**: 29588-29595.

Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C. A., Plattner, H. und Illges, H. (2003) Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8241-8246.

Rajendran, L. und Simons, K. (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118**: 1099-1102.

Ren, X., Glende, J., Al Falah, M., de, Vries, V., Schwegmann-Wessels, C., Qu, X., Tan, L., Tschernig, T., Deng, H., Naim, H. Y. und Herrler, G. (2006) Analysis of ACE2 in polarized epithelial cells: surface expression and function as receptor for severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J Gen Virol* **87**: 1691-1695.

Risco, C., Anton, I. M., Enjuanes, L. und Carrascosa, J. L. (1996) The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J Virol* **70**: 4773-4777.

Risco, C., Muntion, M., Enjuanes, L. und Carrascosa, J. L. (1998) Two types of virus-related particles are found during transmissible gastroenteritis virus morphogenesis. *J Virol* **72**: 4022-4031.

Roberts, A., Kretzschmar, E., Perkins, A. S., Forman, J., Price, R., Buonocore, L., Kawaoka, Y. und Rose, J. K. (1998) Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge. *J Virol* **72**: 4704-4711.

Roberts, A., Buonocore, L., Price, R., Forman, J. und Rose, J. K. (1999) Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J Virol* **73**: 3723-3732.

Rodriguez, Boulan E., Kreibich, G. und Sabatini, D. D. (1978) Spatial orientation of glycoproteins in membranes of rat liver rough microsomes. I. Localization of lectin-binding sites in microsomal membranes. *J Cell Biol* **78**: 874-893.

Rose, N. F., Roberts, A., Buonocore, L. und Rose, J. K. (2000) Glycoprotein exchange vectors based on vesicular stomatitis virus allow effective boosting and generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**: 10903-10910.

Rose, N. F., Marx, P. A., Luckay, A., Nixon, D. F., Moretto, W. J., Donahoe, S. M., Montefiori, D., Roberts, A., Buonocore, L. und Rose, J. K. (2001a) An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. *Cell* **106**: 539-549.

Rose, J. K. und Whitt M. A. (2001b) Rhabdoviruses. In: D.M. Knipe und P.M. Howley. (Hrsg.) *Fields Virology*, Vierte Edition, Lippincott Williams and Wilkins, S. 1221-1244

Rossen, J. W., Bekker, C. P., Voorhout, W. F., Strous, G. J., van der, Ende A. und Rottier, P. J. (1994) Entry and release of transmissible gastroenteritis coronavirus are restricted to apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* **68**: 7966-7973.

Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M. H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C., Burns, C., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A. D., Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J. und Bellini, W. J. (2003) Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**: 1394-1399.

Rottier, P. J. (1995) The coronavirus membrane glycoprotein. In: S. G. Siddell (Hrsg.) *The Coronaviridae*. Plenum Press, New York, S. 115-139

Rousset, M. (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* **68**: 1035-1040.

Sainz, B., Jr., Rausch, J. M., Gallaher, W. R., Garry, R. F. und Wimley, W. C. (2005) Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein. *J Virol* **79**: 7195-7206.

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

Schelhaas, M., Jansen, M., Haase, I. und Knebel-Morsdorf, D. (2003) Herpes simplex virus type 1 exhibits a tropism for basal entry in polarized epithelial cells. *J Gen Virol* **84**: 2473-2484.

Schlessinger, J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**: 669-672.

Schnell, M. J., Buonocore, L., Kretzschmar, E., Johnson, E. und Rose, J. K. (1996) Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11359-11365.

Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E. und Allard, J. (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* **127**: 1217-1232.

Schultze, B., Gross, H. J., Brossmer, R. und Herrler, G. (1991a) The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J Virol* **65**: 6232-6237.

Schultze, B., Wahn, K., Klenk, H. D. und Herrler, G. (1991b) Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity. *Virology* **180**: 221-228.

Schultze, B., Zimmer, G. und Herrler, G. (1996) Virus entry into a polarized epithelial cell line (MDCK): similarities and dissimilarities between influenza C virus and bovine coronavirus. *J Gen Virol* **77** (Pt 10): 2507-2514.

Schutz, G. J., Kada, G., Pastushenko, V. P. und Schindler, H. (2000) Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J* **19**: 892-901.

Schwegmann-Wessels, C., Al Falah, M., Escors, D., Wang, Z., Zimmer, G., Deng, H., Enjuanes, L., Naim, H. Y. und Herrler, G. (2004) A novel sorting signal for intracellular localization is present in the S protein of a porcine coronavirus but absent from severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J Biol Chem* **279**: 43661-43666.

Shvartsman, D. E., Gutman, O., Tietz, A. und Henis, Y. I. (2006) Cyclodextrins but not compactin inhibit the lateral diffusion of membrane proteins independent of cholesterol. *Traffic* **7**: 917-926.

Siddell, S.G., Anderson, R., Cavanagh, D., Fujiwara, K., Klenk, H. D., Macnaughton, M. R., Pensaert, M., Stohman, S.A., Sturman, L. und van der Zeijst, B.A. (1983) Coronaviridae. *Intervirology* **20**, 181-189

Siddell, S.G. (1995) The coronaviridae: An introduction. In: S. G. Siddell (Hrsg.) *The Coronaviridae*, Plenum Press, New York, S. 1-10

Sieczkarski, S. B. und Whittaker, G. R. (2002) Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **76**: 10455-10464.

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

Simmons, G., Gosalia, D. N., Rennekamp, A. J., Reeves, J. D., Diamond, S. L. und Bates, P. (2005) Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11876-11881.

Simons, K. und Fuller, S. D. (1985) Cell surface polarity in epithelia. *Annu Rev Cell Biol* **1**: 243-288.

Simons, K. und Virta, H. (1987) Perforated MDCK cells support intracellular transport. *EMBO J* **6**: 2241-2247.

- Simons, K. und Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.
- Simons, K. und Ikonen, E. (2000) How cells handle cholesterol. *Science* **290**: 1721-1726.
- Simons, K. und Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39.
- Simons, K. und Ehehalt, R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* **110**: 597-603.
- Simons, K. und Vaz, W. L. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**: 269-295.
- Sims, A. C., Baric, R. S., Yount, B., Burkett, S. E., Collins, P. L. und Pickles, R. J. (2005) Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of human ciliated airway epithelia: role of ciliated cells in viral spread in the conducting airways of the lungs. *J Virol* **79**: 15511-15524.
- Singer, S. J. und Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731.
- Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L. L., Guan, Y., Rozanov, M., Spaan, W. J. und 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.
- Song, H. C., Seo, M. Y., Stadler, K., Yoo, B. J., Choo, Q. L., Coates, S. R., Uematsu, Y., Harada, T., Greer, C. E., Polo, J. M., Pileri, P., Eickmann, M., Rappuoli, R., Abrignani, S., Houghton, M. und Han, J. H. (2004) Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *J Virol* **78**: 10328-10335.
- Song, H. D., Tu, C. C., Zhang, G. W., Wang, S. Y., Zheng, K., Lei, L. C., Chen, Q. X., Gao, Y. W., Zhou, H. Q., Xiang, H., Zheng, H. J., Chern, S. W., Cheng, F., Pan, C. M., Xuan, H., Chen, S. J., Luo, H. M., Zhou, D. H., Liu, Y. F., He, J. F., Qin, P. Z., Li, L. H., Ren, Y. Q., Liang, W. J., Yu, Y. D., Anderson, L., Wang, M., Xu, R. H., Wu, X. W., Zheng, H. Y., Chen, J. D., Liang, G., Gao, Y., Liao, M., Fang, L., Jiang, L. Y., Li, H., Chen, F., Di, B., He, L. J., Lin, J. Y., Tong, S., Kong, X., Du, L., Hao, P., Tang, H., Bernini, A., Yu, X. J., Spiga, O., Guo, Z. M., Pan, H. Y., He, W. Z., Manuguerra, J. C., Fontanet, A., Danchin, A., Niccolai, N., Li, Y. X., Wu, C. I. und Zhao, G. P. (2005) Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2430-2435.
- Stang, E. und Bakke, O. (1997) MHC class II-associated invariant chain-induced enlarged endosomal structures: a morphological study. *Exp Cell Res* **235**: 79-92.
- Stohlman, S. A., Bergmann, C. C., van der Veen, R. C. und Hinton, D. R. (1995) Mouse hepatitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes protect from lethal infection without eliminating virus from the central nervous system. *J Virol* **69**: 684-694.
- Stohlman, S. A., Baric, R. S., Nelson, G. N., Soe, L. H., Welter, L. M. und Deans, R. J. (1988) Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. *J Virol* **62**: 4288-4295.
- Sturman, L. S., Ricard, C. S. und Holmes, K. V. (1990) Conformational change of the coronavirus peplomer glycoprotein at pH 8.0 and 37 degrees C correlates with virus aggregation and virus-induced cell fusion. *J Virol* **64**: 3042-3050.
- Sun, X. und Whittaker, G. R. (2003) Role for influenza virus envelope cholesterol in virus entry and infection. *J Virol* **77**: 12543-12551.

Surjit, M., Liu, B., Jameel, S., Chow, V. T. und Lal, S. K. (2004) The SARS coronavirus nucleocapsid protein induces actin reorganization and apoptosis in COS-1 cells in the absence of growth factors. *Biochem J* **383**: 13-18.

Surjit, M., Liu, B., Chow, V. T. und Lal, S. K. (2006) The nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. *J Biol Chem* **281**: 10669-10681.

Takada, A., Robison, C., Goto, H., Sanchez, A., Murti, K. G., Whitt, M. A. und Kawaoka, Y. (1997) A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14764-14769.

Takeda, M., Leser, G. P., Russell, C. J. und Lamb, R. A. (2003) Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14610-14617.

Thorp, E. B. und Gallagher, T. M. (2004) Requirements for CEACAMs and cholesterol during murine coronavirus cell entry. *J Virol* **78**: 2682-2692.

Tooze, J., Tooze, S. und Warren, G. (1984) Replication of coronavirus MHV-A59 in sac- cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur J Cell Biol* **33**: 281-293.

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

Tresnan, D. B., Levis, R. und Holmes, K. V. (1996) Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol* **70**: 8669-8674.

Tseng, C. T., Tseng, J., Perrone, L., Worthy, M., Popov, V. und Peters, C. J. (2005) Apical entry and release of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus in polarized Calu-3 lung epithelial cells. *J Virol* **79**: 9470-9479.

Tsukita, S., Furuse, M. und Itoh, M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 285-293.

Tucker, S. P., Thornton, C. L., Wimmer, E. und Compans, R. W. (1993) Bidirectional entry of poliovirus into polarized epithelial cells. *J Virol* **67**: 29-38.

Tyrrell, D.A., Almeida, J.D., Berry, D.M., Cunningham, C. H., Hamre, D., Hofstad, M.S., Mallucci, L., und McIntosh, K.(1968) Coronaviruses. *Nature* **220**, 650

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. und Bingham, R. W. (1975) Coronaviridae. *Intervirology* **5**: 76-82.

van der, Hoek L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., Wertheim-van Dillen, P. M., Kaandorp, J., Spaargaren, J. und Berkhout, B. (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* **10**: 368-373.

van Meer, G. und Simons, K. (1988) Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* **36**: 51-58.

van Meer, G. (1989) Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol* **5**: 247-275.

Vennema, H., Rottier, P. J., Heijnen, L., Godeke, G. J., Horzinek, M. C. und Spaan, W. J. (1990) Biosynthesis and function of the coronavirus spike protein. *Adv Exp Med Biol* **276**: 9-19.

Vennema, H., Godeke, G. J., Rossen, J. W., Voorhout, W. F., Horzinek, M. C., Opstelten, D. J. und Rottier, P. J. (1996) Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J* **15**: 2020-2028.

Viard, M., Parolini, I., Sargiacomo, M., Fecchi, K., Ramoni, C., Ablan, S., Ruscetti, F. W., Wang, J. M. und Blumenthal, R. (2002) Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J Virol* **76**: 11584-11595.

Vlasak, R., Luytjes, W., Leider, J., Spaan, W. und Palese, P. (1988a) The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylsterase activity. *J Virol* **62**: 4686-4690.

Vlasak, R., Luytjes, W., Spaan, W. und Palese, P. (1988b) Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4526-4529.

Wang, G., Deering, C., Macke, M., Shao, J., Burns, R., Blau, D. M., Holmes, K. V., Davidson, B. L., Perlman, S. und McCray, P. B., Jr. (2000) Human coronavirus 229E infects polarized airway epithelia from the apical surface. *J Virol* **74**: 9234-9239.

Wang, P., Chen, J., Zheng, A., Nie, Y., Shi, X., Wang, W., Wang, G., Luo, M., Liu, H., Tan, L., Song, X., Wang, Z., Yin, X., Qu, X., Wang, X., Qing, T., Ding, M. und Deng, H. (2004) Expression cloning of functional receptor used by SARS coronavirus. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 439-444.

Warner, F. J., Lew, R. A., Smith, A. I., Lambert, D. W., Hooper, N. M. und Turner, A. J. (2005) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells. *J Biol Chem* **280**: 39353-39362.

Whelan, S. P., Ball, L. A., Barr, J. N. und Wertz, G. T. (1995) Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8388-8392.

Williamson, J. S. und Stohlman, S. A. (1990) Effective clearance of mouse hepatitis virus from the central nervous system requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol* **64**: 4589-4592.

Winter, C., Schwegmann-Wessels, C., Cavanagh, D., Neumann, U. und Herrler, G. (2006) Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian Infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* **87**: 1209-1216.

Wong, S. K., Li, W., Moore, M. J., Choe, H. und Farzan, M. (2004) A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* **279**: 3197-3201.

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

World Health Organization (WHO) (2003a) Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. Online: www.who.int/csr/sars/country/table2003_09_23/en/

World Health Organization (WHO) (2003b) WHO-recommended measures for persons undertaking international travel from areas affected by severe acute respiratory syndrome (SARS). *Wkly Epidemiol Rec* **78**, 97-120

Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellichio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T. und Holmes, K. V. (1992) Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**: 420-422.

Yu, I. M., Gustafson, C. L., Diao, J., Burgner, J. W., Li, Z., Zhang, J. und Chen, J. (2005) Recombinant severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein forms a dimer through its C-terminal domain. *J Biol Chem* **280**: 23280-23286.

Yu, X., Bi, W., Weiss, S. R. und Leibowitz, J. L. (1994) Mouse hepatitis virus gene 5b protein is a new virion envelope protein. *Virology* **202**: 1018-1023.

Zhong, N. S., Zheng, B. J., Li, Y. M., Poon, 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 und Guan, Y. (2003) Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet* **362**: 1353-1358.

D V V R F P N I T N L C P F G E V F N A
accaagttccccagcgtatacgcctgggagaggaagaagatcagcaactgcgtggccgac 1080
T K F P S V Y A W E R K K I S N C V A D
tacagcgtgctgtacaacagcaccttcttcagcaccttcaagtgctacggcgtgagcgcc 1140
Y S V L Y N S T F F S T F K C Y G V S A
accaagctgaacgacctgtgcttcagcaacgtgtacgccgacagcttcgtggtgaagggc 1200
T K L N D L C F S N V Y A D S F V V K G
gacgacgtgagggcagatcgctcctggacagaccggcgtgatcgccgactacaactacaag 1260
D D V R Q I A P G Q T G V I A D Y N Y K
ctgccccgacgacttcatgggctgctgctggcctggaacaccaggaacatcgacgccacc 1320
L P D D F M G C V L A W N T R N I D A T
agcaccggcaactacaactacaagtacaggtacctgagggcacggcaagctgagggccttc 1380
S T G N Y N Y K Y R Y L R H G K L R P F
gagagggacatcagcaacgtgccattcagccctgacggcaagccctgcacaccacctgcc 1440
E R D I S N V P F S P D G K P C T P P A
ctgaactgctactggccactgaacgactacggcttctacaccaccaccggcatcggtac 1500
L N C Y W P L N D Y G F Y T T T G I G Y
cagccctacaggggtgggtgctgagcttcgagctgctgaacgctcctgccaccgtgtgc 1560
Q P Y R V V V L S F E L L N A P A T V C
ggccctaagctgagcaccgacctgatcaagaaccagtgctgaacttcaacttcaacggc 1620
G P K L S T D L I K N Q C V N F N F N G
ctgaccggcaccggcgtgctgacacctagcagcaagaggttccagcccttccagcagttc 1680
L T G T G V L T P S S K R F Q P F Q Q F
ggcagggacgtgagcgacttcaccgacagcgtgagggaccccaagaccagcgagatcctg 1740
G R D V S D F T D S V R D P K T S E I L
gacatcagcccttgagcttcggcggcgtgagcgtgatcacacctggcaccaacgccagc 1800
D I S P C S F G G V S V I T P G T N A S
agcgaggtggcctgctgtaccaggacgtgaactgcaccgacgtgagcaccgcatccac 1860
S E V A V L Y Q D V N C T D V S T A I H
gccgaccagctgacacctgcctggaggatctacagcaccggcaacaacgtgttccagacc 1920
A D Q L T P A W R I Y S T G N N V F Q T
cagggccggctgcctgatcgccgcccagcagctggacaccagctacgagtgcgacatccct 1980
Q A G C L I G A E H V D T S Y E C D I P
atcgccgcccggcatctgcccagctaccacaccgtgagcctgctgaggagcaccagccag 2040
I G A G I C A S Y H T V S L L R S T S Q
aagagcatcgctggcctacaccatgagcctgggcgcccagcagcagcatcgccctacagcaac 2100
K S I V A Y T M S L G A D S S I A Y S N
aacaccatcgccatttctaccaacttcagcatcagcatcaccaccgaggtgatgcccgtg 2160
N T I A I P T N F S I S I T T E V M P V
agcatggccaagaccagcgtggactgcaacatgtacatctgcccggcagcagcaccgagtg 2220
S M A K T S V D C N M Y I C G D S T E C
gccaacctgctgctccagtagcggcagcttctgcacccagctgaacagggccctgagcggc 2280
A N L L L Q Y G S F C T Q L N R A L S G
atcgccgcccagcagggacaggaacaccagggaggtgttcgcccaggtgaagcagatgtac 2340
I A A E Q D R N T R E V F A Q V K Q M Y
aagaccccaaccctgaagtacttccggcggcttcaacttcagccagatcctgcccgacccc 2400
K T P T L K Y F G G F N F S Q I L P D P
ctgaagcccaccaagaggagcttcatcgaggacctgctgttcaacaaggtgaccctggcc 2460
L K P T K R S F I E D L L F N K V T L A
gacgcccggcttcatgaagcagtagcggcgagtgctggggcgacatcaacgccagggacctg 2520
D A G F M K Q Y G E C L G D I N A R D L

atctgcgcccagaagttcaacggcctgaccgtgctgccacctctgctgaccgacgacatg 2580
I C A Q K F N G L T V L P P L L T D D M
atcgccgcctacaccgcccctggtgagtggtcaccgccaccgcccggctggaccttcggc 2640
I A A Y T A A L V S G T A T A G W T F G
gccggcgcccctccagatcccccttcgccatgcagatggcctacaggttcaacggcatc 2700
A G A A L Q I P F A M Q M A Y R F N G I
ggcgtgaccagaacgtgctgtacgagaaccagaagcagatcgccaaccagttcaacaag 2760
G V T Q N V L Y E N Q K Q I A N Q F N K
gccatcagccagatccaggagagcctgaccaccaccagcaccgccctgggcaagctccag 2820
A I S Q I Q E S L T T T S T A L G K L Q
gacgtggtgaaccagaacgcccaggccctgaacaccctggtgaagcagctgagcagcaac 2880
D V V N Q N A Q A L N T L V K Q L S S N
ttcggcgccatcagcagcgtgctgaacgacatcctgtctagactggacaaggtggaggcc 2940
F G A I S S V L N D I L S R L D K V E A
gaggtgcagatcgacaggctgatcaccggcaggctgcagagcctgcagacctacgtgacc 3000
E V Q I D R L I T G R L Q S L Q T Y V T
cagcagctgatcagggccgcccagatcagggccagcgcacaacctggccgcccaccaagatg 3060
Q Q L I R A A E I R A S A N L A A T K M
agcgagtgctgctgggcccagagcaagaggggtggacttctgcggcaagggctaccacctg 3120
S E C V L G Q S K R V D F C G K G Y H L
atgagcttccccaggccgccccccacggcggtggttctctgcacgtgacctacgtgccc 3180
M S F P Q A A P H G V V F L H V T Y V P
agccaggagaggaacttcaccaccgccccccgcatctgccacgagggcaaggcctacttc 3240
S Q E R N F T T A P A I C H E G K A Y F
cccaggggagggcgtgttcgtgttcaacggcaccagctggttcatcaccagaggaacttc 3300
P R E G V F V F N G T S W F I T Q R N F
ttcagccccagatcatcaccaccgacaacaccttcgtgagcggcaactgacgacgtggtg 3360
F S P Q I I T T D N T F V S G N C D V V
atcggcatcatcaacaacaccgtgtacgacccccctgcagcccagctggacagcttcaag 3420
I G I I N N T V Y D P L Q P E L D S F K
gaggagctggacaagtacttcaagaaccacaccagccccgacgtggacctgggacatc 3480
E E L D K Y F K N H T S P D V D L G D I
agcggcatcaacgccagcgtggtgaacatccagaaggagatcgacaggctgaacgaggtg 3540
S G I N A S V V N I Q K E I D R L N E V
gccaaagaacctgaacgagagcctgatcgacctgcaggagctgggcaagtacgagcagtac 3600
A K N L N E S L I D L Q E L G K Y E Q Y
atcaagtgcccctggtacgtgtggtgggcttcatcgccggcctgatcgccatcgtgatg 3660
I K W P W Y V W L G F I A G L I A I V M
gtgaccatcctgctgtgctgcatgaccagctgctgcagctgcctgaagtga 3162
V T I L L C C M T S C C S C L K !

Aminosäuren

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

Lebenslauf

Nachname	Glende
Vorname	Jörg-Henning
Geburtsdatum	27. Januar 1977
Geburtsort	Hannover,
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1989, August – 1997 Juni	Schule in Isernhagen, Gymnasium Isernhagen Schulabschluss der allgemeinen Hochschulreife
--------------------------	---

Zivildienst

1997, Oktober – 1998, September	Zivildienst, Sozialamt Hannover
---------------------------------	---------------------------------

Studium

1998, Oktober – 2004, August	Studium an der Leibniz Universität Hannover, Fachbereich Biologie; Diplomarbeit zum Thema “Untersuchung des S-Proteins des SARS-assoziierten Coronavirus durch Einbau in die Hülle replikationsdefekter Fremdviren” bei Prof. Georg Herrler, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
2001, September – 2002, Juni USA,	Studium an der Northeastern University, Boston MA, Fachbereich Life Sciences
2004, September	Universitätsabschluss “Diplom-Biologe” ; Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer Molekularbiologie und Virologie (Gesamtnote 1,3)
2004, Oktober – 2007, September	Promotionsstudium an der Leibniz Universität Hannover; Doktorarbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs 745/2 bei Prof. Georg Herrler, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Praktische Tätigkeiten

2000, April – 2001, März	Hilfswissenschaftler an der Leibniz Universität Hannover, UWTH Garbsen. Beteiligung an der Konstruktion einer Andockstation für autonome Unterwasserfahrzeuge
2002, Oktober – 2003, November	Informationstechniker bei CC-CompuNET, Hannover. Roll-out Service für Unternehmen
2007, Oktober -	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, AG Prof. Georg Herrler

Stipendien

2004, Oktober – 2007, September	Promotionsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 745 "Mucosal-Host-Pathogen Interactions"
2001, September – 2002, Juni	DAAD-Auslandsstipendium

Wissenschaftliche Beiträge

Veröffentlichungen

Ren X, Glende J, Al-Falah M, de Vries V, Schwegmann-Weßels C, Qu X, Tan L, Tschernig T, Deng H, Naim HY, Herrler G. Analysis of ACE2 in polarized epithelial cells: surface expression and function as receptor for severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J Gen Virol.* 2005; **87**:1691-5.

Glende J, Schwegmann-Weßels C, Al-Falah M, Pfefferle S, Qu X, Deng H, Drosten C, Naim H, Herrler G. Importance of cholesterol-rich membrane microdomains in the interaction of the S protein of SARS-coronavirus with the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2. Eingereicht

Kongressbeiträge

Ren X, Glende J, Schwegmann-Weßels C, Herrler G. Analysis of ACE2 in polarized epithelial cells. Gesellschaft für Virologie, Annual Meeting, Hannover, March 2005 (Vortrag durch X. Ren)

Ren X, Glende J, Schwegman-Weßels C, Herrler G. Localization of angiotensin-converting enzyme 2-the cellular receptor of the SARS-associated coronavirus. Xth International Nidovirus Symposium; Colorado Springs, CO, USA, June 25-30 2005 (Posterpräsentation durch X. Ren)

Glende J, Herrler G, Schwegmann-Weßels C. Comparison of VSV-derived pseudotypes bearing S proteins of TGEV or SARS-CoV. Xth International Nidovirus Symposium; Colorado Springs CO, USA, June 25-30 2005 (Posterpräsentation)

Glende J, Herrler G, Schwegmann-Weßels C. Comparison of VSV-derived pseudotypes bearing S proteins of TGEV or SARS-CoV. Gesellschaft für Virologie, Annual Meeting, Munich, March 15-18, 2006 (Posterpräsentation)

Glende J, Pfefferle S, Drosten C, Schwegmann-Weßels C, Herrler G. Effect of cholesterol depletion during SARS-CoV entry process. 8th International symposium on positive-strand RNA viruses; Washington DC, USA, May 26-30, 2007 (Posterpräsentation)

Glende J, Pfefferle S, Drosten C, Schwegmann-Weßels C, Herrler G. Effect of cholesterol depletion during SARS-CoV entry process. Third European Congress of Virology, Nürnberg, September 1-5, 2007 (Posterpräsentation)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Georg Herrler für die Überlassung des spannenden Themas. Ich danke ihm auch für die ideenreichen Anregungen und fachlichen Diskussionen zu dieser Arbeit und die Möglichkeit meine eigenen Ideen umzusetzen.

Dr. Christel Schwegmann-Weßels danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und konstruktiven Anregungen bis zu ihrer Babypause. Ich freue mich wenn du wieder da bist und hoffe, dass wir noch eine Weile so gut zusammenarbeiten werden.

Prof. Hassan Y. Naim danke ich für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit und dafür, dass ich bei ihm im Institut immer willkommen war.

Prof. Martin Messerle und PD Dr. Hans Bakker danke ich für die externe Betreuung dieser Arbeit.

PD Dr. Gert Zimmer danke ich für die Unterstützung im Labor und für die Bereitstellung des VSV- Δ G-Systems und VSV-Antikörper.

Dr. Marwan Al-Falah und Zeynep Isgueder-Hein danke ich für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen über ACE2. Insbesondere danke ich den beiden für die Einarbeitung in die Methodik zur Isolierung Detergenz-resistenter Membranen.

Dr. Robert Lindner danke ich für die Einführung in die Methodik der Kopatchinganalyse und Herrn Dr. Rudolf Bauerfeind für die Einarbeitung am konfokalen Lasermikroskop.

Meiner Zimmernachbarin Christine danke ich insbesondere für die lustige und angenehme Zusammenarbeit im Büro. Für das gute Arbeitsklima im Labor danke ich allen Kollegen der AG Herrler und AG Zimmer, André, Caro, Katherina, Julia, Alexandra, Diane, Markus Lorek, Maren, Sahar, Nazeer, Markus Hofmann, Martina, Sandra und Sabine. Ebenfalls danke ich meinen ehemaligen Kollegen Wiebke, Brigitte, Heidi und Xiaofeng.

Ich danke auch allen weiteren Kollegen des Instituts für Virologie, die nicht namentlich erwähnt sind.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für die moralische Unterstützung wenn es im Labor mal nicht so gut lief und die Möglichkeiten, die sie mir gegeben haben, diese Arbeit anzufertigen. Ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen.

