

**Untersuchungen zur Interaktion der  
zytoplasmatischen Domäne des TGEV S-Proteins  
mit zellulären Proteinen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biol. Anna Trincone  
geboren am 18.01.1981 in Pozzuoli / Italien

2011

Referentin: Dr. vet. med. Christel Elisabeth Schwegmann-Weßels

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Walter Müller

Tag der Promotion: 20.09.2011

*a mia madre*

## Zusammenfassung

Das Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine (TGEV) gehört zur Familie der *Coronaviridae* und löst bei Schweinen Darminfektionen aus, die bei Saugferkeln zum Tode führen können. Einen Pathogenitätsfaktor stellt das Oberflächenglykoprotein S (S-Protein) dar, das für die Rezeptorbindung sowie Fusion des Virus mit der Zellmembran verantwortlich ist. Die Virusreplikation von TGEV findet im Zytoplasma statt, und die Viruspartikel werden im ER-Golgi-intermediären-Kompartiment (ERGIC) gebildet. Im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins befindet sich ein Tyrosinmotiv mit der Sequenz YEPI. Dieses tyrosinbasierte Motiv ist verantwortlich für die intrazelluläre Retention des TGEV S-Proteins.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kompartimentmarker eingesetzt, um die genaue intrazelluläre Lokalisierung des TGEV S-Proteins zu ermitteln. In der Fluoreszenz- und in der konfokalen Mikroskopie zeigte sich, dass das TGEV S-Protein mit dem ERGIC-Marker ERGIC53 kolokalisiert. Zwei Mutanten, TGEVS\_Y/A und TGEVS\_K/M wurden vergleichend dazu eingesetzt. Das TGEVS\_Y/A Protein weist im zytoplasmatischen Abschnitt einen Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Alanin auf. Es wird nicht mehr intrazellulär zurückgehalten und wandert zur Zelloberfläche. Bei der TGEVS\_K/M Mutante ist das Lysin im zytoplasmatischen Abschnitt gegen ein Methionin ausgetauscht. Dies führt zur Endozytose der zur Plasmamembran transportierten Mutante. Diese mutierten Proteine wurden somit nicht mehr intrazellulär zurückgehalten und kolokalisierten nicht mit dem ERGIC-Marker. Die Kolokalisierungsstudien fanden in BHK21-Zellen (Hamsternierenzellen) statt, wurden jedoch in porcinen Zelllinien (Schweine Hoden- und epitheliale Ileumzellen) bestätigt, um *in vivo* ähnliche Bedingungen nachzuahmen.

Im Folgenden wurde das Endozytoseverhalten der TGEVS\_K/M Mutante vergleichend zum authentischen S-Protein näher untersucht. Zum einen fanden Kolokalisierungsstudien dieser Mutante mit Endozytosemarker wie RhoGTPase, AP2 $\mu$ 2 und CD63 statt. Zum anderen wurde ein Funktionstest, ein *antibody uptake assay*, durchgeführt, um endozytotische Bedingungen zu gewährleisten. Anhand dieser Untersuchungen wurde festgestellt, dass der Austausch eines Lysins gegen ein Methionin im zytoplasmatischen Abschnitt ausreicht, um ein Endozytosesignal zu erstellen. Die TGEVS\_K/M Mutante wies eine Kolokalisierung mit allen Endozytosemarkern auf. Insbesondere zeigte die Kolokalisierung

mit der  $\mu 2$ -Untereinheit von AP2, dass die TGEVS\_K/M Mutante die Bildung von Vesikeln induziert. Des Weiteren wurde getestet, ob das TGE Virus mit der ESCRT-Maschinerie bzw. deren Marker (Vps4A) interagiert bzw. kolokalisiert. In Infektionsversuchen mit TGEV konnte nicht eindeutig eine Kolokalisierung mit Vps4A festgestellt werden.

Um die Bedeutung des tyrosinbasierten Signals für die Virusbildung und -reifung zu verstehen, wurde nach einem/mehreren zellulären Interaktionspartnern gesucht, die mit dem Retentionssignal wechselwirken. Unterschiedliche Methoden wurden angewandt, um dieses Ziel zu erreichen. Zum einen wurde der zytoplasmatische Abschnitt des Wildtyp S-Proteins und seiner Mutanten mit unterschiedlichen *tags* wie *Flag* oder *HA* fusioniert und mittels *pulldown assay* nach Interaktionspartnern gesucht. Zum anderen wurde der GST *pulldown assay* sowie die *tandem affinity purification* eingesetzt. Mit der GST-Methode und nachfolgender massenspektrometrischer Analyse konnte Filamin A als potentieller Kandidat identifiziert werden. Die Interaktion des S-Proteins mit Filamin A wurde mithilfe einer Koimmunpräzipitation bestätigt. Dabei konnte das Wildtyp S-Protein, im Gegensatz zur TGEVS\_Y/A Mutante, Filamin A aus einem porzinen Zelllysate immunpräzipitieren. Das HA-Konstrukt mit dem zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins konnte ebenfalls Filamin A aus einem Proteingemisch isolieren. Nach einer Virusinfektion konnte außerdem eine partielle Kolokalisierung zwischen Filamin A und dem S-Protein beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das tyrosinbasierte Retentionssignal von TGEV das S-Protein im ERGIC zurückhält. Dieses Oberflächenprotein befindet sich somit am Ort der Virusknospung und kann in die Viruspartikel eingebaut werden. Die Retention im ERGIC wird vermutlich durch die Interaktion mit einem zellulären Protein wie Filamin A unterstützt. Die Analyse der Mutanten hat außerdem gezeigt, dass ein einziger Aminosäureaustausch den Proteintransport beeinflussen kann.

**Schlagnworte:** TGEV S-Protein, Retentionssignal, ERGIC, Interaktionspartner, Endozytose

## Abstract

Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) belongs to the family of *Coronaviridae*. This enteropathogenic virus causes diarrhea in suckling piglets with mortality rates up to 100%. The viral surface glycoprotein S mediates binding and fusion of the virus to the cell membrane. Replication of TGEV takes place in the cytoplasm and virus assembly occurs in the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC). The cytoplasmic tail of the S protein contains a tyrosine motif (YEPI), which is responsible for its intracellular retention.

One aim of this work was to determine the intracellular localisation of the TGEV S protein related to compartment markers for ER, ERGIC and Golgi. Fluorescence and confocal microscopy showed a colocalisation between the S protein and the ERGIC marker (ERGIC53). Two mutants, TGEVS\_Y/A, and TGEVS\_K/M were compared with the authentic S protein. Both mutant proteins abolished the colocalisation with the ERGIC marker. In the cytoplasmic tail of TGEVS\_Y/A the amino acid tyrosine is replaced by an alanine. This mutation led to the transport of the S protein to the plasma membrane. The cytoplasmic tail of TGEVS\_K/M shows a replacement of a lysine to a methionine. This leads to the transport of the protein to the cell surface and subsequent endocytosis. First, the colocalisation studies were performed in *baby hamster kidney cells* (BHK21). To simulate *in vivo* conditions porcine cell lines such as *swine testis* (ST) and *ileum epithelial cells* (IPI2I) were additionally used for the colocalisation experiments. This cell lines confirmed the localisation of the S protein.

Furthermore, colocalisation and functional studies with endocytosis markers (Rho-GTPase, AP2 $\mu$ 2 and CD63) aimed the characterisation of the endocytosis behaviour of TGEVS\_K/M. The results indicated that the replacement of a lysine to a methionine in the cytoplasmic tail of the S protein transformed the retention signal to an endocytosis signal. TGEVS\_K/M colocalised with all used endocytosis markers. Particularly, the colocalisation of the TGEVS\_K/M mutant with the  $\mu$ 2 subunit of AP2 increased vesicle building by AP2. Colocalisation and infection studies were started to determine if the TGE virus interact with the ESCRT machinery. Vps4 as ESCRT marker did not show clear colocalisation with the S protein.

To understand the importance of the retention signal for virus assembly and maturation and its interaction with host factors different methods were used to identify potential cellu-

lar interaction partner/s of the S protein. On the one hand the cytoplasmic tail of the S protein and its mutants (TGEVS\_Y/A, and TGEVS\_K/M) was fused to tags such as Flag or HA for using them in pulldown assays. On the other hand a *GST pulldown assay* and a *tandem affinity purification* were performed. The GST method and a following massspectrometry analysis identified Filamin A as a potential interaction candidate. Coimmunoprecipitation studies showed that the authentic as well as the HA fused S protein isolated Filamin A from porcine cell lysates, confirming the interaction of Filamin A with the S protein. In addition infected cells showed a partial colocalisation of Filamin A with the S protein.

The results of this work demonstrate that the tyrosine motif retains the S protein in the ERGIC. Therefore the S protein resides on the assembly site of TGEV and can be inserted in virus particles. Presumably, the retention of the S protein in the ERGIC is mediated by the interaction with a cellular protein such as Filamin A. Furthermore, mutagenesis studies have shown that a single amino acid change can affect the protein transport.

**Key words:** TGEV S protein, retention signal, ERGIC, interaction partner, endocytosis

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1 Coronaviren.....	6
1.1.1 Taxonomie .....	6
1.1.2 Übertragbare Gastroenteritis der Schweine .....	8
1.1.3 Genomorganisation.....	9
1.1.4 Morphologie und Strukturproteine .....	12
1.1.5 Knospung.....	15
1.1.6 TGEV S-Protein .....	16
1.1.7 Tyrosinbasierte Motive .....	17
1.1.8 TGEV S-Protein und der sekretorische Transportweg .....	19
1.1.9 Endozytose .....	21
1.1.10 ESCRT Pathway .....	22
1.2 Filamin A.....	26
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>33</b>
<b>3. Material</b> .....	<b>35</b>
3.1 Eukaryotische Zelllinien .....	35
3.1.1 BHK21-Zellen.....	35
3.1.2 IPI2I-Zellen.....	35
3.1.3 ST-Zellen.....	35
3.1.4 Vero-Zellen.....	36
3.2 Bakterien.....	36
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	36
3.2.2 BL21 Gen-X™.....	36
3.3 Plasmide .....	37
3.3.1 pCG1 .....	37
3.3.2 pGEX-5X-1 .....	37
3.4 Virus.....	38
3.4.1 TGEV PUR-46 MAD.....	38
3.4.2 VSV Indiana .....	38
3.5 cDNA.....	38
3.5.1 TGEV S-Protein .....	38
3.5.2 Kompartimentmarker.....	39
3.6 Zellkulturmedien.....	39
3.7 Puffer und Lösungen.....	40

3.8	Primer .....	45
3.9	Restriktionsendonukleasen .....	46
3.10	Enzyme .....	47
3.11	DNA- und Proteinmarker .....	47
3.12	Antikörper .....	47
3.13	Kits .....	48
3.14	Substrate .....	48
3.15	Transfektionsreagenz .....	48
3.16	Chemikalien und Reagenzien .....	48
3.17	Geräte .....	50
3.17.1	Agarosegelelektrophorese .....	50
3.17.2	Autoklav .....	50
3.17.3	Bakterienkultur .....	50
3.17.4	Eukaryotische Zellkultur .....	51
3.17.5	Magnetrührer .....	51
3.17.6	Mikroskope .....	51
3.17.7	PCR .....	51
3.17.8	pH-Meter .....	51
3.17.9	Pipetten .....	52
3.17.10	Pipettierhilfen .....	52
3.17.11	SDS-PAGE und Western Blotkammer .....	52
3.17.12	Transferkammern .....	52
3.17.13	Vortexer .....	52
3.17.14	Waagen .....	52
3.17.15	Wasserbad .....	53
3.17.16	Sicherheitswerkbänke .....	53
3.17.17	Zentrifugen/Rotoren .....	53
<b>4.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>54</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden .....	54
4.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA .....	54
4.1.2	Hybridisierungs-PCR .....	56
4.1.3	Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen .....	58
4.1.4	Agarosegelelektrophorese .....	59
4.1.5	DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	59
4.1.6	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA .....	60
4.1.7	Ligation .....	61
4.1.8	Hitzeschock-Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien .....	61
4.1.9	Kolonie-PCR .....	62
4.1.10	Präparation der Plasmide (Midi- und Mini-Präp) .....	63
4.1.11	Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Plasmid DNA .....	63
4.1.12	Sequenzierung .....	64

---

4.2	Zellkultur-Methoden .....	64
4.2.1	DAPI-Test.....	65
4.2.2	Lagerung von Zellen .....	66
4.3	Heterologe Expression in eukaryotischen Zellsystemen .....	66
4.3.1	Transfektion mittels Lipofectamine® .....	66
4.3.2	Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation .....	67
4.3.3	Lokalisierungsanalysen von S-Proteinen .....	67
4.4	Methoden zum Nachweis von Proteinen.....	68
4.4.1	Immunfluoreszenzanalyse (IFA).....	68
4.4.2	<i>Antibody uptake assay</i> .....	69
4.4.3	Lysatanalyse .....	70
4.4.4	Oberflächenbiotinylierung .....	70
4.4.5	Immunpräzipitation.....	71
4.4.6	SDS-PAGE.....	72
4.4.7	Western Blot Analyse.....	72
4.4.8	Silberfärbung.....	74
4.5	Interaktionspartnersuche.....	74
4.5.1	<i>GST-pulldown assay</i> .....	74
4.5.2	<i>Pulldown assay</i> .....	75
4.5.3	<i>Tandem Affinity Purification</i> .....	77
4.6	Infektionsversuche .....	77
4.6.1	Infektion .....	77
4.6.2	Virusreinigung .....	77
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>79</b>
5.1	Lokalisierungsexperimente .....	79
5.1.1	Lokalisierung des S-Proteins von TGEV .....	79
5.1.2	Lysate der S-Proteinkonstrukte .....	83
5.1.3	Oberflächenbiotinylierung der S-Proteinkonstrukte.....	84
5.1.4	Lokalisierung der Kompartimentmarker .....	87
5.1.5	Kolokalisierungsversuche des TGEV S-Proteins mit den Kompartimentmarkern.....	88
5.1.6	Kolokalisierung der Kompartimentmarker mit <i>SpCherryMT</i> .....	89
5.1.7	Blockieren der S-Protein-Neusynthese .....	91
5.1.8	Lokalisierung der S-Proteinmutanten.....	95
5.1.9	Kolokalisierung der Kompartimentmarker und der TGEVS_Y/A Mutante .....	96
5.1.10	Kolokalisierung der Kompartimenmarker und der TGEVS_K/M Mutante .....	97
5.1.11	Vergleich zwischen der BHK21-, der ST- und der IPI2I-Zelllinie .....	98
5.1.11.1	Lokalisierung des TGEV S-Proteins in ST Zellen .....	99
5.1.11.2	Lokalisierung des TGEV S-Proteins in IPI2I Zellen .....	101

5.1.12	Kolokalisierung zwischen dem TGEVS_wt bzw. TGEVS_K/M Mutante und dem Endozytose-Weg.....	102
5.1.13	Endozytose Test: <i>antibody uptake assay</i> .....	105
5.1.14	Kolokalisierung des TGEV-S-Proteins und Markern des ESCRT-Weges.....	109
5.1.15	Transfektions- und Infektionsversuche.....	111
5.2	Suche nach dem Interaktionspartner des TGEV S-Proteins .....	112
5.2.1	GST <i>pulldown assay</i> .....	112
5.3	Validierung der Interaktion zwischen Filamin A und dem S-Protein. ....	118
5.3.1	Immunfluoreszenzanalyse und Detektion von Filamin A in Zelllysaten.....	118
5.3.2	Kolokalisierung zwischen Filamin A und dem TGEV S-Protein.....	119
5.3.3	Koimmunpräzipitationsversuche .....	120
5.4	Infektion der ST-Zellen und Detektion von Filamin A .....	122
5.4.1	Kolokalisierung von Filamin A und dem S-Protein nach einer Infektion .....	122
5.4.2	<i>Pulldown assay</i> von Filamin nach einer TGEV-Infektion.....	125
5.4.3	Detektion von Filamin A nach einer Virusreinigung.....	125
5.5	Suche nach dem Interaktionspartner von TGEV S-Protein auf Zellkulturebene.....	127
5.5.1	<i>Flag</i> -Fusionsprotein .....	127
5.5.2	Immunpräzipitationsversuche mit dem <i>Flag</i> -Fusionsprotein .....	128
5.5.3	<i>HA</i> -Fusionsprotein .....	129
5.5.4	Immunpräzipitationsversuche mit den <i>HA</i> -Fusionsproteinen .....	130
5.5.5	<i>Tandem Affinity Purification</i> .....	131
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>133</b>
6.1	Zelluläre Lokalisierung des S-Proteins.....	133
6.1.1	Auswirkung des Austausches der Ektodomäne des S-Proteins gegen ein fluoreszierendes Protein.....	133
6.1.2	Das S-Protein kolokalisiert mit dem ERGIC-Marker.....	135
6.1.3	Die Hemmung der Proteinneusynthese beeinträchtigt die S-Proteinlokalisierung nicht. ....	137
6.1.4	Mutationen im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins ändern dessen zelluläre Lokalisierung. ....	137
6.1.5	Porzine Zelllinien bestätigen die Lokalisierung des S-Proteins im ERGIC.....	138
6.1.6	Die TGEVS_K/M Mutante wird endozytiert. ....	139
6.1.7	TGEVS_wt und TGEVS_K/M Mutante kolokalisieren partiell mit dem ESCRT-Marker Vps4A. ....	141
6.2	Das S-Protein interagiert mit Filamin A durch das Tyrosin in seinem zytoplasmatischen Abschnitt. ....	143
6.2.1	Das S-Protein kolokalisiert mit Filamin A in IPI2I Zellen.....	145
6.2.2	Filamin A immunpräzipitiert das S-Protein aus einem IPI2I-Zelllysat.....	145

---

6.2.3	Ein HA-Fusionsprotein detektiert Filamin A als Interaktionspartner des S-Proteins.....	147
6.2.4	Modell zur Interaktion von Filamin A mit dem TGEV S-Protein im ERGIC.....	148
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>CLIII</b>
7.1	Aminosäuren .....	CLVII
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>CLVIII</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>CLXIII</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>CLXIV</b>
<b>11.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>CLXVIII</b>
<b>12.</b>	<b>Wissenschaftliche Beiträge.....</b>	<b>CLXXXII</b>
<b>13.</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>CLXXXIII</b>
<b>14.</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>CLXXXIV</b>
<b>15.</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>CLXXXV</b>

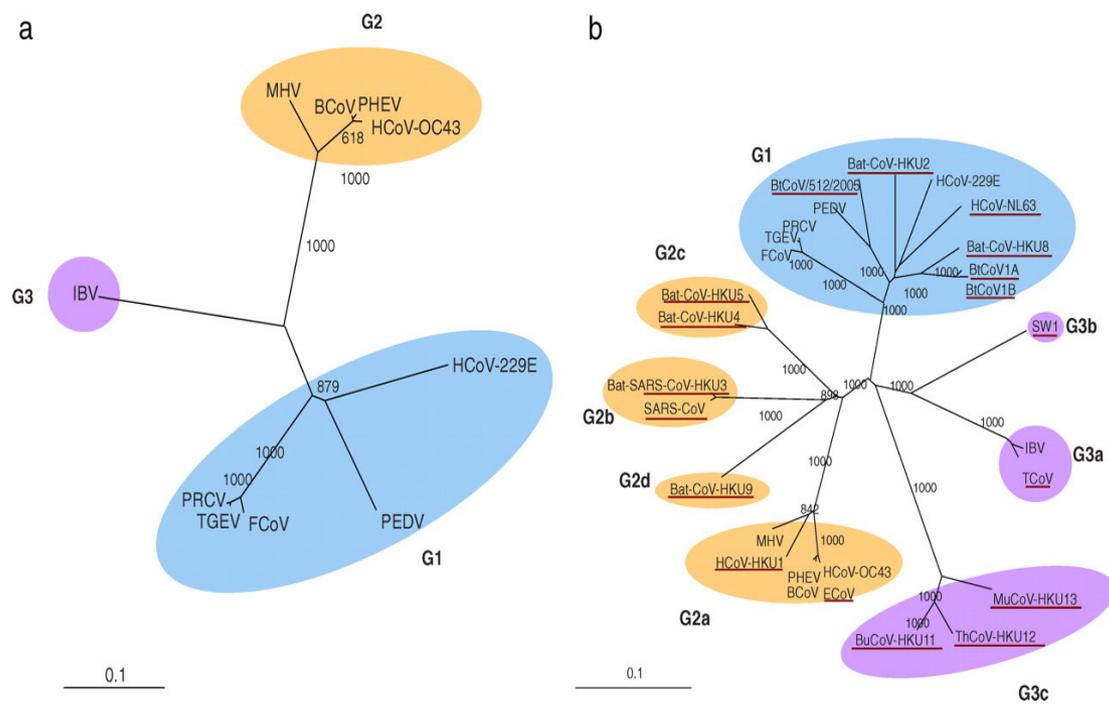
# 1. Einleitung

## 1.1 Coronaviren

### 1.1.1 Taxonomie

Die Vertreter der *Nidovirales* sind Viren, die wichtige Infektionen bei Säugetieren verursachen. Der Name leitet sich vom lateinischen *nidus* (Nest) ab, da während des Replikationszyklus bei den Vertretern dieser Ordnung ein „*nested set*“ von bis zu 8 messenger-RNAs entsteht. Die Ordnung der *Nidovirales* umfasst drei Familien von umhüllten Viren mit einem nicht-segmentierten, einzelsträngigen RNA-Genom von positiver Polarität. Die drei Familien heißen *Coronaviridae*, *Arteriviridae* und *Roniviridae* und unterscheiden sich in der Struktur und Funktion der viralen Replikase (RNA-Polymerase) von allen anderen RNA-Viren (Cavanagh, 1997). Die Familie *Coronaviridae* wird unterteilt in die Subfamilien *Coronavirinae* und *Torovirinae*. Die Coronaviren (CoV) besitzen mit 30 kb das größte Genom aller bekannten RNA-Viren. Der Name Coronavirus stammt aus dem elektronenmikroskopischen Bild, was die 20 nm langen keulenförmigen S-Proteine (Projektionen, s. Abbildung 4) in einer kronenähnlichen (lateinisch „*corona*“) Anordnung auf der Oberfläche aufweist (Enjuanes et al., 2000). Die Viren erscheinen sphärisch, pleomorph und erreichen einen Durchmesser von 60 bis 220 nm.

Die Coronaviren unterteilen sich hinsichtlich ihrer Serologie und Sequenzhomologie in drei Gruppen (Abbildung 1) I, II und III (Gonzalez et al. 2003; Gorbalenya et al., 2006). Im Jahre 2009 hat das internationale Komitee für Virus Taxonomie (ICTV) eine neue Unterteilung der Coronaviren in folgende drei Genera vorgeschlagen: *Alphacoronavirus* statt Gruppe I, *Betacoronavirus* anstelle von Gruppe II und *Gammacoronavirus* stellvertretend für Gruppe III.



**Abbildung 1:** Phylogenetische Analyse der RNA-abhängigen RNA-Polymerase der Genomsequenzen von Coronaviren (Woo et al., 2009)

Die *Alpha-* und die *Betacoronaviren* infizieren verschiedene Säugetiere, von Fledermäusen bis Menschen, während die *Gammacoronaviren* im Geflügel und im Beluga Wal nachgewiesen wurden.

Die serologische Alphagruppe umfasst die Katzen-Coronaviren FCoV und FIPV, das Hunde-Coronavirus CCoV, die humanen Viren 229E und NL63, sowie die porcinen Coronaviren PEDV, PRCoV und TGEV (engl. **T**ransmissible **G**astroenteritis **V**irus), das Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine, das in dieser Arbeit untersucht wurde. Zu den *Betacoronaviren* werden das häufig als Coronavirusmodell dienende murine MH-, das bovine BCoV- und das humane OC43-Virus gezählt sowie das Fledermaus-SARS Coronavirus und der Erreger des schweren akuten respiratorischen Syndroms, SARS-CoV. Zur Gammagruppe gehören das Truthahn-Coronavirus TCoV und das infektiöse Bronchitis Virus IBV (Gonzalez et al., 2003; Weiss und Navas-Martin, 2005).

### 1.1.2 Übertragbare Gastroenteritis der Schweine

Das virale Krankheitsbild der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine wurde bereits um das Jahr 1930 beobachtet und schließlich 1946 durch einen Bericht von Doyle und Hutchings in den Vereinigten Staaten bestätigt (Smith, 1956). Nach einer Verbreitung des Virus in allen Kontinenten, war die übertragbare Gastroenteritis für die Schweineindustrie von großer Bedeutung (Woode, 1969). Im Jahre 1968 beschrieben Tyrrell et al. die Kriterien für die Einteilung von Viren in die Gruppe der Coronaviren. Daraufhin, wurde TGEV 1970 von Tajima in die Familie *Coronaviridae* eingeteilt. Coronaviren infizieren weltweit sowohl Menschen als auch Tiere und führen zu gastrointestinalen und respiratorischen Infektionen, wobei sie epitheliale Zellen befallen. Eine Übersicht über die von Coronaviren verursachten Erkrankungen sowie den zellulären Rezeptoren gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Übersicht der von Coronaviren verursachten Erkrankungen und der zellulären Rezeptoren (APN=Aminopeptidase N)

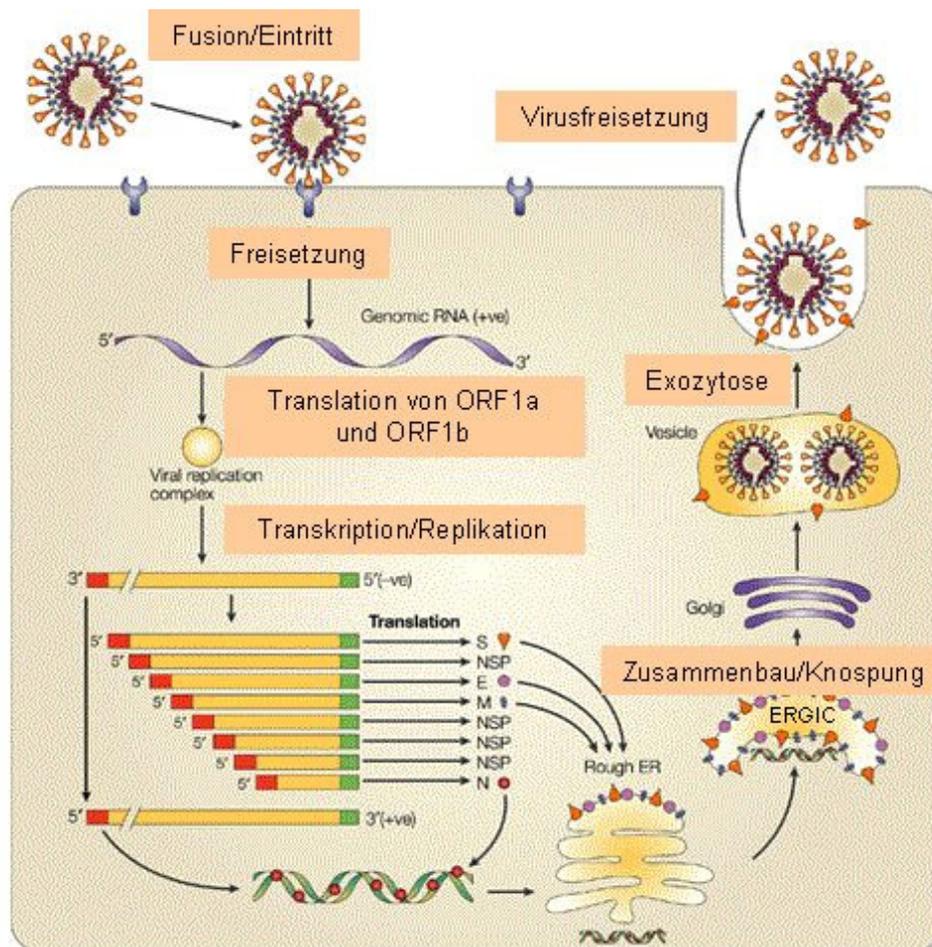
Virus	Acronym	Wirt	Erkrankung	Rezeptor	Referenz
Virus der übertragbaren Gastroenteritis	TGEV	Schwein	Enteritis	Porzine APN	Delmas et al., 1992
Virus der felines infektiösen Peritonitis	FIPV	Katze	Peritonitis, perivaskuläre pyogranulomatöse Entzündung	Feline APN	Tresnan et al., 1996
Felines Coronavirus	FCoV	Katze	Enteritis	Feline APN	Tresnan et al., 1996
Coronavirus der Hunde	CCoV	Hund	Enteritis	Canine APN	Benbacer et al., 1997
Humanes Coronavirus (229E)	CoV229E	Mensch	Erkältungserkrankung der oberen Atemwege	Humane APN	Yeager et al., 1992
Humanes Coronavirus (OC43)	CoVOC43	Mensch	Erkältungserkrankung der oberen Atemwege	Humane APN	Vlasak et al., 1988 Krempel et al., 1995
Erreger des schweren respiratorischen Syndroms	SARS-CoV	Mensch	akute respiratorische Symptome, welche bis zum Tod führen können	Angiotensin konvertierendes Enzym 2	Li et al., 2003
Maus-Hepatitis-Virus	MHV	Maus	Enzephalomyelitis, Hepatitis, Enteritis	Carcino-embryonales Antigen	Williams et al., 1991

TGEV verursacht nach einer fäkal-oralen Übertragung Darminfektionen in Tieren aller Altersgruppen. Das Virus erreicht durch die Magen-Darm-Passage den Dünndarm und infiziert die Epithelzellen von Jejunum und Ileum (Garwes, 1995). Die Ablösung der infizierten epithelialen Zellen bewirkt die Atrophie der Villi, welche wiederum zu einer wässrigen Diarrhöe führt. (Hooper und Haelterman, 1969; Pensaert et al., 1970). Fünf bis sieben Tage nach der Infektion lösen sich die Epithelzellen ab, wobei neue Zellen, aus den so genannten Krypten sie ersetzen, und die Infektion somit beendet ist. Basierend auf einer mukosalen Immunität, sind Schweine nach einer Infektion für ein bis zwei Jahre vor der Krankheit geschützt (Saif et al., 1994). Erwachsene Tiere entwickeln nach der Infektion einen starken Durchfall, welcher nach zwei bis vier Tagen nachlässt. Während bei Absetzferkeln eine Mortalitätsrate von 10-20% beobachtet wurde, liegt sie bei erwachsenen Tieren unter 5%. Bei Saugferkeln bis zum Alter von zwei Wochen verläuft das Krankheitsbild jedoch mit 100% Mortalität (Saif und Wesley, 1992). Die Infektion verursacht neben Diarrhöe auch starkes Erbrechen und die darauf folgende Dehydratation und der Gewichtsverlust rufen die Letalität bei den Ferkeln hervor.

### 1.1.3 Genomorganisation

Die Coronaviren und somit TGEV besitzen das größte Genom unter den bekannten RNA-Viren. Die RNA-Polymerasen dieser Viren haben keine „*proof reading*“ Funktion, das heißt sie besitzen keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch eine Fehlerkorrektur möglich wäre. RNA-Genome replizieren mit einer Fehlerrate von 1 zu 10000 Basen, sodass die Genomgröße von TGEV über der Obergrenze liegt, bei welcher die genomische Information korrekt weitergegeben werden kann, um replikationsfähige Nachkommen zu erzeugen (Strauss und Strauss, 2002). In Plusstrang-RNA-Viren fungiert die RNA als Matrize der genomischen Information aber auch als erste virale mRNA (s. Abbildung 2). Das wichtigste Gen für die RNA-Synthese ist die virale Replikase. Das Gen besteht aus rund 20000 Nukleotiden und kodiert für zwei Polyproteine. Die so genannten ORFs 1a und 1b auf dem RNA Molekül werden mittels ribosomaler Leserahmen-Verschiebung in zwei große Polyproteine

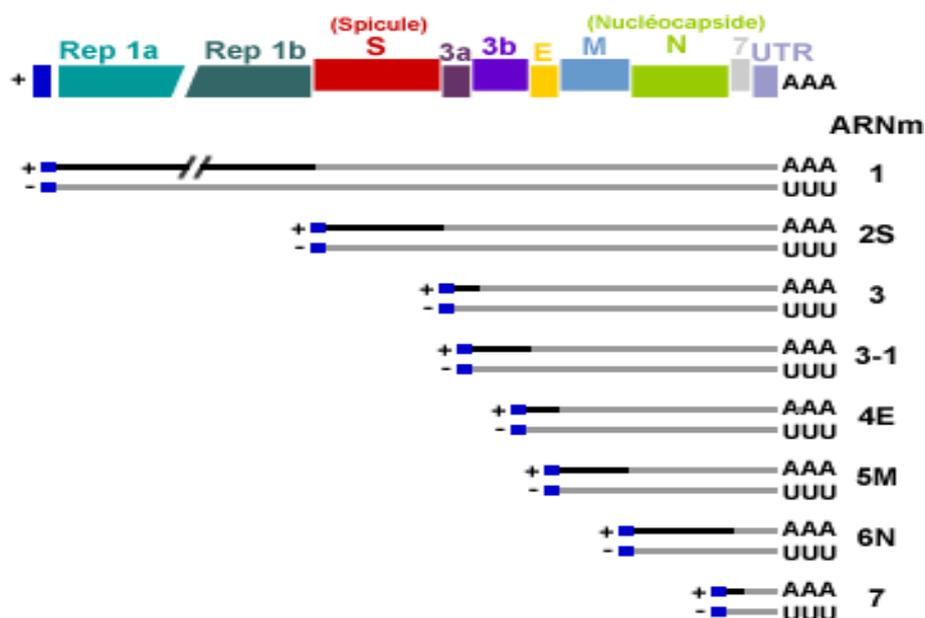
translatiert, *pp1a* und *pp1ab*, welche dann proteolytisch prozessiert werden. Nach der Fusion und Eintritt der RNA ins Zytoplasma der Zelle wird die virale Replikase mit der RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) produziert, welche die genomische mRNA amplifiziert. Dabei entsteht ein Minusstrang-Transkript des kompletten Virus-Genoms. Nach diesem Prozess kann die genomische RNA vom Minusstrang-Transkript repliziert und die so entstandene positiv-polare genomische RNA mit dem N-Protein zu Nukleokapsiden verpackt werden (Enjuanes et al., 2000).



**Abbildung 2:** Replikationszyklus der Coronaviren (modifiziert aus Stadler et al., 2003)

Es wird vermutet, dass das N-Protein schon während der Replikation mit der RNA interagiert oder gar während des Replikationsprozesses eine Rolle spielt (Compton et al. 1987; Chang und Brian, 1996). Baric et al. beschrieben 1988, dass das N-Protein mit der *leader* RNA assoziiert, welche das 5'-Ende der genomischen RNA darstellt. Viele der Replikaseprodukte bilden Dimere

oder gar Multimere, die sich an Membranen assoziieren und sowohl die Replikation, als auch die Transkription katalysieren. Zeitgleich zur Minusstrang-Synthese werden subgenomische mRNA-Moleküle synthetisiert (Spaan et al., 1988) während einer so genannten diskontinuierlichen Transkription (Zuniga et al., 2004). Diese Moleküle liegen 5'-3' koterminal zum Genom vor und bilden somit das so genannte „*nested set*“ von mRNAs. Die Replikation der positivsträngigen RNA-Viren findet im Zytoplasma der eukaryotischen Wirtszelle statt. Das einzelsträngige RNA-Molekül trägt am 5'-Ende eine 7-Methylguanosisin-Kappe, und am 3'Ende ist es mit einem polyadenylierten Schwanz versehen (Lai und Cavanagh ,1997). Diese Eigenschaft ermöglicht dem Virus sich in die Translationsmaschinerie der Zelle einzuschleusen. In den letzten Jahren wurde geklärt, dass die Größe und die Komplexität der Coronaviren auf das Vorhandensein vieler (15-16) Nichtstrukturproteine (*nsps*) zurückzuführen ist, wodurch das Virus ein großes Set von subgenomischen RNAs herstellen kann. Vertreter der *Coronaviridae* aber auch die *Togaviridae* und die *Flaviviridae* können das Verhältnis von Nichtstruktur- zu Strukturprotein-Synthese regulieren. Die Strukturproteine, die sich am 3'-Ende des Genoms befinden, werden durch eine oder mehrere subgenomische mRNAs synthetisiert. Die Abbildung 3 stellt schematisch die Anordnung der kodierenden Regionen auf der RNA dar.

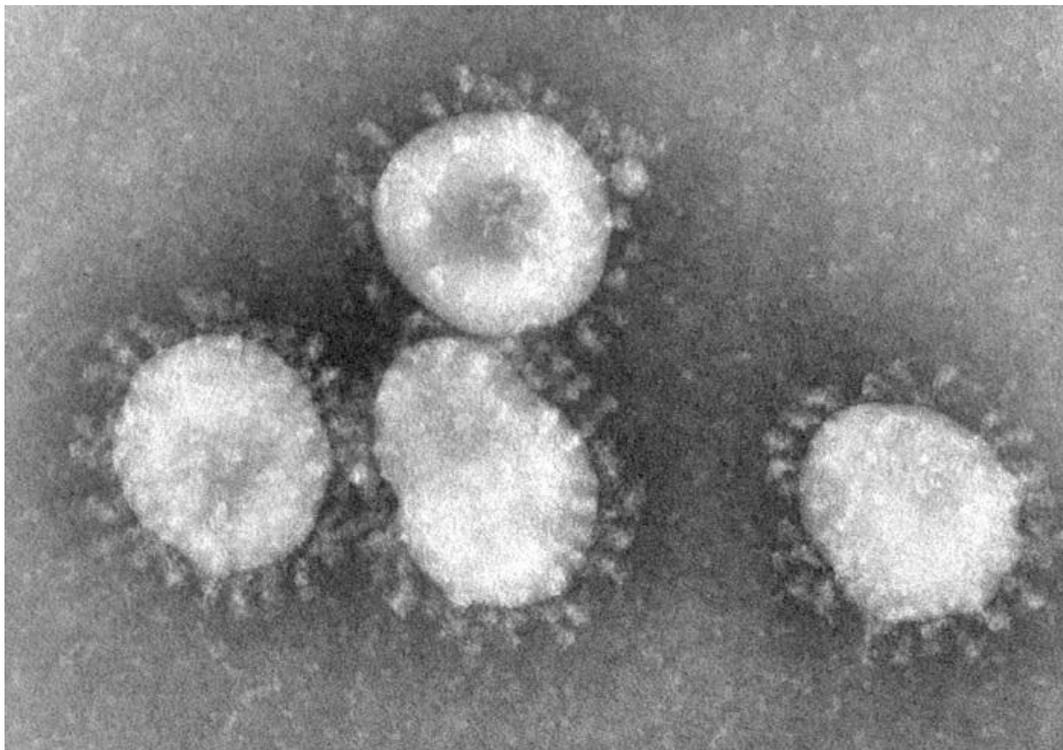


**Abbildung 3:** Anordnung der kodierenden Regionen auf der viralen RNA (Enjuanes, 2003)

Am 5'-Terminus des Genoms finden wir den offenen Leserahmen (*open reading frame* ORF) 1a und 1b, welcher für die Replikase kodiert. In 5'→ 3' Richtung kommt dann die codierende Gensequenz für die Strukturproteine. Diese sind das Oberflächenglykoprotein **Spike**, das **Envelope**-, das integrale **Membran**- und das **Nukleokapsid**-Gen. Zwischen der codierenden Region für *spike* und *envelope* Protein befinden sich die 3a- und 3b-Transkriptionseinheiten, welche für nicht Strukturproteine kodieren (de Vries et al., 1997).

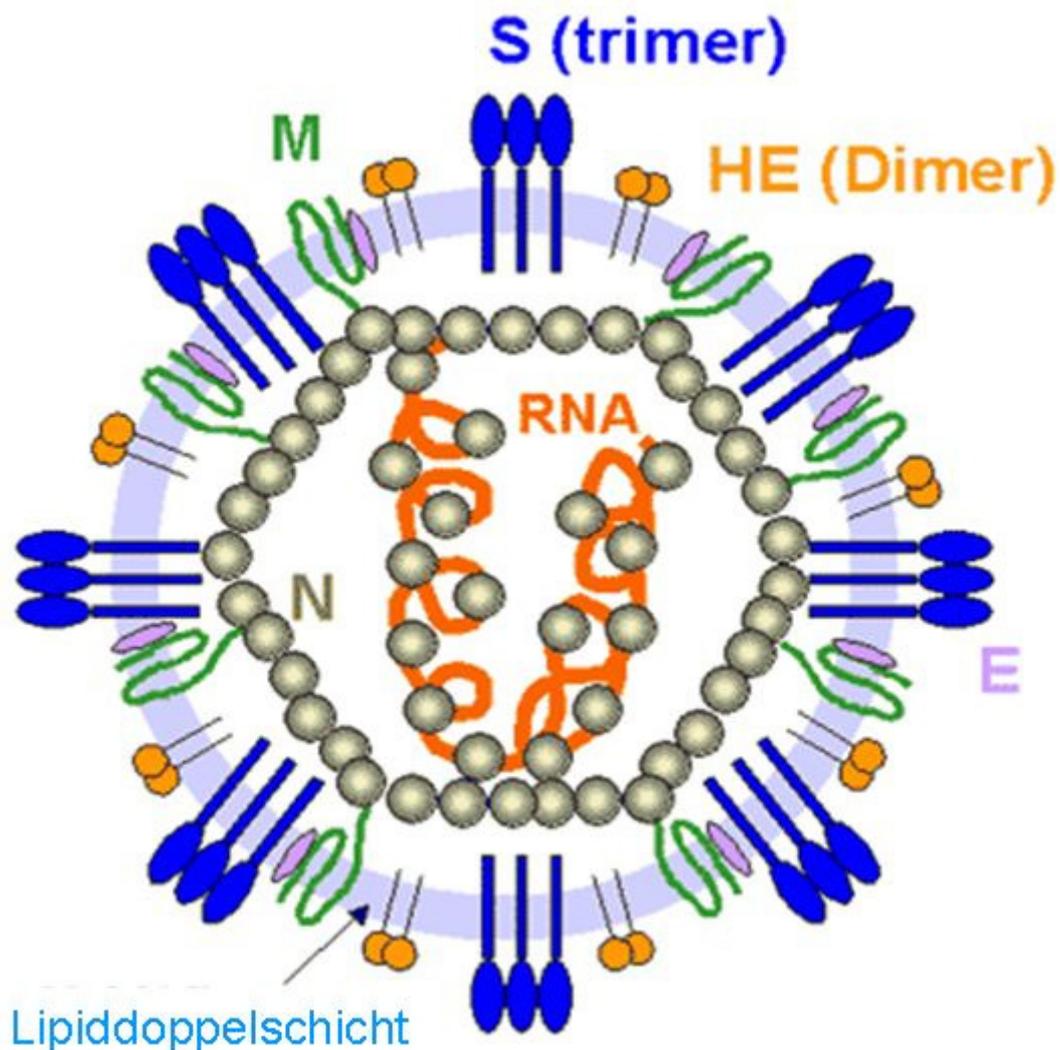
#### 1.1.4 Morphologie und Strukturproteine

Das Virion erscheint im elektronenmikroskopischen Bild sphärisch und setzt sich aus einer Hüll-Membran und aus einem Nukleokapsid zusammen. Auf seiner Oberfläche weist das Viruspartikel Projektionen auf, die dem S-Protein entsprechen (s. Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Elektronenmikroskopisches Bild vom SARS-Coronavirus (Stadler et al., 2003)

Wie es in Abbildung 5 schematisch zu verfolgen ist, besteht das Nukleokapsid, auch *core* genannt, aus dem einzelsträngigen RNA-Molekül und dem N-Protein, die entweder helikal oder kubisch-symmetrisch miteinander angeordnet sind (Macnaughton, 1978; Risco et al., 1996). Nach der Virusreifung, die bei TGEV am intrazellulären Kompartiment (ERGIC) zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat stattfindet ist das Viruspartikel wie folgt aufgebaut (Stephens und Compans, 1988; Garoff et al., 1998). Die äußere Lipiddoppelschicht ist mit dem S-Protein, dem M-Protein und dem E-Protein assoziiert. Einige Betacoronaviren enthalten außerdem ein Hemagglutinin-Esterase Glykoprotein.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des Coronavirusaufbaus (modifiziert nach Vabret et al., 2009)

Das N-Phosphoprotein kann mit dem carboxyterminalen Ende vom M-Protein wechselwirken, was die Strukturgebung und das Knospen der Virionen beeinflusst (Escors et al., 2001). Das Protein ist aufgrund der vielen Arginin- und Lysinreste stark basisch und kann durch die vielen Serinreste posttranslational phosphoryliert werden (Laude und Masters, 1995).

Das *envelope*-Protein kommt in geringer Kopienzahl in der Virushülle vor und wurde zum ersten Mal bei TGEV 1992 nachgewiesen (Godet et al.1992). Vennema et al. veröffentlichten 1996, dass die Expression von E- und M-Protein allein genügt, um virusähnliche Partikeln (*virus like particles, VLPs*) zu erlangen. Mit einer molekularen Masse von 11 kDa stellt das E-Protein das kleinste aller Strukturproteine dar. Es fungiert als Ionen-Kanal und ist für den Virus-Eintritt und -Zusammenbau wichtig.

Das M-Protein weist nach seiner N-Glykosylierung eine molekulare Masse von 29 kDa auf. Bei seiner Einzelexpression in der Immunfluoreszenz ist das Protein im CGN (*cis*-Golgi Netzwerk) zu detektieren (Klumperman et al., 1994). Das Protein weist drei stark hydrophobe Regionen auf, welche durch kurze hydrophile Regionen unterbrochen sind. Mit der hydrophoben Domäne durchspannt das Protein die Virushülle (Laude et al., 1990). Mithilfe einer amphiphilen Region am C-Terminus kann das Protein mit der Innenseite der Virusmembran assoziieren (Rottier et al., 1986; Laude et al., 1987,1990). Nach einer Infektion ist das M-Protein für die Induktion einer hohen Interferon- $\alpha$  Expression im Wirt verantwortlich (Charley und Laude, 1988).

Wie oben erwähnt tragen manche Betacoronaviren in der Virushülle die Hämagglutinin-Esterase. So wie das S-Protein, bildet dieses Protein Projektionen auf der Oberfläche, die jedoch anders als S durch die Esterase eine rezeptorspaltende Aktivität aufweist (Vlasak et al., 1988). Durch dieses weitere Protein kann der Virus-Eintritt dieser Betacoronaviren leichter stattfinden.

Das S-Protein stellt das untersuchte Protein dieser Arbeit dar, und wird später in einem eigenen Kapitel beschrieben.

### 1.1.5 Knospung

Die Virionen der Coronaviren werden im ERGIC zusammen gebaut. Sie knospen in das Lumen dieses Kompartiments und verlassen die Zelle mittels Exozytose (Klumperman et al., 1994).

Nach der Translation wandern die reifen Strukturproteine S, M, E und soweit vorhanden HE zum ERGIC (engl. endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment), welches die Knospungsstelle der Coronaviren darstellt (Tooze et al., 1994; Krinse-Locker et al., 1994). Am ERGIC befinden sich auch die Nukleokapside, welche mit den Membranproteinen zur Bildung von Virionen interagieren (Dubois-Dalcq et al., 1982). Die Knospung ist das Resultat einer Protein-Protein-Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne eines viralen Proteins mit Schlüsselrolle (im Fall von TGEV das M-Protein) und dem zytoplasmatisch lokalisierten Nukleokapsid. Die Knospung der Coronaviren am ERGIC beruht auf der intrinsischen Information der Strukturproteine nach der Synthese im subzellulären Kompartiment zurückgehalten zu werden. Diese Rückhalteinformation beruht im Falle des S-Proteins von TGEV auf dem tyrosinbasierten Retentionssignal des S-Proteins im zytoplasmatischen Abschnitt (Schwegmann-Weßels et al., 2004). Der Knospungsprozess involviert eine Interaktion zwischen dem helikalen Nukleokapsid und dem M-Protein. Das M-Protein bildet wiederum einen Komplex mit dem S-Protein. Nach der Knospung wandern die Viruspartikel über den vesikulären Zelltransport durch den Golgi-Apparat zur Plasmamembran (Griffiths und Rottier, 1992). Die Virionen werden im exozytotischen Weg zur Zellmembran für die Freisetzung transportiert, wobei *post-assembly* Prozesse wie Oligosaccharid-Modifizierung und Proteolyse stattfinden (Vennema et al., 1996). Viren wie TGEV verlassen die befallene Zelle als reife Viruspartikel über die apikale Plasmamembran, während MHV zum Beispiel über den basolateralen Weg aus der Zelle ausgeschleust wird. Im Falle von TGEV bildet das M-Protein zusammen mit dem E-Protein virusähnliche Partikel aus (Baudoux et al., 1998). In einer Studie von 2010 wurde gezeigt, dass nach Einzelexpression des SARS-CoV M-Proteins, M-Protein-haltige Membranvesikel in Zellkulturüberständen gefunden werden (Tseng et al., 2010). Das SARS-CoV und das

TGEV M-Protein lokalisieren wie bei anderen Coronaviren nahe dem Endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi Kompartiment (Krijnse-Locker et al., 1994).

#### 1.1.6 TGEV S-Protein

Das S-Protein ist ein Glykoprotein, ist verantwortlich für die Bindung an den Rezeptor auf der Zielzelle und bestimmt somit den Tropismus des Virus (Gallagher und Buchmeier 2001). Nach der Erkennung des Rezeptors (bei TGEV pAPN) auf der Zelloberfläche wird TGEV durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen (Hansen et al., 1998). Das TGEV S-Protein weist zwei Bindungsaktivitäten auf, die auf unterschiedlichen Regionen des Proteins lokalisiert sind. Die Bindung an Aminopeptidase N leitet die Infektion von TGEV ein, während die Sialinsäurebindungsaktivität dem Virus die Erkennung von Sialinsäureresten auf Glykoproteinen sowie auf Glykolipiden ermöglicht (Delmas et al., 1992; Schultze et al., 1996, Schwegmann-Weßels et al., 2002; Schwegmann-Weßels et al., 2003). Aufgrund der letzten Aktivität, kann TGEV Erythrozyten agglutinieren (Schwegmann et al., 2001). Das S-Protein ist ein Typ I Transmembranprotein, welches Peplomere bildet und für die Rezeptorerkennung sowie für die Fusion der viralen Hüllmembran mit der Lipiddoppelschicht der Wirtszelle zuständig ist (Lewicki und Gallagher, 2002; Suñé et al., 1991). Wird das Protein auf der Oberfläche von infizierten Zellen exprimiert, so kann es bei manchen Coronaviren die Bildung von Synzytien hervorrufen (Cavanagh, 1995). Dabei induziert das S-Protein die Fusion von infizierten Zellen mit nicht infizierten Zellen. Beim TGEV induziert das S-Protein durch B-Zellepitope die Antwort der Wirtszelle mit neutralisierenden monoklonalen Antikörpern (Gallagher et al., 1990).

Das S-Protein kann schematisch in drei Domänen aufgeteilt werden. Die Ektodomäne weist eine starke Glykosylierung auf. Die darauffolgende Transmembrandomäne durchspannt die Virushülle und der zytoplasmatische Abschnitt erscheint cysteinreich und acyliert. Dieses Protein besteht aus 1446 Aminosäuren und trägt am aminoterminalen Ende ein Signalpeptid, welches das neusynthetisierte Protein zum ER dirigiert. Hier wird das Signalpeptid

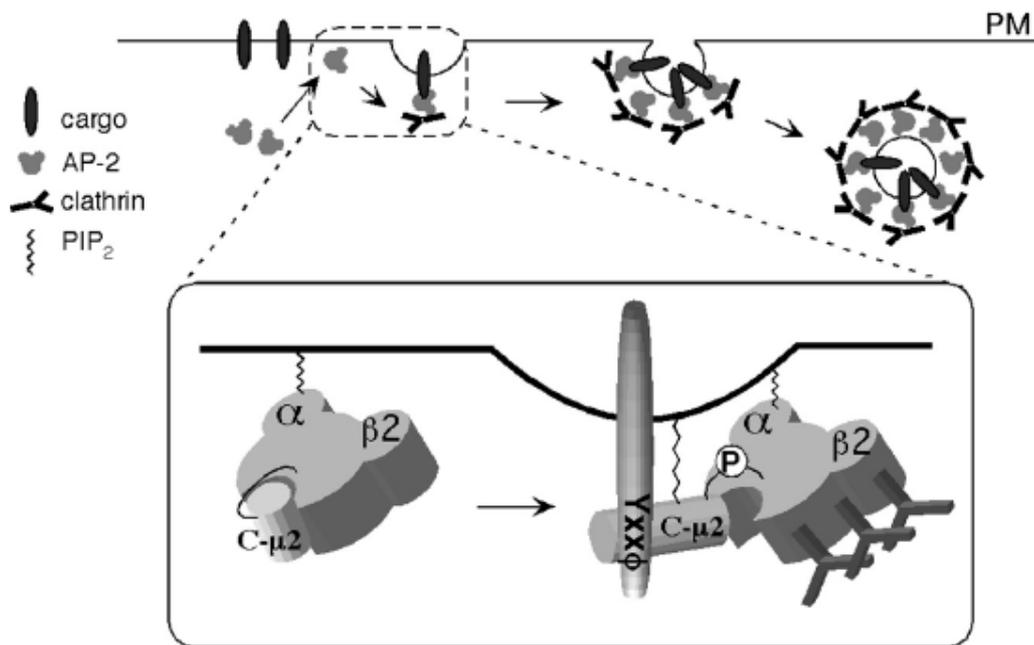
abgespalten, sodass ein 128 kDa langes Monomer entsteht. Dies wird wiederum während der Reifung glykosyliert, sodass ein Glykoprotein mit der Größe von ungefähr 250 kDa entsteht. Im ERGIC kann das Protein in Virionen während des oben beschriebenen Knospungsprozesses eingebaut werden. Die S-Proteine aller Coronaviren weisen eine Region reich an aromatischen Aminosäuren (KWPW[Y/W]VWL) auf, welche unmittelbar vor der hydrophoben Transmembrandomäne zu finden ist. Diese Regionen werden auch in Klasse 1 Fusionsproteinen gefunden und spielen eine Rolle bei der Porenbildung sowie bei der Membranfusion. Der Transmembrandomäne folgt eine 40 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne (auch Endodomäne genannt). Die letzten beiden Domänen sind wichtig für das Inserieren von S-Protein-Trimeren in die Virionen. Außerdem enthält die Endodomäne wichtige Motive, die das S-Glykoprotein durch den intrazellulären Transport dirigieren. Eine cysteinreiche Region in der Endodomäne ist unabdingbar für die Reifung und die Infektiosität des Virus und enthält überdies die Acylierungsstelle des Proteins (Ye et al., 2004; Thorp et al., 2006). Für das TGEV S-Protein fungiert ein tyrosinbasiertes Signal im zytoplasmatischen Abschnitt als intrazelluläres Retentionssignal, da die Mutation dieses Tyrosins zu einer Oberflächenlokalisierung des Proteins führt (Schwegmann-Weßels et al., 2004).

#### 1.1.7 Tyrosinbasierte Motive

Das Targeting von Membranproteinen zu unterschiedlichen Kompartimenten des endozytotischen und späten sekretorischen Signalwegs ist abhängig von Sortierungssignalen, welche am zytoplasmatischen Ende von Proteinen lokalisiert sind. Man geht davon aus, dass diese Signale mit spezifischen Erkennungsmolekülen interagieren. Diese Moleküle sind Teil einer Maschinerie, in welche Intermediäre für den membrangebundenen Transport eingebettet sind (Kirchhausen et al., 1997; Mellman, 1996).

Tyrosinbasierte Signale gehören zu einer Familie von degenerierten Motiven, welche durch das Vorkommen von einem entscheidenden Tyrosinmolekül definiert sind. Die meisten tyrosinbasierten Signale entsprechen dem Kon-

sensus-Motiv YXX $\Phi$ , wobei Y dem Tyrosin, X einer beliebigen und  $\Phi$  einer stark hydrophoben Aminosäure entspricht (Canfield et al., 1991). YXX $\Phi$ -Signale werden in den zytoplasmatischen Domänen von verschiedenen Membranproteinen gefunden einschließlich Typ I-Membranproteinen (z.B. lamp-1), Typ II-Membranproteinen (z.B. Transferrin-Rezeptor) und Typ IV-Membranproteinen (z.B. CD63). Dieses Motiv kann sowohl in sehr kurzen (<35 Aminosäuren) als auch in großen zytosolischen Domänen von manchen Signalrezeptoren (z.B. EGF-Rezeptor) und retroviralen Envelope-Glykoproteinen (z.B. HIV-1 gp41) gefunden werden. Das Vorhandensein von YXX $\Phi$ -Motiv in einem Protein muss nicht für ein Sortierungssignal sprechen, da der Proteinkontext, in dem sich das Signal befindet, für seine Funktionalität entscheidend ist (Bonifacino und Dell'Angelica, 1999). Manche YXX $\Phi$ -Signale können in weiteren Prozessen vermitteln, wie im lysosomalen Targeting, in der Lokalisierung zu bestimmten endosomal-lysosomalen Organellen wie z.B. Antigen-prozessierenden Kompartimenten, in der Übergabe an die basolaterale Plasmamembran von polarisierten epitheliale Zellen oder in der Lokalisierung im TGN (Kirchhausen et al., 1997; Mellman, 1996). Es gibt Rückschlüsse darauf, dass tyrosinbasierte Signale für die Retention an zellulären Kompartimenten verantwortlich sind wie bei CD3- $\epsilon$  und beim TGEV und IBV S-Protein (Mallabiabarrena et al., 1992 und 1995; Schwegmann-Weßels et al., 2004; Winter et al., 2008). Das YXXI-Motiv am zytoplasmatischen Ende des S-Proteins ist verantwortlich für die Retention von TGEV an einem prä-Golgi Kompartiment (Schwegmann-Weßels et al., 2004). Ein weiteres Interaktionsbeispiel für das Tyrosinsignal stellt die Wechselwirkung mit der  $\mu$ 2-Untereinheit von AP2 im Rahmen der Endozytose dar. Dabei kann der aromatische Ring vom Tyrosinmolekül hydrophobisch mit den Aminosäuren Tryptophan und Phenylalanin der  $\mu$ 2-Untereinheit interagieren oder Wasserstoffbrücken mit den Aminosäuren Lysin, Arginin und Asparagin von  $\mu$ 2 bilden. Nach der Bindung zu Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat können die Clathrinproteine, welche die Endozytose vermitteln, rekrutiert werden (s. Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Die clathrinvermittelte Endozytose (Nakatsu und Ohno, 2003)

Die mannigfaltige Funktion des YXX $\Phi$ -Motivs bringt die Frage auf, wie ein einziges Signal, das Sortieren in unterschiedliche zelluläre Kompartimente vermitteln kann. Eine Hypothese zur Erklärung der unterschiedlichen Rollen von YXX $\Phi$  ist, dass diese Signale mit einer bestimmten Familie von Molekülen interagieren müssen, welche durch unterschiedliche Erkennungssignale an verschiedenen Orten der Proteinsortierung assoziiert sind (Bonifacino und Dell'Angelica, 1999).

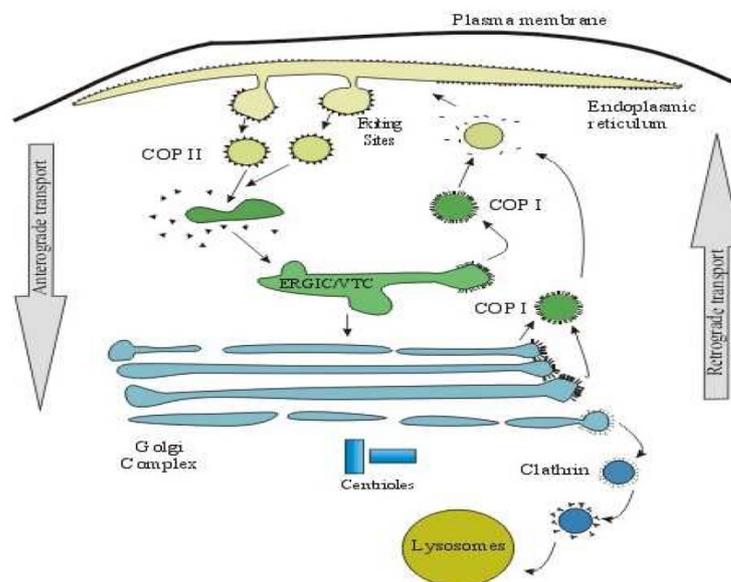
### 1.1.8 TGEV S-Protein und der sekretorische Transportweg

Coronaviren nutzen unter anderem auch die sekretorische Route um zur Plasmamembran zu gelangen. Die Replikation von TGEV ist abhängig vom exozytotischen Transportweg, wobei das Virus seine Morphogenese hierdurch vervollständigt (Salanueva et al., 1999). Virionen werden als große, kranzförmige Partikel an einem perinukleären Kompartiment der Zelle hergestellt, und wechseln ihre Morphologie zu kleinen dichten Virionen während des Transports durch den exozytotischen Transportweg (Risco et al., 1998; Tooze et al., 1987). Wenn die TGEV-Infektion durch Monensin blockiert wird, so wird die Reifung des Virus im ERGIC festgehalten. Viele Viren benutzen

den sekretorischen Transportweg um sich durch die Zelle fortzubewegen, oder gar um Teile für den eigenen Aufbau zu rekrutieren. Die funktionelle Evolution der eukaryotischen Zelle verlief parallel zur Entstehung von neuen intrazellulären Kompartimenten. Diese strukturelle und funktionelle Kompartimentalisierung ist durch die unterschiedliche Verteilung der Zellmembran-Komponenten wie Lipide und Proteine bestimmt. Die korrekte Positionierung in den Membranen ermöglicht der Zelle ihre genetischen Funktionen zu erfüllen (Egea, 2001).

Lipide und Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Hier befinden sich sowohl im Lumen eingelagerte lösliche als auch membrangebundene Proteine. Diese Proteine werden entweder im ER zurückgehalten oder aber in andere Zellkompartimente dirigiert. Unterschiedliche Signalsequenzen am C-Terminus von Proteinen bestimmen ihre Retention im ER. Diese sind z.B. Di-Lysin und Di-Arginin Signale am zytoplasmatischen Terminus von Typ I- und Typ II-Membranproteinen sowie Lysin-Asparagin-Glutamat-Leucin-Signalsequenzen (KDEL) bei löslichen Proteinen (Munro und Pelham, 1987; Nilsson et al., 1989; Jackson et al., 1990; Schutze et al., 1994). Sowohl die löslichen als auch die membrangebundenen Proteine verlassen letztendlich das endoplasmatische Retikulum und erreichen durch den sekretorischen Transportweg den Golgi-Apparat. Im Golgi werden sie durch Modifizierungen wie Glykosylierung oder Phosphorylierung in ihrer Struktur vervollständigt. Der Golgi-Apparat besteht aus Zisternen mit einer Eingangs- (*cis*) und einer Ausgangszone (*trans*). Aus diesem Grund unterscheidet man ein cis-Golgi- (CGN) und ein trans-Golgi-Netzwerk (TGN) (Rambourg und Clermont, 1990). Hier können die reifen Proteine zu ihrem Ziel gerichtet werden. Da das ER größer als das Golgi ist, entsteht das Problem, dass die Proteine vom ER zum Golgi hin konzentrierter werden müssen. Um das Problem zum umgehen, verhilft sich die Zelle mit Transportvesikel, welche sich im ER bilden, an so genannten Ausgangsstellen. Zwei Hauptereignisse sind mit dem Transport aus dem ER assoziiert: 1. das Beladen vom Cargo und 2. die Umgestaltung der Membran bei den Ausgangsstellen mit der darauf folgenden Abspaltung, die zur Bildung von Transportvesikeln führt. Das Zusammenkommen von verschiedenen Vesikel in multiproteischen Komplexen führt dazu, dass die Donor-Membran sich zu COP (*coat proteins*) umformt (Egea,

2001). Man unterscheidet zwischen COPI und COPII Vesikeln (Kreis und Pepperkok, 1994). Abbildung 7 zeigt, wie COPII Vesikel zuerst im ER gebildet werden und dann miteinander zu einem vesikulär-tubulären Transportkomplex (VTC) fusionieren, woraus COPI-Vesikel gebildet werden. Dieser VTC ist eine pleomorphe Organelle, die auch als ERGIC bekannt ist (Hauri et al., 2000). Das ERGIC ist eine mobile Membranstruktur, in welcher Komponenten des sekretorischen Transportwegs konzentriert eingebettet sind (Martínez-Menárguez et al., 1999). Ein weiterer „coat“ des intrazellulären Transports stellen das Clathrin und das AP2 dar. Diese sind sowohl im Transport zwischen dem Golgi-Apparat und den Lysosomen als auch in der Endozytose involviert (Le Borgne und Hoflack, 1998a und 1998b).



**Abbildung 7:** Bildung und Verkehr von Vesikel im sekretorischen Transport (Egea, 2001)

### 1.1.9 Endozytose

Viren sind obligate intrazelluläre Parasiten, die für die eigene Morphogenese und Propagierung von Wirtszell-Funktionen abhängig sind (Freed, 2004; van Regenmortel, 2000; Weiss, 2002). Wenn ein Virus eine Zelle durchdringt, dann implizieren die darauffolgenden Schritte seiner Replikation Interaktionen zwischen den Faktoren der Wirtszelle und den Virusproteinen (Novoa et al., 2005). Die hohe Mutationsrate des viralen Genoms bei RNA Viren hat

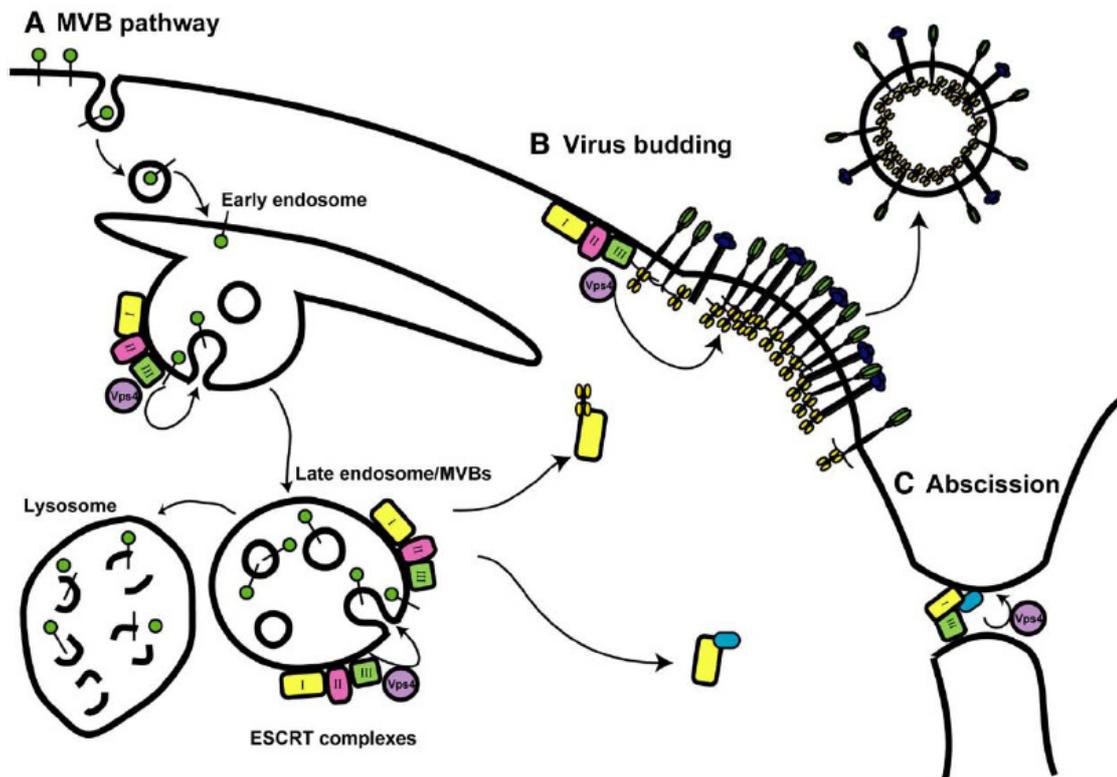
dazu geführt, dass sich ständig neue Interaktionen zwischen viralen und zellulären Elementen entwickeln (Domingo und Holland, 1997). Da Viren eine restriktive genetische Kapazität haben, nutzen sie elementare zelluläre Mechanismen für den Zelleintritt (Endozytose), für die Proteinsynthese (Ribosomen/ER Synthese und Translokationsmaschinerie), für die Glykosylierung sowie andere post-translationale Modifizierungen und für den intrazellulären Transport vom ER zur Plasmamembran. Im Fall von Viren wie SFV (Simian Foamy Virus), VSV (Virus der vesikulären Stomatitis) oder Influenzaviren verhalten sich virale Membranglykoproteine genauso wie zelluläre Proteinen in ihrer Synthese und im Transport zur Plasmamembran. Die Ansammlung dieser Proteine an der Zelloberfläche ist der erste Schritt zur Virusknospung.

Das endosomale System einer eukaryotischen Zelle nimmt Cargo-Proteine vom endozytotischen und biosynthetischen Stoffwechsel entgegen und sortiert sie zum Zielort (Lemmon und Ferguson, 2000). In einem späteren Schritt der endosomalen Sortierung werden Membranproteine, die für die Degradierung in Vakuolen/Lysosomen reif sind, in Endosomen aufgenommen und in „*multivesicular bodies*“ (MVB) sortiert. Diese sind Strukturen, die sich bei einer Invagination und Knospung der äußeren Membran in das Lumen des Endosomen bilden. Während dieses Prozesses werden mehrere endosomale Membranproteine in die sich formenden Vesikel eingeschlossen. Nach der Fusion der MVB mit den Lysosomen/Vakuolen werden die Cargos den translysosomalen Hydrolasen exponiert und degradiert (Felder et al., 1990). Es ist naheliegend, dass die Endozytose einer eukaryotischen Zelle Ähnlichkeiten mit dem Knospungsprozess eines Virus aufweist und aus diesem Grunde ist es verständlich, dass manche Viren diese Route im Wirtsorganismus einschlagen (Babst et al., 2002a und 2002b).

#### 1.1.10 ESCRT Pathway

Um die Zelle zu verlassen, müssen nicht lytische umhüllte Viren eine Knospung entweder aus der Plasmamembran heraus oder aber aus der Membran eines intrazellulären Kompartiments mit darauffolgende Abspaltung oder Abklammern durchführen. Die Abspaltung wird von Virus kodierten Aufbau-

Spät-domänen unterstützt, die die zelluläre MVB-Knospfungsmaschinerie rekrutiert (Bieniasz, 2006; Morita und Sundquist, 2004). In der Zelle haben die MVBs die einzigartige Fähigkeit intraluminale Vesikel zu generieren, welche sich vom Zytosol aus wegbewegen. Dieser Prozess ist topologisch äquivalent zur Knospfung der umhüllten Viren (Lambert et al., 2007).



**Abbildung 8:** Die Virusknospfung und die ESCRT-Pathway (Chen und Lamb 2008)

Unterschiedliche Viren, einschließlich Retroviren, nutzen so genannte Spät-domänen-Motive (PT/SAP, PPXY oder YXXL) in ihren Nukleokapsiden oder Matrixproteinen für eine effiziente Virion-Freisetzung (Demirov und Freed, 2004.) Das PTAP-Motiv kann zum Beispiel von dem zellulären Faktor Tsg101 erkannt werden, welcher dann das virale Kapsid an die *vacuolar protein sorting (Vps)*-Maschinerie für die Virusknospfung bindet (Garrus et al., 2001; Licata et al., 2003). *Vacuolar protein sorting 4 (Vps4)* ist ein Mitglied der AAA-Familie von ATPasen, welche mit einer Vielfalt an zellulären Aktivitäten assoziiert sind. Deren zelluläre Funktionen beinhalten Membranfusion, Proteindegradierung sowie Chaperon-ähnliche Aufgaben (Babst et al., 1998). Das PPXY Motiv interagiert mit einem weiteren zellulären Faktor, dem so genannten Nedd4 (Demirov und Freed, 2004). Wie andere Viren muss auch

das Hepatitis B Virus (HBV) Komponenten der zellulären Wirtsmaschinerie für seine Freisetzung nutzen. Studien mit einer negativ-dominanten Mutante von Vps4 zeigten, dass die HBV-Replikation aber auch die HBV-Sekretion von der Vps-Maschinerie abhängig ist.

Das Sortieren von zellulären Proteinen in Richtung MVB-Vesikel für entweder Degradierung, lysosomale Funktionen oder exosomale Abgabe benötigt die koordinierte Aktivität von mindestens drei hetero-oligomere Komplexen bezeichnet als ESCRT (engl. endosomal sorting complex required for transport) Komplex I, II und III (Babst et al., 2002a und 2002b; Katzmann et al., 2001; Pelchen-Matthews et al., 2004; Slagsvold et al., 2006). Die Komplexe werden sequentiell zu den spätendosomalen Membranen assoziiert und steuern die Bildung der MVBs. MVB-Vesikel werden somit in Spätendosomen gebildet und beinhalten Cargos, die zur lysosomalen Degradierung bestimmt sind. Die ESCRT Komplexe steuern nun die Vesikularisierung der Cargo-Proteine in Endosomen. Die atomische Struktur der zwei Schlüsselkomponenten dieses Transportweges- Tsg101 aus Komplex I und AIP1/Alix, ein Protein welches Komplex I zu Komplex III verbindet, zeigen die Bindungstasche für die L-Domänen (Fisher et al., 2007; Lee et al., 2004; Pornillos et al., 2002). Es wird angenommen, dass diese Interaktionen zwischen viralen und ESCRT-Komponenten die ESCRT-Maschinerie zum Ort der Virusknospung umleitet. Dabei kann die Vesikularisierung der viralen Partikel erfolgen. Es wird angenommen, dass diese Proteininteraktionen, die Schubkraft zur Virusknospung bieten, wie in Abbildung 8 dargestellt (Chen and Lamb, 2008). Eine dritte L-Motivdomäne kann an das Protein Nedd4 und vermutlich an HECT-Domänen der E3 Ubiquitinligasen binden. Diese stellen Proteine dar, die wahrscheinlich in den Vps-Transportweg über den ESCRT-Komplex einströmen (Martin-Serrano et al., 2005).

Vps4 stellt ein Schlüsselprotein im letzten Schritt vor der Knospung dar, während der Abschnürung der Vesikel von der Membran. Dieses Protein ist eine AAA-ATPase, welche im Menschen in zwei Isoformen vorhanden ist, Vps4A und Vps4B (Babst et al., 1998; Scheuring et al., 2001). Strukturelle und funktionelle Studien haben bewiesen, dass Vps4 den ESCRT Komplex III katalytisch von der Membran entfernt. Dieser Prozess führt bei der HIV-Infektion zu

einer Kontraktion der Membran, die die sich bildenden Vesikel umlegt, und somit die Spaltung und die MVB-Bildung hervorruft (Scott et al., 2005a und 2005b). Dies wurde mithilfe einer dominant-negativen Mutante von Vps4 verstanden. Diese weist eine Mutation im katalytischen Zentrum der ATPase auf, die zu unvollständiger und aberranter Vesikelbildung führt. Diese aberranten Komplexe akkumulieren teilweise und verhindern die Membranabschnürung (Fujita et al., 2003; Scheuring et al., 2001). Eine ausführliche Tabelle (Tabelle 2) listet die Viren auf, die den Vps-Transportweg und die ESCRT-Proteine während der Knospung nutzen.

**Tabelle 2:** Viren, die den ESCRT bzw. den Vps-Transportweg nutzen (modifiziert nach Chen und Lamb 2008)

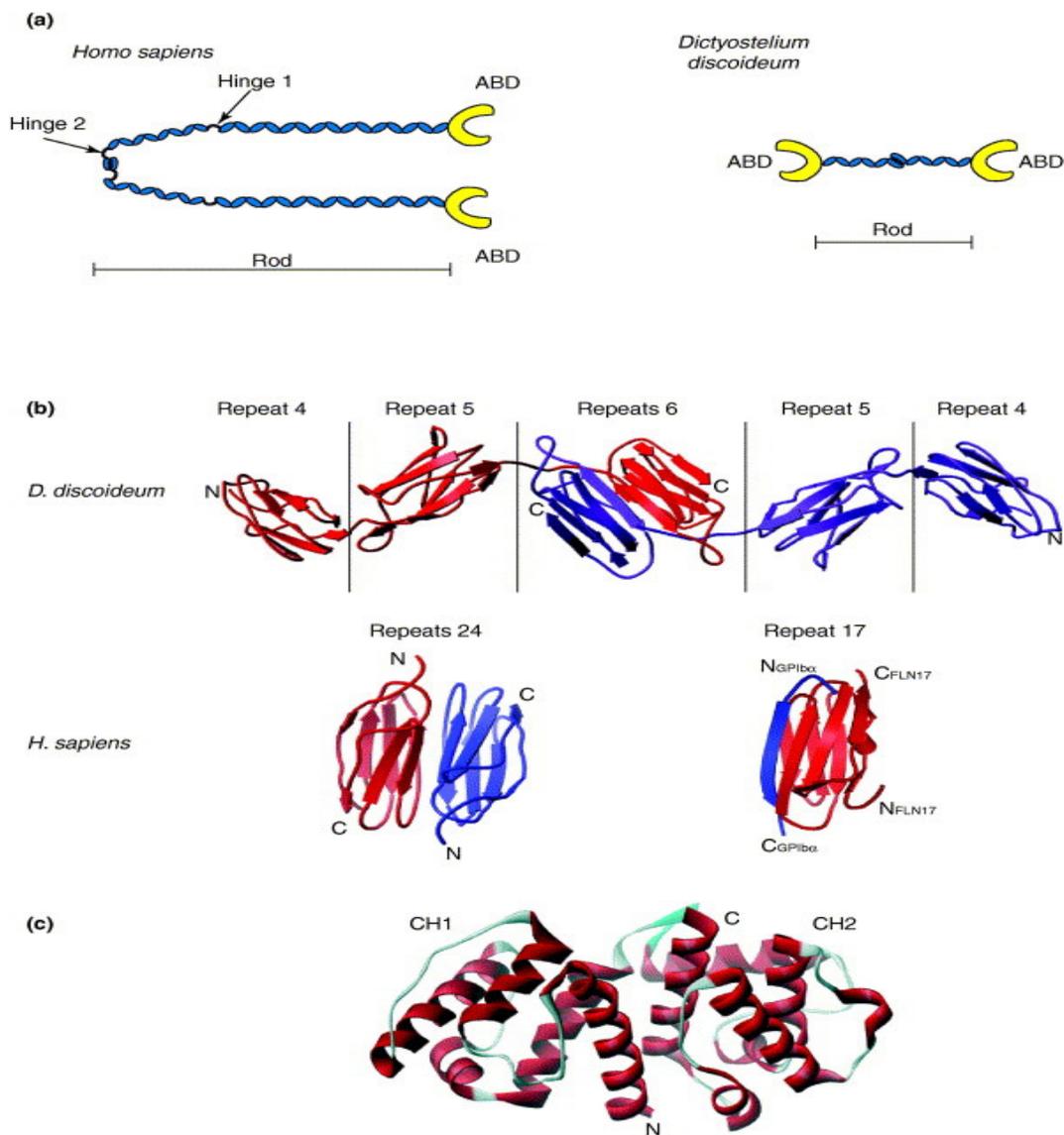
Virus	Virales Protein/L-Domäne	Direkte Interaktion
Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)	Gag (p6): PTAP, YPDL	Tsg101, Alix, ESCRT-I,-III, Vps4A/B
Rous-Sarkom-Virus (RSV)	Gag (p2b): PPPPYV	Nedd4, Vps4A
Virus der equinen infektiösen Anämie (EIAV)	Gag (p9): YPDL	Alix, AP-2
Mason-Pfizer Affen Virus (MPMV)	Gag (p24): PSAP, PPPY	Tsg101, Nedd4, Vps4A
Murines Leukämievirus (M-MuLV)	Gag (MA <sub>p12</sub> ): PSAP, PPPY	Tsg101, Alix, Nedd4
Human T-cell leukemia virus (HTLV)	Gag (MA): PPPY, PTAP	Nedd4.1, WWP1, Tsg101, Vps4A/B, Alix
Virus der vesikulären Stomatitis (VSV)	M: PPPY, PSAP	Nedd4
Tollwutvirus (RABV)	M: PPEY	Nedd4
Ebola Virus (EBOV)	Vp40: PTAPPEY	Tsg101, Nedd4

Sowohl das VLP (*virus like particles*)-System als auch die reverse Genetik haben in den letzten Jahren an Wichtigkeit gewonnen, um die Knospung von umhüllten Viren zu untersuchen. Die Membranproteine der umhüllten Viren stellen für die Organisation der Knospung attraktive Kandidaten dar, da diese Interaktionen zwischen den zellulären Faktoren, den viralen Strukturproteinen und dem Nukleokapsid überbrücken. Wie in Tabelle 2 zu sehen können manche strukturellen Proteine L-Domänen enthalten, die die Knospung ohne die Hilfe von weiteren viralen Proteinen steuern. Manche andere Viren müssen außer der L-Domäne und dem Vps-Transportweg mit anderen viralen Proteinen interagieren, um die Knospung zu unterstützen. Unter den Retroviren benötigt zum Beispiel das Foamy-Virus für seine Knospung außer dem Gag-Protein (was in anderen Retroviren für die Knospung ausreicht) die Ak-

tion vom Env-Protein (Fischer et al., 1998; Shaw et al., 2003). Während die Gag-Proteine aller anderen Retroviren in Einzelexpression VLPs bilden können, kann es das Prototyp Foamy Virus (PFV) nicht. Trotz dieser Eigenschaft, enthält das Gag-Protein von PFV ähnlich wie andere Retroviren eine PSAP-L-Domäne. Außerdem haben Versuche gezeigt, dass die Knospung von Viruspartikeln abhängig von dominant-negativen Mutanten von Tsg101, CHMP-3 und Vps4 ist (Patton et al., 2005; Stange et al., 2005). Ähnlich wie PFV zeigt das Matrix-Protein des Paramyxovirus Simian Virus (SV) eine L-Domäne, dennoch zeigt die Expression von M-Protein allein in Zellen keine Vesikelbildung (Schmitt et al., 2002). VLP-Studien zeigen, dass das M-Protein nur effizient in VLPs freigesetzt wird, wenn dieses mit dem HN-Protein koexprimiert wird. Außerdem ist das zytoplasmatische Ende vom HN-Protein sowohl für die VLP-Knospung als auch für die Virus-Replikation erforderlich. Dies deutet daraufhin, dass dieses Protein eine wichtige Rolle spielt, um den Virus-Zusammenbau vor der Knospung stattfinden zu lassen (Schmitt et al., 2002).

## 1.2 Filamin A

Filamine (*FLN*) sind Strukturproteine und gehören zusammen mit den so genannten F-Aktin Proteinen wie Spektrin, Fimbrin und alfa-Aktinin zu den Aktin-bindenden Proteinen (*ABP*) (Popowicz et al., 2006). Sie sind an der Quervernetzung von Aktinfilamenten, einem Hauptbestandteil des Zytoskeletts, sowie der Vernetzung von Aktinfilamenten mit Proteinen in der Zellmembran beteiligt. Indirekt spielen sie darüber hinaus eine wichtige Rolle bei Zell-Zell- und Zell-Matrixverbindungen, der Zellmotilität sowie bei der Entwicklung von Eukaryoten (Stossel et al., 2001). Die Abbildung 9 zeigt die räumliche Struktur des Filamins. Der Aktin-bindenden Domäne folgt eine stabförmige Struktur, die aus hoch homologen Wiederholungen von ~96 Aminosäuren besteht. Dieser Stab ist charakterisiert durch eine Immunglobulin-ähnliche Faltung, in welcher 7  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen antiparallel zueinander angeordnet sind (Fucini et al., 1997; van der Flier und Sonnenberg, 2001).



**Abbildung 9:** Vergleich der Struktur von Filamin zwischen *Homo sapiens* und *Dictyostelium discoideum* (Popowicz et al., 2006)

Die Filamine stellen eine hochkonservierte Proteinklasse dar und werden in vielen Organismen exprimiert aber die best untersuchtesten stellen die von *Dictyostelium discoideum* (ddFLN) und das Säugetierfilamin (hsFLN) dar. In folgender Tabelle 3 werden einige der bekannten Filamine zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Liste der bekannten Filamine. **hs** für Homo sapiens (Mensch) **gg** für Gallus gallus (Bankivahuhn) **dm** für Drosophila melanogaster **dd** für Dictyostelium discoideum. (M. Knuth: *Identifizierung und Charakterisierung von FIP, einem neuen Filamin-bindenden Protein* Dissertation von 2001)

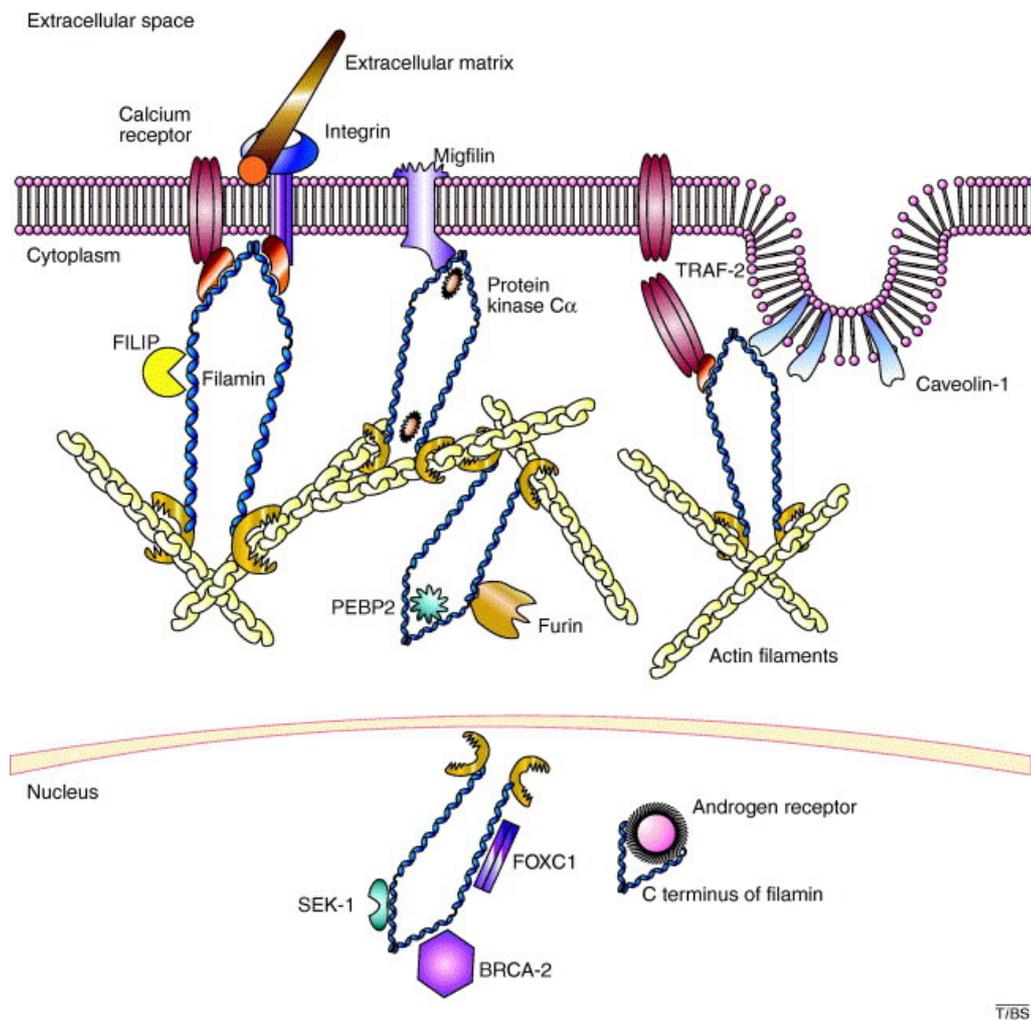
Name	Alte Bezeichnungen	Einheiten
hsFLNa	ABP, ABP280, FLN1 non-muscle FLN, $\alpha$ Fln, Filamin A	24
hsFLNb	$\beta$ FLN, FH1, FLN3, Filamin B	24
hsFLNc	$\gamma$ FLN, ABP-L, FLN2, Filamin C	24
ggFLNb	FLN	24
ddFLN	ABP120, Gelationsfaktor	6
dmFLN1-20	Filamin-240, Filamin1	20
dmFLN1-9	Filamin90	9

Filamin A (FLNa) besteht aus 2 Untereinheiten mit einer relativen Molekularmasse von 280 kDa. Jede Untereinheit enthält 24 immunoglobulin  $\beta$  Faltblatt-Tandem Wiederholungen von ungefähr 96 Aminosäuren. Die Filamin A bindende Domäne befindet sich am aminoterminalen Ende während die Dimerisierungsdomäne in der 24sten Wiederholung vom carboxyterminalen Ende zu finden ist. In den letzten Jahren wurden insgesamt 60 Interaktionspartner für Filamin A identifiziert (Minsaas et al., 2010). Eine Zusammenfassung der Interaktionspartner von Filamin wird in Tabelle 4 gezeigt. Dopamin Rezeptoren D2 und D3 sowie Kaliumkanäle aber auch intrazelluläre Signalmoleküle wie z.B. die GTPasen der Rho Familie interagieren mit Filamin A (Ohta et al., 1999; Petrecca et al., 2000; Li et al., 2002). Es reorganisiert kortikale Aktinfilamente (Terashima et al., 2005).

**Tabelle 4:** Interaktionspartner von Filamin Abkürzungen **aa** Aminosäuren; **AR**, androgenes Rezeptor; **CaR** Ca<sup>2+</sup>-sensitives Rezeptor, **ECM** , extrazelluläre Matrix; **ER**, endoplasmatisches Retikulum; **TGF** Wachstumsfaktor (modifiziert nach Popowicz et al., 2006.)

Bindungspartner	Funktion des Bindungspartners	Filaminfunktion mit Bindungspartner	Bindungsstelle an Filamin
FLIP	Filamindegradierung, -Regulierung	Runterregulierung von FLIP	unbekannt
Furin	proteolytische Reifung von Proteinen	Sortierung, Kompartimentalisierung und Stabilisierung	unbekannt
SHP-2	Zelladhäsion, Aktinremodellierung	Rezeptorverankerung zum Aktin	unbekannt
Calcitonin-Rezeptor	Ca <sup>2+</sup> -Homöostase	Rezeptorverankerung, -internalisierung und -wiederverwertung	Wiederholungen 20-22
D2/D3-Dopaminrezeptoren	prä-/postsynaptische Rezeptoren	Rezeptorverankerung an Aktin	Wiederholung 19
Integrin	ECM-Rezeptor	Rezeptorverankerung an Aktin	Wiederholungen 19-24
Caveolin-1	Membranprotein, Caveolae-Bildung	Caveolaeverankerung an Zytoskeletton	Wiederholungen 22-24
PEBP2/CBF	Transkriptionsfaktor	Zelladhäsionsstruktur für die Aktinverankerung	Wiederholungen 23-24

Tatsächlich reguliert Filamin A die Rho-GTPase vermittelte Umgestaltung des Zytoskeletts (Minsaas et al., 2010). Filamin A führt zur Aggregation von Zytoskelettelementen, Transmembranrezeptoren oder zytoplasmatische Signalproteinen und spielt eine wichtige Rolle sowohl in der Stabilisierung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche als auch in der Zellsignalintegration und Zellmigration. Die Interaktion von Filamin A und dessen Interaktionspartner ist in den verschiedensten Rollen der Zelle involviert: Regulierung der Oberflächenexpression, Stabilisierung, Clustering, Degradierung, Internalisierung, Recycling, Verankerung an Aktin sowie Zellmotilität. Die vielfältigen Funktionen von Filamin werden in Abbildung 10 schematisch dargestellt und beweisen, dass im Laufe der Evolution immer mehr neue Aufgaben Filamin zugeteilt wurden.

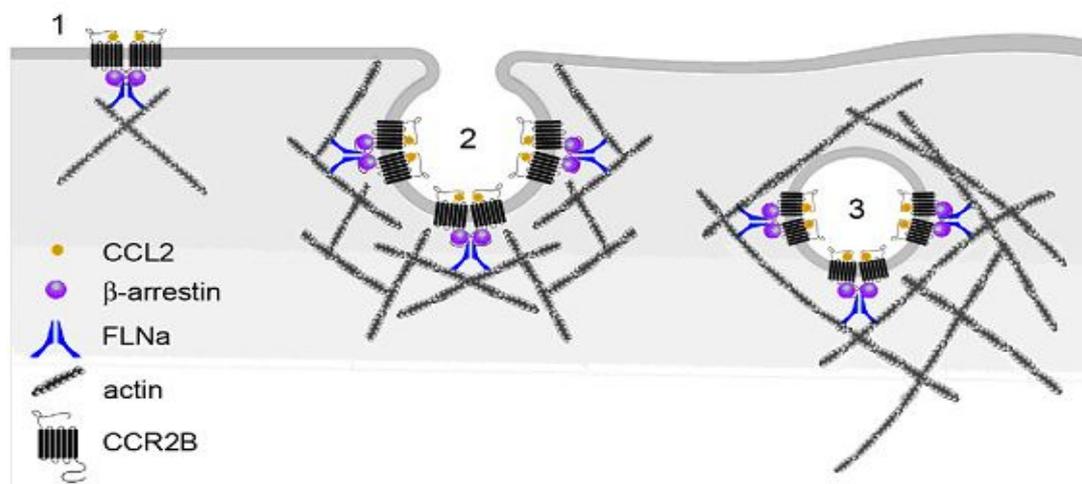


**Abbildung 10:** Unterschiedliche Funktionen von Filamin A (Popowicz et al., 2006)

In mutierten Zellen, in denen die Filaminexpression eliminiert wurde, wird die ligandinduzierte Internalisierung blockiert. FLNa-defiziente M2 Zellen zeigen eine reduzierte Internalisierungsrate von Rezeptoren aus der Zelloberfläche (Minsaas et al., 2010). Studien der letzten Jahren haben erwiesen, dass das Aktinzytoskelett der Säugetierzellen direkt an der Membrandynamik während der clathrinvermittelten Endozytose mitwirkt (Kaksonen et al., 2005). Aktin erscheint gegen Ende der Lebensdauer von Clathrinvesikeln in Clathrin bedeckten Strukturen an der Plasmamembran, wobei dies mit dem Prozess der Vesikelinternalisierung überlappt (Merrifield et al., 2002). Somit ist die Aktinpolymerisierung zeitlich und räumlich eng mit der Vesikelknospung während der Endozytose assoziiert (Minsaas et al., 2010). Andererseits wurde gezeigt, dass in Säugetierzellen eine Invagination ohne Aktinrekrutierung vonstatten gehen kann, jedoch eine effiziente Vesikelspaltung eine Aktinbeteiligung erfordert (Merrifield et al., 2002). Außer der Bindung zu Aktin muss

FLNa gleichzeitig mit Proteinen oder gar anderen Rezeptoren und Faktoren für die Endozytose interagieren. Studien mit dem CCR2B (*C-C motif receptor 2b*) zeigen, dass FLNa diesen Rezeptor an Aktinfilamente anbindet. Damit kann die Bildung von CCL2 (*monocyte chemoattractant protein-1*) induzierbaren Komplexen mit interagierenden Proteinen katalysiert werden, sodass eine effiziente Endozytose des Rezeptors in Clathrinvesikel stattfinden kann. Infolgedessen funktioniert Filamin wie eine signalisierende Plattform, die multiple Rezeptoren und an knospenden Vesikeln lokalisierte Proteine an Aktinstrukturen assoziiert.

Es ist auch bekannt, dass Filamin als struktureller Adapter für CD4 sowie das Chemokine-Korezeptoren Clustering in T-Zellen fungiert (Jimenez-Baranda et al., 2007). Hinsichtlich CCR2B wurde letztlich gezeigt, dass das Protein FROUNT an diesen Rezeptor auf der Membran bindet und das Rezeptorclustering ermöglicht (Terashima et al., 2005). So kann es sein, dass FROUNT der wichtigste Mitwirkende für die Rezeptoraggregation ist und dass Filamin als Unterstützungsprotein fungiert, um den Rezeptor mit anderen stromabwärts wirkenden Proteinen zu verbinden. In dieser Weise vereinfacht FLNa die Bildung und die Internalisierung der Clathrinvesikel sowie die Aktivierung von stromabwärts lokalisierten Transportwegen (Minsaas et al., 2010). Aus der erwähnten Studie geht hervor, dass Filamin als Verankerung von Proteinen an Aktinfilamente des Zytoskeletts fungiert, wobei das Schicksal der verankerten Proteine dirigiert wird, wie es in Abbildung 11 zu erkennen ist.



**Abbildung 11:** Schematisches Modell von CCL2 aktiviertem CCR2B in der Zellmembran während der Internalisierung (Minsaas et al., 2010)

Im Falle von CCR2B spielt Filamin eine Rolle für die Lokalisierung des Rezeptors nahe den Aktin-remodellierenden Proteinen. Wie auch in Abbildung 11 gezeigt, stabilisiert Filamin die Bindung des Rezeptors/Liganden und der  $\beta$ -Arrestin-Proteine zu den Aktinfilamenten.

## 2. Zielsetzung

Das S-Protein von TGEV wird in Einzelexpression intrazellulär zurückgehalten. Ein Ziel dieser Doktorarbeit war es, mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten zellulären Markern für das ER, den Golgi-Apparat und das ERGIC die genaue Lokalisierung des S-Proteins zu bestimmen. Die Analyse sollte mithilfe der konfokalen Mikroskopie erfolgen, damit die genaue Lage des S-Proteins innerhalb der Zelle und im Vergleich zu den Kompartimentmarkern ermittelt werden konnte. Porzine Zelllinien sollten ergänzend zur Standardzelllinie eingesetzt werden, um der *in vivo* Situation im Schwein möglichst nahe zu kommen.

Der Viruszusammenbau der Coronaviren findet im ERGIC zwischen ER und Golgi statt. Um in die Viruspartikel eingebaut zu werden, muss das S-Protein im ERGIC zurückgehalten werden. Dies kann während der Virusinfektion, durch die Interaktion mit anderen viralen Proteinen wie z.B. dem M-Protein geschehen. Wir vermuten, dass zelluläre Proteine ebenfalls eine Rolle bei der Retention des S-Proteins spielen und mit dem tyrosinbasierten Signal im C-Terminus des S-Proteins wechselwirken. Der Einbau des S-Proteins in neue Viruspartikel könnte durch diese Wechselwirkung beeinflusst werden. Um potentielle zelluläre Interaktionspartner des S-Proteins zu finden, sollten Fusionsproteine mit *Flag*-, *HA*-, *GST*- und *TAP-tags* hergestellt und eingesetzt werden. Zusätzlich zum C-Terminus des authentischen S-Proteins sollten auch zwei mutierte Proteine, die TGEVS\_Y/A und die TGEVS\_K/M Mutante, untersucht werden. Es wurde erwartet, dass Unterschiede im Interaktionsmuster zwischen authentischem S-Protein und den Mutanten auf zelluläre Proteine hinweisen, die für die Retention des S-Proteins von Bedeutung sind. Nach der Identifizierung eines Interaktionspartners sollte eine Analyse des potentiellen Kandidaten erfolgen.

Ein einzelner Aminosäureaustausch im C-Terminus des S-Proteins von Lysin zu Methionin (TGEVS\_K/M) führt zum Transport des S-Proteins zur Zelloberfläche mit darauf folgender Endozytose. Mithilfe von Endozytosemarkern wie CD63, Rho und AP2 und anschließender konfokaler Mikroskopie wurden

das authentische TGEV S-Protein und die TGEVS\_K/M Mutante hinsichtlich ihres Endozytose-Potentials getestet.

## 3. Material

### 3.1 Eukaryotische Zelllinien

#### 3.1.1 BHK21-Zellen

*Baby hamster kidney* Klon 21-Zellen stammen aus dem Nierengewebe von jungen syrischen Goldhamstern, *Mesocricetus auratus*. Sie stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (Katalognummer DSM ACC 61). Die Zelllinie wurde vom Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.2 IPI2I-Zellen

IPI2I Zellen stellen stammen aus der Europäischen Zellkultur Sammlung (E-CACC, Katalog-Nummer 93100622). Diese Zellen stammen aus dem Ileum von einem männlichen Miniatur Wildschwein. Es handelt sich um eine epitheliale Zelllinie, die für TGEV anfällig ist (Kaeffer et al., 1993).

#### 3.1.3 ST-Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten ST-Zellen sind Schweinehodenzellen (engl. *swine testis*). Sie wurden 1966 von McClurkin und Norman zum ersten Mal isoliert. Die ST-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche die porcine Amino-peptidase N. Dies ist der Rezeptor für TGEV. Somit sind ST-Zellen für eine erfolgreiche Infektion mit dem Virus geeignet. Die Zelllinie wurde vom Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule zur Verfügung gestellt.

### 3.1.4 Vero-Zellen

Die Vero-Zellen stellen eine permanente Zelllinie aus Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze dar und stammen aus der American Type Culture Collection (ATCC).

**Tabelle 5:** Übersicht der verwendeten Zelllinien und ihre Medien

\*FKS=Fetales Kälberserum

Zelllinie	Medium	FKS	Passage	Verdünnung
BHK21	EMEM	5%	2-3 Tage	1:20
IPI2I	DMEM + L-Glutamin + 0,1% Insulin	10%	3-5 Tage	1:4 bis 1:5
ST	DMEM	10%	3-5 Tage	1:5
Vero	DMEM	5%	2-3 Tage	1:3

## 3.2 Bakterien

### 3.2.1 *Escherichia coli*

E.Coli XL1Blue Bakterien vom Stratagene wurden im Labor chemisch kompetent erzeugt und für die Hitzeschocktransformation von Plasmid-DNA eingesetzt.

### 3.2.2 BL21 Gen-X™

Die BL21 Gen-X *E.coli* stellt die nächste Generation von einer Variante der Standard-BL21 (DE3) Strang dar. Der BL21 Gen-X Strang wurde durch mehrere Mutagenesezyklen hergestellt, um Bakterien für eine hohe Proteinexpression zu erlangen. Diese speziellen *E.coli* haben eine langsame Wachstumsrate und ermöglichen eine signifikant höhere Expression von rekombinantem Protein, während die endogene Proteinexpression niedriger gehalten

wird. Außerdem erlauben die BL21 die Expression von Fusionsproteinen, die sonst in anderen Systemen nicht exprimiert werden.

### 3.3 Plasmide

#### 3.3.1 pCG1

Dieses Plasmid wurde von R. Cattaneo aus Zürich dem Institut für Virologie zur Verfügung gestellt und 1995 von Cathomen et al. beschrieben. Es erlaubt die Expression von Proteinen unter der Kontrolle des Cytomegalivirus Promotors (CMV). Es beinhaltet außerdem das Intron des aus dem Kaninchen stammenden  $\beta$ -Globin-Gens. Dies unterstützt die Expression von unterschiedlichen exogenen Proteinen, unter anderem dem S-Protein von TGEV, über den Zellkern von Säugetierzellen. Eine *multiple cloning site* (MCS) erlaubt die Klonierung verschiedener Sequenzen, während die Ampicillinresistenz die Selektion erleichtert.

#### 3.3.2 pGEX-5X-1

Dieser Vektor ermöglicht die Expression von exogenen Proteinen, deren Sequenz unidirektional in die MCS eingefügt werden kann. Außerdem trägt er zusätzlich zur Kanamycinresistenz eine Glutathiontransferase (GST)-Sequenz. Diese ist gekoppelt an einem *lac*-Operon, das durch IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induziert wird und dessen Expression einschaltet. Das hineinklonierte Protein kann nach der Expression durch GST bindende *beads* aufgereinigt werden. Eine Thrombin-Schnittstelle ermöglicht die komplette Isolierung des gewünschten Proteins aus dem restlichen Proteingemisch.

### 3.4 Virus

#### 3.4.1 TGEV PUR-46 MAD

Die Arbeitsgruppe L. Enjuanes aus Madrid stellte den TGEV-Stamm PUR-46 MAD zur Verfügung.

#### 3.4.2 VSV Indiana

Das Virus der vesikulären Stomatitis (Strang Indiana) wurde von John K. Rose aus New Haven (USA) ursprünglich dem Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

### 3.5 cDNA

#### 3.5.1 TGEV S-Protein

In der NCBI-Datenbank ist die vollständige genomische Nukleotidsequenz des TGEV-Stamms PUR-46-MAD unter der Nummer AJ271965 aufgeführt. In Tabelle 6 sind die verwendeten viralen Proteine bzw. deren cDNA-Sequenzen (engl. *complementary DNA*) aufgeführt. TGEV kommt in verschiedenen Stämmen vor. Dadurch variiert die Sequenz des S-Proteins. Die meisten TGEV-Stämme weisen eine Länge von 4.344 bp (1.447 As). Im Vergleich zu den anderen Stämmen ist der Stamm PUR-46 MAD durch das Fehlen von 2 As von Position 1.123 bis Position 1.128 bp (As 375 und 376) charakterisiert. Es ist sinnvoll, für einen Vergleich der TGEV S-Proteine, diesen Positionen „Platzhalter“-Aminosäuren zuzuordnen und deshalb auch bei PUR-46 MAD mit einer Aminosäuresequenz von 1.449 Aa zu arbeiten. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit genutzten Virusproteine sind im Anhang aufgeführt.

**Tabelle 6:** Größe und Zugangsnummer des S-Proteins von TGEV

Bezeichnung	Größe (Bp / As)	Zugangsnummer (NCBI)
TGEV S-Protein (PUR46-MAD)	4350 / 1449	M94101.1 / NP_058424

### 3.5.2 Kompartimentmarker

Das Markerprotein für das Golgi-Kompartiment stellt die  $\beta$ -Galactosyltransferase auch Golgin130 genannt dar (EGFP-Golgi). Diese cDNA wurde von Dr. Eric Snijder (LUMC, Leiden, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

Das Protein ERGIC53 dient als Marker für das Endoplasmatische Retikulum-Golgi intermediäre Kompartiment (ERGIC). Dieses Markerprotein wurde in unserer Arbeitsgruppe am 5'-Ende nach dem Signalpeptid mit GFP fusioniert und liegt im pCGI-Plasmidvektor kloniert vor. Die ERGIC cDNA wurde von Hans-Peter Hauri zur Verfügung gestellt.

Für die Markierung des Endoplasmatischen Retikulums wird das am 3'-Terminus mit GFP fusionierte Calretikulin verwendet, welches von Dr. Fank van Kuppeveld (Nijmegen University, Niederlande) zur Verfügung gestellt wurde.

## 3.6 Zellkulturmedien

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

EDulb-Fertigpulver	13,53 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,20 g
Aqua bidest.	ad 1 l

### **EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium), pH 7,0**

EMEM-Fertigpulver	9,6 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 g
Aqua bidest.	ad 1 l

Sowohl das EMEM- als auch das DMEM-Fertigpulver wurden von der Firma GIBCO BRL bezogen. Für 1 Liter Medium wurden 0,06 g Penicillin G und 0,05 g Streptomycin (beide von Sigma) hinzugegeben. Mithilfe einer CO<sub>2</sub>-Begasung wurde der pH-Wert eingestellt. Die Medien wurden steril filtriert. Je

nach Zelllinie wurden dem Medium nicht-essentielle Aminosäuren von PAA-Laboratories hinzugegeben

### **Einfriermedium**

EMEM	10 ml
FKS	10 %
Glyzerin	10 %

### **LB-Medium, pH 7,0**

Trypton	10 g
Natriumchlorid	10 g
Hefeextrakt	5 g
Aqua bidest.	ad 1 l

autoklaviert, Lagerung bei 4 °C

### **LB-Agar, pH 7,0**

Trypton	10 g
Natriumchlorid	10 g
Hefeextrakt	5 g
Agar	20 g
Aqua bidest.	ad 1 l

autoklaviert, Lagerung bei 4 °C

## **3.7 Puffer und Lösungen**

### **Anodenpuffer I, pH 9,0 (mit HCl)**

1 M Tris-HCl	300 ml
Ethanol	200 ml
Aqua bidest.	ad 1 l

### **Anodenpuffer II, pH 7,4 (mit HCl)**

---

1 M Tris-HCl	25 ml
Ethanol	200 ml
Aqua bidest.	ad 1 l

**Blocking-Lösung**

Blocking-Reagenz	1 % (w/v)
Blocking-Puffer	99 % (v/v)

**DAPI-Lösung (1000x)**

DAPI	1 mg
Ethanol	ad 100 ml

**Ethidiumbromidfärbebad**

Ethidiumbromid	1 g
TAE Puffer	ad 100 ml

**Einfriermedium**

EMEM	
FKS	10 %
Glyzerin, steril filtriert	10 %

**HBS-Puffer (2x), pH 7,1**

HEPES	1,20 g
NaCl	1,63 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,02 g
Aqua bidest.	ad 1 l
	steril filtriert

**Kathodenpuffer, pH 9,0**

Aminocaprinsäure	5,25 g
1 M Tris-HCl	25 ml

---

Ethanol	200 ml
Aqua bidest.	ad 1 l
<b>MOPS (pH 7,0)</b>	

NaCl	100 mM
KCl	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM,
MgSO <sub>4</sub>	5 mM
Glucose	20 mM
Taurin	50 mM
MOPS	10 mM

**Mowiol**

Mowiol	2,50 g
Glyzerol	6,00 g
Aqua bidest.	6,00 ml
0,2 M Tris pH 8,5	12,00 ml
DABCO	2,5 % (v/v)

**NP-40-Lysispuffer, pH 7,5**

Natriumdesoxycholat	0,50 %
Nonidet P40	1,00 %
Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Proteaseinhibitor Complete™	1 Tablette/50 ml (bei Bedarf)

**PBS, pH 7,5**

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,12 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,10 g

---

CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,132 g
Aqua bidest.	ad 1 l

**PBS-Glycin**

Glyzin	0,1 M
--------	-------

**PBSM, pH 7,5**

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
Aqua bidest.	ad 1 l

**PBSM 0,1 % Tween**

PBSM	2 l
Tween 20	2 ml

**Sammelgel für Polyacrylamidgele (PAGE) (1 Gel)**

Aqua bidest.	0,68 ml
Acrylamidlösung 30%	0,17 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	0,13 ml
10% SDS (in H <sub>2</sub> O)	10,00 µl
10% APS (in H <sub>2</sub> O)	10,00 µl
TEMED	2,00 µl

**10x SDS Laufpuffer für PAGE, pH 8,4**

SDS	10 g
Tris	30 g
Glyzin	144 g
Aqua bidest.	ad 1 l

**2x SDS-Probenpuffer**

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	10 ml
10% SDS-Lösung	20 ml
Glyzerin	10 ml
Bromphenolblau (20 mg/ml in Reinstwasser)	2 %
Aqua bidest.	ad 50 ml
Tris	40 mM
Natriumacetat	20 mM
EDTA	2 mM
Aqua bidest.	ad 1 l

**1xTBE-Puffer, pH 8,0**

Tris	10 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM
Aqua bidest.	ad 1 l

**Trenngellösung für PAGE, 8% (1 Gel)**

Aqua bidest.	2,30 ml
Acrylamidlösung 30%	1,30 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	1,30 ml
10% SDS (in H <sub>2</sub> O)	50 µl
10% APS (in H <sub>2</sub> O)	50 µl
TEMED	16 µl

**Trenngellösung für PAGE, 10% ( 1 Gel)**

Aqua bidest.	2,00 ml
Acrylamidlösung 30%	1,70 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	1,30 ml
10% SDS (in H <sub>2</sub> O)	50 µl

10% APS (in H <sub>2</sub> O)	50 µl
TEMED	4 µl

### Trenngellösung für PAGE, 12% (1 Gel)

Aqua bidest.	1,70 ml
Acrylamidlösung 30%	2,00 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	1,30 ml
10% SDS (in H <sub>2</sub> O)	50 µl
10% APS (in H <sub>2</sub> O)	50 µl
TEMED 4 µl	

### Trypsin 0,125%, pH 7,0

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,31 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,20 g
CaCl <sub>2</sub>	0,13 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,10 g
Trypsin	1,25 g
Versen (EDTA)	1,25 g
Streptomycin	0,05 g
Penicillin	0,06 g
Aqua bidest. (steril)	ad 1 l

### 3.8 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (Tabelle 7) wurden von der Firma SIGMA<sup>®</sup> synthetisiert. Sie wurden in einer Endkonzentration von 10 pmol/µl in der PCR verwendet.

**Tabelle 7:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer

1	pCG1_AS	CCA ACA CAC TAT TGC AAT G
2	pCG1_S	CTT CTG CTA ACC ATG TTC AT
3	TGEVS_S	TTT GAA TTC CAC ACC ATA AAA AAC TAT TTG TTT TG
4	TGEVS_AS	TTT TCT GCA GTT AAT GGA CGT GCA CTT TTT CAA TTG
5	TGEVSSp/dsRed_AS	GTCCTCGGTGTTGTCCATAGGAAAATTGTCTCCATAAATCAATGGCAT
6	TGEVSSp/dsRed_S	CGCCACTCCGGCTCCCAGAAATGGCCTTGGTATGTGTGGCTACTAATA
7	dsRed/TGEVSMT_AS	CACATACCAAGGCCATTTCTGGGAGCCGGAGTGGCGGGCTCGGCGTG
8	dsRed/TGEVSMT_S	CGCCACTCCGGCTCCCAGAAATGGCCTTGGTATGTGTGGCTACTAATA
9	TGEVS_AS(XhoI)	CGCG CTCGAG TTAATGGACGTGCACTTTTTCAATTGG
10	TGEVS4240_S(BamHI)36aa	CGCG GGATCCAA ATGGCCTTGGTATGTG T GGCTACTA
11	TGEVS4240_S(BamHI)26aa	CGCG GGA TCC GG TTAGGAAGTTGTTGT CACTCT ATATGT
12	TGEV-S(K/M)_AS (XhoI)	CGCGCTCGAGTTAATGGACGTGCACCATTTCAATTGG
13	TGEVS_ASRepeat1	TTC GTA ATT TTC AAA TTG TCT TCT ATG GAC GTG CAC TTT TTC AAT TGG
14	TGEVS-ASRepeat2	ATGGACGTGCACTTTTTCAATTGGTTCGTAATTTTCAAATTGTCTTCT
15	TGEVS_Flag_S(BamHI)	GCGCGATCCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGAGAAGA CAATTTGAAAATTACGAA
16	TGEVS_ASstop(PstI)	GCG CCT GCA GTT AAT GGA CGT GCA CTT TTT CAA T
17	TGEVS-flag-AS (PstI)	CGCGCTGCAGTTACTTGTCGTCGTCCTTGTAGTCATGGACGTGCAC TTTTTCAATTGGTTC
18	Flag_TGEVS3x_AS(PstI)	CGCGTGCAGTTCGTAATTTTCAAATTGTCTTCTCACGTGCACTTT
19	HA/TGEVS36aa_S(BamHI)	GGAACCGGATCCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGTACAG GTTGCTGTGGATGCATAGGTTGT
20	HA/TGEVS16aa3x_S(BamHI)	GGAACCGGATCCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGTGACACA GAAGACAATTTGAAAATTACGAA
21	TGEVS_Sp_HA_Membrananker_ CT_AS	CCGGAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAGGAAAA TTGTCTCCATAAATCAATGGCAT

### 3.9 Restriktionsendonukleasen

*BamH1* (#ER0051)

Fermentas

*Pst1* (#ER0611)

Fermentas

*Xho1* (#ER0691)

Fermentas

### 3.10 Enzyme

T4 DNA Ligase (5U/ $\mu$ l)	Fermentas
<i>Pfu</i> DNA Polymerase recombinant	Fermentas
<i>Taq</i> Polymerase (5U/ $\mu$ l)	Fermentas
ECL <i>Streptavidin Biotinylated Horseradish</i>	
<i>Peroxidase</i> (HRP-) Komplex (1:1000)	Amersham Biosciences
SAP <i>shrimp alkaline phosphatase</i>	Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.11 DNA- und Proteinmarker

GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
Spectra™ Multicolor High Range Protein	Fermentas
PageRuler Plus™ Prestained Protein	Fermentas

### 3.12 Antikörper

In dieser Arbeit wurden für die Detektion von unterschiedlichen Proteine bestimmte Antikörper eingesetzt, die in den folgenden Tabellen 8 und 9 aufgeführt sind.

**Tabelle 8:** Liste der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Epitop	Isotyp	Quelle	WB	IFA
6A.C3	S-Protein	Monoklonal Maus	L.Enjuanes	1:200	1:200
$\alpha$ -HA	Hämagglutinin	Monoklonal Maus	SIGMA	1:1000	1:100
$\alpha$ -HA	Hämagglutinin	Polyklonal Kaninchen	SIGMA	1:1000	1:200
$\alpha$ -FlagM2	Flag	Monoklonal Maus	SIGMA	---	1:500
$\alpha$ -GST	GST	Monoklonal Maus	SIGMA	1:1000	---
$\alpha$ -AP2 $\mu$ 2	$\mu$ 2 von AP2	Monoklonal Kaninchen	ABCAM	---	1:200
$\alpha$ -CD63	CD63	Polyklonal Kaninchen	SIGMA	---	1:100
$\alpha$ -FlnA	Filamin A	Monoklonal Kaninchen	ABCAM	1:1000	1:250
$\alpha$ -VSV G I1	G-Protein	Monoklonal Kaninchen	V. ter Meulen	---	1:100
$\alpha$ -VSV G I14	G-Protein	Monoklonal Kaninchen	V. ter Meulen	---	1:100

**Tabelle 9:** Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Epitop	Isotyp	Quelle	WB	IFA
$\alpha$ -Kaninchen POD	Kaninchen IgG	Polyklonal Schwein	DAKO	1:1000	---
$\alpha$ -Maus POD	Maus IgG	Polyklonal Kaninchen	DAKO	1:1000	---
$\alpha$ -Kaninchen Cy3	Kaninchen IgG	Polyklonal Maus	SIGMA	---	1:500
$\alpha$ -Kaninchen FITC	Kaninchen IgG	Monoklonal Maus	SIGMA	1:1000	---
$\alpha$ -Maus Rhodamin	Maus IgG	Polyklonal Ziege	SIGMA	---	1:200
$\alpha$ -Maus Cy3	Maus IgG	Polyklonal Schaf	SIGMA	---	1:200

### 3.13 Kits

NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
QIAprep <sup>®</sup> Spin-Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

### 3.14 Substrate

Super Signal West Dura	Thermo Scientific, Braunschweig
Super Signal West FEMTO	Thermo Scientific, Braunschweig

### 3.15 Transfektionsreagenz

Lipofectamine <sup>®</sup> 2000 Reagent	Invitrogen, Carlsbad (USA)
---	----------------------------

### 3.16 Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dithiotreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Acrylamidlösung (30%)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Amino-n-caproic Säure	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Blocking-Reagenz	Roche, Karlsruhe

---

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Complete™-Proteinase Inhibitor	Roche, Karlsruhe
DEPC-H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
dNTP	Fermentas
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce, Rockford (USA)
Fetales Kälberserum	Biochrom, Hamburg
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Calbiochem, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose	Whatman, Kent (UK)
Nonidet P 40	Roche, Karlsruhe

Paraformaldehyd	Sigma, Deidenhofen
Protein A-Sepharose	Sigma, Deidenhofen
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Tris-Hydroxymethyl-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

### 3.17 Geräte

#### 3.17.1 Agarosegelelektrophorese

Bildverarbeitungssystem	MWG Biotech, Ebersberg
Gelträger, Kammer, Kämme	Keutz, Reichskirchen
Mikrowellengerät Micromat	AEG, Nürnberg
UV-Transilluminator	Amersham, Freiburg
Spannungsquelle	Bio-Rad, München

#### 3.17.2 Autoklav

Autoklav Typ A5	Webeco, Bad Schwartau
-----------------	-----------------------

#### 3.17.3 Bakterienkultur

Petrischalen, 10 cm	Greiner, Nürtingen
Reagenzröhrchen, 15 ml	Greiner, Nürtingen
Reagenzröhrchen, 50 ml	Greiner, Nürtingen
Erlenmeyerkolben, 100, 300 ml	Jürgens, Hannover
Infors HAT Ecotron	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Brutschrank Typ B 16	Heraeus, Osterode
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg

## 3.17.4 Eukaryotische Zellkultur

Zellkulturflaschen, 75 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
24-Napf-Platte	Greiner, Nürtingen
6-Napf-Platte	Greiner, Nürtingen
Zellkulturschale, Ø 10 cm	Greiner, Nürtingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau
Schwenktisch, elektrisch	Keutz, Reiskirchen
Überkopfschwenker REAX 2	Heidolph, Kehlheim
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor, Friedrichsdorf

## 3.17.5 Magnetrührer

Magnetrührer, RTC basic	IKA Labortechnik, Staufen
-------------------------	---------------------------

## 3.17.6 Mikroskope

Leica TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar
Axiophot 2	Zeiss, Göttingen
Axiovert 25	Zeiss, Göttingen

## 3.17.7 PCR

Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg
Primus 25/96 Thermocycler	MWG Biotech, Ebersberg
Primus 96 PLUS	MWG Biotech, Ebersberg
0,2 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Hess. Oldendorf

## 3.17.8 pH-Meter

pH-Meter	Jürgens, Hannover
----------	-------------------

---

### 3.17.9 Pipetten

10, 100, 1000 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg
1, 2, 5, 10, 20 ml Glaspipetten	Jürgens, Hannover

### 3.17.10 Pipettierhilfen

Accu Jet Pipettierhilfe	Brand, Wertheim/Mein
-------------------------	----------------------

### 3.17.11 SDS-PAGE und Western Blotkammer

Slab Gelkammer	Keutz, Reiskirchen
Filterpapier	Whatman, Dassel
Nitrocellulose Membran	Whatman, Dassel

### 3.17.12 Transferkammern

Typ B 43 und B 44	Biometra, Göttingen
Chemi Doc	Bio-Rad, München
Quantity One V 4.4.0 (Software)	Bio-Rad, München

### 3.17.13 Vortexer

Tisch-Vortexer	VWR, Darmstadt
----------------	----------------

### 3.17.14 Waagen

Elektronische Analysenwaage, Typ 1712 MP 8	Sartorius, Göttingen
<i>Portable</i> Waage Lauda A100	Sartorius, Göttingen

---

### 3.17.15 Wasserbad

Wasserbad

GFL, Burgwedel

### 3.17.16 Sicherheitswerkbänke

Nuaire Class II, TypA/B3

Nuaire, Plymouth (USA)

Nuaire Class II

Nuaire, Plymouth (USA)

HeraSafe

Heraeus

### 3.17.17 Zentrifugen/Rotoren

Eppendorf Tischzentrifuge 5417 C

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf Zentrifuge 5417 R

Eppendorf, Hamburg

Megafuge 1,0R

Heraeus, Hamburg

## 4. Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (englisch *Polymerase Chain Reaction*, PCR) kann *in vitro* ein DNA-Abschnitt mit bekannter Sequenz vervielfältigt werden. Diese Technik wurde von Saiki et al., im Jahre 1985 beschrieben. Das Prinzip der PCR ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Bei einer PCR wiederholen sich drei Schritte nacheinander, um eine große Kopienanzahl der zur vervielfältigenden DNA zu produzieren. Im ersten Schritt findet die Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge bei einer Temperatur von 95°C statt. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung (*annealing*) von synthetischen Oligonukleotiden (Primern) an die flankierenden Bereiche des DNA-Abschnittes, der amplifiziert werden soll. Dieser Schritt kann durch das Abkühlen der Temperatur auf 55-60°C gewährleistet werden. Der letzte Schritt erfolgt bei 72°C und ist charakterisiert durch die Synthese der komplementären DNA-Sequenzen (*elongation*) durch eine DNA-Polymerase, die Nukleotide an das freie 3'-OH-Primer-Ende anheftet. Nach dieser ersten Synthese wiederholen sich die Zyklen aus Denaturierung, *annealing* und *elongation* mehrmals. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich der gewünschte DNA-Abschnitt. Es handelt sich also um eine exponentielle Vermehrung der DNA. In dieser Arbeit wurden unterschiedlichen Polymerasen verwendet. Die *Thermus aquaticus* (*Taq*)-Polymerase ist ein Enzym, welches auch bei hohen Temperaturen noch sehr stabil ist. Die DNA-Amplifikation mit *Taq* ist jedoch fehleranfällig, da das Enzym keine *proof reading*-Funktion besitzt. Zwei weitere Polymerasen wurden für diese Arbeit eingesetzt: die *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*)-Polymerase und die Phusion<sup>TM</sup>-Polymerase. Die *Pfu*-Polymerase weist neben ihrer 5'-3'-Polymerisationsaktivität auch eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität auf. Diese Eigenschaft, bekannt auch als „*proof reading*“ verhindert die Entstehung von ungewünschten Mutationen, indem die vervielfältigte DNA nachkontrolliert wird. Dabei bricht sie die Kettenverlängerung bei Erreichen

eines fehlerhaften Uracil in der Kette ab. Die Wahl bestimmter *sense*- (5'-3'-Richtung) und *antisense*-Primer (3'-5'-Richtung) erlaubt gezielt Mutationen durch die PCR in die DNA-Stränge einzufügen.

Die cDNA von TGEV PUR-46-MAD S-Protein wurden durch L. Enjuanes (Madrid) bereitgestellt. Die cDNAs der Konstrukte TGEVS\_Y/A, TGEVS\_K/M, TGEVS\_SpGFP\_MT, TGEVS\_SpCherry\_MT, TGEVS\_GFP, GFP\_TGEVS wurden von der Arbeitsgruppe C. Schwegmann-Weßels zur Verfügung gestellt. Folgende Tabelle 10 listet die cDNA-Konstrukte auf, die für diese Arbeit kloniert wurden:

**Tabelle 10:** Liste der cDNA-Konstrukte

Konstrukt	Beschreibung
GST_26aaSwt	Fusion der letzten 26 Aminosäuren des S-Proteins (wt, Y/A oder K/M) mit GST
GST_26aaSY/A	
GST_26aaSK/M	
Sp_DsRedMT	Austausch der Ektodomäne von S gegen <i>DsRed-Monomer</i> (wt, Y/A und K/M)
TGEVS_Flag_wt2x16aa	Fusion der zweimal wiederholten letzten 16 Aminosäuren des S-Proteins mit einem <i>Flag-tag</i>
SpHAMT_wt	Austausch der Ektodomäne von S gegen <i>HA-tag</i> (wt, Y/A und K/M)
SpHAMT_Y/A	
SpHAMT_K/M	
HA_wt36aa	Fusion der letzten 36 Aminosäuren von TGEVS-Protein (wt, Y/A oder K/M) und einem <i>HA-tag</i>
HA_Y/A36aa	
HA_K/M36aa	
NTAP_wt26aa	Fusion der letzten 26 Aminosäuren des S-Proteins (wt, Y/A oder K/M) mit dem TAP-Vektor
NTAP_Y/A26aa	

Die *Pfu*-PCR wurde für alle Klonierungen der TGEV-Konstrukte verwendet. Für Mutationen innerhalb eines Gens wurde die Hybridisierungs-PCR durchgeführt. Die Auflistung der verwendeten Primer ist im Materialkapitel (Tabelle 7) aufgeführt.

**Tabelle 11:** Ansatz für Pfu-PCR

DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl
10 x Pfu-Puffer (MgSO <sub>4</sub> )	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Template-DNA	x µl (50-100 ng)
Sense Primer (10 µM)	2 µl
Antisense Primer (10 µM)	2 µl
Pfu-Polymerase	1 µl

**Tabelle 12:** Programm für Pfu-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklen
75°C	bis zum Abbruch ( <i>hot start</i> )	1
95°C	2 min	1
95°C	30 sec	10
58°C – 0,2°C	1 min	
72°C	x min	
95°C	30 sec	15
56°C	1 min	
72°C	x min + 10 sec	
72°C	5 min	1
4°C	bis zum Abbruch	1

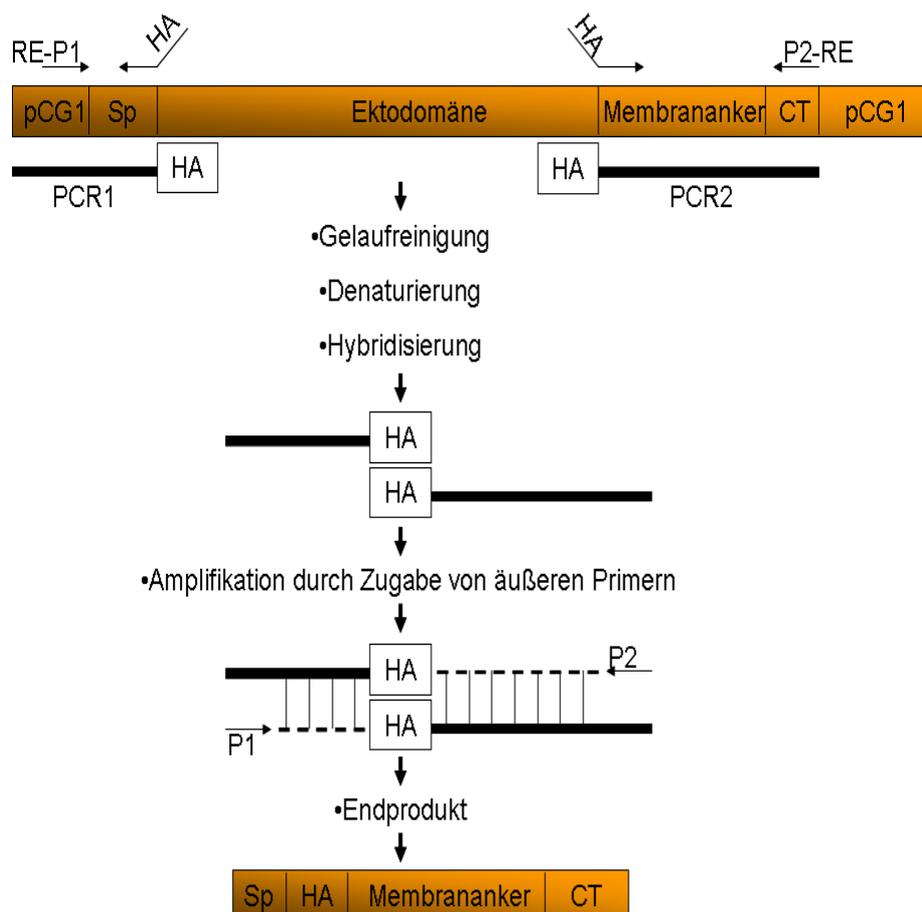
**x:** 1 min Elongationszeit für 500 Nukleotide

Der Ansatz der PCR erfolgte nach Tabelle 11 und unter den PCR-Bedingungen in Tabelle 12. Die Polymerisationsaktivität der Pfu-Polymerasen beträgt ca. 500 Nukleotide pro Minute. Es wurde ein „*hot start*“ durchgeführt.

#### 4.1.2 Hybridisierungs-PCR

Die Hybridisierungs-PCR wurde für die Klonierung der TGEV S-Proteinen mit *tags*, wie zum Beispiel *Flag* oder *HA* verwendet. Das Prinzip der Hybridisie-

rungs-PCR wird Abbildung 12 am Beispiel des Anhängens von *HA* an das S-Protein veranschaulicht. Dazu wurden zunächst zwei getrennte PCRs durchgeführt, unter Verwendung von spezifischen Primerpaaren, die teils der Sequenz der Wildtyp S-Protein-cDNA entsprachen und teils die gewünschten veränderten DNA-Sequenzen enthielten. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetragen und durch eine Gelextraktion aufgereinigt. Danach erfolgte die Hybridisierungs-PCR. Der Ansatz dazu erfolgte wie in Tabelle 11 aufgeführt und unter definierten Bedingungen (Tabelle 13 und 14). Nach der Hybridisierungs-PCR wurden je 2  $\mu$ l der äußeren Primer (P1 und P2) zu dem Ansatz hinzugegeben und eine *Pfu*-PCR wurde gestartet, um die Amplifizierung des gesamten Konstrukts zu erzielen. Die äußeren Primern enthielten Restriktionsenzymchnittstellen, um das Einfügen der Konstrukte in einen Expressionsvektor zu ermöglichen.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung des Prinzips der Hybridisierungs-PCR

**Tabelle 13:** Ansatz für Hybridisierungs-PCR

DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 46 µl
10 x <i>Pfu</i> -Puffer (MgSO <sub>4</sub> ) bzw. GC <i>Phusion</i> Reaction Buffer	5 µl 10 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
PCR-Produkt 1	x µl (50-100 ng)
PCR-Produkt 2	x µl (äquimolar zum PCR-Produkt)
<i>Pfu</i> -Polymerase bzw. <i>Phusion</i> -Polymerase	1 µl 1 µl
Sense Primer (10 µM)	2 µl*
Antisense Primer (10 µM)	2 µl*

\*Zugabe nach Durchlauf der Hybridisierungs-PCR

**Tabelle 14:** Programm für Hybridisierungs-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	1 min	1
95°C	30 sec	2
58°C	30 sec	
72°C	3 min	
72°C	5 min	1
4°C	bis zum Abbruch	1

#### 4.1.3 Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme. Sie können die DNA spezifisch spalten. Es gibt 4 bekannte Klassen von Restriktionsenzymen. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme gehören der Klasse II an, erkennen Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren und schneiden innerhalb der palindromischen Erkennungssequenz. Bei der Restriktion der Nukleinsäure können *blunt* (glatte Enden) oder *sticky ends* (überhängende Enden) entstehen (Roberts und Macelis, 1996).

Die Verwendung der Restriktionsenzyme diente in dieser Doktorarbeit zur Ligation von Inserts in Plasmidvektoren. Der Restriktionsverdau erfolgte nach den Angaben der Enzymlieferanten. PCR-Produkte wurden über Nacht bei 37 °C, Plasmidvektoren 1 h bei 37 °C verdaut.

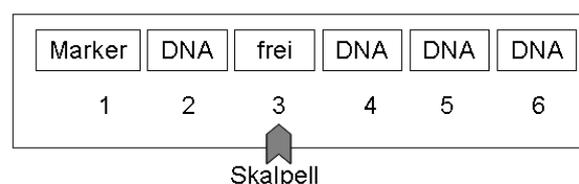
#### 4.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu DNA-Fragmente ihrer Größe nach voneinander zu trennen und zu identifizieren. Die Konzentration der Agarose kann in Abhängigkeit der Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente gewählt werden. Es wurden Agarosekonzentrationen von 1 bis 2% verwendet. Für analytische Zwecke wurden die Agarosegele mit TBE-Puffer hergestellt und bei einer Spannung von 120 V gefahren. Für die DNA-Präparation, wurden die Gele mit TAE-Puffer gegossen und bei 80 V gefahren. Die DNA-Proben wurden 1:6 mit Ladepuffer verdünnt. Um die Fragmentgröße bestimmen zu können, wurden entsprechende DNA-Marker (Kapitel 3.11) mitgeführt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte durch die Anfärbung der Gele in einer Ethidiumbromidlösung für 5 min mit anschließender Entwässerung. Ethidiumbromid ist ein Molekül, welches zwischen die Basen von Nukleinsäuren interkaliert. Durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht werden die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente sichtbar.

#### 4.1.5 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Nach einem Restriktionsverdau und einer PCR wurden die DNA-Fragmente einer präparativen Gelelektrophorese unterzogen, um sie von Enzymen, Salzen und anderen Substanzen zu reinigen.

Dazu wurde in die erste Tasche eines TAE- Agarosegels ein entsprechender Größenstandard aufgetragen (s. Abbildung 13). In die zweite Tasche wurden 10 µl der DNA-Probe, versehen mit Ladepuffer, pipettiert. Die dritte Tasche blieb frei. In die Taschen 4 bis 6 wurde die restliche DNA-Probe gegeben. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel mit einem Skalpell durch die dritte Laufspur durchtrennt.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung eines beladenen TAE-Gels für die präparative Gelaufreinigung

Die erste Hälfte des Gels, die aus Taschen mit Größenstandard und Probe bestand, wurde in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Die gesuchten DNA-Banden wurden beim Betrachten unter dem ultraviolettem Licht mit Hilfe eines Skalpell markiert und auf die nicht in Ethidiumbromid gefärbte andere Gelhälfte übertragen. Die entsprechenden DNA-Banden wurden dort mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung der DNA erfolgte mittels eines Gelextraktionskits nach den Vorgaben des Handbuches.

#### 4.1.6 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Der Verdau von Plasmid-DNA hinterläßt an den 5`-Enden Phosphatreste, die für eine Ligation benötigt werden. Entfernt man diese mit einer Phosphatase, kann keine Religation des Vektors mehr stattfinden. Das Insert besitzt hingegen noch beide Phosphatreste und kann daher seinerseits in den Vektor ligieren. In dieser Arbeit wurde die SAP™ Alkalische Phosphatase für die Dephosphorylierung verwendet. Die Zusammensetzung eines Dephosphorylierungsansatzes ist in Tabelle 15 zu sehen.

**Tabelle 15:** Ansatz für eine alkalische Dephosphorylierung

DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 20 µl
10xReaktionspuffer für SAP™	2 µl
SAP™ Schrimp Alkalische Phosphatase	1 µl
Plasmid-DNA	ca. 1 µg

Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 15 min und eine anschließende Inaktivierung der alkalischen Phosphatase bei 65 °C für 5 min. Eine Umpufferung mit Hilfe des QIAquick® PCR-Purification Kits in H<sub>2</sub>O war erst nötig, um die weitere Verwendung der dephosphorylierten Plasmid-DNA zu erlauben.

#### 4.1.7 Ligation

Die Ligation stellt eine enzymatische Verknüpfung zweier Nukleinsäuremoleküle an ihren Enden dar. Dabei wird das 3'-Hydroxy-Ende des einen Moleküls mit dem 5'-Phosphat-Ende des anderen Moleküls durch das Enzym Ligase unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden. Die hierfür benötigten Überhänge werden durch einen vorherigen Restriktionsverdau hergestellt. In dieser Arbeit wurde die Ligase der T4-Bakteriophage benutzt. Die Tabelle 16 gibt Aufschluss über den Ligationsansatz. Die Ligation wurde bei 16°C über Nacht angesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz ohne Insert-DNA.

**Tabelle 16:** Ligationsansatz

DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 30 µl
10xLigasepuffer	3 µl
T4-Ligase	2 µl
Plasmid-DNA	x µl (50-100 ng)
Insert-DNA	x µl (im molaren Verhältnis 4:1 zur Plasmid-DNA)

#### 4.1.8 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien

Ein Aliquot (100 µl) kompetente *E.coli* XL1Blue Bakterien wurde auf ein Eisbad gestellt. 8-10 µl eines Ligationsansatzes oder 0,5 µl aus einer Plasmidpräparation wurden auf die Bakteriensuspension gegeben und für 30 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 42°C für 30 sec in einem Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und danach sofort auf Eis gestellt und für 2 min abgekühlt. 250 µl LB-Medium wurden zu der Suspension gegeben und für ca. 1 h bei 37°C geschüttelt. 100 µl dieser behandelten Bakteriensuspension wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien, die erfolgreich transformiert wurden enthielten die Antibiotikaresistenz, vermittelt durch den Plasmidvektor und bildeten Kolonien aus. Handelte es sich bei der Transformation um ein etabliertes Konstrukt, so dienten die angewachsenen Kolonien direkt zur Animpfung von LB-Medium zur Plasmidpräparation. War das trans-

formierte Konstrukt nicht etabliert, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt um positive Klone zu visualisieren und später nach einer positiven Sequenzierung zu propagieren.

#### 4.1.9 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob die auf der Platte gewachsenen Kolonien die gewünschten Insert-Fragmente in den Plasmidvektoren tatsächlich eingebaut hatten. Die Durchführung der Kolonie-PCR erfolgte indem zuerst PCR-Reaktionsgefäße mit dem Kolonie-PCR-Ansatz (s. Tabelle 17) und Reaktionsgefäße mit 250 µl LB-Medium befüllt wurden. Nun wurden einzelne Kolonien der transformierten *E. coli*-Bakterien mit Hilfe einer Pipettenspitze von der Agarplatte angepickt, 10 Mal in das PCR-Reaktionsgefäß und anschließend 10 Mal im Reaktionsgefäß mit LB-Medium resuspendiert. So stand der Bakterienklon gleichzeitig für die PCR-Reaktion als auch als Vorkultur für die spätere Vermehrung im LB-Medium zur Verfügung. Die Kolonie-PCR erfolgte mit spezifischen Primern unter den in Tabelle 18 angegebenen Bedingungen. Zudem wurden je 2 µl aus dem Ligations- und Religationsansatz, als Positiv- bzw. Negativkontrolle in der Kolonie-PCR mitgeführt. Die Reaktionsgefäße mit den Bakterien in LB-Medium wurden während der Kolonie-PCR bei 37 °C schüttelnd vorinkubiert. Bei einem positiven Kolonie-PCR Ergebnis wurden die entsprechenden Klone in LB-Medium mit Antibiotikasupplementierung (0,1 %) vermehrt. Es erfolgte eine Mini- oder Midi-Plasmidpräparation.

**Tabelle 17:** Ansatz für eine Kolonie-PCR

DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 15 µl
10x Taq-Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	1,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,2 µl
dNTP (10 mM)	0,3
Sense Primer (10 µM)	0,45 µl
Antisense Primer (10 µM)	0,45 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl

**Tabelle 18:** Programm für eine Kolonie-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklen
95°C	2 min	1
95°C	30 sec	30
54°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	7 min	1
4°C	bis zum Abbruch	1

#### 4.1.10 Präparation der Plasmide (Midi- und Mini-Präp)

Für die Plasmidpräparationen wurde eine 5 ml (Mini-Präp) bzw. 100 ml (Midi-Präp) über Nacht Bakterienkultur in 0,1 %-Antibiotikahaltigen LB-Medium verwendet. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *Nucleo-Bond® Xtra Midi Kits* bzw. des *QIAprep® Spin-Miniprep Kits*. Die Präparation wurde entsprechend der Angaben der Herstellerprotokolle durchgeführt und in H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 4.1.11 Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Plasmid DNA

Nach der Präparation der Plasmid-DNA wurde die Konzentration der DNA bestimmt. Dies wurde mit Hilfe des „Eppendorf BioPhotometer plus UV/Vis“ Photometer durchgeführt. Zur Messung wurde die Plasmid DNA Lösung 1:100 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die Formel, die der Berechnung der DNA-Konzentration zu Grunde liegt, lautet:

$$\begin{aligned} \text{Absorption } 260 \text{ nm} \times (\text{Verdünnung} \times \text{Koeffizient} * / 1000) \\ = \text{DNA-Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

\*Wobei der Koeffizient für doppelsträngige DNA 50 beträgt.

Die DNA Proben wurden mit H<sub>2</sub>O auf die Arbeitskonzentration verdünnt und in 50 µl bzw. 100 µl Aliquots bis zur Verwendung eingefroren.

#### 4.1.12 Sequenzierung

Die klonierten Plasmid-DNAs wurden von der Firma GATC Biotech in Konstanz sequenziert. Die Sequenzen wurden im Internet heruntergeladen und mit dem Internet-Programm *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bzw. *Expasy-Translate-Tool* (<http://expasy.org/tools/dna.html>) auf ihre Richtigkeit überprüft.

## 4.2 Zellkultur-Methoden

Die Zellen wurden bei 37°C sowie 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in 20 ml Medium kultiviert. Je nach Zelllinie wurden sie alle 2 bis 4 Tage passagiert. Dies erfolgte, indem der konfluente Zellrasen mit 5 ml PBSM gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA versetzt wurde. Nach einem kurzen Schwenken wurden 500 µl Trypsin/EDTA entnommen und die Flasche mit dem restlichen Trypsin bei 37°C inkubiert. Je nach Zelllinie kann es 1-10 min dauern, bis sich der Zellrasen ablöst. Nach Zugabe von 1 ml FKS sowie 8,5 ml Medium wurden die Zellen mithilfe der Glaspipette resuspendiert, gesplittet auf 20 ml Medium mit 5-10 %FKS aufgefüllt und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Für die Transfektionen mit Lipofectamine™ musste gewährleistet werden, dass eine 70%ige Konfluenz des Zellrasens erreicht wurde. Dafür wurde eine definierte Zellzahl in die unterschiedlichen Zellkulturgefäße ausgesät (Tabelle 18). Die Auszählung der Zellen erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer und folgender Beispielrechnung:

200 gezählte Zellen für 4 Quadrate

→ Durchschnittsbildung :4 = 50

Entspricht  $50 \times 10^4 \rightarrow 5 \times 10^5 / 1,2 = 4,1$  Verdünnungsfaktor

Gesamtvolumen für 24 well/Platte =  $24 \text{ ml} / 4,1 = 5,85 \text{ ml}$  Zellsuspension

2,40 ml FKS

15,75 ml Medium

---

24 ml

In folgender Tabelle sind die Aussaatzahlen der jeweiligen Zelllinie entsprechend der unterschiedlichen zu verwendenden Platten aufgeführt.

**Tabelle 19:** Aussaatzahlen der verwendeten Zelllinie

Zelllinie	6-Napf-Platte (1 ml Medium/Napf)	24-Napf-Platte (3 ml Medium/Napf)	10 cm-Schale (10ml Medium/Schale)
BHK21	$2,0 \times 10^5$ Zellen/ml	$1,2 \times 10^5$ Zellen/ml	$2,0 \times 10^5$ Zellen/ml
IPI2I	$1,8 \times 10^5$ Zellen/ml	$1,5 \times 10^5$ Zellen/ml	$2,0 \times 10^5$ Zellen/ml
ST	$1,8 \times 10^5$ Zellen/ml	$1,5 \times 10^5$ Zellen/ml	$2,4 \times 10^5$ Zellen/ml

#### 4.2.1 DAPI-Test

Eine DAPI-Färbung der Zellen wurde in regelmäßigen Intervallen durchgeführt, um eine Kontamination durch Mykoplasmen auszuschließen zu können. Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) bindet an DNA und kann unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. DAPI macht die zelleigene DNA als auch die DNA von Mykoplasmen sichtbar. Zellen, die mit Mykoplasmen befallen sind, zeigen neben dem Zellkern, bzw. unterhalb der Plasmamembran DAPI-positive Strukturen. Die DAPI-Färbung wurde ebenfalls verwendet, um die Kerne in zur Immunofluoreszenz verwendeten Zellen anzufärben.

#### 4.2.2 Lagerung von Zellen

In regelmäßige Abstände wurden Gefrierkulturen der unterschiedlichen Zelllinien hergestellt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Dafür wurden zu 80-90 % konfluente  $75\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen trypsinisiert (Kapitel 4.2) und in 9 ml Medium mit 10% FKS resuspendiert. Nachdem die Zellen in einem 50 ml Falcon-Tube aufgenommen und für 5 min bei  $400 \times g$  zentrifugiert wurden, wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gestellt. Das Auftauen erfolgte auf  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Wasserbad. Anschließend wurde die Zellsuspension in 10 ml Medium aufgenommen.

### 4.3 Heterologe Expression in eukaryotischen Zellsystemen

In dieser Arbeit wurden transiente Transfektionen der zu untersuchende DNA durchgeführt. Unter Transfektion versteht man das Einbringen fremder DNA in eukaryotische Zellen (Lottspeich und Engels, 2006). Die DNA wird dabei durch Plasmidvektoren in die Zellen eingeschleust, wobei die Lebensdauer dieser DNA auf wenige Tage beschränkt ist. Danach ist diese DNA vollständig abgebaut. Daher wird diese Art der Transfektion als transient bezeichnet. Die heterologe Expression der zu untersuchenden viralen Proteine wurde mittels Lipofectamine<sup>®</sup> und Calcium-Phosphat-Präzipitation in eukaryotischen Zellsystemen durchgeführt.

#### 4.3.1 Transfektion mittels Lipofectamine<sup>®</sup>

Die Aussaat der Zellen erfolgte einen Tag vor der Transfektion. Am Tag der Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 70-90 % aufweisen. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit dem *Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent* der Firma *Invitrogen* und erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls. Die zu transfizierende DNA-Gesamtmenge für 24-Napf-Platten betrug  $1,5 \mu\text{g}$ , für 6-Napf-Platten  $4 \mu\text{g}$ .

#### 4.3.2 Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

Die Calcium-Phosphat-Präzipitation ist im Vergleich zu der Transfektion mit Lipofectamine® weniger effizient, jedoch kostengünstiger. Sie erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich in 10-cm-Kulturschalen mit IPI2I-Zellen für den *pull-down assay* von HA-fusionierten TGEV S-Proteinen. Bei dieser Zelllinie konnte die Transfektion des TGEV S-Proteins mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation etabliert werden. Die Aussaat der Zellen erfolgte auch bei dieser Methode einen Tag vor der Transfektion. Am Tag der Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 70-90 % aufweisen. Für die Transfektion wurde die Plasmid-DNA von insgesamt 15 µg pro 10 cm Kulturschale in 200 µl H<sub>2</sub>O pipettiert. Zudem wurden 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 250 µl 2 x HBS-Puffer gemischt. Diese beiden Ansätze wurden zusammen pipettiert und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Suspension tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Dabei kann eine kurze Verfärbung des Mediums beobachtet werden, wobei der pH-Wert sich Übergangsweise ändert. Die Zellen wurden für 24 h in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

#### 4.3.3 Lokalisierungsanalysen von S-Proteinen

Die Lokalisierungsanalysen der unterschiedlichen S-Proteine (TGEVS<sub>wt</sub>, TGEVS<sub>Y/A</sub>, TGEVS<sub>K/M</sub>, *Flag*\_TGEVS, *HA*\_TGEVS) mit Hilfe der Kompartimentmarker für ER, ERGIC und Golgi-Apparat erfolgten mit BHK21-Zellen in 24-Napf-Platten. Die S-Protein-cDNAs wurden in einem gleichen Verhältnis zu den Kompartimentmarker-cDNAs transfiziert (je 1,5 µg Plasmid-DNA). Für eine Einzelexpression der S-Proteine wurden die unterschiedlichen cDNAs zusammen mit dem leeren Plasmidvektor pCGI (IpCGI) als Kontrolle transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden für 24 h in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzanalyse (IFA).

## 4.4 Methoden zum Nachweis von Proteinen

### 4.4.1 Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Die Immunfluoreszenzanalyse (IFA) ist eine Methode um die Lokalisierung von Proteinen in Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde die IFA angewendet, um das Lokalisierungsverhalten der TGEV Proteine in eukaryotische Zellen zu beobachten.

Die Zellen wurden zur IFA in 24-Napf-Platten auf Deckgläschen ausgesät und einen Tag später mit den gewünschten Plasmid-DNA mit Lipofectamine™ transfiziert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Nun fand die Immunfluoreszenzfärbung statt. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe von 3%igem Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurde das Paraformaldehyd abgesaugt und eine 0,1 M Glycin/PBS Lösung wurde für 5 min auf die Zellen gegeben, um das Agieren vom PFA zu stoppen. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen. Sollte ein Eindringen der Antikörper in das Zellinnere erfolgen, so musste die Zellmembran zuvor permeabilisiert werden. Dies wurde ermöglicht durch die Inkubation der Zellen mit einer 0,25%igen Triton-X-100 Lösung für 5 min. Nach einem dreimaligen PBS-Waschschritt erfolgte die Inkubation mit den Antikörpern (AK), indem 30 µl AK-Verdünnung auf Parafilm in eine Feuchtkammer gegeben, und die Deckgläschen mit der Zellrasenseite auf die Tropfen gelegt wurden. Primäre bzw. sekundäre Antikörper wurden jeweils eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Nach den Inkubationen mit dem Primär- und dem Sekundärantikörper wurden die Deckgläschen zurück in die 24-Napf-Platten gelegt und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung der Nuklei durch eine DAPI-Lösung. Dazu wurden 250 µl DAPI-Lösung auf jedes Deckgläschen in den *wells* pipettiert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die DAPI-Lösung wurde abpipettiert und die Veriefungen wurden dreimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend konnten die Deckgläschen mit *Mowiol* eingedeckelt werden.

Bei den Lokalisierungsanalysen der S-Proteine (TGEVS\_wt, TGEVS\_Y/A, TGEVS\_K/M) wurden die Zellen vor der Antikörperinkubation permeabilisiert. Die Detektion des TGEV S-Proteins erfolgte mit dem  $\alpha$ -TGEVS (6A.C3) und dem anti Maus Cy3 Antikörper. Die Visualisierung der *Flag*-Proteine wurde mit Hilfe des anti *Flag* Cy3-Antikörpers durchgeführt. Die *HA*-Proteine wurden durch den anti *HA* und den anti Maus bzw. anti Kaninchen FITC detektiert.

Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit dem Konfokalmikroskop Leica TCS SP5. Entsprechend der nachzuweisenden Fluorochrome der einzelnen Antikörper wurde die geeignete Wellenlänge des Anregungslichts gewählt. FITC-tragende Antikörper wurden mit einer Wellenlänge von 488 nm, Cy3-tragende mit 561 nm und das Fluochrom DAPI wurde mit 405 nm angeregt. Die Zellen wurden mit einem 63 x Öbobjektiv betrachtet.

#### 4.4.2 *Antibody uptake assay*

Ein *antibody uptake assay* ist eine Methode zum Nachweis der Fähigkeit eines Proteins endozytiert zu werden. In dieser Arbeit wurde dieser Versuchsansatz benutzt, um zu bestimmen, ob die TGEVS\_K/M Mutante im Vergleich zum im ERGIC zurückgehaltenen TGEVS\_wt von der Oberfläche zurück ins Zytoplasma internalisiert wird. Als Gegenkontrolle diente ein identischer Ansatz, der jedoch im gesamten Versuch auf 4°C oder auf einem Eisbad (nicht-endozytotische Bedingungen) gehalten wurde. Alle verwendeten Lösungen wurden vorgekühlt um unerwünschte Internalisierungen zu vermeiden. Ein Tag nach der Transfektion wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Der anti TGEVS-Antikörper wurde 1:200 angesetzt und 100  $\mu$ l dieser Verdünnung wurden zu jedem Ansatz pipettiert. Die Ansätze wurden nun für 1 h bei 4°C schwenkend inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS. Dann wurde 37°C warmes Medium zu den Vertiefungen hinzupipettiert und für 15 min bei 37°C inkubiert (Endozytose Bedingungen). Die Negativkontrollplatte wurde mit kaltem Medium versetzt und bei 4°C für 15 min gestellt (nicht endozytotische Bedingungen). Nachdem dreimal mit PBS gewaschen wurde, wurden alle Proben mit 100  $\mu$ l Sekundärantikörper Suspension ( $\alpha$ -

Maus Cy3 in PBS 1:200) versetzt und für 1 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit PFA fixiert und das Protokoll ging wie eine normale IFA weiter.

#### 4.4.3 Lysatanalyse

Die Zellen wurden lysiert um eine Expressionsanalyse der transfizierten Proteine durchzuführen. Je nach Fragestellung wurden Zellen in 6-Napf-Platten oder 10 cm-Schalen ausgesät und am darauf folgenden Tag transfiziert. Die Lyse der Zellen erfolgte einen Tag nach der Transfektion. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Reagenzien ausgeführt. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte im Napf bzw. in der Schale. Es wurden 500 µl NP40 Lysispuffer mit Proteaseinhibitor (Complete™) bzw. 1 ml für 10 cm Platten in das Zellkulturgefäß pipettiert. Die Lyse der Zellen erfolgte für 30 min auf Eis. Mithilfe eines Zell-schabers wurden die Zellen von dem Untergrund vorsichtig und gründlich abgekratzt. Anschließend wurden die Zelllysate mit einer Pipette aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30 min bei 4 °C und 16.000 x g. Der Überstand, der die nachzuweisenden Proteine enthielt, wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Proteinauftrennung in der SDS-PAGE wurden die Proben 1:2 mit 2 x SDS-Probenpuffer versehen und für 5 min bei 96°C erhitzt. Für einen spezifischen Proteinnachweis wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe der Methode des Western Blottings auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

#### 4.4.4 Oberflächenbiotinylierung

Mit einer Biotinmarkierung von Oberflächenproteinen und anschließender Immunpräzipitation des gewünschten Proteins mit einem spezifischen Antikörper, kann die Lokalisierung eines Proteins bestimmt werden. Wenn parallel dazu eine Lysatanalyse durchgeführt wird, kann eine Aussage zur Expression des gewünschten Proteins getroffen werden. Durch die Kombination

dieser beiden Methoden wird bestimmt, ob das Protein intrazellulär oder auf der Plasmamembran lokalisiert ist.

Für die Oberflächenbiotinylierung wurden BHK21-Zellen in 6-Napf-Platten ausgesät. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen stets auf Eis platziert. Die verwendeten Lösungen waren eisgekühlt, um die Degradierung der Proteine durch zelluläre Proteasen zu verhindern. Der Zellrasen wurde nach mikroskopischer Beurteilung dreimal mit PBS gewaschen und 0,5 ml der Sulfo-NHS-LC-Biotinlösung (0,5 mg/ml in PBS) wurden in eine Vertiefung pipetiert. Die Biotinylierung der Oberflächenproteine erfolgte für 20-30 min bei 4 °C unter stetigem Schwenken. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 M Glycin/PBS-Lösung gewaschen und für 15 min inkubiert um ungebundenes Biotin zu inaktivieren. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der Zellrasen wurde mit einem Zellschaber in 1 ml PBS aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde bei 3.700 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden zur Zellyse in je 100 µl NP40-Lysispuffer mit Complete™ resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zellysat für 30 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert, um die Proteine von Zelltrümmern zu trennen. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. 20 µl dieser Lysatproben wurden für eine Analyse der Proteinexpression durch SDS-PAGE und Western Blotanalyse entnommen und mit entsprechendem Volumen an 2 x SDS-Probenpuffer gemischt.

#### 4.4.5 Immunpräzipitation

Transfizierte Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und NP40-Lysispuffer hinzugegeben. Nach einer Inkubation für bei 4°C für 5-10 min wurde der Zellysat in ein neues Eppi gegeben und 30 min bei 16000 x g zentrifugiert. 50 µl Protein A-Sepharose (50 %) wurden mithilfe einer blauen Spitze in ein neues Eppi pipettiert und der Überstand in das vorbereitete Eppi pipettiert. Dann wurden 2 µl des gewünschten Antikörpers hinzupipettiert und für eine Stunde auf dem Schüttler bei 4°C gestellt. Die Proben wurden für 3 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und das Pellet dreimal mit 1 ml

kaltem NP40-Lysispuffer gewaschen. 50 µl SDS-Probenpuffer wurden zu der trockenen Protein A-Sepharose gegeben und für 10 min bei 95°C inkubiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde Überstand in ein neues Eppi überführt und bei -20°C eingefroren, bis die Proben auf ein Gel aufgetragen werden mussten.

#### 4.4.6 SDS-PAGE

Mit der *Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese* (SDS-PAGE) werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt (Lämmli, 1970). Für diese Analyse wurden die Trenngele entweder selbst gegossen oder fertige Gradientengele von Invitrogen eingesetzt. Die selbstgegossenen Gele in dieser Arbeit entsprachen einer Acrylamidkonzentration, gemäß der Größe der aufzutrennenden Proteine, von 8 bzw. 10%. Die gekauften *Tris-Acetate-Gradientengele* zeigten eine Acrylamidkonzentration von 4–12 % auf. Die SDS-PAGE wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt, d.h. ohne Zugabe von DTT oder Mercaptoethanol zu den Proben.

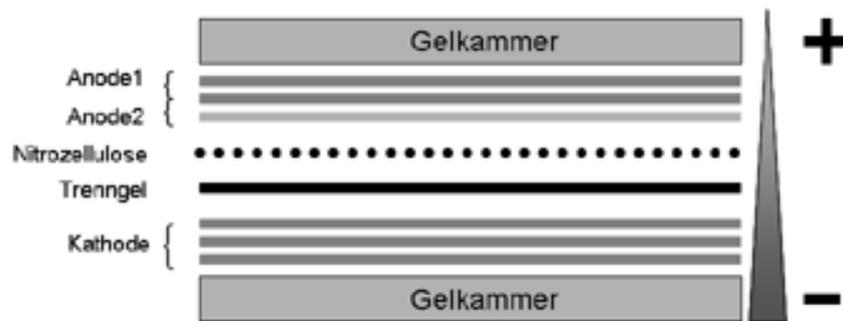
Vor dem Beladen der Proben in die Geltaschen, wurden diese für 5 min bei 96°C gekocht. Bis zum Übergang der Proben vom Sammelgel ins Trenngel wurde das Gel zunächst bei einer konstanten Spannung von 80 V gefahren. Anschließend wurde die Spannung auf 120 V (selbstgegossene Gele) bzw. 150 V (gekaufte Gele) erhöht. Die Laufzeit der Gele hing von den aufzutrennenden Proteinen ab.

Die Marker beinhalteten Proteine mit bekannten Standardgrößen mit einem Molekulargewicht von 10 bis 250 kDa bzw. 300 kDa. Diese wurden vor Gebrauch 1:4 mit 2 x SDS-Probenpuffer verdünnt.

#### 4.4.7 Western Blot Analyse

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels *semidry* Technik auf eine Nitrozellulosemembran (NZ-Membran) übertragen (Towbin et al., 1979). Dazu wurde das Sammelgel entsorgt und das Trenngel in die Transferkammer platziert. Die Anordnung der Filterpapiere, des SDS-PAGE Gels und der Nit-

rozellulosemembran (6 cm x 8 cm) in der Transferkammer sah wie folgt aus (s. Abbildung 14):



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung für die Anordnung in der Western Blotkammer: 3 Filterpapiere mit Kathodenpuffer, die NZ-Membran wurde in dest. H<sub>2</sub>O aktiviert, 1 Filterpapier mit Anodenpuffer 2, 2 Filterpapiere mit Anodenpuffer 1.

Die Proteine wurden vom SDS-PAGE Gel auf die Nitrozellulosemembran mit konstantem Strom von 300 mA für 15 min transferiert. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei Raumtemperatur in Blocking-Lösung geschwenkt. Vor der Behandlung mit den Antikörpern wurde die Membran dann dreimal mit PBSM-Tween jeweils für 10 min bei RT gewaschen. Abhängig von dem nachzuweisenden Protein wurden verschiedene primäre und Sekundärantikörper eingesetzt.

Die Inkubation der Antikörper erfolgte jeweils für 1 h bei 4 °C. Die Inkubation mit Streptavidin-HRP erfolgte schwenkend über Nacht, im 4 °C Kühlraum. Nach jeder Behandlung mit Antikörper wurde dreimal mit PBSM-Tween gewaschen. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend mit einem speziellen Peroxidase-Substrat (Super Signal Dura, Super Signal Femto) für 5 min inkubiert. Das Enzym Peroxidase (POD), welches an die Antikörper gekoppelt war, katalysierte die Umsetzung des Substrates, wobei die entstandene Chemilumineszenz mit Hilfe des *Chemi Doc* Systems detektiert wurde.

#### 4.4.8 Silberfärbung

Zur Visualisierung der Proteine in dem SDS-PAGE-Gradientengel wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Dazu wurde das Pierce<sup>®</sup> *Silver Stain Kit* benutzt. Die Färbung wurde nach den Angaben des Herstellers ausgeführt.

### 4.5 Interaktionspartnersuche

#### 4.5.1 GST-*pull-down* assay

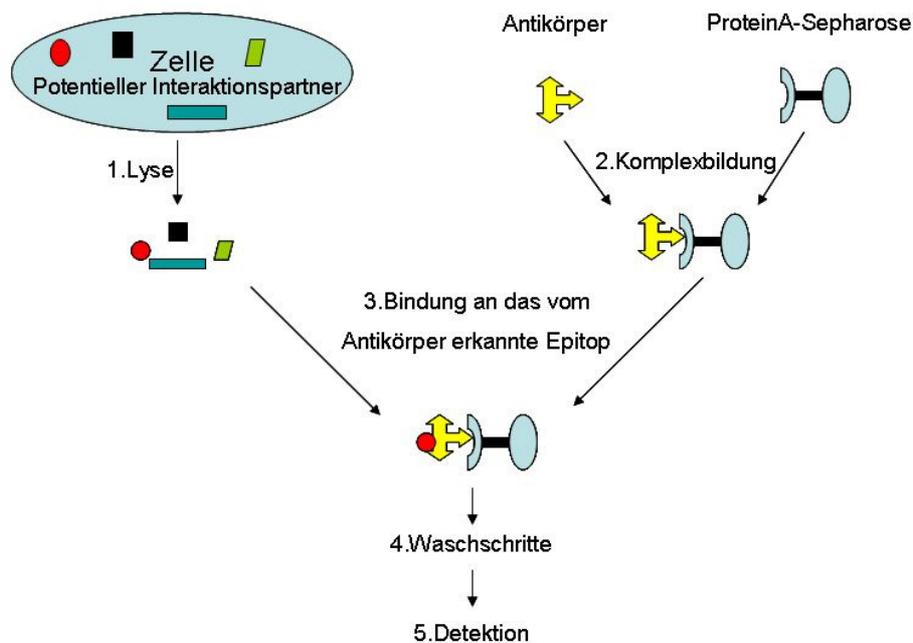
Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine werden in einer Reihe von Anwendungen eingesetzt. Ihre Einführung in Bakterien bietet ein Werkzeug zur Synthese von rekombinanten Proteinen (Smith und Johnson, 1988). Der GST-*pull-down* assay wird genutzt, um Interaktionen zwischen einem bestimmten Protein und unbekanntem Zielproteinen aufzuspüren. Weiterhin dient es auch dem Nachweis von Interaktionen zwischen zwei bekannten Proteinen (Kaelin et al., 1991; Orlinick und Chao, 1996). Das zu untersuchende Protein ist ein GST-Fusionsprotein, dessen Sequenz in einen Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktoside (IPTG)-induzierbaren Expressionsvektor kloniert wurde. Nach der Expression in Bakterien kann das affinitätschromatographisch aufgereinigte GST-Fusionsprotein mit einem Zelllysat und GST-Agarosebeads inkubiert werden (Sambrook und Russell, 2001). Die Komplexe, die durch die *beads* herausgefischt werden, können mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese analysiert werden.

15 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz wurden mit einem positiven GST-Fusionsprotein-Klon angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur mit der Vorkultur 1:10 in 50 ml LB-Medium mit Ampicillin angesetzt. Nach 5 h Inkubation bei 37°C wurde die Kultur bei 4500 x g zentrifugiert und das Pellet bei -20°C tiefgefroren. Am nächsten Tag wurden die Pellets bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 5 ml Lysispuffer versetzt. Durch Hoch- und Runterpipettieren wurde das Pellet resuspendiert und in einem Ultraschallbad für 1 min sonifiziert. Dies diente

sowohl der Zellyse als auch dem Zerstören der DNA. Anschließend wurden die Suspensionen für 30 min bei 4°C und 16000 x g abzentrifugiert und die Überstände für eine Konzentrationsbestimmung der Proteine gemessen. 100 µl GST-*beads* pro Probe wurden in einem 15 ml Falcon-tube vorgelegt und das Volumen an Bakterienlysat dazu pipettiert, so dass alle Proben gleiche Proteinmengen aufwiesen. Die Suspensionen wurden mit Lysispuffer auf 5 ml aufgefüllt und für 1,5 h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Nun wurden die *beads* dreimal mit Lysispuffer gewaschen (8000 x g, 4°C, 3 min) und anschließend mit 1 ml IPI2I-Zellysat versetzt. Es folgte eine weitere Inkubation für 1,5 h bei 4°C über Kopf schüttelnd. Die Proben wurden nach obigen Bedingungen gewaschen. Letztlich wurden die *beads* in 100 µl in 2 x SDS-Puffer aufgenommen und für 10 min bei 96°C erhitzt. Nun folgte eine Zentrifugation bei 16000 x g für 20 min und der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert.

#### 4.5.2 *Pulldown assay*

Der *pulldown assay*, auch Koimmunpräzipitation genannt, diente in dieser Arbeit zur Visualisierung potentieller *in vitro* Protein/Protein-Interaktionen. Mithilfe dieser Methode wurden mögliche zelluläre Interaktionspartner des Retentionssignals von TGEV S-Protein erfasst. Das Prinzip dieses *assays* ist in Abbildung 15 dargestellt. Es beruht auf der Verwendung von Protein A-Sepharose, an welche Antikörper gebunden wurden, die gegen das Protein von Interesse gerichtet sind. Für diese Arbeit wurden entweder gegen HA, gegen S oder gegen Filamin gerichtete Primärantikörper eingesetzt. Durch spezifische Bindung dieser Antikörper an das entsprechende in eukaryotischen Zellen exprimierte Fusionsprotein kann dieses mit dem potentiellen Interaktionspartnern aus einem Proteingemisch isoliert werden. Dieser Vorgang entspricht der so genannten Immunpräzipitation.



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung für das Prinzip des *pull-down assays*

Für den *pull-down assay* wurden Zellkulturschalen (3,5 oder 10 cm Durchmesser) mit IPI2I-Zellen ausgesät. Die 10 cm Schalen wurden mittels der Calcium-Phosphat-Präzipitation, die 3,5 cm Schalen mittels Lipofectamine™ transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Platten auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Mit einem Zellschaber erfolgte das Ablösen der Zellen. Daraufhin erfolgte ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 4500 x g und 4°C. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls bei 4°C, um die intrazelluläre Protease-Aktivität zu reduzieren. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet zur Lyse der Zellen durch Zugabe von 1 ml NP-40 Lysispuffer mit Complete™ für 30 min auf Eis gestellt. Das Lysat wurde dann zentrifugiert (10 min, 16.000 x g, 4°C) und der Überstand auf 50 µL Protein A-Sepharose mit 2 µL Antikörper gegeben. Das Gemisch wurde über Nacht über Kopf schüttelnd bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch dreimal mit NP-40 Lysispuffer gewaschen (jeweils 3 min, 3700 x g, 4°C) und mit 50-100 µL SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 96°C gestellt, wobei die Protein A-Sepharose sich von dem Antikörper/Antigen-Komplex löst. Anschließend wurden die Proben bei 16000 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot.

### 4.5.3 Tandem Affinity Purification

Die TAP (*tandem affinity purification*) wurde 1999 von Rigaut et al. beschrieben und beruht auf einer zweifachen Reinigung von Proteinkomplexen. Der Vektor, der für diese Methode eingesetzt wurde, trägt eine Calmodulin- und eine Streptavidinbindende Domäne, die gemeinsam mit dem einklonierten Gen als Fusionsprotein exprimiert werden. Dadurch kann das Protein von Interesse über zwei Säulen, einmal Calmodulin und einmal Streptavidin laufen, sodass eine hohe Aufreinigungsrate erlangt wird. Für diese Arbeit wurde das *InterPlay Mammalian TAP System* von Agilent Technologies Stratagene benutzt (#240103). Die Anwendung erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers.

## 4.6 Infektionsversuche

### 4.6.1 Infektion

Die Virusinfektion erfolgte auf konfluent wachsende Zellen in Platten (mit 24 Vertiefungen) oder in Maxischalen (29 cm Durchmesser). Für die TGEV-Infektion wurde das Virus in einer 1:1000 Verdünnung in Medium ohne FKS angesetzt. Für die VSV-Infektion wurde eine Verdünnung von 1:10000 vorgenommen. Für 24-Napf-Platten wurden pro Vertiefung 100 µl der Virussuspension pipettiert und die Platte schwenkend bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Für Maxischalen wurden 3 ml Virussuspension hinzupipettiert. Dann wurde die Virussuspension abgesaugt und frisches Medium wurde zu den Vertiefungen hinupipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die 24-Napf-Platte wurde mit 1 ml Medium pro Vertiefung versetzt, während die Maxischalen 20 ml Medium erhielten.

### 4.6.2 Virusreinigung

Zur Reinigung von Viruspartikeln wurden in einem konfluenten Monolayer gewachsene ST-Zellen (10 Maxischalen) mit TGEV infiziert. Ungefähr 24 h nach der Infektion wurden die Zellen auf das Auftreten eines CPE (zytopathischer Effekt) unter dem Mikroskop untersucht. Wenn dieser eintrat (abgekugelte Zellen), wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Die im Überstand

verbliebenen Zellen wurden für 15 min bei 4160 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden auf SW32-Röhrchen verteilt, und die Viruspartikel wurden für 1 h bei 4°C bei 189658 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 100 µl PBSM aufgenommen und mit Parafilm bei 4°C über Nacht gestellt. Am nächsten Tag wurde ein Saccharosegradient in SW41-Röhrchen vorbereitet. Dafür wurden in einem Kolben jeweils eine 60%ige, eine 50%ige und eine 20%ige Saccharoselösung vorbereitet. Mithilfe eines Magnetrührers wurden die Lösungen bei 50°C gelöst. In ein SW41-Röhrchen wurden 7,5 ml der 60%igen Saccharoselösung pipettiert. Mithilfe einer Vakuumpumpe und eines Gradientenmischers wurde aus den 50 und 20%igen Lösungen ein kontinuierlicher Saccharosegradient erstellt. Jeweils 100 µl der Virussuspension wurden vorsichtig auf den Gradienten pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation für 4 h bei 238829 x g und 4°C. Durch diesen Zentrifugationsschritt konzentrieren sich die Viruspartikel in dem Bereich des Gradienten an, in dem die Saccharosekonzentration der Dichte der Viruspartikel entspricht. Die im Gradienten erscheinende leicht weißliche Bande wurde vorsichtig mit einer 1 ml- Spritze abgenommen und in ein neues SW41 Röhrchen übertragen. 10 ml PBSM wurden zum Auffüllen kräftig dazugeben (Mischeffekt). Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 238829 x g, 4°C, 1 h. Das weißliche Pellet, welches die gereinigten und ankonzentrierten Viruspartikel enthält wurde in 100 µl PBSM aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

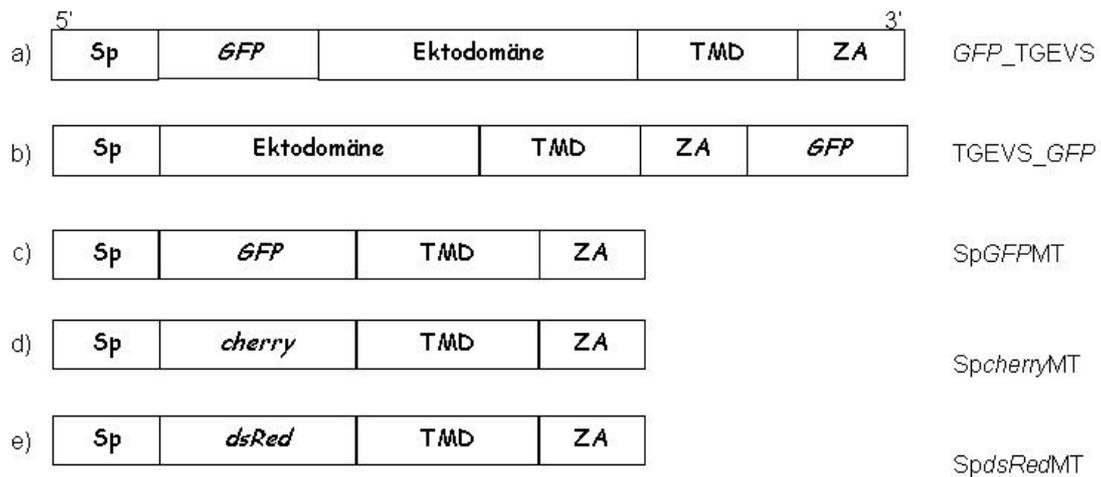
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Lokalisierungsexperimente

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das S-Protein von TGEV hinsichtlich seiner zellulären Lokalisierung untersucht. Hierzu wurden Immunfluoreszenz Analysen (IFA) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde das S-Protein mithilfe eines gegen die Ektodomäne gerichteten Antikörpers detektiert. Außerdem wurden Konstrukte untersucht, die eine direkte Fluoreszenzmarkierung des S-Proteins aufweisen. In manchen Versuchen wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt, sodass der Nukleus gefärbt und eine Orientierung innerhalb der Zelle ermöglicht wurde. Um die Lokalisierung des Proteins genau zu ermitteln, wurden Kompartimentmarker eingesetzt. Diese sind fluoreszenzmarkierte Proteine, welche ausschließlich in bestimmten Organellen der Zelle lokalisieren und für diese als Marker dienen. Die Beobachtung der fluoreszierenden Zellen wurde mit einem Fluoreszenz- oder einem konfokalen Mikroskop durchgeführt.

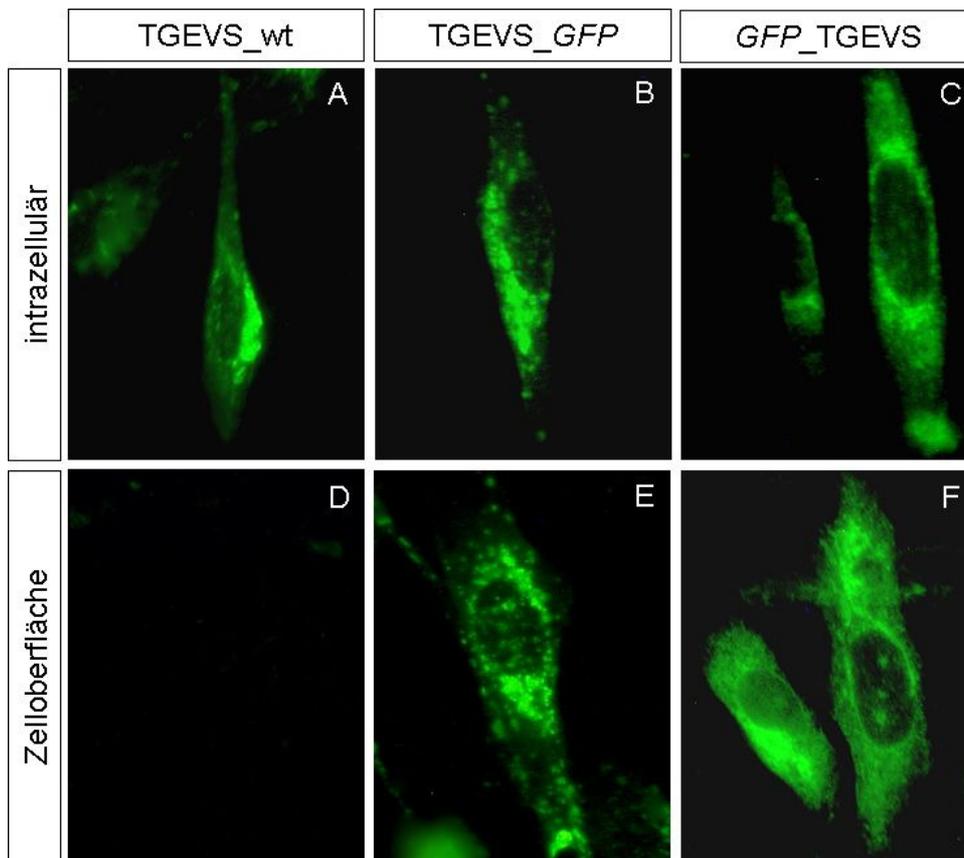
#### 5.1.1 Lokalisierung des S-Proteins von TGEV

Drei Konstrukte zur direkten Lokalisierung des S-Proteins trugen das GFP in ihrer Sequenz. Das *green fluorescent protein* (GFP) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*. Wird dieses Protein mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, so emittiert es ein grünes Licht. Das GFP wurde N-terminal direkt hinter das Signalpeptid des S-Proteins kloniert oder C-terminal an das S-Protein fusioniert (Abbildung 16, a und b).



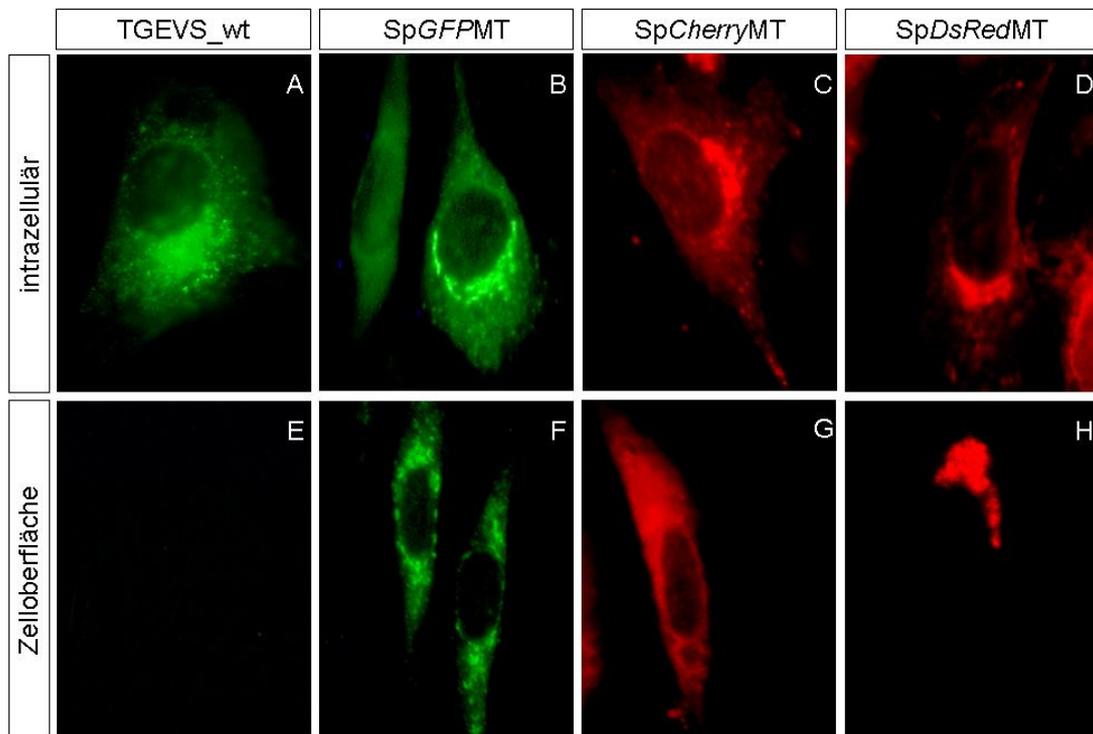
**Abbildung 16:** Übersicht der fluoreszenzmarkierten S-Protein Konstrukte. a-c weisen eine grüne Fluoreszenz auf, d und e leuchten rot. **Sp:** Signalpeptid; **TMD:** Transmembrandomäne; **ZA** zytoplasmatischer Abschnitt.

Ein weiteres Fusionsprotein wies einen Austausch der kompletten Ektodomäne durch das GFP auf (Abbildung 16, c). Dieser Austausch wurde ebenfalls mit dem rot fluoreszierenden *mCherry* (in den Abbildungen als *cherry* abgekürzt) vorgenommen (Abbildung 16, d). *MCherry* ist ein synthetisch hergestelltes Protein, das aus dem *dsRedMonomer* aus *Discosoma sp.* stammt (Shaner et al., 2004). In einem weiteren fluoreszierenden Fusionsprotein wurde die Ektodomäne des S-Proteins durch das *DsRedMonomer* ausgetauscht (Abbildung 16, e). Der Austausch der Ektodomäne (Abbildung 16, c-e) gab einen ersten Hinweis darauf, ob diese Region für die Lokalisierung des S-Proteins entbehrlich ist. Das Einfügen von GFP am N- oder C-terminalen Ende hatte zum Ziel, ein fluoreszierendes Protein zu erhalten, das nach einer transienten Transfektion direkt am Mikroskop visualisiert werden konnte. Jedes der in Abbildung 16 beschriebenen Konstrukte wurde in einem doppelten Ansatz in BHK21-Zellen untersucht. Ein Ansatz wurde mit Triton-X-100 behandelt, während der andere nicht permeabilisiert wurde. Die Tritonbehandlung permeabilisiert die Zellmembran und ermöglicht so das Eindringen von Antikörpern in den intrazellulären Raum der Zelle.



**Abbildung 17:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Vergleichs der Einzeldetektion der Konstrukte TGEVS\_wt (A und D), TGEVS\_GFP (B und E) und GFP\_TGEVS (C und F) in BHK21-Zellen. A-C wurden mit Triton-X-100 permeabilisiert (intrazelluläre Detektion) während D-F nicht permeabilisiert wurden (Zelloberflächendetektion).

Das S-Protein zeigte nach der Behandlung mit Triton-X-100 eine subnukleäre Lokalisierung (Abbildung 17, A). Wenn die BHK21-Zellen nicht permeabilisiert wurden, konnte der Antikörper 6A.C3 (Gebauer et al., 1991) nicht durch die Membran hindurch gelangen. Somit konnte kein Signal detektiert werden (Abbildung 17, D). Das Protein TGEVS\_GFP wies mit und ohne Permeabilisierung (Abbildung 17, B, E) eine deutliche subnukleäre Lokalisierung auf. Die Lokalisierung des S-Proteins wurde durch die Fusion von GFP an dessen N-Terminus nicht gestört (Abbildung 17, B und E). Dies schien anders bei dem GFP\_TGEVS-Konstrukt zu sein, bei welchem die C-terminale Addition von GFP hinter das Signalpeptid von GFP eine diffuse zytoplasmatische Verteilung aufwies. Es schien so, als würde das Protein im ER bleiben. Dies war sowohl bei permeabilisierten als auch bei nicht permeabilisierten Zellen zu beobachten (Abbildung 17, C und F).

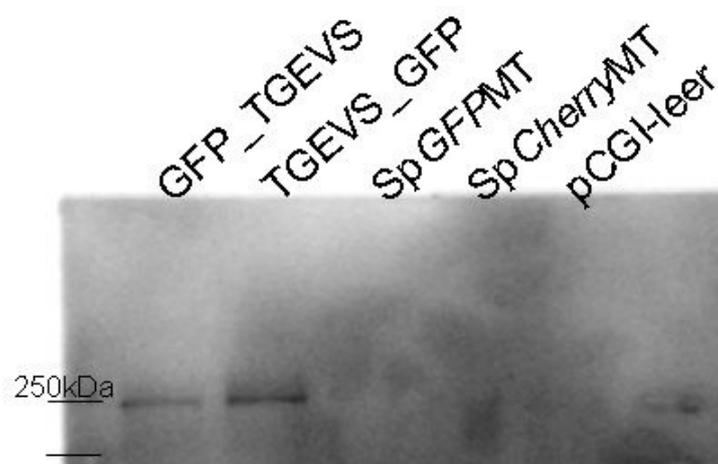


**Abbildung 18:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Einzelexpression des Wildtyp S-Proteins (A und E) von TGEV, des GFP markierten Konstrukt (B und F) und der rot fluoreszierenden Konstrukte (C, D, G und H) in BHK21-Zellen. A-D zeigen mit Triton-X-100 behandelte (intrazelluläre Detektion) Zellen, E-H nicht permeabilisierte Zellen (Zelloberflächendetektion).

Die direkt fluoreszenzmarkierten Konstrukte, in denen die Ektodomäne durch GFP (Abbildung 18, B und F), *mCherry* (Abbildung 18, C und G) oder *DsRedMonomer* (Abbildung 18, D und H) ausgetauscht wurden, zeigten, dass ihre Lokalisierung sowohl unter permeabilisierenden Bedingungen als auch ohne Tritonbehandlung ein subnukleär detektierbares Signal aufwies, das mit dem direkt detektierten S-Protein identisch war (Abbildung 18, A). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Information für die Lokalisierung des S-Proteins nicht in der Ektodomäne enthalten ist.

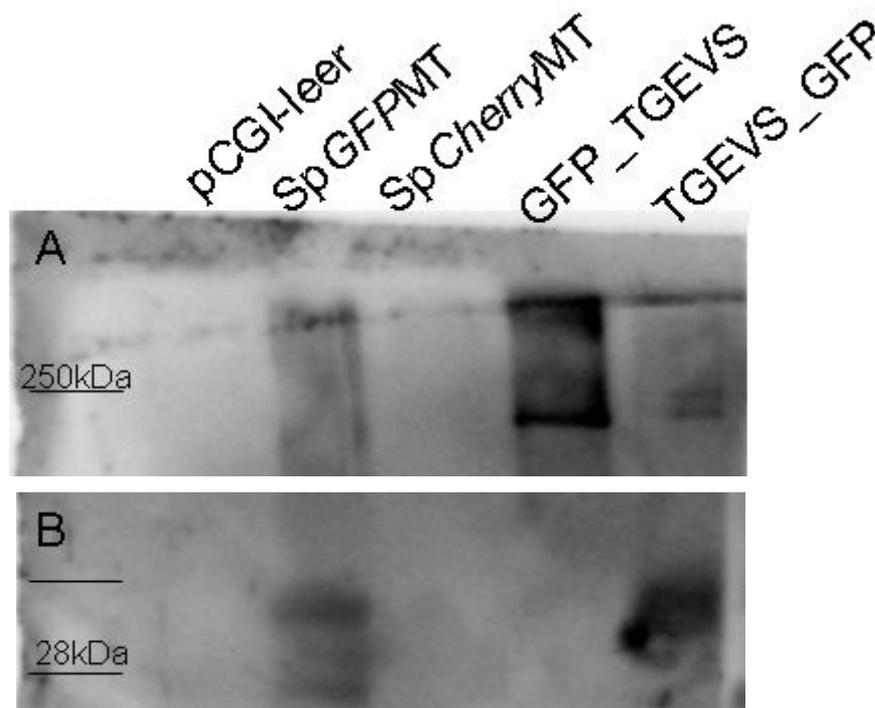
### 5.1.2 Lysate der S-Proteinkonstrukte

In einem Ansatz wurden Lysate aus BHK21-Zellen hergestellt, die mit den Konstrukten transfiziert worden waren. Nach der Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden die S-Proteine durch die anti Maus-Peroxidase detektiert. Somit konnte zusätzlich zur IFA eine weitere Aussage getroffen werden, ob die Konstrukte exprimiert werden (das Signal ist in Lysaten positiv detektierbar), oder an die Oberfläche wandern (Signal ist zusätzlich in der Oberflächenbiotinylierung positiv).



**Abbildung 19:** Lysate von BHK21-Zellen transfiziert mit den GFP markierten S-Proteinen. Der Blot wurde mit anti S-Antikörper und anti-Maus Peroxidase behandelt.

Wurde der anti S-Antikörper gegen die Ektodomäne des S-Proteins eingesetzt, so zeigten die ersten beiden Spuren des Blots (Abbildung 19), dass sowohl TGEVS\_GFP als auch GFP\_TGEVS ein Signal um die 250 kDa ergaben. Sowohl der leere pCGI, der als Negativkontrolle fungierte, als auch die Konstrukte SpGFPMT und SpCherryMT zeigten nach der Detektion mit diesem Antikörper kein Signal.



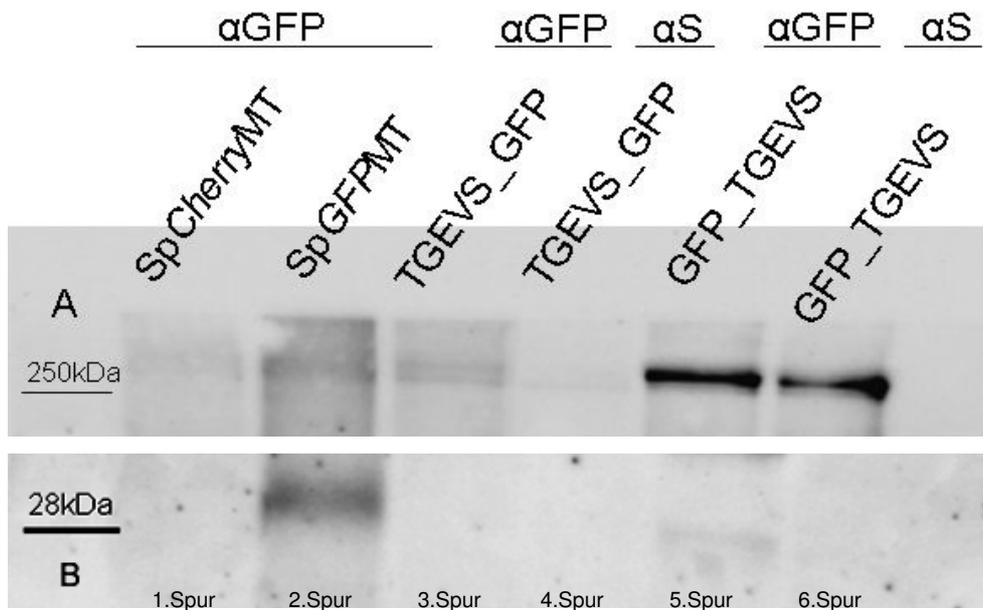
**Abbildung 20:** Lysate von BHK21-Zellen transfiziert mit den GFP markierten S-Proteinen. Der Blot wurde mit anti GFP-Antikörper und anti Maus-POD behandelt. A) Banden in einer Größenordnung von 250 kDa. B) Banden in einer Größenordnung von 30 kDa.

Der Austausch der Ektodomäne des S-Proteins mit GFP oder mCherry führte dazu, dass die Proteine nicht mehr von dem anti S-Antikörper gebunden werden konnten (untere Region des Gels, Daten nicht gezeigt). Wurden die gleichen Proben auf einem weiteren Blot mit dem anti GFP-Antikörper behandelt (Abbildung 20, A und B), dann konnte sowohl ein Signal für das Konstrukt *SpGFPMT* bei 30 kDa detektiert werden als auch 2 Banden bei ungefähr 250 kDa für die Konstrukte *TGEVS\_GFP* und *GFP\_TGEVS* gesehen werden. Die Expression der GFP-Fusionsproteine konnte somit im Western Blot nachgewiesen werden.

### 5.1.3 Oberflächenbiotinylierung der S-Proteinkonstrukte

Die Konstrukte, die für die Immunfluoreszenzversuche und die Lysate in BHK21-Zellen getestet wurden (s. Abbildung 16, 18, 19 und 20), wurden auch in einer Oberflächenbiotinylierung und darauffolgender Immunpräzipitation eingesetzt. Dabei wurden die BHK21-Zellen 24 h nach der Transfektion mit *EZ-link® Sulfo-NHS-LC-Biotin* inkubiert, lysiert und auf Protein A-

Sepharose gegeben. Diese wurde entweder mit dem 6A.C3-Antikörper (gerichtet gegen die Ektodomäne des S-Proteins), oder mit dem gegen GFP gerichteten Antikörper gekoppelt, um die Konstrukte zu detektieren. Die Proben wurden auf ein 10%iges SDS-Gel geladen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Blots wurden mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert und mithilfe der Chemilumineszenz entwickelt.



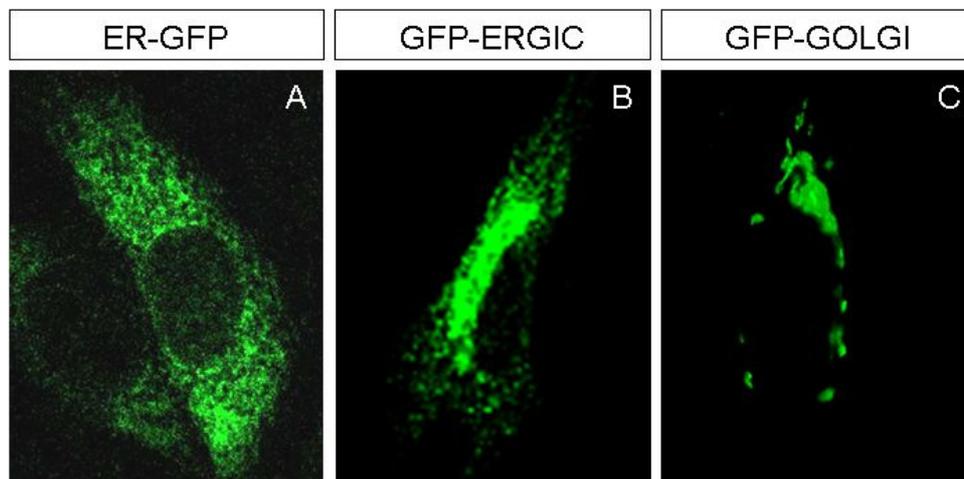
**Abbildung 21:** Oberflächenbiotinylierung mit nachfolgender Immunpräzipitation der mit *cherry* oder GFP markierten Konstrukte. Die Protein A-Sepharose wurde an den anti S-Antikörper (6A.C3) oder dem anti GFP-Antikörper gekoppelt. A) Banden in einer Größenordnung von 250 kDa. B) Banden in einer Größenordnung von 30 kDa.

Die Oberflächenbiotinylierung in Abbildung 21 zeigte, dass GFP\_TGEVS an die Zelloberfläche wanderte. Dieses Protein zeigte eine starke Bande bei 250 kDa (Abbildung 21, A). TGEVS\_GFP zeigte eine schwache Bande in der Höhe von 250 kDa bei der Immunpräzipitation mit anti GFP-Antikörper. Wie erwartet, konnten die Konstrukte SpCherryMT und SpGFPMT nicht in dieser Höhe detektiert werden. Da die Ektodomäne durch das GFP (ca. 30 kDa) ausgetauscht wurde, betrug die molekulare Masse dieses Proteins nur noch ungefähr 30 kDa. Dieses Konstrukt wurde jedoch in Abbildung 21 B sichtbar, wobei die Detektion von SpGFPMT mit dem anti GFP-Antikörper eine deutliche Bande in der Höhe von 30 kDa ergab. Diese Bande war nicht in der 1.Spur der Probe SpCherryMT zu erkennen, da der GFP Antikörper kein Epi-

top auf diesem Fluorochrom erkennen konnte. Sp*Cherry*MT diente hiermit als Negativkontrolle für diesen Versuch.

### 5.1.4 Lokalisierung der Kompartimentmarker

Die Experimente mit den oben genannten Konstrukten zeigen eine Lokalisierung des S-Proteins neben dem Nukleus. Diese Region könnte dem Golgi-Apparat oder dem ERGIC entsprechen. Unwahrscheinlicher scheint die Hypothese, dass es sich um eine Kolokalisierung mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) handelt. Das ER erstreckt sich im gesamten zytoplasmatischen Raum einer Zelle. Für die genaue Identifizierung der zellulären Kompartimente wurden fluoreszenzmarkierte Proteinen eingesetzt, die ausschließlich in bestimmten Organellen exprimiert werden, und somit als Marker fungieren.

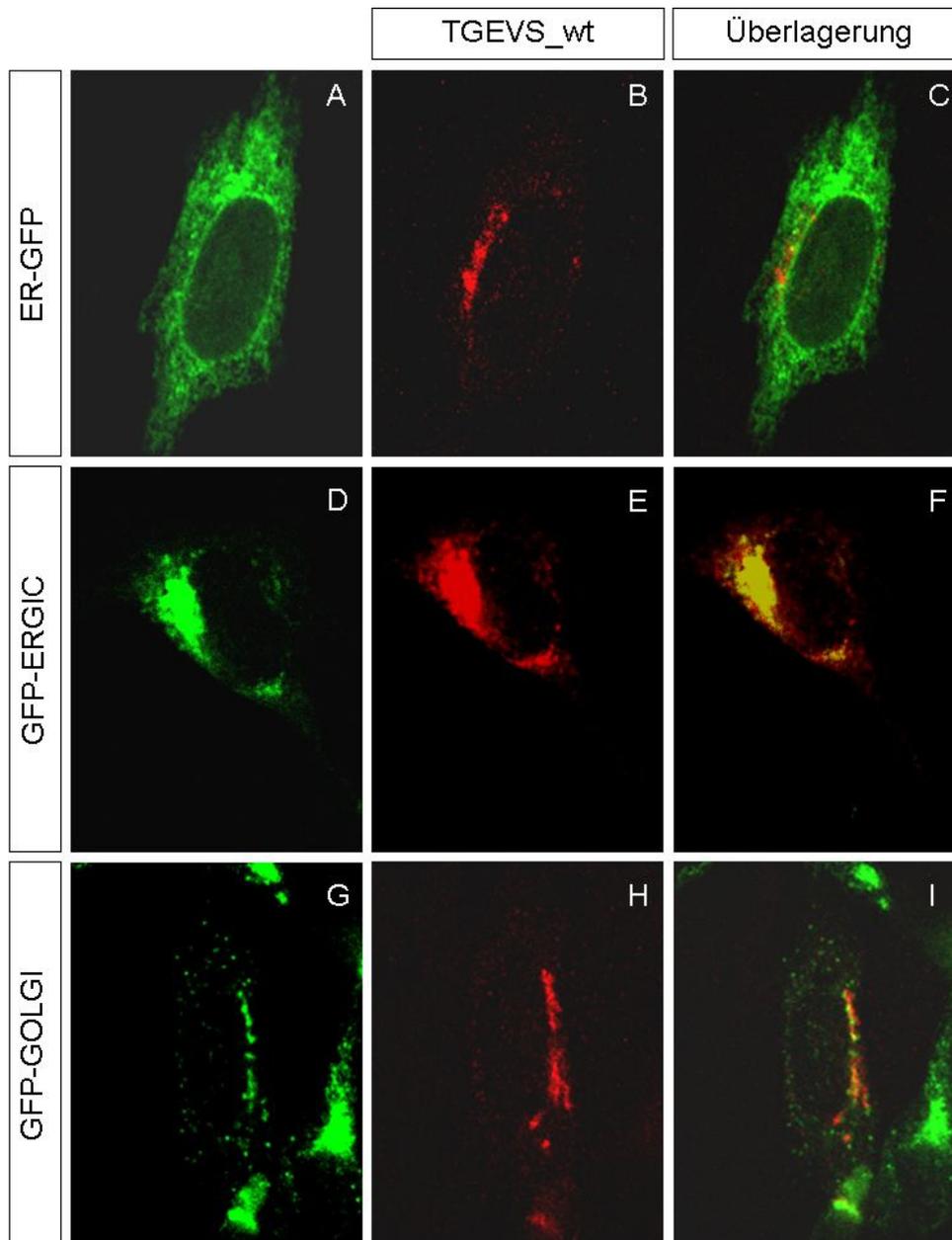


**Abbildung 22:** Einzeldarstellung der Kompartimentmarker in BHK21-Zellen. Das Calretikulin stellt den ER-Marker dar (A). Das p53-Protein visualisiert das ERGIC (B). Die  $\beta$ -Galaktosyltransferase stellt den Golgi-Apparat dar (C).

Das Calretikulin wurde als Marker für das endoplasmatische Retikulum genommen und als diffuses zytoplasmatisches, watteähnliches Signal detektiert (Abbildung 22, A). Dieses Protein wurde N-terminal mit GFP fusioniert. Im Falle des ERGIC-Markers handelt es sich um das ERGIC53-Protein. Dies war nahe dem Nukleus in einer etwas breiteren fast ovalen Formation detektiert (Abbildung 22, B). Das so genannte Golgin130 stellt die  $\beta$ -Galaktosyltransferase dar und ist ein im Golgi-Apparat exprimiertes Protein (Abbildung 22, C), das scharf lineare Strukturen um den Nukleus herum zeigte.

### 5.1.5 Kolokalisierungsversuche des TGEV S-Proteins mit den Kompartimentmarkern

Die Kolokalisierungsexperimente wurden durchgeführt, indem die fluoreszenzmarkierten Kompartimentmarker mit dem TGEV S-Protein kotransfiziert wurden.

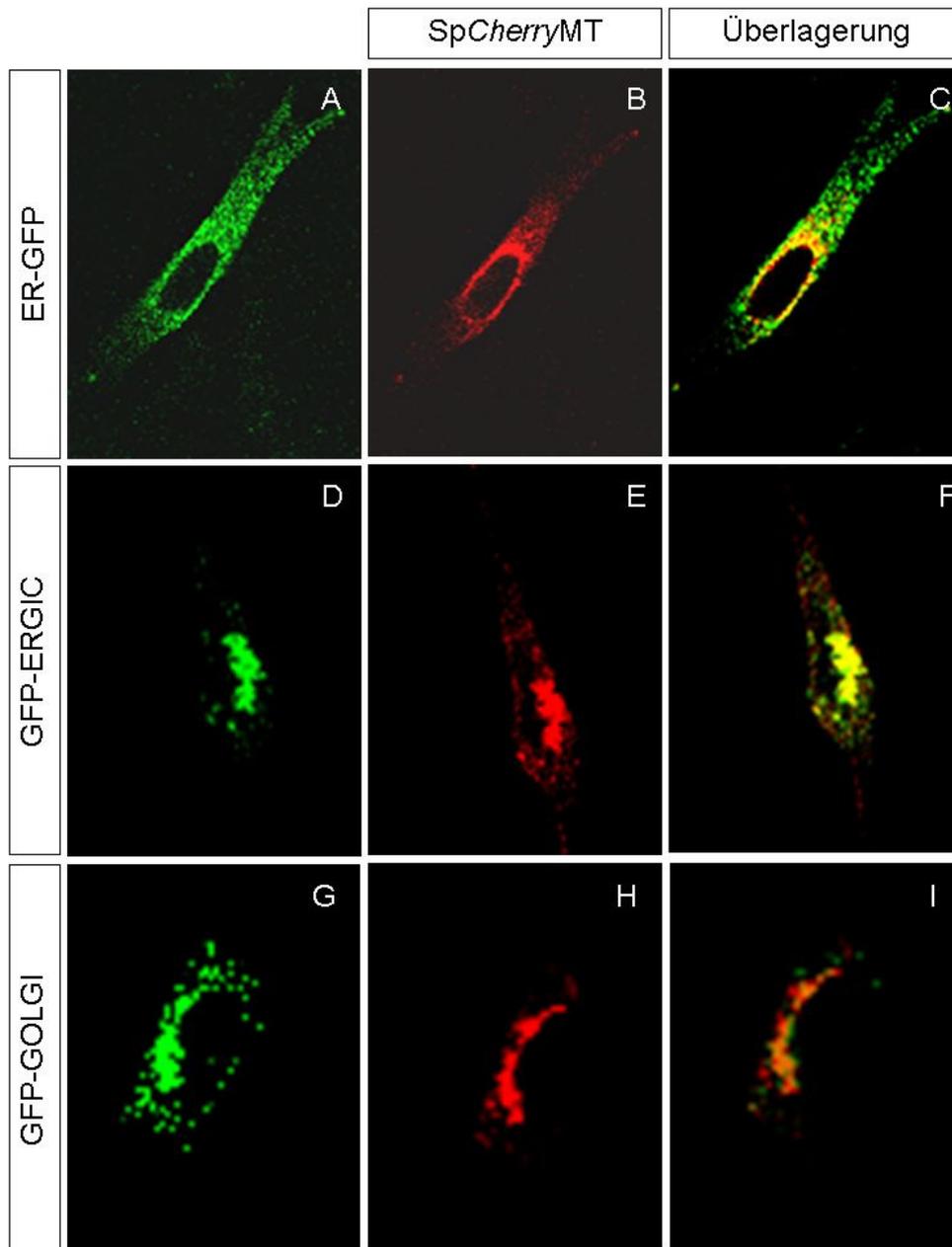


**Abbildung 23:** Konfokale Aufnahme der Koexpression der Kompartimentmarker mit TGEVS\_wt in BHK21-Zellen. A-C zeigen die Koexpression zwischen TGEVS und Calretikulin. D-F zeigen die Koexpression von TGEVS\_wt und ERGIC53. G-I zeigen die Koexpression von TGEVS-wt mit der  $\beta$ -Galaktosyltransferase.

Während die Kompartimentmarker durch die direkte Fluoreszenz detektierbar waren, wurde das S-Protein mithilfe des gegen die Ektodomäne gerichteten Antikörpers 6A.C3 visualisiert. Schließlich konnte mithilfe der konfokalen Mikroskopie die zelluläre Expression beobachtet werden. Der ER-Marker kolokalisiert nicht mit dem S-Protein, da die Überlagerung des roten und des grünen Kanals kein gelbes Signal ergab (Abbildung 23, A-C). Im Gegensatz dazu zeigt das S-Protein eine deutliche Kolokalisierung mit dem ERGIC-Marker (Abbildung 23, D-F). Die Kodetektion vom Golgi-Marker mit dem S-Protein (Abbildung 23, G-I) zeigte eine partielle gelbe Färbung. Hiermit konnte bestätigt werden, dass das S-Protein im ERGIC lokalisiert.

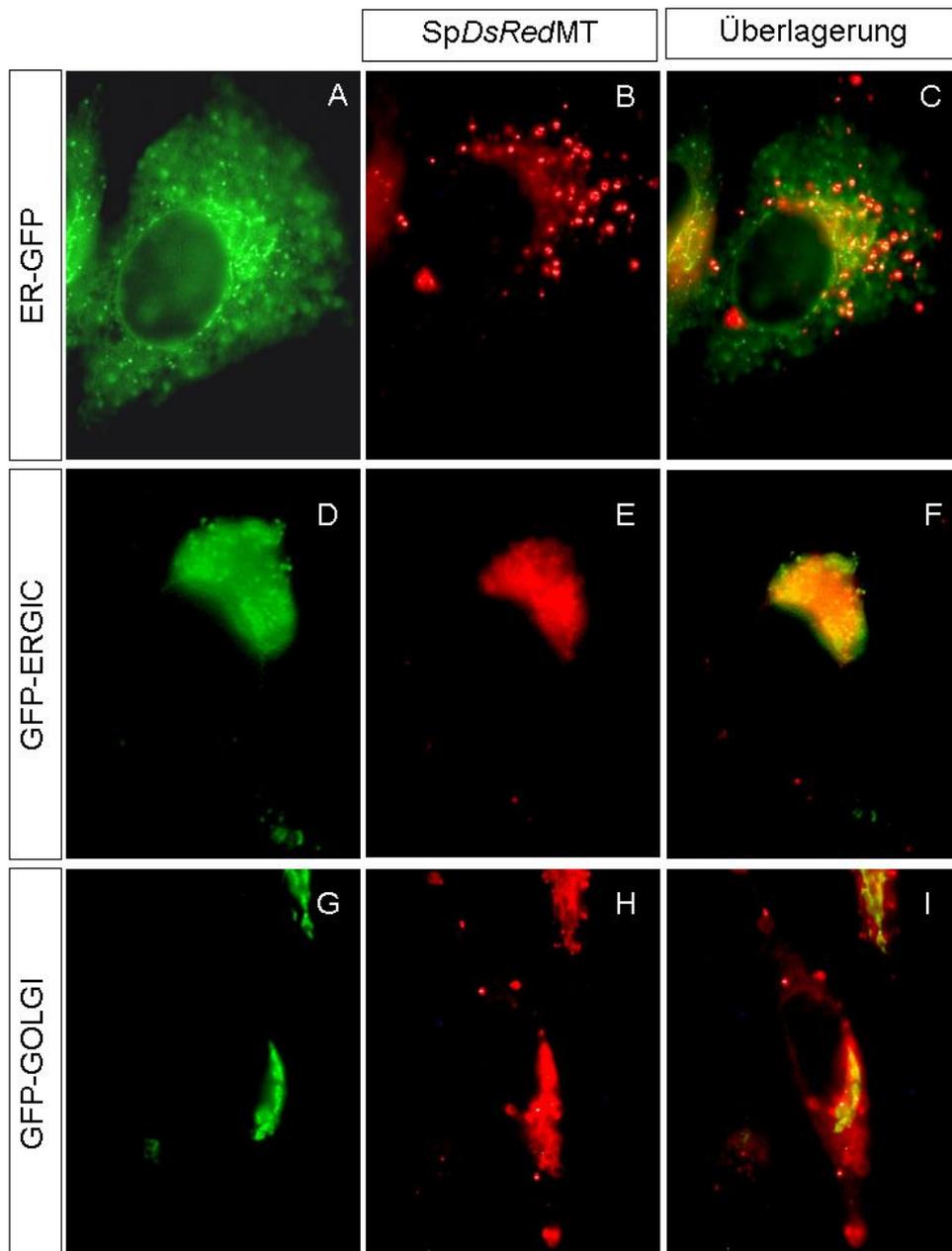
#### 5.1.6 Kolokalisierung der Kompartimentmarker mit SpCherryMT

Die Kolokalisierungsexperimente wurden auch mit den rotfluoreszierenden S-Protein-Konstrukten durchgeführt, um eine weitere Bestätigung hinsichtlich der Lokalisierung von fluoreszierenden Konstrukten im Vergleich zum Wildtyp zu erlangen. Im Falle von SpCherryMT konnte am Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden, dass das S-Protein und das ER vermutlich teilweise kolokalisieren, da die Überlagerung des grünen Kanals (Abbildung 24, A) mit dem roten Kanal (Abbildung 24, B) eine partielle gelbe Färbung ergab (Abbildung 24, C). Wenn das ERGIC-Konstrukt (Abbildung 24, D) mit dem SpCherryMT (Abbildung 24, E) kotransfiziert wurde, ergab die Überlagerung der beiden Kanäle eine nahezu 100%ige Kolokalisierung (Abbildung 24, F). Die Kotransfektion des S-Proteins mit dem GFP-Golgi zeigte eine geringe Kolokalisierung der beiden Proteine (Abbildung 24, I).



**Abbildung 24:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Koexpression von SpCherryMT und den GFP markierten Kompartimentmarkern.

Wurden die Kompartimentmarker mit dem SpDsRedMT kotransfiziert, zeigte das S-Protein am Fluoreszenzmikroskop keine Kolokalisierung mit dem ER-GFP (Abbildung 25, A-C). Es lag eine partielle Kolokalisierung mit dem ER-GIC-Marker vor (Abbildung 25, D-F). Das GFP-Golgi und das S-Protein ergaben in der Überlagerung ebenfalls eine partielle gelbe Färbung, sodass geschlossen werden kann, dass diese beiden Proteine zum Teil kolokalisieren (Abbildung 25, G-I).



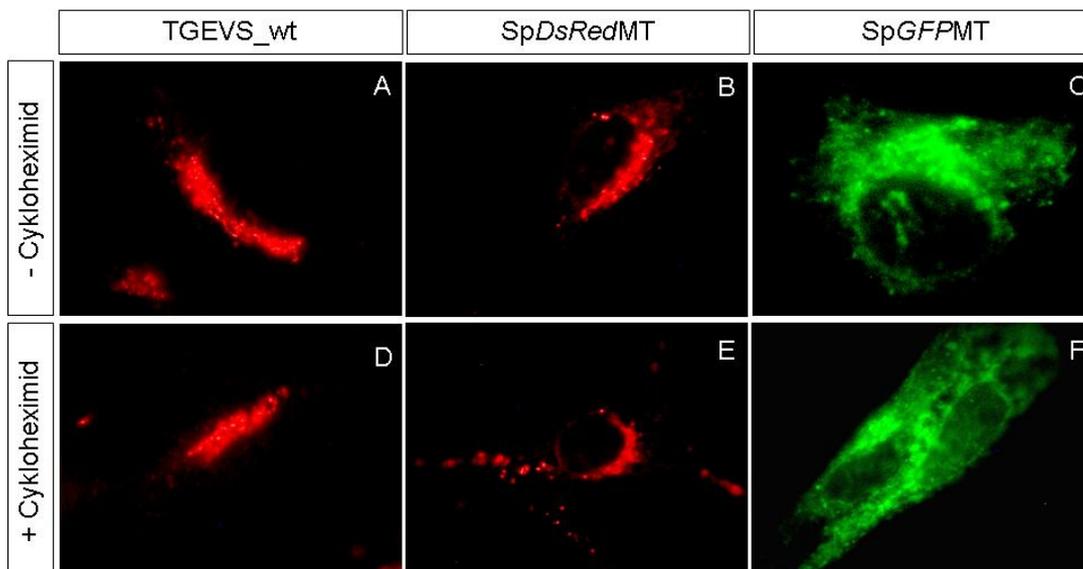
**Abbildung 25:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Koexpression von SpDsRedMT und den GFP markierten Kompartimentmarkern in BHK21-Zellen.

### 5.1.7 Blockieren der S-Protein-Neusynthese

Cykloheximid hat die Fähigkeit die Proteinneusynthese zu blockieren. Wenn Cykloheximid nach der Transfektion zu den zu untersuchenden Zellen hinzu gegeben wird, können die synthetisierten Proteine ihren Zielort in der Zelle erreichen, während kein neues Protein nachgebildet wird. Somit kann die Lokalisierung eines zu untersuchenden Proteins genau ermittelt werden.

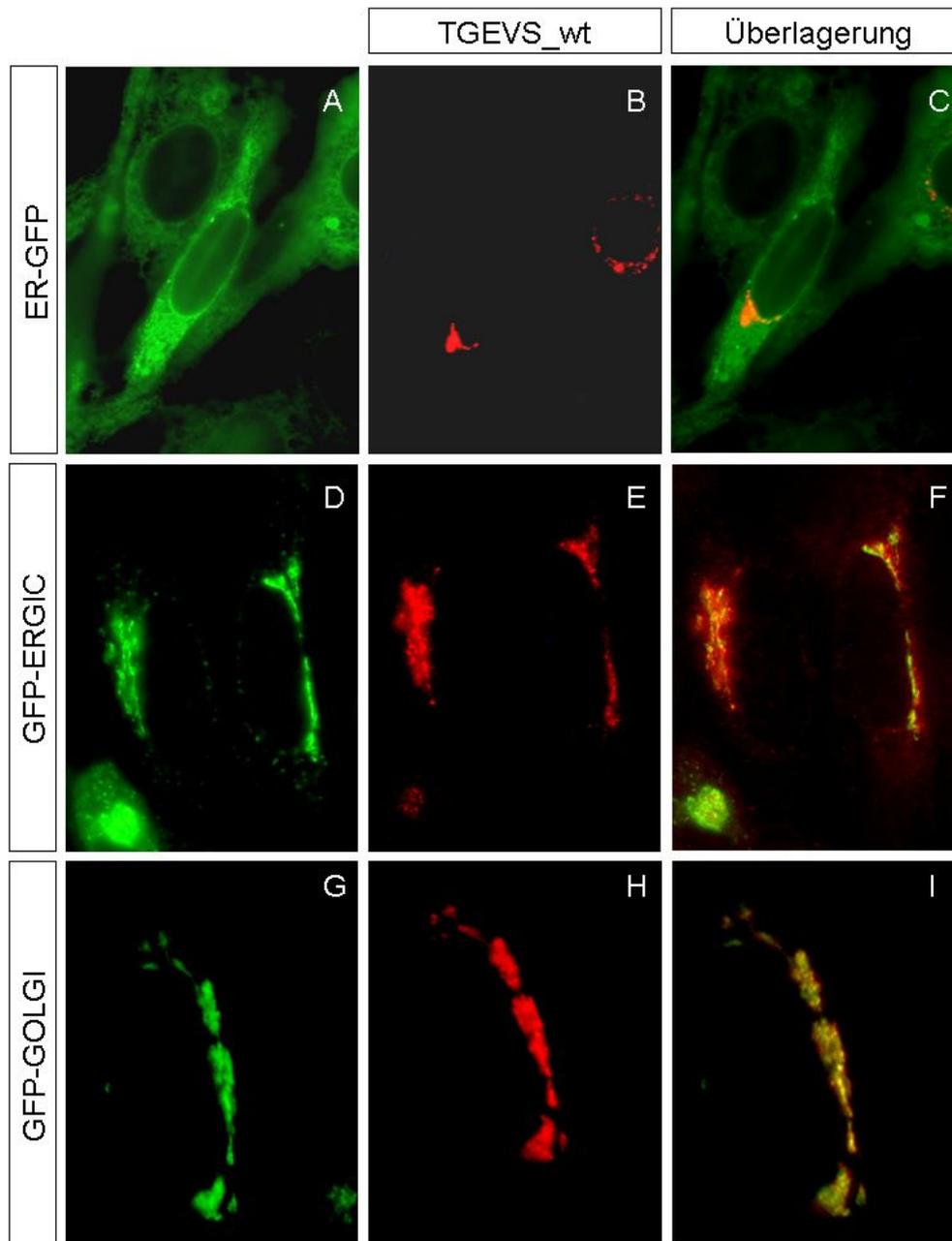
Cykloheximid wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eingesetzt, um die Lokalisierung des S-Proteins genau zu ermitteln. Dieser Versuchsansatz wurde sowohl für das Wildtyp S-Protein als auch für *SpDsRedMT* und *SpGFPMT* durchgeführt.

Erfolgte 24 h nach der Transfektion vom *TGEVS\_wt* eine 5stündige Cykloheximidbehandlung (Abbildung 26, D), wurde kein Unterschied in der Lokalisierung des S-Proteins gegenüber den nicht mit Cykloheximid behandelten Zellen (Abbildung 26, A) beobachtet. Sowohl das Konstrukt *SpDsRedMT* (Abbildung 26, B und E) als auch *SpGFPMT* (Abbildung 26, C und F) verhielten sich wie das Wildtyp S-Protein und lokalisierten auch unter Cykloheximidbehandlung in vergleichbaren Kompartimenten.



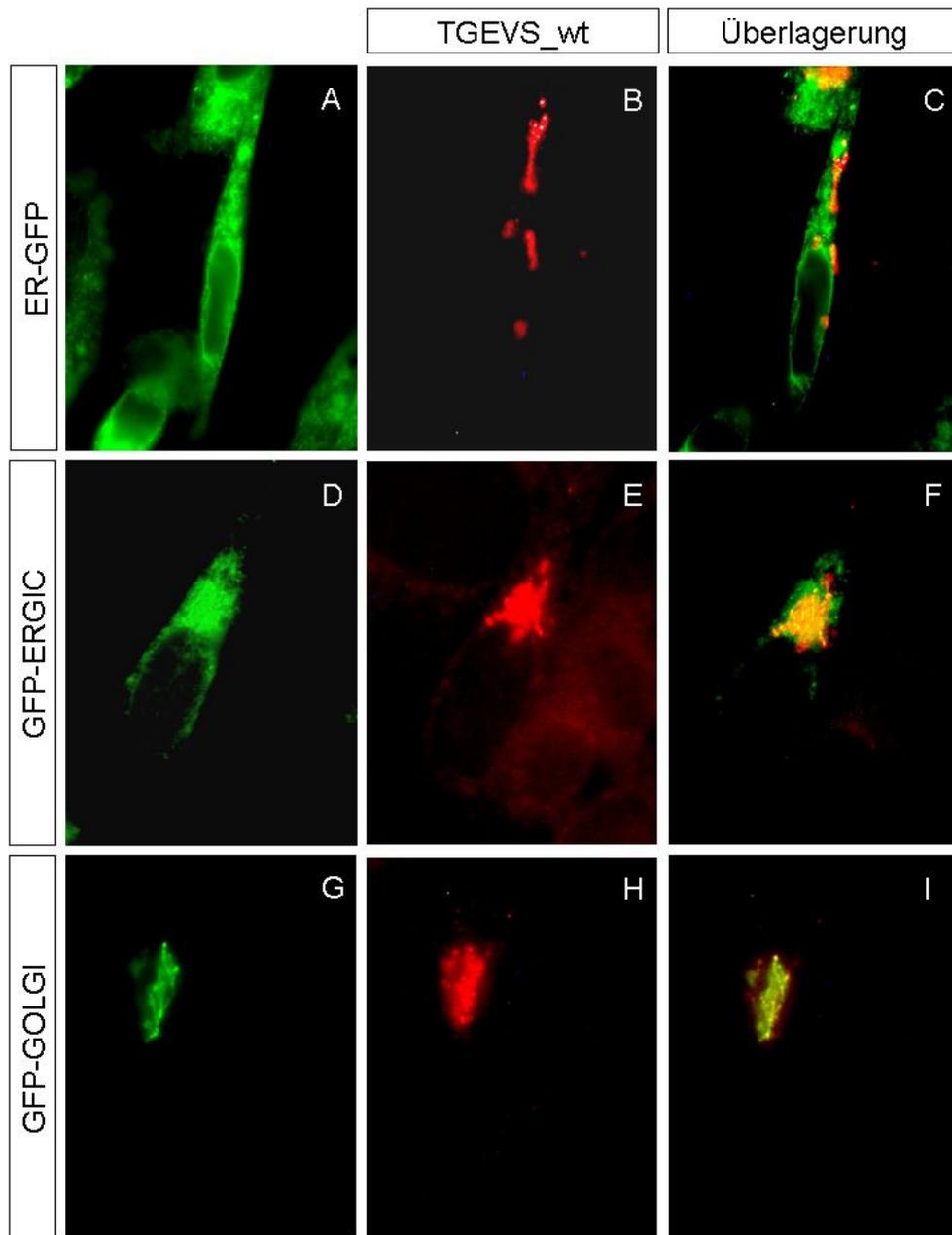
**Abbildung 26:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Vergleichs von *TGEVS\_wt* (A und D), *SpDsRedMT* (B und E) und *SpGFPMT* (C und F) ohne (-) oder mit (+) Cykloheximidbehandlung in BHK21-Zellen.

In Kolokalisierungsexperimenten wurde untersucht, ob die Behandlung mit Cykloheximid eine Auswirkung auf die Kodetektion des S-Proteins mit den Kompartimentmarkern hat. Abbildung 27 zeigt BHK21-Zellen, die nach der Transfektion nicht mit Cykloheximid behandelt wurden. Die BHK21-Zellen wiesen keine Kolokalisierung des TGEV S-Proteins mit dem ER-Marker auf (Abbildung 27, A-C). Der ERGIC- (D-F) sowie der Golgi-Marker (G-I) wiesen in der Überlagerung eine Kolokalisierung mit dem S-Protein auf.



**Abbildung 27:** Konfokale Aufnahmen der Kodetektion von TGEVS\_wt und den GFP markierten Kompartimentmarkern in BHK21-Zellen.

Für das Blockieren der Proteinneusynthese wurden die Zellen nach 24 h Transfektion für 5 h mit Cycloheximid behandelt, fixiert, permeabilisiert und mit dem anti S-Antikörper inkubiert.



**Abbildung 28:** Konfokale Aufnahmen der Koexpression von TGEVS\_wt und den Kompartimentmarkern nach 5 h Cycloheximidbehandlung in BHK21-Zellen.

Abbildung 28 zeigt, dass die Behandlung mit Cycloheximid weder eine Auswirkung auf die Detektion der Kompartimente noch auf die Lokalisierung des S-Proteins im ERGIC hat. Somit konnte für weitere Experimente auf eine Cycloheximidbehandlung verzichtet werden. Die Koloalierungsstudien mithilfe der IFA haben bewiesen, dass das S-Protein im ERGIC mit dem ERGIC53 Protein koloalisierte. Teilweise war eine Kodetektion des S-Proteins im Bereich vom Golgi mit dem  $\beta$ -Galaktosyltransferase-Protein erkennbar (Abbildungen 23 I, 25 I und 27 I). Die Eliminierung der Ektodomäne

und der Austausch mit einem fluoreszierenden Protein wie *Cherry* oder *dsRedMonomer* beeinträchtigt nicht die Lokalisierung des S-Proteins im ER-GIC (Abbildungen 24 und 25).

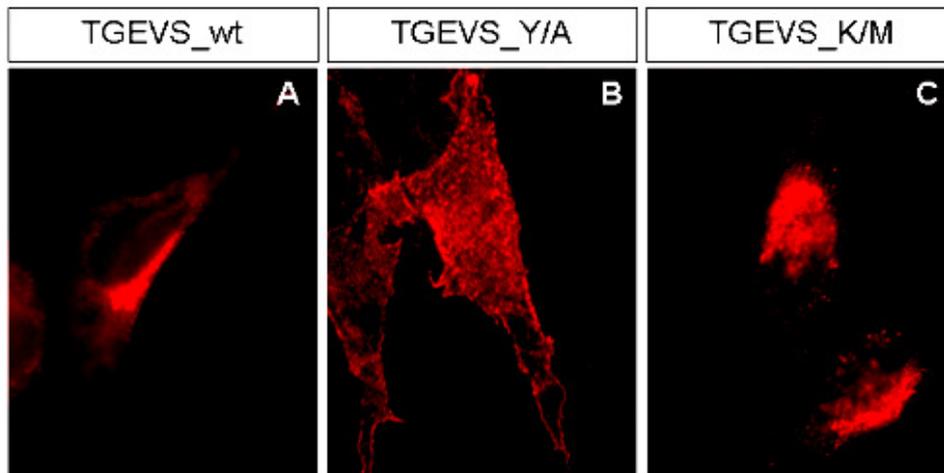
### 5.1.8 Lokalisierung der S-Proteinmutanten

In Vorarbeiten wurden verschiedene Mutanten des S-Proteins hergestellt (Schwegmann-Weßels et al., 2004; André Paul, Diplomarbeit 2006).



**Abbildung 29:** Übersicht der Konstrukte des S-Proteins und seiner Mutanten. **ED:** Ektodomäne; **TMD:** Transmembrandomäne; **ZA:** Zytoplasmatischer Abschnitt. Für die TGEVS\_Y/A Mutante wurde das Tyrosin durch ein Alanin getauscht. Die TGEVS\_K/M Mutante trägt ein Methionin anstelle eines Lysins.

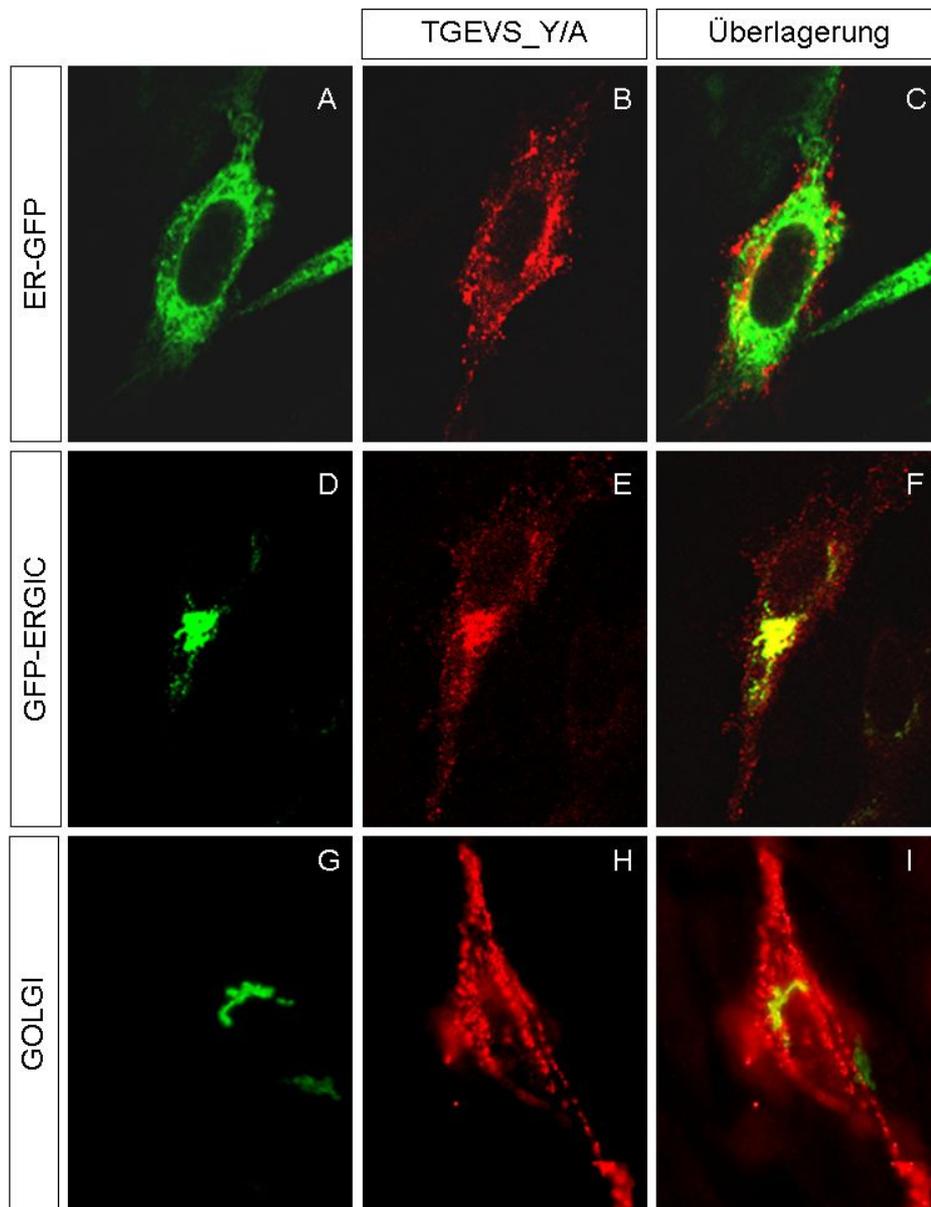
Die Detektion des Wildtyp S-Proteins wies eine ERGIC Lokalisierung in BHK21-Zellen auf (Abbildung 29, 30, A). Der Austausch vom Tyrosin zu Alanin führt dazu, dass die TGEVS\_Y/A Mutante in BHK21-Zellen zur Zelloberfläche wandert (Abbildung 29, 30, B). Dies beweist, dass das Tyrosin für die Retention des S-Proteins eine determinierende Rolle spielt. Eine weitere Mutante, TGEVS\_K/M, wies eine zytoplasmatische Lokalisierung auf, die vesikulär erscheint (Abbildung 29, 30, C). Bei der Herstellung dieser Mutante wurde das Lysin (K) im C-terminalen Bereich des zytoplasmatischen Abschnitts durch ein Methionin (M) substituiert.



**Abbildung 30:** Konfokale Aufnahmen der Einzelexpression des S-Proteins (A) sowie der Mutanten TGEVS\_Y/A (B) und TGEVS\_K/M (C) in BHK21-Zellen.

#### 5.1.9 Kolokalisierung der Kompartimentmarker und der TGEVS\_Y/A Mutante

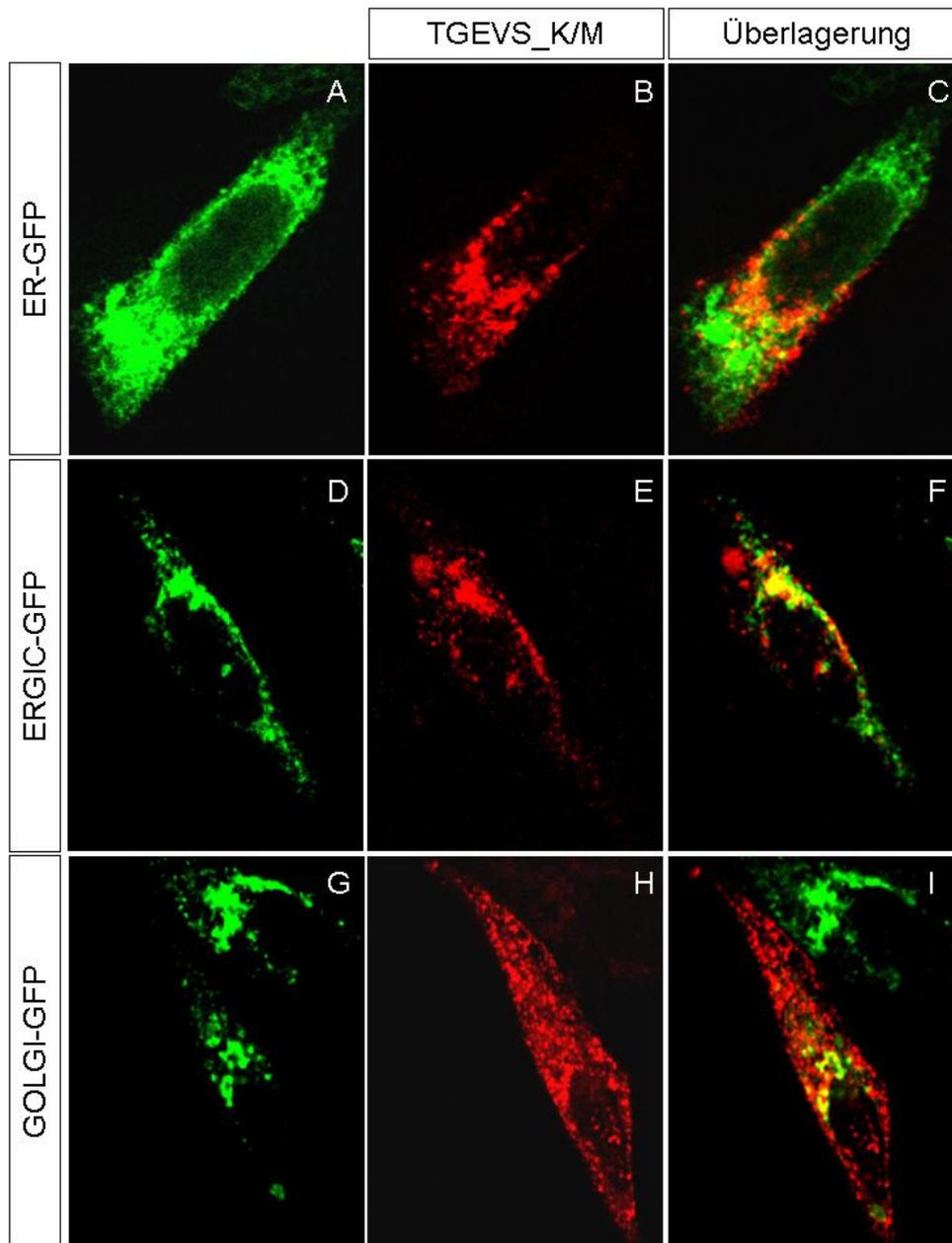
Die TGEVS\_Y/A Mutante wurde in BHK21-Zellen mit den Kompartimentmarkern kotransfiziert. Die Detektion des S-Proteins erfolgte mit dem 6A.C3-Antikörper. Die konfokalen Aufnahmen in Abbildung 31 zeigen, dass die Mutante an die Zelloberfläche wanderte, jedoch zum Teil ein Signal im ERGIC aufwies. Dieser Bereich kolokalisierte tatsächlich weiterhin stark mit dem ERGIC-Marker (Abbildung 31, F). Im Vergleich dazu wies der ER-Marker kein überlappendes Signal mit dem mutierten S-Protein auf (Abbildung 31, D-F). Wurde der Golgi-Marker mit der TGEVS\_Y/A Mutante kotransfiziert, so konnte eine partielle Kolokalisierung im konfokalen Mikroskop erkannt werden (Abbildung 31, G-I).



**Abbildung 31:** Konfokale Aufnahme der Kodetektion von TGEVS\_Y/A mit den fluoreszierenden Kompartimentmarkern in BHK21-Zellen.

#### 5.1.10 Kolokalisierung der Kompartimentmarker und der TGEVS\_K/M Mutante

Die Kolokalisierungsversuche der TGEVS\_K/M Mutante mit den Kompartimentmarkern zeigen am konfokalen Mikroskop, dass der ER-Marker teilweise mit den Vesikeln der Mutante überlappt (Abbildung 32, A-C). Der ERGIC-Marker wies ebenfalls eine partielle Kolokalisierung auf (D-F). Wurde der Golgi-Marker mit dem S-Protein kotransfiziert, so konnte eine partielle Kolokalisierung der beiden Proteine detektiert werden (Abbildung 32, G-I).



**Abbildung 32:** Konfokale Aufnahme der Koexpression der Mutante TGEVS\_K/M und den fluoreszierenden Kompartimentmarkern in BHK21-Zellen.

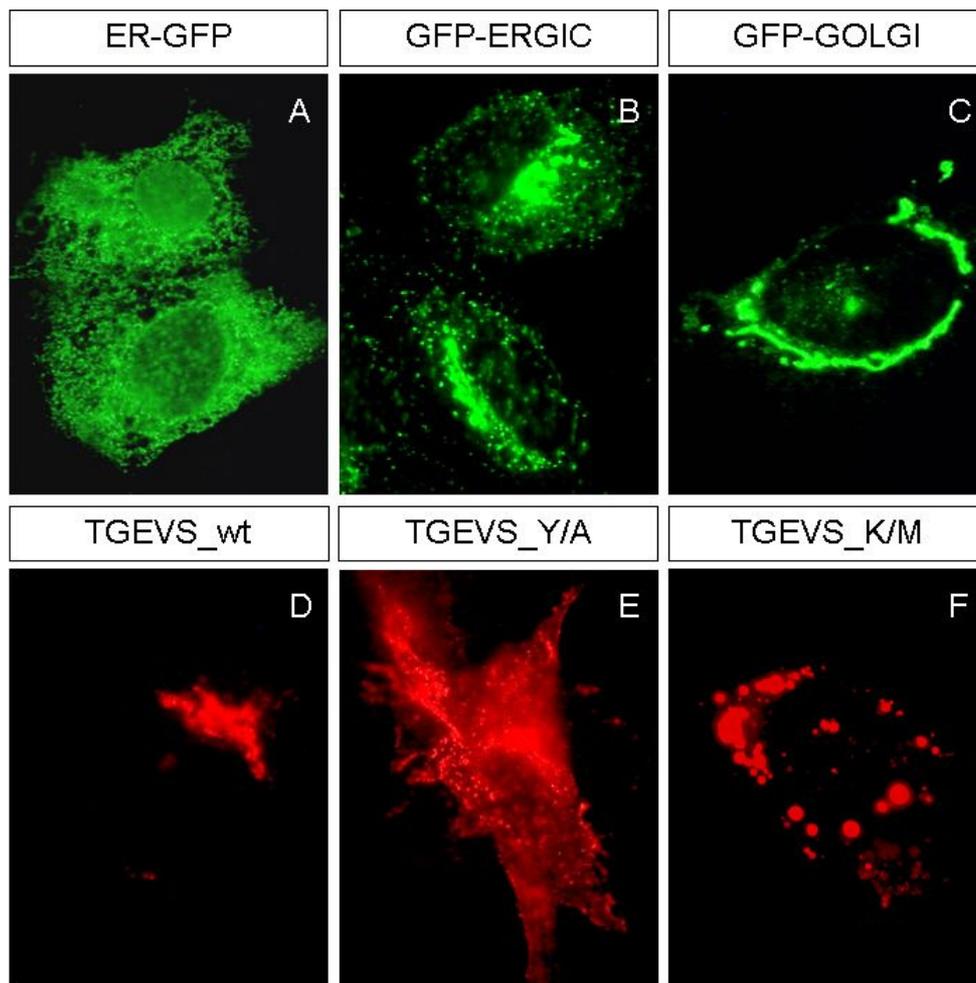
#### 5.1.11 Vergleich zwischen der BHK21-, der ST- und der IPI2I-Zelllinie

Die ersten Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit fanden mithilfe der *baby hamster kidney*- Zelllinie statt, die aus der Niere von Hamstern isoliert wurde. Diese Zelllinie ist in unserem Labor gut etabliert. Auf der Suche nach einer Zelllinie, die den *in vivo* Bedingungen näher steht, wurde zuerst die *swine testis*-(ST)-Zelllinie eingesetzt. Diese Zelllinie stammt aus den Schweinehoden und eignet sich außerdem für Infektionsversuche, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden. Die ST-Zellen lassen sich durch das Vor-

handensein des Rezeptors porcine Aminopeptidase N mit dem TGEV-Stamm PUR-46 MAD infizieren. Eine weitere Zelllinie, die von TGEV infiziert werden kann, stellen die so genannten IPI2I-Zellen dar. Die IPI2I sind epitheliale Zellen aus dem Ileum vom Wildschwein.

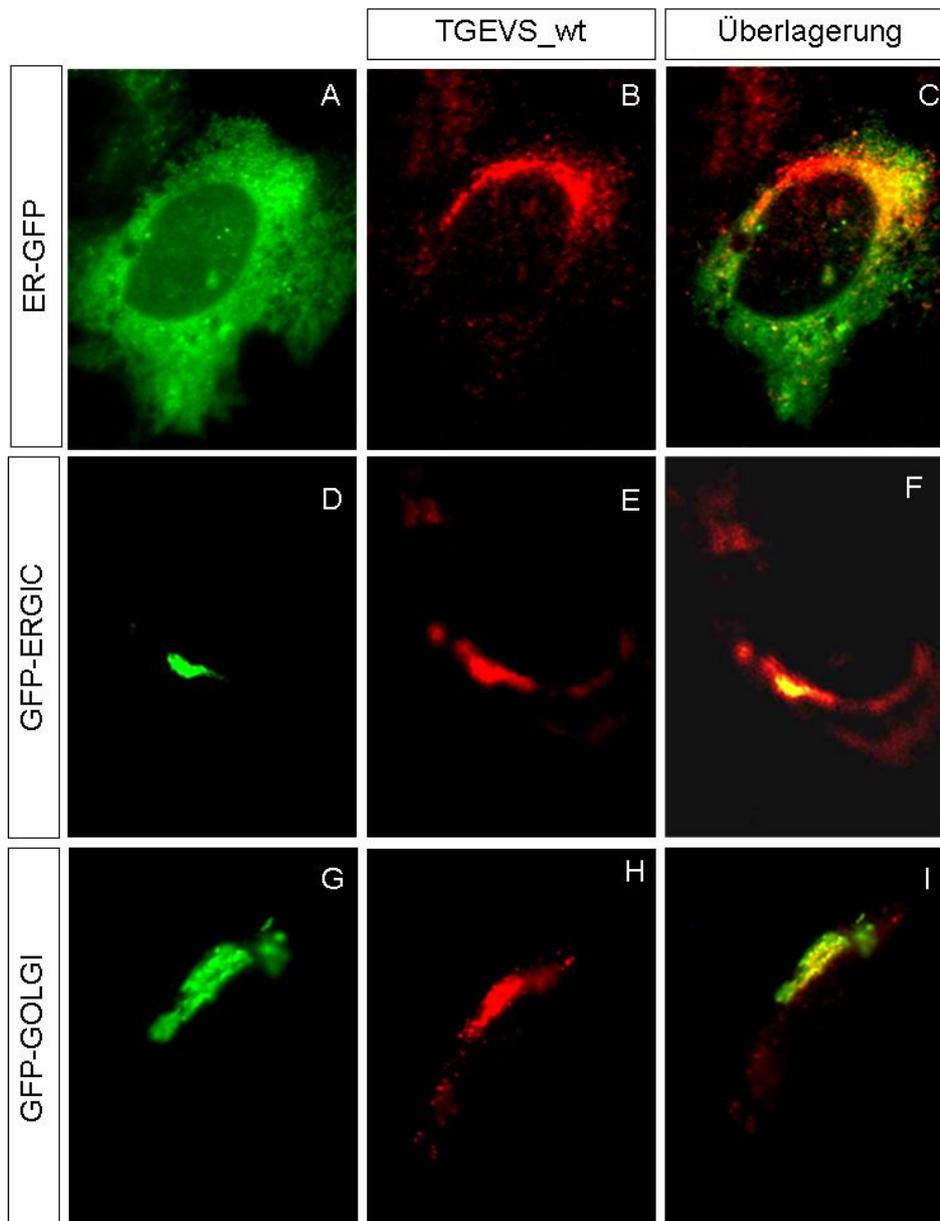
#### 5.1.11.1 Lokalisierung des TGEV S-Proteins in ST Zellen

Das Calretikulin lokalisierte auch in ST-Zellen netzartig im Zytoplasma während der ERGIC und der Golgi-Marker (Abbildung 33, A-C) die typischen subnukleären Strukturen in der Zelle veranschaulichten. Das Wildtyp S-Protein lokalisierte auch in dieser Zelllinie im ERGIC, die TGEVS\_Y/A Mutante zum Teil an der Oberfläche und die TGEVS\_K/M Mutante bildete vesikuläre Strukturen im Zytoplasma (Abbildung 33, D-F). Somit wies die ST-Zelllinie eine zu den BHK21-Zellen identische Lokalisierung der Konstrukte auf.



**Abbildung 33:** Konfokale Aufnahme der Einzelexpression der Kompartimentmarker (A-C), TGEVS\_wt (D), TGEVS\_Y/A und TGEVS\_K/M (F) in ST-Zellen.

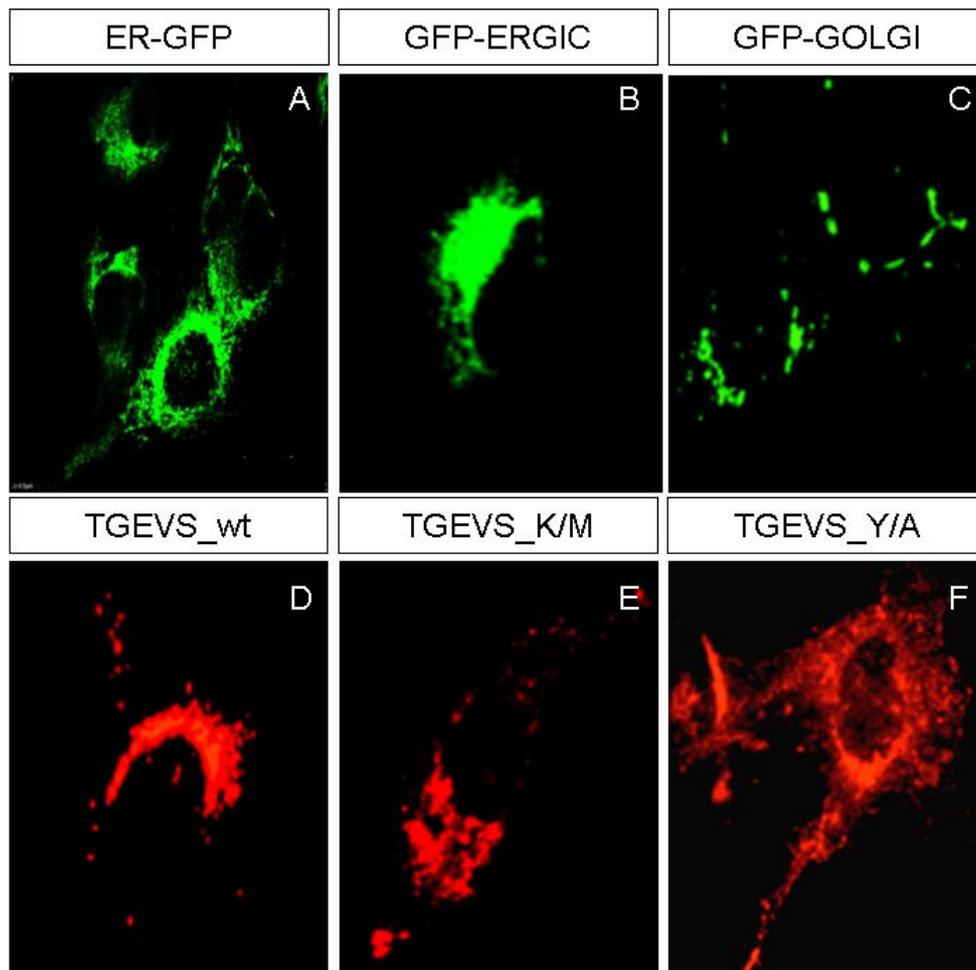
In einem weiteren Versuch wurde die Kolokalisierung des TGEV S-Proteins mit den Kompartimentmarkern in ST-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, wurde das TGEV S-Protein in Einzelexpression in der porzinen ST-Zelllinie in einer dichten subnukleären Linie lokalisiert. Die Kolokalisierungsexperimente mit den Kompartimentmarkern bestätigten die Ergebnisse, die mit den BHK21-Zellen hinsichtlich der zellulären Lokalisierung schon erlangt wurden. In Abbildung 34 D-F wird deutlich, dass das S-Protein eine hohe Kolokalisierung mit dem ERGIC-Marker aufwies, während eine geringe Kolokalisierung mit dem ER-Marker erlangt wurde (A-C). Eine Kolokalisierung mit dem Golgi-Marker war nur teilweise zu erkennen (G-I).



**Abbildung 34:** Konfokale Aufnahmen der Kolokalisierung zwischen dem TGEV S-Protein und den GFP markierten Kompartimentmarkern in ST-Zellen.

## 5.1.11.2 Lokalisierung des TGEV S-Proteins in IPI2I Zellen

Die Lokalisierung des TGEV S-Proteins und seiner Mutanten in IPI2I-Zellen zeigte eine identische Situation wie in BHK21- und in ST-Zellen. TGEVS\_wt zeigte eine ERGIC Lokalisierung (Abbildung 35, D). Die TGEVS\_K/M Mutante lokalisierte in Vesikeln im Zytoplasma der Zelle (Abbildung 35, E).

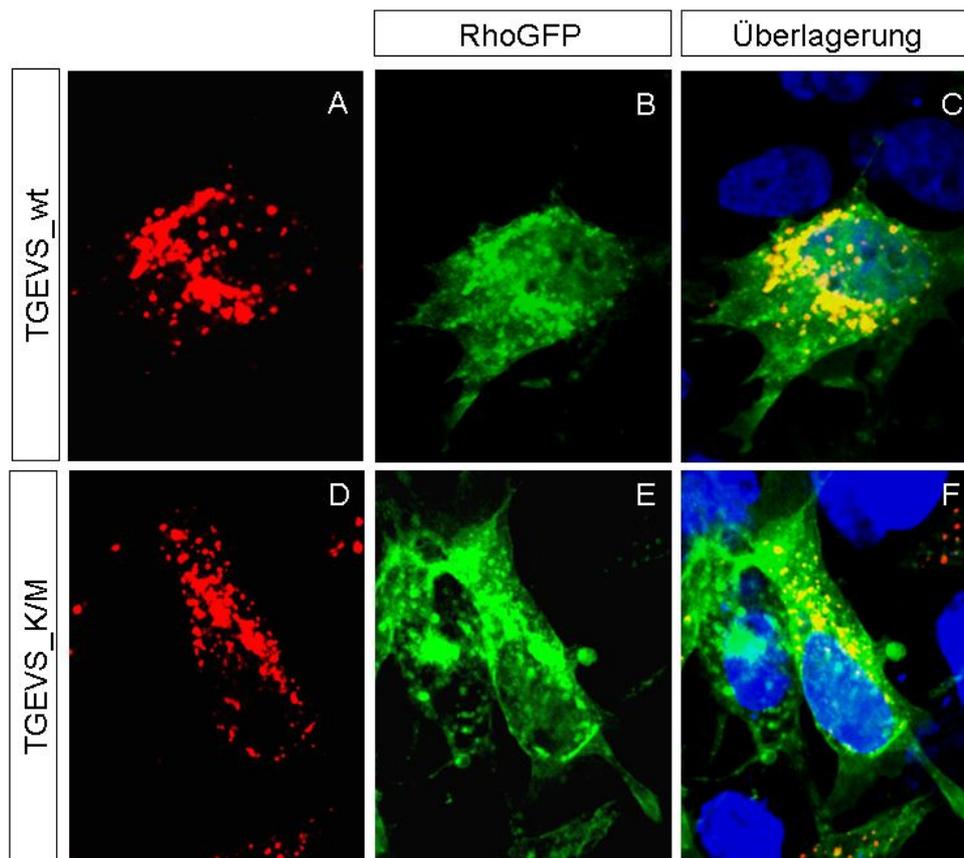


**Abbildung 35:** Konfokale Aufnahme der Einzelexpression von TGEVS\_wt (A), TGEVS\_K/M (B) und TGEVS\_Y/A (C) in IPI2I- Zellen.

Die TGEVS\_Y/A Mutante wies auch in dieser Zelllinie eine Oberflächenlokalisierung auf (Abbildung 35, F). Die Kompartimentmarker zeigten ebenfalls die für BHK21-Zelllinie beschriebene Lokalisierung (A-C).

### 5.1.12 Kolokalisierung zwischen dem TGEVS\_wt bzw. TGEVS\_K/M Mutante und dem Endozytose-Weg

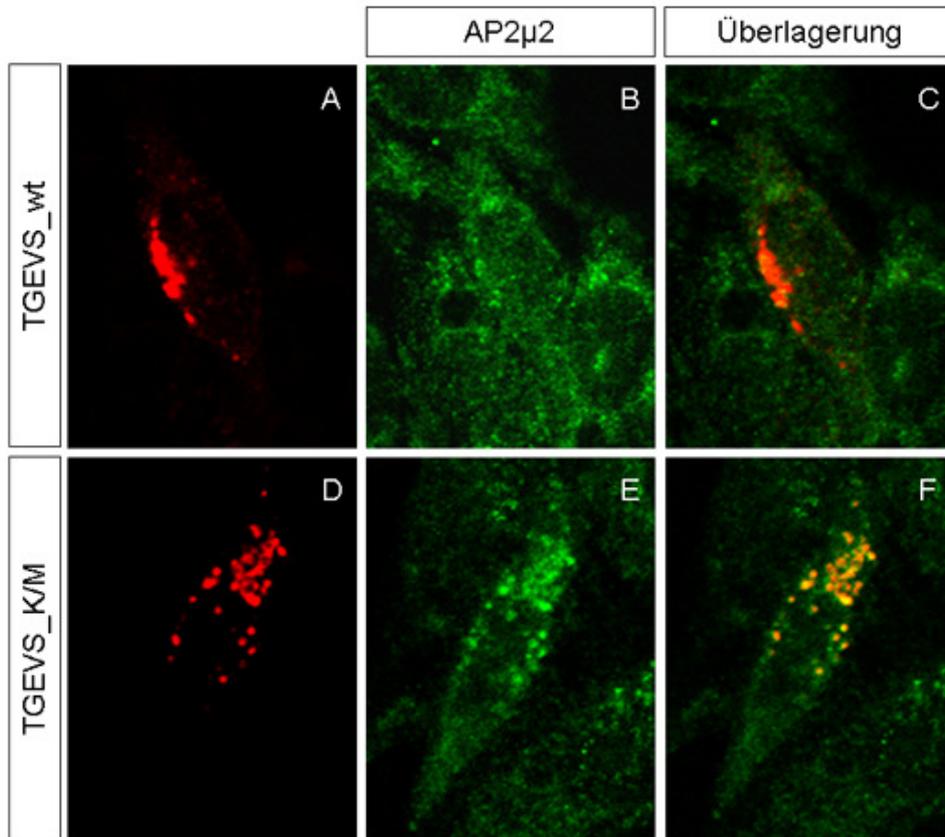
Die TGEVS\_K/M Mutante wies eine zytoplasmatisch vesikuläre Lokalisierung auf (Abbildung 32 B, 33 F und 35 E). Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Mutante erst an die Zelloberfläche wandert und dann von dort aus endozytiert wird, scheint hoch zu sein. Im so genannten „*antibody uptake assay*“ im Rahmen der Diplomarbeit von André Paul wurden erste Ergebnisse produziert, die diese Vermutung nahe legen. Mehrere Proteine wurden in den letzten Jahren identifiziert, die mit dem Endozytoseweg assoziiert vorliegen. Die *RhoGTPase* katalysiert den ersten Schritt der Endozytose, da sie die Internalisierung der Proteine vermittelt, die von der Membran endozytiert werden. Ein weiteres Mitglied dieses Weges stellt die  $\mu$ 2-Untereinheit des *Adaptor Proteins 2* (AP2) dar. Diese Untereinheit ist außerdem ein Erkennungssignal für Tyrosinmotive, (s. Kapitel 1.1.8). Das Tetraspanin Protein CD63 liegt assoziiert an spätendosomal Strukturen der Zelle vor und stellt gegenüber den anderen oben vorgestellten Markern einen Marker der späten Stadien der Endozytose dar.



**Abbildung 36:** Konfokale Aufnahme der Koexpression von TGEVS\_wt bzw TGEVS\_K/M (A und D) und dem endosomalen Marker RhoGFP (B und E) in BHK21-Zellen. Die Überlagerungen (C und F) zeigen die Kolokalisierungen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

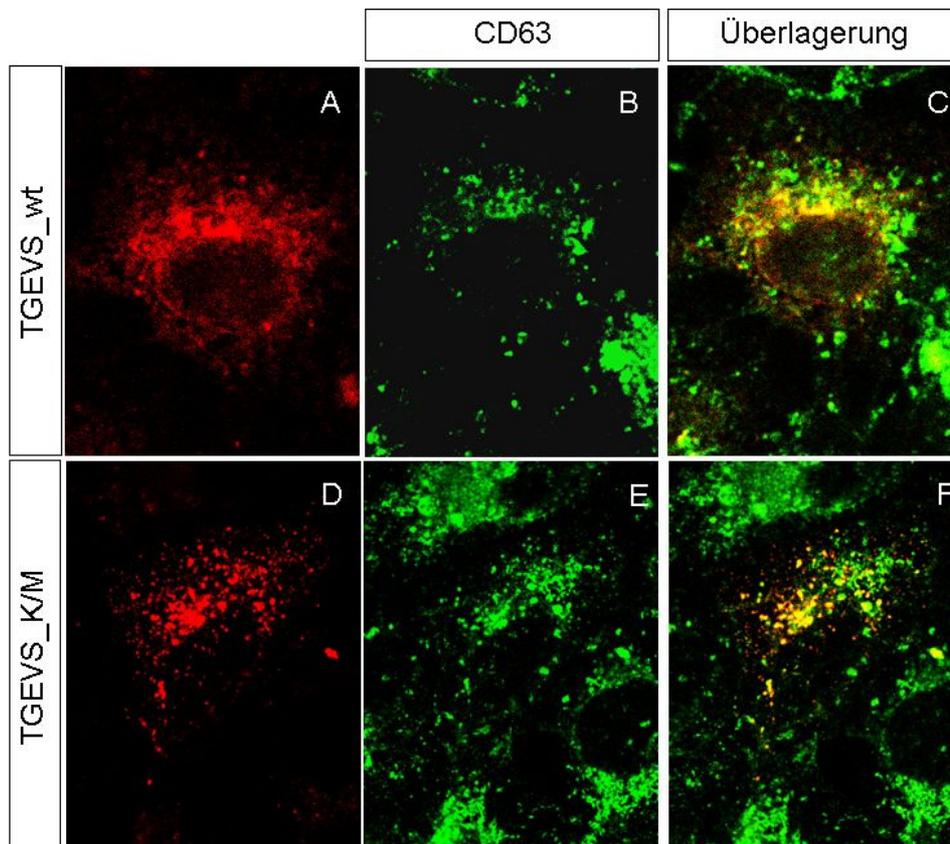
Nach einer Transfektion von TGEVS\_wt und TGEVS\_K/M in BHK21-Zellen in Kombination mit der GFP-gekoppelten RhoGTPase wurde das S-Protein mithilfe des 6A.C3-Antikörpers detektiert. Die konfokalen Bilder zeigten, dass sowohl der Wildtyp als auch die Mutante eine Kodetektion mit dem Endozytose-Marker aufwiesen (Abbildung 36, C und F).

Im Laufe der Studie über die Bestimmung der Endozytose-Fähigkeit von TGEVS\_K/M wurden Kolokalisierungsversuche mit der  $\mu 2$ -Untereinheit des AP2-Proteins gestartet, die als Marker der Endozytose diente.



**Abbildung 37:** Konfokale Aufnahme der Kodetektion von TGEVS\_wt sowie TGEVS\_K/M mit der  $\mu$ 2-Untereinheit vom AP2 in BHK21-Zellen.

Wie in Abbildung 37 zu erkennen ist, ergab die Kodetektion von TGEVS\_wt und dem AP2 $\mu$ 2 keine Kolokalisierung (Abbildung 37, A-C). Im Gegensatz dazu kolokalisierte die TGEVS\_K/M Mutante zu fast 100% mit dem AP2 $\mu$ 2 (D-F). AP2 $\mu$ 2 bildete bei der Koexpression mit TGEVS\_K/M vergleichbare vesikuläre Strukturen aus, die bei der Koexpression mit dem TGEVS\_wt nicht zu erkennen waren. Diese Ergebnisse wiesen auf eine Endozytose der TGEVS\_K/M Mutante hin.



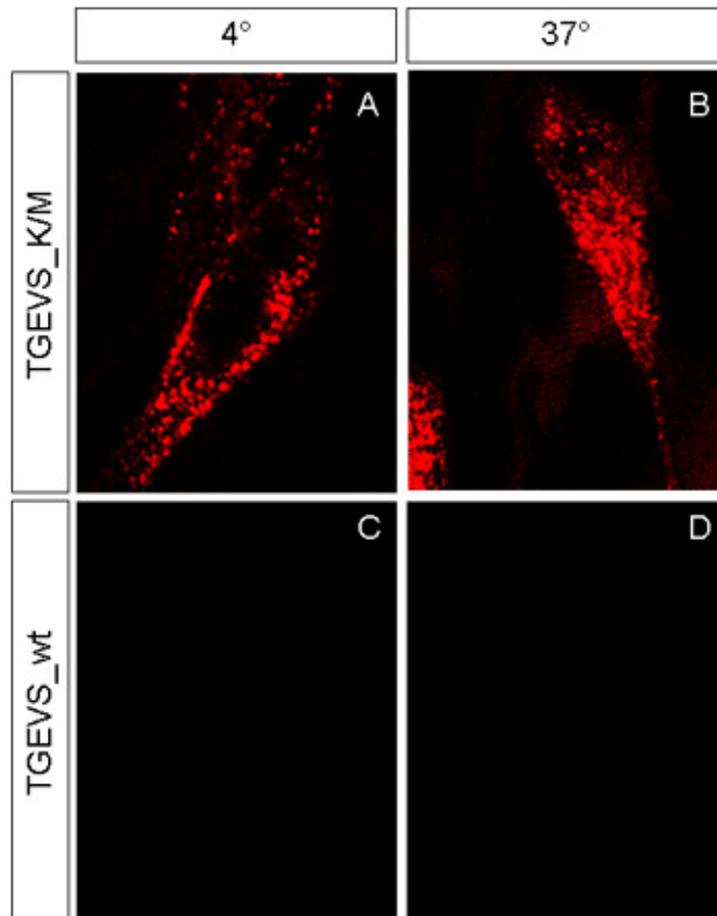
**Abbildung 38:** Konfokale Aufnahme der Kodetektion von TGEVS\_wt bzw. TGEVS\_K/M und dem spätendosomalen Marker CD63 in Vero-Zellen.

Ein Marker für die letzten Stadien der Endozytose stellt, wie oben erwähnt, das CD63-Protein dar. Bei einer Kolokalisierung des spätendosomalen Markers CD63 mit dem S-Protein konnte beobachtet werden, dass sowohl der Wildtyp als auch die K/M Mutante partiell in spätendosomalen Strukturen zu detektieren sind (Abbildung 38, C und F). Um eine genauere Aussage treffen zu können, ob die TGEVS\_K/M Mutante tatsächlich endozytiert wird, eignen sich Kolokalisierungsversuche, die unter Endozytosebedingungen stattfinden. Dies ist auch mit dem oben genannten *antibody uptake assay* möglich.

#### 5.1.13 Endozytose Test: *antibody uptake assay*

Durch den *antibody uptake assay* ist es möglich festzustellen, ob ein Protein endozytiert wird. In einem Doppelansatz wird ein Antikörper gegen das zu untersuchende Protein hinzugegeben. Ein Ansatz wird für 15 min bei 37°C gestellt, sodass Endozytose-Bedingungen herrschen, während der zweite

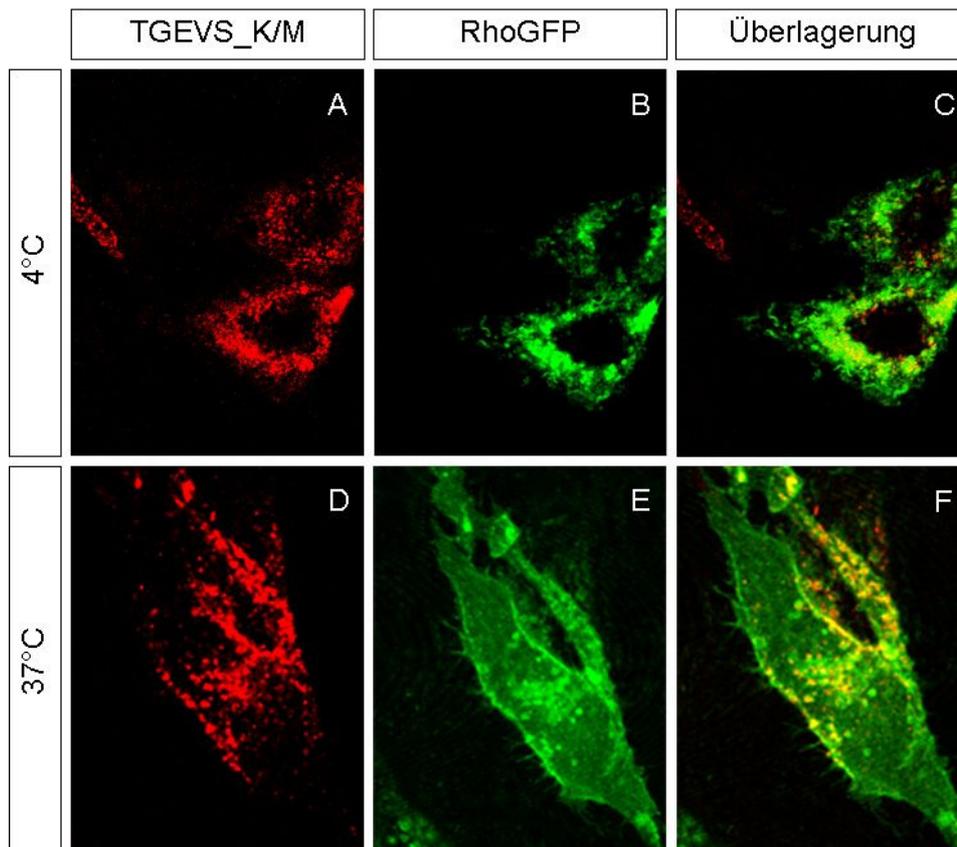
Ansatz auf 4°C als negative Kontrolle dient. Erst nach den jeweiligen Inkubationen wird der Zweitantikörper hinzupipettiert. Wenn eine Endozytose stattgefunden hat, wird dies mittels Fluoreszenz detektiert. Findet keine Endozytose statt, wird das Signal nur an der Zelloberfläche detektierbar sein (bei Oberflächenproteinen). Dieser Versuch wurde für die TGEVS\_K/M Mutante im Vergleich zum TGEVS\_wt durchgeführt.



**Abbildung 39:** Konfokale Aufnahmen von TGEVS\_wt bzw. TGEVS\_K/M jeweils vor (4°C) und nach Herstellung der Endozytosebedingungen (37°C) in Vero-Zellen.

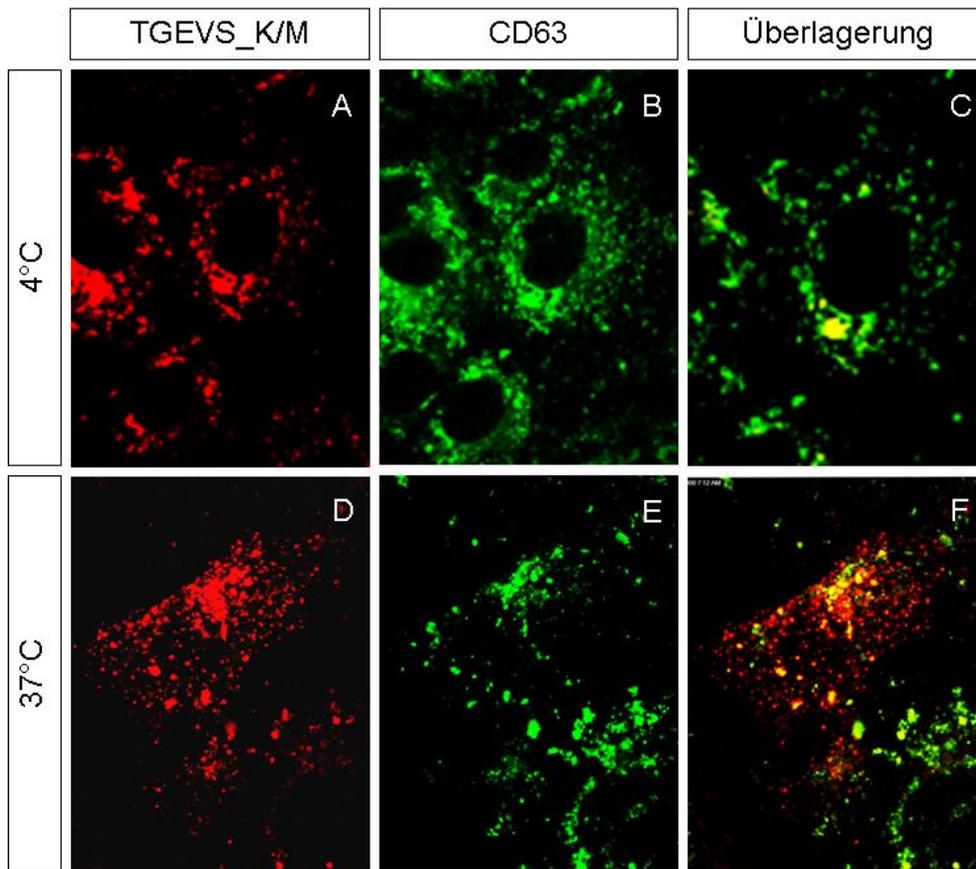
In Abbildung 39 wird deutlich, dass sich das TGEVS\_K/M-Protein bei 4°C an der Zelloberfläche befand (A), während das Wildtyp S-Protein nicht detektierbar war (C). Erst nach der Inkubation bei 37°C für 15 Minuten wurde das TGEVS\_K/M-Protein und somit der Antikörper ins Zellinnere endozytiert und ergab eine diffuse zytoplasmatische Lokalisierung (B). In beiden Fällen schien das Protein in Vesikeln angeordnet zu sein. Auch bei 37°C war das Wildtyp S-Protein nicht detektierbar, da es nicht endozytiert wurde.

Durch den *antibody uptake assay* sowie durch die Kolokalisierung von TGEVS\_K/M mit der  $\mu 2$  Untereinheit von AP2 konnte gezeigt werden, dass diese S-Proteinmutante mit dem Endozytoseweg interagiert. Die Endozytosemarker RhoGFP und CD63 wurden mit TGEVS\_K/M im *antibody uptake assay* untersucht. Hiermit sollte eine genauere Aussage getroffen werden, welche Stadien des Weges die TGEVS\_K/M Mutante durchläuft.



**Abbildung 40:** Konfokale Aufnahmen der Kodetektion von TGEVS\_K/M mit der RhoGTPase jeweils vor (A-C) und nach Herstellung der Endozytosebedingungen (D-F) in Vero-Zellen.

Unter Endozytosebedingungen konnte erkannt werden, dass TGEVS\_K/M mit dem frühendosomalen Marker RhoGTPase kodetektiert wurde. In Abbildung 40 D-F wird sichtbar, dass bei 37°C Vesikel intrazellulär lokalisiert waren und diese mit dem Endozytosemarker kolokalisierten. Bei 4°C (A-C) waren die Vesikel unter der Zellmembran angeordnet. Auch hier war eine Kodetektion erkennbar.

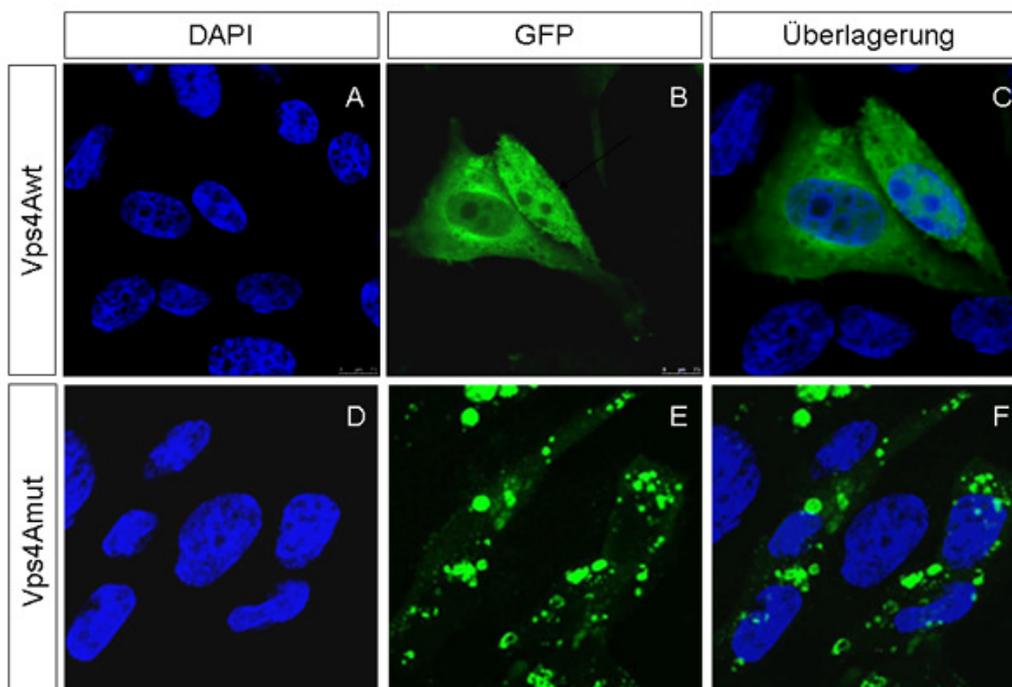


**Abbildung 41:** Konfokale Aufnahme der Kodetektion von TGEVS\_K/M mit dem Tetraspaninprotein CD63 jeweils vor (A-C) und nach Herstellung der Endozytosebedingungen (D-F) in Vero-Zellen.

Wie oben erwähnt ist das Tetraspanin CD63 ein Mitglied des Endozytoseweges und kommt assoziiert an spätendosomalen Strukturen vor. In Abbildung 41 kann erkannt werden, dass unter endozytotischen Bedingungen (37°C) eine klare Kolokalisierung der TGEVS\_K/M Mutante und dem CD63-Protein sichtbar wurde (D-F). Bei 4°C war eine partielle Kodetektion des grünen und des roten Kanals erkennbar (A-C). Außerdem zeigt diese Abbildung eine klare Vesikelbildung von TGEVS\_K/M und die Wanderung dieser Mutante ins Zellinnere unter Endozytosebedingungen (E) im Gegensatz zur Inkubation bei 4° (B).

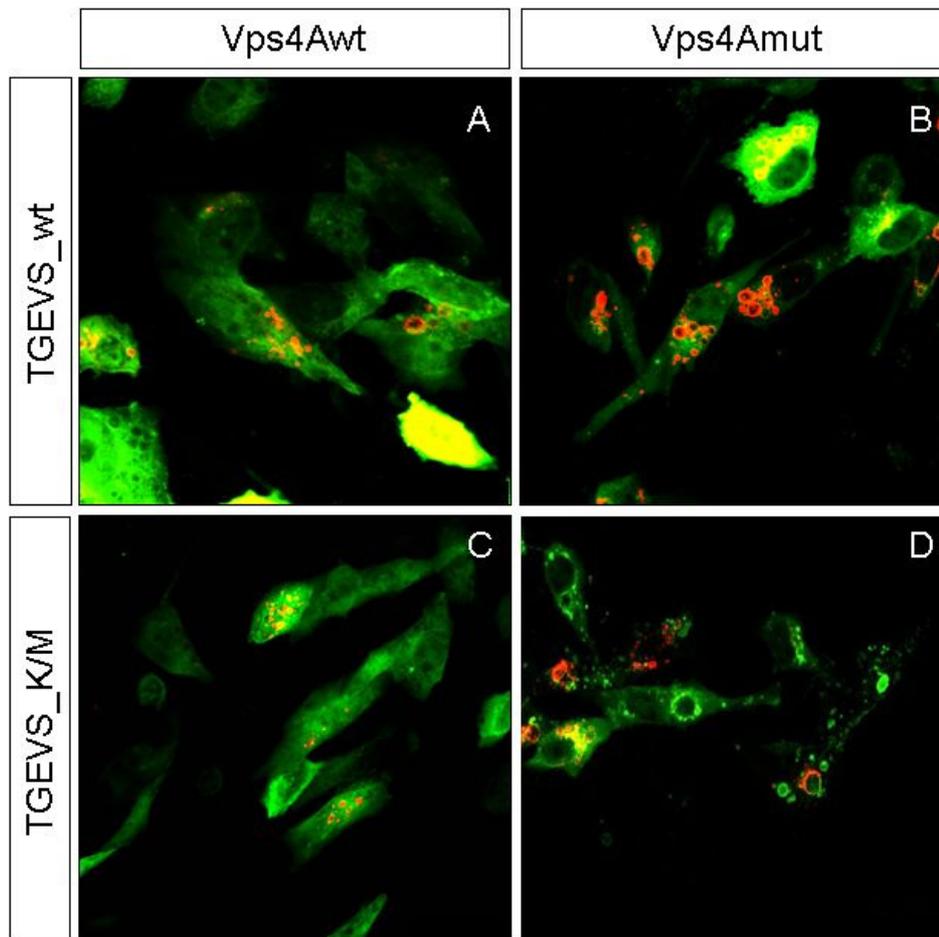
### 5.1.14 Kolokalisierung des TGEV-S-Proteins und Markern des ESCRT-Weges

Endosomen haben unter anderem die Fähigkeit Membranproteine aus ihrem Inneren in MVB-Vesikel (*multi vesicular bodies*) zu sortieren. Diese Membranproteine können dann entweder degradiert werden oder aber zu lysosomalen Funktionen oder exosomaler Abgabe durch die koordinierte Aktivität von mindestens drei hetero-oligomeren Komplexen bezeichnet als ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) Komplex I, II und III genutzt werden (Babst et al., 2002a und 2002b; Katzmann et al., 2001; Pelchen-Matthews et al., 2004; Slagsvold et al., 2006). Die Kolokalisierung der TGEVS\_K/M Mutante mit den Endozytosemarkern wie AP2 $\mu$ 2, CD63 und RhoGTPase warf die Frage auf, ob das S-Protein und im weiteren Sinne das TGE Virus mit der ESCRT-Maschinerie auch interagieren bzw. kolokalisieren.



**Abbildung 42:** Konfokale Aufnahme der Einzeldexpression von Vps4a\_GFP und Vps4Amut\_GFP in IPI2I-Zellen.

Zuerst wurde die Einzelexpression der Konstrukte Vps4aGFP-Wildtyp und Vps4aGFP Mutante untersucht. Das Wildtypprotein zeigte eine zytoplasmatische Detektion unter Ausschluss kleiner runder Körperchen innerhalb der Zelle (Abbildung 42, A-C). Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante abnormale Endosomen innerhalb der Zelle (Abbildung 42, D-F).



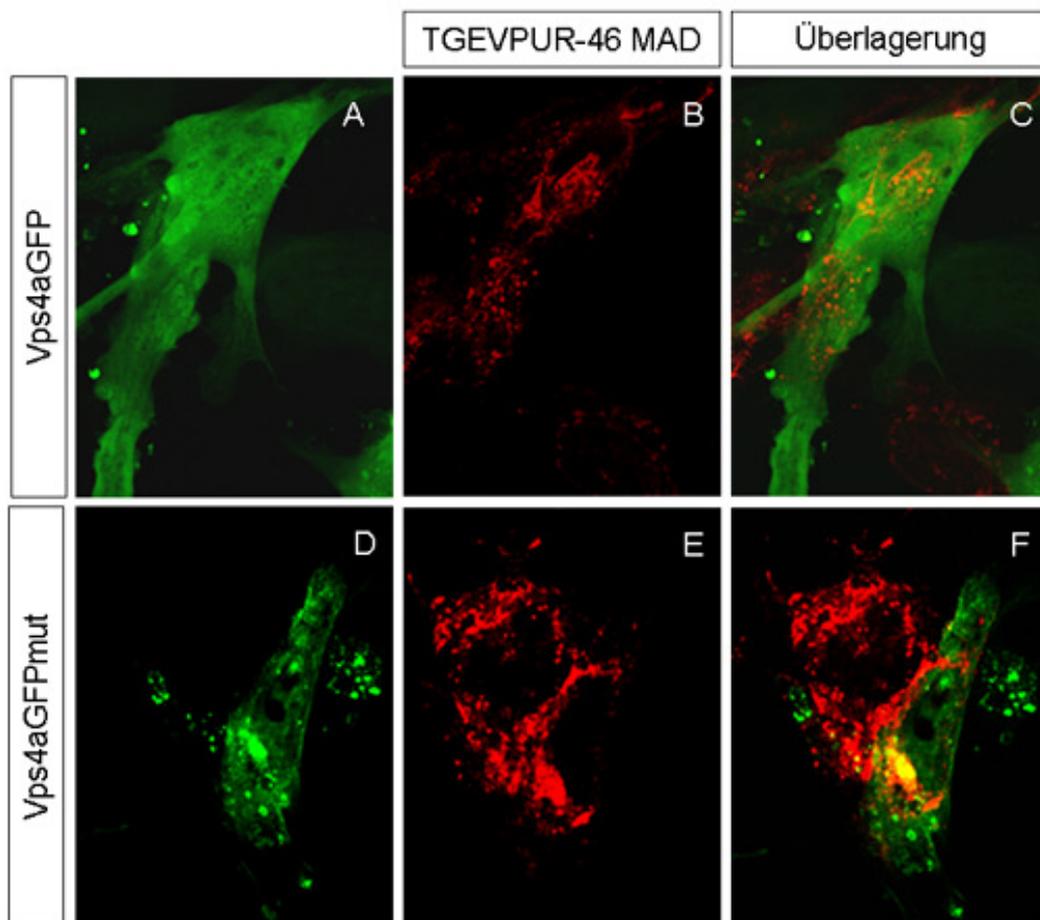
**Abbildung 43:** Konfokale Aufnahmen der Kodetektion von GFP markierten Vps4a-Konstrukten (Wildtyp (A, C) und Mutante (B, D)) und dem S-Protein (Wildtyp (A und B). Mutante (C und D)) in IPI2I-Zellen.

Abbildung 43 zeigt, dass die TGEVS\_K/M Mutante teilweise mit den Konstrukten Vps4aGFP Wildtyp (C) und Vps4aGFP Mutante (D) kodetektierbar war. Während die Vps4aGFP Mutante eine starke Kolokalisierung (gelbe Färbung) mit der TGEVS\_K/M mit den abnormalen Endosomen aufwies (Abbildung 43, D), zeigte der Vps4aGFP Wildtyp eine weniger ausgeprägte Kolokalisierung beider Konstrukte (Abbildung 43, C). Das Wildtyp S-Protein zeigt in Kotransfektion mit dem Vps4A eine vesikuläre Lokalisierung, die von

der erwarteten ERGIC-Lokalisierung abwich. Außerdem schien es keine Kolo-  
kalisierung mit diesem ESCRT-Marker zu ergeben (A-B).

#### 5.1.15 Transfektions- und Infektionsversuche

Um weitere Hinweise über eine mögliche Interaktion des TGEV mit der  
ESCRT-Maschinerie zu erlangen, wurden die IPI2I-Zellen nach der Transfek-  
tion der Vps4a Konstrukte mit dem TGE Virus infiziert. In Abbildung 44 kann  
beobachtet werden, dass das detektierte S-Protein von TGEV (B und E) nicht  
mit dem Vps4aGFP (A) kolokalisierte (C), jedoch eine klare partielle Kolo-  
kalisierung mit der Vps4a Mutante aufwies (F). Die Kolokalisierung zeigte, dass  
das S-Protein mit den abnormalen Endosomen kodetierbar war jedoch nicht  
mit dem ESCRT-Marker Vps4aGFP.



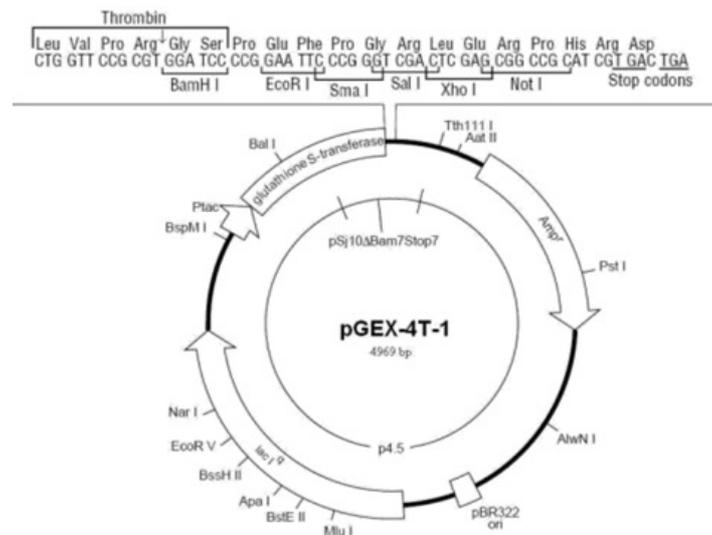
**Abbildung 44:** Konfokale Aufnahmen der Kodetektion von TGEV-S Protein nach der TGEV-Infektion mit Vps4aGFP (A-C) bzw. Vps4aGFPmut (D-F) in IPI2I-Zellen.

## 5.2 Suche nach dem Interaktionspartner des TGEV S-Proteins

Das S-Protein wird im ERGIC zurückgehalten. In diesem Kompartiment findet auch die Virusknospung von TGEV statt. Die Lokalisierungsstudien mit Hilfe der S-Proteinmutanten zeigen, dass der Austausch von Tyrosin zu Alanin im zytoplasmatischen Abschnitt die Wanderung des S-Proteins zur Zelloberfläche verursacht. Dies führt zur Vermutung, dass das Tyrosin über die Retention des Proteins im ERGIC bestimmt. Dieses so genannte „Tyrosinmotiv“ ist bekannt dafür, dass es mit unterschiedlichen Signalen von anderen Proteinen interagiert (s. Kapitel 1.1.8). Ein Ziel dieser Doktorarbeit ist gewesen, einen oder mehrere Interaktionspartner hinsichtlich dieses Tyrosinmotivs zu suchen, der/die für die Retention des S-Proteins im ERGIC verantwortlich ist/sind. Das ERGIC weist als eigene Organelle eine Reihe von assoziierten Proteinen auf. Die Hypothese ist, dass ein im ERGIC liegendes Protein oder ein Teil dieses Proteins, mit dem Tyrosin interagiert und damit das ganze S-Protein an diesem Kompartiment zurückhält. Die Suche nach Interaktionspartnern von einer Reihe von Proteinen in verschiedene Studien führte dazu, dass verschiedene Methoden der Molekularbiologie entwickelt wurden, um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen.

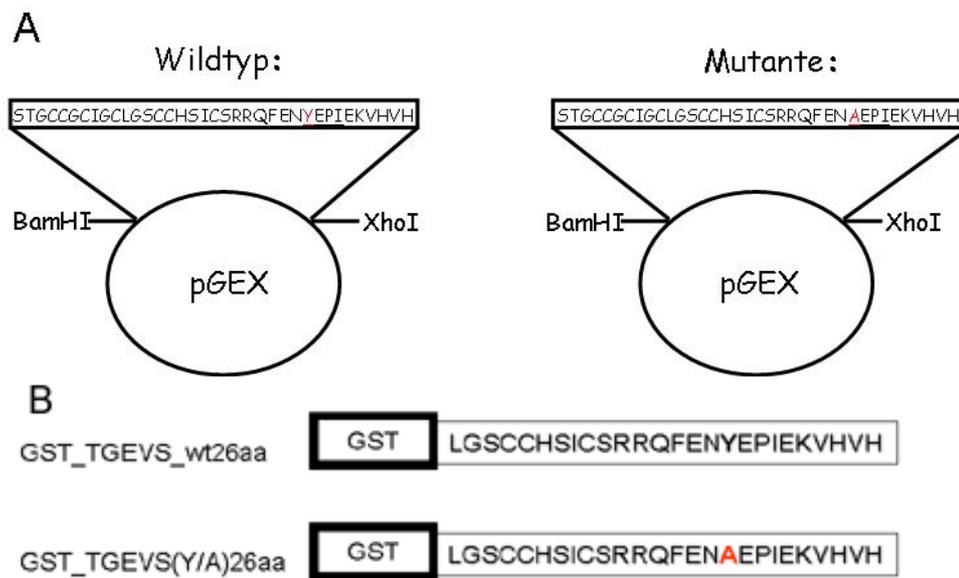
### 5.2.1 GST pulldown assay

Eine Methode, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde, ist der so genannte „GST pulldown assay“. Hierfür wurden die letzten 26 Aminosäuren des zytoplasmatischen Abschnitt des Proteins in den Multiklonierungsabschnitt des pGEX-Vektors inseriert. Der zu untersuchende Proteinabschnitt kann in diesem Vektor durch den pBR322ori Promotor von Bakterien exprimiert werden. Dieser Vektor (Abbildung 45) enthält die Sequenz zur Expression der Glutathiontransferase, die nach der Klonierung an dem zu untersuchenden Protein fusioniert vorliegt. Weiterhin weist der Vektor eine Induktionsstelle auf, die es ermöglicht die Überexpression des Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG zu starten.



**Abbildung 45:** Plasmidkarte vom pGEX-4T-1 Vektor als Beispiel für GST-Vektoren.

Die Expression des Fusionsproteins mit der Glutathiontransferase ermöglicht die Aufreinigung des zu untersuchenden Proteins samt seiner Interaktionspartner. Dafür werden so genannte *GST-beads* eingesetzt um die Komplexe aus den Bakterienlysaten gezielt zu isolieren. Die gleichzeitige Bearbeitung von GST-TGEVS<sub>wt</sub> und der GST-TGEVS<sub>Y/A</sub> Mutante ergab die Möglichkeit, einen direkten Vergleich zu erstellen. So konnte festgestellt werden, ob ein potentieller Interaktionskandidat nur durch den Wildtyp und nicht durch die Mutante isoliert wird. Dies würde bedeuten, dass das Tyrosin für die Erkennung des Interaktionspartners unentbehrlich ist. In Abbildung 49 ist eine schematische Darstellung der GST-Fusionsproteine dargestellt.

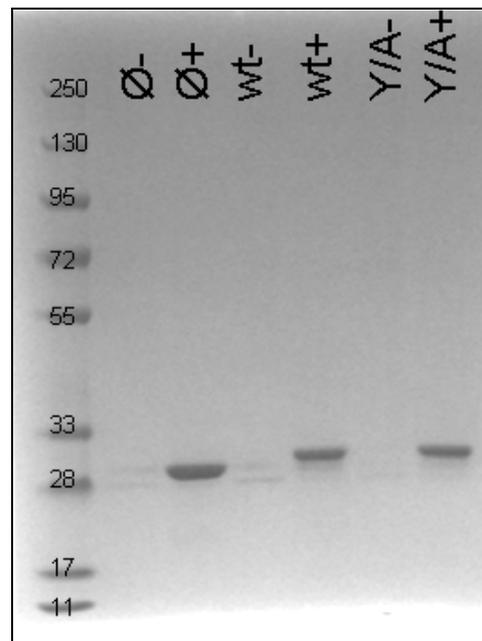


**Abbildung 46:** Schematische Darstellung der Fusion der letzten 26 Aminosäuren der S-Proteine und dem GST Vektor (A). Fusionsprodukt des GST-Proteins mit den C-terminalen 26aa des TGEV S-Proteins (B).

Wie in Abbildung 46 A gezeigt, wurde das S-Protein Gen durch die *BamHI* *XhoI* Restriktionsstellen in den GST-Vektor hineinkloniert. Die Expression in BL21-Bakterien ergab ein Fusionsprotein, das C-terminal des GST-Produkts entweder die letzten 26aa vom Wildtyp S oder von der Y/A Mutante enthielt, wie in Abbildung 46 B zu sehen ist.

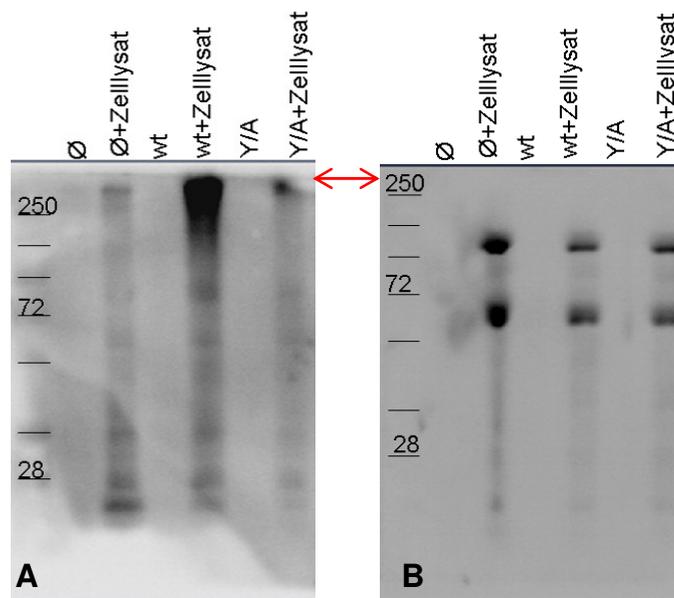
Nach der Aufreinigung des Fusionsproteins mithilfe von GST-*beads* aus den Bakterienlysaten, wurde ein eukaryotisches Zelllysate zugegeben. Wurde ein Interaktionspartner aus diesem Lysat isoliert, so konnte dies durch eine *Coomassie* Färbung visualisiert werden. Dies konnte ebenfalls mit einem gegen GST gerichteten Antikörper im Western Blot detektiert werden.

In einem ersten Schritt wurde festgestellt, ob die Bakterien das Fusionsprotein exprimierten. Dieser Ansatz fand in einem geringen Volumen (2 ml Bakteriensuspension) statt.



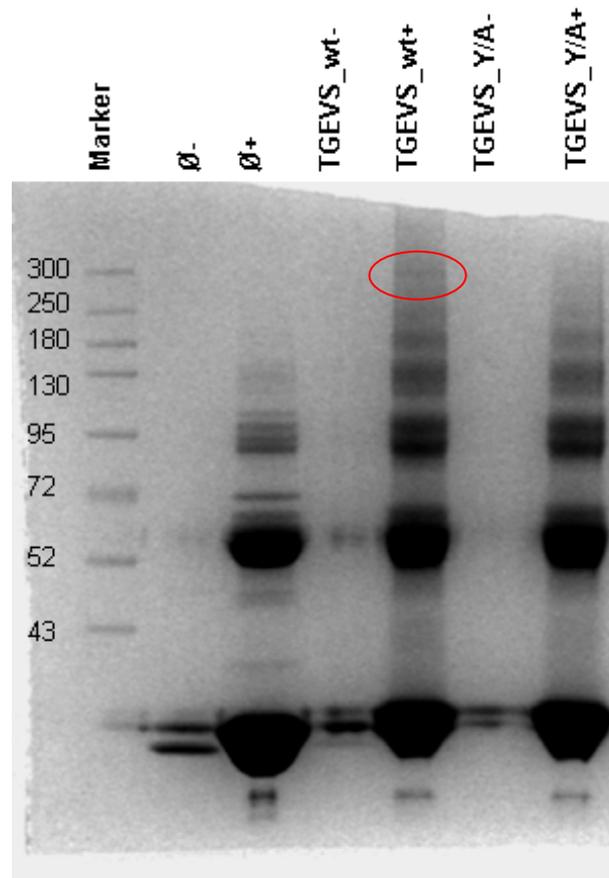
**Abbildung 47:** Coomassie-Gel nach der Aufreinigung von BL21 Bakterien. Ø ist der leere pGEX Vektor. Nicht mit IPTG induzierte Proben wurden mit einem Minuszeichen, induzierte Proben mit einem Pluszeichen versehen.

Wie in Abbildung 47 gezeigt, wurden die Fusionsproteine nach Zugabe von IPTG (+) exprimiert. Der S-Proteinabschnitt, der an das GST fusioniert wurde, war 26 Aminosäuren lang und wies eine Größe von ungefähr 2 kDa auf. Aus diesem Grund wanderten diese Konstrukte (wt und Y/A) langsamer als der leere Vektor, der ein Molekulargewicht von 28 kDa hatte. Die Detektion mit einem GST-Antikörper wies folgendes Bild im Western Blot auf:



**Abbildung 48:** (A) Western Blot mit einem gegen GST gerichteten Primärantikörper und darauffolgende Inkubation mit einem anti Maus Biotin Antikörper und dem Peroxidase gekoppelten Streptavidin. (B) Negativkontrolle, die nur mit anti Maus Biotin und Peroxidase gekoppeltem Streptavidin inkubiert wurde.

Die Ergebnissen in Abbildung 48 A zeigten, dass der TGEVS\_wt ein starkes Signal oberhalb der 250 kDa Bande aufwies, das in dieser Form weder im leeren Vektor noch in der Y/A-Mutantenspur noch in der Negativkontrolle (Abbildung 48, B nur Zweitantikörper) zu sehen war. Dieses Signal könnte ein potentieller Kandidat bei der Suche nach dem Interaktionspartner sein. In einer der Wiederholungen des GST-Protokolls erschien im *Coomassie*-Gel eine Bande um die 300 kDa Höhe, welche ausgeschnitten und zur Massenspektrometrie eingeschickt wurde (Abbildung 49, rot markierte Bande). Für diesen Ansatz wurden nach der Aufreinigung des Fusionsproteins in Bakterien IPI2I-Zelllysate zugegeben. Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde gemessen und so verdünnt, dass die Proteinmenge in allen Proben identisch eingestellt war. Die Bande ist auch in diesem Fall nur in der Wildtyp Spur zu erkennen und weder in dem leeren Vektor ( $\emptyset$ ) noch in der Y/A Mutante zu sehen. Eine weitere Negativkontrolle wurde erlangt, indem die gereinigten Fusionsproteine ohne die Zugabe des IPI2I-Zelllysates auf das Gel mit aufgetragen wurden. Die 300 kDa Bande war in diesen Spuren ebenfalls nicht sichtbar.



**Abbildung 49:** *Coomassie*-Gel der Bakterienlysate. Die Bakterienlysate enthielten das gereinigte Fusionsprotein, das durch die Inkubation mit einem IPI2I-Zelllysat (+) an potentielle Interaktionspartner band.

Dieses Gel wurde zur Massenspektrometrie an das Institut für Toxikologie der Medizinischen Hochschule Hannover, AG von Prof. Dr. rer.nat. Andreas Pich abgegeben. Als Negativkontrolle wurden Proben in der Höhe der zu untersuchenden Bande entnommen in der Spur des leeren Vektors, der Y/A-Mutante sowie einer leeren Tasche. BSA-Proben wurden zur Analyse auch als Negativkontrollen mitgeführt. Die Proteine Glutathiontransferase und Trypsin wurden in allen Gelproben gefunden (Tabelle 20). Das Protein Filamin A scheint zusätzlich nur durch den TGEVS\_wt ausgefischt worden zu sein, jedoch weder mit dem leeren Vektor noch mit der Y/A Mutante.

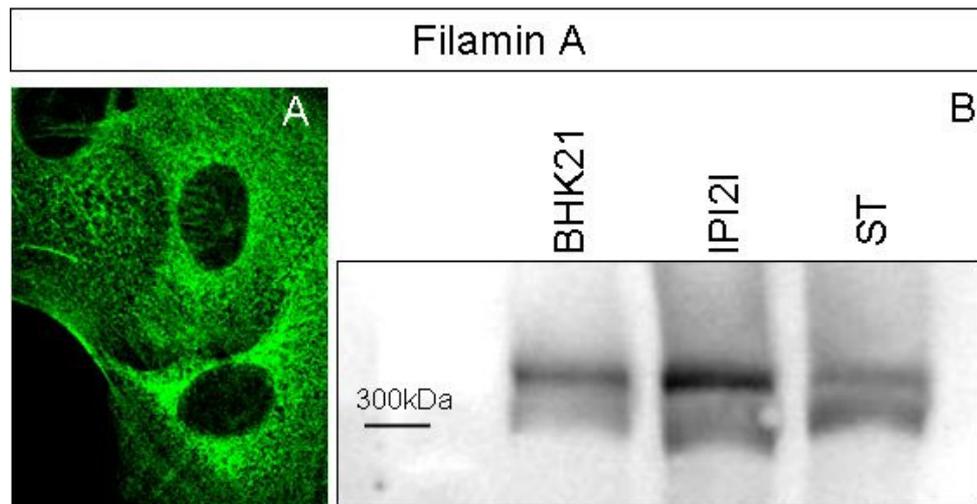
**Tabelle 20:** Resultate der Massenspektrometrie. Probe 1: leerer Vektor, pGEX. Probe 2: Wildtyp S-Protein an GST gekoppelt. Probe 3: mutiertes S-Protein an GST gekoppelt. Probe 4: Gelstück ohne Ladung (Negativkontrolle). Eine BSA Probe wurde ebenfalls als Negativkontrolle eingesetzt. (Im Anhang Originalkopie der MHH).

Probe	Zugangsnummer	Proteinname	kDa	score
pGEX	K2C1_Human	Typ II Keratin	65999	105
	K1C9_Human	Typ I Keratin	65027	69
TGEVS_wt	TRYP_Pig	Trypsin	24394	128
	GST2 6_SchJa	GST	25482	65
	FLNA_Human	Filamin A	280564	63
TGEVS_Y/A	TRYP_Pig	Trypsin	24394	148
	GST2 6_SchJa	GST	25482	48
Gel	TRYP_Pig	Trypsin	24394	145
BSA	K22E_Human	Typ II Keratin	65393	629
	K1C10_Human	Typ I Keratin	58792	300
	ALBU_Bovin	Serumalbumin	69248	245
	K2C1_Human	Typ II Keratin	65999	130
	ALBU_Bovin	Serumalbumin	69248	449
	TRYP_Pig	Trypsin	24394	182

### 5.3 Validierung der Interaktion zwischen Filamin A und dem S-Protein

#### 5.3.1 Immunfluoreszenzanalyse und Detektion von Filamin A in Zelllysaten

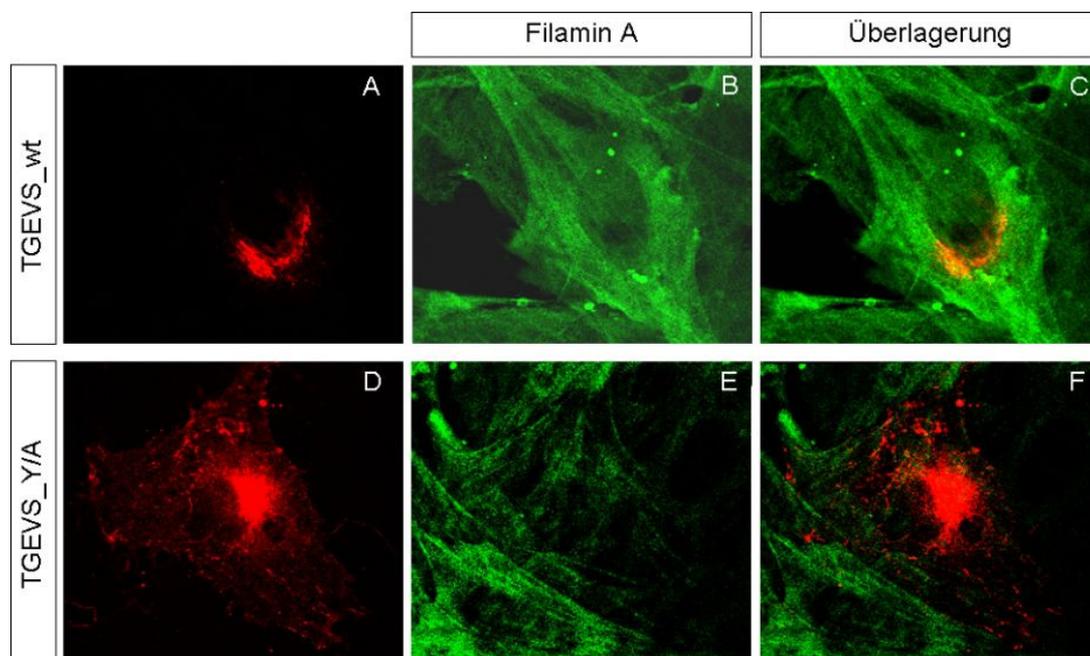
Das Resultat der Massenspektrometrie führte dazu, dass Filamin A als potentieller Kandidat für die Interaktion mit dem S-Protein in Betracht gezogen wurde. Zuerst wurde die Lokalisierung und Expression dieses Proteins mithilfe eines monoklonalen Antikörpers getestet. In Abbildung 52 kann gesehen werden, dass Filamin A am konfokalen Mikroskop ein Netzwerk im gesamten Zytoplasma aufwies. In manchen Ebenen konnte Filamin A jedoch auch Fasern zeigen, die entweder zytoplasmatisch oder unmittelbar unter der Zelloberfläche (Abbildung 52, A) vorkamen. In einem Western Blot zeigte der Antikörper gegen Filamin A, dass das Protein in BHK21-, in IPI2I- sowie in ST-Zelllysaten als ungefähre 300 kDa Bande zu detektieren war (Abbildung 52, B).



**Abbildung 50:** Konfokale Aufnahmen (A) und Immundetektion (B) von Filamin A mit Hilfe von anti Kaninchen Filamin A-Antikörper in Zelllysaten.

### 5.3.2 Kolokalisierung zwischen Filamin A und dem TGEV S-Protein

Nachdem die massenspektrometrische Analyse ergab, dass TGEVS-wt mit dem Filamin A interagiert hatte, jedoch die Substitution von Tyrosin zu Alanin diese Interaktion mit der TGEVS\_Y/A Mutante eliminierte, wurde mithilfe der IFA die Kolokalisierung der viralen Proteine mit Filamin A untersucht.

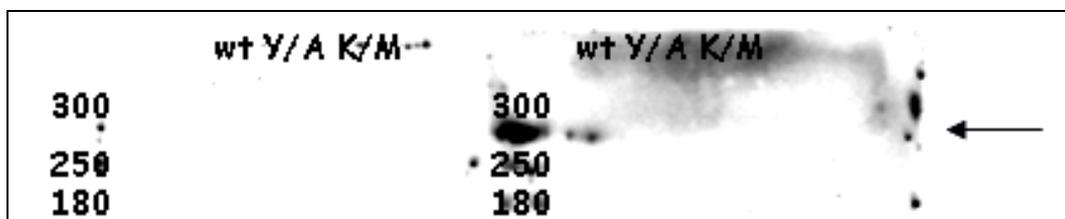


**Abbildung 51:** Konfokale Aufnahmen der Kodetektion von Filamin A und dem TGEVS\_wt (A-C) bzw. TGEVS\_Y/A (D-F).

Die Aufnahmen in Abbildung 53 veranschaulichten die Kollokalisierungsstudien zwischen dem S-Protein und dem Filamin A. Im Falle des Wildtyp S-Proteins konnte eine partielle Kollokalisierung der beiden Proteine gesehen werden. Wenn die Y/A Mutante transfiziert wurde und mit einem Antikörper gegen Filamin A intrazelluläres Filamin A detektiert wurde, konnte keine Kollokalisierung mehr am konfokalen Mikroskop gesehen werden.

### 5.3.3 Koimmunpräzitationsversuche

Koimmunpräzitationen stellen einen deutlichen Beweis für Interaktionen zwischen zwei Proteinen dar. Dabei wurden IPI2I-Zellen mit dem S-Protein transfiziert, und zwar mit dem Wildtyp, mit der Y/A Mutante und der K/M Mutante. Nach der Lyse wurde die Zellsuspension auf eine Protein A-Sepharose Säule gegeben, an die der Filamin A-Antikörper gebunden war. Wenn Filamin A und die überexprimierten S-Protein-Konstrukte interagieren würden, so könnten diese an die Säule binden. Nach mehreren Waschschrritten wurden die *beads* gekocht, sodass nach einer Zentrifugation der Überstand gewonnen werden konnte. In diesem Überstand befand sich das Filamin A, sowie alle Proteine, die daran gebunden hatten. Unser Ziel war es, beweisen zu können, dass das S-Protein mit dem Filamin A interagiert hatte und dadurch mit dem gegen Filamin A gerichteten Antikörper ausgefischt wurde. Um das S-Protein zu visualisieren, wurde der 6A.C3 anti S-Antikörper im darauffolgenden Western Blot eingesetzt.



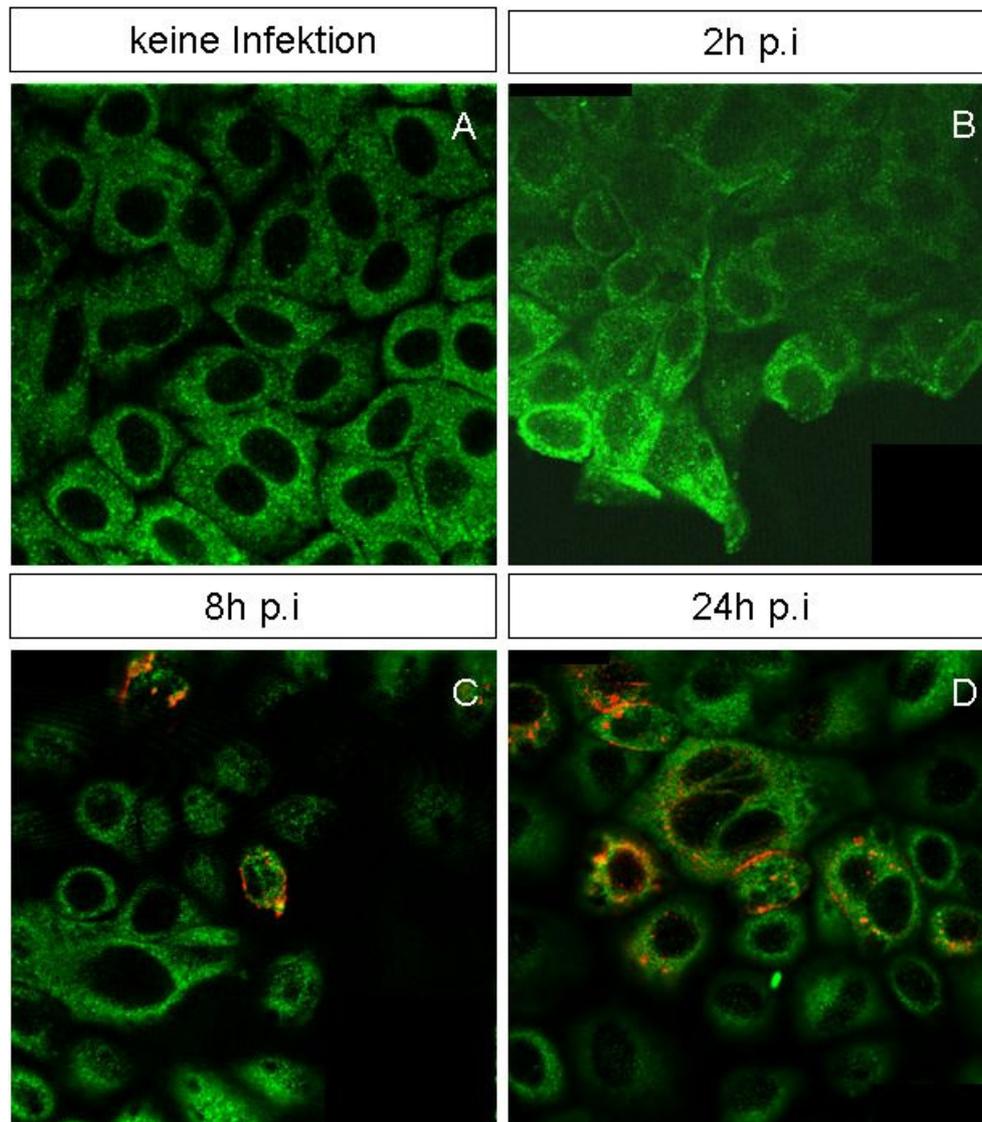
**Abbildung 52:** Western Blot einer Koimmunpräzitation von Filamin-A mit dem TGEV S-Protein. Links die Negativkontrolle mit dem Sekundärantikörper (anti Maus Peroxidase). Rechts das S-Protein konnte im Western Blot in eine Höhe um die 300 kDa visualisiert werden.

In Abbildung 52 kann man sehen, dass der anti S-Antikörper eine Bande in der TGEVS\_wt Spur detektiert. Diese Bande ist in der TGEVS\_Y/A (sowie K/M Spur) nicht detektierbar. Das Ergebnis deutet daraufhin, dass Filamin A und das TGEV S-Protein interagierten, während bei der Y/A Mutante diese Interaktion nicht nachweisbar war. Das TGEV S-Protein weist ein Molekulargewicht von 220 kDa auf. In diesem Blot liegt das Molekulargewicht zwischen 250 und 300 kDa. Diese Unterschiede in der molekularen Masse bezogen auf den Marker lassen sich durch die Verwendung eines Gradientengels in diesem Versuch erklären. Wurde der anti S-Antikörper in der Immunpräzipitation eingesetzt und der Filamin A-Antikörper im Western Blot, so konnten keine Banden detektiert werden.

## 5.4 Infektion der ST-Zellen und Detektion von Filamin A

### 5.4.1 Kolokalisierung von Filamin A und dem S-Protein nach einer Infektion

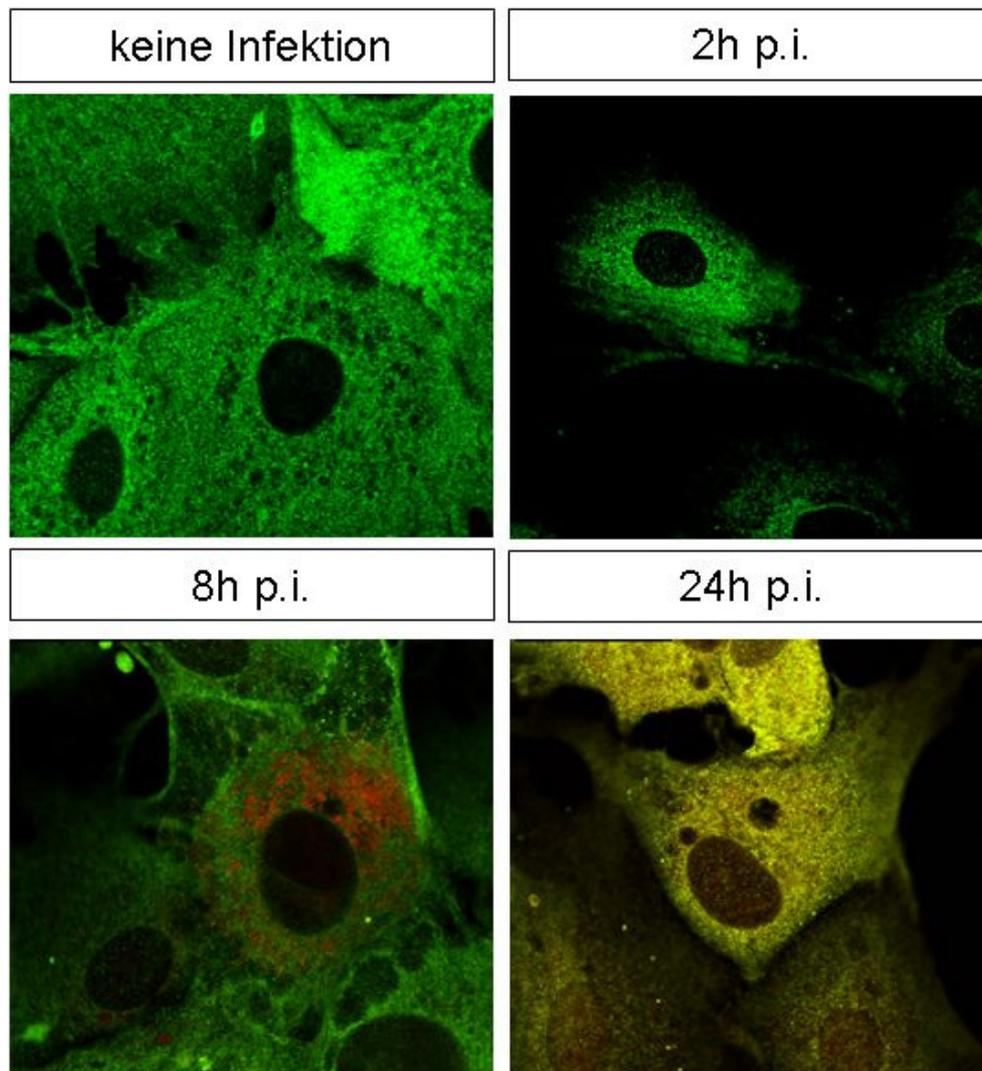
ST-Zellen wurden mit dem TGEV-Stamm PUR-46 MAD infiziert und mit einem gegen Filamin A gerichteten Antikörper gefärbt. So sollte untersucht werden, ob die Viruspartikel mit dem Filamin A eine Kolokalisierung aufweisen. Die Infektion wurde mithilfe des gegen das S-Protein gerichteten Antikörpers zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion visualisiert.



**Abbildung 53:** Konfokale Aufnahme der TGEV PUR 46 MAD-Infektion (Antikörper gegen das S-Protein, rot) und Filamin A Detektion (Antikörper gegen Filamin, grün) in ST-Zellen 2 (B), 8 (C) und 24 (D) Stunden nach der Infektion (p.i.). Eine Filamin A Detektion unter nicht infizierten Bedingungen wird in A gezeigt.

In Abbildung 53 wird deutlich, dass das Virus bzw. das S-Protein des Virus eine partielle Kolokalisierung mit dem Filamin A innerhalb der Zelle aufwies (C und D). Außerdem zeigt die Abbildung, dass die Infektion nach 24 Stunden am stärksten war und dass bei diesem Zeitpunkt auch Synzytien durch die Verschmelzung der Kerne von infizierten Zellen zu beobachten waren. Die Kolokalisierung zwischen dem TGE-Virus S-Protein und dem Filamin A schien nach 8 Stunden Infektion am stärksten zu sein. Detektiert wurde hier mit dem anti S-Antikörper sowohl an zellulären Membranen vorkommendes S-Protein, als auch bereits in Viruspartikel eingebautes S-Protein.

Als Negativkontrolle wurde eine Infektion mit dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV), einem RNA-Virus aus der Familie der *Rhabdoviridae*, durchgeführt. Rhabdoviren knospen an der Plasmamembran, so dass in der Zelle keine Viruspartikel sondern die produzierten Proteine nachweisbar sind. Bei diesem Virus ist laut Literatur keine Interaktion mit Filamin A bekannt. Dieses Virus hat einen aggressiveren Infektionsverlauf und wurde in einer 10fachen schwächeren Verdünnung eingesetzt als TGEV.



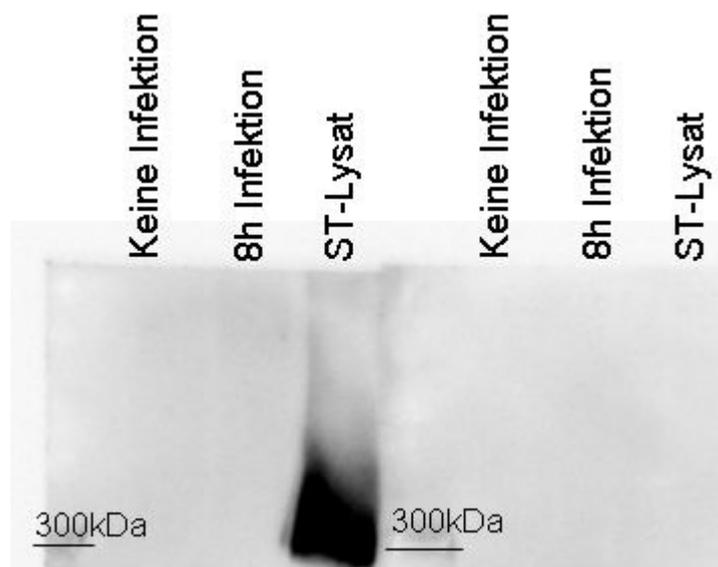
**Abbildung 54:** Konfokale Aufnahme der VSV-Indiana Infektion (Antikörper gegen G-Protein, rot) und Filamin A Detektion (grün) in ST-Zellen nach 2 h (B), 8 h (C) und 16 h (D). Detektion von Filamin A unter nicht infizierten Bedingungen (A).

Die konfokalen Aufnahmen (Abbildung 54) zeigen, dass nach 8 Stunden Infektion das VSV G-Protein zytoplasmatisch lokalisiert war und keine Kolo-kalisierung mit Filamin A aufwies.

Nach 16 Stunden konnte beobachtet werden, dass die gesamte Zelle eine hohe Infektion zeigte. In diesem Falle wurde deutlich, dass Virusproteine in der gesamten Zelle verteilt waren und eine Kodetektion des G-Proteins mit dem Filamin A auftrat.

#### 5.4.2 *Pulldown assay* von Filamin nach einer TGEV-Infektion

ST-Zellen wurden infiziert und die Lysate auf mit anti S-Antikörper gekoppelte Protein A-Sepharose gegeben. In einem Western Blot wurde dann das eventuelle gebundene Filamin A mithilfe des anti Filamin A-Antikörpers detektiert. Die Positivkontrolle mit einem ST-Lysat zeigte, dass der Antikörper gebunden hat (Abbildung 55). Sowohl nicht infizierte Zellen als auch ST-Zellen 8 Stunden p.i. zeigten keine Detektion des Filamin A nach der Immunpräzipitation mit anti S-Antikörper.

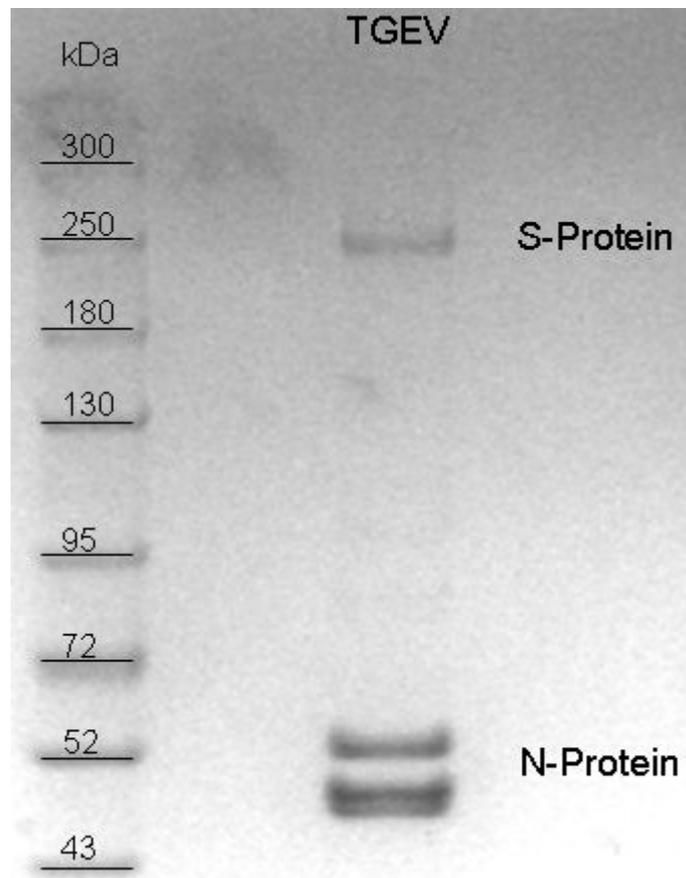


**Abbildung 55:** Western Blot mit dem anti Filamin A-Antikörper (links) und anti Kaninchen Peroxidase. Negativkontrolle mit anti Kaninchen Peroxidase (rechts).

#### 5.4.3 Detektion von Filamin A nach einer Virusreinigung

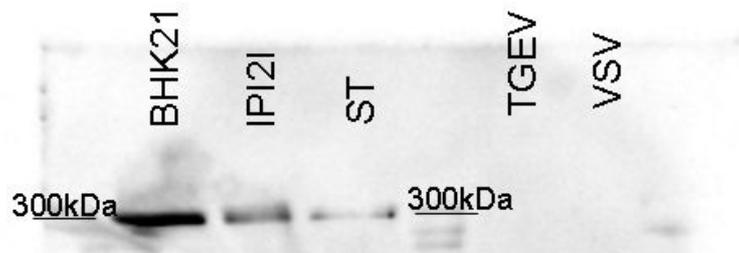
Viren können beim Knospungsvorgang Wirtsproteine in ihre Partikel miteinbauen, wie zum Beispiel für das respiratorische Synzitialvirus (RSV) gezeigt wurde (Radhakrishnan et al., 2010). Um festzustellen, ob TGEV das Filamin A durch eine Interaktion während des Knospungsvorgangs auch in die Viruspartikel einbaut, wurde eine Virusreinigung über einen Saccharosegradienten durchgeführt. Die gereinigten Viren wurden im Western Blot auf den Gehalt an Filamin A untersucht. Ein *Coomassie*-Gel zeigte, dass die Virusreinigung erfolgreich war, und wies die Strukturproteine S (~250 kDa Höhe) und N

(Doppelbande bei 55 kDa Höhe) auf. Das 30 kDa schwere M-Protein von TGEV kann nicht erkannt werden, da die 30 kDa Bande ausgelaufen war (Abbildung 56).



**Abbildung 56:** *Coomassie*-Gel nach der Virusreinigung von TGEV infizierten ST-Zellen

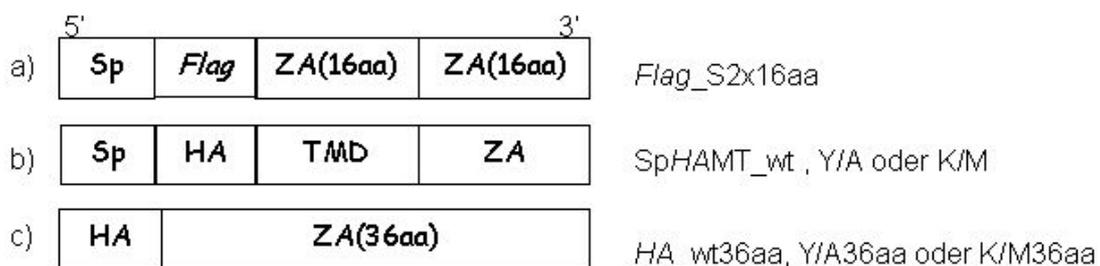
Wie in Abbildung 57 gezeigt, konnte jedoch in einem Western Blot kein Filamin nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle dienten die BHK21-, IPI2I- und ST-Lysate während als Negativkontrolle gereinigtes VSV verwendet wurde.



**Abbildung 57:** Western Blot mit dem Antikörper gegen Filamin nach der Virusreinigung. BHK21-, IPI2I- und ST-Lysate fungieren als Positivkontrolle (links).

## 5.5 Suche nach dem Interaktionspartner von TGEV S-Protein auf Zellebene

Eine weitere Methode zur Suche eines Interaktionspartners ist das Klonieren von Fusionsproteinen in Vektoren, die in eukaryotischen Zellen exprimiert werden können. Diese Fusionsproteine bestanden aus einem Teil des zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins (Wildtyp und Mutanten) und einem *tag*, das der Aufreinigung durch *beads* und der Detektion in Western Blots dient. In dieser Arbeit wurden sowohl eine *Flag*- (DYKDDDDK) als auch eine *HA*-Sequenz (YPYDVPDYA) eingesetzt (Abbildung 58). Nach dem Klonieren wurden die Fusionsproteine auf ihre Expression getestet.

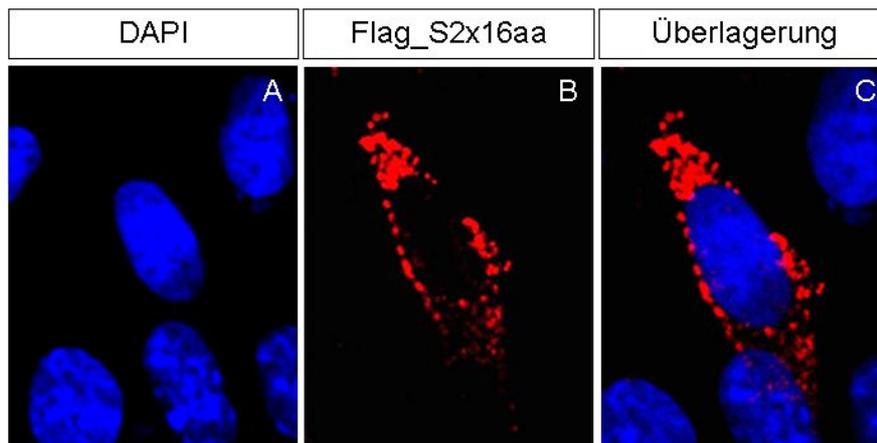


**Abbildung 58:** Übersicht der getaggen S-Protein Konstrukte. a) trägt eine *Flag*-Sequenz, b) und c) tragen eine *HA*-Sequenz. **Sp**: Signalpeptid; **TMD**: Transmembrandomäne/Membrananker; **ZA** zytoplasmatischer Abschnitt.

### 5.5.1 *Flag*-Fusionsprotein

Mit der Fusion von einem *Flag*-tag mit einer zweimaligen Wiederholung der letzten 16 Aminosäuren im C-Terminus des S-Proteins änderte sich die Lo-

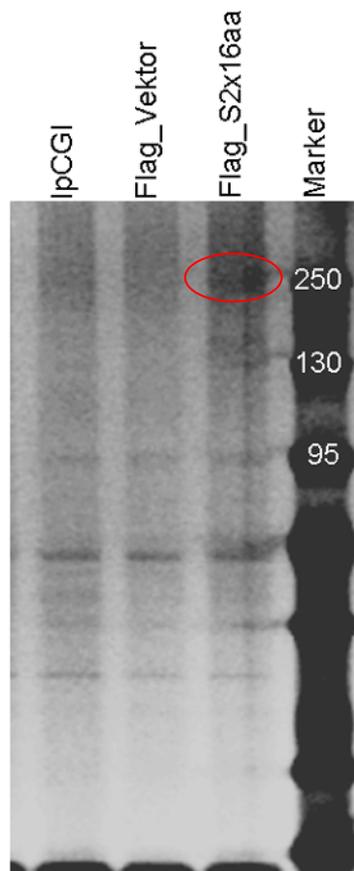
kalisierung des S-Proteins in der Zelle. Das S-Fusionsprotein schien in der Zelle verteilt zu sein (Abbildung 59, A-C).



**Abbildung 59:** Konfokale Aufnahme der Einzeldexpression des Fusionsproteins *Flag\_S2x16aa* (*Flag\_S2x16aa*) in BHK21-Zellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (A, C).

#### 5.5.2 Immunpräzipitationsversuche mit dem *Flag*-Fusionsprotein

Dieses Fusionsprotein wurde für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Dabei wurden der leere pCGI als auch der leere *Flag*-Vektor als Negativkontrollen mitgeführt. Nach einer Transfektion von BHK21-Zellen wurden die Lysate auf *Flag-beads* geladen. Nach 2 Stunden Inkubation wurden die beads auf 96 °C erhitzt und die Proben auf ein SDS-Gel geladen. Mithilfe einer Silberfärbung wurde nach einer Bande gesucht, die nur in der Probe *Flag\_S2x16aa* zu finden war.



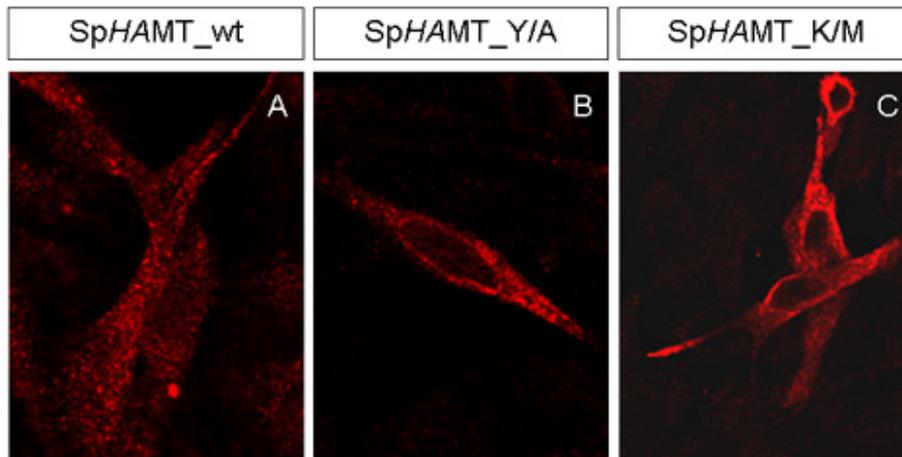
**Abbildung 60:** Silbergel einer Immunpräzipitation mithilfe der *FlagM2*-beads. Als Negativkontrollen wurden der leere pCGI sowie der leere *Flag*-Vektor eingesetzt.

Anhand des Silbergels von Abbildung 60 ist erkennbar, dass eine Bande in der dritten Spur zu sehen ist, die in den Negativkontrollen nicht sichtbar ist. Da die Klonierung der Y/A Mutante als *Flag*-Fusionsprotein nicht erfolgreich war, konnte nicht festgestellt werden, ob die detektierte Bande selektiv von der Wildtyp S-Proteinsequenz erkannt wurde (im gegensatz zur Y/A Sequenz) und somit der hier detektierte potentielle Interaktionskandidat von dem Tyrosinmotiv abhängig ist.

### 5.5.3 HA-Fusionsprotein

Das *HA-tag* wurde entweder N-terminal von den letzten 36aa des S-Proteins kloniert oder hinter das Signalpeptid des S-Proteins anstelle der Ektodomäne eingefügt (Abbildung 58 b, c). Als Kontrollen wurden in diesem Falle auch die Y/A und die K/M Mutante mit dem *HA* fusioniert. Abbildung 61 zeigt die Im-

munfluoreszenzfärbung der Einzelexpression der Konstrukte mit Membrananker (entsprechen der Abbildung 58, b).



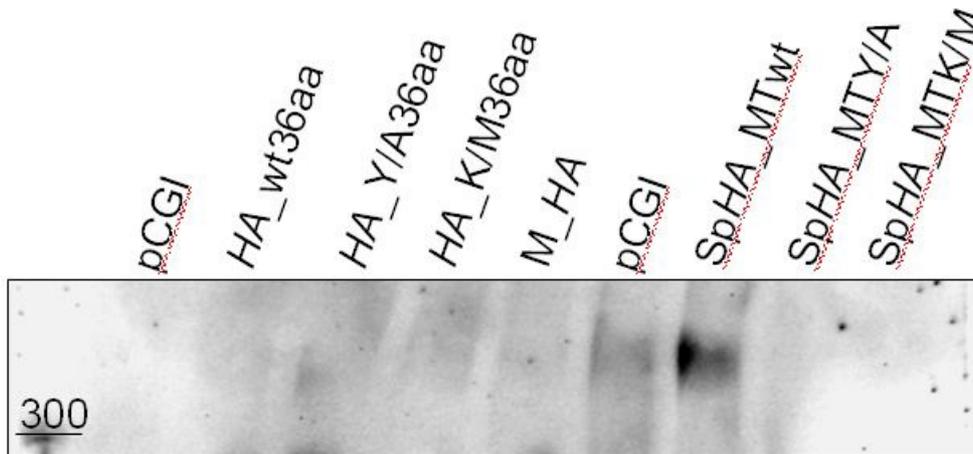
**Abbildung 61:** Konfokale Aufnahmen der Einzelexpression der *HA*-Fusionsproteine in BHK21-Zellen. Die Konstrukte zeigten den Austausch der Ektodomäne des S-Proteins durch den *HA-tag*. A zeigt den Wildtyp, B die Y/A Mutante und C die K/M Mutante.

Obwohl diese Konstrukte den Membrananker des ursprünglichen S-Proteins in der Sequenz enthielten, stimmte die zelluläre Lokalisierung nicht mit der des authentischen S-Proteins im ERGIC überein. Die Konstrukte wiesen meist eine diffuse Lokalisierung in der gesamten Zelle auf (Abbildung 61, A-C). Die Fusion des *HA-tags* vor die letzten 36 Aminosäuren des zytoplasmatischen Abschnittes des S-Proteins wies in der IFA kein spezifisches Signal auf. Alle Konstrukte zeigten eine diffuse Hintergrundfärbung der BHK21-Zellen.

#### 5.5.4 Immunpräzipitationsversuche mit den *HA*-Fusionsproteinen

Die *HA*-Fusionsproteine wurden für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Obwohl die Konstrukte *HA\_wt36aa*, *HA\_Y/A36aa* und *HA\_K/M36aa* keine positiven Ergebnisse in der IFA aufwiesen, wurden sie mit in die Immunpräzipitationsversuche mit aufgenommen. Dabei wurde der leere pCGI als Negativkontrolle und das TGEV M\_*HA* Fusionsprotein (Fusion des *HA-tags* an das Membranprotein von TGEV, Masterarbeit Sandra Siewert) als Positivkontrolle mitgeführt. Nach einer Transfektion von IPI2I-Zellen wurden die Lysate auf

Protein A-Sepharose *beads* geladen, nachdem der HA-Antikörper daran gebunden wurde. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die *beads* auf 96°C erhitzt und die Proben auf ein SDS-Gel geladen. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und im Western Blot mit einem gegen Filamin A gerichteten Antikörper detektiert.



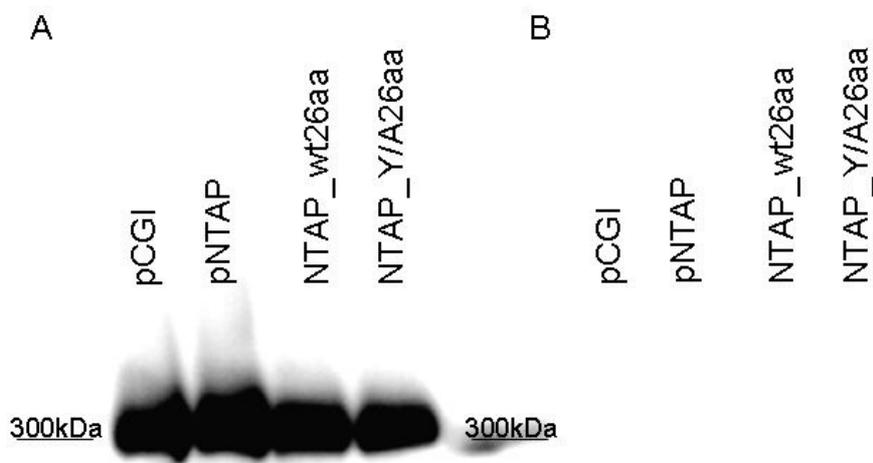
**Abbildung 62:** Western Blot detektiert mit einem anti Filamin A-Antikörper. Die Proben wurden mit anti HA-Antikörper immunpräzipitiert und potentielle Interaktionspartner des Tyrosinmotivs isoliert.

Der Blot in Abbildung 62 zeigte, dass SpHA\_MTWt nach einem *pull-down assay* tatsächlich Filamin A aus einem IPI2I-Zellgemisch isoliert hatte. Die Bindung beruhte einerseits auf das Vorhandensein der letzten 36 Aminosäuren von TGEV, da der leere pCGI sowie das Kontrollprotein aus dem Membranprotein des TGE-Virus die Filamin Bande nicht zeigte. Andererseits beruhte die Interaktion auf dem Vorhandesein des Tyrosinmotivs, da die Isolierung durch die Y/A Mutante nicht mehr stattfand. Auch die K/M Mutante band in diesem Versuch kein Filamin A.

### 5.5.5 Tandem Affinity Purification

Die TAP (*tandem affinity purification*) kombiniert die Aufreinigung eines Proteinkomplexes mit darauf folgender Identifizierung von unbekanntem Proteinkomplex-Komponenten mittels Massenspektrometrie. Der in dieser Arbeit genutzte Vektor wurde am N-Terminus der CBP- (*calmodulin binding protein*) und der SBP- (*streptavidin binding protein*) Domäne mit den letzten 26 Ami-

nosäuren des TGEVS\_wt bzw. Y/A Mutante versehen. Diese Konstrukte wurden in IPI2I-Zellen transfiziert. Nach einer doppelten Aufreinigung, erst durch eine Calmodulin- und dann durch eine Streptavidin-bindende Säule könnte mittels Western Blot eine potentielle Filamin A Bindung detektiert werden. Am Anfang der Durchführung wurde eine Probe aus den lysierten IPI2I-Zellen entnommen um zu überprüfen, ob Filamin enthalten war. Wie in Abbildung 63 A zu sehen ist, war diese erste Probe Filamin A positiv. Nach der Passage des Lysats über die Calmodulinsäule konnte kein Filamin mehr detektiert werden, unabhängig davon, ob NTAP\_wt26aa oder NTAP\_Y/A26aa in die Zellen transfiziert wurden (Abbildund 63, B).



**Abbildung 63:** Western Blot mit dem gegen Filamin A gerichteten Antikörper. (A) IPI2I-Lysate vor der Aufreinigung. (B) Aufgereinigte Fusionsproteine.

## 6. Diskussion

### 6.1 Zelluläre Lokalisierung des S-Proteins

#### 6.1.1 Auswirkung des Austausches der Ektodomäne des S-Proteins gegen ein fluoreszierendes Protein

Das S-Protein der Coronaviren spielt eine wichtige Rolle sowohl für die Rezeptorbindung als auch für die Fusion (Williams et al., 1991; Dveksler et al., 1991; Delmas et al. 1992; Yeager et al., 1992; Tresnan et al., 1996; Li et al., 2003). Die Coronaviren replizieren im Zytoplasma und die Bildung der Viruspartikel findet im ER-Golgi-Intermediären-Kompartiment statt (Tooze et al., 1984; Klumperman et al., 1994; Goldsmith et al., 2004). Da die Viruspartikel von TGEV im ERGIC zusammengebaut werden, sollte sich auch das S-Protein in diesem Kompartiment befinden um eingebaut zu werden. Das im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchte TGEV S-Protein lag im Vektor pCGI vor. Dieser Vektor ermöglichte durch das  $\beta$ -Globin-Intron die Kernexpression und Transportanalyse in unterschiedlichen Zelllinien, wie zum Beispiel in BHK21-Hamsternierenzellen (Schwegmann-Weßels et al., 2006). Das S-Protein von TGEV wird intrazellulär zurückgehalten (Schwegmann-Weßels, 2004). Die Detektion mit einem gegen die Ektodomäne gerichteten Antikörper zeigte eine subnukleäre Lokalisierung, die einer Region zwischen dem ERGIC und dem Golgi entsprach (Kapitel 5.1.1). In weiteren Versuchen sollten Kolokalisierungsstudien mit grün fluoreszierenden Markern stattfinden. Für die Kolokalisierungsstudien sollten ähnliche Ausgangsbedingungen auch für das S-Protein hergestellt werden, indem eine direkte Fluoreszenz an das Protein angefügt wurde. Es wurden drei GFP tragenden Konstrukte hergestellt, die das Fluorochrom N- (GFP\_TGEVS) oder C-terminal (TGEVS\_GFP) trugen oder die Ektodomäne ganz ersetzten (SpGFPMT). Das Anhängen des GFP-Peptids am N-Terminus änderte die Lokalisierung des Proteins (Kapitel 5.1.1). Es befand sich nicht mehr kernnah, sondern war in einer watteähnlichen Struktur, die auf das ER hinwies, über die ganze Zelle verteilt. Die Änderung im Lokalisierungsverhaltens des S-Proteins könnte damit erklärt werden, dass durch die N-terminale Markierung mit GFP der Transport des Proteins vom ER zum ERGIC gestört oder die Faltung des Proteins im ER be-

einträchtig war. Das C-terminal mit GFP markierte S-Protein hingegen wies eine ähnliche Lokalisierung wie der Wildtyp auf. Bessere Ergebnisse wurden jedoch erzielt, wenn die Ektodomäne gegen das GFP getauscht wurde. In diesem Fall erlangte man eine identische Lokalisierung im ERGIC, vergleichbar zum Wildtyp-S-Protein. In einem weiteren Schritt wurde für das S-Protein nach einer roten Markierung gesucht, sodass die Kolokalisierungsstudien mit den grün markierten Kompartimentmarkern möglich wurden. Wie für das GFP, wurden auch die roten Fluorochrome nach dem Signalpeptid inseriert, sodass das Protein den Zielort innerhalb der Zelle erreichen konnte. Das *dsRedMonomer*- und das *mCherry*-Protein stellten die rotfluoreszierenden Vertreter der Ektodomäne dar. Diese Konstrukte wurden zuerst anhand einer Einzelexpression untersucht. Das *Cherry* tragende Konstrukt wies die identische Lokalisierung auf wie der Wildtyp. Jedoch leuchtete dieses Konstrukt so sehr, dass die Dokumentation am Mikroskop erschwert wurde. Daraufhin wurde das *SpDsRedMonomerMT* Konstrukt kloniert, das in Einzelexpression eine ERGIC-Lokalisierung aufwies. Der Austausch mit *Cherry*, *GFP* oder *DsRedMonomer* beeinträchtigte die Lokalisierung im ERGIC nicht. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dass die Ektodomäne für die zelluläre Lokalisierung entbehrlich ist.

Der Nachweis der direkt fluoreszierenden S-Proteinkonstrukte mit anti GFP-Antikörper (Kapitel 5.1.2) zeigte im Western Blot, dass die Fusionsproteine in der Zelle exprimiert wurden und in Lysaten detektierbar waren. Wenn die Lysate mithilfe des gegen S gerichteten Antikörpers behandelt wurden, konnten nur GFP\_TGEVS und TGEVS\_GFP detektiert werden. Dies ist dadurch zu erklären, dass der anti S-Antikörper an ein Epitop in der Ektodomäne des TGEV S-Proteins bindet, das in den Konstrukten *SpGFPMT*, *SpCherryMT* und *SpDsRedMT* nicht mehr vorhanden war. GFP\_TGEVS wies in der IFA eine diffuse Verteilung in der Zelle auf. Jedoch schien das Protein von dem Anti S-Antikörper richtig erkannt worden zu sein, sodass geschlussfolgert werden kann, dass die Faltung dieses Proteins die Bindung des Antikörpers an das Epitop auf der Ektodomäne ermöglichte.

Die Fusionsproteine wurden außerdem mithilfe der Oberflächenbiotinylierung untersucht (Kapitel 5.1.3). Diese Methode ermöglicht es an der Zelloberflä-

che exprimierte Proteine nachzuweisen. Alle GFP-Fusionsproteine konnten auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. TGEVS\_GFP und SpGFPMT wurden jedoch nur als schwache Banden nachgewiesen, GFP\_TGEVS hingegen wies eine stärkere Expression auf der Plasmamembran auf. Die Ergebnisse der IFA und der Oberflächenbiotinylierung stimmten somit nicht überein, da das GFP\_TGEVS in der IFA eine starke ER-Lokalisierung aufwies und somit nicht zur Oberfläche wandern könnte. Möglich ist es, dass dieses Ergebnis darauf hindeutet, dass alle Fusionsproteine zu einem gewissen Grade zur Zelloberfläche wandern. Durch die direkte Markierung dieser Fusionsproteine kann in der IFA durch die Permeabilisierung keine Differenzierung zwischen Zelloberfläche- und intrazellulärer Detektion gezeigt werden. Es könnte sein, dass die Oberflächenexpression der Fusionsproteine, die die Ektodomäne des TGEV S-Proteins enthielten, mit dem anti S-Antikörper in der IFA hätte gefärbt werden können. Ein solcher Versuchsansatz sollte mit sowohl permeabilisierten als auch nicht permeabilisierten Zellen durchgeführt werden, um den Grad der Oberflächenexpression dieser Proteine auch in der IFA abschätzen zu können.

### 6.1.2 Das S-Protein kolokalisiert mit dem ERGIC-Marker.

Die Ergebnisse der Kolokalisierungsstudien zeigen, dass das S-Protein mit dem ERGIC-Marker kolokalisierte. Drei Kompartimentmarker standen zur Verfügung: das Calretikulin trägt am C-Terminus ein GFP-Peptid und fungierte als ER-Marker. Seine Einzelexpression zeigte eine netzartige Lokalisierung. Das ERGIC53 (ERGIC-Marker) sowie die  $\beta$ -Galaktosyl-Transferase (Golgi-Marker) trugen am N-Terminus hinter dem Signalpeptid ein GFP und lokalisierten in einer ähnlichen Form um den Nukleus. Diese drei Membranproteine konnten somit einerseits durch die Signalpeptide ihren Zielort in der Zelle erreichen und andererseits durch das GFP mikroskopisch direkt visualisiert werden (Kapitel 5.1.4).

Die Immunofluoreszenzbilder bestätigten einerseits die Kolokalisierung des S-Proteins mit dem ERGIC-Marker zeigten jedoch andererseits eine partielle Kodetektion des S-Proteins mit dem Golgi-Marker. An dieser Stelle muss

gesagt werden, dass die Kompartimentmarker keine endgültige Aussage über die Lokalisierung ergeben können. Die Zellorganellen stellen eine dynamische Einheit dar. Das ERGIC-53 Protein befindet sich z.B. in niedrigen Konzentrationen im ER aber auch in den ersten cis-Golgi Zisternen (Schweizer et al., 1988; Klumperman et al., 1998). Die  $\beta$ -Galaktosyltransferase stellt ein Protein dar, das auch im cis-Golgi (also dem frühen, dem ERGIC am nächsten stehenden Part vom Golgi-Apparat) vorkommt. Somit stellte die partielle Kodetektion des S-Proteins mit dem Golgi-Marker eine momentane Aufnahme von Zellorganellen dar, die ineinander übergehen und teilweise mit in die Kolokalisierungsstudien aufgenommen wurden, um so zu zeigen, dass das TGEV S-Protein nicht bis in den trans-Golgi transportiert wird. Hinweise darauf liefert auch die Publikation von Schwegmann-Weßels et al. (2004), in der gezeigt wurde, dass das authentische TGEV S-Protein Endoglykosidase H sensitiv ist. Dies bedeutet, dass das Protein mannosereich glykosyliert ist und somit nicht den trans-Golgi-Apparat erreicht.

Die Untersuchungen zur Kolokalisierung fanden ebenfalls mit den direkt rot fluoreszierenden S-Proteinkonstrukten statt und zeigten, dass sie ungeeignet für solche Versuche waren (Kapitel 5.1.6). Die Überexpression des SpCherryMT für die Kodetektion mit den Kompartimentmarkern störte die mikroskopische Dokumentation, da dieses Konstrukt ein zu starkes Signal produzierte. Das mit dem DsRedMonomer fusionierte Protein wies nach der Kotransfektion mit den Kompartimentmarkern eine anormale Lokalisierung auf. Dies Fusionsprotein konnte in der Zelle als kleine Punkte beobachtet werden. An dieser Stelle kann vermutet werden, dass diese Vesikel Proteasome oder Lysosome darstellen, die die Zelle mit dem überexprimierten Protein bildet, sodass diese ausgeschieden werden kann. Somit wurde festgestellt, dass die Transfektion des Wildtyp S-Proteins und die darauf folgende Detektion mit dem 6A.C3-Antikörper die beste Variante für die Kolokalisierungsexperimente darstellte.

### 6.1.3 Die Hemmung der Proteinneusynthese beeinträchtigt die S-Proteinlokalisierung nicht.

Um die Lokalisierung des S-Proteins genauer zu ermitteln, wurde die Proteinneusynthese durch die Zugabe von Cykloheximid gehemmt. Für diesen Ansatz wurden sowohl das Wildtyp S-Protein als auch die fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine untersucht. Die fünfstündige Behandlung mit dieser Chemikalie wies jedoch keinen Unterschied zu nicht behandelten Zellen auf (Kapitel 5.1.7). Die Kolokalisierung von TGEVS\_wt mit den Kompartimentmarkern wurde von der Cykloheximid-Behandlung auch nicht beeinflusst und zeigte weiterhin eine Kodetektion mit dem ERGIC-Marker.

### 6.1.4 Mutationen im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins ändern dessen zelluläre Lokalisierung.

Das S-Protein von TGEV wird intrazellulär durch ein im zytoplasmatischen Abschnitt enthaltendes Retentionssignal zurückgehalten. Dieses Signal ist die so genannte tyrosinbasierte Domäne YXXI (Schwegmann-Weßels et al., 2004). Mutagenesestudien zum Retentionssignal (Diplomarbeit von André Paul, 2006) zeigten, dass das Isoleucin nicht essentiell ist und an dieser Stelle eine stark hydrophobe Aminosäure vorliegen muss. Ein Austausch gegen diese Aminosäure durch Methionin, Valin, Leucin und Phenylalanin zeigte tatsächlich keine Änderung im Transport des S-Proteins. Wurde jedoch das Isoleucin gegen ein Alanin getauscht, so zeigte sich eine Oberflächenlokalisierung des Proteins. Die Retention wurde zerstört (Schwegmann-Weßels et al., 2004). Ein Austausch im zytoplasmatischen Abschnitt in C-terminaler Richtung vom Retentionssignal von Lysin zu Methionin führte dazu, dass das Protein nicht mehr zurückgehalten wurde, sondern zur Oberfläche wanderte und endozytiert wurde (André Paul, Diplomarbeit 2006).

Die Lokalisierung der Mutanten wurde in dieser Arbeit mithilfe der IFA untersucht. Die TGEVS\_Y/A Mutante trägt die Substitution von Tyrosin zu Alanin im zytoplasmatischen Abschnitt und lokalisiert an der Zelloberfläche (Kapitel 5.1.8). Diese Mutante wies eine Kolokalisierung mit dem ERGIC-Marker auf,

die vermutlich das nachzügeln Protein darstellt, das exprimiert wird und durch ER, ERGIC und Golgi für die co- und posttranslationale Modifizierung wandert (Kapitel 5.1.9). Dies könnte dafür sprechen, dass das fehlende Tyrosin keine funktionelle Retention mehr ermöglichte, jedoch das Protein zum Teil zumindest für kurze Zeit vor dem Erreichen der Zelloberfläche im ERGIC verblieb. Wenn auch das Tyrosin für die Retention sehr wichtig ist, so kann doch die Umgebung des Signals auch eine wichtige Rolle bei der Lokalisierung des Proteins spielen. Das Fehlen des Tyrosins verursachte vielleicht nicht die komplette Zerstörung der Tertiärstruktur des Proteins, sodass eine „Teilinteraktion“ im ERGIC noch erhalten blieb, zumindest in dem Maße, dass das Protein in diesem Kompartiment kurz verblieb. Natürlich kann es auch sein, dass ein zufälliger Aufenthalt des Proteins im ERGIC auf dem Weg zur Plasmamembran mikroskopisch aufgenommen wurde.

Für die TGEVS\_K/M Mutante ergab die IFA eine vesikuläre Lokalisierung (Kapitel 5.1.8 und 5.1.10). Nach der Kotransfektion mit den Kompartimentmarkern kolokalisierte diese Mutante zu einem geringen Teil sowohl mit dem ER als auch mit dem ERGIC und dem Golgi-Apparat. Ein Großteil des Proteins kolokalisierte aber nicht mit diesen Markern, sondern befand sich in vesikulären Strukturen über die gesamte Zelle verteilt bis zur Plasmamembran. Dies beweist, dass die TGEVS\_K/M Mutante sich in ihrer Lokalisierung vom TGEVS\_wt unterscheidet und, dass die Retention im ERGIC zerstört wurde, obwohl das Tyrosinsignal weiter erhalten blieb. Dies zeigt, dass einige der das Retentionssignal umgebenden Aminosäuren eine wichtige Rolle spielen, da diese Mutation des Lysins zu Methionin die intrazelluläre Retention ausschaltet.

#### 6.1.5 Porzine Zelllinien bestätigen die Lokalisierung des S-Proteins im ERGIC.

Die Expression des S-Proteins im pCGI Vektor ermöglichte die Untersuchung auch in Zelllinien, welche von TGEV infiziert werden können. Diese sind die ST- (Schweinhoden) und die IPI2I- (Ileum-Epithel) Zelllinien. Diese letztere Zelllinie ahmt die *in vivo* Bedingungen nach, da die TGEV-Infektion im Epi-

thel des Schweinedünndarms erfolgt. Die transiente Expression in beiden Zelllinien bestätigte die Lokalisierung des S-Proteins im ERGIC (Kapitel 5.1.11). In zukünftigen Arbeiten könnte einerseits die Lokalisierung und der Transport des S-Proteins in polaren Zellen wie z. B. den IPEC J2-Zellen (permanente porcine intestinale epitheliale Zelllinie) untersucht werden, so dass die Polarität des Schweinedarms nachgeahmt wird. Andererseits könnte eine stabile Zelllinie hergestellt werden, die im Gegensatz zu einer transienten Überexpression dem natürlichen Expressionslevel eines Proteins entspricht. Somit könnte das Proteinverhalten unter natürlicheren Bedingungen untersucht werden.

#### 6.1.6 Die TGEVS\_K/M Mutante wird endozytiert.

In der Literatur gibt es viele Beispiele für eine durch ein Tyrosinmotiv vermittelte Endozytose. Dazu gehören zum Beispiel die zellulären Proteine TGN38 und EGFR. Diese Proteine weisen ein YXXL-Motiv in ihrer Sequenz auf, die mit der  $\mu$ 2 Untereinheit des Adaptorproteins 2 (AP2) interagiert (Sorkin et al., 1995; Owen und Evans 1998). Viele Studien untersuchten die Rolle der tyrosinbasierten Signale in der Endozytose und stellten fest, dass diese für die basolaterale Sortierung und Endozytose von Proteinen zuständig sind (Collawn et al., 1990; Hunziker et al., 1991; Letourneur und Klausner, 1992). Ein wichtiges Beispiel für virale Glykoproteine stellt das F-Protein des Masernvirus dar, dessen Tyrosinmotiv den basolateralen Transport sowie die Endozytose vermittelt (Moll et al., 2002). Das G-Protein von VSV enthält auch ein Tyrosinmotiv, das gemeinsam mit einem sauren Motiv (DXE) sowohl den Transport vom ER zur Plasmamembran als auch die basolaterale Sortierung vermittelt. Dieses Signal scheint jedoch von einem Methionin unterstützt zu werden (Sevier et al., 2000).

Die in dieser Arbeit untersuchte TGEVS\_K/M-Mutante trägt eine Substitution in C-Terminus hinter dem Tyrosinmotiv. Hier wurde ein Lysin gegen ein Methionin getauscht. Aus den oben genannten Studien über das VSV-G-Protein ergab sich die Vermutung, dass diese Mutante tatsächlich endozytiert wird. Sowohl die Lokalisierungsarbeiten dieser Doktorarbeit als auch Vorar-

beiten in der Diplomarbeit von André Paul 2006 unterstützen diese These. Um diese Aussage zu belegen, wurden Endozytosemarker für Kolokalisierungsstudien benutzt. Die Kolokalisierungsanalyse von AP2 $\mu$ 2 und dem S-Protein zeigte, dass TGEVS\_wt nicht mit diesem Endozytosemarker kodetektierbar war (Kapitel 5.1.12). Im Gegensatz dazu kolokalisierte die TGEVS\_K/M Mutante mit den Vesikeln von AP2 $\mu$ 2 und schien AP2 sogar durch seine Anwesenheit in Vesikeln anzukonzentrieren. Dies deutet daraufhin, dass das tyrosinbasierte Signal des Wildtyp S-Proteins kein Endozytose-signal darstellt. Nur im Falle der Substitution des Lysins zum Methionin wurde das Tyrosinmotiv zum Endozytosesignal und ließ das S-Protein von der Zelloberfläche ins Zellinnere aufnehmen. Weiterhin kann hiermit gesagt werden, dass das Methionin die Retentionsfähigkeit des tyrosinbasierten Signals eliminierte. Außerdem konnte festgestellt werden, dass der Kontext in dem das Retentionssignal sich befindet, dessen Funktion bestimmt (Schwegmann-Weßels et al., 2004).

Zwei weitere Endozytosemarker wurden in den Untersuchungen eingesetzt. Diese waren die Rho-GTPase und das Tetraspanin CD63. Die Rho-GTPase spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von unterschiedlichen Zellfunktionen wie Zellmigration, Genexpression, Endozytose, Zellzyklusfortschreitung und Differenzierung. Diese Klasse von Proteinen stellt molekulare Schalter dar, welche zwischen einer aktiven GTP-bindenden Form und einer inaktiven GDP-bindenden Form alternieren. Die GFP fusionierte Rho-GTPase befindet sich an der Oberfläche und vermittelt den ersten Schritt der Endozytose. Stromabwärts liegende Effektormoleküle werden durch aktivierte Rho-GTPasen stimuliert (Bishop und Hall, 2000). Das CD63 stellt einen Marker für spätendosomale Endozytoseereignisse dar, da dieses Protein an multivesikulären Körperchen (MVBs) assoziiert vorliegt. Das Protein zirkuliert zwischen den MVBs und den exozytotischen Transportweg. Diese zwei zellulären Proteine zeigten jeweils in der IFA eine Kolokalisierung sowohl mit dem TGEVS\_wt als auch mit der TGEVS\_K/M Mutante. Immunfluoreszenzbasierte Kolokalisierungsversuche stellen Momentaufnahmen der Zelle dar und könnten eine zufällige Kodetektion zweier Proteinen ergeben. Aus diesem Grunde wurden soweit möglich Funktionstests eingesetzt. Um die Endozytose zu induzieren, wurde der *antibody uptake assay* durchgeführt und die Ko-

lokalisierung von TGEVS\_wt und der TGEVS\_K/M Mutante mit Rho-GTPase und CD63 beobachtet. Das TGEVS\_wt Protein wird nicht endozytiert, während sich die TGEVS\_K/M Mutante unter endozytotischen Bedingungen von einer vorwiegenden Oberflächenlokalisierung zu einer zytoplasmatischen, vesikulären Lokalisierung änderte (Kapitel 5.1.13). Die Kollokalisierung mit den beiden Endozytosemarkern erwies sich tatsächlich als erhöht, wenn die Zellen bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert wurden.

#### 6.1.7 TGEVS\_wt und TGEVS\_K/M Mutante koloalisieren partiell mit dem ESCRT-Marker Vps4A.

In der Zelle haben die MVBs (multivesikuläre Körperchen) die einzigartige Fähigkeit intraluminale Vesikel herzustellen, die weg vom Zytosol knospen, ein Prozess äquivalent zu der Virusknospung von umhüllten Viren (Lambert et al., 2007). Die Beobachtung, dass CD63 eine Kollokalisierung mit TGEVS\_wt aufwies, warf die Frage auf, ob das S-Protein mit dem MVB-Transportweg der Wirtszelle interagiert. Die Sortierung der zellulären Proteine in die MVBs für Degradierung, lysosomale Funktionen oder exosomale Abgabe braucht die koordinierte Aktion von mindestens drei oligomeren Komplexen, der so genannten ESCRT-Maschinerie (*endosomal sorting complex for transport*) (Babst et al., 2002 a und 2002 b; Katzmann et al., 2001; Pelchen Matthews et al., 2004; Slagsvold et al., 2006). Nach der Sortierung wird der Prozess von der AAA-Typ ATPase Vps4 terminiert (Bishop und Woodman, 2001; Fujita et al., 2003; Garrus et al., 2001). In den letzten Jahren wurden viele Studien durchgeführt um zu verstehen wie umhüllte RNA-Viren Komponenten des MVB-Transportweges für die Bildung der Nachkommenpartikel benutzen, welche von der Plasmamembran infizierter Zellen knospen (Bieniasz, 2006; Martin-Serrano et al., 2005; Morita und Sundquist, 2004; Strack et al., 2003). Nach einer Kotransfektion von TGEVS\_wt und Vps4a schienen diese überexprimierten Proteine partiell zu koloalisieren (Kapitel 5.1.14). Wenn die Vps4a Mutante mit dem TGEVS-wt kotransfiziert wurde, so schienen die abnormalen Endosomen das S-Protein zu umschließen, während die Oberfläche eine deutliche Kollokalisierung aufwies. Die TGEVS\_K/M verhielt sich ähnlich wie der TGEVS\_wt und zeigte eine partiel-

le Kolokalisierung sowohl mit dem Vps4a als auch mit der Vps4a Mutante, wobei letztere ein stärkeres Signal ergab. Die Studien der letzten Jahren haben bewiesen, dass umhüllte Viren wie Retroviren, Rhabdoviren und Filoviren den MVB-Transportweg nutzen (Bieniasz, 2006; Morita und Sundquist, 2004; Pelchen-Matthews et al., 2004; Slagsvold et al., 2006). Das Gag und das Matrixprotein dieser Viren können in den MVB-Transportweg über die Erkennung von so genannten Spät-domänen eingeschleust werden. Diese Spät-domänen sind PTAP, YPXL oder PPXY und erkennen jeweils Tsg101, Alix/AIP1 und Nedd4 (Lambert et al., 2007). Der zytoplasmatische Abschnitt des TGEV S-Proteins wies keine dieser Spät-domänen auf. Trotzdem schien das S-Protein eine Kodetektion mit der ESCRT-Maschinerie zu zeigen. Bei einer gleichzeitigen Infektion mit TGEV und Transfektion der Vps4a Konstrukte wurde sichtbar, dass das Virus nicht mit dem Vps4a-Protein kolokalisierte, jedoch mit den abnormalen Endosomen der Vps4a Mutante (Kapitel 5.1.15). Dies könnte damit erklärt werden, dass die abnormalen Endosomen das S-Protein in ihren Strukturen festhalten. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass an der Stelle der aberranten Endosomen eine Akkumulierung des S-Proteins zu sehen war. Interessant wäre die Untersuchung, ob die Bildung von neuen Viruspartikeln bei einer Expression von Vps4A Mutante im Vergleich zur wildtyp-Situation nach der Infektion vermindert ist. Dies könnte man mit rekombinanten TGE-Viren oder mit einem VLP-basierten *assay* untersuchen. Dafür wäre die Etablierung einer Vps4a stabil exprimierenden Zelllinie von Vorteil.

## 6.2 Das S-Protein interagiert mit Filamin A durch das Tyrosin in seinem zytoplasmatischen Abschnitt.

Das S-Protein von TGEV wird durch ein tyrosinbasiertes Signal im zytoplasmatischen Abschnitt intrazellulär zurückgehalten (Schwegmann-Weßels et al., 2004). Dieses tyrosinbasierte Signal verursacht auch die Retention eines anderen Proteins in zellulären Kompartimenten, wie dem CD3- $\epsilon$  (Mallabiarrena et al., 1992). Ein anderes Coronavirus, das IBV, weist auch eine intrazelluläre Retention des S-Proteins auf (Winter et al., 2008). Das SARS S-Protein hingegen hat im zytoplasmatischen Abschnitt kein Tyrosin und lokalisiert auf der Zelloberfläche (Schwegmann-Weßels et al., 2004). Diese Beobachtung weist daraufhin, dass das Tyrosin eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Retention spielt. Die Suche im Rahmen dieser Arbeit nach potentiellen zellulären Interaktionspartnern und deren Mitwirkung in der Retention des S-Proteins von TGEV soll zum Verständnis der Virusreifung beitragen. Mehrere Ansätze wurden zu diesem Zweck evaluiert. Durch den GST *pull-down assay* wurde ein Protein mittels *Coomassiefärbung* identifiziert, das mit den letzten 26 Aminosäuren vom zytoplasmatischen Abschnitt des Wildtyp S-Proteins interagiert und nicht mit denen der TGEVS\_Y/A Mutante (Kapitel 5.2.1). Dieses Protein wurde massenspektrometrisch als Filamin A eingeordnet. Die Visualisierung einer Bande erwies sich als sehr schwer. Dies beruhte wahrscheinlich darauf, dass die Interaktion mit Filamin A möglicherweise transient oder nicht sehr stabil ist. Die unterschiedlichen Waschschriffe des Aufreinigungsprotokolls könnten dazu beigetragen haben, dass das ausgefischte Protein verloren ging. Eine Degradierung sollte durch die Zugabe der Protease-Inhibitoren vermieden werden. Ein weiteres Problem stellte der Antikörper gegen GST dar. Dieser Antikörper zeigte viele Hintergrundbanden auf, sodass ein potentieller Kandidat eventuell verdeckt geblieben ist. Ein starkes Signal wurde jedoch in einem Western Blot identifiziert (Abbildung 48), das als breite Bande zu erkennen war. Diese Bande blieb in den Kontrollspuren aus. Dieses breitere Signal würde vermuten lassen, dass es sich nicht nur unbedingt um einen einzigen Interaktionspartner handelt, sondern mehrere zelluläre Proteine mit dem Tyrosin des YXX $\Phi$ -Signals wechselwirken und somit die Retention bestimmen. In einer der Wiederholungen des

GST *pulldown assay* wurde eine klare einzigartige Bande im *Coomassie*-Gel sichtbar. Diese Bande mit einer molekularen Masse von ca. 300 kDa wurde tatsächlich nur mit dem Wildtyp Fusionsprotein ausgefischt und weder mit dem leeren Vektor noch mit der Mutante. Dies wies darauf hin, dass das Tyrosin bei der Interaktion mit diesem Protein eine Rolle spielte, da sein Fehlen in der TGEVS\_Y/A Mutante die Isolierung des Filamin A unterband. Es wurde erwartet, dass mehrere Proteine die Retention des S-Proteins steuern und, dass es sich um einen Multikomplex handelt. Die Visualisierung von einem einzigen Kandidaten muss dieser Erwartung jedoch nicht entgegenlaufen, denn es ist möglich, dass mehrere Proteinen nicht im *Coomassie*-Gel sichtbar wurden weil: i) sie in zu niedrigen Konzentrationen vorhanden waren; ii) sie von anderen stärker repräsentierten Proteinen im Gel maskiert wurden; iii) sie zu klein waren und somit vom Gel nicht mit aufgetrennt wurden. Weitere Untersuchungen könnten die Identifizierung weiterer potentieller Kandidaten ermöglichen. Eine weitere Technik wäre zum Beispiel die *tandem affinity purification* (Puig et al., 2001), die für die Suche nach Protein-Interaktionen eingesetzt wird. Diese wurde in dieser Arbeit für einen ersten Versuch eingesetzt. Leider konnte im Western Blot kein Filamin A detektiert werden, und in der *Coomassie*färbung keine auffälligen Banden nachgewiesen werden. Da der Versuch nur einmal erfolgte, könnte eine Wiederholung andere Ergebnisse liefern. Zudem wurden in den NTAP-Vektor nur die letzten 26 Aminosäuren des S-Proteins eingefügt. Es lag somit kein Membranprotein mit dem kompletten zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins vor. Dieser Unterschied zum authentischen S-Protein könnte die Faltung des hergestellten Fusionsproteins beeinflussen. Somit könnte auch eine potentielle Interaktion mit zellulären Proteinen gestört sein. Eine weitere mögliche Erklärung für das Fehlen eines positiven Ergebnisses in der TAP ist, dass das Filamin A oder aber ein anderer Interaktionskandidat in so geringen Mengen vorhanden waren, dass sie nicht visualisiert werden konnten. Einen weiteren möglichen Ansatz zur Detektion von potentiellen Interaktionspartnern stellt das *yeast two hybrid* System dar.

### 6.2.1 Das S-Protein kolokalisiert mit Filamin A in IPI2I Zellen.

Nachdem der potentielle Interaktionspartner identifiziert wurde, musste das Ergebnis validiert werden. Zuerst wurde mit einem gegen Filamin A gerichteten Antikörper das Protein in IPI2I-Zellen mithilfe einer IFA untersucht und festgestellt, dass Filamin A filamentös im Zytoplasma lokalisiert ist (Kapitel 5.3.1). Wurde das S-Protein transfiziert, so zeigte sich, dass der Wildtyp mit dem Filamin A tatsächlich zu einem kleinen Teil kolokalisierte, während der Austausch des Tyrosins zu Alanin diese Kolokalisierung aufhob. Das zum Teil intrazellulär befindliche sowie das an der Oberfläche liegende TGEVS\_Y/A Protein zeigte keine Kolokalisierung mit dem Filamin A (Kapitel 5.3.2).

### 6.2.2 Filamin A immunpräzipitiert das S-Protein aus einem IPI2I-Zelllysats.

Eine wichtige Bestätigung zur Interaktion des S-Proteins mit Filamin A wurde durch eine Koimmunpräzipitation erlangt. Wenn ein mit dem S-Protein transfiziertes IPI2I-Zelllysats mit einer mit anti-Filamin A-Antikörper gekoppelten Säule aufgereinigt und ein Western Blot gegen das S-Protein durchgeführt wurde, so konnte das S-Protein tatsächlich visualisiert werden (Kapitel 5.3.3). Dies deutete daraufhin, dass Filamin A mit dem Wildtyp S-Protein interagiert und eine Bindung zwischen den beiden Proteinen stattfand. TGEVS\_Y/A und TGEVS\_K/M konnten bei diesem Ansatz nicht kodetektiert werden. Dies ist der aussagekräftigste Beweis dafür, dass eine Interaktion zwischen dem tyrosinbasierten Retentionssignal des S-Proteins und Filamin A besteht und aufgehoben wird, wenn das Tyrosin oder das Lysin nicht mehr vorhanden sind. Beim G-Protein von VSV wurde gezeigt, dass das tyrosinbasierte Sortierungssignal zusammen mit einem weiteren aus zwei sauren Aminosäuren bestehenden Motiv den Transport an die Membran steuert (Sevier et al., 2000). In dieser Publikation wird außerdem vermutet, dass auch das Methionin hinter diesem Motiv eine Rolle bei dem Proteintransport spielt. Dies zeigt, dass die Umgebung des Tyrosinsignals eine sehr wichtige Rolle bei Interaktionen mit anderen Proteinen spielt. Die Filamininteraktion mit dem S-Protein könnte dadurch gestört werden, dass die Substitution des Lysins zum

Methionin auch eine Änderung der Tertiärstruktur hervorruft und die Konformation beeinträchtigt.

In der Literatur scheint die Interaktion zwischen Filamin und seinen Interaktionspartnern die unterschiedlichsten Rollen zu spielen, von Degradierung zu Internalisierung, von Wiederverwertung bis zur Verankerung an Aktin (Minsaas et al., 2010). Hinsichtlich dieser letzten Rolle könnte Filamin A das S-Protein nach der Herstellung am ERGIC wie ein Gerüst unterstützen und zurückhalten, sodass das S-Protein mit dem M-Protein und dem E-Protein zu einem Viruspartikel assoziieren kann (s. Abbildung 64-67). Für HIV wurde bereits beschrieben, dass Filamin für das Clustering des zellulären Rezeptors zuständig ist (Jimenez-Baranda et al., 2007). Auch in diesem Falle fungiert das Filamin als Adaptor zum Aktin im Zytoplasma, um den HIV-1-Rezeptor an die Aktin-Zytoskeleton-Remodellierungsmaschinerie zu koppeln. Hierdurch wird die Virusinfektion erleichtert (Jimenez-Baranda et al., 2007).

Um die *in vivo* Situation zu simulieren, wurde die Interaktion des S-Proteins mit Filamin A im Viruskontext untersucht. Dafür wurden ST-Zellen mit TGEV infiziert und eine IFA durchgeführt. Das Virus wurde durch den gegen S gerichteten Antikörper visualisiert. Die Kolo-kalisierung mit dem Filamin A zeigte tatsächlich eine partielle Kodetektion (Kapitel 5.4.1). Somit kann letztendlich gesagt werden, dass das S-Protein von TGEV mit Filamin A sowohl in Einzel-expression als auch im Viruskontext kolokalisierte.

Die S-Protein/Filamin A-Interaktion wurde ebenfalls in den Infektionsversuchen untersucht (Kapitel 5.4.2). Ein Ansatz war es, nach der Infektion von ST-Zellen eine Koimmunpräzipitation mit dem Filamin A-Antikörper zu starten. Nach der achtstündigen Infektion und der Aufreinigung durch eine Protein A-Sepharose-anti S-Säule konnte kein Filamin A im Western Blot detektiert werden. Es könnte sein, dass Filamin in so geringen Mengen vertreten ist, dass dies nicht vom Antikörper detektierbar ist.

Nach einer Virusreinigung wurde mithilfe des gegen Filamin gerichteten Antikörpers nach diesem Protein im Viruspartikel gesucht (Kapitel 5.4.3). Das gereinigte Virus wurde mit SDS denaturiert und bei 96°C erhitzt. Dabei wer-

den die Proteine aus der Virusmembran freigesetzt und können im Western Blot visualisiert werden. Leider konnte im Blot kein Filamin A detektiert werden. Dies kann damit erklärt werden, dass die Menge an integriertem Wirtspotein in einem Viruspartikel sehr gering ist, dass es nicht in einem Western Blot detektierbar ist. Außerdem könnte es sein, dass die Interaktion des S-Proteins mit Filamin A nur vorübergehend ist, und das zelluläre Protein bei dem *Assembly* nicht in den Partikeln miteingeschleust wird. Ein wichtiger Ansatz wäre es, eine massenspektrometrische Analyse der im Viruspartikel eingebauten Proteine durchzuführen. Diese Methode hätte eine höhere Sensitivität in der Identifizierung von Proteinen. Diese LC-MS/MS-Analyse der in Viruspartikeln eingebauten Wirtszellproteine wurde tatsächlich von Radhakrishnan et al. angewandt, um Interaktionspartnerstudien bei RSV zu validieren (Radhakrishnan et al., 2010).

Weitere Versuche zur Analyse der Interaktion des zellulären Proteins mit dem S-Protein müssen stattfinden. Ein weiterer Untersuchungsansatz wäre die Analyse des S-Protein-Transports auf Filamin A defizienten Zellen. Solche Zellen wurden von J. Hartwig, aus der *Harvard Medical School*, Boston, MA, USA hergestellt. Sie stellen jedoch eine humane Melanom-Zelllinie dar. Diese Zellen sind somit nicht zur Infektion mit TGEV geeignet. Eine porcine Filamin-defiziente Zelllinie müsste etabliert werden. Hier könnte man während einer TGEV Infektion nach Defekten in der Virusreifung suchen, sodass die eventuell wichtige Rolle von Filamin A für TGEV verdeutlicht werden könnte. Ebenfalls könnte mithilfe von siRNA das Filamin A herunterreguliert und das Verhalten des S-Proteins untersucht werden.

### 6.2.3 Ein HA-Fusionsprotein detektiert Filamin A als Interaktionspartner des S-Proteins.

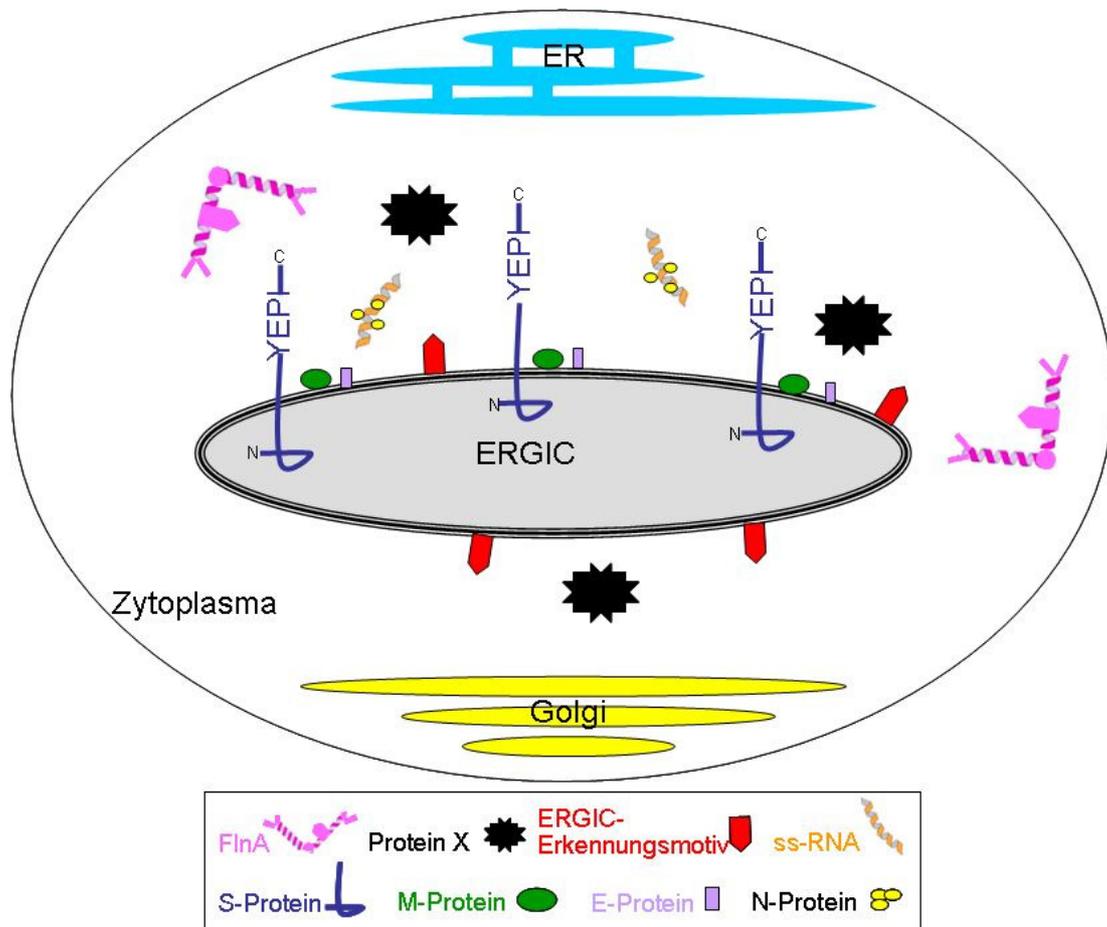
Durch die Fusion von einem Teil des zytoplasmatischen Abschnitts des S-Proteins mit einem *Flag*- oder *HA-tag* konnten die Fusionsproteine direkt in IPI2I Zellen exprimiert und dann aufgereinigt werden. Im Falle von *Flag* wurde eine interessante Bande in Höhe von 250 kDa dargestellt. Die Klonierung dieses Fusionsproteins erfolgte nur für die TGEVS\_wt Variante. Da die TGEVS\_Y/A Mutante nicht in den Versuch eingesetzt werden konnte, konn-

ten wir nicht sicher sein, dass die 250 kDa Bande auf einer tyrosinbasierten Interaktion beruht. Außerdem ließ sich diese Bande nicht wiederholt nachweisen, sodass sie nicht massenspektrometrisch untersucht werden konnte. Die IFAs mit diesem Konstrukt zeigten eine zytoplasmatische Lokalisierung des Fusionsproteins, da der Membrananker fehlt und sich damit das Transportverhalten vom authentischen S-Protein unterscheidet (Kapitel 5.5.1).

Die Fusion des *HA-tags* erfolgte in zwei unterschiedlichen Varianten. Zum einen wurden die letzten 36 Aminosäuren N-terminal mit dem *HA-tag* fusioniert. In einer zweiten Variante wurde das Signalpeptid des TGEV S-Proteins vor dem *HA-tag* kloniert, und hinter dem *HA-tag* folgten der Membrananker und der zytoplasmatische Abschnitt des S-Proteins. Erst diese Variante ergab in der IFA eine spezifische intrazelluläre Färbung aller drei Konstrukte SpHAMT\_wt, SpHAMT\_Y/A und SpHAMT\_K/M (Kapitel 5.5.3). Die Koimmunpräzipitation zeigte, dass nur das SpHAMT\_wt Protein nach der Expression in IPI2I-Zellen im Western Blot ein Signal für Filamin A ergab (Kapitel 5.5.4). Dies zeigt, dass das Tyrosin im Wildtyp Protein für die Interaktion wichtig ist, aber auch dass die Lokalisierungsinformation für eine Interaktion ausschlaggebend ist. Hiermit haben wir einen weiteren Beweis, dass der zytoplasmatische Abschnitt des TGEV S-Proteins für eine Interaktion mit dem Filamin A sorgt. Diese Interaktion ist aufgehoben, wenn das Tyrosin zu einem Alanin mutiert wurde.

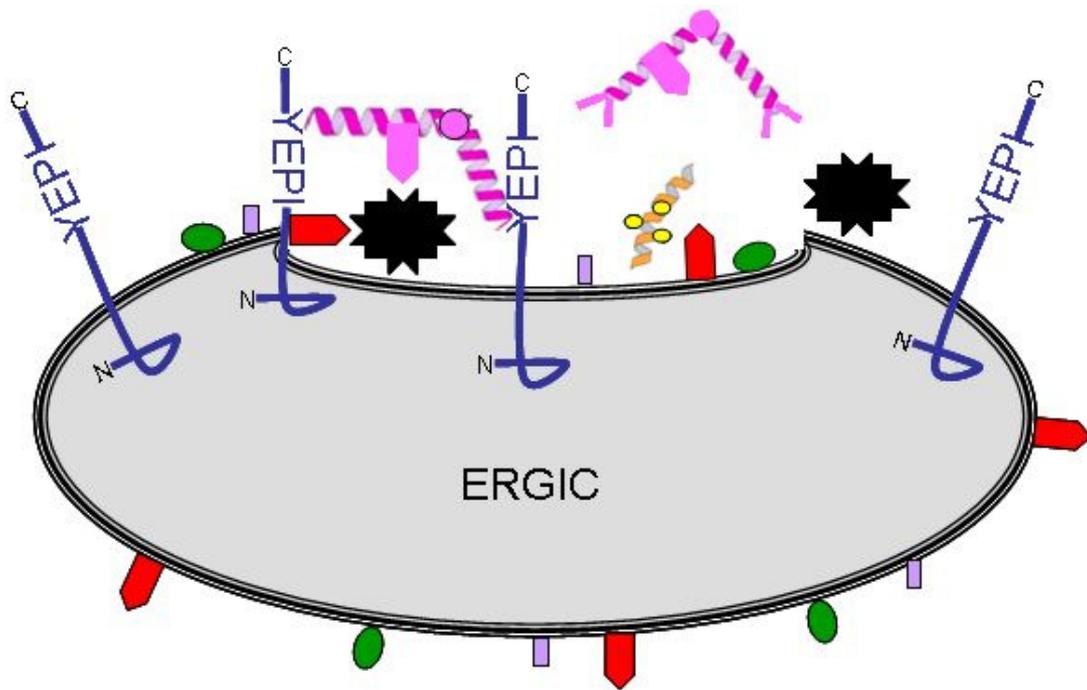
#### 6.2.4 Modell zur Interaktion von Filamin A mit dem TGEV S-Protein im ER-GIC

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Protein Filamin A eine Rolle beim Einbau des TGEV S-Proteins in die Viruspartikel spielen könnte. Im Folgenden wird ein hypothetisches Modell für die Interaktion von Filamin A mit dem S-Protein während des Viruszusammenbaus beschrieben.



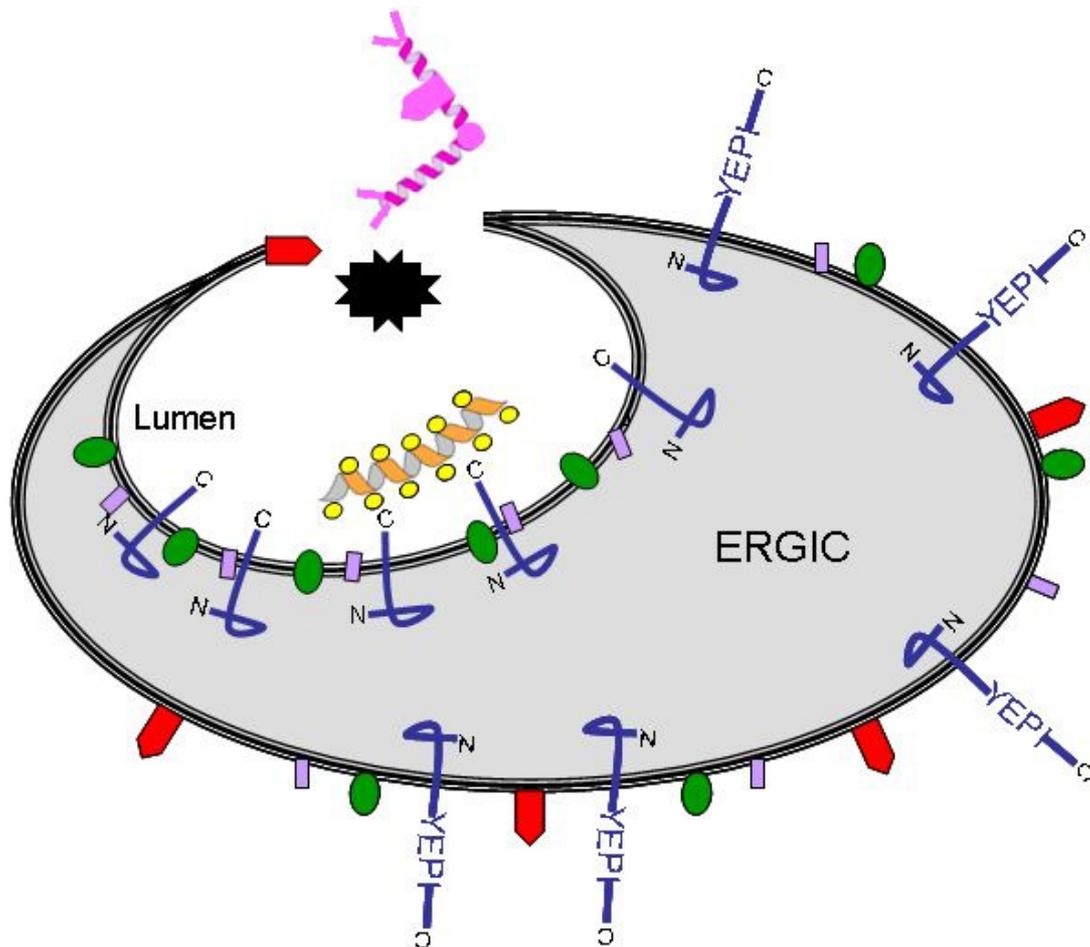
**Abbildung 64:** Nach der Translation liegen die Virusproteine im ERGIC eingebettet vor.

In der Abbildung 64 sind die synthetisierten Virusproteine (S-, M-, und E-Protein) im ERGIC, dem Ort der Virusknospung, dargestellt. Die einzelsträngige Ribonukleinsäure, die mit dem N-Protein assoziiert ist und das Nukleokapsid ausbildet, befindet sich ebenfalls am ERGIC. Im Zytoplasma befinden sich Filamin A sowie verschiedene Proteine wie z.B. ein für diese Abbildung so genanntes Protein X (s. Legende). Der C-terminale Abschnitt mit dem tyrosinbasierten Signal des S-Proteins zeigt in das Zytoplasma. Die Transmembrandomäne des S-Proteins ist in die ERGIC-Membran eingebettet, und die Ektodomäne zeigt in das Lumen des Organells.



**Abbildung 65:** Bildung eines Interaktoms aus Filamin A, Protein X und S-Protein.

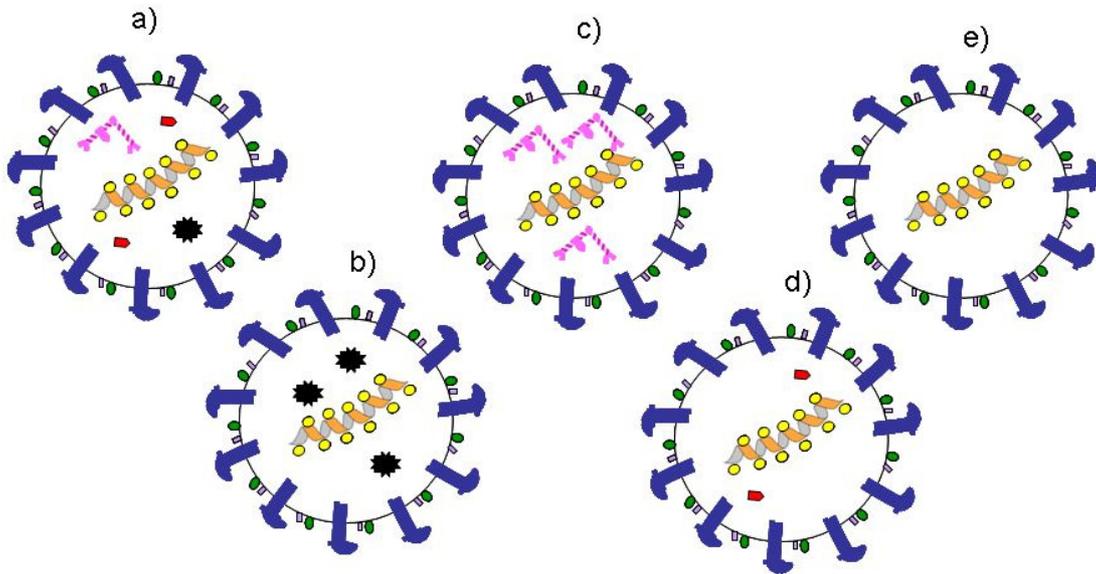
Zu Beginn der Knospung (Abbildung 65) würde Filamin A mit dem Tyrosin des S-Proteinretentionssignals (oder mit mehreren S-Proteinmolekülen) interagieren und gleichzeitig mit einem Protein X, das durch ein Retentionssignal selbst im ERGIC zurückgehalten werden würde (durch ein hypothetisches ERGIC-Erkennungsmotiv).



**Abbildung 66:** Vorgang der Virusknospung. Die ERGIC-Membran stülpt sich mit den enthaltenen Virusproteinen in das ERGIC-Lumen. Dabei wird das Nukleokapsid in das Partikelinnere eingeschlossen.

Beim Einstülpen der ERGIC-Membran (Abbildung 66) gelangt der zytoplasmatische Abschnitt des S-Proteins ins Partikelinnere (Virusknospung). An dieser Stelle könnte die Interaktion des S-Proteins mit Filamin A unterschiedliche Szenarien einnehmen (Abbildung 67). Eine Möglichkeit wäre es, dass das Viruspartikel schließt und alle an der Interaktion beteiligten Proteine Filamin A, Protein X und das Erkennungsmotiv mit eingeschlossen werden würden (Abbildung 67, a). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Filamin A nicht mit eingeschlossen wird und es im Zytoplasma verbleibt. Hingegen würde Protein X in das Viruspartikel integriert werden (Abbildung 67, b). Desweiteren wäre vorstellbar, dass nur Filamin A in das Viruspartikel eingebaut wird (Abbildung 67, c). Die letzten beiden Szenarien spekulieren darauf, dass keine der vorgestellten Wirtsproteine mit in das Viruspartikel eingebaut werden (Abbildung 67, d und e). Abbildung 67 b, d und e würden zum Teil erklä-

ren, warum kein Filamin A im Virus nachgewiesen werden konnte (Kapitel 5.4.2). Die Hypothese des Filamin A-Einbaus in das Viruspartikel (Abbildung 67, a und c) müsste mit geeigneten Experimenten, die in Kapitel 6.6.2 erwähnt wurden, weiter erforscht werden.



**Abbildung 67:** Unterschiedliche Szenarien hinsichtlich des Interaktionspartners für den Einbau des S-Proteins in das Viruspartikel

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

As	Aminosäuren
Abk.	Abkürzung
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 ( <i>Angiotensin-Converting-Enzyme 2</i> )
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APN	Aminopeptidase N
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser ( <i>Aqua bidestillata</i> )
AS	Aminosäure <u>oder</u> <i>Antisense</i> -Primer
bp	Basenpaare
BCoV	Bovines Coronavirus
BHK	<i>Baby hamster kidney</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DANN</i>
CEACAM1	<i>Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1</i>
CoV	Coronavirus
CPE	zytopathischer Effekt
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy3	Carbocyanin-3
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	<i>Ektodomäne</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

EGFP	grün-fluoreszierendes Protein (enhanced green fluorescent protein)
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMEM	Eagle´s Minimum Essential Medium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	Endoplasmatisches Retikulum-Golgi-intermediäres Kompartiment ( <i>Endoplasmic reticulum golgi intermediate compartment</i> )
et al.	und andere ( <i>et alli</i> )
FcoV	Felines Coronavirus
FIPV	<i>Feline infectious peritonitis virus</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm (bezogen auf die Masse) <u>oder</u> Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCoV	Humanes Coronavirus
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HE-Protein	Hämagglutinin-Esterase-Protein
IBV	Infektiöses Bronchitisvirus ( <i>Infectious bronchitis virus</i> )
ICTV	<i>International Committee for the Taxonomy of Viruses</i>
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MHV	Maus-Hepatitisvirus ( <i>Murine hepatitis virus</i> )
min	Minute

---

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> RNA
N-Terminus	Aminoterminus
ORF	Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pAPN	porzine Aminopeptidase
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
POD	Peroxidase
pp	Polyprotein
PRCoV	Porzines Respiratorisches Coronavirus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase- PCR
S	<i>Sense</i> -Primer
SARS	schweres aktue Atemwegssyndrom
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Protein	Spike-Protein
(+)ss-RNA	positivorientierte Einzelstrang-RNA
ST	swine testis
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N', N'-Tetramethylethylendiamin

---

TGEV	Virus der übertragbaren Gastroenteris der Schweine ( <i>Transmissible gastroenteritis virus</i> )
TMD	Transmembrandomäne
TGN38	Trans Golgi Network 38- Protein
U	Einheit ( <i>Unit</i> )
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLPs	Virusähnliche Partikel ( <i>Virus-like particles</i> )
v/v	Volumen zu Volumen
WB	Western Blotanalyse
<i>well</i>	Vertiefung
wt	Wilttyp
w/v	Masse zu Volumen
X	beliebige Aminosäure
$\alpha$	entgegengerichtet (bei Antikörpern)
°C	Grad Celsius
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
$\Phi$	hydrophobe Aminosäure
®	Registriert

## **7.1 Aminosäuren**

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetische Analyse der RNA-abhängigen RNA-Polymerase der Genomsequenzen von Coronaviren (Woo et al., 2009) .....	7
Abbildung 2: Replikationszyklus der Coronaviren (modifiziert aus Stadler et al., 2003).....	10
Abbildung 3: Anordnung der kodierenden Regionen auf der viralen RNA (Enjuanes, 2003) .....	11
Abbildung 4: Elektronenmikroskopisches Bild vom SARS-Coronavirus (Stadler et al., 2003) .....	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Coronavirusaufbaus (modifiziert nach Vabret et al., 2009) .....	13
Abbildung 6: Die clathrinvermittelte Endozytose (Nakatsu und Ohno, 2003) .....	19
Abbildung 7: Bildung und Verkehr von Vesikel im sekretorischen Transport (Gustavo Egea, 2001) .....	21
Abbildung 8: Die Virusknospung und die ESCRT-Pathway (Chen und Lamb 2007) .....	23
Abbildung 9: Vergleich der Struktur von Filamin zwischen <i>Homo sapiens</i> und <i>Dictyostelium discoideum</i> (Popowicz et al., 2006) .....	27
Abbildung 10: Unterschiedliche Funktionen von Filamin A (Popowicz et al., 2006).....	30
Abbildung 11: Schematisches Modell von CCL2 aktiviertem CCR2B in der Zellmembran während der Internalisierung (Minsaas et al., 2010) .....	31
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Prinzips der Hybridisierungs-PCR.....	57
Abbildung 13: Schematische Darstellung eines beladenen TAE-Gels für die präparative Gelaufreinigung.....	59
Abbildung 14: Schematische Darstellung für die Anordnung in der Western Blotkammer: 3 Filterpapiere mit Kathodenpuffer, die NZ-Membran wurde in dest. H <sub>2</sub> O aktiviert, 1 Filterpapier mit Anodenpuffer 2, 2 Filterpapiere mit Anodenpuffer 1. ....	73
Abbildung 15: Schematische Darstellung für das Prinzip des <i>pull-down assays</i> .....	76
Abbildung 16: Übersicht der fluoreszenzmarkierten S-Protein Konstrukte. a-c weisen eine grüne Fluoreszenz auf, d und e leuchten rot. Sp: Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne; ZA zytoplasmatischer Abschnitt.....	80
Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Vergleichs der Einzeldarstellung der Konstrukte TGEVS_wt (A und D) ,TGEVS_GFP (B und E) und GFP_TGEVS (C und F) in BHK21-Zellen. A-C wurden mit Triton-X-100 permeabilisiert (intrazelluläre Detektion) während D-F nicht permeabilisiert wurden (Zelloberflächendetektion).....	81

Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Einzelexpression des Wildtyp S-Proteins (A und E) von TGEV, des GFP markierten Konstrukt (B und F) und der rot fluoreszierenden Konstrukte (C, D, G und H) in BHK21-Zellen. A-D zeigen mit Triton-X-100 behandelte (intrazelluläre Detektion) Zellen, E-H nicht permeabilisierte Zellen (Zelloberflächendetektion).....	82
Abbildung 19: Lysate von BHK21-Zellen transfiziert mit den GFP markierten S-Proteinen. Der Blot wurde mit anti S-Antikörper und anti-Maus Peroxidase behandelt. ....	83
Abbildung 20: Lysate von BHK21-Zellen transfiziert mit den GFP markierten S-Proteinen. Der Blot wurde mit anti GFP-Antikörper und anti Maus-POD behandelt. A) Banden in einer Größenordnung von 250 kDa. B) Banden in einer Größenordnung von 30 kDa. ....	84
Abbildung 21: Oberflächenbiotinylierung mit Protein A-Sepharose der mit <i>cherry</i> oder GFP markierten Konstrukte. Die Protein A-Sepharose wurde an den anti S-Antikörper (6A.C3) oder dem anti GFP-Antikörper gekoppelt. Der Blot wurde mit biotinylierte Streptavidin-Peroxidase detektiert. A) Banden in einer Größenordnung von 250 kDa. B) Banden in einer Größenordnung von 30 kDa. ....	85
Abbildung 22: Einzelexpression der Kompartimentmarkern in BHK21-Zellen. Das Calretikulin stellt den ER-Marker dar (A). Das p53-Protein visualisiert das ERGIC (B). Die $\beta$ -Galaktosyltransferase stellt den Golgi-Apparat dar (C). ....	87
Abbildung 23: Konfokale Aufnahme der Koexpression der Kompartimentmarker mit TGEVS_wt in BHK21-Zellen. A-C zeigen die Koexpression zwischen TGEVS und Calretikulin. D-F zeigen die Koexpression von TGEVS_wt und ERGIC53. G-I zeigen die Koexpression von TGEVS-wt mit der $\beta$ -Galaktosyltransferase. ....	88
Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Koexpression von SpCherryMT und den GFP markierten Kompartimentmarkern. ...	90
Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Koexpression von SpDsRedMT und den GFP markierten Kompartimentmarkern in BHK21-Zellen.....	91
Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Vergleichs von TGEVS_wt (A und D), SpDsRedMT (B und E) und SpGFPMT (C und F) ohne (-) oder mit (+) Cycloheximidbehandlung in BHK21-Zellen.....	92
Abbildung 27: Konfokale Aufnahmen der Kodetektion von TGEVS_wt und den GFP markierten Kompartimentmarkern in BHK21-Zellen. ...	93
Abbildung 28: Konfokale Aufnahmen der Koexpression von TGEVS_wt und den Kompartimentmarkern nach 5 h Cycloheximidbehandlung in BHK21-Zellen.....	94
Abbildung 29: Übersicht der Konstrukte des S-Proteins und seiner Mutanten. ED: Ektodomäne; TMD: Transmembrandomäne; ZA: Zytoplasmatische Domäne. Für die TGEVS_Y/A Mutante wurde das Tyrosin durch ein Alanin getauscht. Die TGEVS_K/M Mutante trägt ein Methionin anstelle eines Lysins. ....	95

Abbildung 30: Konfokale Aufnahmen der Einzelexpression des S-Proteins (A) sowie der Mutanten TGEVS_Y/A (B) und TGEVS_K/M (C) in BHK21-Zellen. ....	96
Abbildung 31: Konfokale Aufnahme der Kodetektion von TGEVS_Y/A mit den fluoreszierenden Kompartimentmarkern in BHK21-Zellen. ....	97
Abbildung 32: Konfokale Aufnahme der Koexpression der Mutante TGEVS_K/M und den fluoreszierenden Kompartimentmarkern in BHK21-Zellen. ....	98
Abbildung 33: Konfokale Aufnahme der Einzelexpression der Kompartimentmarkern (A-C), TGEVS_wt (D), TGEVS_Y/A und TGEVS_K/M (F) in ST-Zellen. ....	99
Abbildung 34: Konfokale Aufnahmen der Kolokalisierung zwischen dem TGEV S-Protein und den GFP markierten Kompartimentmarkern in ST-Zellen. ....	100
Abbildung 35: Konfokale Aufnahme der Einzelexpression von TGEVS_wt (A), TGEVS_K/M (B) und TGEVS_Y/A (C) in IPI2I- Zellen. ....	101
Abbildung 36: Konfokale Aufnahme der Koexpression von TGEVS_wt bzw TGEVS_K/M (A und D) und dem endosomalen Marker RhoGFP (B und E) in BHK21-Zellen. Die Überlagerungen (C und F) zeigen die Kolokalisierungen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. ....	103
Abbildung 37: Konfokale Aufnahme der Kodetektion von TGEVS_wt sowie TGEVS_K/M mit der $\mu$ 2-Untereinheit vom AP2 in BHK21-Zellen. ....	104
Abbildung 38: Konfokale Aufnahme der Kodetektion von TGEVS_wt bzw. TGEVS_K/M und dem spätendosomalen Marker CD63 in Vero-Zellen. ....	105
Abbildung 39: Konfokale Aufnahmen von TGEVS_wt bzw. TGEVS_K/M jeweils vor (4 °C) und nach Herstellung der Endozytosebedingungen (37 °C) in Vero-Zellen. ....	106
Abbildung 40: Konfokale Aufnahmen der Kodetektion von TGEVS_K/M mit der RhoGTPase jeweils vor (A-C) und nach Herstellung der Endozytosebedingungen (D-F) in Vero-Zellen. ....	107
Abbildung 41: Konfokale Aufnahme der Kodetektion von TGEVS_K/M mit dem Tetraspaninprotein CD63 jeweils vor (A-C) und nach Herstellung der Endozytosebedingungen (D-F) in Vero-Zellen. ....	108
Abbildung 42: Konfokale Aufnahme der Einzelexpression von Vps4a_GFP und Vps4Amut_GFP in IPI2I-Zellen. ....	109
Abbildung 43: Konfokale Aufnahmen der Kodetektion von GFP markierten Vps4a-Konstrukte (Wildtyp (A, C) und Mutante (B, D)) und dem S-Protein (Wildtyp (A und B) Mutante (C und D)) in IPI2I-Zellen. ....	110
Abbildung 44: Konfokale Aufnahmen der Kodetektion von TGEV-S Protein nach der TGEV-Infektion mit Vps4aGFP (A-C) bzw. Vps4aGFPmut (D-F) in IPI2I-Zellen. ....	111
Abbildung 45: Plasmidkarte vom pGEX-4T-1 Vektor als Beispiel für GST-Vektoren. ....	113
Abbildung 46: Schematische Darstellung der Fusion der letzten 26 Aminosäuren der S-Proteinen and den GST Vektor (A).	

Fusionsprodukt des GST-Proteins mit den C-terminalen 26aa des TGEV S-Proteins (B). .....	114
Abbildung 47: <i>Coomassie</i> -Gel nach der Aufreinigung von BL21 Bakterien. Ø ist der leere pGEX Vektor. Nicht mit IPTG induzierte Proben wurden mit einem Minuszeichen, induzierte Proben mit einem Pluszeichen versehen.....	115
Abbildung 48: (A) Western Blot mit einem gegen GST gerichteten Primärantikörper und darauffolgende Inkubation mit einem anti Maus Biotin und das Peroxidase gekoppelte Streptavidin. (B) Negativkontrolle, die nur mit anti Maus Biotin und das Peroxidase gekoppelte Streptavidin inkubiert wurde. ....	116
Abbildung 49: <i>Coomassie</i> -Gel der Bakterienlysate. Die Bakterienlysate enthielten das gereinigte Fusionsprotein, das durch die Inkubation mit einem IPI2I-Zellysat (+) an potentielle Interaktionspartner band.....	117
Abbildung 50: Konfokale Aufnahmen (A) und Immundetektion (B) von Filamin A mit Hilfe von anti Kaninchen Filamin A-Antikörper in Zellysaten. ....	119
Abbildung 51: Konfokale Aufnahmen der Kodetektion von Filamin A und dem TGEVS_wt (A-C) bzw. TGEVS_Y/A (D-F). ....	119
Abbildung 52: Western Blot einer Koimmunpräzipitation von Filamin-A mit dem TGEV S-Protein. A) Negativkontrolle mit dem Sekundärantikörper (anti Maus Peroxidase). B) Das S-Protein konnte im Western Blot in eine Höhe um die 300 kDa visualisiert werden.....	120
Abbildung 53: Konfokale Aufnahme der TGEV PUR 46 MAD-Infektion (Antikörper gegen das S-Protein, rot) und Filamin A Detektion (Antikörper gegen Filamin, grün) in ST-Zellen 2 (B), 8 (C) und 24 (D) Stunden nach der Infektion (p.i.). Eine Filamin A Detektion unter nicht infizierten Bedingungen wird in A gezeigt. ....	122
Abbildung 54: Konfokale Aufnahme der VSV-Indiana Infektion (Antikörper gegen G-Protein, rot) und Filamin A Detektion (grün) in ST-Zellen nach 2 h (B), 8 h (C) und 16 h (D). Detektion von Filamin A unter nicht infizierten Bedingungen (A). ....	124
Abbildung 55: Western Blot mit dem Maus anti S-Antikörper (links) und anti Maus Peroxidase). Negativkontrolle mit anti Maus Peroxidase (rechts). ....	125
Abbildung 56: <i>Coomassie</i> -Gel nach der Virusreinigung von TGEV infizierten ST-Zellen.....	126
Abbildung 57: Western Blot mit dem Antikörper gegen Filamin nach der Virusreinigung. BHK21-, IPI2I- und ST-Lysate fungieren als Positivkontrolle (links). ....	127
Abbildung 58: Übersicht der getaggtten S-Protein Konstrukte. a) trägt eine <i>Flag</i> -Sequenz, b) und c) tragen eine <i>HA</i> -Sequenz. Sp: Signalpeptid; TMD: Transmembrandomäne/Membrananker; ZA zytoplasmatischer Abschnitt. ....	127
Abbildung 59: Konfokale Aufnahme der Einzelexpression des Fusionsproteins <i>Flag_S2x16aa</i> ( <i>Flag_S2x16aa</i> ) in BHK21-Zellen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (A, C).....	128

---

Abbildung 60: Silbergel einer Immunpräzipitation mithilfe der <i>FlagM2</i> -beads. Als Negativkontrollen wurden der leere pCGI sowie der leere <i>Flag</i> -Vektor eingesetzt. ....	129
Abbildung 61: Konfokale Aufnahmen der Einzelexpression der <i>HA</i> -Fusionsproteinen in BHK21-Zellen. Die Konstrukte zeigten den Austausch der Ektodomäne des S-Proteins durch den <i>HA-tag</i> . A zeigt den Wildtyp, B die Y/A Mutante und C die K/M Mutante. ....	130
Abbildung 62: Western Blot detektiert mit einem anti Filamin A-Antikörper. Die Proben wurden mit anti HA-Antikörper immunpräzipitiert und potentielle Interaktionspartner des Tyrosinmotivs isoliert. ....	131
Abbildung 63: Western Blot mit dem gegen Filamin A gerichteten Antikörper. (A) IPI2I-Lysate vor der Aufreinigung. (B) Aufgereinigte Fusionsproteine. ....	132
Abbildung 64: Vorgang der Virusknospung. Die ERGIC-Membran stülpt sich mit den enthaltenen Virusproteinen in das ERGIC-Lumen. Dabei wird das Nukleokapsid in das Partikelinnere eingeschlossen. ....	151
Abbildung 65: Unterschiedliche Szenarien hinsichtlich des Interaktionspartners für den Einbau des S-Proteins in das Viruspartikel. ....	152

---

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der von Coronaviren verursachten Erkrankungen und der zellulären Rezeptoren (APN=Aminopeptidase N).....	8
Tabelle 2: Viren, die den ESCRT bzw. den Vps-Transportweg nutzen .....	25
Tabelle 3: Liste der bekannten Filamine.....	28
Tabelle 4: Interaktionspartner von Filamin .....	29
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Zelllinien und ihre Medien	36
Tabelle 6: Größe und Zugangsnummer des S-Proteins von TGEV .....	38
Tabelle 7: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer .....	46
Tabelle 8: Liste der verwendeten Primärantikörper .....	47
Tabelle 9: Liste der verwendeten Sekundärantikörper .....	48
Tabelle 10: Liste der cDNA-Konstrukte .....	55
Tabelle 11: Ansatz für Pfu-PCR .....	56
Tabelle 12: Programm für <i>Pfu</i> -PCR.....	56
Tabelle 13: Ansatz für Hybridisierungs-PCR .....	58
Tabelle 14: Programm für Hybridisierungs-PCR .....	58
Tabelle 15: Ansatz für eine alkalische Dephosphorylierung .....	60
Tabelle 16: Ligationsansatz.....	61
Tabelle 17: Ansatz für eine Kolonie-PCR .....	62
Tabelle 18: Programm für eine Kolonie-PCR .....	63
Tabelle 19: Aussaatzahlen der verwendeten Zelllinie .....	65
Tabelle 20: Resultate der Massenspektrometrie.. .....	118

---

## 10. Anhang

### Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

#### TGEV (PUR-46 MAD) S-Protein

##### Nukleotidsequenz (4.344 bp):

```
atgaaaaaactatTTGTGGTTTTGGTCGTAATGCCATTGATTTATGGAGA  
caatTTTCCTTGTTCTAAATTGACTAATAGAACTATAGGCAACCAAGTGG  
atctcattgaaaccttCCTTCTAAACTATAGTAGTAGGTTACCACCTAAT  
tcagatgtggtgTtaggtgattTTTTCTACTGTACAACCTTGGTTTAA  
ttgcattcgcaatgatagtaatGACCTTTATGTTACTACTGGAAAATCTTA  
aagcattgtattGGGATTATGCTACAGAAAATATCACTTGGAAATCACAGA  
caacggttaaACGTAGTCGTTAATGGATACCCATACTCCATCACAGTTAC  
aacaaccCGCAATTTAATTCTGCTGAAGGTGCTATTATATGCATTTGTA  
agggctcaccactactaccaccacagaatctagTTTGACTTGCAATTGG  
ggtagtgagTgcaggttaaaccataagttccctatatgtccttctaattc  
agaggcaaattgtggtaatatgctgtatggcctacaatggTTTGCAGATG  
aggttgttgcttatttacatggTgctagttaccgTattagTTTTGAAAAT  
caatggTctggcactgtcacattTGGTGATATGCGTGCACAACATTAGA  
agtCGCTGGCAGCTGTAGACCTTTGGTGGTTAATCCTGTTTATGATG  
tcagttattatagggTtaataataaaaaatggTactaccgtagTTTCCAAT  
tgactgatcaatgtgctagttatgtggctaattTTTTACTACACAGCC  
aggaggtTTTATACCATCAGATTTTAGTTTTAATAATTGGTTCCTTCTAA  
ctaataGCTCCACGTTGGTTAGTGGTAAATTAGTTACCAAACAGCCGTTA  
ttagTtaattgcttatggccagTccctagctTTGAGAAGCAGCTTCTAC  
atTTTGTTTTGAGGGTGTGGCTTTGATCAATGTAATGGTGTGTTTTAA  
ataaactgtagacgtcattaggtTcaaccttaattTTACTACAAATGTA  
caatcaggtAagggTgccacagTgttttcattgaacacaacgggtggTgt  
cactctTgaaatttcatgttatacagTgagTgactcgagctTTTTcagtt  
acggtgaaattccgttcggcGtaactgatggaccggtactgttacgta  
cactataatggcacagctcttaagTatttaggaacattaccacctagTgt  
caaggagattgctattagTaaTggggccatTTTTatattaatggTtaca  
atTTCTTtagcacatttCctattgattgtatatctTTTaatTTgaccact  
ggTgatagTgacgtTTTctggacaatagctTtacacatcgtactgaagc  
attagTacaagTtgaaaacacagctattacaaggtgacgtattgtaata  
gtcacgttaataacattaaatgctctcaaattactgctaattTgaataat  
ggattTTatcctgtttcttcaagTgaagTtggTctTgtcaataagagTgt  
tgtgttactacctagctTTTtacacacataccattgttaacataactattg  
gtctTggTatgaagcgtagTggTtatggTcaaccatagcctcaacatta  
agTaacatcacactaccaatgcaggatcacaacaccgatgtgtactgtat
```

tcgttctgaccaatthttcagtttatgttcattctacttgcaaaagtgcct  
tatgggacaatatthtttaagcgaactgcacggacgthtttagatgccaca  
gctgtataaaaactggacttgcctttctcatttgataaattgaacaa  
ttacttaactthtttaacaagttctgtttgtcgttgagtctgttggtgcta  
attgtaagtttgatgtagctgcccgtacaagaaccaatgagcaggttggt  
agaagtttgatgtaatatatgaagaaggagacaacatagtgggtgtacc  
gtctgataatagtgggtgtgcacgatttgtcagtgctacacctagattcct  
gcacagattacaatatatggtagaactgggtgttggtattattagacaa  
actaacaggacgctacttagtggcttatattacacatcactatcaggtga  
tttgtaggtthtttaaaaatgtagtgatgggtgcatctactctgtaacgc  
catgtgatgtaagcgcacaagcagctgttattgatgggtaccatagttggg  
gctatcacttccattaacagtgaactgtaggtctaacacattggacaac  
aacacctaathtttattactactctatatataattacacaaatgatagga  
ctcgtggcactgcaattgacagtaatgatggtgattgtgaacctgtcata  
acctattctaacataggtgthttgtaaaaatgggtgctthttgtthttatta  
cgtcacacattctgatggagacgtgcaaccaattagcactggtaatgtca  
cgatacctacaaactttaccatatccgtgcaagtcgaatatattcaggtt  
tactactacaccagtgcaatagactgttcaagatatgthttgtaatggtaa  
ccctaggtgtaacaaattgtaacacaatacgtthttctgcatgtcaacta  
ttgagcaagcacttgcaatgggtgccagacttgaaaacatggaggttgat  
tccatgthttgtthttctgaaaatgcccttaaatggcatctgttgaagc  
attcaatagttcagaaactthtagaccctatttacaagaatggcctaata  
taggtggttcttggctagaaggtctaaaatacacttccgtcccataat  
agcaaacgtaagatcgttcagctatagaggacttgctthtttgataaggt  
tgtaacatctgthtttaggtacagttgatgaagattataaacgthttgtacag  
gtggttatgacatagctgacttagtatgtgctcaatactataatggcatc  
atggtgctacctggtgtggctaatactgacaaaatgactatgtacacagc  
atcccttgcaggtggtataacattaggtgcacttgggtggaggcgccgtgg  
ctatacctthttgcagtagcagttcaggctagacttaattatgthttgctcta  
caaactgatgtattgaacaaaaaccagcagattctggctagtgcctthcaa  
tcaagctattggtaacattacacagtcattthggttaaggthttatgatgcta  
tacatcaaacatcacgaggtcttgctactgthttgctaaagcattggcaaaa  
gtgcaagatgthttgcaacatacaagggcaagctthtaagccacctaacagt  
acaattgcaaaaataatthccaagccattagtagthttctattagtacattt  
ataataggcttgacgaattgagtgctgatgcacaagttgacaggctgatc  
acaggaagacttacagcacttaatgcattthgtgtctcagactctaaccag  
acaagcggaggttagggctagtagacaacttgccaaagacaaggttaatg  
aatgcttaggtctcagctcagagattcggattctgtggttaatggtaca  
cattthgtthttcactcgcaaatgcagcaccacaaatggcatgattthctthca  
cacagtgcattaccaacggcttatgaaactgtgactgctthggccaggta  
thttgtgcttcagatggtgatcgactthttggactthgtcgttaagatgtc  
cagthtgactthgtthttcgtaactctagatgacaagthttctattthgacccccag  
aactatgtatcagcctagagthttgcaactagthttctgactthgtthcaattg

aaggggtgcatgtgctgtttgttaatgcaactgtaagtgatttgcttagt  
 attatacctgattatattgatattaatcagactgttcaagacatattaga  
 aaatTTtagaccaaattggactgtacctgagttgacatttgacattTTta  
 acgcaacctatttaaacctgactggtgaaattgatgacttagaatttagg  
 tcagaaaagctacataacaccactgtagaacttgccattctcattgacaa  
 cattaacaatacatttagtcaatcttgaatggctcaatagaattgaaacct  
 atgtaaaatggccttggatgtgtggctactaataggcttagtagtaata  
 ttttgcataccattactgctattttgctggttagtacaggttgctgtgg  
 atgcataggttgttttaggaagttggtgtcactctatatgtagtagaagac  
 aatttgaaaattacgaaccaattgaaaaagtgcacgtccattaa

### Aminosäuresequenz (1.447 AS):

MKKLFFVVLVVMPLIYGDNFPCSKLTNRTIGNQWNLIETFLNLYSSRLPPN  
 SDVVLGDYFPTVQPWFNCIRNDSNDLYVTLENLKALYWDYATENITWNHR  
 QRLNVVNGYPYSITVTTTRNFNSAEGAIICICKGSPPTTTTESLTCNW  
 GSECRLNHKFPICPSNSEANCGNMLYGLQWFADEVVAYLHGASYRISFEN  
 QWSGTVTFGDMRATTLEVAGTLVDLWVFNVPYDVSYYRVNKNKNGTTVVSN  
 CTDQCASYVANVFTTQPGGFIPSDFSFNWFLLTNSSTLVSGKLVTKQPL  
 LVNCLWPVPSFEEAASFCEGAGFDQCNGAVLNNTVDVIRFNLNFTTNV  
 QSGKGATVFSLNTTGGVTLEISCYTVSDSSFFSYGEIPFGVTDGPRYCYV  
 HYNGTALKYLGTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCISFNLT  
 GDSDFVFTIAYTSYTEALVQVENTAITKVTYCNSHVNNIKCSQITANLNN  
 GFYPVSSSEVGLVNKSVLLPSFYHTIVNITIGLGMKRSGYGQPIASTL  
 SNIITLPMQDHNNTDYVICRSDQFSVYVHSTCKSALWDNIFKRNCTDVLDA  
 AVIKTGTCPFSFDKLNLYLTFNKFCLSLSPVGANCKFDVAARTRTNEQVV  
 RSLYVIYEEGDNIVGVPSDNSGVHDLVSLHLDSDTDYNIYGRITGVGIIRQ  
 TNRTLLSGLYYSLSGLLGFKNVSDGVIYSVTPCDVSAQAVIDGTIVG  
 AITSINSELLGLTHWTTTPNFYYYSINYTNDRTRGTAIDSNDVDCEPVI  
 TYSNIGVCKNGAFVFINVTHSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQV  
 YTPVSIDCSRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQTEQALAMGARLENMEVD  
 SMLFVSENAKLASVEAFNSSETLDPYKEWPNIGGSWLEGLKYILPSHN  
 SKRKYRSAIEDLLFDKVVTSGLGTVEDEYKRCCTGGYDIADLVCAQYYNGI  
 MVLPGVANADKMTMYTASLAGGITLALGGGAVAIPIFAVAVQARLNYVAL  
 QTDVLNKNQQILASAFNQAINITQSFQKVNDAIHQTSRGLATVAKALAK  
 VQDVVNIQGGALSHLTVQLQNNFQAISSSISDIYNRLDELSADAQVDRLI  
 TGRLTALNAFVSQTLTRQAEVRASRQLAKDKVNECVRSQSQRFGFCGNGT  
 HLFSLANAAPNGMIFHTVLLPTAYETVTAWPGICASDGDRTFGLVVKDV  
 QLTFLFRNLDDKFYLTPTMYQPRVATSSDFVQIEGCDVLFVNATVSDLPS  
 IIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPELTFDIFNATYLNLTGEIDDLEFR  
 SEKLHNTTVELAILIDNINNTLVNLEWLNRIETYVKWPWYVWLLIGLVVI  
 FCIPLLLFCSTGCCGICGLGSCCHSICSRQFEN YEPIEKVHVH

Sample	Position	Accession no	Database	Protein name	kDa	Mascot Score
Bande 1	E 1	K2C1_HUMAN	Swiss-Prot	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	65999	105
		K1C9_HUMAN	Swiss-Prot	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	65027	69
Bande 2	E 2	TRYP_PIG	Swiss-Prot	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	24394	128
		GSTZ6_SCHJA	Swiss-Prot	Glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isozyme OS=Schistosoma japonicum PE=1 SV=3	25482	65
		FLNA_HUMAN	Swiss-Prot	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4	280564	63
Bande 3	E 3	TRYP_PIG	Swiss-Prot	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	24394	148
		GSTZ6_SCHJA	Swiss-Prot	Glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isozyme OS=Schistosoma japonicum PE=1 SV=3	25482	48
Bande 4 (leer)	E 4	TRYP_PIG	Swiss-Prot	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	24394	145
BSA 1	E 5	K2Z2_HUMAN	Swiss-Prot	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	65393	629
		K1C10_HUMAN	Swiss-Prot	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	58792	300
		ALBU_BOVIN	Swiss-Prot	Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	69246	245
		K2C1_Human	Swiss-Prot	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	65999	130
BSA 1	E 6	ALBU_BOVIN	Swiss-Prot	Serum albumin OS=Bos taurus GN=ALB PE=1 SV=4	69246	449
		TRYP_PIG	Swiss-Prot	Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1	24394	182

---

## 11. Literaturverzeichnis

Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD. **The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function.** EMBO J. 1998 Jun 1;17(11):2982-93.

Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD. **Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body.** Dev Cell. 2002 Aug;3(2):283-9.

Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD. **Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting.** Dev Cell. 2002 Aug;3(2):271-82.

Baric RS, Nelson GW, Fleming JO, Deans RJ, Keck JG, Casteel N, Stohlman SA. **Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription.** J Virol. 1988 Nov;62(11):4280-7.

Baudoux P, Carrat C, Besnardeau L, Charley B, Laude H. **Coronavirus pseudoparticles formed with recombinant M and E proteins induce alpha interferon synthesis by leukocytes.** J Virol. 1998 Nov;72(11):8636-43.

Bieniasz PD. **Late budding domains and host proteins in enveloped virus release.** Virology. 2006 Jan 5;344(1):55-63. Review

Bishop AL, Hall A. **Rho GTPases and their effector proteins.** Biochem J. 2000 Jun 1;348 Pt 2:241-55. Review.

Bishop N, Woodman P. **TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes.** J Biol Chem. 2001 Apr 13;276(15):11735-42. Epub 2000 Dec 27.

Bonifacino JS, Dell'Angelica EC. **Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals.** J Cell Biol. 1999 May 31;145(5):923-6. Review.

Canfield WM, Johnson KF, Ye RD, Gregory W, Kornfeld S. **Localization of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail.** J Biol Chem. 1991 Mar 25;266(9).

Cathomen T, Buchholz CJ, Spielhofer P, Cattaneo R. **Preferential initiation at the second AUG of the measles virus F mRNA: a role for the long untranslated region.** Virology. 1995 Dec 20;214(2):628-32.

Cavanagh D. (1995) **The coronavirus surface Glykoprotein** In: The Coronaviridae S. 73-103, Siddell S. G., Plenum Press, New York

Cavanagh D. **Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae.** Arch Virol. 1997;142(3):629-33.

Chang R.Y. und D.A. Brian. **Cis requirement for N-specific protein sequence in bovine coronavirus defective interfering RNA replication.** J.Virol. 70, 2201-2207. 1996.

Charley B, Laude H. **Induction of alpha interferon by transmissible gastroenteritis coronavirus: role of transmembrane Glykoprotein E1.** J Virol. 1988 Jan;62(1):8-11.

Chen BJ, Lamb RA. **Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT?** Virology. 2008 Mar 15;372(2):221-32.

Collawn JF, Stangel M, Kuhn LA, Esekogwu V, Jing SQ, Trowbridge IS, Tainer JA. **Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis.** Cell. 1990 Nov 30;63(5):1061-72.

Compton SR, Rogers DB, Holmes KV, Fertsch D, Remenick J, McGowan JJ. **In vitro replication of mouse hepatitis virus strain A59.** J Virol. 1987 Jun;61(6):1814-20.

De Vries A.A, Horzinek M.C., Rottier P.J. und Groot. **The genome organisation of the nidovirales: similarities and differences between arteri-, toro, and coronaviruses.** *Seminars Virol.* 1997. 8, 33-47.

Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjöström H, Norén O, Laude H. **Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV.** Nature. 1992 Jun 4;357(6377):417-20.

Demirov DG, Freed EO. **Retrovirus budding.** Virus Res. 2004 Dec;106(2):87-102. Review.

Domingo E, Holland JJ. **RNA virus mutations and fitness for survival.** Annu Rev Microbiol. 1997;51:151-78. Review.

Doyle LP, Hutchings LM. **A transmissible gastroenteritis in pigs.** J Am Vet Med Assoc. 1946 Apr;108:257-9.

Dubois-Dalcq ME, Doller EW, Haspel MV, Holmes KV. **Cell tropism and expression of mouse hepatitis viruses (MHV) in mouse spinal cord cultures.** Virology. 1982 Jun;119(2):317-31.

Dveksler GS, Pensiero MN, Cardellichio CB, Williams RK, Jiang GS, Holmes KV, Dieffenbach CW. **Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV.** J Virol. 1991 Dec;65(12):6881-91.

Egea G. **Ciencia al día Internacional.** 2001 No.2 Volumen 4

Enjuanes, L., D. Brian, D. Cavanagh, K. Holmes, M.M.C. Lai, H. Laude, P. Masters, P.Rottier, S.G. Siddell, W.J.M. Spaan, F. Taguchi und P. Talbot. **Coronaviridae.** Aus: M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L Bishop,

E.B. Carsten, M.K. Estes, S.M Lemon, M.A. Mayo, D.J.McGeoch, C.R. Pringle und R.B.Wickner (Hrsg.) **Virus Taxonomy**. S.835-849. 2000

Enjuanes L. **Cours de virology- Coronaviridae- Les Coronavirus**. <http://virologie.free.fr/34-Coronaviridae/coronaviridae.htm>.2003

Escors D, Ortego J, Enjuanes L. **The membrane M protein of the transmissible gastroenteritis coronavirus binds to the internal core through the carboxy-terminus**. Adv Exp Med Biol. 2001;494:589-93.

Felder CC, Kanterman RY, Ma AL, Axelrod J. **Serotonin stimulates phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Mar;87(6):2187-91.

Fischer N, Heinkelein M, Lindemann D, Enssle J, Baum C, Werder E, Zentgraf H, Müller JG, Rethwilm A. **Foamy virus particle formation**. J Virol. 1998 Feb;72(2):1610-5.

Fisher RD, Chung HY, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP. **Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding**. Cell. 2007 Mar 9;128(5):841-52.

Freed EO. **Mechanisms of enveloped virus release**. Virus Res. 2004 Dec;106(2):85-6.

Fucini P, Renner C, Herberhold C, Noegel AA, Holak TA. **The repeating segments of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120) have an immunoglobulin-like fold**. Nat Struct Biol. 1997 Mar;4(3):223-30.

Fujita H, Yamanaka M, Imamura K, Tanaka Y, Nara A, Yoshimori T, Yokota S, Himeno M. **A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: class E vps phenotype in mammalian cells**. J Cell Sci. 2003 Jan 15;116(Pt 2):401-14.

Gallagher TM, Parker SE, Buchmeier MJ. **Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike Glykoprotein**. J Virol. 1990 Feb;64(2):731-41.  
Gallagher TM, Buchmeier MJ. **Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis**. Virology. 2001 Jan 20;279(2):371-4.

Garoff H., et al. **Virus maturation by budding**. *Microbiology and Molecular biology Reviews*. 1998; 62 (4):1171-1190.

Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Côté M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI. **Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding**. Cell. 2001 Oct 5;107(1):55-65.

- Garwes, D.J. **Pathogenesis of the porcine coronaviruses.** Aus: **S.G.Siddell** (Hrsg.) **The Coronaviridae**. Plenum Press, New York, S.377-388. 1995.
- Godet M, Rasschaert D, Laude H. **Processing and antigenicity of entire and anchor-free spike Glykoprotein S of coronavirus TGEV expressed by recombinant baculovirus.** *Virology*. 1991 Dec;185(2):732-40.
- Godet M, L'Haridon R, Vautherot JF, Laude H. **TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions.** *Virology*. 1992 Jun;188(2):666-75.
- Gebauer F, Posthumus WP, Correa I, Suñé C, Smerdou C, Sánchez CM, Lenstra JA, Melen RH, Enjuanes L. **Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis coronavirus S Glykoprotein.** *Virology*. 1991 Jul;183(1):225-38.
- Goldsmith CS, Tatti KM, Ksiazek TG, Rollin PE, Comer JA, Lee WW, Rota PA, Bankamp B, Bellini WJ, Zaki SR. **Ultrastructural characterization of SARS coronavirus.** *Emerg Infect Dis*. 2004 Feb;10(2):320-6.
- González JM, Gomez-Puertas P, Cavanagh D, Gorbalenya AE, Enjuanes L. **A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae.** *Arch Virol*. 2003 Nov;148(11):2207-35.
- Gorbalenya A. E. et al. (2006) **Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome** *Virus Research*, 117, 17–37
- Griffiths G, Rottier P. **Cell biology of viruses that assemble along the biosynthetic pathway.** *Semin Cell Biol*. 1992 Oct;3(5):367-.
- Hansen GH, Delmas B, Besnardeau L, Vogel LK, Laude H, Sjöström H, Norén O. **The coronavirus transmissible gastroenteritis virus causes infection after receptor-mediated endocytosis and acid-dependent fusion with an intracellular compartment.** *J Virol*. 1998 Jan;72(1):527-34.
- Hauri HP, Kappeler F, Andersson H, Appenzeller C. **ERGIC53 and traffic in the secretory pathway.** *J Cell Sci*. 2000 Feb;113 ( Pt 4):587-96. Review.
- Hooper BE, Haelterman EO. **Lesions of the gastrointestinal tract of pigs infected with transmissible gastroenteritis.** *Can J Comp Med*. 1969 Jan;33(1):29-36.
- Hunziker W, Harter C, Matter K, Mellman I. **Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant.** *Cell*. 1991 Sep 6;66(5):907-20.
- Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. **Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum.** *EMBO J*. 1990 Oct;9(10):3153-62.

Jimenez-Baranda S, Gomez-Mouton C, Rojas A, Martinez-Prats L, Mira E, et al. **Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors.** *Nat Cell Biol.* 2007;9:838–846

Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG. **A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery.** *Cell.* 2005;123:305–320.

Kaeffer B, Bottreau E, Velge P, Pardon P. **Epithelioid and fibroblastic cell lines derived from the ileum of an adult histocompatible miniature boar (d/d haplotype) and immortalized by SV40 plasmid.** *Eur J Cell Biol.* 1993 Oct;62(1):152-62.

Kaelin WG Jr, Pallas DC, DeCaprio JA, Kaye FJ, Livingston DM. **Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product.** *Cell.* 1991 Feb 8;64(3):521-32.

Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. **Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I.** *Cell.* 2001 Jul 27;106(2):145-55.

Kirchhausen T, Bonifacino JS, Riezman H. **Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins.** *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Aug;9(4):488-95. Review.

Klumperman J, Locker JK, Meijer A, Horzinek MC, Geuze HJ, Rottier PJ. **Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding.** *J Virol.* 1994 Oct;68(10):6523-34.

Klumperman J, Schweizer A, Clausen H, Tang BL, Hong W, Oorschot V, Hauri HP. **The recycling pathway of protein ERGIC53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment.** *J Cell Sci.* 1998 Nov;111 ( Pt 22):3411-25.

Knuth M. **Identifizierung und Charakterisierung von FIP, einem neuen Filamin-bindenden Protein.** Dissertation von 2001

Kreis TE, Pepperkok R. **Coat proteins in intracellular membrane transport.** *Curr Opin Cell Biol.* 1994 Aug;6(4):533-7. Review.

Krijnse-Locker J. et al. (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** *The Journal of Cell Biology*, 124 (1 und 2): 55-70

Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox

N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ; SARS Working Group. **A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome.** N Engl J Med. 2003 May 15;348(20):1953-66. Epub 2003 Apr 10.

Lai MM, Cavanagh D. **The molecular biology of coronaviruses.** Adv Virus Res. 1997;48:1-100.

Lambert C, Döring T, Prange R. **Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin.** Virol. 2007 Sep;81(17):9050-60. Epub 2007 Jun 6.

Laude H, Rasschaert D, Huet JC. **Sequence and N-terminal processing of the transmembrane protein E1 of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus.** J Gen Virol. 1987 Jun;68 ( Pt 6):1687-93.

Laude H, Rasschaert D, Delmas B, Godet M, Gelfi J, Charley B. **Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus.** Vet Microbiol. 1990 Jun;23(1-4):147-54. Review.

Laude H. und Masters P.S. **The coronavirus nucleocapsid protein.** Aus: S.G. Siddell (Hrsg.) **The Coronaviridae**, Plenum Press, New York, S.157, 47-57.1987

Laude H. und Masters P.S. **The coronavirus nucleocapsid protein.** In: S.G. Siddell (Hrsg.) **The Coronaviridae 1995**, Plenum Press, New York, S.141-163.

Le Borgne R, Hoflack B. **Mechanisms of protein sorting and coat assembly: insights from the clathrin-coated vesicle pathway.** Curr Opin Cell Biol. 1998 Aug;10(4):499-503. Review.

Le Borgne R, Hoflack B. **Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells.** Biochim Biophys Acta. 1998 Aug 14;1404(1-2):195-209. Review.

Lee M.C.S, E.A. Miller, J. Goldberg, L.cOrci und R. Schekman. **Bi-directional protein transport between ER and Golgi.** Annu.Rev Cell.Dev.Biol.20, 87-123. 2004.

Lemmon M A and Ferguson K M. **Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains.** Biochem J. 2000 August 15; 350(Pt 1): 1–18.

Letourneur F, Klausner RD. **A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains.** Cell. 1992 Jun 26;69(7):1143-57.

Lewicki DN, Gallagher TM. **Quaternary structure of coronavirus spikes in complex with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule cellular receptors.** J Biol Chem. 2002 May 31;277(22):19727-34. Epub 2002.

Li M, Li C, Weingarten P, Bunzow JR, Grandy DK, Zhou QY. **Association of dopamine D(3) receptors with actin-binding protein 280 (ABP-280).** *Biochem Pharmacol.* 2002 Mar 1;63(5):859-63.

Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. **Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus.** *Nature.* 2003 Nov 27;426(6965):450-4.

Licata JM, Simpson-Holley M, Wright NT, Han Z, Paragas J, Harty RN. **Overlapping motifs (PTAP and PPEY) within the Ebola virus VP40 protein function independently as late budding domains: involvement of host proteins TSG101 and VPS-4.** *J Virol.* 2003 Feb;77(3):1812-9.

MacNaughton MR. **The genomes of three coronaviruses.** *FEBS Lett.* 1978 Oct 15;94(2):191-4.

Mallabiabarrena A, Fresno M, Alarcón B. **An endoplasmic reticulum retention signal in the CD3 epsilon chain of the T-cell receptor.** *Nature.* 1992 Jun 18;357(6379):593-6.

Mallabiabarrena A, Jiménez MA, Rico M, Alarcón B. **A tyrosine-containing motif mediates ER retention of CD3-epsilon and adopts a helix-turn structure.** *EMBO J.* 1995 May 15;14(10):2257-68.

Martin-Serrano J, Eastman SW, Chung W, Bieniasz PD. **HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway.** *J Cell Biol.* 2005 Jan 3;168(1):89-101. Epub 2004 Dec 28.

Martínez-Menárguez JA, Geuze HJ, Slot JW, Klumperman J. **Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles.** *Cell.* 1999 Jul 9;98(1):81-90.

Mellman I. **Endocytosis and molecular sorting.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:575-625. Review.

Merrifield CJ, Feldman ME, Wan L, Almers W. **Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits.** *Nat Cell Biol.* 2002;4:691-698.

Minsaas L, Planagumà J, Madziva M, Krakstad BF, Masià-Balagué M, Katz AA, Aragay AM. **Filamin a binds to CCR2B and regulates its internalization.** *PLoS One.* 2010 Aug 17;5(8):e12212.

Moll M, Klenk HD, and Maisner A. **Importance of the Cytoplasmic Tails of the Measles Virus Glycoproteins for Fusogenic Activity and the Generation of Recombinant Measles Viruses.** *J Virol.* 2002 July; 76(14): 7174-7186. doi: 10.1128/JVI.76.14.7174-7186.2002

Morita E, Sundquist WI. **Retrovirus budding.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:395-425. Review.

Munro S, Pelham HR. **A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins.** *Cell.* 1987 Mar 13;48(5):899-907

Nakatsu F, Ohno H. **Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network.** *Cell Struct Funct.* 2003 Oct;28(5):419-29. Review.

Nilsson T. et al. **Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum** *Cell*, 1989. 58: 707-718

Novoa RR, Calderita G, Arranz R, Fontana J, Granzow H, Risco C. **Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis.** *Biol Cell.* 2005 Feb;97(2):147-72. Review.

Ohta Y, Suzuki N, Nakamura S, Hartwig JH, Stossel TP. **The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2122–2128

Orlinick JR, Chao MV. **Interactions of cellular polypeptides with the cytoplasmic domain of the mouse Fas antigen.** *J Biol Chem.* 1996 Apr 12;271(15):8627-32.

Owen DJ, Evans PR. **A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals.** *Science.* 1998 Nov 13;282(5392):1327-32.

Patton GS, Morris SA, Chung W, Bieniasz PD, McClure MO. **Identification of domains in gag important for prototypic foamy virus egress.** *J Virol.* 2005 May;79(10):6392-9.

Paul A. **Charakterisierung des intrazellulären Transports des Spike-Proteins des Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine.** Biologische Diplomarbeit, 2006

Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M. **Endosomes, exosomes and Trojan viruses.** *Trends Microbiol.* 2004 Jul;12(7):310-6.

Pensaert M, Haelterman EO, Hinsman EJ. **Transmissible gastroenteritis of swine: virus-intestinal cell interactions. II. Electron microscopy of the epithelium in isolated jejunal loops.** *Arch Gesamte Virusforsch.* 1970;31(3):335-51.

Petrecchia K, Miller DM, Shrier A. **Localization and enhanced current density of the Kv4.2 potassium channel by interaction with the actin-binding protein filamin** *J Neurosci.* 2000 Dec 1;20(23):8736-44.

- Popowicz GM, Schleicher M, Noegel AA, Holak TA. **Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton.** Trends Biochem Sci. 2006 Jul;31(7):411-9. Epub 2006 Jun 16. Review.
- Pornillos O, Alam SL, Davis DR, Sundquist WI. **Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein.** Nat Struct Biol. 2002 Nov;9(11):812-7.
- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B. **The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification.** Methods. 2001 Jul;24(3):218-29. Review.
- Radhakrishnan A, Yeo D, Brown G, Myaing MZ, Iyer LR, Fleck R, Tan BH, Aitken J, Sanmun D, Tang K, Yarwood A, Brink J, Sugrue RJ. **Protein analysis of purified respiratory syncytial virus particles reveals an important role for heat shock protein 90 in virus particle assembly.** Mol Cell Proteomics. 2010 Sep;9(9):1829-48. Epub 2010 Jun 8.
- Rambourg A, Clermont Y. **Three-dimensional electron microscopy: structure of the Golgi apparatus.** Eur J Cell Biol. 1990 Apr;51(2):189-200.
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. **A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration.** Nat Biotechnol. 1999 Oct;17(10):1030-2.
- Risco C, Antón IM, Enjuanes L, Carrascosa JL. **The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins.** J Virol. 1996 Jul;70(7):4773-7.
- Risco C, Antón IM, Muntión M, González JM, Carrascosa JL, Enjuanes L. **Structure and intracellular assembly of the transmissible gastroenteritis coronavirus.** Adv Exp Med Biol. 1998;440:341-6.
- Roberts RJ, Macelis D. **REBASE--restriction enzymes and methylases.** Nucleic Acids Res. 1996 Jan 1;24(1):223-35.
- Rottier PJ, Welling GW, Welling-Wester S, Niesters HG, Lenstra JA, Van der Zeijst BA. **Predicted membrane topology of the coronavirus protein E1.** Biochemistry. 1986 Mar 25;25(6):1335-9.
- Saif LJ, van Cott JL, Brim TA. **Immunity to transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus infections in swine.** Vet Immunol Immunopathol. 1994 Oct;43(1-3):89-97. Review.
- Saif, L.J. und R.D. Wesley: Transmissible gastroenteritis. Aus: A.D. Leman, B.Straw, W.L. Mengeling, S. D'Allaire und D.J. Taylor (Hrsg.) **Diseases of swine.** Iowa Sate University Press, Ames, S.362-386. 1992.
- Salanueva IJ, Carrascosa JL, Risco C. **Structural maturation of the transmissible gastroenteritis coronavirus.** J Virol. 1999 Oct;73(10):7952-64.

Scheuring S, Röhricht RA, Schöning-Burkhardt B, Beyer A, Müller S, Abts HF, Köhrer K. **Mammalian cells express two VPS4 proteins both of which are involved in intracellular protein trafficking.** J Mol Biol. 2001 Sep 21;312(3):469-80.

Schmitt Anthony P., George P. Leser, David L. Waning, and Robert A. Lamb .**Requirements for Budding of Paramyxovirus Simian Virus 5 Virus-Like Particles.** J Virol. 2002 April; 76(8): 3952–3964. doi: 10.1128/JVI.76.8.3952-3964.2002

Schultze B, Krempl C, Ballesteros ML, Shaw L, Schauer R, Enjuanes L, Herrler G. **Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity.** J Virol. 1996 Aug;70(8):5634-7.

Schutze M P, Peterson P A, and Jackson M R. **A N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum.** EMBO J. 1994 April 1; 13(7): 1696–1705.

Schwegmann C, Zimmer G, Yoshino T, Enss M, Herrler G. **Comparison of the sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis coronavirus and E. coli K99.** Virus Res. 2001 May;75(1):69-73.

Schwegmann-Weßels C, Zimmer G, Laude H, Enjuanes L, Herrler G.**Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus to cell surface sialoglycoproteins.** J Virol. 2002 Jun;76(12):6037-43.

Schwegmann-Wessels C, Gert Zimmer, Bernd Schröder, Gerhard Breves, and Georg Herrler. **Binding of Transmissible Gastroenteritis Coronavirus to Brush Border Membrane Sialoglycoproteins.**J Virol. 2003 November; 77(21): 11846–11848

Schwegmann-Weßels C, Al-Falah M, Escors D, Wang Z, Zimmer G, Deng H, Enjuanes L, Naim HY, Herrler G. **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. 2004 Oct 15;279(42):43661-6. Epub 2004 Aug 10.

Schwegmann-Weßels C, Ren X, Herrler G. **Intracellular transport of the S proteins of coronaviruses.** Adv Exp Med Biol. 2006;581:271-5.

Schweizer A, Fransen JA, Bächli T, Ginsel L, Hauri HP.**Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulovesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus.** J Cell Biol. 1988 Nov;107(5):1643-53.

Scott A, Chung HY, Gonciarz-Swiatek M, Hill GC, Whitby FG, Gaspar J, Holton JM, Viswanathan R, Ghaffarian S, Hill CP, Sundquist WI. **Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins.** EMBO J. 2005 Oct 19;24(20):3658-69. Epub 2005 Sep

Scott A, Gaspar J, Stuchell-Brereton MD, Alam SL, Skalicky JJ, Sundquist WI. **Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 27;102(39):13813-8.

Sevier CS, Weisz OA, Davis M, Machamer CE. **Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs.** Mol Biol Cell. 2000 Jan;11(1):13-22.

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. **Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein.** Nat Biotechnol. 2004 Dec;22(12):1567-72. Epub 2004 Nov 21.

Shaw KL, Lindemann D, Mulligan MJ, Goepfert PA. **Foamy virus envelope Glykoprotein is sufficient for particle budding and release.** J Virol. 2003 Feb;77(4):2338-48.

Slagsvold T, Pattni K, Malerød L, Stenmark H. **Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins.** Trends Cell Biol. 2006 Jun;16(6):317-26. Epub 2006 May 22. Review.

Smith, H.C. **Advances made in swine practice. IX. Transmissible gastro-enteritis.** Vet. Med. 51, 1956.425-429.

Smith DB, Johnson KS. **Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.** Gene. 1988 Jul 15;67(1):31-40.

Sorkin A, McKinsey T, Shih W, Kirchhausen T, Carpenter G. **Stoichiometric interaction of the epidermal growth factor receptor with the clathrin-associated protein complex AP-2.** J Biol Chem. 1995 Jan 13;270(2):619-25.

Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. **Coronaviruses: structure and genome expression.** J Gen Virol. 1988 Dec;69 ( Pt 12):2939-52. Review.

Stadler K, Massignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD, Rappuoli R. **SARS-beginning to understand a new virus.** Nat Rev Microbiol. 2003 Dec;1(3):209-18. Review.

Stange A, Mannigel I, Peters K, Heinkelein M, Stanke N, Cartellieri M, Göttlinger H, Rethwilm A, Zentgraf H, Lindemann D. **Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity.** J Virol. 2005 May;79(9):5466-76.

- Stephens E.B, und Compans R.W. **Assembly of animal viruses at cellular membranes.** *Ann. Rev. Microbiol.*, 1988. 42:489-5/6.
- Stossel T.P. et al. **Filamins as integrators of cell mechanics and signaling.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):138-45
- Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger HG. **AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding.** *Cell.* 2003 Sep 19;114(6):689-99.
- Strauss J.H. und E.G. Strauss. **Viruses and human diseases.** Academic Press, 1.Aufl. 2002.
- Suñé C, Smerdou C, Antón IM, Abril P, Plana J, Enjuanes L. **A conserved coronavirus epitope, critical in virus neutralization, mimicked by internal-image monoclonal anti-idiotypic antibodies.** *J Virol.* 1991 Dec;65(12):6979-84.
- Tajima M. **Morphology of transmissible gastroenteritis virus of pigs.** *Arch. gesamte Virusforsch.* 1970; 29, 105-108
- Terashima Y, Onai N, Murai M, Enomoto M, Poonpiriya V, et al. **Pivotal function for cytoplasmic protein FROUNT in CCR2-mediated monocyte chemotaxis.** *Nat Immunol.* 2005;6:827–835.
- Thorp EB, Boscarino JA, Logan HL, Goletz JT, Gallagher TM. **Palmitoylations on murine coronavirus spike proteins are essential for virion assembly and infectivity.** *J Virol.* 2006 Feb;80(3):1280-9.
- Tooze J, Tooze S, Warren G. **Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions.** *Eur J Cell Biol.* 1984 Mar;33(2):281-93.
- Tooze J, Tooze SA, Fuller SD. **Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells.** *J Cell Biol.* 1987 Sep;105(3):1215-26.
- Tooze SA, Hollinshead M, Dittié AS. **Antibodies to secretogranin II reveal potential processing sites.** *Biochimie.* 1994;76(3-4):271-6.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.
- Tresnan DB, Levis R, Holmes KV. **Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in sero-group I.** *J Virol.* 1996 Dec;70(12):8669-74.

- Tseng YT, Wang SM, Huang KJ, Lee AI, Chiang CC, Wang CT. **Self-assembly of severe acute respiratory syndrome coronavirus membrane protein.** J Biol Chem. 2010 Apr 23;285(17):12862-72. Epub 2010 Feb 12.
- Tyrrell DA. **Respiratory viruses.** J Clin Pathol Suppl Coll Pathol. 1968;2:6-9. No abstract available.
- Vabret A, Dina J, Brison E, Brouard J, Freymuth F. **Human coronaviruses.** Pathol Biol (Paris). 2009 Mar;57(2):149-60. Epub 2008 May 5. Review.
- van der Flier A, Sonnenberg A. **Structural and functional aspects of filamins.** Biochim Biophys Acta. 2001 Apr 23;1538(2-3):99-117.
- van Regenmortel MH. **On the relative merits of italics, Latin and binomial nomenclature in virus taxonomy.** Arch Virol. 2000;145(2):433-41.
- Vennema H, Godeke GJ, Rossen JW, Voorhout WF, Horzinek MC, Opstelten DJ, Rottier PJ. **Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes.** EMBO J. 1996 Apr 15;15(8):2020-8.
- von Schwedler UK, Stuchell M, Müller B, Ward DM, Chung HY, Morita E, Wang HE, Davis T, He GP, Cimbora DM, Scott A, Kräusslich HG, Kaplan J, Morham SG, Sundquist WI. **The protein network of HIV budding.** Cell. 2003 Sep 19;114(6):701-13.
- Vlasak R, Luytjes W, Leider J, Spaan W, Palese P. **The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetyltransferase activity.** J Virol. 1988 Dec;62(12):4686-90.
- Weiss RA. **Virulence and pathogenesis.** Trends Microbiol. 2002 Jul;10(7):314-7. Review.
- Weiss SR, Navas-Martin S. **Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus.** Microbiol Mol Biol Rev. 2005 Dec;69(4):635-64. Review.
- Williams RK, Jiang GS, Holmes KV. **Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of Glykoproteins.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jul 1;88(13):5533-6.
- Winter C, Schwegmann-Weßels C, Neumann U, Herrler G. **The spike protein of infectious bronchitis virus is retained intracellularly by a tyrosine motif.** J Virol. 2008 Mar;82(6):2765-71. Epub 2007 Dec 19.
- Woo PC, Lau SK, Huang Y, Yuen KY. **Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping.** Exp Biol Med (Maywood). 2009 Oct;234(10):1117-27. Epub 2009 Jun 22.

Woode, G.N. **Transmissible gastroenteritis of swine.** Vet. Bull. 30, 239-248. 1969.

Ye R, Montalto-Morrison C, Masters PS. **Genetic analysis of determinants for spike Glykoprotein assembly into murine coronavirus virions: distinct roles for charge-rich and cysteine-rich regions of the endodomain.** J Virol. 2004 Sep;78(18):9904-17.

Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV. **Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E.** Nature. 1992 Jun 4;357(6377):420-2.

Zúñiga S, Sola I, Alonso S, Enjuanes L. **Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis.** J Virol. 2004 Jan;78(2):980-94.

## 12. Wissenschaftliche Beiträge

1. Christel Schwegmann-Weßels, Sandra Bauer, Katarina Shahwan, Anna Trincone, Christine Winter, Georg Herrler

The sialic acid binding activity facilitates infection by porcine transmissible gastroenteritis coronavirus. *19<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Virology*. Leipzig, Deutschland. Posterpräsentation. März **2009**

2. Christel Schwegmann-Weßels, Daniel Soetkamp, Anna Trincone

Interaction between TGEV S and M protein is not determined by the tyrosine-based retention signal in the C-terminal region of S but by the membrane-proximal part of the S protein cytoplasmic tail. *9<sup>th</sup> International Symposium on positive-strand RNA Viruses*. Atlanta, GA, USA. Posterpräsentation. Mai **2010**.

3. Anna Trincone, Christel Schwegmann-Weßels

A single amino acid change transforms the retention signal of the S protein of TGEV into an endocytosis signal. *21<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Virology*. Freiburg, Deutschland. Posterpräsentation. März **2011**.

---

## 13. Danksagungen

Ich danke Fr. Dr. Christel Schwegmann-Weßels für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Doktorarbeit an dem Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Ich bin Fr. Dr. Schwegmann-Weßels sehr dankbar für Ihre Professionalität, Ihre Kompetenz und Ihre stetige, freundliche Unterstützung bei der Betreuung meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Müller möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Im Labor des Instituts für Virologie möchte ich mich bei Prof. Georg Herrler, Sandra Bauer, Sandra Siewert, Dr. Jörg Glende, Dr. André Paul, Dr. Florian Klauschies, Dr. Katherina Goris, Christine Winter PhD, Sahar Abd el Rahman PhD, Dr. Maren Bohm, Katarina Shahwan, Markus Hoffmann, Meike Diedrichs, Sarah Hinkelmann, Sabine Uhlenbruck, Nicole Buhr, Tim Gützkow, Darsanya Pursidarsanya, Martina Kaps, Jana Kirchoff, Ann-Kathrin Mork, Mareike Steinhäuser, Holger Mosch, Günter Thiem und Monika Berg für die zahlreichen und konstruktiven Diskussionen und für die Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt dem Glück meines Lebens, meinem Mann Filippo.

Meiner Schwester Rosa möchte ich danken, weil Sie mir immer im Leben an der Seite steht und ohne Sie vieles nicht möglich gewesen wäre.

Ringrazio mio Padre per l'amore, che nonostante tutto é sempre piú forte.

Anastasia, Anita, Maria-Alessandra, Raffi und Rosaria sage ich Danke, da Ihre Freundschaft mich über die Jahre begleitet.

---

## 14. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name, Vorname: Trincone, Anna

Geburtsdatum und -ort: 18. Januar 1981 in Pozzuoli/Italien

Nationalität: italienisch

### Hochschulausbildung:

10/2001 – 01/2007: Studium an der Leibniz Universität Hannover, Fachbereich Biologie

01/2007: Universitätsabschluss: Dipl. Biol.  
Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie  
Nebenfächer: Mikrobiologie, Biochemie

05/2007-06/2011: Promotionsstudium an der Leibniz Universität Hannover

10/2003 – 09/2004: Auslandsaufenthalt im Rahmen des Hauptstudiums: *Università agli Studi di Napoli, Federico II.* Italien

### Schulbildung

09/1987 – 07/1995: Grundschule und Realschule, Italien

08/1995 – 07/1998: Ludwig-Windthorst- Realschule, Hannover

08/1998 – 06/2001: Lutherschule Gymnasium, Hannover

## 15. Erklärung zur Dissertation

Gemäß § 6 (1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur Interaktion der zytoplasmatischen Domäne des TGEV S-Proteins mit zellulären Proteinen“ selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Anna Trincone