

**Untersuchung zu Transport und Funktion des
Oberflächenproteins S des Virus der übertragbaren
Gastroenteritis der Schweine (TGEV)**

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. Katarína Shahwan

Geboren am 12.01.1979 in Martin (Slowakei)

2012

**Untersuchung zu Transport und Funktion des
Oberflächenproteins S des Virus der übertragbaren
Gastroenteritis der Schweine (TGEV)**

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. Katarína Shahwan

Geboren am 12.01.1979 in Martin (Slowakei)

2012

Referent: Univ. Prof. Dr. Georg Herrler

Koreferent: Univ. Prof. Dr. Edgar Maiss

Tag der Disputation: 30.01.2012

Nabil, Lea und Milla

Zusammenfassung

Untersuchung zu Transport und Funktion des Oberflächenproteins S des Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine (TGEV)

Das Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine (TGEV) ist ein Vertreter der Familie *Coronaviridae*, die der Ordnung *Nidovirales* zugeordnet ist. Das S-Protein, das sich in der Virushülle befindet, besitzt zwei Bindungsaktivitäten: Bindung an den zellulären Rezeptor porcine Aminopeptidase N (pAPN) und Bindung an Sialinsäurereste. Die pAPN ist ein Ektoenzym, das an der apikalen Membran der Enterozyten vorliegt. Es wurde bereits nachgewiesen, dass das S Protein von gereinigtem TGEV durch die Bindungsaktivität an Sialinsäuren ein muzinartiges Protein erkennt. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Bindungsaktivitäten des S-Proteins analysiert. Zunächst wurden lösliche Formen des TGEV S-Proteins erzeugt und in Säugerzellen exprimiert. Die Proteine wurden am C-Terminus mit Fc-Tag von humanem Immunglobulin G oder mit der Trimerisierungsdomäne des GCN4-Leucin-Zippers versehen. Mit den erzeugten Konstrukten wurden zellbasierte Bindungstests durchgeführt. Für die Identifizierung der Sialinsäure-Bindungseigenschaft wurden endständige Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche mit Hilfe einer Neuraminidase entfernt. Es wurde festgestellt, dass die löslichen Proteine auch nach einer Neuraminidase Behandlung der Zellen keine Sialinsäure-Bindungsaktivität besitzen. Die Entfernung der endständigen Sialinsäuren verstärkte allerdings die Bindung an den zellulären Rezeptor, die porcine Aminopeptidase N.

Das S-Protein weist im zytoplasmatischen Abschnitt ein Tyrosin-haltiges Motiv, das die Zurückhaltung des Proteins in subzellulären Kompartimenten verursacht. Nach Erzeugung rekombinanter TGE-Viren, die Mutationen oder Deletionen in dem Tyrosin-Motiv aufweisen, wurde die Replikationskompetenz der Viren getestet. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ergab, dass die intrazelluläre Retention für TGEV von entscheidender Bedeutung ist. Wurde das Retentionssignal außer Kraft gesetzt, wurden keine replikationsfähigen Viren mehr gebildet.

Schlagwörter: TGEV, Sialinsäuren, porcine Aminopeptidase N, Replikation

Abstract

Investigation of the transport and function of the S protein of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV)

The transmissible gastroenteritis virus (TGEV) is a member of the family *Coronaviridae*, which belongs to the order *Nidovirales*. The main surface protein S possesses two binding activities: binding to the cellular receptor, the porcine aminopeptidase N, and the binding to sialic acid residues on the cell surface. The pAPN is an ectoenzyme that is present at the apical membranes of enterocytes. In previous studies it has been shown, that the TGEV recognizes a mucin-type glycoprotein in a sialic acid-dependent fashion. In the present study the aim was to analyze the both binding activities of S protein. At first soluble forms of the TGEV S protein were generated and expressed in mammalian cells. The soluble S proteins comprising the S ectodomain connected either to the human Fc backbone or to the trimerization domain derived from the GCN4 leucine zipper were used to perform cell based binding assays. To identify the sialic acid binding activity the cells were pretreated with neuraminidase to remove the sialic acids from the cell surface. The experiments did not provide evidence for interaction of sol S proteins with sialic acids. Pretreatment of the cells with neuraminidase showed a significant increase in binding of the soluble S proteins to pAPN.

Additionally, infection studies with recombinant TGE viruses, carrying mutated S protein, were performed. A tyrosin-dependent signal in the cytoplasmic tail of S protein is responsible for its intracellular localization. The generated recombinant viruses with mutations or deletions in the tyrosin motif were tested for their replication ability. The importance of the intracellular retention for the viral replication was shown. Through Inactivation of this signal by mutations or deletions in the cytoplasmic tail of S protein, no virus assembly occurs.

Keywords: TGEV, sialic acids, porcine aminopeptidase N, replication

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Coronaviren	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Virusmorphologie und Genomstruktur	3
1.1.3 Strukturproteine	4
1.2 Das Virus der übertragbaren Gastroenteritis (TGEV)	8
1.3 Bindungseigenschaften von Spike-Proteinen	12
1.4 Reverse Genetik	16
2 ZIELSETZUNG	19
3 MATERIAL	21
3.1 Zelllinien	21
3.2 Zellkulturmedien	21
3.3 Viren	23
3.4 Bakterien	23
3.5 Bakterienkulturmedien	23
3.6 Plasmide	25
3.7 cDNAs	25
3.8 Puffer und Lösungen	26
3.9 Synthetische Oligonukleotide	31
3.10 Enzyme, DNA-Polymerasen	32
3.11 Antikörper	33
3.12 Kits	33
3.13 Substrate und Reagenzien	34
3.14 Weitere Chemikalien	34
3.15 Geräte und sonstige Materialien	35
3.16 Software	36
4 METHODEN	37
4.1 Molekularbiologische Methoden	37

4.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
4.1.2	Reinigung von DNA-Fragmenten	38
4.1.3	Agarosegelelektrophorese	38
4.1.4	Spaltung von PCR-Produkten mittels Restriktionsendonukleasen	39
4.1.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	39
4.1.5	Dephosphorylierung von linearisierten Plasmid-Vektoren	40
4.1.6	Bestimmung der DNA-Konzentration	40
4.1.7	Ligation von DNA	40
4.1.8	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	41
4.1.9	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> Bakterien	41
4.1.10	Hitzeschock-Transformation	42
4.1.11	Elektroporation	42
4.1.12	Kolonie-PCR	42
4.1.13	Plasmid-Präparation	43
4.1.14	Sequenzierung	43
4.2	Zellkulturtechnik	44
4.2.1	Zellkultur	44
4.2.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	44
4.2.3	DAPI-Test	45
4.2.4	Bestimmung der Zellzahl	45
4.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	45
4.3.1	Transiente Transfektion von BHK-21-Zellen	45
4.3.2	Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation ..	46
4.3.3	Transfektion zur Erzeugung rekombinanter Viren	46
4.4	Biochemische und immunologische Methoden	47
4.4.1	Immunfluoreszenztest	47
4.4.2	Nachweis von Proteinen im Zelllysate transfizierter Zellen mit anschließender Präzipitation	47
4.4.3	<i>Fast protein liquid chromatography</i> (FPLC)	48
4.4.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	49
4.4.5	Western Blot	49
4.4.6	Immunologische Detektion von Proteinen	50
4.5	Virologische Methoden	50
4.5.1	Vermehrung von TGEV auf ST-Zellen	50
4.5.2	Plaquetest	51
4.5.3	Immunoperoxidase-Test	51
4.5.4	Virusreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation	52
4.6	Bindungstests mit löslichen TGEV-S Proteinen	53
4.6.1	Neuraminidase-Behandlung	53
4.6.2	Immunfluoreszenz-Bindungstest	53
4.6.3	Durchflusszytometrie	54
4.6.4	Erythrozyten-Bindungstest	54
4.6.5	Bindungstest mit isolierten Membranproteinen	55
5	ERGEBNISSE	56
5.1	Bindungstests mit löslichen TGEV-S Proteinen	56
5.1.1	Erzeugung und Expression von löslichen S-Proteinen	56
5.1.2	Nachweis der Bindung an ST-Zellen mittels Immunfluoreszenz	62
5.1.3	Nachweis der Bindung an BHK-21-Zellen mittels Immunfluoreszenz	63
5.1.4	Quantifizierung der Bindung mittels Durchflusszytometrie	65
5.1.5	Bindung der löslichen TGEV-S-Proteine an immobilisierte Membranproteine	67
5.1.6	Nachweis von löslichen Proteinen nach einer FPLC-Reinigung	69
5.1.7	Bindungsnachweis an neuraminidasebehandelte ST-Zellen	70
5.1.8	Bindungsnachweis an neuraminidasebehandelten IPI-2I Zellen	71
5.1.9	Bindungsnachweis an neuraminidasebehandelte BHK-21-Zellen	72

5.1.10	Bindungsnachweis an neuraminidasebehandelte HEK-293T-Zellen	74
5.1.11	Quantifizierung der Bindung nach Neuraminidase-Behandlung	75
5.1.12	Erythrozyten-Bindungstest.....	76
5.1.13	Untersuchung der Bindung an Kryoschnitte vom Darmgewebe.....	78
5.2	Erzeugung rekombinanter TGE-Viren	79
5.2.1	Klonierarbeiten zum Einführen von Mutationen ins Retentionssignal des TGEV-S-Proteins 79	
5.2.2	Viruserzeugung und Infektion von ST-Zellen	80
5.2.3	Komplementation der klonierten Viren mit Wildtyp-S-Protein	83
5.2.4	Komplementation der klonierten Viren mit pCG1S_K/M	85
5.2.5	Komplementation der klonierten Viren mit pCG1S_YI/AA und pCG1S_del10.....	86
5.2.6	Infektion von ST-Zellen mit komplementierten Viren (Passage 2)	87
6	DISKUSSION.....	89
6.1	Untersuchungen zur Interaktion der löslichen TGEV-S-Proteine mit dem zellulären Rezeptor pAPN und Sialinsäureresten	89
6.1.1	Erzeugung und Expression von löslichen Proteinen	89
6.1.2	Bindung der löslichen S-Proteine an verschiedene Zelllinien	91
6.1.3	Bindung der löslichen S-Proteine nach einer Behandlung mit Neuraminidase	94
6.1.4	Nachweis der Bindung im Erythrozyten-Bindungstest.....	96
6.1.5	Nachweis der Bindung an Kryoschnitte vom Darmgewebe	97
6.2	Untersuchungen der rekombinanten TGE-Viren mit Mutationen im Retentionssignal von S-Protein.....	98
6.2.1	Erzeugung rekombinanter TGE-Viren	99
6.2.2	Untersuchungen zur Komplementation der rekombinanten Viren mit Wildtyp-S, S_K/M, S_YI/AA und S_del10	101
6.2.3	Bedeutung des Retentionssignals für die Replikation von TGEV	102
	LITERATURVERZEICHNIS	104
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	112
	TABELLENVERZEICHNIS	113
	SEQUENZEN.....	114
	LEBENS LAUF	119
	WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE	120
	DANKSAGUNG	121

Abkürzungsverzeichnis

<i>Aqua bidest.</i>	Aqua bidestillata, zweifach destilliertes Wasser
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i> (künstliches Bakterienchromosom)
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
bp	Basenpaare
Bzw.	beziehungsweise
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CoV	Coronavirus
CPE	zytopathischer Effekt
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s modified EageI Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
E-Protein	<i>envelope</i> Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>Endoplasmatic reticulum-Golgi intermediate compartment</i>
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G-Protein	Glykoprotein
h	<i>hour</i> (Stunde)
HE-Protein	Hämagglutinin-Esterase

HEK-293T	<i>Human embryonic kidney cells</i>
H ₂ O	Reinstwasser
HRP	Horseradish peroxidase (Peroxidase aus Meerrettich)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
Ig	Immunoglobulin
IPI-2I	<i>Pig Intestine Ileum</i>
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LAMP-1	<i>lysosomal associated membrane-protein 1</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Mol
mA	Milliamper
min	Minute
mM	millimolar
ml	Milliliter
M-Protein	Membranprotein
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NA	Neuraminidase
N-Protein	Nukleokapsidprotein
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pAPN	porzine Aminopeptidase N
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSM	PBS ohne Calcium und Magnesium
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PRCoV	<i>Porcine respiratory coronavirus</i> (porzines respiratorisches Coronavirus)
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pfu	<i>plaque forming units</i> (Plaque-bildende Einheiten)
Ω	Ohm

x

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SARS	<i>Severe acute respiratory syndrome</i> (schweres akutes Atemwegsyndrom)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
S-Protein	Spike-Protein
ST	<i>Swine testis</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGEV	<i>Transmissible gastroenteritis virus</i> (Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine)
U	<i>unit</i> (Einheit)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WT	Wildtyp
X	mal
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
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

1 Einleitung

1.1 Coronaviren

1.1.1 Taxonomie

Das Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine (TGEV) gehört zur Familie *Coronaviridae*, die mit den Familien *Arteriviridae* und *Roniviridae* der Ordnung *Nidovirales* zugeordnet wird (Cavanagh, 1997). Die Mitglieder sind durch ein einzelsträngiges, nicht-segmentiertes RNA-Genom in positiver Orientierung charakterisiert. Die Coronaviren sind durch ihr charakteristisches Erscheinungsbild im Elektronenmikroskop gekennzeichnet und wurden bereits 1968 als Virusfamilie vorgeschlagen (Tyrrell et al., 1968). Sie wurden 1975 durch das internationale Komitee für Virus-Taxonomie (ICTV) als eigenständige Virusfamilie anerkannt (Tyrrell et al., 1975). Zu der Familie gehörten bis 2009 zwei Genera: *Coronavirus* und *Torovirus* (Cavanagh und Horzinek, 1993). Diese Zuordnung bezieht sich auf die Gemeinsamkeiten in der Organisation und Expression ihrer Genome. Aufgrund serologischer und phylogenetischer Eigenschaften wurden die Coronaviren in drei Gruppen unterteilt: Gruppe 1 und Gruppe 2, deren Vertreter Säugetiere infizieren und Gruppe 3, die aviäre Viren beinhaltet (Gonzalez et al., 2003, Gorbalenya et al., 2004). Im Jahre 2009 wurde die Nomenklatur von dem internationalen Komitee für Virus-Taxonomie (ICTV) aktualisiert, die Coronaviren wurden in 2 Subfamilien unterteilt: *Coronavirinae* und *Torovirinae*. Die Bezeichnung der drei Gruppen wurde ebenfalls verändert. Man spricht nicht mehr von Coronaviren der Gruppe 1, 2 und 3 sondern von den drei Genera *Alpha-*, *Beta-* und *Gammacoronavirus* (Woo et al., 2009).

Der Name der Ordnung Nidovirales ist auf das lateinische Wort *nidus* für „Nest“ zurückzuführen. Er bezieht sich auf die einzigartige, für Vertreter der Ordnung *Nidovirales* charakteristische Replikationsstrategie, die durch eine diskontinuierliche RNA-Synthese gekennzeichnet ist. Während der viralen mRNA-Synthese entstehen Transkripte, die sich in ihren Startpunkten unterscheiden, die aber alle die gleichen

3'-Enden aufweisen und somit ein sog. *nested* set von mRNAs darstellen (Lai und Cavanagh, 1997). Die Bezeichnung Coronaviren bezieht sich auf die ca. 20 nm langen keulenförmigen Oberflächenstrukturen, die für das Erscheinungsbild der Viruspartikel im Elektronenmikroskop verantwortlich sind und das Virus wie von einem Kranz (lat. *corona*) umgeben erscheinen lassen (Siddell et al., 1983).

Coronaviren stehen mit akuten Gastroenteritiden bei Rindern, Schweinen, Katzen und Hunden in Verbindung. Bei Menschen verursachen sie meistens harmlose Erkältungskrankheiten. Das Anfang 2002 neu aufgetretene SARS assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) wurde durch das klinische Bild einer atypischen Lungenentzündung mit Fieber, Schüttelfrost und in einigen Fällen auch durch Diarrhöe charakterisiert (Drosten et al., 2003; Berger et al., 2004). Die meisten Coronaviren sind artspezifisch und infizieren nur Zellkulturen ihrer Wirtsspezies.

Tabelle 1: Phylogenetische Verwandtschaft der Coronaviren mit einigen Vertretern der *Alpha*-, *Beta*- und *Gammacoronaviren*

Genus	Speziesname (englisch)
<i>Alphacoronavirus</i>	HCoV-229E (human coronavirus 229-E) HCoV-NL-63 (human coronavirus NL-63) TGEV (transmissible gastroenteritis virus) PRCoV (porcine respiratory coronavirus) PEDV (porcine epidemic diarrhea virus) CCoV (canine coronavirus) FCoV (feline coronavirus) FIPV (feline infectious peritonitis virus) BatCoV 1 (miniopterus bat coronavirus 1)
<i>Betacoronavirus</i>	HCoV-OC43 (human coronavirus OC43) HCoV-HKU1 (human coronavirus HKU1) SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus) MHV (murine hepatitis virus) BatCoV-HKU5 (pipistrellus bat coronavirus HKU5)
<i>Gammacoronavirus</i>	IBV (avian infectious bronchitis virus) TCoV (turkey coronavirus) Beluga whale coronavirus SW1

1.1.2 Virusmorphologie und Genomstruktur

Ein Coronaviruspartikel setzt sich aus dem Nukleokapsid und der Hüllmembran zusammen und hat einen Durchmesser von 80-200 nm. Die Viruspartikel sind pleomorph, meist sphärisch, mit den charakteristischen keulenförmigen Oberflächenstrukturen in ihrer Virushülle, die etwa 20 nm aus der Oberfläche herausragen und das Viruspartikel wie von einem Kranz umgeben erscheinen lassen. Diese Strukturen werden von dem Spike-Protein (S-Protein) gebildet. Das einzelsträngige nicht-segmentierte RNA-Genom besitzt eine positive Polarität und liegt assoziiert mit dem Nukleokapsid-Protein (N-Protein) als Nukleokapsid vor. Dieser Komplex aus RNA und N-Proteinen liegt wahrscheinlich in einer helikalen Anordnung, obwohl auch eine ikosaedrische Form diskutiert wurde (Risco et al., 1996; Lai et al., 1997). Die Helix hat einen Durchmesser von 10 bis 20 nm. In der Virusmembran sind neben dem S-Protein drei weitere Proteine eingelagert: das mit der Innenseite der Membran assoziierte Membran-Protein (M-Protein), das in kleiner Kopienzahl vorkommende Envelope-Protein (E-Protein) und bei einigen Vertretern der *Betacoronaviren* das Hämagglutinin-Esterase-Protein (HE-Protein).

Coronaviren besitzen das größte Genom aller bekannten RNA-Viren mit einer Größe von ca. 30000 Nukleotiden. Die genomische RNA ist am 5`-Ende mit einer *Cap*-Struktur versehen und am 3`-Ende polyadenyliert. Das Genom enthält mehrere kodierende Abschnitte, die in folgender Reihenfolge angeordnet sind 5`-pol-S-3a-3b-E-M-N-3`. Etwa zwei Drittel des Genoms enthalten zwei große miteinander überlappende Leserahmen 1a und 1b, die unter anderem für die RNA-Polymerase (pol) kodieren. Die Gene für die Strukturproteine und Polymerase können von Genen, die für weitere Struktur- und Nichtstrukturproteine kodieren, unterbrochen sein.

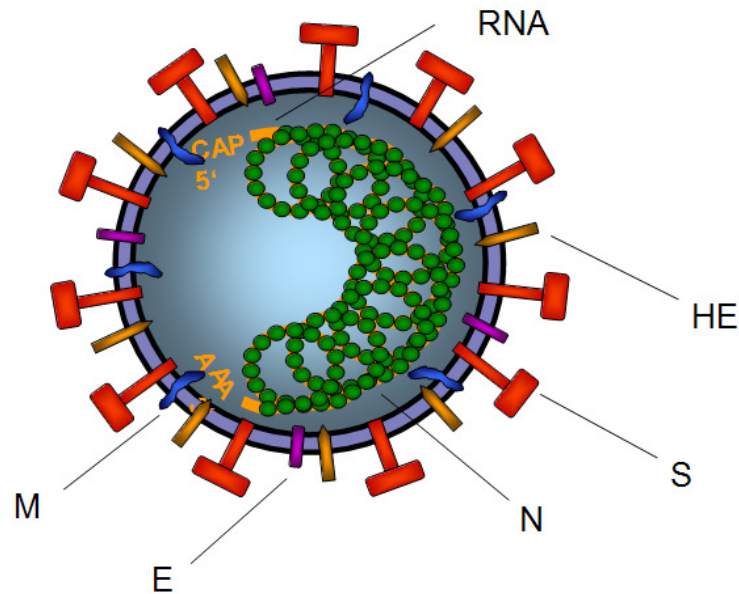


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Coronaviruspartikels. S-Spike-Protein, M-Membran-Protein, E-Envelope-Protein, N-Nukleokapsid-Protein, HE-Hämagglutinin-Esterase-Protein. Das HE-Protein kommt nur bei den *Betacoronaviren* vor. (Hoffmann, 2010)

1.1.3 Strukturproteine

Alle Coronaviruspartikel bestehen aus mindestens vier Strukturproteinen: das N-Protein, das M-Protein, das E-Protein und das S-Protein. Einige Vertreter der *Betacoronaviren* kodieren zusätzlich für das HE-Protein.

Das N-Protein

Das N-Protein ist die Hauptkomponente des Nukleokapsids. Es umschließt die gesamte RNA und hat ein Molekulargewicht von 45-63 kDa. Die N-Proteine sind reich an basischen Aminosäuren wie Lysin und Arginin. Sie besitzen mehrere Serinreste, die posttranslational phosphoryliert werden. Bei der viralen Replikation werden dem N-Protein mehrere Aufgaben zugeschrieben. Es bildet mit der genomischen RNA den helikalen Ribonukleoproteinkomplex (Davies et al., 1981). Mit den carboxyterminalen Regionen des M-Proteins formt das N-Protein das innere *Core* (Risco et al., 1996; Escors et al., 2001b). Durch die Bindung an die Leader-Sequenz wird vermutet, dass das N-Protein auch an der viralen Transkription beteiligt ist (Baric et al., 1988; Stohlman et al., 1988). Es wurde gezeigt, dass bei *virus rescue*-Experimenten mit viralem cDNA-Klon, eine zusätzliche Transfektion eines Expressionsplasmids für N-Protein zu einem höheren Virustiter führt (Yount et

al., 2000; Casais et al., 2001; Thiel et al., 2003). Außerdem wird vermutet, dass das N-Protein als RNA-Chaperon wirkt und durch richtige Faltung die RNA in aktiven Zustand bringt (Zuniga et al., 2007).

Das M-Protein

Das M-Protein ist ein glykosyliertes Oberflächenprotein mit einem Molekulargewicht von 20 bis 38 kDa. Das M-Protein besitzt 3 Transmembranregionen und nur wenige aminoterminalen Abschnitte sind an der Oberfläche exponiert (Escors et al., 2001a). Das carboxyterminale Ende befindet sich während des Budding-Prozess im Zytoplasma und interagiert mit dem Nukleokapsid. Das M-Protein trägt entweder N- oder O-glykosidisch gebundene Zuckergruppen. Die Oligosaccharide sind vorwiegend mit Serin- oder Threoninresten verknüpft. Im Verlauf der Replikation wird das M-Protein an intrazellulären Membranen akkumuliert und nicht zur Plasmamembran transportiert. Auch bei Einzelexpression wird das M-Protein nur bis zum Trans-Golgi-Netzwerk transportiert (Klumperman et al., 1994; Krijnse-Locker et al., 1994). Das M-Protein übernimmt eine wichtige Aufgabe bei der Virusreifung. In Coexpressionsstudien wurde gezeigt, dass M- und E-Protein für die Bildung und Freisetzung von virus-ähnlichen Partikel ausreichend sind (Vennema et al., 1996; Kim et al., 1997).

Das E-Protein

Das kleine unglykosylierte E-Protein befindet sich in der Virusmembran und hat ein Molekulargewicht von 9,1-12,4 kDa. Im Jahre 1992 wurde das E-Protein zum ersten Mal bei TGEV beschrieben (Godet et al., 1992). Es ist nur in kleiner Kopienzahl in der Virushülle vorhanden. Sein Vorhandensein ist essentiell für die Bildung von Virionen. Das E- und M-Protein sind für die Bildung von virus-ähnlichen Partikeln ausreichend (Vennema et al., 1996).

Das S-Protein

Das S-Protein vermittelt die Bindung an den zellulären Rezeptor und die anschließende Fusion der Virushülle mit der Zellmembran. In der Membran des Viruspartikels ist das trimere S-Protein über eine hydrophobe Transmembrandomäne innerhalb seines carboxyterminalen Endes verankert. Das monomere S-Protein hat,

abhängig vom Ausmaß seiner Glykosylierung, ein Molekulargewicht von 170 bis 220 kD. Von den zahlreichen potentiellen Glykosylierungsstellen, über die das S-Protein verfügt, werden die meisten auch genutzt. Während seines Transports durch das ER werden Kohlenhydratseitenketten kotranslational an die meisten der Glykosylierungsstellen angehängt. Das S-Protein aller Coronaviren besteht aus 3 strukturellen Domänen: einer langen Ektodomäne, die den größten Teil des Proteins ausmacht, einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt. Am Amino-Terminus befindet sich ein Signalpeptid, das nach der Translokation ins ER abgespalten wird. Die S-Proteine einiger Coronaviren werden in zwei nicht-kovalent verbundene Untereinheiten, die S1- und S2-Untereinheit, gespalten. Das S-Protein von TGEV wird nicht gespalten. Dagegen findet man bei BCoV, MHV und IBV die S-Proteine in gespaltenen Form. Die Spaltung erfolgt mit Hilfe einer zellulären furinähnlichen Protease, die das Protein an einer definierten Sequenz basischer AS spaltet. Die Coronavirus S-Proteine stellen eine Modifikation der Fusionsproteine vom Typ 1 dar, die die Membranfusion auch bei Viren der Familien *Orthomyxoviridae*, *Retroviridae*, *Paramyxoviridae* und *Filoviridae* vermitteln (Bosch et al., 2003). Die Vertreter der Typ-1-Fusionsproteine haben folgende gemeinsame Eigenschaften: sie kommen in der Virushülle in trimerer Form vor, meistens setzen sie sich aus S1- und S2-Untereinheit zusammen und sie sind für die Rezeptorbindung und Membranfusion verantwortlich. Im Allgemeinen ist die Rezeptorbindungsdomäne von der Membranfusionsdomäne durch die oben erwähnte Protease-Spaltstelle getrennt. Die S1-Untereinheit ist im Gegensatz zur S2-Untereinheit sehr heterogen, wenn man die Aminosäuresequenz vergleicht. Im N-terminalen Teil der S1-Untereinheit befindet sich die Rezeptorbindungsdomäne. Die antigenen Epitope des S-Proteins sind ebenfalls in der S1-Untereinheit lokalisiert (Delmas et al., 1990b). Die S1-Untereinheit bildet den globulären Teil des S-Proteins. In der S2-Untereinheit befinden sich 2 Abschnitte mit *heptad repeats*, die auf eine *coiled coil* Struktur hindeuten (de Groot et al., 1987). Diese Tatsache deutet auf eine Struktur des S-Proteins als Homotrimer hin. Erst nach der Bildung der Monomere werden sie zu Trimeren zusammengelagert, jedoch bevor die letzten Glykosylierungsschritte im Golgi-Apparat stattfinden (Delmas und Laude, 1990a).

Das HE-Protein

Einige Vertreter der *Betacoronaviren* besitzen ein zusätzliches virales Oberflächenglykoprotein, die Hämagglutinin-Esterase (HE), die rezeptorzerstörende Aktivität besitzt. Es handelt sich um ein Typ I-Membranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa. HE-Monomere, die in infizierten Zellen synthetisiert werden, werden über Disulfidbrücken zu einem Homodimer verbunden, das durch seine hydrophobe Domäne am C-Terminus in der Virushülle verankert ist (de Groot, 2006). Das HE-Protein interagiert mit 9-O-acetylierten Sialinsäuregruppen, die sich als Modifikationen auf Proteinen auf der Zellmembran befinden. Es besitzt eine 9-O-Acetylerase-Aktivität, ähnlich dem HEF-Protein von Influenza-C-Viren, mit dem es eine Homologie von 30% auf Aminosäureebene aufweist (Vlasak et al., 1988a; Vlasak et al., 1988b). Es wird vermutet, dass das HE-Protein mittels RNA-Rekombination mit einem viralen oder zellulären Gen von einem Coronavirus aufgenommen wurde (de Groot, 2006). Über die Bindung an 9-O-Acetylneuraminsäure kann das HE-Protein Erythrozyten agglutinieren. Allerdings ist die Bindungsaffinität des HE-Proteins zu 9-O-Acetylneuraminsäure von geringerer Intensität als beim TGEV-S-Protein (Schultze et al., 1991a; Schultze et al., 1991b; Schultze und Herrler, 1992b).

1.1.4 Replikation

Der Replikationszyklus des TGEV beginnt mit der Bindung der Virionen an die Plasmamembran der Wirtszelle, die vom S-Protein vermittelt wird. Nach der Wechselwirkung mit dem zellulären Rezeptor (porzine Aminopeptidase N) und der anschließenden Fusion der zellulären mit der viralen Membran wird das Nukleokapsid über diese Rezeptor-vermittelte Fusion oder Rezeptor-vermittelte Endozytose in das Zytoplasma der Zelle entlassen. Von der genomischen RNA werden dann zunächst die großen ORFs 1a, und nach ribosomalen Leserasterverschiebung, 1b translatiert und durch Proteasen gespalten. Durch die Leserasterverschiebung kommt es zum Überlesen eines Stopcodons am Ende des Leserahmens 1a und zur Synthese des Vorläuferproteins 1ab, das in seinem carboxyterminalen Bereich den Anteil der RNA-abhängigen RNA-Polymerase enthält. Durch die Polymeraseaktivität wird unter Verwendung der genomischen RNA

als Matrize der Minusstrang synthetisiert. Dieser erfüllt zwei Funktionen: er dient als Matrize für die Synthese neuer Plus-Strang-Genome und für die Bildung subgenomischer mRNA-Spezies. Die diskontinuierliche Transkription der subgenomischen mRNA-Spezies wird durch transkriptionsregulierende Sequenzen (TRS) kontrolliert. Die TRS befinden sich sowohl am 3'-Ende des viralen Genoms und werden als *leader* TRS bezeichnet, als auch vor den Leserahmen der subgenomischen mRNAs. Aus den subgenomischen mRNAs, die alle das gleiche 3'-Ende aufweisen, werden die verschiedenen Strukturproteine synthetisiert. Diese subgenomischen mRNAs bilden ein sogenanntes „*nested set*“, von dem jeweils nur der am 5'-Ende gelegene Leserahmen in ein Protein translatiert wird. Die neu synthetisierten Strukturproteine werden für den Zusammenbau neuer Viruspartikel verwendet. Das N-Protein komplexiert mit der genomischen RNA zu den Nukleokapsiden. Das M-Protein interagiert mit dem E-Protein und beide Proteine werden im Prä-Golgi-Kompartiment zurückgehalten (Lim und Liu, 2001). Hier kommt es zu einer Bindung der carboxyterminalen Domäne des M-Proteins mit dem N-Protein. Die Virusknospung und Freisetzung findet am intermediären Kompartiment zwischen ER und Golgi-Apparat (*endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*, ERGIC) statt (Risco et al., 1998). Die entstehenden Viruspartikel werden in das Lumen des ERGIC abgeschnürt und durch Transportvesikel über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert, wo sie in die Umgebung entlassen werden.

1.2 Das Virus der übertragbaren Gastroenteritis (TGEV)

1.2.1 Epidemiologie und Übertragung

Im Jahre 1946 wurde TGEV erstmals von Doyle und Hutchings in Indiana als Ursache von Gastroenteritis in Schweinen beschrieben (Doyle und Hutchings, 1946). Auf allen Kontinenten wurde in Ländern mit verbreiteter Schweineindustrie über TGEV berichtet. TGEV-Infektionen traten bis in die 70er Jahre in Europa und in den Vereinigten Staaten regelmäßig in den Wintermonaten in Aufzuchtbetrieben auf. Eine natürliche Infektion hinterließ eine Immunität, die etwa zwei Jahre anhielt, bis es dann zu einer neuen Infektion kam.

Mit dem Auftreten des porcinen respiratorischen Coronavirus (PRCoV), das eine Variante des TGEV darstellt, wurde Mitte der 80er Jahre ein Rücklauf der TGEV-Neuinfektionen festgestellt (Pensaert et al., 1986). Im Vergleich zu TGEV, repliziert das PRCoV im Respirationstrakt, jedoch wenig im Gastrointestinaltrakt von Schweinen (Cox et al., 1990). Serologische Untersuchungen haben gezeigt, dass TGEV und PRCoV nahe verwandt sind und aus diesem Grund wird PRCoV auch als TGEV-Variante betrachtet (Callebaut et al., 1988; Sanchez et al., 1992).

Das TGEV wird durch Kontakt mit infektiösem Material wie dem Fäces oder der Sauenmilch auf oralem Wege von den Tieren aufgenommen. Jedoch sind auch aerogene Übertragungen nachgewiesen worden (Aynaud et al., 1991). Nach der Magen-Darm-Passage infiziert das Virus die Epithelzellen des Jejunums und Ileums und breitet sich von den Zottenspitzen auf die tiefer liegenden Epithelzellen aus. Das Virus wurde allerdings niemals in den Zellen der Krypten gefunden. Die infizierten Zellen werden lytisch zerstört und durch neue Epithelzellen aus den Krypten ersetzt (Wege, 1995). Durch die Zerstörung und Ablösung der Epithelzellen kommt es zur Zottenatrophie und zu einer wässrigen, nicht blutigen Diarrhöe (Pensaert et al., 1970). Die transmissible Gastroenteritis ist eine Erkrankung der Schweine aller Altersgruppen, wobei bei neugeborenen Saugferkeln die Erkrankung meistens lethal endet. Es kommt zum Erbrechen und einer wässrigen Diarrhöe, die zur Dehydratation und starkem Gewichtsverlust führt. Bei Absetzferkeln (3–8 Wochen alt) beträgt die Mortalitätsrate weniger als 10–20%. Es kommt jedoch zu Wachstumsverzögerungen und somit zu wirtschaftlichen Verlusten. Erwachsene Tiere entwickeln ebenfalls einen wässrigen Durchfall, der 2–4 Tage anhält, aber die Mortalitätsrate in dieser Altersgruppe liegt unter 5%.

Die oben erwähnte natürlich vorkommende Variante des TGEV, das PRCoV, hat den Enterotropismus verloren und repliziert vorwiegend in Makrophagen des Respirationstraktes (Cox et al., 1990). Da das PRCoV über den Luftweg übertragen wird, besitzt es eine hohe Ausbreitungsrate. Eine Infektion mit PRCoV verursacht keine oder nur milde Krankheitssymptome. Die Ausbreitung von PRCoV wird als Grund für den Rückgang der TGEV-Infektionen angesehen. Eine Infektion mit PRCoV wirkt häufig als natürlicher Impfschutz gegen eine TGEV-Infektion (Sestak et al., 1996). Die Sequenzanalyse von TGEV und PRCoV zeigte eine Homologie von 96%. Die Hauptunterschiede in der Genomsequenz sind zwei Deletionen, eine im

ORF3a, der für ein Nichtstruktur-Protein kodiert, und eine zweite Deletion von über 220 AS im S-Protein (Rasschaert et al., 1990).

1.2.2 Das TGEV-Spike-Protein

Das monomere S-Protein ist 1449 AS lang und hat ein Molekulargewicht von 170 bis 220 kDa. Es bildet die charakteristischen keulenförmigen Oberflächenstrukturen in der Virushülle, die etwa 20 nm aus der Oberfläche herausragen und das Viruspartikel als von einem Kranz umgeben erscheinen lassen. Nach seiner Synthese wird am N-Terminus ein 17 AS langes Signalpeptid abgespalten, das für die Translokation ins ER-Lumen dient. Das S-Protein ist ein Glykoprotein. Während des Transports durch das ER werden Kohlenhydratseitenketten kotranslational an die meisten der Glykosylierungsstellen (bis zu 35) angehängt. Ein weiterer Glykosylierungsschritt, bei dem mannose-reiche Glykane in die komplexen Glykane überführt werden, findet im Golgi-Apparat statt (Laude et al., 1990). Das 1449 AS große Glykoprotein besteht aus 3 strukturellen Domänen: einer 1387 AS langen Ektodomäne, die den größten Teil des Proteins ausmacht, einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt, der die Aminosäuren 1434 bis 1449 umfasst. Hinter dem Membrananker befindet sich noch ein cysteinreicher-Abschnitt, der zwar im Zytoplasma liegt, von dem jedoch vermutet wird, dass er mit der Membran assoziiert vorliegt. Die S-Proteine einiger Coronaviren werden in zwei nicht kovalent-verbundene Untereinheiten, die S1- und S2-Untereinheit, gespalten. Das S-Protein von TGEV wird nicht proteolytisch gespalten. Das S-Protein ist das Hauptantigen und induziert die Bildung neutralisierender Antikörper. Die antigenen Epitope des S-Proteins sind am aminoterminalen Ende des Proteins lokalisiert (Delmas et al., 1990b). In der Aminosäuresequenz des S-Proteins wurden drei (nach Delmas) bzw. vier (nach Enjuanes) Epitope beschrieben (Delmas et al., 1986; Jimenez et al., 1986; Gebauer et al., 1991).

1.2.3 Tyrosin-haltige Signale

Tyrosin-haltige Signale findet man in der zytoplasmatischen Domäne von verschiedenen integralen Membranproteinen (LAMP-1), bei Membrandurchspannenden Proteinen (CD63), Signal-Rezeptoren (EGF) und bei viralen Glykoproteinen (gp41 von HIV). Das allgemeine Konsensusmotiv lautet YXX Φ , wobei X für jede beliebige und Φ für eine große aliphatische Aminosäure steht. Es ist bei einer Vielzahl von Proteinen enthalten, die über den sekretorischen Weg in der Zelle sortiert werden (Mallabiabarrena et al., 1995). Dieses Signal erfüllt mehrere Funktionen, es kann als Transportsignal zur basolateralen Membran, als Endozytosesignal oder als Retentionssignal fungieren. Beim Clathrin-vermittelten Vesikeltransport zwischen der Plasmamembran und dem Golgi-Apparat spielt das Motiv ebenfalls eine Rolle, indem es mit den Adapter-Proteinen (AP) interagiert (Bonifacino und Dell'Angelica, 1999). Die Adapter-Proteine vermitteln die Sortierung von Membranproteinen, indem sie bei der Erzeugung der *clathrin-coated vesicles* beteiligt sind (Keen, 1987). Es wurde nachgewiesen, dass die μ 2-Untereinheit des Adapter-Protein-Komplexes mit dem Tyrosin-haltigen Motiv von Proteinen interagiert (Owen und Evans, 1998). Durch eine Konformationsänderung der μ 2-Untereinheit ist diese in der Lage mit dem Tyrosin und der großen aliphatischen Aminosäure zu wechselwirken. Durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz innerhalb des Motivs wird eines der Adapter-Proteine erkannt und das Zielprotein an seinen Bestimmungsort transportiert.

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass das TGEV-S-Protein nach seiner Synthese durch den verlangsamten Transport im Golgi Apparat nicht zur Oberfläche transportiert wird, sondern in diesem Kompartiment zurückbleibt (Vennema et al., 1990). Für dieses Verhalten wird ein Tyrosin-haltiges Signal, das sich im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins befindet, verantwortlich gemacht (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Das Motiv besteht aus den Aminosäuren 1440YEPI1443. Das Retentionssignal vermittelt durch Interaktion mit unbekanntem zellulären Proteinen höchstwahrscheinlich die intrazelluläre Zurückhaltung des Proteins. Auch bei weiteren Coronaviren wie z.B. bei dem infektiösen Bronchitis Virus (IBV) wurde ein ähnliches Tyrosin-haltiges Signal im S-Protein identifiziert, das die Zurückhaltung des Proteins in subzellulären Kompartimenten bewirkt (Winter et al., 2008). Im zytoplasmatischen Abschnitt von SARS-CoV konnte dagegen kein

Tyrosin-haltiges Retentionssignal nachgewiesen werden und das S-Protein wird folglich auch zur Oberfläche transportiert (Schwegmann-Wessels et al., 2004).

Bei der CD3 ϵ -Untereinheit des T-Zell-Rezeptors bewirkt das Tyrosin-haltige Signal, ähnlich wie bei TGEV-S, eine intrazelluläre Retention der CD3 ϵ -Untereinheit (Mallabiabarrena et al., 1995).

Einzelexpressionsstudien von Paul (2005) haben gezeigt dass ein Methionin an Position 1445 im TGEV-S-Protein das Retentionssignal inaktiviert, obwohl das oben erwähnte Motiv noch vorhanden ist. Nach dem Transport zur Zelloberfläche fungiert das YEPI-Motiv allerdings als Endozytose-Signal, so dass das S-Protein internalisiert wird und in Endosomen nachzuweisen ist.

1.3 Bindungseigenschaften von Spike-Proteinen

1.3.1 Bindung an zelluläre Rezeptoren

Die Infektion einer Zelle beginnt mit der Bindung der Virionen an zelluläre Rezeptoren auf der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Diese Wechselwirkung wird bei den Coronaviren hauptsächlich durch das S-Protein vermittelt. Proteine, Lipide oder Kohlenhydrate können als zelluläre Rezeptoren dienen. Die Rezeptor-bindende Domäne (RBD) wurde bei verschiedenen Coronaviren in der S1-Untereinheit des Spike-Glykoproteins lokalisiert, obwohl sich die RBDs in nicht-homologen Regionen der S1-Untereinheit befinden.

Für die meisten Vertreter der *Alphacoronaviren* wurde Aminopeptidase N (APN) als Rezeptor identifiziert (Delmas et al., 1992; Yeager et al., 1992; Tresnan et al., 1996). Die Aminopeptidase N ist ein Typ II-Membranprotein, das mit 967 AS ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa beträgt und auch unter der Bezeichnung CD13 bekannt ist (Look et al., 1989). Die Aminopeptidase N ist eine stark glykosylierte Zink-Metallprotease, die auf der Oberfläche vieler Zellarten vorkommt, wie Enterozyten, Lungenfibroblasten und Nierenepithelzellen (Look et al., 1989). Eine Expression von APN findet man auch in Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und synaptischen Neuronen im ZNS (Riemann et al., 1999; Dong et al., 2000). Die Aminopeptidase N erfüllt vielfältige Funktionen, wie Aminosäuren-Resorption im Darm und in der Niere, Spaltung von an MHC Klasse II gebundenen Peptiden an

Antigen präsentierenden Zellen und Abbau von Neuropeptiden in synaptischen Verbindungen (Riemann et al., 1999; Dong et al., 2000). Das Vorkommen von APN scheint für eine Infektion, Gewebetropismus und virale Übertragung wichtig zu sein. Aminosäuresequenzen von humanen, felines und porcinen Aminopeptidasen sind stark konserviert und zeigen eine Ähnlichkeit von 83% und eine Identität von 78%. Spezies-spezifische Aminosäuren und/oder postranslationale Modifikationen von APN beeinflussen die Rezeptoraktivität für HCoV-229E, FCoV und TGEV. Bei TGEV dient die porcine APN als Rezeptor und für die Bindung ist der Bereich zwischen den Aminosäuren 717 und 813 von APN von Bedeutung (Delmas et al., 1994). Die porcine APN kann von TGEV, jedoch nicht von FCoV und HCoV-229E als Rezeptor verwendet werden (Delmas et al., 1994; Benbacer et al., 1997). Der Bereich zwischen den Aminosäuren 260 und 353 von der humanen APN ist dagegen für die Infektion mit HCoV-229E entscheidend (Yeager et al., 1992; Kolb et al., 1997). Für die Infektion mit TGEV, CCoV und FCoV ist die humane APN allerdings nicht ausreichend. Dagegen erfüllt die feline APN eine Funktion als Rezeptor für FCoV, TGEV, CCoV und HCoV-229E (Tresnan et al., 1996).

Die Maus-Hepatitis-Viren (MHV) als Vertreter der *Betacoronaviren* nutzen Glykoproteine aus der Familie der carcinoembryonalen Antigene (CEA), die ihrerseits der Immunoglobulin-Superfamilie angehören, als Rezeptoren (Dveksler et al., 1991; Williams et al., 1991; Dveksler et al., 1993). Das CEACAM1 (carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1) wurde als Rezeptor für MHV identifiziert (Dveksler et al., 1991; Williams et al., 1991; Dveksler et al., 1993). CEACAM1-Glykoproteine werden auf Zellen im Leber und Darm exprimiert, wo auch die Replikation von MHV stattfindet. Die RBD von MHV ist im aminoterminalen Bereich des Spike-Proteins lokalisiert (Kubo et al., 1994; Suzuki und Taguchi, 1996).

Als Rezeptor für das SARS-CoV, das ebenfalls dem Genus *Betacoronavirus* zugeordnet wird, wurde das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) identifiziert (Li et al., 2003). ACE2 wird auch von HCoV-NL63, einem Vertreter der *Alphacoronaviren*, als Rezeptor verwendet (Hofmann et al., 2005; Smith et al., 2006). Das ACE2 ist, ähnlich wie die APN, eine Zink-Metallprotease, die bei der Aufrechterhaltung des Blutdruckes und des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes von Bedeutung ist. ACE2 ist eine Peptidase, die das Peptid Angiotensin I in Angiotensin II umwandelt (Donoghue et al., 2000; Warner et al., 2004). In früheren Studien wurde

gezeigt, dass die Rezeptorbindungsstelle, ähnlich wie bei den anderen Coronaviren, im aminoterminalen Bereich des S-Proteins zwischen den Aminosäuren 270 bis 510, liegt (Babcock et al., 2004). In der RBD des S-Proteins sind die Aminosäuren 479 und 487 für die Bindung und Wirtsspezifität von großer Bedeutung (Li et al., 2005).

1.3.2 Sialinsäure-Bindungsaktivität

Die Sialinsäure-Bindungsaktivität wurde bereits früher bei den S-Proteinen einiger Vertreter der *Alpha*-, *Beta*- und *Gammacoronaviren* beschrieben. Das BCoV und das HCoV-OC43, die dem Genus *Betacoronavirus* zugeordnet werden, erkennen N-Acetyl-9-O-Acetylneuraminsäure (Neu5,9Ac₂) als Rezeptordeterminante (Vlasak et al., 1988b; Schultze et al., 1990; Schultze et al., 1992b). Die erste beschriebene Rezeptordeterminante ist N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), die von Influenza A- und B-Viren erkannt wird (Gottschalk, 1958). Influenza-C-Viren erkennen eine andere Sialinsäure, die N-Acetyl-9-O-Acetylneuraminsäure (Neu5,9Ac₂) (Rogers et al., 1986).

Sialinsäuren bezeichnen die N- und O-Derivate der Neuraminsäure, die häufig in den Zuckerketten von Glykoproteinen und Glykolipiden vorkommen. Sialinsäuren findet man an der Oberfläche von Zellmembranen, im Blut und in Drüsensekreten. Sie sind für Zellreifungs- und Alterungsprozesse von großer Bedeutung. Die verschiedenen Neuraminsäure-Derivate unterscheiden sich durch ihre Modifikationen, wie Acetylierungen und durch die Bindungen, mit den sie mit den Zuckerketten verknüpft sind. Mehrere Studien belegen, dass viele Viren und Bakterien Sialinsäuren als Rezeptordeterminante für die Einleitung einer Infektion nutzen. So ist eine Sialinsäure-Bindungsaktivität bei Mitgliedern der Familien *Paramyxoviridae*, *Reoviridae*, *Rotaviridae* und *Polyomaviridae* nachgewiesen worden (Suzuki et al., 1985; Fernandes et al., 1994; Rolsma et al., 1994).

Für den Viruseintritt und Gewebetropismus ist die Interaktion mit Sialinsäuren bei den Coronaviren auch von großer Bedeutung (Schwegmann-Wessels und Herrler, 2006; Winter et al., 2006). Zwei Vertreter der *Alphacoronaviren*, das enteropathogene TGEV und die attenuierte Form PRCoV, nutzen die oben beschriebene Aminopeptidase N als Rezeptor (Delmas et al., 1992). Zusätzlich

besitzen sie eine zweite Bindungsaktivität, die durch die Bindung an Sialinsäuren charakterisiert wird (Schultze et al., 1996). Durch die Sialinsäure-Bindungsaktivität kann TGEV Erythrozyten agglutinieren (Noda et al., 1987; Noda et al., 1988; Schultze et al., 1993). TGEV ist ein typisch enteropathogener Vertreter, der aber auch im Respirationstrakt replizieren kann. Degegen kann das PRCoV nur in den Zellen des Respirationstrakts replizieren. Das letztere Virus besitzt keine Hämagglutinationsaktivität und damit auch keine Sialinsäure-Bindungsaktivität. Am aminoterminalen Ende des PRCoV-S-Proteins findet man eine Deletion von 224/227 AS, die für die Bindung an pAPN nicht erforderlich sind (Sanchez et al., 1992; Jackwood et al., 1993). Die fehlenden 224/227 AS werden für die Bindung an Sialinsäuren benötigt. Das TGEV bindet bevorzugt an die N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) (Schultze et al., 1996). Die Sialinsäure-Bindungsaktivität scheint ein wichtiger Faktor für die Enteropathogenität von TGEV zu sein (Ballesteros et al., 1997; Krempl et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass durch Einführen von Punktmutationen an mehreren Positionen des N-Terminus vom TGEV-S-Protein, die Enteropathogenität des Virus reduziert wird (Bernard und Laude, 1995; Krempl et al., 1997; Krempl et al., 2000). Da die Bedingungen im Gastrointestinaltrakt durch den sauren pH und durch peristaltische Bewegungen nicht vorteilhaft für eine virale Infektion sind, hilft wahrscheinlich die Sialinsäure-Bindungsaktivität dem Virus länger im Darm zu verbleiben und so mehr Zeit für eine Bindung an pAPN zu gewinnen. Erst nach der Bindung an Sialinsäuren in der Schleimschicht der Darmmukosa, erreicht das Virus die Epitheloberfläche, wo es an pAPN bindet und die Enterozyten infiziert (Schwegmann-Wessels et al., 2002; Schwegmann-Wessels et al., 2003). Es wird vermutet, dass das Virus durch Verlust der Sialinsäure-Bindungsaktivität nicht mehr an muzinartige Glykoproteine im Darm binden kann (Schwegmann-Wessels et al., 2002; Schwegmann-Wessels et al., 2003). Um die in Zellkultur wachsenden Zellen mit TGEV zu infizieren, ist die Fähigkeit an Sialinsäuren zu binden eher von geringerer Bedeutung (Bernard et al., 1995; Krempl et al., 1997; Krempl et al., 2000). In einem Virus-Bindung-Assay konnte gezeigt werden, dass nach einer Vorbehandlung der Zellen mit Neuraminidase, die Anzahl an TGEV-gebundenen Zellen abnahm (Schwegmann-Wessels et al., 2002; Schwegmann-Wessels et al., 2003).

Über die Sialinsäure-Bindungsaktivität erkennt gereinigtes TGEV ein muzinartiges Protein (*mucin-like glykoprotein*, MGP), das bislang nicht näher identifiziert worden ist (Schwegmann-Wessels et al., 2002; Schwegmann-Wessels et al., 2003). Nach einer Vorbehandlung der zellulären Membranproteine mit Neuraminidase wurde die Bindung an MGP aufgehoben und nur die Bindung an pAPN detektiert (Schwegmann-Wessels et al., 2002; Schwegmann-Wessels et al., 2003). Weitere Studien mit Kryoschnitten aus Dünndarmgewebe belegen, dass TGEV vorwiegend an Becherzellen der Darmschleimhaut bindet, die für die Synthese und Sekretion von Muzinen verantwortlich sind. Die bisherigen Studien deuten darauf hin, dass die Sialinsäure-Bindungsaktivität von TGEV einen wichtigen Pathogenitätsfaktor darstellt (Ballesteros et al., 1997; Kreml et al., 1997).

Das infektiöse Bronchitits Virus, ein Vertreter der *Gammacoronaviren*, besitzt ähnlich wie TGEV die Fähigkeit an Sialinsäuren zu binden und Erythrozyten zu agglutinieren (Bingham et al., 1975). Eine Behandlung der Zellen mit Neuraminidase bewirkt eine Abnahme der Empfänglichkeit für Infektion durch die IBV-Stämme Beaudette und M41. Das IBV bindet bevorzugt an α -2,3-gebundene Sialinsäure. Ein Protein-Rezeptor analog dem APN bei TGEV wurde bei IBV bislang noch nicht identifiziert, Sialinsäuren wird aber beim Viruseintritt in die Zelle eine wichtige Rolle zugeschrieben (Winter et al., 2006).

1.4 Reverse Genetik

Reverse Genetik beschreibt die Möglichkeit den Genotyp eines Virus oder anderes Organismus zu verändern, so dass man die Auswirkungen der Veränderung auf die Funktion des Gens untersuchen kann. Die schnelle Entwicklung der verschiedenen reversen Genetik-Systeme in der Virologie seit den 90er Jahren hat dazu beigetragen, dass auch Coronaviren als Grundlage für die Erzeugung eines reversen Genetik-Systems verwendet wurden. Coronavirus-basierte reverse Genetik-Systeme wurden etabliert, um alle Aspekte der viralen Infektion analysieren zu können, wie Tropismus, Pathogenese, Viruseintritt, Viruszusammenbau und Replikation. Es gibt mehrere Vorteile eines Coronavirus-basierten reversen Genetik-Systems im Vergleich mit anderen viralen Systemen. Zu einem findet die Replikation eines RNA-

Virus im Zytoplasma statt, was die mögliche Integration des viralen Genoms in Chromosomen der Wirtszelle unwahrscheinlich macht (Lai et al., 1997). Zum anderen haben die Coronaviren das größte Genom aller bekannten RNA Viren, das genügend Platz für Insertion fremder Gene bietet (Enjuanes et al., 2001; Enjuanes et al., 2005). Außerdem kann durch Modifizierung des S-Proteins der Wirtstropismus verändert werden (Ballesteros et al., 1997; Sanchez et al., 1999; Kuo et al., 2000). Coronaviren verursachen meistens Erkrankungen des respiratorischen oder gastrointestinalen Traktes, wodurch zusätzlich eine starke sekretorische Immunantwort induziert werden kann.

In den 90er Jahren wurde von Masters die sogenannte gezielte RNA-Rekombination („*targeted RNA recombination*“) eingeführt, um Coronavirus-Genome zu manipulieren (Koetzner et al., 1992; Masters, 1999; Masters und Rottier, 2005). Durch diese Methode war es allerdings nur möglich, den zum 3`-Ende orientierte Abschnitt des viralen Genoms, der die Gene für die Strukturproteine, für einige Nichtstrukturproteine und eine nicht translatierte Region enthält, zu verändern (Masters et al., 2005). Genome von drei Vertretern der Coronaviren wurden auf diese Weise verändert: das Genom von MHV, FIPV und TGEV (Sanchez et al., 1999; Haijema et al., 2003; Haijema et al., 2004; Masters et al., 2005). Allerdings war es notwendig ein System zu entwickeln, das auch die zum 5`-Ende orientierten Bereiche des Genoms manipulieren kann.

Im Jahre 2000 ist es der Arbeitsgruppe von Enjuanes gelungen, ein cDNA-basiertes reverses Genetik-System zu erzeugen (Almazan et al., 2000). Als erste wurden rekombinante TGE-Viren von einem cDNA-Klon voller Länge, der als künstliches Bakterienchromosom (*bacterial artificial chromosome* – BAC) vorlag, generiert (Almazan et al., 2000). Die Stabilität der cDNA-Klone in *E.coli* wurde durch Insertion von Introns erreicht. Dieselbe Strategie wurde verwendet, um infektiöse cDNAs von SARS-CoV und HCoV-OC43 zu erzeugen (Almazan et al., 2006; St-Jean et al., 2006).

Eine andere Strategie, um infektiöse virale cDNA voller Länge zu erhalten, ist die sogenannte *in vitro*-Ligation der benachbarten kurzen cDNA Subklone, die die Sequenz des kompletten Genoms enthalten. Als erstes wurde mit dieser Methode

cDNA von TGEV konstruiert, gefolgt von cDNA für MHV, SARS-CoV und IBV (Yount et al., 2000; Yount et al., 2002; Yount et al., 2003; Youn et al., 2005b).

Eine weitere Möglichkeit virale cDNA eines Coronavirus zu gewinnen ist die *in vitro*-Transkription der infektiösen RNA von einer cDNA des Genoms, das mit Hilfe des Vaccinia Virus kloniert und vermehrt wird, wie für HCoV-229E und IBV gezeigt wurde (Casais et al., 2001; Thiel et al., 2001a). Die Vorteile der *in vitro*-Transkription liegen in der Stabilität der klonierten cDNA im Vaccinia Virus und in der Fähigkeit das Coronavirus-Genom durch homologe Rekombination des Vaccinia Virus-Genoms einfach zu modifizieren (Britton et al., 2005).

Als nicht-infektiöses System zur Analyse der viralen Replikation und Transkription gilt das System, das auf Coronavirus-Replikons basiert, die bei TGEV aus infektiöser cDNA abgeleitet wurden (Almazan et al., 2004). Auch von HCoV-229E wurden Replikons erzeugt, die als Fremdgene GFP, Chloramphenicol-Acetyltransferase und Luziferase exprimieren (Thiel et al., 2001b; Thiel et al., 2003). Replikationskompetente, aber nicht vermehrungsfähige TGE-Viren, bei denen das essentielle E-Gen deletiert wurde und durch Expression in einer Helfer-Zelllinie *in trans* gestellt wurde, wurden auch konstruiert (Ortego et al., 2002). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass nach einer Umordnung der Reihenfolge der einzelnen viralen Gene, die für Strukturproteine kodieren, ebenfalls replikationsfähige Viren entstehen können (de Haan et al., 2002).

Durch die Größe des Genoms und durch ihre einzigartige Transkriptionsstrategie sind Coronaviren für die Entwicklung multigener Expressionsvektoren sehr gut geeignet (Enjuanes et al., 2001). Eine Reihe der Nichtstrukturproteine der Coronaviren sind für die virale Replikation verzichtbar und können prinzipiell durch beliebige Gene ersetzt werden (Enjuanes et al., 2001; Thiel et al., 2003). Derzeit werden Coronavirus-basierte reverse Genetik-Systeme für die Produktion heterologer Proteine, Expression von Reportergenen sowie für Untersuchungen des viralen Replikationszyklus angewendet.

2 Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Bindungsaktivität des TGEV-S-Proteins. Das S-Protein, das sich in der Virushülle befindet, besitzt zwei Bindungsaktivitäten: Bindung an den zellulären Rezeptor porcine Aminopeptidase N (pAPN) und Bindung an Sialinsäurereste, bevorzugt N-Glykolyneuraminsäure als Bestandteil von Makromolekülen. Die Sialinsäure-Bindungsaktivität scheint ein wichtiger Faktor für die Enteropathogenität von TGEV zu sein. Frühere Untersuchungen belegen, dass das S-Protein von gereinigtem TGEV durch die Bindungsaktivität an Sialinsäuren ein muzinartiges Protein erkennt. Um das muzinartige Protein zu identifizieren und die beiden Bindungsaktivitäten des S-Proteins besser zu untersuchen, sollen lösliche Formen des TGEV S-Proteins erzeugt und in Säugerzellen exprimiert werden. Für die Erzeugung von löslichen TGEV-S-Proteinen wird der zytoplasmatische Abschnitt und der Membrananker entfernt. Die Proteine werden am C-Terminus mit Fc-Tag von humanem Immunglobulin G oder mit der Trimerisierungsdomäne des GCN4-Leucin-Zippers versehen. Die erzeugten löslichen Proteine sollen dann für zellbasierte Bindungstests verwendet werden. Für diesen Zweck werden Zelllinien eingesetzt, die den Rezeptor pAPN entweder endogen exprimieren oder in die zuvor das Rezeptorgen durch Transfektion eingeführt worden ist. Für die Identifizierung der Sialinsäure-Bindungseigenschaft sollen endständige Sialinsäurereste auf der Zelloberfläche mit Hilfe einer Neuraminidase entfernt werden. Auf diese Weise soll die Interaktion der löslichen Proteine mit dem zellulären Rezeptor pAPN und mit den Sialinsäuren analysiert werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist die Erzeugung von rekombinanten TGEV Virionen, die eine Mutation in dem zytoplasmatischen Abschnitt des S Proteins aufweisen. Ein bereits identifiziertes Tyrosin-haltiges Signal, das sich in dem zytoplasmatischen Abschnitt des S Proteins befindet, wird für die Zurückhaltung des S Proteins im subzellulären Kompartimenten verantwortlich gemacht (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Es soll gezeigt werden, wie sich Aminosäuren-Mutationen innerhalb des Retentionssignals auf die virale Replikation auswirken und ob überhaupt

replikationsfähige Viren entstehen können. Die rekombinanten Viren werden mit Hilfe der BAC-Technologie erzeugt, wobei das Wild-Typ Virus als cDNA durch die Arbeitsgruppe von Luis Enjuanes zur Verfügung gestellt worden ist.

3 Material

3.1 Zelllinien

BHK-21 *Baby hamster kidney cells*

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
Braunschweig.Nr. ACC 61

HEK-293T *Human embryonic kidney cells*

Prof. Thomas Pietschmann, Twincore GmbH

IPI-2I *Pig Intestine Ileum*

European collection of cell cultures Nr. 93100622

ST *Swine testis*

Dr. Christel Schwegmann-Wessels , Institut für Virologie, TiHo Hannover

3.2 Zellkulturmedien

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

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

EMEM-Fertigpulver	9,6 g	Gibco /Invitrogen
NaHCO ₃	2,2 g	Merck
<i>Aqua bidest steril</i>	Ad 1 l	

DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)

Edulb-Fertigpulver	9,6 g	Gibco /Invitrogen
NaHCO ₃	2,2 g	Merck

<i>Aqua bidest steril</i>	Ad 1 l	
---------------------------	--------	--

Versen-Trypsin 0,125%, pH 7

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

Zellkulturzusätze

Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG
Insulin	Roche
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH
Natriumpyruvat	Gibco/Invitrogen

Einfriermedium

EMEM oder DMEM	10 ml
FKS	10%
Glycerin	10%

Sonstige Materialien

Ethanol	AppliChem
Isopropanol	Roth

3.3 Viren

TGEV Purdue46-MAD

Das Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine wurde vom Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Das Ausgangsisolat wurde 1946 an der Purdue Universität in Indiana gewonnen (Doyle et al., 1946).

3.4 Bakterien

Escherichia coli XL1-Blue (E.coli)

Der *E. coli*-XL1-Blue-MRF⁻-Stamm wurde im Rahmen dieser Arbeit vermehrt, chemisch kompetent gemacht und bei der Hitzeschocktransformation verwendet. Die Bakterien wurden von der Firma Stratagene erworben.

Escherichia coli DH10B

Der *E. coli* DH10B–Stamm wurde von Prof. Louis Enjuanes aus Madrid zur Verfügung gestellt. Die Bakterien wurden vermehrt und elektrokompent gemacht. Sie wurden für die Elektroporation der BAC-Vektoren verwendet.

3.5 Bakterienkulturmedien

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

Trypton	10 g	AppliChem
Natriumchlorid (NaCl)	10 g	AppliChem
Hefe-Extrakt	5 g	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

Bei Bedarf wurden 20 g Agar-Agar/L (Roth) Medium zugefügt. Das LB-Medium wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurde das Medium in der Mikrowelle erhitzt, im Wasserbad auf 50°C abgekühlt und in Petrischalen gegossen. Benötigte Antibiotika wurden erst nach dem

Abkühlen des LB-Agars auf 42°C zugegeben (1:1000 Verdünnung der Stammlösungen).

Super Optimal Broth (SOB-Medium), pH 7,0

Das SOB Medium wurde für die Herstellung der elektrokompetenten DH10B Zellen verwendet.

Trypton	20 g	AppliChem
Natriumchlorid (NaCl)	0,5 g	AppliChem
Hefe-Extrakt	5 g	AppliChem
Kaliumchlorid	250 mM	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

Antibiotika

Ampicillin (50 mg/ml)	Roth
Kanamycin (30 mg/ml)	Roth
Chloramphenicol (16 mg/ml)	Roth

TFB I-Puffer

Calciumchlorid (CaCl ₂)	10 mM	Roth
Glycerin	15 %	AppliChem
Kaliumacetat (KCOOH)	30 mM	Merck
Rubidiumchlorid (RbCl ₂)	100 mM	Merck
Manganchlorid (MnCl ₂ x 4 H ₂ O)	50 mM	Merck
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

TFB II-Puffer

MOPS	10 mM	Roth
Rubidiumchlorid (RbCl ₂)	10 mM	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂)	75 mM	Roth
Glycerin	15 %	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

3.6 Plasmide

pCG1

Dieses Plasmid wurde von R.Cattaneo, Mayo Clinic, Rochester, USA zur Verfügung gestellt. Es beinhaltet einen Promotor vom Cytomegalievirus und ein Intron des β -Globin-Gens aus Kaninchen. Zur Selektion in Bakterien verfügt das Plasmid über eine Ampicillin-Resistenz (Cathomen et al., 1995).

pCG1-Fc und pCG1-FcATG

Bei diesen Plasmiden handelt es sich um eine Modifikation des pCG1 Plasmids. Sie beinhalten das Gen für das Fc-Fragment (Fc-Tag) vom humanen Immunglobulin G, wobei bei dem pCG1-FcATG Plasmid das Fc-Fragment ohne Insertion eines weiteren Fremdproteins exprimiert wird. Beide Plasmide wurden von Dr. Jörg Glende, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, hergestellt und zur Verfügung gestellt.

3.7 cDNAs

pCG1solS1Fc und pCG1solS1S2Fc

Es handelt es sich um Plasmide zur Expression löslicher S-Proteine. Beide Plasmide wurden von Dr. Jörg Glende, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, hergestellt und zur Verfügung gestellt.

pBACTGEVSC11FL

Bei diesem Konstrukt handelt es sich um ein künstliches Bakterienchromosom (Bacterial Artificial Chromosome), das die Expression des gesamten TGEV Genoms (AJ271965) erlaubt. Diese cDNA wurde von Prof. Luis Enjuanes, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spanien, zur Verfügung gestellt.

pSLTRS3a

Diese cDNA beinhaltet außer der kodierenden Sequenz für das TGEV-S Protein auch die stromabwärts des S-Gens liegende Abschnitte des viralen Genoms. Diese

cDNA wurde von Prof. Luis Enjuanes, Centro Nacional de Biotecnologia, Madrid, Spanien, zur Verfügung gestellt.

pSLTR3a_YI/AA, pSLTRS3a_4317, und pSLTRS3a_KM

Bei folgenden cDNAs handelt es sich um Modifikationen des pSLTRS3a Konstrukts, bei dem das Retentionssignal im cytoplasmatischen Abschnitt des S Proteins durch Aminosäurenaustausch oder Deletion von Aminosäuren verändert wurde. Bei der pSLTR3a-YI/AA Mutante sind in dem Retentionssignal des S-Proteins zwei Aminosäuren ausgetauscht: Tyrosin-1440 gegen Alanin und Isoleucin-1443 gegen Alanin. Die pSLTR3A_4317 ist eine Deletionsmutante bei der die 10 carboxyterminalen AS einschließlich des Retentionssignals aus dem zyttoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins entfernt wurden. Bei der pSLTRS3a_K/M Mutante wurde das carboxyterminal vom Retentionssignal gelegene Lysin-1445 gegen ein Methionin ausgetauscht. Die cDNAs wurden von Dr. Schwegmann-Wessels, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

pCDNA3.1-pAPN

Es handelt sich hierbei um ein Plasmid, dass zur Expression des Rezeptors von TGEV der porcinen Aminopeptidase N verwendet wurde. Die cDNA wurde von Dr. Schwegmann-Wessels, Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

3.8 Puffer und Lösungen

Agarosegelelektrophorese

10 x TBE-Puffer

Tris	108 g	AppliChem
Borsäure	53,4 g	AppliChem
EDTA	7,4 g	AppliChem
H ₂ O	ad 1 l	

10 x TAE-Puffer, pH 8

Tris/HCl, pH 8	40 mM	AppliChem
Natriumacetat (NaCH ₃ COO x 3 H ₂ O)	20 mM	Merck
EDTA (für 1x)	2 mM	AppliChem
H ₂ O	ad 1 l	

Ethidiumbromid-Färbegrad

Ethidiumbromid	1 g	Sigma
1 x TAE-Puffer	Ad 100 ml	

Die Stammlösung wurde zum Färben von Agarosegelen 1:20.000 mit 1 x TAE-Puffer verdünnt (0,5 µg/ml).

Sea Plaque Agarose	Biozym
<i>Generuler™ 100 bp DNA ladder plus</i>	MBI Fermentas
<i>Lamda DNA/EcoRI/HindIII Marker 3</i>	MBI Fermentas
<i>Generuler™ 1kb Plus DNA ladder</i>	MBI Fermentas
6x Loading Dye Solution	MBI Fermentas

Polyacrylamidgel-Elektrophorese**10 x SDS-Laufpuffer**

SDS	10 g	AppliChem
Tris	30 g	AppliChem
Glycin	144 g	AppliChem
H ₂ O	ad 1 l	

Sammelgellösung (5 ml)

H ₂ O	3,4 ml	
Acrylamidlösung 30%	0,83 ml	Roth
1 M Tris/HCl, pH 6,8	0,63 ml	Roth

10% SDS	50 µl	Roth
10% APS	50 µl	BIO-RAD
TEMED	10 µl	Sigma

Trenngellösung (12%) (5 ml)

H ₂ O	3,3 ml	
Acrylamidlösung 30%	4 ml	Roth
1 M Tris/HCl, pH 6,8	2,5 ml	Roth
10% SDS	100 µl	Roth
10% APS	100 µl	BIO-RAD
TEMED	16 µl	Sigma

20 x MOPS Laufpuffer, pH 7,0

MOPS	0,4 M	Sigma
Natriumacetat	160 mM	Sigma
EDTA	20 mM	AppliChem
H ₂ O	ad 1 l	

<i>PageRuler™ Plus Prestained Proteinin Ladder</i>	Fermentas
<i>Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder</i>	Fermentas
<i>Gel Code Blue Stain Reagent</i>	Pierce
<i>NuPAGE LDS sample buffer 4x</i>	Invitrogen
<i>NuPAGE Novex Tris-Acetate Mini Gels 3-8%</i>	Invitrogen

Western Blot

Anodenpuffer I, pH 9

1 M Tris/HCl, pH 9	300 ml	AppliChem
Ethanol	200 ml	AppliChem
H ₂ O	500 ml	

Anodenpuffer II, pH 7,4

1 M Tris/HCl, pH 7,4	25 ml	AppliChem
----------------------	-------	-----------

Ethanol	200 ml	AppliChem
H ₂ O	775 ml	

Kathodenpuffer, pH 9

Aminocaprinsäure	5,25 mg	Sigma
1 M Tris/HCl, pH 9	25 ml	AppliChem
Ethanol	200 ml	AppliChem
H ₂ O	775 ml	

PBS, pH 7,5

NaCl	8,0 g	AppliChem
KCl	0,2 g	AppliChem
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,15 g	Roth
KH ₂ PO ₄	0,12 g	Roth
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 g	Roth
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,132 g	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

PBSM, pH 7,5

NaCl	8 g	AppliChem
KCl	0,2 g	AppliChem
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,15 g	Roth
KH ₂ PO ₄	0,2 g	Roth
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	

PBSM 0,1% Tween

PBSM	2 l	Roth
Tween 20	2 ml	AppliChem

Immunfluoreszenz**3% Paraformaldehyd**

Paraformaldehyd	3 g	AppliChem
-----------------	-----	-----------

PBSM	ad 100 ml	
------	-----------	--

0,1 M Glycin in PBSM

Glycin	0,7 g	AppliChem
PBSM	ad 100 ml	

0,2% TRITON-X-100 in PBSM

TRITON X	0,2 g	Roth
PBSM	ad 100 ml	

1% BSA in PBS

BSA	1g	Roth
PBS	ad 100 ml	

Mowiol

Mowiol	2,5 g	Calbiochem
Glycerin	6,0 g	AppliChem
<i>Aqua bidest.</i>	6,0 ml	

Mykoplasmentest

DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid)	10 µg	Sigma
Ethanol	ad 10 ml	AppliChem

Fast protein liquid chromatography**Elutionspuffer, pH 3,0**

Natriumcitrat, 0,1 M	17 ml	AppliChem
Zitronensäure	33 ml	AppliChem

Neutralisationspuffer

Tris-HCl, pH 9,0	1 M	AppliChem
------------------	-----	-----------

Sonstige Puffer und Lösungen**NP40-Lysispuffer, pH 7,5**

Nonidet P 40	1%	Roche
Tris HCl, pH 7,5	50 mM	AppliChem
NaCl	150 mM	Roth
Protease-Inhibitor Complete	1 Tablette auf 50 ml	Roche

3.9 Synthetische Oligonukleotide

Die folgenden Primer wurden von den Firmen Invitrogen oder Sigma synthetisiert.

Name	Sequenz 5`-3`
TGEVS-S (400-419)	AGG GCT CAC CAC CTA CTA CC
TGEVS-S (800-819)	GGA GGT TTT ATA CCA TCA GA
TGEVS-S (1200-1219)	CAC TAT AAT GGC ACA GCT CT
TGEVS-S (1600-1619)	GTC TTG GTA TGA AGC GTA GT
TGEVS-S (2000-2019)	GTC TGA TAA TAG TGG TGT GC
TGEVS-S (2400-2419)	ACC TAT TCT AAC ATA GGT GT
TGEVS-S (2800-2819)	TAG GTG GTT CTT GGC TAG AA
TGEVS-S (3185-3204)	CGC TAG TGC TTT CAA TCA AG
TGEVS-S (3600-3619)	CAT TTG TTT TCA CTC GCA AA
TGEVS-S (4000-4019)	ACG CAA CCT ATT TAA ACC
TGEVs1Fc_AS (EcoRV)	TTT GAT ATC GTC TAT TGA CAC TGG TGT AGT
TGEVs1s2Fc_AS (EcoRV)	TTT GAT ATC TAC ATA GGT TTC AAT TCT ATT GAG CCA TT
TGEV_S1_AS (PstI)	TTT CTG CAG TTA GTC TAT TGA CAC TGG TGT AGT
TGEVS1S2_AS (PstI)	TTT CTG CAG TTA TAC ATA GGT TTC AAT TCT ATT GAG CCA TT
TGEV-S 2450	GGT GCT TTT GTT TTT ATT AA

TGEV-S 3060	CAC CTA ATG TTA TAC CAC CT
TGEVS-S 33350 (HindIII)	AGG GCA AGC TTT AAG CCA CCT AAC AGT ACA
TGEV-S Trimer1-AS	CGC GTT CAA TTT TAT CTT CAA TCT GTT TCA TTA CAT AGG TTT CAA TTC TAT T
TGEV-S Trimer2-AS	CGC GTT CGT TTT CAA TAT GAT AAA TTT TGC TCA GAA TTT CTT CAA TTT TAT CTT CAA TCT GTT T
TGEV-S Trimer3-AS	CGC GCT GCA GCT ACA CTT CGC CAA TCA GTT TTT TAA TAC GCG CAA TTT CGT TTT CAA TAT GAT AAA T
pCG1-S	CCT CTG CTA ACC ATG TTC AT
pCG1-AS	CCA ACA CAC TAT TGC AAT G

3.10 Enzyme, DNA-Polymerasen

<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/μl)	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase (5 U/μl)	MBI Fermentas
CIAP (1 U/μL) (<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>)	MBI Fermentas
SAP (1 U/μl) (shrimp alkaline phosphatase)	MBI Fermentas
Neuraminidase Typ V (<i>C.perfringens</i>)	Sigma-Aldrich
<i>Bam</i> HI (10 U/μl)	MBI Fermentas
BlnI (AvrII 10U/μl)	Roche
Clal /Bsu15I (10U/μl)	MBI Fermentas
<i>Eco</i> RI (10 U/μl)	MBI Fermentas
HindIII (10U/μl)	MBI Fermentas
PstI(10U/μl)	MBI Fermentas
<i>Xho</i> I (10 U/μL)	MBI Fermentas

3.11 Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft	Verdünnung/ Anwendung	Bezugsquelle
anti-TGEV-S	6A.C3	Maus	1:200 IF 1:200 WB	L. Enjuanes, Madrid
anti-pAPN	porzine APNG43	Maus	1:200 IF 1:200 WB	H. Laude, Jouys-en-Josas
anti-Maus- FITC	Maus IgG-FITC	Ziege	1:200 IF	Sigma
anti-Maus- Cy3	Maus IgG-Cy3	Schaf	1:200 IF	Sigma
anti-Maus- HRP	Maus Peroxidase	Kaninchen	1:1000 WB	DAKO
anti-hFc-FITC	Kaninchen IgG-FITC	Kaninchen	1:300 IF	Sigma
anti-hFc- Cy3	humanes IgG-Cy3	Ziege	1:300 IF	Sigma
anti-hFc- HRP	humanes IgG-HRP	Ziege	1:3000 WB	Sigma

3.12 Kits

<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen
<i>QiaexII Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>NucleoBond Xtra BAC100</i>	Macherey-Nagel
<i>NucleoBond Xtra Midi</i>	Macherey-Nagel

3.13 Substrate und Reagenzien

AEC-(3-Amino-9-Ethylcarbazol)	Sigma
Anti-Biotin Streptavidin-Peroxidase	Amersham Bioscience
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce

3.14 Weitere Chemikalien

Accutase	PAA
Amicon ® Ultra Centrifugal Filters Ultracel 100K	Millipore
Bovines Serumalbumin	AppliChem
Hi Trap™ Protein A HP columns	GE Healthcare
DEPC behandeltes Wasser	Roth
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
2-Mercaptoethanol	Fluka
Blocking-Reagenz	Roche
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Isopropanol	Roth
Lipofectamine™ 2000 Reagent	Invitrogen
MOPS	Invitrogen
Opti-MEM®	Gibco
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Triton X 100	Roth

3.15 Geräte und sonstige Materialien

Mikroskope

Fluoreszenzmikroskop Axiophot 2	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Nikon eclipse Ti	Nikon
Konfokales Mikroskop Leica TCS SP5	Leica
Lichtmikroskop Axiovert 25	Leitz

Zentrifugation

Ultrazentrifuge Modell 28-70 mit Rotoren SW28, SW41, SW55	Beckman
Ultrazentrifuge J2-21	Beckman
Tischzentrifugen (5417R, 5417C)	Eppendorf
Vacuumpumpe Speed Vac Savant	Savant Instruments
Megafuge 1,0R	Heraeus

Sonstige Materialien und Geräte

Autoklav Webeco	Jürgens
Brutschrank Typ B16	Heraeus
Coulter Epics XL Durchflusszytometer	Beckman Coulter
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus
<i>ChemiDoc</i> System	BIO-RAD
Elektrophoresekammer	Keutz
Elektrophoresekammer für Tris-Acetat Gele	Invitrogen
Fastblot Semi-Dry Blotter	Biometra
Elektroporationsküvette, 2 mm	BIO-RAD
FPLC Anlage	Pharmacia Biotech
Gene Pulser Xcell	BIO-RAD
Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech
Gradientenmischer	Keutz Labortechnik
Kühl- und Gefriergeräte	Liebherr
LKB-Pumpe	Pharmacia
<i>MF-Membrane Filters</i>	Millipore
Primus 25/96 Thermocycler	MWG Biotech

Photometer Ultraspec 2000	Amersham
pH-Meter	Jürgens
<i>RCT basic</i> Magnetrührer	IKA Labortechnik
Schüttelinkubator Typ 3033	GFL
Thermoblock	Liebisch
Thermomixer Kompakt	Eppendorf

3.16 Software

Axiophot 2 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Coulter Epics XL (Durchflusszytometer)	Beckman Coulter
Gel Capture Entry (DNA-Gel)	INTAS
NIS Viewer	Nikon
Quantity One V4.4.0 (ChemiDoc)	BIO-RAD
Adobe Photoshop CS2	Adobe

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine *in vitro*-Methode zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Voraussetzung zur Anwendung dieser Methode ist die Kenntnis der DNA-Sequenz an den Enden des zu amplifizierenden Abschnitts, an die zwei synthetische Oligonukleotid-Primer in gegenläufiger Orientierung binden können. Durch die Wahl geeigneter Primer können Mutationen, Deletionen, Insertionen und Restriktionsschnittstellen in das Amplifikat eingeführt werden. Jeder Zyklus einer PCR besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Anlagerungsschritt, und einem Elongationsschritt, bei dem mittels einer DNA-Polymerase ein neuer DNA-Doppelstrang synthetisiert wird. Zur Amplifikation der DNA wurde die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt, die über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Diese Aktivität verringert den Einbau von falschen Nukleotiden in den neusynthetisierten DNA-Strang. Die PCR-Reaktionen wurden, soweit dies nicht anders beschrieben ist, in einem Thermocycler unter den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 2: Standard-Ansatz für die *Pfu*-PCR

DEPC- H ₂ O	ad 50 µl
10 x <i>Pfu</i> -Puffer + MgSO ₄	5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 µM sense-Primer	2 µl
10 µM antisense-Primer	2 µl
Template-DNA	x µl (50-100 ng)
<i>Pfu</i> -Polymerase	1 µl

Tabelle 3: Bedingungen der *Pfu*-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
75 °C	Bis zum Abbruch	
95 °C	2 min	
95 °C	30 sec	10
55 °C – 0,2 °C	30 sec	
72 °C	2 min/kb	
95 °C	30 sec	8 -15
54 °C	30 sec	
72 °C	2 min/kb	
72 °C	7 min	
4 °C	Bis zum Abbruch	

Die *Pfu*-Polymerase wurde erst nach dem Erhitzen des PCR-Ansatzes auf 75 C° zugegeben.

4.1.2 Reinigung von DNA-Fragmenten

Nach der Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die PCR-Produkte und Vektoren mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* nach Angaben des Herstellers gereinigt, um Enzyme und Salze von der DNA zu entfernen. Nach der Reinigung wurde die DNA in DEPC-Wasser eluiert.

4.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Trennverfahren, das auf der Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld beruht. Die negativ geladene DNA wandert von der Kathode zur Anode mit einer Geschwindigkeit, die durch ihre Größe bestimmt wird. Die Elektrophorese wird sowohl zu analytischen (unter Verwendung von TBE-Puffer) als auch zu präparativen (unter Verwendung von TAE-Puffer) Zwecken eingesetzt. Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente lag die Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 1,5%. Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer, welche mit entsprechendem Laufpuffer gefüllt wurde. Die mit Probenpuffer versetzten DNA-Proben wurden zusammen mit dem DNA-Größenstandard, um die Größe der Fragmente besser abschätzen zu können, auf das Gel aufgetragen und aufgetrennt. Für analytische Zwecke erfolgte die Elektrophorese für 30 min bei 130 Volt und für präparative Zwecke für 60 min bei 80

Volt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele im Ethidiumbromidbad für ca. 10 min gefärbt und danach ca. 5 min im Wasserbad entfärbt. Ethidiumbromid ist ein DNA-bindender Farbstoff, der unter Anregung durch UV-Licht bei 245 nm fluoresziert und dadurch die DNA-Banden sichtbar macht.

4.1.4 Spaltung von PCR-Produkten mittels Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von bakteriellen Restriktionsendonukleasen, welche die DNA an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden, kann die DNA in die gewünschten Fragmente zerlegt werden. Die Restriktionsenzyme erzeugen überstehende Enden, die zueinander komplementär sind. Diese kompatiblen Enden können dann mit Hilfe einer DNA-Ligase verknüpft werden.

Tabelle 4: Restriktionsansatz:

DEPC-H ₂ O	ad 50 µl
10x Puffer*	5 µl
BSA**	0,5 µl
DNA	x µl
Enzym	1 - 5 µl

* es wurde jeweils der vom Hersteller des Enzyms empfohlene Puffer verwendet

** BSA wurde nur bei bestimmten Enzymen benötigt

Die Spaltungen erfolgten bei 37°C im Brutschrank, wobei Plasmid-DNA für 60 min und PCR-Produkte über Nacht verdaut wurden.

4.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach der Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA aus dem Gel isoliert. Für die Reinigung der DNA-Fragmente wurde zunächst wie unter 4.1.3 beschrieben ein präparatives Gel hergestellt. Um die zu reinigende DNA nicht durch UV-Licht zu schädigen, wurden nur die Markerspur und ein Referenzstreifen, der nur einen Teil der Probe enthält, im Ethidiumbromidbad gefärbt. Beim Betrachten unter dem UV-Licht wurden die gesuchten DNA-Banden mit Hilfe von Skalpelleinschnitten im Gel markiert. Die entsprechende Region wurde im ungefärbten Gel ausgeschnitten und

die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* oder des *Qiaex II Gel Extraction Kits* nach Angaben des Herstellers extrahiert.

4.1.5 Dephosphorylierung von linearisierten Plasmid-Vektoren

Um die Religation eines Plasmid-Vektors zu verhindern, wurden die freien Phosphatreste am 5'-Ende mit Hilfe einer Phosphatase entfernt. Die Probe (38 µl) wurde mit 2 µl CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) oder 2 µl SAP (*shrimp alkaline phosphatase*), 5 µl Wasser und 5 µl Puffer in einem Endvolumen von 50 µl für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem *PCR Purification Kit* gereinigt.

4.1.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm mit dem *Gene Quant II RNA/DNA Calculator* (Pharmacia) bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$OD_{260nm} \times (\text{Verdünnung} \times \text{Faktor}/1000) = \text{DNA-Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

Der spezifische Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA ist 50, d.h. eine OD von 1 entspricht einer Konzentration von ca. 50 µg / ml DNA.

4.1.7 Ligation von DNA

Die DNA-Ligase des T4-Bakteriophagen katalysiert die Bindung der Phosphodiester-Gruppen zwischen den 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA. Der geschnittene und gereinigte Vektor wurde mit dem geschnittenen und gereinigten PCR-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:5 angesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz ohne Insert-DNA.

Tabelle 5: Ligationsansatz

DEPC- H ₂ O	ad 20 µl
10 x Ligase-Puffer	2 µl
T4 DNA-Ligase (4 U/µL)	2 µl
Vektor-DNA	x µl (50-100ng)
Insert-DNA	x µl

Die Ligation wurde über Nacht bei 14 °C oder 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.1.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Mit einer Kolonie *E. coli* XL1-Blue wurden 20 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. 250 ml frisches LB-Medium wurden mit 5 ml dieser Vorkultur angeimpft und für 2-3 Stunden unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 inkubiert. Dann wurden die Bakterien pelletiert, in 75 ml TFB I resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 10 ml TFB II resuspendiert. Die Bakterien wurden in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.1.9 Herstellung elektrokompetenter *E.coli* Bakterien

Mit dieser Methode werden Bakterien kompetent gemacht, damit BAC-Vektoren oder andere Plasmide durch Elektroporation von *E. coli* DH10B aufgenommen werden können. Hierfür wurden zunächst 10 ml SOB-Medium mit einer Kolonie *E. coli* DH10B angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zwei Kolben mit 400 ml SOB-Medium wurden mit jeweils 400 µl dieser Vorkultur angeimpft und für 4-5 Stunden bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 0,7 inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 20 min bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 5000 U/min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 800 ml 10% Glycerin (mit SOB-Medium) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde mit 400 ml 10% Glycerin gemischt, erneut zentrifugiert und das Sediment erneut mit 200 ml 10% Glycerin resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation folgte die Resuspendierung der pelletierten Bakterien in 2,5 ml 10% Glycerin. Die Bakterien wurden in Portionen zu 110 µl im Ethanol-Trockeneisbad eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.1.10 Hitzeschock-Transformation

Mit Hilfe dieser Methode wird die zuvor ligierte DNA in *E. coli* XL1-Blue Bakterien eingeschleust. Dazu wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu den chemisch kompetenten Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 30 sec auf 42°C erhitzt. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 200 µl LB-Medium dazugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden auf einer LB-Ampicillin-Platte oder LB-Kanamycin-Platte ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

4.1.11 Elektroporation

Mit Hilfe dieser Methode wurden die BAC-Konstrukte in die elektrokompetenten Bakterien eingeschleust und vermehrt. Hierfür wurden 50 µl elektrokompetenter Bakterien mit 5 µl der zuvor mit Hilfe des *MF-Membrane Filters* entsalzener Ligation gemischt und in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω. Nach dem Puls wurden 500 µl SOB-Medium hinzu gegeben und das Gefäß für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien auf eine LB-Chloramphenicol-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.1.12 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob die Bakterien das gewünschte rekombinante Plasmid mit dem richtigen Insert aufgenommen haben, wurden die Kolonien mit Hilfe der PCR untersucht, wobei mindestens einer der beiden Primer spezifisch mit dem inklonierten Fragment hybridisierte. Als Polymerase wurde die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eingesetzt, die im Gegensatz zu der *Pfu*-Polymerase nicht über eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität verfügt. Pro Konstrukt wurden 10 Kolonien untersucht.

Tabelle 6 : Mastermix für 12 PCR Reaktionen:

DEPC- H ₂ O	132 µl
10 x Taq-Puffer	18 µl
25 mM MgCl ₂	14,4 µl
10 mM dNTP	3,6 µl
10 µM sense-Primer	2 µl

10 μ M antisense-Primer	2 μ l
Template-DNA	x μ l (50-100 ng)

Je 15 μ l dieses Ansatzes wurden in PCR-Gefäßen vorgelegt. In entsprechender Anzahl wurden 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit 250 ml LB-Medium und entsprechendes Selektionsantibiotikum angesetzt und durchnummeriert. Mit Hilfe einer 10 μ l Pipettenspitze wurden die Kolonien von der Agarplatte gepickt und nacheinander in dem entsprechenden PCR-Ansatz und im LB-Medium resuspendiert. Als Positivkontrolle wurden 2 μ l des Ligationsansatzes zu einem PCR-Ansatz gegeben. Die LB-Kulturen wurden bei 37°C geschüttelt, während die PCR-Reaktion unter folgenden Bedingungen ablief.

Tabelle 7 : Bedingungen der Kolonie-PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	2 min	
95°C	15 sec	
55°C	30 sec	20
72°C	x min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

Die PCR-Produkte wurden auf einem TBE-Gel bei 130 Volt aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Mit jeweils 2 positiven Klonen wurden Bakterienkulturen für eine anschließende Plasmidpräparation angesetzt.

4.1.13 Plasmid-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA diente zur Gewinnung von DNA aus einer Bakterienkultur. Je nach Bedarf erfolgte die Präparation entweder mit dem *NucleoBond Xtra Midi Kit* (100 ml Bakterienkultur) oder dem *NucleoBond BAC100 Kit* (300 ml Bakterienkultur) nach Angaben des Herstellers.

4.1.14 Sequenzierung

Die Plasmide wurden von der Firma *MWG Biotech AG* in Martinsried oder von der Firma *GATC* sequenziert. Der Vergleich der sequenzierten Sequenz mit der Originalsequenz wurde mit dem *Blast* Programm von *NCBI*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) durchgeführt. Für das Umschreiben der erhaltenen DNA-Sequenzen in die Aminosäuresequenz wurde das Programm *Transeq* von EMBOSS verwendet (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/transeq/>).

4.2 Zellkulturtechnik

4.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit 20 ml Medium kultiviert und alle zwei bis vier Tage passagiert. Zunächst wurde dabei das Medium abgenommen und die Zellen einmal kurz mit 10 ml PBSM gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 4 ml Trypsin/EDTA dazugegeben, kurz geschwenkt, 3 ml wieder abgenommen und die Zellen mit dem restlichen Trypsin inkubiert, bis sie sich von dem Flaschenboden ablösten. Anschließend wurden die Zellen in Medium mit FKS resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden bis zu 9,5 ml verworfen oder zum Aussäen der Zellen verwendet. Für die weitere Kultivierung wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 bis 1:20 in einem Volumen von 10 ml Zellkulturmedium umgesetzt.

Tabelle 8: Zellkulturbedingungen der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Medium	FKS	Zellkulturzusätze
BHK-21	EMEM	5%	
HEK-293T	DMEM	5-10%	Pyruvat
IPI-2I	DMEM	10%	L-Gluthamin, Insulin, Pyruvat
ST	DMEM	10%	

4.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Konservierung der Zellen wurden die Kulturen eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden trypsiniert, in 9 ml Medium aufgenommen und für 5 min bei 400 g x zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium bestehend aus EMEM oder DMEM, 10% Glycerin und 10 % FKS, resuspendiert. Die Zellsuspension

wurde in Aliquots von je 1 ml in Kryoröhrchen abgefüllt und in dem *Strata Cooler Cryo Preservation Module* bei -80°C eingefroren. Zum Auftauen wurden die Gefrierkulturen bei 37°C im Wasserbad erwärmt und mit 10 ml Medium versetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt.

4.2.3 DAPI-Test

Alle zwei bis vier Wochen wurden die Zellen mittels DAPI-Test auf Mycoplasmen getestet. Dazu wurden die Zellen dünn auf Deckgläschen ausgesät, damit sie am nächsten Tag vereinzelt waren. Nach dem Waschen mit PBS folgte eine Inkubation mit 200 μl DAPI-Lösung pro Deckgläschen. Die zu untersuchenden Deckgläschen wurden mit Mowiol auf einem Objektträger fixiert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zusätzlich zum DAPI-Test wurden die Zellen alle zwei Monate in einem ELISA-Test auf Mycoplasmen getestet.

4.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zahl der Zellen wird mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei wurde ein Tropfen der Zellsuspension auf die Kammer pipettiert und ein Deckglas aufgelegt.

Unter dem Mikroskop wurden vier Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert von 4 Großquadraten} \times 10^4$$

4.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

4.3.1 Transiente Transfektion von BHK-21-Zellen

Das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Da die Genexpression der eingebrachten Plasmide hierbei auf wenige Tage beschränkt ist, bezeichnet man sie als transient. Für die Transfektion wurden die Zellen am Vortag mit einer Anzahl von 2×10^5 Zellen/ml in 24-Napf-Schalen (je 1 ml Zellsuspension), in 6-Napf-Schalen (je 2,5 ml Zellsuspension) oder auf 10 mm-Schalen (je 10 ml Zellsuspension) ausgesät. Die Zellen waren am Tag der Transfektion 80-100% konfluent. Transfiziert wurden je $1,5 \mu\text{g}$ DNA/Deckglas bei

Einzelexpression und je 1 µg DNA/Konstrukt bei Co-Transfektion. Das Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz betrug 1 µg DNA zu 2 µl Transfektionsreagenz. Die Durchführung der Transfektion erfolgte mittels *Lipofectamine™ 2000 Reagent* nach Angaben des Herstellers. Nach der Transfektion wurden die Zellen 16-24 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

4.3.2 Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

Bei einer Calcium-Phosphat-Präzipitation bindet die zu übertragende DNA in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat an ausfallendes Calciumphosphat. Die ausgefallenen Präzipitate werden dann von den Zellen durch Endozytose aufgenommen.

Für die Transfektion wurden HEK-293T-Zellen am Vortag in 100 mm-Schalen mit einer Konzentration von 10⁵ Zellen/ml ausgesät. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Transfektion. Dafür wurde zunächst die DNA (15 µg/Schale) mit 200 µl H₂O verdünnt und in einem separaten Reaktionsgefäß 50 µl Calciumchlorid mit 250 µl 2 x HBS Puffer gemischt. Daraufhin wurden die DNA und die Calciumphosphatmischung zusammen pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde das Gemisch tropfenweise zu den Zellen gegeben und diese für 8-16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel mit Medium das 3% FKS enthielt. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände geerntet und die löslichen Proteine daraus gereinigt.

4.3.3 Transfektion zur Erzeugung rekombinanter Viren

Für die Transfektion der viralen cDNA im BAC-Vektor wurden in 30 mm-Schalen am Vortag BHK-21-Zellen mit einer Konzentration von 2 x 10⁵ Zellen/ml in EMEM und ST Zellen auf 100 mm-Schalen mit einer Konzentration von 2 x 10⁵ Zellen/ml in DMEM mit 10% FKS ausgesät. Die Transfektion erfolgte mittels *Lipofectamine™ 2000 Reagent* nach Angaben des Herstellers. Um bessere Transfektionseffizienz zu erzielen wurde anstatt von EMEM das Opti-MEM®-Medium verwendet. Nach einer Inkubation von 5 h bei 37 °C wurden die transfizierten Zellen mit 200 µl Trypsin gewaschen und nach erneuter Trypsinzugabe bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen

ablösen. Danach wurden die abgelösten BHK-21-Zellen auf die am Vortag auf 100 mm-Schalen ausgesäten ST-Zellen gegeben und diese Zellmischung für 3 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

4.4 Biochemische und immunologische Methoden

4.4.1 Immunfluoreszenztest

Nach einer Transfektion standen am nächsten Tag die Deckglaskulturen in 24-Napf-Schalen für den Immunfluoreszenztest zur Verfügung. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl 3% Paraformaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschschrift mit 0,1 M Glycin in PBS wurden die Zellen mit 250 µl Glycin für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Nachweis von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen mit 0,2% TRITON-X-100 in PBSM für 10 min permeabilisiert. Um die gewünschten Proteine sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern behandelt. Der primäre Antikörper wurde in 1% BSA/PBS verdünnt und als 30 µl Tropfen in einer feuchten Kammer vorgelegt, die fixierten Deckglaskulturen mit der Zellseite auf den Tropfen gelegt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der ersten Inkubation wurden die Deckgläser zurück in die 24-Napf-Schalen gebracht, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einer feuchten Kammer mit dem zweiten Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Deckgläser wurden mit warmem Mowiol auf einem Objektträger eingebettet. Nach dem Trocknen des Mowiol bei 4 °C im Dunkeln konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop oder dem konfokalen Lasermikroskop unter Verwendung geeigneter Filter betrachtet und ausgewertet werden.

4.4.2 Nachweis von Proteinen im Zelllysat transfizierter Zellen mit anschließender Präzipitation

Nach der Transfektion mit den gewünschten Konstrukten wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgelöst und in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml-Gefäße überführt und bei

3800 x g für 5 min bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 100 µl 1% NP40-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden bei 20000 x g für 30 min bei 4°C pelletiert und die Überstände in neue 1,5 ml-Gefäße überführt. Für den Western-Blot wurden je 50 µl der Überstände abgenommen und mit 50 µl 4xSDS-Probenpuffer versetzt. Die Affinitätsreinigung wurde mit Protein-A-Sepharose durchgeführt, da die exprimierten löslichen Proteine mit einem Protein-A bindenden Fc-Tag versehen waren. Hierfür wurden 50 µl der Protein-A-Sepharose dreimal mit je 1 ml NP40-Puffer ohne Proteaseinhibitoren gewaschen, mit den Überständen gemischt und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze bei 10.000 U/min für 3 min zentrifugiert und wie am Vortag dreimal mit je 1 ml NP40-Lysispuffer ohne Proteaseinhibitoren gewaschen. Die pelletierte Protein-A-Sepharose wurde mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 96 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 20000 x g für 5 min wurden die Überstände abgenommen und standen für die anschließende Auftrennung durch die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) bereit oder wurden bei -20°C gelagert.

4.4.3 *Fast protein liquid chromatography (FPLC)*

Bei der FPLC handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von Proteinen oder anderen Biomolekülen aus einem komplexen Gemisch mit Hilfe einer flüssigen mobilen und einer festen stationären Phase.

Für die Aufreinigung der löslichen Proteine während dieser Arbeit wurden 24 und 48 Stunden nach Transfektion die proteinhaltigen Zellkulturüberstände gesammelt und bei 2800 x g und 4°C zentrifugiert. Die löslichen Proteine wurden durch einen 0,45 µm Filter vorfiltriert, um eventuell vorhandene Verunreinigungen und andere Partikeln zu entfernen und auf Amicon® Ultra Centrifugal Filters Ultracel 100K konzentriert. Hierbei wurden der Lösung alle Proteine unter 100 kDa Molekulargewicht entzogen und das Gesamtvolumen auf 1/3 verringert.

Zur Reinigung der Proteine mit einem Fc-Tag wurden die Hi Trap™ Protein A HP Säulen verwendet, die durch ihre Spezifität für die Fc-Region charakterisiert sind. Nach dem die Pumpen nach Angaben des Herstellers gewaschen worden waren, wurden 100 ml des vorfiltrierten und konzentrierten Zellkulturüberstandes auf die FPLC Säule beladen und mit dem gleichen PBS Volumen gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 10 ml Elutionspuffer eluiert, wobei Fraktionen von 1

ml in Gefäße mit vorgelegtem Neutralisationspuffer (200 µl) gesammelt wurden. Nach der Aufreinigung wurde die Konzentration photometrisch bestimmt, die Proteine aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.4.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Laemmli, 1970) werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen der Proteine überdeckt. Durch SDS werden die Proteine denaturiert und die Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbunden. Bei der SDS-PAGE wandern die SDS-Proteinkomplexe im elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Molekulargewicht auf. Im ersten Schritt wurde die Gelapparatur zusammengebaut. Dann wurde die Trenngelmischung zusammenpipettiert, in den Zwischenraum zwischen die beiden Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem vollständigen Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgelmischung zusammenpipettiert und in die Gelapparatur gegossen. Die Trenngele hatten die Maße 50 x 80 x 0,75 mm³ und eine Acrylamidkonzentration von 10% oder 12%. Erfolgte die Auftrennung unter nicht reduzierenden Bedingungen, so wurden die Proben nach der Zugabe von SDS-Probenpuffer für 5 min bei 96 °C denaturiert und aufgetragen. Für reduzierende Bedingungen wurde den Proben zusätzlich 100 mM DTT zugefügt und für 3 min bei 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 130 V. Der Lauf wurde beendet, wenn der Bromphenolblau-Marker des Probenpuffers den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

4.4.5 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel getrennt und dieses auf eine mit H₂O getränkte Nitrozellulosemembran mit Hilfe der "Semi-Dry-Blot"-Technik (Kyhse-Anderson, 1984) transferiert. Auf die Graphitelektrode (Anode) der Blot-Apparatur wurden Filterpapier, Nitrozellulose und Gel in der folgenden Reihenfolge gelegt: 6 Blatt Filterpapier getränkt in Anodenpuffer I, 3 Blatt Filterpapier getränkt in Anodenpuffer II, Nitrozellulose getränkt in Wasser, Gel und 9 Blatt

Filterpapier getränkt in Kathodenpuffer. Die Kammer wurde mit der oberen Graphitelektrode (Kathode) geschlossen und der Transfer erfolgte für 60 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm². Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit *Blocking Reagenz* (0,5% in PBSM) über Nacht bei 4°C abgesättigt.

4.4.6 Immunologische Detektion von Proteinen

Im nächsten Schritt wurden die auf die Nitrocellulose-Membran übertragenen Proteine mittels Antikörper nachgewiesen. Alle Inkubationen wurden bei 4°C für jeweils eine Stunde durchgeführt, wobei die Membran in 10 ml der entsprechenden Antikörperverdünnung geschwenkt wurde. Die Nitrocellulose-Membran wurde vor jeder Inkubation dreimal für jeweils 10 min mit PBSM-0,1% Tween unter Schwenken gewaschen. Zur Detektion des Antigens wurden 1000 µl der Antikörperlösung auf die Membran gegeben und unter Parafilm für 1 h bei 4°C inkubiert. Dieser Inkubation folgten drei weitere Waschschriffe mit PBSM-0,1% Tween und eine weitere Antikörperinkubation, z. B. mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, gefolgt von drei weiteren Waschschriffen mit PBSM-0,1% Tween. Der gebundene Peroxidasekomplex konnte nach ein- bzw. fünfminütiger Inkubation mit *BM Chemoluminescence Blotting Substrate* bzw. *Super Signal* mit Hilfe des ChemiDoc System (BIO-RAD) detektiert werden.

4.5 Virologische Methoden

4.5.1 Vermehrung von TGEV auf ST-Zellen

Für die Virusvermehrung wurden ST-Zellen in einer 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 1 h mit 3 ml Virussuspension entsprechend einer m.o.i. (*multiplicity of infection*) von 1 pfu/Zelle unter Schwenken bei 37°C und 5%-CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Virus von den Zellen entfernt, die Zellen gewaschen und die Zellkulturflasche mit 20 ml DMEM-Medium aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurde der virushaltige Zellüberstand abgenommen und für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert, um die

Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.5.2 Plaquetest

Mit Hilfe des Plaque-Tests lässt sich die Zahl infektiöser Viruseinheiten in einer Virussuspension quantitativ bestimmen. Der Test setzt voraus, dass das verwendete Virus einen zytopathischen Effekt hervorruft. Die Ausbreitung von Viren durch Diffusion wird durch halbfestes Agarmedium verhindert, wodurch sich die infektiösen Viren nur von Zelle zu Zelle ausbreiten können und einen „Plaque“ bilden. Die lebenden Zellen lassen sich mit einem Vitalfarbstoff anfärben, so dass sich die infizierten Zellen im Zellrasen als helle Flächen vom angefärbten Zellrasen abheben.

ST-Zellen wurden in 6-Napf-Platten mit $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät, so dass sich am folgenden Tag ein 80-100% konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Von der Virussuspension wurden zwei Verdünnungsreihen mit dem Faktor 10 angefertigt, wobei Medium zum Verdünnen verwendet wurde. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und $500 \mu\text{l}$ von jeder Verdünnungsstufe zu den Zellen in je zwei Näpfen gegeben. Die Platten wurden für eine Stunde auf einem Schwenktisch im Brutschrank bei 37°C inkubiert und anschließend mit Agarose-DMEM-Gemisch überschichtet. Dazu wurde Agarose (1,6% in H_2O) aufgekocht und im Wasserbad auf 46°C abgekühlt. Zweifach konzentriertes DMEM-Medium wurde auf 37°C vorgewärmt, zu gleichen Teilen mit der Agaroselösung vermischt und 2 ml des Gemisches in jede Vertiefung pipettiert. Damit die Agarose erstarren konnte, wurden die Platten für 15 min im Kühlschrank stehen gelassen. Anschließend wurden die Platten für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Plaquetests wurden mit 1,6% iger Sea-Plaque-Agarose/0,0125% Neutralrot überschichtet und über Nacht gefärbt. Lebende Zellen wurden durch den Farbstoff Neutralrot angefärbt, wogegen die Plaques farblos blieben. Die Plaques wurden gezählt und der Virustiter in „*plaque-forming units*“ pro ml (pfu/ml) angegeben.

4.5.3 Immunoperoxidase-Test

ST-Zellen wurden in einer 96-Napf-Platte in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in einem Volumen von $100 \mu\text{l}$ /Napf ausgesät, so dass die Zellen am folgenden Tag einen konfluenten Zellrasen gebildet haben. Es wurden zwei

Virusverdünnungsreihen im serumfreien DMEM-Medium in 10-er Schritten vorbereitet und 50 µl von jeder Verdünnungsstufe pro Vertiefung zu den Zellen gegeben und für 1 Stunde bei 37°C schwenkend inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und mit serumfreiem DMEM bei 37°C kultiviert. Nach einer zweitägigen Kultivierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min bei RT mit 3%-igem Paraformaldehyd fixiert. Um Reste von Paraformaldehyd zu entfernen, wurden die Zellen mit 0,1 M Glycin gewaschen, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation mit 0,1 M Glycin. Die Permeabilisierung der Zellen wurde mit 0,2% Triton-X-100 für 10 min bei RT durchgeführt und die Zellen anschließend mit einem Antikörper gegen das TGEV-S Protein (6A.C3) inkubiert. Der Antikörper wurde 1:200 verdünnt und 100 µl pro Vertiefung eingesetzt. Es erfolgte eine Inkubation von 1 h bei RT, nach welcher die Zellen dreimal mit PBS gewaschen wurden. Der peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (Anti-Maus-HRP) wurde 1:500 verdünnt und mit den Zellen für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe des AEC-Substrats von 200 µl pro Vertiefung und eine Inkubation von 20 min bei RT. Die Platten wurden zweimal mit Leitungswasser gewaschen und die infizierten rot gefärbten Zellen unter Lichtmikroskop betrachtet.

4.5.4 Virusreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation

Für die Virusreinigung wurden ST-Zellen auf zehn 145 mm-Schalen in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml mit 25 ml pro Schale ausgesät und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Am Tag der Infektion wurde der Überstand abgenommen, der Zellrasen mit DMEM-Medium ohne FCS gewaschen und eine Virusverdünnung erstellt. Die Zellen wurden mit einer m.o.i. von 1 infiziert und für 1 h mit 4 ml der Virusverdünnung bei 37°C geschwenkt. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und die Zellen dreimal mit EMEM-Medium ohne FCS gewaschen und mit 20 ml EMEM-Medium ohne FCS überschichtet. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 3000 U/min bei 4°C für 10 min entfernt. Zum Sedimentieren der Viruspartikel wurden SW28-Zentrifugenröhrchen mit je 35 ml des Überstandes befüllt und in der Ultrazentrifuge bei 27.000U/min bei 4°C für 1 h zentrifugiert. Währenddessen wurden 60%, 50% und 20% (w/w) Saccharoselösungen in PBS angesetzt und bei 50°C gerührt. Je 0,5 ml der 60% Saccharoselösung wurden in SW55-Zentrifugenröhrchen als Saccharosekissen

gefüllt. Aus den 20% und 50% Saccharoselösungen wurde mit Hilfe einer Pumpe und eines Gradientenmischers ein kontinuierlicher Saccharosegradient erstellt. Die Viruspellets wurden in 400 µl PBS resuspendiert, vorsichtig auf den Gradienten pipettiert und bei 35.000 U/min bei 4°C für 60 min zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation wurde die Virusbande mit Hilfe einer Kanüle und einer 1 ml Spritze unter Belichtung entnommen, in neue SW55-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 35.000 U/min bei 4°C für 60 min pelletiert. Das Viruspellet wurde in 200 µl PBS aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

4.6 Bindungstests mit löslichen TGEV-S Proteinen

4.6.1 Neuraminidase-Behandlung

Um die endständigen Sialinsäuren auf der Oberfläche von Zellen zu entfernen, wurden die Zellen mit Neuraminidase Typ V aus *Clostridium perfringens* vorbehandelt. Die Desialylierung erfolgte einen Tag nach der pAPN Transfektion oder einen Tag nach dem Aussäen von pAPN endogen exprimierenden Zelllinien. Bevor die Zellen fixiert wurden, wurden 100 mU Neuraminidase, verdünnt mit Medium in einem Volumen von 200 µl/Deckglas zugesetzt und bei 37 °C für eine Stunde geschwenkt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und standen für weitere Versuche zur Verfügung.

4.6.2 Immunfluoreszenz-Bindungstest

Für diesen Bindungstest wurden 2×10^5 Zellen/ml auf Deckgläser kultiviert und am folgenden Tag wie unter 4.4.1 beschrieben mit 3% PFA fixiert. Die Inkubation mit dem löslichen TGEV-S Protein erfolgte für 2 Stunden bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Nach dreimaligen Waschen wurden die Deckgläser zurück in die 24-Napf-Schalen gebracht, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einer feuchten Kammer mit dem zweiten Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Deckgläser wurden mit warmem Mowiol auf einem Objektträger fixiert. Nach dem

Trocknen des Mowiois bei 4°C im Dunkeln konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop oder dem konfokalen Lasermikroskop unter Verwendung geeigneter Filter betrachtet und ausgewertet werden.

4.6.3 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie wurde für die quantitative Untersuchung der Bindung von löslichen TGEV-S-Proteinen an die Zellen durchgeführt. Für diesen Zweck wurden BHK-21-Zellen am Vortag mit pAPN transfiziert oder pAPN endogen exprimierende ST-Zellen in 6-Napf-Platten kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 600 µl Accutase behandelt. Nach Ablösen der Zellen wurden diese mit 0,1% BSA in PBS versetzt. Nach dem Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min folgte die Inkubation der Zellen für 1 h mit löslichem TGEV-S-Protein in einem Überkopfschüttler. Die Zellen wurden dreimal mit 0,1% BSA in PBS gewaschen und bei 1000 U/min für 5 min pelletiert. Nach der Inkubation mit anti-Fc-FITC oder anti-TGEV-S Antikörper für 1 h bei 4 °C erfolgte erneutes Waschen der Zellen mit 0,1% BSA in PBS. Nach Resuspendieren der Zellen wurden diese direkt in einem Beckmann Coulter Epics Durchflusszytometer analysiert und die Bindung des löslichen TGEV-S Proteins an pAPN exprimierende Zellen mit der EXPO32 Analysesoftware quantifiziert.

4.6.4 Erythrozyten-Bindungstest

Aus den zuvor isolierten Schweine- und Hühnererythrozyten wurde eine 1%-Suspension (in PBS) hergestellt und diese für den Bindungstest mit löslichen TGEV-S-Proteinen verwendet. Hierfür wurden 500 µl Erythrozyten mit 50 µl löslicher Proteine für 1 h in einem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert und 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde wie unter 4.4.2 beschrieben einer Protein A-Präzipitation unterzogen, wobei eine Inkubation der Protein A-Sepharose mit einem Antikörper nicht notwendig war, da der an löslichen Proteinen verbundene Fc-Tag an Protein A bindet. Die Auswertung der Präzipitation erfolgte mittels einer Western Blot-Analyse.

4.6.5 Bindungstest mit isolierten Membranproteinen

Um die Membranproteine zu isolieren, wurden ST-Zellen auf zwei 145 mm–Schalen ausgesät, damit sie am nächsten Tag konfluent vorlagen. Nach zweimaligem Waschen mit PBSM wurden die Zellen in je 10 ml PBSM abgeschabt und bei 2000 U/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml PBSM resuspendiert und tropfenweise, unter Schwenken, zu 20 ml TRIS Puffer, pH 7,4, hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 20 min wurde die Zellsuspension 20-30 Mal im Dounce-Homogenisator geschert. Um die Zellkerne zu entfernen, wurde die Suspension bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das entstandene Pellet erneut in TRIS-Puffer, pH 7,4, resuspendiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde mit dem ersten vereinigt und in der Ultrazentrifuge bei 25.000 U/min und 4°C für 1 h sedimentiert. Das Sediment, welches die Membranfraktion enthält, wurde in 200 µl PBSM resuspendiert und für weitere Versuche verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Um einen Bindungstest mit den löslichen TGEV-S Proteinen durchzuführen, wurden die zuvor isolierten Membranproteine in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und über Nacht mit *Blocking Reagenz* (0,5% in PBSM) bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Schwenken für jeweils 10 min mit PBSM-0,1% Tween folgte die erste Inkubation mit 500 µl des konzentrierten löslichen Proteins unter Parafilm für 1 h bei 4 °C. Dieser Inkubation folgten drei Waschschrte mit PBSM-0,1% Tween und eine Antikörperinkubation, gefolgt von drei weiteren Waschschrten mit PBSM-0,1% Tween. Anschließend folgte die letzte Antikörperinkubation mit peroxidase-gekoppelten Immunglobulinen für 1 h bei 4 °C. Der gebundene Peroxidasekomplex konnte nach fünfminütiger Inkubation mit *Super Signal Kit* mit Hilfe des ChemiDoc System (BIO-RAD) detektiert werden.

5 Ergebnisse

5.1 Bindungstests mit löslichen TGEV-S Proteinen

5.1.1 Erzeugung und Expression von löslichen S-Proteinen

Das TGEV-S Protein besitzt zwei Bindungsaktivitäten: Bindung an den zellulären Rezeptor porcine Aminopeptidase N (pAPN) und Bindung an terminale Sialinsäurereste von Makromolekülen (Delmas et al., 1992; Schultze et al., 1996).

Um die beiden Bindungsaktivitäten des S-Proteins besser zu untersuchen, sollten lösliche Formen des TGEV S-Proteins erzeugt und in Säugerzellen exprimiert werden.

Für die Erzeugung von löslichen TGEV-S-Proteinen wurden der zytoplasmatische Abschnitt und der Membrananker entfernt. Die Proteine wurden am C-Terminus mit Fc-Tag vom humanen Immunglobulin G oder mit der Trimerisierungsdomäne des GCN4-Leucin-Zippers versehen. Außerdem wurden lösliche Konstrukte ohne einen Tag erzeugt. Dabei handelte es sich um Konstrukte, die entweder beide Untereinheiten des S-Proteins oder nur die S1-Untereinheit enthielten. Da das TGEV-S-Protein in gespaltener Form nicht vorkommt, wurde die S1-Untereinheit entsprechend der Sequenz der S1-Untereinheit des SARS-S Proteins hergestellt. Konstrukte, die mit dem Fc-Tag versehen waren, standen bereits zu Beginn dieser Doktorarbeit zur Verfügung und konnten direkt für die Expressionsstudien und Bindungstests verwendet werden. Weitere Konstrukte wurden entsprechend dem Klonierungsablauf (4.1) kloniert und in BHK-21-Zellen exprimiert. Es handelte sich dabei um die in der **Abbildung 2** dargestellten Konstrukte solS1S2Trim, solS1 und solS1S2.

Um die Expression der löslichen S-Proteine zu analysieren, wurden BHK-21-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert, 24 Stunden nach der Transfektion mit 3% PFA fixiert und mit Triton-X-100 permeabilisiert. Die Permeabilisierung der Zellen war notwendig, um die intrazelluläre Lokalisation der löslichen Proteine mittels Antikörper nachweisen zu können. Die Färbung erfolgte mit einem anti-TGEV-S und einem anti-Maus-FITC-Antikörper.

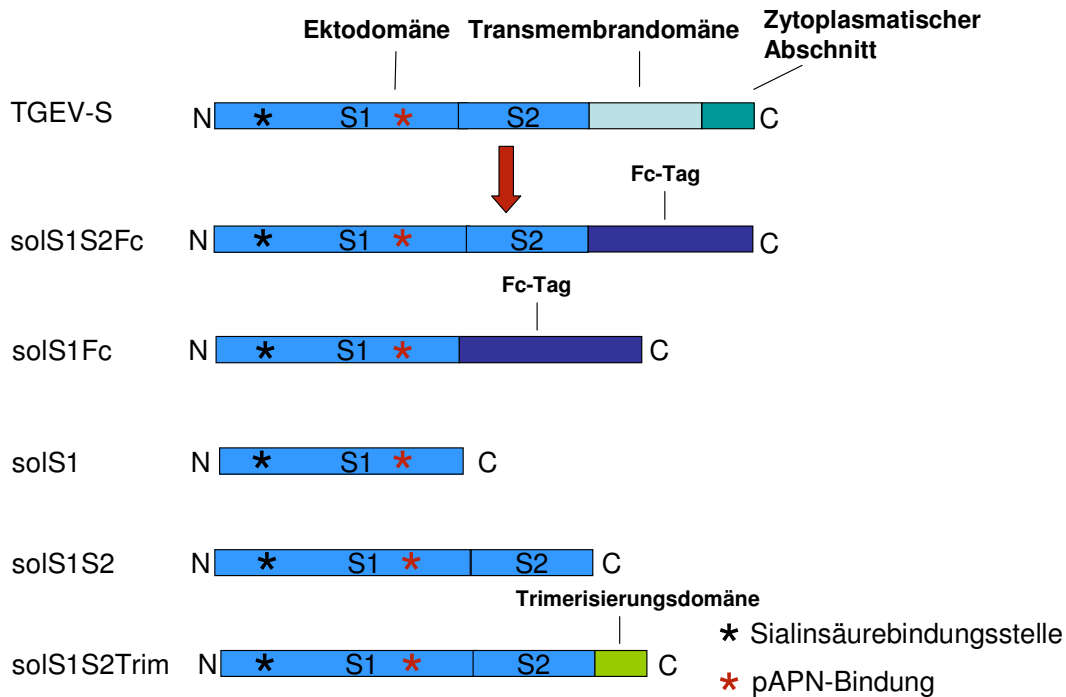


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verwendeten löslichen Proteine: solS1Fc, solS1S2Fc, solS1, solS1S2 und solS1S2Trim, die im pCG1- oder pCG1Fc-Vektor vorlagen. Die Größe der einzelnen Abschnitte ist nicht entsprechend dem Molekulargewicht der betreffenden Polypeptide dargestellt.

Der leere pCG1-Fc Vektor wurde in allen Versuchen als Negativkontrolle verwendet. Anschließend wurde die Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt.

Abbildung 3 zeigt die intrazelluläre Expression der löslichen TGEV-S-Proteine. Alle löslichen Proteine wurden in den BHK-21-Zellen exprimiert, wobei die Expression bei den solS1- und solS1S2-Konstrukten nicht so deutlich war.

Nachdem gezeigt worden war, dass die löslichen TGEV-S-Proteine in BHK-21-Zellen exprimiert werden, wurde untersucht, ob die Proteine im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden können, d.h. ob sie auch sezerniert werden. Hierfür wurden die Überstände der zuvor transfizierten BHK-21- oder HEK-293T-Zellen geerntet und 10-fach konzentriert. Die löslichen Proteine wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.4), auf Nitrocellulosemembran übertragen und mittels Chemilumineszenz detektiert (4.4.6).

In **Abbildung 4** ist die Expression der löslichen TGEV-S-Proteine zu sehen. Die Konstrukte solS1Fc und solS1S2Fc konnten sowohl mit anti-TGEV-S und anti-Maus-HRP (**Abbildung 4A**) als auch mit dem anti-hFc-HRP-Antikörper nachgewiesen werden (**Abbildung 4B**). Das Laufverhalten des solS1Fc-Konstrukts (**Abbildung 4A**) hatte ein

Molekulargewicht von ca. 250 kDa, was einer dimeren Form des Proteins entspricht, da die S1-Untereinheit je nach Glykosylierungsgrad einer Größe von ca. 100 kDa und der Fc-Tag ein Molekulargewicht von 35 kDa aufweist. Die Gelelektrophorese wurde, wie bereits erwähnt, unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Der Größenmarker ist für reduzierende Bedingungen optimiert, also könnte die tatsächliche Größe höher als 250 kDa sein und könnte bei 270 kDa liegen, was einer dimeren Form des solS1Fc-Proteins entspräche. Es konnte außerdem eine weitere hochmolekulare Bande oberhalb der 250 kDa Marker-Bande detektiert werden, die vermutlich das lösliche Protein als Multimer zeigt. Bei dem solS1S2Fc Konstrukt wurden ebenfalls durch den anti-TGEV-S-Antikörper zwei Banden erkannt: eine Bande von ca. 300 kDa, die der monomeren oder dimeren Form des Proteins entspricht und eine hochmolekulare Bande, die das Protein in multimerer Form präsentiert. Der anti-hFc-HRP-Antikörper färbte bei beiden Konstrukten nur Einzelbanden, die jeweils der multimeren Form der Proteine entsprachen (**Abbildung 4B**). Es wird vermutet, dass der Fc-Tag für die Bildung der Dimere verantwortlich ist. Außerdem sind in **Abbildung 4A** unspezifische Banden von ca. 250 kDa erkennbar, die auf den anti-Maus-HRP-Antikörper zurückzuführen sind.

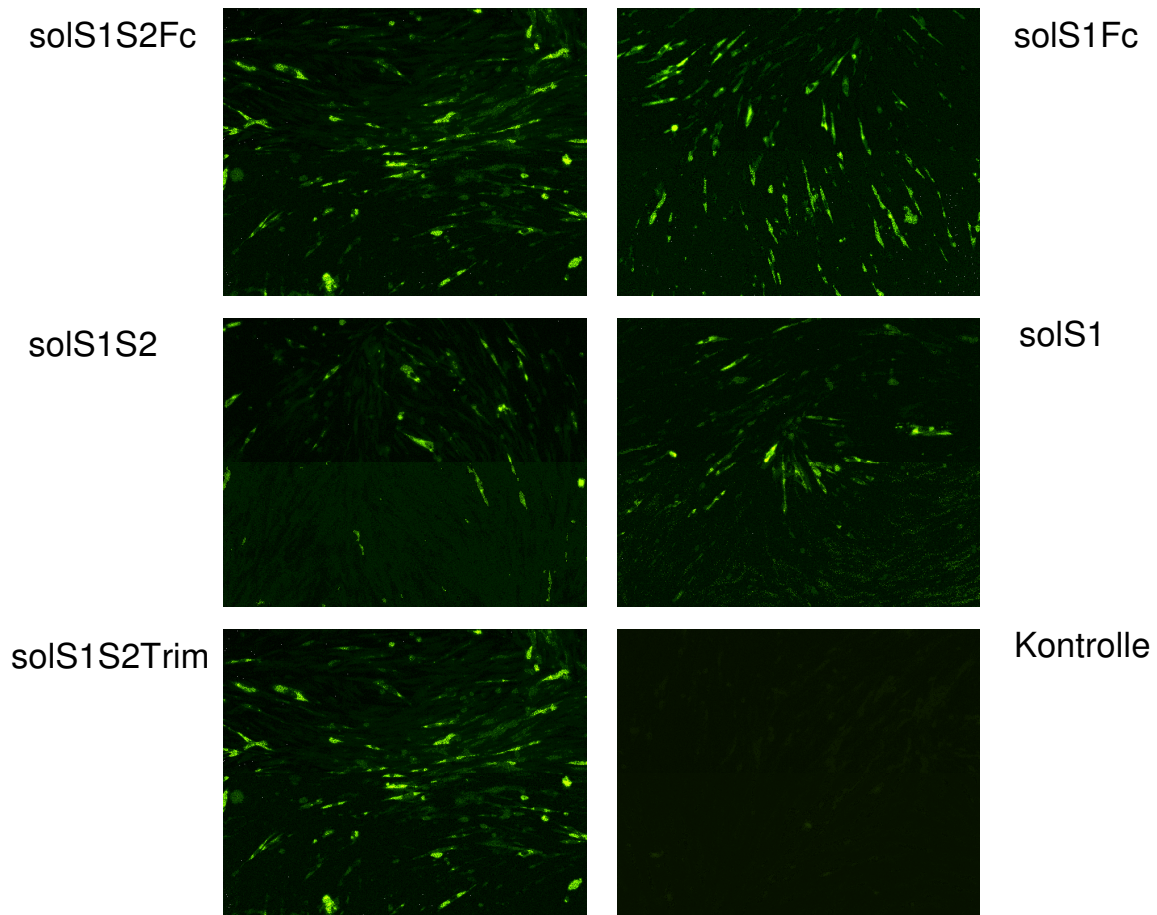


Abbildung 3: Nachweis der Expression von TGEV-S-Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die löslichen TGEV-S-Proteine wurden mit dem monoklonalen anti-TGEV-S und mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-FITC detektiert. Fotografiert mit einem 20er Objektiv.

Obwohl die Expression der löslichen Konstrukte solS1 und solS1S2 in den BHK-21-Zellen gezeigt werden konnte (**Abbildung 3**), konnten diese Konstrukte im Überstand von transfizierten BHK-21-Zellen nicht nachgewiesen werden (**Abbildung 5**). Man kann nur unspezifische Banden von ca. 250 kDa erkennen, die auf den Sekundärantikörper anti-Maus-HRP zurückzuführen sind. Als Kontrolle diente das solS1Fc-Protein, das mit dem anti-Maus-HRP detektiert werden konnte und als hochmolekulare Bande sichtbar wurde. Das lösliche S-Protein, das eine Trimerisierungsdomäne besitzt, konnte mit dem anti-TGEV-S-Antikörper detektiert werden (**Abbildung 6**). Wenn der Denaturierungsschritt bei 96 °C ausgelassen wurde, wurden hochmolekulare Banden sichtbar, die vermutlich Multimere von solS1S2Trim-Protein darstellen. Unterhalb der 250 kDa Marker-Bande sind außerdem unspezifische Banden zu erkennen.

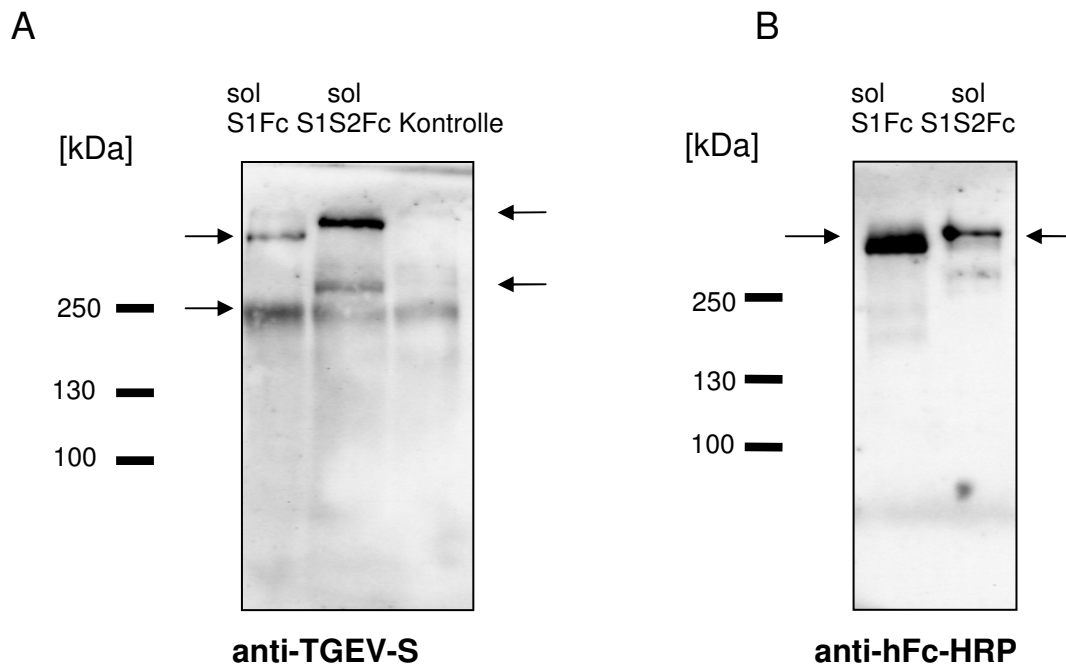


Abbildung 4: Nachweis der löslichen Proteine im Überstand transfizierter BHK-21-Zellen.

A: solS1Fc und solS1S2Fc detektiert mit anti-TGEV-S **B:** solS1Fc und solS1S2Fc detektiert mit anti-hFc-HRP.

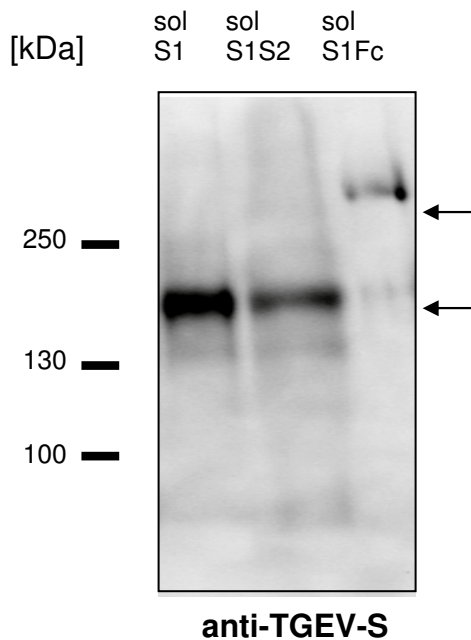


Abbildung 5: Nachweis der löslichen Proteine im Überstand transfizierter BHK-21-Zellen. Lösliche Proteine ohne Tag solS1 und solS1S2 detektiert mit anti-TGEV-S und anti-Maus-HRP.

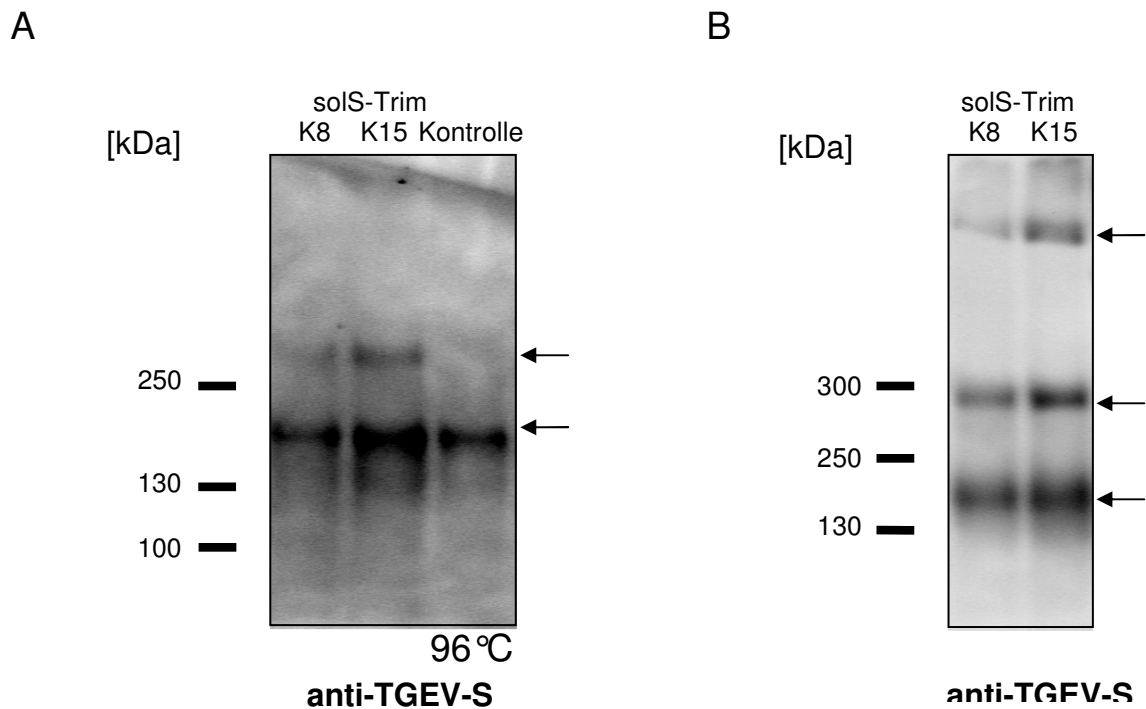


Abbildung 6: Nachweis der löslichen Proteine im Überstand transfizierter BHK-21-Zellen. solS1S2Trim, A: denaturiert bei 96°C B: ohne Inkubation bei 96°C. Detektiert mit anti-TGEV-S und anti-Maus-HRP.

Um zu überprüfen, ob die Konstrukte ohne Tag im Zelllysate transfizierter BHK-21-Zellen detektiert werden können, wurden Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag laut Protokoll (4.4.2) lysiert. Die Zelllysate wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und per Western Blot analysiert. Eine schwache Proteinbande wurde bei 130 kDa sichtbar, die dem solS1-Konstrukt entspricht und eine bei ca. 180 kDa, die dem solS1S2-Konstrukt entspricht (**Abbildung 7**). Dadurch wurde das Ergebnis der Immunfluoreszenz bestätigt. Die Proteine werden in den Zellen exprimiert, nicht aber bzw. nur sehr ineffizient sezerniert. Da diese Konstrukte nach einer Transfektion nicht im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnten, wurden für weitere Studien während dieser Doktorarbeit nur die löslichen Proteine solS1Fc, solS1S2Fc und solS1S2Trim verwendet.

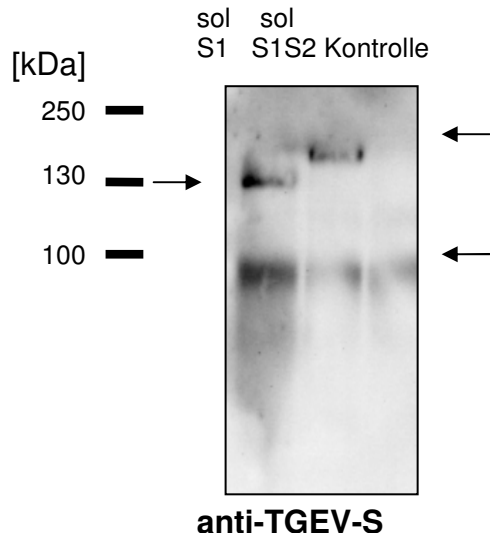


Abbildung 7: Zelllysate von BHK-21-Zellen nach Transfektion mit solS1 und solS1S2 Konstrukten. Detektiert mit anti-TGEV-S und anti-Mouse-HRP.

5.1.2 Nachweis der Bindung an ST-Zellen mittels Immunfluoreszenz

Als erstes wurden BHK-21-Zellen auf 140 mm-Schalen ausgesät und mit dem Expressionsplasmid für das jeweilige lösliche Protein transfiziert. Zu den Zeitpunkten 24 und 48 h nach der Transfektion wurden die Zellkulturüberstände geerntet, Zelltrümmer abzentrifugiert und die Überstände 10-fach konzentriert.

Mit Hilfe des Immunfluoreszenz-Bindungstests (4.6.2) sollte dann demonstriert werden, ob die hergestellten löslichen S-Proteine über den Rezeptor porcine Aminopeptidase N (pAPN) an Zellen binden können. Bei den ST-Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die aus dem Hoden eines Schweineföten isoliert worden war. In dieser Zelllinie kommt es zur endogenen Expression von pAPN. Die ST-Zellen wurden zunächst auf Deckgläser ausgesät und am nächsten Tag für 2 h mit 30 µl des löslichen Proteins inkubiert. Als Kontrolle diente Zellkulturüberstand von pCG1-Fc transfizierten BHK-21-Zellen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit anti-TGEV-S und anti-Maus-FITC-Antikörper.

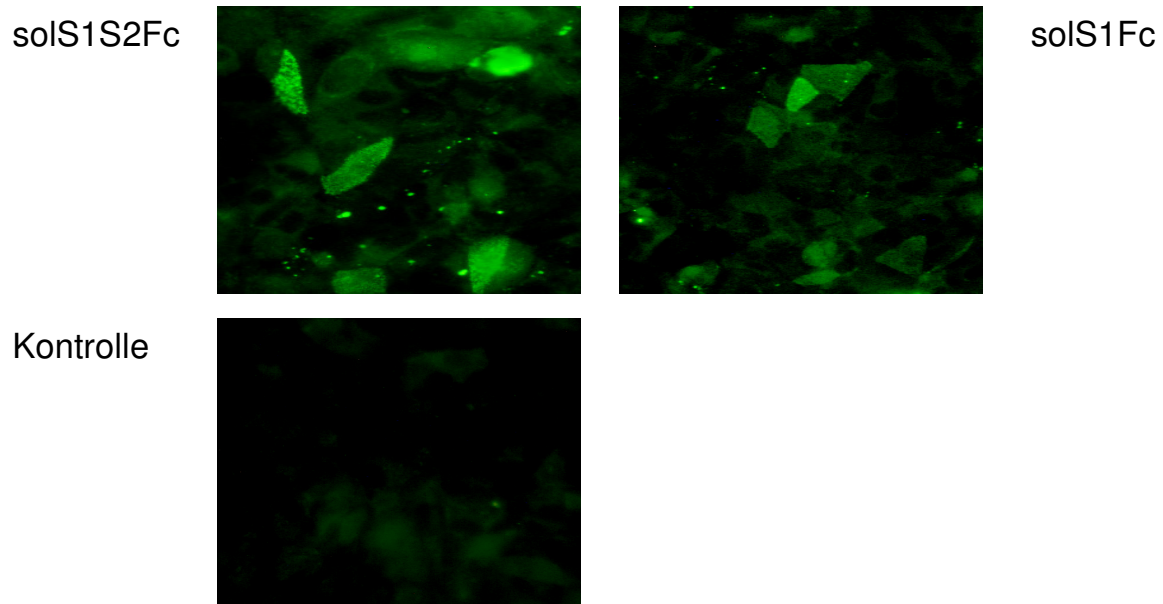


Abbildung 8: Bindung von solS1S2Fc und solS1Fc an pAPN. Die Bindung wurde mit anti-TGEV-S und anti-Maus-FITC nachgewiesen. Fotografiert mit einem 40er Objektiv.

Wie in **Abbildung 8** zu sehen ist, konnte eine Bindung der löslichen Konstrukte solS1S2Fc und solS1Fc an die ST-Zellen gezeigt werden. Dagegen konnte bei der Kontrolle nur eine Hintergrund-Fluoreszenz nachgewiesen werden, was für eine spezifische Bindung der löslichen Proteine an die Zellen spricht.

5.1.3 Nachweis der Bindung an BHK-21-Zellen mittels Immunfluoreszenz

Weiterhin sollte untersucht werden, ob lösliche TGEV-S-Proteine auch an BHK-21-Zellen binden können. Da BHK-21-Zellen aus Nierengewebe des syrischen Goldhamsters *Mesocricetus auratus* etabliert worden sind, findet bei dieser Zelllinie keine Expression von pAPN statt. Das TGEV-S-Protein bindet an pAPN (Delmas et al., 1992), hat aber noch eine zweite Bindungsaktivität die Bindung an Sialinsäuren (Schultze et al., 1996). Es sollte untersucht werden, ob die erzeugten löslichen Proteine an Sialinsäuren binden können. Dafür wurden BHK-21-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und am nächsten Tag entweder mit Medium oder mit dem pAPN-Expressionsplasmid laut Protokoll (4.3.1) transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte die Fixierung der Zellen mit 3% PFA, gefolgt von einer Inkubation mit 30 µl vom konzentrierten löslichen Protein und eine abschließende Inkubation mit anti-TGEV-S und anti-Maus-FITC-Antikörper (**Abbildung 9**). Zum Vergleich wurde der gleiche Ansatz mit anti-hFc-FITC-Antikörper gefärbt (**Abbildung 10**).

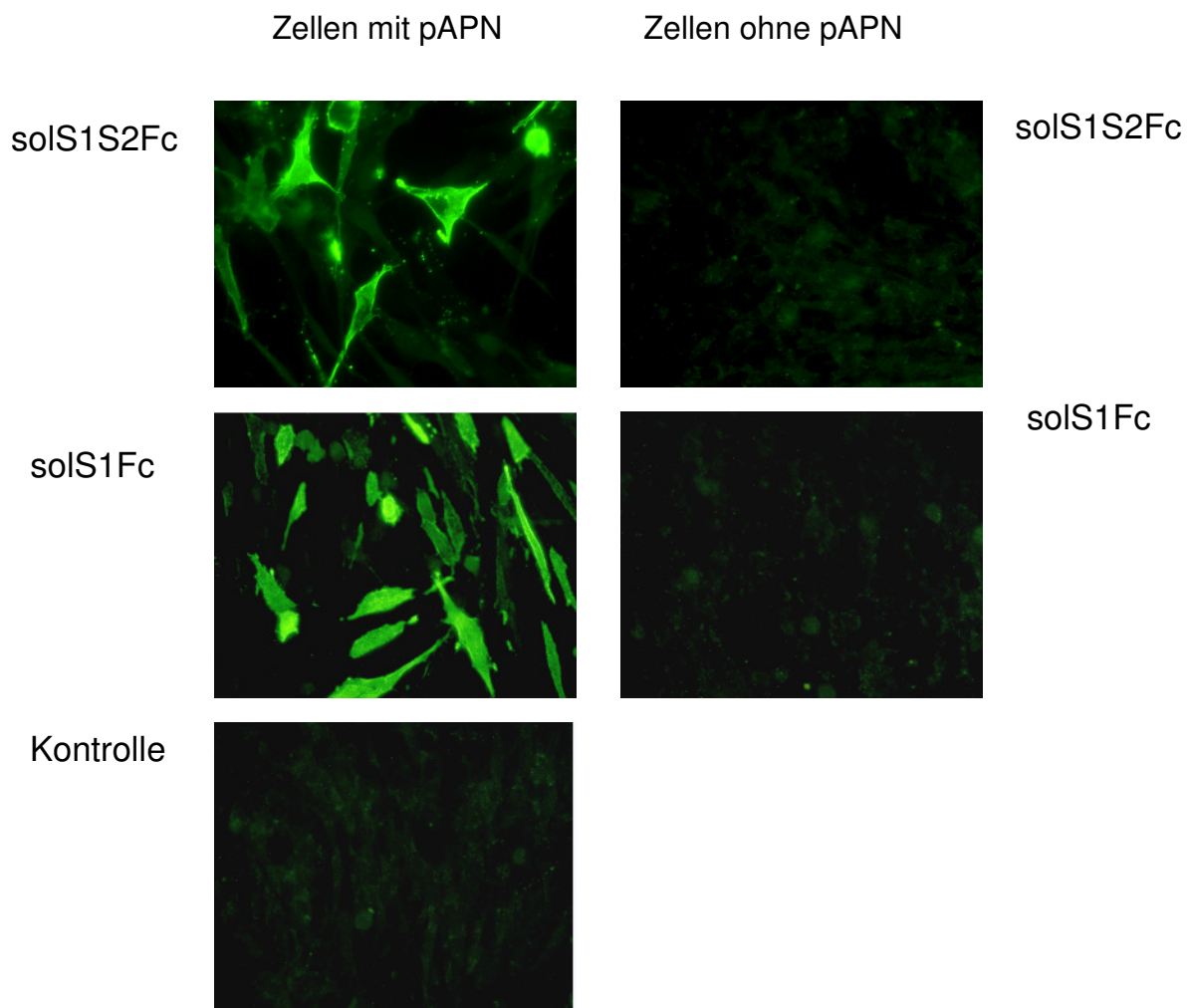


Abbildung 9: Bindung von solS1S2Fc und solS1Fc an BHK-21-Zellen. Bei Zellen die keine pAPN exprimieren, konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Detektiert mit anti-TGEV-S und anti-Maus-FITC-Antikörper. Fotografiert mit einem 40x Objektiv.

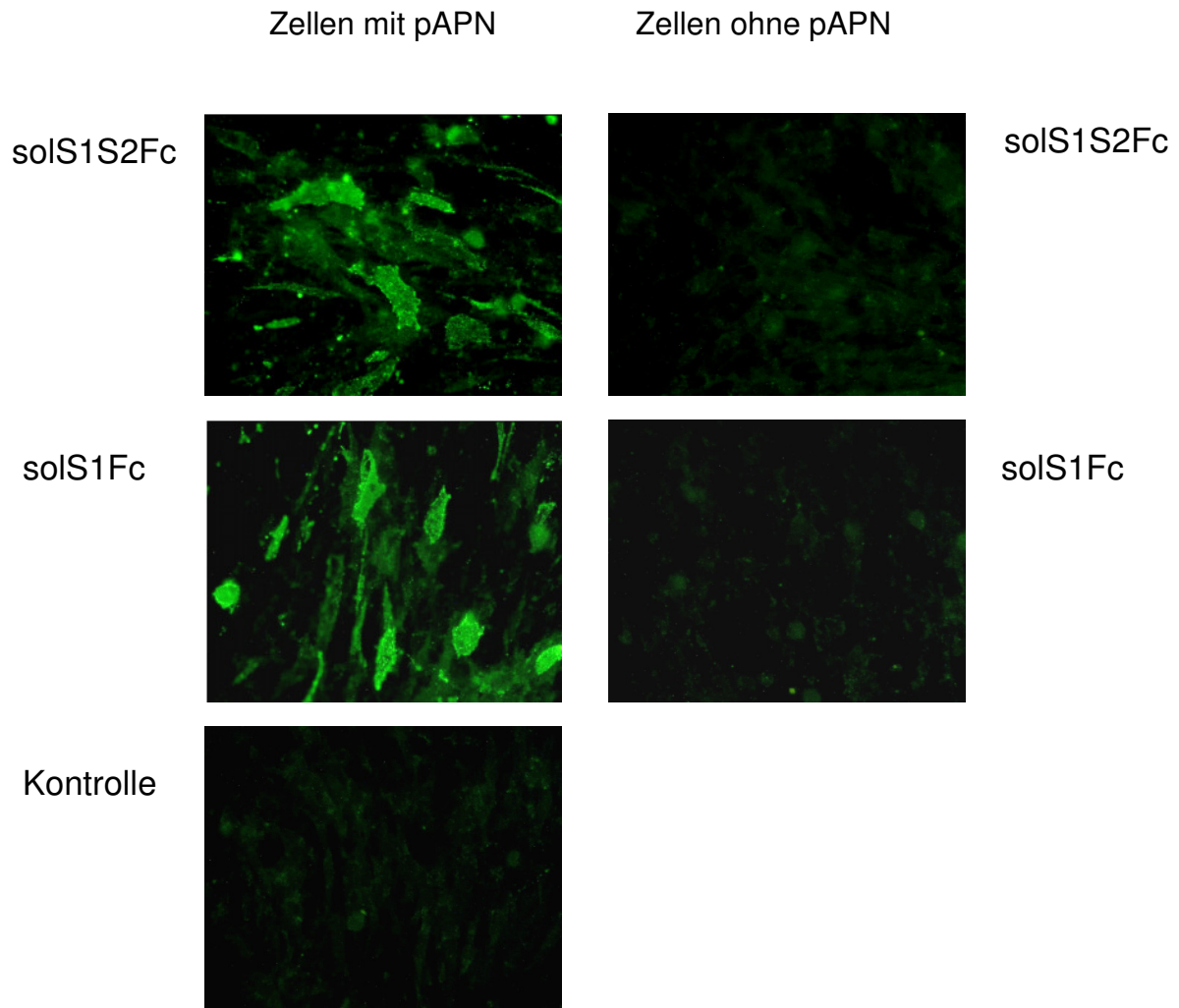


Abbildung 10: Bindung von solS1S2Fc und solS1Fc an BHK-21-Zellen. Bei Zellen die keine pAPN exprimieren, konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Detektiert mit anti-hFc-FITC- Antikörper. Fotografiert mit einem 40er Objektiv.

Abbildung 9 und **Abbildung 10** zeigen eine spezifische Bindung von solS1S2Fc und solS1Fc an die Zellen, die mit pAPN transfiziert wurden. Im Vergleich dazu konnte bei den Zellen, die keine pAPN exprimieren, auch keine Bindung detektiert werden. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die erzeugten löslichen Proteine an pAPN binden, aber keine Bindungsaktivität für Sialinsäuren besitzen.

5.1.4 Quantifizierung der Bindung mittels Durchflusszytometrie

Für die quantitative Untersuchung der Bindung von löslichen TGEV-S-Proteinen an die Zellen wurde Durchflusszytometrie durchgeführt. Dafür wurden BHK-21-Zellen mit dem pAPN-Expressionsplasmid transfiziert bzw. die ST-Zellen mit dem endogenen pAPN in

6-Napf-Platten kultiviert und laut Protokoll (4.6.3) weiterbehandelt. Nach Zugabe von konzentriertem solS1S2Fc, solS1Fc, solS-Trim oder pCG1-Fc wurden die Zellen für 1 h in einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit anti-hFc-FITC oder mit anti-TGEV-S und anti-Maus-FITC-Antikörper. Nach Resuspendieren der Zellen wurden diese direkt in einem Durchflusszytometer analysiert und die Bindung des löslichen TGEV-S-Proteins an pAPN-exprimierende Zellen quantifiziert.

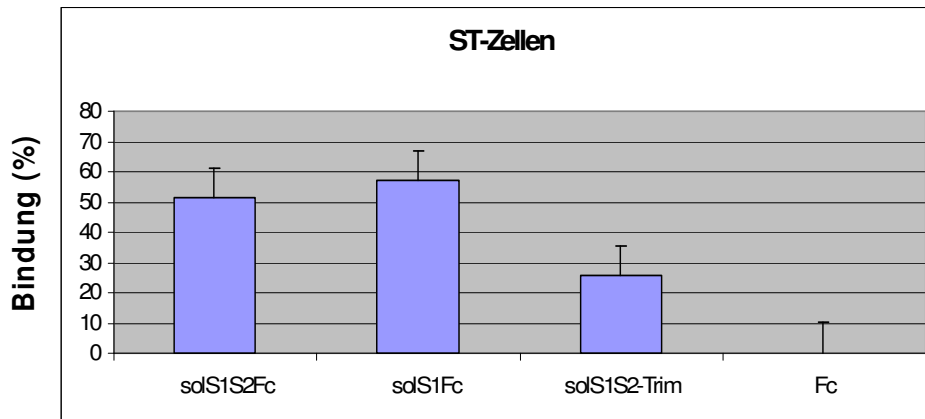


Abbildung 11: Quantifizierung der Bindung an ST-Zellen. Die mit Accutase abgelösten Zellen wurden mit solS1S2Fc, solS1Fc, solS-Trim oder Fc inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit anti-hFc-FITC oder anti-TGEV-S und anti-Maus-FITC-Antikörper. Die Messung der Bindung erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Gezeigt sind die Mittelwerte von 3 Experimenten und die Standardabweichungen.

Wie dem Diagramm in **Abbildung 11** zu entnehmen ist, konnte in diesem Versuch eine spezifische Bindung an ST-Zellen nachgewiesen werden. Die Bindung an solS1S2Fc ist vergleichbar mit der Bindung an solS1Fc-Protein und wurde mit ca. 50% quantifiziert, d.h. etwa die Hälfte der Zellen wies gebundenes S-Protein auf. Beim solS1S2Trim-Protein wurde eine Bindung von ca. 25% gemessen. Im Vergleich dazu wurde beim leeren pCG1-Fc Vektor keine Bindung ermittelt.

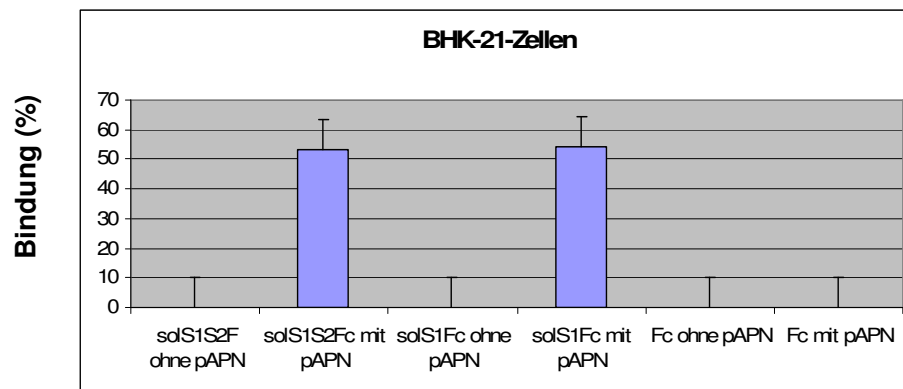


Abbildung 12: Quantifizierung der Bindung an BHK-21-Zellen. Die Zellen wurden zuvor mit pAPN transfiziert. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte BHK-21-Zellen. Die mit Accutase abgelösten Zellen wurden mit solS1S2Fc, solS1Fc oder Fc inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit anti-hFc-FITC. Die Quantifizierung der Bindung erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Die Mittelwerte von 2 Versuchen und die Standardabweichungen sind dargestellt.

Da durch die Bindung an ST-Zellen nicht ausgeschlossen werden konnte, ob die löslichen Proteine auch Sialinsäurereste erkennen, wurde die Bindung an BHK-21 Zellen analysiert (**Abbildung 12**). Bei BHK-21-Zellen, die nicht mit pAPN transfiziert wurden, konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Dagegen war das Ergebnis der Bindung von pAPN-exprimierenden Zellen positiv und zeigte eine Bindung von ca. 52%. Die Negativkontrolle (Fc) blieb mit oder ohne Expression der pAPN negativ.

5.1.5 Bindung der löslichen TGEV-S-Proteine an immobilisierte Membranproteine

Es wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass das S-Protein von gereinigtem TGEV-Virus durch die Bindungsaktivität an Sialinsäuren ein hochmolekulares Sialoglykoprotein erkennt (Schwegmann-Wessels et al., 2003). Es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um ein muzinartiges Protein, das mit der Membran assoziiert ist (Schwegmann-Wessels et al., 2002). Um dieses Protein näher zu identifizieren, wurden zunächst Membranproteine aus ST-Zellen isoliert und unter nicht-reduzierenden Bedingungen per SDS-PAGE aufgetrennt (4.4.4). Für den Bindungstest wurden die auf Nitrozellulose transferierten Membranproteine mit den löslichen S-Proteinen inkubiert (4.6.5).

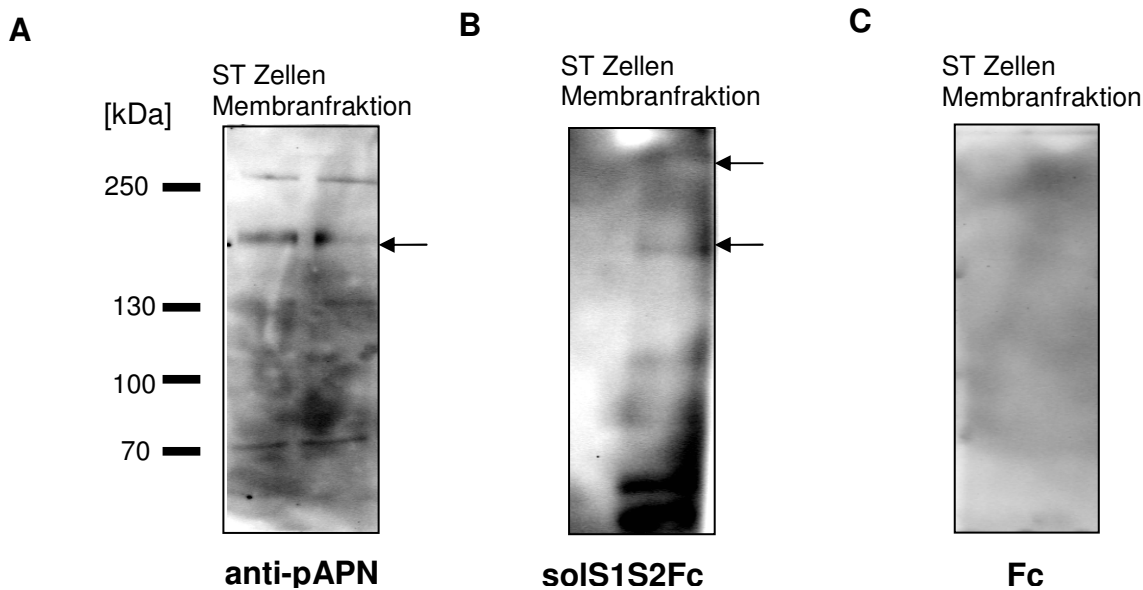


Abbildung 13: Bindung löslicher S-Proteine an zelluläre Membranproteine. Isolierte Membranproteine von ST-Zellen wurden auf Nitrocellulose transferiert und anschließend mit solS1S2Fc (**B**) oder Fc (**C**) inkubiert. Gebundenes Protein konnte dann mittels anti-hFc-HRP nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde die Membranfraktion auf das Vorkommen von pAPN untersucht und dafür mit anti-pAPN und sekundärem anti-Maus-HRP Antikörper inkubiert (**A**).

Um zu überprüfen, ob in der Membranfraktion pAPN vorhanden ist, wurde ein Teil der Membranproteine nach Transfer auf Nitrozellulose mit anti-pAPN inkubiert. Nach Inkubation mit einem sekundären peroxidase-gekoppelten Antikörper und nach Zugabe des Substrats konnte im Chemiimager eine Proteinbande mit einer Größe von ca. 150 kDa detektiert werden (

Abbildung 13A). Diese Größe entspricht dem zellulären Rezeptor von TGEV und konnte als Kontrolle der Membranproteinisolierung betrachtet werden. Als Negativkontrolle wurde Fc ohne gebundenes S-Protein statt des solS1S2Fc-Proteins mit der Nitrozellulosemembran inkubiert. Nachweis von gebundenem Protein erfolgte mittels anti-hFc-HRP. Im Vergleich zur Negativkontrolle (

Abbildung 13C) konnte man nach der Inkubation der Nitrozellulose mit solS1S2Fc eine Proteinbande von ca. 150 kDa erkennen, die der pAPN entspricht (

Abbildung 13B). Eine weitere sehr schwache hochmolekulare Bande wurde auch detektiert. Unterhalb der pAPN Bande sind zwei weitere Banden zu erkennen, die aber unspezifische Bindung des Antikörpers darstellen.

5.1.6 Nachweis von löslichen Proteinen nach einer *FPLC*-Reinigung

Da in den bisherigen Versuchen die Konzentration der Proteine nicht quantitativ bestimmt werden konnte, wurden die Fc-gekoppelten Konstrukte solS1S2Fc und solS1Fc mit Hilfe einer *FPLC* gereinigt. Der Überstand, der mit dem leeren Vektor pCG1-Fc transfizierten Zellen, wurde als Kontrolle verwendet. Für die Reinigung wurden die Hi Trap™ Protein A HP-Säulen verwendet, die durch die Spezifität für die Fc-Region charakterisiert sind (4.4.3). Nach der Reinigung wurden die Proteine auf ein 3-8% Tris-Acetat Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Um die gereinigten Proteine mit den zuvor verwendeten 10x konzentrierten Proteinen zu vergleichen, wurden diese auch elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Blue gefärbt. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung im Photometer bei 280 nm bestimmt.

Abbildung 14A zeigt die aufgetrennten löslichen S-Proteine ohne vorherige Reinigung über *FPLC*. Die Zuordnung der Banden zu den löslichen Proteinen ist sehr schwierig, da der proteinhaltige Zellkulturüberstand auch andere zelluläre Proteine enthält. Nach Aufreinigung der löslichen Proteine via *FPLC* erkennt man Banden, die spezifisch für die löslichen Proteine sind. Das solS1Fc-Protein zeigt eine Bande von ca. 150 kDa und eine unterhalb 300 kDa. Die kleinere Bande entspricht durch ihre Größe monomerer Form des Proteins und die größere Bande zeigt das Protein als Dimer (

Abbildung 14A). Das solS1S2Fc-Protein zeigt nur eine hochmolekulare Bande die das Protein als Multimer präsentiert (

Abbildung 14B). Als Kontrolle wurde Fc mit Coomassie Blue angefärbt, das eine Bande von ca. 140 kDa zeigt.

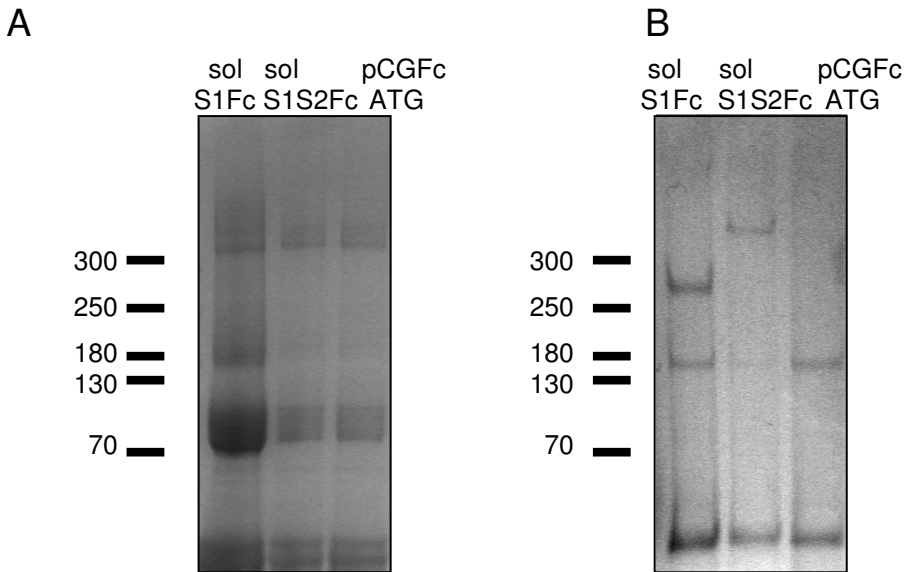


Abbildung 14: Vergleich der aufgetrennten Proteine nach Färbung mit Coomassie Blue. A: solS1Fc und solS1S2Fc nicht gereinigt, **B:** solS1Fc und solS1S2Fc nach FPLC-Reinigung.

5.1.7 Bindungsnachweis an neuraminidasebehandelte ST-Zellen

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die löslichen Proteine an pAPN binden, sollte jetzt die Sialinsäure-Bindungsaktivität von gereinigten Proteinen näher untersucht werden. Dafür wurden die Zellen auf 24-Well-Platten ausgesät und am folgenden Tag für 1 h mit Neuraminidase (NA) behandelt (4.6.1). Durch Neuraminidase werden endständige Sialinsäurereste an der Zelloberfläche entfernt. Danach wurde der Bindungstest mit den Proteinen solS1S2Fc und solS1Fc laut Protokoll (4.6.2) durchgeführt. Wie in **Abbildung 15** zu sehen ist, wurde nach der NA-Behandlung die Bindung an die Zellen nicht schwächer, vielmehr wurde sogar ein intensiveres Fluoreszenzsignal beobachtet.

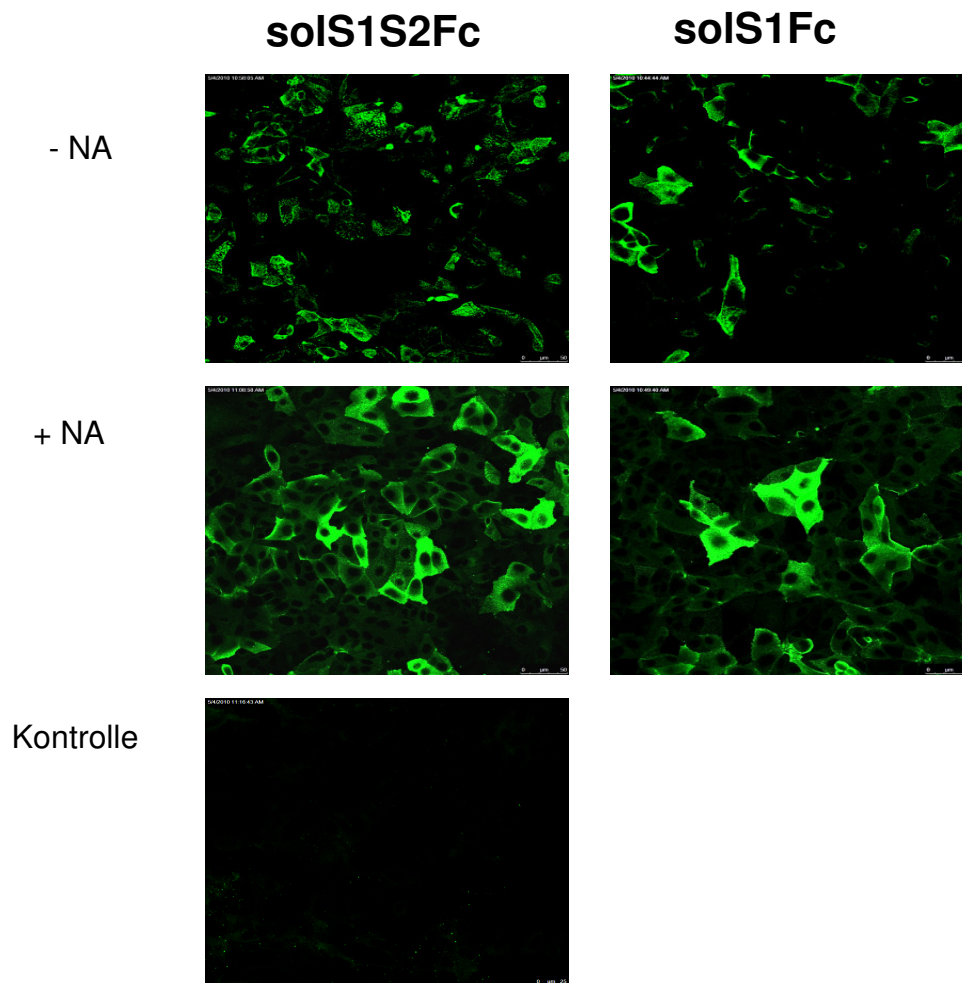


Abbildung 15: Bindung von solS1S2Fc und solS1Fc an ST-Zellen. ST-Zellen wurden mit 100 mU Neuraminidase vorbehandelt. Nach der Inkubation mit solS1S2Fc oder solS1Fc wurde die Bindung mit anti-hFc-FITC im konfokalen Lasermikroskop detektiert. Fotografiert mit einem 40er Objektiv.

5.1.8 Bindungsnachweis an neuraminidasebehandelten IPI-2I Zellen

Bei den IPI-2I-Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie die aus dem Ileum eines männlichen Wildschweins etabliert worden ist. Diese Zelllinie sollte als Vergleich zu den ST-Zellen verwendet werden. Da die Expression der endogenen pAPN bei diesen Zellen aber zu niedrig war, wurde zusätzlich das pAPN-Plasmid in die Zellen am Tag der Konfluenz transfiziert. Es erfolgte eine Neuraminidase-Behandlung der Zellen, gefolgt von Inkubation mit solS1S2Fc oder solS1S2Fc. Mit Hilfe des anti-human-FITC-Antikörpers sollte der Bindungstest ausgewertet werden. Das Ergebnis der Bindung an ST-Zellen konnte bei den IPI-2I-Zellen bestätigt werden. Bei Zellen, die mit

Neuraminidase vorbehandelt wurden, erscheint die Bindung intensiver zu sein (**Abbildung 16**).

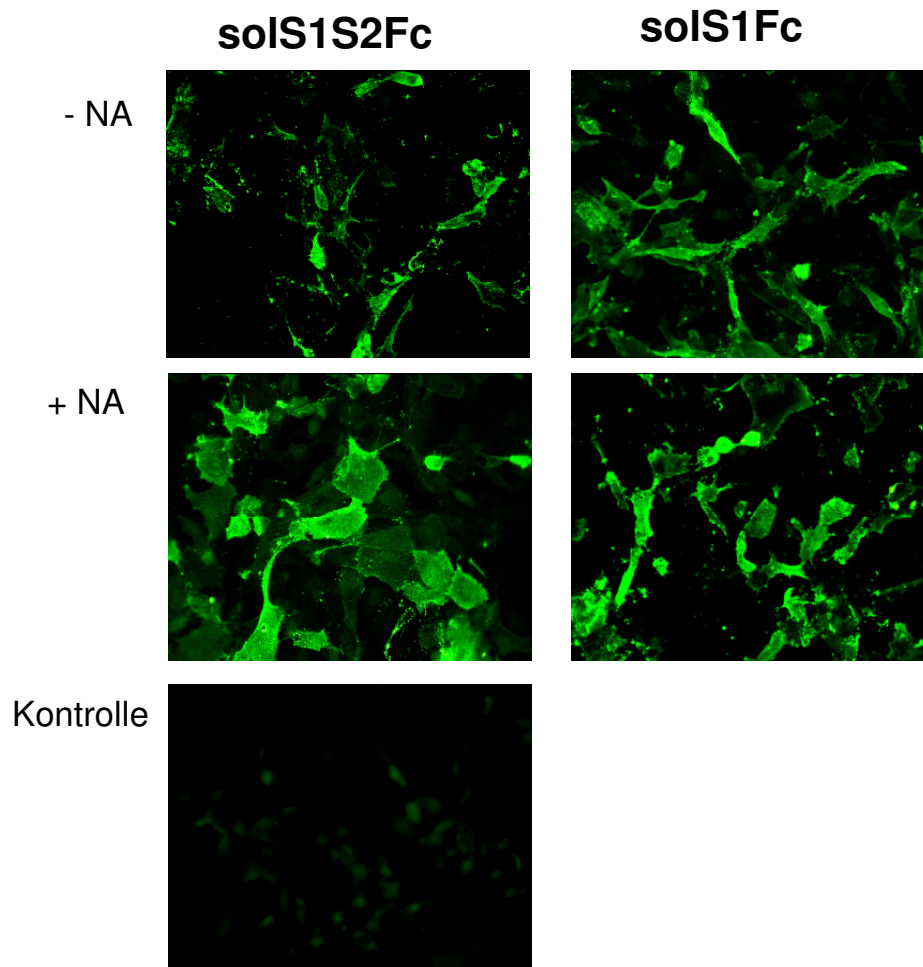


Abbildung 16: Bindung an IPI-21-Zellen. Da die Expression von endogener pAPN zu niedrig war, wurden die Zellen am Vortag zusätzlich mit dem pAPN-Expressionsplasmid transfiziert. Ein Tag nach der Transfektion erfolgte Behandlung mit 100 mU Neuraminidase. Nach der Inkubation mit solS1S2Fc oder solS1Fc erfolgte Detektion der Bindung mit anti-hFc-FITC im konfokalen Mikroskop. Fotografiert mit einem 40er Objektiv.

5.1.9 Bindungsnachweis an neuraminidasebehandelte BHK-21-Zellen

Da BHK-21-Zellen keine pAPN endogen exprimieren, wurden diese am Vortag mit pAPN transfiziert. Der Neuraminidase-Behandlung folgte die Inkubation mit solS1S2Fc, solS1Fc oder pCG1-FcATG. Nach der Inkubation mit anti-hFc-FITC- Antikörper wurde die Bindung ermittelt.

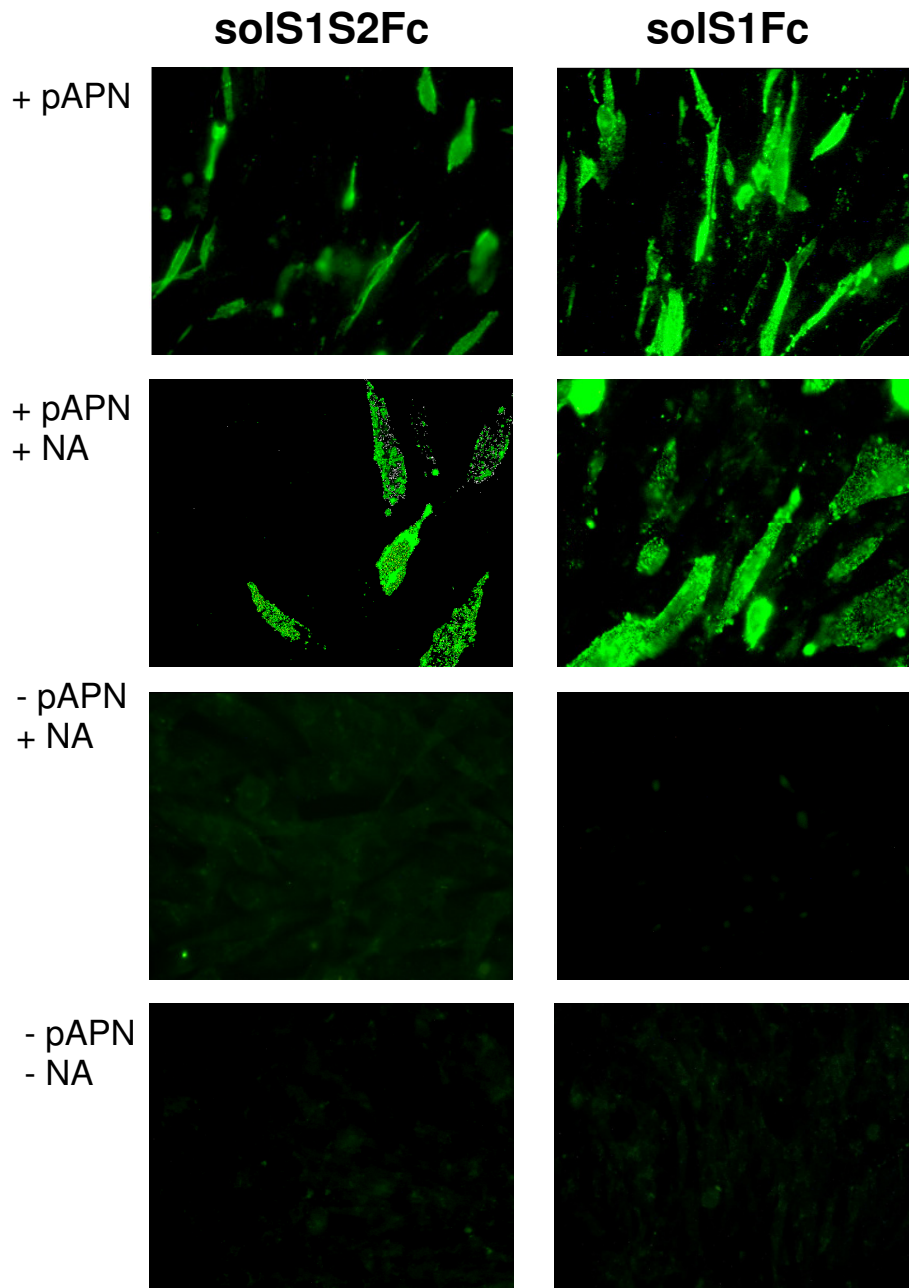


Abbildung 17: Bindung an BHK-21-Zellen. BHK-21-Zellen wurden am Vortag mit pAPN transfiziert. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen. Ein Tag nach der Transfektion erfolgte Behandlung mit 100 mU Neuraminidase. Nach der Inkubation mit solS1S2Fc oder solS1Fc wurde die Bindung mit anti-hFc-FITC im konfokalen Mikroskop untersucht. Fotografiert mit einem 63er Objektiv.

Die Behandlung der pAPN exprimierenden Zellen mit Neuraminidase führte zur optischen Zunahme der Bindung von löslichen S-Proteinen, im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Neuraminidase vorbehandelt worden waren. Dagegen konnte bei nicht pAPN-exprimierenden Zellen sowohl ohne als auch mit Neuraminidase-Behandlung keine Bindung demonstriert werden (**Abbildung 17**).

5.1.10 Bindungsnachweis an neuraminidasebehandelte HEK-293T-Zellen

Eine weitere Zelllinie, die für die Bindungstests verwendet wurde, war die humane HEK-293T-Zelllinie, die aus embryonalen Nieren isoliert worden war.

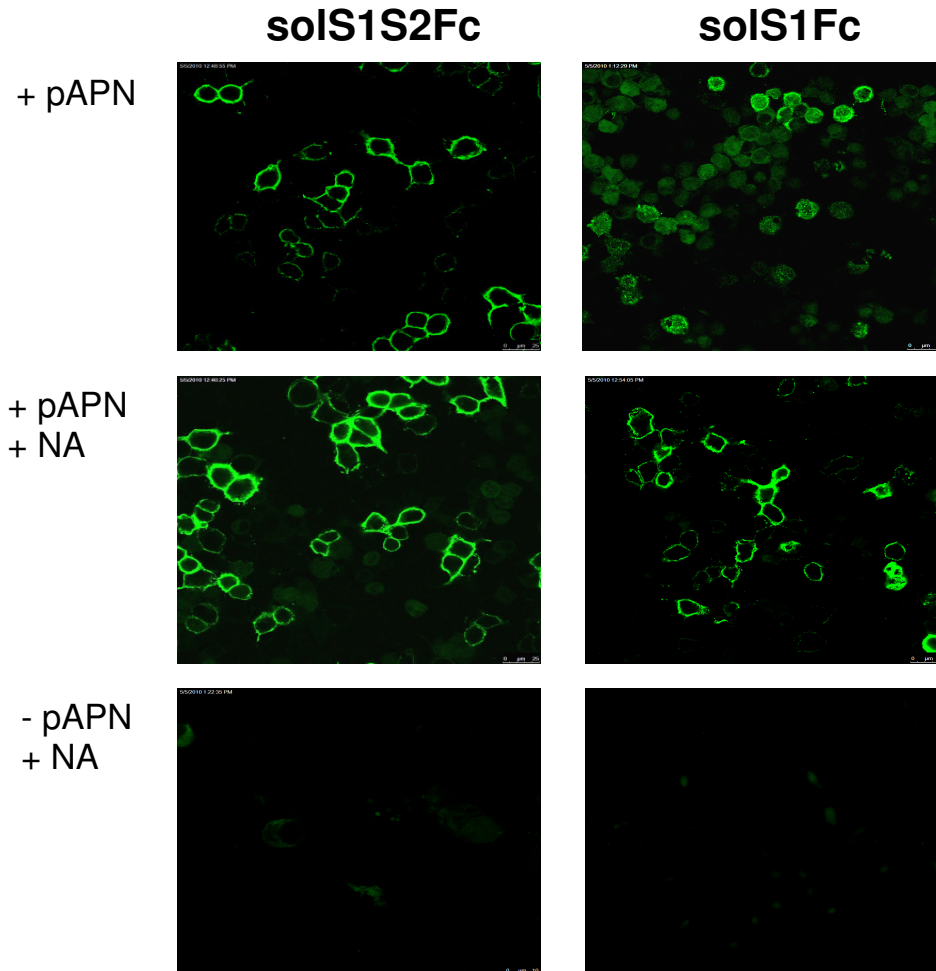


Abbildung 18: Bindung an HEK-293T-Zellen, HEK-293T-Zellen wurden am Vortag mit dem pAPN-Expressionsplasmid transfiziert. Als Kontrolle dienen nicht transfizierte HEK-293T-Zellen. Ein Tag nach der Transfektion erfolgte Behandlung mit 100 mU Neuraminidase. Nach der Inkubation mit solS1S2Fc oder solS1Fc wurde die Bindung mit anti-hFc-FITC im konfokalen Mikroskop untersucht. Fotografiert mit einem 63er Objektiv.

Diese Zellen exprimieren keine pAPN. Aus diesem Grund musste pAPN zuvor in die Zellen transfiziert werden. Ein Tag nach der Transfektion wurde Immunfluoreszenz-Bindungstest mit solS1S2Fc, solS1Fc oder pCG1-FcATG durchgeführt. Nach der Inkubation mit anti-hFc-FITC-Antikörper sollten die Bindungseigenschaften der löslichen Proteine beobachtet werden. Das Ergebnis war vergleichbar mit der Bindung an BHK-21-Zellen. Ohne Expression von pAPN konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Mit pAPN sah man deutliche Bindung des jeweiligen Proteins an die Zellen, die sich nach einer Neuraminidase-Behandlung der Zellen noch verstärkte (**Abbildung 18**).

5.1.11 Quantifizierung der Bindung nach Neuraminidase-Behandlung

Für die quantitative Analyse der Bindung nach einer Neuraminidase-Behandlung wurde Durchflusszytometrie durchgeführt. Zunächst wurden BHK-21-Zellen mit pAPN transfiziert und am Folgetag nach Neuraminidase-Zugabe für 1 h geschwenkt. Als Kontrolle dienten entweder Zellen die keine pAPN exprimieren oder die keiner Neuraminidase-Behandlung unterzogen wurden. Nach Ablösen der Zellen wurden sie mit gereinigtem solS1S2Fc, solS1Fc oder Fc in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit anti-hFc-FITC-Antikörper. Nach Resuspendieren der Zellen wurden diese direkt in einem Durchflusszytometer analysiert und die Bindung des löslichen TGEV-S-Proteins gemessen.

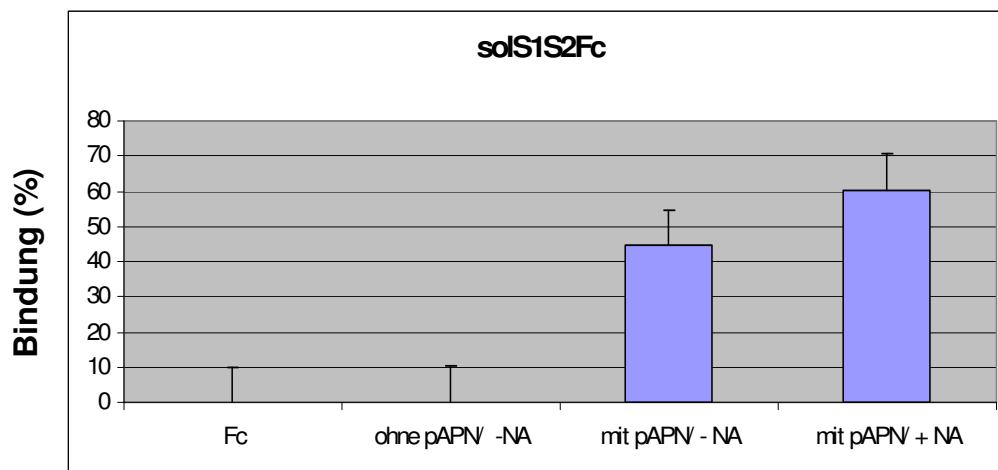


Abbildung 19: Quantifizierung der Bindung von solS1S2Fc an BHK-21-Zellen. Die mit Accutase abgelösten Zellen wurden mit solS1S2Fc oder Fc inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit anti-hFc-FITC-Antikörper. Die Messung der Bindung erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt.

Wie in **Abbildung 19** und **Abbildung 20** zu sehen ist, konnte das Ergebnis des Immunfluoreszenz-Bindungstests bestätigt werden. Bei beiden löslichen Proteinen nimmt die Bindung nach Neuraminidase-Behandlung der Zellen zu. Bei Zellen die nicht mit pAPN transfiziert wurden, konnte auch nach Neuraminidase-Behandlung keine Bindung festgestellt werden.

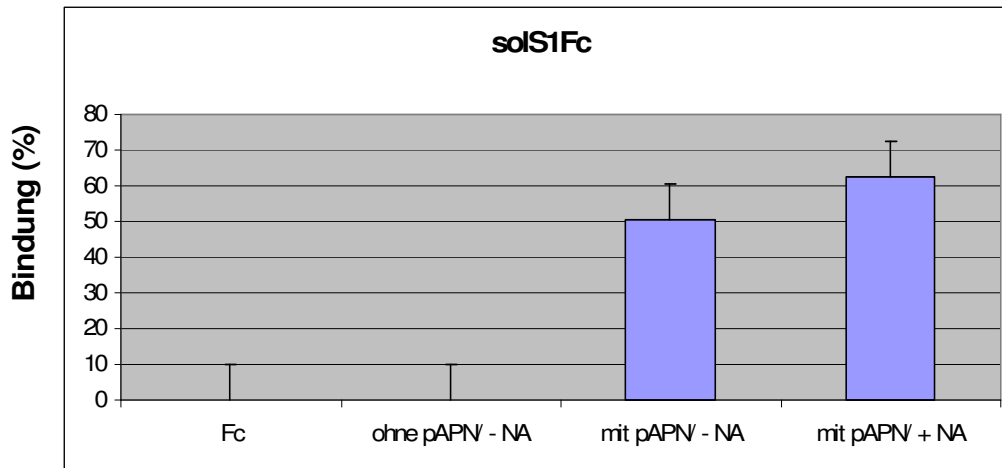


Abbildung 20: Quantifizierung der Bindung von solS1Fc an BHK-21-Zellen. Die Zellen wurden zuvor mit pAPN transfiziert und am nächsten Tag mit Neuraminidase behandelt. Die mit Accutase abgelösten Zellen wurden mit solS1Fc oder Fc inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit anti-hFc-FITC. Die Quantifizierung der Bindung erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt.

5.1.12 Erythrozyten-Bindungstest

Durch die Sialinsäure-Bindungsaktivität kann TGEV Erythrozyten agglutinieren (Noda et al., 1987; Noda et al., 1988). Ein weiterer Vertreter der Familie *Coronaviridae*, der durch Sialinsäure-Bindungsaktivität Hämagglutinationsfähigkeit besitzt, ist das infektiöse Bronchitis Virus (IBV) (Schultze et al., 1992a). Ein Protein-Rezeptor analog dem APN bei TGEV wurde bei IBV bislang noch nicht identifiziert, Sialinsäuren wird aber beim Viruseintritt in die Zelle eine wichtige Rolle zugeschrieben (Winter et al., 2006).

Mit Hilfe des Erythrozyten-Bindungstests wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Dr. Christine Winter bereits gezeigt, dass das lösliche IBV-S Protein (IBVS1Fc) an Hühnererythrozyten binden kann (**Abbildung 21**). Nach Inkubation des Proteins mit 0,5%-, 1%- oder 5%iger Erythrozytenlösung und anschließender Protein-A Präzipitation wurde gezeigt, dass durch eine steigende Menge von Erythrozyten eine steigende Menge von IBV-S präzipitiert wird und damit aus dem Überstand verschwindet.

Um die Bindungsaktivität der löslichen Proteine von TGEV zu testen, wurde ein Bindungstest mit Schweineerythrozyten durchgeführt. Dafür wurden solS1S2Fc oder TGE-Virus mit 5%iger Erythrozytenlösung inkubiert und anschließend zentrifugiert. Durch den Zentrifugationsschritt sollten an Erythrozyten gebundene lösliche Proteine bzw. virales S-Protein pelletiert werden. Der Überstand wurde dann einer Protein-A

Präzipitation unterzogen. Als Kontrolle diente Inkubation des löslichen Proteins mit PBSM statt Erythrozyten bzw. des TGEV-Virus mit Erythrozyten.

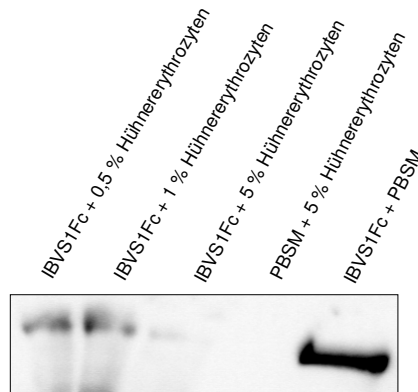


Abbildung 21: Bindung von IBVS1Fc an Hühnererythrozyten. Als Kontrolle wurde das lösliche Protein mit PBSM inkubiert (letzte Spur). Detektiert mit anti-hFc-HRP. Durchgeführt von Dr.Christine Winter.

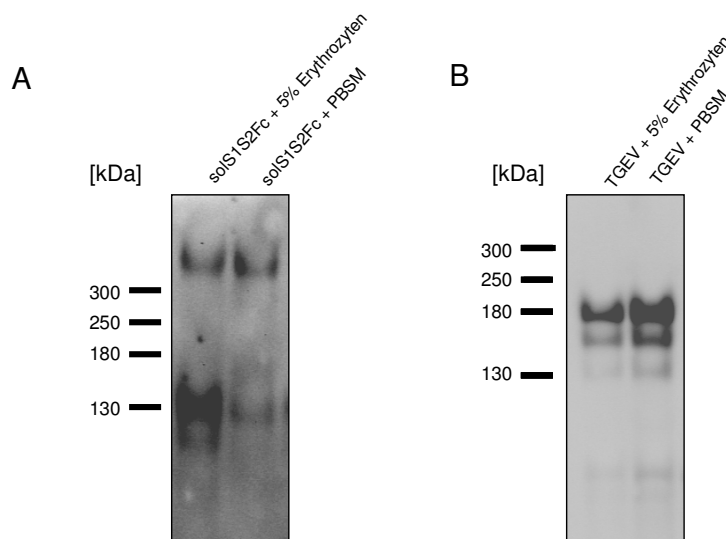


Abbildung 22: Bindung von solS1S2Fc (A) und TGEV an Erythrozyten (B). Als Kontrolle wurde solS1S2Fc oder TGEV mit PBSM inkubiert. Detektiert mit anti-TGEV-S und anti-Maus-HRP.

In **Abbildung 22A** wird deutlich, dass sich die Bindung des löslichen S-Proteins an Erythrozyten nicht nachweisen lässt. Wenn man die Banden auf dem Western Blot vergleicht, erkennt man keinen deutlichen Unterschied. Im Vergleich dazu konnte man nach Inkubation von TGEV mit 5%iger Schweinerythrozytenlösung und anschließender Präzipitation eine Abnahme der Bindung feststellen, die sich durch die Abnahme der Bandenintensität äußert. Dies deutet auf eine Bindung von TGEV an Erythrozyten, die durch S-Protein vermittelt wird. Dadurch wurde demonstriert, dass das lösliche solS1S2Fc-Protein wahrscheinlich keine Sialinsäure-Bindungsaktivität besitzt, während

das lösliche IBV-S-Protein Sialinsäuren an der Oberfläche der Hühnererythrozyten erkennt.

5.1.13 Untersuchung der Bindung an Kryoschnitte vom Darmgewebe

Es wurden Gefrierschnitte des Jejunums eines ca. 12 Wochen alten Schweins angefertigt. Diese Methode wurde gewählt, weil so die Strukturen des Darmgewebes erhalten blieben. Die Kryoschnitte wurden mit 3% PFA fixiert und mit gereinigten löslichen S-Proteinen von TGEV inkubiert. Anschließend erfolgte Inkubation mit anti-hFc-FITC-Antikörper und die Beurteilung der Bindung im konfokalen Mikroskop.

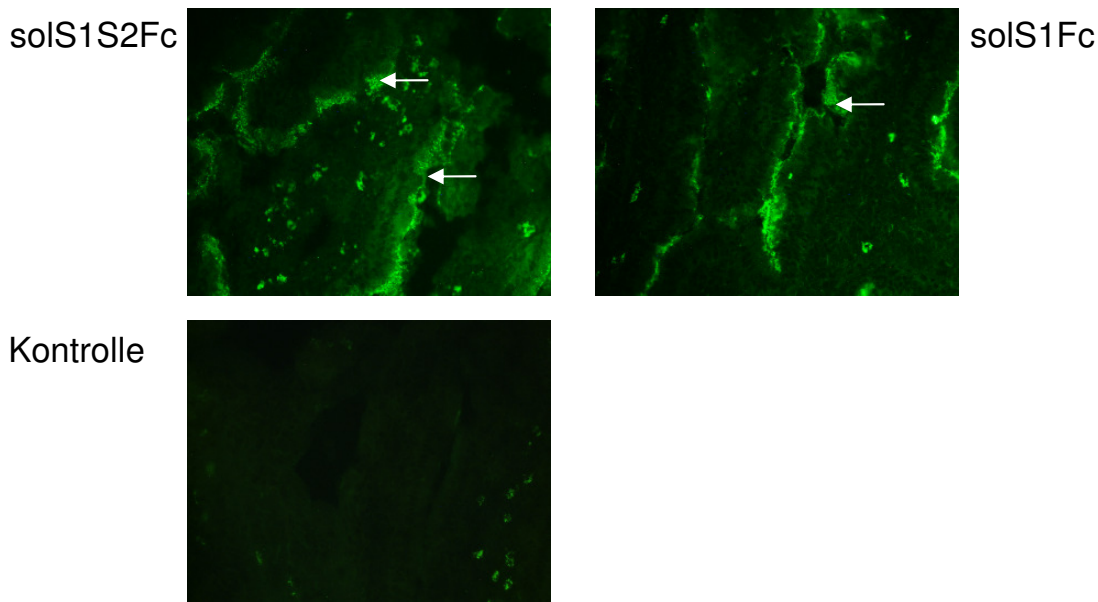


Abbildung 23: Kryoschnitte von Jejunum eines männlichen Schweins. Kryoschnitte wurden mit solS1S2Fc oder solS1Fc inkubiert. Als Kontrolle diente Fc. Angefärbt mit anti-hFc-FITC. Die Bindung wird durch weiße Pfeile dargestellt. Fotografiert mit einem 40er Objektiv.

In **Abbildung 23** wird gezeigt, dass die beiden löslichen Proteine an die Zellen der Darmschleimhaut binden konnten (weiße Pfeile). Dabei könnte es sich um Enterozyten und Becherzellen des Dünndarmepithels handeln. Die Bindung erkennt man durch die fluoreszierenden Randbereiche der Darmschleimhaut. Dagegen blieb die Kontrolle im Mikroskop negativ, lediglich eine schwache Hintergrund-Fluoreszenz konnte beobachtet werden.

5.2 Erzeugung rekombinanter TGE-Viren

5.2.1 Klonierarbeiten zum Einführen von Mutationen ins Retentionssignal des TGEV-S-Proteins

Ein bereits identifiziertes Tyrosin-haltiges Signal, das sich im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins befindet, wird für die Zurückhaltung des S-Proteins in subzellulären Kompartimenten verantwortlich gemacht (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Das Motiv besteht aus den Aminosäuren 1440YEPI1443. Das Retentionssignal vermittelt durch Interaktion mit unbekanntem zellulären Proteinen höchstwahrscheinlich das intrazelluläre Zurückhalten des Proteins.

Im diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte charakterisiert werden, wie sich Aminosäure-Mutationen innerhalb des Retentionssignals auf die virale Replikation auswirken und ob überhaupt replikationsfähige Viren entstehen können. Die rekombinanten Viren wurden mit Hilfe der BAC-Technologie kloniert (Almazan et al., 2000). Das TGEV Genom wurde als cDNA (pBACTGEVSC11FL) zur Erzeugung der in **Abbildung 24** dargestellten Mutanten verwendet. Die Mutanten rTGEVS_YI/AA und rTGEVS_del10 wurden ausgewählt, weil aus Einzelexpressionsstudien bekannt war, dass die betreffenden S-Proteine über kein funktionsfähiges Retentionssignal verfügen und folglich zur Oberfläche transportiert werden. Untersuchungen von Paul (2005) haben gezeigt dass ein Methionin an Position 1445 das Retentionssignal inaktiviert, obwohl das oben erwähnte tyrosin-haltige Tetrapeptid noch vorhanden ist. Nach dem Transport zur Zelloberfläche fungiert das YEPI-Motiv allerdings als Endozytose-Signal, so dass die 1445K/M-Mutante internalisiert wird und in Endosomen nachzuweisen ist. Wegen dieses interessanten Phänotyps sollte die K/M-Mutation auch im Kontext eines rekombinanten Virus (TGEVS_K/M Mutante) analysiert werden.

Die virale cDNA pBACTGEVSC11FL wurde mit dem Restriktionsenzym *BlnI* geschnitten, wodurch ein Teil des S-Gens sowie ein stromabwärts liegender Abschnitt des viralen Genoms ausgeschnitten wurden. Mit dem gleichen Enzym wurden dann die pSLTRS3a-Vektoren (3.7) verdaut, die bereits zur Verfügung standen und die jeweiligen Mutationen im Retentionssignal enthielten. Als Positiv-Kontrolle der Klonierungsstrategie sollte das ausgeschnittene Stück gegen das gleiche aus dem

pSLTR3a-Vektor stammende Stück ohne Mutation ausgetauscht werden. Nach der Ligation wurden die BAC-Vektoren durch Elektroporation in die Bakterien eingeschleust und vermehrt. Nach der DNA-Präparation wurde die BAC-DNA zum Sequenzieren geschickt, um die eingeführten Mutationen in der Sequenz zu kontrollieren. Das Klonieren der rTGEVS_K/M-Mutante erwies sich als sehr schwierig. Diese Mutante konnte während dieser Doktorarbeit leider nicht fertig gestellt werden. Nach der Vermehrung der BAC-DNA in Bakterien stand nicht genügend DNA zur Verfügung, um diese sequenzieren zu lassen. Vermutlich führte das Einführen der Mutation zur Beeinträchtigung des Wachstums in Bakterien. Für weitere Experimente wurden die hier klonierten rTGEVS_YI/AA, rTGEVS_del10 und die rTGEVS-Kontrolle verwendet.

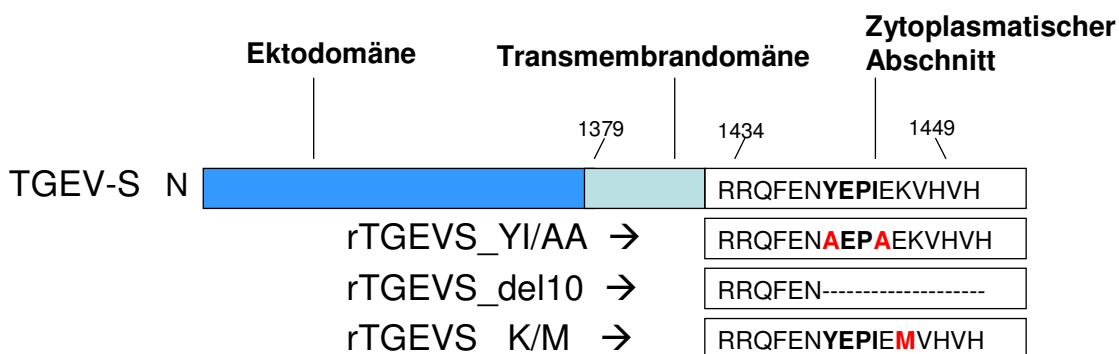


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Wildtyp-TGEV-S-Proteins und der S-Mutanten.

TGEV-S → Wildtyp

rTGEVS_YI/AA: Austausch von Tyrosin-1440 gegen Alanin und Isoleucin-1443 gegen Alanin

rTGEVS_del10: Deletion der 10 carboxyterminalen Aminosäuren des zytoplasmatischen Abschnitts des S-Proteins

rTGEVS_KM: Austausch von Lysin-1445 gegen Methionin an der Position +5 nach dem Tyrosin

5.2.2 Viruserzeugung und Infektion von ST-Zellen

Für die Transfektion der zuvor klonierten viralen cDNA wurden am Vortag BHK-21-Zellen und ST-Zellen ausgesät. Die Transfektion erfolgte mittels *Lipofectamine™ 2000 Reagent* nach Angaben des Herstellers. Nach einer Inkubation von 5 h wurden die transfizierten BHK-21-Zellen mit Trypsin abgelöst und auf die am Vortag ausgesäten ST-Zellen gegeben und diese Zellmischung für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Die Verwendung von ST-Zellen war notwendig, da sie im Gegensatz zu BHK-21-Zellen den zellulären Rezeptor die pAPN exprimieren.

Nach drei Tagen haben die BHK-21-Zellen teilweise die ST-Zellen überwuchert. Bei der Kontrolle rTGEVS war ein deutlicher zytopatischer Effekt (CPE) zu erkennen, der sich durch abgelöste Zellen äußerte. Bei der rTGEVS_del10 und die rTGEVS_YI/AA war kein CPE zu erkennen. Der Überstand wurde geerntet und auf neue ST-Zellen auf 100 mm-Schalen gegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Ernte der Viren (Passage1).

Mit dem Immunoperoxidase-Test sollte anschließend die Replikationsfähigkeit der erzeugten Viren getestet werden. Hierfür wurden auf einer 96-Napf-Platte ausgesäten ST-Zellen mit den erzeugten rekombinanten Viren in verschiedenen Verdünnungen laut Protokoll (4.5.3) infiziert. Nach einer zweitägigen Kultivierung wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert, permeabilisiert und mit dem Antikörper gegen das TGEV-S-Protein (6A.C3) inkubiert. Nach der Inkubation mit dem peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte die Zugabe des AEC-Substrats. Der Test wurde unter dem Lichtmikroskop ausgewertet (**Abbildung 25**). Als Vergleich wurde der gleiche Ansatz auch mit FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt (**Abbildung 26**). In **Abbildung 25** wird gezeigt, dass nur Zellen, die mit dem TGEVS-wt oder rTGEVSwT-Kontrolle inkubiert wurden, infiziert sind. Bei den Mutanten konnte, ähnlich wie bei der Negativ-Kontrolle, keine Infektion festgestellt werden. Im Immunfluoreszenztest wurde das Ergebnis noch mal verdeutlicht (**Abbildung 26**). Bei den rekombinanten Virusmutanten konnten, im Vergleich zu den Kontrollen, keine infizierten Zellen nachgewiesen werden.

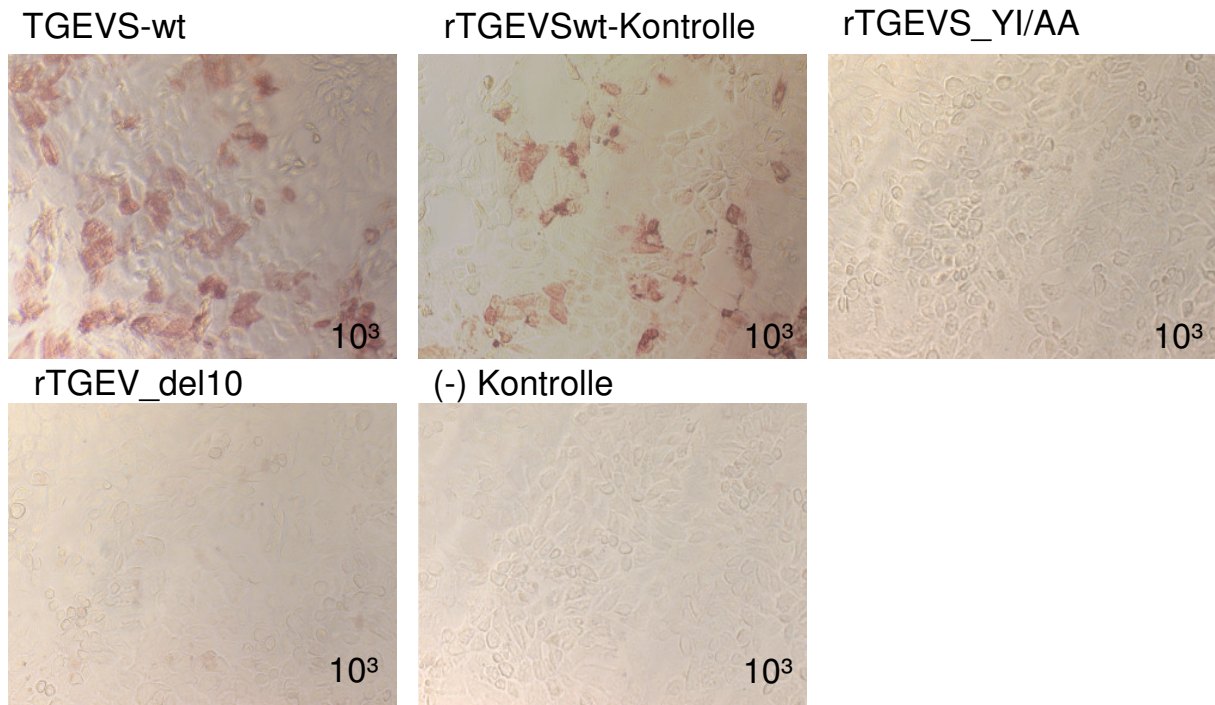


Abbildung 25: Untersuchung der Infektiosität rekombinanter TGE-Viren mit dem Immunoperoxidase-Test. Rote Färbung zeigt die Infektion an und wurde nur bei folgenden Viren beobachtet: TGEVS-wt und rTGEVSwT-Kontrolle. Bei Viren mit Veränderungen im Retentionssignal konnte keine Infektion detektiert werden. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellen mit PBS statt Virus inkubiert. Fotografiert mit einem 20er Objektiv.

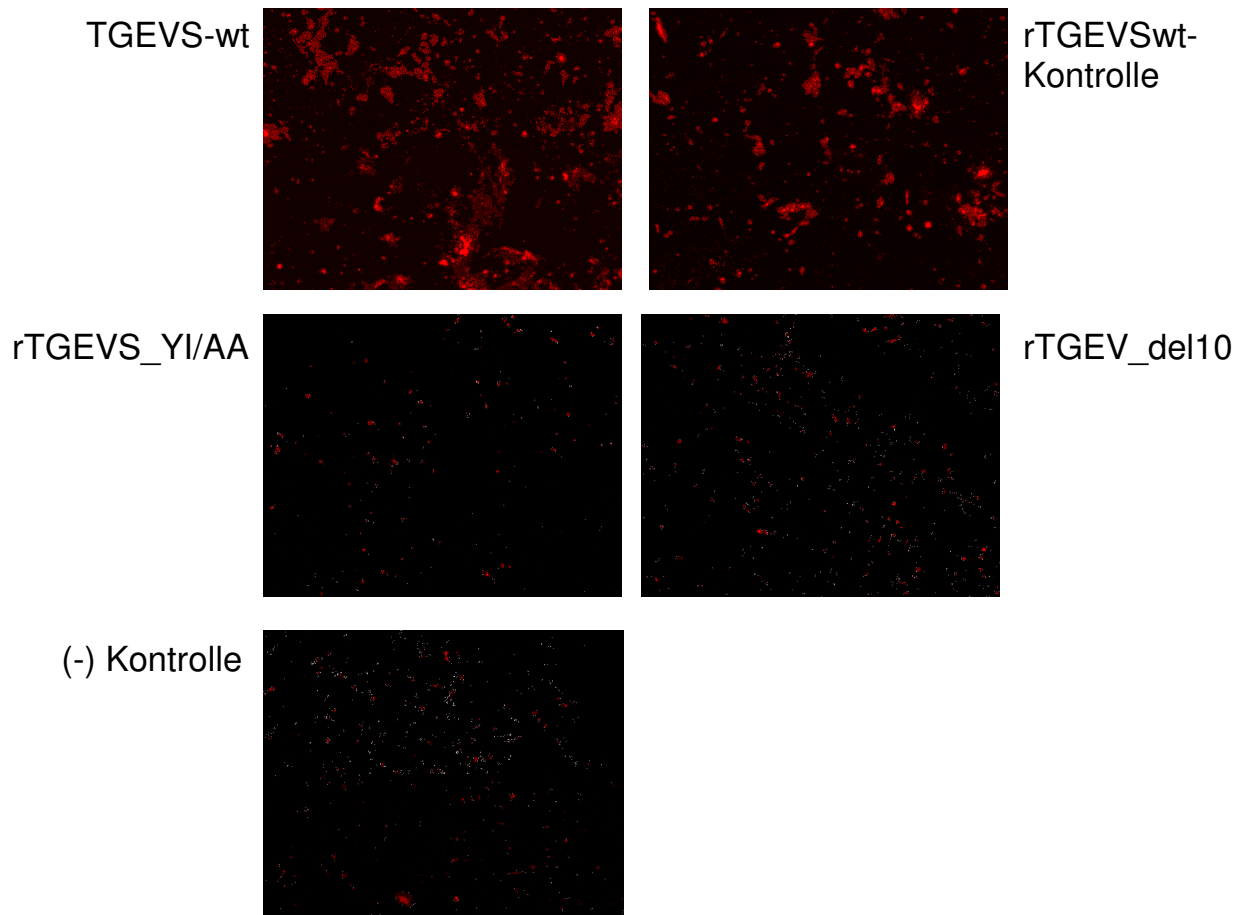


Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis der Infektion von ST-Zellen durch rekombinante TGE-Viren. Rote Fluoreszenz wurde nur nach Infektion mit folgenden Viren: TGEVS-wt und rTGEVSwT-Kontrolle sichtbar. Bei Viren mit Veränderung im Retentionssignal wurde keine Infektion detektiert. Fotografiert mit einem 20er Objektiv.

5.2.3 Komplementation der klonierten Viren mit Wildtyp-S-Protein

Bei den zuvor erzeugten Viren, die Mutationen im Retentionssignal oder eine Deletion im carboxyterminalen Abschnitt der zytoplasmatischen Domäne enthalten, wurde keine nachweisbare Infektion festgestellt (5.2.2). Durch dieses Ergebnis lag die Vermutung nahe, dass dies durch die Veränderungen des S-Proteins verursacht wurde. Diese Vermutung sollte durch einen Komplementationstest mit Wildtyp-S-Protein bestätigt oder widerlegt werden. Hierfür wurden zunächst BHK-21-Zellen auf 30 mm-Schalen und ST-Zellen auf 100 mm-Schalen ausgesät. Am Tag der Konfluenz wurden BHK-21-Zellen mit der viralen cDNA und zusätzlich mit je 1 µg des Expressionsplasmids pCG1SwT mittels *Lipofectamine™ 2000 Reagent* transfiziert. Nach 5 h wurden die transfizierten Zellen durch Trypsinzugabe abgelöst und mit den ST-Zellen auf 100 mm-Schalen vermischt. Die Zellmischung wurde für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Nach drei

Tagen war nicht nur bei der Positivkontrolle, sondern auch bei den Mutanten ein deutlicher CPE sichtbar (nicht gezeigt), nur bei der Negativkontrolle blieb erwartungsgemäß die Infektion aus. Mit dem mutmaßlichen Virus im Zellüberstand wurden neue ST-Zellen infiziert (Passage1). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert, permeabilisiert und mit dem Antikörper gegen das TGEV-S-Protein inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Infektion wurde am Folgetag unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Wie in (**Abbildung 27**) zu sehen ist, wurden bei allen Proben, bei denen das Wildtyp-S-Protein *in trans* zur Verfügung gestellt wurde, Fluoreszenz-Signale gefunden. Das Wildtyp-S-Protein, das über das Begleitplasmid exprimiert und im Zytoplasma zurückgehalten wurde, konnte das fehlende mutierte S-Protein ersetzen und somit zur Bildung von rekombinanten Viren beitragen (**Abbildung 27**).

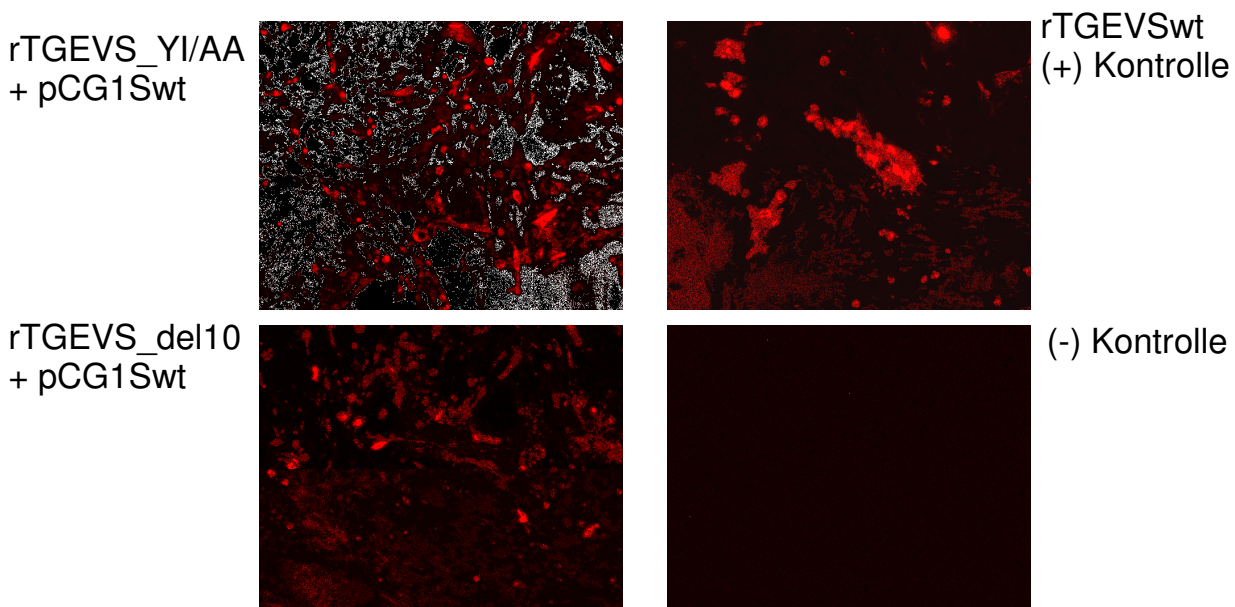


Abbildung 27: Komplementationstest mit Wildtyp-S-Protein. Bei der Viruserzeugung wurden zusätzlich zur viralen cDNA (rTGEVS_YI/AA oder rTGEVS_del10) je 1 µg von pCG1Swt in die BHK-21-Zellen transfiziert. Mit den erzeugten Viren wurden ST-Zellen auf Deckgläser infiziert. Detektiert mit anti-TGEV-S. Fotografiert mit einem 20er Objektiv.

5.2.4 Komplementation der klonierten Viren mit pCG1S_K/M

Der Austausch von Lysin gegen Methionin an der Position +5 nach dem Tyrosin führt zum Transport des S-Proteins zur Oberfläche mit anschließender Endozytose, wie in Einzelexpressionsuntersuchungen gezeigt werden konnte (Paul, 2005). Ein rekombinantes Virus mit der K/M Mutation im S-Protein konnte leider im Rahmen dieser Arbeit nicht erzeugt werden. Deshalb sollte der pCG1S_K/M-Vektor zur Expression des S_K/M-Proteins für einen Komplementationstest, ähnlich dem Test im vorherigen Abschnitt, genutzt werden. Es sollte untersucht werden, ob das S_K/M-Protein den Defekt der Virusmutanten rTGEVS_YI/AA bzw. rTGEVS_del10 ersetzen und somit zur Viruserzeugung beitragen kann.

BHK-21-Zellen wurden auf 30 mm-Schalen und ST-Zellen auf 100 mm-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die BHK-21-Zellen mit der viralen cDNA und zusätzlich mit je 1 µg von pCG1S_K/M mittels *Lipofectamine™ 2000 Reagent* transfiziert. Nach 5 h wurden die transfizierten Zellen durch Trypsinzugabe abgelöst und mit den ST-Zellen auf 100 mm-Schalen vermischt. Die Zellmischung wurde für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Mit dem geernteten Virusüberstand wurden neue ST-Zellen infiziert. Nach dem die Zellen für 20 min mit 3% PFA fixiert waren, wurden sie mit dem anti-TGEV-S-Antikörper inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.

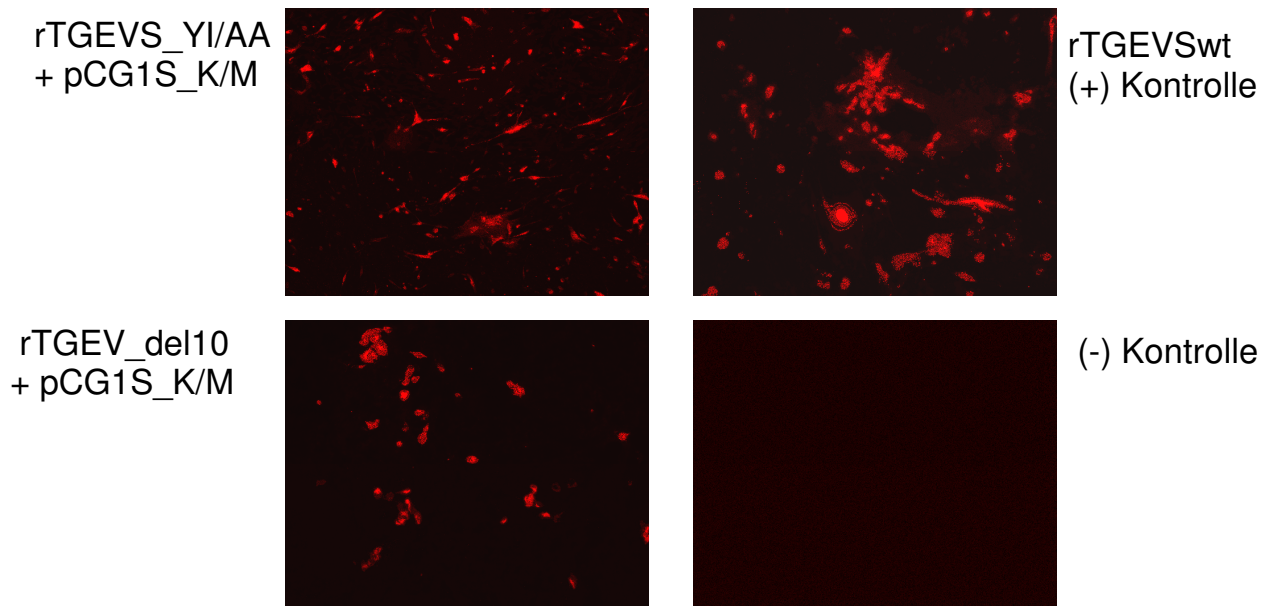


Abbildung 28: Komplementationstest mit pCG1S-K/M. Bei der Viruserzeugung wurden zusätzlich zur viralen cDNA (rTGEVS_YI/AA oder rTGEVS_del10) je 1 µg von pCG1S_K/M in die BHK-21-Zellen transfiziert. Mit den erzeugten Viren wurden ST-Zellen auf Deckgläser infiziert. Detektiert mit anti-TGEV-S. Fotografiert mit einem 20er Objektiv.

Durch die Expression des pCG1S_K/M Proteins, konnte das im TGEV-Genom mutierte-S-Protein ersetzt werden. Das S_K/M Protein wurde vermutlich endozytiert und konnte in die Viruspartikeln eingebaut werden, wie durch die rote Fluoreszenz gekennzeichnete Infektion sichtbar wurde (**Abbildung 28**).

5.2.5 Komplementation der klonierten Viren mit pCG1S_YI/AA und pCG1S_del10

Als weitere Kontrolle sollten die erzeugten mutierten Viren mit homologen Proteinmutanten komplementiert, d.h. zusätzlich mit pCG1S_YI/AA oder pCG1S_del10 transfiziert werden. Nachdem die viralen cDNAs und die oben genannten S-Protein-Plasmide in die BHK-21-Zellen transfiziert und mit den ST-Zellen vermischt worden waren, wurden sie für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Der virushaltige Zellkulturüberstand wurde geerntet und auf neue ST-Zellen gegeben (Passage1). Nach dem die Zellen am nächsten Tag mit 3% PFA fixiert wurden, wurden sie mit dem anti-TGEV-S inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.

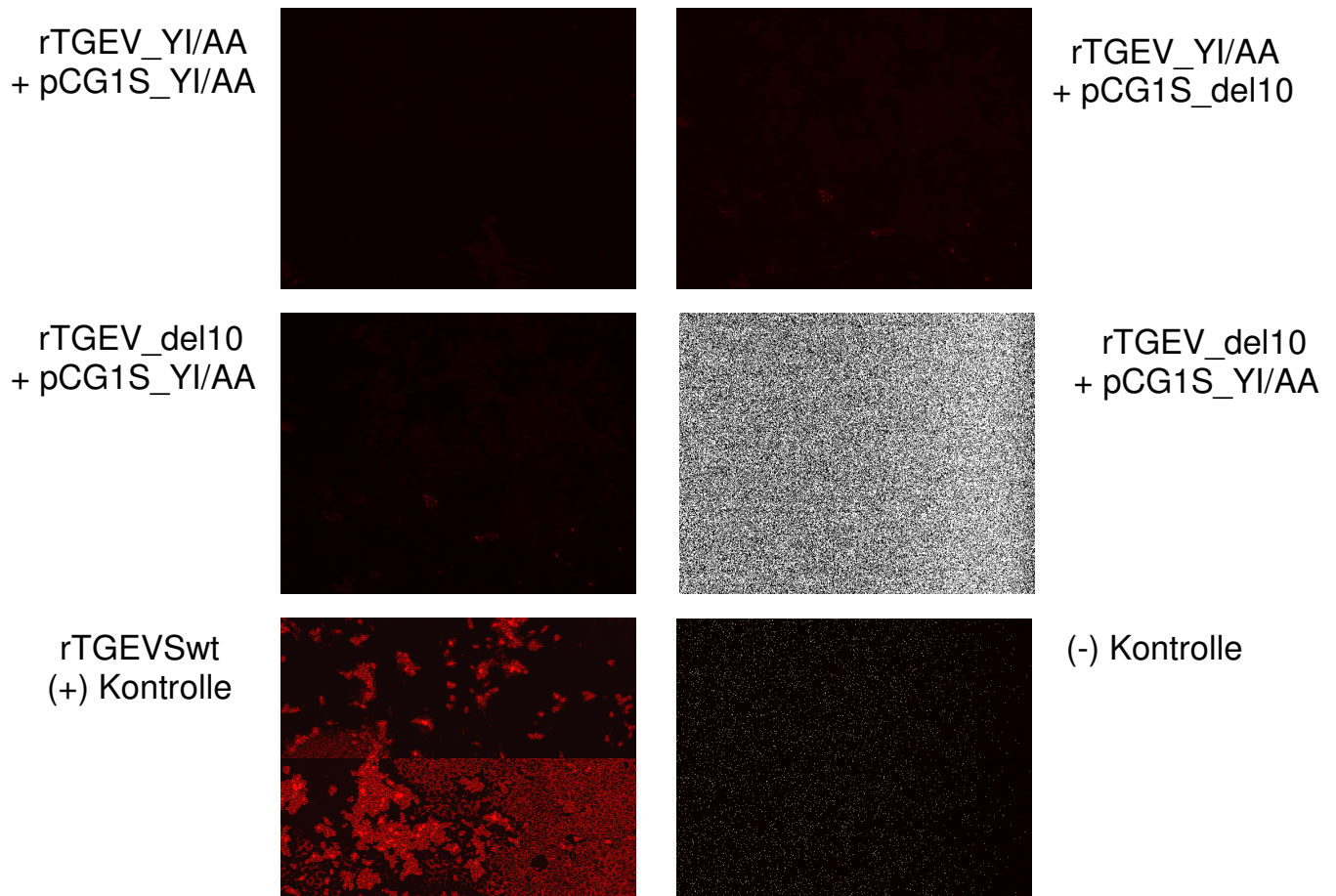


Abbildung 29: Komplementationstest mit pCG1S_YI/AA und pCG1S_del10. Bei der Viruserzeugung wurden zusätzlich zur viralen cDNA (rTGEVS_K/M oder rTGEVS_del10) je 1 µg von pCG1S_YI/AA oder pCG1S_del10 in die BHK-21-Zellen transfiziert. Mit den erzeugten Viren wurden ST-Zellen auf Deckgläser infiziert. Detektiert mit anti-TGEV-S. Fotografiert mit einem 20er Objektiv.

In **Abbildung 29** wird deutlich, dass auch durch Überexpression der Mutanten mit Aminosäure-Änderungen im Tyrosin-Signal keine replikationsfähigen Viren entstanden sind. Wenn das tyrosinhaltige Motiv außer Kraft gesetzt wurde, wurden keine Viruspartikel gebildet.

5.2.6 Infektion von ST-Zellen mit komplementierten Viren (Passage 2)

Die obigen geschilderten Versuche haben gezeigt, dass durch Komplementation der rekombinanten Viren mit Wildtyp-S-Protein oder mit S_K/M-Protein, infektiöse Viren entstehen können. Um zu überprüfen, ob die komplementierten Viren replikationsfähig sind, sollten neue ST-Zellen infiziert werden. Es wurde aber kein neues S-Protein per Transfektion zur Verfügung gestellt.

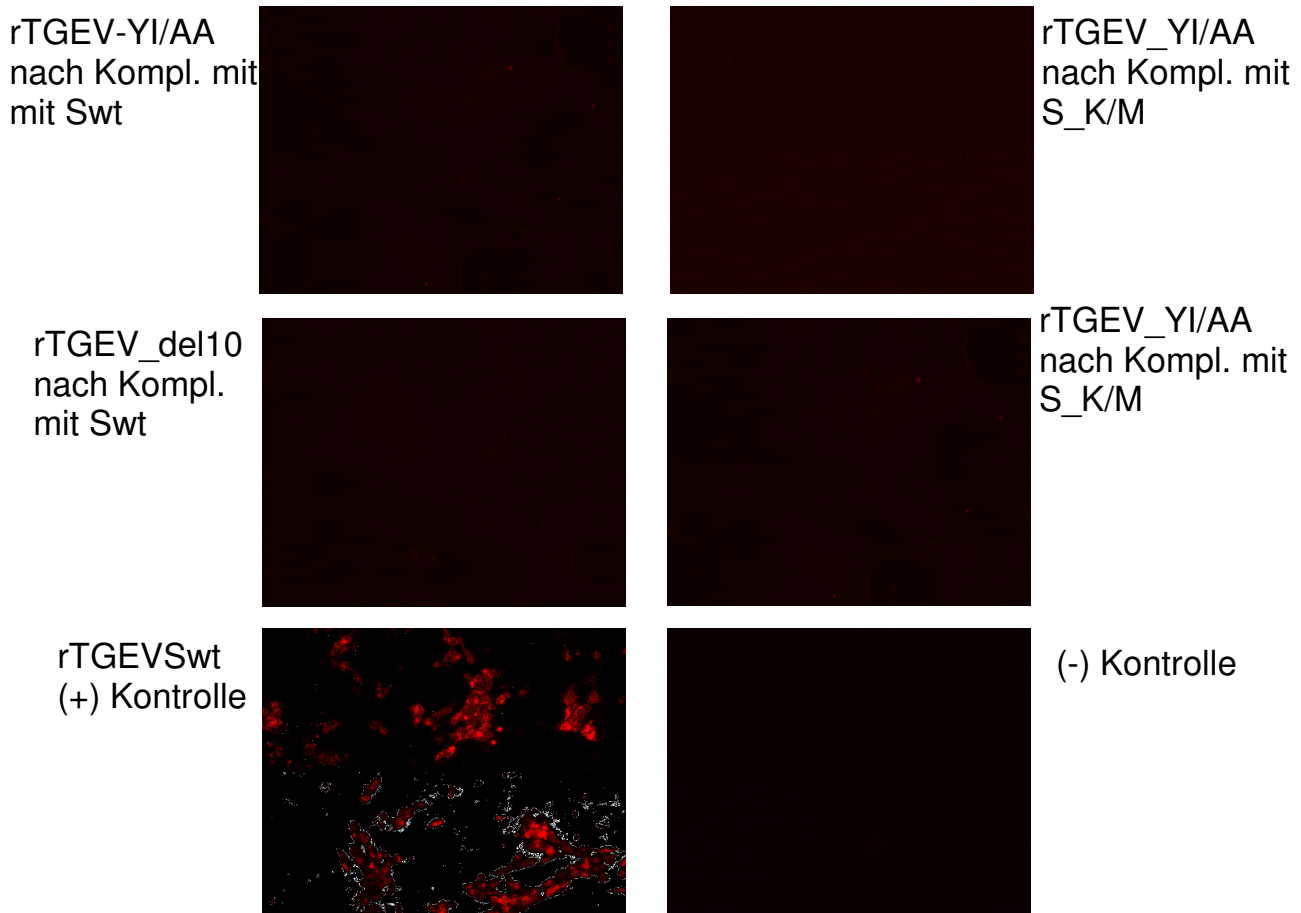


Abbildung 30: Infektion der ST-Zellen mit den komplementierten Viren (Passage2). Die mit den zuvor durch Komplementation mit pCG1Sw oder pCG1S_K/M erzeugten Viren wurden nach einer Passage in ST-Zellen ohne Komplementation (analog zu Abb. 28) in einer 2. Passage auf frische ST-Zellen gegeben und die Infektion im Immunfluoreszenztest getestet. Detektiert mit anti-TGEV-S. Fotografiert mit einem 20er Objektiv.

Wie in **Abbildung 30** zu erkennen ist, konnte erwartungsgemäß keine Infektion festgestellt werden. Das Swt- Protein oder das S_K/M-Protein wurden in den Zellen über das Expressionsplasmid transient exprimiert, also kam es nur zur zeitlich begrenzten Expression der Proteine. Diese Proteine wurden in die Viruspartikel eingebaut und mit diesem Virus konnten Zellen einmal infiziert werden (Passage 1). Da in der zweiten Infektionsrunde keine S-Proteine mehr zu Verfügung standen, fand kein weiterer Zusammenbau infektiöser Viren statt und die Zellen der 2. Passage konnten nicht infiziert werden.

6 Diskussion

6.1 Untersuchungen zur Interaktion der löslichen TGEV-S-Proteine mit dem zellulären Rezeptor pAPN und Sialinsäureresten

Die porcine Aminopeptidase N wurde bereits 1992 von Delmas als zellulärer Rezeptor für TGEV beschrieben (Delmas et al., 1992). Nach Anheftung an die porcine Aminopeptidase N und Fusion der Zytoplasmamembran mit der Virushülle wird das Nukleokapsid ins Zytoplasma freigesetzt und die Translation des RNA-Genoms beginnt. Es wird vermutet, dass, bevor das Virus mit pAPN interagiert, es durch die Sialinsäure-Bindungsaktivität an muzinartige Glykoproteine bindet und somit verhindert, dass das Virus durch peristaltische Bewegungen im Darm ausgespült wird (Schwegmann-Wessels et al., 2002; Schwegmann-Wessels et al., 2003). Erst nach der Bindung an Sialinsäuren erreicht das Virus die Epitheloberfläche, wo es an pAPN bindet und die Enterozyten infiziert (Schwegmann-Wessels et al., 2002; Schwegmann-Wessels et al., 2003). Ein muzinartiges Glykoprotein wurde mit Hilfe von gereinigtem TGEV identifiziert, aber nicht näher charakterisiert. Virusmutanten, die keine Sialinsäure-Bindungsaktivität besitzen, sind nicht in der Lage, das muzinartige Protein zu erkennen (Schwegmann-Wessels et al., 2002; Schwegmann-Wessels et al., 2003).

6.1.1 Erzeugung und Expression von löslichen Proteinen

Um die beiden Bindungsaktivitäten näher zu untersuchen, wurden lösliche Formen des TGEV-S-Proteins hergestellt und in den Säugetierzellen exprimiert. Bei der Erzeugung war es von Bedeutung, dass die natürliche Proteinstruktur weitestgehend erhalten blieb. Für die Erzeugung von löslichen TGEV-S-Proteinen wurden der zytoplasmatische Abschnitt und die Transmembrandomäne entfernt. Das am aminoterminalen Ende gelegene Signalpeptid, das das Protein ins ER-Lumen transloziert, blieb dadurch erhalten. Die antigenen Epitope des S-Proteins sind ebenfalls in der aminoterminalen Hälfte lokalisiert, also wurden sie durch Entfernen

der Transmembrandomäne und des zytoplasmatischen Abschnitts nicht beeinträchtigt. Die löslichen Proteine wurden entweder am C-Terminus mit Fc-Tag von humanem Immunglobulin G versehen oder als Konstrukte ohne einen Tag erzeugt. Die Konstruktion löslicher Proteine ermöglicht eine hohe Expression und Sekretion in den Zellkulturüberstand. Die Vorteile eines Fc-Tags liegen zu einem in der Möglichkeit einer *FPLC*-Aufreinigung über eine Protein A-Säule. Zum anderen kann man zur Detektion des S-Proteins einen zusätzlichen gegen den humanen Immunglobulin G gerichteten Antikörper verwenden. Konstrukte, die mit dem Fc-Tag versehen waren, standen bereits zu Beginn dieser Doktorarbeit zur Verfügung und konnten direkt für die Expressionsstudien und Bindungstests verwendet werden. Alle löslichen Proteine wurden erwartungsgemäß in den BHK-21-Zellen intrazellulär exprimiert, wobei die Expression bei den solS1- und solS1S2-Proteinen nicht so stark war im Vergleich mit den Fc-Konstrukten (5.1.1).

Weiterhin wurde untersucht, ob die Proteine im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden können, d.h. ob sie auch sezerniert werden. Hierfür wurden die Überstände der zuvor transfizierten BHK-21- oder HEK-293T-Zellen geerntet, konzentriert und einer Western Blot Analyse unterzogen. Die solS1Fc und solS1S2Fc-Proteine zeigten jeweils Banden, die die Proteine als Dimere und Multimere präsentieren. Es wird vermutet, dass der Fc-Tag für die Bildung der Dimere bzw. Multimere verantwortlich ist. Die löslichen Konstrukte ohne Tag konnten im Überstand von transfizierten BHK-21-Zellen nicht nachgewiesen werden, obwohl im Immunfluoreszenztest eine intrazelluläre Expression gezeigt werden konnte. Auch in der anschließenden Zellysat-Analyse mit den transfizierten BHK-21-Zellen konnte nur eine schwache Expression ermittelt werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Proteine in den Zellen exprimiert, nicht aber bzw. nur sehr ineffizient sezerniert werden. Da diese Proteine nach einer Transfektion nicht im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnten, wurden sie für weitere Studien während dieser Doktorarbeit nicht verwendet.

Wie die Ergebnisse der Western Blot-Analyse belegen, werden die solS1Fc- und solS1S2Fc-Proteine in di- bzw. multimerer Form in den Zellkulturüberstand sezerniert. Das in der Virushülle natürlich vorkommende TGEV-S-Protein liegt jedoch in einer trimeren Form vor. Um später mit den löslichen Proteinen zellbasierte Bindungstest durchführen zu können, war es von Bedeutung, dass das S-Protein in

seiner Struktur, dem in den Virionen natürlich vorkommenden S-Protein ähnelt. Deshalb sollte zusätzlich eine Möglichkeit gefunden werden, das TGEV-S-Protein als Trimer zu erzeugen. Im Jahre 1993 wurde von Harbury gezeigt, dass der Leuzin-Zipper des Transkriptionsfaktors GCN4 eine Oligomerisierung von Proteinstrukturen begünstigt (Harbury et al., 1993). Es handelt sich dabei um eine Trimerisierungsdomäne, die durch ihre Länge von 30 Aminosäuren eine optimale Länge besitzt, um die Konformation und Funktion von Proteinen nicht zu verändern. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die GCN4-Leuzin-Zipper-Trimerisierungsdomäne die Trimerbildung des Glykoproteins von HIV-1 in löslicher Form stabilisieren kann (Yang et al., 2000). Als weitere Möglichkeit, um Oligomerisierung von Proteinen zu erreichen, wurde der Einsatz einer Trimerisierungsdomäne von Fibrin des T4-Bakteriophagen beschrieben (Yang et al., 2002).

Um die Trimerisierung von TGEV-S-Protein zu ermöglichen, wurde mit Hilfe des GCN4-Leuzin-Zippers das solS1S2Trim-Protein hergestellt und in BHK-21-Zellen exprimiert. Die Trimerisierungsdomäne wurde nach dem Entfernen der Transmembrandomäne und des zytoplasmatischen Abschnitts am carboxyterminalen Ende von TGEV-S angehängt. Die löslichen Proteine konnten dann mit Hilfe einer Western Blot-Analyse detektiert werden. Das lösliche solS1S2Trim-Protein wurde als hochmolekulare Bande sichtbar, die Multimere möglicherweise Trimere von solS1S2Trim-Protein darstellt (5.1.1).

6.1.2 Bindung der löslichen S-Proteine an verschiedene Zelllinien

Für weitere Studien während dieser Doktorarbeit wurden die löslichen Proteine solS1Fc, solS1S2Fc und solS1S2Trim verwendet. Die Fähigkeit der löslichen Proteine, an Zellen zu binden, sollte in verschiedenen Ansätzen getestet werden. Zunächst wurde der Immunfluoreszenz-Bindungstest mit Zellen, die pAPN endogen exprimieren, durchgeführt. Die ST-Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit den löslichen Proteinen inkubiert. Mittels Antikörper konnte eine Bindung der löslichen Konstrukte solS1S2Fc und solS1Fc an die ST-Zellen gezeigt werden (5.1.2). Dagegen konnte bei der Kontrolle nur eine Hintergrund-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Diese Tatsache deutete auf eine spezifische Bindung der löslichen viralen Proteine hin, wobei beide Konstrukte mit gleicher Intensität an die

ST-Zellen gebunden haben. Durch den durchgeführten Test konnte noch nicht gezeigt werden, um welche Art der Bindung es sich handelt. Da es sich bei den ST-Zellen um eine Zelllinie handelt, die aus dem Hoden eines Schweineföten isoliert worden war, wird bei ihnen die porcine Aminopeptidase N konstitutiv exprimiert. Deshalb konnte nicht beurteilt werden, ob die löslichen Proteine auch die Sialinsäuren auf der Zelloberfläche erkennen, oder nur mit pAPN interagieren.

Um die Art der Bindung näher zu untersuchen, wurde ein Immunfluoreszenz-Bindungstest mit BHK-21-Zellen durchgeführt. Da es sich bei den BHK-21-Zellen um eine Hamster-Zelllinie handelt, findet hier keine Expression von pAPN statt. Das TGEV-S-Protein bindet an pAPN (Delmas et al., 1992), hat aber noch eine zweite Bindungsaktivität, die Bindung an Sialinsäuren (Schultze et al., 1996). Es sollte untersucht werden, ob die erzeugten löslichen Proteine an Sialinsäuren binden können. Die Zellen wurden entweder mit Medium oder mit einem pAPN-Expressionsplasmid transfiziert, um die pAPN-Expression zu ermöglichen. Nach der Inkubation mit den löslichen Proteinen zeigten die zuvor transfizierten Zellen eine spezifische Bindung der löslichen Proteine an pAPN (5.1.3). Im Vergleich dazu konnte bei den Zellen, die keine pAPN exprimieren, auch keine Bindung detektiert werden. Es lag die Vermutung nahe, dass die erzeugten Proteine keine Bindungsaffinität für Sialinsäuren besitzen bzw. nur eine sehr schwache Affinität, die aber im Fluoreszenzmikroskop nicht detektierbar war.

Weiterhin wurde eine Durchflusszytometrie-Analyse durchgeführt, um die Bindungsaktivitäten der löslichen Proteine zu quantifizieren. Dafür wurden BHK-21-Zellen mit dem pAPN-Expressionsplasmid transfiziert bzw. die ST-Zellen mit der endogenen pAPN verwendet und mit den löslichen Proteinen inkubiert. Die Bindungsaktivität wurde in einem Durchflusszytometer analysiert. Es konnte eine spezifische Bindung von solS1Fc und solS1S2Fc an ST-Zellen nachgewiesen werden (5.1.4). Die Bindung an solS1S2Fc ist vergleichbar mit der Bindung an solS1Fc-Protein und wurde mit ca. 50% quantifiziert, d.h. etwa die Hälfte der Zellen wies gebundenes S-Protein auf. Beim solS1S2Trim-Protein wurde eine Bindung von ca. 25% gemessen. Im Vergleich dazu konnte beim leeren pCG1-Fc Vektor keine Bindung ermittelt werden. Das lösliche Protein solS1S2Trim, das die Trimerisierungsdomäne besitzt, zeigte eine um die Hälfte reduzierte Bindung an ST-

Zellen. Es lässt sich dadurch erklären, dass das Protein möglicherweise nicht wie erwartungsgemäß als Trimer vorlag, sondern eine multimerere Form angenommen hat. Dadurch kam es zur Ausbildung einer ungünstigen Konformation, durch die die Bindungs-Epitope teilweise verdeckt wurden.

Das S-Protein von gereinigtem TGE-Virus erkennt durch die Bindungsaktivität an Sialinsäuren ein hochmolekulares Sialoglykoprotein (Schwegmann-Wessels et al., 2003). Es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um ein muzinartiges Protein (mucin-like glykoprotein, MGP), das assoziiert mit der Membran vorliegt (Schwegmann-Wessels et al., 2002). Zur Identifizierung des muzinartigen Proteins wurden zunächst Membranproteine aus ST-Zellen isoliert, unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die auf der Membran transferierten Proteine konnten dann für einen Bindungstest mit dem löslichen Protein solS1S2Fc verwendet werden. In einem ähnlichen Bindungstest wurde von Schwegmann-Wessels auch das oben erwähnte muzinartige Protein detektiert, wobei anstatt lösliches Proteins gereinigtes TGEV eingesetzt wurde (Schwegmann-Wessels et al., 2002). Ein mutmaßlicher Bindungspartner des Fusionsproteins vom humanen respiratorischen Synzytialvirus (HRSV), das Hitzeschockprotein gp96, konnte ebenfalls auf diese Weise nachgewiesen werden (Goris, 2009).

Im Bindungstest mit löslichem S-Protein von TGEV konnte eine Bande von ca. 150 kDa nachgewiesen werden, die wahrscheinlich der porzinen APN entspricht. Eine weitere sehr schwache hochmolekulare Bande wurde auch detektiert. Diese Bande könnte das bereits erwähnte MGP darstellen (5.1.5). In dem Bindungstest von Schwegmann-Wessels wurde das TGE-Virus im Vorfeld stets mit Neuraminidase vorbehandelt, um die endständigen Sialinsäuren zu entfernen (Schwegmann-Wessels et al., 2002). Ohne vorherige Desialylierung konnte gereinigtes TGEV kein muzinartiges Protein binden, lediglich pAPN-Bindung konnte in abgeschwächter Form detektiert werden (Schwegmann-Wessels et al., 2003). Um die Intensität der schwachen hochmolekularen Bande, die durch das lösliche TGEV-S-Protein detektiert wurde, zu verstärken, müsste vielleicht auch das lösliche Protein mit Neuraminidase vorbehandelt werden. Durch die Neuraminidase-Behandlung würde das lösliche S-Protein mehrere freie Bindungsstellen besitzen, die für eine Bindung

mit den immobilisierten Proteinen verfügbar wären. Eine weitere Möglichkeit wäre die Erhöhung der Proteinmenge, die für den Bindungstest verwendet wurde. Allerdings war die Konzentration nicht bekannt, da die löslichen Proteine als konzentrierte Zellkulturüberstände angesetzt wurden, die auch weitere zelluläre Proteine enthielten. Aus Zeitgründen wurde dieser Bindungstest allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

6.1.3 Bindung der löslichen S-Proteine nach einer Behandlung mit Neuraminidase

Da in den bisherigen Bindungstests die Konzentration der Proteine nicht quantitativ bestimmt werden konnte, wurden die Fc-gekoppelten Konstrukte solS1S2Fc und solS1Fc mit Hilfe einer *FPLC* im Vorfeld gereinigt (5.1.6). Dadurch konnte im nachhinein die Konzentration der Proteine gemessen werden und es konnte bewerkstelligt werden, dass keine weiteren zellulären Proteine in der Lösung vorhanden sind. Die *FPLC*-gereinigten Proteine wurden für alle Bindungstests, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit durchgeführt wurden, verwendet. Zusätzlich wurde bei den Bindungstests eine Neuraminidase-Behandlung durchgeführt, um die Sialinsäuren von der Zelloberfläche zu entfernen. Auf diese Weise sollte analysiert werden, ob Sialinsäure-Bindungsaktivität eine Bedeutung für die Bindung der löslichen Proteine an die Zellen hat.

Als erstes wurde der Immunfluoreszenz-Bindungstest mit ST-Zellen, die pAPN endogen exprimieren, durchgeführt. Am Tag der Konfluenz wurden die Zellen mit Neuraminidase behandelt, um endständige Sialinsäurereste an der Zelloberfläche zu entfernen. Zuerst wurde vermutet, dass nach einer Neuraminidase-Behandlung der Zellen, die Bindung der löslichen Proteine abnimmt, da durch die Desialylierung weniger Sialinsäuren für eine Interaktion mit TGEV-S zur Verfügung stehen. Im Immunfluoreszenz-Bindungstest mit solS1Fc und solS1S2Fc konnte aber das Gegenteil bewiesen werden. Nach der NA-Behandlung wurde die Bindung an die Zellen nicht schwächer, vielmehr wurde sogar ein intensiveres Fluoreszenzsignal beobachtet (5.1.7).

Als Vergleich zu den ST-Zellen wurde im nächsten Versuch die IPI-2I-Zelllinie herangezogen. Da die Expression der endogenen pAPN bei diesen Zellen aber zu

niedrig war, wurde zusätzlich das pAPN-Expressionsplasmid in die Zellen transfiziert. Nach einer NA-Behandlung wurde der Immunfluoreszenz-Bindungstest mit solS1Fc und solS1S2Fc durchgeführt. Das Ergebnis der Bindung an ST-Zellen konnte bei den IPI-2I-Zellen bestätigt werden (5.1.8). Bei Zellen, die mit Neuraminidase vorbehandelt wurden, erscheint die Bindung intensiver zu sein. Es lässt sich dadurch erklären, dass erst durch Entfernen der Sialinsäuren, die pAPN für die löslichen Proteine zugänglich wird und die Proteine bindet. Wahrscheinlich blockieren die vorhandenen Sialinsäuren den Zugang zum Bindungsepitop auf der pAPN, wodurch eine optimale Interaktion verhindert wird.

Ein weiterer Nachweis der Bindung der löslichen Proteine besteht in einem Immunfluoreszenz-Bindungstest mit BHK-21- und HEK-293T Zellen (5.1.9, 5.1.10). Beide Zelllinien exprimieren keine pAPN, mussten also zunächst mit dem pAPN-Expressionsplasmid transfiziert werden. Um eventuelle Sialinsäure-Bindungsaktivität zu entdecken, wurde ein Teil der Zellen nicht mit pAPN-Expressionsplasmid transfiziert, sondern nur mit Neuraminidase vorbehandelt. Dadurch sollte eine mögliche Interaktion der löslichen Proteine solS1Fc und solS1S2Fc mit den Sialinsäuren identifiziert werden. Das Ergebnis hat aber gezeigt, dass bei nicht pAPN-exprimierenden Zellen sowohl ohne als auch mit NA-Behandlung keine Bindung demonstriert werden konnte. Dagegen bestätigten die pAPN-exprimierenden Zellen die zuvor aufgeführten Ergebnisse. Eine Vorbehandlung der Zellen mit Neuraminidase verursacht optische Zunahme der Bindung von löslichen S-Proteinen, im Vergleich zu Zellen, die nicht mit NA vorbehandelt worden waren.

Nach den durchgeführten Experimenten lag die Vermutung immer näher, dass die erzeugten löslichen S-Proteine nur eine der beiden Bindungsaktivitäten des nativen TGEV-S-Proteins wiedergeben. Dabei handelt es sich um die Bindungseigenschaft, die porcine APN zu erkennen. Interessant war das Verhalten der Proteine nach der Behandlung der Zellen mit Neuraminidase. Alle verwendeten Zelllinien zeigten die Tendenz, nach einer NA-Behandlung stärker an pAPN zu binden. Es liegt vermutlich daran, dass das Abspalten der Sialinsäuren die pAPN für das S-Protein besser zugänglich macht und so die Bindung verstärkt.

Für die quantitative Analyse der Bindung nach einer NA-Behandlung wurde mit den BHK-21-Zellen Durchflusszytometrie durchgeführt. Zunächst wurden BHK-21-Zellen mit pAPN transfiziert und anschließend wurde Neuraminidase zugegeben. Als Kontrolle dienten entweder Zellen die keine pAPN exprimieren oder die keiner Neuraminidase-Behandlung unterzogen wurden. Das Ergebnis des Immunfluoreszenz-Bindungstests mit den löslichen Proteinen solS1Fc und solS1S2Fc wurde auch hier bestätigt. Bei beiden löslichen Proteinen nimmt die Bindung nach NA-Behandlung der Zellen zu. Bei Zellen die nicht mit pAPN transfiziert wurden, konnte auch nach NA-Behandlung keine Bindung festgestellt werden.

6.1.4 Nachweis der Bindung im Erythrozyten-Bindungstest

Mit Hilfe des Erythrozyten-Bindungstests wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Dr. Christine Winter bereits gezeigt, dass das lösliche S-Protein (IBVS1Fc) vom infektiösen Bronchitis Virus (IBV), durch seine Sialinsäure-Bindungsaktivität an Hühnererythrozyten binden kann. Das infektiöse Bronchitis Virus besitzt durch die genannte Aktivität eine Hämagglutinationsfähigkeit (Schultze et al., 1992a). Ein Protein-Rezeptor analog der pAPN bei TGEV wurde bei IBV bislang noch nicht identifiziert, Sialinsäuren wird aber beim Viruseintritt in die Zelle eine wichtige Rolle zugeschrieben (Winter et al., 2006). Eine Inkubation des IBVS1Fc-Proteins mit 0,5%-1%- oder 5%iger Erythrozytenlösung mit anschließender Protein-A Präzipitation zeigten, dass durch eine steigende Menge von Erythrozyten eine steigende Menge von IBV-S präzipitiert wird und damit aus dem Überstand verschwindet. Um die Bindungsaktivität der löslichen Proteine von TGEV zu testen, bzw. die Fähigkeit an Sialinsäuren zu binden, auszuschließen, wurde ein Bindungstest mit Schweineerythrozyten durchgeführt (5.1.12). Dafür wurden solS1S2Fc oder TGEV-Virus mit 5%iger Erythrozytenlösung inkubiert und anschließend zentrifugiert. Durch den Zentrifugationsschritt wurden an Erythrozyten gebundene lösliche Proteine bzw. virales S-Protein pelletiert. Der Überstand wurde dann einer Protein-A Präzipitation unterzogen. Als Kontrolle diente die Inkubation des löslichen Proteins mit PBSM statt Erythrozyten bzw. des TGEV-Virus mit Erythrozyten.

Die Bindung des löslichen S-Proteins an Erythrozyten ließ sich erwartungsgemäß nicht nachweisen. Im Vergleich dazu konnte man nach Inkubation von TGEV mit 5%iger Schweinerythrozytenlösung und anschließender Präzipitation eine Abnahme der Bindung feststellen, die sich durch die Abnahme der Bandenintensität äußerte. Dies deutete auf eine Bindung von TGEV an Erythrozyten, die durch S-Protein vermittelt wurde. Dadurch wurde erneut demonstriert, dass das lösliche solS1S2Fc-Protein keine Sialinsäure-Bindungsaktivität besitzt, während das lösliche IBV-S-Protein Sialinsäuren an der Oberfläche der Hühnererythrozyten erkennt. Allerdings wurde der beschriebene Bindungstest mit löslichen TGEV-S-Proteinen aus Zeitgründen nur ein Mal durchgeführt. In zukünftigen Studien müsste der Versuch wiederholt werden, um das Ergebnis reproduzieren zu können. Interessant wäre auch eine Vorbehandlung der Erythrozyten mit Neuraminidase. Ebenfalls sollten die anderen löslichen Proteine solS1Fc und solS1S2Trim diesem Test unterzogen werden. Eine Vorbehandlung der löslichen Proteine mit Neuraminidase könnte auch von Bedeutung sein, da das an Erythrozyten gebundene TGE-Virus auch im Vorfeld mit NA behandelt wurde.

6.1.5 Nachweis der Bindung an Kryoschnitte vom Darmgewebe

Die Untersuchung der Bindung an Kryoschnitte bietet eine weitere Möglichkeit die Bindungsaktivität der löslichen Proteine von TGEV zu untersuchen. Diese Methode wurde gewählt, weil so die Strukturen des Darmgewebes erhalten blieben. Die Kryoschnitte wurden fixiert und mit gereinigten löslichen S-Proteinen von TGEV inkubiert. Die beiden löslichen Proteine konnten an die Zellen der Darmschleimhaut binden. Es erwies sich als schwierig die Zellen näher zu identifizieren, da sich die positive Färbung in den Randbereichen der Darmschleimhaut befand. Dabei könnte es sich um Enterozyten und Becherzellen des Dünndarmepithels handeln. Bei einer Infektion mit TGEV werden die Epithelzellen des Jejunums und Ileums infiziert, wobei sich das Virus von den Zottenspitzen auf die tiefer liegenden Epithelzellen ausbreitet. In den Zellen der Krypten wurde bislang keine TGEV-Infektion gefunden (Pensaert et al., 1970). Verwendet man für einen Bindungstest in Kryoschnitten von Darmgewebe gereinigtes TGE-Virus, bindet diese vorwiegend an Becherzellen des Darmepithels, die für die Produktion und Sekretion von Schleim verantwortlich sind (Schwegmann-Wessels et al., 2003). Versuche mit NA-behandeltem Darmgewebe belegen, dass die Bindung in den Becherzellbereichen nach NA-Behandlung

verschwindet, was die Sialinsäureabhängigkeit der Bindung in diesem Bereich zeigt (Schwegmann-Wessels et al., 2003). Das Ergebnis der positiven Bindung der löslichen Proteine in Kryoschnitten von Darmgewebe legt weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Art der Bindung nahe. Als erstes müsste überprüft werden, ob nach einer NA-Behandlung des Darmepithels, ähnlich wie bei vorangegangenen Untersuchungen während dieser Arbeit, zu einer stärkeren Bindung an Darmgewebe kommen würde. Weitere Möglichkeit wäre die NA-Behandlung der löslichen Proteine und die Auswirkung auf die Bindung.

Die fehlende Sialinsäure-Bindungsaktivität von löslichem TGEV-S ist überraschend, da bei löslichem S von IBV und bei löslichen Influenza-Hämagglutininen die Sialinsäure-Bindung erhalten bleibt. Das ursprüngliche Ziel, mit löslichem TGEV-S das muzinartige Glykoprotein zu isolieren und durch Sequenzierung zu identifizieren, ist jetzt nicht mehr erreichbar. Vielleicht bieten sich andere sialinsäure-bindende Proteine für diese Aufgabe an. Das IBV-S-Protein scheint kein so guter Kandidat, da es einerseits keine so hohe Bindungsaffinität zu Sialinsäure aufweist, andererseits erkennt es bevorzugt N-Acetyl-Neuraminsäure und nicht – wie TGEV-S-Protein – N-Glykolylnneuraminsäure. Ein vielversprechender Kandidat ist das lösliche Hämagglutinin von Schweine-Influenzaviren, da es neben einer höheren Bindungsaffinität auch über eine bevorzugte Erkennung von N-Glykolylnneuraminsäure verfügt.

6.2 Untersuchungen der rekombinanten TGE-Viren mit Mutationen im Retentionssignal von S-Protein

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass das TGEV-S-Protein nach seiner Synthese durch den verlangsamten Transport im Golgi Apparat nicht zur Oberfläche transportiert wird, sondern in diesem Kompartiment zurückbleibt (Vennema et al., 1990). Ein Tyrosin-haltiges Signal, das sich im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins befindet, verursacht die Zurückhaltung des Proteins (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Das Motiv, das aus den Aminosäuren YXX Φ besteht, hat eine wichtige Bedeutung für (i) die Proteinsortierung zur basolateralen Membran, (ii)

endozytotische Internalisierung bzw. (iii) die intrazelluläre Retention. Es ist bei einer Vielzahl von Proteinen enthalten, die über den sekretorischen Weg in der Zelle sortiert werden (Mallabiabarrena et al., 1995). In einer Veröffentlichung von Schwegmann-Wessels wurde das Transportverhalten von TGEV-S-Protein mit dem des SARS-S-Protein verglichen (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Das letztere Protein besitzt kein Tyrosin-haltiges Signal und wird schließlich auch zur Oberfläche transportiert. Ein weiterer Vertreter der Familie *Coronaviridae* das infektiöse Bronchitis Virus (IBV), ist wiederum ähnlich wie TGEV durch das Vorkommen eines Tyrosin-haltigen Retentionssignals gekennzeichnet (Winter et al., 2008).

Untersuchungen von Paul belegen, dass ein Methionin an Position 1445 im zytoplasmatischen Abschnitt des TGEV-S-Proteins das Retentionssignal außer Kraft setzt, obwohl das oben erwähnte Motiv noch vorhanden ist (Paul, 2005). Nach dem Transport zur Zelloberfläche fungiert das YEPI-Motiv als Endozytose-Signal, so dass das S-Protein internalisiert wird und in Endosomen nachzuweisen ist.

6.2.1 Erzeugung rekombinanter TGE-Viren

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der BAC-Technologie rekombinante TGE-Viren generiert, die Aminosäure-Mutationen innerhalb des Retentionssignals aufweisen (5.2.1). Die Mutanten rTGEVS_YI/AA und rTGEVS_del10 wurden ausgewählt, weil aus Einzelexpressionsstudien bekannt war, dass die betreffenden S-Proteine über kein funktionsfähiges Retentionssignal verfügen und folglich zur Oberfläche transportiert werden. Außerdem sollte die TGEVS_K/M Mutante erzeugt werden, die dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Methionin statt Lysin an Position 1445 im TGEV-S-Protein das Retentionssignal außer Kraft setzt. Wegen dieses interessanten Phänotyps sollte die K/M-Mutation auch im Kontext eines rekombinanten Virus analysiert werden.

Die Klonierarbeiten zur Erzeugung der rekombinanten Viren erwiesen sich als sehr schwierig. Das TGEV Genom stand als cDNA (pBACTGEVSC11FL) zur Verfügung und sollte zur Erzeugung der oben erwähnten Mutanten verwendet werden. Nach einem Restriktionsverdau des BAC-Vektors und des Inserts, anschließender Ligation und Elektroporation konnten anfänglich keine Kolonien auf den LB-Platten gefunden werden, obwohl die Ligation in der Kontroll-Kolonie-PCR positiv war. Die

Schwierigkeiten lagen wahrscheinlich in der Menge des TGEV-Genom-haltigen BAC-Vektors. Nachdem die Konzentration der cDNA, die für die Ligation verwendet wurde, erhöht wurde, hat man nach der Elektroporation genügend Kolonien für die anschließende Kolonie-PCR erhalten. Nachdem die BAC-Vektoren in Bakterien vermehrt worden waren, wurde die BAC-DNA zum Sequenzieren geschickt, um die eingeführten Mutationen in der Sequenz zu kontrollieren. Als Positiv-Kontrolle der Klonierungsstrategie diente die rTGEVS-Kontrolle, bei der durch Klonieren keine Mutation eingeführt wurde, sondern das ausgeschnittene Stück mit dem gleichen aus dem pSLTR3a-Vektor stammenden Stück ohne Mutation ersetzt wurde.

Das Klonieren der rTGEVS_K/M-Mutante brachte weitere Hindernisse mit sich. Die genannte Mutante wurde während dieser Doktorarbeit nicht fertig gestellt. Nach der Vermehrung der BAC-DNA in Bakterien stand nicht genügend DNA zur Verfügung, um diese sequenzieren zu lassen. Vermutlich führte das Einführen der Mutation zur Beeinträchtigung des Wachstums in Bakterien. Durch Erhöhung der Menge an Medium könnte vielleicht das Problem umgegangen werden. Es ist in naher Zukunft geplant das Klonieren der rTGEVS_K/M-Mutante zu wiederholen.

Nachdem die Klonierarbeiten fertig waren, wurde die Replikationskompetenz der rekombinanten Virusmutanten getestet (5.2.2). Bei *virus rescue*-Experimenten wurden BHK-21-Zellen mit der klonierten cDNAs transfiziert und nach einer Inkubation von drei Tagen mit den ST-Zellen gemischt. Die Verwendung von ST-Zellen war notwendig, da sie im Gegensatz zu BHK-21-Zellen den zellulären Rezeptor die pAPN exprimieren, während sie sich nur mit geringerer Effizienz transfizieren lassen.

Der Immunperoxidase-Test zeigte, dass nur Zellen, die mit dem TGEVS-wt oder rTGEVSwT-Kontrolle inbubiert wurden, infiziert waren. Die Virusmutanten waren nicht in der Lage, die ST-Zellen zu infizieren. Das Ergebnis wurde im Immunfluoreszenztest noch mal bestätigt. Bei Viren, die Mutationen im Retentionssignal oder eine Deletion im carboxyterminalen Abschnitt der zytoplasmatischen Domäne enthalten, wurde keine nachweisbare Infektion festgestellt. Dieses Ergebnis ähnelt vergleichbaren Versuchen mit IBV, bei dem es auch nicht gelungen ist, gentechnologisch veränderte Viren mit einem Austausch des

Tyrosins im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins zu erzeugen (Youn et al., 2005a).

6.2.2 Untersuchungen zur Komplementation der rekombinanten Viren mit Wildtyp-S, S_K/M, S_YI/AA und S_del10

Da die erzeugten Viren keine nachweisbare Infektion verursachten, musste eine andere Strategie gefunden werden, die die Bedeutung des Retentionssignals für die virale Replikation verdeutlichte. Bei den *virus rescue*-Experimenten wurde nicht nur die mutierte virale cDNA in die Zellen transfiziert, sondern zusätzlich ein Expressionsplasmid, das das Wildtyp-S-, S_K/M-, S_YI/AA- oder S_del10-Protein exprimiert. Zunächst wurde das mit dem Wildtyp-S-Protein komplementierte Virus geerntet und auf neue ST-Zellen gegeben (5.2.3). Im darauf folgenden Immunfluoreszenztest wurde die Vermutung bestätigt, dass das Retentionssignal im S-Protein eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation spielt. Das Wildtyp-S-Protein, das über das Begleitplasmid exprimiert und im Zytoplasma zurückgehalten wurde, konnte das fehlende mutierte S-Protein ersetzen und somit zur Bildung von rekombinanten Viren beitragen.

Weiterhin wurde der Komplementationstest mit dem S_K/M-Protein, das im Begleitplasmid vorlag, durchgeführt (5.2.4). Da das Einführen der K/M-Mutation im S-Protein den Transport des Proteins zur Oberfläche mit anschließender Endozytose verursacht, wurde untersucht, ob die Expression dieses Proteins den Defekt der Virusmutanten rTGEVS_YI/AA bzw. rTGEVS_del10 ersetzen und somit zur Viruserzeugung beitragen kann. Diese Vermutung konnte tatsächlich bestätigt werden, da die Expression des S_K/M Proteins das im TGEV-Genom mutierte-S-Protein ersetzen und eine Infektion von ST-Zellen verursachen kann. Wahrscheinlich kam es zur Endozytose des S_K/M-Proteins, wodurch das Protein intrazellulär vorlag und das defekte S-Protein in den rekombinanten Viren rTGEVS_YI/AA bzw. rTGEVS_del10 ersetzen konnte.

Des Weiteren wurden die erzeugten mutierten Viren mit homologen Proteinmutanten komplementiert, d.h. zusätzlich mit pCG1S_YI/AA oder pCG1S_del10 transfiziert (5.2.5). Die Überexpression der mutierten S-Proteine konnte aber nicht dazu beitragen, dass replikationsfähige Viren entstehen. Wurde einmal das

Retentionssignal im TGEV-S-Protein mutiert oder deletiert, wurden als Folge die Proteine zur Oberfläche transportiert. Somit fehlten sie am Ort des Viruszusammenbaus und als Konsequenz konnten keine Viruspartikel gebildet werden.

Da in den Komplementationsversuchen die Wildtyp-S- und S_K/M-Expressionsplasmide nur transient in die Zellen transfiziert wurden, kam es zur zeitlich begrenzten Expression der Proteine. Es wurde vermutet, dass bei der nächsten Viruspassage keine Replikation mehr stattfinden kann, da keine Proteine mehr *in trans* zur Verfügung stehen. Das nächste Experiment bestätigte diese Vermutung, da die mutierten rekombinanten Viren neue ST-Zellen nicht mehr infizieren konnten.

6.2.3 Bedeutung des Retentionssignals für die Replikation von TGEV

Durch das Tyrosin-haltige Signal, das im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins von TGEV zu finden ist, wird die intrazelluläre Zurückhaltung des Proteins bewirkt (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Die Aminosäurefolge 1440YEPI1443 im S-Protein von TGEV entspricht der Konsensussequenz YXX Φ und wurde als Sortierungssignal bei einer Vielzahl von Proteinen identifiziert. Bei der CD3 ϵ -Untereinheit des T-Zellrezeptors führt das Tyrosin-haltige Signal, ähnlich wie bei TGEV-S, zu einer intrazellulären Retention der CD3 ϵ -Untereinheit (Mallabiabarrena et al., 1995). Das S-Protein von infektiösem Bronchitis Virus (IBV), das dem Genus *Gammacoronavirus* zugeordnet wird, weist im zytoplasmatischen Abschnitt ein ähnliches Tyrosin-haltiges Signal auf (Winter et al., 2008). Das Motiv wird für die Retention des IBV-S-Proteins im Golgi-Kompartiment verantwortlich gemacht. Im Unterschied zu dem IBV-S-Protein wird das TGEV-S-Protein im prä-Golgi-Kompartimenten zurückgehalten, wie die Experimente nach einer Behandlung mit Endoglykosidase-H belegen (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Das TGEV-S-Protein enthält nur Endoglykosidase-H sensitive Glykane, da es durch die Retention im intermediären Kompartiment zwischen ER und Golgi-Apparat (ERGIC) nicht der komplexen Glykosylierung unterzogen wird (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Im zytoplasmatischen Abschnitt von SARS-CoV-S-Protein wurde kein Tyrosin-haltiges Retentionssignal identifiziert und als Folge wird das Protein zur Oberfläche transportiert (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Da der Knospungsprozess bei den

Coronaviren am ERGIC stattfindet, ist es sinnvoll die viralen Proteine an diesem Ort zurückzuhalten. Auch die M- und E-Proteine werden nicht zur Oberfläche transportiert, sondern in subzellulären Kompartimenten zurückgehalten (Machamer et al., 1990; Krijnse-Locker et al., 1994). Außerdem bietet die zelluläre Retention dem Virus den Vorteil, dass zelluläre Abwehrmechanismen erst später im Infektionsverlauf aktiviert werden.

Einzelexpressionsstudien von Paul haben gezeigt dass ein Methionin an Position 1445 im TGEV-S-Protein das Retentionssignal außer Kraft setzt, obwohl das Motiv noch vorhanden ist. Durch die Inaktivierung des Retentionssignals kommt es zum Transport des Proteins zur Zelloberfläche mit anschließender Internalisierung des Proteins (Paul, 2005).

Die beschriebenen Ergebnisse von Paul, Schwegmann-Wessels und Winter wurden ausschließlich durch Einzelexpressionsstudien gewonnen (Schwegmann-Wessels et al., 2004; Paul, 2005; Winter et al., 2008). Deshalb war es von Bedeutung die Ergebnisse im Rahmen einer Infektion zu reproduzieren. Mit Hilfe der cDNA, die das gesamte TGEV-Genom enthält, war es möglich, Mutationen oder Deletionen in das Retentionssignal einzuführen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung des Retentionssignals für die Replikation bewiesen werden. Wird das Tyrosin-Motiv durch Einführen von Mutationen oder Deletionen inaktiviert, steht kein funktionsfähiges S-Protein zur Verfügung und folglich werden keine Viruspartikel gebildet. Komplementiert man das mutierte S-Protein mit Wildtyp-S-Protein, kommt es zur Ausbildung replikationsfähigen Viren. Interessant ist das Verhalten der oben beschriebenen S_{K/M}-Mutante. Durch ihre Fähigkeit, Endozytose zu bewirken, war sie in der Lage, das defekte S-Protein in TGEV zu ersetzen, was sich durch Zusammenbau der rekombinanten Viren und Infektion der Zellen äußerte. Es ist geplant das Klonieren der rTGEVS_{K/M}-Mutante fertig zu stellen, um das Verhalten im Kontext einer Virusinfektion zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

- Almazan, F., M. L. Dediego, C. Galan, D. Escors, E. Alvarez, J. Ortego, I. Sola, S. Zuniga, S. Alonso, J. L. Moreno, A. Nogales, C. Capiscol and L. Enjuanes (2006). "Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis." *J Virol* **80**: 10900-6.
- Almazan, F., C. Galan and L. Enjuanes (2004). "The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication." *J Virol* **78**: 12683-8.
- Almazan, F., J. M. Gonzalez, Z. Penzes, A. Izeta, E. Calvo, J. Plana-Duran and L. Enjuanes (2000). "Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5516-21.
- Aynaud, J. M., S. Bernard, E. Bottreau, I. Lantier, H. Salmon and P. Vannier (1991). "Induction of lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis virus of swine using an attenuated coronavirus mutant able to survive in the physicochemical environment of the digestive tract." *Vet Microbiol* **26**: 227-39.
- Babcock, G. J., D. J. Eshaki, W. D. Thomas, Jr. and D. M. Ambrosino (2004). "Amino acids 270 to 510 of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein are required for interaction with receptor." *J Virol* **78**: 4552-60.
- Ballesteros, M. L., C. M. Sanchez and L. Enjuanes (1997). "Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism." *Virology* **227**: 378-88.
- Baric, R. S., G. W. Nelson, J. O. Fleming, R. J. Deans, J. G. Keck, N. Casteel and S. A. Stohlman (1988). "Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription." *J Virol* **62**: 4280-7.
- Benbacer, L., E. Kut, L. Besnardeau, H. Laude and B. Delmas (1997). "Interspecies aminopeptidase-N chimeras reveal species-specific receptor recognition by canine coronavirus, feline infectious peritonitis virus, and transmissible gastroenteritis virus." *J Virol* **71**: 734-7.
- Berger, A., C. Drosten, H. W. Doerr, M. Sturmer and W. Preiser (2004). "Severe acute respiratory syndrome (SARS)--paradigm of an emerging viral infection." *J Clin Virol* **29**: 13-22.
- Bernard, S. and H. Laude (1995). "Site-specific alteration of transmissible gastroenteritis virus spike protein results in markedly reduced pathogenicity." *J Gen Virol* **76**: 2235-41.
- Bingham, R. W., M. H. Madge and D. A. Tyrrell (1975). "Haemagglutination by avian infectious bronchitis virus-a coronavirus." *J Gen Virol* **28**: 381-90.
- Bonifacino, J. S. and E. C. Dell'Angelica (1999). "Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals." *J Cell Biol* **145**: 923-6.
- Bosch, B. J., R. van der Zee, C. A. de Haan and P. J. Rottier (2003). "The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex." *J Virol* **77**: 8801-11.
- Britton, P., S. Evans, B. Dove, M. Davies, R. Casais and D. Cavanagh (2005). "Generation of a recombinant avian coronavirus infectious bronchitis virus using transient dominant selection." *J Virol Methods* **123**: 203-11.
- Callebaut, P., I. Correa, M. Pensaert, G. Jimenez and L. Enjuanes (1988). "Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus." *J Gen Virol* **69**: 1725-30.

- Casais, R., V. Thiel, S. G. Siddell, D. Cavanagh and P. Britton (2001). "Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus." *J Virol* **75**: 12359-69.
- Cathomen, T., C. J. Buchholz, P. Spielhofer and R. Cattaneo (1995). "Preferential initiation at the second AUG of the measles virus F mRNA: a role for the long untranslated region." *Virology* **214**: 628-32.
- Cavanagh, D. (1997). "Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae." *Arch Virol* **142**: 629-33.
- Cavanagh, D. and M. C. Horzinek (1993). "Genus Torovirus assigned to the Coronaviridae." *Arch Virol* **128**: 395-6.
- Cox, E., M. B. Pensaert, P. Callebaut and K. van Deun (1990). "Intestinal replication of a porcine respiratory coronavirus closely related antigenically to the enteric transmissible gastroenteritis virus." *Vet Microbiol* **23**: 237-43.
- Davies, H. A., R. R. Dourmashkin and M. R. Macnaughton (1981). "Ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis virus." *J Gen Virol* **53**: 67-74.
- de Groot, R. J. (2006). "Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses." *Glycoconj J* **23**: 59-72.
- de Groot, R. J., W. Luytjes, M. C. Horzinek, B. A. van der Zeijst, W. J. Spaan and J. A. Lenstra (1987). "Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses." *J Mol Biol* **196**: 963-6.
- de Haan, C. A., H. Volders, C. A. Koetzner, P. S. Masters and P. J. Rottier (2002). "Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization." *J Virol* **76**: 12491-502.
- Delmas, B., J. Gelfi, E. Kut, H. Sjostrom, O. Noren and H. Laude (1994). "Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site." *J Virol* **68**: 5216-24.
- Delmas, B., J. Gelfi, R. L'Haridon, L. K. Vogel, H. Sjostrom, O. Noren and H. Laude (1992). "Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV." *Nature* **357**: 417-20.
- Delmas, B., J. Gelfi and H. Laude (1986). "Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein." *J Gen Virol* **67**: 1405-18.
- Delmas, B. and H. Laude (1990a). "Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression." *J Virol* **64**: 5367-75.
- Delmas, B., D. Rasschaert, M. Godet, J. Gelfi and H. Laude (1990b). "Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S." *J Gen Virol* **71**: 1313-23.
- Dong, X., B. An, L. Salvucci Kierstead, W. J. Storkus, A. A. Amoscato and R. D. Salter (2000). "Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells." *J Immunol* **164**: 129-35.
- Donoghue, M., F. Hsieh, E. Baronas, K. Godbout, M. Gosselin, N. Stagliano, M. Donovan, B. Woolf, K. Robison, R. Jeyaseelan, R. E. Breitbart and S. Acton (2000). "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." *Circ Res* **87**: E1-9.
- Doyle, L. P. and L. M. Hutchings (1946). "A transmissible gastroenteritis in pigs." *J Am Vet Med Assoc* **108**: 257-9.
- Drosten, C., S. Gunther, W. Preiser, S. van der Werf, H. R. Brodt, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolesnikova, R. A. Fouchier, A. Berger, A. M. Burguiere, J. Cinatl, M. Eickmann, N. Escriou, K. Grywna, S. Kramme, J. C. Manuguerra, S. Muller, V. Rickerts, M. Sturmer, S. Vieth, H. D. Klenk, A. D. Osterhaus, H. Schmitz and H. W.

- Doerr (2003). "Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome." *N Engl J Med* **348**: 1967-76.
- Dveksler, G. S., C. W. Dieffenbach, C. B. Cardellichio, K. McCuaig, M. N. Pensiero, G. S. Jiang, N. Beauchemin and K. V. Holmes (1993). "Several members of the mouse carcinoembryonic antigen-related glycoprotein family are functional receptors for the coronavirus mouse hepatitis virus-A59." *J Virol* **67**: 1-8.
- Dveksler, G. S., M. N. Pensiero, C. B. Cardellichio, R. K. Williams, G. S. Jiang, K. V. Holmes and C. W. Dieffenbach (1991). "Cloning of the mouse hepatitis virus (MHV) receptor: expression in human and hamster cell lines confers susceptibility to MHV." *J Virol* **65**: 6881-91.
- Enjuanes, L., I. Sola, F. Almazan, J. Ortego, A. Izeta, J. M. Gonzalez, S. Alonso, J. M. Sanchez, D. Escors, E. Calvo, C. Riquelme and C. Sanchez (2001). "Coronavirus derived expression systems." *J Biotechnol* **88**: 183-204.
- Enjuanes, L., I. Sola, S. Alonso, D. Escors and S. Zuniga (2005). "Coronavirus reverse genetics and development of vectors for gene expression." *Curr Top Microbiol Immunol* **287**: 161-97.
- Escors, D., E. Camafeita, J. Ortego, H. Laude and L. Enjuanes (2001a). "Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core." *J Virol* **75**: 12228-40.
- Escors, D., J. Ortego, H. Laude and L. Enjuanes (2001b). "The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability." *J Virol* **75**: 1312-24.
- Fernandes, J., D. Tang, G. Leone and P. W. Lee (1994). "Binding of reovirus to receptor leads to conformational changes in viral capsid proteins that are reversible upon virus detachment." *J Biol Chem* **269**: 17043-7.
- Gebauer, F., W. P. Posthumus, I. Correa, C. Sune, C. Smerdou, C. M. Sanchez, J. A. Lenstra, R. H. Melen and L. Enjuanes (1991). "Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis coronavirus S glycoprotein." *Virology* **183**: 225-38.
- Godet, M., R. L'Haridon, J. F. Vautherot and H. Laude (1992). "TGEV corona virus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions." *Virology* **188**: 666-75.
- Gonzalez, J. M., P. Gomez-Puertas, D. Cavanagh, A. E. Gorbalenya and L. Enjuanes (2003). "A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae." *Arch Virol* **148**: 2207-35.
- Gorbalenya, A. E., E. J. Snijder and W. J. Spaan (2004). "Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus." *J Virol* **78**: 7863-6.
- Goris, K. (2009). Interaktion des respiratorischen Synzytialvirus mit primären Lungenepithelzellen.
- Gottschalk, A. (1958). "The influenza virus neuraminidase." *Nature* **181**: 377-8.
- Haijema, B. J., H. Volders and P. J. Rottier (2003). "Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome." *J Virol* **77**: 4528-38.
- Haijema, B. J., H. Volders and P. J. Rottier (2004). "Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis." *J Virol* **78**: 3863-71.
- Harbury, P. B., T. Zhang, P. S. Kim and T. Alber (1993). "A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants." *Science* **262**: 1401-7.
- Hofmann, H., K. Pyrc, L. van der Hoek, M. Geier, B. Berkhout and S. Pohlmann (2005). "Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7988-93.
- Jackwood, D. J., I. Bae, R. J. Jackwood and L. J. Saif (1993). "Transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus: molecular characterization of the S gene using cDNA probes and nucleotide sequence analysis." *Adv Exp Med Biol* **342**: 43-8.

- Jimenez, G., I. Correa, M. P. Melgosa, M. J. Bullido and L. Enjuanes (1986). "Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization." *J Virol* **60**: 131-9.
- Keen, J. H. (1987). "Clathrin assembly proteins: affinity purification and a model for coat assembly." *J Cell Biol* **105**: 1989-98.
- Kim, K. H., K. Narayanan and S. Makino (1997). "Assembled coronavirus from complementation of two defective interfering RNAs." *J Virol* **71**: 3922-31.
- Klumperman, J., J. K. Locker, A. Meijer, M. C. Horzinek, H. J. Geuze and P. J. Rottier (1994). "Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding." *J Virol* **68**: 6523-34.
- Koetzner, C. A., M. M. Parker, C. S. Ricard, L. S. Sturman and P. S. Masters (1992). "Repair and mutagenesis of the genome of a deletion mutant of the coronavirus mouse hepatitis virus by targeted RNA recombination." *J Virol* **66**: 1841-8.
- Kolb, A. F., A. Hegyi and S. G. Siddell (1997). "Identification of residues critical for the human coronavirus 229E receptor function of human aminopeptidase N." *J Gen Virol* **78**: 2795-802.
- Kreml, C., M. L. Ballesteros, G. Zimmer, L. Enjuanes, H. D. Klenk and G. Herrler (2000). "Characterization of the sialic acid binding activity of transmissible gastroenteritis coronavirus by analysis of haemagglutination-deficient mutants." *J Gen Virol* **81**: 489-96.
- Kreml, C., B. Schultze, H. Laude and G. Herrler (1997). "Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus." *J Virol* **71**: 3285-7.
- Krijnse-Locker, J., M. Ericsson, P. J. Rottier and G. Griffiths (1994). "Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step." *J Cell Biol* **124**: 55-70.
- Kubo, H., Y. K. Yamada and F. Taguchi (1994). "Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein." *J Virol* **68**: 5403-10.
- Kuo, L., G. J. Godeke, M. J. Raamsman, P. S. Masters and P. J. Rottier (2000). "Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier." *J Virol* **74**: 1393-406.
- Lai, M. M. and D. Cavanagh (1997). "The molecular biology of coronaviruses." *Adv Virus Res* **48**: 1-100.
- Laude, H., D. Rasschaert, B. Delmas, M. Godet, J. Gelfi and B. Charley (1990). "Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus." *Vet Microbiol* **23**: 147-54.
- Li, W., M. J. Moore, N. Vasilieva, J. Sui, S. K. Wong, M. A. Berne, M. Somasundaran, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, T. C. Greenough, H. Choe and M. Farzan (2003). "Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus." *Nature* **426**: 450-4.
- Li, W., C. Zhang, J. Sui, J. H. Kuhn, M. J. Moore, S. Luo, S. K. Wong, I. C. Huang, K. Xu, N. Vasilieva, A. Murakami, Y. He, W. A. Marasco, Y. Guan, H. Choe and M. Farzan (2005). "Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2." *Embo J* **24**: 1634-43.
- Lim, K. P. and D. X. Liu (2001). "The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins." *J Biol Chem* **276**: 17515-23.
- Look, A. T., R. A. Ashmun, L. H. Shapiro and S. C. Peiper (1989). "Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N." *J Clin Invest* **83**: 1299-307.

- Machamer, C. E., S. A. Mentone, J. K. Rose and M. G. Farquhar (1990). "The E1 glycoprotein of an avian coronavirus is targeted to the cis Golgi complex." Proc Natl Acad Sci U S A **87**: 6944-8.
- Mallabiabarrena, A., M. A. Jimenez, M. Rico and B. Alarcon (1995). "A tyrosine-containing motif mediates ER retention of CD3-epsilon and adopts a helix-turn structure." Embo J **14**: 2257-68.
- Masters, P. S. (1999). "Reverse genetics of the largest RNA viruses." Adv Virus Res **53**: 245-64.
- Masters, P. S. and P. J. Rottier (2005). "Coronavirus reverse genetics by targeted RNA recombination." Curr Top Microbiol Immunol **287**: 133-59.
- Noda, M., F. Koide, M. Asagi and Y. Inaba (1988). "Physicochemical properties of transmissible gastroenteritis virus hemagglutinin." Arch Virol **99**: 163-72.
- Noda, M., H. Yamashita, F. Koide, K. Kadoi, T. Omori, M. Asagi and Y. Inaba (1987). "Hemagglutination with transmissible gastroenteritis virus." Arch Virol **96**: 109-15.
- Ortego, J., D. Escors, H. Laude and L. Enjuanes (2002). "Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome." J Virol **76**: 11518-29.
- Owen, D. J. and P. R. Evans (1998). "A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals." Science **282**: 1327-32.
- Paul, A. (2005). Charakterisierung des intrazellulären Transports des Spike-Proteins des Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine.
- Pensaert, M., P. Callebaut and J. Vergote (1986). "Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis." Vet Q **8**: 257-61.
- Pensaert, M., E. O. Haelterman and T. Burnstein (1970). "Transmissible gastroenteritis of swine: virus-intestinal cell interactions. I. Immunofluorescence, histopathology and virus production in the small intestine through the course of infection." Arch Gesamte Virusforsch **31**: 321-34.
- Rasschaert, D., M. Duarte and H. Laude (1990). "Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions." J Gen Virol **71**: 2599-607.
- Riemann, D., A. Kehlen and J. Langner (1999). "CD13--not just a marker in leukemia typing." Immunol Today **20**: 83-8.
- Risco, C., I. M. Anton, L. Enjuanes and J. L. Carrascosa (1996). "The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins." J Virol **70**: 4773-7.
- Risco, C., I. M. Anton, M. Muntion, J. M. Gonzalez, J. L. Carrascosa and L. Enjuanes (1998). "Structure and intracellular assembly of the transmissible gastroenteritis coronavirus." Adv Exp Med Biol **440**: 341-6.
- Rogers, G. N., G. Herrler, J. C. Paulson and H. D. Klenk (1986). "Influenza C virus uses 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid as a high affinity receptor determinant for attachment to cells." J Biol Chem **261**: 5947-51.
- Rolsma, M. D., H. B. Gelberg and M. S. Kuhlenschmidt (1994). "Assay for evaluation of rotavirus-cell interactions: identification of an enterocyte ganglioside fraction that mediates group A porcine rotavirus recognition." J Virol **68**: 258-68.
- Sanchez, C. M., F. Gebauer, C. Sune, A. Mendez, J. Dopazo and L. Enjuanes (1992). "Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses." Virology **190**: 92-105.
- Sanchez, C. M., A. Izeta, J. M. Sanchez-Morgado, S. Alonso, I. Sola, M. Balasch, J. Planaduran and L. Enjuanes (1999). "Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence." J Virol **73**: 7607-18.

- Schultze, B., D. Cavanagh and G. Herrler (1992a). "Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes." *Virology* **189**: 792-4.
- Schultze, B., L. Enjuanes, D. Cavanagh and G. Herrler (1993). "N-acetylneuraminic acid plays a critical role for the haemagglutinating activity of avian infectious bronchitis virus and porcine transmissible gastroenteritis virus." *Adv Exp Med Biol* **342**: 305-10.
- Schultze, B., H. J. Gross, R. Brossmer and G. Herrler (1991a). "The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant." *J Virol* **65**: 6232-7.
- Schultze, B., H. J. Gross, R. Brossmer, H. D. Klenk and G. Herrler (1990). "Hemagglutinating encephalomyelitis virus attaches to N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid-containing receptors on erythrocytes: comparison with bovine coronavirus and influenza C virus." *Virus Res* **16**: 185-94.
- Schultze, B. and G. Herrler (1992b). "Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells." *J Gen Virol* **73**: 901-6.
- Schultze, B., C. Krempl, M. L. Ballesteros, L. Shaw, R. Schauer, L. Enjuanes and G. Herrler (1996). "Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity." *J Virol* **70**: 5634-7.
- Schultze, B., K. Wahn, H. D. Klenk and G. Herrler (1991b). "Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity." *Virology* **180**: 221-8.
- Schwegmann-Wessels, C., M. Al-Falah, D. Escors, Z. Wang, G. Zimmer, H. Deng, L. Enjuanes, H. Y. Naim and G. Herrler (2004). "A novel sorting signal for intracellular localization is present in the S protein of a porcine coronavirus but absent from severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus." *J Biol Chem* **279**: 43661-6.
- Schwegmann-Wessels, C. and G. Herrler (2006). "Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses." *Glycoconj J* **23**: 51-8.
- Schwegmann-Wessels, C., G. Zimmer, H. Laude, L. Enjuanes and G. Herrler (2002). "Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus to cell surface sialoglycoproteins." *J Virol* **76**: 6037-43.
- Schwegmann-Wessels, C., G. Zimmer, B. Schroder, G. Breves and G. Herrler (2003). "Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus to brush border membrane sialoglycoproteins." *J Virol* **77**: 11846-8.
- Sestak, K., I. Lanza, S. K. Park, P. A. Weilnau and L. J. Saif (1996). "Contribution of passive immunity to porcine respiratory coronavirus to protection against transmissible gastroenteritis virus challenge exposure in suckling pigs." *Am J Vet Res* **57**: 664-71.
- Siddell, S. G., R. Anderson, D. Cavanagh, K. Fujiwara, H. D. Klenk, M. R. Macnaughton, M. Pensaert, S. A. Stohman, L. Sturman and B. A. van der Zeijst (1983). "Coronaviridae." *Intervirology* **20**: 181-9.
- Smith, M. K., S. Tusell, E. A. Travanty, B. Berkhout, L. van der Hoek and K. V. Holmes (2006). "Human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a receptor for human respiratory coronavirus NL63." *Adv Exp Med Biol* **581**: 285-8.
- St-Jean, J. R., M. Desforges, F. Almazan, H. Jacomy, L. Enjuanes and P. J. Talbot (2006). "Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone." *J Virol* **80**: 3670-4.
- Stohman, S. A., R. S. Baric, G. N. Nelson, L. H. Soe, L. M. Welter and R. J. Deans (1988). "Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein." *J Virol* **62**: 4288-95.

- Suzuki, H. and F. Taguchi (1996). "Analysis of the receptor-binding site of murine coronavirus spike protein." *J Virol* **70**: 2632-6.
- Suzuki, Y., T. Suzuki, M. Matsunaga and M. Matsumoto (1985). "Gangliosides as paramyxovirus receptor. Structural requirement of sialo-oligosaccharides in receptors for hemagglutinating virus of Japan (Sendai virus) and Newcastle disease virus." *J Biochem* **97**: 1189-99.
- Thiel, V., J. Herold, B. Schelle and S. G. Siddell (2001a). "Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus." *J Gen Virol* **82**: 1273-81.
- Thiel, V., J. Herold, B. Schelle and S. G. Siddell (2001b). "Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription." *J Virol* **75**: 6676-81.
- Thiel, V., N. Karl, B. Schelle, P. Disterer, I. Klagge and S. G. Siddell (2003). "Multigene RNA vector based on coronavirus transcription." *J Virol* **77**: 9790-8.
- Tresnan, D. B., R. Levis and K. V. Holmes (1996). "Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I." *J Virol* **70**: 8669-74.
- Tyrrell, D. A., J. D. Almeida, C. H. Cunningham, W. R. Dowdle, M. S. Hofstad, K. McIntosh, M. Tajima, L. Y. Zakstelskaya, B. C. Easterday, A. Kapikian and R. W. Bingham (1975). "Coronaviridae." *Intervirology* **5**: 76-82.
- Vennema, H., G. J. Godeke, J. W. Rossen, W. F. Voorhout, M. C. Horzinek, D. J. Opstelten and P. J. Rottier (1996). "Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes." *Embo J* **15**: 2020-8.
- Vennema, H., L. Heijnen, A. Zijderveld, M. C. Horzinek and W. J. Spaan (1990). "Intracellular transport of recombinant coronavirus spike proteins: implications for virus assembly." *J Virol* **64**: 339-46.
- Vlasak, R., W. Luytjes, J. Leider, W. Spaan and P. Palese (1988a). "The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylsterase activity." *J Virol* **62**: 4686-90.
- Vlasak, R., W. Luytjes, W. Spaan and P. Palese (1988b). "Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4526-9.
- Warner, F. J., A. I. Smith, N. M. Hooper and A. J. Turner (2004). "Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective." *Cell Mol Life Sci* **61**: 2704-13.
- Wege, H. (1995). "Immunopathological aspects of coronavirus infections." *Springer Semin Immunopathol* **17**: 133-48.
- Williams, R. K., G. S. Jiang and K. V. Holmes (1991). "Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5533-6.
- Winter, C., C. Schwegmann-Wessels, D. Cavanagh, U. Neumann and G. Herrler (2006). "Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian Infectious bronchitis virus." *J Gen Virol* **87**: 1209-16.
- Winter, C., C. Schwegmann-Wessels, U. Neumann and G. Herrler (2008). "The spike protein of infectious bronchitis virus is retained intracellularly by a tyrosine motif." *J Virol* **82**: 2765-71.
- Woo, P. C., S. K. Lau, Y. Huang and K. Y. Yuen (2009). "Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping." *Exp Biol Med (Maywood)* **234**: 1117-27.
- Yang, X., L. Florin, M. Farzan, P. Kolchinsky, P. D. Kwong, J. Sodroski and R. Wyatt (2000). "Modifications that stabilize human immunodeficiency virus envelope glycoprotein trimers in solution." *J Virol* **74**: 4746-54.
- Yang, X., J. Lee, E. M. Mahony, P. D. Kwong, R. Wyatt and J. Sodroski (2002). "Highly stable trimers formed by human immunodeficiency virus type 1 envelope

- glycoproteins fused with the trimeric motif of T4 bacteriophage fibrin." *J Virol* **76**: 4634-42.
- Yeager, C. L., R. A. Ashmun, R. K. Williams, C. B. Cardellichio, L. H. Shapiro, A. T. Look and K. V. Holmes (1992). "Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E." *Nature* **357**: 420-2.
- Youn, S., E. W. Collisson and C. E. Machamer (2005a). "Contribution of trafficking signals in the cytoplasmic tail of the infectious bronchitis virus spike protein to virus infection." *J Virol* **79**: 13209-17.
- Youn, S., J. L. Leibowitz and E. W. Collisson (2005b). "In vitro assembled, recombinant infectious bronchitis viruses demonstrate that the 5a open reading frame is not essential for replication." *Virology* **332**: 206-15.
- Yount, B., K. M. Curtis and R. S. Baric (2000). "Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model." *J Virol* **74**: 10600-11.
- Yount, B., K. M. Curtis, E. A. Fritz, L. E. Hensley, P. B. Jahrling, E. Prentice, M. R. Denison, T. W. Geisbert and R. S. Baric (2003). "Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12995-3000.
- Yount, B., M. R. Denison, S. R. Weiss and R. S. Baric (2002). "Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59." *J Virol* **76**: 11065-78.
- Zuniga, S., I. Sola, J. L. Moreno, P. Sabella, J. Plana-Duran and L. Enjuanes (2007). "Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone." *Virology* **357**: 215-27.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Coronaviruspartikels.....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der verwendeten löslichen Proteine.....	57
Abbildung 3: Nachweis der Expression von TGEV-S-Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie. ...	59
Abbildung 4: Nachweis der löslichen Proteine im Überstand transfizierter BHK-21-Zellen.....	60
Abbildung 5: Nachweis der löslichen Proteine im Überstand transfizierter BHK-21-Zellen.....	60
Abbildung 6: Nachweis der löslichen Proteine im Überstand transfizierter BHK-21-Zellen.....	61
Abbildung 7: Zelllysate von BHK-21-Zellen nach Transfektion mit solS1 und solS1S2 Konstrukten.. ..	62
Abbildung 8: Bindung von solS1S2Fc und solS1Fc an pAPN.....	63
Abbildung 9: Bindung von solS1S2Fc und solS1Fc an BHK-21-Zellen.....	64
Abbildung 10: Bindung von solS1S2Fc und solS1Fc an BHK-21-Zellen.....	65
Abbildung 11: Quantifizierung der Bindung an ST-Zellen.....	66
Abbildung 12: Quantifizierung der Bindung an BHK-21-Zellen.....	67
Abbildung 13: Bindung löslicher S-Proteine an zelluläre Membranproteine.....	68
Abbildung 14: Vergleich der aufgetrennten Proteine nach Färbung mit Coomassie Blue.....	70
Abbildung 15: Bindung von solS1S2Fc und solS1Fc an ST-Zellen.....	71
Abbildung 16: Bindung an IPI-21-Zellen.	72
Abbildung 17: Bindung an BHK-21-Zellen.	73
Abbildung 18: Bindung an HEK-293T-Zellen.	74
Abbildung 19: Quantifizierung der Bindung von solS1S2Fc an BHK-21-Zellen.	75
Abbildung 20: Quantifizierung der Bindung von solS1Fc an BHK-21-Zellen.....	76
Abbildung 21: Bindung von IBVS1Fc an Hünhererythrozyten.	77
Abbildung 22: Bindung von solS1S2Fc und TGEV an Erythrozyten.. ..	77
Abbildung 23: Kryoschnitte von Jejunum eines männlichen Schweins.. ..	78
Abbildung 24: Schematische Darstellung des Wildtyp-TGEV-S-Proteins und der S-Mutanten.	80
Abbildung 25: Untersuchung der Infektiosität rekombinanter TGE-Viren mit dem Immunoperoxidase-Test.	82
Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis der Infektion von ST-Zellen durch rekombinante TGE-Viren.....	83
Abbildung 27: Komplementationstest mit Wildtyp-S-Protein.....	84
Abbildung 28: Komplementationstest mit pCG1S-K/M.	86
Abbildung 29: Komplementationstest mit pCG1S_YI/AA und pCG1S_del10.....	87
Abbildung 30: Infektion der ST-Zellen mit den komplementierten Viren (Passage2.)......	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phylogenetische Verwandtschaft der Coronaviren mit einigen Vertretern der <i>Alpha</i> -, <i>Beta</i> und <i>Gammacoronaviren</i>	2
Tabelle 2: Standard-Ansatz für die <i>Pfu</i> -PCR	37
Tabelle 3: Bedingungen der <i>Pfu</i> -PCR.....	38
Tabelle 4: Restriktionsansatz:	39
Tabelle 5: Ligationsansatz.....	41
Tabelle 6: Mastermix für 12 PCR Reaktionen:.....	42
Tabelle 7: Bedingungen der Kolonie-PCR	43
Tabelle 8: Zellkulturbedingen der verwendeten Zelllinien.....	44

Sequenzen

TGEV-S-Protein

Nukleotidsequenz (4344 Bp)

atgaaaaaactat tttgtgggttttggctcgtaatgccattgatttatggagacaat tttccttgttctaattgac
taatagaactataggcaaccagtggaatctcattgaaaccttcttctaactatagtagtaggttaccaccta
attcagatgtgggttaggtgattat tttcctactgtacaaccttgggttaattgcattcgcaatgatagtaat
gacctttatgttacactggaaaatcttaagcattgtattgggattatgctacagaaaatataccttggaaatca
cagacaacgggttaaacgtagtcgtaatggataccataactccatcacagttacaacaacccgcaat ttttaatt
ctgctgaagggtgctatttatatgcattttgtaagggtcaccacctactaccaccacagaatctagtttgacttgc
aattggggtagtgagtgagggttaaacataagttccctatatgtccttctaattcagaggcaaattgtggtaa
tatgctgtatggcctacaatgggtttgcagatgagggttggcttatttacatgggtgctagttaccgtagtt
ttgaaaatcaatggctggcactgtcacatttgggtgatatgctgacgacaacattagaagtcgctggcacgctt
gtagacctttgggtgggttaactcctgtttatgatgtcagttattatagggttaataataaaaatggtagctaccgt
agtttccaattgcactgatcaatgtgctagttatgtggctaagtgtttttactacacagccaggagggttttatac
catcagat ttttagtttttaataattgggtccttctaactaatagctccacgcttgggttagtggtaaat tagttacc
aacagccgcttattagtttaattgcttatggccagtcocctagctttgagaagcagcttctacattttgttttga
gggtgctggctttgatcaatgtaatgggtgctgttttaataataactgttagacgctcattaggttcaaccttaatt
ttactacaaatgtacaatcaggtaagggtgccacagtgctttcattgaaacacaacgggtgggtgctactcctgaa
at tttcatgttatacagtgagtgactcgagct ttttcagttacggtgaaattccgcttcggcgtaactgatggacc
acggtagctgttacgtacactataatggcacagctcttaagtagtttaggaacattaccacctagtgcaaggaga
ttgctat tagtaagtgggggccat ttttatattaatgggttacaatttctttagcacatttctattgattgtata
tcttttaatttgaccactgggtgatagtgacgttttctggacaatagcttacacatcgtacactgaagcattag
acaagttgaaaacacagctattacaagggtgacgtattgtaatagtcacggttaataaacattaaatgctctcaa
ttactgctaatttgaataatggattttatcctgtttcttcaagtgaagttggctctgtcaataagagtggtgtg
ttactacctagctttttacacacataaccattgttaacataactattgggtcttgggtatgaagcgtagtggttatgg
tcaaccatagcctcaacattaagtaacatcacactaccaatgcaggatcacaacaccgatgtgtactgtattc
gttctgaccaat ttttcagtttatgttctacttgcaaaagtgctttatgggacaat tttttaagcgaaac
tgcacggacgttttagatgccacagctgttataaaaaactggtagcttgcctttctcatttgataaattgaacaa
ttacttaact ttttaacaagttctgtttgtcggttagtctggttggctaatgtgaagtttgatgtagctgcc
gtacaagaaccaatgagcaggttgttagaagttgtatgtaatatatgaagaaggagacaacatagtggtgta
ccgtctgataatagtggtgtgcacgatttgtcagtgctacacctagattcctgcacagattacaatatatagg
tagaactgggtgttggtattattagacaaaactaacaggacgctacttagtggttatattacacatcactatcag
gtgatttgttaggttttaaaaatgttagtgatgggtgtcatctactctgtaacgccatgtgatgtaagcgcacaa
gcagctgttattgatggtagcatagttggggctatcacttccattaacagtgaaactgttaggtctaacacattg
gacaacaacacctaat tttttattactactctatatataattacacaaatgataggactcgtggcactgcaattg
acagtaatgatgttgattgtgaacctgtcataacctattctaacatagggtgtttgtaaaaaatgggtgcttttgtt
tttattaacgtcacacattctgatggagacgtgcaaccaat tagcactggtaatgtcacgatacctacaaactt
taccatatacgtgcaagtcgaatatattcaggtttacactacaccagtgccaatagactgttcaagatatgttt
gtaatggtaaccctagggtgaacaaat tgttaacacaatacgtttctgcatgtcaaactattgagcaagcactt
gcaatgggtgacagacttgaaaacatggaggttgattccatgttggtttctgaaaatgcccttaaatggc
atctgttgaagcattcaatagttcagaaaactttagacctatttacaagaatggcctaataatagggtgttctt
ggctagaagggtctaaaatacataacttccgtcccataatagcaaacgtaagtatcgttcagctatagaggacttg
ctttttgataagggttgaacatctgggtttaggtagcattgatgaagattataaacggttgtagcaggtgggttatga
catagctgacttagtatgtgctcaatactataatggcatcatgggtgctacctgggtggcctaagctgacaaaa
tgactatgtacacagcatcccttgcaggtgggtataaacattagggtgcacttgggtggaggcgccgtggctatacct
tttgcagtagcagttcaggctagacttaattatgttgcctacaaactgatgtattgaacaaaaaccagcagat
tctggctagtgctttcaatcaagctattggtaacattacacagtcatttggtaagggttaatgatgctatacatc
aaacatcacgaggtcttgctactgttgctaaagcattggcaaaagtgcaagatgttgtcaacatacaagggcaa
gctttaagccacctaacagtacaattgcaaaaataatttccaagccattagtagttctattagtgacatttataa
taggcttgacgaattgagtgctgatgcacaagttgacagggctgatcacaggaagacttacagcacttaatgcat
ttgtgtctcagactctaaccagacaagcggagggttagggctagtagacaacttgccaaagacaagggttaatgaa
tgcgttaggtctcagctcagagattcggattctgtggtaatggtagacatttgttttctactcgcaaatgcagc
accaaattggcatgattttctttcacacagtgctattaccaacggcttatgaaactgtgactgcttggccaggta

tttgtgcttcagatgggtgatcgacttttggacttgtcgtaaagatgtccagttgactttgtttcgtaaatcta
gatgacaagttctatattgacccccagaactatgtatcagcctagagttgcaactagttctgactttgttcaaat
tgaaggggtgcatgtgctggtttgtaaatgcaactgtaagtgtttgcctagattataacctgattatattgata
ttaatcagactgttcaagacatattagaaaatttttagaccaaatggactgtacctgagttgacatttgacatt
ttaacgcaacctatttaaacctgactgggtgaaattgatgacttagaatttaggtcagaaaagctacataaacac
cactgtagaacttgccattctcattgacaacattaacaatacatttagtcaatcttgaatggctcaatagaattg
aacctatgtaaaatggccttggatgtgtggctactaataggcttagtagtaaatattttgcataaccattactg
ctattttgctggttagtacaggttgcctgtggatgcataggttgttttaggaagttgttgcactctatatgtag
tagaagacaatttgaaaattacgaaccaattgaaaaagtgcacgtccattaa

Aminosäuresequenz (1447 AS)

MKKLFFVVLVVMPLIYGDNFPCKLNTNRTIGNQWNLIEFLLNYSSRLPPNSDVVLGDYFPTVQPWFNCIRNDSN
DLYVTLENLKYLDYATENITWNHRQRLNVVNGYPYSITVTTTRNFNSAEGAIICICKGSPPTTTTESSLTC
NWGSECRNLNFKFPICPNSEANCGNMLYGLQWFADEVVAYLHGASYRISFENQWSGTVTFGDMRATTLLEVAGTL
VDLWVFNVPYDVSYYRVNKNKNGTTVVSNCCTDQCASVYANVFTTQPGGFIPSDFSFNWFLLTNSSTLVSGKLV
KQPLLNVNCLWPVPSFEEAASTFCFEGAGFDQCNGAVLNNTVDVIRFNLNFTTNVQSGKATVFSLNTTGGVTLE
ISCYTVSDSSFFSYGEIPFGVTDGPRYCYVHYNGTALKYLGTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCI
SFNLTTGSDVFWTIAYSYTEALVQVENTAITKVTYCNSHVNNIKCSQITANLNNGFYFVSSSEVGLVNKSVV
LLPSFYTHITIVNITIGLGMKRSYQPIASTLSNITLPMQDHNTDVYCI RSDQFSVYVHSTCKSALWDNIFKRN
CTDVLDATAVIKGTGCPFSFDKLNLYLTFNKFCLSLSPVGANCKFDVAARTRTNEQVVRSLYVIYEEGDNIVGV
PSDNSGVHDLVSLHLDSDTDYNIYGRGTGVIIRQTNRTLLSGLYYTSLSGDLLGFKNVSDGVIYSVTPCDVSAQ
AAVIDGTIVGAITSINSELLGLTHWTTTPNFYYSIYNYTNDRTRGTAIDSNDVDCEPVIYTSNIGVCKNGAFV
FINVTHSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTPVSDCSRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQTEIQAL
AMGARLENMEVDSMLFVSENALKLASVEAFNSSETLDPYKWPNIIGGSWLEGLKYILPSHNSKRKYRSAIEDL
LFDKVVTSGLGTVEDEYKRCCTGGYDIADLVCAQYYNGIMVLPGVANADKMTMYTASLAGGITLGALGGGAIPA
FAVAVQARLNLYVALQTDVNLKNQQILASAFNQAIIGNITQSFQKVNDAIHQTSRGLATVAKALAKVQDVVNIQGO
ALSHLTVQLQNNFQAISSISDIYNRLDELSADAQVDRLITGRLTALNAFVSQTLTRQAEVRASRQLAKDKVNE
CVRSQSQRFGFCNGTHLFLSLANAAPNGMIFHTVLLPTAYETVTAWPGICASDGDRTFGLVVKDVQLTLFRNL
DDKFYLTPTMYQPRVATSSDFVQIEGCDVLFVNATVSDLPSIIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPELTFDI
FNATYLNLTGEIDDLEFRSEKLNHTTVELAILIDNINNTLVNLEWLNRIETVVKWPYVWLLIGLVVIFCIPLL
LFCSTGCCGICGLGSCCHSICSRQFENYEPYIEKVHVH

TGEV-soIS1

Nukleotidsequenz (2574 Bp)

atgaaaaaactatattgtggttttggctcgtaatgccattgattatggagacaattttccttctgctctaaattgact
aatagaactataggcaaccagtggaatctcattgaaaccttccctctaaactatagtagtaggttaccaccta
tcagatgtggtggttaggtgattatcttactgtacaaccttgggttaattgcattcgcaatgatagtaatgac
ctttatggtacactggaaaatcttaaagcattgtattgggattatgctacagaaaatatacacttggaaatcacaga
caacggttaaactgtagtgcgttaattggataccataactccatcacagttacaacaacccgcaattttaattctgct
gaaggtgctattatgcatgttgaagggctcaccacactaccaccacagaatctagtttgacttgcaattgg
gtagtgagtgaggttaaaccataagttccctatagtccttctaattcagaggcaaattgtggtaaatatgctg
tatggcctacaatgggttgcagatgaggttgttgcctatttacctggtgctagttaccgtattagtttgaaaat
caatggctggcactgtcacatttgggtgatatgcgtgcgacaacattagaagtcgctggcagcctgttagacctt
tgggtggttaactcctgctttagatgtcagttattatagggttaataataaaaaatggactaccgtagttccaat
tgcactgatcaatgtgctagttatgtggctaatgttttactacacagccaggaggttttataccatcagatttt
agttttaataaattggttcccttctaactaatagctccagcttgggttagtggttaaattagttaccaaacagccggtta
ttagttaaattgcttatggccagtccttagcttgaagaagcagcttctacattttgttttgagggtgctggcttt
gatcaatgtaattggtgctggttttaataaactgttagacgtcatttaggttcaaccttaattttactacaaatgta
caatcaggttaaggggtgccacagtggtttcattgaacacaacgggtggtgctcactcttgaatttcatgttataca
gtgagtgactcgagctttttcagttacgggtgaaattccgcttcggcgtaactgatggaccaggtactgttacgta
cactataatggcacagctcttaagtattaggaacattaccacctagtggtcaaggagattgctattagtaagtg
ggcatttttatattaatgggttacaatttctttagcacatttccattgattgtatatttttaatttgaccact
ggtgatagtgacgttttctggacaatagcttacacatcgtacactgaagcatttagtacaagttgaaaacacagct
attacaaaggtgacgtattgtaatagtcaggttaataacattaaatgctctcaaattactgctaatttgaataat

ggatTTTTatcctgTTTTcttcaagtgaagttggtcttgtcaataagagtgttgtggtactacctagctTTTTacaca
 cataaccattgTTaacataactattgggtcttgggtatgaagcgtagtggttatgggtcaacccatagcctcaacatta
 agtaacatcacactaccaatgcaggatcacaacaccgatgtgtactgtattcgttctgaccaatTTTcagtttat
 gttcatttctacttgcaaaagtgTTTTatgggacaatTTTTtaagcgaaactgcacggacgTTTTtagatgccaca
 gctgttataaaaaactggtacttgtcTTTTctatttgataaattgaacaattacttaactTTTTaacaagttctgt
 ttgtcgttgagtcctgttgggtgctaattgtaagtttgatgttagctgcccgtaacaagaaccaatgagcaggttgtt
 agaagtttgatgtaatatgaagaaggagacaacatagtggtgtaccgtctgataatagtggtgtgcacgat
 ttgtcagtgctacacctagattcctgcacagattacaatatatggtagaactggtgttggattatttagacaa
 actaacaggacgctacttagtggttatattacacatcactatcaggtgatttgttaggtTTTTaaaaatgtcagt
 gatggtgtcatctactctgtaacgccatgtgatgtaagcgcacaagcagctgttattgatggtaccatagttggg
 gctatcacttccattaacagtgactgttaggtctaacacattggacaacaacacctaTTTTtactactct
 atatataattacacaaatgataggactcgtggcactgcaattgacagtaaatgatgttgattgtgaaacctgcata
 acctatttaacataggtgttggtaaaaaatggtgctTTTTgtTTTTattaacgtcacacattctgatggagacgtg
 caaccaattagcactggtaatgtcacgatacctacaaactttaccatatccgtgcaagtcgaatatattcaggtt
 tacactacaccagtgtcaatagac

Aminosäuresequenz (858 AS)

MKKLFVVLVVMPLIYGDNFPCSKLTNRTIGNQWNL IETFLNLYSSRLPPNSDVVLGDYFPTVQPFNCIRNDSN
 DLYVTLENLKALYWDYATENITWNHRQRLNVVVGYPYSITVTTTRNFNSAEGAIICICKGSPPTTTTESSLTC
 NWGSECLRNHKFPICPNSNEANCGNMLYGLQWFADEVVAYLHGASYRISFENQWSGTVTFGDMRATTLLEVAGTL
 VDLWWFNPVYDVSYYRVNKNKNGTTVVSNC TDQCASYVANVFTTQPGGFIP SDFSFNWFLLTNSSTLVSGKLV
 KQPLLVNCLWPVPSFEAAA STFCFEGAGFDQCNGAVLNNTVDVIRFNLNFTTNVQSGKATVFSLNTTGGVTLE
 ISCYTVSDSSFFSYGEIPFGVTDGPRYCYVHYNGTALKYLGTLPPSVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCI
 SFNLTTGSDVFWTIAYSYTEALVQVENTAITKVTYCNSHVNNIKCSQITANLNNGFYVPSSEVGLVNKSVV
 LLPSFYHTHIVNITIGLGMKRSGYQPIASTLSNITLPMQDHNTDVYCI RSDQFSVYVHSTCKSALWDNIFKRN
 CTDVLDATAVIKGTGCPFSFDKLNLYLTFNKFCLSLSPVGANCKFDVAARTRTNEQVVRSLYVIYEEGDNIVGV
 PSDNSGVHDL SVLHLDSDCTDYNIYGRGTGVGII RQTNRTLLSGLYYTSLSGDLLGFKNVSDGVIYSVTPCDVSAQ
 AAVIDGTIVGAITSINSELLGLTHWTTTPNFYYSIYNYTNDRTRGTAIDSNDVDCEPVIYTSNIGVCKNGAFV
 FINVTHSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTTTPVSI D

TGEV-soIS1S2

Nukleotidsequenz (4155 Bp)

atgaaaaaactatTTTgtggtTTTTggtcgtaatgccattgatttatggagacaatTTTccttgttctaaattgact
 aatagaactataggcaaccagtggaatctcattgaaaccttcccttctaactatagtagtaggttaccaccta
 tcagatgtggtggttaggtgattTTTTcctactgtacaaccttgggttaattgcattcgcaatgatagtaatgac
 cTTTatgTTacactggaaaatcttaaagcattgtattgggattatgctacagaaaatcacttgggaatcacaga
 caacggttaaactagtcgtaaatggataaccatactccatcacagttacaacaaccgcaatTTTaatctgct
 gaaggtgctattatgcatTTTgtaagggctcaccacctactaccaccacagaatctagtttgacttgcaattgg
 ggtagtgagtgagggttaaaccataagttccctatatgtccttctaattcagaggcaaatTgtggtaaatatgctg
 tatggcctacaatggtTtgcatgaggtTgttgcctatTTTcatggtgcttagttaccgtattagttTtgaaaat
 caatggtctggcactgtcacattTggtgatatgctgcaaacatttagaagtcgctggcagccttgttagacctt
 TggtggtTaatcctgTTtatgatgtcagttattatagggttaataataaaaaatggactaccgtagttTccaat
 TgcactgatcaatgtgctagttatgtggctaattgTTTTactacacagccaggaggtTTTataccatcagattTt
 agTTtaataatTggtTccttctaactaatagctccacgTtggTtagtggtTaaatagttaccaaacagccgTta
 TtagTtaattgcttatggccagTccctagctTTgaagaagcagctTctacattTgtTTtagggTgctggctTt
 gatcaatgtaagTgctgTTtaataactgtagcagctcattaggtTcaacctTaatTTTactacaaatgta
 caatcaggtTaaaggtgccacagTgTTTTcattgaacacaacggTggtgTcactctTgaaattTcatgTtataca
 gtgagTgactcgagctTTTTcagTtacggTgaaatccgTtccgTgTaaactgatggaccacggTactgTtacgta
 cactataatggcacagctctTaaagtattTtaggaacattaccacctagTgtcaaggagattgctattagTaaTgg
 ggccatTTTTatattaatggtTacaatTTTctTtagcacattTcctattgattgtatatctTTTaatTTgaccact
 ggtgatagTgacgTTTTctggacaatagctTcacacatcgtacactgaagcattagTacaagTtgaaaacacagct

attacaaaggtgacgtattgtaatagtcacggttaataacattaaatgctctcaaactactgctaatttgaataat
ggatTTTTatcctgTTTcttcaagtgaaagttggctctgtcaataagagtggtgtgtactacctagcttttacaca
cataccattgTTaacataactattgggtcttgggtatgaagcgtagtggttatgggtcaaccatagcctcaacatta
agtaacatcacactaccaatgcaggatcacaacaccgatgtgtactgtattcgttctgaccaattttcagtttat
gttcattctacttgcaaaagtgtttatgggacaatatttttaagcgaaactgcacggacgttttagatgccaca
gctgttataaaaaactggtacttgtcctttctcatttgataaaattgaacaattacttaacttttaacaagttctgt
ttgtcgttgagtcctgttgggtgctaattgtaagtttgatgttagctgcccgtaacaagaaccaatgagcaggttgtt
agaagtttgatgtaatatgaagaaggagacaacatagtggtgtaccgtctgataatagtggtgtgcacgat
ttgtcagtgctacacctagattcctgcacagattacaatatatggtagaactggtgttggattatttagacaa
actaacaggacgctacttagtggttatattacacatcactatcaggtgatttggtaggttttaaaaatgttagt
gatgggtgctactctactctgtaacgccatgtgatgtaagcgcacaagcagctgttattgatggtagcattagttggg
gctatcacttccattaacagtgaaactgttaggtctaacacattggacaacaacacctaatttttactactct
atatataattacacaaatgataggactcgtggcactgcaattgacagtaatgatgttgattgtgaaacctgtcata
acctattcaacataggtgtttgtaaaaaatggtgcttttgtttttattaacgtcacacattctgatggagacgtg
caaccaattagcactggtaatgtcacgatacctacaaactttaccatatacctgcaagtcgaatatattcaggtt
tacctacaccagtgcaatagactgttcaagatatgtttgtaatggtaaccctaggtgtaacaaaattgttaaca
caatagctttctgcatgtcaactattgagcaagcacttgcaatgggtgccagacttgaaaacatggaggttgat
tccatgttgtttgtttctgaaaatgcccttaaatggcatctgttgaagcattcaatagttcagaaactttagac
cctatttacaagaatggcctaataataggtgggtcttggctagaaggtctaaaatacacttccgtcccataat
agcaaacgtaagtatcgttcagctatagaggacttggcttttgataaggttgaacatctgggttaggtacagtt
gatgaagattataaacggtgtacaggtgggttatgacatagctgacttagtatgtgctcaatactataatggcatc
atgggtgctacctgggtgtggctaattgctgacaaaatgactatgtacacagcatcccttgcaggtgggtataacatta
ggtgcacttgggtggaggcgcctggtctataccttttgcagtagcagttcaggctagacttaattatgttgcctca
caactgatgtattgaacaaaaaccagcagattctggctagtgctttcaatcaagctattggtaacattacacag
tcatttggtaaggttaatgatgctatacatcaaacatcacgaggtcttgcactggttgcataaagcattggcaaaa
gtgcaagatgttgtcaacatacaagggcaagctttaagccacctaacagtaacaattgcaaaaataatttccaagcc
attagtagtctatttagtgactttataataggcttgacgaattgagtgctgatgcacaagttgacaggtgat
acaggaagacttacagcacttaatgcaatttggctctcagactcaaccagacaagcggaggttagggctagtaga
caacttgcacaagacaaggttaatgaaatgcttggctcagctcagagattcggattctgtggtaatggtaca
catttgttttctcactgcaaatgcagcaccacaaatggcatgattttctttcacacagtgctattaccaacggctt
gaaactgtgactgcttggccaggtatttgtgctcagatgggtgatcgcacttttggacttgtcgttaaagatgtc
cagttgactttgtttcgtaatctagatgacaagttctatttgacccccagaactatgtatcagcctagagttgca
actagttctgactttgttcaaatggaaggggtgcatgtgctgtttgttaatgcaactgtaagtgatttgcctagt
attatacctgattatattgatattaatcagactgttcaagacataattagaaaatttttagaccaaattggactgta
cctgagttgacattttgacatttttaacgcaacctatttaaacctgactggtgaaattgatgacttagaatttagg
tcagaaaagctacataacaccactgtagaacttggcattctcattgacaacattaacaatacattagtcattctt
gaatggctcaatagaattgaaacctatgta

Aminosäuresequenz (1385 AS)

MKKLFVVLVVMPLIYGNFPCSKLTNRTIGNQWNL IETFLNYSRLPNSDVVLGDYFPTVQPFNCIRNDSN
DLYVTLENLKALYWDYATENITWNHRQRLNVVVGYPYSITVTTTRNFNSAEGAIICICKGSPPTTTTESSLTC
NWGSECRNLNHKFPICPSNSEANCGNMLYGLQWFADEVVAYLHGASYRISFENQWSGTVTFGDMRATTELVAGTL
VDLWVFNVPYDVSYYRVNNKNGTTVVSNC TDQCASYVANVFTTQPGGFIP SDFSFNWFLLTNSSTLVSGKLVT
KQPLLNVNCLWPVPSFEEAASTFCFEGAGFDQCNGAVLNNTVDVIRFNLNFTTNVQSGKGATVFSLNTTGGVTLE
ISCYTVSDSSFFSYGEIPFGVTDGPRYCYVHYNGTALKYLGLTLPSPVKEIAISKWGHFYINGYNFFSTFPIDCI
SFNLTTGSDSDVFWTIAYSYTEALVQVENTAITKVTYCNSHVNNIKCSQITANLNNGFYFVSSSEVGLVNKSVV
LLPSFYHTHIVNITIGLGMKRSYQPIASTLSNITLPMQDHNTDVYICIRSDQFSVYVHSTCKSALWDNIFKRN
CTDVLDATAVIKGTGCPFSFDKLNLYLTFNKFCLSLSPVGANCKFDVAARTRTNEQVVRSLYVIYEEGDNIVGV
PSDNSGVHDL SVLHLDSDCTDNYIYGRGTGVIIRQTNRTLLSGLYYTSLSGDLLGFKNVSDGVIYSVTPCDVSAQ
AAVIDGTIVGAITSINSELLGLTHWTTTNPFFYYSIYNYTNDRTRGTAIDSNDVDCEPVIYTSNIGVCKNGAFV
FINVTHSDGDVQPISTGNVTIPTNFTISVQVEYIQVYTPVSDCSRYVCNGNPRCNKLLTQYVSACQTI EQAL
AMGARLENMEVDSMLFVSENALKLASVEAFNSSETLDPIYKEWPNIGGSWLEGLKYILPSHNSKRKYRSAIEDL
LFDKVVTSGLGTVEDEYKRCTGGYDIADLVCAQYYNGIMVLPGVANADKMTMYTASLAGGITL GALGGGAIPA
FAVAVQARLNLYVALQTDVLNKNQQILASAFNQAIIGNITQSFQKVNDAIHQTSRGLATVAKALAKVQDVVNIQGGQ
ALSHLTVQLQNNFQAISSSISDIYNRLDELSADAQVDRLITGRLTALNAFVSQTLTRQAEVRASRQLAKDKVNE
CVRSQSQRFGFCNGTHLFLSANAAPNGMIFHFTVLLPTAYETVTAWPGICASDGDRTFGLVVKDVQLTLFRNL
DDKFYLTPTMYQPRVATSSDFVQIEGCDVLFVNATVSDLPSIIPDYIDINQTVQDILENFRPNWTVPELTFDI
FNATYLNLTGEIDDLEFRSEKLHNTTVELAILIDNINNTLVNLEWLNRIETVY

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dipl.-Biol. Katarina Shahwan
Geburtsdatum: 12.01.1979
Geburtsort: Martin (Slowakei)
Staatsangehörigkeit: slowakisch

Hochschulausbildung

Ab 10/2007 Doktorarbeit am Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
2005-2006 Diplomarbeit am Institut für Virologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
2001-2006 Studium Diplom Biologie an der Leibniz Universität Hannover mit Abschluss Diplom-Biologin
1998-2000 Studium der Ökologie an der Universität von Matej Bell in Banska Bystrica (Slowakei)

Schulische Ausbildung

1993-1997 Gymnasium V. P. Totha in Martin (Slowakei)
mit Abschluss Abitur
1985-1993 Grundschule Hurbanova in Martin (Slowakei)

Wissenschaftliche Beiträge

Shahwan K, Glende J, Schwegmann-Wessels C, Herrler G. Binding of soluble S proteins of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) to target cells. XIth International Nidovirus Symposium Oxford UK (Posterpräsentation)

Schwegmann-Wessels C, Bauer S, Shahwan K, Trincone A, Winter C, Herrler G. The sialic acid binding activity facilitates infection by porcine transmissible gastroenteritis coronavirus. 19th Annual Meeting of the Society for Virology, Leipzig, March 18-21, 2009 (Posterpräsentation)

Shahwan K, Schwegmann-Wessels C, Herrler G. Analysis of the binding properties of the surface protein S of Transmissible gastroenteritis virus (TGEV). IXth International Symposium on positive strand RNA Viruses, Atlanta, USA, May 17-23, 2010 (Posterpräsentation)

Shahwan K, Herrler G, Importance of the Spike glycoprotein for the enteropathogenicity of Transmissible Gastroenteritis Virus. Klausurtagung SFB621 Pathobiologie der intestinalen Mukosa. Soltau, June 11-12, 2010 (Vortrag)

Danksagung

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Georg Herrler für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Edgar Maiss danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Frau Dr. Christel Schwegmann-Wessels und Herrn Dr. Jörg Glende danke ich für die Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen.

Markus Hoffmann danke ich für seine Hilfe in allen computertechnischen Angelegenheiten.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere danke ich Anna, Anne, Ann-Kathrin, Jana, Christine, Mareike, Markus, Martina, Meike, Sabine, Sandra B., Sandra S., Tim und Trust. Ebenfalls danke ich meinen ehemaligen Kollegen: André, Caro, Julia, Katherina, Maren, und Sahar.

Meinem Mann Nabil und meiner Familie danke ich für ihre unermüdliche Geduld, Unterstützung und Liebe.

