

Philipps-Universität Marburg
Institut für Virologie



Wechselwirkungen von SARS-Coronavirus mit zellulären Abwehrmechanismen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Verena Krähling

aus Marburg/Lahn

Marburg/Lahn im Juli 2008

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von August 2004 bis Juli 2008 am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung und in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Elke Mühlberger durchgeführt. Die Betreuung am Fachbereich Biologie wurde von Herrn Prof. Dr. Bölker übernommen.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 03. 09. 2008 angenommen.

Erstgutachter:	Prof. Dr. Bölker
Zweitgutachter:	PD Dr. Elke Mühlberger

Tag der mündlichen Prüfung am 22. 09. 08

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Coronaviren.....	1
1.1.1	Taxonomie.....	1
1.2	SARS-Coronavirus.....	2
1.2.1	Epidemiologie und Pathogenese.....	2
1.2.2	Morphologie der SARS-CoV-Partikel.....	5
1.2.3	Genomstruktur.....	6
1.3	Das humane Coronavirus NL63.....	7
1.3.1	Epidemiologie und Pathogenese des hCoV-NL63.....	7
1.3.2	Genomstruktur.....	8
1.3.3	Vergleich des hCoV-NL63 mit dem SARS-CoV.....	8
1.4	Antivirale Mechanismen.....	9
1.4.1	Die Typ-I-Interferon-Antwort.....	10
1.4.2	dsRNA-abhängige Protein Kinase.....	12
1.4.3	Die Funktion des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α	13
1.4.4	Weitere eIF2 α -phosphorylierende Kinasen.....	15
1.5	Apoptose.....	16
1.5.1	Rezeptor-vermittelte Apoptose.....	16
1.5.2	Mitochondrial-vermittelte Apoptose.....	17
2	Zielsetzung	20
3	Methoden	22
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	22
3.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	22
3.1.2	Reverse-Transkription PCR.....	23
3.1.3	Reinigung von Nukleinsäuren.....	24
3.1.4	Fällung von Nukleinsäuren.....	24
3.1.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	25
3.1.6	Restriktionsverdau.....	25
3.1.7	Ligation.....	26
3.1.8	Transformation Z-kompetenter XL1-Blue-Zellen.....	26
3.1.9	Plasmid-DNA Präparation im kleinen Maßstab (Mini).....	27
3.1.10	Plasmid-DNA Präparation im großen Maßstab (Maxi).....	27
3.1.11	In vitro-Transkription/Translation.....	28
3.2	Zellbiologische Methoden.....	29
3.2.1	Langzeitlagerung von Säugerzellen.....	29

3.2.2	Kultivierung von Säugerzellen.....	29
3.2.3	Zellzahlbestimmung	30
3.2.4	Transfektion von Säugerzellen mit der Calciumphosphat-Methode.....	30
3.2.5	Transfektion von Säugerzellen mit L2000 oder FuGENE 6	31
3.2.6	Ernte und Lyse von Säugerzellen.....	32
3.3	Virologische Methoden.....	33
3.3.1	Anzucht und Konzentrierung von Viren	33
3.3.2	Bestimmung der Virustiter: TCID ₅₀ -Assay.....	33
3.3.3	Infektion von Säugerzellen mit verschiedenen Viren	34
3.3.4	PPMO-Behandlung von Säugerzellen und Infektion mit Viren.....	34
3.4.	Biochemische Methoden	35
3.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.4.2	Western Blot-Analyse.....	35
3.4.3	Immunfärbung von Proteinen	36
3.4.4	Immunfluoreszenz-Analyse	37
3.4.5	Dual-Luziferase-Assay	38
3.4.6	Chloramphenicol-Acetyltransferase-Assay.....	39
4	Ergebnisse	41
4.1	Tests zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-Proteine	41
4.1.1	Klonierung verschiedener Gene des SARS-CoV.....	41
4.1.2	Expressionsnachweis der hergestellten SARS-CoV-Genkonstrukte.....	42
4.1.3.	Analysen zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-nsp.....	46
4.1.4	Analysen zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-ORFs	51
4.2	Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch SARS-CoV.....	54
4.2.1	Induktion von Apoptose durch SARS-CoV in Zellkultur	54
4.2.2	Induktion von Apoptose durch die akzessorischen ORFs 7a und 7b.....	60
4.3	Inhibition von ORF 7a und 7b in SARS-CoV-infizierten Zellen.....	63
4.3.1	Strategie	63
4.3.2	Analyse der konzentrationsabhängigen Inhibitionseffizienz.....	64
4.3.3	Inhibition durch PPMO 7a ist spezifisch für SARS-CoV.....	66
4.4	Untersuchungen zur Aktivität der PKR in SARS-CoV-infizierten Zellen	69
4.4.1	Induktion der dsRNA-abhängigen Protein Kinase.....	69
4.4.2	Hemmung der PKR durch die Verwendung von PPMO.....	70
4.5	Analysen des Phosphorylierungs-Status der Kinasen GCN2 und PERK in SARS-CoV-infizierten Zellen	79
4.6	Hemmung der Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen.....	81
4.7	Vergleichende Analysen des SARS-CoV mit dem humanen CoV NL63	84
4.7.1	Nachweis des hCoV-NL63 mittels RT-PCR.....	84
4.7.2	Analysen zur Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch hCoV-NL63.....	85

4.7.3	Nachweis von eIF2 α und dsRNA in hCoV-NL63-infizierten Zellen	88
5	Diskussion	90
5.1	Hemmung des Typ-I-IFN-Systems durch SARS-CoV	91
5.2	Funktionelle Charakterisierung von ORF 7a und ORF 7b.....	98
5.3	SARS-CoV induziert Apoptose über die PKR, ist aber resistent gegenüber deren antiviraler Aktivität	104
5.4	Aktivierung eIF2 α -phosphorylierender Kinasen durch SARS-CoV.....	112
5.5	Funktion von eIF2 α während der SARS-CoV-Infektion	114
5.6	Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch hCoV-NL63	115
6	Zusammenfassung	117
7	Literaturverzeichnis	119
8	Anhang	134
A	Material	134
A.1	Medien und Lösungen für Zellkultur	134
A.2	Lösungen und Puffer	135
A.3	Chemikalien	136
A.4	Verbrauchsmaterial	137
A.5	Geräte	137
A.6	Molekularbiologische und biochemische Kits	138
A.7	Materialien für molekularbiologische Arbeiten	138
A.8	Materialien für biochemische Arbeiten.....	139
A.9	Zelllinien.....	139
A.10	Viren	139
A.11	Antikörper.....	140
A.12	Primer	141
A.13	Plasmide	143
A.14	Vektoren und Reporter-gen-Konstrukte	144
B.	Abkürzungsverzeichnis	145
C.	Curriculum Vitae.....	148
D	Veröffentlichungen und Präsentationen	149
D.1	Vorträge auf Kongressen und Tagungen.....	149
D.2	Posterpräsentationen	149
D.3	Publikationen	150
E.	Danksagung	151
F.	Ehrenwörtliche Erklärung	152

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines SARS-Coronavirus	1
Abb. 2:	Taxonomie der Coronaviren	2
Abb. 3:	Schematische Darstellung des SARS-Coronavirus	5
Abb. 4:	Schematischer Aufbau des SARS-CoV-Genoms.....	6
Abb. 5:	Vergleich des Genoms des hCoV-NL63 mit dem des SARS-CoV	8
Abb. 6:	Induktion der Typ-I-Interferon-Antwort	11
Abb. 7:	Regeneration von eIF2/GDP und der Einfluss von eIF2 α	14
Abb. 8:	Induktion eIF2 α -phosphorylierender Kinasen	15
Abb. 9:	Induktion von Apoptose	18
Abb. 10:	Schematischer Aufbau des Western Blots.....	36
Abb. 11:	CAT-Assay.....	39
Abb. 12:	Klonierung von ORF 7b und ORF 7b del	42
Abb. 13:	Expressionskontrolle mittels in vitro-Transkription/Translation	44
Abb. 14:	Expressionskontrolle mittels Western Blot-Analysen	45
Abb. 15:	Expressionskontrolle der SUD-Konstrukte mittels Western Blot-Analyse	46
Abb. 16:	Tests zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-nsp	51
Abb. 17:	Tests zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-ORFs.....	52
Abb. 18:	Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch ORF 7a und ORF 7b.....	53
Abb. 19:	Spaltung von Caspase 3 und 8 durch SARS-CoV	55
Abb. 20:	Infektionskontrolle	56
Abb. 21:	mRNA-Level von Bcl2 und Bax in SARS-CoV-infizierten Zellen.....	57
Abb. 22:	Proteinlevel von Bcl2 und Bax in SARS-CoV-infizierten Zellen	59
Abb. 23:	PARP-Spaltung in SARS-CoV-infizierten Zellen.....	59
Abb. 24:	Caspase 3-Spaltung in ORF 7a- und 7b-transfizierten Zellen.....	61
Abb. 25:	Expressionsnachweis von ORF 7a und 7b	61
Abb. 26:	Konzentrationsabhängige Inhibition der Vermehrung von SARS-CoV durch die Vorbehandlung von Zellen mit PPMO 7a	65
Abb. 27:	IFA PPMO-behandelter und SARS-CoV-infizierter Zellen	66
Abb. 28:	Inhibition der Vermehrung von SARS-CoV durch PPMO 7a.....	67
Abb. 29:	PPMO-Behandlung von VSV-infizierten Zellen.....	68
Abb. 30:	Induktion der PKR in SARS-CoV-infizierten Zellen.....	70
Abb. 31:	Behandlung von 293-Zellen mit PPMO gerichtetet gegen PKR.....	72
Abb. 32:	RT-PCR Analyse der PKR-mRNA in PPMO-behandelten Zellen	73
Abb. 33:	Test zur IFN Induktion durch PKR-spezifische PPMO	75

Abb. 34:	Einfluss der PKR auf die Replikation von SARS-CoV	76
Abb. 35:	Inhibition der IFN β -induzierten PKR-Expression durch PPMO ex-8 beeinflusst die SARS-CoV-Replikation nicht.....	78
Abb. 36:	Induktion der GCN2 und PERK durch eine SARS-CoV-Infektion	80
Abb. 37:	Aktivierung der PERK und GCN2 in IFN β -behandelten und SARS-CoV-infizierten Zellen.....	80
Abb. 38:	Inhibition der Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen 48 h p.i.....	82
Abb. 39:	Inhibition der Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen 72 h p.i.....	83
Abb. 40:	Infektionsnachweis des hCoV-NL63 mittels RT-PCR	85
Abb. 41:	Test zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch hCoV-NL63	86
Abb. 42:	Test zur Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch hCoV-NL63	87
Abb. 43:	Analysen zur Anwesenheit von dsRNA und des Phosphorylierungs-Status von eIF2 α in hCoV-NL63-infizierten Zellen.....	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	SDS-Proteingelzusammensetzung	35
Tabelle 2:	Proteingrößen ermittelt durch IVT und Western Blot-Analysen.....	44
Tabelle 3:	PPMO: Sequenzen und Zielregionen auf der SARS-CoV-RNA.....	63
Tabelle 4:	PPMO: Sequenzen und Zielregionen auf der hPKR-mRNA	71
Tabelle 5:	Antikörper	140
Tabelle 6:	Oligonukleotide	142
Tabelle 7:	Rekombinante Plasmide	144
Tabelle 8:	Vektoren und Reporter-gen-Konstrukte	144

1 Einleitung

1.1 Coronaviren

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Coronaviren (CoV) zeigen sphärische Viruspartikel, die von einer Membranhülle mit eingelagerten Proteinen umgeben sind. Durch diese scheinen die Viren wie von einem „Strahlenkranz“ (gr.-lat.; corona, „Kranz, Krone“ oder Strahlenkranz der Sonne) umgeben zu sein, weshalb diese Viren den Namen Coronaviren erhielten (Abb. 1)(Nature, Vol. 220. Nov 16. 1968).

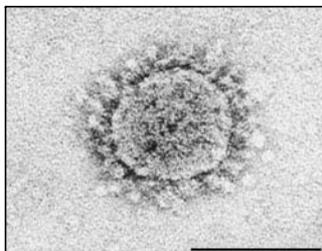


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines SARS-Coronavirus

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. L. Kolesnikova, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg. Bei Coronaviren handelt es sich um zumeist runde aber auch unregelmäßig geformte Viruspartikel, die einen Durchmesser von 80 bis 120 nm haben (209).

1.1.1 Taxonomie

Die Familie der *Coronaviridae*, welche die Genera Coronavirus und Torovirus umfasst, bildet zusammen mit den *Arteriviridae* und *Roniviridae* die Ordnung der *Nidovirales* (110, 164).

CoV sind bekannt für ein breites Wirtsspektrum. Die Infektion vieler Vertebraten, wie Mäuse, Hühner, Schweine, Katzen, Kaninchen, Rinder und Pferde verursacht teilweise schwere Erkrankungen des Respirations- wie auch des Gastrointestinal-Traktes (114). CoV werden bislang nach ihren molekularen und serologischen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt. Charakteristische Vertreter der drei Gruppen sind das transmissible Gastroenteritis-Virus (TGEV, Gruppe I), das Maus-Hepatitis-Virus (MHV, Gruppe II) und das aviäre infektiöse Bronchitis-Virus (IBV, Gruppe III) (Abb. 2).

Die Homologie des SARS-CoV zu den drei Gruppen der Coronaviren ist sehr gering. Detailliertere Analysen der Aminosäuresequenz des Spike (S)-Protein zeigten die größte Übereinstimmung mit der Gruppe II der Coronaviren (48). Die Zugehörigkeit des SARS-CoV zu dieser Gruppe ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Neuere Stammbaumanalysen verschiedener Fledermaus-CoV (btCoV) ergaben, dass es zwei weitere mögliche Gruppen innerhalb der CoV geben könnte. Hierbei wird SARS-

CoV mit einigen btCoV einer möglichen vierten Gruppe zugeordnet. Die fünfte Gruppe umfasst ausschließlich btCoV (193) (Abb. 2).

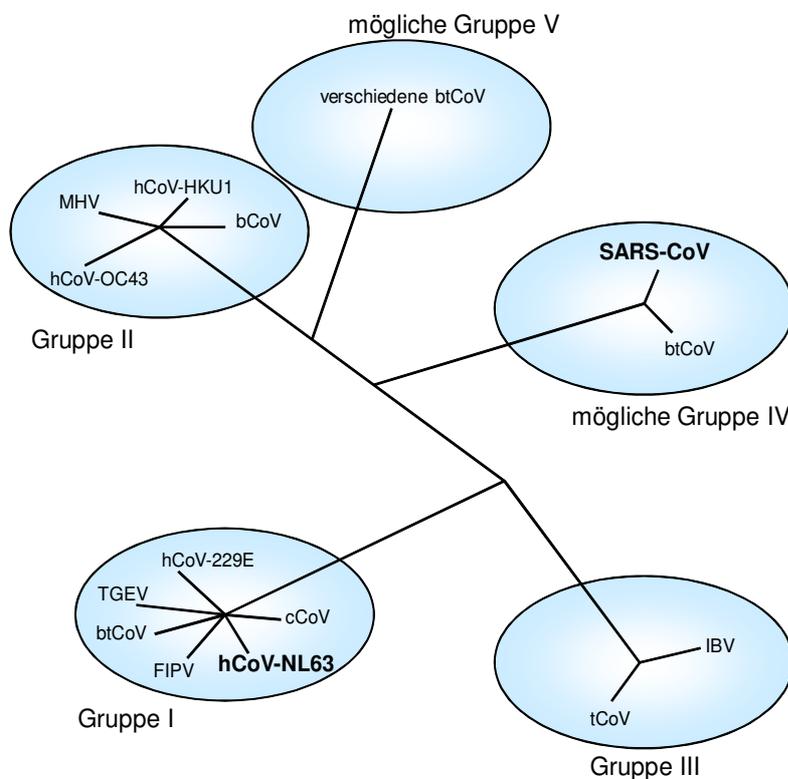


Abb. 2: Taxonomie der Coronaviren

Abgeleitet aus Tang *et al.*, 2006 und Groneberg *et al.*, 2005 (70, 193). Mögliche Einteilung der Coronaviren in fünf verschiedene Gruppen. Das humane CoV isoliert in den Niederlanden aus Probe 63 (hCoV-NL63) gehört zur Gruppe I der CoV. Die Zugehörigkeit des SARS-CoV ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Stammbaumanalysen verschiedener Fledermaus-Coronaviren (btCoV) ergaben die Zugehörigkeit zu einer möglichen vierten Gruppe. bCoV = Rinder-Coronaviren, MHV = Maus-Hepatitis-Virus, TGEV = transmissible Gastroenteritis-Virus, FIPV = Felines Infektiöses Peritonitis-Virus, cCoV = Hunde-Coronavirus, tCoV = Truthahn-Coronavirus, IBV = Infektiöses Bronchitis-Virus

Derzeit sind fünf humane Coronaviren (hCoV) bekannt: hCoV-229E, hCoV-OC43, hCoV-NL63, hCoV-HKU1 und SARS-CoV (46, 73, 98, 110, 134, 200, 216). Die vier erstgenannten Viren führen zu mild verlaufenden Erkältungskrankheiten der Atemwege. SARS-CoV hingegen ist hochpathogen und verursacht eine schwere Schädigung der oberen und unteren Atemwege (32).

1.2 SARS-Coronavirus

1.2.1 Epidemiologie und Pathogenese

Im Februar 2003 wurde der Weltgesundheitsorganisation (WHO) der Ausbruch einer atypischen Pneumonie in der südchinesischen Provinz Guangdong gemeldet, die sich seit November 2002 von dort ausbreitete. Bis in den März hinein häuften sich ähnliche Ausbrüche auch außerhalb von China. Es wurden Infektionen in Vietnam, Hongkong, Kanada und Singapur gemeldet (20, 67, 118, 149, 154, 197).

Epidemiologische Studien wie auch Sequenzanalysen zeigten, dass alle diese Fälle auf einen Index-Patienten zurückzuführen waren. Es handelte sich um einen Arzt,

der aus der Provinz Guangdong nach Hongkong gekommen war. Er hatte in Guangdong Patienten behandelt, die an einer respiratorischen Erkrankung litten und selbst Symptome einer fiebrigen Atemwegserkrankung entwickelt. Er und alle Indexpatienten der folgenden Ausbrüche wohnten am 21. und 22. Februar 2003 in Hongkong im neunten Stock des gleichen Hotels (149).

Die schnelle, weltweite Ausbreitung dieser respiratorischen Erkrankung unbekanntes Ursprungs mittels Tröpfcheninfektion veranlasste die WHO am 12. März 2003 eine globale Warnung vor dieser unbekanntes Infektionskrankheit auszusprechen (213). In internationaler Zusammenarbeit wurde innerhalb kürzester Zeit ein Coronavirus als Erreger dieser Erkrankung identifiziert. Aufgrund der auftretenden Symptome eines schweren akuten Atemwegssyndroms wurde das Virus als „severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus“ (SARS-CoV) bezeichnet. (46, 53, 110, 150). Die vollständige Sequenz des Virus (130) und die epidemiologischen Parameter waren ebenfalls schnell verfügbar (44).

Noch im März 2003 erreichte diese Infektionskrankheit Deutschland. Die WHO teilte dem Hessischen Kompetenzzentrum für hochkontagiöse, lebensbedrohliche Erkrankungen mit, dass sich ein 32-jähriger Arzt auf dem Rückflug von New York über Frankfurt nach Singapur befinde, der vermutlich an SARS erkrankt sei. Dieser Arzt sowie seine Frau und seine Schwiegermutter wurden auf die Isolierstation des Frankfurter Universitätsklinikums gebracht und dort intensivmedizinisch betreut. Nach einer 18-tägigen Behandlung und vollständiger Genesung konnten alle drei Patienten die Heimreise nach Singapur antreten. Dieser Arzt hatte im Februar einen Patienten mit einer respiratorischen Erkrankung behandelt, der ebenfalls in besagtem Hotel in Hongkong übernachtet hatte. Aus Proben dieses Arztes (Sputum) wurde im Zellkultur-Versuch letztendlich der Erreger isoliert. Dieses Isolat aus Frankfurt wird im Folgenden FFM-1 genannt und wurde in der vorliegenden Arbeit für alle Versuche verwendet (<http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/volltexte/2007/4547/>).

Die mittlere Inkubationszeit bei einer SARS-CoV-Infektion beträgt 4 bis 5 Tage, wobei sie je nach Allgemeinzustand der betroffenen Personen auch zwischen 2 und 12 Tagen liegen kann (5). Als erstes Symptom zeigen Patienten hohes Fieber (>38°C) begleitet von weiteren Symptomen wie allgemeinem Unwohlsein, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Diarrhö und Muskelschmerzen. Respiratorische Symptome, z.B. schwerer Husten und Atemnot, treten typischerweise 2 bis 7 Tage

nach dem Beginn der Krankheit auf. Bei einem Drittel aller Fälle sind diese Symptome sofort präsent. Nahezu alle SARS-CoV-infizierten Personen entwickeln Anzeichen einer Lungenentzündung vom 7. bis zum 10. Tag der Infektion. Außerdem wurden Lymphopenien und Thrombozytopenien beobachtet (148, 218). Die Schwere des Krankheitsverlaufes, wie auch das Risiko an einer SARS-CoV-Infektion zu versterben, steigt signifikant mit fortschreitendem Alter der Infizierten (149). Während des SARS-CoV-Ausbruchs 2003 wurden 8096 Fälle bestätigt von denen 774 tödlich verliefen. Die Mortalitätsrate bei SARS-CoV-Infektionen liegt bei ungefähr 10 Prozent (212).

Ein dem SARS-CoV sehr ähnliches Virus wurde in wild lebenden Larvenrollern (*Paguma larvata*) und Marderhunden (*Nyctereutes procyonoides*) auf südchinesischen Tiermärkten nachgewiesen. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei SARS-CoV um ein zoonotisches Virus handelt (77). Jedoch bilden diese Tiere nicht das natürliche Reservoir, sondern sind vermutlich nur Zwischenwirte des SARS-CoV (100). Neuere Studien deuten auf Fledermäuse, die Hufeisennasen der Gattung *Rhinolophus*, als natürliches Reservoir für SARS-CoV oder zumindest für SARS-ähnliche CoV hin (115, 124).

Eine Therapie sowie eine effiziente Vakzine existieren bislang nicht. Daher ist man auf eine symptomatische und intensivmedizinische Versorgung der Erkrankten angewiesen. Die Patienten wurden während des Ausbruchs 2003 in Quarantäne genommen und mit Kortikosteroiden oder gängigen antiviralen Agenzien (Ribavirin, Lopinavir und Ritonavir) behandelt. Rückblickende Studien konnten jedoch in keinem Fall nachweisen, dass eines der gegen SARS-CoV verwendeten Mittel eine positive Wirkung auf die Erholung der Patienten hatte (119, 182).

Zur Entwicklung von Vakzinen gegen SARS-CoV wurden viele verschiedene Versuche unternommen. Es gibt Ansätze inaktivierte Viren, attenuierte Viren, Untereinheiten des SARS-CoV, wie einzelne Proteine, als Impfstoff zu entwickeln. Es wurden ebenfalls DNA-Vakzine entwickelt. Hierbei wird Plasmid-DNA gereinigt und dem Wirt intradermal appliziert, der als Antwort darauf Protein-Antigene bildet. Im Falle der DNA-Vakzine gegen SARS-CoV wurden verschiedene Konstrukte getestet, die das vollständige oder Teile des S-Proteins exprimierten (224).

1.2.2 Morphologie der SARS-CoV-Partikel

Die sphärisch geformten Partikel der SARS-CoV sind von einer Lipidmembran umhüllt, in die verschiedene Proteine eingelagert sind. Das S-Protein, welches für das Andocken und Eindringen in die Wirtszelle verantwortlich ist, das Membranprotein (M-Protein) sowie das Hüllprotein (E-Protein). Bei dem M- und E-Protein handelt es sich ebenfalls um Oberflächenproteine. Beide sind wichtig für die Zusammenlagerung der Viruspartikel, wobei das M-Protein mit dem viralen Nukleokapsid interagiert (113, 114). Das Protein des offenen Leserahmens 3a (ORF 3a) ist auch eine Strukturkomponente des Virus. Es handelt sich um ein O-glykosiliertes Typ-III-Transmembranprotein mit drei membrandurchspannenden Domänen (127, 145). Auch die Proteine des ORF 7a und ORF 7b sind Strukturkomponenten des SARS-CoV (87, 151).

Im Inneren des Virus befindet sich das helikale Nukleokapsid, welches sich aus der viralen einzelsträngigen RNA und den daran gebundenen Nukleokapsidproteinen (N-Proteine) zusammensetzt (Abb. 3).

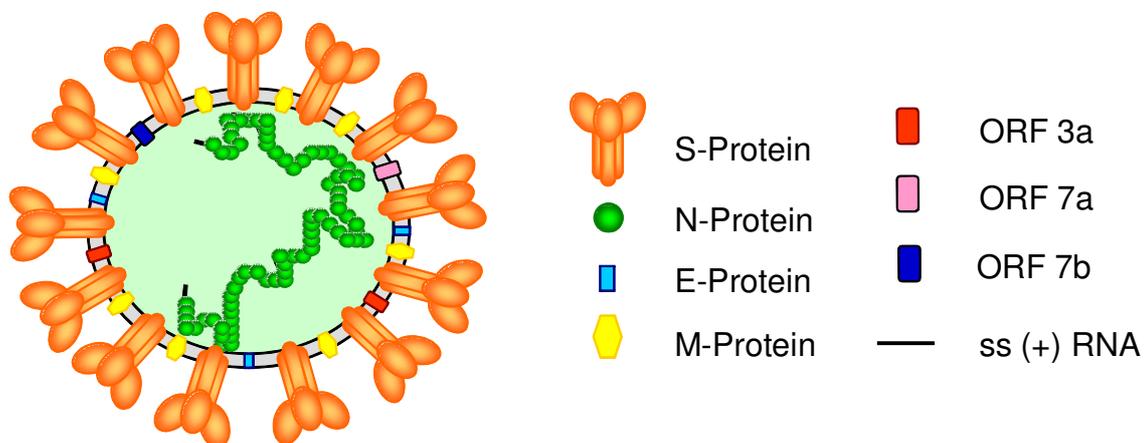


Abb. 3: Schematische Darstellung des SARS-Coronavirus

Dargestellt sind die in die Lipidmembran inserierten Proteine S, E, M, ORF 3a, 7a und 7b. Die einzelsträngige (ss) RNA positiver Polarität (+) liegt im Virus mit Nukleokapsidproteinen komplexiert vor.

1.2.3 Genomstruktur

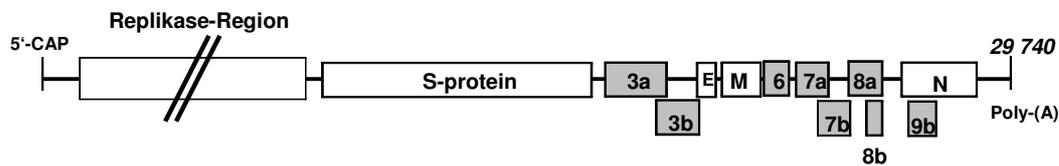


Abb. 4: Schematischer Aufbau des SARS-CoV-Genoms

Das 29.740 Nukleotide umfassende Genom kodiert für die vier Hauptstrukturproteine (S-, E-, M- und N-Protein) und vier zusätzliche ORFs (3, 6, 7 und 8, in grau hervorgehoben). Die Replikase-Region umfasst zwei Drittel des Genoms und kodiert für 16 Nicht-Strukturproteine.

Das virale Genom des Frankfurter Isolats des SARS-CoV (FFM-1, Genbank AY310120) hat eine Länge von 29 740 Nukleotiden (Nts). Es besteht aus einer einzelsträngigen, unsegmentierten RNA positiver Polarität, ist mit einem 5'-„cap“ versehen und polyadenyliert. Auf dem Genom liegen 9 Gene. Das letzte Drittel des Genoms (3'-Ende) kodiert für alle Strukturproteine sowie zusätzliche ORFs, die keinerlei Sequenzhomologien zu bekannten CoV aufweisen (179) (Abb. 4). Das FFM-1 Isolat hat eine charakteristische Deletion im Bereich dieser zusätzlichen ORFs, die 45 Nts umfasst (Nts: 27 654 - 27 698 von GenBank accession No. AY310120). Die Deletion ist ausgehend von Passage drei in Zellkultur beschrieben und betrifft ORF 7b (195). Es stellt sich nun die Frage, ob diese Deletion relevant für die Vermehrung von SARS-CoV in Zellkultur ist.

Das erste und größte Gen besteht aus zwei überlappenden ORFs (ORF 1a und 1b). Dieser Replikase-Region kodiert für 16 Nicht-Strukturproteine (nsp) und wird direkt von der genomischen RNA in zwei Polyproteine (pp) translatiert (pp1a und pp1ab). Die Synthese von pp1ab benötigt einen ribosomalen Leserasterschub während der Translation von ORF 1a. Während oder nach der Synthese der beiden Polyproteine werden diese durch virale Proteasen in die einzelnen Nicht-Strukturproteine (nsp) gespalten (168, 231).

Im Folgenden lagert sich der membrangebundene Replikations- und Transkriptionskomplex (RTK) zusammen, der aus vielen viralen nsp aber auch einigen zellulären Proteinen besteht. Der RTK erkennt cis-aktive Sequenzen an den 5'- und 3'-Enden des Genoms und kopiert dieses entweder kontinuierlich (Voll-Länge-Genome) oder diskontinuierlich in verschiedene subgenomische (sg) Minus-Strang-Matrizen. Diese Minus-Strang-Matrizen dienen der Synthese von Plus-Strang-

Genomen und sg-mRNAs, von letzteren werden die Strukturproteine und zusätzlichen ORFs translatiert (168, 195). Alle sg-mRNAs besitzen die gleichen 5'- und 3'-Enden, wobei das 5'-Ende der sg-mRNAs einem Teil des 5'-Endes der genomischen RNA entspricht. Diese Sequenz wird während der Synthese der mRNAs mit dieser durch den RTK verbunden. Wichtig für diesen Prozess sind die sogenannten „transcription-regulating sequences“ (TRS). Diese befinden sich im Genom am 3'-Ende der 5'-nicht translatierten Region (UTR) und vor jedem ORF (168). Bei SARS-CoV wurden 9 TRS identifiziert, die durch die Nukleotide 5'-ACGAAC-3' gekennzeichnet sind (48). Es wurden dementsprechend auch 8 sg-mRNAs und die genomische RNA nachgewiesen (174).

1.3 Das humane Coronavirus NL63

1.3.1 Epidemiologie und Pathogenese des hCoV-NL63

Im Januar 2003 wurde ein sieben Monate altes Baby in den Niederlanden ins Krankenhaus eingeliefert. Es hatte Fieber, Schnupfen und eine Konjunktivitis. Röntgenaufnahmen des Thorax zeigten, dass es ebenfalls eine Bronchiolitis hatte. Eine Probe aus dem Nasopharynx wurde 5 Tage nach den ersten Symptomen genommen. Diese Probe wurde NL63 genannt.

Diagnostische Tests auf verschiedene Erreger von respiratorischen Erkrankungen, wie z.B. Adenoviren, Influenza A/B Viren, Rhinoviren und hCoV-OC43 und hCoV-229E blieben negativ.

Mit den klinischen Proben wurden im Weiteren verschiedene Zelllinien inokuliert. Ein cytopathischer Effekt (CPE) wurde 8 Tage nach der Infektion unter anderem auf LLC-MK2-Zellen (Nierenzellen des Rhesusaffen) beobachtet. Säurestabilitäts- und Chloroformsensitivitäts-Tests zeigten eindeutig, dass es sich um ein umhülltes Virus handelt.

Van der Hoek, et al. entwickelten eine Methode, um RNA mit unbekannter Sequenz vermehren und analysieren zu können (200). Hierbei zeigten 13 der 16 erhaltenen Sequenzen Ähnlichkeiten zu bekannten CoV. Weitergehende phylogenetische Analysen der ORFs 1a und 1b, sowie des M-, N- und des S-Proteins zeigten, dass es sich bei dem humanen Coronavirus NL63 (hCoV-NL63) um ein Coronavirus der Gruppe I handelte.

Das hCoV-NL63 infiziert hauptsächlich junge Kinder und löst bei diesen eine Infektion der unteren Atemwege aus (98). Im Allgemeinen führt die Infektion mit hCoV-NL63 zu relativ milden Symptomen wie Fieber, Husten, Schnupfen und Halsschmerzen (12). Für gesunde Personen ist die Infektion mit hCoV-NL63 nicht gefährlich. Es handelt sich demnach bei dem hCoV-NL63 um ein Virus, das wie hCoV-229E und hCoV-OC43 nur bei älteren Menschen, jungen Kindern und Immunsupprimierten ernstere Symptome auslösen kann.

1.3.2 Genomstruktur

Das Genom des hCoV-NL63 umfasst 27 553 Nts. Zusätzlich zu den ORFs 1a, 1b und den Strukturproteinen (S, E, M und N) hat das hCoV-NL63 nur einen weiteren ORF, den ORF 3. Ein Vergleich des SARS-CoV-Genoms mit dem des hCoV-NL63 ist in Abb. 5 dargestellt.

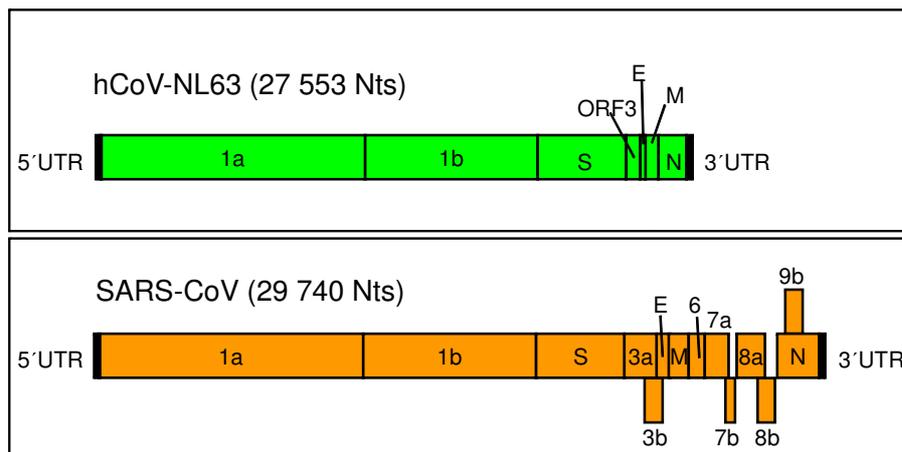


Abb. 5: Vergleich des Genoms des hCoV-NL63 mit dem des SARS-CoV

Das Genom des hCoV-NL63 kodiert nur für einen zusätzlichen ORF (ORF 3), das SARS-CoV-Genom für vier zusätzliche ORFs. Daher ist das Genom auch ungefähr 2 000 Nts länger als das des hCoV-NL63.

1.3.3 Vergleich des hCoV-NL63 mit dem SARS-CoV

Interessanterweise verwenden das SARS-CoV und das hCoV-NL63 den gleichen Rezeptor zum Eindringen in Wirtszellen (83, 123). Beide verwenden das „angiotensin converting enzyme 2“ (ACE2), welches hauptsächlich in der Lunge und dem Gastrointestinaltrakt exprimiert wird, was den Haupt-Replikationsstellen der Viren entspricht (83). Das SARS-CoV benötigt zusätzlich die Cysteinprotease Cathepsin L, um ACE2-exprimierende Zellen produktiv zu infizieren. Das hCoV-NL63 benötigt diese Protease nicht (88).

Ein wichtiger Unterschied zwischen beiden Viren ist, dass das Genom des SARS-CoV vier zusätzliche ORFs umfasst, wohingegen bei dem hCoV-NL63 nur einer dieser ORFs zu finden ist. Diese ORFs des SARS-CoV weisen auch keinerlei Sequenzhomologie zu anderen bekannten Coronaviren auf (179).

SARS-CoV-Infektionen haben eine Mortalitätsrate von 10%. Personen, die sich mit dem hCoV-NL63 infiziert haben, erholen sich fast immer vollständig.

1.4 Antivirale Mechanismen

Bei SARS-CoV handelt es sich um den ersten Vertreter der CoV, der eine stark ausgeprägte Pathogenität für den Menschen aufweist. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war bereits bekannt, dass SARS-CoV sensitiv gegenüber einer Behandlung von Zellen mit Typ-I-Interferonen (IFNs) ist. Spiegel *et al.* konnten zeigen, dass die Behandlung von Vero-Zellen mit 1 000 internationalen Einheiten (IU) IFN β das Wachstum von SARS-CoV um 2 log-Stufen reduziert. IFN α und γ waren nicht so effektiv (177).

Vorarbeiten im Rahmen meiner Diplomarbeit machten deutlich, dass eine SARS-CoV-Infektion nicht die Produktion von IFNs induziert, wie z.B. das Sendai-Virus (SeV) (109). CoV produzieren in den infizierten Zellen doppelsträngige (ds) RNA als Replikationsintermediat. So kann man auch bei einer SARS-CoV-Infektion von einer Anhäufung von dsRNA in den Zellen ausgehen.

Die Anwesenheit von dsRNA kann über verschiedene Mechanismen zur Induktion der Typ-I-IFN-Antwort führen (Abb. 6). Dies legte die Vermutung nahe, dass SARS-CoV in der Lage ist die Immunantwort des Wirts zu umgehen oder zu blockieren. Ein Ansatzpunkt für Blockademechanismen der Viren könnte somit die initiale Antwort des menschlichen Körpers auf eine Infektion sein: Das Interferon-System.

Die IFN-Antwort stellt eine der ersten Abwehrmechanismen virusinfizierter Wirtszellen und eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems bei Menschen und vielen Wirbeltieren dar. Sie untergliedert sich in die Typ-I- und die Typ-II-IFN-Antwort. Bei der Typ-II-IFN-Antwort wird IFN γ produziert, welches den IFN γ -Rezeptor (IFNGR) nutzt (68).

1.4.1 Die Typ-I-Interferon-Antwort

Virusinfektionen können in eukaryotischen Zellen die Typ-I-IFN-Antwort auslösen, wodurch IFN β und verschiedene α -IFNs sekretiert werden. Diese Sekretion führt zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die zur Etablierung des antiviralen Status in der infizierten Zelle und in nicht infizierten Nachbarzellen führen (10, 90, 180). Viele Viren kodieren jedoch für Antagonisten dieser Immunantwort, um diese zu unterdrücken und somit eine effizientere Vermehrung zu erreichen (69, 72).

Die meisten Zellen verwenden den „klassischen Weg“ zur Induktion der Typ-I-IFN-Antwort, bei dem intrazelluläre Sensoren die Anwesenheit von viralen Komponenten, wie z.B. dsRNA, im Cytoplasma detektieren und daraufhin die Haupt-Transkriptionsfaktoren zur Induktion von Typ-I-IFNs aktivieren. Die Bildung von IFN β erfolgt über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „nuclear factor κ B“ (NF κ B), IFN regulatory factor 3 / 7 (IRF-3 / IRF-7) und ATF-2 / c-Jun, die sich sobald sie aktiviert sind im Kern befinden. NF κ B ist im inaktiven Zustand im Cytoplasma an einen Inhibitor (I κ B) gebunden. Im Falle einer Aktivierung, z.B. durch die Protein Kinase R (PKR), wird der Inhibitor von NF κ B abgespalten. IRFs werden durch Phosphorylierung aktiviert. Die Faktoren NF κ B, IRF-3 / IRF-7 und ATF-2 / c-Jun binden im Zellkern an den IFN β -Promotor und aktivieren die Transkription des IFN β -Gens (129). Als initiale Antwort wird zunächst IFN β sekretiert. Im Laufe der Immunantwort werden vermehrt verschiedene α -IFNs produziert. IRF-3 kann im aktivierten Zustand durch die Rekrutierung seines Co-Aktivators CBP/p300 die Produktion von IFN β auch alleine hervorrufen (82).

Für IRF-3 konnte gezeigt werden, dass sich dieser für die IFN β -Produktion essentielle Transkriptionsfaktor in der frühen Phase einer SARS-CoV-Infektion (8 Std. post infectionem (h p.i.)) im Zellkern befindet. Im Verlauf der Infektion (16 h p.i.) wird IRF-3 dann hauptsächlich außerhalb des Zellkerns detektiert (176). Die zur vollständigen Aktivierung des Faktors nötige Phosphorylierung und Dimerisierung findet in SARS-CoV-infizierten Zellen nicht statt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass SARS-CoV in der Lage ist die Induktion von Typ-I-IFNs zu hemmen.

IFNs werden sekretiert und wirken sowohl auto- als auch parakrin (128, 205). Durch Bindung an den IFN α -Rezeptor (IFNAR) (144) werden die an diesen gebundenen Kinasen Tyrosin Kinase 2 (Tyk2) und Janus Kinase 1 (Jak1) durch Autophosphorylierung aktiviert. Tyk2 und Jak1 sind somit in der Lage die „signal

transducer and activator of transcription“ 1 und 2 (STAT1 / STAT2) zu phosphorylieren. Diese bilden Dimere und binden an einen weiteren zellulären Faktor (p48 oder IRF-9 genannt) (214).

Der so gebildete multifaktorielle Transkriptionsfaktor „IFN stimulated gene factor 3“ (ISGF3) bindet an spezifische DNA-Sequenzen eines bestimmten Motivs: das „IFN stimulated regulatory element“ (ISRE) (82, 152, 180).

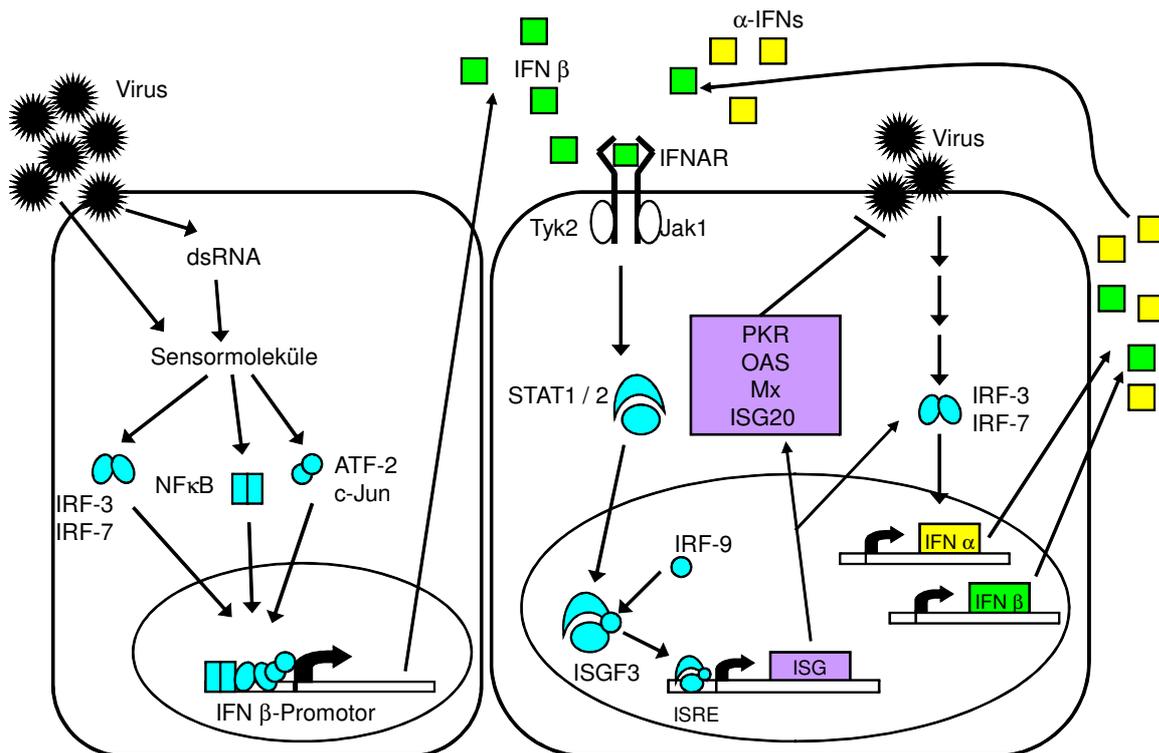


Abb. 6: Induktion der Typ-I-Interferon-Antwort

Sensormoleküle werden durch die Anwesenheit viraler Strukturen wie z.B. dsRNA aktiviert. Dies führt zur Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren (IRF-3, IRF-7, NFκB, ATF-2, c-Jun), die an den IFN β-Promotor binden, was zur verstärkten Transkription und schließlich zur Sekretion von IFN β führt. Das gebildete IFN bindet an seinen Rezeptor (IFNAR), wodurch die gebundenen intrazellulären Kinasen zunächst sich und dann die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 phosphorylieren. Diese bilden Heterodimere und zusammen mit IRF-9 den Transkriptionsfaktor ISGF3, der im Kern die Transkription von Genen anschaltet, die durch ISRE-Promotoren reguliert werden. Es folgt die Expression vieler antiviraler Proteine (PKR, OAS, Mx, ISG20) sowie die Sekretion von IFN α und β. Der antivirale Status ist in der Zelle etabliert.

STAT3, als weiterer Transkriptionsfaktor, wird durch verschiedene Cytokine aktiviert und gilt als anti-apoptotischer Faktor. Nach der Phosphorylierung und Dimerisierung wandert STAT3 ebenfalls in den Kern um die Transkription verschiedener ISRE oder „gamma activated sequences“ GAS zu induzieren. Auch dieser Faktor ist wie IRF-3 Ziel des SARS-CoV. Die Infektion von Zellen mit SARS-CoV führt zu einer Dephosphorylierung des Faktors was zum Funktionsverlust führt (136).

Durch die Aktivierung ISRE-regulierter Elemente werden hunderte von Genen transkribiert und translatiert. Darunter befinden sich vor allem Effektorproteine, die antivirale Aktivität besitzen (42, 68). Als wichtigste IFN-induzierte Produkte mit antiviraler Aktivität gelten die dsRNA-abhängige Protein Kinase (PKR) (61), 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS) (156) und Mx-Proteine, welche die Virusreplikation auf verschiedenen Ebenen hemmen. Weitere Gene, die durch IFN α/β induziert werden bzw. deren Expression verstärkt wird, sind „adenosine deaminase acting on RNA“ (ADAR), p56, Guanylatbindungsproteine (GBPs) und MHC Klasse I Moleküle (Abb.6) (68, 180).

Die durch dsRNA aktivierte OAS katalysiert die Synthese von 2'-5'-Oligoadenylaten, welche dann an RNase L binden und diese aktivieren. Dieser Prozess führt zur Degradierung von RNA und somit zur Inhibierung der viralen Replikation. Zusätzlich kann dieser Signalweg (OAS / RNase L) in infizierten Zellen Apoptose induzieren (167).

Mx-Proteine gehören zur Superfamilie der Dynamine mit GTPase-Aktivität. Sie haben die Fähigkeit an die Nukleokapside verschiedener Viren zu binden, womit sie die virale Replikation blockieren (71, 86).

ADAR ist ein RNA-editierendes Enzym, welches die Sequenz von viraler und zellulärer RNA modifiziert, indem es Adenosin in Inosin umwandelt. Dieser Vorgang erhöht die Menge an mutierten Proteinen in der infizierten Zelle (167).

1.4.2 dsRNA-abhängige Protein Kinase

Die dsRNA-abhängige Protein Kinase (PKR) als Serin/Threonin Kinase phosphoryliert sich nach Aktivierung selbst, was zu einer Konformationsänderung des Enzyms mit erhöhter Affinität zu ATP führt. Diese Autophosphorylierung kann durch die Bindung von dsRNA (35, 36, 61), 5'-Triphosphat-RNA (141) und des zellulären PKR Aktivators PACT (122) ausgelöst werden. In der Folge phosphoryliert die PKR die α -Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors-2 (eIF2 α), was zu Einschränkungen bis hin zum Stopp der Translation und zur Induktion von Apoptose in diesen Zellen führen kann (104, 194). Diese Induktion findet hauptsächlich über den Rezeptor-vermittelten Signalweg und die Proteine FADD und Caspase 8 statt (7, 64). Die genauen Abläufe sind jedoch noch nicht endgültig verstanden.

Während der Infektion von Zellen mit SARS-CoV ist mit großer Wahrscheinlichkeit dsRNA als Intermediat der Replikation anwesend. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die PKR durch die Infektion von Zellen mit SARS-CoV aktiviert wird. Bei Negativstrang-Viren wie z.B. dem Sendai-Virus (SeV) kann dsRNA nicht nachgewiesen werden (207). Hier wird die PKR vermutlich durch die Erkennung von 5'-Triphosphaten der RNA aktiviert (141).

Die Phosphorylierung von eIF2 α durch die PKR führt häufig zur Induktion von Apoptose in den betroffenen Zellen (171). Der Infektionsherd im infizierten Organismus wird somit durch die Hemmung der Produktion von Nachkommenviren eingegrenzt. Eine Ausbreitung der Infektion im Organismus wird somit unterbrochen. Auch durch die Infektion mit SARS-CoV wird in betroffenen Zellen Apoptose ausgelöst (191). Die PKR könnte unter anderem auch dafür verantwortlich sein.

Die PKR hat auch regulatorische Funktionen. In aktiver Form spaltet sie den Inhibitor I κ B von NF κ B ab, was zur Produktion von IFN führt (33, 92). Außerdem bindet PKR an p53 und STAT1 bzw. STAT3 (61). Weiterhin löst PKR über einen FAS-abhängigen Signalweg Apoptose aus. Fehlt diese Induktion der Apoptose kann es zur malignen Transformation kommen (61, 63).

1.4.3 Die Funktion des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α

Zur Steuerung der Translationsinitiation benötigen eukaryotische Zellen mehr als ein Dutzend Proteine, die sogenannten „eukaryotischen Initiationsfaktoren“ (eIF). Zur Initiation der Translation muss sich das Ribosom aus seinen zwei Untereinheiten (40S- und 60S-Untereinheit) zusammensetzen, bevor die methioninbeladene Initiations-tRNA (Met-tRNA_i) über ihr Anti-Codon an das Start-Codon der mRNA binden kann (84).

Im ersten Schritt zur Initiation der Translation wird die ribosomale 40S-Untereinheit durch Bindung des Proteins eIF1A und des multimeren Komplexes eIF3 für die Initiation vorbereitet. Zugleich blockieren diese Faktoren eine vorzeitige Anlagerung der 60S-Untereinheit. Nun bilden die Met-tRNA_i und das GTP-tragende Protein eIF2 einen ternären Komplex, welcher dann an die 40S-Untereinheit bindet. In einem weiteren Schritt bindet der „Cap“-Bindungskomplex (eIF4F) an das 5'-Ende der mRNA. Die 40S-Untereinheit gelangt an das „Cap“ mit den gebundenen Proteinen und bewegt sich entlang der mRNA, bis sie auf ein Start-Codon trifft. Nun wird das GTP gespalten, welches im ternären Komplex an eIF2 gebunden ist, so dass die

Met-tRNA_i in die korrekte Position am Ribosom gelangt. Der „verbrauchte“ Faktor eIF2-GDP, sowie eIF1A und eIF3 verlassen die 40S-Untereinheit. Die Phase der Initiation wird durch die Anlagerung der 60S-Untereinheit beendet (104, 147).

EIF2, bestehend aus drei Untereinheiten eIF2 α (Molekulargewicht: 36 kDa), eIF2 β (38 kDa) und eIF2 γ (52 kDa), ist für die GTP-abhängige Bindung der Met-tRNA_i verantwortlich. Mit dem Erreichen des Ribosoms wird GTP gespalten und ein nicht aktiver eIF2 / GDP-Komplex freigesetzt. Zur Regeneration von eIF2 / GDP ist der Austausch von GDP durch GTP notwendig. Diese Reaktion wird von dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor eIF2B durchgeführt (104).

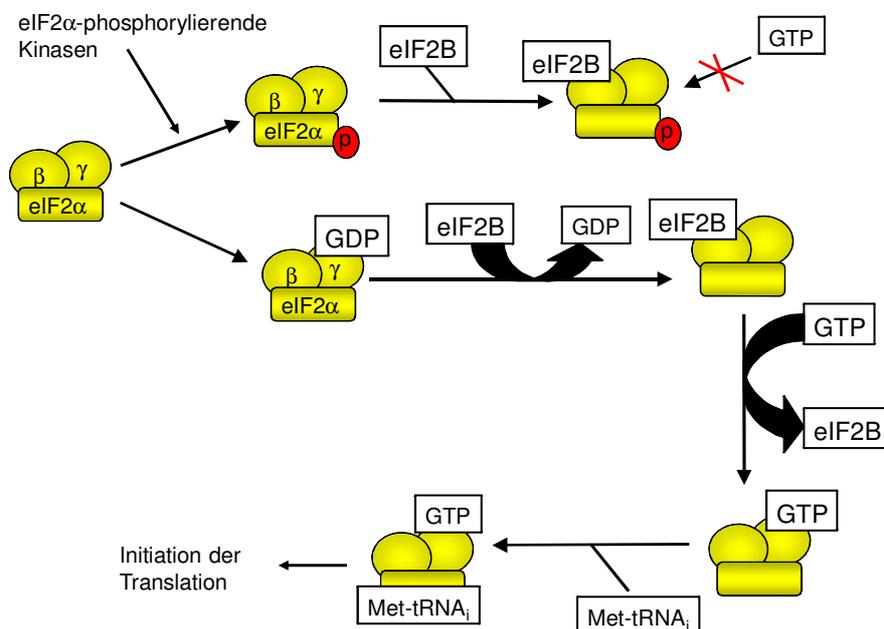


Abb. 7: Regeneration von eIF2/GDP und der Einfluss von eIF2 α

Ist eIF2 nach der Initiation der Translation mit GDP verbunden, so muss der Faktor regeneriert werden. Hierzu wird eIF2B benötigt. Dieser Faktor bindet an eIF2 β und tauscht GDP gegen GTP. In dieser Form ist eIF2 wieder in der Lage an die Initiations-tRNA (Met-tRNA_i) zu binden. Dieser ternäre Komplex ist bereit zur nächsten Initiation der Translation.

Ist die α -Untereinheit von eIF2 jedoch phosphoryliert, bleibt der Regenerationsfaktor eIF2B stabil gebunden. Der Austausch von GDP zu GTP ist nicht möglich, eIF2 bleibt inaktiv, was zu Einschränkungen bis hin zum Stopp der Translation führt.

Wird das Serin an Position 51 des eIF2 α phosphoryliert, so bindet dieser über eIF2 β an den Regenerationsfaktor eIF2B. Dieser Faktor hält phosphoryliertes eIF2 in so stabiler Form gebunden, dass eine Aufnahme von GTP nicht möglich ist (79). Auf diese Weise wird die Translation unterbunden, was nicht selten zur Induktion von Apoptose führt. Der Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von eIF2 α und der Induktion von Apoptose wurde zum ersten Mal dadurch gezeigt, dass die PKR-vermittelte Apoptose durch die Expression eines nicht phosphorylierbaren eIF2 α (Ser51 zu Ala) verhindert werden konnte (63, 178). Da bereits in der dieser Arbeit

vorangegangenen Diplomarbeit (109) gezeigt werden konnte, dass eine SARS-CoV-Infektion die Phosphorylierung von eIF2 α auslöst, wurde nun versucht den Zusammenhang zur PKR und der durch SARS-CoV induzierten Apoptose herzustellen.

1.4.4 Weitere eIF2 α -phosphorylierende Kinasen

Neben der PKR gibt es noch drei weitere Kinasen, die eIF2 α phosphorylieren.

Die „PKR-like endoplasmatic reticulum kinase“ (PERK) wird durch ungefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) aktiviert (76, 210). Die „general control non-derepressible-2 kinase“ (GCN2) wird durch UV-Strahlung, Aminosäure-Mangel oder auch bestimmte virale RNA-Sequenzen aktiviert (16). Von beiden Kinasen ist beschrieben, dass sie als Antwort auf virale Infektionen aktiviert werden können (16, 28, 203).

Die „heme-regulated inhibitor kinase“ (HRI) wird durch Häm-Mangel, oxidativen Stress sowie durch Hitzeschock aktiviert (211). Neuere Studien zeigen, dass die HRI als Antwort auf die Inhibition des 26S Proteasoms eIF2 α phosphoryliert (220). Allerdings gibt es bei der HRI keinen Hinweis darauf, dass sie als Antwort auf virale Infektionen aktiviert wird.

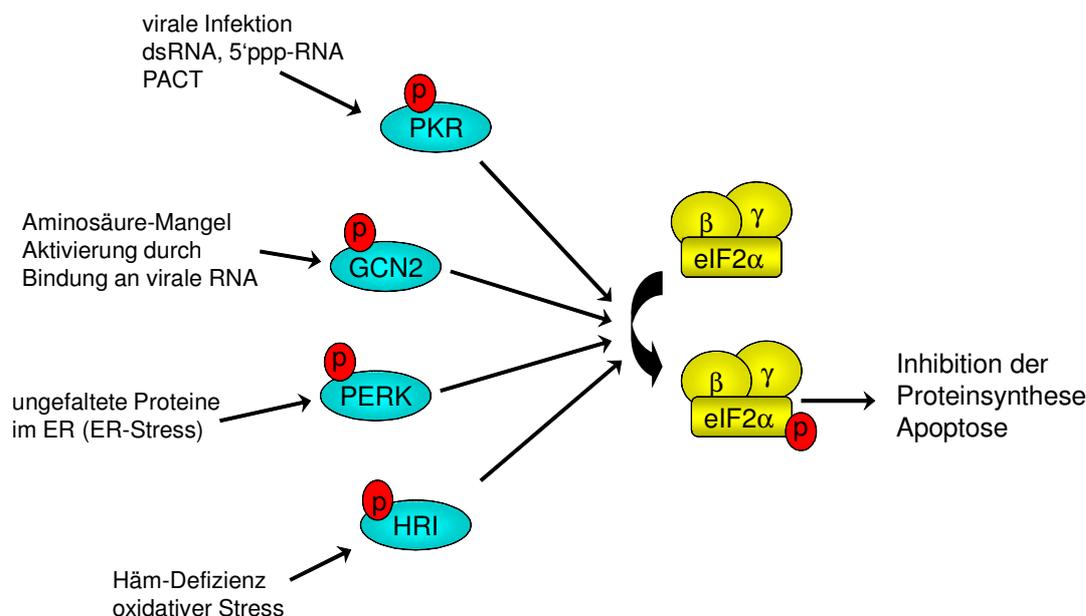


Abb. 8: Induktion eIF2 α -phosphorylierender Kinasen

Vier Kinasen sind in der Lage eIF2 α zu phosphorylieren. Die PKR wird nach Bindung von dsRNA, 5'-ppp-RNA oder dem zellulären Protein PACT aktiviert. GCN2 reagiert auf Aminosäure-Mangel, PERK auf ungefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) und HRI auf Häm-Defizienz oder oxidativen Stress. Die Phosphorylierung von eIF2 α kann aufgrund der Hemmung der Proteinsynthese zur Apoptose in Zellen führen.

1.5 Apoptose

Bei der Induktion von Apoptose nehmen Caspasen, eine Familie von Cysteinproteasen, eine zentrale Rolle ein. Sie werden als inaktive Vorläufer synthetisiert und erst nach der Spaltung an spezifischen Aspartat-Resten aktiviert. Es wird zwischen Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen unterschieden, die kaskadenartig aktiviert werden. Hierbei spalten Initiator-Caspasen zunächst sich selbst, um dann Effektor-Caspasen über deren Spaltung zu aktivieren (172). Nach dieser Aktivierung lösen sie morphologische Änderungen in apoptotischen Zellen aus. Hierzu zählt u.a. das Abrunden der Zellen, der Kollaps des Cytoskeletts sowie die Fragmentierung der DNA (31, 173).

Durch die Fragmentierung der DNA wird in der Regel die „poly-ADP-ribose-polymerase-1“ (PARP) aktiviert; ein 113 kDa Zink-Finger Protein, das im Kern zu finden ist. PARP spürt Brüche in der DNA auf und ist im Folgenden für Reparaturprozesse verantwortlich. Wenn nun in Zellen Apoptose induziert wurde, ist diese Funktion nicht länger erwünscht. Daher wird PARP durch aktive Caspasen in zwei inaktive Fragmente (89 kDa, 24 kDa) gespalten (94).

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass SARS-CoV in vivo sowie in vitro Apoptose in infiziertem Gewebe induziert (136, 190, 217, 227). Eines der verantwortlichen Proteine ist ORF 7a. Die Überexpression von ORF 7a induziert in verschiedenen Zelllinien die Aktivierung von Caspase 3 sowie die Spaltung von PARP (190). Auch die Überexpression des Nukleoproteins führte zur Induktion der Spaltung von Caspase 3 und 7 (187). Noch nicht bekannt war, über welchen Signalweg Caspase 3 in SARS-CoV-infizierten Zellen aktiviert wird.

Zur Aktivierung von Caspasen und der Induktion von Apoptose in Säugerzellen werden zwei Hauptsignalwege unterschieden: der Rezeptor- und der mitochondrial-vermittelte Signalweg.

1.5.1 Rezeptor-vermittelte Apoptose

Die Rezeptor-vermittelte Apoptose (extrinsischer Weg) wird durch Mitglieder der sogenannten „Todesrezeptor“-Familie induziert, zu denen z.B. Fas (CD95) oder auch die TRAIL-Rezeptoren zählen (TRAIL = „tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand“). Im Falle von Fas wird durch das Binden des Fas-Liganden (Fas-L)

die Bildung eines Komplexes ausgelöst. Dieser rekrutiert über das Adaptormolekül FADD (Fas-associated death domain protein) viele Procaspase 8-Moleküle, die sich durch die entstandene Nähe gegenseitig spalten und somit aktivieren (140). Dieser Aktivierungsprozess kann durch die Bindung des Caspasen-Homologs FLIP (FLICE-inhibitory protein) verhindert werden.

Gespaltene Caspase 8 spaltet als Initiator-Caspase die Effektor-Caspasen 3 und 7, was zur Spaltung vieler Substrate und des apoptotischen Phänotyps führt.

Dieser Rezeptor-vermittelte Signalweg zur Induktion von Apoptose kann von aktiver PKR stimuliert werden (7, 64). Da diese durch dsRNA in SARS-CoV-infizierten Zellen induziert werden könnte, war das ein möglicher Signalweg über den SARS-CoV Apoptose induziert.

1.5.2 Mitochondrial-vermittelte Apoptose

Die mitochondrial-vermittelte Apoptose (intrinsischer Weg) ist eine Antwort auf viele extrazelluläre Stimuli aber auch auf DNA-Schäden (159). Alle diese Signalwege laufen an den Mitochondrien zusammen. Dort werden die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl2-Familie (B-cell lymphoma 2) aktiviert, die inaktiv im Cytosol vorliegen. Bis auf Bcl2, welches die meiste Zeit an intrazelluläre Membranen gebunden bleibt, sind die meisten dieser Proteine, wie auch Bax (Bcl2-associated X protein), in der Lage sich zwischen dem Cytosol und den Membranen zu bewegen (215). Verschiedene Signale führen diese Proteine zurück zur Oberfläche der Mitochondrien, wo sie über die Freisetzung von Cytochrom C entscheiden. Der genaue Vorgang dieser Freisetzung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist hingegen, dass die Gabe von pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie zu isolierten Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom C führt. Die Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen dieser Familie verhindert diesen Vorgang.

Auch dieser Signalweg wird wenn auch in sehr viel geringerem Maße von aktiver PKR induziert. Allerdings kann PKR-induzierte Apoptose nicht über Caspase 9-Inhibitoren verhindert werden (65). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SARS-CoV-infizierten Zellen zeigten neben kondensiertem Chromatin auch geschwollene Mitochondrien, was ebenfalls auf ein Mitwirken des hier beschriebenen Signalweges bei SARS-CoV-induzierter Apoptose hinweist (217). Somit kommen beide Signalwege für eine Induktion durch SARS-CoV in Frage.

Wird an Mitochondrien Apoptose induziert, so führt das zur Freisetzung von Cytochrom C und einigen anderen Molekülen. Cytochrom C bildet im Cytoplasma mit dem „apoptotic protease activating factor-1“ (Apaf-1) und Caspase 9 und eventuell noch anderen Molekülen das sogenannte Apoptosom (25). Durch die Komplexbildung mit Apaf-1 wird Caspase 9 durch autokatalytische Spaltung aktiviert, um im Weiteren die Effektor-Caspasen 3 und 7 zu spalten (120).

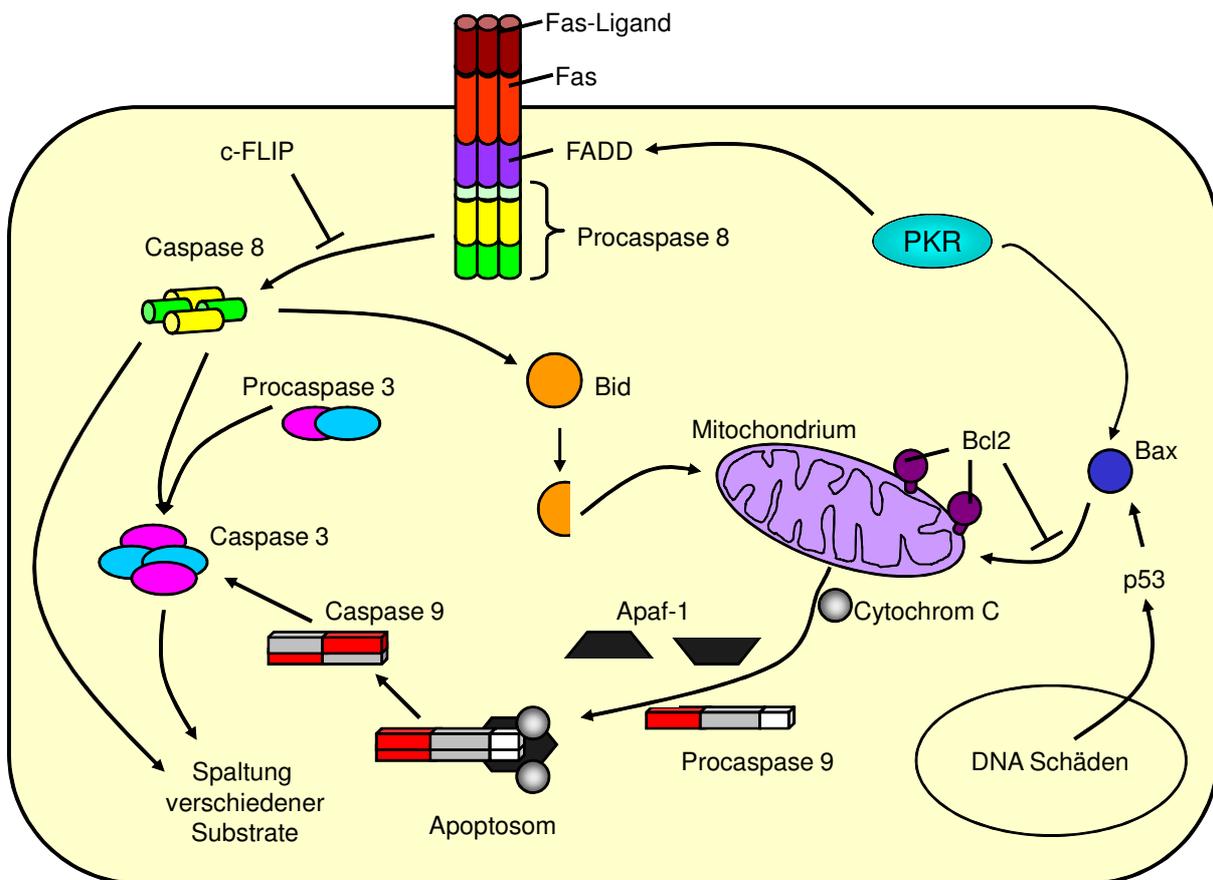


Abb. 9: Induktion von Apoptose

Exemplarisch dargestellt sind die beiden Hauptsignalwege zur Induktion von Apoptose: der Rezeptor-vermittelte und der mitochondrial-vermittelte Signalweg. Die Bindung des Fas-Liganden an Fas führt zur Rekrutierung von Procaspase 8-Molekülen an FADD (Fas-associated death domain protein). Diese spalten sich dort selbst und im Folgenden sogenannte Effektor-Caspasen, wie Caspase 3. Der mitochondriale Weg wird durch verschiedene Stimuli wie z.B. DNA-Schäden induziert. Hier veranlassen Mitglieder der Bcl2-Familie die Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Cytochrom C bildet im Cytoplasma zusammen mit Apaf-1 und Caspase 9 das sogenannte Apoptosom. Innerhalb dieses Komplexes spaltet sich Caspase 9 selbst und ist dann in der Lage auch Effektor-Caspasen zu spalten. Diese spalten dann verschiedene Substrate und lösen damit die morphologischen Änderungen in apoptotischen Zellen aus.

Eine Verbindung zwischen beiden Signalwegen stellt die Spaltung von Bid durch Caspase 8 dar, was zur Induktion des mitochondrial-vermittelten Signalweges führt.

Die PKR induziert Apoptose hauptsächlich über den Rezeptor-vermittelten Signalweg und Interaktionen mit FADD, die Induktion über die Mitochondrien ist auch möglich, spielt aber eine untergeordnete Rolle.

An diesem Punkt laufen nun beide Hauptsignalwege zur Induktion von Apoptose zusammen. Nach der Aktivierung von Caspase 3 spaltet sich der Prozess der Apoptose in viele Wege auf, die dann gemeinsam zum geordneten Abbau der Zelle führen (51).

Eine Verbindung zwischen beiden Hauptsignalwegen zur Induktion von Apoptose stellt das Protein Bid dar, ein pro-apoptotisches Protein der Bcl2-Familie. Es wird durch Caspase 8 gespalten, was zur Verstärkung seiner pro-apoptotischen Aktivität führt. Es folgt die Translokation von Bid in die Mitochondrien, was letztendlich in der Freisetzung von Cytochrom C endet (120).

Unter den meisten Bedingungen ist diese Verbindung allerdings minimal und beide Signalwege funktionieren unabhängig voneinander. Es müssen jedoch noch weitere Signalwege zur Induktion von Apoptose existieren, weil Caspase 8 und 9 nicht essentiell für diesen Vorgang sind (47)

2 Zielsetzung

SARS-CoV-Infektionen induzieren in Zellen nicht die Typ-I-IFN-Antwort, obwohl dsRNA, bekannt als Induktor dieser Immunantwort, in infizierten Zellen vorhanden ist. Die für diesen Effekt verantwortlichen viralen Proteine sollten innerhalb dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit weiteren Forschungsgruppen aus Freiburg und China identifiziert werden. Dafür sollten alle Proteine des SARS-CoV auf ihre Fähigkeit, die Typ-I-IFN-Antwort zu hemmen, überprüft werden. Dazu wurde ein IFN-sensitiver Reporter-Gen-Assay verwendet, durch den die Hemmung der IFN-Antwort bzw. deren Aktivierung nachgewiesen werden kann.

Innerhalb dieser Versuche wurden ORF 7a und 7b als Induktoren des Typ-I-IFN-Systems identifiziert. Da Tan *et al.* (2004) zeigen konnten, dass ORF 7a zur Induktion von Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen beiträgt (190), stellte sich nun die Frage, ob auch ORF 7b in der Lage ist, Apoptose zu induzieren. Hierüber sollten Analysen der Spaltung von Caspasen in transfizierten Zellen Aufschluss geben. Von besonderem Interesse war dabei, dass das in dieser Arbeit verwendete SARS-CoV-Isolat FFM-1 eine charakteristische Deletion in ORF 7b aufweist, was auf einen möglichen Selektionsdruck auf ORF 7b hinweisen könnte. So sollte auch untersucht werden, ob die Deletionsmutante ORF 7b del in der Lage ist, die IFN-Antwort zu induzieren und Apoptose auszulösen.

Um den Einfluss von ORF 7a und 7b auf die Vermehrung von SARS-CoV näher zu charakterisieren, wurden in Zusammenarbeit mit AVI BioPharma Inc. (Corvallis, Oregon, USA) synthetische DNA-Analoga getestet, die gegen die Start-Codons der jeweiligen ORFs gerichtet sind und deren Expression in virusinfizierten Zellen verhindern sollten.

Bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass die Infektion von Zellen mit SARS-CoV zur Phosphorylierung von eIF2 α führt (109). Unklar war, welche Kinase für diesen Vorgang verantwortlich ist. Da dsRNA in SARS-CoV-infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde zunächst der Aktivierungszustand der PKR untersucht. Die PKR kann über die Phosphorylierung von eIF2 α auch für die Induktion von Apoptose verantwortlich sein. Um die Konsequenzen der innerhalb dieser Arbeit festgestellten Aktivierung der PKR für SARS-CoV zu untersuchen, sollte die PKR in infizierten Zellen inhibiert und die

Auswirkungen auf die induzierte Apoptose sowie die Vermehrung des Virus bestimmt werden. In Zusammenarbeit mit AVI BioPharma Inc. wurden verschiedene synthetische DNA-Analoga getestet.

Ob die Induktion von Apoptose einen Nutzen für SARS-CoV und dessen Vermehrung hat oder einen Nachteil darstellt, sollte letztendlich unter Verwendung des Breitspektrum-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk analysiert werden.

SARS-CoV ist mit einer Mortalitätsrate von 10% ein hochpathogenes Virus innerhalb der Coronaviren, wohingegen das hCoV-NL63 nur eine leichte Erkältung bei infizierten Personen auslöst. Innerhalb dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob dieser Unterschied unter anderem auf verschiedene Induktions- bzw. Inhibitionsmechanismen gegenüber dem Typ-I-IFN-Systems zurückzuführen ist.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur effizienten Amplifikation einer spezifischen Sequenz wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt. Die verwendeten Primer (A.12) umfassten oft eine flankierende Restriktionsschnittstelle, um das PCR-Produkt nach einem Restriktionsverdau (3.1.6) in einen geeigneten Vektor ligieren (3.1.7) zu können. Auch die Insertion von HA-tags oder einem T7-RNA-Polymerase-Promotor wurde durch die Verwendung von Restriktionsenzymen mittels PCR durchgeführt. Die Reaktion wurde mit der Pwo-Polymerase (Peqlab) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 50 μl enthielt gewöhnlich:

50 - 300 ng	DNA-Matrize (oder 1,5 μl einer Minipräparation)
5 μl	10x Pwo Puffer, komplett
1 μl	dNTP Mix (je 10 mM)
1,5 μl	Vorwärtsprimer (10 pmol/ μl)
1,5 μl	Rückwärtsprimer (10 pmol/ μl)
1 μl	Pwo-Polymerase (1 U/ μl) (Hot-Start)
<hr/>	
ad 50 μl	ddH ₂ O

Um eine Verlängerung von unspezifisch an die DNA gebundenen Oligonukleotiden zu verhindern, wurde eine "hotstart"-PCR durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur variierte von 50 bis 60 °C, die PCR Bedingungen waren wie folgt:

Denaturierung	99 °C	5 Min.	
Abkühlen, Pwo-Zugabe	90 °C	2 Min.	
Denaturierung	94 °C	1 Min.	35 Zyklen
Anlagerung	50 °C	1 Min.	
Amplifikation	72 °C	2 Min.	
Amplifikation	72 °C	10 Min.	
Lagerung	8 °C		

Ein Zehntel des PCR-Produkts wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.1.5) überprüft. Der verbleibende Ansatz wurde unter Verwendung des „PCR Purification Kits“ (3.1.3) gereinigt, mit Restriktionsenzymen verdaut (3.1.6) und in den vorgesehenen Vektor ligiert (3.1.7).

3.1.2 Reverse-Transkription PCR

Zur Amplifikation verschiedener DNA-Sequenzen von einer RNA-Vorlage, muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben, d.h. revers transkribiert werden. Die Reverse-Transkription PCR (RT-PCR) kann in zwei aufeinander folgenden Schritten oder in einem Ansatz durchgeführt werden. Die „OneStep RT-PCR“ wurde unter Verwendung eines Kits von Qiagen (A.6) durchgeführt. Der verwendete RNase-Inhibitor Ribolock (Fermentas) war nicht im Kit enthalten.

5 bis 10 µl gereinigte RNA (3.1.3) (ad 10 µl RNase-freies H₂O) wurden 5 Min. bei 65°C inkubiert, um eventuell vorhandene Sekundärstrukturen zu zerstören. Nach einer 3-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Ansätze wie folgt ergänzt:

10 µl	RNA / ddH ₂ O
10 µl	5x Puffer
2 µl	dNTPs (je 10 mM)
3 µl	Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)
3 µl	Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
0,5 µl	Ribolock RNasin (40 U/µl)
2 µl	Enzym Mix
<hr/>	
<u>ad 50 µl</u>	ddH ₂ O

Sollten verschiedene Sequenzen in einem Ansatz amplifiziert werden (z.B. GAPDH und Bcl2), so wurden wie oben beschrieben 30 pmol pro Primer eingesetzt und die ddH₂O-Menge angeglichen. Das RT-PCR-Profil sah folgendermaßen aus:

Reverse Transkription	50 °C	30 Min.	
Inaktivierung der Reversen Transkriptase	95 °C	15 Min.	
Denaturierung	94 °C	1 Min.	35 Zyklen
Anlagerung	50 - 60 °C	1 Min.	
Amplifikation	72 °C	2 Min.	
Amplifikation	72 °C	10 Min.	
Lagerung	8 °C		

Ein Zehntel der RT-PCR wurde im Anschluss auf einem Agarosegel analysiert (3.1.5).

3.1.3 Reinigung von Nukleinsäuren

Reinigung von DNA über Säulchen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten größer als 100 bp wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (A.6) verwendet. Das Prinzip des Kits besteht in der Kopplung der DNA an eine Säulenmatrix. Die für eine vorangegangene PCR verwendeten Primer binden nicht, werden also entfernt. Es wurde nach dem beiliegenden Handbuch gearbeitet und die DNA in 40 µl ddH₂O eluiert.

Reinigung von RNA über Säulchen

Zelluläre wie auch virale RNA wurde mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ (A.6) gemäß den Angaben im Kapitel „Animal Cell“ des Handbuchs aufgereinigt. Es wurden alle optionalen Schritte durchgeführt und die RNA in 40 µl ddH₂O eluiert. Proben aus dem BSL4-Labor wurden durch die Zugabe von 600 µl RLT-Puffer und dem gleichen Volumen an 70%igem Ethanol inaktiviert. Nachdem die Proben gründlich gemischt wurden, wurden sie in frische Safe-Lock Reaktionsgefäße überführt und durch das Ausschleusbad aus dem Labor gebracht. Es wurde wie im Handbuch beschrieben verfahren, wobei auf den Schritt des Scherens verzichtet wurde.

Reinigung von DNA mittels Gelextraktion

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus einem Gemisch wurden diese zunächst elektrophoretisch aufgetrennt (3.1.5) und die gewünschte Bande mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Zur Isolation der DNA wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (A.6) nach den Angaben des Herstellers verwendet, wobei alle optionalen Schritte durchgeführt wurden. Die DNA wurde in 40 µl ddH₂O eluiert. Ein Zehntel des Eluats wurde im Anschluss zur Kontrolle der Präparation mit einem Agarosegel (3.1.5) analysiert.

3.1.4 Fällung von Nukleinsäuren

Die Ankonzentrierung von Nukleinsäuren ist mit Alkohol (Ethanol oder Isopropanol) und hohen Konzentrationen an Salz (Natriumacetat oder Natriumchlorid) möglich. Hier wurde die wässrige DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0 - 6,0) und 2,5 Volumen 100% Ethanol versetzt, gemischt und die DNA für 30 Min. auf Eis oder über Nacht bei -20 °C gefällt. Die Nukleinsäuren wurden durch 30-minütiges

Zentrifugieren bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (14 000 rpm, Zentrifuge 5417R) pelletiert und zweimal mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifuge 5417R, 10 Min., 14 000 rpm). Der Überstand wurde möglichst komplett entfernt, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe erfolgte elektrophoretisch über ein Agarosegel. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurden Agarosekonzentrationen von 1 bis 2% verwendet. Die jeweilige Menge an Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst.

Die Proben wurden mit „6x Loading Dye Solution“ (Fermentas) versetzt und aufgetragen. Nach 10 Min. bei 30 mA wurde die Stromstärke auf 50 mA erhöht, bis eine ausreichende Auftrennung erreicht war. Die DNA wurde durch Interkalieren von Ethidiumbromid (15 Min. Färbung, 1:10 000, Stock 10 mg/ml) markiert und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Bandenmuster wurden unter Verwendung des GelDoc 2000 (Biorad) fotografiert und ausgedruckt.

3.1.6 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme (Fermentas oder NEB) wurden verwendet, um DNA an definierten Stellen zu schneiden. Zwei Ziele wurden damit verfolgt:

Ein analytischer Verdau zur Identifizierung entstandener Klonierungsprodukte erfolgte in 10 µl Gesamtvolumen mit 2 bis 10 Units des entsprechenden Enzyms. Es wurden 5 µl einer Minipräparation verdaut (3.1.9). Die Inkubation erfolgte bei der für das jeweilige Enzym angegebenen Temperatur für 1 - 2 Std. in dem empfohlenen Puffer. Anschließend wurde das Resultat mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (3.1.5).

Größere Mengen DNA wurden verdaut, um z.B. PCR Fragmente oder Vektoren für die Ligation (3.1.7) vorzubereiten. Ein solcher präparativer Verdau erfolgte in 50 µl Gesamtvolumen mit 10 - 20 Units des entsprechenden Enzyms. Die Inkubation wurde für 1 - 2 Std. unter den empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Im Anschluss wurde die geschnittene DNA auf einem Agarosegel (3.1.5) aufgetrennt, das gewünschte Fragment ausgeschnitten und mittels Gelextraktion (3.1.3) gereinigt.

War ein Doppelverdau der DNA mit zwei Enzymen notwendig, so wurde dieser in dem vom jeweiligen Hersteller dafür empfohlenen Puffer unter den optimalen Bedingungen durchgeführt.

Wurde ein Vektor für eine folgende Ligation geschnitten, so wurde dem Restriktionsansatz 1 µl der Alkalischen Phosphatase (CIP, A.7) zugegeben, um die endständigen Phosphatreste zu entfernen.

3.1.7 Ligation

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (NEB) verbunden. Dabei wurden pro 15 µl Ansatz 1,5 µl 10x Reaktionspuffer und 1 µl der Ligase (A.7) eingesetzt. Das einzufügende Fragment wurde im Verhältnis 1:1 bis 8:1 zum dephosphorylierten Vektor (3.1.6) eingesetzt und das Restvolumen mit ddH₂O aufgefüllt. Als Kontrollen dienten Ansätze mit nur einem der beiden DNA-Fragmente oder ohne Ligase. Da der Puffer aliquotiert war und somit das enthaltene ATP nicht mehrfach aufgetaut wurde, konnte auf zusätzliches ATP verzichtet werden.

Die Inkubation erfolgte für 1 Std. bei Raumtemperatur (Rt) oder bei 16 °C über Nacht. Die Hälfte jedes Ansatzes wurde zur Transformation von chemokompetenten XL1-Blue-Zellen verwendet (3.1.8).

3.1.8 Transformation Z-kompetenter XL1-Blue-Zellen

Zur Aufnahme fremder Plasmid-DNA wurden Zellen des *E.coli* Stammes XL1-Blue mit dem „Z-Competent *E.coli* Transformation Buffer Set“ (A.6) entsprechend dem beiliegenden Protokoll behandelt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die Z-kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und transformiert, indem 100 µl Zellsuspension mit der DNA (Ligation: 7,5 µl; Maxis: 10 - 100 ng) vorsichtig vermischt und für 1 Std. auf Eis inkubiert wurde. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf einer ampicillinhaltigen (0,1 mg/ml), vorgewärmten LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien entweder zur Analyse gepickt (Mini und Restriktionsverdau (3.1.6, 3.1.9)) oder direkt in eine Kultur zur DNA Präparation (Maxi, 3.1.10) überimpft.

3.1.9 Plasmid-DNA Präparation im kleinen Maßstab (Mini)

Die Präparation wurde unter Verwendung des „peqGold Plasmid Miniprep Kit I“ (A.6) nach beiliegendem Protokoll durchgeführt. Die Isolierung erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Ausgenutzt wurden die selektiven Bindungseigenschaften von DNA an Silikamembranen.

Einzelne Kolonien (3.1.8) wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 5 ml LB-Medium (0,1 mg/ml Ampicillin) überführt. Diese Kultur wurde bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis sie eine ausreichende Dichte erreicht hatte. Die Isolierung der DNA erfolgte aus 1,5 ml dieser Kultur nach den Angaben des Herstellers (A.6). Die DNA wurde in 50 µl ddH₂O eluiert. 5 µl des Eluats wurden zur Analyse mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (3.1.6) und auf einem Agarosegel (3.1.5) aufgetrennt. Klone, die das richtige Bandenmuster im Verdau zeigten, wurden anschließend sequenziert, bevor Maxipräparationen zur Vermehrung der DNA angefertigt wurden (3.1.10).

Die Sequenzierungen erfolgten über die Firma Seqlab (Göttingen). Es wurde eine „extended hot shot“ Reaktion (bis 900 bp) bestellt und die einzelnen Komponenten nach den Angaben von Seqlab zusammengefügt.

3.1.10 Plasmid-DNA Präparation im großen Maßstab (Maxi)

Um Plasmide in großer Menge und hoher Reinheit verfügbar zu haben, wurden positive Bakterienklone (nach Sequenzierung) einer Maxipräparation unter Verwendung des „Hispeed Plasmid Maxi Kits“ (A.6) unterzogen. Die Isolierung erfolgte auch hier nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gefolgt von einer Reinigung über eine Anionenaustauschersäule, an welche die DNA bei bestimmten pH-Werten und Salzbedingungen bindet bzw. abgelöst wird.

Zur Vermehrung der Bakterien wurden 200 ml LB-Medium (0,1 mg/ml Ampicillin) mit 200 µl einer Bakterienkultur inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert (200 rpm). Anschließend erfolgten Präparation, Reinigung und Präzipitation der DNA. Die DNA wurde in 500 µl ddH₂O eluiert und die Menge bei 260 nm photometrisch quantifiziert (Genequant II DNA/RNA Calculator, A.5).

3.1.11 In vitro-Transkription/Translation

Unter Verwendung von Plasmid-DNA und dem TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (A.7) können [³⁵S]-Methionin/Cystein markierte Proteine im zellfreien System hergestellt werden. Das enthaltene Kaninchen-Retikulozytenlysat und die T7-RNA-Polymerase vermitteln sowohl die Transkription als auch die Translation, sofern dem zu exprimierenden Gen ein T7-RNA-Polymerase-Promotor vorgeschaltet ist.

In vitro-Transkription/Translation (IVT):	0,5 µl	Plasmid DNA (1 µg/µl)
	1 µl	TNT Reaktionspuffer
	8,5 µl	Nuklease-freies Wasser
	12,5 µl	TNT T7 Kaninchen-Retikulozytenlysat
	0,5 µl	RNasin (40 U/µl)
	0,5 µl	Aminosäure-Mix -Met, -Cys (1mM)
	0,5 µl	TNT T7-RNA-Polymerase
	1 µl	PRO-MIX [³⁵ S]-Met/Cys(70%/30%)
	Σ 25 µl	

Die Ansätze wurden wie in obiger Tabelle beschrieben auf Eis pipettiert und für 90 Min. bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 2 bis 15 µl des Ansatzes mit ddH₂O und 2x Probenpuffer vermischt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.4.1). Dieses wurde 15 Min. in Fixierungslösung (A.2) inkubiert, kurz in Wasser gespült, auf Whatman-3MM-Papier getrocknet und mit dem Bio-Imager analysiert. Dazu wurde das getrocknete Gel für 15 Min. bis zu 24 Std. auf einer Bio-Imager Platte exponiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem Bio-Imager Analyzer Bas-1000. Zur Auswertung und Verarbeitung der erhaltenen Daten wurde die Software BasReader und Tina 2.0 (RayTest, Freiburg) verwendet.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Langzeitlagerung von Säugerzellen

Die Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen ist in flüssigem Stickstoff bei -196°C möglich. Diese Lagerung bewahrt die Zellen vor Kontamination und vor Variabilität durch Subkultivierung. Als Schutzsubstanz dient 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen sowie partielle Dehydratation des Cytoplasmas verhindert.

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80% in 175 cm^2 -Zellkulturflaschen kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit auf 37°C vorgewärmtem PBS_{def} wurden sie durch Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA vom Untergrund abgelöst. Nach der mikroskopischen Kontrolle wurden 3 ml $\text{DMEM}_{10\%\text{FCS}}$ (A.1) zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation der Zellsuspension für 5 Min. bei 4°C und 1 200 rpm (Zentrifuge 5417R) in Schraubröhrchen. Das Pellet wurde in $900\ \mu\text{l}$ $\text{DMEM}_{20\%\text{FCS}, 10\%\text{DMSO}}$ resuspendiert und in ein Kryoröhrchen gegeben, in dem bereits $900\ \mu\text{l}$ $\text{DMEM}_{20\%\text{FCS}, 10\%\text{DMSO}}$ vorgelegt waren. Die Zellen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox über Nacht bei -80°C gelagert, bevor sie in den Stickstofftank zur Langzeitlagerung überführt wurden. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Die gesamte Zellsuspension wurde in eine 25 cm^2 -Zellkulturflasche mit 5 ml $\text{DMEM}_{10\%\text{FCS}}$ gegeben und bis zur Konfluenz kultiviert. Für die nächsten vier Zellkulturpassagen (3.2.2) wurden je $400\ \mu\text{l}$ „MycoKill“ (A.1) pro 20 ml $\text{DMEM}_{10\%\text{FCS}}$ zugegeben, um eventuell vorhandene Mykoplasmen zu zerstören. Im Anschluss wurden die Zellen unter Verwendung des „MycoAlert Mycoplasma Detection Assays“ (A.6) auf die Anwesenheit von Mykoplasmen untersucht.

3.2.2 Kultivierung von Säugerzellen

Die Inkubation aller Zelllinien erfolgte in einer feuchten, 5%igen CO_2 -Atmosphäre bei 37°C im Brutschrank. Zweimal pro Woche wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurden in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche konfluent gewachsene Zellen zweimal mit auf 37°C vorgewärmtem PBS_{def} gewaschen und durch die Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA vom Untergrund abgelöst. Nach der mikroskopischen Kontrolle wurden 8 ml $\text{DMEM}_{10\%\text{FCS}}$ (A.1) zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren

resuspendiert. Entsprechend der benötigten Dichte wurden die Zellen in 20 ml oder 40 ml DMEM_{10%FCS} (75 bzw. 175 cm²-Flasche) umgesetzt.

Zum Aussäen der Zellen in Zellkulturplatten wurde jeweils die Zellzahl unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe folgender Abschnitt).

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Bildung der sogenannten „Newtonschen Ringe“ zeigte den korrekten Sitz des Deckgläschens auf der Neubauer-Zählkammer an. Somit wurde ein definierter Raum von $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ } \mu\text{l}$ pro Großquadrat geschaffen, in den die Zellsuspension durch Adhäsionskräfte eingebracht wurde. Unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl bei 10-facher Vergrößerung bestimmt. Dazu wurden alle vier Großquadrate ausgezählt (1 Großquadrat = 16 Kleinquadrate) und deren Durchschnittswert bestimmt. Diese Zellzahl pro $0,1 \text{ } \mu\text{l}$ Volumen wurde auf Zellen pro μl umgerechnet ($\times 10$). Die je Vertiefung einer Zellkulturplatte gewünschte Zellzahl wurde dann durch den erhaltenen Wert geteilt und das Ergebnis entsprach der benötigten Menge der Zellsuspension angegeben in μl .

3.2.4 Transfektion von Säugerzellen mit der Calciumphosphat-Methode

Die Calciumphosphat-Transfektion wurde für die Reporter-Gen-Analysen unter 4.1 verwendet. Durch diese Methode kann eine 100%ige Transfektionsrate erreicht werden, ohne dass die IFN-Antwort in transfizierten Zellen ausgelöst wird. Verwendet wurden im Folgenden die Komponenten des „Calciumphosphate Transfection Kits“ von Invitrogen (A.1). Die Transfektion der 293M-Zellen (1×10^6 pro Ansatz, A.9) erfolgte in Suspension mit je $0,3 \text{ } \mu\text{g}$ des Firefly-Luziferase-Reporterplasmids pHISG54-Luz und des Renilla-Luziferase-Reporterplasmids pRL-SV40 und $4 \text{ } \mu\text{g}$ der zu testenden Expressionsplasmide (Dual-Luziferase-Assay, 3.4.5). Zur besseren Aufnahme der DNA in die Zellen wurden $16 \text{ } \mu\text{g}$ Carrier-DNA („Herring Sperm DNA“, Promega) zu jedem Ansatz gegeben. Die DNA wurde in $264 \text{ } \mu\text{l}$ ddH₂O Endvolumen gemischt bevor $36 \text{ } \mu\text{l}$ Calciumchlorid (in zwei Schritten) vorsichtig hinzupipettiert wurden. Das Mischen dieses DNA-Ansatzes mit $300 \text{ } \mu\text{l}$ HBS-Puffer erfolgte durch Einträufeln der DNA in den HBS-Puffer, in dem gleichzeitig Luftblasen erzeugt wurden. In der anschließenden Inkubationszeit von 30 Min. wurden 293M-Zellen (75 cm²-Flasche) für die Transfektion abtrypsiniert (3.2.2), ausgezählt (3.2.3) und die

entsprechende Menge pro Ansatz bei 4°C und 200 x g für 5 Min. zentrifugiert. Die Zellen wurden im Transfektionsgemisch resuspendiert. Das Zell-Transfektionsgemisch wurde nach weiteren 15 Min. in eine 10 cm-Schale mit 10 ml DMEM_{2%FCS} (A.1) gegeben. Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde ein Teil der Ansätze mit Sendai-Virus (SeV, 20 hämagglutinierende Einheiten) zur Induktion des Typ-I-IFN-Systems infiziert (3.3.3). 24 h p.i. wurden die Zellen für 15 Min. in 100 µl Passiv-Lysis-Puffer lysiert und nach den Angaben des „Dual-Luciferase Reporter Assay-Kits“ (3.4.5) analysiert. Die erhaltenen Firefly-Luziferase-Werte wurden mit Hilfe der Renilla-Luziferase-Werte als Maß für die Transfektionseffizienz normalisiert.

3.2.5 Transfektion von Säugerzellen mit L2000 oder FuGENE 6

Lipofectamine 2000 (L2000)

Zellen unterschiedlicher Konfluenz (20 - 80%) wurden einmal mit DMEM_{0%FCS, - P/S} gewaschen, wobei 2 ml DMEM_{0%FCS, - P/S} auf den Zellen verblieben. Die Zellen wurden mit einem Verhältnis von DNA zu L2000 von 1 zu 3 transfiziert. Die DNA und die erforderliche Menge an L2000 wurden getrennt voneinander zu jeweils 150 µl Optimem in Mikro-Schraubröhrchen gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation des L2000-Ansatzes bei Rt wurde dieser zum DNA-Ansatz gegeben. Es folgte eine Inkubation von 20 Min. bei Rt, bevor der DNA-Liposomen-Komplex vorsichtig auf die Zellen gegeben und für 4 bis 6 Std. bei 37°C inkubiert wurde. Das Medium wurde anschließend durch 2 ml DMEM_{2%FCS} ersetzt und die Inkubation über Nacht oder für 48 Std. fortgesetzt.

FuGENE 6 Transfection Reagent

Zellen unterschiedlicher Konfluenz (20 - 80%) wurden zweimal mit DMEM_{0%FCS, - P/S} gewaschen, wobei 1 ml DMEM_{0%FCS, - P/S} auf den Zellen verblieben. Die Zellen wurden mit einem Verhältnis von DNA zu FuGENE 6 von 1 zu 3 transfiziert. Die DNA wurde zu 200 µl DMEM_{0%FCS, - P/S} und die erforderliche Menge an FuGENE zu 800 µl DMEM_{0%FCS, - P/S} gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation des FuGENE-Ansatzes bei Rt wurde dieser zum DNA-Ansatz gegeben. Nach 20 Min. bei Rt wurde der DNA-Liposomen-Komplex auf die Zellen gegeben und für 4 bis 6 Std. bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde anschließend durch 2 ml DMEM_{2%FCS} ersetzt und die Inkubation über Nacht oder für 48 Std. fortgesetzt.

3.2.6 Ernte und Lyse von Säugerzellen

Ernte in Chaps-Puffer

Zellen in denen Caspasen und deren Spaltprodukte nachgewiesen werden sollten, wurden in Chaps-Puffer geerntet. Nach einer Infektion oder Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS_{def} gewaschen und im Anschluss in 50 µl Chaps-Puffer (Cell Signaling) durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Dieser Puffer wurde zuvor mit 5 mM DTT und einem Protease Inhibitor Mix (1x Complete Tablette, Roche) versetzt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 14 000 rpm (Zentrifuge 5417R) und 4°C. Der Überstand wurde mit der gleichen Menge 2x SDS-Probenpuffer vermischt und für Western Blot-Analysen (3.4.1 und 3.4.2) verwendet. Proben aus dem BSL4-Labor wurden nach Zugabe des SDS-Probenpuffers in neue Safe-Lock Reaktionsgefäße (A.4) überführt, 10 Min. im Wasserbad gekocht und durch das Ausschleusbad (5% Microchem) aus dem Sicherheitsbereich gebracht.

Ernte in Zelllysis-Puffer (CLP)

Für alle Western Blot-Analysen mit phosphospezifischen Ak wurden Zellen in CLP geerntet, da dieser Puffer drei Phosphatase-Inhibitoren beinhaltet. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion oder PPMO-Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS_{def} gewaschen. Die Lyse erfolgte in 80 µl Cell Extraction Buffer (CLP, Biosource) für 20 Min. auf Eis. Der Puffer wurde zuvor mit 0,1 µM des Serin/Threonin Phosphatase Inhibitors Calyculin A (Cell Signaling) und einem Protease Inhibitor Mix (1x Complete Tablette, Roche) versetzt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 14 000 rpm (Zentrifuge 5417R) und 4°C. Der Überstand wurde im Anschluss mit der gleichen Menge 2x SDS-Probenpuffer vermischt und für Western Blot-Analysen verwendet (3.4.1 und 3.4.2). Proben aus dem BSL4-Labor wurden wie im vorigen Abschnitt beschrieben inaktiviert.

Ernte von Zellen zur Expressionskontrolle

Nach der Transfektion mit L2000 (48 Std., 3.2.5) zur Expression verschiedener Proteine wurden die Zellen zweimal mit PBS_{def} gewaschen, in 300 µl PBS_{def} abgekratzt und mit der gleichen Menge 2x SDS-Probenpuffer zur Lyse vermischt. Unterschiedliche Mengen dieser Lysate (5 - 30 µl) wurden für Western Blot-Analysen (3.4.1 und 3.4.2) verwendet.

3.3 Virologische Methoden

3.3.1 Anzucht und Konzentrierung von Viren

Alle Arbeiten mit SARS-CoV wurden in einem Hochsicherheitslabor der Stufe 4 (BSL4) am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. SARS-CoV und das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) wurden in Vero E6-Zellen, das hCoV-NL63 in LLC-MK2-Zellen vermehrt. Dazu wurden die Zellen (30 - 60% konfluent) in 175 cm²-Flaschen mit je 10 ml Virusverdünnung in DMEM_{0%FCS} infiziert und 1 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 35 ml DMEM_{2%FCS} zugegeben und die Zellen inkubiert bis sich ein deutlicher CPE zeigte. Typische Werte waren hierbei für SARS-CoV 3 bis 5 Tage, bei hCoV-NL63 10 bis 14 Tage und bei VSV 2 bis 3 Tage. Die Überstände wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen in einer Megafuge 1.0 R (Heraeus) für 10 Min. bei 5 000 rpm zentrifugiert, in neue Falcon-Röhrchen überführt und bei 4°C gelagert. Zur Konzentrierung des Virus wurde im Anschluss eine Ultrazentrifugation (Rotor: SW-28, Optima L100K Ultrazentrifuge) der Überstände bei 20 000 rpm für 2 Std. durchgeführt. Die Pellets wurden in 250 µl je Ultrazentrifugen-Röhrchen aufgenommen, in einem Röhrchen gesammelt, aliquotiert und bei -80°C weggefroren. Die Virustiter wurden mittels TCID₅₀-Analysen (3.3.2) bestimmt.

Das SeV wurde in 11 Tage alten Hühnereiern vermehrt. Die hämagglutinierenden Einheiten pro ml Allantoisflüssigkeit wurden durch einen Standard-Hämagglutinationstest bestimmt (Durchführung J. Olejnik).

3.3.2 Bestimmung der Virustiter: TCID₅₀-Assay

Zur Bestimmung von viralen Titern wurden TCID₅₀-Assays („Tissue Culture Infectious Dose“) durchgeführt. Pro Vertiefung einer 96-well-Platte wurden Vero E6-Zellen in 270 µl DMEM_{2%FCS} ausgesät und bis zu einer Dichte von 20-50% kultiviert. Aus der ersten Reihe wurde das Medium entfernt und durch 200 µl einer Virussuspension in DMEM_{0%FCS} (unverdünnt oder verdünnt) ersetzt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden 30 µl in die jeweils nächste Reihe überführt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Bei den ersten 6 bis 8 Reihen wurden dabei jeweils die Spitzen gewechselt, um ungewollte Übertragungen von Viren zu vermeiden. Die so entstandenen Verdünnungsreihen wurden inkubiert, bis sich der cytopathische Effekt (CPE) nicht mehr veränderte. Die Berechnung des TCID₅₀/ml erfolgte nach der Spearman und Kärber Methode (81).

3.3.3 Infektion von Säugerzellen mit verschiedenen Viren

Die Infektion von Zellen (10^4 bis 10^6 Zellen) mit Viren erfolgte in $\text{DMEM}_{0\% \text{FCS}}$ für eine Stunde in einer 6-well-Zellkulturplatte oder einer 10 cm-Zellkulturschale. Dazu wurden die jeweiligen Virusverdünnungen in $\text{DMEM}_{0\% \text{FCS}}$ angesetzt, das Medium von den zu infizierenden Zellen entfernt und das Inokulum zugegeben (500 μl im 6-well, 2 ml in der 10 cm-Schale). Die „Multiplicity of Infection“ (MOI), hämagglutinierenden Einheiten oder auch Virusverdünnungen sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben. Nach der einstündigen Inkubation wurde das Inokulum entfernt und durch 1,5 ml (6-well) bzw. 10 ml (10 cm-Schale) $\text{DMEM}_{2\% \text{FCS}}$ ersetzt und für die angegebenen Zeiten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Abweichungen von diesem Protokoll sind bei den einzelnen Versuchen angegeben.

Die Inaktivierung von Viren durch UV-Strahlung erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm und einem Abstand zur UV-Quelle von 10 cm. Die Virusverdünnung wurde in Vertiefungen einer 6-well-Platte (pro Vertiefung je 500 μl) verteilt und für 5 bis 10 Min. mit UV-Licht bestrahlt. Die Infektion der Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

3.3.4 PPMO-Behandlung von Säugerzellen und Infektion mit Viren

Falls nicht anders vermerkt, wurde das folgende Standardprotokoll für die Inhibitionsstudien mit PPMO in Zellkultur verwendet.

4×10^4 293Ip- oder 293/ACE2-Zellen (A.9) wurden pro Vertiefung in eine 6-well-Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (1 - 20 μM) der PPMO in 1 ml $\text{DMEM}_{2\% \text{FCS}}$ behandelt. Die folgende Inkubation betrug 4 Std. bei den Versuchen zu ORF 7a und 7b und 24 bis 120 Std. bei den Versuchen zur Inhibition der PKR. Die so vorbehandelten Zellen wurden entweder für Western Blot-Analysen in CLP (3.2.6) geerntet, mit 10 000 internationalen Einheiten (IU) Interferon β behandelt oder mit verschiedenen Viren infiziert. Diese Infektion erfolgte für 1 Std. in dem bereits vorhandenen $\text{DMEM}_{2\% \text{FCS} + \text{PPMO}}$. Die eingesetzten Virusmengen sind bei den jeweiligen Versuchsteilen angegeben. Nach der einstündigen Inkubationszeit wurde das Inokulum entfernt und durch 1 ml $\text{DMEM}_{2\% \text{FCS} + \text{PPMO}}$ ersetzt. Die Ansätze wurden für 24 - 72 Std. inkubiert und die Vermehrung der Viren über TCID_{50} -Analysen (3.3.2) bestimmt.

3.4. Biochemische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch die Bindung von SDS an Proteine entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe, die aufgrund dieser Ladung entsprechend ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Proteinproben (3.2.6) wurden auf denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAG) aufgetrennt. Die Gele setzen sich aus 4%igen Sammelgelen und Trenngelen zusammen, deren Prozentigkeit von der Größe der aufzutrennenden Proteine bestimmt wird (Tabelle 1).

Zelllysate wurden mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 3 bis 5 Min. bei 95°C erhitzt und aufgetragen. Die Proben wurden in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt, bis die Farbstoff-Front herausgelaufen war (100 bis 170 Volt). Durch das Mitführen von Proteinmarkern (A.8) ließen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln. Zur Auftrennung sehr kleiner Proteine wurde ein 20%iges Trenngel verwendet in das 8M Harnstoff in das Sammel- (2,4 g) und Trenngel (4,9 g) eingewogen wurde.

Bei nicht radioaktiv markierten Proben folgte im Anschluss an die SDS-PAGE ein Western Blot (3.4.2). Die Detektion radioaktiv markierter Proben aus einer in vitro-Translation ist unter 3.1.11 beschrieben.

	Sammelgel		Trenngel			
	4%	8%	10%	12%	15%	20%
H ₂ O	2,9 ml	4,7 ml	4 ml	3,3 ml	2,3 ml	0,7 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	750 µl	2,6 ml	3,3 ml	4 ml	5 ml	6,6 ml
10% SDS	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
1,5 M Tris pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml	-	-	-	-	-
10% APS	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 1: SDS-Proteingelzusammensetzung

3.4.2 Western Blot-Analyse

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen in Zelllysaten wurden diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.4.1) und mittels Western Blot („semi-dry“) auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran (9 x 6 cm) wurde zunächst für 2 bis 5 Min. in

Methanol aktiviert und in Anodenpuffer II gewaschen. Für die Detektion von Proteinen mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern (POD-Ak) wurde die PVDF-Membran (Immobilon-P) verwendet. Für die Detektion mit fluoreszierenden Infrarotfarbstoff-gekoppelten Ak hingegen wurde die PVDF-Membran (Immobilon-FL) von Millipore verwendet. Pro SDS-Gel wurden je drei Lagen Whatman-3MM Papier in Anodenpuffer I, II bzw. Kathodenpuffer getränkt und der Western Blot wie in Abb. 10 gezeigt aufgebaut. Luftblasen zwischen den Schichten wurden durch Ausstreichen mit einer Glaspipette beseitigt. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte bei 0,8 mA/cm² für 90 Min. (= 43 mA pro Gel) oder bei 30 Volt für 30 Min. (Fast-Blot).

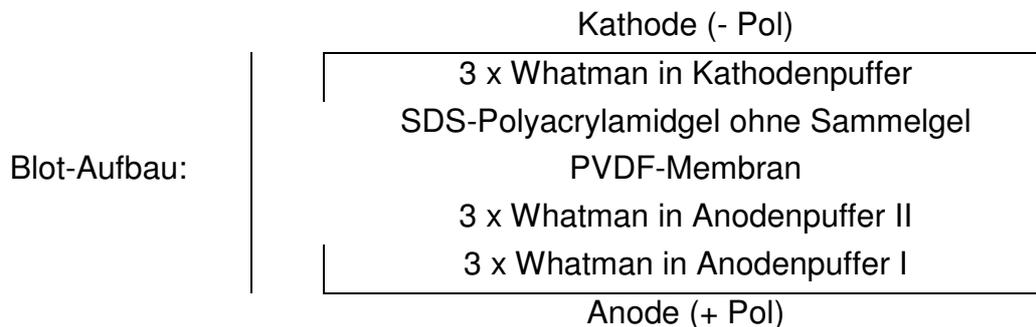


Abb. 10: Schematischer Aufbau des Western Blots

3.4.3 Immunfärbung von Proteinen

Detektion mit Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörpern

Nach dem Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Immobilon-P) wurden diese zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Std. in einer 5%igen Milchpulverlösung (MP) in PBS_{def} plus 0,1% Tween 20 (PBS_{def}+T) schüttelnd inkubiert. Es folgten drei 10-minütige Waschschriffe in PBS_{def}+T. Der Erst-Antikörper (Erst-Ak) wurde wie beschrieben in einer 5%igen MP- oder 5%igen BSA-PBS_{def}+T-Lösung verdünnt (A.11) und über Nacht bei 4°C oder für 1 Std. bei Rt schwenkend inkubiert. Ungebundene Ak wurden durch dreimaliges Waschen in PBS_{def}+T für je 10 Minuten entfernt. Die Membranen wurden für 1 Std. mit dem passenden POD-gekoppelten Zweit-Ak schüttelnd inkubiert und erneut dreimal gewaschen (PBS_{def}+T). Im Anschluss wurde noch zweimal für 10 Min. mit PBS_{def} ohne Tween 20 gewaschen. Die Waschpuffer und Antikörperverdünnungen wurden je nach Angaben der Herstellerfirma der Ak mit PBS_{def} oder mit TBS angesetzt.

Die Detektion der POD-gekoppelten Ak erfolgte mittels Chemilumineszenz mit den

SuperSignal Reagenzien (A.8) von Thermo Scientific. 500 µl der beiden Detektionslösungen wurden vermischt, auf der Membran gleichmäßig verteilt und für 5 Min. in einer Plastiktasche inkubiert. Die Lösung wurde mit einem Papiertuch vollständig ausgestrichen und die Membran in der Tasche luftdicht eingeschweißt. Es folgte die Exposition eines Röntgenfilms für 1 Sek. bis zu einer Std., je nach Effizienz des verwendeten Ak und der Menge detektierbaren Materials.

Detektion mit Infrarotfarbstoff-gekoppelten Zweit-Antikörpern

Zur Detektion von Proteinen mit fluoreszierenden Infrarotfarbstoff-gekoppelten Zweit-Ak wurde wie im vorigen Abschnitt beschrieben vorgegangen, unter Berücksichtigung folgender Ausnahmen.

Die einstündige Absättigung der für diese Anwendung besonders gut geeigneten FL-Membran (Millipore, Immobilon-FL) erfolgte mit 5% Milchpulver in TBS bzw. PBS_{def} ohne Tween. Des Weiteren wurde der Marker mit Bleistift, nicht mit Kugelschreiber eingezeichnet. Da die verwendeten Zweit-Ak an Infrarotfarbstoffe (Alexa680 (rot) oder IRDye800 (grün)) gekoppelt waren, wurden die Membranen ab diesem Schritt lichtgeschützt inkubiert. Mithilfe des „Odyssey Infrared Imaging Systems“ (LI-COR) konnten die Lichtsignale über einen langen Zeitraum stabil detektiert und digital dokumentiert werden. Alle Änderungen zum Standardprotokoll dienten der Reduktion des Hintergrunds beim „Einscannen“ der Blots.

3.4.4 Immunfluoreszenz-Analyse

Für die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse benötigte Zellen wurden in 6-well-Zellkulturschalen auf Deckgläschen (12 mm, rund) kultiviert. Nach der Infektion oder Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS_{def} gewaschen. Es folgte die Fixierung bzw. Inaktivierung mit 4% PFA in DMEM ohne weitere Zusätze für 15 Min. oder über Nacht. Proben aus dem BSL4-Labor wurden mindestens 12 Std. vor dem Ausschleusen in 4% PFA inaktiviert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS_{def} wurden die Proben mit 0,1 M Glycin für 10 Min. bei Rt abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS_{def} erfolgte die Permeabilisierung der Zellen in 0,1% Triton X-100, bevor erneut zweimal gewaschen wurde. Es folgte eine Inkubation in Blocking-Reagenz (A.2) für 10 Min. bei Rt oder über Nacht bei 4°C. Für die Inkubation mit dem jeweiligen spezifischen Erst-Ak (Verdünnungen siehe A.11) wurde eine feuchte Kammer vorbereitet. Es handelt sich

dabei um einen verschließbaren Plastikkasten, in den ein feuchtes Tuch und ein mit Parafilm überzogener Deckel einer 6-well-Zellkulturplatte gelegt wurden. Auf den Parafilm wurden je 25 µl der Antikörperverdünnung getropft und die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf den Tropfen gelegt. Die Inkubation erfolgte für 1 Std. bei Rt. Es folgte dreimaliges Waschen mit PBS_{def} für 5 Min., bevor die einstündige Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweit-Ak (A.11) analog zu der des Erst-Ak durchgeführt wurde. In die Verdünnung des Zweit-Ak wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI (1mg/ml); 1:2 000, A.3) gegeben. Es handelt sich hierbei um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die DNA einlagert und so die Zellkerne sichtbar macht. Nach dieser Inkubation wurden die Deckgläschen viermal mit PBS_{def} für 5 Min. gewaschen, in ddH₂O getaucht und mit der Zellseite nach unten mittels FluorSafe (A.3) auf dem Objektträger fixiert. Nachdem das Präparat getrocknet war, wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.4.5 Dual-Luziferase-Assay

Die Versuche zur Inhibition des Typ-I-IFN-Systems durch SARS-CoV-Proteine wurden mit dem „Dual-Luciferase Reporter Assay“ (A.6) ausgewertet. Mit der Calciumphosphat-Methode (3.2.4) wurden die beiden Reporterplasmide pRL-SV40 und pHISG54-Luz, wie auch das zu testende Expressionsplasmid in 293M-Zellen eingebracht.

Das Reporterplasmid pRL-SV40 enthält das leicht modifizierte Renilla-Luziferase-Gen aus der Seefeder *Renilla reniformis*. Die vorgeschaltete Early enhancer/Promotor-Region des Simian Virus 40 führt nach Transfektion zu einer starken, konstitutiven Expression des Gens in Säugerzellen und ist somit ein Maß für die Transfektionseffizienz und die Translationsleistung der Zelle.

Das pHISG54-Luz Reporterkonstrukt enthält das Luziferase-Gen des Glühwürmchens *Photinus pyralis* unter der Kontrolle des durch Interferon stimulierbaren Promotors des humanen Gens ISG54. Das Luziferase-Gen wird nur nach Induktion der IFN-Antwort durch die in diesem Assay durchgeführte SeV-Infektion exprimiert.

Der Vorteil des hier verwendeten Dual-Luziferase-Assays ist, dass in einer Probe nacheinander die Enzymaktivitäten beider Luziferasen gemessen werden können. Dies ist möglich, weil beide Enzyme unterschiedliche Enzymstrukturen besitzen und

somit auch unterschiedliche Substrate umsetzen. Die freigesetzten „Lichtblitze“ werden dann durch das Luminometer gemessen und mit dem angeschlossenen Computer und der entsprechenden Software (MicroWin 2000 Version 4) ausgewertet.

Die wie beschrieben (3.2.4; 3.3.3) behandelten 293M-Zellen wurden für diesen Assay zweimal mit PBS_{def} gewaschen und in 100 µl Passiv-Lysis-Puffer (PLB) für 15 Min. bei Rt lysiert. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 10 000 rpm (Zentrifuge 5417R) wurden jeweils 10 µl Lysat in eine Vertiefung einer 96-well-Zellkulturplatte pipettiert (3.2.4). Als Blindwert wurde eine Vertiefung mit 10 µl PLB bestückt. Die Zugabe der Luziferase-Reagenzien (je 50 µl) und die Quantifizierung der Lichtreaktion wurden automatisch vom Luminometer durchgeführt. Typische Werte für Messzeiten waren 1 Sek. bei der Renilla- und 20 Sek. bei der Firefly-Luziferase.

Nach der Messung wurden die erhaltenen Firefly-Luziferase-Werte anhand der Renilla-Luziferase-Werte normalisiert und graphisch dargestellt (4.1).

3.4.6 Chloramphenicol-Acetyltransferase-Assay

Die häufig als Reporterprotein verwendete Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) kann anhand ihrer enzymatischen Aktivität nachgewiesen werden. Sie katalysiert die Übertragung von Acetyl-Gruppen des Donors Acetyl-CoA auf den Akzeptor Chloramphenicol (CAMP). Dabei entstehen die Produkte 1'-Acetyl-CAMP, 3'-Acetyl-CAMP und 1'-3'-Diacetyl-CAMP, die durch ihr Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie (DC) unterschieden werden können (Abb. 11). Der verwendete FAST-CAT von Molecular Probes (Invitrogen) basiert auf einem CAMP, an das ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Die durch Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase entstehenden Produkte können dadurch unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

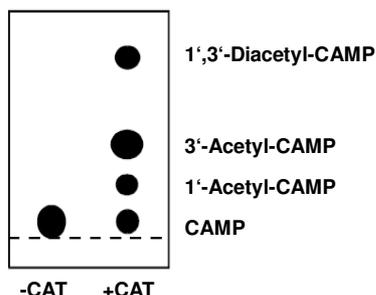


Abb. 11: CAT-Assay

Dargestellt sind die verschiedenen durch die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase (+CAT) entstandenen Produkte des fluoreszenzgekoppelten Chloramphenicols (CAMP). Es handelt sich um einfach oder zweifach acetyliertes CAMP, deren Laufverhalten in der Dünnschichtchromatographie unterschieden werden kann. Durch die Kopplung an einen Fluoreszenzfarbstoff werden diese unter UV-Licht sichtbar.

Die durch FuGENE 6 nach den Angaben des Herstellers (3.2.5) mit dem Reporterplasmid pHISG54-CAT transfizierten Zellen (DNA zu FuGENE 1:3; 2 µg DNA) wurden für diesen Assay zweimal mit PBS_{def} gewaschen und in 100 µl Reporter Lysis-Puffer für 15 Min. bei Rt lysiert. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation (5417R) bei 4°C und 10 000 rpm wurden 1 - 50 µl der Lysate in den CAT-Assay eingesetzt und wie angegeben bei 37°C inkubiert.

1 - 50 µl	Zellysat	
5 µl	Komponente A (BODIPY CAMP Substrat)	
ad 79 µl	250 mM Tris/HCl pH 7,5	Inkubation bei 37°C, 5 Min.
plus 1 µl	Acetyl-Coenzym A (70 mg/ml)	Inkubation bei 37°C, 0,5-2 Std.

Die Katalyse wurde durch Zugabe von 1 ml Ethylacetat (-20°C) gestoppt. Durch kräftiges Mischen (30 Sek.) wurden nicht acetyliertes und acetyliertes CAMP extrahiert. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 10 000 rpm (Zentrifuge 5417R) bei 4°C zur Phasentrennung wurde die obere, organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Deckel dieses Gefäßes war mit einer Kanüle dreimal durchstoßen, damit die Proben anschließend in der beheizten Speed-Vac vollständig verdampft werden konnten. Dieses Gerät senkt durch das angelegte Vakuum die Siedetemperatur von Ethylacetat, wodurch das Lösungsmittel leichter verdampft. Das Pellet wurde in 12 µl Ethylacetat aufgenommen und auf eine Kieselgel-beschichtete DC-Platte aufgetropft. Die Platte wurde in eine Laufkammer mit DC-Laufpuffer (A.2) gestellt, bis die Laufront den oberen Rand der DC-Platte erreichte. Dann wurde die Platte aus der Kammer genommen, unter dem Abzug getrocknet und mit dem GelDoc 2000 unter UV-Licht das Ergebnis dokumentiert. Die Auswertung wurde mit der Software QuantityOne 4.6.2 durchgeführt.

Proben aus dem BSL4-Labor wurden zur Inaktivierung möglicher Viruskontaminationen mit 1% SDS (Endkonzentration) versetzt. Die Proben wurden dann in neue Safe-Lock Reaktionsgefäße transferiert, 10 Min. gekocht und ausgeschleust. Nach dem Ausschleusen der Proben wurden folgende Änderungen an dem bereits aufgeführten Protokoll vorgenommen: Bevor Ethylacetat zugegeben wurde, wurden die Proben zentrifugiert. Zum Auftragen auf die DC-Platte wurden diese Proben in 20 µl Ethylacetat aufgenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Tests zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-Proteine

Die Vermehrung von SARS-CoV in Zellkultur kann durch die Prä-Inkubation von Vero E6-Zellen mit 1 000 internationalen Einheiten (IU) Interferon (IFN) β um 2 log-Stufen reduziert werden (177). Allerdings löst die Infektion von 293- sowie Vero E6-Zellen mit SARS-CoV keine Induktion der Typ-I-IFN-Antwort aus (109). Man kann demnach davon ausgehen, dass aktive Mechanismen bestehen, durch die diese Induktion, die z.B. durch Erkennung viraler Strukturen wie dsRNA oder 5'ppp-RNA ausgelöst wird, verhindert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun alle Proteine des SARS-CoV auf ihre Fähigkeit untersucht, die Induktion des Typ-I-IFN-Systems zu hemmen.

4.1.1 Klonierung verschiedener Gene des SARS-CoV

Dieses umfangreiche Vorhaben wurde innerhalb einer Kooperation mit einer Arbeitsgruppe in Freiburg, sowie zwei weiteren chinesischen Arbeitsgruppen in Peking und Shanghai ausgeführt.

Die verschiedenen Gene des SARS-CoV (FFM-1, GenBank accession No. AY310120) wurden jeweils, ausgehend von RNA aus infizierten Zellen (3.1.3), mittels RT-PCR amplifiziert (3.1.2). Dazu wurden Gen-spezifische Primer (A.12), die Restriktionsschnittstellen für die spätere Ligation beinhalteten, verwendet. Nach einem Restriktionsverdau (3.1.6) der erhaltenen PCR-Fragmente wie auch der verwendeten Vektoren wurden diese ligiert (3.1.7), in chemokompetente XL1-Blue-Zellen transformiert und vervielfältigt (3.1.8-10). Die genaue Vorgehensweise ist im Anhang (A.13) beschrieben.

Auch nsp3 sollte in seiner vollen Länge für die Versuche zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort kloniert werden. Dieses Protein umfasst 1922 AS was zu einer Klonierungsstrategie führte, die drei Schritte umfasste. Es war auch nach zahlreichen Versuchen nicht möglich, das nsp3 Protein in seiner vollen Länge zu klonieren. Letztendlich wurden Konstrukte von Kooperationspartnern für die Reporterassays verwendet, die allerdings auch nur Teile des Gens umfassten (189, 204)(A.13).

Des Weiteren wurde festgestellt, dass die RT-PCR mit Primern, die spezifisch für ORF 7b waren (A.12), zur Amplifikation zwei verschiedener Produkte führte (Abb. 12). Literaturrecherchen ergaben, dass das SARS-CoV-Isolat aus Frankfurt (FFM-1) ausgehend von Passage drei in Zellkultur eine charakteristische Deletion in ORF 7b aufweist (195). Diese Deletion umfasst 45 Nukleotide (Nts: 27 654 – 27 698 von GenBank accession No. AY310120). Weiterführende Sequenzanalysen bestätigten diesen Zusammenhang. Es wurden also zwei Konstrukte von ORF 7b im Vektor pI.18-T7 hergestellt: pI.18-T7 ORF 7b und eine natürlich entstandene Deletionsmutante pI.18-T7 ORF 7b del (Abb. 12).

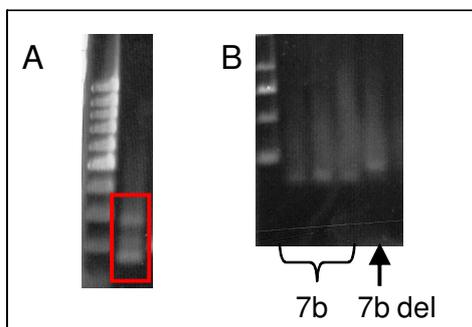


Abb. 12: Klonierung von ORF 7b und ORF 7b del
(A) RT-PCR von SARS-CoV-RNA mit ORF 7b spezifischen Primern (# 1864 und # 1865, A.12) Analyse der Produkte auf einem 2%igen Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung. (B) Restriktionsverdau der hergestellten Konstrukte zur Exzision des Inserts. Produkte der Klonierung der unter (A) erhaltenen RT-PCR-Fragmente, analysiert auf einem 2%igen Agarosegel.

4.1.2 Expressionsnachweis der hergestellten SARS-CoV-Genkonstrukte

Nur gegen einige der zu testenden Proteine waren Ak vorhanden, daher mussten für den Nachweis der Expression verschiedene Methoden verwendet werden. Viele Konstrukte beinhalten einen T7-RNA-Polymerase-Promotor und konnten somit unter Verwendung des in vitro-Transkriptions- und Translationssystems (IVT, 3.1.11) auf ihre Expressionsfähigkeit getestet werden. Gegen das Nukleoprotein (N-Protein), das Spike-Protein (S-Protein), ORF 7a und ORF 7b lagen Ak vor (A.11), sodass diese mittels Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen nachgewiesen werden konnten (3.4.2-4). Auch das Envelope-Protein (E-Protein) und die SARS-unique domain des nsp3 (SUD) konnten durch die Verwendung von Ak gegen das angehängte Flag- oder HA-Epitop nachgewiesen werden.

Für den Expressionsnachweis mittels radioaktiver in vitro-Transkription und Translation wurden entweder pcDNA3.1- oder pl.18-T7-Konstrukte verwendet. Die verwendete T7-RNA-Polymerase benötigt einen T7-Promotor für ihre Aktivität und dieser ist in beiden Konstrukten vorhanden.

Die verschiedenen ORFs wurden wie in 3.1.11 beschrieben transkribiert und translatiert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Trocknen des Gels mit dem Bio-Imager detektiert.

Mit dieser Methode konnten mit Ausnahme der pl.18-T7-Konstrukte des Membran-Proteins (M-Protein) und des ORFs 8b alle Proteine nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte Restethanol in den Maxipräparationen oder auch eine zu hohe Calciumkonzentration sein, was zur Reaktivierung der Mikrokokken-Nuklease und dem folgenden Abbau der DNA führen könnte. Trotz der Verwendung verschiedener DNA-Präparationen konnten beide Proteine nicht nachgewiesen werden.

Die Produkte aller anderen Genkonstrukte konnten nachgewiesen werden (Abb. 13). Die detektierten Proteine liefen zumeist auf der Höhe der unter Verwendung des „peptide-mass“-Berechnungsprogramms von ExPASy anhand der Aminosäuresequenz der Proteine errechneten Größen (www.expasy.org/tools/peptide-mass.html). Die experimentell ermittelten sowie die kalkulierten Werte der Größe der jeweiligen Proteine sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Abweichungen voneinander sind vermutlich auf Ungenauigkeiten zurückzuführen, die beim Abschätzen der Größen auf den getrockneten Gelen auftreten. Aufgrund der geringen Größe von ORF 7b del und ORF 8a konnten diese nur sehr schwach nachgewiesen werden. ORF 7a wurde aufgrund des geringen Methionin- und Cystein-Anteils (6 x Cys) nur sehr schwach markiert. Anhand der durch die IVT erhaltenen Daten wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Größen abgeschätzt.

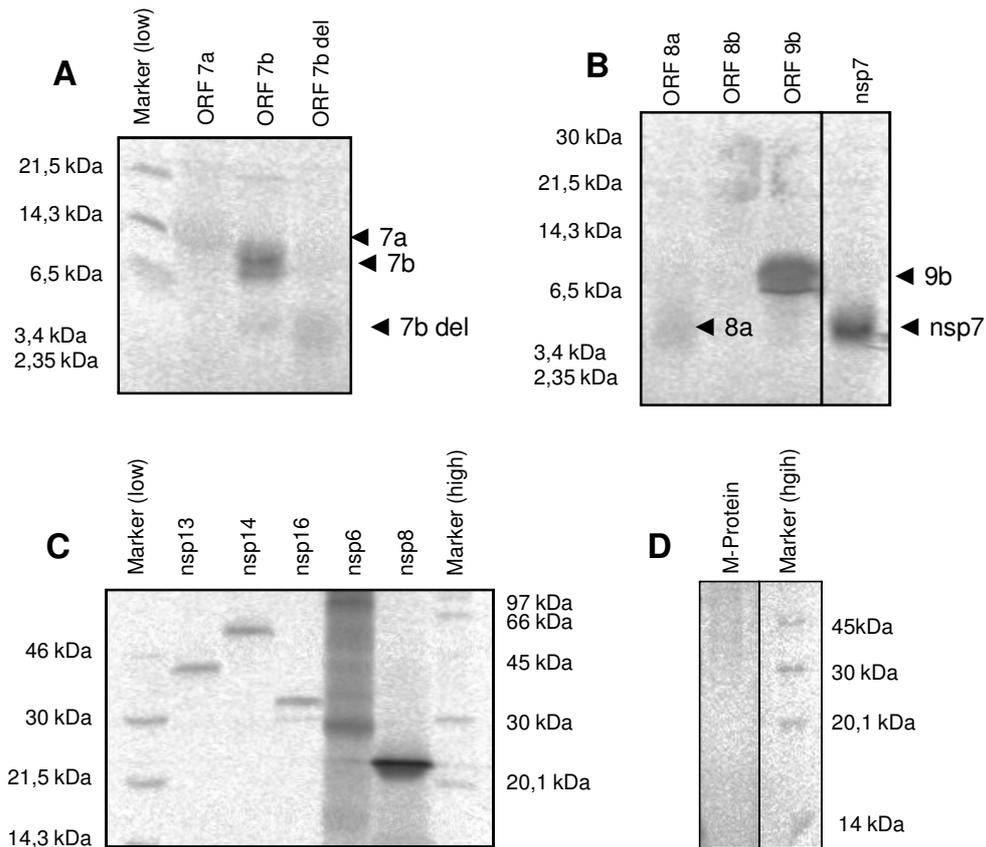


Abb. 13: Expressionskontrolle mittels in vitro-Transkription/Translation

Die SARS-CoV-Gene (im pl.18-T7 oder pcDNA3.1 Vektor, 0,5 µg) wurden unter Verwendung von ³⁵S-Met/Cys im zellfreien System transkribiert und translatiert (3.1.11). 3 µl des Translats wurden mittels SDS-PAGE (A, B 20%, C, D 15%) aufgetrennt, die Gele getrocknet und mit dem Bio-Imager analysiert (3.1.11). Als Marker dienten der Radioactive ¹⁴C-methylated Rainbow Marker (14,3 - 220 kDa, (high)) und der Low-Range Rainbow Molecular Weight Marker (2,35 - 45 kDa, (low)) (A.8).

SARS-CoV-ORFs	kalkulierte Proteingröße	experimentell ermittelte	SARS-CoV-ORFs	kalkulierte Proteingröße	experimentell ermittelte
nsp6	33 kDa	29 kDa	ORF 7b	5,3 kDa	7 kDa
nsp7	9 kDa	4 kDa	ORF 7b del	3,6 kDa	4 kDa
nsp8	22 kDa	22 kDa	ORF 8a	4,3 kDa	5 kDa
nsp13	35 kDa	42 kDa	ORF 8b	9,5 kDa	-----
nsp14	60 kDa	60 kDa	N-Protein	46 kDa	48 kDa
nsp16	30 kDa	32 kDa	ORF 9b	11 kDa	11 kDa
S-Protein	-----	200 / 140 kDa	1.1 SUD	43,4 kDa	48 kDa
E-Protein	-----	14 kDa	2.1 SUD	43,4 kDa	46 kDa
M-Protein	25 kDa	-----	3.3 SUD	48,8 kDa	51 kDa
ORF 7a	14 kDa	13 kDa	4.5 SUD	48,8 kDa	51 kDa

Tabelle 2: Proteingrößen ermittelt durch IVT und Western Blot-Analysen

Konstrukte, die mit einem Flag- oder HA-Epitop versehen waren, konnten, wie auch das N- und das S-Protein, ORF 7a und ORF 7b, im Western Blot beziehungsweise der Immunfluoreszenz-Analyse nachgewiesen werden. Die verwendeten Ak sind in einer Tabelle im Anhang (A.11) aufgeführt. Für diese Expressionsanalysen wurden 293-Zellen mit Lipofektamin 2000 (L2000) transfiziert und 48 Std. nach der Transfektion geerntet (3.2.5-6). Nach der Ernte wurden die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und die Membranen mit den jeweiligen Erst-Ak gefärbt. Die Detektion erfolgte dann mittels Röntgenfilmanalyse, da der Zweit-Ak an eine Peroxidase gekoppelt war.

Für die Immunfluoreszenz-Analysen wurden 293-Zellen mit L2000 transfiziert und nach 48 Std. Inkubationszeit mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden wie unter 3.4.4 beschrieben permeabilisiert und mit den jeweiligen Ak (A.11) gefärbt. Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI, einer Verbindung die sich bevorzugt in AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA einlagert, verwendet. Wie in den folgenden Abbildungen gezeigt, konnten die verschiedenen Proteine durch die Verwendung spezifischer Ak in transfizierten Zellen eindeutig detektiert werden.

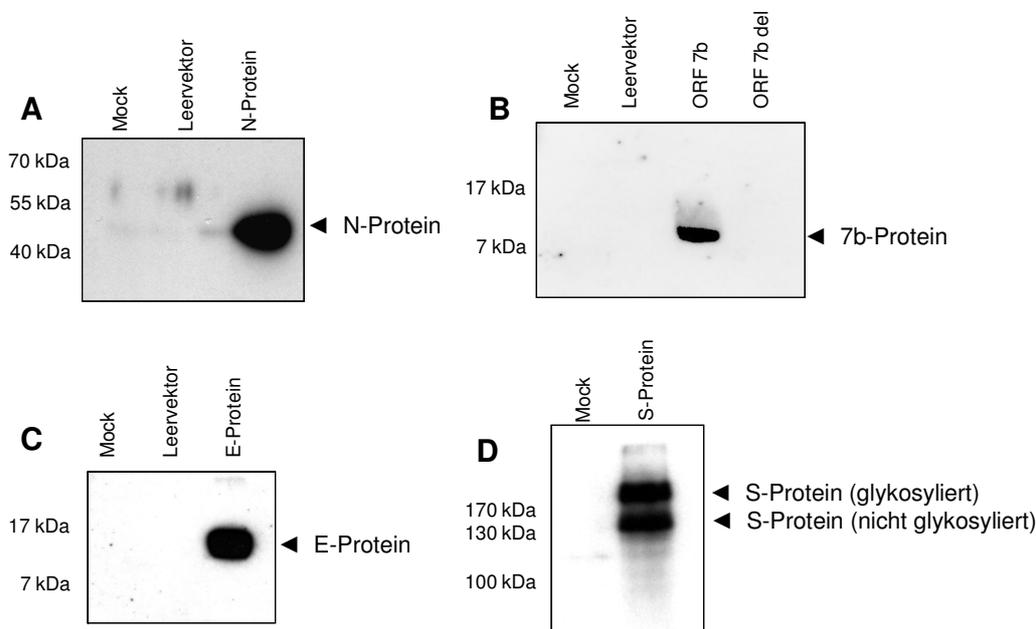


Abb. 14: Expressionskontrolle mittels Western Blot-Analysen

40% konfluente 293-Zellen wurden unter Verwendung von Lipofectamine 2000 mit 1 µg der jeweiligen Konstrukte transfiziert (3.2.5). Die Analyse von 20 µl des Lysates (3.2.6) mittels SDS-PAGE ((**A**) 10%, (**B**) 20% + 8M Harnstoff, (**C**) 20%, (**D**) 8%) erfolgte nach 48 Std.. Als Marker dienten der PageRuler Prestained Protein Ladder und der Prestained Protein Marker, Broad Range. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert (3.4.1-3) und mit folgenden Ak detektiert: A: anti-SARS-CoV-N-Protein (Kaninchen), B: anti-ORF 7b (Kaninchen), C: anti-Flag-M2 (Maus) und D: anti-S-Protein (Kaninchen)(A.11). Die Detektion der Erst-Ak erfolgte mit Peroxidase gekoppelten Zweit-Ak aus der Ziege gerichtet gegen die jeweilige Spezies.

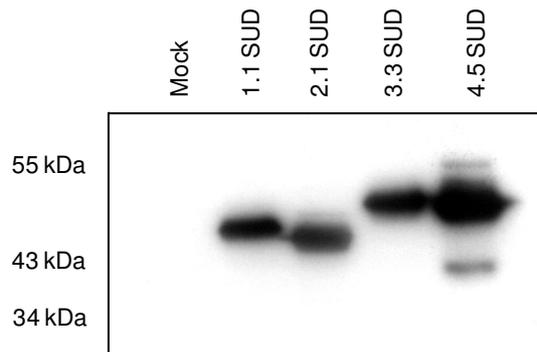


Abb. 15: Expressionskontrolle der SUD-Konstrukte mittels Western Blot-Analyse

Die Proteine wurden wie beschrieben (Abb. 14) auf einem 10%igen SDS-PAG nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mit den Ak anti-Maus-HA und Ziege-anti-Maus-POD (A.11). Der Laufunterschied der Konstrukte 1.1 und 2.1 zu den Konstrukten 3.3 und 4.5 lässt sich durch die zusätzlichen Nukleotide im N- und C-terminalen Bereich erklären (A.13).

4.1.3. Analysen zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-nsp

Eine Tabelle im Anhang (A.13) umfasst die für die Reporterassays verwendeten Konstrukte, deren Herstellung und deren Herkunft. Es wurden alle Nicht-Strukturproteine (nsp) und alle offenen Leserahmen (ORF) des SARS-CoV mit Ausnahme des nsp11 für diesen Versuchsteil verwendet. nsp11 umfasst nur 13 AS und schien somit nicht relevant für unsere Untersuchungen zu sein.

293M-Zellen wurden unter Verwendung der Calciumphosphat-Methode wie unter 3.2.4 beschrieben mit den Reporter-Gen-Konstrukten (Reporter: pHISG54-Firefly-Luziferase; Expressionskontrolle, da konstitutiv exprimiert: pRL-SV40 Renilla-Luziferase) sowie den zu testenden nsp transfiziert. Von zwei identischen Ansätzen wurde je einer nach 24 Std. mit Sendai-Virus (SeV) infiziert, um die Induktion der Typ-I-IFN-Antwort auszulösen. Das führte zur verstärkten Transkription und Translation von Genen, die sich unter der Kontrolle sogenannter „interferon stimulated genes“- (ISG) Promotoren befinden. Ist ein exprimiertes Protein in der Lage diese Induktion zu hemmen, so wird die Expression des Reporter-Proteins (Firefly-Luziferase) nicht mehr durch SeV induziert. In diesem Fall kann durch die Verwendung dieses Dual-Luziferase-Reporterassays die Hemmfähigkeit eines exprimierten Proteins bezüglich der Induktion des Interferon-Systems gemessen werden. Auf der anderen Seite können mit Expressionsplasmiden transfizierte Zellen, die nicht mit Sendai-Virus infiziert wurden, Aufschluss darüber geben, ob die Expression eines bestimmten Proteins ausreicht die IFN-Antwort zu induzieren.

24 Std. nach der Infektion mit SeV (3.3.3) wurden die Zellen lysiert und die Firefly- und Renilla-Luziferase-Aktivität anhand eines Dual-Luziferase-Assays bestimmt

(3.4.5). Nach der Normalisierung der erhaltenen Firefly-Luziferase-Werte mit den entsprechenden Renilla-Luziferase-Werten, die die Transfektionseffizienz sowie die zelluläre Proteinsynthese widerspiegeln (dargestellt in Abb. 16A), wurde die Induktion der Typ-I-IFN-Antwort graphisch dargestellt (Abb. 16B).

Dargestellt ist pro Ansatz jeweils der Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen. Um den Vergleich der einzelnen Proben untereinander zu ermöglichen, wurde die Negativkontrolle (transfiziert mit Leervektor und ohne SeV-Infektion) gleich 1 gesetzt. Als Positivkontrolle zur Induktion des Typ-I-IFN-Systems wurden Zellen verwendet, die mit einem Leervektor transfiziert und durch die folgende SeV-Infektion stimuliert wurden (Spur 3 der Abb. 16B). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert aber dann nicht mit SeV infiziert wurden und somit den nicht induzierten Grundzustand der Typ-I-IFN-Antwort repräsentieren (Abb. 16B Spur 2). Das VP35-Protein von Ebola-Virus Zaire (ZEBOV), welches die Fähigkeit besitzt das Typ-I-IFN-System zu hemmen (11), wurde als Positivkontrolle transfiziert (Abb. 16B Spur 1).

Die Expression der nsp hatte keinen signifikant inhibitorischen Effekt auf die durch SeV induzierte Typ-I-IFN-Antwort (schwarze Balken in Abb. 16B).

Durch die Transfektion der N-terminalen Domäne des nsp3 konnte die Induktion des IFN-Systems um den Faktor 1,7 reduziert werden, ohne dass gleichzeitig die Transfektionseffizienz der Zellen stark reduziert war, wie es z. B. bei nsp2 zu beobachten war (Abb. 16A). Da der bei nsp3 beobachtete Effekt sehr schwach ausgeprägt war, wurde er, nicht zuletzt aufgrund des Vergleichs mit der durch VP35 verursachten Hemmung, als nicht signifikant bewertet.

Die nicht mit SeV infizierten Zellen (graue Balken in Abb. 16B) zeigten im Falle von nsp1 eine verstärkte Induktion des IFN-Systems, was allerdings auf die sehr niedrigen Renilla-Luziferase-Werte zurückzuführen ist. Diese spiegeln entweder eine schlechte Transfektionseffizienz oder eine generelle Hemmung der Wirtszellproteinsynthese wider. Im Fall von nsp1 ist dieser Effekt vermutlich auf die Fähigkeit des Proteins die Wirtszellproteinsynthese zu hemmen, indem es den Abbau von mRNAs unterstützt, zurückzuführen (99). Neben nsp1 wurde auch bei verschiedenen anderen nsp (nsp2, SUD, nsp5 und nsp15) eine gewisse Cytotoxizität, die sich in einer geringen Renilla-Luziferase-Aktivität widerspiegelte, festgestellt (Abb. 16A). Diese Beobachtungen konnten aber bisher auf keine spezielle Funktion der einzelnen Proteine zurückgeführt werden. Es wird deshalb

vermutet, dass die Überexpression dieser Proteine toxisch für die transfizierten Zellen ist.

Im Falle der SUD ist hier nur das Ergebnis eines der sechs verschiedenen Konstrukte dargestellt (II.3). Alle anderen zeigten aber das gleiche Ergebnis.

Die hohen Renilla-Werte, die durch die Transfektion von nsp10 ausgelöst werden, könnten auf einen allgemein verstärkenden Effekt auf die Transkription durch dieses Protein hindeuten. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass es sich bei nsp10 vermutlich um einen Transkriptionsfaktor handelt. Es wurden zwei Zink-Finger in der monomeren Struktur dieses Proteins identifiziert, sodass man davon ausgeht, dass es die SARS-CoV- Replikation/Transkription unterstützt (97, 184).

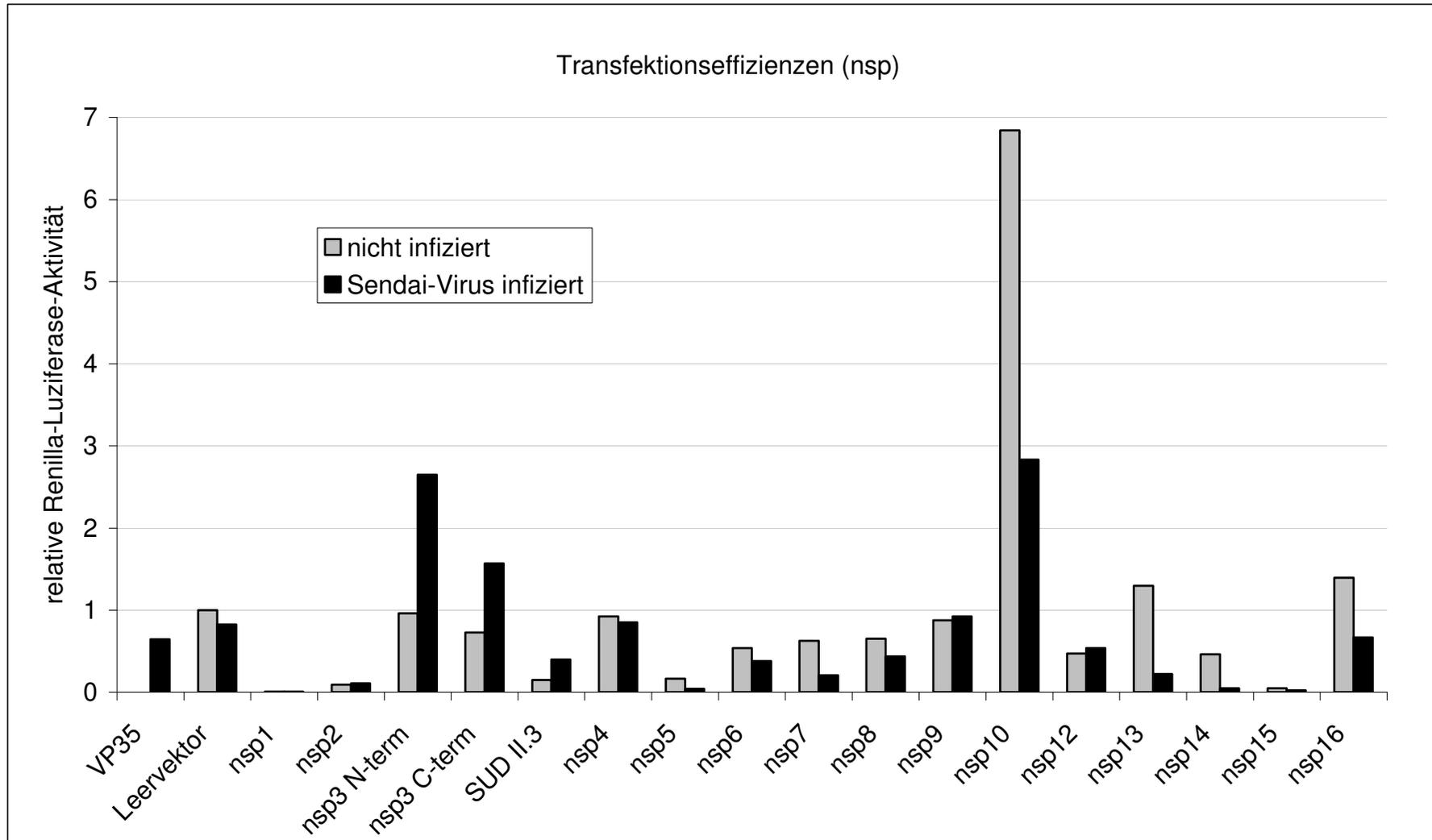


Abb. 16A: Renilla-Luziferase-Werte zu den Tests zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-nsp
Die Werte spiegeln zum einen die Transfektionseffizienz und zum anderen die Effizienz der Wirtszellproteinsynthese wider.

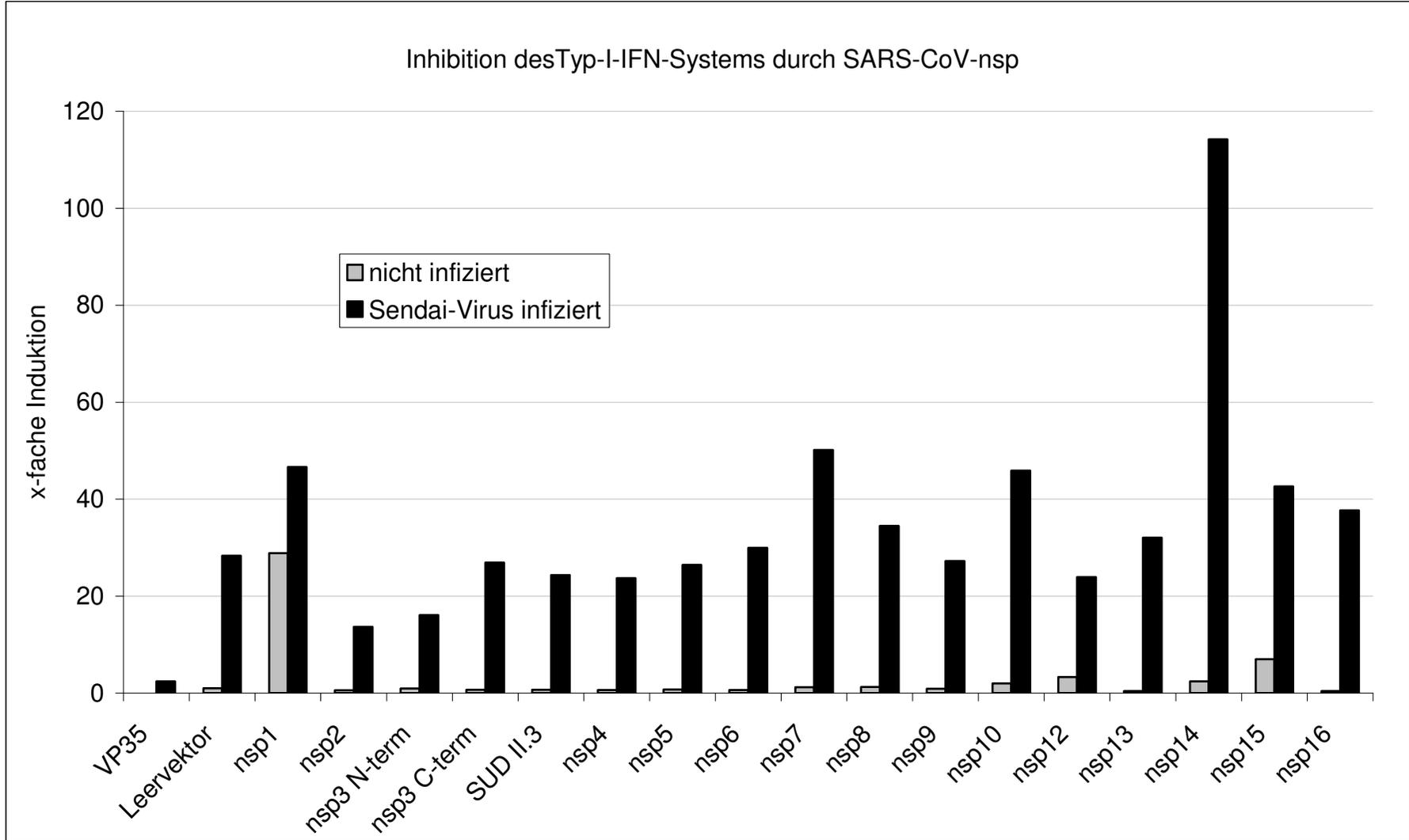


Abb. 16B: Tests zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-nsp

Abb. 16: Tests zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-nsp

10^6 293M-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Transfektion mit jeweils 0,3 μg der Reporterplasmide pHISG54-Luz und pRL-SV40 und 4 μg des jeweiligen Expressionsplasmids transfiziert (Tab. 8). Als Kontrollen wurden das Plasmid pcDNA3.1-VP35_{EBO} (Tab. 7) und ein passender Leervektor eingesetzt. 24 Std. nach der Transfektion erfolgte eine SeV-Infektion (20 hämagglutinierende Einheiten) und weitere 24 Std. später die Ernte der Zellen in Passive-Lysis-Puffer (PLB)(3.4.5). Die nicht infizierten Proben sind in grau und die SeV-infizierten Proben in schwarz dargestellt. Es folgte die Analyse mittels eines Dual-Luziferase-Assays. Die Firefly-Reporteraktivitäten wurden mit den Renilla-Werten (**A**, Transfektionseffizienzen), normalisiert. Die erhaltenen Werte wurden dann in Bezug zur Leervektor-Kontrolle, die gleich 1 gesetzt wurde, gebracht. Zu sehen ist demnach die Transfektionseffizienz der einzelnen Ansätze (**A**) und die nach der Normalisierung erhaltenen relativen Werte für die Induktion des Typ-I-IFN-Systems (**B**).

4.1.4 Analysen zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-ORFs

Die Strukturproteine und zusätzlichen ORFs des SARS-CoV wurden innerhalb des unter 4.1.3 beschriebenen Assays auf ihre Fähigkeit untersucht die Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch SeV zu hemmen.

Auch innerhalb dieser Versuchsreihen war kein hemmender Effekt der getesteten Proteine auf die Induktion des IFN-Systems zu beobachten (Abb. 17 unten, schwarze Balken). Die durch SeV induzierte IFN-Antwort war bei den meisten ORFs auf dem gleichen Level wie bei Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren. Nur bei den Proteinen ORF 8a, ORF 8b und bei dem Nukleoprotein war eine Reduktion dieser Induktion um den Faktor 2 zu beobachten. Diese „Hemmfähigkeit“ bezüglich des IFN-Systems ist allerdings nicht annähernd so gut ausgeprägt wie bei der verwendeten Positivkontrolle, dem VP35, welches die Induktion um den Faktor 10 bis auf das Niveau der Negativkontrolle absenkt (Abb. 17, Spur 1).

Auch innerhalb dieser Versuchsreihe scheint die Überexpression einiger Proteine (S-Protein, E-Protein und ORF 6) toxisch für die verwendeten Zellen zu sein. Das kann im Falle des S-Proteins mit der durch die Überexpression ausgelösten Induktion der sogenannten „unfolded protein response“ zusammen hängen (28, 203).

Die Transfektion von ORF 8b führte zu einer verstärkten Expression des pRL-SV40-Konstruktes in den nicht infizierten Zellen, was allerdings keiner Funktion des Proteins zugeschrieben werden konnte.

Des Weiteren führte die Überexpression von ORF 7a und 7b zur Induktion des Typ-I-IFN-Systems um den Faktor 6 bzw. 11 im Vergleich zum Leervektor. Interessanterweise wurde diese Induktion nicht bei der Transfektion der Deletionsmutante von ORF 7b beobachtet (Abb. 17 unten).

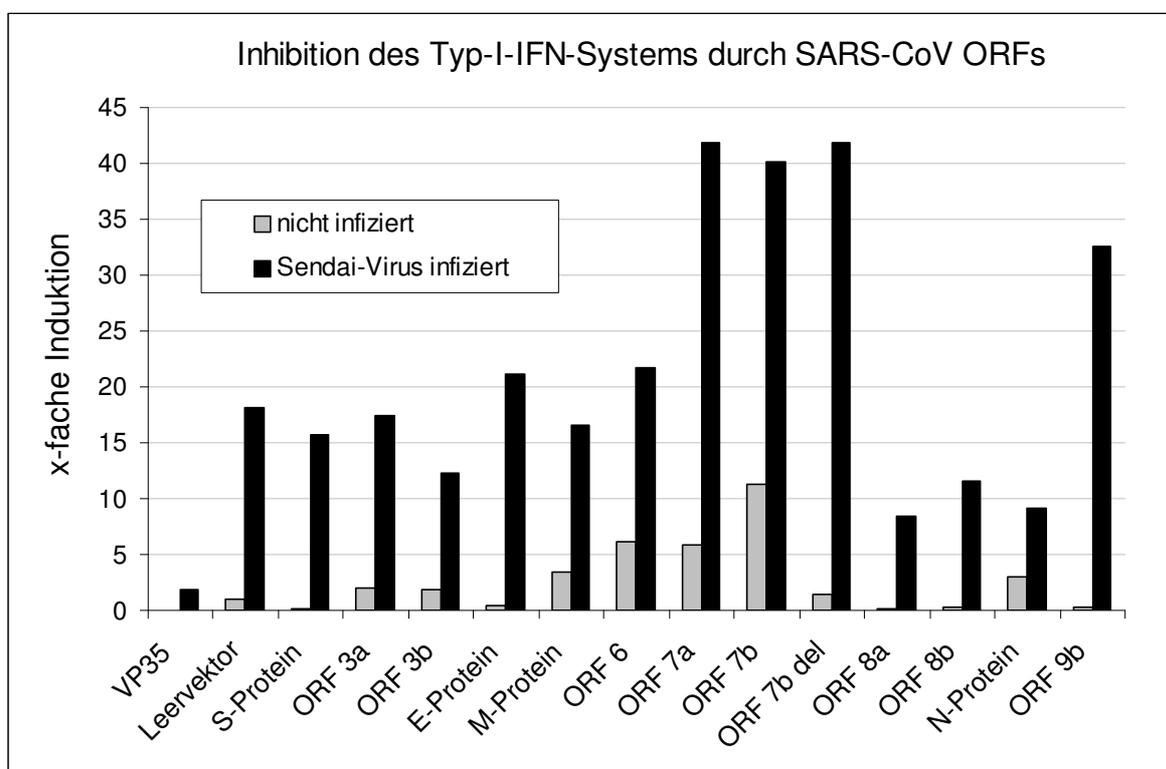
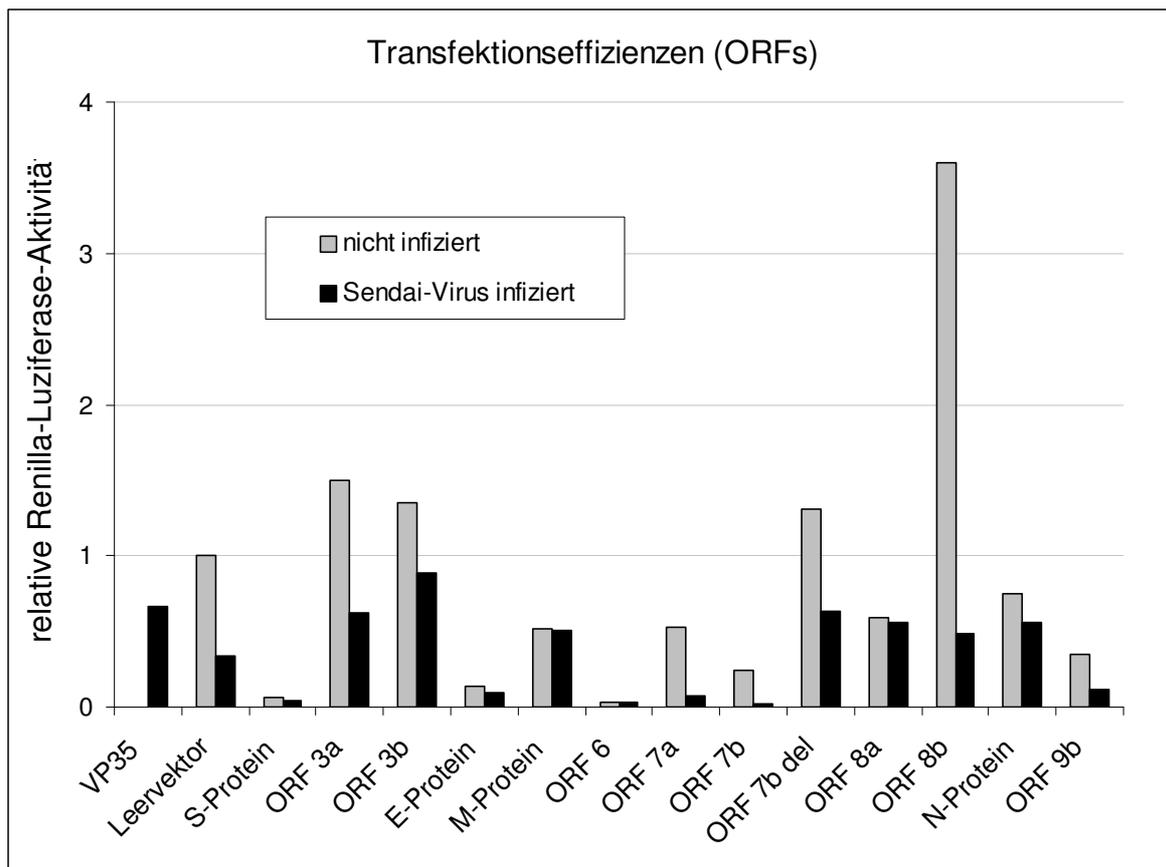


Abb. 17: Tests zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch SARS-CoV-ORFs

Methodik wie unter Abb. 16 beschrieben. Dargestellt sind hier die Ergebnisse, erhalten durch die Transfektion der Strukturproteine und der zusätzlichen ORFs des SARS-CoV, bezüglich der Inhibition des Typ-I-IFN-Systems.

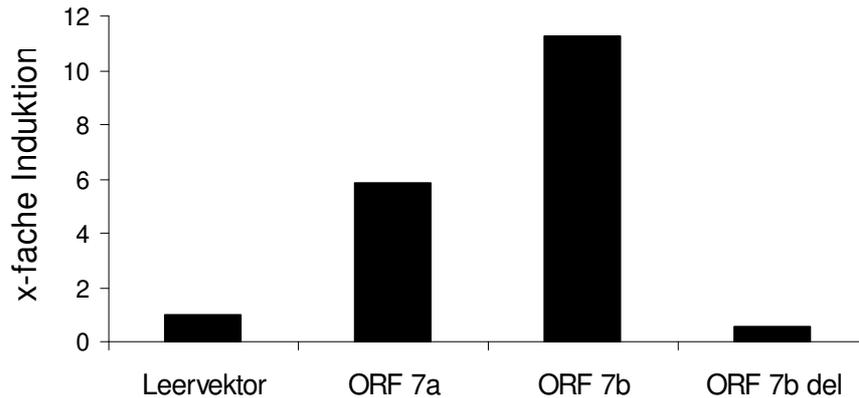


Abb. 18: Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch ORF 7a und ORF 7b

Dieser Auszug aus Abb. 17 zeigt deutlich die Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch die Transfektion von ORF 7a- und ORF 7b-exprimierenden Plasmiden, wohingegen die Transfektion eines Leervektors und der natürlich vorkommenden Deletionsmutante von ORF 7b keine Induktion hervorrufen.

Zusammenfassung

In dem durchgeführten Reporterassay war keines der getesteten nsp oder ORFs in der Lage, die durch SeV induzierte IFN-Antwort in 293M-Zellen zu inhibieren. Einige Proteine (N-Protein, ORF 8a und 8b) zeigten zwar die Fähigkeit, die IFN-Antwort zu reduzieren, doch diese war verglichen mit dem Kontrollprotein VP35 (ZEBOV) nur sehr schwach ausgeprägt (Faktor 2).

Interessant war die Beobachtung, dass das SARS-CoV-Isolat FFM-1 eine natürliche Deletion von 45 Nukleotiden im ORF 7b umfasst. Dieser ORF konnte mittels RT-PCR amplifiziert und in zwei verschiedenen „Ausführungen“, mit und ohne Deletion, kloniert werden. Weitere Untersuchungen zur Bedeutung dieser zellkulturadaptierten Mutation könnten interessante Einblicke in den Selektionsdruck auf Coronaviren und die folgende rasche Anpassung bieten. Ein erster Ansatzpunkt ist die beobachtete Induktion des Typ-I-IFN-Systems durch ORF 7a und ORF 7b, allerdings nicht durch die Deletionsmutante ORF 7b del (Abb. 18).

4.2 Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch SARS-CoV

SARS-CoV-Infektionen verursachen gravierende Schäden in den oberen sowie den unteren Atemwegen und führen meist zu Lymphopenien und Thrombozytopenien (32, 148, 218). Autopsien von verstorbenen Patienten zeigten in infizierten Geweben der Lunge, der Milz und der Schilddrüse Zeichen von Apoptose (227). Diese Beobachtungen legten nahe, dass die Regulierung von Apoptose während der Infektion wichtig für die Vermehrung und Pathogenese von SARS-CoV sein könnte. Daher wurden, wie im Folgenden beschrieben, verschiedene Wege zur Induktion von Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen untersucht.

4.2.1 Induktion von Apoptose durch SARS-CoV in Zellkultur

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die Infektion mit SARS-CoV zur Induktion von Apoptose in 293/ACE2- und Vero-Zellen führt. Als Kontrolle fungierten zumeist das SeV, Stamm Cantell, und das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV), Stamm Indiana. Diese Viren sind dafür bekannt, dass sie nach der Infektion sehr schnell Apoptose in den betroffenen Zellen auslösen (18, 125). Für die folgenden Versuche wurden jeweils 4×10^4 Vero-Zellen zur Detektion der Spaltung von Caspase 3 und 8 (Abb. 19) und der mRNA- sowie der Proteinlevel von Bcl2 und Bax (Abb. 21, 22) ausgesät. Zur Detektion von gespaltenem PARP wurden je 4×10^4 293/ACE2-Zellen (Abb. 23) verwendet. Die Zellen wurden einen Tag nach dem Aussäen mit den jeweiligen Viren SARS-CoV, SeV oder VSV infiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten zum Nachweis von Caspase 3 oder 8, Bcl2 oder Bax und PARP im Western Blot oder zum Nachweis zellulärer RNA von Bcl2 und Bax mittels RT-PCR.

Die Aktivierung von Caspasen als zentrales Element der Apoptose wurde durch die Detektion von gespaltenen Caspase 3 und 8 im Western Blot untersucht. Ebenfalls mittels Western Blot-Analysen wurde als spät auftretendes Kennzeichen von Apoptose die Spaltung der „poly-ADP-ribose-polymerase-1“ (PARP) detektiert.

Der mitochondriale Weg zur Induktion von Apoptose wurde durch die Detektion der mRNA- und der Proteinlevel des anti-apoptischen Proteins Bcl2 und des pro-apoptischen Proteins Bax untersucht. Hierbei diente Camptothecin als

Positivkontrolle. Dieser Wirkstoff inhibiert die DNA Topoisomerase-1, was zur Induktion von Apoptose über den mitochondrialen Weg führt (Abb. 9).

Vero-Zellen wurden mit infektiösem bzw. UV-inaktiviertem SARS-CoV oder SeV infiziert und nach 48 bzw. 72 Std. in Chaps-Puffer (3.2.6) geerntet. Das Proteingemisch wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um im folgenden Western Blot die Caspasen 3 und 8 und deren durch Aktivierung entstehende Spaltprodukte nachzuweisen.

Abbildung 19 verdeutlicht, dass die Kontrollinfektion mit SeV bereits nach 48 Std. und auch nach 72 Std. eine Spaltung von Caspase 8 und 3 auslöst. In Zelllysaten der nicht infizierten Zellen (Mock) war keine eindeutige Spaltung der Caspasen detektierbar. Nach 72-stündiger Inkubation trat in den nicht infizierten und in den mit UV-inaktiviertem Virus behandelten Zellen eine schwache Hintergrund-Spaltung von Caspase 8 auf.

Im Falle des SARS-CoVs ist 48 h p.i. nur eine sehr schwache Spaltung von Caspase 8 und 3 zu sehen, nach 72 Std. allerdings sieht man eine deutliche Spaltung der beiden Caspasen. Die Bindung von SeV bzw. SARS-CoV an die Zellen reicht für diese Induktion nicht aus, da in Zellen, die mit UV-inaktivierten Virus infiziert wurden, keine Aktivierung der Caspasen detektiert werden konnte.

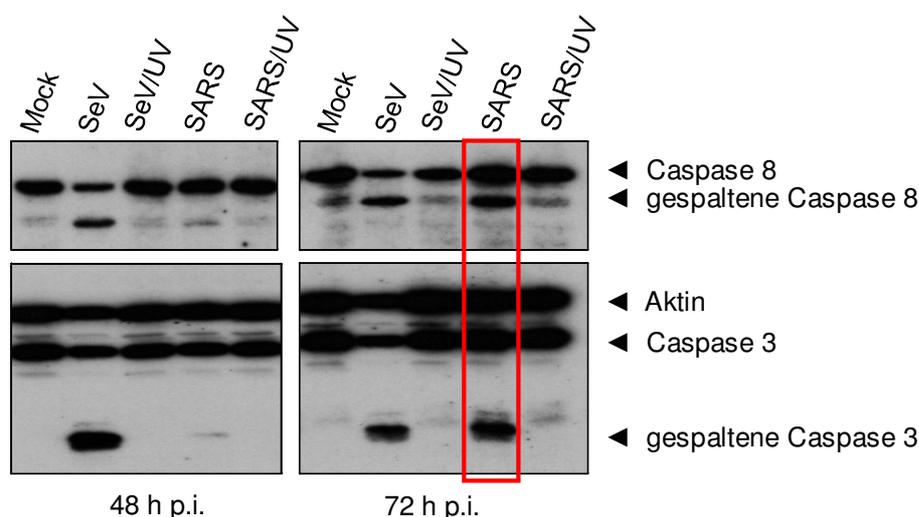


Abb. 19: Spaltung von Caspase 3 und 8 durch SARS-CoV

Vero-Zellen wurden mit SARS-CoV (MOI = 1) oder SeV (10 hämagglutinierende Einheiten) infiziert (3.3.3). Die UV-Behandlung erfolgte mit der vorbereiteten Virusverdünnung in einem 6-well-Gefäß für 10 Min. bei einer Wellenlänge von 254 nm. 48 oder 72 h p.i. wurden die Zellen in Chaps-Puffer durch dreimaliges Frieren und Tauen geerntet (3.2.6), auf einem 15%igen SDS-PAG aufgetrennt und mittels Western Blot-Analysen untersucht. Detektiert wurde die Spaltung der Caspasen mit einem Kaninchen-anti-Caspase 3 oder einem Kaninchen-anti-Caspase 8 Erst-Ak und dem Ziege-anti-Kaninchen-HRP-Ak (A.11).

Parallel zur Western Blot-Analyse wurde die Infektionsrate der Zellen mit SeV und SARS-CoV mittels Immunfluoreszenz-Analysen bestimmt. Die Zellen wurden dafür zeitgleich zu den Ernten für die Western Blot-Analysen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert (3.4.4), um anschließend mit den Virus-spezifischen Ak (A.11) gefärbt zu werden. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

Die Infektionsraten der Zellen sind Abbildung 20 zu entnehmen. Während SeV zu beiden Zeitpunkten alle Zellen infizieren konnte (B), waren 48 h p.i. ungefähr 50% und 72 h p.i. ungefähr 70% der Zellen mit SARS-CoV infiziert (A). Die Immunfluoreszenzen der Zellen, die mit UV-inaktiviertem Virus infiziert worden waren, zeigten nur einige rote Punkte, bei denen es sich vermutlich um Virusaggregate des Inokulums handelte.

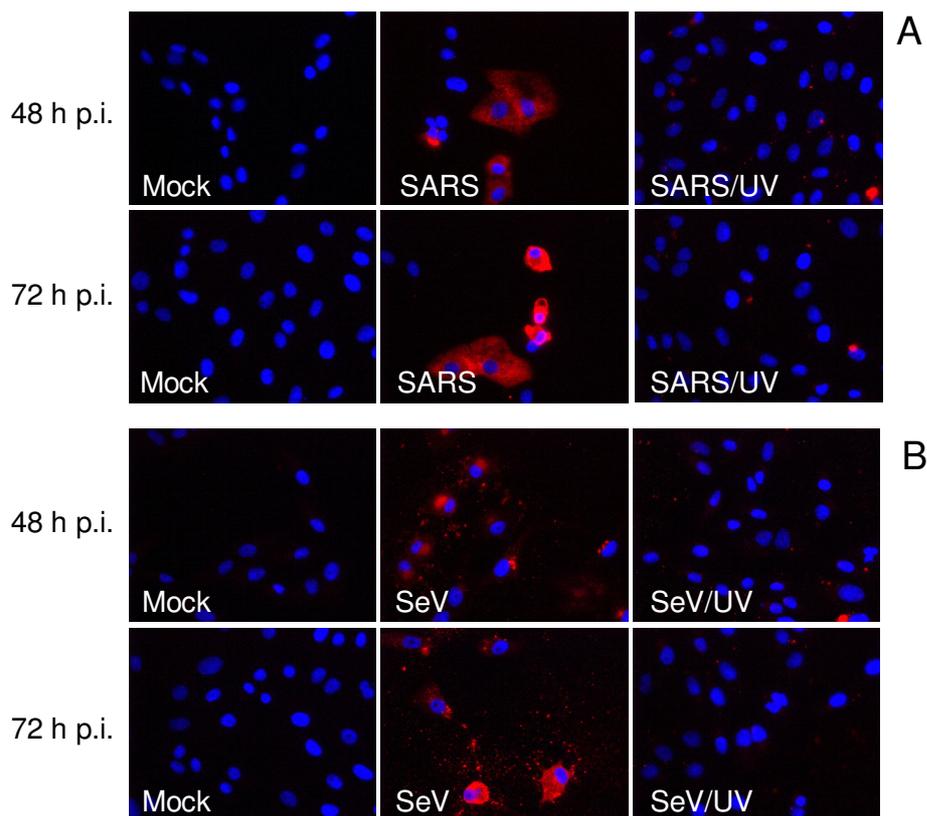


Abb. 20: Infektionskontrolle

Die, wie unter Abb. 19 beschrieben, infizierten Zellen wurden 48 und 72 h p.i. für mindestens 12 Std. mit 4% PFA fixiert und aus dem BSL4-Labor ausgeschleust. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,1% Triton X-100 (3.4.4) und die Färbung der infizierten Zellen mit einem Kaninchen-anti-SARS-NP bzw. einem Kaninchen-anti-SeV Erst-Ak, der dann mit einem Esel-anti-Kaninchen-Cy3 Ak (A.11) detektiert wurde. Eine DAPI-Färbung diente der Visualisierung der Zellkerne. Gezeigt sind Immunfluoreszenzbilder aufgenommen in Öl und mit einer 40-fachen Vergrößerung.

Um den mitochondrialen Weg zur Induktion von Apoptose näher zu untersuchen, wurden die mRNA- sowie die Proteinlevel von Bcl2 und Bax in SARS-CoV-infizierten Zellen analysiert. Hierzu wurden Vero-Zellen wie oben beschrieben mit SeV oder SARS-CoV infiziert oder mit Camptothecin behandelt. Die Ernte erfolgte entweder mit RLT-Puffer für die RNA-Isolierung (3.1.3) oder mit CLP zur Proteindetektion mittels Western Blot-Analysen (3.2.6, 3.4.2).

Die isolierte RNA wurde mittels RT-PCR unter Verwendung GAPDH-, Bax- und Bcl2-spezifischer Primer (A.12) amplifiziert (3.1.2) und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

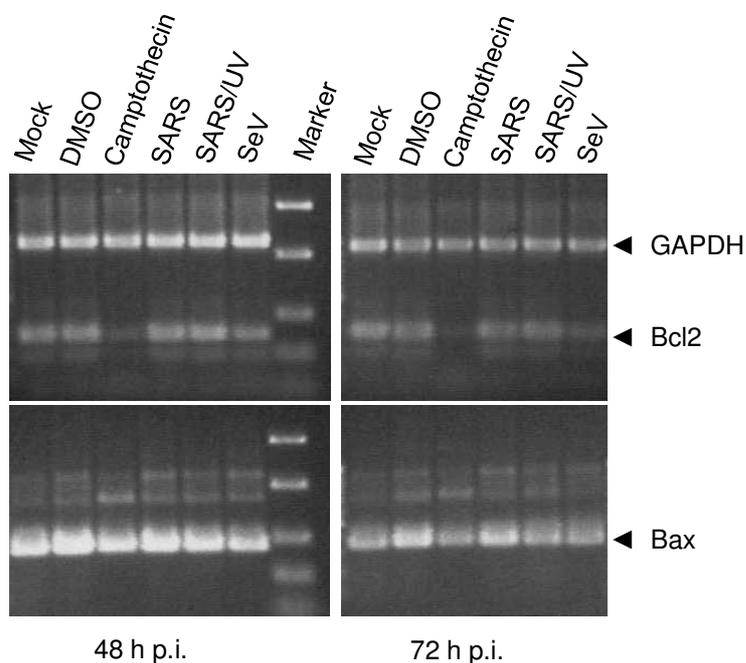


Abb. 21: mRNA-Level von Bcl2 und Bax in SARS-CoV-infizierten Zellen

Aus den, wie unter Abb. 19 beschrieben, infizierten Zellen wurde 48 und 72 h p.i. die Gesamt-RNA isoliert. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 4 μ M Camptothecin behandelt. DMSO als Lösungsmittel dieses Wirkstoffs wurde als Negativkontrolle ebenfalls in die Untersuchungen eingeschlossen. Beide Substanzen wurden parallel zur Infektion in das Medium der Kontrollzellen gegeben. Ein Achtel der isolierten RNA wurde mittels RT-PCR unter Verwendung von Bcl2- (# 1735, # 1736), Bax- (# 1768, # 1769) und GAPDH- (# 1770, # 1771) spezifischen Primern analysiert (A.12). Ein Zehntel der erhaltenen Produkte wurde auf einem 2%igen TAE-Agarosegel nach Ethidiumbromid-Färbung analysiert. Der Versuch wurde dreimal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

Abbildung 21 zeigt, dass die Menge der detektierten GAPDH-mRNA in allen Proben vergleichbar ist, sodass davon ausgegangen wird, dass nahezu gleiche Mengen an RNA analysiert wurden. Die Menge an detektierter Bcl2-mRNA nahm in Zellen, die mit Camptothecin behandelt wurden, sehr deutlich ab. Auch in SeV-infizierten Zellen war dieser Effekt, wenn auch nicht so stark ausgeprägt, sichtbar. Die Menge der

mRNA des pro-apoptischen Proteins Bax hingegen blieb in allen Proben nahezu konstant. Nach 72-stündiger Inkubation wurden Schwankungen der Bax-mRNA Mengen beobachtet. Allerdings war nur in Camptothecin-behandelten Zellen weniger RNA zu detektieren als in nicht infizierten Zellen (Mock). Das kann allerdings auf den allgemein sehr schlechten Zustand dieser Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit Camptothecin zurückzuführen sein.

Die mRNA-Level von Bcl2 und Bax in SARS-CoV-infizierten Zellen zeigten keine signifikante Veränderung verglichen mit nicht infizierten Zellen. Die Level der mRNAs von Bcl2 und Bax scheinen also durch eine Infektion von Zellen mit SARS-CoV nicht beeinflusst zu werden.

Da viele Regulationsmechanismen wie z.B. Einflüsse auf die Translation nicht die mRNA- aber dafür die Proteinmengen in Zellen verändern, wurden im Folgenden die Proteinlevel von Bcl2 und Bax untersucht.

Die Proteine der in CLP geernteten Zellen (3.2.6) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgten Western Blot-Analysen zum Nachweis von Bcl2, Bax und Aktin unter Verwendung des Odyssey-Systems (3.4.3). Im „Normalzustand“ der Zelle herrscht zwischen beiden Proteinen ein Gleichgewicht; wird nun die Menge an Bcl2 reduziert, führt das zur Induktion von Apoptose.

Abbildung 22 zeigt in den Kontrollen mit Camptothecin und SeV eine Verschiebung des Gleichgewichts der beiden Proteine nach 48h. Die Menge an Bcl2 (grün, untere Bande) nimmt in beiden Fällen ab, wohingegen die Menge an Bax (rot) relativ stabil bleibt. Da allerdings die apoptotischen Prozesse 72 h p.i. sehr weit fortgeschritten ist, nehmen auch die Proteinmengen von Bax und Aktin in diesen Zellen ab.

Mit SARS-CoV infizierte Zellen zeigen den gleichen Phänotyp wie nicht infizierte (Mock) oder mit DMSO behandelte Zellen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass eine SARS-CoV Infektion von Vero-Zellen die Proteinlevel von Bcl2 und Bax nicht wesentlich beeinflusst.

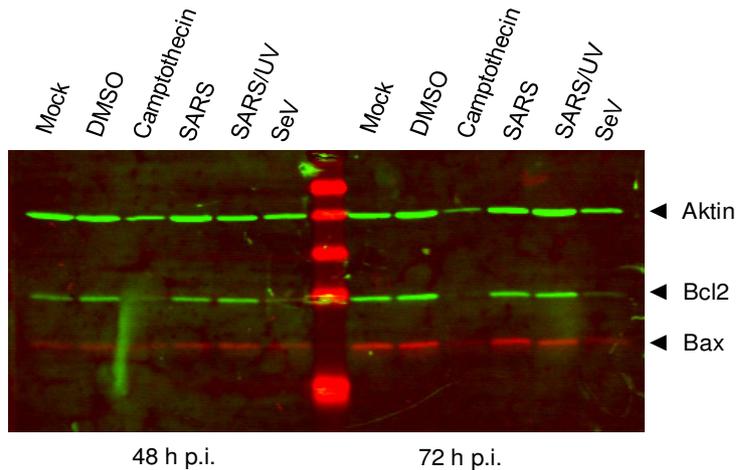


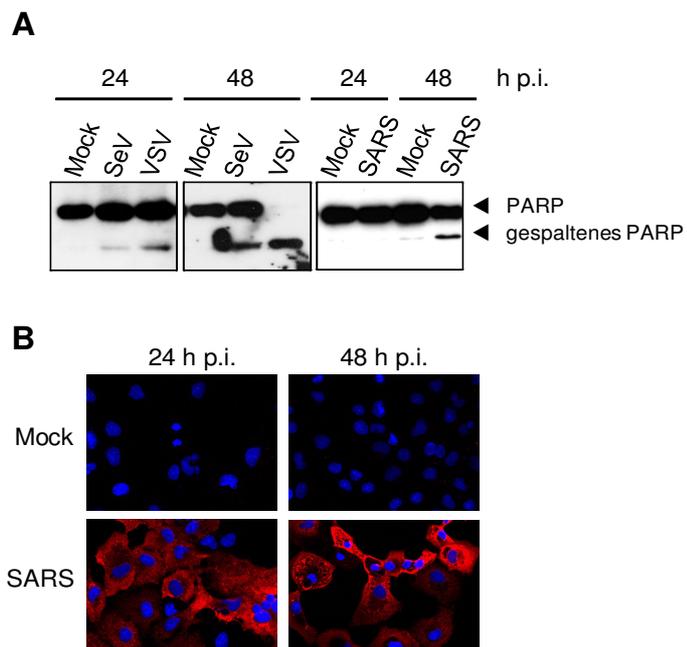
Abb. 22: Proteinlevel von Bcl2 und Bax in SARS-CoV-infizierten Zellen

Die, wie unter Abb. 19 und Abb. 21 beschrieben, infizierten und Camptothecin-behandelten Zellen wurden 48 und 72 h p.i. in CLP lysiert (3.2.6) und auf einem 15%igen SDS-PAG analysiert. Zur Detektion wurden Maus-anti- β -Aktin, Maus-anti-Bcl2 und Kaninchen-anti-Bax Erst-Ak verwendet, die dann mit den Ziege-anti-Maus-IRDye800 oder dem Ziege-anti-Kaninchen-IRDye680 detektiert wurden (A.11). Die Analyse erfolgte unter Verwendung des LI-COR Odyssey Infrared Imaging System.

Um eine weitere Zelllinie in die Untersuchungen mit einzubeziehen wurden 293-Zellen, die den Rezeptor des SARS-CoV, das Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), stabil exprimieren, bezüglich der Induktion von Apoptose durch SARS-CoV untersucht. Für 24 bzw. 48 Std. wurden diese Zellen mit SARS-CoV, VSV und SeV infiziert, bevor sie in CLP lysiert und auf die Spaltung von PARP untersucht wurden. Hierzu wurde ein Ak, der die ungespaltene Form wie auch das große Spaltfragment von PARP detektieren kann, verwendet.

Abb. 23: PARP-Spaltung in SARS-CoV-infizierten Zellen

(A) 293/ACE2-Zellen infiziert mit VSV (MOI 0,01), SeV (20 hämaggl. Einheiten) oder SARS-CoV (MOI 0,01) wurden 24 und 48 h p.i. in CLP lysiert (3.2.6) und auf einem 8%igen SDS-PAG aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem Kaninchen-anti-PARP Ak und einem HRP-Zweit-Ak.
(B) Auf Deckgläschen gewachsene 293/ACE2-Zellen wurden wie unter A beschrieben infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten einer IFA (3.4.4) zugeführt. Die Detektion infizierter Zellen erfolgte mit einem Kaninchen-Antiserum gegen das NP des SARS-CoV (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).



Wie in Abbildung 23 (A) dargestellt, führt die Infektion von 293/ACE2-Zellen mit SeV und VSV zur Spaltung von PARP. Dieser während der Apoptose spät auftretende Prozess ist bereits 24 h p.i. schwach detektierbar, nach 48 Std. hingegen voll ausgeprägt. Die Infektion mit SARS-CoV löst in diesen Zellen auch die Spaltung von PARP aus, allerdings sind hier erste Anzeichen erst 48 h p.i. sichtbar.

293/ACE2-Zellen lassen sich sehr gut mit VSV und SeV infizieren. Die mikroskopische Überprüfung der Infektion der Zellen mit beiden Viren, die einen starken CPE induzieren, ergab, dass die Zellen zu 100% infiziert waren. Um die Infektionsrate der Zellen mit SARS-CoV zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenz-Analysen wie beschrieben (3.4.4) durchgeführt. Die Auswertung ergab, dass auch hier alle Zellen infiziert waren (Abb. 23B).

4.2.2 Induktion von Apoptose durch die akzessorischen ORFs 7a und 7b

Wie bereits beschrieben, induzieren die akzessorischen Proteine ORF 7a und ORF 7b nach Überexpression die Typ-I-IFN-Antwort (4.1) (Abb. 18). Da bezüglich ORF 7a bereits bekannt war, dass dieses Protein nach Überexpression Apoptose über einen Caspase-abhängigen Weg induziert (190), war der nächste Schritt zu überprüfen, ob auch ORF 7b dazu in der Lage war und speziell, wie sich die natürlich vorkommende Deletionsmutante ORF 7b del verhielt.

Vero E6-Zellen wurden mit für ORF 7a und ORF 7b bzw. 7b del kodierende Plasmide transfiziert (3.2.5). Als Kontrolle zur Induktion der Spaltung von Caspase 3 diente eine Infektion mit SeV. Zellernte und Western Blot-Analysen wurden wie im vorigen Abschnitt beschrieben durchgeführt.

Der Western Blot (Abb. 24) verdeutlicht, dass die Spaltung von Caspase 3 durch ORF 7a, ORF 7b und durch die Infektion der Zellen mit SeV induziert wurde. Interessanterweise führte die Expression der ORF 7b Deletionsmutante nicht zu einer solchen Spaltung.

Analysen zur Spaltung von Caspase 8 konnten nicht durchgeführt werden, da die Transfektion der Zellen bereits ausreichend war diese Spaltung hervorzurufen (95). Auch die Detektion der PARP Spaltung war in Vero-Zellen nicht möglich, da der verwendete Ak human-spezifisch ist.

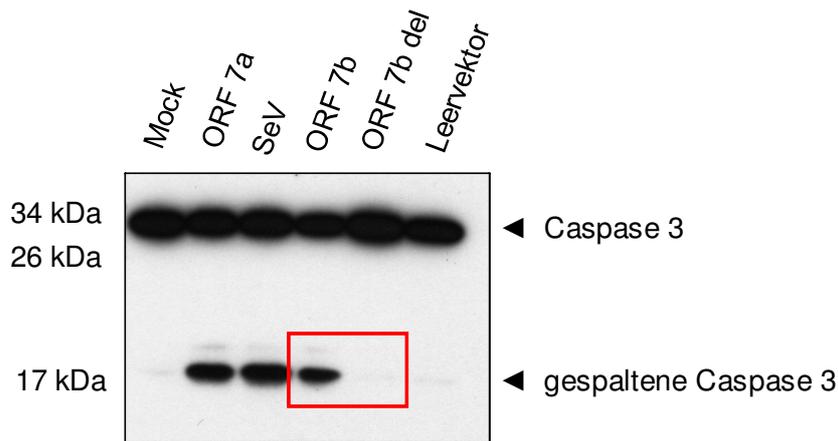


Abb. 24: Caspase 3-Spaltung in ORF 7a- und 7b-transfizierten Zellen

4×10^4 Vero E6-Zellen wurden mit $1 \mu\text{g}$ der Plasmide p18-T7 ORF7b, p18-T7 ORF 7b del und pCAGGS ORF 7a unter Verwendung von Lipofectamine 2000 transfiziert (3.2.5). Als Positivkontrolle diente eine SeV-Infektion der Zellen mit 10 hämagglutinierenden Einheiten. 48 Std. später wurden die Zellen wie unter Abb. 19 beschrieben geerntet und analysiert.

Bei verschiedenen SARS-CoV-Isolaten gibt es Deletionen im Bereich der zusätzlichen ORFs 7a und 7b sowie 8a und 8b (201) und auch innerhalb dieser Arbeit konnte eine Deletion im ORF 7b des FFM-1-Isolates von SARS-CoV nachgewiesen werden. Daher sollte zunächst die Expression der beiden Proteine in SARS-CoV-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Hierzu wurden diese für 48 Std. mit SARS-CoV infiziert. Nach der Fixierung und der Permeabilisation (3.4.4) wurden sie mit den ORF 7a- und ORF 7b-spezifischen Ak (A.11) gefärbt.

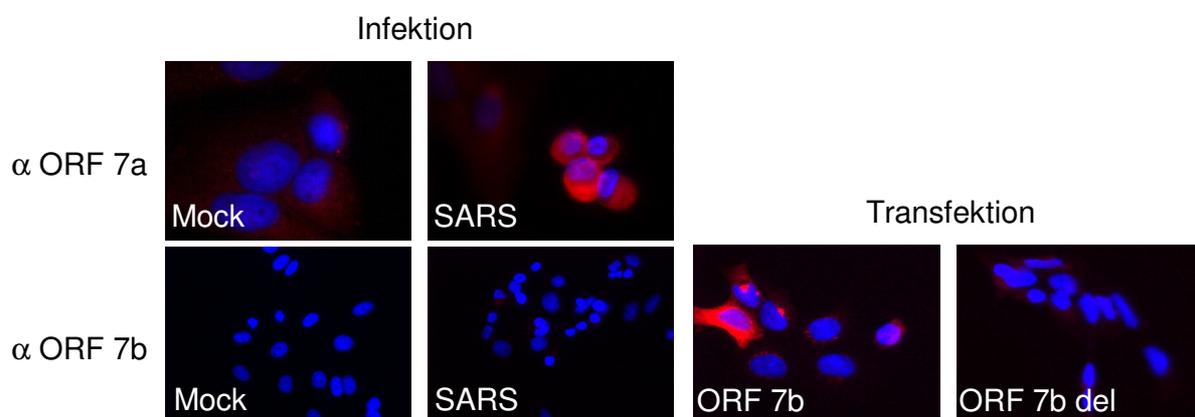


Abb. 25: Expressionsnachweis von ORF 7a und 7b

SARS-CoV-infizierte (MOI 1) oder mit p18-T7 ORF 7b bzw. ORF 7b del transfizierte (L2000, $1 \mu\text{g}$ DNA, 3.2.5) 293-Zellen wurden 48 h p.i. oder p.t. fixiert, permeabilisiert und mit einem Maus-anti-ORF 7a oder einem Kaninchen-anti-ORF 7b Ak gefärbt, die jeweils mit einem Rhodamin-gekoppeltem passenden Zweit-Ak (A.11) detektiert wurden. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Wie in Abb. 25 gezeigt konnte ORF 7a in SARS-CoV-infizierten Zellen eindeutig nachgewiesen werden, wohingegen ORF 7b nicht detektiert werden konnte. Als Kontrolle zur Funktionalität des Ak wurden auch mit ORF 7b transfizierte Zellen gefärbt. In diesen Zellen konnte das Protein eindeutig nachgewiesen werden. Die natürlich vorkommende Deletionsmutante von ORF 7b konnte auch in transfizierten Zellen nicht mit dem 7b-spezifischen Ak nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass in Zellen, die mit dem Frankfurter Isolat (FFM-1) des SARS-CoV infiziert wurden der vollständige ORF 7b nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird.

Zusammenfassung

Die Infektion von Vero- wie auch 293/ACE2-Zellen mit SARS-CoV führt zur Induktion von Apoptose in diesen Zellen. Hierzu ist das Replizieren der Viren in den Zellen nötig, da UV-inaktiviertes Virus, welches Zellen zwar infiziert, aber replikationsdefizient ist, keine Apoptose induziert. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine SARS-CoV-Infektion die Spaltung von Caspase 3 und 8 sowie die Spaltung von PARP ausgelöst wird. Die mRNA- und Proteinlevel von Bcl2 und Bax scheinen von der Infektion mit SARS-CoV unbeeinflusst.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Expression von ORF 7a und ORF 7b zur Spaltung von Caspase 3 und somit zur Induktion von Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen beiträgt. Die Expression von ORF 7a in Zellen, die mit dem SARS-CoV-Isolat FFM-1 infiziert waren, konnte gezeigt werden. Die Expression von ORF 7b konnte nicht nachgewiesen werden, was nahe legt, dass dieses Isolat hauptsächlich die Deletionsmutante von ORF 7b exprimiert.

4.3 Inhibition von ORF 7a und 7b in SARS-CoV-infizierten Zellen

4.3.1 Strategie

In den letzten Jahren wurden vermehrt Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomere (PMO) zur Inhibition von Viren wie auch der Expression zellulärer Proteine eingesetzt (4, 49, 133). Bei diesen Komponenten handelt es sich um synthetische RNA- oder DNA-Analoga mit einem modifizierten Rückgrat, welches Phosphorodiamidat-Bindungen und Morpholinringe enthält. Aufgrund dieser Struktur sind PMO sehr resistent gegenüber Nukleasen (89), relativ stabil in humanen Zellen und Serum (221) und werden von Zellen unter Standard-Zellkulturbedingungen aufgenommen (2, 40). Zur besseren Aufnahme in die behandelten Zellen sind PMO mit Argininreichen Peptiden verknüpft (PPMO), was eine Transfektion der Komponenten überflüssig macht. Die hier eingesetzten PPMO sind mit einem (RXR)₄XB Peptid (R = Arginin, X = 6 aminohexanoic acid, B = beta Alanin) verknüpft (2, 185).

PPMO wurden schon häufig eingesetzt, um die Replikation verschiedener Viren, wie z.B. die des Ebola-Virus Zaire, des Maus-Hepatitis-Virus, des Dengue-Virus und verschiedener Subtypen des Influenza A Virus, erfolgreich zu hemmen (24, 49, 62, 85). Auch die Vermehrung des SARS-CoV wurde bereits erfolgreich durch die Verwendung von verschiedenen PPMO inhibiert (143).

Für die folgenden Untersuchungen wurden PPMO verwendet, die spezifisch gegen die Start-Codons des ORF 7a und des ORF 7b gerichtet sind. Es wurde untersucht, ob die Expression der ORFs und die daraus resultierende Induktion von Apoptose einen Einfluss auf die Vermehrungsfähigkeit von SARS-CoV hat. Zusätzlich wurde ein PPMO (scramble) verwendet, welches keine SARS-CoV-spezifischen Sequenzen umfasst, um unspezifische Effekte der PPMO auf die Vermehrung von SARS-CoV auszuschließen.

PPMO	PPMO-Zielregion	Sequenz 5'-3'
SARS 7a	AUG des ORF 7a	GAA GAG AAT AAT TTT CAT GTT CGT
SARS 7b	AUG des ORF 7b	GAG CTC ATT CAT TCT GTC TTT CTC

Hervorgehoben: AUG innerhalb der Sequenz

Tabelle 3: PPMO: Sequenzen und Zielregionen auf der SARS-CoV-RNA

4.3.2 Analyse der konzentrationsabhängigen Inhibitionseffizienz

Zunächst wurden die PPMO gegen ORF 7a und ORF 7b (Tabelle 3) auf deren Fähigkeit getestet, die Replikation von SARS-CoV zu beeinflussen. 293/ACE2-Zellen wurden 24 Std. nach dem Aussäen mit unterschiedlichen Konzentrationen der PPMO behandelt. Vier Std. nach dieser Behandlung wurden die Zellen mit SARS-CoV infiziert. Es wurde eine sehr niedrige MOI von 0,001 gewählt, um eventuell auftretende Effekte besser nachweisen zu können. Nach 48 und 72 Std. wurde der Überstand dieser Zellen für TCID₅₀-Analysen verwendet. Die Auswertung und Titerberechnung der TCID_{50s} erfolgte 5 bis 8 Tage nach der Infektion, wenn sich der CPE stabilisiert hatte.

Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 26 dargestellt. Im Vergleich zu nicht PPMO-behandelten SARS-CoV-infizierten Zellen (rosa) zeigte sich, dass die Behandlung von Zellen mit 10 µM des PPMO 7a (hellblau) zu einer schlechteren Vermehrung von SARS-CoV in diesen Zellen führte. Dieser Effekt war 48 h p.i. wie auch 72 h p.i. zu beobachten. Je nach durchgeführtem Experiment lag die Reduktion der Virustiter in diesen Ansätzen bei 2 bis 4 log-Stufen. PPMO 7b (grün), wie auch der unspezifische Inhibitor (scramble, orange), hatten bei keiner der verwendeten Konzentrationen einen Effekt auf die Vermehrung von SARS-CoV. Die sehr geringen Titer des SARS-CoV bei 10 µM oder 20 µM des PPMO 7a oder beider PPMO (7a und 7b) schwankten zwischen 1 und 100 je nach Versuch. Die mit beiden PPMO behandelten Zellen zeigten nur selten eine schlechtere Virusvermehrung als die PPMO 7a-behandelten Zellen. Daher wird angenommen, dass die gleichzeitige Gabe der PPMO 7a und 7b (dunkelblau) keinen verstärkenden Effekt auf die Inhibition der Virusvermehrung hatte. Dieser Versuch wurde zweimal mit einem sehr ähnlichen Ergebnis durchgeführt.

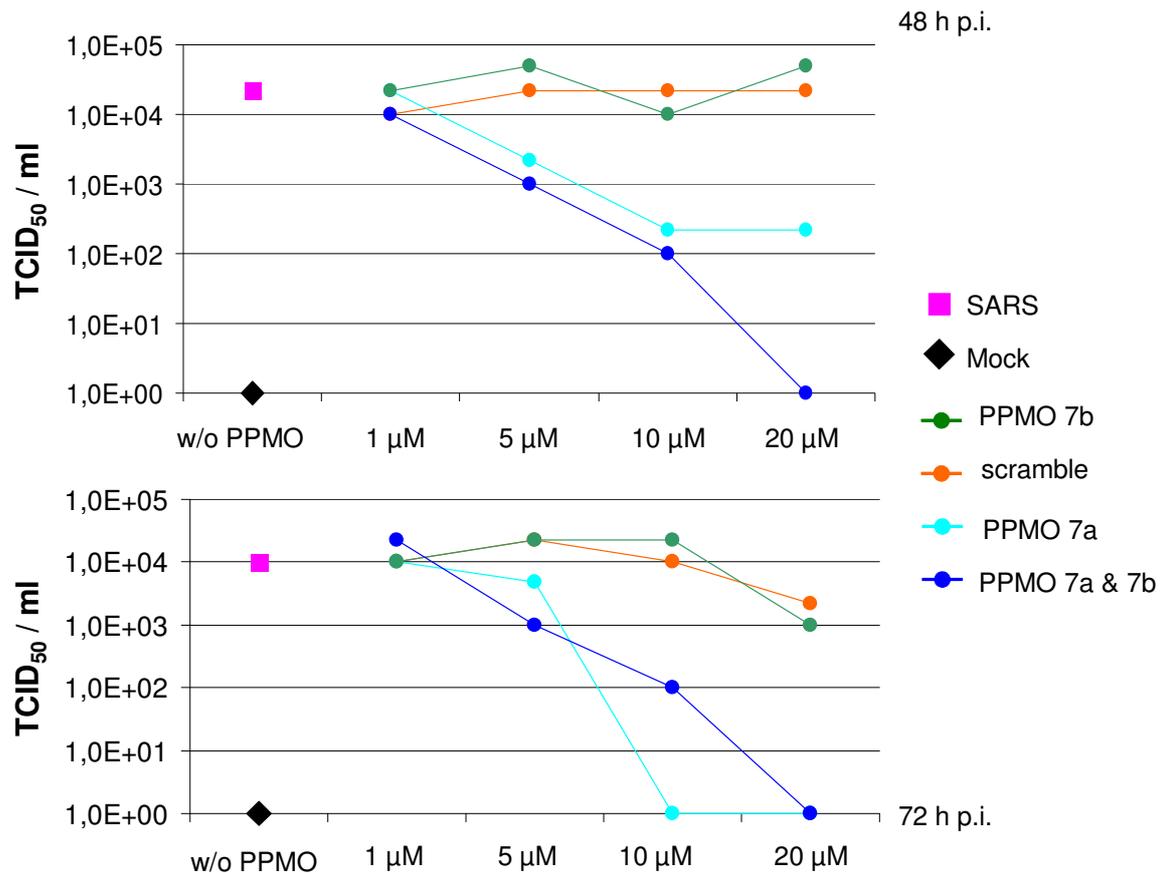


Abb. 26: Konzentrationsabhängige Inhibition der Vermehrung von SARS-CoV durch die Vorbehandlung von Zellen mit PPMO 7a

4×10^4 293/ACE2-Zellen wurden für 4 Std. mit den jeweiligen PPMO (Konzentration 1, 5, 10 oder 20 μM , w/o = ohne PPMO-Zugabe; in $\text{DMEM}_{2\%FCS}$) behandelt, bevor sie durch Zugabe von SARS-CoV (MOI 0,001) in das vorhandene Medium infiziert wurden. Nach der einstündigen Inkubationszeit wurde das Inokulum entfernt und durch frisches $\text{DMEM}_{2\%FCS}$ mit dem jeweiligen PPMO ersetzt. Nach 48 bzw. 72 Std. wurde der Überstand für TCID_{50} -Analysen (3.3.2) verwendet.

Um diese Ergebnisse zu untermauern wurden Immunfluoreszenz-Analysen der PPMO-behandelten und infizierten Zellen durchgeführt. Diese wurden 72 h p.i. geerntet (3.4.4) und mit einem Ak gefärbt, der das SARS-CoV N-Protein detektiert. Das Ergebnis in Abb. 27 zeigt, dass die Behandlung mit 10 μM des PPMO 7a zu einer sehr deutlichen Reduktion der Anzahl infizierter Zellen führte, wohingegen die PPMO scramble und 7b keinen Effekt zeigten. Eine Konzentration von 5 μM des PPMO 7a reichte nicht aus, um das Viruswachstum zu hemmen. Zu beobachten war auch, dass die Gesamtkonzentration der hier verwendeten PPMO 10 μM nicht überschreiten sollte. Die Zellen, die mit beiden PPMO gleichzeitig behandelt wurden, zeigten nach einer Inkubationszeit von 72 Std. bereits cytotoxische Effekte, was sich auch in der reduzierten Zellzahl widerspiegelt (Abb. 27, rechte Spalte).

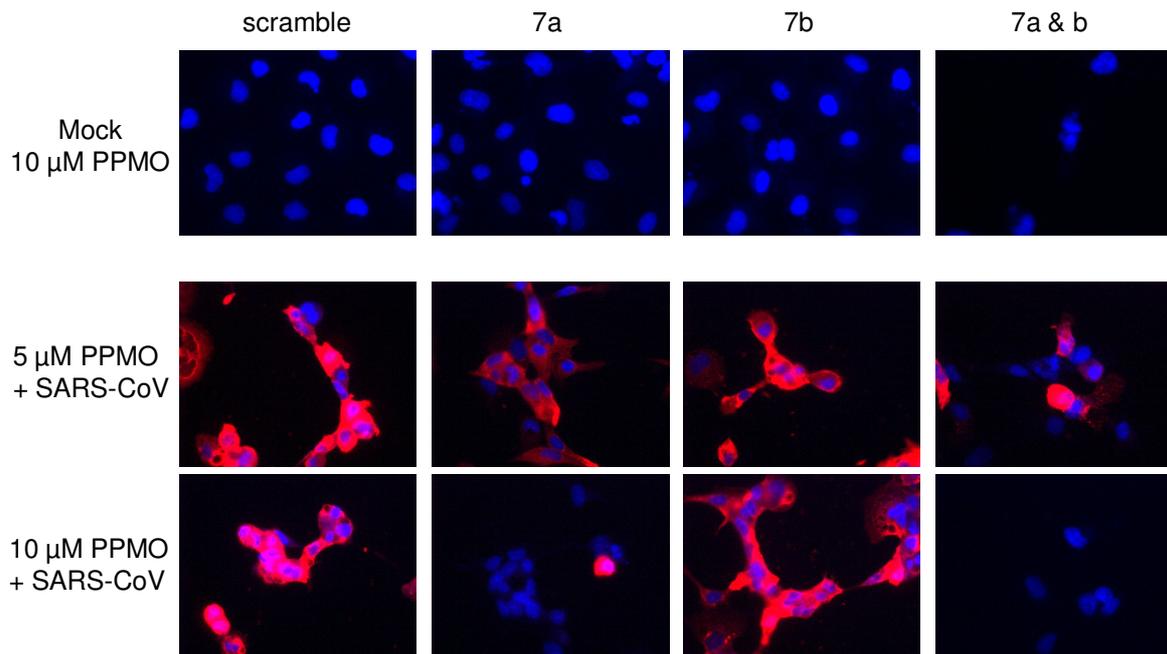


Abb. 27: IFA PPMO-behandelter und SARS-CoV-infizierter Zellen

Die, wie unter Abb. 26 beschrieben, PPMO-behandelten und SARS-CoV-infizierten 293/ACE2-Zellen wurden 72 h p.i. mit 4% PFA für mind. 12 Std. fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Die Infektion wurde anschließend mit einem Kaninchen-anti-SARS-CoV-NP Erst-Ak und einem Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 Ak (rot) detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Gezeigt ist ein repräsentativer Bildausschnitt.

4.3.3 Inhibition durch PPMO 7a ist spezifisch für SARS-CoV

Um den hemmenden Effekt des PPMO 7a auf die Vermehrung von SARS-CoV eindeutig zu charakterisieren, wurde das oben beschriebene Experiment mit einer PPMO-Konzentration von 10 μ M mehrfach wiederholt. Die Auswirkungen auf die Vermehrung von SARS-CoV sind aus Abb. 28 ersichtlich. Wie bereits erwähnt, führte die Behandlung von SARS-CoV-infizierten Zellen mit dem PPMO 7a, zu einer Reduktion des Virustiters um etwa 2 log-Stufen.

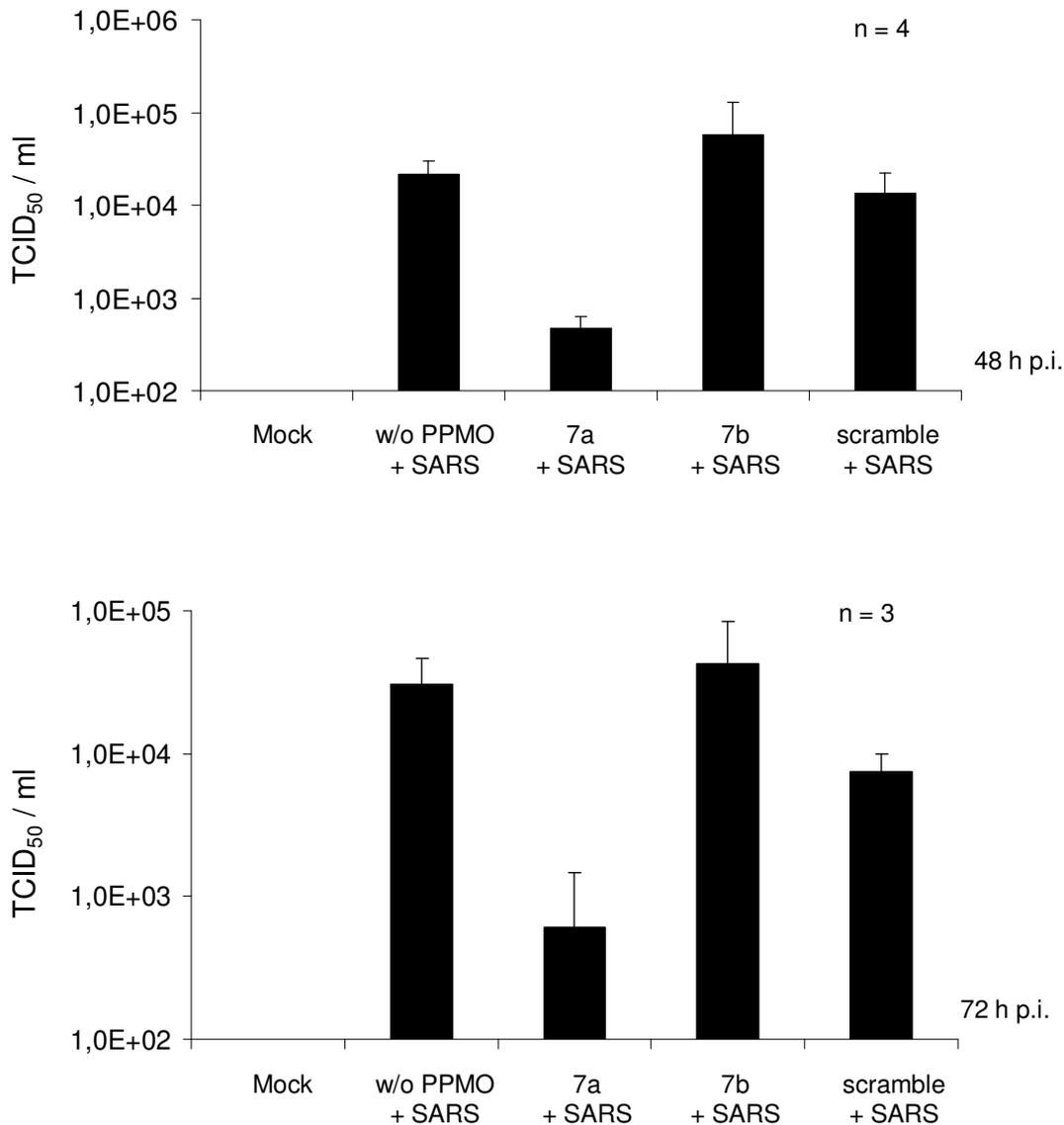


Abb. 28: Inhibition der Vermehrung von SARS-CoV durch PPMO 7a

4×10^4 293/ACE2-Zellen wurden für 4 Std. mit den jeweiligen PPMO (Konzentration $10 \mu\text{M}$, w/o = ohne PPMO Zugabe) behandelt, bevor sie wie unter Abb. 26 beschrieben infiziert wurden. Nach 48 (obere Grafik) bzw. 72 Std. (untere Grafik) wurde der Überstand für TCID₅₀-Analysen (3.3.2) verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus 3 bzw. 4 unabhängigen Versuchen.

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei diesem Effekt um einen spezifischen gegen das SARS-CoV handelt, wurde nun der gleiche Versuch mit VSV wiederholt. Hierzu wurden Zellen, wie für SARS-CoV beschrieben, mit den jeweiligen PPMO behandelt und mit VSV infiziert. Da VSV ein schnell replizierendes Virus ist, wurden die Überstände der Zellen bereits 24 h p.i. für TCID₅₀-Analysen verwendet. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen sind in Abb. 29 dargestellt und zeigen, dass die PPMO keinen Effekt auf die Vermehrung von VSV haben.

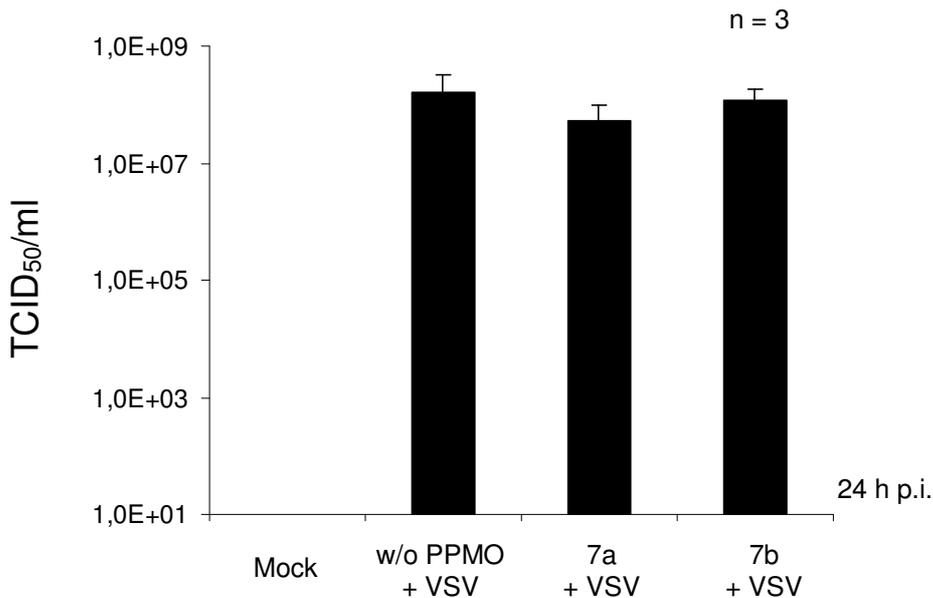


Abb. 29: PPMO-Behandlung von VSV-infizierten Zellen

4×10^4 293/ACE2-Zellen wurden für 4 Std. mit den jeweiligen PPMO (Konzentration $10 \mu\text{M}$, w/o = ohne PPMO Zugabe) behandelt, bevor sie wie für SARS-CoV unter Abb. 26 beschrieben mit VSV (MOI 0,001) infiziert wurden. Nach 24 Std. wurde der Überstand für TCID₅₀-Analysen (3.3.2) verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass die Behandlung von 293/ACE2-Zellen mit einem PPMO, welches gegen das Start-Codon des ORFs 7a gerichtet ist, die Vermehrung von SARS-CoV um 2 log-Stufen reduziert. Hierzu waren eine 4-stündige Prä-Inkubation und eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ des PPMO ausreichend. Parallel dazu durchgeführte Versuche mit VSV bestätigten, dass es sich nicht um einen generellen Effekt auf die Virusvermehrung in Zellen, sondern um einen spezifischen Effekt auf SARS-CoV handelt.

4.4 Untersuchungen zur Aktivität der PKR in SARS-CoV-infizierten Zellen

Untersuchungen während meiner Diplomarbeit zeigten, dass in SARS-CoV-infizierten, wie auch in SeV-infizierten Zellen, 24 h p.i. die α -Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors-2 (eIF2 α) phosphoryliert vorliegt (109). Diese Phosphorylierung führt zur Inhibition der Translation, was zu Apoptose in den betroffenen Zellen führen kann (171).

Bisher sind vier zelluläre Protein Kinasen bekannt, die eIF2 α phosphorylieren: PKR, GCN2, PERK und HRI. Aufgrund der beschriebenen antiviralen Aktivität gegenüber den verschiedensten Viren (69, 72) schien PKR zunächst der vielversprechendste Kandidat zu sein, eIF2 α in SARS-CoV-infizierten Zellen zu phosphorylieren.

4.4.1 Induktion der dsRNA-abhängigen Protein Kinase

Die PKR wird durch die Bindung von dsRNA oder 5'ppp-RNA aktiviert, was zur Autophosphorylierung der Kinase führt (122, 141). Die folgenden Untersuchungen beruhen auf dem Nachweis der phosphorylierten Form der PKR und von dsRNA durch spezifische Ak.

Für die Analysen zur PKR-Aktivität wurden 293-Zellen mit SARS-CoV oder SeV infiziert und 24 bzw. 48 h p.i. für Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen geerntet (3.4.1-4). SeV diente als Kontrolle, da von diesem Virus bereits bekannt war dass es in infizierten Zellen die Phosphorylierung von PKR und eIF2 α auslöst (109).

Für die Western Blot-Analysen wurden zwei Ak verwendet, von denen einer die Gesamtmenge der PKR, der andere aber nur den phosphorylierten Anteil detektiert. Wie in Abb. 30 (A) gezeigt, führte die Infektion der Zellen mit SARS-CoV wie auch mit SeV zur Phosphorylierung der PKR.

Für die IFA wurden die Zellen wie in 3.4.4 beschrieben fixiert, permeabilisiert und für den Infektionsnachweis mit einem SARS-CoV- oder SeV-spezifischem Ak oder einem gegen dsRNA gerichteten Ak gefärbt. Die Infektionsstudien zeigten, dass 100% der Zellen mit SeV aber nur 20% mit SARS-CoV infiziert waren, was auch die unterschiedlich starke Phosphorylierung der PKR erklärt (B, Abb. 30).

Des Weiteren konnte durch Färbungen mit einem Ak spezifisch für dsRNA eindeutig gezeigt werden, dass im Verlauf einer SARS-CoV-Infektion dsRNA in den infizierten Zellen nachweisbar ist (C, Abb. 30). In SeV-infizierten Zellen hingegen konnte keine dsRNA nachgewiesen werden.

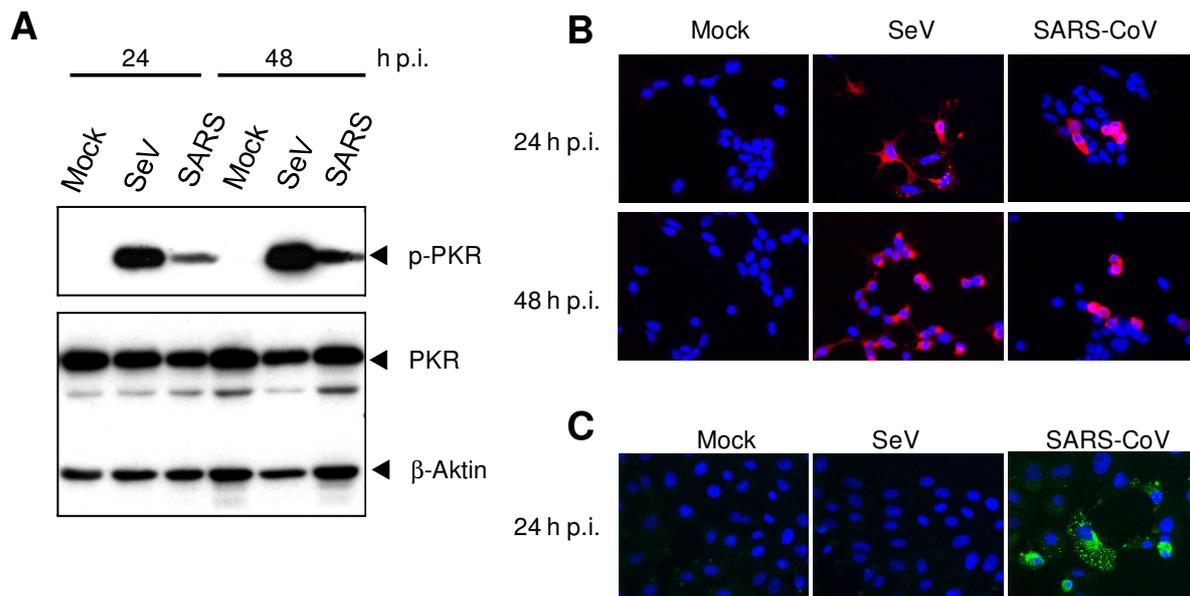


Abb. 30: Induktion der PKR in SARS-CoV-infizierten Zellen

(A) 4×10^4 293-Zellen wurden mit SARS-CoV oder SeV infiziert, 24 bzw. 48 h p.i. in CLP geerntet und die Lysate auf einem 10% SDS-PAG mit anschließendem Western Blot analysiert. Verwendete Ak: Maus-anti-β-Aktin, Maus-anti-PKR, Kaninchen-anti-phospho-PKR (p-PKR) und Ziege-anti-Maus bzw. anti-Kaninchen-HRP. (B) Die, wie unter A beschrieben, infizierten Zellen wurden mit 4% PFA fixiert und nach dem Ausschleusen aus dem BSL4-Labor mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Färbung erfolgte mit DAPI (Zellkerne), SARS-CoV-, SeV- oder dsRNA-spezifischen Ak (A.11) und den jeweiligen Rhodamin- bzw. Cy2-gekoppelten Zweit-Ak.

4.4.2 Hemmung der PKR durch die Verwendung von PPMO

Um den Einfluss der PKR auf die Replikation von SARS-CoV in Säugerzellen zu untersuchen, sollte die PKR-Expression in den Zellen inhibiert werden. Verschiedene Versuche die PKR durch die Verwendung von siRNAs oder einer dominant-negativen Mutante (121) zu inhibieren brachten keinen Erfolg. Daher wurden gegen die mRNA der PKR gerichtete PPMO synthetisiert und in Zellkultur eingesetzt.

Wie bereits beschrieben (4.3) handelt es sich bei diesen Komponenten um stabile Inhibitoren, die intrazellulär über lange Zeiträume hinweg präsent sind und so auch zelluläre Proteine effektiv inhibieren können (4, 52, 131-133).

Für die folgenden Versuche wurden vier verschiedene PPMO von der Firma AVI BioPharma Inc. synthetisiert, gerichtet gegen die PKR-mRNA (GenBank accession No. BC057805). Die Sequenzen und Zielregionen der PPMO ‚AUG‘, 5'ED, ex-7 und ex-8 sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Inhibitoren ‚AUG‘ und 5'ED sind gegen das Start-Codon und Teile der nicht translatierten Region der PKR-mRNA gerichtet und sollen somit die Initiation der Translation inhibieren. Die PPMO ex-7 und ex-8 hingegen sind gegen die 5'-Enden der jeweiligen Exons in der Nähe der Spleißstellen gerichtet. Sie sollen über sterische Hemmung den korrekten Zusammenbau des Spliceosoms an der Spleißstelle verhindern und so dafür sorgen, dass Exons aus der mRNA entfernt werden, was zum Verlust der Proteinfunktion führen sollte.

Tabelle 4: PPMO: Sequenzen und Zielregionen auf der hPKR-mRNA

PPMO	PPMO Zielregion	Sequenz 5´-3´
Scramble	N/A	AGT CTC GAC TTG CTA CCT CA
‚AUG‘	Nts 426-447 (Initiator AUG der mRNA)	ATC ACC AGC CAT TTC TTC TTC C
5'ED	Nts 17-38 (5'-UTR)	AGT CAC AAA GTA TGA GCA AAC T
ex-7	Nts 956-977	GAA CCA GAG GAC AGG TAG TCA G
ex-8	Nts 1028-1052	CCT TCA GAT GAT GAT TCA GAA GCG

N/A, nicht bekannt; hPKR = humane PKR

4.4.2.1 Auswahl des effizientesten Inhibitors

Zunächst wurden die verschiedenen PPMO mittels Western Blot-Analysen auf ihre Fähigkeit getestet, die Expression der PKR in 293-Zellen zu reduzieren. Als Kontrolle für unspezifische Effekte der PPMO auf die PKR diente der Inhibitor scramble, der keinerlei Sequenzhomologie zur PKR-mRNA aufweist.

293-Zellen wurden für 48 Std. mit 10 oder 20 µM des jeweiligen PPMO behandelt. Anschließend wurde die Expressionsrate der PKR in diesen Zellen analysiert. Wie Abb. 31 (A) zeigt, war eine Endkonzentration von 10 µM der PPMO ex-7 und ex-8 ausreichend, um die Expressionsrate der PKR zu reduzieren. Dieser Effekt konnte aber noch deutlich verstärkt werden, wenn 20 µM der PPMO eingesetzt wurden. Die Inhibitoren ‚AUG‘ und 5'ED, wie auch der unspezifische Inhibitor scramble hatten keinen inhibierenden Effekt auf die Expression der PKR in behandelten Zellen.

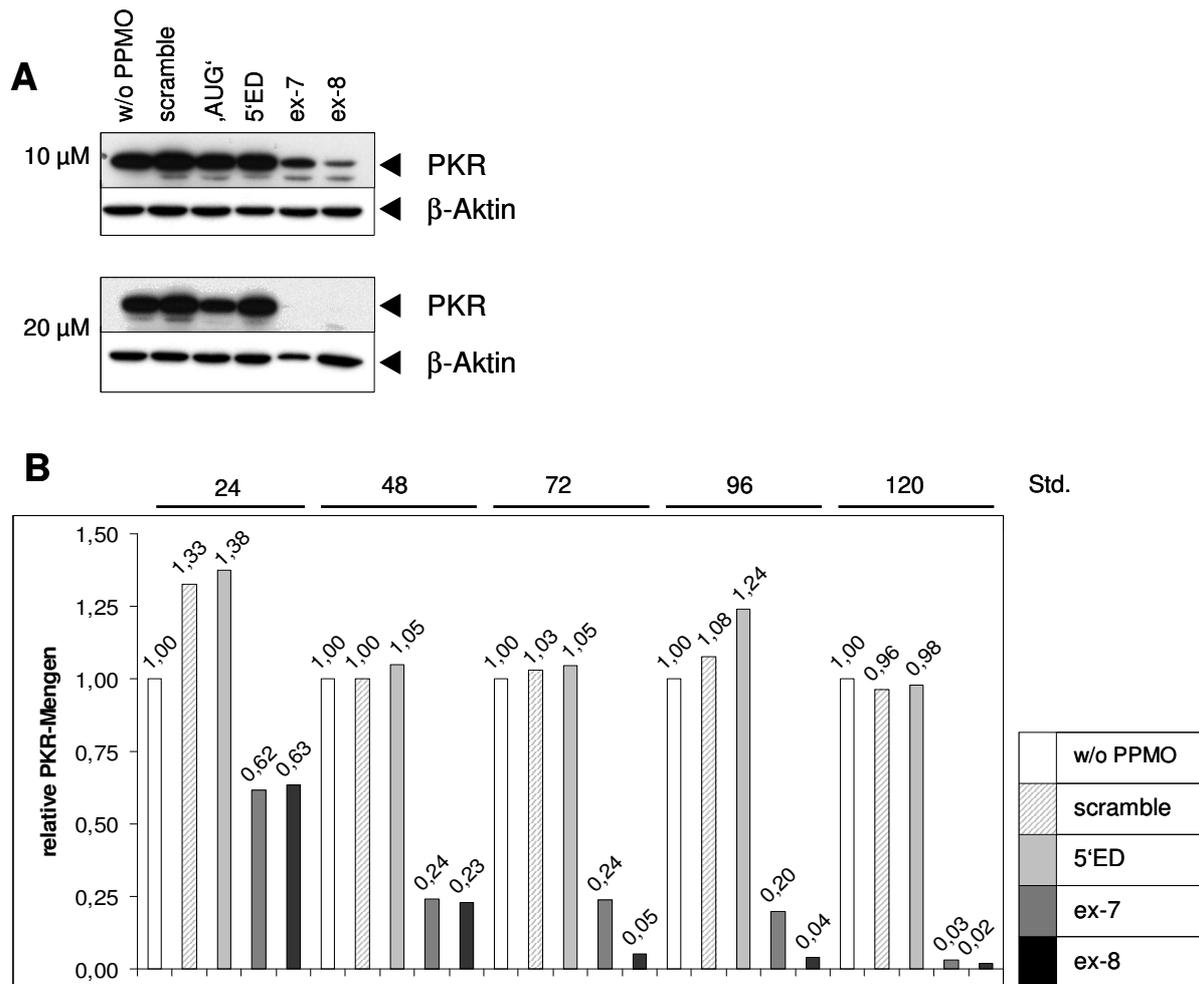


Abb. 31: Behandlung von 293-Zellen mit PPMO gerichtet gegen PKR

(A) 4×10^4 293-Zellen wurden mit 10 oder 20 μM der PPMO scramble, ‚AUG‘, 5'ED, ex-7 und ex-8 (Tab. 4) für 48 Std. behandelt oder unbehandelt gelassen (w/o PPMO). Die PKR- und Aktin-Syntheseraten in den Zellen (3.2.6, CLP) wurden unter Verwendung von Maus-anti-Aktin und Maus-anti-PKR Ak und einem Ziege-anti-Maus-HRP Zweit-Ak im Western Blot analysiert. **(B)** Lysate von 293-Zellen, die mit 20 μM der PPMO behandelt wurden, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (24 Std.- 120 Std.) nach der wie unter A beschriebenen Behandlung einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die PKR-Banden wurden densitometrisch quantifiziert und mit den jeweiligen Aktin-Banden normalisiert. Der ermittelte PKR-Wert jeder Probe ist zu der Kontrolle ohne PPMO des jeweiligen Zeitwerts (=1) in Relation gesetzt.

Nun wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt nach Gabe der PPMO der Hemmeffekt auf die PKR am größten war. Hierzu wurden 293-Zellen mit 20 μM der PPMO behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet (3.2.6 CLP). Die Expression der PKR wurde anhand von Western Blot-Analysen nachgewiesen und im Vergleich zu den korrespondierenden Aktin-Banden normalisiert.

Die erhaltenen Daten sind in Abb. 31 (B) zusammengefasst. Durch die Verwendung des PPMO ex-8 konnte die Expression der PKR nach 72 Std. sehr effizient reduziert werden. Auch ex-7 hatte einen nachweisbaren Effekt, dieser war allerdings 72 Std.

nach der Behandlung der Zellen um den Faktor 5 schwächer ausgeprägt. Des Weiteren führte die Behandlung von Zellen mit 20 μM ex-7 zu einem starken cytopathischen Effekt, was auch die reduzierten Aktin-Mengen in diesen Zellen deutlich machten (Abb. 31, A, unten). Deshalb wurde für die weiteren Studien nur der Inhibitor ex-8 verwendet.

4.4.2.2 Überprüfung der vorhergesagten Funktion der PPMO ex-7 und ex-8 mittels RT-PCR und Sequenzierung

Die Verwendung von PPMO, die gegen die 5'-Enden von Exons gerichtet sind, führt über eine sterische Hemmung zu einer fehlerhaften Erkennung der in der Nähe gelegenen Spleißstellen. Das führt, so wird vermutet, zum Entfernen eines oder mehrerer Exons aus der mRNA und somit zu einem fehlerhaften Protein (1).

Da es sich bei ex-7 und ex-8 um gegen Spleißstellen gerichtete PPMO handelt, wurde über RT-PCR-Analysen die Integrität der aus behandelten und nicht behandelten Zellen isolierten mRNA überprüft. Durch die Verwendung von Primern, die die Binderegionen der PPMO ex-7 und ex-8 flankieren (# 1663, # 1750, A.12), sollte bei unbehandelten Zellen ein 1 394 Nukleotide langes PCR Fragment (Nts: 457 bis 1 850) der humanen PKR-mRNA amplifiziert werden.

Aus PPMO-behandelten und nicht behandelten 293-Zellen wurde nach 48 Std. RNA isoliert und eine RT-PCR (3.1.2) zur Amplifikation des beschriebenen PKR-mRNA-Fragmentes durchgeführt. Es folgte die Analyse der Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

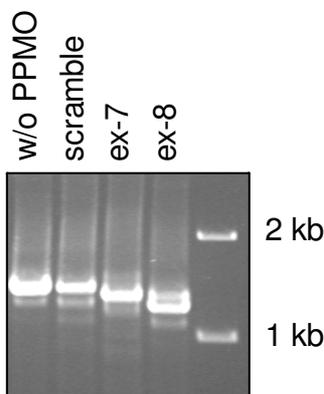


Abb. 32: RT-PCR Analyse der PKR-mRNA in PPMO-behandelten Zellen

4×10^4 293-Zellen wurden mit 20 μM der PPMO scramble, ex-7 und ex-8 für 48 Std. behandelt. Die Gesamt-RNA dieser Zellen wurde unter Verwendung des RNeasy Kits (QIAGEN) isoliert und ein Achtel dieser RNA mittels RT-PCR analysiert (Primer # 1663, # 1750). Gezeigt ist die Analyse der Produkte auf einem 1,5%igen Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung.

Während die Behandlung von Zellen mit den PPMO ex-7 und ex-8 zur Synthese eines verkürzten PCR Fragmentes führte, hatte der Inhibitor scramble keinen Effekt auf die Länge des synthetisierten Fragmentes (Abb. 32). Sequenzvergleiche der erhaltenen Fragmente mit der PKR-mRNA (GenBank BC057805) ergaben für ex-7-behandelte Zellen eine Deletion der Nukleotide 952 bis 1 028 und für ex-8-behandelte Zellen eine Deletion der Nukleotide 950 bis 1 116. Die PCR-Fragmente aus scramble- und aus nicht behandelten Zellen (w/o PPMO) entsprachen der Wildtyp-Sequenz. Diese Resultate bestätigen, dass die Bindung der PPMO ex-7 und ex-8 mit Spleißvorgängen interferiert. So wird vermutet, dass sie durch sterische Interferenz den Aufbau des Spliceosoms verhindern (1, 133).

4.4.2.3 Analyse zur Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch die Gabe von PKR-spezifischen PPMO

Für verschiedene siRNAs wurde gezeigt, dass sie die Typ-I-IFN-Antwort induzieren (103, 158). Um nun zu überprüfen, ob auch die Behandlung von Zellen mit den PKR-spezifischen PPMO zu einer solchen Induktion führt, wurden Luziferase-Reporterassays durchgeführt. Hierzu wurden 293-Zellen mit dem pHISG54-Luz Reporterkonstrukt und dem konstitutiv aktiven pRL-SV40 Expressionsplasmid transfiziert (vgl. 4.1). Die Zellen wurden 24 Std. nach der Transfektion für 48 Std. mit 20 µM des jeweiligen PPMO behandelt oder zur Induktion des IFN-Systems und somit der Expression des Luziferase-Reporters mit SeV infiziert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen lysiert und unter Verwendung des Dual-Luziferase-Assays die Reporter-gen-Expression analysiert.

Wie in Abb. 31 dargestellt, konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Verwendung der PPMO 5'ED, ex-7 und ex-8 nicht zur Induktion des Typ-I-IFN-Systems führt. Ein geringer Anstieg der Reporteraktivität wurde durch den Inhibitor ‚AUG‘ ausgelöst. Dieser hatte jedoch keinen Effekt auf die PKR-Expression und wurde deshalb auch nicht für weitere Experimente verwendet.

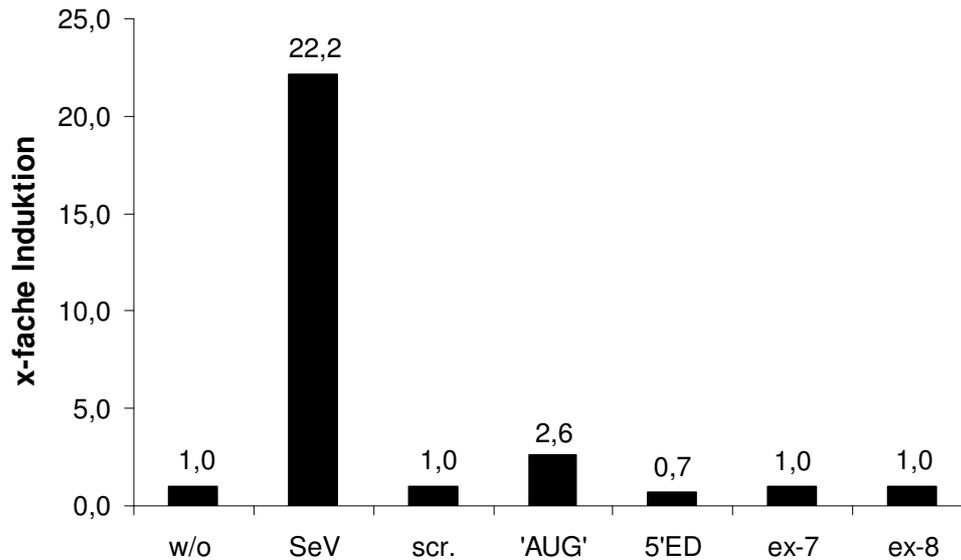


Abb. 33: Test zur IFN Induktion durch PKR-spezifische PPMO

4×10^4 293-Zellen wurden mit 20 μ M der PPMO scramble (scr.), 'AUG', 5'ED, ex-7 und ex-8 für 48 Std. behandelt oder unbehandelt gelassen (w/o). Zur Induktion der IFN-Antwort wurde eine SeV-Infektion durchgeführt (20 hämagglutinierende Einheiten). Die Ernte erfolgte wie unter 3.4.5 beschrieben in PLB. Die Analyse der Renilla- und Firefly-Luziferase-Aktivitäten erfolgte mittels luminometrischer Messung. Die Transfektionseffizienz der einzelnen Proben wurde über die Renilla-Aktivität bestimmt und zur Normalisierung der Firefly-Luziferase-Werte, die die IFN-Induktion widerspiegeln, eingesetzt. Die Induktion in nicht behandelten und nicht infizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt.

4.4.2.4 Hemmung der PKR in SARS-CoV-infizierten Zellen durch PPMO ex-8

Um den Einfluss aktiver PKR auf die Vermehrung von SARS-CoV näher zu charakterisieren, wurde die Expression der PKR unter Verwendung des PPMO ex-8 in SARS-CoV-infizierten Zellen inhibiert. Für diese Versuche wurden 293/ACE2-Zellen für 72 Std. vorbehandelt und dann mit einer sehr geringen MOI von 0,001 mit SARS-CoV infiziert. Nach 48 Std. wurden die Zellen lysiert (CLP, 3.2.6) und Westen Blot-Analysen durchgeführt. Es wurde zunächst anhand des Proteinlevels der PKR und der Menge an gespaltenem PARP untersucht, ob die durch SARS-CoV induzierte Apoptose durch die PKR vermittelt wird. Zusätzlich wurden die Titer des SARS-CoV im Überstand mittels TCID₅₀-Analysen bestimmt, um so einen eventuellen Einfluss der PKR auf die Vermehrung des Virus feststellen zu können.

Wie in Abb. 34 dargestellt, führte die Behandlung der Zellen mit PPMO ex-8 dazu, dass in diesen Zellen die PKR nicht mehr detektiert werden konnte. In SARS-CoV-infizierten Zellen, die mit dem PPMO scramble oder 5'ED behandelt wurden, wie

auch in unbehandelten Zellen (w/o) wurde eine Spaltung von PARP nachgewiesen. In ex-8-behandelten Zellen wurde trotz der SARS-CoV Infektion nur eine sehr schwache Spaltung von PARP detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die Induktion von Apoptose durch SARS-CoV in diesen Zellen beeinträchtigt war.

Des Weiteren wurde auch die Phosphorylierung von eIF2 α in diesen Zellen analysiert. Zu beobachten war hier eine starke Hintergrund-Phosphorylierung in allen Proben und zwar unabhängig davon, ob die Zellen mit SARS-CoV infiziert waren oder nicht. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von eIF2 α 144 Stunden nach dem Aussäen der Zellen auf die hohe Zelldichte zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen ist (37).

TCID₅₀-Analysen (B, Abb. 34) machten deutlich, dass die Behandlung von Zellen mit ex-8 und die daraus resultierende Hemmung der PKR-Expression keinen Einfluss auf die Replikationseffizienz von SARS-CoV hatte. Insofern kann festgehalten werden, dass SARS-CoV nicht sensitiv gegenüber aktivierter PKR ist. Darüber hinaus lässt sich sagen, dass auch die Induktion von Apoptose keinen Wachstumsvorteil für SARS-CoV bietet.

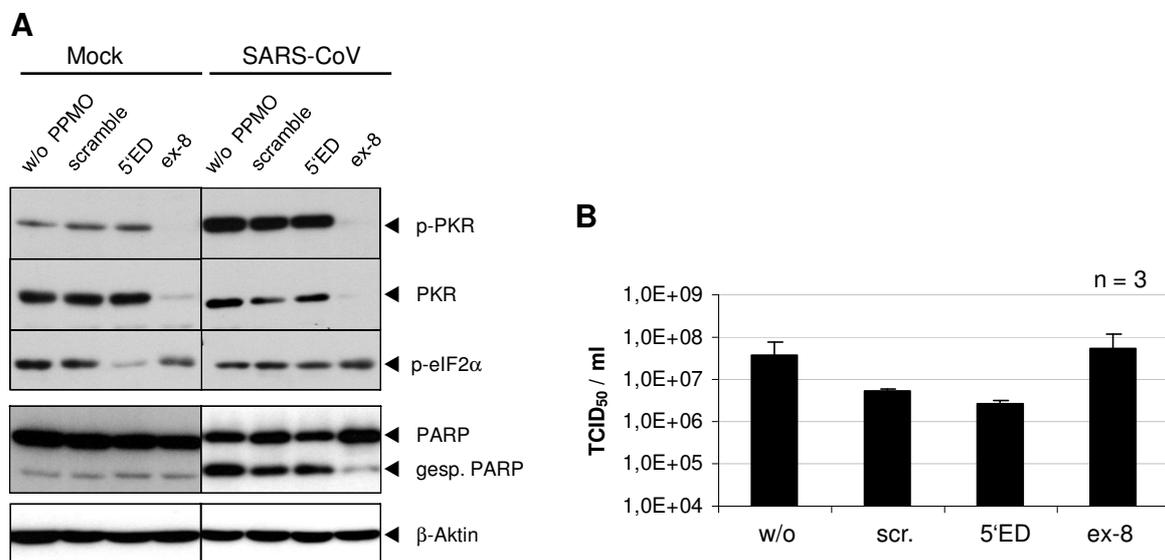


Abb. 34: Einfluss der PKR auf die Replikation von SARS-CoV

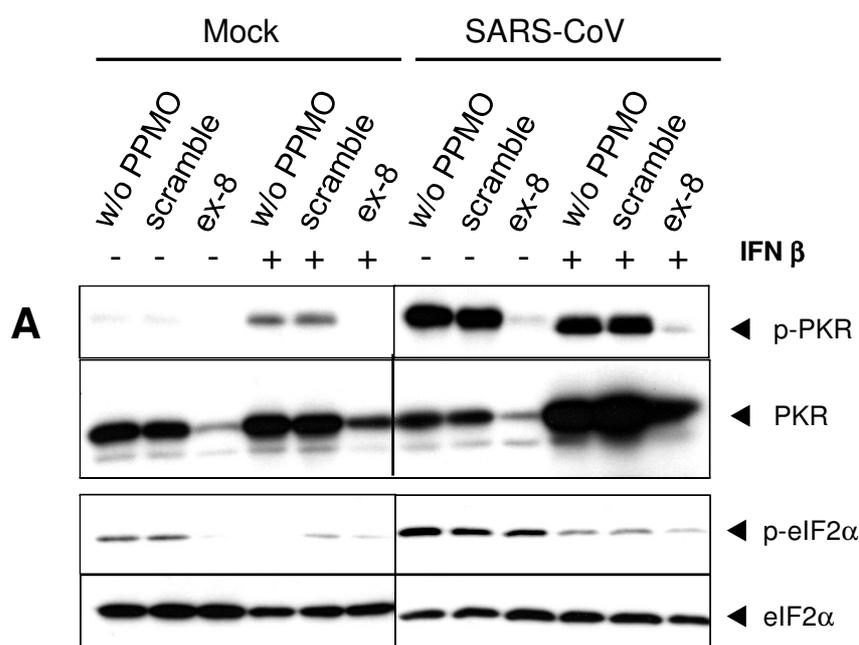
(A) 4×10^4 293-Zellen wurden für 72 Std. mit dem angegebenen PPMO (Konz. 20 μ M) vorbehandelt und anschließend mit SARS-CoV infiziert (MOI 0,001). Nach einer Std. wurde das Inokulum durch frisches DMEM_{2%FCS} mit dem jeweiligen PPMO ersetzt. Nach 48 Std. wurden die Zellen in CLP geerntet (3.2.6) und mittels Western Blot-Analysen untersucht. Verwendete Ak: Kaninchen-anti-p-PKR, Maus-anti-PKR, Kaninchen-anti-p-eIF2 α , Kaninchen-anti-PARP, Maus-anti- β -Aktin und Ziege-anti-Maus oder Kaninchen-HRP. (B) Die Überstände der Zellen wurden für TCID₅₀-Analysen verwendet. Die Versuche wurden dreimal mit gleichem Ergebnis wiederholt.

4.4.2.5 Hemmung der PKR durch PPMO ex-8 nach IFN β -Induktion in SARS-CoV-infizierten Zellen

Exogenes IFN β induziert die Synthese vieler antiviraler Proteine. So wird auch PKR in IFN β -behandelten Zellen verstärkt exprimiert. In diesem Versuchsteil wurde nun die PKR-Expression durch die Gabe von IFN β induziert, um eventuelle Wachstums-Unterschiede des SARS-CoVs bei aktiver bzw. inhibierter PKR zu untersuchen.

PPMO-vorbehandelte 293/ACE2-Zellen wurden für 24 Std. mit 10 000 internationalen Einheiten (IU) IFN β inkubiert. Dies führte zur Induktion des Typ-I-IFN-Systems und somit auch der PKR-Expression. Anschließend wurden die Zellen mit SARS-CoV infiziert und 24 Std. später lysiert. Die Lysate (CLP, 3.2.6) wurden im Western Blot-Verfahren auf PKR-Expression sowie auf die Phosphorylierung von PKR und eIF2 α analysiert.

Wie in Abb. 35 gezeigt, führte eine IFN β -Behandlung mit anschließender SARS-CoV-Infektion zu einer erhöhten Expression der PKR. Dieser Effekt war in nicht infizierten Zellen nicht zu beobachten. Die PKR-Expression war in ex-8-behandelten Zellen deutlich reduziert und es waren nur sehr geringe Mengen an phosphorylierter PKR in diesen Zellen zu detektieren. Eine schwache Phosphorylierung der PKR war in nicht infizierten aber IFN β -behandelten Zellen zu beobachten. Die durch SARS-CoV ausgelöste Phosphorylierung der PKR war sehr viel ausgeprägter und konnte auch durch die zusätzliche Induktion mit IFN β nicht mehr verstärkt werden.



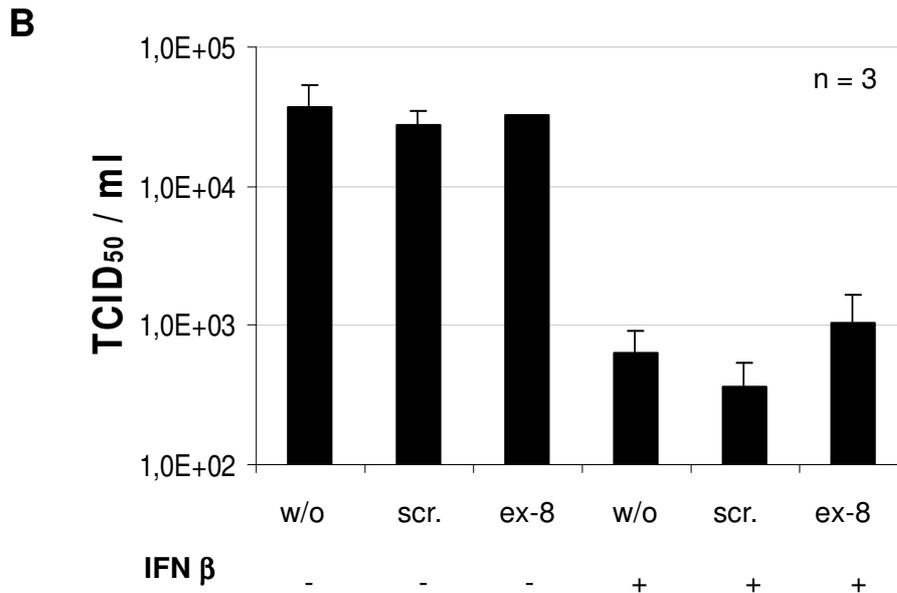


Abb. 35: Inhibition der IFN β -induzierten PKR-Expression durch PPMO ex-8 beeinflusst die SARS-CoV-Replikation nicht

(A) 4×10^4 293-Zellen, für 72 Std. mit dem angegebenen PPMO (20 μ M) vorbehandelt, wurden mit 10 000 IU IFN β behandelt bevor sie nach weiteren 24 Std. mit SARS-CoV infiziert wurden (MOI 0,01). Nach einer Std. wurde das Inokulum durch frisches DMEM_{2%FCS} mit dem jeweiligen PPMO ersetzt. Die Zellen wurden nach weiteren 24 Std. in CLP geerntet (3.2.6) und mittels Western Blot-Analyse auf die Gesamtproteinmengen und den phosphorylierten Anteil von PKR, eIF2 α , GCN2 und PERK untersucht. Verwendete Ak: A.11 (B) Die Titer von SARS-CoV in den Überständen wurden mittels TCID₅₀ analysiert. Die Versuche wurden dreimal wiederholt und zeigten das gleiche Ergebnis.

Interessanterweise stimmte das Muster der Phosphorylierung von eIF2 α nicht mit dem der PKR überein (Abb. 35). Der Phosphorylierungsgrad von eIF2 α war in infizierten und IFN β -behandelten Zellen deutlich reduziert und dies unabhängig von der Anwesenheit aktiver PKR.

Wie bereits in früheren Untersuchungen gezeigt (177), führte die IFN β -Behandlung von SARS-CoV-infizierten Zellen auch in dieser Versuchsreihe zu einer Reduktion des Virustiters um 2 log-Stufen (Abb. 35, B). Die Inhibition der PKR durch PPMO ex-8 hatte wiederum keinen Effekt auf die SARS-CoV-Replikation. Dies lässt den Schluss zu, dass die Aktivierung der PKR keinen Einfluss auf die Vermehrung von SARS-CoV hat.

Diese Daten deuteten darauf hin, dass andere Kinasen einen Einfluss auf die Phosphorylierung von eIF2 α in SARS-CoV-infizierten Zellen haben. Daher wurde überprüft ob die beiden anderen durch virale Infektionen induzierbaren eIF2 α -Kinasen, GCN2 und PERK, durch eine SARS-CoV-Infektion induziert werden.

Zusammenfassung

In SARS-CoV-infizierten 293-Zellen wurde dsRNA sowie die durch dsRNA aktivierte phosphorylierte Form der PKR nachgewiesen. Durch eine 72-stündige Vorbehandlung mit 20 μ M des PKR-spezifischen PPMO ex-8 konnte die Expressionsrate der PKR in SARS-CoV-infizierten Zellen drastisch reduziert werden. Dieser Vorgang reduzierte die Induktion von Apoptose hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Vermehrungsfähigkeit von SARS-CoV. TCID₅₀-Analysen zeigten keine Unterschiede zwischen nicht behandelten und ex-8-behandelten Zellen. Auch die zusätzliche Induktion der PKR durch eine IFN β -Vorbehandlung änderte diesen Phänotyp nicht.

4.5 Analysen des Phosphorylierungs-Status der Kinasen GCN2 und PERK in SARS-CoV-infizierten Zellen

Um die Induktion der Kinasen GCN2 und PERK in SARS-CoV-infizierten Zellen zu untersuchen, wurde deren Phosphorylierungs-Status 24 h p.i. und zum Zeitpunkt der Induktion von Apoptose durch SARS-CoV 48 h p.i. bestimmt.

293/ACE2-Zellen wurden dazu mit SARS-CoV infiziert (MOI 0,01), zu den beschriebenen Zeitpunkten geerntet und die Lysate mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung phospho-spezifischer Ak untersucht.

Abb. 36 zeigt eindeutig, dass PERK sowohl 24 als auch 48 h p.i. phosphoryliert in SARS-CoV-infizierten Zellen vorlag, wohingegen keine Phosphorylierung von GCN2 zu beobachten war.

Die Phosphorylierung von GCN2 in nicht infizierten Zellen 48 h p.i. ist vermutlich auf einen Aminosäuremangel in diesen Zellen zurückzuführen (6).

Interessanterweise führte die Infektion mit SARS-CoV 48 h p.i. zu einer drastischen Reduktion der Menge an GCN2, wohingegen die Aktin-Mengen in diesen Zellen fast unverändert blieben. Dieses Experiment wurde mit dem gleichen Resultat dreimal wiederholt.

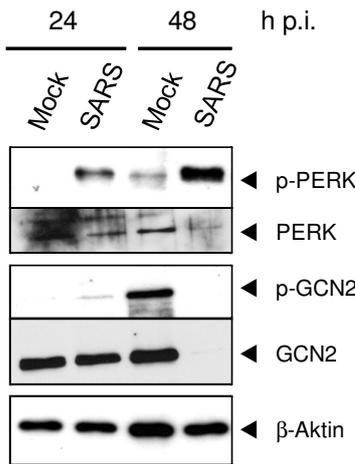


Abb. 36: Induktion der GCN2 und PERK durch eine SARS-CoV-Infektion

293/ACE2-Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 für 24 oder 48 Std. mit SARS-CoV infiziert, in CLP lysiert und Western Blot-Analysen unterzogen. Es wurden Ak verwendet, die das Gesamtprotein und den phosphorylierten Teil von GCN2 und PERK in den Lysaten detektierten (A.11).

Des Weiteren wurden die Lysate der Versuche zur Expression der PKR in SARS-CoV-infizierten und IFN β-behandelten Zellen (4.4.2.5) nun auf die Expression der PERK und GCN2 hin untersucht.

In Abb. 37 ist gezeigt, dass PERK in SARS-CoV-infizierten Zellen (ohne IFN β-Behandlung) phosphoryliert wurde, wohingegen GCN2 nicht aktiviert wurde. Phosphorylierte PERK konnte nicht in IFN β-behandelten Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde auch die Gesamtmenge des Proteins durch IFN β leicht reduziert.

Diese Ergebnisse zeigen eine eindeutige Korrelation der PERK- mit der eIF2α-Phosphorylierung (vgl. Abb. 35) in SARS-CoV-infizierten Zellen. Daraus kann geschlossen werden, dass hauptsächlich PERK die durch SARS-CoV induzierte eIF2α-Phosphorylierung vermittelt.

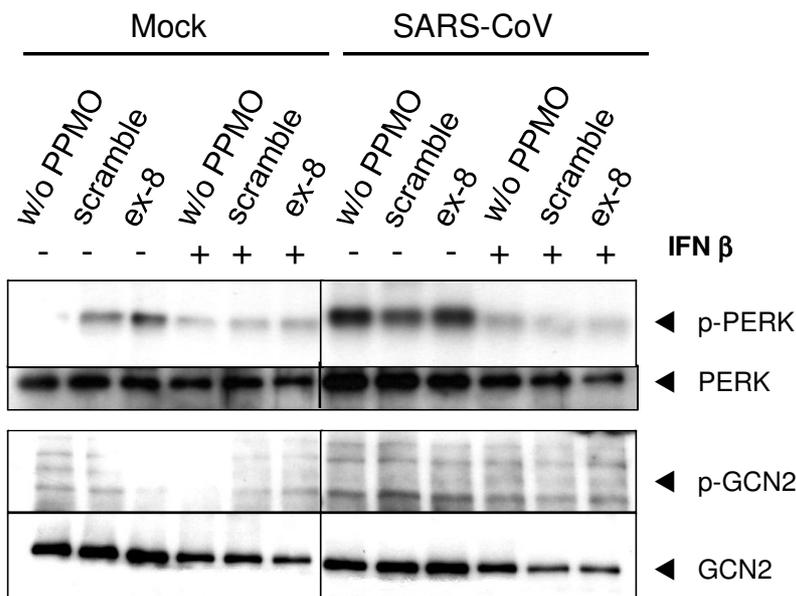


Abb. 37: Aktivierung der PERK und GCN2 in IFN β-behandelten und SARS-CoV-infizierten Zellen

Analyse der Lysate aus Abb. 35 mittels Western Blot auf die Gesamtproteinmengen und den phosphorylierten Anteil von GCN2 und PERK. (Vorgehen wie beschrieben) Verwendete Ak: A.11 Die Titer von SARS-CoV in den Überständen wurden mittels TCID₅₀ analysiert (Abb. 35). Die Versuche wurden dreimal wiederholt und zeigten das gleiche Ergebnis.

Zusammenfassung

Untersuchungen zur Aktivierung der beiden eIF2 α -phosphorylierenden Kinasen GCN2 und PERK spät in der Infektion mit SARS-CoV zeigten, dass PERK 24 und 48 h p.i. phosphoryliert vorliegt, wohingegen GCN2 nicht aktiviert wird. Interessanterweise konnte GCN2 48 h p.i. in SARS-CoV-infizierten Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Es wird ein aktiver Mechanismus für diese Beobachtung vermutet.

Weiterführende Analysen ergaben, dass in SARS-CoV-infizierten Zellen das Phosphorylierungsmuster von PERK mit dem von eIF2 α übereinstimmte, wohingegen die PKR ein anderes Muster zeigte (Abb. 35, 37).

Diese Daten legen nahe, dass in SARS-CoV-infizierten Zellen hauptsächlich PERK und nicht wie angenommen die PKR die Phosphorylierung von eIF2 α vermittelt. GCN2 ist in SARS-CoV-infizierten Zellen nicht phosphoryliert und hat demnach keinen Anteil an der Phosphorylierung von eIF2 α .

4.6 Hemmung der Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen

Die unter 4.5 beschriebenen Versuche zur Inhibition der PKR in SARS-CoV-infizierten Zellen lieferten erste Hinweise darauf, dass die Induktion von Apoptose keinen positiven Einfluss auf die Vermehrung von SARS-CoV hat. Um diese Vermutung zu unterstützen, wurde die Induktion von Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen durch die Verwendung eines Caspase-Inhibitors verhindert. Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss die Hemmung der Apoptose auf die Freisetzung der Viren in den Überstand (TCID₅₀-Analysen) hat. Die kaskadenartige Aktivierung von Caspasen stellt ein zentrales Element der Apoptose dar (47, 78) und bietet somit einen ausgezeichneten Angriffspunkt um Apoptose zu inhibieren. Im Folgenden wurde der zellgängige Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk verwendet um über die Bindung an das aktive Zentrum aller Caspasen diese sofort und irreversibel zu hemmen (22, 58).

293/ACE2-Zellen wurden nach einer einstündigen Infektionsphase mit SARS-CoV mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk behandelt. Die Überstände wurden 48 bzw. 72 h p.i. mittels TCID₅₀-Assays untersucht (3.3.2). Zur Ermittlung der Infektionsrate

wurden die Zellen mit 4% PFA inaktiviert und anschließend in der Immunfluoreszenz-Analyse mit einem Ak gegen das N-Protein des SARS-CoV gefärbt.

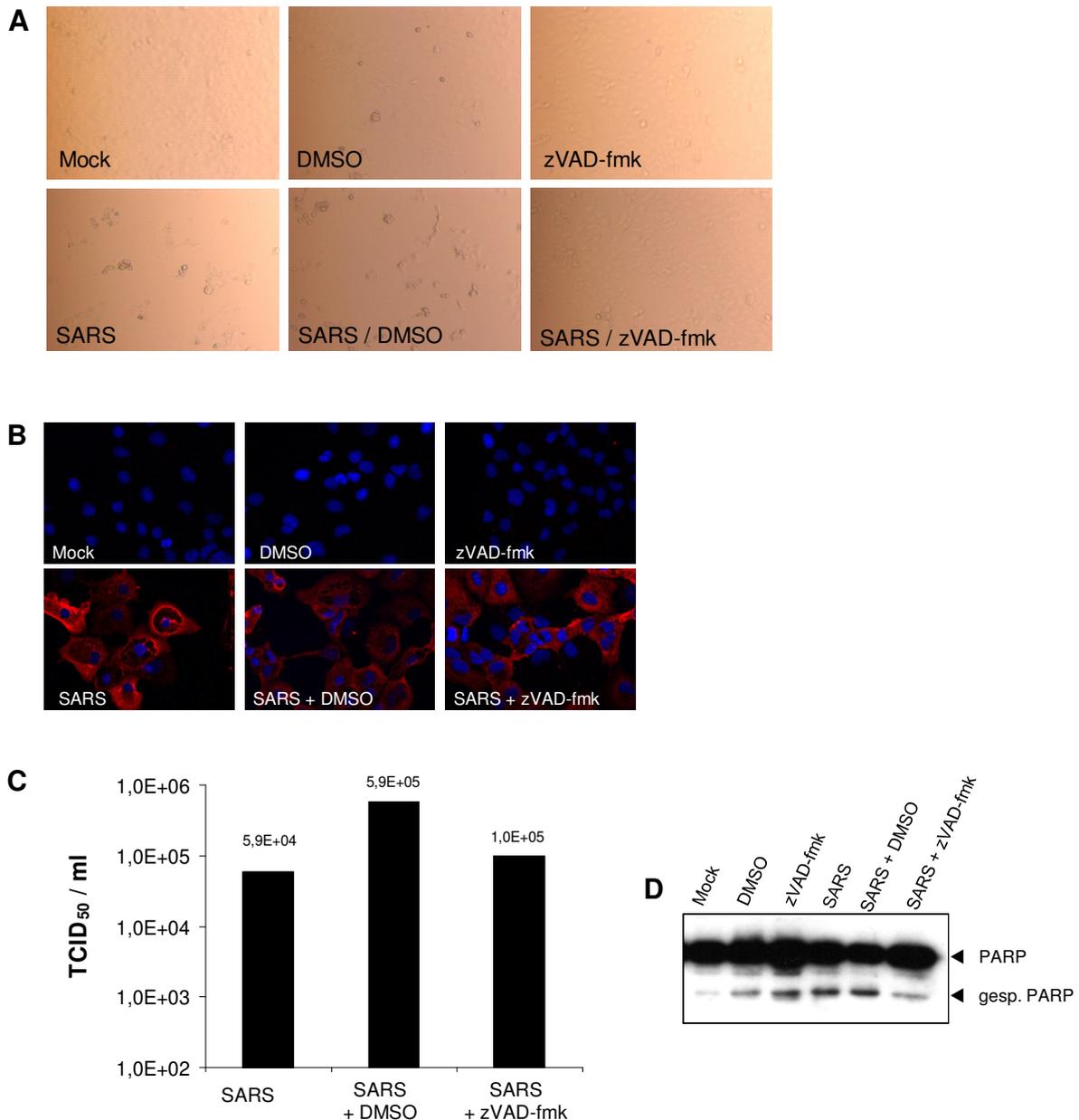


Abb. 38: Inhibition der Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen 48 h p.i.

(A) 293/ACE2-Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 mit SARS-CoV infiziert. Das Inokulum wurde entfernt und die Zellen mit DMSO (Lösungsmittel-Kontrolle) oder dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk (Endkonz.: 100 μ M) behandelt. Nach 48 Std. wurden die Zellen lichtmikroskopisch analysiert (Vergrößerung: 10x). Ein Teil dieser Zellen wurde zur Analyse der Infektionsrate wie unter Abb. 20 beschrieben geerntet und gefärbt (B). Die Überstände wurden mittels TCID₅₀-Assays analysiert (C). Die restlichen Zellen wurden in CLP (3.2.6) geerntet und im Western Blot auf PARP-Spaltung untersucht (D).

Wie in Abb. 38A anhand der mikroskopischen Bilder zu sehen, führte die Behandlung von SARS-CoV-infizierten Zellen mit zVAD-fmk zu einem abgeschwächten CPE.

Mittels IFA konnte allerdings gezeigt werden, dass in den verschiedenen Ansätzen (mit und ohne Caspase-Inhibitor, DMSO-Kontrolle, Abb. 38B) alle Zellen mit SARS-CoV infiziert waren. Übereinstimmend mit diesen Daten zeigte auch die Auswertung der $TCID_{50}$ s keine Unterschiede in der Virusfreisetzung aus den jeweiligen Zellen (Abb. 38C). In allen durchgeführten Versuchen scheint sich SARS-CoV in Anwesenheit von DMSO geringfügig besser zu vermehren.

Die Induktion der Apoptose war 48 h p.i. aufgrund der geringen MOI noch nicht sehr stark ausgeprägt (Abb. 38D). Daher wurden im Weiteren Zellen analysiert, die nach der Infektion mit SARS-CoV für 72 Std. inkubiert wurden.

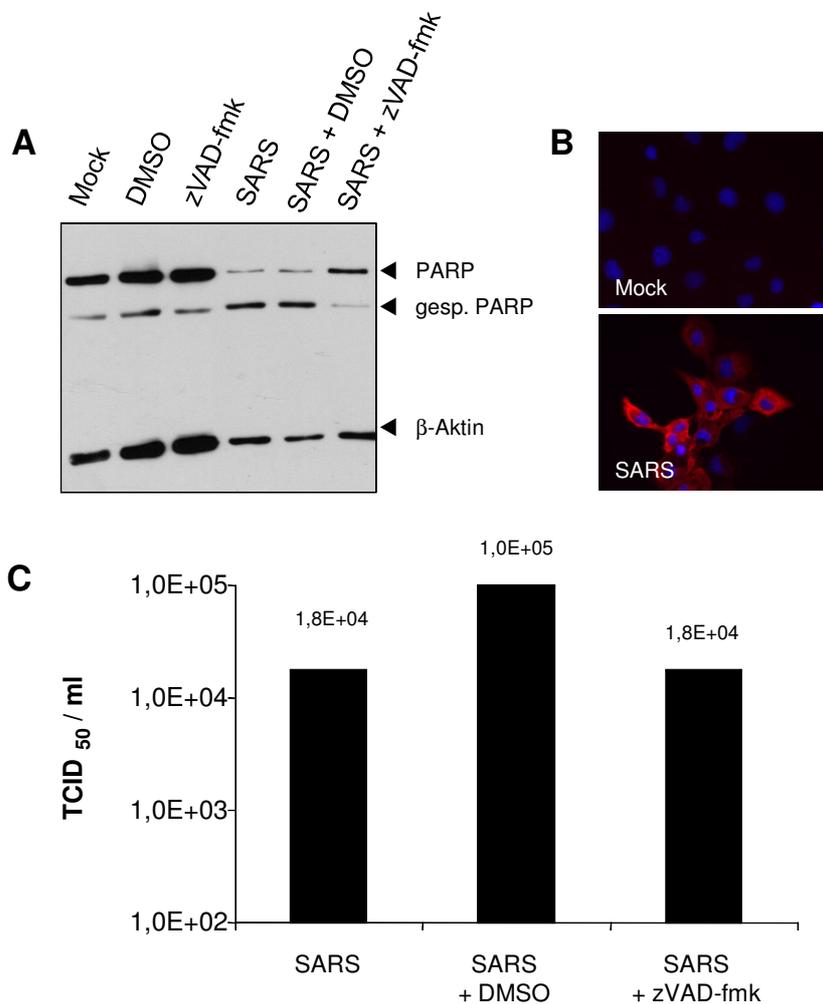


Abb. 39: Inhibition der Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen 72 h p.i.

293/ACE2-Zellen wurden wie unter Abb. 38 beschrieben infiziert und behandelt und 72 h p.i. mittels IFA (A), $TCID_{50}$ -Analysen (B) und Western Blot-Analysen untersucht (C).

Innerhalb dieser Versuchsreihe konnte eine starke Induktion von Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen ausgelöst werden, was durch die Spaltung von PARP in Abb. 39A nachgewiesen wurde. In den Zellen, die mit dem Inhibitor zVAD-fmk behandelt worden waren, war die PARP-Spaltung schwächer ausgeprägt, was jedoch keinen Einfluss auf die Infektiosität und Vermehrungsfähigkeit von SARS-CoV hatte (IFA, Abb. 39 B, C). Die Auswertung der TCID₅₀-Assays erbrachten keine Unterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Zellen.

Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die Induktion der Apoptose durch SARS-CoV in Zellkultur nicht für eine effiziente Vermehrung des Virus benötigt wird.

Zusammenfassung

Innerhalb dieses Abschnitts wurde dargestellt, dass die Hemmung der durch SARS-CoV induzierten Apoptose durch den Caspase-Inhibitor zVAD-fmk keinerlei Einfluss auf die Vermehrung des Virus hat.

4.7 Vergleichende Analysen des SARS-CoV mit dem humanen CoV NL63

Kurze Zeit nach der Entdeckung des SARS-CoV wurde ein weiteres für Menschen pathogenes Coronavirus beschrieben, das humane CoV NL63 (hCoV-NL63). Dieses Virus löst eine akute respiratorische Erkrankung bei Kindern aus. Im Gegensatz zu SARS-CoV erholen sich alle Erkrankten vollständig von der Infektion. Aufgrund dieses Unterschiedes in der Pathogenität war es nun interessant beide Viren bezüglich der Fähigkeit, das Typ-I-IFN-System zu hemmen, zu vergleichen.

4.7.1 Nachweis des hCoV-NL63 mittels RT-PCR

Da keine gegen hCoV-NL63 gerichteten Ak zur Verfügung standen, wurde eine RT-PCR zur Analyse der Infektion von Zellen etabliert. Verwendet wurden für alle folgenden PCR-Analysen die Primer N5-PCR und N3-PCR, die gegen das N-Proteingen des hCoV-NL63 gerichtet sind und ein Fragment von 255 Basen amplifizieren (198)(A.12).

Für diesen Infektionsnachweis wurden LLC-MK2-Zellen, eine der wenigen Zelllinien, in denen sich dieses Virus vermehren kann, mit hCoV-NL63 infiziert. Die zelluläre Gesamt-RNA wurde 48 h p.i. isoliert und in eine RT-PCR mit den oben genannten Primern eingesetzt (3.1.2). Das amplifizierte Produkt von nicht infizierten und hCoV-NL63-infizierten LLC-MK2-Zellen ist in Abb. 40 dargestellt.

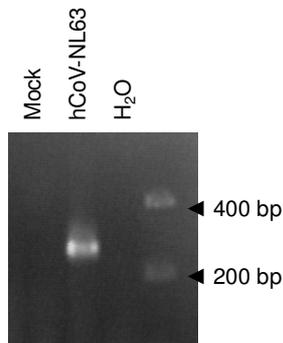


Abb. 40: Infektionsnachweis des hCoV-NL63 mittels RT-PCR

Die Infektion der LLC-MK2-Zellen mit hCoV-NL63 erfolgte mit größtmöglicher Virusmenge in einer Verdünnung von 1:2. 48 h p.i. wurde die Gesamt-RNA isoliert und ein Achtel des Volumens einer RT-PCR-Analyse (Primer # 2036, # 2037, A.12) mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese (2%) unterzogen. (Auszug aus Abb. 43)

4.7.2 Analysen zur Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch hCoV-NL63

Zunächst wurde untersucht, ob die Infektion von Zellen mit hCoV-NL63 zu einer Induktion des Typ-I-IFN-Systems führt. Hierzu wurde ein Assay mit der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) als Reporter gen durchgeführt.

Hierzu wurden LLC-MK2-Zellen mit dem CAT-Reporter gen-Konstrukt pHISG54-CAT transfiziert, welches nach Induktion der IFN-Antwort vermehrt exprimiert werden sollte. Nach 24 Std. wurden diese Zellen mit SARS-CoV, hCoV-NL63 oder SeV infiziert (3.3.3) und nach einer weiteren Inkubationszeit von 48 Std. mittels CAT-Assay (3.4.6) analysiert. Ein Teil der mit SARS-CoV- oder hCoV-NL63-infizierten Zellen wurde 24 Std. nach der ersten Infektion mit SeV überinfiziert, um die Induktion des IFN-Systems in diesen Zellen auszulösen. Die Positivkontrolle zur Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch das SeV sollte eine eindeutige CAT-Aktivität zeigen. Wäre ein Virus in der Lage diese Induktion zu hemmen, so würde man in diesen Proben keine oder eine geringere CAT-Aktivität detektieren. Durch diesen Versuch kann sowohl die Induktions- als auch die Hemmfähigkeit eines Virus bzgl. der IFN-Antwort analysiert werden.

Die Infektionseffizienz der mit hCoV-NL63 infizierten Zellen wurde wie unter Abbildung 40 beschrieben mittels RT-PCR überprüft, die der mit SARS-CoV- oder SeV-infizierten Zellen mittels IFA (3.4.4).

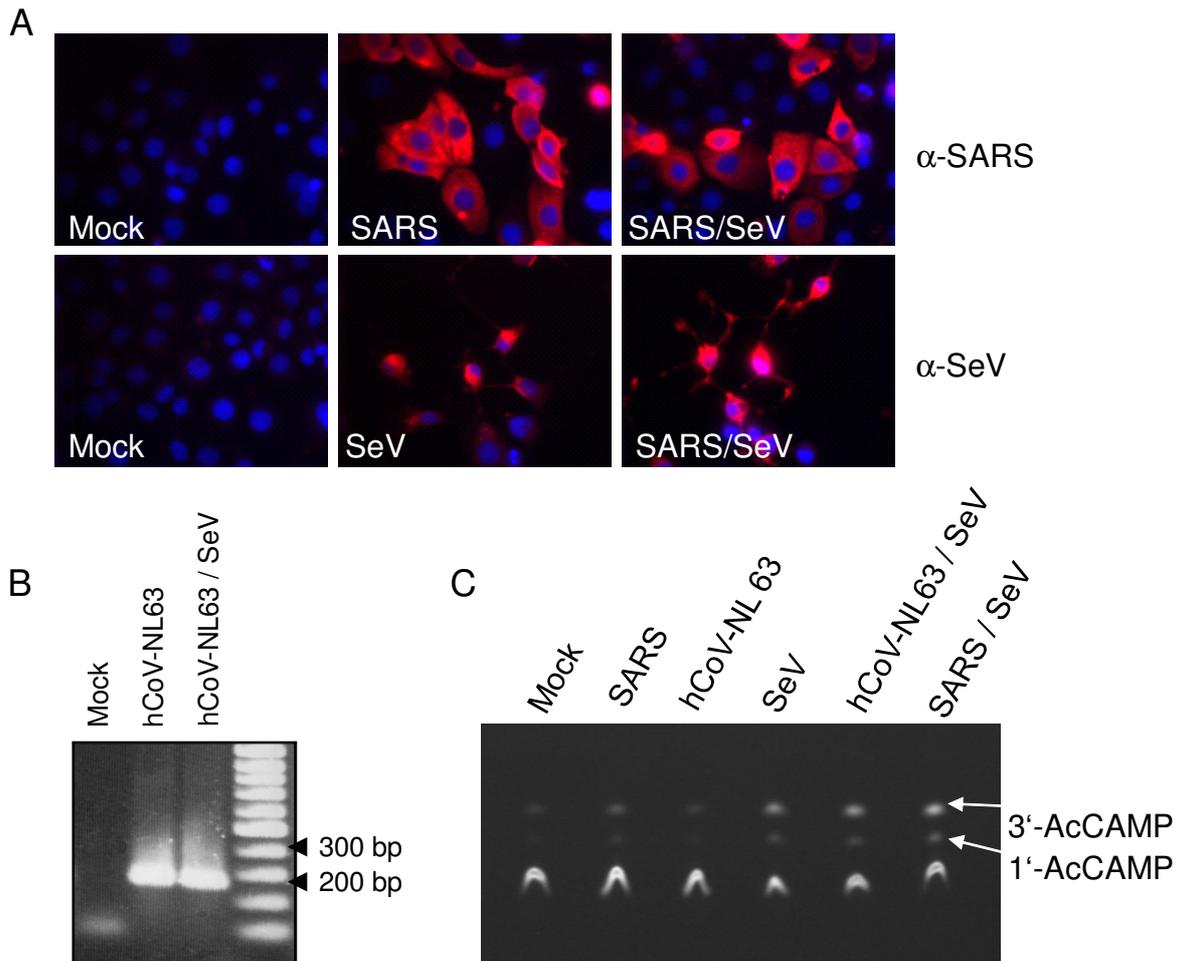


Abb. 41: Test zur Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort durch hCoV-NL63

10^4 LLC-MK2-Zellen wurden mit 2 μ g des pHISG54-CAT Reporter-Gen-Konstruktes unter Verwendung von FuGENE 6 transfiziert und nach 24 Std. mit SARS-CoV (MOI 10), SeV (20 hämagglutinierende Einheiten) oder hCoV-NL63 (1:2) infiziert. Nach weiteren 24 Std. erfolgte die Überinfektion einiger Ansätze mit SeV. 48 Std. nach der ersten Infektion wurden die Zellen geerntet (3.3.3, 3.4.6), inaktiviert und mittels IF- und RT-PCR-Analysen die Infektionsraten bestimmt (**A**, **B**). Es folgte ein Fast-CAT-Assay (Durchführung beschrieben in 3.4.6) zur Untersuchung der Induktion oder Inhibition der Typ-I-IFN-Antwort (**C**).

In Abb. 41 ist unter A gezeigt, dass 50 - 70% der Zellen mit SARS-CoV und 100% der Zellen mit SeV infiziert waren. Bezüglich der hCoV-NL63-infizierten Zellen ist keine Aussage über den Anteil infizierter Zellen möglich, da kein spezifischer Antikörper vorhanden war. Durch RT-PCR-Analysen konnte die Infektion mit hCoV-NL63 nachgewiesen werden (Abb. 41B).

Die Analyse der CAT-Aktivität (Abb. 41C) ergab allerdings keinerlei Unterschiede zwischen SARS-CoV und hCoV-NL63. Beide Viren lösten im Gegensatz zu SeV keine Induktion des Typ-I-IFN-Systems aus und waren auch nicht in der Lage die Induktion durch SeV in den überinfizierten Zellen zu hemmen.

Da es sich bei hCoV-NL63 um ein verglichen mit SARS-CoV sehr langsam wachsendes Virus handelt, wurden im Weiteren Analysen zur Induktion des Typ-I-IFN-Systems nach längeren Inkubationszeiten durchgeführt. Hierzu wurde ein System mit zwei Luziferase-Reportergenen gewählt (Transfektion von 1,5 µg pHISG54-Luz und 0,5 µg SV40-Ren), welches für die Versuche mit SARS-CoV nicht verwendet werden konnte, da unter BSL4-Bedingungen kein Luminometer zur Verfügung stand.

Der Versuch wurde wie beschrieben (Abb. 41) durchgeführt und die Zellen nach 24 bis 96 Std. geerntet. Da dieser Versuch ohne SARS-CoV außerhalb des BSL4-Labors durchgeführt werden konnte, konnte auch eine Normalisierung der erhaltenen Firefly-Luziferase-Werte mit den Renilla-Luziferase-Werten, die ein Maß für die Transfektionseffizienz und die Translationsleistung der Zellen darstellten, stattfinden. Wie in Abb. 42 dargestellt, konnte auch nach längeren Inkubationszeiten keine Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch hCoV-NL63 festgestellt werden. Die Messungen ergaben zu jedem Zeitpunkt ähnliche Werte wie bei Mock-infizierten Zellen, wohingegen bei SeV-infizierten Zellen eine eindeutige Induktion des Typ-I-IFN-Systems festzustellen war.

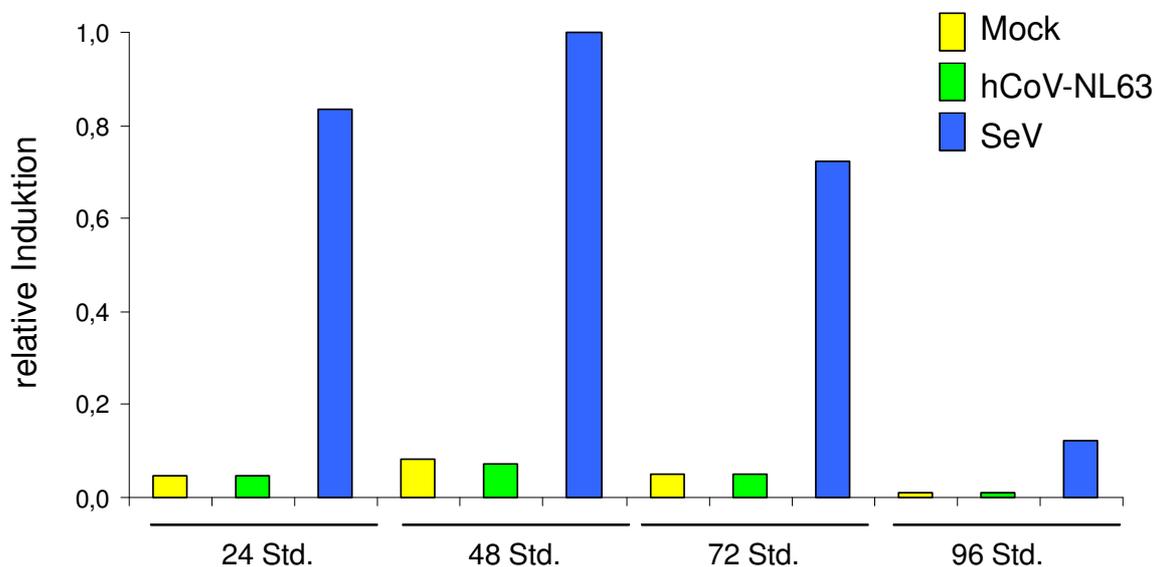


Abb. 42: Test zur Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch hCoV-NL63

10^4 LLC-MK2-Zellen wurden mit 1,5 µg des ISG54-Firefly-Luz und 0,5 µg des SV40-Renilla-Luz Reportergen-Konstruktes unter Verwendung von FuGENE 6 transfiziert und nach 24 Std. mit hCoV-NL63 (Verdünnung von 1:2) oder SeV (20 hämagglutinierende Einheiten) infiziert. 24 bis 96 Std. nach dieser Infektion wurden die Zellen lysiert und mittels eines Dual-Luziferase-Assays auf die Induktion des Typ-I-IFN-Systems untersucht (3.4.5). Es wurde eine Normalisierung der Werte anhand der Renilla-Aktivität der einzelnen Proben vorgenommen und die Induktion durch SeV nach 48 Std. gleich 1 gesetzt.

4.7.3 Nachweis von eIF2 α und dsRNA in hCoV-NL63-infizierten Zellen

Um einen weiteren Vergleich zu SARS-CoV ziehen zu können, wurde die Bildung von dsRNA und der Phosphorylierungs-Status von eIF2 α in hCoV-NL63-infizierten LLC-MK2-Zellen untersucht. Das experimentelle Vorgehen ist unter Abb. 43 beschrieben. Die Infektion der Zellen mit hCoV-NL63 wurde mit einer RT-PCR gegen das N-Proteingen des Virus nachgewiesen (Abb. 43A).

Wie bereits in SARS-CoV-infizierten Zellen, so konnte dsRNA auch in hCoV-NL63-infizierten Zellen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 43B).

Der Western Blot zum Nachweis von eIF2 α brachte jedoch keinen eindeutigen Hinweis darauf, dass die Infektion mit hCoV-NL63 eine der eIF2 α -phosphorylierenden Kinasen aktiviert und in der Folge die Phosphorylierung von eIF2 α auslöst. Im Vergleich zur Gesamtmenge an eIF2 α in den Zellen und zur Induktion durch SeV kann man davon ausgehen, dass eine eIF2 α -Phosphorylierung nicht oder nur in einem sehr geringen Umfang ausgelöst wird (Abb. 43C).

Vermutet wird, dass aufgrund der sehr langsamen Infektion im Vergleich zu SARS-CoV nur wenig dsRNA frei zugänglich ist und somit keine ausreichend starke Induktion der PKR erreicht wird. Dies belegen auch die Immunfluoreszenz-Analysen, die nur wenig dsRNA in hCoV-NL63-infizierten Zellen im Vergleich zu SARS-CoV-infizierten Zellen zeigen (Abb. 30C).

Leider konnten keine weiteren Analysen, die PKR, PERK oder GCN2 betreffend, mit hCoV-NL63 durchgeführt werden, da die verwendeten human-spezifischen Ak die jeweiligen Proteine in LLC-MK2-Zellen nicht detektierten.

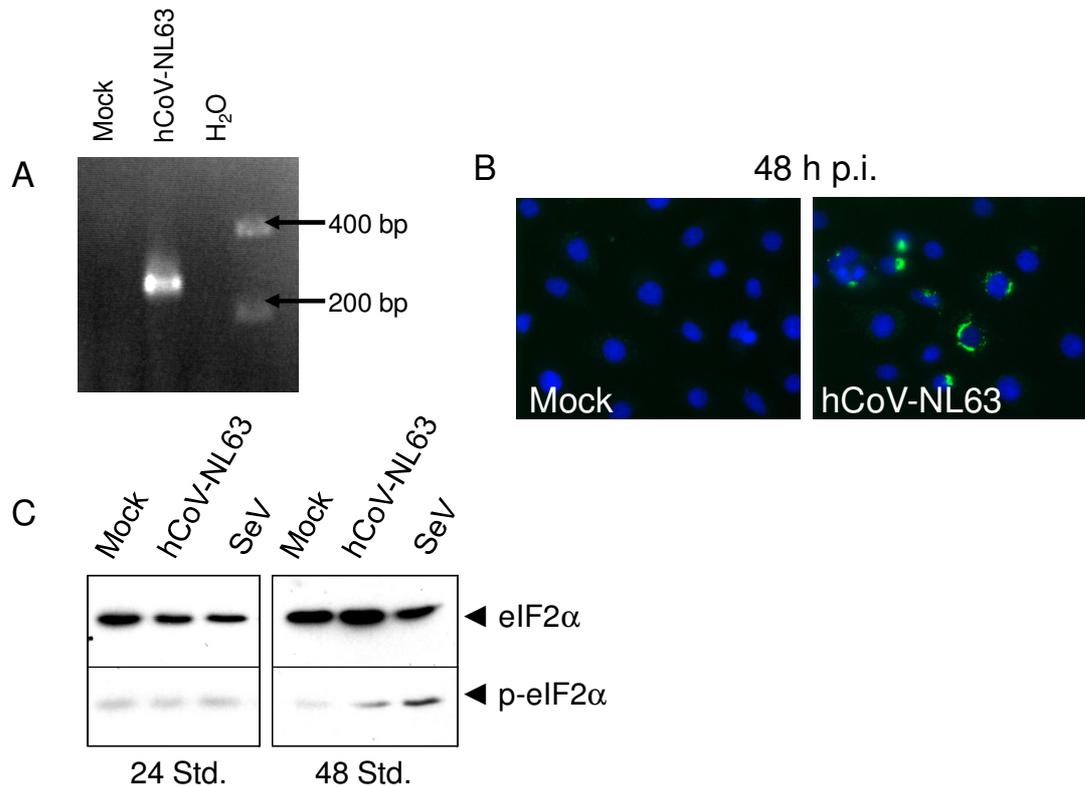


Abb. 43: Analysen zur Anwesenheit von dsRNA und des Phosphorylierungs-Status von eIF2 α in hCoV-NL63-infizierten Zellen

10⁴ LLC-MK2-Zellen wurden mit hCoV-NL63 (Verdünnung von 1:2) oder SeV (20 hämagglutinierende Einheiten) infiziert. 48 Std. nach der Infektion erfolgte der Infektionsnachweis wie unter Abb. 40 beschrieben mittels RT-PCR (A). Die Analyse zur Detektion von dsRNA (B) wurde wie in Abb. 30 durchgeführt. Die Zellen wurden lysiert und mittels Western Blot-Analysen die Menge an phosphoryliertem eIF2 α bestimmt (C). Der Versuch wurde zweimal mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von LLC-MK2-Zellen mit hCoV-NL63 nicht zu einer Induktion der Typ-I-IFN-Antwort und auch nicht zu einer verstärkten Phosphorylierung von eIF2 α führt. Die Anwesenheit von dsRNA hingegen konnte eindeutig nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war Wechselwirkungen des Typ-I-IFN-Systems mit SARS-CoV aufzuzeigen. Dazu wurden alle Nicht-Strukturproteine (nsp) sowie alle ORFs von SARS-CoV unter Verwendung eines IFN-sensitiven Reporter-gen-Assays auf ihre Fähigkeit getestet die IFN-Antwort zu hemmen.

Des Weiteren wurde die Induktion von Apoptose durch SARS-CoV untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Zellen entweder mit SARS-CoV infiziert oder mit den viralen ORFs 7a und 7b transfiziert. Die Inhibition der Expression dieser beiden ORFs sollte Aufschluss über ihre Relevanz für die Vermehrungsfähigkeit des SARS-CoV in Zellkultur geben.

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der antiviralen Protein Kinase R und deren Aktivierung in SARS-CoV-infizierten Zellen. Um den Einfluss der PKR auf die Replikation und Transkription des Virus sowie auf die durch das Virus induzierte Apoptose näher zu charakterisieren, wurde die PKR in Zellkultur unter Verwendung von PPMO inhibiert. Weitergehende Analysen beschäftigten sich mit der Induktion von zwei weiteren eIF2 α -phosphorylierenden Kinasen: PERK und GCN2.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass in SARS-CoV-infizierten Zellen, in denen die PKR inhibiert wurde, die Induktion von Apoptose reduziert ist.

Unter Verwendung des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk wurde daher näher untersucht, ob die Induktion von Apoptose einen Einfluss auf die Vermehrung von SARS-CoV ausübt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit beschäftigte ich mich mit dem Vergleich von SARS-CoV und hCoV-NL63 bezüglich deren Fähigkeit das Typ-I-IFN-System zu hemmen sowie des Phosphorylierungs-Status von eIF2 α in infizierten Zellen.

5.1 Hemmung des Typ-I-IFN-Systems durch SARS-CoV

Die Vermehrung von SARS-CoV wird nachweislich durch die Zugabe von Interferonen (IFNs) stark eingeschränkt (177). IFN β hat hierbei einen um den Faktor 50 bis 90 stärker ausgeprägten Effekt als IFN α (34). Abbildung 35 zeigt, dass die Zugabe von 10 000 IU IFN β die Menge an freigesetzten infektiösen SARS-CoV-Partikeln deutlich reduziert.

Anhand eines IFN-sensitiven Reporter-gen-Assays durchgeführt mit SARS-CoV-infizierten Zellen konnte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit bereits zeigen, dass SARS-CoV die IFN-Antwort selbst nicht auslöst (109)(Abb. 41). In SARS-CoV-infizierten Zellen ist dsRNA als Replikationsintermediat vorhanden (207)(Abb. 30). Dies ist ein Hinweis darauf, dass SARS-CoV in der Lage ist die Typ-I-IFN-Antwort zu antagonisieren, da dsRNA in infizierten Zellen die Produktion von IFNs auslösen müsste (Abb. 6, (60)).

Für das Maus-Hepatitis-Virus (MHV), ein Mitglied der Gruppe II der CoV (Abb. 2), wurde ebenfalls gezeigt, dass die kombinierte Gabe von IFN α und γ , einen ausgeprägten antiviralen Effekt auf die MHV-Infektion hatte (55, 112).

Alle 16 nsp, mit Ausnahme von nsp11, sowie alle ORFs von SARS-CoV (Abb. 4, 1.2.3) wurden unter Verwendung eines IFN-sensitiven Reporter-gen-Assays auf deren Fähigkeit getestet die IFN-Antwort zu hemmen. Nsp11 umfasst nur 13 Aminosäuren (AS) und schien somit nicht relevant für unsere Untersuchungen zu sein.

Die akzessorischen ORFs 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a und 8b zeigen keinerlei Homologie zu der Genomsequenz anderer CoV. Die nsp und Strukturproteine zeigen Homologien zwischen 10 und 70% (179).

Die Expression der rekombinanten Gene der nsp und ORFs von SARS-CoV (Abb. 13-15) konnte, mit Ausnahme des Membran-Proteins (M-Proteins) und des ORFs 8b, nachgewiesen werden.

Die Auswertung der Reporter-gen-Assays zur Untersuchung potentieller Typ-I-IFN-Antagonisten ergab, dass keines der getesteten Proteine von SARS-CoV als IFN-Antagonist identifiziert werden konnte. Dies wurde in parallel laufenden Untersuchungen in der Arbeitsgruppe um F. Weber, Institut für Virologie, Freiburg

bestätigt. Dagegen hemmte das als Positivkontrolle eingesetzte VP35 von EBOV die Typ-I-IFN-Antwort in jedem Versuch sehr effizient.

Die Identifikation des VP35 als IFN-Antagonist erfolgte bereits im Jahr 2000 durch einen Komplementations-Assay (11). In diesem Assay besaß VP35 die Fähigkeit, in IFN-produzierenden Zellen das Wachstum der Influenza Virus-Mutante delNS1 zu komplementieren. Dieser Mutante fehlt der ORF NS1 weshalb sie das NS1-Protein, welches als Typ-I-IFN-Antagonist wirkt (59, 60), nicht herstellen kann. Aus diesem Grund kann das mutierte Virus in Zellen, die eine aktive Typ-I-IFN-Antwort besitzen, nicht mehr wachsen. Wurde allerdings durch Transfektion VP35 in die Zellen eingebracht, so trat wieder Viruswachstum auf.

Basler *et al.* (2003) zeigten, dass VP35 die Virus-induzierte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 und somit dessen Dimerisierung und Translokation in den Nukleus verhindert. Weitere Analysen ergaben, dass VP35 dsRNA binden kann und somit auch die Aktivierung von RIG-I, der PKR sowie die Phosphorylierung von eIF2 α verhindert (26, 50). Indem VP35 in verschiedene Signalwege innerhalb der Typ-I-IFN-Antwort regulierend eingreift, verhindert es die Induktion antiviraler Gene einschließlich des IFN β -Gens und ISRE-regulierter Gene (Abb. 6).

Die Beobachtung, dass keiner der getesteten ORFs von SARS-CoV die IFN-Antwort hemmt, stimmt jedoch nicht mit den Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein (43, 105, 206).

Kopecky-Bromberg *et al.* (2007) konnten zeigen, dass ORF 3b, ORF 6 und das Nukleoprotein (N-Protein) des SARS-CoV die IFN-Antwort inhibieren (105).

Das N-Protein, dessen Hauptfunktion die Enkapsidierung des viralen Genoms ist, ist als Strukturkomponente sehr wichtig für SARS-CoV. Zusätzlich sind weitere Funktionen des Proteins beschrieben, wie z. B. die Induktion von Apoptose in bestimmten Zelllinien (186, 187). Auch die Transfektion von ORF 3b soll Apoptose über den Arrest der Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus induzieren (222). Die Funktionen von ORF 3b und ORF 6 sind bisher noch weitgehend unbekannt. Für ORF 6 konnte eine direkte Interaktion mit nsp8 gezeigt werden. Das lässt eine Rolle bei der SARS-CoV-Replikation vermuten, da es sich bei nsp8 um eine RNA-abhängige RNA-Polymerase handelt (91, 111).

Alle drei Proteine waren trotz einer Induktion durch das SeV, bekannt als starker Induktor des Typ-I-IFN-Systems, in der Lage, die Expression von IFN β sowie von

Genen unter der Kontrolle von ISRE-Promotoren zu hemmen. ORF 3b und 6 konnten außerdem die Induktion von Genen unter der Kontrolle von ISRE-Promotoren nach der Gabe von IFN β verhindern. Hierzu war das N-Protein nicht in der Lage. Diese Daten deuten darauf hin, dass das N-Protein die Synthese von Typ-I-IFNs hemmt, ORF 3b und ORF 6 zusätzlich dazu den durch IFNs ausgelösten Signalweg inhibieren. Daten zur Effektivität dieser Proteine in SARS-CoV-infizierten Zellen legen Kopecky-Bromberg *et al.* nicht vor.

Für diese Versuche wurde das SARS-CoV-Isolat Urbani verwendet, wohingegen in der vorliegenden Arbeit das Frankfurter-Isolat (FFM-1) verwendet wurde. Sequenzvergleiche zwischen beiden Isolaten ergaben keine Unterschiede in den Sequenzen des ORF 3b und ORF 6. In der Sequenz des N-Proteins gibt es einen Nukleotidaustausch, das Uracil an Position 28253 des FFM-1-Isolates entspricht im Urbani-Isolat einem Cytosin, wodurch ein Threonin anstelle eines Isoleucins in das Protein eingebaut wird.

Des Weiteren wurden in der beschriebenen Veröffentlichung für die Versuche zur Inhibition der Expression IFN stimulierter Gene 293T-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um 293-Zellen, die das T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) enthalten. Zur Frage steht daher, ob die Anwesenheit dieses Proteins einen Einfluss auf die durchgeführten Versuche haben kann, da die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit 293-Zellen ohne T-Antigen durchgeführt wurden. Auch bessere Transfektionseffizienzen von 293T-Zellen im Vergleich zu 293-Zellen ohne T-Antigen könnten hier eine Rolle spielen.

Als Protein, das in der Lage ist das Typ-I-IFN-System zu hemmen (Positivkontrolle), wurde in dieser Veröffentlichung das NS1-Protein von Influenza A (Stamm PR8) verwendet. Dieses konnte in dem hier verwendeten System die Induktion des Typ-I-IFN-Systems durch SeV ebenso gut unterbinden wie das VP35 des Ebola-Virus (Daten nicht gezeigt).

Daher ist es schwer nachzuvollziehen, woraus sich die Diskrepanz in den Ergebnissen bezüglich der Proteine ORF 3b und ORF 6 herleitet.

Das N-Protein hemmt nach Kopecky-Bromberg *et al.* (2007) die Synthese von IFN β (105). In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reportersystem wurden ISRE-Promotoren, jedoch keine IFN β -Promotoren verwendet. Für das N-Protein konnten wir in unserem System eine Hemmung um den Faktor 2 zeigen, die wir als nicht signifikant eingestuft haben. Kopecky-Bromberg *et al.* (2007) zeigten in ihrer

Publikation eine Hemmung der Expression von ISRE-Promotoren durch das N-Protein um den Faktor 6. Die Positivkontrolle, das Nipah-Virus W-Protein, erreichte in diesem Versuch eine Reduktion der IFN-Antwort um den Faktor 25. Auch hier war das N-Protein also nicht in der Lage die IFN-Antwort mit gleicher Effizienz wie die Positivkontrolle zu inhibieren.

Nähere Analysen der Funktion von ORF 6 als Typ-I-IFN-Antagonist ergaben, dass dieses Protein Karyopherin $\alpha 2$ im ER zurückhält. Das führt über die Konkurrenz um den Faktor Karyopherin $\beta 1$ dazu, dass die dimerisierten Transkriptionsfaktoren STAT1 / STAT2 nicht über Karyopherin $\alpha 1$ in den Zellkern gebracht werden können (54). Somit wird die Induktion von ISRE-Elementen reduziert (Abb. 6).

Ein weiterer Grund für die voneinander abweichenden Ergebnisse bei der Identifizierung von Typ-I-IFN-Antagonisten könnten unterschiedliche Expressionsraten der verwendeten Konstrukte sein (A.13). Das ORF 6-Expressionskonstrukt wurde durch Kooperationspartner in Freiburg kloniert und dort wurde dessen Expression überprüft. Die Expression des N-Proteins wurde innerhalb dieser Arbeit, die des ORFs 3b im Rahmen meiner Diplomarbeit überprüft. Das N-Protein und ORF 6 wurden in den pL18-Vektor und ORF 3b in den pCAGGS-Vektor kloniert.

Unterschiede zu den von Kopecky-Bromberg *et al.* verwendeten Konstrukten im pCAGGS-Vektor, der als starker Expressionsvektor gilt können aber dennoch bestehen.

Ein weiterer Antagonist des Typ-I-IFN-Systems ist nach Devaraj *et al.* (2007) die Papain-ähnliche Protease-Domäne des nsp3 (43). Nsp3 als größtes Protein des SARS-CoV umfasst sechs unterschiedliche Domänen und übernimmt wichtige Funktionen innerhalb der Replikation und Transkription (189). Bislang ist nur die Funktion der Papain-ähnlichen Protease-Domäne näher charakterisiert worden. Sie ist als eine der Proteasen verantwortlich für die Spaltung der Polyproteine des SARS-CoV (74). Bei der Papain-ähnlichen Protease-Domäne handelt es sich um die Aminosäuren 1 541-1 855 (Nts 4 880 - 5 830) des Polyproteins 1a des SARS-CoV-Isolates Urbani. Koimmunpräzipitations-Analysen transfizierter Zellen zeigten eine direkte Interaktion dieser Domäne mit dem Transkriptionsfaktor IRF-3. Durch diese Bindung wird die Phosphorylierung wie auch die folgende Translokation in den

Zellkern verhindert (43). Koimmunpräzipitations-Analysen mit Lysaten infizierter Zellen zeigten eine direkte Interaktion des nsp3 mit IRF-3 28 Std. nach der Infektion mit SARS-CoV.

Diese Papain-ähnliche Protease-Domäne ist vollständig in keinem der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Konstrukte vorhanden. Es existieren Konstrukte verschiedener Arbeitsgruppen, die bestimmte Domänen des nsp3 umfassen (189, 204), aber bislang ist es nur Wathelet *et al.*, gelungen nsp3 vollständig zu klonieren (206). Diese geben in ihrer Veröffentlichung allerdings auch an, dass dieses Konstrukt instabil sei (206). Da auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie in der Gruppe unserer Kooperationspartner aus Freiburg die Herstellung eines nsp3-Konstruktes nicht erfolgreich war, scheint die Klonierung und Expression von nsp3 sehr problematisch zu sein. Die von Devaraj *et al.* (43) angegebenen Nts des nsp3 des SARS-CoV-Isolats Urbani entsprechen den Nts 4865 - 5815 des SARS-CoV-Isolats FFM-1. Im Konstrukt pDest-N-his/flag-Nsp3C (A.13, Nts 4885 - 8484) ist die Papain-ähnliche Protease Domäne bis auf 20 Nts vorhanden. Aber auch diese zeigte im verwendeten Reportersystem keine Inhibition des Typ-I-IFN-Systems (Abb. 16).

Auch nsp1 wurde als Antagonist der Typ-I-IFN-Antwort identifiziert (142, 206).

Eine wichtige Funktion von nsp1 ist die Inhibition der Wirtszellproteinsynthese durch die Degradation von Wirtszell-mRNA (99). Dieser Effekt von nsp1 könnte auch zu einer unspezifischen Hemmung des Typ-I-IFN-Systems führen. In den Studien von Wathelet *et al.* (2007) wurden 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden der nsp von SARS-CoV gemeinsam mit einem IFN β -Reporter-gen-Konstrukt transfiziert und die IFN-Antwort durch SeV induziert (206). Nach Expression von nsp1 war die Reporter-gen-Aktivität in diesen Zellen um den Faktor 6 im Vergleich zu mit Leervektor transfizierten Zellen reduziert. Bei mit nsp3 transfizierten Zellen war dieser Effekt auch vorhanden, aber schwächer ausgeprägt (Faktor 2,5), was auf dessen Instabilität zurückgeführt wurde (206). Im Weiteren wurde gezeigt, dass der inhibitorische Effekt von nsp1 auf eine reduzierte Phosphorylierung von STAT1 zurückzuführen ist. Es wurden hier ausschließlich nsp des SARS-CoV getestet, daher sind keine Daten zu ORF 3b oder ORF 6 verfügbar. Der Einfluss von nsp1 auf die Vermehrung von SARS-CoV wurde durch die Verwendung einer attenuierten Mutante untersucht. Diese zeigte in IFN-defizienten Zellen Vermehrungsraten wie der Wildtyp. In IFN-kompetenten Zellen zeigte diese Mutante dagegen eine um 2,5 log-

Stufen reduzierte Vermehrung, allerdings nur bei der sehr geringen MOI von 0,00004.

Der Unterschied dieser Studie zu hier vorgestellten Daten liegt in der Verwendung eines konstitutiv exprimierten Reporter-gen-Konstruktes, welches nicht durch nsp1 in der Expression gestört wurde (vgl. Abb. 16A). Wathelet *et al.* konnten zeigen, dass die Expression von nsp1 die gleichzeitige Expression einiger Reporter-gen-Konstrukte unterbindet (206). Da allerdings nicht alle Konstrukte mit den gleichen Promotoren oder den gleichen Reporter-genen von dieser Funktion des nsp1 betroffen waren, wird vermutet, dass nsp1 flankierende Regionen der exprimierten Gene zum Ziel hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Luziferase-Reporter-gen-Konstrukt unter der Kontrolle eines SV-40 Promotors verwendet, dessen Expression eindeutig durch die Kotransfektion von nsp1 verhindert wurde (Abb. 16A). Das machte die Auswertung der Assays zur Identifikation der Typ-I-IFN-Antagonisten bezüglich des nsp1 schwierig, da die schlechte Expressionseffizienz in die erhaltenen Werte eingerechnet wurde.

Ein ähnlicher Effekt ist auch für das nsp1 des MHV beschrieben. Rekombinante MHV mit einer Deletion von 99 Nts (Nts 829 - 927) im Bereich des nsp1 wuchsen in Zellkultur zwar normal, waren *in vivo* allerdings stark attenuiert. Dieser Effekt konnte aufgehoben werden, indem Typ-I-IFN-Rezeptor-defiziente Mäuse verwendet wurden, was darauf hindeutet, dass nsp1 in das IFN-System hemmend eingreift (233).

Viele Viren besitzen IFN-Antagonisten, um zelluläre Abwehrmechanismen zu überwinden. Bei Coronaviren wird noch ein anderer Mechanismus diskutiert, der hilft die Induktion von IFNs zu verhindern. Während einer MHV- oder einer SARS-CoV-Infektion in Zellkultur wird IRF-3 nicht bzw. nur sehr früh (8 h p.i.) in den Kern gebracht (176, 230). In meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass SARS-CoV nicht in der Lage ist die durch SeV-induzierte IFN-Bildung über IRF-3 zu inhibieren (109). Auch MHV kann die durch polyIC, einer künstlichen dsRNA, ausgelöste Induktion von IFNs über diesen Signalweg nicht verhindern (230). Es kommt hinzu, dass dsRNA in CoV-infizierten Zellen zwar als Replikationsintermediat vorhanden ist (207) (Abb. 30, 43), aber nicht zur Induktion von IFNs führt. Es könnte demnach sein, dass die Inhibition der IFN-Antwort in CoV-infizierten Zellen gar nicht nötig ist, da andere

Mechanismen existieren, die die Erkennung viraler Strukturen, wie dsRNA, durch das Immunsystem verhindern. (202, 230). Diese These wird durch zwei weitere Veröffentlichungen gestützt. Es konnte gezeigt werden, dass sich mögliche Replikationskomplexe von SARS-CoV sehr früh in der Infektion in vom endoplasmatischen Retikulum abstammenden „double-membrane“-Vesikeln zusammenlagern und dort somit auch vor zellulären Sensormolekülen geschützt wären (175, 181).

Die Vorbehandlung von MHV-infizierten Zellen mit IFN α allein (1 - 10 000 IU) führte nicht zu einer Reduktion des Viruswachstums, wohingegen die Vermehrung des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) ab einer Behandlung mit 100 IU bereits stark eingeschränkt war (165, 219). Diese Beobachtung könnte ebenfalls auf den Schutz des Virus vor Sensormolekülen innerhalb von Membranstrukturen zurückzuführen sein. Rescue-Versuche eines Vaccinia-Virus (VV), dem der IFN-Antagonist E3L fehlt (Δ E3L), zeigten dagegen, dass dieses Virus in Anwesenheit von IFN wachsen kann, wenn das Nukleoprotein des MHV gleichzeitig exprimiert wird. Das S-Protein hatte keinen positiven Einfluss auf die Vermehrung des VV Δ E3L in IFN-vorbehandelten Zellen. Daher wird vermutet, dass es sich bei dem N-Protein des MHV um einen Typ-I-IFN-Antagonisten handelt (219).

Zusätzlich kann MHV die Mengen an IFN reduzieren, die während einer SeV-Infektion induziert werden, ohne die Lokalisation von IRF-3 im Kern oder die Stabilität der IFN-mRNA zu beeinflussen. Allerdings wird in Gehirnen von infizierten Mäusen während einer MHV-Infektion IFN gebildet, was zur Annahme führt, dass die in vitro beobachteten Inhibitionsmechanismen nicht ausreichen, um eine Produktion von IFN in vivo zu verhindern (165). Schlussfolgernd kann man sagen, dass MHV resistent gegen einige Signalwege der Typ-I-IFN-Antwort ist und vermutlich eine einzigartige Strategie verwendet, die IFN-Antwort an verschiedenen Stellen zu hemmen.

5.2 Funktionelle Charakterisierung von ORF 7a und ORF 7b

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die Expression von ORF 7a und 7b eine erhöhte Expression IFN-stimulierter Gene hervorgerufen wurde (Abb. 18). Somit gelten diese beiden Proteine als Induktoren der Typ-I-IFN-Antwort. Es ist jedoch nicht bekannt, ob dieser Effekt auf die Überexpression der Proteine im rekombinanten System zurückzuführen ist, da in SARS-CoV-infizierten Zellen keine IFN-Induktion beobachtet werden konnte.

Interessant war die Beobachtung, dass das SARS-CoV-Isolat FFM-1 ausgehend von Passage drei in Zellkultur eine natürliche Deletion von 45 Nts im ORF 7b aufweist (Nts: 27 654 - 27 698 von GenBank accession No. AY310120) (195). Die ORF 7b-Deletionsmutante war nicht mehr in der Lage das Typ-I-IFN-System zu induzieren.

Sequenzvergleiche von 54 verschiedenen SARS-CoV-Isolaten ergaben, dass alle entstandenen Deletionsmutationen im Bereich der ORFs 7b und 8a auftraten (201). Zusätzlich zu fünf Deletionen in diesem Bereich wurden eine Insertion und viele Nukleotidaustausche gefunden, die teilweise zu Aminosäureaustauschen führten. Aufgrund der erhaltenen Daten wurde eine Mutationsrate von 0,172 Nts pro Genom pro Tag errechnet (oder $5,7 \times 10^{-6}$ Nukleotidaustausche pro Stelle pro Tag). Dies entspricht Mutationsraten ähnlich anderer RNA-Viren (45), welche aber generell sehr hoch im Vergleich zur Mutationsrate von DNA-Viren ist. Diese können auf die „proof-reading“-Aktivität zellulärer DNA-Polymerasen zurückgreifen und senken dadurch die Mutationsrate ihres Genoms.

Einige Mitglieder der *Nidovirales* sind dafür bekannt, die Produktion von Typ-I-IFNs in Zellen auszulösen. So ist das „porcine reproductive and respiratory syndrome virus“ (PRRSV) ein starker Induktor von IFN α in den Lungen von Schweinen (23). Des Weiteren sind verschiedene Stämme des „avian infectious bronchitis virus“ (IBV) in der Lage in verschiedenen Organen von sechs Wochen alten Hühnern die Produktion von IFNs auszulösen (146). Auch neurotrophe CoV induzieren die Bildung von IFN β im Zentralen Nervensystem infizierter Nager (93).

Am besten als Induktor von IFN innerhalb der CoV charakterisiert ist das „transmissible gastroenteritis virus“ (TGEV) (14, 29, 30, 116, 160-162), ein Mitglied

der Gruppe I der CoV (Abb. 2), welches in vitro und in vivo die Synthese von IFN α hervorruft (160). TGEV verursacht in Schweinen respiratorische- sowie Darmerkrankungen (114). Das Membran-Protein (M-Protein), schien als Induktor der IFN-Antwort identifiziert. Es besitzt eine kurze N-terminale Domäne an der Oberfläche des Viruspartikels, über die es die IFN α -Synthese auslöst (161, 162). Durch die Verwendung von monoklonalen Ak gegen dieses Protein konnte dessen IFN-induzierende Fähigkeit jedoch nicht blockiert werden (29). Da auch die rekombinante Expression des M-Proteins nicht zur Produktion von IFN α führte, wird vermutet, dass weitere virale Komponenten für die IFN-Induktion benötigt werden (14). Wichtig für die IFN α -Induktion scheint die Glykosylierung der viralen Proteine, im Besonderen die Verfügbarkeit komplexer Oligosaccharide (30) und die Anwesenheit komplexer nativer Strukturen der Hüllproteine zu sein (161, 162).

Analysen der Spaltung von Caspase 3 ergaben, dass die Überexpression von ORF 7a und 7b zusätzlich zur Induktion von IFN in 293-Zellen auch zur Induktion von Apoptose in Vero E6-Zellen führt. Vergleichbar zu den Daten bezüglich der IFN-Induktion war die Deletionsmutante von ORF 7b wiederum nicht in der Lage, Apoptose zu induzieren.

Weitergehende Analysen der Aktivierung von Caspase 8 waren nicht möglich, da die Transfektion von Leervektoren alleine bereits zu einer Spaltung von Caspase 8 führte. Beobachtungen anderer Gruppen zeigten ähnliche Ergebnisse bezüglich kationischer Liposomen, die über die „p38 mitogen-activated protein kinase“ (p38-MAPK) die Spaltung von Caspase 8 induzieren (95).

Da die Expressionsrate der Deletionsmutante von ORF 7b wesentlich geringer war als die des Volle-Länge-Proteins (Abb. 13), kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Verlust der Fähigkeit zur Induktion des Typ-I-IFN-Systems und der Apoptose nicht auf die Deletion zurückzuführen ist sondern auf die schwächeren Expression des Proteins.

Übereinstimmend mit den hier vorgestellten Daten wurde die Induktion von Apoptose durch die Überexpression von ORF 7a auch von anderen Gruppen beobachtet. So konnten Tan *et al.* zeigen, dass die Überexpression von ORF 7a in verschiedenen Zelllinien Apoptose über Caspase-abhängige Signalwege induziert (190). Dieser Effekt konnte durch die Überexpression von Bcl-XL, einem anti-apoptotischen

Mitglied der Bcl2-Familie, aufgehoben werden. Koimmunpräzipitations-Analysen zeigten, dass ORF 7a mit verschiedenen anti-apoptotischen Proteinen der Bcl2 Familie nicht jedoch mit pro-apoptotischen interagiert. Für die Bindung an Bcl-XL sind die Aminosäuren 224 und 225 essentiell (192).

Die Fähigkeit von ORF 7a Apoptose zu induzieren könnte auch auf die von Kopecky-Bromberg *et al.* beschriebene Inhibition der Translation und Aktivierung der p38-MAPK durch ORF 7a zurückgeführt werden (106). P38-MAPK liegt auch in SARS-CoV-infizierten Zellen in aktiver Form vor (138). Zusätzlich zur Inhibition der Translation scheint ORF 7a auch den Zellzyklus negativ zu regulieren. Über die Reduktion der Expression von Cyclin-D3, was zur Inhibition der Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins führt, stoppt ORF 7a den Zellzyklus in der G0/G1-Phase (223).

Über ORF 7b war lange Zeit nicht viel bekannt. So wurde erst 2006 die Expression und zelluläre Lokalisation des Proteins in SARS-CoV-infizierten Zellen nachgewiesen (151). ORF 7b ist ein Typ-III-Transmembranprotein und im Golgi-Kompartiment lokalisiert (169).

Die Bedeutung von ORF 7a und 7b für die Vermehrung des SARS-CoV ist bislang nicht eindeutig geklärt. So sollte die Inhibition der Expression der ORFs 7a und 7b durch synthetische DNA-Analoga: Peptid-gekoppelte Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomere (PPMO) Aufschluss über ihre Relevanz für die Vermehrungsfähigkeit des SARS-CoV in Zellkultur geben. Da PPMO durch Endozytose aufgenommen werden (2, 40), ist eine Transfektion dieser Komponenten nicht nötig. Auch längere Inkubationszeiten sind möglich, da PPMO sehr stabil in humanem Serum und nahezu resistent gegenüber Nukleasen sind (89, 221).

Die ORFs 7a und 7b werden von einer subgenomischen (sg)-mRNA translatiert. Als Ziel für die PPMO diene das Start-Codon des jeweiligen ORFs. Die Maskierung des Start-Codons durch die Bindung der PPMO sollte deren Expression in infizierten Zellen verhindern.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Vermehrung des SARS-CoV durch die Verwendung eines ORF 7a-spezifischen PPMO stark eingeschränkt war, wohingegen ein PPMO, welches gegen ORF 7b gerichtet war, keinen Effekt auf das Virus und seine Ausbreitung in Zellkultur hatte.

Die Vermehrung verschiedener Viren, wie z.B. Ebola-Viren, Influenza A Viren, Herpesviren und Dengue-Viren, konnte bereits durch die Verwendung von PPMO inhibiert werden (24, 49, 52, 62, 85, 199, 228, 229).

Auch Mitglieder der *Nidovirales* waren schon Ziel dieser Inhibierungsstrategie. So wurde die Vermehrung zweier Arteriviren, des „equinen arteritis virus“ (199) und des PRRSV (228) erfolgreich durch die Verwendung von PPMO gehemmt. Hierbei waren jeweils die PPMO am erfolgreichsten, die gegen die 5'-nicht translatierte Region (5'-UTR) des jeweiligen Genoms gerichtet waren.

Burrer *et al.* konnten zeigen, dass ein PPMO, welches gegen die ersten 20 Nts des 5'-Endes des Genoms gerichtet war, die Vermehrung des MHV einschränken konnte. Dies war in vitro wie auch in vivo der Fall und führte bei fünf verschiedenen MHV-Stämmen zu reduzierten Titern von bis zu 4 log-Stufen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen oder Mäusen (24).

Wie bei MHV konnten auch PPMO gegen das SARS-CoV erfolgreich die Vermehrung des Virus einschränken (143). Zwei PPMO, die gegen die „transcription regulating sequences“ (TRS) in der 5'-UTR gerichtet sind, waren dabei mit einer Reduktion der Titer um 2 bis 4 log-Stufen die effizientesten. Beide schlossen in ihre Sequenz die TRS-Konsensus-Sequenz (5'-ACG AAC, (48)) mit ein. Nach einigen Viruspassagen in Anwesenheit dieser PPMO entstanden allerdings resistente SARS-CoV, die etwas langsamer wuchsen als der Wildtyp. Innerhalb des Genoms dieser Viren waren drei benachbarte Nts in der Binderegion des PPMO mutiert (CTC zu AAA), was nach Vorhersagen aufgrund der Nukleotidsequenz (Mfold) zu einer veränderten Sekundärstruktur dieser Region führt.

Die hier verwendeten PPMO waren gegen die Start-Codons von ORF 7a und 7b gerichtet und sollten sowohl an die genomische RNA, wie auch an die sg-mRNAs binden. Über die daraus resultierende sterische Hemmung während der Initiation der Translation sollte die Expression der beiden Proteine verhindert werden. Um die Erkennung des AUG der sg-mRNA effektiv einzuschränken, sollten zu beiden Seiten mindestens 6 Nts ebenfalls an die Ziel-RNA binden. Das Design der PPMO nach diesen Vorgaben führte dazu, dass das PPMO gegen ORF 7a im 5'-Bereich die komplementäre Sequenz zur TRS-Konsensus-Sequenz des SARS-CoV enthielt. Ein Vergleich der Zielsequenz des PPMO 7a mit der Sequenz des TRS im leader-Bereich der genomischen RNA von SARS-CoV zeigte, dass eine Bindung dort

möglich ist. Zusätzlich könnten auch alle anderen TRS-Sequenzen ein Ziel dieses PPMO sein.

Zielsequenz des PPMO 7a	ACG AAC ATG AAA ATT ATT CTC TTC
3' Bereich des 5'-leaders	ACG AAC TTT AAA ATC TGT GTA GCT

Das PPMO gegen ORF 7b wie auch unspezifische PPMO hatten keinen Einfluss auf die Vermehrung des SARS-CoV. Verschiedene Studien zur Hemmung von CoV mittels PPMO zeigten die größte Effektivität bei PPMO, die an die 5'-Bereiche der Genome binden. Waren Sequenzen innerhalb des Genoms Ziel der PPMO, so hatte das keinen Effekt auf die Vermehrung der CoV.

Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Effektivität des PPMO 7a die Vermehrung von SARS-CoV zu hemmen, darauf beruht, dass es im 5'-Bereich des SARS-CoV-Genoms an die TRS-Sequenz binden kann.

Andere Untersuchungen bezüglich der Rolle von ORF 7a und 7b in der SARS-CoV-Replikation erbrachten sich widersprechende Ergebnisse. Akerstrom *et al.*, konnten unter Verwendung von siRNAs, die spezifisch die Expression von ORF 7a verhindern, eine Reduktion der Virusfreisetzung um 1 bis 1,5 log-Stufen erreichen. Daher wurde vermutet, dass es sich bei ORF 7a um einen wichtigen Faktor für die SARS-CoV-Replikation handelt (3).

Schaecher *et al.* zeigten hingegen, dass rekombinante SARS-CoV, in denen die Gene für ORF 7a und 7b deletiert wurden, in verschiedenen Zelllinien sowie im Goldhamster zu gleichen Titern wie der Wildtyp wachsen. Auch frühe Stadien der Apoptose, wie die Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran oder die Spaltung von Caspase 3, waren von der Deletion der Gene nicht beeinflusst. Leichte Unterschiede wurden bei der Virus-induzierten DNA-Fragmentierung beobachtet. 48 Std. nach der Infektion mit SARS-CoV waren 25% der Zellen im TUNEL-Assay positiv, wohingegen bei rekombinanten Viren ohne ORF 7a und 7b weniger als 10% der Zellen DNA-Fragmentierung im Zellkern zeigten (170). Durch diese Daten wird deutlich, dass ORF 7a und 7b zwar zur Induktion von Apoptose beitragen, allerdings dafür nicht alleine verantwortlich sind.

Rekombinante SARS-CoV, denen die ORFs 6, 7a, 7b, 8a, 8b und 9b fehlen, sind noch in der Lage virale Partikel zu formen, die die gleiche Morphologie wie die des

Wildtyps zeigen. Auch die Replikationsfähigkeit dieser Viren ist in verschiedenen Zelllinien (Vero E6, CaCo-2 und HUH7.5.1) nicht eingeschränkt (41).

Die durch die Verwendung von PPMO gegen ORF 7a und 7b im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten unterstützen die Annahme, dass ORF 7b entbehrlich für die Vermehrung von SARS-CoV ist. Die Behandlung von Zellen mit PPMO ORF 7b hatte keinen Einfluss auf die Vermehrung von SARS-CoV. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass die PPMO-Behandlung die Expression von ORF 7b inhibierte, da die Expression von ORF 7b in Zellen, die mit dem FFM-1-Isolat des SARS-CoV infiziert waren, nicht nachgewiesen werden konnte. Das legt die Vermutung nahe, dass in diesen Zellen nur die Deletionsmutante von ORF 7b exprimiert wird. Bezüglich der Funktion von ORF 7a lässt sich keine eindeutige Aussage treffen. Es müsste zunächst gezeigt werden, dass der Effekt des PPMO 7a auf die Vermehrung von SARS-CoV nicht auf die Inhibition der Expression von ORF 7a sondern auf die Bindung an die TRS-Sequenz im 5'-Bereich zurückzuführen ist.

Fasst man nun alle Daten zusammen, so ist festzustellen, dass die ORFs 7a und 7b zur Induktion von Apoptose über verschiedenste Mechanismen beitragen. Allerdings werden sie dabei durch andere Proteine des SARS-CoV unterstützt, sodass sie für die meisten Prozesse zur Induktion von Apoptose und die Vermehrung des SARS-CoV entbehrlich sind.

5.3 SARS-CoV induziert Apoptose über die PKR, ist aber resistent gegenüber deren antiviraler Aktivität

In meiner Diplomarbeit (109) habe ich gezeigt, dass der Translationsinitiationsfaktor eIF2 α in SARS-CoV-infizierten Zellen phosphoryliert und demnach inaktiv vorliegt. Diese Phosphorylierung führt dazu, dass eIF2 α nach der Initiation der Translation nicht mehr regeneriert werden kann. Somit steht aktives eIF2 α nicht länger zur Verfügung, was zum Stopp der Translation in diesen Zellen sowie zur Induktion von Apoptose führen kann (Abb. 7).

Verschiedene zelluläre Kinasen phosphorylieren eIF2 α . Die PKR, bekannt als antivirale Kinase, wird durch dsRNA aktiviert. Auch die „PKR-like endoplasmatic reticulum kinase“ (PERK) und die „general control non-derepressible-2 kinase“, (GCN2) können durch virale Infektionen induziert werden (16, 28, 203). Im Vorfeld dieser Arbeit war nicht klar, welche dieser Kinasen verantwortlich für die Phosphorylierung von eIF2 α ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte dsRNA, bekannt als Induktor der PKR, in SARS-CoV-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 30)(207). PKR spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von viralen Infektionen und wird durch die Typ-I-IFN-Antwort induziert, weshalb viele Viren PKR-Antagonisten besitzen (69, 72). Aus diesen Punkten resultierte die Fokussierung auf die PKR als verantwortliche Kinase für die Phosphorylierung von eIF2 α .

Western Blot-Analysen zeigten eine Aktivierung der PKR in SARS-CoV-infizierten Zellen (Abb. 30). Um den Einfluss dieser Aktivierung auf die Vermehrung von SARS-CoV näher zu charakterisieren, sollte die PKR in SARS-CoV-infizierten Zellen gehemmt werden. PKR-Inhibitionsversuche unter Verwendung gängiger siRNA-Ansätze oder einer dominant-negativen PKR-Mutante (121) brachten keinen Erfolg. So wurden PPMO zur Inhibition der PKR eingesetzt. Es wurden vier verschiedene PPMO getestet, die an verschiedene Regionen der PKR-mRNA binden und dadurch deren Expression verhindern sollten.

PPMO ‚AUG‘, welches gegen das Start-Codon der PKR-mRNA gerichtet ist, und 5'ED, welches im 5'-Bereich der PKR-mRNA bindet, hatten keinen Effekt auf die

Expression der PKR in behandelten Zellen. PPMO ex-7 wirkte inhibitorisch auf die Expression der PKR, war aber auch toxisch für die behandelten Zellen und konnte somit nicht für weitergehende Versuche eingesetzt werden. In meinen Versuchen erwies sich PPMO ex-8 als der effektivste Inhibitor der PKR-Expression. Ex-8 bindet an den 5'-Bereich von Exon-8 der PKR-mRNA, wodurch über eine sterische Hemmung die Spleißstelle nicht korrekt erkannt und somit Exon-8 aus der mRNA entfernt werden soll. Diese Annahme konnte durch RT-PCR-Analysen bestätigt werden. Wichtig war hier, dass die Exzision von Exons zu einer Verschiebung des Leserasters führt.

Es gab bereits erfolgreiche Versuche die Expression von eukaryotischen Genen durch PPMO zu unterbinden. Ein Beispiel ist die Behandlung von Zellen mit PPMO gerichtet gegen die Dystrophin-mRNA, die zum Verlust von einem oder mehreren Exons führt. Leserasterschub-Mutationen in diesem Gen führen in der Regel zu einem nicht funktionellen Protein, was zur Ausprägung der Duchenne'schen Muskeldystrophie führt. Die Exzision einiger Exons (im Leseraster) führt nun nicht zum Verlust der Proteinfunktion, sondern zu einem zwar verkürzten, aber eingeschränkt funktionellen Protein. Aus dieser Deletion resultiert die sogenannte Becker-Muskeldystrophie, die meist asymptomatisch verläuft, da das trunkierte Protein die Rolle des Wildtyp-Dystrophins übernehmen kann (52, 131-133). Hier ist es im Gegensatz zu unserem Vorhaben wichtig keine Verschiebung des Leserasters durch die Behandlung mit PPMO hervorzurufen.

Um ihre Funktion zu erfüllen müssen PPMO in ausreichender Menge bis in den Kern der Zelle vordringen. Vergleichende Studien ergaben, dass verschiedene Peptide, die an PMO gekoppelt werden können, in der Lage sind diese in Zellen und in den Kern zu bringen. Allerdings bestehen große Unterschiede in der Effizienz dieses Transportes. Es wurde gezeigt, dass ein Großteil der PPMO über Endozytose aufgenommen wird, der limitierende Faktor ist dann die Freisetzung der PPMO aus Vesikeln. Das bisher effizienteste Peptid für diesen Schritt ist das (RXR)₄XB-Peptid (R = Arginin, X = 6 aminohexanoic acid, B = β -Alanin) welches auch hier verwendet wurde (2, 139).

Durch die Behandlung von SARS-CoV-infizierten Zellen mit PPMO ex-8 konnte die Expression der PKR um 98% reduziert werden. In diesen Zellen zeigte sich, dass die durch SARS-CoV induzierte Apoptose im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich

reduziert war, wohingegen eIF2 α trotz inhibierter PKR phosphoryliert vorlag. Überraschenderweise war die Replikationsrate von SARS-CoV in ex-8-behandelten Zellen unverändert im Vergleich zu nicht PPMO-behandelten Zellen (Abb. 34, 35). Dies weist darauf hin, dass weder die PKR-Aktivierung noch die Induktion von Apoptose die Vermehrung von SARS-CoV beeinflussen.

Das Virus scheint eine andere Strategie entwickelt zu haben den antiviralen Funktionen der PKR zu entgehen. Hierzu könnte auch die bevorzugte Translation der SARS-CoV-mRNA trotz phosphoryliertem eIF2 α zählen.

Die Vorbehandlung von SARS-CoV-infizierten Zellen mit IFN β führte zwar zu einer zusätzlichen Induktion der PKR, die Mengen phosphorylierter PKR nahmen im Vergleich zu nicht IFN β -behandelten SARS-CoV-infizierten Zellen allerdings nicht zu. Das spricht dafür, dass eine SARS-CoV-Infektion bereits zu einer vollständigen Phosphorylierung der PKR führt und dies nicht durch die Gabe von IFN β verstärkt wird. Auch bei IFN β -behandelten Zellen war kein Unterschied in der Vermehrungsrate von SARS-CoV in ex-8-behandelten und nicht behandelten Zellen zu detektieren. Die Virusreplikation war bei allen Ansätzen im gleichen Maße durch die Behandlung mit IFN β eingeschränkt. Dies weist darauf hin, dass auch in IFN β -behandelten Zellen aktive PKR keine Rolle als antiviraler Faktor in der SARS-CoV-Infektion spielt.

Eine transiente oder stabile Inhibition der PKR in humanen Zellen wurde auch von anderen Gruppen beschrieben. RNA-Interferenz führte in diesen Versuchen zur Reduktion der PKR-Menge um 50% bis 98% der Ausgangsmenge (57, 66, 117, 225, 226). Im Rahmen unserer Inhibitionsversuche wurde die PKR-Expression ebenfalls um 98% reduziert.

PKR-defiziente HeLa-Zellen zeigten in den Versuchen von Zhang *et al.*, eine schwächere Induktion dsRNA-abhängiger Apoptose und dieses korrelierte mit einer ebenfalls reduzierten Menge an phosphoryliertem eIF2 α (226).

Wurden diese PKR-defizienten Zellen mit einem Vaccinia-Virus infiziert, welchem der PKR-Inhibitor E3L fehlte (Δ E3L), so vermehrte sich dieses Virus nach dem ersten Replikationszyklus um 2 log-Stufen besser als in Zellen mit aktiver PKR. Des Weiteren war die für Δ E3L charakteristische Induktion von Apoptose wie auch die Phosphorylierung von eIF2 α in PKR-defizienten Zellen reduziert (225). Daher wird angenommen, dass die eIF2 α -Phosphorylierung in Vaccinia-Virus-infizierten Zellen

hauptsächlich durch die PKR vermittelt wird. Dies scheint jedoch nicht bei SARS-CoV der Fall zu sein, da eIF2 α in infizierten Zellen phosphoryliert vorlag, obwohl die PKR-Expression durch PPMO ex-8 effizient inhibiert wurde.

Viele Viren kodieren im Gegensatz zu SARS-CoV für Proteine, die die PKR antagonisieren (61, 72). Werden sie jedoch ihrer PKR-Inhibitoren beraubt, wachsen sie in Zellkultur zumeist sehr viel langsamer und zeigen im Tiermodell einen attenuierten Phänotyp. Diese Daten zeigen, wie wichtig die PKR bei der Abwehr verschiedenster viraler Erreger ist.

Einen bislang einzigartigen Mechanismus zur Inhibition der PKR verwendet das Paramyxovirus Simian-Virus 5 (SV 5). Wichtig dafür sind die P-Untereinheit der viralen Polymerase und das akzessorische V-Protein. Beide Proteine sind in der Lage die Replikation und Transkription des Virus so anzupassen, dass die PKR in infizierten Zellen nicht aktiviert und die Inhibition der Proteinsynthese verhindert wird. Werden beide Proteine durch Mutationen in ihrer Funktion gestört, so führt das in infizierten Zellen zu einer starken Phosphorylierung der PKR und eIF2 α und einer anschließenden Inhibition der Translation (57).

Viren, die wie SARS-CoV in Zellen PKR aktivieren, lösen dadurch zumeist auch die Inhibition zellulärer Translation und damit Apoptose aus.

Unstrittig ist, dass SARS-CoV-Infektionen zur Induktion von Apoptose in Zellkultur führen, was zur Aktivierung von Caspasen und Spaltung von PARP führt. (21, 157, 170, 191). Autopsien zeigten, dass auch in vivo verschiedene SARS-CoV-infizierte Gewebe, wie die Lunge, Milz und Schilddrüse, Anzeichen von Apoptose zeigten (208, 227). Dies legte die Vermutung nahe, dass die Induktion von Apoptose wichtig für die Pathogenese von SARS-CoV sein könnte. Unterstützend kommt hinzu, dass von verschiedenen Proteinen des SARS-CoV bereits beschrieben ist, dass sie in Zellkultur Apoptose induzieren (27, 102, 170, 190, 192, 222). Die genauen Mechanismen, die zur Induktion von Apoptose führen, sind allerdings noch nicht bekannt.

Studien von persistent-infizierten Vero E6-Zellen zeigten, dass SARS-CoV den anti-apoptotischen Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Akt Signalweg beeinflusst, was 8 Std. nach der Infektion zur Phosphorylierung von Akt führt. Diese Phosphorylierung geht nach 18 Std. wieder zurück (137), sodass nun die Induktion von Apoptose nicht

länger unterbunden wird. Dies korreliert mit der hier gemachten Beobachtung, dass SARS-CoV spät innerhalb der SARS-CoV-Infektion Apoptose induziert.

Viele RNA-Viren, wie z. B. das respiratorische Syncytial-Virus (RSV), aktivieren den anti-apoptotischen PI3K-Akt Signalweg innerhalb der ersten Stunden der Infektion, um später zur Unterstützung der Freisetzung von viralen Partikeln Apoptose zu induzieren (39, 196). Dieses scheint bei SARS-CoV allerdings nicht der Fall zu sein, da die Inhibition von Apoptose keinen Einfluss auf die Vermehrung des Virus hat.

Neuere Daten zeigen, dass auch eIF2 α -phosphorylierende Kinasen eine Rolle bei der Induktion des PI3K-Akt Signalweges spielen und somit für die Zellproliferation wichtig sind. So haben PKR- oder PERK-defiziente Fibroblasten der Maus die Fähigkeit verloren Akt zu phosphorylieren. Die Aktivierung des PI3K-Akt Signalweges ist indirekt und benötigt die Phosphorylierung von eIF2 α (101).

PKR induziert Apoptose hauptsächlich über den Rezeptor-vermittelten Signalweg und die Proteine FADD und Caspase 8 (7, 64). Die Induktion von Apoptose über PKR kann durch die Behandlung von Zellen mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk verhindert werden (64). Die Aktivierung von Caspase 9 über die Mitochondrien trägt auch zur Induktion von Apoptose über die PKR bei. Allerdings kann eine Inhibition der Aktivierung von Caspase 9 nicht die Induktion von Apoptose durch die PKR verhindern (65). Es wird deswegen vermutet, dass Caspase 9 nach oder durch Caspase 8 aktiviert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Vero-Zellen mit SARS-CoV nach 72 Std. zur Spaltung von Caspase 3 und 8 führt (Abb. 19). 293/ACE2-Zellen zeigen nach Infektion mit SARS-CoV PARP-Spaltung, ein spät auftretendes Kennzeichen für Apoptose (Abb. 23). Diese Daten passen zur beschriebenen PKR-abhängigen Induktion von Apoptose über den Rezeptor-vermittelten Signalweg durch Caspase 8.

Der mitochondrial-vermittelte Signalweg zur Induktion von Apoptose wurde durch Analysen zu mRNA- und Proteinmengen von Bcl2 und Bax näher untersucht.

Eine ausreichende Proteinmenge an Bcl2 verhindert die Induktion von Apoptose, wohingegen die vermehrte Expression von Bax zur Induktion von Apoptose in den betroffenen Zellen führt. Dies geschieht über die Bildung von Bax-Homodimeren zur Induktion und Bcl2-Bax-Heterodimeren zur Inhibition des programmierten Zelltodes.

Beide Proteine werden transkriptionell über den Faktor p53 reguliert, der als Antwort auf DNA-Schäden entweder Apoptose oder den Arrest des Zellzyklus induziert (13, 232). Die Überexpression von Bcl2 reicht jedoch nicht aus, um Zellen vor der Induktion von Apoptose zu schützen. Als weiterer regulatorischer Mechanismus wird daher die post-translationale Phosphorylierung von Bcl2 an Ser70 diskutiert. Sie wird durch verschiedene Kinasen wie auch Phosphatasen reguliert und bietet somit einen exzellenten Mechanismus um schnell und reversibel die Aktivität von Bcl2 zu beeinflussen (166).

Die mRNA- sowie die Proteinmengen von Bcl2 (anti-apoptotisch) und Bax (pro-apoptotisch) blieben in SARS-CoV-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen unverändert (Abb. 21, 22). Der Phosphorylierungs-Status von Bcl2 wurde nicht untersucht. Diese Daten deuten auf eine untergeordnete Rolle der mitochondrial-vermittelten Apoptose während einer SARS-CoV-Infektion hin. Die Spaltung von Caspase 9, ein wichtiges Element innerhalb der mitochondrial-vermittelten Apoptose, wurde nicht untersucht, da Versuche mit verschiedenen Ak keine zufriedenstellenden Ergebnisse brachten.

Weitergehende Versuche zur Hemmung der SARS-CoV-induzierten Apoptose durch die Verwendung des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk zeigten, dass die Induktion von Apoptose keinen Einfluss auf die Vermehrung des Virus hat (Abb. 39). Diese Daten werden dadurch unterstützt, dass auch die Inhibition der PKR zur Reduktion der Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen führte, ohne die Vermehrung des Virus einzuschränken (Abb. 34). Zwei weitere Arbeiten zeigten ebenfalls, dass die Inhibition von Apoptose keinen Effekt auf die Vermehrung von SARS-CoV in Zellkultur hatte (8, 53). Zum einen wurde die mitochondrial-vermittelte Apoptose durch die Überexpression von Bcl2 gehemmt und zum anderen wurde der Caspase-Inhibitor zDEVD-fmk zur Inhibition von Apoptose verwendet. Beides hatte keinen Einfluss auf die Vermehrung von SARS-CoV (21, 157).

Zusammengenommen machen diese Daten deutlich, dass Apoptose für eine effiziente Virusfreisetzung nicht benötigt wird. Es scheint so, als würde sich SARS-CoV effizient und ungestört vermehren, bevor die infizierten Zellen spät in der Infektion in Apoptose gehen. Daher hat die Hemmung der Apoptose auch keinen Effekt auf die Vermehrungseffizienz des Virus.

Als Positivkontrollen zur Induktion von Apoptose wurden im Rahmen dieser Arbeit, das SeV, welches zur Familie der *Paramyxoviridae* gehört, und VSV, ein Mitglied der *Rhabdoviridae*, eingesetzt. Beide Viren gehören in die Ordnung der *Mononegavirales* und besitzen somit ein einzelsträngiges, nicht segmentiertes RNA-Genom negativer Polarität. Beide Viren sind als starke Induktoren von Apoptose in infizierten Zellen bekannt.

Die Induktion von Apoptose durch VSV wird hauptsächlich über die Aktivierung von Caspase 9 und damit über den mitochondrial-vermittelten Signalweg ausgelöst (8, 107, 108). Für morphologische Veränderung der Zellen, wie das Abrunden, die Aktivierung von Caspase 3 und die Inhibition der Wirtszellproteinsynthese ist das Matrix-Protein (M-Protein) von VSV verantwortlich. Je nach verwendeter Zelllinie liegen allerdings unterschiedliche Daten vor, ob das M-Protein im Kontext einer VSV-Infektion die Induktion von Apoptose alleine beeinflusst oder noch weitere Komponenten dazu beitragen (108). Die Infektion von Zellen mit einem rekombinanten VSV, dessen M-Protein die Wirtszellproteinsynthese nicht mehr hemmen kann, führt im Gegensatz zur Infektion mit dem Wildtyp-Virus zur Induktion von Apoptose durch Caspase 8, also über den Rezeptor-vermittelten Signalweg (56). Die Inhibition von Apoptose durch die Behandlung von VSV-infizierten Zellen mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk führte wie bei SARS-CoV nicht zu einer Reduktion von freigesetzten Virus-Partikeln (Daten nicht gezeigt).

VSV repliziert effizienter in PKR $-/-$ MEFs als in Wildtyp-Fibroblasten. PKR-defiziente Mäuse unterliegen der intranasalen Infektion mit VSV bereits nach vier Tagen, wohingegen Wildtyp-Mäuse die Infektion überleben. Dies macht wiederum deutlich, dass die PKR eine sehr wichtige antivirale Komponente des Immunsystems ist (183). Im Gegensatz zu SARS-CoV scheint die PKR hier einen inhibitorischen Effekt auf die Vermehrung des Virus auszuüben. Auch durch VSV wird in der frühen Phase der Infektion die Inhibition der Wirtszelltranslation ausgelöst. Später wird schließlich auch die Translation viraler RNA reduziert. In der frühen Phase der Infektion (3 bis 6 h p.i.) ist für die Inhibition der Translation eine Veränderung des eIF4F-Komplexes und in der späten die Phosphorylierung von eIF2 α über die PKR verantwortlich (38).

In SARS-CoV-infizierten Zellen wurde die Veränderung anderer an der Initiation der Translation beteiligter Komplexe bislang nicht untersucht.

Auch das SeV, insbesondere der verwendete Stamm Cantell, ist dafür bekannt in infizierten Zellen Apoptose zu induzieren.

Apoptose wird allerdings nur dann induziert, wenn virale Gene exprimiert und der Rezeptor-vermittelte Signalweg über Caspase 8 funktionsfähig ist. Ein weiterer wichtiger Faktor ist IRF-3 (80). Ist dieser Faktor nicht vorhanden oder wird seine Aktivierung über RIG-I gestört, so findet keine Apoptose sondern eine persistente Infektion mit SeV statt (153). Zur Induktion von Apoptose über Caspase 9 (80) ist im Fall des SeV keine Freisetzung von Cytochrom C oder die Anwesenheit von Apaf-1 nötig. Daher wird ein alternativer Mechanismus vermutet, der in SeV-infizierten Zellen zur Spaltung von Caspase 3 führt (17).

Innerhalb der Coronaviren wurde die Induktion von Apoptose in MHV- und TGEV-infizierten Zellen untersucht (191). Es ist bekannt, dass die Infektion von Oligodendrozyten mit MHV zur Induktion von Apoptose in diesen über den Fas-abhängigen Signalweg führt (126). In einer späteren Phase der Infektion wird dann auch eIF2 α phosphoryliert (15), was allerdings wie bei einer SARS-CoV-Infektion nicht zur Induktion von Apoptose beiträgt.

Über die Induktion von Apoptose während einer Infektion mit humanen CoV ist bislang nur sehr wenig bekannt. Das hCoV-OC43 löst Apoptose in neuronalen Zellen der Maus aus und das hCoV-229E verstärkt die Apoptose in Monozyten und Makrophagen (37, 96).

5.4 Aktivierung eIF2 α -phosphorylierender Kinasen durch SARS-CoV

Da die Inhibition der PKR durch PPMO ex-8 nicht zu einer Reduktion der Phosphorylierung von eIF2 α führte, wurde vermutet, dass andere eIF2 α -phosphorylierende Kinasen in SARS-CoV-infizierten Zellen aktiv sind.

Neben der PKR sind drei weitere Kinasen bekannt, die eIF2 α phosphorylieren (9, 16, 28, 135, 203). Zwei dieser Kinasen PERK und GCN2 können durch virus-induzierten Stress aktiviert werden, wohingegen HRI durch Häm-Mangel oder oxidativen Stress aktiviert wird (211). Es gibt bislang keine Hinweise darauf, dass HRI als Antwort auf virale Infektionen aktiviert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in SARS-CoV-infizierten Zellen zusätzlich zur PKR auch PERK phosphoryliert und damit aktiviert wird, während GCN2 nicht durch SARS-CoV aktiviert wird. Es findet sogar eine starke Reduktion der Proteinmenge von GCN2 in SARS-CoV-infizierten Zellen statt. Bezüglich des zeitlichen Verlaufs stimmen die Phosphorylierungsmuster von PERK und eIF2 α überein, während PKR und eIF2 α zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Infektion phosphoryliert vorliegen. Dies weist darauf hin, dass die Phosphorylierung von eIF2 α während SARS-CoV-Infektionen von PERK katalysiert wird (Abb. 35, 37). Auch für die Vermehrung des SARS-CoV könnte die Aktivierung von PERK förderlich sein. Die IFN β -Behandlung von SARS-CoV-infizierten Zellen führte nicht nur zur Reduktion der Virustiter, sondern auch zur Reduktion der PERK- und der eIF2 α -Phosphorylierung. Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass beide Signale wichtig für SARS-CoV sind.

Es ist bereits bekannt, dass das S-Protein von SARS-CoV ER-Stress induziert und dabei die sogenannte „unfolded protein response“ (UPR) auslöst (28, 203). Hierbei induziert es die verstärkte Expression der ER-Chaperone „glucose-related protein“ 78 und 94 (GRP 78/94) über die Aktivierung von PERK (28). Es gibt drei unterschiedliche Signalwege innerhalb der UPR. Sie werden durch die Sensorproteine „activating transcription factor 6“ (ATF6), „inositol-requiring protein 1 (IRE1) und PERK in Gang gesetzt (163).

Da nach Hemmung der PERK-Expression in SARS-CoV-infizierten Zellen eine deutliche Verminderung von Apoptose zu beobachten war, scheint aktivierte PERK nicht zur Induktion von Apoptose in infizierten Zellen beizutragen. Dies stimmt mit Daten zur UPR überein, da das S-Protein die IRE1- und ATF6-Signalwege nicht beeinflusst und auch nur zu einer geringfügigen PERK-abhängigen Induktion des pro-apoptotischen „C/EBP-homologous protein“ (CHOP) führt (28). Obwohl relativ wenig über UPR-induzierte Apoptose bekannt ist, scheint es so, dass in den meisten Fällen die Aktivierung von PERK Apoptose in Zellen verhindert. So führt der Verlust von PERK-vermittelter eIF2 α -Phosphorylierung zu schlechteren Überlebensraten von Zellen, die ER-Stress ausgesetzt sind (75, 163).

Eine Regulation der UPR wurde auch für das MHV beschrieben. Während der Infektion mit MHV wurde IRE1-vermitteltes Spleißen der XBP1-mRNA sowie die Spaltung von ATF6 festgestellt (15). Die gespleißte Variante der XBP1-mRNA kodiert für einen starken Transkriptionsaktivator, wohingegen die ungespleißte Variante für einen Inhibitor der UPR kodiert. Auch bei gespaltenem ATF6 handelt es sich um einen wirksamen Transkriptionsfaktor, der an DNA binden und somit verschiedene UPR-Zielgene aktivieren kann (163). Trotz dieser Induktion wurde wie bei SARS-CoV nur eine sehr schwache Aktivierung von UPR-Zielgenen festgestellt, was bei MHV auf regulatorische Mechanismen von phosphoryliertem eIF2 α in infizierten Zellen zurückgeführt wird. Es ist bislang nicht geklärt, ob die Phosphorylierung von eIF2 α in MHV-infizierten Zellen auf die Induktion von PERK oder anderer Kinasen zurückzuführen ist.

Es ist nicht ungewöhnlich, dass eine virale Infektion zur Aktivierung verschiedener eIF2 α -phosphorylierender Kinasen führt. In VSV-infizierten Zellen wurde wie bei SARS-CoV eine Induktion der PERK und der PKR beobachtet. Beide Proteine spielen eine wesentliche Rolle in der Resistenz einiger Wirte gegenüber VSV-Infektionen. Des Weiteren ist aktivierte PERK in der Lage VSV-induzierte Apoptose zu hemmen (9, 183). Interessanterweise scheint eine vollständige Aktivierung der PKR als Antwort auf eine VSV Infektion in embryonalen Fibroblasten der Maus nicht mehr möglich zu sein, wenn diese keine PERK exprimieren (PERK $-/-$). Daraus wird gefolgert, dass die antiviralen Funktionen beider Proteine zumindest zu einem Teil auf die Aktivierung des anderen angewiesen sind (9).

5.5 Funktion von eIF2 α während der SARS-CoV-Infektion

Über die Phosphorylierung von eIF2 α an Ser51 wird die Translation in eukaryotischen Zellen eingeschränkt. Dies kann auch zur Induktion von Apoptose in diesen Zellen führen (84). Der Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von eIF2 α und der Induktion von Apoptose konnte dadurch gezeigt werden, dass PKR-vermittelte Apoptose durch die Expression einer nicht phosphorylierbaren eIF2 α -Mutante (Ser51 zu Ala) verhindert werden konnte (63, 178).

Wie hier gezeigt wurde, liegen in SARS-CoV-infizierten Zellen sowohl PKR als auch PERK aktiv vor und tragen somit zur anhaltenden Phosphorylierung von eIF2 α bei. Allerdings scheint die Vermehrung des Virus davon unbeeinflusst zu bleiben. Es wäre möglich, dass die Phosphorylierung von eIF2 α durch SARS-CoV aktiv herbeigeführt wird, um die Wirtszellproteinsynthese zu hemmen und einen Nutzen daraus zu ziehen. Dies könnte zum Beispiel durch eine bevorzugte Translation viraler mRNAs bei phosphoryliertem eIF2 α der Fall sein.

Obwohl bislang nicht geklärt ist, ob die Vermehrung von SARS-CoV von der Phosphorylierung von eIF2 α abhängig ist, konnte gezeigt werden, dass CoV verschiedene Strategien entwickelt haben, die Translation viraler RNA in der infizierten Zelle bevorzugt stattfinden zu lassen. Dazu zählen die Stimulation der Translation viraler RNA in cis durch 5'-leader RNA-Sequenzen des MHV (188) und die Inhibition zellulärer Proteinsynthese durch die nsp1-Proteine von SARS-CoV und MHV (99, 233). Das nsp1 des SARS-CoV induziert die Degradation von zellulären mRNAs und inhibiert so deren Translation (99).

Rekombinante SARS-CoV, deren nsp1 weder die Degradation von mRNAs noch die Inhibition der Proteinsynthese unterstützte, wuchsen zu gleichen Titern wie das Wildtyp-Virus. Allerdings lösten sie in infizierten Zellen im Gegensatz zum Wildtyp-Virus eine starke Produktion von IFNs aus. Das unterstützt die Vermutung, dass nsp1 ein wichtiger Virulenzfaktor des SARS-CoV ist (142, 206).

Der hemmende Effekt des nsp1 auf die Wirtszellproteinsynthese könnte auch die starke Reduktion der Proteinmenge von GCN2 in SARS-CoV-infizierten Zellen 48 h p.i. erklären (Abb. 36).

Spät im Infektionszyklus des MHV wird eIF2 α phosphoryliert und dadurch die zelluläre Translation inhibiert (15). Das scheint jedoch nicht zur Induktion von Apoptose oder zur effizienteren Replikation des Virus beizutragen, da die Vermehrung des Virus in Zellen ohne funktionelles eIF2 α nicht beeinflusst wird (155). Bei anderen CoV ist bislang nichts über die Induktion der Phosphorylierung von eIF2 α und deren Auswirkungen bekannt.

5.6 Induktion der Typ-I-IFN-Antwort durch hCoV-NL63

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass weder die Infektion mit SARS-CoV noch mit hCoV-NL63 die Typ-I-IFN-Antwort auslösen. Beide Viren waren nicht in der Lage die durch SeV induzierte IFN-Antwort zu hemmen. Analysen bezüglich eIF2 α ergaben, dass dieser Faktor in hCoV-NL63-infizierten Zellen im Gegensatz zu SARS-CoV-infizierten Zellen nicht verstärkt phosphoryliert wird.

Ein wichtiger Unterschied beider Viren ist die unterschiedliche Replikationsgeschwindigkeit und die damit einhergehende Ausbildung eines CPE in den infizierten Zellen. Infiziert man 293- oder Vero-Zellen mit SARS-CoV, so ist 3 Tage nach dieser Infektion ein deutlicher CPE erkennbar. Bereits 3 Std. nach der Infektion konnte mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen die Knospung von SARS-CoV-Partikeln im Bereich des „ER-Golgi intermediate compartment“ (ERGIC) oder des Golgi-Kompartiments beobachtet werden (181).

Bei ersten Inokulationsversuchen von van der Hoek *et al.* mit hCoV-NL63 konnten nur Affennierenzellen infiziert werden, wobei sich erst nach 8 Tagen ein schwacher CPE zeigte. Bei der folgenden Infektion von Vero E6-Zellen, humanen fötalen Lungenfibroblasten, LLC-MK2-Zellen und Rhabdomyosarkom-Zellen, zeigten nur LLC-MK2-Zellen einen deutlichen CPE (200). Hierbei handelt es sich um Nierenzellen des Rhesusaffen. Während meiner Versuche war ein deutlicher CPE in hCoV-NL63-infizierten LLC-MK2-Zellen nach 10 bis 14 Tagen sichtbar.

Diese langsame Replikation spiegelt sich auch in der geringeren Menge dsRNA wieder, die in hCoV-NL63-infizierten im Vergleich zu SARS-CoV-infizierten Zellen detektiert werden konnte (Abb. 30, 43).

In meinen Händen war das Virus nicht in der Lage menschliche Zellen zu infizieren, was die Analyse mit kommerziell erhältlichen Ak erschwerte. Nur eIF2 α konnte in LLC-MK2-Zellen mit den vorhandenen Ak detektiert werden.

Untersuchungen zur Phosphorylierung von eIF2 α ergaben, dass dieser Translationsinitiationsfaktor in hCoV-NL63-infizierten Zellen im Vergleich zu SARS-CoV-infizierten Zellen nicht verstärkt phosphoryliert wird, obwohl wie in SARS-CoV-infizierten Zellen dsRNA in hCoV-NL63-infizierten Zellen detektierbar ist. Die Aktivierung eIF2 α -phosphorylierender Kinasen konnte nicht untersucht werden, da keiner der vorhandenen Ak diese Proteine in Affennierenzellen detektierte.

Es können demnach nur Vermutungen geäußert werden, warum die Anwesenheit von dsRNA nicht zur Phosphorylierung von eIF2 α führte. Immunfluoreszenz-Analysen zeigten, dass in hCoV-NL63-infizierten Zellen (Abb. 30, 43) 48 h p.i. sehr geringe Mengen dsRNA detektiert werden konnten, wohingegen in SARS-CoV-infizierten Zellen bereits 24 h p.i. sehr viel dsRNA nachweisbar war. Vielleicht könnte also die Menge dsRNA in Zellen der entscheidende Faktor zur Induktion der PKR und der nachfolgenden Phosphorylierung von eIF2 α sein. Hierbei spielt vermutlich auch die langsame Replikation des hCoV-NL63 eine Rolle.

Spät im Infektionszyklus des MHV wird eIF2 α phosphoryliert und dadurch die zelluläre Translation inhibiert (15). Das scheint jedoch nicht zur Induktion von Apoptose oder zur effizienteren Replikation des Virus beizutragen, da die Vermehrung des Virus in Zellen ohne funktionelles eIF2 α nicht beeinflusst wird (155). In SARS-CoV-infizierten Zellen hingegen wird eIF2 α früh phosphoryliert und spielt über die Hemmung der Wirtszelltranslation vermutlich auch eine wichtige Rolle im Verlauf der Infektion.

Bei anderen CoV ist bislang nichts über die Induktion der Phosphorylierung von eIF2 α und deren Auswirkungen bekannt.

Da sich bei unseren Analysen zeigte, dass die Phosphorylierung von eIF2 α keine Rolle während einer hCoV-NL63-Infektion spielt und die Detektion der PKR in LLC-MK2-Zellen nicht möglich war, wurden keine weitere Untersuchungen durchgeführt.

6 Zusammenfassung

Das im Jahre 2003 erstmals isolierte SARS-Coronavirus (SARS-CoV) verursacht bei Menschen ein schweres akutes Atemwegssyndrom mit einer Mortalitätsrate von 10%. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob SARS-CoV in zelluläre Abwehrmechanismen eingreift, was zu der für CoV einzigartigen Humanpathogenität beitragen könnte. Zu diesen Abwehrmechanismen zählen die Typ-I-Interferon (IFN)-Antwort sowie die Induktion von Apoptose. Die IFN-Antwort wird in SARS-CoV-infizierten Zellen nicht induziert, obwohl doppelsträngige (ds) RNA, bekannt als IFN-Induktor, anwesend ist. Daher wurde vermutet, dass Proteine des SARS-CoV die Induktion von IFNs inhibieren.

Zunächst wurden die Proteinprodukte aller offener Leserahmen (ORFs) des SARS-CoV auf ihre Fähigkeit überprüft, die IFN-Antwort zu hemmen. In einem IFN-sensitiven Reporter-Gen-Assay konnte jedoch keines der Proteine als IFN-Antagonist identifiziert werden. Die Expression der viralen Proteine ORF 7a und ORF 7b führte sogar zur Induktion der IFN-Antwort sowie zur Induktion von Apoptose. Eine natürlich entstandene Deletionsmutante von ORF 7b induzierte dagegen weder die IFN-Antwort noch Apoptose. Die Inhibition von ORF 7a und 7b führte im Falle eines ORF 7a-spezifischen Inhibitors zur Reduktion freigesetzter SARS-CoV-Partikel, was vermutlich auf eine unspezifische Bindung des Inhibitors an regulatorische Sequenzen im 5'-nicht translatierten Bereich des SARS-CoV-Genoms zurückzuführen ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass SARS-CoV in der späten Phase der Infektion Apoptose induziert. Nachgewiesen wurde die Spaltung der Caspasen 3 und 8 sowie die der poly-ADP-ribose-polymerase-1 (PARP). Die Infektion hatte jedoch keinen Einfluss auf die relativen Proteinmengen von Bcl2 und Bax.

Ein wichtiges Bindeglied zwischen IFN-Antwort und Apoptose ist die antivirale Protein Kinase PKR. Sie wird durch Typ-I-IFNs induziert und phosphoryliert die α -Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor-2 (eIF2 α), was zum Stopp der Translation in Zellen führen kann. Über diesen Weg, wie auch über direkte Interaktionen mit pro-apoptotischen Proteinen, ist PKR an der Induktion von Apoptose beteiligt. Weitere Kinasen, die eIF2 α als Antwort auf virale Infektionen phosphorylieren, sind PERK und GCN2.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die PKR in SARS-CoV-infizierten Zellen durch dsRNA aktiviert wird. Um die Konsequenzen dieser Aktivierung zu untersuchen, wurde die PKR-Expression in SARS-CoV-infizierten Zellen durch

synthetische DNA-Analoga, Peptid-gekoppelte Phosphorodiamidat-Morpholino-Oligomere (PPMO), die sich an die Ziel-mRNA anlagern, gehemmt. Der effizienteste Inhibitor exon-8 (ex-8) konnte die PKR-Expression um 98% reduzieren. Durch die Bindung von ex-8 an die PKR-mRNA werden Spleißstellen maskiert, was zum Entfernen von Exons aus der mRNA und damit zur Synthese trunkierter Proteine führt.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Inhibition der PKR durch PPMO ex-8 zu einer verminderten Induktion von Apoptose durch SARS-CoV führte. Die Phosphorylierung von eIF2 α hingegen war in diesen Zellen nicht reduziert. Das lässt vermuten, dass SARS-CoV die PKR-vermittelte Apoptose nicht über eIF2 α induziert. Überraschenderweise hatte die Inhibition der PKR und die daraus resultierende Reduktion der Apoptose keinen Einfluss auf die Vermehrung von SARS-CoV. Wurde die Inhibition von Apoptose in SARS-CoV-infizierten Zellen durch die Behandlung mit einem Caspase-Inhibitor gehemmt, so beeinflusste das die Virusreplikation ebenfalls nicht. Das heißt die Induktion von Apoptose ist für die effiziente Vermehrung des SARS-CoV nicht von Bedeutung.

Weitergehende Analysen anderer eIF2 α -phosphorylierender Kinasen ergaben, dass PERK, nicht jedoch GCN2 durch eine Infektion mit SARS-CoV induziert wurde. Die Vorbehandlung SARS-CoV-infizierter Zellen mit IFN β führte zur reduzierten Phosphorylierung von eIF2 α und PERK, auch die Menge freigesetzter SARS-CoV war deutlich reduziert. Da die Phosphorylierungsmuster von eIF2 α und PERK in SARS-CoV-infizierten Zellen übereinstimmten, und die Inhibition der PKR keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von eIF2 α hatte, wird vermutet, dass die Phosphorylierung von eIF2 α in SARS-CoV-infizierten Zellen hauptsächlich durch PERK vermittelt wird. Die Phosphorylierung von eIF2 α hatte keinen Einfluss auf die Vermehrung von SARS-CoV. Das Virus hat daher vermutlich Strategien entwickelt die inhibitorischen Effekte von eIF2 α zu umgehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Induktion der PKR sowie der Apoptose durch SARS-CoV keinen Einfluss auf die Vermehrung des Virus hat. Ob die Aktivierung von PERK und die Phosphorylierung von eIF2 α von Vorteil für SARS-CoV sind, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

7 Literaturverzeichnis

1. **Aartsma-Rus, A., and G. J. van Ommen.** 2007. Antisense-mediated exon skipping: a versatile tool with therapeutic and research applications. *Rna* **13**:1609-24.
2. **Abes, S., H. M. Moulton, P. Clair, P. Prevot, D. S. Youngblood, R. P. Wu, P. L. Iversen, and B. Lebleu.** 2006. Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)₄ peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents. *J Control Release* **116**:304-13.
3. **Akerstrom, S., A. Mirazimi, and Y. J. Tan.** 2007. Inhibition of SARS-CoV replication cycle by small interference RNAs silencing specific SARS proteins, 7a/7b, 3a/3b and S. *Antiviral Res* **73**:219-27.
4. **Alter, J., F. Lou, A. Rabinowitz, H. Yin, J. Rosenfeld, S. D. Wilton, T. A. Partridge, and Q. L. Lu.** 2006. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* **12**:175-7.
5. **Anderson, R. M., C. Fraser, A. C. Ghani, C. A. Donnelly, S. Riley, N. M. Ferguson, G. M. Leung, T. H. Lam, and A. J. Hedley.** 2004. Epidemiology, transmission dynamics and control of SARS: the 2002-2003 epidemic. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**:1091-105.
6. **Averous, J., A. Bruhat, S. Mordier, and P. Fafournoux.** 2003. Recent advances in the understanding of amino acid regulation of gene expression. *J Nutr* **133**:2040S-2045S.
7. **Balachandran, S., C. N. Kim, W. C. Yeh, T. W. Mak, K. Bhalla, and G. N. Barber.** 1998. Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. *Embo J* **17**:6888-902.
8. **Balachandran, S., P. C. Roberts, T. Kipperman, K. N. Bhalla, R. W. Compans, D. R. Archer, and G. N. Barber.** 2000. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol* **74**:1513-23.
9. **Baltzis, D., L. K. Qu, S. Papadopoulou, J. D. Blais, J. C. Bell, N. Sonenberg, and A. E. Koromilas.** 2004. Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2alpha kinases PERK and PKR. *J Virol* **78**:12747-61.
10. **Basler, C. F., and A. Garcia-Sastre.** 2002. Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion. *Int Rev Immunol* **21**:305-37.
11. **Basler, C. F., X. Wang, E. Muhlberger, V. Volchkov, J. Paragas, H. D. Klenk, A. Garcia-Sastre, and P. Palese.** 2000. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12289-94.
12. **Bastien, N., J. L. Robinson, A. Tse, B. E. Lee, L. Hart, and Y. Li.** 2005. Human coronavirus NL-63 infections in children: a 1-year study. *J Clin Microbiol* **43**:4567-73.
13. **Basu, A., and S. Haldar.** 1998. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* **4**:1099-109.
14. **Baudoux, P., B. Charley, and H. Laude.** 1995. Recombinant expression of the TGEV membrane glycoprotein M. *Adv Exp Med Biol* **380**:305-10.
15. **Bechill, J., Z. Chen, J. W. Brewer, and S. C. Baker.** 2008. Coronavirus infection modulates the unfolded protein response and mediates sustained translational repression. *J Virol* **82**:4492-501.

16. **Berlanga, J. J., I. Ventoso, H. P. Harding, J. Deng, D. Ron, N. Sonenberg, L. Carrasco, and C. de Haro.** 2006. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *Embo J* **25**:1730-40.
17. **Bitzer, M., S. Armeanu, F. Prinz, G. Ungerechts, W. Wybranietz, M. Spiegel, C. Bernlohr, F. Cecconi, M. Gregor, W. J. Neubert, K. Schulze-Osthoff, and U. M. Lauer.** 2002. Caspase-8 and Apaf-1-independent caspase-9 activation in Sendai virus-infected cells. *J Biol Chem* **277**:29817-24.
18. **Bitzer, M., F. Prinz, M. Bauer, M. Spiegel, W. J. Neubert, M. Gregor, K. Schulze-Osthoff, and U. Lauer.** 1999. Sendai virus infection induces apoptosis through activation of caspase-8 (FLICE) and caspase-3 (CPP32). *J Virol* **73**:702-8.
19. **Bluyssen, H. A., R. J. Vlietstra, A. van der Made, and J. Trapman.** 1994. The interferon-stimulated gene 54 K promoter contains two adjacent functional interferon-stimulated response elements of different strength, which act synergistically for maximal interferon-alpha inducibility. *Eur J Biochem* **220**:395-402.
20. **Booth, C. M., L. M. Matukas, G. A. Tomlinson, A. R. Rachlis, D. B. Rose, H. A. Dwosh, S. L. Walmsley, T. Mazzulli, M. Avendano, P. Derkach, I. E. Ephtimios, I. Kitai, B. D. Mederski, S. B. Shadowitz, W. L. Gold, L. A. Hawryluck, E. Rea, J. S. Chenkin, D. W. Cescon, S. M. Poutanen, and A. S. Detsky.** 2003. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *Jama* **289**:2801-9.
21. **Bordi, L., C. Castilletti, L. Falasca, F. Ciccocanti, S. Calcaterra, G. Rozera, A. Di Caro, S. Zaniratti, A. Rinaldi, G. Ippolito, M. Piacentini, and M. R. Capobianchi.** 2006. Bcl-2 inhibits the caspase-dependent apoptosis induced by SARS-CoV without affecting virus replication kinetics. *Arch Virol* **151**:369-77.
22. **Borner, C., and L. Monney.** 1999. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* **6**:497-507.
23. **Buddaert, W., K. Van Reeth, and M. Pensaert.** 1998. In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Adv Exp Med Biol* **440**:461-7.
24. **Burrer, R., B. W. Neuman, J. P. Ting, D. A. Stein, H. M. Moulton, P. L. Iversen, P. Kuhn, and M. J. Buchmeier.** 2007. Antiviral effects of antisense morpholino oligomers in murine coronavirus infection models. *J Virol* **81**:5637-48.
25. **Cain, K., D. G. Brown, C. Langlais, and G. M. Cohen.** 1999. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* **274**:22686-92.
26. **Cardenas, W. B., Y. M. Loo, M. Gale, Jr., A. L. Hartman, C. R. Kimberlin, L. Martinez-Sobrido, E. O. Saphire, and C. F. Basler.** 2006. Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol* **80**:5168-78.
27. **Chan, C. M., C. W. Ma, W. Y. Chan, and H. Y. Chan.** 2007. The SARS-Coronavirus Membrane protein induces apoptosis through modulating the Akt survival pathway. *Arch Biochem Biophys* **459**:197-207.
28. **Chan, C. P., K. L. Siu, K. T. Chin, K. Y. Yuen, B. Zheng, and D. Y. Jin.** 2006. Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Virol* **80**:9279-87.
29. **Charley, B., and H. Laude.** 1988. Induction of alpha interferon by transmissible gastroenteritis coronavirus: role of transmembrane glycoprotein E1. *J Virol* **62**:8-11.
30. **Charley, B., L. Lavenant, and B. Delmas.** 1991. Glycosylation is required for coronavirus TGEV to induce an efficient production of IFN alpha by blood mononuclear cells. *Scand J Immunol* **33**:435-40.

31. **Chawla-Sarkar, M., D. J. Lindner, Y. F. Liu, B. R. Williams, G. C. Sen, R. H. Silverman, and E. C. Borden.** 2003. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* **8**:237-49.
32. **Chen, J., Y. Q. Xie, H. T. Zhang, J. W. Wan, D. T. Wang, Z. H. Lu, Q. Z. Wang, X. H. Xue, W. X. Si, Y. F. Luo, and H. M. Qiu.** 2003. [Lung pathology of severe acute respiratory syndrome]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **25**:360-2.
33. **Chu, W. M., D. Ostertag, Z. W. Li, L. Chang, Y. Chen, Y. Hu, B. Williams, J. Perrault, and M. Karin.** 1999. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* **11**:721-31.
34. **Cinatl, J., B. Morgenstern, G. Bauer, P. Chandra, H. Rabenau, and H. W. Doerr.** 2003. Treatment of SARS with human interferons. *Lancet* **362**:293-4.
35. **Clemens, M. J.** 1997. PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol* **29**:945-9.
36. **Clemens, M. J., and A. Elia.** 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* **17**:503-24.
37. **Collins, A. R.** 2002. In vitro detection of apoptosis in monocytes/macrophages infected with human coronavirus. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**:1392-5.
38. **Connor, J. H., and D. S. Lyles.** 2005. Inhibition of host and viral translation during vesicular stomatitis virus infection. eIF2 is responsible for the inhibition of viral but not host translation. *J Biol Chem* **280**:13512-9.
39. **Cooray, S.** 2004. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *J Gen Virol* **85**:1065-76.
40. **Deas, T. S., I. Binduga-Gajewska, M. Tilgner, P. Ren, D. A. Stein, H. M. Moulton, P. L. Iversen, E. B. Kauffman, L. D. Kramer, and P. Y. Shi.** 2005. Inhibition of flavivirus infections by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication. *J Virol* **79**:4599-609.
41. **Dediego, M. L., L. Pewe, E. Alvarez, M. T. Rejas, S. Perlman, and L. Enjuanes.** 2008. Pathogenicity of severe acute respiratory coronavirus deletion mutants in hACE-2 transgenic mice. *Virology* **376**:379-89.
42. **Der, S. D., A. Zhou, B. R. Williams, and R. H. Silverman.** 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15623-8.
43. **Devaraj, S. G., N. Wang, Z. Chen, Z. Chen, M. Tseng, N. Barretto, R. Lin, C. J. Peters, C. T. Tseng, S. C. Baker, and K. Li.** 2007. Regulation of IRF-3-dependent innate immunity by the papain-like protease domain of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Biol Chem* **282**:32208-21.
44. **Donnelly, C. A., A. C. Ghani, G. M. Leung, A. J. Hedley, C. Fraser, S. Riley, L. J. Abu-Raddad, L. M. Ho, T. Q. Thach, P. Chau, K. P. Chan, T. H. Lam, L. Y. Tse, T. Tsang, S. H. Liu, J. H. Kong, E. M. Lau, N. M. Ferguson, and R. M. Anderson.** 2003. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet* **361**:1761-6.
45. **Drake, J. W., and J. J. Holland.** 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13910-3.
46. **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.

47. **Earnshaw, W. C., L. M. Martins, and S. H. Kaufmann.** 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**:383-424.
48. **Eickmann, M., S. Becker, H. D. Klenk, H. W. Doerr, K. Stadler, S. Censini, S. Guidotti, V. Masignani, M. Scarselli, M. Mora, C. Donati, J. H. Han, H. C. Song, S. Abrignani, A. Covacci, and R. Rappuoli.** 2003. Phylogeny of the SARS coronavirus. *Science* **302**:1504-5.
49. **Enterlein, S., K. L. Warfield, D. L. Swenson, D. A. Stein, J. L. Smith, C. S. Gamble, A. D. Kroeker, P. L. Iversen, S. Bavari, and E. Muhlberger.** 2006. VP35 knockdown inhibits Ebola virus amplification and protects against lethal infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:984-93.
50. **Feng, Z., M. Cerveny, Z. Yan, and B. He.** 2007. The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol* **81**:182-92.
51. **Fischer, U., R. U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff.** 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**:76-100.
52. **Fletcher, S., K. Honeyman, A. M. Fall, P. L. Harding, R. D. Johnsen, J. P. Steinhaus, H. M. Moulton, P. L. Iversen, and S. D. Wilton.** 2007. Morpholino oligomer-mediated exon skipping averts the onset of dystrophic pathology in the mdx mouse. *Mol Ther* **15**:1587-92.
53. **Fouchier, R. A., T. Kuiken, M. Schutten, G. van Amerongen, G. J. van Doornum, B. G. van den Hoogen, M. Peiris, W. Lim, K. Stohr, and A. D. Osterhaus.** 2003. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* **423**:240.
54. **Frieman, M., B. Yount, M. Heise, S. A. Kopecky-Bromberg, P. Palese, and R. S. Baric.** 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *J Virol* **81**:9812-24.
55. **Fuchizaki, U., S. Kaneko, Y. Nakamoto, Y. Sugiyama, K. Imagawa, M. Kikuchi, and K. Kobayashi.** 2003. Synergistic antiviral effect of a combination of mouse interferon-alpha and interferon-gamma on mouse hepatitis virus. *J Med Virol* **69**:188-94.
56. **Gaddy, D. F., and D. S. Lyles.** 2005. Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct pathways. *J Virol* **79**:4170-9.
57. **Gainey, M. D., P. J. Dillon, K. M. Clark, M. J. Manuse, and G. D. Parks.** 2008. Paramyxovirus-induced shutoff of host and viral protein synthesis: role of the P and V proteins in limiting PKR activation. *J Virol* **82**:828-39.
58. **Garcia-Calvo, M., E. P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D. W. Nicholson, and N. A. Thornberry.** 1998. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* **273**:32608-13.
59. **Garcia-Sastre, A.** 2001. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology* **279**:375-84.
60. **Garcia-Sastre, A.** 2002. Mechanisms of inhibition of the host interferon alpha/beta-mediated antiviral responses by viruses. *Microbes Infect* **4**:647-55.
61. **Garcia, M. A., J. Gil, I. Ventoso, S. Guerra, E. Domingo, C. Rivas, and M. Esteban.** 2006. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:1032-60.
62. **Ge, Q., M. Pastey, D. Kobasa, P. Puthavathana, C. Lupfer, R. K. Bestwick, P. L. Iversen, J. Chen, and D. A. Stein.** 2006. Inhibition of multiple subtypes of influenza A virus in cell cultures with morpholino oligomers. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3724-33.

63. **Gil, J., J. Alcami, and M. Esteban.** 1999. Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol Cell Biol* **19**:4653-63.
64. **Gil, J., and M. Esteban.** 2000. The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* **19**:3665-74.
65. **Gil, J., M. A. Garcia, and M. Esteban.** 2002. Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: molecular mechanism and relevance. *FEBS Lett* **529**:249-55.
66. **Gilfoy, F. D., and P. W. Mason.** 2007. West Nile virus-induced interferon production is mediated by the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol* **81**:11148-58.
67. **Gillim-Ross, L., and K. Subbarao.** 2006. Emerging respiratory viruses: challenges and vaccine strategies. *Clin Microbiol Rev* **19**:614-36.
68. **Goodbourn, S., L. Didcock, and R. E. Randall.** 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* **81**:2341-64.
69. **Grandvaux, N., B. R. tenOever, M. J. Servant, and J. Hiscott.** 2002. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis* **15**:259-67.
70. **Groneberg, D. A., R. Hilgenfeld, and P. Zabel.** 2005. Molecular mechanisms of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Respir Res* **6**:8.
71. **Haller, O., and G. Kochs.** 2002. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* **3**:710-7.
72. **Haller, O., G. Kochs, and F. Weber.** 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344**:119-30.
73. **Hamre, D., and J. J. Procknow.** 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med* **121**:190-3.
74. **Harcourt, B. H., D. Jukneliene, A. Kanjanahaluethai, J. Bechill, K. M. Severson, C. M. Smith, P. A. Rota, and S. C. Baker.** 2004. Identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase products and characterization of papain-like protease activity. *J Virol* **78**:13600-12.
75. **Harding, H. P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng, and D. Ron.** 2000. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* **5**:897-904.
76. **He, B.** 2006. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death Differ* **13**:393-403.
77. **Heeney, J. L.** 2006. Zoonotic viral diseases and the frontier of early diagnosis, control and prevention. *J Intern Med* **260**:399-408.
78. **Hengartner, M. O.** 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**:770-6.
79. **Hershey, J. W.** 1989. Protein phosphorylation controls translation rates. *J Biol Chem* **264**:20823-6.
80. **Heylbroeck, C., S. Balachandran, M. J. Servant, C. DeLuca, G. N. Barber, R. Lin, and J. Hiscott.** 2000. The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis. *J Virol* **74**:3781-92.
81. **Hierholzer, J. C. a. K., R.A.** 1996. Virus isolation and quantitation, p. 36-38. *In* B. W. M. a. H. O. Kangro (ed.), *Virology methods manual*. Academic Press Limited, London, United Kingdom.
82. **Hiscott, J., P. Pitha, P. Genin, H. Nguyen, C. Heylbroeck, Y. Mamane, M. Algarte, and R. Lin.** 1999. Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. *J Interferon Cytokine Res* **19**:1-13.

83. **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.
84. **Holcik, M., and N. Sonenberg.** 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:318-27.
85. **Holden, K. L., D. A. Stein, T. C. Pierson, A. A. Ahmed, K. Clyde, P. L. Iversen, and E. Harris.** 2006. Inhibition of dengue virus translation and RNA synthesis by a morpholino oligomer targeted to the top of the terminal 3' stem-loop structure. *Virology* **344**:439-52.
86. **Horisberger, M. A.** 1992. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol* **66**:4705-9.
87. **Huang, C., N. Ito, C. T. Tseng, and S. Makino.** 2006. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J Virol* **80**:7287-94.
88. **Huang, I. C., B. J. Bosch, F. Li, W. Li, K. H. Lee, S. Ghiran, N. Vasilieva, T. S. Dermody, S. C. Harrison, P. R. Dormitzer, M. Farzan, P. J. Rottier, and H. Choe.** 2006. SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *J Biol Chem* **281**:3198-203.
89. **Hudziak, R. M., E. Barofsky, D. F. Barofsky, D. L. Weller, S. B. Huang, and D. D. Weller.** 1996. Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **6**:267-72.
90. **Imada, K., and W. J. Leonard.** 2000. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* **37**:1-11.
91. **Imbert, I., J. C. Guillemot, J. M. Bourhis, C. Bussetta, B. Coutard, M. P. Egloff, F. Ferron, A. E. Gorbalenya, and B. Canard.** 2006. A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *Embo J* **25**:4933-42.
92. **Iordanov, M. S., J. Wong, J. C. Bell, and B. E. Magun.** 2001. Activation of NF-kappaB by double-stranded RNA (dsRNA) in the absence of protein kinase R and RNase L demonstrates the existence of two separate dsRNA-triggered antiviral programs. *Mol Cell Biol* **21**:61-72.
93. **Ireland, D. D., S. A. Stohlman, D. R. Hinton, R. Atkinson, and C. C. Bergmann.** 2008. Type I interferons are essential in controlling neurotropic coronavirus infection irrespective of functional CD8 T cells. *J Virol* **82**:300-10.
94. **Ivana Scovassi, A., and M. Diederich.** 2004. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem Pharmacol* **68**:1041-7.
95. **Iwaoka, S., T. Nakamura, S. Takano, S. Tsuchiya, and Y. Aramaki.** 2006. Cationic liposomes induce apoptosis through p38 MAP kinase-caspase-8-Bid pathway in macrophage-like RAW264.7 cells. *J Leukoc Biol* **79**:184-91.
96. **Jacomy, H., and P. J. Talbot.** 2006. HCoV-OC43-induced apoptosis of murine neuronal cells. *Adv Exp Med Biol* **581**:473-8.
97. **Joseph, J. S., K. S. Saikatendu, V. Subramanian, B. W. Neuman, A. Brooun, M. Griffith, K. Moy, M. K. Yadav, J. Velasquez, M. J. Buchmeier, R. C. Stevens, and P. Kuhn.** 2006. Crystal structure of nonstructural protein 10 from the severe acute respiratory syndrome coronavirus reveals a novel fold with two zinc-binding motifs. *J Virol* **80**:7894-901.
98. **Kahn, J. S.** 2006. The widening scope of coronaviruses. *Curr Opin Pediatr* **18**:42-7.
99. **Kamitani, W., K. Narayanan, C. Huang, K. Lokugamage, T. Ikegami, N. Ito, H. Kubo, and S. Makino.** 2006. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12885-90.

100. **Kan, B., M. Wang, H. Jing, H. Xu, X. Jiang, M. Yan, W. Liang, H. Zheng, K. Wan, Q. Liu, B. Cui, Y. Xu, E. Zhang, H. Wang, J. Ye, G. Li, M. Li, Z. Cui, X. Qi, K. Chen, L. Du, K. Gao, Y. T. Zhao, X. Z. Zou, Y. J. Feng, Y. F. Gao, R. Hai, D. Yu, Y. Guan, and J. Xu.** 2005. Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *J Virol* **79**:11892-900.
101. **Kazemi, S., Z. Mounir, D. Baltzis, J. F. Raven, S. Wang, J. L. Krishnamoorthy, O. Pluquet, J. Pelletier, and A. E. Koromilas.** 2007. A novel function of eIF2 α kinases as inducers of the phosphoinositide-3 kinase signaling pathway. *Mol Biol Cell* **18**:3635-44.
102. **Khan, S., B. C. Fielding, T. H. Tan, C. F. Chou, S. Shen, S. G. Lim, W. Hong, and Y. J. Tan.** 2006. Over-expression of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3b protein induces both apoptosis and necrosis in Vero E6 cells. *Virus Res* **122**:20-7.
103. **Kim, J. Y., S. Choung, E. J. Lee, Y. J. Kim, and Y. C. Choi.** 2007. Immune activation by siRNA/liposome complexes in mice is sequence- independent: lack of a role for Toll-like receptor 3 signaling. *Mol Cells* **24**:247-54.
104. **Kimball, S. R.** 1999. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol* **31**:25-9.
105. **Kopecky-Bromberg, S. A., L. Martinez-Sobrido, M. Frieman, R. A. Baric, and P. Palese.** 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J Virol* **81**:548-57.
106. **Kopecky-Bromberg, S. A., L. Martinez-Sobrido, and P. Palese.** 2006. 7a protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cellular protein synthesis and activates p38 mitogen-activated protein kinase. *J Virol* **80**:785-93.
107. **Kopecky, S. A., and D. S. Lyles.** 2003. Contrasting effects of matrix protein on apoptosis in HeLa and BHK cells infected with vesicular stomatitis virus are due to inhibition of host gene expression. *J Virol* **77**:4658-69.
108. **Kopecky, S. A., M. C. Willingham, and D. S. Lyles.** 2001. Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *J Virol* **75**:12169-81.
109. **Krähling, V.** 2004. Wechselwirkungen des Typ-I-Interferon-Systems mit SARS-Coronavirus. Diploma thesis. Philipps-University, Marburg.
110. **Ksiazek, T. G., D. Erdman, C. S. Goldsmith, S. R. Zaki, T. Peret, S. Emery, S. Tong, C. Urbani, J. A. Comer, W. Lim, P. E. Rollin, S. F. Dowell, A. E. Ling, C. D. Humphrey, W. J. Shieh, J. Guarner, C. D. Paddock, P. Rota, B. Fields, J. DeRisi, J. Y. Yang, N. Cox, J. M. Hughes, J. W. LeDuc, W. J. Bellini, and L. J. Anderson.** 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* **348**:1953-66.
111. **Kumar, P., V. Gunalan, B. Liu, V. T. Chow, J. Druce, C. Birch, M. Catton, B. C. Fielding, Y. J. Tan, and S. K. Lal.** 2007. The nonstructural protein 8 (nsp8) of the SARS coronavirus interacts with its ORF6 accessory protein. *Virology* **366**:293-303.
112. **Kyuwa, S., S. Kawamura, Y. Tagawa, Y. Iwakura, T. Urano, and Y. Yoshikawa.** 2003. Differences between BALB/c and C57BL/6 mice in mouse hepatitis virus replication in primary hepatocyte culture. *Exp Anim* **52**:81-4.
113. **Lai, M. M.** 2003. SARS virus: the beginning of the unraveling of a new coronavirus. *J Biomed Sci* **10**:664-75.
114. **Lai, M. M. C. a. K. V. H.** 2001. *Coronaviridae: The Viruses And Their Replication*, p. 1163-1185, Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
115. **Lau, S. K., P. C. Woo, K. S. Li, Y. Huang, H. W. Tsoi, B. H. Wong, S. S. Wong, S. Y. Leung, K. H. Chan, and K. Y. Yuen.** 2005. Severe acute respiratory syndrome

- coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:14040-5.
116. **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.
117. **Lee, E. S., C. H. Yoon, Y. S. Kim, and Y. S. Bae.** 2007. The double-strand RNA-dependent protein kinase PKR plays a significant role in a sustained ER stress-induced apoptosis. *FEBS Lett* **581**:4325-32.
118. **Lee, N., D. Hui, A. Wu, P. Chan, P. Cameron, G. M. Joynt, A. Ahuja, M. Y. Yung, C. B. Leung, K. F. To, S. F. Lui, C. C. Szeto, S. Chung, and J. J. Sung.** 2003. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* **348**:1986-94.
119. **Li, N., J. Ma, L. Nie, H. Li, C. Que, Z. Gao, G. Wang, X. Xu, H. Lu, and G. Wang.** 2003. [Retrospective analysis of the corticosteroids treatment on severe acute respiratory syndrome (SARS)]. *Beijing Da Xue Xue Bao* **35 Suppl**:16-8.
120. **Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang.** 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**:479-89.
121. **Li, S., and A. E. Koromilas.** 2001. Dominant negative function by an alternatively spliced form of the interferon-inducible protein kinase PKR. *J Biol Chem* **276**:13881-90.
122. **Li, S., G. A. Peters, K. Ding, X. Zhang, J. Qin, and G. C. Sen.** 2006. Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:10005-10.
123. **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.
124. **Li, W., Z. Shi, M. Yu, W. Ren, C. Smith, J. H. Epstein, H. Wang, G. Crameri, Z. Hu, H. Zhang, J. Zhang, J. McEachern, H. Field, P. Daszak, B. T. Eaton, S. Zhang, and L. F. Wang.** 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**:676-9.
125. **Licata, J. M., and R. N. Harty.** 2003. Rhabdoviruses and apoptosis. *Int Rev Immunol* **22**:451-76.
126. **Liu, Y., and X. Zhang.** 2007. Murine coronavirus-induced oligodendrocyte apoptosis is mediated through the activation of the Fas signaling pathway. *Virology* **360**:364-75.
127. **Lu, W., B. J. Zheng, K. Xu, W. Schwarz, L. Du, C. K. Wong, J. Chen, S. Duan, V. Deubel, and B. Sun.** 2006. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus 3a protein forms an ion channel and modulates virus release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12540-5.
128. **Mamane, Y., C. Heylbroeck, P. Genin, M. Algarte, M. J. Servant, C. LePage, C. DeLuca, H. Kwon, R. Lin, and J. Hiscott.** 1999. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* **237**:1-14.
129. **Marie, I., J. E. Durbin, and D. E. Levy.** 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *Embo J* **17**:6660-9.
130. **Marra, M. A., S. J. Jones, C. R. Astell, R. A. Holt, A. Brooks-Wilson, Y. S. Butterfield, J. Khattra, J. K. Asano, S. A. Barber, S. Y. Chan, A. Cloutier, S. M. Coughlin, D. Freeman, N. Girn, O. L. Griffith, S. R. Leach, M. Mayo, H. McDonald, S. B. Montgomery, P. K. Pandoh, A. S. Petrescu, A. G. Robertson, J. E. Schein, A. Siddiqui, D. E. Smailus, J. M. Stott, G. S. Yang, F. Plummer, A. Andonov, H. Artsob, N. Bastien, K. Bernard, T. F. Booth, D. Bowness, M. Czub,**

- M. Drebot, L. Fernando, R. Flick, M. Garbutt, M. Gray, A. Grolla, S. Jones, H. Feldmann, A. Meyers, A. Kabani, Y. Li, S. Normand, U. Stroher, G. A. Tipples, S. Tyler, R. Vogrig, D. Ward, B. Watson, R. C. Brunham, M. Krajden, M. Petric, D. M. Skowronski, C. Upton, and R. L. Roper. 2003. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **300**:1399-404.
131. Marshall, N. B., S. K. Oda, C. A. London, H. M. Moulton, P. L. Iversen, N. I. Kerkvliet, and D. V. Mourich. 2007. Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing. *J Immunol Methods* **325**:114-26.
132. McClorey, G., A. M. Fall, H. M. Moulton, P. L. Iversen, J. E. Rasko, M. Ryan, S. Fletcher, and S. D. Wilton. 2006. Induced dystrophin exon skipping in human muscle explants. *Neuromuscul Disord* **16**:583-90.
133. McClorey, G., H. M. Moulton, P. L. Iversen, S. Fletcher, and S. D. Wilton. 2006. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther* **13**:1373-81.
134. McIntosh, K., J. H. Dees, W. B. Becker, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1967. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**:933-40.
135. Medigeshi, G. R., A. M. Lancaster, A. J. Hirsch, T. Briese, W. I. Lipkin, V. Defilippis, K. Fruh, P. W. Mason, J. Nikolich-Zugich, and J. A. Nelson. 2007. West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *J Virol* **81**:10849-60.
136. Mizutani, T., S. Fukushi, M. Murakami, T. Hirano, M. Saijo, I. Kurane, and S. Morikawa. 2004. Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. *FEBS Lett* **577**:187-92.
137. Mizutani, T., S. Fukushi, M. Saijo, I. Kurane, and S. Morikawa. 2004. Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. *Virology* **327**:169-74.
138. Mizutani, T., S. Fukushi, M. Saijo, I. Kurane, and S. Morikawa. 2004. Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochem Biophys Res Commun* **319**:1228-34.
139. Moulton, H. M., S. Fletcher, B. W. Neuman, G. McClorey, D. A. Stein, S. Abes, S. D. Wilton, M. J. Buchmeier, B. Lebleu, and P. L. Iversen. 2007. Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication in vivo. *Biochem Soc Trans* **35**:826-8.
140. Muzio, M., B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, and V. M. Dixit. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**:2926-30.
141. Nallagatla, S. R., J. Hwang, R. Toroney, X. Zheng, C. E. Cameron, and P. C. Bevilacqua. 2007. 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science* **318**:1455-8.
142. Narayanan, K., C. Huang, K. Lokugamage, W. Kamitani, T. Ikegami, C. T. Tseng, and S. Makino. 2008. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. *J Virol* **82**:4471-9.
143. Neuman, B. W., D. A. Stein, A. D. Kroeker, M. J. Churchill, A. M. Kim, P. Kuhn, P. Dawson, H. M. Moulton, R. K. Bestwick, P. L. Iversen, and M. J. Buchmeier. 2005. Inhibition, escape, and attenuated growth of severe acute respiratory syndrome coronavirus treated with antisense morpholino oligomers. *J Virol* **79**:9665-76.

144. **Novick, D., B. Cohen, and M. Rubinstein.** 1994. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* **77**:391-400.
145. **Oostra, M., C. A. de Haan, R. J. de Groot, and P. J. Rottier.** 2006. Glycosylation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus triple-spanning membrane proteins 3a and M. *J Virol* **80**:2326-36.
146. **Otsuki, K., T. Nakamura, Y. Kawaoka, and M. Tsubokura.** 1988. Interferon induction by several strains of avian infectious bronchitis virus, a coronavirus, in chickens. *Acta Virol* **32**:55-9.
147. **Pain, V. M.** 1996. Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* **236**:747-71.
148. **Panesar, N. S.** 2003. Lymphopenia in SARS. *Lancet* **361**:1985.
149. **Parashar, U. D., and L. J. Anderson.** 2004. Severe acute respiratory syndrome: review and lessons of the 2003 outbreak. *Int J Epidemiol* **33**:628-34.
150. **Peiris, J. S., S. T. Lai, L. L. Poon, Y. Guan, L. Y. Yam, W. Lim, J. Nicholls, W. K. Yee, W. W. Yan, M. T. Cheung, V. C. Cheng, K. H. Chan, D. N. Tsang, R. W. Yung, T. K. Ng, and K. Y. Yuen.** 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361**:1319-25.
151. **Pekosz, A., S. R. Schaefer, M. S. Diamond, D. H. Fremont, A. C. Sims, and R. S. Baric.** 2006. Structure, expression, and intracellular localization of the SARS-CoV accessory proteins 7a and 7b. *Adv Exp Med Biol* **581**:115-20.
152. **Pestka, S., J. A. Langer, K. C. Zoon, and C. E. Samuel.** 1987. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* **56**:727-77.
153. **Peters, K., S. Chattopadhyay, and G. C. Sen.** 2008. IRF-3 activation by Sendai virus infection is required for cellular apoptosis and avoidance of persistence. *J Virol* **82**:3500-8.
154. **Poutanen, S. M., D. E. Low, B. Henry, S. Finkelstein, D. Rose, K. Green, R. Tellier, R. Draker, D. Adachi, M. Ayers, A. K. Chan, D. M. Skowronski, I. Salit, A. E. Simor, A. S. Slutsky, P. W. Doyle, M. Krajden, M. Petric, R. C. Brunham, and A. J. McGeer.** 2003. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* **348**:1995-2005.
155. **Raaben, M., M. J. Groot Koerkamp, P. J. Rottier, and C. A. de Haan.** 2007. Mouse hepatitis coronavirus replication induces host translational shutoff and mRNA decay, with concomitant formation of stress granules and processing bodies. *Cell Microbiol* **9**:2218-29.
156. **Rebouillat, D., and A. G. Hovanessian.** 1999. The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* **19**:295-308.
157. **Ren, L., R. Yang, L. Guo, J. Qu, J. Wang, and T. Hung.** 2005. Apoptosis induced by the SARS-associated coronavirus in Vero cells is replication-dependent and involves caspase. *DNA Cell Biol* **24**:496-502.
158. **Reynolds, A., E. M. Anderson, A. Vermeulen, Y. Fedorov, K. Robinson, D. Leake, J. Karpilow, W. S. Marshall, and A. Khvorova.** 2006. Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *Rna* **12**:988-93.
159. **Rich, T., R. L. Allen, and A. H. Wyllie.** 2000. Defying death after DNA damage. *Nature* **407**:777-83.
160. **Riffault, S., C. Carrat, K. van Reeth, M. Pensaert, and B. Charley.** 2001. Interferon-alpha-producing cells are localized in gut-associated lymphoid tissues in transmissible gastroenteritis virus (TGEV) infected piglets. *Vet Res* **32**:71-9.

161. **Riffault, S., J. Grosclaude, M. Vayssier, H. Laude, and B. Charley.** 1997. Reconstituted coronavirus TGEV virosomes lose the virus ability to induce porcine interferon-alpha production. *Vet Res* **28**:77-86.
162. **Riffault, S., J. Grosclaude, M. Vayssier, H. Laude, and B. Charley.** 1997. Reconstituted coronavirus TGEV virosomes lose the virus ability to induce porcine interferon-alpha production. *Vet Res* **28**:105-14.
163. **Ron, D., and P. Walter.** 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:519-29.
164. **Rota, P. A., M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A. D. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson, and W. J. Bellini.** 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**:1394-9.
165. **Roth-Cross, J. K., L. Martinez-Sobrido, E. P. Scott, A. Garcia-Sastre, and S. R. Weiss.** 2007. Inhibition of the alpha/beta interferon response by mouse hepatitis virus at multiple levels. *J Virol* **81**:7189-99.
166. **Ruvolo, P. P., X. Deng, and W. S. May.** 2001. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* **15**:515-22.
167. **Samuel, C. E.** 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**:778-809, table of contents.
168. **Sawicki, S. G., D. L. Sawicki, and S. G. Siddell.** 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol* **81**:20-9.
169. **Schaecher, S. R., M. S. Diamond, and A. Pekosz.** 2008. The Transmembrane Domain of the SARS-CoV ORF7b Protein is Necessary and Sufficient for Its Retention in the Golgi Complex. *J Virol*.
170. **Schaecher, S. R., E. Touchette, J. Schriewer, R. M. Buller, and A. Pekosz.** 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus gene 7 products contribute to virus-induced apoptosis. *J Virol* **81**:11054-68.
171. **Scheuner, D., R. Patel, F. Wang, K. Lee, K. Kumar, J. Wu, A. Nilsson, M. Karin, and R. J. Kaufman.** 2006. Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **281**:21458-68.
172. **Shi, Y.** 2004. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* **117**:855-8.
173. **Siegel, R. M.** 2006. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* **6**:308-17.
174. **Snijder, E. J., P. J. Bredenbeek, J. C. Dobbe, V. Thiel, J. Ziebuhr, L. L. Poon, Y. Guan, M. Rozanov, W. J. Spaan, and A. E. Gorbalenya.** 2003. Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol* **331**:991-1004.
175. **Snijder, E. J., Y. van der Meer, J. Zevenhoven-Dobbe, J. J. Onderwater, J. van der Meulen, H. K. Koerten, and A. M. Mommaas.** 2006. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. *J Virol* **80**:5927-40.
176. **Spiegel, M., A. Pichlmair, L. Martinez-Sobrido, J. Cros, A. Garcia-Sastre, O. Haller, and F. Weber.** 2005. Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* **79**:2079-86.

177. **Spiegel, M., A. Pichlmair, E. Muhlberger, O. Haller, and F. Weber.** 2004. The antiviral effect of interferon-beta against SARS-coronavirus is not mediated by MxA protein. *J Clin Virol* **30**:211-3.
178. **Srivastava, S. P., K. U. Kumar, and R. J. Kaufman.** 1998. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **273**:2416-23.
179. **Stadler, K., V. Masignani, M. Eickmann, S. Becker, S. Abrignani, H. D. Klenk, and R. Rappuoli.** 2003. SARS--beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol* **1**:209-18.
180. **Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber.** 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**:227-64.
181. **Stertz, S., M. Reichelt, M. Spiegel, T. Kuri, L. Martinez-Sobrido, A. Garcia-Sastre, F. Weber, and G. Kochs.** 2007. The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* **361**:304-15.
182. **Stockman, L. J., R. Bellamy, and P. Garner.** 2006. SARS: systematic review of treatment effects. *PLoS Med* **3**:e343.
183. **Stojdl, D. F., N. Abraham, S. Knowles, R. Marius, A. Brasey, B. D. Lichty, E. G. Brown, N. Sonenberg, and J. C. Bell.** 2000. The murine double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR is required for resistance to vesicular stomatitis virus. *J Virol* **74**:9580-5.
184. **Su, D., Z. Lou, F. Sun, Y. Zhai, H. Yang, R. Zhang, A. Joachimiak, X. C. Zhang, M. Bartlam, and Z. Rao.** 2006. Dodecamer structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10. *J Virol* **80**:7902-8.
185. **Summerton, J., and D. Weller.** 1997. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **7**:187-95.
186. **Surjit, M., and S. K. Lal.** 2008. The SARS-CoV nucleocapsid protein: A protein with multifarious activities. *Infect Genet Evol* **8**:397-405.
187. **Surjit, M., B. Liu, S. Jameel, V. T. Chow, and S. K. Lal.** 2004. The SARS coronavirus nucleocapsid protein induces actin reorganization and apoptosis in COS-1 cells in the absence of growth factors. *Biochem J* **383**:13-8.
188. **Tahara, S. M., T. A. Dietlin, C. C. Bergmann, G. W. Nelson, S. Kyuwa, R. P. Anthony, and S. A. Stohlman.** 1994. Coronavirus translational regulation: leader affects mRNA efficiency. *Virology* **202**:621-30.
189. **Tan, J., Y. Kusov, D. Mutschall, S. Tech, K. Nagarajan, R. Hilgenfeld, and C. L. Schmidt.** 2007. The "SARS-unique domain" (SUD) of SARS coronavirus is an oligo(G)-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **364**:877-82.
190. **Tan, Y. J., B. C. Fielding, P. Y. Goh, S. Shen, T. H. Tan, S. G. Lim, and W. Hong.** 2004. Overexpression of 7a, a protein specifically encoded by the severe acute respiratory syndrome coronavirus, induces apoptosis via a caspase-dependent pathway. *J Virol* **78**:14043-7.
191. **Tan, Y. J., S. G. Lim, and W. Hong.** 2007. Regulation of cell death during infection by the severe acute respiratory syndrome coronavirus and other coronaviruses. *Cell Microbiol* **9**:2552-61.
192. **Tan, Y. X., T. H. Tan, M. J. Lee, P. Y. Tham, V. Gunalan, J. Druce, C. Birch, M. Catton, N. Y. Fu, V. C. Yu, and Y. J. Tan.** 2007. Induction of apoptosis by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a protein is dependent on its interaction with the Bcl-XL protein. *J Virol* **81**:6346-55.
193. **Tang, X. C., J. X. Zhang, S. Y. Zhang, P. Wang, X. H. Fan, L. F. Li, G. Li, B. Q. Dong, W. Liu, C. L. Cheung, K. M. Xu, W. J. Song, D. Vijaykrishna, L. L. Poon, J. S. Peiris, G. J. Smith, H. Chen, and Y. Guan.** 2006. Prevalence and genetic diversity of coronaviruses in bats from China. *J Virol* **80**:7481-90.

194. **Taylor, S. S., N. M. Haste, and G. Ghosh.** 2005. PKR and eIF2alpha: integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell* **122**:823-5.
195. **Thiel, V., K. A. Ivanov, A. Putics, T. Hertzog, B. Schelle, S. Bayer, B. Weissbrich, E. J. Snijder, H. Rabenau, H. W. Doerr, A. E. Gorbalenya, and J. Ziebuhr.** 2003. Mechanisms and enzymes involved in SARS coronavirus genome expression. *J Gen Virol* **84**:2305-15.
196. **Thomas, K. W., M. M. Monick, J. M. Staber, T. Yarovinsky, A. B. Carter, and G. W. Hunninghake.** 2002. Respiratory syncytial virus inhibits apoptosis and induces NF-kappa B activity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **277**:492-501.
197. **Tsang, K. W., P. L. Ho, G. C. Ooi, W. K. Yee, T. Wang, M. Chan-Yeung, W. K. Lam, W. H. Seto, L. Y. Yam, T. M. Cheung, P. C. Wong, B. Lam, M. S. Ip, J. Chan, K. Y. Yuen, and K. N. Lai.** 2003. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* **348**:1977-85.
198. **Vabret, A., T. Mourez, J. Dina, L. van der Hoek, S. Gouarin, J. Petitjean, J. Brouard, and F. Freymuth.** 2005. Human coronavirus NL63, France. *Emerg Infect Dis* **11**:1225-9.
199. **van den Born, E., D. A. Stein, P. L. Iversen, and E. J. Snijder.** 2005. Antiviral activity of morpholino oligomers designed to block various aspects of Equine arteritis virus amplification in cell culture. *J Gen Virol* **86**:3081-90.
200. **van der Hoek, L., K. Pyrc, M. F. Jebbink, W. Vermeulen-Oost, R. J. Berkhout, K. C. Wolthers, P. M. Wertheim-van Dillen, J. Kaandorp, J. Spaargaren, and B. Berkhout.** 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* **10**:368-73.
201. **Vega, V. B., Y. Ruan, J. Liu, W. H. Lee, C. L. Wei, S. Y. Se-Thoe, K. F. Tang, T. Zhang, P. R. Kolatkar, E. E. Ooi, A. E. Ling, L. W. Stanton, P. M. Long, and E. T. Liu.** 2004. Mutational dynamics of the SARS coronavirus in cell culture and human populations isolated in 2003. *BMC Infect Dis* **4**:32.
202. **Versteeg, G. A., P. J. Bredenbeek, S. H. van den Worm, and W. J. Spaan.** 2007. Group 2 coronaviruses prevent immediate early interferon induction by protection of viral RNA from host cell recognition. *Virology* **361**:18-26.
203. **Versteeg, G. A., P. S. van de Nes, P. J. Bredenbeek, and W. J. Spaan.** 2007. The coronavirus spike protein induces endoplasmic reticulum stress and upregulation of intracellular chemokine mRNA concentrations. *J Virol* **81**:10981-90.
204. **von Brunn, A., C. Teepe, J. C. Simpson, R. Pepperkok, C. C. Friedel, R. Zimmer, R. Roberts, R. Baric, and J. Haas.** 2007. Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORFome. *PLoS ONE* **2**:e459.
205. **Wathelet, M. G., C. H. Lin, B. S. Parekh, L. V. Ronco, P. M. Howley, and T. Maniatis.** 1998. Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. *Mol Cell* **1**:507-18.
206. **Wathelet, M. G., M. Orr, M. B. Frieman, and R. S. Baric.** 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus evades antiviral signaling: role of nsp1 and rational design of an attenuated strain. *J Virol* **81**:11620-33.
207. **Weber, F., V. Wagner, S. B. Rasmussen, R. Hartmann, and S. R. Paludan.** 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* **80**:5059-64.
208. **Wei, L., S. Sun, C. H. Xu, J. Zhang, Y. Xu, H. Zhu, S. C. Peh, C. Korteweg, M. A. McNutt, and J. Gu.** 2007. Pathology of the thyroid in severe acute respiratory syndrome. *Hum Pathol* **38**:95-102.
209. **Weiss, S. R., and S. Navas-Martin.** 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:635-64.

210. **Wek, R. C., and D. R. Cavener.** 2007. Translational control and the unfolded protein response. *Antioxid Redox Signal* **9**:2357-71.
211. **Wek, R. C., H. Y. Jiang, and T. G. Anthony.** 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* **34**:7-11.
212. **WHO** 21st April 2004, posting date. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html. [Online.]
213. **WHO** 12th March 2003, posting date. WHO issues a global alert about cases of atypical pneumonia. http://www.who.int/csr/sars/archive/2003_03_12/en/. [Online.]
214. **Williams, J. G.** 1999. Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT. *Trends Biochem Sci* **24**:333-4.
215. **Wolter, K. G., Y. T. Hsu, C. L. Smith, A. Nechushtan, X. G. Xi, and R. J. Youle.** 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**:1281-92.
216. **Woo, P. C., S. K. Lau, C. M. Chu, K. H. Chan, H. W. Tsoi, Y. Huang, B. H. Wong, R. W. Poon, J. J. Cai, W. K. Luk, L. L. Poon, S. S. Wong, Y. Guan, J. S. Peiris, and K. Y. Yuen.** 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* **79**:884-95.
217. **Yan, H., G. Xiao, J. Zhang, Y. Hu, F. Yuan, D. K. Cole, C. Zheng, and G. F. Gao.** 2004. SARS coronavirus induces apoptosis in Vero E6 cells. *J Med Virol* **73**:323-31.
218. **Yang, M., M. H. Ng, and C. K. Li.** 2005. Thrombocytopenia in patients with severe acute respiratory syndrome (review). *Hematology* **10**:101-5.
219. **Ye, Y., K. Hauns, J. O. Langland, B. L. Jacobs, and B. G. Hogue.** 2007. Mouse hepatitis coronavirus A59 nucleocapsid protein is a type I interferon antagonist. *J Virol* **81**:2554-63.
220. **Yerlikaya, A., S. R. Kimball, and B. A. Stanley.** 2008. Phosphorylation of eIF2alpha in response to 26S proteasome inhibition is mediated by the haem-regulated inhibitor (HRI) kinase. *Biochem J* **412**:579-88.
221. **Youngblood, D. S., S. A. Hatlevig, J. N. Hassinger, P. L. Iversen, and H. M. Moulton.** 2007. Stability of cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells. *Bioconj Chem* **18**:50-60.
222. **Yuan, X., Y. Shan, Z. Zhao, J. Chen, and Y. Cong.** 2005. G0/G1 arrest and apoptosis induced by SARS-CoV 3b protein in transfected cells. *Virol J* **2**:66.
223. **Yuan, X., J. Wu, Y. Shan, Z. Yao, B. Dong, B. Chen, Z. Zhao, S. Wang, J. Chen, and Y. Cong.** 2006. SARS coronavirus 7a protein blocks cell cycle progression at G0/G1 phase via the cyclin D3/pRb pathway. *Virology* **346**:74-85.
224. **Zakhartchouk, A. N., S. Viswanathan, I. Moshynskyy, M. Petric, and L. A. Babiuk.** 2007. Optimization of a DNA vaccine against SARS. *DNA Cell Biol* **26**:721-6.
225. **Zhang, P., B. L. Jacobs, and C. E. Samuel.** 2008. Loss of protein kinase PKR expression in human HeLa cells complements the vaccinia virus E3L deletion mutant phenotype by restoration of viral protein synthesis. *J Virol* **82**:840-8.
226. **Zhang, P., and C. E. Samuel.** 2007. Protein kinase PKR plays a stimulus- and virus-dependent role in apoptotic death and virus multiplication in human cells. *J Virol* **81**:8192-200.
227. **Zhang, Q. L., Y. Q. Ding, L. He, W. Wang, J. H. Zhang, H. J. Wang, J. J. Cai, J. Geng, Y. D. Lu, and Y. L. Luo.** 2003. [Detection of cell apoptosis in the pathological tissues of patients with SARS and its significance]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* **23**:770-3.

-
228. **Zhang, Y. J., D. A. Stein, S. M. Fan, K. Y. Wang, A. D. Kroeker, X. J. Meng, P. L. Iversen, and D. O. Matson.** 2006. Suppression of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by morpholino antisense oligomers. *Vet Microbiol* **117**:117-29.
229. **Zhang, Y. J., K. Y. Wang, D. A. Stein, D. Patel, R. Watkins, H. M. Moulton, P. L. Iversen, and D. O. Matson.** 2007. Inhibition of replication and transcription activator and latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by morpholino oligomers. *Antiviral Res* **73**:12-23.
230. **Zhou, H., and S. Perlman.** 2007. Mouse hepatitis virus does not induce Beta interferon synthesis and does not inhibit its induction by double-stranded RNA. *J Virol* **81**:568-74.
231. **Ziebuhr, J., E. J. Snijder, and A. E. Gorbalenya.** 2000. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J Gen Virol* **81**:853-79.
232. **Zinkel, S., A. Gross, and E. Yang.** 2006. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* **13**:1351-9.
233. **Zust, R., L. Cervantes-Barragan, T. Kuri, G. Blakqori, F. Weber, B. Ludewig, and V. Thiel.** 2007. Coronavirus non-structural protein 1 is a major pathogenicity factor: implications for the rational design of coronavirus vaccines. *PLoS Pathog* **3**:e109.

8 Anhang

A Material

A.1 Medien und Lösungen für Zellkultur

Blasticidin (12 µg/ml)	Calbiochem (Kat.-Nr. 203351)
Calciumphosphate Transfection Kit	Invitrogen (44-0052)
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Kat.-Nr. 21969-035)
DMEM _{20%FCS, 10%DMSO}	70 ml DMEM _{0%FCS} 20 ml FCS 10 ml DMSO (steril)
DMEM _{10%FCS}	500 ml DMEM 50 ml FCS 5 ml L-Glutamin 5 ml Pen/Strep
DMEM _{2%FCS}	500 ml DMEM 10 ml FCS 5 ml L-Glutamin 5 ml Pen/Strep
DMEM _{0%FCS}	500 ml DMEM 5 ml L-Glutamin 5 ml Pen/Strep
Fötales Kälberserum (FCS)	Pan BIOTECH GmbH (Kat.-Nr. 3302-P271806)
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche (11988387001)
Herring Sperm DNA	Promega (D181A)
β-Interferon, human, rekombinant, CHO Cells	Calbiochem (Kat.-Nr. 407318)
L-Glutamin	Gibco (Kat.-Nr. 25030-123)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Kat.-Nr. 11668-027)
MycoKill AB (50x)	PAA (Kat.-Nr. P11-016)
Optimem	Gibco (Kat.-Nr. 31985-047)
PBS _{def}	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 Liter ddH ₂ O ^(A)

^(A) autoklavieren

Penicillin / Streptomycin (Pen/Strep)

Gibco (Kat.-Nr. 15070-063)

Trypsin / EDTA

Gibco (Kat.-Nr. 25300-096)

A.2 Lösungen und Puffer

Ampicillin (0,1 g/ml)

1 g Ampicillin
⇒ ad 10 ml ddH₂O ^(S)

Blocking-Reagenz

3% Glycerin
2% BSA
0,2% Tween20
0,05% NaN₃

DC-Laufpuffer

87% Chloroform (v/v)
13% Methanol (v/v)

Fixierungslösung

50% ddH₂O
40% Methanol
10% Eisessig

LB-Medium

10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
10 g Bacto-Pepton
⇒ ad 1 Liter H₂O ^(A)

LB-Agar:

LB-Medium (250 ml)
+ 3,75 g Bacto-Agar ^(A)

10x Proteingellaufpuffer

10 g SDS
30 g Tris-Base
144 g Glycin
⇒ ad 1 Liter ddH₂O

2x SDS-Probenpuffer

25% Glycerol
2,5% SDS
125 mM Tris
125 mM DTT
0,25% Bromphenolblau

50x TAE

2 M Tris-Base (242 g)
1 M Eisessig (57,1 ml)
50 mM EDTA (100 ml von 0,5 M)
⇒ ad 1 Liter ddH₂O (ggf. pH = 8,5)

^(A) autoklavieren
^(S) steril filtrieren

10x TBS	0,5 M Tris-Base (305 g) 9% NaCl (450 g) ⇒ ad 5 Liter ddH ₂ O (pH = 7,6) (mit ungefähr 200 ml konz. HCl)
Tris-HCl (Trenngele)	1,5 M Tris-Base ⇒ auf pH = 8,8 einstellen
Tris-HCl (Sammelgele)	0,5 M Tris-Base ⇒ auf pH = 6,8 einstellen
Western Blot Anodenpuffer I	36,34 g Tris-Base 200 ml EtOH (vergällt) ⇒ ad 1 Liter ddH ₂ O
Western Blot Anodenpuffer II	3,03 g Tris-Base 200 ml EtOH (vergällt) ⇒ ad 1 Liter ddH ₂ O
Western Blot Kathodenpuffer	5,25 g 6-Amino-N-Caprone Säure 3,03 g Tris-Base 200 ml EtOH (vergällt) ⇒ ad 1 Liter ddH ₂ O

A.3 Chemikalien

Acrylamid /Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth (Art.-Nr. 3029.1)
Agarose	Invitrogen (Kat.-Nr. 15510-027)
6-Aminocaproic acid	Sigma (A2504.100G)
Ammoniumpersulfat (APS)	BIO RAD (Kat.-Nr. 161-0700)
Ampicillin 1,0	Ratiopharm
Bacto-Agar	Difco Labs (0140-01)
Albumin bovine Fraction V	Serva (Kat.-Nr. 11926)
Bromphenolblau	Sigma (B-8026)
Chloroform (Trichlormethan)	J. T. Baker (7386)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)(1 mg/ml)	Sigma (Prod.-Nr. D 9542)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche (Kat.-Nr. 708984)
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma (Kat.-Nr. D2650)
Essigsäure	Merck (1 00063.2511)
Ethanol (EtOH)	J. T. Baker (8006)
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roche (2218.1)
Ethylacetat	Merck (1.09623.2500)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (8043.2)
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma (E-3889)
FluorSafe Reagent	Calbiochem (Kat.-Nr. 345789)
Glycerin	Roth (3783.2)

Glycin	Roth (3908.3)
Hefeextrakt	Merck (103753.0500)
Immersion Oil	Leica (Best.-Nr. 11513860)
Isopropanol	Acros Organics (184130025)
Magermilchpulver	Saliter
-2-Mercaptoethanol	Sigma (M6250-100ML)
Methanol (MeOH)	Fluka (65543)
Natriumacetat (NaAc)	Merck (1.06268.1000)
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel-de-Haën (31434)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (1.13760.1000)
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka (Kat.-Nr. 76240)
Pepton	Merck (1.07213.1000)
Redivue PRO-MIX [³⁵ S]-Met/Cys	Amersham (AGQ0080)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BIO RAD (Kat.-Nr. 161-0800)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Base)	Acros Organics (140500010)
Triton X-100	Serva (Kat.-Nr. 39795)
Tween 20	Serva (Kat.-Nr. 37470)

A.4 Verbrauchsmaterial

6- & 12-well-Zellkulturplatten	Greiner (657160; 665180)
24- & 96-well-Zellkulturplatten	Greiner (662160; 655180)
25 cm ² -, 75 cm ² - und 175 cm ² -Zellkulturflaschen	Greiner (690175; 658175; 660175)
50 ml Falcon-Röhrchen	Greiner (210261)
15 ml Falcon-Röhrchen	Sarstedt (62.554.502)
Centrifuge Tubes (Ultra-Clear, 25 x 89 mm)	Beckman (Reorder No. 344058)
Immuno LockWell Luminunc (96-well)	Nunc (463200 oder 201)
Kryoröhrchen	Corning Incorporated (431386)
Mikro-Schraubröhre (1,5 ml)	Sarstedt (72.692.105)
Parafilm	Pechney Plastic Packaging (PM-996)
PCR-Tubes (0,2 ml)	Biozym (710928)
10 cm-Zellkulturschalen	Greiner (633171)
Polystyrenröhrchen (RedCAP, 12 ml)	Greiner (163160)
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt (72.690.001)
Safe-Lock Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf (0030 120.086)
Safe-Lock Reaktionsgefäß (2 ml)	Eppendorf (0030 120.094)

A.5 Geräte

Bio-Imager Analyser BAS-100	Fuji (Kanagawa, Japan)
Bio-Imager Screens Image Plate 2040S MP	Fuji (Kanagawa, Japan)
Fastblot Whatman	Biometra (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop Apotome	Zeiss (Jena)
Geiger-Müller-Zähler	Berthold (Wildbach)
Gel Doc 2000	BIO RAD (München)
Geltrockner	von Keutz (Reiskirchen)

Genequant II DNA/RNA-Calculator	Amersham Europe (Freiburg)
Keutz Minigelkammer	von Keutz (Reiskirchen)
Luminometer Centro LB 960	Berthold Tech. (Bad Wildbach)
J-25 Avanti Zentrifuge	Beckman (Palo Alto, USA)
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments (Hanau)
Microfuge R (Rotor F 241.5)	Beckman (Palo Alto, USA)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences (USA)
Optimax 2010 Imaging systems	Protec Processor Technology
Primus 25 Thermocycler	MWG-Biotech (Ebersberg)
Optima L100K Ultrazentrifuge	Beckman (Palo Alto, USA)
UV-Kontaktlampe Chroma 41 (254nm)	Laborgeräte Vetter (Wiesloch)
Vakupack Tischschweißgerät	Krupps (Essen)
Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac)	von Keutz (Reiskirchen)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)

A.6 Molekularbiologische und biochemische Kits

BD In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit	BD Bioscience (Kat.-Nr. 639602)
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega (#E1960)
FAST-CAT Chloramph. Acetyltransferase Assay Kit	Invitrogen (F2900)
Luciferase Assay System	Promega (#E4030)
MycoAlert Mycoplasma Detection Assay	Lonza (LT07-418)
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen (Kat.-Nr. 210212)
Hispeed Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen (Kat.-Nr. 12663)
peqGold Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab (Kat.-Nr. 12-6942-02)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (28706)
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen (Kat.-Nr. 28106)
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen (Kat.-Nr. 74104)
Z-Competent <i>E.coli</i> Transformation Buffer Set	Zymo Research (T3002)

A.7 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

Alkalische Phosphatase (calf intestine, CIP, 1U/μl)	Fermentas (Kat.-Nr. EF0341)
Aminosäure-Mix -Met/-Cys	Promega (Kat.-Nr. L5511)
dNTP-Mix (je 10mM)	Fermentas (#R0191)
<i>E.coli</i> XL1-Blue	Stratagene
(Genotyp: <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 ReA1 lac</i>)	
FastRuler (low, middle and high range)	Fermentas (#SM1103, 1113, 1123)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas (#SM0241)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas (#SM0311)
6x Loading Dye Solution	Fermentas (#R0611)
Pwo DNA-Polymerase (1 U/μl)	Peqlab (#EP0502)
Restriktionsenzyme	Fermentas / NEB
RiboLock Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl)	Fermentas (#EO0382)
T4 DNA-Ligase	NEB (M0202S)
TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega (L4611)

A.8 Materialien für biochemische Arbeiten

Calyculin A	Cell Signaling (#9902)
Complete Proteaseinhibitoren	Roche (Best.-Nr. 1697498)
PageRuler Prestained Protein ladder	Fermentas (#SM1819)
Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB (P7708)
PVDF-Membran (Immobilon-FL)	Millipore (Kat.-Nr. IPFL00010)
PVDF-Membran (Immobilon-P)	Millipore (Kat.-Nr. IPVH00010)
Rainbow ¹⁴ C Marker (high- und low-range)	GE Healthcare (CFA 755, CFA 756)
Röntgenfilme (PR New)	CEA
SuperSignal West Dura Extenden Duration Substrate	Thermo Scientific (#34075)
SuperSignal West Femto Maximum Sensivity Substrate	Thermo Scientific (#34095)
Thapsigargin	Biomol (Kat.-Nr. PE-180)
Whatman-Papier 3MM	Schleicher & Schuell (Kat.-Nr. 3030917)
Cell Extraction Buffer (CLP)	Biosource (Cat. No. FNN0011)
Chaps Cell Extract Buffer	Cell Signaling (#9852)
zVAD-fmk (Caspase Inhibitor)	Promega (Kat.-Nr. G723A)

A.9 Zelllinien

293/ACE2-Zellen (humane embryonale Nierenzellen)	S. Makino (UTMB, Galveston, TX)
293 low passage(lp)-Zellen (humane embryonale Nierenzellen)	Microbix Biosystems Inc. (Kat.-Nr. PD-02-01)
293M-Zellen (humane embryonale Nierenzellen)	C. Basler (Mount Sinai School, New York, USA)
Vero E6-Zellen (Nierenzellen der Grünen Meerkatze)	ATCC-CRL-1586
LLC-MK2-Zellen (Nierenzellen des Rhesusaffen)	L. van der Hoek (Department of Human Retrovirology, Amsterdam)

A.10 Viren

SARS-Coronavirus (FFM-1)	GenBank accession No. AY310120
Sendai-Virus (Stamm Cantell) (SeV)	C. Basler (Mount Sinai School, New York, USA)
vesikuläres Stomatitis-Virus (Stamm Indiana) (VSV)	Dr. Wagner (Philipps-Universität Marburg)
Humanes Coronavirus NL63 (hCoV-NL63)	L. van der Hoek (Department of Human Retrovirology, Amsterdam) (200)

A.11 Antikörper

Bezeichnung	verw. Verdünnung	in	Quelle (Kat.-Nr.)
Maus-anti-HA (Clone HA-7)	1:1 000 (IFA) 1:10 000 (WB)	BR 5% MP	Sigma-Aldrich (H9608)
Maus-anti- β -Aktin	1:40 000 (WB)	5% MP	Abcam (ab8226)
Kaninchen-anti-SARS-NP	1:1 000 (IFA) 1:10 000 (WB)	BR 5% MP	Garcia-Sastre, Martínez-Sobrido (Mount Sinai School of Medicine)
Kaninchen-anti-PARP	1:1 000 WB	5% MP	Cell Signaling (#9542)
Maus-anti-PKR	1:30 000 (WB)	5% MP	BD Bioscience (610765)
Kaninchen-anti-phospho PKR	1:1 000 (WB)	5% BSA	Epitomics (#1120-1)
Maus-anti-eIF2 α	1:1 000 (WB)	5% MP	Biosource (AHO0802)
Kaninchen-anti-phospho-eIF2 α	1:30 000 (WB)	5% MP	Biosource (44-728G)
Kaninchen-anti-PERK	1:500 (WB)	5% MP	Santa Cruz (sc-13073)
Kaninchen-anti-phospho-PERK	1:1 000 (WB)	5% MP	BioLegend (631202)
Kaninchen-anti-GCN2	1:5 000 (WB)	5% BSA	Cell Signaling (#3302)
Kaninchen-anti-phospho-GCN2	1:1 000 (WB)	5% BSA	Cell Signaling (#3301)
Kaninchen-anti-Caspase 3	1:1 000 (WB)	5% MP	Cell Signaling (#9662)
Maus-anti-Caspase 8	1:1 000 (WB)	5% BSA	Cell Signaling (#9746)
Maus-anti-Bcl2	1:1 000 (WB)*	1% MP	Sigma Aldrich (B3170)
Kaninchen-anti-Bax	1:1 000 (WB)*	1% MP	Serotec (AHP471)
Maus-anti-Flag M2	1:15 000 (WB)	1% MP	Sigma Aldrich (F1804)
Kaninchen-anti-Spike (SARS)	1:1 000 (WB)*	3% BSA	J. Kursawe (Philipps-Universität Marburg)
Maus-J2 (anti-dsRNA)	1:100 (IFA)	BR	English & Scientific Consulting (J2-041)
Maus-anti-SeV	1:500 (IFA)	BR	W.J. Neubert (Max Planck Institut, Martinsried)
Maus-anti-U122 (anti ORF 7a)	1:500 (IFA)	BR	Y. J. Tan (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore)
Kaninchen-anti-ORF7b	1:1 000 (WB) 1:1 000 (IFA)	5% MP BR	A. Pekosz (Washington University School of Medicine)
Zweit-Antikörper			
Esel-anti-Maus-Cy2	1:100 (IFA)	BR	Dianova (715-225-150)
Ziege-anti-Kaninchen-Rhodamin	1:100 (IFA)	BR	Dianova (111-295-003)
Esel-anti-Kaninchen-Cy3	1:100 (IFA)	BR	Dianova (711-165-152)
Ziege-anti-Kaninchen-Cy2	1:100 (IFA)	BR	Dianova (111-225-045)
Ziege-anti-Kaninchen-Alexa680	1:5 000 (WB)	1% MP	Invitrogen (A21076)
Esel-anti-Maus-Irdye800	1:5 000 (WB)	1% MP	Rockland (610-732-124)
Ziege-anti-Maus-POD	1:40 000 (WB)	5% MP	Dianova (115-035-062)
Ziege-anti-Kaninchen-POD	1:40 000 (WB)	5% MP	Dianova (111-035-045)

Tabelle 5: Antikörper

WB: Western Blot-Analysen; IFA: Immunfluoreszenz-Analysen; MP: Milchpulver, BSA: Rinderserumalbumin, BR: Blocking-Reagenz (A.2). Alle Antikörper (Ak) zur IFA und die Zweit-Ak für WB-Analysen wurden für 1 Std. eingesetzt. Die Erst-Ak für Western Blot-Analysen wurden in der Regel bei 4 °C über Nacht verwendet. Wurde die Inkubation für 1 Std. bei Rt durchgeführt, so ist das mit einem * gekennzeichnet.

A.12 Primer

Nummer	Bezeichnung	Funktion	Nukleotidsequenz 5'-3'
# 1663	PKR-fwd-siRNA	RT-PCR	GGT TTC TTC ATG GAG GAA CTT AAT AC
# 1735	Bcl-2-fwd	RT-PCR	TGC ACC TGA CGC CCT TCA C
# 1736	Bcl-2-rev	RT-PCR	AGA CAG CCA GGA GAA ATC AAA
# 1750	PKR-1851-siRNA-r	RT-PCR	TAG AGG TCC ACT TCC TTT CCA
# 1768	Bax-fwd	RT-PCR	ACC AAG AAG CTG AGC GAG TGTC
# 1769	Bax-rev	RT-PCR	ACA AAG ATG GTC ACG GTC TGC C
# 1771	GAPDH-fwd	RT-PCR	TGA AGG TCG GAG TCA ACG GA
# 1772	GAPDH-rev	RT-PCR	CAT GTG GGC CAT GAG GTC CA
# 1833	EcoRV-SARS-NSP14-f	Klonierung; <i>EcoRV</i>	gca gat atc atg GCA GAA AAT GTA ACT GGA CTT
# 1834	SARS-NSP14-XhoI-r	Klonierung; <i>XhoI</i>	gca ctc gag tta CTG TAA CCT GGT AAA TGT ATT
# 1835	EcoRV-SARS-ORF7b-f	Klonierung; <i>EcoRV</i>	gac gat atc CTT CAC CAT TAA GAG AAA GAC
# 1836	SARS-ORF7b-XhoI-r	Klonierung; <i>XhoI</i>	gca ctc gag AAT GAG AAG TTT CAT GTT CGT
# 1837	EcoRV-SARS-ORF8a-f	Klonierung; <i>EcoRV</i>	gca gat atc CCT TGT ACC AAA GTC TAA ACG
# 1838	SARS-ORF8a-XhoI-r	Klonierung; <i>XhoI</i>	ccg ctc gag CAG TGC TAT AAG TAT TAC CCC
# 1839	EcoRV-SARS-ORF8b-f	Klonierung; <i>EcoRV</i>	gca gat atc AGC GCT GTG CAT CTA ATA AAC
# 1840	SARS-ORF8b-XhoI-r	Klonierung ; <i>XhoI</i>	gca ctc gag TGG GGT CCA TTG TCA GAC ATT
# 1864	SARS-ORF7b-Bdin-pl.18-f	Klonierung; BdinFusion-Kit	cta gaa ttc ctc gag ACA ATG AGA AGT TTC ATG TTC
# 1865	SARS-ORF7b-Bdin-pl.18-r	Klonierung BdinFusion-Kit	atc gtc gac ctc gag TCA CCA TTA AGA GAA AGA CAG
# 1866	SARS-ORF8a-Bdin-pl.18-f	Klonierung BdinFusion-Kit	cta gaa ttc ctc gag AAG CAG TGC TAT AAG TAT TAC
# 1867	SARS-ORF8a-Bdin-pl.18-r	Klonierung BdinFusion-Kit	atc gtc gac ctc gag CCT TGT ACC AAA GTC TAA ACG
# 1868	SARS-ORF8b-Bdin-pl.18-f	Klonierung BdinFusion-Kit	cta gaa ttc ctc gag GAT TGG GGT CCA TTA TCA GAC
# 1869	SARS-ORF8b-Bdin-pl.18-r	Klonierung BdinFusion-Kit	atc gtc gac ctc gag AGC GCT GTG CAT CTA ATA AAC
# 1870	SARS-NSP14-Bdin-pl.18-f	Klonierung BdinFusion-Kit	cta gaa ttc tcg agt taC TGT AAC CTG GTA AAT GTA TTC
# 1871	SARS-NSP14-Bdin-pl.18-r	Klonierung BdinFusion-Kit	atc gtc gac ctc gag atg GCA GAA AAT GTA ACT GGA CTT
# 1889	seqprimer-pl18-f	Sequenzierung	CTT AGT ACG GTT TCA CAG GCG
# 1890	seqprimer-pl18-r	Sequenzierung	GCT GAC AGA CTA ACA GAC TG
# 1926	seq-NSP14-f	Sequenzierung	GCA AAA CCT CCA CCA GGT GAC
# 1972	pl.18-mut <u>TZ</u> insBamHI-f	Klonierung; IVM, <i>T7-Promotor</i>	<u>gtc gta tta gga tcc</u> AAA AGA CCC ATG GAA AGG AAC
# 1973	pl.18-mut <u>TZ</u> ins-r	Klonierung; IVM, <i>T7-Promotor</i>	<u>tca cta tag gga gaC</u> TGC AGT CAC CGT CCT TGA CAC
# 1980	ORF9b-Sall-r	Klonierung; <i>Sall</i>	gca gtc gac GTA CCA TCT GGG GCT GAG CTC
# 1981	NSP16-XmaI-f	Klonierung; <i>XmaI</i>	gca ccc ggg atg GCT GTT ATA CCA AAA GGA ATA ATG

# 1982	NSP16-XhoI-r	Klonierung; <i>XhoI</i>	gca ctc gag TTA GTT GTT AAC AAG AAT ATC AC
# 1983	NSP13-XmaI-f	Klonierung; <i>XmaI</i>	gca ccc ggg atg GCT CTC TAT TAC CCA TCT GC
# 1984	NSP13-XhoI-r	Klonierung; <i>XhoI</i>	gca ctc gag tta TTG TAA TGT AGC CAC ATT GCG
# 1985	ORF9b-BglII-f	Klonierung; <i>BglII</i>	gca aga tct GCT TGA TAA TGG ACC CCA ATC
# 2022	N-SARS-XmaI-f	Klonierung; <i>XmaI</i>	gta ccc ggg ATG TCT GAT AAT GGA CCC CA
# 2023	N-SARS-BglII-r	Klonierung ; <i>BglII</i>	cgt aga tct TTA TGC CTG AGT TGA ATC AG
# 2036	N-NL63-f	RT-PCR	GAT AAC CAG TCG AAG TCA CCT AGT TC
# 2037	N-NL63-r	RT-PCR	ATT AGG AAT CAA TTC AGC AAG CTG TG
# 2050	N-Seq-fwd (SARS)	Sequenzierung	CTA CCG AAG AGC TAC CCG
# 2051	N-Seq-rev (SARS)	Sequenzierung	CAG TTC CTT GTC TGA TTA G
# 2102	pl18T7-7bdeI-Flagins-fwd	Klonierung; <i>Bst1107I</i> <u><i>Flag-tag</i></u>	gca gta tac tta <u><i>ctt gtc atc gtc gtc ctt gta gtc</i></u> gac ttt ggt aca agg ttc ttc tag atc c
# 2103	pl18T7-7bdeI-Flagins-rev	Klonierung; <i>Acc65I</i>	cgg atc ccg ggt acc tct aga aga tct g
# 2128b	pl18-Bst1107I-fwd	Klonierung; <i>Bst1107I</i>	gag tat aat ata gag tat aca ata gtg acg
# 2129b	Acc65I-NtermHAinpl18-rev	Klonierung; <i>Acc65I</i> ; <u><i>HA-tag</i></u>	gca ggt acc atg <u><i>tac cct tat gat gtg ccg gat tat gcc</i></u> AAT GAG CTC ACT TTA ATT GAC TTC TAT
# 2130b	Bst1107I-CtermHAinpl18-f	Klonierung; <i>Bst1107I</i> ; <u><i>HA-tag</i></u>	gca gta tac tta <u><i>ggc ata atc ccg cac atc ata agg gta</i></u> GAC TTT GGT ACA AGG TTC TTC TAG ATC CTG G
# 2195	SARS-SUD-Nterm-HA	Klonierung; <i>XhoI</i> ; <u><i>HA-tag</i></u>	gca ctc gag ATG <u><i>tac cct tat gat gtg ccg gat tat gcc</i></u> GAT TAT CTT GAT AAC CTG AAG CCT AGA G
# 2196	SARS-SUD-Nterm-HA	Klonierung; <i>NotI</i>	gca gcg gcc gc TTA AGT CTT AAC CTC CCG CAG GGA TAA GAG
# 2197	SARS-SUD-Cterm-HA	Klonierung; <i>XhoI</i>	gca ctc gag ATG GAT TAT CTT GAT AAC CTG AAG CCT AG
# 2198	SARS-SUD-Cterm-HA	Klonierung; <i>NotI</i> ; <u><i>HA-tag</i></u>	gca gcg gcc gc tta <u><i>ggc ata atc ccg cac atc ata agg gta</i></u> AGT CTT AAC CTC CCG CAG GGA TAA GAG
# 2199	SARS-SUD-OS-Nterm-HA	Klonierung.; <i>XhoI</i> ; <u><i>HA-tag</i></u>	gca ctc gag atg <u><i>tac cct tat gat gtg ccg gat tat gcc</i></u> gcg ATG GAT TAT CTT GAT AAC CTG AAG
# 2200	SARS-SUD-OS-Nterm-HA	Klonierung; <i>BglII</i>	gca aga tct tta ATC CTC TGG GTC TTC AGG AGC GAG TTC
# 2201	SARS-SUD-OS-Cterm-HA	Klonierung; <i>XhoI</i>	gca ctc gag atg gcg ATG GAT TAT CTT GAT AAC CTG
# 2202	SARS-SUD-OS-Cterm-HA	Klonierung; <i>BglII</i> ; <u><i>HA-tag</i></u>	gca aga tct tta <u><i>ggc ata atc ccg cac atc ata agg gta</i></u> ATC CTC TGG GTC TTC AGG AGC GAG TTC
# 2203	Seq-Primer-SARS-SUD	Sequenzierung	GCC TAT ATG CAT GGA TGT TAG AGC

Tabelle 6: Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (OntS) sind hier mit den jeweiligen Bezeichnungen, Sequenzen und Funktionen angegeben. Die für RT-PCRs verwendeten OntS wurden, wie unter 3.1.2 beschrieben, eingesetzt. OntS zur Sequenzierung wurden im jeweiligen DNA/10mM Tris/Cl, pH 8,5-Mix an die Firma SeqLab geschickt (3.1.9). OntS die zur Klonierung der angegebenen Gene (Bezeichnung) benötigt wurden, wurden zunächst wie in 3.1.1 für PCRs verwendet. Nach einem Restriktionsverdau (Schnittstelle ist angegeben und in der Sequenz fett gedruckt) wurden die erhaltenen PCR-Fragmente in den passenden Vektor ligiert. Eingefügte Markierungen wie HA- oder Flag-tags sind kursiv und unterstrichen hervorgehoben.

A.13 Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden innerhalb dieser Arbeit verwendet. Mittels Sequenzierung wurde die Richtigkeit und Vollständigkeit der jeweiligen Sequenzen überprüft. Für jedes Plasmid ist entweder die Klonierungsstrategie, die Herkunft bzw. eine Referenz (Clone-Chart-Nummer (cc.-Nr.)) angegeben. Sofern nicht anders angegeben entspricht die Sequenz der jeweiligen Gene denen des SARS-CoV-Isolates FFM-1.

Die Konstrukte der SARS-unique Domäne (SUD, Domäne in nsp3) wurden ausgehend von einem Konstrukt von R. Hilgenfeld (Universität zu Lübeck, pIVEX1.3-SARS-SUD, (189)) kloniert. Dieses hatte an beiden Enden zusätzliche nicht SARS-CoV-spezifische Nukleotide (Nts), was dazu führte, dass zwei Sets an Konstrukten hergestellt wurden. Zum einen wurde die Originalsequenz (OS) des erhaltenen Konstruktes und zum anderen ausschließlich die SARS-CoV-spezifische Sequenz (Nts angegeben) zur Klonierung verwendet.

Die Nummern der zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide sind in Klammern angegeben.

Konstrukt	Nts im SARS-CoV-Genom / Herkunft	cc.-Nr.	Vektor
pl.18-nsp1	F. Weber, Inst. for Medical Microbiol. and Hygiene, Freiburg	VK-11/06	pl.18
pl.18-nsp2	F. Weber, Inst. for Medical Microbiol. and Hygiene, Freiburg	VK-15/06	pl.18
pDest-N-his/flag-nsp3N	2 719 – 4 431 (204) (A. von Brunn, Max von Pettenkofer-Institut, München)	-	pCR3
pDest-N-his/flag-nsp3C	4 885 – 8 484 (204) (A. von Brunn, Max von Pettenkofer-Institut, München)	-	pCR3
SUD I.5	3 745 – 4 881 (kloniert aus pIVEX1.3-SARS-SUD (189), von R. Hilgenfeld, Universität zu Lübeck (mit # 2196, 2197, A.12)	VK-05/08	pCAGGS+mcs
SUD 1.1-Nterm-HA	3 745 – 4 881 (kloniert aus pIVEX1.3-SARS- SUD (189) von R. Hilgenfeld, Universität zu Lübeck (mit # 2195, 2196, A.12)	VK-01/08	pCAGGS+mcs
SUD 2.1-Cterm-HA	3 745 – 4 881 (kloniert aus pIVEX1.3-SARS- SUD (189) von R. Hilgenfeld, Universität zu Lübeck (mit # 2197, 2198, A.12)	VK-02/08	pCAGGS+mcs
SUD-OS-II.3	3 745 – 4 881 (kloniert aus pIVEX1.3-SARS- SUD (189) von R. Hilgenfeld, Universität zu Lübeck (mit # 2200, 2201, A.12)	VK-06/08	pCAGGS+mcs
SUD-OS-3.3-Nterm-HA	3 745 – 4 881 (kloniert aus pIVEX1.3-SARS- SUD (189) von R. Hilgenfeld, Universität zu Lübeck (mit # 2199, 2200, A.12)	VK-03/08	pCAGGS+mcs
SUD-OS-4.5-Cterm-HA	3 745 – 4 881 (kloniert aus pIVEX1.3-SARS- SUD (189) von R. Hilgenfeld, Universität zu Lübeck (mit # 2201, 2202, A.12)	VK-04/08	pCAGGS+mcs
pl.18-nsp4	F. Weber, Inst. for Medical Microbiol. and Hygiene, Freiburg	VK-16/06	pl.18
pl.18-nsp5	F. Weber, Inst. for Medical Microbiol. and Hygiene, Freiburg	VK-17/06	pl.18
pl.18-T7 nsp6	10 888 – 11 756 C. Wei, Inst. of Microbiology and Epidemiology, Peking	VK-06/06	pl.18-T7
pl.18-T7 nsp7	11 757 – 12 006 C. Wei, Inst. of Microbiology and Epidemiology, Peking	VK-01/06	pl.18-T7
pl.18-T7 nsp8	12 007 – 12 600 C. Wei, Inst. of Microbiology and Epidemiology, Peking	VK-07/06	pl.18-T7
pl.18-nsp9	F. Weber, Inst. for Medical Microbiol. and Hygiene, Freiburg	VK-18/06	pl.18
1.4-III-SARS-nsp10	12 940 -13 356 - (109)	VK-30/03	pCAGGS+mcs
pl.18-nsp12	F. Weber, Inst. for Medical Microbiol. and Hygiene, Freiburg	VK-12/06	pl.18
pl.18-T7 nsp13	17 037 – 17 954 (# 1983, 1984)	VK-10/05	pl.18-T7
pl.18-T7 nsp14	17 955 – 19 535 (# 1870, 1871 unter Verwendung des BD in Fusion Kits (A.6) nach Angaben des Herstellers)	VK-14/05	pl.18-T7
pl.18-nsp15	F. Weber, Inst. for Medical Microbiol. and Hygiene, Freiburg	VK-13/06	pl.18
pl.18-T7 nsp16	20 673 – 21 470 (# 1981, 1982)	VK-11/05	pl.18-T7

pcDNA3.1 SARS-spike	SARS-CoV-Stamm BJ01 (M. Eickmann, Philipps-Universität Marburg)	-	pcDNA3.1
4.10-SARS-ORF 3a	25 253 -26 077 - (109)	VK-18/03	pCAGGS+mcs
I.2-SARS-ORF 3b	25 674 – 26 138 - (109)	VK-11/03	pCAGGS+mcs
pCG1-SARS-E-Flag	CHUK-W1 Stamm des SARS-CoV; AY278554; (J. Glende, TH Hannover)	VK-20/06	pCG1
pl.18-T7 M-Protein	26 383 – 27 048 C. Wei, Inst. of Microbiology and Epidemiology, Peking	VK-03/06	pl.18-T7
pl.18-ORF 6	F. Weber, Inst. for Medical Microbiol. and Hygiene, Freiburg	VK-14/06	pl.18
IV.6-SARS-ORF 7a	27 258 -27 626 - (109)	VK-10/03	pCAGGS+mcs
pl.18-T7 ORF 7b	27 623 – 27 757 (# 1864, 1865)	VK-12/05	pl.18-T7
pl.18-T7 ORF 7b del	27 623 – 27 757 Deletion: 27 654 - 27 698 (# 1864, 1865)	VK-15/05	pl.18-T7
pl.18-T7 ORF 8a	27 764 – 27 881 (# 1866, 1867)	VK-13/05	pl.18-T7
pl.18-T7 ORF 8b	27 849 – 28 103 (# 1868, 1869)	VK-16/05	pl.18-T7
pl.18-T7 N-Protein	28 105 – 29 373 C. Wei, Inst. of Microbiology and Epidemiology, Peking	VK-09/06	pl.18-T7
pl.18-T7 ORF 9b	28 115 – 28 411 (# 1980, 1985)	VK-09/06	pl.18-T7
Konstrukt	Herkunft	cc.-Nr.	Vektor
pcDNA3.1-VP35 _{ZEBov} HA _N	S. Miller, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg	S. Miller (04.06.2002)	pcDNA3.1

Tabelle 7: Rekombinante Plasmide

A.14 Vektoren und Reporter-gen-Konstrukte

Konstrukt	Informationen	Herkunft
pCAGGS+mcs	pCAGGS mit zusätzlich eingefügter multiple-cloning site (mcs), Amp ^r	Dr. M. Weik (Philipps-Universität Marburg)
pcDNA3.1 D/V5-His-TOPO [®]	CMV-Promotor, Amp ^r , Neo ^r	Invitrogen (Kat.-Nr. K4900-01)
pl.18	Immediate early (IE) CMV-Promotor plus hCMV Intron A, nach mcs poly-(A), Amp ^r	F. Weber (Inst. for Medical Microbiol. and Hygiene, Freiburg)
pl.18-T7	in pl.18 zusätzlich eingefügter T7-Promotor mit Primer # 1972 und # 1973, cc Nr.: VK-08/05,	selbst hergestellt
pRL-SV40	SV40-Promotor vor Renilla-Luziferase-Gen, Amp ^r	Promega (Kat.-Nr. E2231)
pGL3-Control	SV40-Promotor vor Firefly-Luziferase-Gen, Amp ^r	Promega (Kat.-Nr. E1741)
pHISG54-Luz	ISRE-Promotor vor Firefly-Luziferase-Gen, Amp ^r	D. Levy (New York University School of Medicine, New York)
pHISG54-CAT	ISRE-Promotor vor CAT-Gen, Amp ^r in (11) wird auf (19) verwiesen	C. Basler (Mount Sinai School of Medicine, New York)

Tabelle 8: Vektoren und Reporter-gen-Konstrukte

B. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter, 10 ⁻⁶ L
5´-ppp	„5´-triphosphate“
Abb.	Abbildung
ACE2	„angiotensin converting enzyme 2“
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADAR	„adenosine deaminase acting on RNA“
Ak	Antikörper
APAF-1	„apoptotic protease activating factor-1“
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	„American Tissue Culture Collection“
ATF6	„activating transcription factor 6“
AS	Aminosäure
Bax	Bcl2-associated X protein“
Bcl2	„B-cell lymphoma 2“
bCoV	bovine Coronaviren
bp	Basenpaare
BR	Blocking-Reagenz
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CAMP	Chloramphenicol
cCoV	Hunde-Coronaviren
CHOP	„C/EBP-homologous protein“
CMV-Promotor	Promotor des Cytomegalie-Virus
CoV	Coronavirus
CPE	cytopathischer Effekt
DABCO	1,4 Diazaabicyclo(2.2.2.)octane
DAPI	4´,6´-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dünnschicht-Chromatographie
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreitol
ECACC	“European Collection of Cell Cultures“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
E-Protein	„envelope protein“
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	“ER golgi intermediate compartment“
EtOH	Ethanol
eIF2α	α-Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors-2
FADD	“Fas-associated death domain protein“
Fas-L	Fas-Ligand
FCS	Fötale Kälberserum
FIPV	Felines Infektiöses Peritonitis-Virus
FLICE	“FADD-like IL-1β-converting enzyme“
FLIP	“FLICE-inhibitory protein“

g	Gramm
GAS	„gamma activated sequence“
GCN2	„general control non-derepressible-2 kinase“
GRP 78/94	„glucose-regulated protein“ 78/ 94
hCoV-NL63	humanes Coronavirus isoliert aus Probe 63 in den Niederlanden
h p.i.	Stunden nach der Infektion
HA	Hämagglutinin des Influenza A Virus
HBS	„hepes buffered saline“
Hepes	N-2-Hydroxymethylpiperazin-N´-2-Ethan Sulfonsäure
HRI	„heme-regulated inhibitor kinase“
IBV	Infektiöses Bronchitits Virus
ICTV	„International Committee on Taxonomy of Viruses“
IFA	Immunfluoreszenz-Assay
IFN α / β / γ	Interferon alpha / beta / gamma
IFNAR	Rezeptor für Typ-I-Interferone
IFNGR	Rezeptor für Interferon γ
I κ B	Inhibitor von NF κ B
inkl.	inklusive
IRE1	„inositol-requiring protein-1“
ISG	„interferon-stimulated gene“
ISGF3	„interferon-stimulated gene factor-3“
ISRE	„interferon-stimulated response element“
IRF	„interferon regulatory factor“
IU	international units
IVT	In vitro-Transkription / Translation
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobasen
L	Liter
LB	„lysogeny broth“
Lsg.	Lösung
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
M-Protein	„membrane protein“
Met-tRNA _i	Initiations-tRNA mit der Aminosäure Methionin
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
MHV	Maus-Hepatitis-Virus
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter, 10 ⁻³ L
mM	Millimolar, 10 ⁻³ M
MOI	„Multiplicity of Infection“
mRNA	„messenger RNA“
NaAc	Natriumacetat
NaCl ₂	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF κ B	„nuclear factor κ B“
ng	Nanogramm, 10 ⁻⁹ g
N-Protein	Nukleoprotein
nsp	Nicht-Strukturprotein/e
Nts	Nukleotide
OAS	2´-5´-Oligoadenylatsynthetase
ORF/s	Offene/r Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	„poly-ADP-ribose-polymerase-1“
PBS	„phosphate buffered saline“
PBS _{def}	„phosphate buffered saline deficient“

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PERK	„PKR-like endoplasmatic reticulum kinase“
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKR	doppelsträngige RNA-abhängige Protein Kinase
pmol	Picomol, 10^{-12} M
POD-Ak	Peroxidase-gekoppelter Antikörper
pp	Polyprotein
P/S	Penicillin und Streptomycin
p.i.	post infectionem (lat.: nach der Infektion)
p.t.	post transfectionem (lat.: nach der Transfektion)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i> (thermophiles Archaeobakterium)
RIG-I	„retinoic acid inducible gene-1“
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	„rounds per minute“
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RTK	Replikations-Transkriptionskomplex
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
SeV	Sendai-Virus
S-Protein	„spike protein“
STAT	„signal transducers and activators of transcription“
Std.	Stunde(n)
SV 40	Simian-Virus 40
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
tCoV	Truthahn-Coronavirus
TdT	„terminal deoxynucleotidyl transferase“
TGEV	Transmissibles Gastroenteritis-Virus
TOPO	Topoisomerase
TRAIL	„tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand“
tRNA	Transfer-RNA
TRS	„transcription-regulating sequences“
TUNEL	„TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling“
Tyk	Tyrosin Kinase
U	„unit“, Einheit
UPR	„unfolded protein response“
VSV	vesikuläres Stomatitis-Virus
(v/v)	Volumen / Volumen
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
(w/v)	Gewicht / Volumen
XPB1	„X-box binding protein-1“
z. B.	zum Beispiel
ZEBOV	Ebola-Virus (Subtyp Zaire)
zVAD-fmk	„carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone“

C. Curriculum Vitae

Name: Krähling, Verena
Geburtstag/-ort: 16. Juni 1979 in Marburg/Lahn
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Hochschulausbildung:

10. 2005 - Arbeiten im Hochsicherheitslabor der Stufe 4 der Philipps-Universität Marburg

09.2007 - 08. 2008 Philipps-Universität Marburg, Institut für Virologie; Promotion: Wechselwirkungen von SARS-Coronavirus mit zellulären Abwehrmechanismen, in der AG von PD Dr. Mühlberger, unterstützt vom SFB 535, TP B9

08.2004 - 08.2007 Philipps-Universität Marburg, Institut für Virologie; Promotion: Wechselwirkungen von SARS-Coronavirus mit zellulären Abwehrmechanismen, in der AG von PD Dr. Mühlberger, unterstützt vom Deutsch-Chinesischen Zentrum für Wissenschaftsförderung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft

02.2004 - 08.2004 Praktikum: Arbeiten mit dem reversen Genetiksystem für Filoviren, Institut für Virologie, Marburg

05.2003 - 02.2004 Diplomarbeit an der Philipps-Universität Marburg; Titel: Wechselwirkungen des Typ-I-Interferon-Systems mit SARS-Coronavirus
Abschlussnote: 1,4

April 2003 mündliche Abschlussprüfungen

10.1998 - 02.2004 Philipps-Universität Marburg
Studium der Biologie, Hauptfach: Virologie
Nebenfächer: Genetik und Entwicklungsbiologie

Schulbildung:

1995 - 1998 Gymnasium Philippinum Marburg
Leistungskurse: Biologie und Englisch

1989 - 1995 Gesamtschule Ebsdorfer Grund

1985 - 1989 Grundschule Mardorf

D Veröffentlichungen und Präsentationen

D.1 Vorträge auf Kongressen und Tagungen

1. Krähling, V., Mühlberger, E. Interaction of the type I interferon system with SARS-Coronavirus and Ebola virus. Chinese-German Symposium on SARS and Interferon, Februar 2005 in Freiburg, Deutschland
2. Krähling, V., Küsters, J. und Mühlberger, E. Interaction of SARS-Coronavirus with the type I interferon system and the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. Study group "Immunobiology of Viral Infections", 4th Workshop, September 2005 auf Schloß Zeilitzheim bei Würzburg, Deutschland
3. Grosch, M., Cash, J., Krähling, V., Mühlberger, E. Interference of Marburg and Ebola viruses with the type I interferon response: induction and signaling. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2006, März 2006 in München, Deutschland
4. Krähling, V., Mühlberger, E. Interaction of SARS-Coronavirus and hCoV-NL63 with type I interferon system and double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. Chinese-German Symposium on SARS and Interferon, April 2006 in Shanghai, China
5. Krähling, V., Küsters, J., Mühlberger, E. Activation of dsRNA-dependent protein kinase and induction of apoptosis in SARS-Coronavirus-infected cells. Third European Congress of Virology, September 2007 in Nürnberg, Deutschland

D.2 Posterpräsentationen

1. Krähling, V., Grosch, M. und Mühlberger, E., Interaction of SARS-Coronavirus and Ebola virus with double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR and their ability to inhibit the type I interferon system. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2005, März 2005 in Hannover, Deutschland
2. Krähling, V., Mühlberger, E., SARS-CoV is not sensitive to activated dsRNA dependent protein kinase PKR. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2008, März 2008 in Heidelberg, Deutschland

D.3 Publikationen

1. Krähling, V., Stein, D. A., Spiegel, M., Weber, F., Mühlberger, E., SARS-Coronavirus triggers apoptosis via protein kinase R but is resistant to its antiviral activity. J Virol, 2008 (in revision)
2. Pfefferle, S., Krähling, V., Grywna, K., Mühlberger, E., Drosten, C., Novel SARS-Coronavirus reverse genetics system and characterization of a naturally acquired deletion of a transmembrane domain in the noncanonical SARS-Coronavirus ORF 7b protein (in Vorbereitung)
3. Enterlein, S., Schmidt, K., Schümann, M., Conrad, D., Krähling, V., Olejnik, J., Volchkov, V., Mühlberger, E., Characterisation of the Marburg virus NP transcription start signal and the genomic replication promoter (in Vorbereitung)

E. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem langjährigen Leiter des Instituts für Virologie in Marburg Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk und seinem Nachfolger Prof. Dr. S. Becker für die fortwährende Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Bölker danke ich sehr herzlich für die Bereitschaft die Betreuung meiner Doktorarbeit am Fachbereich Biologie zu übernehmen. Den Mitgliedern der Prüfungskommission Frau Prof. Dr. M. Hassel und Herrn Prof. Dr. G. Kost danke ich sehr herzlich.

Frau PD Dr. Elke Mühlberger danke ich besonders herzlich für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit. Ihre offene, freundliche und jederzeit hilfsbereite Art sorgte für ein sehr angenehmes Arbeitsklima.

Allen jetzigen sowie ehemaligen Mitgliedern der AG Mühlberger danke ich ganz besonders für die großartige Unterstützung im Laboralltag, welche zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre führte. Vor allem sei hier Dr. Sven Enterlein erwähnt, der gerade zu Beginn meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Für alle zukünftigen Bostoner: Ich werde euch alle ganz schrecklich vermissen. Für Dominik: Weil's geht!

Auch allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie gilt mein herzlicher Dank. Hervorgehoben seien hier die Mitarbeiter und Techniker des BSL4-Labors.

Special Thanks for helpful comments and discussion on PPMO compounds to our collaborator David Stein, Corvallis, Oregon.

I thank S. Makino, UTMB, Galveston for generously providing 293/ACE2 cells, L. Martínez-Sobrido and A. Garcia-Sastre, Mount Sinai School of Medicine, New York for the SARS-CoV antibody, D. Levy, New York University School of Medicine, New York for plasmid pHISG-54-Luc, and the Chemistry Group at AVI BioPharma for the production of PPMO.

Herzlichen Dank auch an Steffi & Mirko sowie Judith & Karsten für die anregenden und abendfüllenden wissenschaftlichen Gespräche, die über so manches Tal hinweghalfen.

Meinen Eltern, Christa und Willi Krähling, danke ich für ihre Großzügigkeit und immerwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Meinem Lebensgefährten Jochen Wahlers danke ich für seine Liebe, sein Verständnis und den Rückhalt in den vergangenen Jahren.

F. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Wechselwirkungen von SARS-Coronavirus mit zellulären Abwehrmechanismen

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, im Juli 2008

(Verena Krähling)