

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut  
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ulrich Koszinowski

**Identifikation und Charakterisierung von zellulären  
Zielproteinen zur antiviralen  
Therapie der SARS-Coronavirus Infektion**

**Dissertation**  
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Julia Schöpf  
aus  
Schrobenhausen

- 2011 -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Haas

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. Ursula Zimmer-Strobl

Dekan: Prof. Dr. med Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29. November 2011

## Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist.

München, den 03.03.2011

(Julia Schöpf)

## Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
- dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 03.03.2011

(Julia Schöpf)

*für meine Eltern*

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muss sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das Möglichste getan hat.

J. W. Goethe, Italienische Reise, 16. März 1787

## Inhalte dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

### **THE SARS-CORONAVIRUS-HOST INTERACTOME: IDENTIFICATION OF CYCLOPHILINS AS TARGET FOR PAN-CORONAVIRUS INHIBITORS**

S. Pfefferle\*, **J. Schöpf\***, M. Kögl\*, C. C. Friedel, M. A. Müller, J. Carbajo-Lozoya, T. Stellberger, E. von Dall'armi, P. Herzog, S. Kallies, D. Niemeyer, V. Ditt, T. Kuri, R. Züst, K. Pumpor, R. Hilgenfeld, F. Schwarz, R. Zimmer, I. Steffen, F. Weber, V. Thiel, G. Herrler, H.-J. Thiel, C. Schwegmann-Weßels, S. Pöhlmann, J. Haas, C. Drosten, A. von Brunn. \* = equal contribution  
PLoS Pathogens 7 (10): e1002331.doi:10.1371/journal.ppat:100233

## Beiträge zu wissenschaftlichen Tagungen:

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie  
Heidelberg, 05. bis 07. März 2008

### **ANALYSIS OF INTRAVIRAL PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS OF THE SARS CORONAVIRUS ORFOME BY PEPTIDE SCANNING**

von Brunn A., Ester C., **Schöpf J.**, Uetz P. and Haas J.

Art der Präsentation: Vortrag

Jahrestreffen SARS-BMBF Zoonoseverbund  
Bonn, 11. April 2008

### **GENOMWEITE ANALYSE VON PROTEIN-PROTEIN INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEM SARS-CORONAVIRUS MIT DER HUMANEN WIRTSZELLE**

**Schöpf J.**, Kögl M., von Dall'armi E., Endesfelder M., Haas J., von Brunn A.

Art der Präsentation: Vortrag

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie  
Leipzig, 18. bis 21. März 2009

### **GENOME-WIDE ANALYSIS OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS BETWEEN THE SARS-CORONAVIRUS AND THE HUMAN HOST**

**Schöpf J.**, Kögl M., von Dall'armi E., Endesfelder M., Weber F., Kuri T., Glowaka I., Bertram S., Pöhlmann S., Pfefferle S., Drosten C., Haas J., von Brunn A.

Art der Präsentation: Poster

Jahrestreffen SARS-BMBF Zoonoseverbund  
Frankfurt, 14. Januar 2010

### **IDENTIFICATION OF CYCLOSPORIN A AS AN INHIBITOR OF VIRAL REPLICATION OF SEVERAL CORONAVIRUSES**

**Schöpf J.**, Pfefferle S., Kögl M., Herzog P., Müller M.A., Muth D., Kuri T., Ebel F., Friedel C., Zimmer R., Weber F., Haas J., Thiel H.-J., Herrler G., Thiel V., Drosten C., von Brunn A.

Art der Präsentation: Vortrag

4th European Congress of Virology  
Cernobbio, Comer See 07. bis 11. April 2010

### **APPLYING SYSTEMS BIOLOGY TO SEVERE ACUTE RESPIRATORY CORONAVIRUS AND ITS HUMAN HOST: IDENTIFICATION OF A CELLULAR TARGET AND ITS INHIBITOR FOR ANTIVIRAL INTERVENTION**

**Schöpf J.**, Pfefferle S., Kögl M., Herzog P., Müller M.A., Muth D., Kuri T., Ebel F., Friedel C., Zimmer R., Weber F., Haas J., Thiel H.-J., Herrler G., Thiel V., Drosten C., von Brunn A.

Art der Präsentation: Vortrag

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b>	<b>1</b>
1.1	<b>Die Familie der <i>Coronaviridae</i></b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Struktureller Aufbau eines Coronavirus.....	2
1.1.2	Genomorganisation und Replikationszyklus .....	3
1.2	<b>Das SARS-assoziierte Coronavirus</b> .....	<b>7</b>
1.2.1	Der zoonotische Ursprung des SARS-CoV .....	7
1.2.2	Pathogenese des SARS-CoV .....	8
1.2.3	Das SARS-CoV und die Zytokin-Antwort .....	9
1.2.4	Antivirale Strategien gegen das SARS-CoV .....	11
1.3	<b>Der Calcineurin / NFAT-Signalweg</b> .....	<b>12</b>
1.3.1	Proteine der NFAT-Familie .....	12
1.3.2	Die Calcineurin / NFAT - Signaltransduktionskaskade .....	14
1.3.3	Inhibitoren des Calcineurin/NFAT-Signalwegs.....	16
1.3.4	Das antivirale Potential von Cyclosporin A.....	17
1.4	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b>	<b>20</b>
2.1	<b>Materialien</b> .....	<b>20</b>
2.1.1	Laborgeräte.....	20
2.1.2	Chemikalien .....	20
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.4	Enzyme und Größenstandards.....	23
2.1.5	Antikörper.....	23
2.1.6	Fertigsätze (Kits).....	23
2.1.7	Zelllinien .....	24
2.1.8	Viren.....	24
2.1.9	Bakterienstämme .....	25
2.1.10	Plasmide .....	26
2.1.11	Oligonucleotide .....	31
2.2	<b>Mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>34</b>
2.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	34
2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien .....	35
2.2.3	Transformation von Bakterien.....	35
2.2.4	Automatisiertes Hefe-Zwei-Hybrid-Screening .....	35
2.3	<b>DNA-Standardmethoden</b> .....	<b>36</b>
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	36
2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	36
2.3.3	Verdau mit Restriktionsenzymen.....	37
2.3.4	Dephosphorylierung des Vektor-Plasmids .....	37

2.3.5	Ligation.....	37
2.3.6	Rekombinationsklonierung (Gateway®-Klonierung) .....	37
2.3.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.3.8	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	38
2.3.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
2.3.10	Sequenzierung von DNA .....	39
<b>2.4</b>	<b>RNA-Standardmethoden .....</b>	<b>39</b>
2.4.1	RNA-Isolation aus Gewebe-Zellkulturen .....	39
2.4.2	Synthese von cDNA.....	39
2.4.3	Echtzeit PCR-Quantifizierung von RNA Transkripten mittels TaqMan™-PCR.....	40
2.4.4	Virale RNA-Isolation aus infizierten Gewebe-Zellkulturen .....	40
2.4.5	Echtzeit PCR-Quantifizierung viraler RNA mittels SuperScript™ II One-Step RT-PCR mit Platinum™ <i>Taq</i> .....	41
<b>2.5</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>41</b>
2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
2.5.2	Western-Blot-Analyse .....	42
2.5.3	Modifiziertes LUMIER Bindungs-Assay.....	42
<b>2.6</b>	<b>Zellkultur und virologische Methoden.....</b>	<b>43</b>
2.6.1	Zellkultur.....	43
2.6.2	Immunfluoreszenz Analysen.....	44
2.6.3	Transfektion .....	44
2.6.4	Herstellung stabiler Zelllinien.....	44
2.6.5	Dual-Luziferase-Reporterassay .....	45
2.6.6	Virusinfektion von Zellen.....	46
2.6.7	Herstellung von Virusstocks .....	46
2.6.8	Virustitration (Plaque Assay) .....	46
2.6.9	Zytotoxizitäts - Test.....	47
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Validierung neu identifizierter Protein-Protein-Interaktionen mittels LUMIER Bindungs-Assay.....</b>	<b>51</b>
3.1.1	Klonierung der SARS-CoV Gene und humaner cDNAs in LUMIER-Expressionsplasmide.....	51
3.1.2	Validierung der Protein-Protein-Interaktionen mit dem modifizierten LUMIER Bindungs-Assay .....	52
<b>3.2</b>	<b>Funktionelle Analyse ausgewählter Protein-Proteininteraktionen .....</b>	<b>57</b>
3.2.1	Etablierung eines Dual-Luziferase Reporterassays .....	58
3.2.2	SARS-CoV Nsp1 verstärkt die Expression NFAT-regulierter Gene.....	60
3.2.3	Die Verstärkung der Expression NFAT-regulierter Gene ist SARS- spezifisch.....	65
3.2.4	Einfluss des SARS-CoV Nsp1 auf die Genexpression der Interleukine-2, -4 und -8 ...	67
3.2.5	SARS-CoV Nsp1 verstärkt die Expression NFAT-regulierter Gene in Lymphozyten ...	68



3.2.6	Erhöhte Expression NFAT-regulierter Gene im Viruskontext.....	69
3.2.7	Das Zytokinmuster SARS-CoV infizierter CaCo-2 Zellen .....	71
3.2.8	Inhibition der viralen Replikation des SARS-CoV durch Cyclosporin A.....	73
3.2.9	Inhibition der viralen Replikation weiterer humaner Coronaviren .....	75
3.2.10	Cyclosporin A als Pan-Coronavirus-Inhibitor.....	81
3.2.11	Der Wirkmechanismus der Cyclosporin A und FK506 vermittelten Inhibition der viralen Replikation .....	83
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>88</b>
4.1	Die Identifikation neuer Protein-Proteininteraktionen mittels H2H-System und anderer Hochdurchsatzverfahren .....	88
4.2	Proteininteraktionen von SARS-Coronavirus Proteinen.....	92
4.3	Das SARS-CoV Nsp1 und Zytokinstürme in SARS-Patienten .....	94
4.4	Cyclosporin A als antivirale Therapiemöglichkeit .....	97
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b><i>Abstract</i></b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b><i>Referenzen</i></b>	<b>106</b>
7.1	Literatur.....	106
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	116
7.3	Tabellenverzeichnis.....	117
7.4	Kooperationen.....	118

## Abkürzungsverzeichnis

	(-)ssRNA	einzelsträngiges RNA Genom in minusstrang Orientierung
	(+)ssRNA	einzelsträngiges RNA Genom in plusstrang Orientierung
	3CL <sup>PRO</sup>	3C-ähnliche Cystein-Protease
<b>A</b>	..... ACE-2	Angiotensin-konvertierendes Enzym-2
	AD	Aktivierungs-Domäne
	ADRP	Adenosindiphosphat-Ribose-1''-Phosphatase
	AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
	Amp	Ampicillin
	Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
	AP-1	<i>activating protein-1</i>
	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
<b>B</b>	..... BCoV	bovines Coronavirus
	BSA	<i>bovine serum albumin</i>
	bp	Basenpaar
<b>C</b>	..... CnA	Calcineurin
	Cham	Chloramphenicol
	Cham <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
	cDNA	<i>copyDNA</i>
	Co-IP	Co-Immunopräzipitation
	CoV	Coronavirus
	Cyp	Cyclophiline
	CspA	Cyclosporin A
	CspD	Cyclosporin D
<b>D</b>	..... DAD	diffuse alveolare Zerstörung ( <i>diffuse alveolar damage</i> )
	DAG	Diacylglycerin
	DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
	DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	DNA BD	DNA Bindedomäne
	dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
	DMV	Doppelmembranvesikel
	DTT	1,4 Dithiothreitol
<b>E</b>	..... <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	ER	Endoplasmatischen Retikulum
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

		ETOH	Ethanol
<b>F</b>	.....	FCoV	felines Coronavirus
		FK506	Macrolid Tracolismus
		FKBP	FK506-Bindeproteine
		FKS (FCS)	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
<b>G</b>	.....	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
		Gent	Gentamicin
		Gent <sup>R</sup>	Genatmicin-Resistenz
		GFP	grünfluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
<b>H</b>	.....	H2H	Hefe-2-Hybrid
		HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
		HCV	Hepatitis-C-Virus
		HCoV-229E	humanes Coronavirus 229E
		HCoV-NL63	humanes Coronavirus NL-63
		HIS	Histidin
		HIS <sup>-</sup>	Histidin-Mangelmedium
		HIV-1	humanes Immundefizienz-Virus-1
		HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
<b>I</b>	.....	IBV	infektiöses Bronchitis Virus
		IgG	Immunglobulin G
		INF	Interferon
		IL	Interleukin
		Io.	Ionomycin
		IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
		IP 10	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10
<b>K</b>	.....	Kan	Kanamycin
		Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
		Kb	Kilobasenpaar
<b>L</b>	.....	LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
		Luc	Luziferase
		LUMIER	<i><u>L</u>uminescence-based <u>M</u>mammalian <u>I</u>nt<u>E</u>Ractome mapping</i>
<b>M</b>	.....	MAP-Kinasen	mitogenaktivierende Proteinkinasen
		MAPPIT	<i>mammalian protein-protein interactions trap</i>
		MCP-1	Monozyten Chemoattraktanten Protein-1
		MGC	<i>mammalian gene collection</i>
		MHV	murines Hepatits Virus
		mock	nicht infiziert (engl. = vortäuschen)
		MOI	<i>multiplicity of infection</i>
		mRNA	Boten ( <i>messenger</i> ) RNA

<b>N</b>	.....	NEAA	nichtessentielle Aminosäuren
		NES	Kernexportsignal
		NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
		NFAT-BS	NFAT-Bindestelle
		NFκB	nuclear factor kappa-B
		NHR	<i>NFAT homology region</i>
		NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
		NLS	Kernlokalisierungssignal
		Nsp	Nicht-Strukturprotein
		nt	Nucleotid
		NTPase	Nukleosid Triphosphat Hydrolase
<b>O</b>	.....	OD	optische Dichte
		Orf	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
<b>P</b>	.....	PBS	Phosphatgepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
		PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
		PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
		PCA	<i>protein fragment complementation assay</i>
		PFU	<i>plaque forming unit</i>
		p.i.	<i>post infection</i>
		PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphate
		PL <sub>2</sub> <sup>PRO</sup>	Papain-ähnliche Cystein-Protease
		PLC- γ	Phospholipase C-γ
		PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
		CypAse	Peptidyl-Prolyl-Isoomerase
		PRS	<i>positive reference set</i>
		<b>Q</b>	.....
<b>R</b>	.....	RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
		RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
		rpm	<i>rounds per minute</i>
		RSD	Rel-ähnliche Domäne ( <i>Rel-similarity-domain</i> )
		RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
		RRS	<i>random reference set</i>
<b>S</b>	.....	SARS	schweres akutes Atemwegssyndrom
		SARS-CoV	SARS assoziiertes Coronavirus
		SARS-CoV FFM1	Wildtyp-Stamm des SARS-Coronavirus Isolat "Frankfurt 1"
		SARS-CoV HK	Wildtyp-Stamm des SARS-Coronavirus Isolat "Hong-Kong"
		SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>

		siRNA	<i>short interfering RNA</i>
		Spec	Spectinomycin
		Spec <sup>R</sup>	Spectinomycin-Resistenz
		SUD	<i>SARS-CoV unique domain</i>
<b>T</b>	.....	TAD	Transaktivierende Domäne
		TAE	Tris-Acetat-EDTA
		Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
		TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
		TGEV	transmissibles Gastroenteritis-Virus
		TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor beta
		TMD	Transmembrandomäne
		TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha
		Tris	Tris(-hydroxymethyl)-Aminoethen
		TRS	<i>transcription regulatory sequence</i>
<b>U</b>	.....	U	<i>unit</i>
<b>V</b>	.....	v/v	Volumen/Volumen
<b>W</b>	.....	WHO	Weltgesundheitsorganisation
		WB	Western-Blot-Analyse
		wNAPPA	<i>nucleic acid programmable protein array</i>
		wt	Wildtyp
<b>Y</b>	.....	YFP	gelbfluoreszierendes Protein ( <i>yellow fluorescent protein</i> )

# 1 Einleitung

Das Schwere Akute Atemwegs Syndrom (*severe acute respiratory syndrom*, SARS) trat erstmals als eine untypisch verlaufende Lungenentzündung im November 2002 in der südchinesischen Provinz Guangdong in Erscheinung. Infizierte Patienten wiesen zunächst grippeähnliche Symptome, wie hohes Fieber, Kopfschmerzen und trockenen Husten auf, die teilweise jedoch aufgrund der starken alveolaren Zerstörung auch bis hin zu Atemnot und Atemstillstand führten. Im Frühjahr 2003 wurde als Ursache der Krankheit ein Coronavirus identifiziert und somit als SARS-assoziiertes Coronavirus (SARS-CoV) bezeichnet (75,77). Von den ersten SARS-Fällen in China ausgehend, verbreitete sich das Virus schnell über den internationalen Flugverkehr in 28 Länder weltweit und infizierte etwa 8000 Menschen, von denen ca. 10% starben. Die Virus-Übertragung erfolgte über Tröpfcheninfektion, so dass strikte Quarantäne und intensivmedizinische Betreuung der Infizierten ein weiteres Ausbreiten des Virus verhinderten. Somit konnte die SARS-Epidemie hauptsächlich mittels traditioneller epidemiologischer Maßnahmen bis August 2003 eingedämmt werden. Seither wurden bis auf drei Laborunfälle keine weiteren Neuinfektionen beobachtet (96). Spezifische Therapien gegen das Virus stehen bis heute nicht zur Verfügung (30,131,151).

## 1.1 Die Familie der *Coronaviridae*

Coronaviren sind umhüllte Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom, in Plus-Strang Orientierung. Ihren Namen erhielten sie 1968 aufgrund des charakteristischen Kranzes, der das Virus umgibt und welcher deutlich im Elektronenmikroskop sichtbar ist (131). Coronaviren infizieren verschiedenste Tierspezies wie auch den Menschen und verursachen respiratorische sowie gastro-intestinale Erkrankungen. Tiercoronaviren befallen Haustiere und Nutztier-Bestände wodurch sie zu großen ökonomischen Verlusten führen. Im Menschen verursachen Coronaviren milde respiratorische Erkrankungen, wie grippale Infekte oder Erkältungen, welche relativ leicht, meist ohne Medikation vom Körper selbst eingedämmt werden können. Erst mit dem Ausbruch von SARS im Jahr 2003 änderte sich das Potential einer Coronavirus-Infektion. Das SARS-CoV löste erstmals eine, durch Coronaviren verursachte, lebensbedrohliche Krankheit im Menschen aus (109,141).

Phylogenetisch wird die Familie der *Coronaviridae* zusammen mit den *Arteviridae* und den *Roniviridae* in die Ordnung der *Nidovirales* eingeordnet. Die *Coronaviridae* wiederum sind unterteilt in die beiden Gattungen *Coronavirus* und *Torovirus*. Basierend auf serologischen Aspekten, welche durch spätere Genomsequenzanalysen bestätigt wurden, werden die Coronaviren in drei Gruppen klassifiziert. Gruppe 1 (Gruppe  $\alpha$ ) beinhaltet Tierpathogene wie zum Beispiel das transmissible Gastroenteritis-Virus (TGEV) oder das feline Coronavirus (FCoV). Außerdem beinhaltet diese Gruppe auch humanpathogene Viren wie das humane Coronavirus 229E (HCoV-229E) oder das humane Coronavirus NL63 (HCoV-NL63). Auch

Gruppe 2 (Gruppe  $\beta$ ) enthält sowohl Tierpathogene, wie zum Beispiel das bovine Coronavirus (BCoV) oder das murine Hepatitis-Virus (MHV), als auch humanpathogene Viren. Gruppe 3 (Gruppe  $\gamma$ ) Coronaviren befallen ausnahmslos Vögel wie zum Beispiel das infektiöse Bronchitis Virus (IBV). Zunächst wurde vermutet, dass das SARS-CoV eine eigene neue Gruppe bildet, wobei genaue phylogenetische Analysen zeigten, dass es sich um eine frühe Abspaltung der Gruppe 2 handelt, woraufhin das SARS-CoV in die Untergruppe 2b eingeordnet wurde (47,128).

Folgende Tabelle zeigt die Klassifizierung der verschiedenen Coronaviren in drei Gruppen.

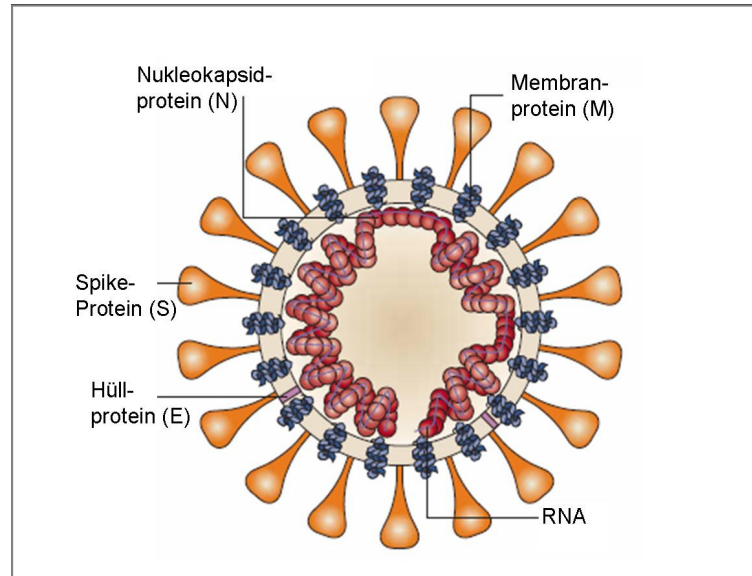
**Tab. 1.1: Die Gruppen der Coronaviren.** Modifiziert nach (151)

Gruppe	Virus	Wirtsspezies	Krankheitsbild
1	HCoV-229E	Mensch	respiratorische Infektion
	HCoV-NL63	Mensch	respiratorische Infektion, Krupp
	PRCoV	Schwein	respiratorische Infektion
	CCoV	Hund	intestinale Infektion
	FCoV	Katze	intestinale Infektion
	PEDV	Schwein	intestinale Infektion
	TGEV	Schwein	respiratorische u. intestinale Infektion
2	MHV	Maus	intestinale u. neurologische Infektionen, Hepatitis
	2a hCoV-OC-43	Mensch	respiratorische u. intestinale Infektion
	BCoV	Rind	intestinale Infektion
	HKU1	Mensch	respiratorische Infektion
	2b SARS-CoV	Mensch	schweres akutes Atemwegssyndrom
	batSARS-CoV	Fledermäuse	Krankheitsbild nicht bekannt
3	IBV	Huhn	respiratorische Infektion, Hepatitis
	TCoV	Truthahn	respiratorische u. intestinale Infektion

### 1.1.1 Struktureller Aufbau eines Coronavirus

Ein Coronavirus-Partikel wird begrenzt von einer äußeren Lipiddoppelschicht und hat einen Durchmesser von etwa 80 bis 120 nm. Die Lipiddoppelschicht ist assoziiert mit drei membranintegralen Proteinen: dem Membranprotein (M), dem Spike-Protein (S) und dem Hüllprotein (E). Das M-Protein durchspannt dreimal die Lipiddoppelschicht und besitzt eine kleine N-terminale Ektodomäne sowie ein zytoplasmatisches Ende. Das S-Protein, welches unter anderem die Rezeptorbindung und Membranfusion vermittelt, ist als Trimer in die Membran eingebettet und verleiht dem Viruspartikel den typischen Corona-Kranz. Das E-Protein liegt in relativ geringen Mengen in der Lipiddoppelschicht vor und ist verantwortlich für den Viruseintritt und den Virusaufbau in der Zelle. Das RNA-Genom ist mit dem vierten

Strukturprotein der Coronaviren, dem Nukleokapsidprotein (N) komplexiert und bildet ein langes, flexibles, helicales Nukleokapsid im Inneren der Lipiddoppelschicht (131,151). Folgende Abbildung zeigt einen SARS-CoV Partikel.



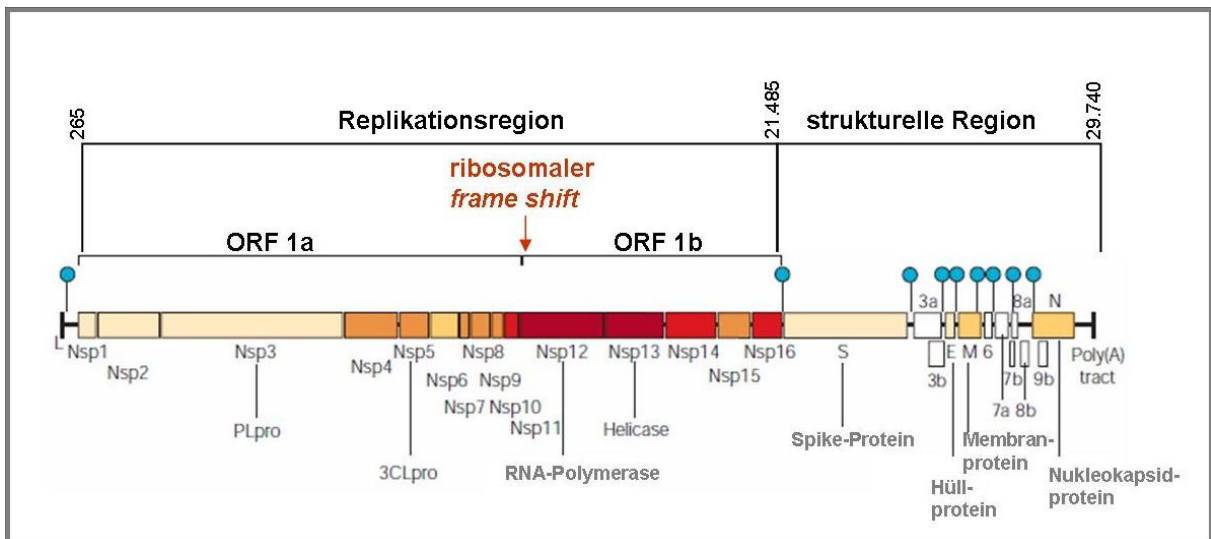
**Abb. 1.1: Aufbau eines SARS-CoV Partikels.** Modifiziert nach (131)  
Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines SARS-CoV Partikels, mit den vier Strukturproteinen M, S, E und N sowie das einzelsträngige RNA-Genom mit Plus-Strang Orientierung.

### 1.1.2 Genomorganisation und Replikationszyklus

Coronaviren besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom mit Plus-Strang Orientierung [(+)ssRNA]. Mit Genomgrößen zwischen 27.000 und 32.000 Nukleotiden sind dies bis heute die längsten, nicht segmentierten viralen RNA-Genome. Das coronavirale Genom besitzt wie die meisten eukaryotischen mRNAs eine 5'-CAP-Struktur und eine 3'-Polyadenylierung (47). Alle Informationen für die Virusreplikation sind im RNA-Genom enthalten, so dass bei Transfektion in Wirtszellen dieses allein ausreichend ist für eine produktive Infektion.

Das RNA-Genom lässt sich grundsätzlich in zwei funktionelle Regionen unterteilen, die Replikationsregion und die strukturelle Region. Die Replikationsregion liegt in den ersten zwei Drittel des gesamten Genoms und besteht aus zwei überlappenden *open reading frames* (ORF) 1a und 1b, welche alle für den Replikationskomplex benötigten Nicht-Strukturproteine (Nsps) kodieren. Die zweite Region befindet sich im übrigen Drittel des Genoms und kodiert neben den vier Strukturproteinen S, E, M und N noch weitere acht akzessorische Proteine mit bislang unbekannter Funktion. Folgende Abbildung zeigt eine Übersicht über das SARS-CoV Genom (121,131).



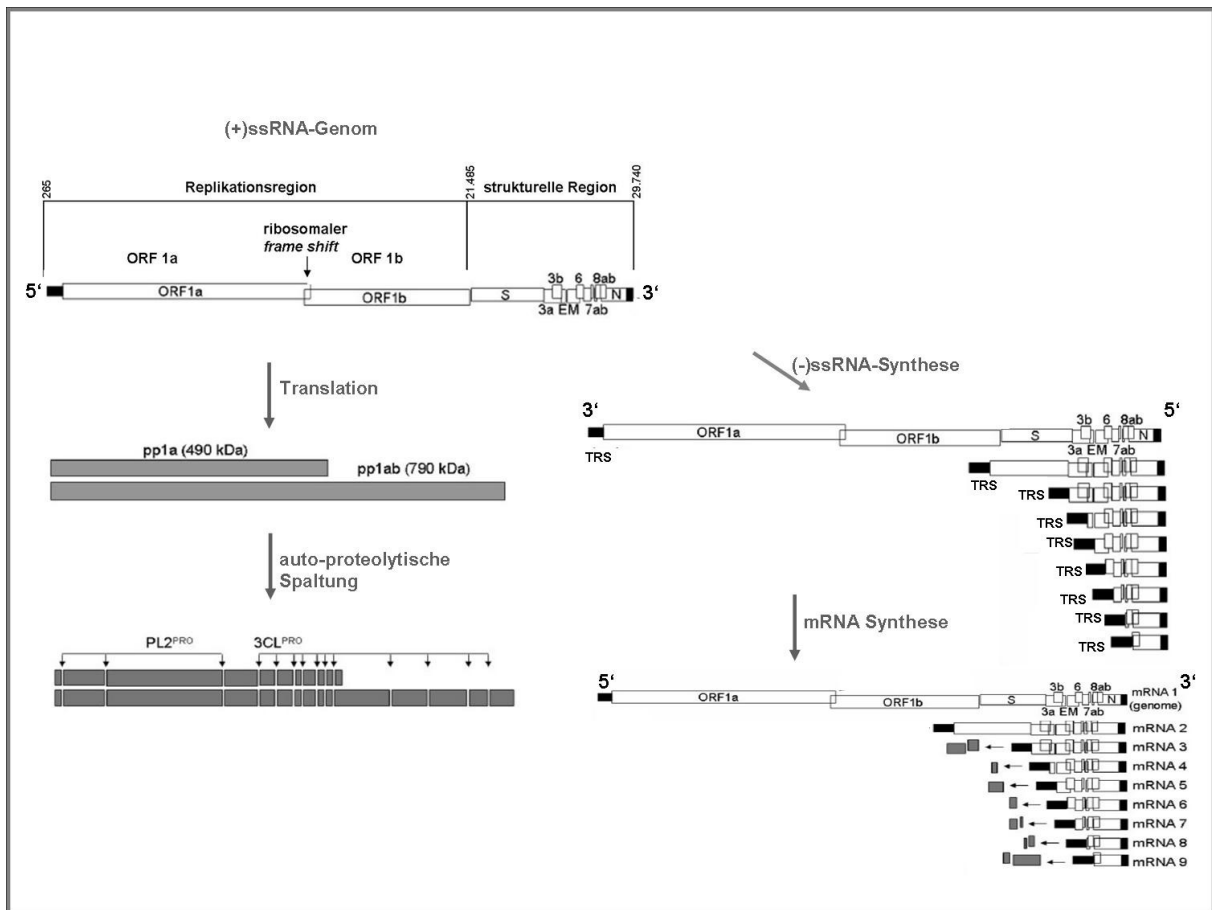


**Abb. 1.2: Schematische Darstellung des SARS-CoV Genoms.** Modifiziert nach (131)

Die ersten zwei Drittel des Genoms bilden die Replikationsregion, kodierend für 16 Nicht-Strukturproteine, die an der viralen Replikation beteiligt sind. Das letzte Drittel des Genoms ist die strukturelle Region, kodierend für vier Strukturproteine M, S, E und N sowie weitere acht akzessorische Proteine.

Wie in Abb. 1.2 dargestellt, besitzen ORF1a und ORF1b im überlappenden Bereich ein Signal für die Verschiebung des ribosomalen Leserasters (*frame shift*) von -1. Diese Verschiebung führt dazu, dass einige Ribosomen das ORF 1a-Stoppkodon überlesen und anstatt die Translation zu beenden ein Volllänge Polyprotein 1ab translatieren. Dieser Regulationsmechanismus ist in Coronaviren relativ effizient (35-40%) und führt zur Expression von zwei großen Polyproteinen, welche dann von viralen Proteasen posttranslational und auto-proteolytisch gespalten werden (7). Durch diese Spaltung entstehen 16 Nsp, unter ihnen die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Nach Bildung des Replikationskomplexes synthetisiert die RNA-abhängige RNA-Polymerase einen Volllänge RNA-Strang, mit Minus-Orientierung [(-)ssRNA]. Regulatorische Sequenzen (*transcription regulatory sequence* (TRS)), die jedem Gen vorgeschaltet sind, führen zusätzlich zu einer diskontinuierlichen Transkription der (-)ssRNA und somit zu einem ganzen Set subgenomischer (-)ssRNAs. Die neu entstandenen Volllänge und diskontinuierlichen (-)ssRNA-Stränge dienen dann wiederum als Matrize für die Synthese von mRNAs in positiver Orientierung, so dass zum einen Kopien des gesamten RNA-Genoms entstehen und zum anderen alle viralen Proteine translatiert werden können (7,47,106,121,123,131).

Einen schematischen Überblick über die virale Replikation zeigt die folgende Abbildung:



**Abb. 1.3: Replikation des SARS-CoV Genoms.** Modifiziert nach (106)

Nach der Translation des viralen Genoms in zwei Polyproteine (pp1a und pp1ab) erfolgt die auto-proteolytische Spaltung durch zwei virale Proteasen (PL2<sup>PRO</sup> und 3CL<sup>PRO</sup>). Anschließend erfolgt die Synthese eines (-)ssRNA-Stranges durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase. Transkriptionsregulatorische Sequenzen (TRS) führen zusätzlich zur Synthese subgenomischer (-)ssRNAs. Der Volllänge (-)ssRNA-Strang und die subgenomischen (-)ssRNAs dienen als Matrize für die abschließende mRNA Synthese.

Im Replikationszyklus wird das coronavirale Genom nach der Bindung des S-Proteins an den humanen Angiotensin-konvertierenden Enzym-2 (ACE-2)-Rezeptor und der Fusion des Virus mit der Zelle ins Zytoplasma der infizierten Zelle freigesetzt und dient dort zunächst als mRNA-Matrize für die Wirtszell-Translationsmaschinerie. Durch die oben beschriebene Genomorganisation ist dann der gleichzeitige, komplexe Ablauf mehrerer Replikations- und Transkriptionszyklen möglich. Diese Replikations- und Transkriptionszyklen finden in Vesikeln mit Doppelmembranen statt (100,129). Das N-Protein komplexiert den neu synthetisierten (+)ssRNA-Strang und bildet das stabile Nukleokapsid, wobei der anschließende Aufbau des Viruspartikels auf der Wanderung im intermediären Kompartiment zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat auf dem Weg zur Exozytose stattfindet (34,121,131).

In der folgenden Tabelle sind alle SARS-CoV Proteine mit ihren Funktionen und Positionen im Genom zusammengefasst.

**Tab. 1.2: Übersicht aller SARS-CoV Proteine.** Modifiziert nach (131)

ORF	Protein	Länge (AS)	Position im Polyprotein	Funktion/Struktur
<b>Replikationsregion</b>				
	Nsp 1	180	1M - 180G	Degradation von mRNA, Pathogenitätsfaktor (66,160)
	Nsp 2	638	181A - 818G	nicht bekannt
	Nsp 3 (PL2 <sup>PRO</sup> )	1922	819A -2740G	Papain-ähnliche Cystein-Protease, schneidet Nsp1 - Nsp4, ADRP, 2 TMD
	Nsp 4	500	2741K - 3240Q	3 TMD, evtl. Verankerung in DMV (100)
ORF 1a	Nsp 5 (3Clpro)	306	3241S - 3546Q	3C-ähnliche Cystein-Protease, schneidet Nsp4 - Nsp16
	Nsp 6	290	3547G-3836Q	5 TMD, evtl. Verankerung in DMV (100)
	Nsp 7	83	3837S - 3919Q	bindet an Nsp8
	Nsp 8	198	3920A - 4117Q	Primase (4,62)
	Nsp 9	113	4118N - 4230Q	bindet einzelsträngige RNA
	Nsp 10	139	4231A - 4369Q	Wachstumsfaktoren-ähnliche Domäne
	Nsp 11	13	4370S - 4382V	nicht bekannt
	Nsp 12 (RdRp)	932	4370S - 5301Q	RNA-abhängige RNA-Polymerase
ORF1b	Nsp13 (Helikase)	601	5302A - 5902Q	Helikase, Zink-bindende Domäne, NTPase
	Nsp14	527	5903A - 6429Q	3' - 5' Exonuklease
	Nsp15	346	6430S - 6775Q	EndoRNase
	Nsp16	298	6776A - 7073N	mRNA Cap-1 Methyltransferase
<b>Strukturelle Region</b>				
ORF2	Spike-Protein	1255		1 TMD, Rezeptorbindung und Endozytose
ORF3a		274		2 TMD, Membranorganisation, Zelltot (41)
ORF3b		154		NLS, Zellzyklus-Arrest, Apoptose Interferon-Antagonist (73)
ORF4	Hüllprotein	76		1TMD
ORF5	Membranprotein	221		3TMD
ORF6		63		1TMD, Zellzyklus-Arrest, Apoptose Interferon-Antagonist (73)
ORF7a		122		1TMD, nicht bekannt
ORF7b		44		nicht bekannt
ORF8a		39		nicht bekannt
ORF8b		84		nicht bekannt
ORF9a	Nukleokapsid-protein	422		Interferon-Antagonist (73)
ORF9b		98		nicht bekannt

ADRP = Adenosindiphosphat-Ribose-1''-Phosphatase, TMD = Transmembrandomäne, DMV = Doppelmembranvesikel

## 1.2 Das SARS-assoziierte Coronavirus

In der frühen Phase nach dem Ausbruch des Schweren Akuten Atemwegs Syndrom 2002 versuchten viele Forschungseinrichtungen weltweit zusammen mit der Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Ursache der schweren Krankheit zu finden. Zunächst kamen einige Erreger, wie zum Beispiel Metapneumoviren oder Chlamydien in Frage, die jedoch immer nur in einigen Patientengruppen gefunden wurden (WHO, 2003) (11). Bereits im März 2003 wurde das neue Coronavirus von vier verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander isoliert (30,75,77,104). Der endgültige Beweis für den Zusammenhang der Krankheit mit dem neu entdeckten Coronavirus, das Koch'sche Postulat, wurde durch die Virusinfektion von Makaken, die daraufhin ähnliche Symptome wie SARS-CoV infizierte Patienten entwickelten, erbracht (39).

### 1.2.1 Der zoonotische Ursprung des SARS-CoV

Erste Hinweise auf einen zoonotischen Ursprung des SARS-CoV zeigten epidemiologische Berichte, die den Kontakt von frühen SARS-Patienten mit wild lebenden Tieren auf asiatischen Tiermärkten beschrieben. Um Tiere, die mit SARS-CoV infiziert sind zu identifizieren, wurden verschiedene wild lebende und domestizierte Tiere untersucht und zum Beispiel Schleichkatzen (*Paguma larvata*) oder Marderhunde (*Nyctereutes procyonides*) als Träger eines SARS-ähnlichen Coronavirus entdeckt. Diese Erkenntnisse führten zu der Vermutung, dass es sich bei diesen asiatischen Tiermärkten um die Schnittstelle handelte, an der der Spezies-Übergang stattfand (50). Anschließende ausgedehnte Untersuchungen der Tiere zeigten jedoch, dass Wildbestände keine SARS-ähnlichen Coronaviren in sich trugen und sich die Tiere somit wahrscheinlich selbst auf den Tiermärkten infiziert hatten. Außerdem entwickelten Schleichkatzen nach Infektion mit humanen SARS-CoV klinische Symptome, was sie selbst als natürliches Wirtsreservoir ausschließt (86).

Fledermäuse sind das natürliche Reservoir vieler verschiedener Viren und haben eine zunehmende Präsenz in verschiedenen chinesischen Nahrungsprodukten oder in der traditionellen asiatischen Medizin. Aus diesem Grund wurden Exemplare verschiedener Fledermaus-Gattungen gefangen und eingehend untersucht. Schließlich wurde 2005 ein weiteres SARS-ähnliches Virus aus wilden *Rinolophus* Fledermäusen isoliert (79). Genomsequenzanalysen ergaben eine Übereinstimmung der Sequenz des neu identifizierten sogenannten Fledermaus SARS-CoV (batSARS-CoV) mit dem humanen SARS-CoV von 92%. Die Strukturproteine S, E, M und N sowie die Polymerase zeigten eine Übereinstimmung von 100%, bis auf die S1-Untereinheit des S-Proteins, hier sank die Übereinstimmung auf 64% ab. Die S1-Domäne des S-Proteins ist verantwortlich für die Rezeptorbindung und somit für die Gewebespezifität. Die S2-Domäne vermittelt die Membranfusion der Virus-Wirtsmembranen und weist somit keine Veränderungen auf

(79,86). Die genaue Kette der Infektionsereignisse, die schließlich die Übertragung des SARS-CoV auf den Menschen zur Folge hatte, ist immer noch nicht detailliert geklärt. Man geht davon aus, dass Fledermäuse auf Tiermärkten gehaltene Wildtiere, wie Schleichkatzen oder Marderhunde, als Zwischenwirte infizierten. Die Vermehrung im Zwischenwirt lieferte dann dem Virus die Möglichkeit zu maßgeblichen genetischen Veränderungen, um eine erfolgreiche Tier zu Mensch und sogar Mensch zu Mensch Übertragung zu bewerkstelligen (79).

### 1.2.2 Pathogenese des SARS-CoV

Die menschliche Übertragung des SARS-CoV erfolgte hauptsächlich über Aerosole oder durch direkten Kontakt. Weitere Übertragungswege, zum Beispiel über die Ausscheidung des Virus in Stuhl oder Urin, sind nicht ausgeschlossen, da SARS-CoV Partikel sehr stabil sind und bei Raumtemperatur bis zu sechs Tagen infektiös bleiben können (110,151). Die Infektion erreichte Frauen und Männer verschiedenen Alters in gleichem Maße, nach einer Inkubationszeit von 2 bis 16 Tagen, wobei der Verlauf bei Kindern in der Regel schwächer und weniger infektiös verlief. Der Grad der Erkrankung korrelierte dabei mit einer hohen Viruslast (59). Das klinische Erscheinungsbild der Patienten wurde von grippe-ähnlichen Symptomen wie Fieber, Schüttelfrost, Gliederschmerzen, Diarrhöe, Husten, Atemnot und Lungenentzündung geprägt. 20-30 % der Patienten benötigten eine künstliche Beatmung. Laboruntersuchungen zeigten unter anderem Lymphopenie, Neutrophilie und Thrombozytopenie. Die Behandlung erfolgte zunächst über die Gabe von Antibiotika, gefolgt von der gleichzeitigen Gabe von Ribavirin (Virostatikum) und Kortikosteroiden wie Methylprednisolon (49,78,105). Ein typischer Krankheitsverlauf umfasste die folgenden drei Phasen:

1. Aktive virale Infektion
2. Hyperaktive Immunantwort
3. Genesung oder Lungenzerstörung und Tod

In schwer verlaufenden Fällen war der dominierende pathologische Befund eine sogenannte diffuse alveolare Zerstörung (*diffuse alveolar damage*, DAD) mit schweren Läsionen in der Lunge, die zum einen direkt durch die virale Infektion und zum anderen durch eine Dysregulation des Immunsystems entstanden. In vielen Fällen wurden Infiltrationen der Gewebe, hauptsächlich von Makrophagen oder von Makrophagen, Lymphozyten und Neutrophilen beschrieben (78). Man vermutet, dass das SARS-CoV mittels Tröpfcheninfektion die Atemwege erreicht und in die Epithelzellen der Tracheen, Bronchien, Bronchiolen und Alveolen eindringt. Die virale Replikation in den ersten Zielzellen führt direkt zu leichten Gewebeschädigungen in der Lunge. Lokale Entzündungsreaktionen haben die Erhöhung der Permeabilität der Blutgefäße zur Folge und das SARS-CoV kann schon

vorhandene und zirkulierende Immunzellen infizieren, was zur späteren Lymphopenie führt. Die infizierten, zirkulierenden Immunzellen verbreiten dann das SARS-CoV in andere Gewebe, wie zum Beispiel der Milz und Lymphknoten. Die Zerstörung der Immunzellen und Schädigung der Milz resultiert früher oder später in einer Immunsuppression der Patienten (51).

Als Rezeptor des Virus wurde das Angiotensin-konvertierende Enzym-2 (ACE-2) identifiziert (85). Der ACE-2 Rezeptor wird auf epithelialen Zellen der Lunge, des Dünndarms sowie auf vielen weiteren Geweben des menschlichen Körpers exprimiert. Mausversuche haben gezeigt, dass die Überexpression des ACE-2 Rezeptors vor respiratorischen Schäden schützt. Bei einer SARS-CoV Infektion spielt der ACE-2 Rezeptor nicht nur eine Schlüsselrolle bei der initialen Infektion, sondern auch bei der weiteren Pathogenese und Lungenschädigung. Die Bindung des S-Proteins an den ACE-2 Rezeptor führt zu einer Reduktion der Expression des Rezeptors auf dem Gewebe und induziert dadurch das sogenannte *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) (61,76).

### 1.2.3 Das SARS-CoV und die Zytokin-Antwort

Zytokin- und Chemokin-Spiegel sind in schweren akuten Infektionen erhöht, da sie eine Schlüsselfunktion in der angeborenen Immunantwort haben. Eine Dysregulation dieser Proteine kann zu schweren immunvermittelten Gewebeschädigungen führen. Schon in frühen Berichten nach dem Ausbruch von SARS, wurde vermutet, dass die Gewebeschädigungen, die mit der Krankheit einhergehen, auf eine Dysregulation von Zytokinen zurückzuführen ist (42,43). Obwohl die Berichte zur Expression verschiedener Zytokine in SARS-Patienten sehr unterschiedlich und teilweise widersprüchlich sind steht fest, dass in den meisten SARS-Patienten erhöhte Spiegel verschiedener Zytokine, sogenannte Zytokin-Stürme, gemessen wurden (58). Die teils widersprüchlichen Daten zur Zytokinexpression beruhen vermutlich darauf, dass Untersuchungen und Studien mit Patientenmaterial im Vergleich zu Zellkultur-Systemen schwer zu standardisieren sind. Die Patienten wurden meist in unterschiedlichen Krankheitsstadien mit verschiedenen Analysemethoden untersucht (49,78,105).

Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über verschiedene Berichte der Zytokin-Spiegel in SARS-Patienten:

**Tab. 1.3: Vielfalt der Zytokin-Berichte von SARS-Patienten.** Modifiziert nach (43)

Autor	Untersuchte Zellen	Zytokinmuster	Regulation
Zhang <i>et al.</i> (159)	PBMC infizierter Patienten	IL-6, IL-10, IL-4, INF- $\gamma$ IL-8, TGF-beta	↑ ↓
Regunathan <i>et al.</i> (116)	PBMC infizierter Patienten	IP-10, IL-6, IL-8, MCP-1	↑
Castilletti <i>et al.</i> (9)	<i>ex vivo</i> infizierte PBMCs	IFN- $\alpha$ , INF- $\beta$	↑
Law <i>et al.</i> (81)	<i>ex vivo</i> infizierte PBMCs	IP-10, MIP1 $\alpha$ , Rantes, MCP-1	↑
Tang <i>et al.</i> (134)	Huh7-Zellen	kein INF- $\alpha$ und INF- $\beta$	nicht nachweisbar
Cinatl <i>et al.</i> (22)	CaCo-2 und CL-14 Zellen	CXC-Chemokine, OAS2, IL-18, MIF	↑ ↓
Spiegel <i>et al.</i> (130)	CaCo-2 und 293 Zellen	IP-10, IL-8 in CaCo-2 IP-10, IL-8 in 293	↑ nicht nachweisbar
Okabayashi <i>et al.</i> (99)	CaCo-2 Zellen	IFN- $\alpha$ , INF- $\beta$ , IRF-7, OAS2,...	↑

↑ = Hochregulation; ↓ = Herunterregulation

Wie Tabelle 1.3 zeigt, berichteten Zhang *et al.* (159) über erhöhte Konzentrationen des IL-6 in Patientenseren, wohingegen IL-8 und der transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF- $\beta$ ) nur in geringen Konzentrationen nachweisbar waren. IL-4, IL-10 und Interferon gamma (INF- $\gamma$ ) waren nur in Patienten hochreguliert, die die Krankheit überstanden und genesen. Reghunathan *et al.* (116) zeigten zum Beispiel, dass Patienten mit hohen Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10 (IP-10)- Spiegeln eine schlechte Prognose zu erwarten hatten. Desweiteren zeigten sie einen Zusammenhang zwischen erhöhten IL-6-, IL-8- und dem Monozyten Chemoattraktanten Protein-1 (MCP-1)- Spiegeln und einer hohen Sterberate auf (43,116,159). Bis jetzt ist noch unklar, welche Zellen für die hohen Zytokin- und Chemokin-Spiegel verantwortlich sind, einige Studien deuten auf Makrophagen und dendritische Zellen hin. Auf dem Gebiet der Zytokin- und Chemokinregulation, während der SARS-CoV Infektion, stehen noch viele Fragen offen. Klar ist jedoch, dass die Hyperinduktion der Zytokine und Chemokine und eine insuffiziente Interferon-Reaktion zur ausgeprägten Pathogenese der SARS-Patienten beitragen. Die sogenannten Zytokin-Stürme sind einerseits wichtig für die Beseitigung der viralen Infektion durch das angeborene Immunsystem, können jedoch andererseits als Reaktion auf hohe Viruslasten auch zu starken Entzündungsreaktionen, Lungenzerstörung und Multiorganversagen führen (14,43,49,78,155).

### 1.2.4 Antivirale Strategien gegen das SARS-CoV

Wie unter 1.2.2 beschrieben, wurden SARS-Patienten während der Epidemie hauptsächlich mit Antibiotika gegen Sekundärinfektionen, mit dem Virusstatikum Ribavirin sowie Steroiden gegen die hohen Zytokin-Spiegel behandelt. Diese Medikamente behandelten allerdings nur Sekundäreffekte der SARS-CoV Infektion, gegen das Virus selbst waren sie nicht wirksam (78,105). Bis heute gibt es noch keine antivirale Therapie gegen das SARS-CoV. Die wissenschaftlichen Bemühungen liefern viele Ansätze, um an verschiedenen Punkten der Virusinfektion einzugreifen. Ein vielversprechender Angriffspunkt wären die beiden viralen Proteasen, die während der Replikation essentiell für die Prozessierung der Polyproteine 1a und 1ab benötigt werden (siehe 1.1.2). Gegen die virale Cystein-Protease 3CL<sup>PRO</sup> konnten mittels Computer-Screenings, basierend auf der 3D-Kristallstruktur und verschiedenen dynamischen Molekül-Simulationen des Proteins, mehrere sogenannte *small molecule* Inhibitoren gefunden werden (28,103). Ein weiterer interessanter Angriffspunkt wäre die SARS-CoV RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp). Der Vorteil ist, dass die SARS-CoV RdRp als einzige Coronavirale RdRp strukturell und funktionell charakterisiert ist (19,154,157). Auch hier wurden, basierend auf Computeranalysen der 3D-Strukturen sowie auf Sequenzanalysen eine ganze Serie an potentiellen Nukleosid-Analog-Inhibitoren entdeckt. Diese potentiellen Inhibitoren wurden anschließend experimentell getestet und zum Beispiel  $\beta$ -D-N<sup>4</sup>-Hydroxycytidin, ein Nukleosid-Analogon, das spezifisch die SARS-CoV RdRp hemmt, entdeckt (2). Weitere inhibitorische Potentiale liegen in der Blockade der Funktion des E-Proteins, das essentiell zum Virusaufbau und der Morphogenese beiträgt. Auch mittels RNA-Interferenz könnte die virale RNA-Synthese spezifisch gehemmt werden (137). Antikörper könnten ebenfalls als Inhibitor des Virus-Eintritts eingesetzt werden. Schon während der SARS-Epidemie wurden infizierte Patienten mit Plasma von genesenen Personen behandelt. Dies führte zu einem positiveren Verlauf der Krankheit, falls das Plasma in einem frühen Krankheitsstadium verabreicht wurde (151). Die schützende Wirkung von neutralisierenden Antikörpern gegen das SARS-CoV konnte auch an Mäusen gezeigt werden (48).

Die hier aufgeführten Therapiemöglichkeiten sind vielversprechend, sie können jedoch teilweise zum Beispiel schon durch Punktmutationen des Virus umgangen werden. Eine Therapie sollte sich deshalb nicht auf nur eine der aufgeführten Therapiemöglichkeiten stützen, sondern breit angelegt werden (137,138).



### 1.3 Der Calcineurin / NFAT-Signalweg

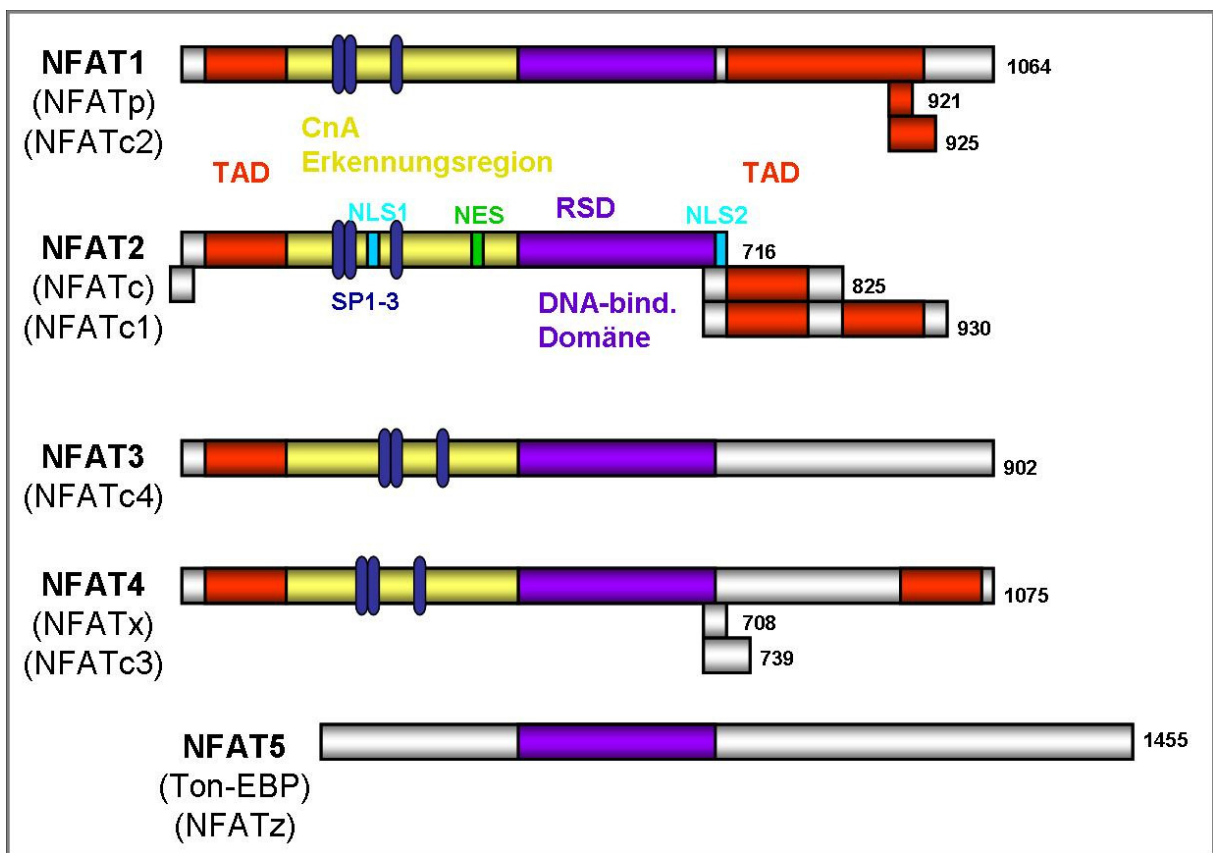
Die Anwesenheit von Zytokinen im Blut ist eine der ersten Indikationen einer Infektion und zeigt eine erste Reaktion des Immunsystems an. Die virale Invasion löst in infizierten Zellen verschiedene Signalkaskaden aus, welche dann die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, Interferonen sowie Chemokinen zur Folge haben. Die Zytokinausschüttung einzelner infizierter Zellen aktiviert umfassendere Reaktionen des angeborenen Immunsystems. Hierzu gehören unter anderem die Aktivierung von dendritischen Zellen, Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophilen und/oder Granulozyten sowie die Komplement-Aktivierung. Die Produktion inflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6 oder Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) lösen eine lokale Entzündungsreaktion aus, die zur weiteren Anlockung zirkulierender Lymphozyten und somit zur Einbindung der adaptiven Immunantwort führt. Eine zelluläre Immunantwort gegen Viren beinhaltet meist die Interferon- $\gamma$  Sekretion von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen um einen antiviralen Status zu induzieren. Zytotoxische T-Zellen zerstören zusätzlich Virus-infizierte Zellen, ebenso wie NK-Zellen und Makrophagen, entweder direkt oder durch eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität. Die humorale Immunantwort versucht über Antikörper eine Virus-Wirts-Bindung und -Fusion zu verhindern sowie eine Agglutination der Virionen und die Opsonisierung bzw. Lyse der Viren durch das Komplement-System zu aktivieren (38).

Proteine der NFAT (*nuclear factor of activated T cells*)-Familie sind Transkriptionsfaktoren, die mittels induzierbarer Gen-Transkription eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort spielen. Die NFAT-Proteine sind die Zielproteine einer der vielen Signalkaskaden, die die Ausschüttung der inflammatorischen Zytokine als zelluläre Antwort auf eine Infektion nach sich ziehen (113).

#### 1.3.1 Proteine der NFAT-Familie

NFAT-Proteine werden, entgegen ihres Namens, nicht nur in T-Zellen, sondern auch in B-Zellen, Mastzellen, Basophilen und NK-Zellen exprimiert. NFATs wurden zunächst als mutmaßliche Transkriptionsfaktoren, die an den humanen IL-2 Promotor binden, in Kernproteinextrakten aktivierter Jurkat T-Zellen beschrieben (126). Inzwischen wurde jedoch eine Schlüsselrolle der NFAT-Proteine bei der Zellaktivierung in verschiedenen Geweben und Zelltypen nachgewiesen (117,124). Die NFAT-Familie beinhaltet fünf Mitglieder: NFAT1 (NFATc2, NFATp), NFAT2 (NFATc1, NFATc), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3, NFATx) und das untypische NFAT5 (NFATz, Ton-EBP). Zusätzlich gibt es von NFAT1, NFAT2 und NFAT4 noch mehrere Isoformen, die durch alternatives Spleißen zustande kommen. Die diverse Nomenklatur der verschiedenen NFAT-Mitglieder entstand durch die Isolation der einzelnen Proteine in verschiedenen Labors und vielen Isoformen. NFAT1, NFAT2 und NFAT4 werden hauptsächlich in Immunzellen und peripheren Lymphorganen (z.B.: Milz)

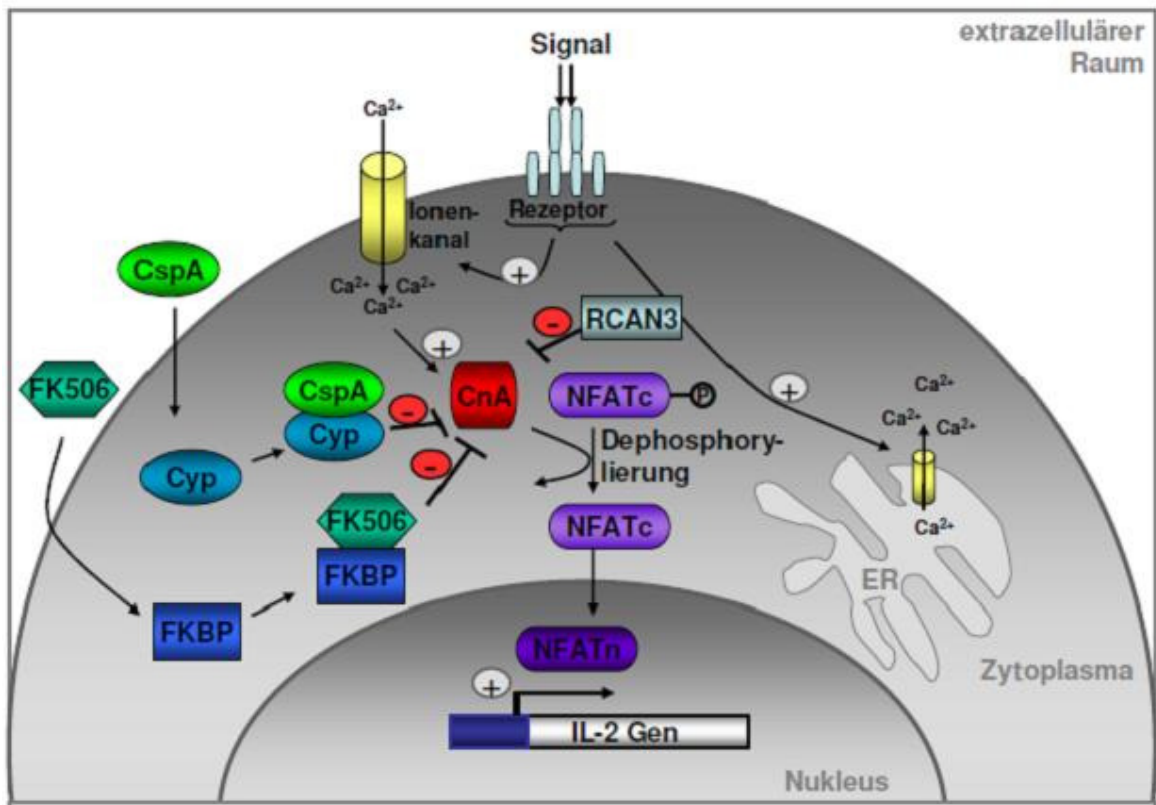
exprimiert. NFAT3 hingegen wird nur in geringeren Mengen in lymphatischen Geweben exprimiert, stattdessen eher in Zellen von Lunge, Niere oder dem Herzen (88,113). Die Proteine der NFAT-Familie besitzen eine hochkonservierte ca. 300 Aminosäuren lange DNA-bindende Domäne, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur DNA-bindenden Domäne der Rel/NFκB-Transkriptionsfaktoren auch als Rel-ähnliche Domäne (RSD) bezeichnet wird (64). Zwischen den vier typischen NFAT Mitgliedern 1 bis 4 zeigt die RSD eine 70% Homologie, zu NFAT5 jedoch nur eine 40%. Die sogenannte *NFAT homology region* (NHR) kommt ebenfalls in den Isoformen NFAT1 bis 4 vor. In diesem Bereich befindet sich eine für die Aktivierung des NFAT-Signalwegs essentielle Calcineurin-Erkennungsregion. NFAT5 ist ein untypischer Vertreter der NFAT-Familie, da es diese Calcineurin-Erkennungsregion nicht besitzt und somit über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade nicht regulierbar ist. NFAT5 liegt stattdessen konstitutiv aktiv im Zellkern fast aller Zellen des Körpers vor (88). Die Calcineurin-Erkennungsregion kann durch aktiviertes Calcineurin an Serin/Threonin-Phosphorylierungsmotiven dephosphoryliert werden, wodurch Signalsequenzen für den Transport der NFAT-Proteine in den Zellkern (NLS) freierwerden (125). Folgende Abbildung zeigt eine Übersicht über die fünf verschiedenen Mitglieder der NFAT-Familie, deren schematischen Aufbau, sowie die Nomenklatur.



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der NFAT-Proteine.** Modifiziert nach (125)  
 Am N- und C-Terminus befindet sich eine transaktivierende Domäne (TAD, rot). Die Calcineurin (CnA)-Erkennungsregion (gelb) beinhaltet die Phosphorylierungsmotive (SP 1-3) sowie das Kernlokalisationsignal (NLS) und das Kernexportsignal (NES). Direkt hinter der Calcineurin-Erkennungsregion befindet sich die *Rel-similarity-domain* (RSD), die DNA-bindende Domäne.

### 1.3.2 Die Calcineurin / NFAT - Signaltransduktionskaskade

NFAT-Proteine werden durch die Stimulation verschiedener Rezeptoren, wie T- und B-Zellrezeptor, Fcε-Rezeptor von Mastzellen und Basophilen oder Fcγ-Rezeptor der NK-Zellen aber auch Histamin- und Thrombinrezeptor auf Epithelzellen aktiviert. Die Aktivierung gliedert sich dabei in drei Ereignisse: Dephosphorylierung des NFAT-Proteins, Translokation in den Kern und Anstieg der Binde-Affinität zur DNA. In ruhenden Zellen liegt NFAT phosphoryliert im Zytoplasma vor und weist eine niedrige Affinität zu DNA auf. Eine Stimulierung der oben aufgezählten Rezeptoren aktiviert die Phospholipase C-γ (PLC-γ), die dann das Signal weiterleitet und verstärkt. Die aktivierte PLC-γ spaltet mehrere Phosphatidylinositibisphosphate (PIP<sub>2</sub>) in Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>). Die Wechselwirkung von IP<sub>3</sub> mit Rezeptoren am Endoplasmatischen Retikulum (ER) führt zur Ausschüttung der intrazellulären Kalziumspeicher und somit zu einem mehrfachen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels. Nach Leerung der intrazellulären Kalziumspeicher werden zusätzlich Kalziumkanäle in der Zytoplasmamembran geöffnet um den erhöhten Kalziumspiegel aufrecht zuerhalten. Das Kalzium-abhängige Enzym Calmodulin bindet an freies Kalzium und aktiviert dann Calcineurin, eine Serin/Threonin-Proteinphosphatase (84,120). Das aktivierte Calcineurin ist dann in der Lage das phosphorylierte NFAT im Zytoplasma zu dephosphorylieren. Durch diese Dephosphorylierung wird das Kern-Lokalisationssignal freigesetzt und NFAT wird in den Kern transloziert. Durch die Dephosphorylierung erhöht sich gleichzeitig die Affinität von NFAT zur DNA. Im Zellkern bindet NFAT an DNA-Erkennungssequenzen in der regulatorischen Promoterregion und induziert somit die Transkription verschiedener Gene (8,72,113,152). Folgende Abbildung stellt die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade schematisch dar.



**Abb. 1.5: Schematischer Überblick über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade.** Modifiziert nach (67)  
 Die initiale Rezeptorstimulation führt zu einem Kalziuminflux in das Zytoplasma. Das Kalzium bindet an Calmodulin und aktiviert dann die Phosphatase Calcineurin (CnA). Calcineurin wiederum dephosphoryliert dann NFAT, welches im phosphorylierten Zustand im Zytosol (NFATc) lokalisiert. Durch die Dephosphorylierung wird das Kern-Lokalisationssignal freigesetzt und NFAT wird in den Kern (NFATn) transloziert, wo es die Transkription verschiedener Gene, z.B.: IL-2, induziert.  
 Das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CspA) bindet an zelluläre Cyclophiline (Cyp) und inhibiert die Phosphatase CnA, wodurch die Expression NFAT-regulierter Gene gehemmt wird. FK506 bindet an zelluläre FK506-Bindeproteine (FKBP) und inhibiert ebenfalls die Aktivität des CnA und somit die Expression NFAT-regulierter Gene.

Im Gegensatz zu vielen anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NFκB liegt NFAT stets als Monomer vor. Die hochaffinen DNA-Bindestellen liegen entweder allein oder als sogenannte *composite*-Bindestellen vor, an die NFAT nur komplexiert mit AP-1 (Fos-Jun)-Proteinen binden kann. Die Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie werden durch einen Kalzium-unabhängigen Signalweg über DAG, die PLC-γ und verschiedene mitogenaktivierende Proteinkinasen (MAP-Kinasen) als Folge einer T-Zellrezeptorstimulation aktiviert (8,16,92).

Die anschließende Tabelle zeigt eine Übersicht der über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade induzierbaren Gene.

**Tab. 1.4: Überblick der über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade regulierten Gene.**

Modifiziert nach (113)

	<b>Getestete Zellen</b>	<b>Inhibition durch CyclosporinA oder FK506</b>
<i>Zytokine</i>		
IL-1 $\beta$	Makrophagen, Mastzellen (Fc $\epsilon$ RI)	Partielle Inhibition
IL-2	T-Zellen	Inhibition
IL-3	T-Zellen	Inhibition
	Eosinophile, Neutrophile	Inhibition
IL-4	T-Zellen, Mastzellen	Inhibition
IL-5	T-Zellen	Inhibition
	Mastzellen	Inhibition
IL-6	Mastzellen	Inhibition
IL-8	T-Zellen	Inhibition
IL-10	T-Zellen, Milzzellen	Partielle Inhibition
IL-13	T-Zellen	Inhibition
GM-CSF	T-Zellen, NK-Zellen, Eosinophile, Neutrophile	Inhibition
	Endothelzellen	Partielle Inhibition
INF- $\gamma$	T-Zellen	Inhibition
TGF- $\beta$	T-Zellen	Stimulation
TNF- $\alpha$	T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen	Inhibition
	Makrophagen	Partielle Inhibition
<i>Surfactant Proteine</i>		
CD40-L	T-Zellen	Inhibition
IL-2R $\alpha$ (CD25)	T-Zellen	Inhibition
CD69	T-Zellen	Partielle Inhibition
CTLA-4	Milzzellen	Nicht bekannt
FasL	Milzzellen	Nicht bekannt

### 1.3.3 Inhibitoren des Calcineurin/NFAT-Signalwegs

Der Aktivierungsprozess der NFAT-Proteine basiert auf einem mehrstufigen Signaltransduktionsweg. Dies hat zur Folge, dass jeder einzelne Schritt der Signalkaskade einen potentiellen Angriffspunkt zur Suppression der NFAT-Funktion darstellt. Die wirkungsvollsten und bekanntesten Inhibitoren des Calcineurin/NFAT-Signalwegs sind das zyklische Peptid Cyclosporin A (CspA), aus den Schlauchpilzen *Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum* isoliert und das Makrolid Tacrolimus FK506, aus dem Bakterium *Streptomyces tsukubaensis* (83,147). Beides sind bekannte Immunsuppressiva, die heute, trotz ihrer hohen Toxizität und der daraus resultierenden starken Nebenwirkungen, vor allem

in der Organtransplantation sehr erfolgreich eingesetzt werden. CspA und FK506 unterscheiden sich sehr in ihrem strukturellen Aufbau, der Wirkmechanismus ist jedoch der gleiche. Beide Proteine binden an intrazelluläre Rezeptoren, sogenannte Immunophiline und sind dann im gebundenen Komplex in der Lage die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin zu unterbinden (67). Da die Dephosphorylierung von zytoplasmatisch lokalisiertem NFAT durch Calcineurin für die Translokation von NFAT in den Kern unabdingbar ist, wird somit die Expression NFAT-regulierter Gene gehemmt. Wie Abbildung 1.5 zeigt, bindet CspA im Zytoplasma an sogenannte Cyclophiline und FK506 an sogenannte FK506-Bindeproteine (31,82). Die Proteinsuperfamilie der Immunophiline, also der Cyclophiline (Cyp) und FK506-Bindeproteine (FKBP), sind zelluläre Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen), die die cis/trans-Isomerisierung von Peptidbindungen an Prolinresten katalysieren. Neben dieser Aufgabe sind PPIasen an weiteren Prozessen, wie beispielsweise der Proteinfaltung, dem Proteintransport oder auch dem Proteinaufbau, beteiligt. Neben Cyclophilin A (CypA), dem Hauptvertreter der Cyclophiline, der auch die Inhibition durch CsA vermittelt, gibt es noch weitere Vertreter, wie zum Beispiel Cyclophilin B (CypB), Cyclophilin G (CypG) oder Cyclophilin H (CypH). Die Hauptvertreter der FK506-Bindeproteine sind FKBP1A (FKBP12) bzw. FKBP1B (FKBP12.6), die sich bis auf wenige Aminosäuren kaum unterscheiden (55,67,98). Neben den beiden Calcineurin-Inhibitoren CsA und FK506 gibt es auch endogene Proteine, die die Calcineurin-Aktivität unterbinden können, sogenannte Calcipressine. Hauptvertreter der Calcipressin-Proteinfamilie ist RCAN1 (DSCR1 oder MCIP1), RCAN2 (DSCR111 oder MCIP2) und RCAN3 (DSCR112) (27). Die Expression von RCAN-Proteinen unterliegt der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade. Neu synthetisiertes RCAN bindet jedoch direkt an die katalytische Domäne von Calcineurin und hemmt somit dessen Phosphatase-Aktivität, so dass sich ein sogenannter *negativer feedback loop* bildet (27,56,118).

Da die über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade regulierten Gene eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielen, ist auch die Inhibition des Signalweges ein wichtiger Angriffspunkt zur Unterbindung der Immunantwort. Die Unterbindung der Immunantwort wird zum einen von Pathogenen genutzt, zum anderen jedoch auch als Möglichkeit der medikamentösen Immunsupprimierung, die beispielsweise für Transplantationen vonnöten ist.

### 1.3.4 Das antivirale Potential von Cyclosporin A

Das Immunsuppressivum CspA besitzt interessanterweise neben seiner immunsuppressiven Wirkung zusätzlich ein antivirales Potential. Das erworbene Immundefizienzsyndrom (*acquired immunodeficiency syndrome*) AIDS wird von zwei verschiedenen humanen Immundefizienz-Viren-1 und -2 (HIV-1, HIV-2) ausgelöst. Beide infizieren hauptsächlich

CD4-positive T-Zellen und Makrophagen, wobei hierdurch die virale Replikation zur Zerstörung des Immunsystems führt. Die Replikation von HIV-1 kann durch die kombinierte Verabreichung antiviraler Medikamente (HAART = *highly active antiretroviral therapy*) drastisch reduziert werden, wobei die Behandlungen noch nicht zur endgültigen Beseitigung des Virus ausreicht. Vor einigen Jahren konnten Karpas *et al.* (69) zeigen, dass die virale Replikation von HIV-1 durch die Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 gehemmt werden kann. Innerhalb eines Screening-Programms zur Identifikation inhibitorischer Komponenten gegen HIV-1 wurden CspA und FK506 getestet und als hemmend identifiziert. Über den genauen Wirkmechanismus war zunächst nichts bekannt (69). Der inhibitorische Effekt von CspA auf die HIV-1 Replikation liegt an der Bindung des HIV-1 Gag-Proteins an CypA (89). Weitere Untersuchungen zeigten, die Inkorporation von CypA in infektiöse HIV-1 Partikel. CspA ist in der Lage die Bindung zwischen HIV-1 Gag und CypA und somit auch die Inkorporation des CypA in HIV-1 Partikel zu stören. Die fehlende Inkorporation des CypA führt dann zu einer Hemmung der HIV-1 Infektiosität (40,89,135,136).

Ein weiteres Beispiel für das antivirale Potential von CspA ist das Hepatitis-C-Virus (HCV). Eine persistierende HCV-Infektion, von der 170 Millionen Menschen weltweit betroffen sind, ist die Hauptursache verschiedener Leberkrankheiten, wie der chronischen Hepatitis, Leberzirrhose oder des Leberzellkarzinoms. Momentan ist keine Impfung gegen HCV erhältlich und die Standardtherapie mit Interferon- $\alpha$  plus Ribavirin ist nur bei 50-60 % der Patienten erfolgreich und mit einer schweren Unverträglichkeit und teilweise gravierenden Nebenwirkungen (z.B.: hämolytische Anämie) behaftet (74,95). Auch für HCV konnte eine Sensitivität gegen CspA gezeigt werden. Zellkulturversuche zeigten, dass eine Behandlung infizierter Zellen mit 1  $\mu\text{g/ml}$  CspA über eine Woche die virale Replikation auf nicht detektierbare Mengen reduzierte (148). Die notwendige Dosis zur Hemmung der viralen Replikation liegt im therapeutisch möglichen Bereich. Somit scheint CspA, ein eigentlich immunsuppressives Medikament, die Therapie und Prognose von HCV-Patienten, vor allem derer, die Transplantate erhielten, deutlich zu verbessern. Der CspA Sensitivität von HCV liegt eine Blockade der Cyclophilin-Aktivität zugrunde (45,94,95,148).

## **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Eine fundamentale Eigenschaft von Viren ist ihre obligate Replikation in lebenden Wirtszellen. Das äußerst kompakte virale Genom kodiert nicht alle notwendigen Proteine, die für einen kompletten Infektionszyklus benötigt werden. Aus diesem Grund sind Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem Virus und der Wirtszelle von elementarer Bedeutung für das Virus und für unser Verständnis der viralen Replikation und Pathogenese.

Im Vorfeld dieser Doktorarbeit wurde ein automatisierter, genomweiter Hefe-Zwei-Hybrid-Screen zwischen allen 28 Proteinen des SARS-CoV und den Genprodukten von drei humanen cDNA-Banken durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die neu identifizierten Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem SARS-CoV und der humanen Wirtszelle durch eine zweite Methode, dem modifizierten LUMIER Bindungs-Assay, bestätigt werden. Neu identifizierte Protein-Protein-Interaktionen sollen anschließend funktionell charakterisiert werden, um neue Angriffspunkte für die antivirale Therapie einer SARS-CoV Infektion zu finden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zum einen zur Aufklärung der Interaktionen zwischen dem SARS-CoV und der infizierten Wirtszelle beitragen und zum anderen neue Determinanten der Pathogenese im Menschen identifizieren, welche die Entwicklung von Hemmstoffen der Virusreplikation ermöglichen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Laborgeräte

ABI Prism 7000	Applied Biosystems, Foster City, USA
Dampfsterilisator, LTA 1x2x3	Zirbus Technology, Bad Grund/Harz, Deutschland
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filmentwickler Optimax	TR MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
Geldokumentationssystem, Eagle Eye & RH2	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Kammern für Agarosegelelektrophorese	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Kühlzentrifuge 6K15	Sigma, München, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
Multi-Plattenlesegerät Fluostar	BMG-Labtech, Offenburg, Deutschland
Nasstransfersystem, Protean II	Biorad, Mannheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda, Deutschland
PCR Thermocycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
pH Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe, Accu-Jet	Pro Brand, Wertheim, Deutschland
Pipette, Pipetman 10, 20, 200, 1000µl	Gilson, Middleton, USA
Polyacrylamidgelelektrophorese System, Protean II	Biorad, Mannheim, Deutschland
Spannungsquelle für die Elektrophorese	Biorad, Mannheim, Deutschland
Spektrophotometer	Biochrom, Berlin, Deutschland
Sterilbank	BDK, Genkingen, Deutschland
UV-Transilluminator	LKB, Freiburg, Deutschland
UV-VIS Photometer, Nanodrop ND-1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Vortex Mixer	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Wasserbad	Julabo, Selbach, Deutschland
Zellkulturinkubatoren	Forma Scientific, Inc., Marietta, Ohio, USA
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

#### 2.1.2 Chemikalien

Nachfolgend aufgelistete Chemikalien wurden für diese Arbeit verwendet:

Accutase	PAA the cell culture company, Pasching, Österreich
Agarose für Elektrophorese	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

## *Material und Methoden*

Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Avicel RC-581	FMC Biopolymers, Brüssel, Belgien
Bacto Agar	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Trypton	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Yeast Extract	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland
Benzonase	Novagen/Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R-250	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dodecylsulfat Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure, Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, absolute (EtOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromidlösung (10mg/ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum	PAA the cell culture company, Pasching, Österreich
Formaldehyd (37%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gentamicin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Immunoselect Antifading Mounting Medium	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ionomycin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin Sulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin Lösung (200mM)	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N,,N,-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Acetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Chlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Pyruvat	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA, 100x)	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Oligo(dt) 15 Primer	Promega, Madison, USA
Penicillin-Streptomycin Lösung (100x)	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich, München, Deutschland

Protease Inhibitor, Complete, Mini, EDTA-frei	Roche, Mannheim, Deutschland
Rotiphoresegel 30 (37,5:1) Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spectinomycin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Tris-HCL	Roth Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tryptanblau, Färbelösung 0,4%	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin-EDTA (10x)	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Universal Probe Library	TaqMan Sonden, Roche, Mannheim, Deutschland
Zellkulturmedium D-MEM	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturmedium Opti-MEM®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturmedium RPMI1640	Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Alle hier nicht aufgeführten Materialien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), BioRad (München), Biozym Diagnostics GmbH (Hess. Oldendorf), Boehringer (Mannheim), DIFCO (Detroit/USA), Diagonal (Münster), Eppendorf (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), E. Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) mit dem Reinheitsgrad 'pro analysis' bezogen.

### **2.1.3 Verbrauchsmaterialien**

Cronex5 Medical-X-Ray Film	AGFA, Düsseldorf, Deutschland
Cryo-Röhrchen	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Falcon Röhrchen	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Glaswaren (Flaschen, Kolben u.s.w.)	Duran, Schott, Mainz, Deutschland
IgG-gekoppelte magnetische Kügelchen, Schaf-anti-Kaninchen ( <i>magnetic beads</i> )	Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulose	Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Pierce-Zentrifugenröhrchen	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Pipettenspitzen	Fa. Peske GmbH & Co.KG, Aindlingen, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röntgenfilm SuperRX	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterilfiler 0,22 und 0,45 µm	Millipore, Billerica, USA

Zellkulturschalen- / flaschen

Nunc, Langensfeld, Deutschland

## 2.1.4 Enzyme und Größenstandards

Antarctic Phosphatase	New England Biolabs (NEB), Beverly, USA
Benchmark Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
BP-Clonase Mix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Crimson LongAmp™ Taq DNA-Polymerase	NEB, Beverly, USA
DNAseI	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim, Deutschland
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
GoTaq Flexi DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
LR-Clonase Mix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	NEB, Beverly, USA
SuperScriptIII reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SuperScript™II One-Step RT-PCR with Platinum® Taq	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
T4 DNA Ligase	NEB, Beverly, USA

## 2.1.5 Antikörper

**Tab. 2.1: Primär-Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Spezifität	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
α-CypA	Kaninchen	polyclonal	1: 2000 (WB)	Enzo Life Sciences
α-CypB	Kaninchen	polyklonal	1: 1000 (WB)	Abcam
α-LaminB	Ziege	polyklonal	1: 400 (WB)	Santa Cruz Biotechnology

**Tab. 2.2: Sekundär-Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
α-Kaninchen-Ig-HRP	Ziege	1: 3000 (WB)	Dianova
α-Ziege-Ig-HRP	Kaninchen	1: 3000 (WB)	Dianova

## 2.1.6 Fertigsätze (Kits)

Amaya®Nucleofector®-Kit	Lonza, Köln, Deutschland
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Madison, USA
ECL western blotting detection system	Amersham, Freiburg, Deutschland
FuGene HD	Roche, Mannheim, Deutschland

Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine LTX	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Nucleobond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
<i>Renilla</i> Luciferase Assay System	Promega, Madison, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen MinElute PCR purification kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAamp® Viral RNA Mini	Qiagen, Hilden, Deutschland

## 2.1.7 Zelllinien

**Tab. 2.3: Verwendete Zelllinien**

<b>Name</b>	<b>Gewebe</b>	<b>Herkunft</b>
HEK 293	Humane Embryonale Nierenzellen	ATCC (CRL-1573)
Jurkat	Humane T-Zellen	R. Haas, München
Huh7 wt	Humanes Hepatokarzinom Zellen	R. Bartenschlager, Heidelberg
Huh7 unrelated sh control	Humanes Hepatokarzinom Zellen	R. Bartenschlager, Heidelberg
Huh7 delta CypA	Humanes Hepatokarzinom Zellen	R. Bartenschlager, Heidelberg
Huh7 delta CypB	Humanes Hepatokarzinom Zellen	R. Bartenschlager, Heidelberg
CaCo-2 wt	Humane Kolonkarzinom Zellen	C. Drosten, Bonn
CaCo-2 unrelated sh control	Humane Kolonkarzinom Zellen	Sirion, München
CaCo-2 delta CypA	Humane Kolonkarzinom Zellen	Sirion, München
CaCo-2 delta CypB	Humane Kolonkarzinom Zellen	Sirion, München
CaCo-2 delta FKBP1A	Humane Kolonkarzinom Zellen	Sirion, München
Vero E6	Affennierenzellen/Fibroblasten	C. Drosten, Bonn
St - Zellen	Schweinehodenzellen	G. Herrler, Hannover
Fcwf - Zellen	Katzenzelllinie	H.-J. Thiel, Giessen
HRT18	Humane Rektumkarzinom Zellen	H.-J. Thiel, Giessen

## 2.1.8 Viren

Alle Arbeiten mit infektiösem Material wurden entsprechend der Richtlinien des Gentechnik und Infektionsschutzgesetzes durchgeführt. Die sicherheitstechnischen Einrichtungen im Max von Pettenkofer-Institut in München erlauben Experimente mit Viren bis Risikogruppe 2, hierzu gehören HCoV-NL63 und HCoV-229E. Versuche mit weiteren Erregern (siehe Tab. 2.5) wurden in folgenden Einrichtungen durchgeführt:

Tab. 2.4: Übersicht der Erreger und Einrichtungen

Erreger	Einrichtung	Arbeitsgruppen des BMBF-Zoonose Verbunds
SARS-CoV FFM1	Bernhard-Nocht Institut, Hamburg	AG C. Drosten
SARS-CoV HK	Universitätsklinikum, Bonn	AG C. Drosten
FCoV	Justus-Liebig Universität, Gießen	AG H.-J. Thiel
TGEV PUR46	Tiermedizinische Hochschule, Hannover	AG G. Herrler
IBV Bd	Tiermedizinische Hochschule, Hannover	AG G. Herrler
HIV-1	Medizinische Hochschule, Hannover	AG S. Pöhlmann
EMCV	Universitätsklinikum, Freiburg	AG F. Weber

Tab. 2.5: Verwendete Viren

Familie/Genus	Virusspezies/Stamm	Charakteristika/Referenz
<i>Coronaviridae</i>		
Coronavirus	SARS-CoV FFM1	Wildtyp-Stamm des SARS-CoV Isolat "Frankfurt 1"
	SARS-CoV HK	Wildtyp-Stamm des SARS-CoV Isolat "Hongkong"
Coronavirus	HCoV-NL63	Wildtyp-Stamm von HCoV-NL63
Coronavirus	HCoV-229E	Wildtyp-Stamm des HCoV-229E
	HCoV-229E-luc	Orf4 ersetzt durch <i>Renilla</i> Luziferase
	HCoV-229E-GFP	Orf4 ersetzt durch GFP
alle drei von V. Thiel, Kantonsspital St.-Gallen		
Coronavirus	FCoV	FCoV Serotyp1
Coronavirus	TGEV PUR46	Wildtyp-Isolat der Purdue Universität Indiana 1946
Coronavirus	IBV Beaudette (Bd)	Apathogener IBV-Stamm
<i>Retroviridae</i>		
Lentivirus	HIV-1 NL4-3	T-Zell adaptierter Laborstamm NL4-3
<i>Picornaviridae</i>		
Cardiovirus	EMCV	Wildtyp-Stamm

## 2.1.9 Bakterienstämme

Tab. 2.6: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Firma
DB3.1 <sup>TM</sup>	F- <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ- leu mt1</i>	Invitroge, Karlsruhe, Deutschland
DH5α	F- Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland

## 2.1.10 Plasmide

Tab. 2.7: Vorhandene Plasmide

Name	Charakteristika/Verwendungszweck	Quelle/Referenz
pDONR207	Gent <sup>R</sup> , pEntry - Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
pTREX	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor mit N-terminalem ProteinA-Tag zur Verwendung im modifiziertem LUMIER Assay	M.Kögl, Heidelberg
pcDNA3+Rluc	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor mit N-terminaler <i>Renilla</i> Luciferase zur Verwendung im modifiziertem LUMIER Assay	M.Kögl, Heidelberg
pCR3-N-Ha	Amp <sup>R</sup> , pDEST-Vektor, Eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor)	A.Baiker, München
pCR3-C-Ha	Amp <sup>R</sup> , pDEST-Vektor, Eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor)	A.Baiker, München
pCR3-N-c-myc	Amp <sup>R</sup> , pDEST-Vektor, Eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor)	A.Baiker, München
pCR3-C-c-myc	Amp <sup>R</sup> , pDEST-Vektor, Eukaryotischer Expressionsvektor (CMV-Promotor)	A.Baiker, München
pDONR207 Nsp1	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp1(AS 1-180)	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp1-N	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA SARS-CoV Nsp1-N (AS 1-93)	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp1-C	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA SARS-CoV Nsp1-C (AS 119-180)	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp2	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp2	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp3-N	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp3-N	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp4	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp4	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp5	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp5	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp6	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp6	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp7	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp7	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp8	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp8	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp9	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp9	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp12	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp12	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp13	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp13	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp14	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp14	A. von Brunn, München
pDONR207 Nsp15	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Nsp15	A. von Brunn, München
pDONR207 Orf 3	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Orf 3	A. von Brunn, München
pDONR207 Orf 4	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Orf 4	A. von Brunn, München
pDONR207 Orf 7	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Orf 7	A. von Brunn, München
pDONR207 Orf 8	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Orf 8	A. von Brunn, München
pDONR207 Orf 9	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Orf 9	A. von Brunn, München
pDONR207 Orf 10	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Orf 10	A. von Brunn, München
pDONR207 Orf 13	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Orf 13	A. von Brunn, München
pDONR207 Orf 14	Gent <sup>R</sup> , enthält die cDNA des SARS-CoV Orf 14	A. von Brunn, München
pDONR223 ALB	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für ALB	MGC - collection
pDONR223 ARL4D	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für ARL4D	MGC - collection
pDONR223 Bap1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für Bap1	MGC - collection
pDONR223 Bat3	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für Bat3	MGC - collection
pDONR223 BRF1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für BRF1	MGC - collection
pDONR223 BZW2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für BZW2	MGC - collection

pDONR223 C1orf 63	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für C1orf 63	MGC - collection
pDONR223 C1 orf 142	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für C1 orf 142	MGC - collection
pDONR223 C7 orf 36	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für C7 orf 36	MGC - collection
pDONR223 C20 orf 27	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für C2 orf 27	MGC - collection
pDONR223 Chek2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für Chek2	MGC - collection
pDONR223 CHMP2B	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für CHMP2B	MGC - collection
pDONR223 DCTN2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für DCTN2	MGC - collection
pDONR223 DDAH2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für DDAH2	MGC - collection
pDONR223 DEDD2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für DEDD2	MGC - collection
pDONR223 EIF4B	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für EIF4B	MGC - collection
pDONR223 Eno1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für Eno1	MGC - collection
pDONR223 FAHD1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für FAHD1	MGC - collection
pDONR223 FAM108A1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für FAM108A1	MGC - collection
pDONR223 FKBP1A	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für FKBP1A	MGC - collection
pDONR223 GPRASP2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für GPRASP2	MGC - collection
pDONR223 H2AFY2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für H2AFY2	MGC - collection
pDONR223 HGS	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für HGS	MGC - collection
pDONR223 HoxC6	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für HoxC6	MGC - collection
pDONR223 ISLR	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für ISLR	MGC - collection
pDONR223 LAS1L	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für LAS1L	MGC - collection
pDONR223 LCP1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für LCP1	MGC - collection
pDONR223 Mark2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für Mark2	MGC - collection
pDONR223 Mark3	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für Mark3	MGC - collection
pDONR223 MGC 4172	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für 4172	MGC - collection
pDONR223 MIF4GD	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für MIF4GD	MGC - collection
pDONR223 MKRN2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für MKRN2	MGC - collection
pDONR223 MKRN3	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für MKRN3	MGC - collection
pDONR223 MNAT1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für MNAT1	MGC - collection
pDONR223 N4BP2L2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für N4BP2L2	MGC - collection
pDONR223 NAE1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für NAE1	MGC - collection
pDONR223 NCOA5	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für NCOA5	MGC - collection
pDONR223 NDUFA10	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für NDUFA10	MGC - collection
pDONR223 NMB	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für NMB	MGC - collection
pDONR223 Nomo3	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für Nomo3	MGC - collection
pDONR223 NPHP3	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für NPHP3	MGC - collection
pDONR223 OCIAD2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für OCIAD2	MGC - collection
pDONR223 PEX10	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für PEX10	MGC - collection
pDONR223 PFDN5	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für PFDN5	MGC - collection
pDONR223 PLEKHO1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für PLEKHO1	MGC - collection
pDONR223 CypA	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für CYPA	MGC - collection
pDONR223 CypG	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für CYPG	MGC - collection
pDONR223 CypH	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für CYPH	MGC - collection
pDONR223 PSMA2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für PSMA2	MGC - collection
pDONR223 RCAN3	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für RCAN3	MGC - collection
pDONR223 RNF128	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für RNF128	MGC - collection
pDONR223 RPS17	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für RPS17	MGC - collection



pDONR223 RPS20	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für RPS20	MGC - collection
pDONR223 RYBP	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für RYBP	MGC - collection
pDONR223 SERPING1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für SERPING1	MGC - collection
pDONR223 SLC46A3	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für SLC46A3	MGC - collection
pDONR223 SMOC1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für SMOC1	MGC - collection
pDONR223 TBCB	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für TBCB	MGC - collection
pDONR223 TERF1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für TERF1	MGC - collection
pDONR223 TPSAB1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für TPSAB1	MGC - collection
pDONR223 TPSB2	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für TPSB2	MGC - collection
pDONR223 VKORC1	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für VKORC1	MGC - collection
pDONR223 XPA	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für XPA	MGC - collection
pDONR223 YWHAE	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für YWHAE	MGC - collection
pDONR223 ZNF410	Spec <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für ZNF410	MGC - collection
pOTB7 POLR2B	Cham <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für POLR2B	imaGenes, Berlin
pOTB7 HCR	Cham <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für HCR	imaGenes, Berlin
pENTR221 CAMLG	Kan <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für CAMLG	imaGenes, Berlin
pBSKseq2T RCAN1	Amp <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für RCAN1	Stratagene, Santa Clara USA
pGEX-CypB	Amp <sup>R</sup> , enthält die humane cDNA für CypB	R. Bartenschlager, Heidelberg
pLNCX2 NFAT1-GFP	Eukaryotischer Expressionsvektor (CMV Promotor)	V. Heissmeyer, München
pHTS-NFAT	Amp <sup>R</sup> , Reporterplasmid: enthält die Firefly-Luziferase unter der Kontrolle eines 4x NFAT Enhancer Element	Biomyx, San Diego USA
pIL2wt-Luc	Amp <sup>R</sup> , Reporterplasmid: enthält die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle einer 4x NFAT Bindestelle des IL-2 Promotors	E. Serfling, Würzburg
pIL4-TATA-Luc	Amp <sup>R</sup> , Reporterplasmid: enthält die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des IL-4 Promotors mit TATA-Element	E. Serfling, Würzburg
pIL8wt-Luc	Amp <sup>R</sup> , Reporterplasmid: enthält die Firefly-Luciferase unter der Kontrolle des IL-8 Promotors	E. Serfling, Würzburg
pRL-Null	Amp <sup>R</sup> , Reporterplasmid: kodiert eine konstitutiv aktive <i>Renilla Reniformis</i> -Luziferase	Promega, Madison USA
pRSV-NFAT1	Kan <sup>R</sup> , Eukaryotischer Expressionsvektor (SV 40 Promotor)	E. Serfling, Würzburg
pCA-NFAT2	Amp <sup>R</sup> , Eukaryotischer Expressionsvektor (CMV Promotor)	E. Serfling, Würzburg
pRSV-NFAT3	Amp <sup>R</sup> , Eukaryotischer Expressionsvektor (SV 40 Promotor)	M.Kögl, Heidelberg
pCDNA3.1Flag CnA	Amp <sup>R</sup> , Eukaryotischer Expressionsvektor (SV 40 Promotor)	M. Kögl, Heidelberg

**Tab. 2.8: In dieser Arbeit neu konstruierte Plasmide**

Name	Charakteristika/Verwendungszweck
pDONR207 POLR2B	Gent <sup>R</sup> / pENTRY-Vektor
pDONR207 HCR	Gent <sup>R</sup> / pENTRY-Vektor
pDONR07 CypB	Gent <sup>R</sup> / pENTRY-Vektor
pDONR207 Nsp1MHV	Gent <sup>R</sup> / pENTRY-Vektor
pDONR207 Nsp1 HCoV-NL63	Gent <sup>R</sup> / pENTRY-Vektor



pTREX FKBP1A / pCDNA3+Rluc FKBP1A	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX GPRASP2 / pCDNA3+Rluc GPRASP2	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX H2AFY2 / pCDNA3+Rluc H2AFY2	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX HoxC6 / pCDNA3+Rluc HGS	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX HoxC6 / pCDNA3+Rluc HoxC6	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX ISLR / pCDNA3+Rluc ISLR	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX LAS1L / pCDNA3+Rluc LAS1L	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX LCP1 / pCDNA3+Rluc LCP1	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX Mark3 / pCDNA3+Rluc Mark2	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX Mark3 / pCDNA3+Rluc Mark3	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX MGC 4172 / pCDNA3+Rluc MGC 4172	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX MIF4GD / pCDNA3+Rluc MIF4GD	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX Mark3 / pCDNA3+Rluc MKRN2	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX Mark3 / pCDNA3+Rluc MKRN3	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX MNAT1 / pCDNA3+Rluc MNAT1	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX Mark3 / pCDNA3+Rluc N4BP2L2	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX NCOA5 / pCDNA3+Rluc NCOA5	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX NDUFA10 / pCDNA3+Rluc NDUFA10	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX NMB / pCDNA3+Rluc NMB	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX Nomo3 / pCDNA3+Rluc Nomo3	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX NPHP3 / pCDNA3+Rluc NPHP3	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX OCIAD2 / pCDNA3+Rluc OCIAD2	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX PEX10 / pCDNA3+Rluc PEX10	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX PFDN5 / pCDNA3+Rluc PFDN5	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX PLEKHO1 / pCDNA3+Rluc PLEKHO1	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX CypA / pCDNA3+Rluc CypA	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX CypB / pCDNA3+Rluc CypB	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX CypG / pCDNA3+Rluc CypG	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX CypH / pCDNA3+Rluc CypH	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX PSMA2 / pCDNA3+Rluc PSMA2	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX RCAN3 / pCDNA3+Rluc RCAN3	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX RNF128 / pCDNA3+Rluc RNF128	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX RPS17 / pCDNA3+Rluc RPS17	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX RPS20 / pCDNA3+Rluc RPS20	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX RYBP / pCDNA3+Rluc RYBP	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX Mark3 / pCDNA3+Rluc SERPING1	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX SLC46A3 / pCDNA3+Rluc SLC36A3	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX SMOC1 / pCDNA3+Rluc SMOC1	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX TAX1BP3 / pCDNA3+Rluc TAX1BP3	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX TBCB / pCDNA3+Rluc TBCB	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX TERF1 / pCDNA3+Rluc TERF1	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX TPSAB1 / pCDNA3+Rluc TPSAB1	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX TPSB2 / pCDNA3+Rluc TPSB2	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX VKORC1 / pCDNA3+Rluc VKORC1	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX XPA / pCDNA3+Rluc XPA	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX YWHAE / pCDNA3+Rluc YWHAE	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay

pTREX ZNF410 / pCDNA3+Rluc ZNF410	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX POLR2B / pCDNA3+Rluc POLR2B	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX HCR / pCDNA3+Rluc HCR	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX CAMLG / pCDNA3+Rluc CAMLG	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX NFATc4 / pCDNA3+Rluc NFATc4	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pTREX CnA / pCDNA3+Rluc CnA	Amp <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup> modifiziertes Lumier-Assay
pCR3-N-Ha Nsp1	Amp <sup>R</sup> / Überexpression Reporterassays
pCR3-N-Ha Nsp1-N	Amp <sup>R</sup> / Überexpression Reporterassays
pCR3-N-Ha Nsp1-C	Amp <sup>R</sup> / Überexpression Reporterassays
pCR3-N-Ha Nsp1 hCoVNL-63	Amp <sup>R</sup> / Überexpression Reporterassays
pCR3-N-Ha Nsp1 MHV	Amp <sup>R</sup> / Überexpression Reporterassays
pCR3-N-c-myc RCAN3	Amp <sup>R</sup> / Überexpression Reporterassays
pCR3-N-c-myc CypA	Amp <sup>R</sup> / Überexpression Reporterassays
pCR3-N-c-myc CypH	Amp <sup>R</sup> / Überexpression Reporterassays
pCR3-N-c-myc FKBP1A	Amp <sup>R</sup> / Überexpression Reporterassays

### 2.1.11 Oligonucleotide

Tab. 2.9: Primer für Gateway - Klonierungen in pEntry - Vektor

Name	Sequenz (5'...3')
Nsp1FL(aa1-180)for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCAT GGAGAGCCTTGTCTTGGTGTCAACG
Nsp1FL(aa1-180)rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMCAT TTCTGCAACCAGCTCAACGACCTTGTG
Nsp1(aa1-93)for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCA TGGAGAGCCTTGTCTTGGTGTCAACG
Nsp1(aa1-93)rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMCA TTTCTGCAACCAGCTCAACGACCTTGTG
Nsp1(aa119-180)for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCA TGCGCAATGTTCTTCTTCGTAAGAACGGTAATAAG
Nsp1(aa119-180)rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMTC CATTGAGCTCACGAGTGAGTTCACGG
attB1-S-for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCA TGTTTATTTTCTTATTATTTCTTACTCTC
S1Dom-D15-R667rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMAC GTAATAAAGAACTGTATGGTAACTAGCACAAATGCC
S2Dom-R668-T1255for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCATGC GTAGTACTAGCCAAAAATCTATTGTGGCTTATACTATG
attB1-S-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGTGTAA TGTAATTTGACACC
E-aa35-76for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCATGA CTGCGCTTCGATTGTGTGCGTACTGC

E-aa35-76rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMGAC CAGAAGATCAGGAACTCCTTCAGAAGAG
M-aa100-221for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCAT GAGGCTGTTTGTCTCGTACCCGCTC
M-aa100-221rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMCTG TACTAGCAAAGCAATATTGTCTGTTGCTACCG
X1=orf3-aa126-274for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCAT GAGATGTTGGCTTTGTTGGAAGTGCAAATC
X1=orf3-aa126-274rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMCAA AGGCACGCTAGTAGTCGTCTCGGC
X2-orf4aa21-154for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCAT GACAGTGTACAGATACAATTGTCTGTTACTGAAGG
X2-orf4aa21-154rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMACG TACCTGTTTCTTCCGAAACGAATGAGTAC
X3-orf7aa23-63for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCAT GAGGATTGCTATTTGGAATCTTGACG
X3-orf7aa23-63rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMTGG ATAATCTAACTCCATAGGTTCTTCATC
X4-orf8-7a=aa16-98for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCAT GGAGCTATATCACTATCAGGAGTGTG
X4-orf8-7a=aa16-98rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMGTA GAGCTCTTGTTGAACCTCCTCTTGTCTG
Nsp3SUDaa349-726for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCAT GGATTATCTTGATAACCTGAAGCCTAGAG
Nsp3SUDaa349-726rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGTCTT AACCTCCCGCAGGGATAAGAGACTC
Nsp3SUDc5bdom-minimal for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCAT GAAAATTAAGCCTGCATTGATGAGGTTAC
Nsp3SUDc5bdom-minimal rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGACACCCT TGAGTGACGTTGGATGGTTGCCATTATGGCTCTAACATCC
Nsp3 X(ADRP)for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCAT GGAAGAACCAGTTAATCAGTTTACTGG
Nsp3 X(ADRP)rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMCTT CAGGTTATCAAGATAATCCATGACAACCTGCTC
S-gene-TM-AA14-1195for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCAT GGACCTTGACCGGTGCACCACTTTTGATGATGTTCAAGC
S-gene-TM-AA14-1195rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMCCAAG GCCATTTAATATATTGCTCATATTTCCCAATTCTTGAAGG
1074POLR2BattB1sens	GGGGACAABTTTGTACAAAAAABCABBCTCCGCCAT GTACGACGCGGATGAGGATATGC
1075POLR2BattB2antisense	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAA CACTCATCATTGCGGGTGAATAC

1086CHR-norisk-attB1sense	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCA TGTTTCCACCTTCAGGTTCCACTGGGC
1087CHR-norisk-attB2antisense	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMGC TGCTCATCTGGGGATTGGAGC
1110Nsp1-MHVA59-attcompFOR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCA TGGCAAAGATGGGCAAATACG
1111Nsp1-MHVA59attcompREV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACC GCGATAGCCCTTAAGAAGAGC
1112NeuNsp1-NL63attcompFOR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCA TGTTTTACAATCAAGTGACAC
1104Nsp1-NL63-attcompREV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMTC CTGCACCATGGCCAAAAACAAC
1117NFATc1=NFAT2attcompFOR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCA TGCCAAGCACCAGCTTTCAGTCCCTTCC
1118NFATc1=NFAT2attcompREV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMCT GCTGTGGCAGCAGGGCCGGGGTGGCTGC
1121NFATc2=NFAT1attcompFOR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCA TGAACGCCCCGAGCGGCAGCCCCAACCCG
1122NFATc2=NFAT1attcompREV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMCG TCTGATTTCTGGCAGGAGGTCCTGAAACTC
1115NFATc4attcompFOR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCA TGGGGCGGCCAGCTGCGAGGATGAGGAGC
1116NFATc4attcompREV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMGG CAGGAGGCTCTTCTCCAGGAGGTGCAGG
1119CalcineurinATTforComp1PR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCA TGTCCGAGCCGCAAGGCGATTGATCCCAAG
1120CalcineurinATTrevComp1PR	GGGGACCCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCMC TGGATATTGCTGCTATTACTGCCATTGC

M = der gelieferte Primermix enthält sowohl Primer mit dem Nucleotid A als auch Primer mit dem Nukleotid C an dieser Position (Wobble IUPAC-IUB Symbol). So entsteht an dieser Position entweder ein Stopp-Codon (für Klonierungen mit N-terminalem Tag) oder ein Glycin (für Klonierungen mit C-terminalem Tag).

**Tab. 2.10: Primer für die Quantifizierung von Transkripten (TaqMan):**

Name	Sequenz (5'...3')	TaqManSonde (Roche Mouse Library)
RT_GAPDH_(for)	AGCCACATCGCTCAGACAC	mouse # 39
RT_GAPDH_(rev)	GCCCAATACGACCAAATCC	
IL-2-For	CAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCT	mouse # 52
IL-2-Rev	GGTCTTAAGTGAAAGTTTTTGCTTTG	

IL-4-For	CTTTGTCAGCATTGCATCGT	mouse # 3
IL-4-Rev	GATTTGCAGTGACAATGTGAG	
IL-5-For	TTCCTGTTCTGTACATAAAAATCAC	mouse # 37
IL-5- Rev	CAGTACCCCCTTGCACAGTT	
IL-6-For	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA	mouse # 29
IL-6- Rev	CTGCAGCCACTGGTTCTGT	
IL-8-For	AGACAGCAGAGCACACAAGC	mouse # 53
IL-8- Rev	ATGGTTCCTCCGGTGGT	
IL-10-For	CATAAATTAGAGGTCTCCAAAATCG	mouse # 35
IL-10- Rev	AAGGGGCTGGGTCAGCTAT	
IL-17-A-For	ATCACAATCCCACGAAATCC	mouse # 81
IL-17-A- Rev	ACAGTCCGGGGGAAGTTCT	
TNF-For	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT	mouse # 24
TNF-Rev	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	
INF $\beta$ -For	CTTTGCTATTTTCAGACAAGATTC	mouse # 17
INF $\beta$ -Rev	GCCAGGAGGTTCTCAACAAT	

**Tab. 2.11: Primer und Sonden für die Quantifizierung von viraler RNA**

Name	Sequenz (5'...3')	Genomposition (nt)
NL-63RF2for	CTTCTGGTGACGCTAGTACAGCTTAT	(14459 nt - 14484 nt)
NL-63RR2rev	AGACGTCGTTGTAGATCCCTAACAT	(14573 nt - 14597 nt)
NL-63Sonde	FAM-CAGGTTGCTTAGTGTCCCATCAGATTCAT-TAMRA	(14532 nt - 14560 nt)
BNITMSARS1	TTATCACCCGCGAAGAAGCT	(17589 nt - 17607 nt)
BNITMSARAS2	CTCTAGTTGCATGACAGCCCTC	(17645 nt - 17666 nt)
BNITMSARP	FAM-TCGTGCGTGGATTGGCTTTGATGT-TAMRA	(17620 nt - 17643 nt)

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der verschiedenen *E. coli* Stämme erfolgte in LB-Medium [1 % NaCl (w/v), 1 % Bacto Trypton (w/v), 0,5 % Bacto Hefeextrakt (w/v)]. Nährböden wurden durch die Zugabe von 1,5 % Agar (w/v) hergestellt. Abhängig von den Selektionsgenen der Plasmide wurden

folgende Antibiotika zugesetzt: 100 µg/ml Ampicillin, 100 µg/ml Kanamycin, 150 µg/ml Gentamicin oder 100 µg/ml Spectinomycin. Die Kultivierung erfolgte aerob bei 37°C im Inkubationsschüttler, bei Agar-Nährböden im 37°C Inkubator.

Für die Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen wurden 885 µl Übernachtskultur mit 115 µl Glycerin (87 %) versetzt und anschließend bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

## **2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien**

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde ein Einzelklon in 20 ml TYM-Medium [1 % MgSO<sub>4</sub> (w/v), 100 mM NaCl, 20 % Bacto Trypton (w/v), 0,5 % Bacto Hefeextrakt (w/v)] transferiert und solange bei 37°C inkubiert, bis die Suspension eine optische Dichte OD<sub>600nm</sub> = 0,8 erreicht hatte. Anschließend wurde die Bakterienkultur mit 100 ml verdünnt und wiederum bei einer Temperatur von 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,8 inkubiert. Diese Kultur wurde erneut auf 500 ml mit TYM-Medium aufgefüllt und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> = 0,6 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf Eiswasser abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Die Bakterien wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 2.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 25 ml kaltem TfB I-Puffer [30 mM KAc, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 10 mM CaCl, 15 % (v/v) Glycerol] resuspendiert. Nach 45 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 10 min bei 2.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 25 ml kaltem TfB II-Puffer [10 mM MOPS pH = 7,0, 75 mM CaCl, 10 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerol] resuspendiert. Aliquots von 400 µl wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

## **2.2.3 Transformation von Bakterien**

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien mit 100-200 ng Plasmid-DNA oder einem kompletten Ligations- bzw. Rekombinationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45 sek bei 42°C) und kurzer Abkühlung auf Eis wurde zu jedem Ansatz 1 ml frisches LB-Medium gegeben und für 1 h aerob bei 37°C leicht geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes oder der gesamte Ligations- bzw. Rekombinationsansatz auf geeigneten Selektionsnährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert

## **2.2.4 Automatisiertes Hefe-Zwei-Hybrid-Screening**

Der automatisierte Hefe-Zwei-Hybrid (H2H)-Screen wurde in Zusammenarbeit mit Manfred Kögl am DKFZ in Heidelberg durchgeführt. Die detaillierte Durchführung ist in Mohr *et al.* (High-throughput yeast two-hybrid screening of complex cDNA libraries, *Methods in Molecular Biology*, in press) beschrieben. In diesem Screen wurden alle Volllänge SARS-Proteine sowie einige Protein-Teilfragmente ohne hydrophobe Regionen gegen die Genprodukte von humanen cDNA-Banken vom menschlichen Gehirn und fötalem



menschlichen Gehirn (Clontech) sowie eine cDNA-Bank, bestehend aus separat klonierten Volllänge *open reading frames* aus cDNAs von 5000 verschiedenen Genen, gescreent.

## 2.3 DNA-Standardmethoden

### 2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid DNA wurde, je nach benötigter Menge, entweder mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder mit dem Nucleobond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) isoliert. Beide basieren auf der alkalischen Lyse der Bakterien, gefolgt von Bindung, Reinigung und Elution der DNA an einer Silica-Matrix. Die Präparation erfolgte jeweils nach der Anleitung des Herstellers.

### 2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR wurde verwendet um spezifische DNA-Fragmente für Klonierungen *in vitro* zu amplifizieren. Präparative PCRs wurden mit der Crimson LongAmp™ Taq DNA-Polymerase durchgeführt, da diese über eine *proofreading*-Aktivität verfügt und somit mit einer geringeren Fehlerrate arbeitet. Die einzelnen Komponenten wurden in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt, wobei sich eine Standardreaktion wie folgt zusammensetzte:

- 1 µl 10 mM dNTP Mix
- 1 µl 10 µM Vorwärtsprimer
- 1 µl 10 µM Rückwärtsprimer
- 10 µl 5 x Reaktionspuffer (NEB)
- 1 µl Crimson LongAmp™ Taq DNA-Polymerase (5 U)
- x µl DNA-Matrize
- ad. 50 µl H<sub>2</sub>O

Das Standardprotokoll für PCRs lautete wie folgt:

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	30 sec	1 x
-----			
Denaturierung	94 °C	10 sec	
Hybridisierung	55 °C	30 sec	35 x
Elongation	65 °C	50 sec per kb	
-----			
Finale Elongation	65 °C	7 min	1 x

Für analytische Zwecke wurden 15 µl des PCR-Produktes auf einem Agarosegel aufgetrennt, für Klonierungen wurde das gesamte Reaktions-Volumen aufgetragen und das

gewünschte DNA-Fragment mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt (siehe 2.3.8).

### **2.3.3 Verdau mit Restriktionsenzymen**

Zur Klonierung von DNA-Konstrukten und zu analytischen Zwecken wurde DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben verdaut. Hierfür wurden 1,5 µg DNA mit 5 U Enzym versetzt und 2 h bei der empfohlenen Temperatur inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde anschließend mittels Agarose Gelelektrophorese überprüft.

### **2.3.4 Dephosphorylierung des Vektor-Plasmids**

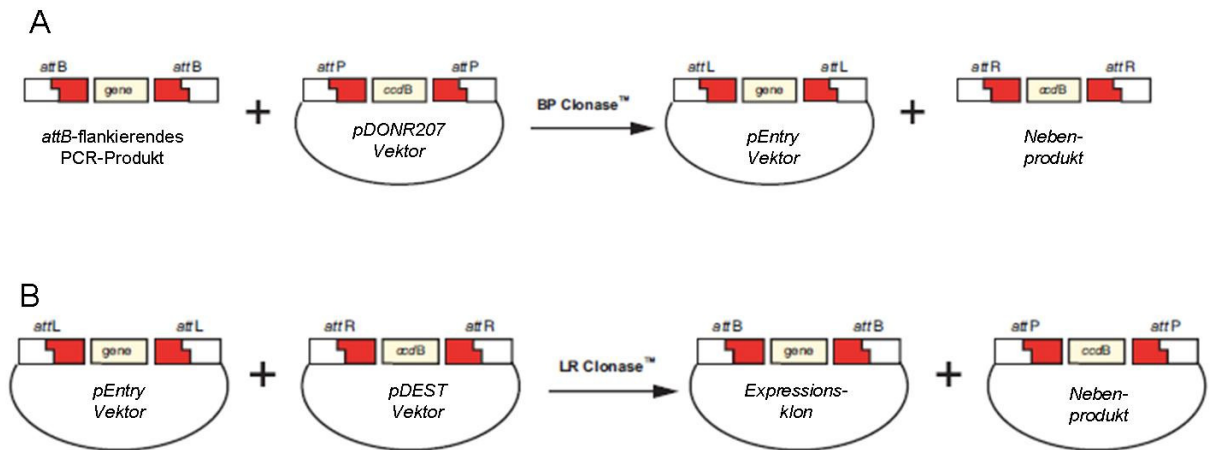
Um 5'-Phosphatreste von linearisierten Vektoren zu entfernen und so deren Religation zu verhindern wurde die Antarctic Phosphatase verwendet. Hierzu wurde ein gesamter Restriktionsansatz mit 4 µl 10 x Antarctic Phosphatase Reaktionspuffer, 5 U Enzym und 5 µl H<sub>2</sub>O versetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase bei 65°C für 5 min inaktiviert und der Reaktionsansatz direkt für die Ligation verwendet.

### **2.3.5 Ligation**

Alle Ligationen wurden mit der T4 DNA Ligase und einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 durchgeführt. Neben den entsprechenden Mengen an linearisiertem dephosphorylierten Vektor und der Insert-DNA enthielt die Reaktionslösung außerdem 1,5 µl 10 x T4 DNA Ligase Reaktionspuffer, 1 µl Enzym (5 U) und wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl eingestellt. Nach Inkubation für 3 h bei 25°C oder über Nacht bei 16°C erfolgte die Transformation des gesamten Ligationsansatzes in kompetente Bakterien.

### **2.3.6 Rekombinationsklonierung (Gateway®-Klonierung)**

DNA-Fragmente, welche entsprechende Rekombinationssequenzen des Phagen λ (att-sites) enthielten, konnten mittels Rekombinationsklonierung mit Hilfe des Gateway®-Systems (Invitrogen) kloniert werden. Dies erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde ein DNA-Abschnitt (z.B. PCR-Produkt), welcher attB-sites enthielt, mittels „BP-Reaktion“ in den attP-sites tragenden Vektor pDONR207 rekombiniert, wodurch flankierende attL-sites entstanden (siehe Abb. 2.1 A). Der somit neu entstandene Vektor wurde nach der Invitrogen-Nomenklatur „pEntry“ benannt. Der gesamte Rekombinationsansatz wurde anschließend in kompetente Bakterien transformiert, aus welchen dann wiederum das Plasmid isoliert wurde. Im zweiten Schritt wurde der DNA-Abschnitt aus dem neu entstandenen „pEntry“-Vektor mittels „LR-Reaktion“ in einen attR-sites tragenden Zielvektor (Destination-Vektor, „pDEST“) rekombiniert und in kompetente Bakterien transformiert (siehe Abb. 2.1 B).



**Abb. 2.1: Die Gateway Rekombinations Technologie (63)**

Im ersten Schritt wird ein *attB*-flankierendes PCR-Produkt mit Hilfe der BP-Clonase in einen *attP*-flankierenden Vektor rekombiniert, wodurch ein *pEntry*-Vektor mit flankierenden *attL*-sites und ein Nebenprodukt entstehen (A). Im zweiten Schritt wird mittels LR-Clonase das entsprechende Gen aus dem *pEntry*-Vektor in einen Zielvektor (*pDEST*-Vektor) mit flankierenden *attR*-sites rekombiniert, wodurch ein fertiger Expressionsvektor und ein Nebenprodukt entsteht.

Die Rekombinationsansätze setzen sich wie folgt zusammen:

BP-Reaktion:           200 ng PCR-Produkt  
                               150 ng *pDONR207*  
                                   1 µl BP-Clonase Mix (Invitrogen)  
                               ad. 5 µl H<sub>2</sub>O

LR-Reaktion:           150 ng *pEntry*  
                               150 ng *pDest*  
                                   1 µl LR-Clonase Mix (Invitrogen)  
                               ad. 5 µl H<sub>2</sub>O

Die Ansätze wurden jeweils bei Raumtemperatur für mindestens 1 h inkubiert.

### 2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA wurden 0,6-2,0 % Agarosegele mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TAE [800 mM Tris, 400 mM NaAc, 40 mM EDTA, pH = 7,8 (mit Essigsäure eingestellt)] eingesetzt. Die Agarosekonzentration wurde je nach DNA-Größe ausgewählt. Die DNA-Proben wurden mit einer entsprechenden Menge eines sechsfach-konzentrierten Ladepuffers (Fermentas) versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA erfolgte mittels UV-Anregung bei 302 nm.

### 2.3.8 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA aus TAE-Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Hierfür wurden die entsprechenden Banden aus einem präparativen

Agarosegel unter UV-Anregung (302 nm) ausgeschnitten und nach Anleitung des Herstellers aus dem Gel eluiert. Die Elution erfolgte in einem Volumen von 30 µl.

### 2.3.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde durch Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Nanodrop ND1000 Spektrophotometers (Peqlab) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte  $OD_{260nm} = 1$  entspricht hierbei 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des Verhältnisses  $OD_{260nm}:OD_{280nm}$  bestimmt, wobei ein Wert von 1,6-2,0 ein Hinweis auf nicht vorhandene bzw. schwache Kontamination mit Protein oder Phenol war.

### 2.3.10 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungsarbeiten wurden von den Firmen GATC Biotech AG (Konstanz) oder Agowa Genomics (Berlin) durchgeführt.

## 2.4 RNA-Standardmethoden

### 2.4.1 RNA-Isolation aus Gewebe-Zellkulturen

Die Gesamt-RNA aus infizierten und uninfizierten Zellen wurde mit Hilfe des TRIZOL®-Reagenzes (Invitrogen) aufgereinigt. Die verwendete Methode basiert hierbei auf dem Prinzip der *single Step*-RNA Isolation nach Chomczynski und Sacchi (20,21). Hierfür wurden Zellen abzentrifugiert und mit 1 ml TRIZOL®-Reagenz pro  $1 \times 10^7$  Zellen für 5 min bei RT lysiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform (pro 1 ml eingesetztem TRIZOL®-Reagenz) wurden die Proben 15 sek vorsichtig geschwenkt und weitere 2-3 min bei RT inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4°C / 15 min / 12.000 x g) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und die enthaltene RNA mit 0,5 ml Isopropanol (pro 1 ml eingesetztes TRIZOL®-Reagenz) gefällt. Nach 10 minütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation (4°C / 10 min / 12.000 x g) wurde die RNA mit 1 ml 80 % Ethanol (pro 1 ml eingesetztem TRIZOL®-Reagenz) gewaschen und erneut zentrifugiert (4°C / 5 min / 7.500 x g). Die RNA wurde dann an der Luft getrocknet und schließlich in 30 µl RNase-freiem Wasser für 10 min bei 55°C gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.3.9). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.4.2 Synthese von cDNA

Die aus Gewebe-Zellkulturen isolierte Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der SuperScript™ III Reversen Transkriptase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde mit Oligo(dT)-Primern (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.4.3 Echtzeit PCR-Quantifizierung von RNA Transkripten mittels TaqMan™-PCR

Um das Zytokinmuster infizierter bzw. nicht infizierter Zellen zu vergleichen wurde die isolierte Gesamt-RNA (siehe 2.4.1) der Zellen in cDNA umgeschrieben (siehe 2.4.2) und mittels TaqMan™-PCR analysiert. Die TaqMan™-PCR wurde im *ABI Prism 7000 sequence detection system* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die TaqMan™-Sonden wurden der Universal Probe Library (Roche) entnommen. Um die für die Detektion eines Gens jeweils optimale Kombination aus einem spezifischen Primerpaar und einer Sonde zu entwickeln, wurde die Software *Assay Design Center* auf der Internetseite „[www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)“ (Roche) verwendet.

Die PCR wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	12 min	1 x
Denaturierung	95 °C	20 sek	45 x
Annealing / Elongation	60 °C	1 min	

Dabei wurde nach jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit der ABI Prism 7000 Software, welche einen  $C_t$ -Wert für jede Reaktion berechnet. Um Unterschiede in den Transkriptmengen eines gegebenen Gens in unterschiedlichen Zelllinien oder unter unterschiedlichen Bedingungen zu berechnen, wurde pro  $C_t$ -Wert eine Verdoppelung der Transkriptmenge angenommen. Der Mengenfaktor (x) wurde also durch die Formel  $x = 2^{-\Delta C_t}$  angenähert.

Für die Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

- 5 µl cDNA
- 12,5 µl TaqMan Universal Master Mix
- 2 µl 10µM Vorwärtsprimer
- 2 µl 10µM Rückwärtsprimer
- 0,25 µl TaqMan Sonde
- 0,5 µl ROX Referenzfarbstoff (Invitrogen)
- ad. 30 µl H<sub>2</sub>O

### 2.4.4 Virale RNA-Isolation aus infizierten Gewebe-Zellkulturen

Zur Detektion der viralen Replikation wurde virale RNA aus dem Überstand infizierter Gewebe-Zellkulturen isoliert. Um den Hintergrund zu ermitteln, wurde nach der Infektion und drei Waschschritten eine Probe des frisch zugegebenen Mediums entnommen und die RNA

isoliert. Diese Probe ergab den Hintergrundwert. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem QIAamp® Viral RNA Mini-Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Zur Elution im letzten Schritt wurde der AVE-Puffer (RNase-freies Wasser mit 0.04% Natriumazid) auf 80 °C erhitzt.

### 2.4.5 Echtzeit PCR-Quantifizierung viraler RNA mittels SuperScript™ II One-Step RT-PCR mit Platinum™ Taq

Die Superscript™ II One-Step RT-PCR mit Platinum® Taq (Invitrogen) vereint zwei Hauptkomponenten: die SuperScript™ Reverse Transkriptase zur cDNA Synthese und die Platinum® Taq DNA-Polymerase zur PCR-Amplifikation. Somit kann die PCR-Amplifikation direkt nach der Reversen Transkription in einem Schritt erfolgen. Zur Detektion der isolierten viralen RNA (siehe 2.4.4) von HCoV-NL63 wurde folgendes Protokoll verwendet:

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Reverse Transkription	45 °C	20 min.	1 x
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min.	1 x
Denaturierung	95 °C	15 sec.	45 x
Annealing / Elongation	60 °C	30 sec.	

Sowie folgender Reaktionsansatz:

5 µl virale RNA  
 12,5 µl 2 x Reaktions-Mix  
 1,8 µl MgSO<sub>4</sub> (50mM)  
 1 µl BSA (10x)  
 0,5 µl RT/Platinum® Taq Mix  
 0,5 µl 10µM Vorwärtsprimer  
 1 µl 10µM Rückwärtsprimer  
 1 µl 10µM Sonde  
 ad. 25 µl H<sub>2</sub>O

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde je nach Proteingröße mit 10 %-, 12 %- oder 15 %-igen Polyacrylamid Trenngelen, welche von einem 5 %-igem Sammelgel überlagert waren, durchgeführt. Die Gele wurden in Gießständen der Firma Biorad gegossen und anschließend in der Elektrophoreseapparatur (Biorad) eingespannt und mit 1 x Laufpuffer [50 mM Tris/HCl (pH = 8,2), 384 mM Glycin, 0,1 % SDS] befüllt. Vor dem Beladen

der Gele wurden die Proben mit 6x Lämmli-Laufpuffer [62,5 mM Tris/HCl (pH = 6,8), 10 % Glycerol, 2 % SDS, 0,01 % Bromphenolblau und 3 %  $\beta$ -Mercaptoethanol] versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 150 V für 1-2 Stunden. Zwei kleine Gele setzten sich wie folgt zusammen:

---

**Sammelgel 5 %:**

650 $\mu$ l	Acrylamid/Bisacrylamid (37, 5:1)
50 $\mu$ l	1M Tris/HCl (pH = 6,8)
50 $\mu$ l	10 % SDS
35 $\mu$ l	10 % APS
35 $\mu$ l	TEMED
3,05 ml	H <sub>2</sub> O

---

**Trenngel 10 %:**

3,33 ml
2,50 ml
100 $\mu$ l
100 $\mu$ l
35 $\mu$ l
4,01 ml

**Trenngel 12 %:**

4,00 ml
2,50 ml
100 $\mu$ l
100 $\mu$ l
35 $\mu$ l
3,35 ml

**Trenngel 15 %:**

5,00 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (37, 5:1)
2,50 ml	1M Tris/HCl (pH = 8,8)
100 $\mu$ l	10 % SDS
100 $\mu$ l	10 % APS
35 $\mu$ l	TEMED
2,35 ml	H <sub>2</sub> O

---

## 2.5.2 Western-Blot-Analyse

Die Proteine wurden mit Hilfe des Protean II Systems (BioRad) unter Verwendung von Transferpuffer [25 mM Tris/HCl (pH = 8,3), 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol] für eine Stunde bei 300 mA auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher&Schüll) geblottet. Unspezifische Bindestellen wurden durch mindestens einstündige Inkubation in Blockierlösung [TBS-TT [20 mM Tris/HCl (pH = 7,5), 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,2 % Triton X-100] mit 5 % Magermilchpulver] abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper erfolgte für eine Stunde ebenfalls in Blockierlösung. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-TT wurde die Membran für eine Stunde mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper in Blockierlösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-TT gewaschen. Um die HRP-konjugierten Antikörper zu visualisieren wurde die Membran für 1 min mit dem ECL™ Western Blot Detektionsreagenz (Amersham) inkubiert und die Signale anschließend mit einem Cronex5 Medical-X-Ray Film (AGFA) detektiert und entwickelt.

## 2.5.3 Modifiziertes LUMIER Bindungs-Assay

Die LUMIER Experimente wurden prinzipiell nach dem Protokoll von Barrios-Rodiles *et al.* (3) durchgeführt, wobei statt des Flag-Tags ein Protein A-Tag (zz-Domäne) verwendet wurde. Die zu testenden Proteine wurden als Hybridproteine, entweder an den

Carboxyterminus des *Staphylococcus aureus* Protein A-Tag oder der *Renilla reniformis* Luziferase fusioniert, in HEK293 Zellen transient überexprimiert. Hierfür wurden jeweils 20 ng des jeweiligen Konstruktes in  $1 \times 10^4$  HEK293 Zellen mittels 0,05  $\mu$ l Lipofectamine 2000 in 96-well-Platten transfiziert. Nach 40 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen auf Eis mit 10  $\mu$ l kaltem Lysepuffer [20 mM Tris/HCl (pH = 7,5), 250 mM NaCl, 1 % TritonX-100, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, Benzonase, Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (Stocklsg.: 1 Tablette gelöst in 2 ml H<sub>2</sub>O; davon pro 10 ml Puffer 100  $\mu$ l)], welcher zusätzlich Schaf-anti-Kaninchen IgG-gekoppelte magnetische Kügelchen (2 mg/ml Endkonzentration) enthielt, lysiert. Nach 15 minütiger Inkubation der Lysate wurden pro Vertiefung 100  $\mu$ l Waschpuffer (PBS, 1 mM DTT) zugegeben und 10 % des verdünnten Lysats für die spätere Analyse der Luziferase-Aktivität pro Vertiefung vor den Waschschrritten abgenommen. Das übrige Lysat wurde mit Hilfe des Tecan Hydroflex *plate washers* sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität sowohl der entnommenen Lysate wie auch der gewaschenen Kügelchen gemessen. Als Negativkontrolle wurde jedes Luziferase-Hybridprotein auf eine Interaktion mit einem ProteinA-ProteinA-Hybridprotein getestet. Um die Daten auf die Transfektionseffizienz zu normalisieren, wurden die Luziferase-Werte logarithmisch transformiert und das Signal der gewaschenen Kügelchen durch das Signal des 10 %-igen Lysates geteilt. Um die Werte auf Hintergrund-Bindungen zu korrigieren wurden von den normalisierten Werten jeder Probe die Werte der Negativkontrolle abgezogen. Die normalisierten und korrigierten Daten wurden anschließend wie folgt z-transformiert: (Mittelwert der Probe)/ (Standard-Abweichung). LUMIER Tests mit einem z-Faktor größer oder gleich 1,0 wurden als positiv gewertet.

## 2.6 Zellkultur und virologische Methoden

### 2.6.1 Zellkultur

Falls nicht anders angegeben wurden HEK293-, HEK293 low passage (lp)-, Vero E6-, St-, Fcwf-, HRT18-, CaCo-2 wt- sowie Huh7 wt-Zellen in „Dulbecco's modified Eagle Medium“ (DMEM) angereichert mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 100  $\mu$ g/ml *non essential aminoacids* (NEAA) kultiviert. Bei folgenden Zelllinien wurde dem Medium zusätzlich Puromycin zugesetzt:

**Tab. 2.12: Zelllinien und eingesetzte Puromycinkonzentrationen**

Zelllinie	Puromycinkonz.	Zelllinie	Puromycinkonz.
CaCo-2 unrelated sh control	10 $\mu$ g/ml	Huh7 unrelated sh control	10 $\mu$ g/ml
CaCo-2 delta CypA	15 $\mu$ g/ml	Huh7 delta CypA	10 $\mu$ g/ml
CaCo-2 delta CypB	15 $\mu$ g/ml	Huh7 delta CypB	10 $\mu$ g/ml
CaCo-2 delta FKBP1A	10 $\mu$ g/ml		



Jurkat Zellen wurden in RPMI 1640 Medium ebenfalls angereichert mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Alle Zellen wurden bei 37°C in feuchter, 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gehalten. Für die Kryo-Konservierung wurden die Zellen 5 min bei 300 x g sedimentiert und anschließend bei einer Konzentration von 0,5-1x10<sup>7</sup> Zellen pro ml in 1 ml FCS mit 10 % DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryo-Röhrchen überführt und in einem „Cryo 1°C Einfrierbehälter“ bei -80°C für 24 h abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte über eine kurze Inkubation der Zellen im 37°C Wasserbad. Nach anschließendem Waschen der Zellen mit 10 ml Zellkulturmedium wurden diese in Kultur genommen.

### 2.6.2 Immunfluoreszenz Analysen

Für Immunfluoreszenz-Experimente wurden entsprechende Zellen auf Deckgläschen in 12-well-Platten mit 70 % Konfluenz ausgesät. Die Zellen wurden am nächsten Tag entweder mit dem Expressionsplasmid pLNCX2 NFAT1-GFP transfiziert oder mit HCoV-229E-GFP mit einer *multiplicity of infection* (MOI) = 0,1 infiziert. Zum entsprechenden Zeitpunkt wurden die Zellen für 15 min mit 2 % Formaldehyd in PBS bei RT fixiert und das Virus inaktiviert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte für 5 min die Permeabilisierung der Zellen mit kaltem 0,5 % Triton X-100 in PBS. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte für 10 min bei RT und im Dunkeln eine DAPI-Färbung, um die DNA anzufärben und somit Zellkerne zu markieren. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit deionisiertem Wasser gewaschen und die Deckgläschen dann mit der Zellseite nach unten in einem Tropfen *Immunoselect Antifading Mounting Medium* (Dianova) auf dem Objektträger eingebettet. Die so angefertigten Präparate wurden mit dem Mikroskop Leica AF6000 analysiert.

### 2.6.3 Transfektion

Für die Transfektion von eukaryotischen Zelllinien wurde entweder das Transfektionsreagenz FuGeneHD (Dual-Luziferase-Reporterassay), Lipofectamin 2000 (modifiziertes LUMIER-Assay) oder Lipofectamin LTX (Dual-Luziferase-Reporterassay im Viruskontext) nach Angaben des Herstellers verwendet. Jurkat-Zellen wurden mit dem Amaxa®Nucleofector®-Kit von Lonza nach Angaben des Herstellers transfiziert.

### 2.6.4 Herstellung stabiler Zelllinien

Um Jurkatzellen mit stabiler Expression des Reporterplasmids pHTS-NFAT herzustellen wurden die Zellen zunächst mit dem pHTS-NFAT Reporterplasmid transfiziert (2.6.3). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen sowie nicht transfizierte Kontrollzellen unter Hygromycin-Selektion (600 µg/ml) genommen. Nach dem Absterben der

Kontrollzellen und dem Heranwachsen eines stabil transfizierten Zellpools wurde dieser mittels Luziferase-Messung auf das korrekt inserierte Reporterplasmid getestet.

### 2.6.5 Dual-Luziferase-Reporterassay

Das Dual-Luziferase-Reporterassay diente der Bestimmung von Promotor-Aktivitäten und wurde mit Hilfe des *Dual-Luciferase-Reporterassay-Systems* (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden sogenannte Reporterplasmide, welche das *Firefly*-Luziferasegen unter Kontrolle des zu untersuchenden Promotors enthalten, in Zellen transfiziert. Durch nachfolgende Virusinfektion oder Co-Transfektion von Plasmiden, die der Expression potentieller Aktivatoren bzw. Inhibitoren des zu untersuchenden Promotors dienen, wurde die Aktivität des Promotors und damit die Expression der *Firefly*-Luziferase beeinflusst. Die gut messbare *Firefly*-Luziferase-Aktivität erlaubte somit Rückschlüsse auf die Aktivität des untersuchten Promotors. Die Luziferase-Aktivitäten wurden in einem Luminometer anhand ihres Substratumsatzes gemessen. Die Co-Transfektion eines weiteren Reporterplasmids (pRL-Null), welches eine konstitutiv aktive *Renilla Reniformis*-Luziferase kodiert, ermöglichte es Schwankungen in der Transfektionseffizienz zu bestimmen und dementsprechend die gemessenen *Firefly*-Luziferase-Werte zu korrigieren. Für das verwendete Standardprotokoll, wurden HEK293-Zellen in 6-well-Platten mit einer Konfluenz von etwa 60-80 % oder  $1 \times 10^6$  Jurkat Zellen in 12-well-Platten ausgesät. In HEK293-Zellen erfolgte dann die Transfektion von 460 ng Reporterplasmid (*Firefly*-Luziferase), 50 ng pRL-Null sowie jeweils 460 ng der Expressionsplasmide, welche Calcineurin, NFAT und entweder das SARS-CoV Nsp1 kodieren oder den entsprechenden Leervektor. Die Jurkat-Zellen wurden nur mit dem Reporterplasmid (1  $\mu$ g), pRL-Null (50 ng) und dem Expressionsplasmid, welches das SARS-CoV Nsp1 (1  $\mu$ g) kodiert, bzw. den entsprechenden Leervektor transfiziert. Eine eventuelle Stimulation der Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (40 ng/ $\mu$ l Endkonzentration) und Ionomycin (2  $\mu$ M Endkonzentration) wurde direkt nach der Transfektion durch Zugabe der Chemikalien ins Medium durchgeführt. 19 h nach der Transfektion wurden die Zellen in 500  $\mu$ l Passive Lysis Buffer (Promega) für 15 min bei Raumtemperatur lysiert.

Für das Dual-Luziferase-Reporterassay im Viruskontext wurden HEK293Ip in 24-well-Platten mit einer Konfluenz von etwa 60-80 % ausgesät und mit 500 ng Reporterplasmid (*Firefly*-Luziferase) und 12 ng pRL-Null transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Infektion mit SARS-CoV Isolat „Hongkong“ mit einer MOI = 1. Wiederum 17 h nach der Infektion erfolgte die Lyse der Zellen, wobei dem Lysepuffer zusätzlich 1 % NP40 zugesetzt wurde, um eine vollständige Virusinaktivierung zu gewährleisten.

Die Luziferaseaktivität wurde in einem Multiplattenlesegerät (Fluostar Optima, BMG-Labtech) nach Herstellerangaben bestimmt. Dabei wurden 20  $\mu$ l Lysat und je 50  $\mu$ l Substrat für die

Firefly- bzw. Renilla Luziferase verwendet. Die Messzeit für das Reporter- bzw. Referenzsignal betrug jeweils 5 Sekunden.

### 2.6.6 Virusinfektion von Zellen

Zur Infektion von Zellen wurde das Medium abgenommen und das entsprechende Virus in 300 µl Opti-MEM® (Invitrogen) auf die Zellen gegeben. Als Negativ-Kontrolle (Mock) wurde Opti-MEM® ohne Virus verwendet. Während der Infektion wurden die Zellen für 1h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Inokulum entfernt und mit Kulturmedium (2.6.1) ersetzt.

### 2.6.7 Herstellung von Virusstocks

Entsprechende Zellen wurden in 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen ausgesät, so dass eine Konfluenz von etwa 70 % erreicht wurde. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert (siehe 2.6.5). Nach der Infektion wurde das Inokulum mit 20 ml Kulturmedium ersetzt und die Zellen so lange inkubiert, bis nahezu alle Zellen aufgrund der Virusinfektion lysiert waren. Der Überstand wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen (Becton Dickensen) überführt und durch Zentrifugation (4° / 10 min / 6.000 x g) von Zelltrümmern befreit. Aliquots des Virusstocks wurden bei -80°C gelagert. Die Virustiterbestimmung erfolgte durch Virustitration (siehe 2.6.8)

### 2.6.8 Virustitration (Plaque Assay)

Plaque Assays wurden durchgeführt, um die Viruskonzentration in Virusstocks und um die Auswirkung potentieller Inhibitoren auf die virale Replikation anhand der Anzahl der *plaque forming units* (PFU) zu bestimmen. Es wurden serielle Verdünnungen des Virusstocks in Opti-MEM®, bis zu einem Verdünnungsschritt von 10<sup>-6</sup>, hergestellt. Entsprechende Zellen, die in 24-well-Platten eine Konfluenz von 90 % erreicht hatten, wurden mit 300 µl der Virusverdünnung für eine Stunde infiziert (siehe 2.6.5). Danach wurden die Zellen mit 0,5 ml Avicel-Kulturagar [2,4% sterile Avicel Lösung 1:1 gemischt mit 2 x DMEM (siehe 2.6.1)] überschichtet und inkubiert. Die Inkubation betrug bei HCoV-NL63 vier Tage und bei HCoV-229E drei Tage. Nach der Inkubation wurde der Avicel-Kulturagar abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 1 ml PBS gewaschen. Die Virusinaktivierung und Fixierung sowie die Färbung des Zellrasens erfolgte dann durch 10 minütige Inkubation der Zellen mit einer Kristallviolettlösung [0,2 % Kristallviolett, 11 % Formaldehyd, 2 % Ethanol, 2 % Paraformaldehyd], wodurch die Plaques sichtbar gemacht wurden. Zur Bestimmung des Virustiters wurde die Anzahl der Plaques einer gut zählbaren Verdünnung auf 1 ml hochgerechnet und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

Um die Auswirkung potentieller Inhibitoren auf die virale Replikation von HCoV-NL63 und HCoV-229E zu testen wurden dem Avicel-Kulturagar direkt verschiedene Inhibitor-Konzentrationen zugesetzt.

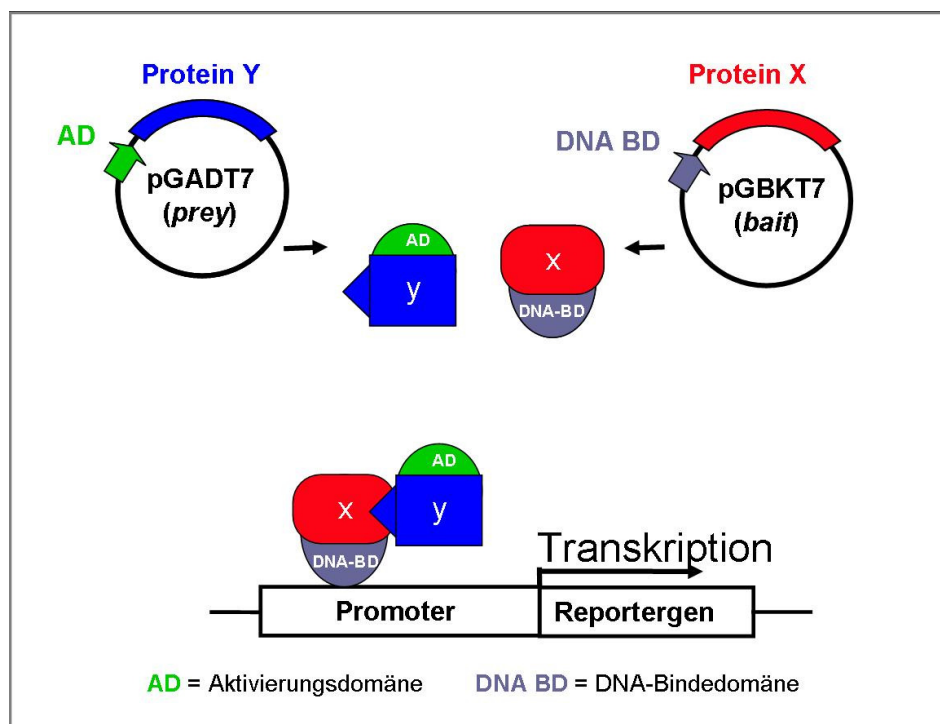
Die Auswirkung der Inhibitoren auf die virale Replikation weiterer Coronaviren wurde in Kooperation mit verschiedenen Arbeitsgruppen des BMBF SARS - Zoonose Verbunds durchgeführt, wobei jede Arbeitsgruppe ihr Standardprotokoll verwendete. Bei IBV Bd und TGEV PUR46 wurden die Inhibitoren direkt zum Überschichtungsmedium hinzugegeben und die Virusreplikation nach einem bzw. drei Tagen Inkubation detektiert. Bei SARS-CoV FFM1, FCoV und EMCV wurden zunächst Zellen infiziert, mit verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen im Medium zwei Tage bzw. bei EMCV einen Tag inkubiert und im Anschluss die Virus-enthaltenden Überstände mittels Plaque Assay titriert. Die Detektion der viralen Replikation von HIV-1 NL4-3 erfolgte über sekretierte alkalische Phosphatase (SEAP). C8166 SEAP Zellen wurden mit HIV-1 NL4-3 infiziert und fünf Tage mit verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen inkubiert. Die Detektion der sekretierten alkalischen Phosphatase im Zellüberstand erfolgte mittels Phospha-Light™ SEAP Reporter Gene Assay nach Angaben des Herstellers.

### **2.6.9 Zytotoxizitäts - Test**

Um auszuschließen, dass die Inhibition der viralen Replikation nur auf einem zytotoxischen Effekt der Inhibitoren auf die Zellen basiert, wurde die Zytotoxizität verschiedener Inhibitor-Konzentrationen auf die verwendeten Zelllinien mit Hilfe des *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Grundlage dieser Arbeit ist ein vorangegangener genomweiter Hefe-Zwei-Hybrid (H2H)-Screen zur Identifizierung neuer Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem SARS-CoV und der humanen Wirtszelle. Der automatisierte Screen wurde in Kooperation mit Manfred Kögl am DKFZ in Heidelberg durchgeführt. In diesem Screen wurden alle 28 Proteine des SARS-CoV gegen die Genprodukte von drei humanen cDNA-Banken aus humanem Gehirn, humanem, fötalen Gehirn, sowie einer Genbank, bestehend aus 5000 einzeln klonierten humanen cDNA-Klonen, gescreent. Wie Abbildung 3.1 zeigt, ist im H2H-System das zu testende Protein X an die DNA-Bindedomäne und das zu testende Protein Y an die Aktivierungsdomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors gekoppelt. Der Gal4 Transkriptionsfaktor ist inaktiv, sobald die DNA-Bindedomäne räumlich von der Aktivierungsdomäne getrennt ist. Erst durch eine Protein-Protein-Interaktion der beiden Hybridproteine kommt die DNA-Bindedomäne in Kontakt mit der Aktivierungsdomäne und ermöglicht die Expression eines Reportergens.



**Abb. 3.1.: Schema des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.**

Das zu testende Protein X ist an die DNA-Bindedomäne (DNA BD) und das zu testende Protein Y an die Aktivierungsdomäne (AD) des Gal4 Transkriptionsfaktors gebunden. Eine Protein-Protein-Interaktion bringt die beiden Domänen in räumliche Nähe und ermöglicht somit die Expression eines Reportergens.

Alle Gene des SARS-CoV wurden als Hybridproteine, gekoppelt an die DNA-Bindedomäne, und die Genprodukte der humanen cDNA-Banken, gekoppelt an die Aktivierungsdomäne, exprimiert. In diesem H2H-Screen wurden zwei verschiedene Reportergene verwendet. Zum einen wurden  $\Delta HIS3$  Hefe-Stämme verwendet, die nur durch die Aktivierung des Reportergens in der Lage sind auf Histidin-Mangelmedium zu wachsen. Der Vorteil dieses

Reportergens ist die sofortige Anreicherung positiver Klone. Zum anderen wurde das Reportergen *MEL1*, das eine  $\alpha$ -Galaktosidase kodiert, verwendet. Die exprimierte  $\alpha$ -Galaktosidase wird sekretiert und führt zur Spaltung eines zugegebenen Substrates, welches dann ein Fluoreszenzsignal ergibt und somit eine quantitative Messung der Interaktion ermöglicht. Im automatisierten H2H-Screen wurde jedes einzelne SARS-Protein gegen die Genprodukte der drei cDNA-Banken getestet. Positive Klone wurden mit Hilfe eines Roboters gepickt und die enthaltene cDNA mittels PCR amplifiziert. Die anschließende Sequenzierung der amplifizierten Fragmente und bioinformatische BLAST-Analysen führten zur Identifikation von insgesamt 237 Protein-Protein-Interaktionen.

Diese 237 gefundenen Protein-Protein-Interaktionen wurden nach statistischer Bewertung in die folgenden drei Klassen unterteilt: die „*high confidence*“-Interaktionen, die „*low confidence*“-Interaktionen sowie die wahrscheinlich „falsch-positiven“ Interaktionen. In die Gruppe der sogenannten „*high confidence*“-Interaktionen fallen Interaktionen, die entweder mehr als dreimal aus einer cDNA-Bank oder aus verschiedenen cDNA-Banken gepickt wurden. Als sogenannte „*low confidence*“-Interaktionen wurden Interaktionen klassifiziert, die einmal aus einer der drei cDNA-Banken gepickt wurden und die letzte Gruppe der „falsch-positiven“ Interaktionen beinhaltet sogenannte klebrige Interaktoren, die unabhängig von ihrem Interaktionspartner in jedem Screen erneut eine Interaktion zeigen.

Folgende Tabelle zeigt einen beispielhaften Ausschnitt der Ergebnisse des H2H-Screens.

**Tab. 3.1: Ausschnitt der Ergebnisliste des H2H-Screens**

<b>„<i>high confidence</i>“ Interaktionen: 46</b>		
<b>bait</b>	<b>prey</b>	
Nsp12	C1orf142	chromosom 1 open reading frame 142
Nsp13	MARK2	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2
Nsp13	MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
Orf 14	HGS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
<b>„<i>low confidence</i>“ Interaktionen: 150</b>		
<b>bait</b>	<b>prey</b>	
Nsp9	C1orf142	chromosom 1 open reading frame 142
Nsp12	PFDN5	prefoldin subunit 5
Orf3a	PFDN5	prefoldin subunit 5
Nsp1	CypA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A), CYP A
Nsp1	CypG	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G), CYP G
Nsp1	CypH	peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H), CYP H
Nsp1	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa
Nsp1	RCAN3	RCAN family member 3
<b>„falsch-positiv“ Interaktionen: 41</b>		

Proteine mit Transmembrandomänen sind im H2H-System nur schwer zu untersuchen, da die Proteine aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität nur schwer in den Kern der Hefe gelangen. Aus diesem Grund wurden die Gene folgender Transmembranproteine als Fragmente ohne Transmembrandomänen neu kloniert, um diese ebenfalls in einem nachgezogenen H2H-Screen zu testen. Zusätzlich wurden die Gene von Nsp1 und Nsp3 (PL2<sup>PRO</sup>) ebenfalls aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität in Fragmente unterteilt und kloniert.

**Tab. 3.2.: Übersicht der klonierten Gen-Fragmente**

Protein	Länge (AS)	klonierte Fragmente (AS-Positionen)	Struktur/Funktion
S-Protein	1255	S1-Domäne: AS 15-667	Transmembranprotein
		S2-Domäne: AS 668-1255	
		SΔTMD: AS 14-1195	
ORF3a	274	Orf3aΔTMD: AS126-274	Transmembranprotein
ORF3b	154	Orf 3bΔTMD: AS 21-154	Transmembranprotein
E-Protein	76	EΔTMD: AS 35-77	Transmembranprotein
M-Protein	221	MΔTMD: AS 100-221	Transmembranprotein
ORF6	63	Orf 6ΔTMD: AS 23-63	Transmembranprotein
ORF7a	12	Orf 7aΔTMD: AS 16-98	Transmembranprotein
Nsp1	180	N-terminales Fragment: AS 1-93	Nicht-Strukturprotein 1
		C-Terminales Fragment: AS 119-180	
Nsp3 (PL2PRO)	1922	SUD-Domäne: AS 349-726	Papain-ähnliche Cystein-Protease

Die Daten des nachgezogenen Screens wurden mit den Daten des vorherigen Screens vereinigt, wodurch sich insgesamt eine Summe von 712 identifizierten Protein-Protein-Interaktionen ergab. Der Datensatz des zweiten Screens wurde ebenfalls in die oben beschriebenen drei Gruppen klassifiziert, so dass zusammenfassend folgende Interaktionen gefunden wurden.

**Tab. 3.3: Ergebnisübersicht der beiden H2H-Screens**

Gruppe:	Anzahl der Interaktionen
„high confidence“ Interaktionen:	86
„low confidence“ Interaktionen:	378
„falsch-positive“ Interaktionen:	248
<b>Gesamt:</b>	<b>712</b>

Eine tabellarische Zusammenfassung aller neu identifizierter Protein-Protein Interaktionen ist im Anhang zu finden.

### 3.1 Validierung neu identifizierter Protein-Protein-Interaktionen mittels LUMIER Bindungs-Assay

Das H2H-System hat wie jede andere Methode viele Vor- aber auch Nachteile. Zu den Vorteilen zählen auf jedenfall die kostengünstige, einfache und schnelle Durchführung weitangelegter Protein-Protein-Interaktions-Screens sowie die relativ robuste Handhabung der Hefe. Ein Nachteil des H2H-Systems ist jedoch, dass die Protein-Protein-Interaktionen im Kern der Hefe stattfinden müssen. Dies hat aufgrund des veränderten Milieus im Kern eventuell eine falsche Proteinfaltung der zu testenden Proteine zur Folge, was dann zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen kann. Desweiteren muss bei der Auswertung der H2H-Daten in Betracht gezogen werden, dass Protein-Protein-Interaktionen gefunden werden, die in der natürlichen Zellumgebung gar nicht zustande kommen können, da die beiden Interaktionspartner beispielsweise aufgrund des Zellzyklus oder einer Lokalisation in verschiedenen Zellkompartimenten nie aufeinander treffen würden.

Aus diesen Gründen ist es notwendig, die im H2H-System identifizierten Protein-Protein-Interaktionen kritisch zu betrachten und mit einer zweiten Methode zu validieren. Wir haben uns für die Validierung der Protein-Protein-Interaktionen der Kategorie „*high confidence*“ Interaktionen und „*low confidence*“ Interaktionen mit einem modifizierten LUMIER Bindungs-Assay (*Luminescence-based Mammalian IntERactome mapping*) entschieden (3).

#### 3.1.1 Klonierung der SARS-CoV Gene und humaner cDNAs in LUMIER-Expressionsplasmide

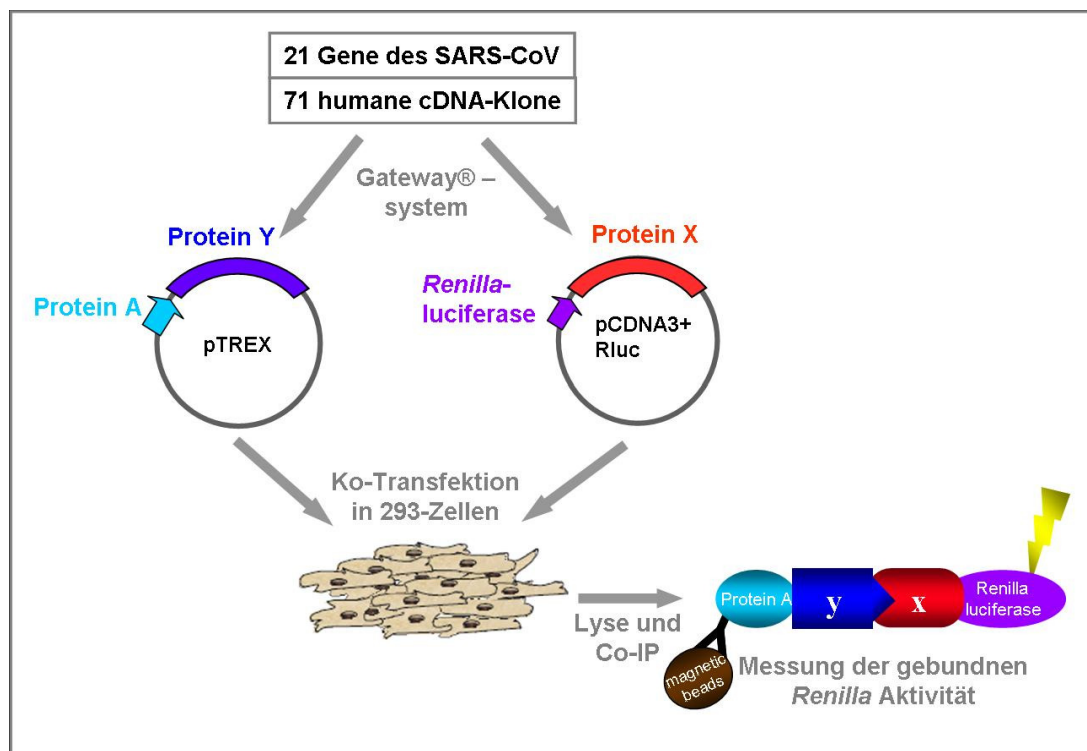
Zur Validierung der im H2H-Screen identifizierten Protein-Protein-Interaktionen wurden 21 Gene des SARS-CoV, welche im H2H-Screen Interaktionen gezeigt haben, sowie die nachträglich klonierten Proteinfragmente des SARS-CoV Nsp1 in LUMIER-Expressionsplasmide kloniert. Die Anzahl der im LUMIER Bindungs-Assay getesteten Interaktionen richtete sich in erster Linie nach der Verfügbarkeit der humanen cDNA-Klone. In unserem Labor haben wir Zugriff auf eine Kollektion bestehend aus etwa 12.000 humanen cDNA-Klonen (*mammalian gene collection*, MGC-Kollektion). In dieser Kollektion waren 65 humane cDNA-Klone, die im H2H-Screen identifiziert wurden, enthalten und konnten somit für die weitere Validierung verwendet werden. Zusätzlich standen noch sechs Klone aus verschiedenen Kooperationen zur Verfügung. Die Rekombinationsklonierung wurde mit dem Gateway®-System von Invitrogen durchgeführt. Alle Klone der MGC-Kollektion lagen schon in einem sogenannten pDONR-Vektor vor. Die restlichen Klone wurden mittels PCR-Amplifizierung mit Rekombinationssequenzen versehen und in einen pDONR-Vektor rekombiniert. Anschließend wurden alle Klone aus dem pDONR-Vektor in die beiden LUMIER-Expressionsvektoren rekombiniert (siehe 2.3.6).



Abbildung 3.2 stellt neben dem Ablauf des LUMIER Bindungs-Assays auch die Expressionsvektoren schematisch dar. Im modifizierten LUMIER Bindungs-Assay ist das zu testende Protein X am Amino-Terminus an die *Renilla reniformis* Luziferase und das Protein Y am Amino-Terminus an ein Protein A-Tag gekoppelt. Die Fusion der Gene an verschiedene Tags kann später negative Auswirkungen auf die Proteinfaltung der getaggen Hybridproteine haben. Um eine veränderte Bindeeigenschaft der Hybridproteine auszuschließen wurden alle zu testenden Interaktionspartner in beide LUMIER-Expressionsvektoren kloniert, so dass jede Protein-Protein-Interaktion nicht nur in eine Richtung, sondern auch in die entgegengesetzte Richtung getestet werden konnte.

### 3.1.2 Validierung der Protein-Protein-Interaktionen mit dem modifizierten LUMIER Bindungs-Assay

Die Validierung der im H2H-Screen identifizierten Protein-Protein-Interaktionen wurde ebenfalls in enger Zusammenarbeit mit Manfred Kögl in Heidelberg durchgeführt, der den modifizierten LUMIER Bindungs-Assay etabliert hatte (siehe 7.4). Die Modifikationen betreffen den Protein A-Tag, denn im original LUMIER Assay nach Barrios-Rodiles *et al.* (3) wurde ein Flag-Tag verwendet (Abb. 3.2).

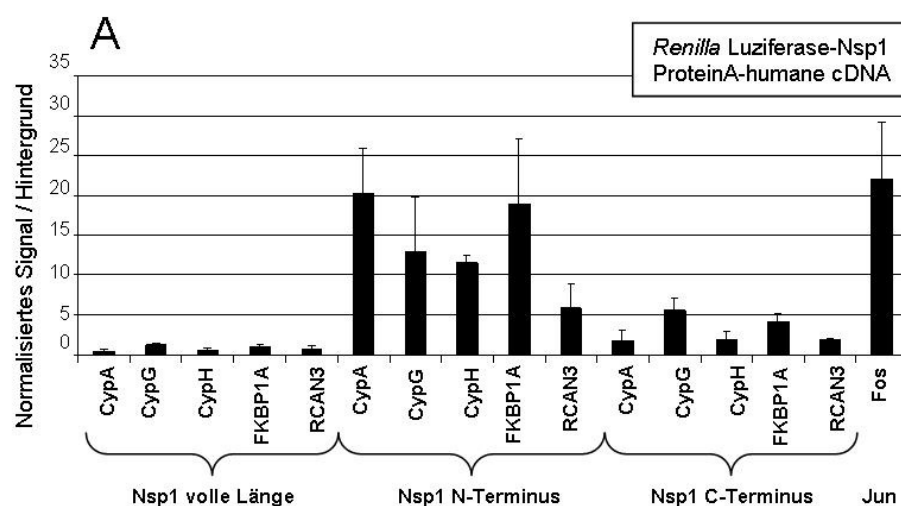


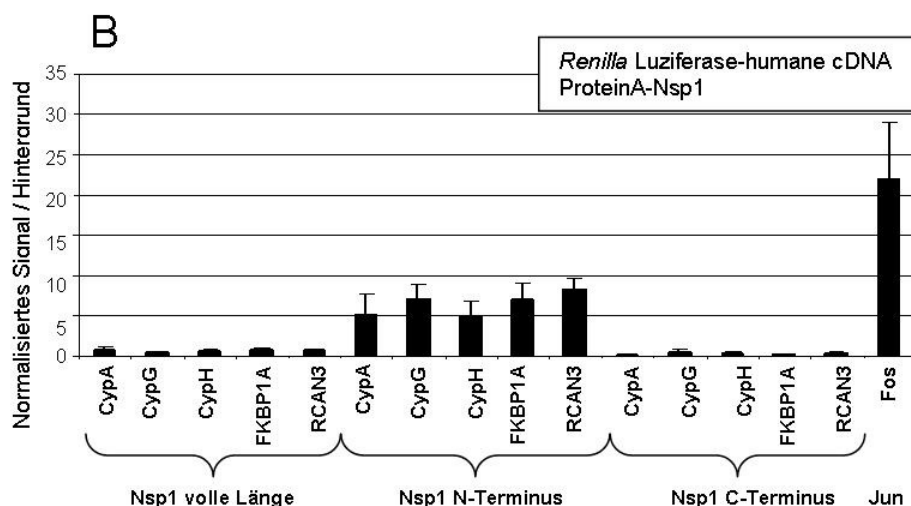
**Abb. 3.2.: Das modifizierte LUMIER Bindungs-Assay.**

Die beiden LUMIER-Expressionsvektoren werden in HEK293 Zellen kotransfiziert. Nach 40 h erfolgt die Lyse der Zellen und der gebildete Proteinkomplex kann durch die stabile Bindung des Protein A-Hybridproteins an IgG-gekoppelte magnetische Kügelchen (*magnetic beads*) aus dem Lysat gereinigt werden. Die Protein-Protein-Interaktion wird anschließend über die Aktivität der *Renilla reniformis* Luziferase des gebundenen und somit co-gereinigten Luziferase-Hybridproteins nachgewiesen.

Im ersten Schritt wurden die beiden LUMIER-Expressionsvektoren in HEK293 Zellen kotransfiziert. Nach zwei Tagen transients Überexpression wurden die Zellen lysiert und der gebildete Proteinkomplex konnte über IgG-gekoppelte, magnetische Kügelchen präzipitiert werden. Nach einigen Waschschrinen wurde dann die Luziferase Aktivität des gereinigten Komplexes gemessen und somit die Protein-Protein-Interaktion über die Aktivität des co-gereinigten Luziferase-Hybridproteins nachgewiesen. Zur Normalisierung der im Komplex gebundenen Luziferase Aktivität auf die Transfektionseffizienz wurde zusätzlich die Luziferase Aktivität in 10 % verdünntem Lysat gemessen. Jedes Luziferase-Hybridprotein wurde als Negativkontrolle gegen ein ProteinA-ProteinA-Hybridprotein getestet, um eine unspezifische Bindung an den ProteinA-Tag auszuschließen. Zur Datenauswertung wurde von jeder Interaktion das Verhältnis normalisiertes Signal / Hintergrund berechnet: Alle Luziferase Signale wurden logarithmisch transformiert und die gemessene Luziferase Aktivität des gereinigten Proteinkomplexes wurde durch das Signal des Lysates geteilt, um die Werte auf die Transfektionseffizienz zu normalisieren. Anschließend wurden die Werte zusätzlich auf eine unspezifische Hintergrundbindung korrigiert, indem die Werte der Negativkontrolle den normalisierten Werten jeder Probe abgezogen wurden.

Abbildung 3.3 zeigt beispielhaft das Ergebnis der ausgewerteten Daten des LUMIER Bindungs-Assays der Protein-Protein-Interaktionen des SARS-CoV Nsp1 Volllänge Protein und der N- und C-terminalen Fragmente mit verschiedenen humanen Proteinen.





**Abb. 3.3: LUMIER Ergebnis der Interaktionstests zwischen SARS-CoV Nsp1 und humanen Proteinen.**

Alle gemessenen Luziferase Daten wurden logarithmisch transformiert. Zur Normalisierung der Daten auf die Transfektionseffizienz wurde die gemessene Luziferase Aktivität des gereinigten Proteinkomplexes durch das Signal des Lysates geteilt. Die Korrektur auf unspezifische Hintergrundbindung erfolgte durch die anschließende Subtraktion der Werte der Negativkontrolle.

Das N-terminale Fragment des SARS-CoV Nsp1 gekoppelt an die *Renilla* Luziferase bestätigt die Interaktion mit den ProteinA-gekoppelten humanen Proteinen CypA, CypG, CypH, FKBP1A und RCAN3. Das Volllänge Nsp1 bestätigt die Interaktionen nicht. Das C-terminale Nsp1-Fragment zeigt leicht Interaktion mit den humanen Proteinen CypG und FKBP1A ( $n = 6$ ) (A). Das Nsp1 N-terminale Fragment gekoppelt an ProteinA bestätigt die Interaktionen mit den humanen Proteinen CypA, CypG, CypH, FKBP1A und RCAN3 mit geringerer Intensität. Das Volllänge Nsp1 und das C-terminale Nsp1-Fragment bestätigen die Interaktionen nicht ( $n=6$ ) (B). Die Interaktion zwischen Fos & Jun diente als Positivkontrolle.

Die Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem SARS-CoV Nsp1 und den humanen Proteinen CypA, CypG, CypH, FKBP1A und RCAN3 konnten mit der Kopplung des Nsp1 an die *Renilla* Luziferase deutlich besser validiert werden als mit der Kopplung des Nsp1 an den ProteinA-Tag (Abb. 3.3). Das ProteinA-Nsp1 Hybridprotein bestätigte die gleichen Interaktionen, jedoch mit wesentlich geringerer Intensität als das Luziferase-Nsp1 Hybridprotein. Das Volllänge Nsp1 bestätigte keine Interaktionen, so konnten sowohl im Test des ProteinA-Nsp1 Hybridproteins wie auch mit dem Luziferase-Nsp1 Hybridprotein die Interaktionen nur mit dem N-terminalen Fragment validiert werden. Die beiden humanen Proteine CypG und FKBP1A reagierten zudem leicht mit dem C-terminalen Nsp1-Fragment. Als Positivkontrolle des Assays wurde immer die Protein-Protein-Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren Fos und Jun mitgeführt.

Einige Genprodukte der humanen cDNAs interagierten mit mehreren SARS-CoV Proteinen, so dass 89 Interaktionen der im H2H-Screen identifizierten Protein-Protein-Interaktionen im LUMIER Bindungs-Assay validiert wurden. Tabelle 3.4 fasst die Ergebnisse des LUMIER Bindungs-Assays zusammen.

Tab. 3.4: LUMIER Bindungs-Assays zum Nachweis von Virus-Wirt-Proteininteraktionen

SARS-Protein	Genprodukt cDNA-Bank (Gensymbol)	z-Faktor	Verhältnis Signal/Hintergrund	SARS-Protein	Genprodukt cDNA-Bank (Gensymbol)	z-Faktor	Verhältnis Signal/Hintergrund
Nsp1	CypA	3,2	20,2	Nsp12	CHMP2B	1,3	4,2
Nsp1	FKBP1A	2,9	19,0	Nsp12	C1orf142	1,3	3,1
Nsp1	CypG	2,8	13,0	Nsp12	TPSAB1	1,1	5,0
Nsp1	CypH	2,7	11,5	Nsp12	POLR2B	0,9	4,0
Nsp1	RCAN3	2,5	8,3	Nsp12	TBCB	0,8	2,9
Nsp1	LAS1L	1,4	5,9	Nsp12	TPSB2	0,7	1,6
Nsp2	SERPING1	1,5	10,7	Nsp12	MNAT1	0,6	2,1
Nsp2	DEDD2	0,9	2,7	Nsp12	PEX10	0,5	4,7
Nsp2	NPHP3	-0,1	1,2	Nsp12	HOXC6	0,5	2,0
Nsp2	SLC46A3	-0,5	1,1	Nsp12	CCHCR	0,3	1,8
Nsp3	FAM108A1	2,5	12,6	Nsp12	MGC4172	0,3	1,5
Nsp3	MKRN2	1,1	3,3	Nsp12	GPRASP2	0,2	1,7
Nsp3	MKRN3	1,1	3,4	Nsp13	RYBP	1,3	5,3
Nsp3	ZNF410	0,9	2,2	Nsp13	CHEK2	1,1	2,5
Nsp4	NMB	0,7	1,7	Nsp13	SERPING1	0,4	2,6
Nsp4	LAS1L	0,7	2,3	Nsp13	OCIAD2	-0,3	1,0
Nsp5	FKBP1A	1,2	5,2	Nsp13	MARK3	-0,4	1,1
Nsp5	N4BP2L2	0,2	1,3	Nsp13	N4BP2L2	-0,5	0,7
Nsp5	XPA	0,2	2,1	Nsp13	MARK2	-0,6	1,2
Nsp5	C20orf27	0,1	1,4	Nsp14	SERPING1	1,1	3,2
Nsp6	ISLR	0,8	3,0	Nsp14	DCTN2	0,7	2,4
Nsp7	DDAH2	1,8	7,5	Nsp15	CYPA	0,3	2,1
Nsp7	MIF4GD	1,7	7,7	ORF3	DCTN2	0,6	2,2
Nsp7	RNF128	0,6	2,4	ORF3	YWHAE	0,5	2,8
Nsp7	BAP1	0,6	1,8	ORF3	PFDN5	0,0	1,6
Nsp7	NAE1	0,5	2,4	ORF4	DCTN2	0,6	2,1
Nsp7	ARL4D	0,4	2,1	ORF4	SERPING1	0,0	1,2
Nsp7	PLEKHO1	0,3	1,9	ORF4	ALB	-0,2	1,0
Nsp7	LCP1	0,1	1,7	ORF7	DCTN2	1,8	5,1
Nsp7	NCOA5	0,0	1,5	ORF7	BRF1	-0,2	1,2
Nsp7	YWHAE	-0,3	1,2	ORF8	VKORC1	1,5	4,1
Nsp8	NOMO3	2,9	10,4	ORF8	SMOC1	0,0	1,4
Nsp8	H2AFY2	1,2	7,6	ORF9	CAMLG	1,5	6,3
Nsp8	TERF1	1,1	2,6	ORF9	SERPING1	-0,3	1,4
Nsp8	SERPING1	0,4	1,9	ORF10	BAT3	2,0	6,7
Nsp8	EIF4B	0,1	2,3	ORF13	RYBP	4,9	78,4
Nsp8	BZW2	0,1	2,3	ORF13	MARK3	2,7	13,0
Nsp9	C1orf142	1,7	6,1	ORF13	RPS20	1,2	3,2
Nsp9	CHMP2B	1,1	4,8	ORF13	PSMA2	1,1	3,5
Nsp9	C1orf63	0,9	2,8	ORF13	RPS17	0,0	1,8

SARS-Protein	Genprodukt cDNA-Bank (Gensymbol)	z-Faktor	Verhältnis Signal/Hintergrund	SARS-Protein	Genprodukt cDNA-Bank (Gensymbol)	z-Faktor	Verhältnis Signal/Hintergrund
Nsp9	NPHP3	0,7	2,6	ORF14	HGS	2,4	9,2
Nsp9	FAHD1	0,2	1,1	ORF14	DCTN2	1,4	3,8
Nsp9	ENO1	-0,6	0,8	ORF14	SERPING1	0,4	1,9
<b>Nsp12</b>	<b>PFDN5</b>	<b>2,0</b>	<b>4,4</b>	ORF14	C7orf36	-0,3	1,2
<b>Nsp12</b>	<b>NDUFA10</b>	<b>1,7</b>	<b>4,4</b>				

Von diesen 89 getesteten Interaktionen zeigten 37 ein positives Ergebnis, was eine Bestätigungsrate von 42 % ergibt. Als positiv wurden solche Interaktionen bewertet, die einen z-Faktor  $\geq 1$  hatten. Eine ausführliche Tabelle, mit Beschreibung der humanen cDNAs ist im Anhang zu finden.

Neben den im H2H-Screen identifizierten Protein-Protein-Interaktionen wurden zusätzlich einige ausgewählte Interaktionen, deren cDNA-Klone ebenfalls verfügbar waren, im modifizierten LUMIER Bindungs-Assay untersucht. Zu diesen Interaktionen gehörte zum Beispiel Cyclophilin (Cyp) B, welches der Proteinfamilie der Cyclophiline angehört und von denen drei weitere Vertreter (CypA, CypG und CypH) im H2H-Screen gefunden wurden. Zudem wurden das Protein Calcineurin und ein Vertreter der NFAT-Proteinfamilie NFAT3 auf eine Interaktion mit dem SARS-CoV Nsp1 im LUMIER Bindungs-Assay untersucht. Auch die Ergebnisse der Interaktionen mit dem Volllänge SARS-CoV Nsp1 sowie dessen N-terminalen und C-terminalen Fragment sind in dieser Tabelle zu finden. Insgesamt wurden somit 108 Protein-Protein-Interaktionen im LUMIER Bindungs-Assay analysiert.

**Tab. 3.5: LUMIER Bindungs-Assays zum Nachweis von Virus-Wirt-Proteininteraktionen mit Proteindomänen**

SARS-Protein	Genprodukt cDNA-Bank (Gensymbol)	z-Faktor	Verhältnis Signal/Hintergrund	SARS-Protein	Genprodukt cDNA-Bank (Gensymbol)	z-Faktor	Verhältnis Signal/Hintergrund
<b>Nsp1-fl</b>	<b>Calcineurin</b>	<b>1,4</b>	<b>24,5</b>	<b>Nsp1-N</b>	<b>CYPG</b>	<b>2,8</b>	<b>13,0</b>
Nsp1-fl	NFAT3	-2,2	0,5	<b>Nsp1-N</b>	<b>CYPH</b>	<b>2,7</b>	<b>11,5</b>
Nsp1-fl	CYPA	-0,8	0,5	<b>Nsp1-N</b>	<b>FKBP1A</b>	<b>2,9</b>	<b>19,0</b>
Nsp1-fl	CYPB	-0,6	0,9	<b>Nsp1-N</b>	<b>RCAN3</b>	<b>1,7</b>	<b>5,8</b>
Nsp1-fl	CYPG	0,9	1,3	Nsp1-C	Calcineurin	0,3	5,0
Nsp1-fl	CYPH	-0,7	0,6	Nsp1-C	NFAT3	-2,1	0,3
Nsp1-fl	FKBP1A	-0,5	1,0	Nsp1-C	CYPA	0,4	1,8
Nsp1-fl	RCAN3	-0,7	0,7	Nsp1-C	CYPB	-0,4	1,2

SARS-Protein	Genprodukt cDNA-Bank (Gensymbol)	z-Faktor	Verhältnis Signal/Hintergrund	SARS-Protein	Genprodukt cDNA-Bank (Gensymbol)	z-Faktor	Verhältnis Signal/Hintergrund
Nsp1-N	Calcineurin	-0,9	0,6	<b>Nsp1-C</b>	<b>CYPG</b>	<b>2,3</b>	<b>5,6</b>
Nsp1-N	NFAT3	-0,2	1,4	Nsp1-C	CYPH	0,5	1,9
<b>Nsp1-N</b>	<b>CYPA</b>	<b>3,2</b>	<b>20,2</b>	<b>Nsp1-C</b>	<b>FKBP1A</b>	<b>1,3</b>	<b>4,2</b>
<b>Nsp1-N</b>	<b>CYPB</b>	<b>1,2</b>	<b>4,2</b>	Nsp1-C	RCAN3	0,5	2,0

### 3.2 Funktionelle Analyse ausgewählter Protein-Proteininteraktionen

Nach der Validierung der im H2H-Screen identifizierten Protein-Protein-Interaktionen mittels des modifizierten LUMIER Bindungs-Assays wurden die SARS-CoV Interaktionspartner mit der entsprechenden Literatur verglichen, um Hinweise für anschließende funktionelle Analysen zu erhalten.

Wie oben erwähnt, reagierte das SARS-CoV Nsp1 mit den humanen Proteinen CypA, CypG, CypH, FKBP1A und RCAN3. Bei diesen Interaktionen war auffällig, dass alle humanen Interaktionspartner Regulatoren des Calcineurin/NFAT-Signalwegs sind. Bei den Proteinen CypA, CypG und CypH handelt es sich um Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPI), auch Cyclophiline (Cyp) genannt. FKBP1A ist der Hauptvertreter der sogenannten FK506 Bindeproteine (FKBPs) und RCAN3 ist ein Vertreter der Calcipressine. Wie in der Einleitung beschrieben, gehören die Cyclophiline und FK506-Bindeproteine zur Proteinsuperfamilie der Immunophiline. Neben ihren Aufgaben bei Proteintransport, Proteinfaltung oder Proteinaufbau dienen Immunophiline auch als zellulärer Rezeptor von Cyclosporin A (CspA) oder FK506. CspA und FK506 wirken, nach Bindung an die intrazellulären Immunophiline, inhibitorisch auf die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade (siehe 1.3.3).

Um die Wirkung des SARS-CoV Nsp1 auf die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade näher zu untersuchen wurden die folgenden Protein-Protein-Interaktionen zu den humanen Proteinen der Immunophilin- und Calcipressin-Familie für weitere funktionelle Analysen ausgewählt.

**Tab. 3.6: Protein-Protein-Interaktionen des SARS-CoV Nsp1 mit Proteinen der Immunophilin- und Calcipressin-Familie**

SARS-CoV	humane cDNA	Funktion der humanen cDNA	Kategorie H2H-Screen	z-Faktor LUMIER-Assay
Nsp1	CypA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	„low confidence“ Interaktion	3,2
Nsp1	CypG	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)	„low confidence“ Interaktion	2,8
Nsp1	CypH	peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H)	„low confidence“ Interaktion	2,7
Nsp1	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa	„low confidence“ Interaktion	2,9
Nsp1	RCAN3	RCAN family member 3	„low confidence“ Interaktion	2,5

### 3.2.1 Etablierung eines Dual-Luziferase Reporterassays

Zur funktionellen Analyse der Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem SARS-CoV Nsp1 und den regulatorischen Proteinen der Immunophilinsuperfamilie wurde ein Luziferase Reporterassay etabliert mit dem mögliche Auswirkungen des SARS-CoV Nsp1 auf die Expression NFAT-regulierter Gene untersucht werden können.

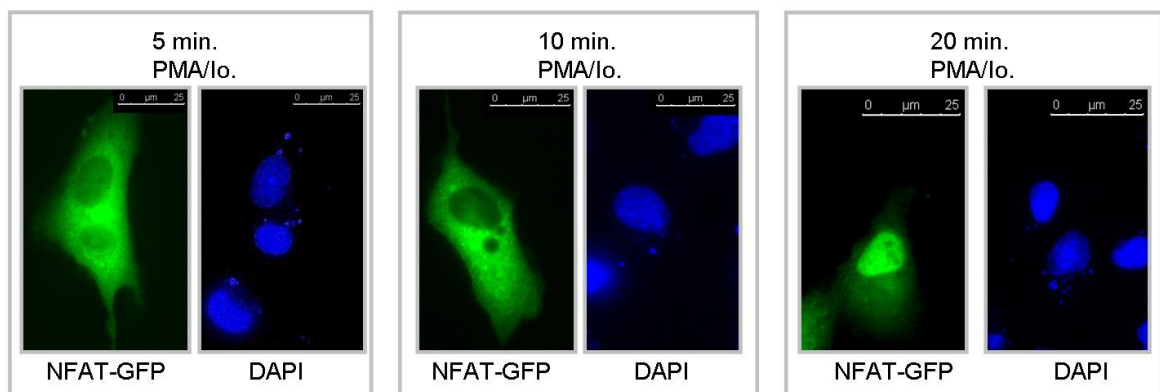
Hierfür wurden die einzelnen Komponenten des Calcineurin/NFAT-Signalwegs in HEK293 Zellen kotransfiziert. Zu den einzelnen Komponenten zählen die Serin/Threonin-Proteinphosphatase Calcineurin (CnA), ein Vertreter der NFAT-Proteinfamilie (z.B.: NFAT3) und ein NFAT-Reporterplasmid (NFAT-luc), welches eine *Firefly* Luziferase unter der Kontrolle von vier NFAT-Bindestellen kodiert. Darüber hinaus wurde zusätzlich ein Plasmid kotransfiziert, welches eine konstitutive *Renilla* Luziferase exprimiert, so dass hinsichtlich der Transfektionseffizienz normalisiert werden konnte.

Wie in der Einleitung beschrieben, beginnt die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade mit einer Rezeptorstimulation und einem assoziierten Kalziuminflux in die Zelle. Um diese Rezeptorstimulation zu simulieren wurden HEK293 Zellen nach der Transfektion mit Phorbol-12-Myristate-13-Acetat (PMA) und Ionomycin stimuliert. PMA aktiviert die Proteinkinase C und sorgt somit für die Öffnung von Kalziumkanälen, wohingegen Ionomycin, ein Kalzium-Ionophor, den Transport von Kalzium durch die Membran ermöglicht (13,113).

Die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin führt zur Aktivierung der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade mit folgendem Ablauf:

1. Kalziuminflux in die Zelle
2. Calcineurin bindet intrazelluläres Kalzium und wird aktiviert
3. aktiviertes Calcineurin dephosphoryliert zytoplasmatisches NFAT
4. Translokation von NFAT in den Kern
5. NFAT bindet an die vierfach Bindestelle des *Firefly*-Reporterplasmids
6. *Firefly* Luziferase wird transkribiert und translatiert und kann quantitativ gemessen werden

In einem Vorversuch wurde der Effekt von PMA und Ionomycin auf ein GFP-gekoppeltes NFAT-Protein getestet. Das NFAT-GFP Hybridprotein wurde in HEK293 Zellen überexprimiert und nach 24 h wurden die Zellen für 5, 10 oder 20 Minuten mit PMA und Ionomycin stimuliert. Nach 20 minütiger Stimulation der Zellen erfolgte die Translokation des NFAT-GFP Hybridproteins in den Zellkern (Abb. 3.4).

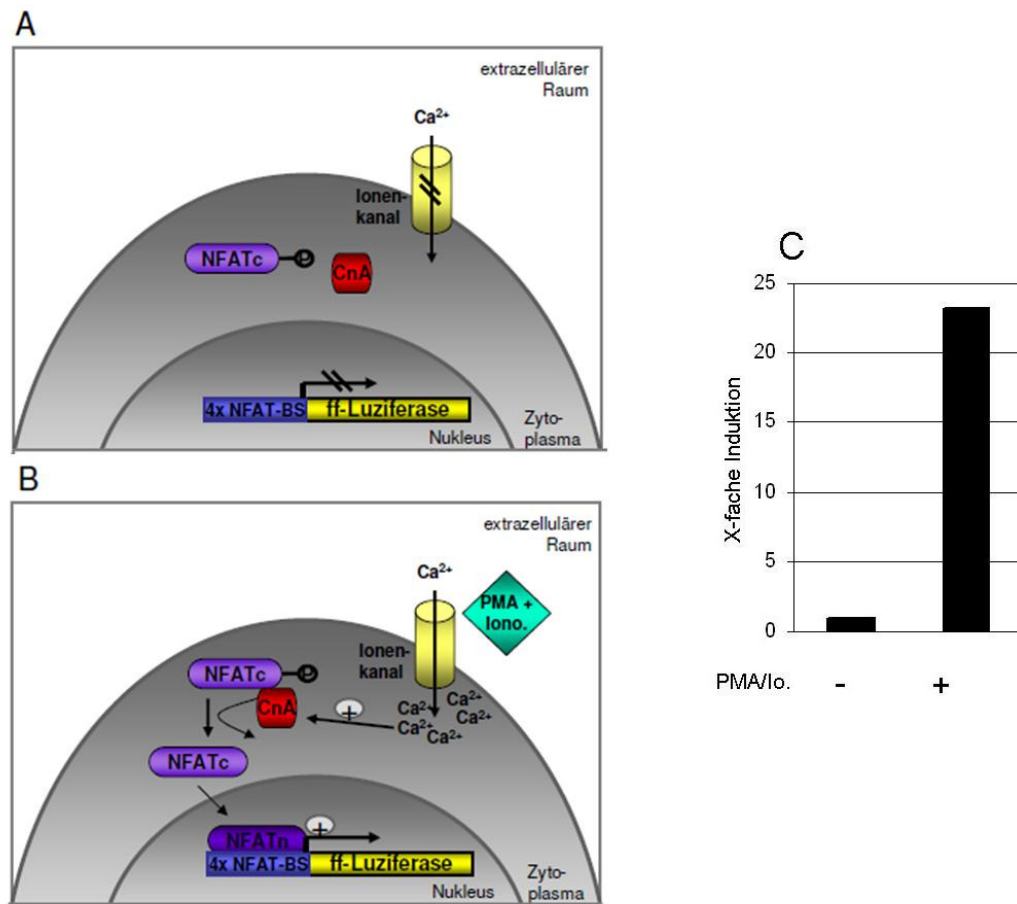


**Abb. 3.4: Translokation des NFAT-GFP in den Kern.**

Die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin (PMA/Io.) aktiviert die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade und führt innerhalb von 20 Minuten zur Translokation des NFAT-GFP Hybridproteins in den Kern.

Der Effekt der Stimulation durch PMA und Ionomycin hält über Stunden an, so dass im etablierten Assay die Zellen 19 Stunden nach der Transfektion und Stimulation lysiert und die Expression NFAT-regulierter Gene mit Hilfe des Luziferase-Signals gemessen werden kann (siehe 2.6.5).



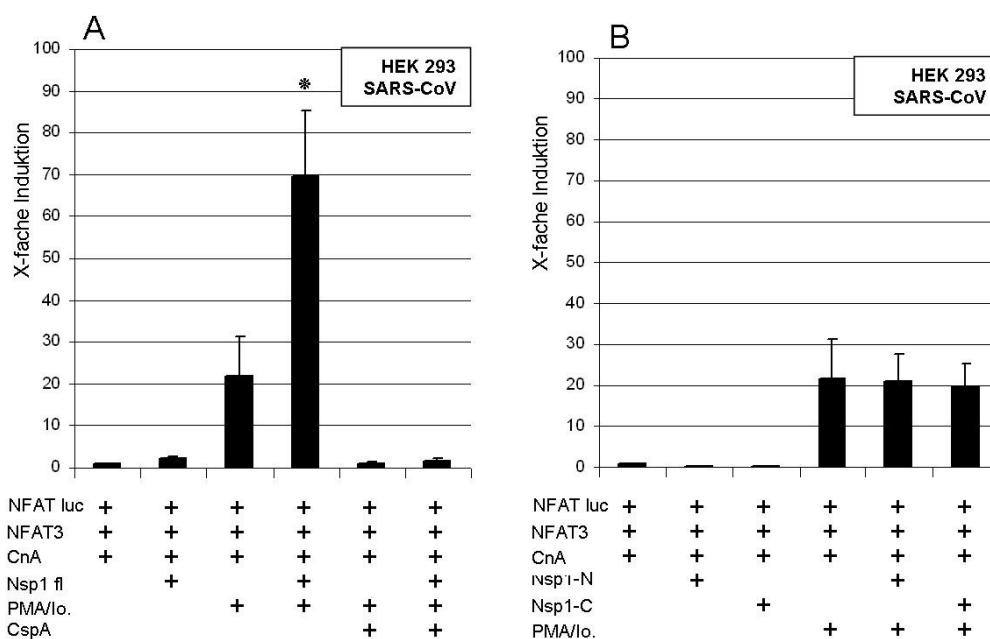


**Abb. 3.5: Schematische Darstellung des NFAT-Reporterassays.**

HEK293 Zellen wurden transient kotransfiziert mit den einzelnen Komponenten der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade wie Calcineurin (CnA), ein Protein der NFAT-Familie (NFAT), das *Firefly* Reporterplasmid und ein Plasmid, kodierend für eine konstitutiv aktive *Renilla* Luziferase. Das Reporterplasmid kodiert die *Firefly*-Luziferase unter der Kontrolle von vier NFAT-Bindestellen (4xNFAT-BS) (A). Um die Rezeptorstimulation zu simulieren werden die Zellen nach der Transfektion mit PMA und Ionomycin (PMA/Io.) stimuliert, wodurch ein Kalziuminflux in die Zelle entsteht. CnA bindet Kalzium, wird aktiviert und dephosphoryliert NFAT, wodurch dieses in den Kern transloziert wird und die Expression NFAT-regulierter Gene bewirkt (B). Die Stimulation der Zellen mit PMA/Io. führt zur messbaren Expression der *Firefly*-Luziferase des NFAT-Reporterplasmids. Um auf die Transfektionseffizienz zu normalisieren wurde die *Firefly* Luziferase Aktivität durch die konstitutiv aktive *Renilla* Luziferase Aktivität geteilt (C).

### 3.2.2 SARS-CoV Nsp1 verstärkt die Expression NFAT-regulierter Gene

Um einen Einfluss des SARS-CoV Nsp1 auf die Expression NFAT-regulierter Gene zu untersuchen, wurde das SARS-CoV Nsp1 zusätzlich im etablierten Reporterassay exprimiert. Hierfür wurde ein Expressionsplasmid, welches das SARS-CoV Nsp1 kodiert bzw. als Kontrolle der Leervektor, zusätzlich in HEK293 Zellen kotransfiziert und der Assay, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die Protein-Protein-Interaktionen des SARS-CoV Nsp1 mit den Regulatoren der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade wurden sowohl im H2H-Screen wie auch im LUMIER Bindungs-Assay, nicht mit dem Volllänge Nsp1 sondern mit den N- und C-terminalen Fragmenten identifiziert. Aus diesem Grund wurden auch die Auswirkungen dieser beiden Fragmente des SARS-CoV Nsp1 auf die Expression NFAT-regulierter Gene untersucht.



**Abb. 3.6: SARS-CoV Nsp1 induziert die NFAT-regulierte Genexpression.**

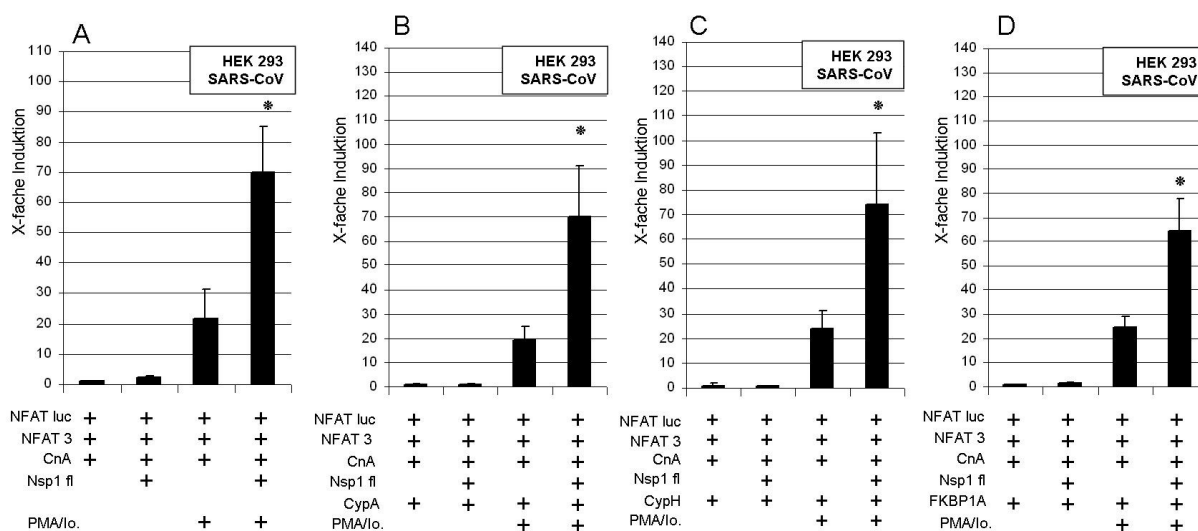
HEK293 Zellen wurden transient kotransfiziert mit dem NFAT-Reporterplasmid (NFAT luc) und Expressionsplasmiden die NFAT3, Calcineurin (CnA) und das Volllänge SARS-CoV Nsp1 (Nsp1 fl) kodieren oder den Leervektor. Nach der Transfektion wurden die Zellen in Abwesenheit oder mit PMA und Ionomycin (PMA/Io.) oder mit PMA/Io. und zusätzlich Cyclosporin A (CspA) kultiviert (n = 5) (A). Reporterassay mit dem N- oder C-terminalen Fragment des SARS-CoV Nsp1. Nach der Transfektion wurden die Zellen in Abwesenheit oder mit PMA und Ionomycin (PMA/Io.) kultiviert (n = 3) (B). Die Luciferase Messung erfolgte 19 h nach Transfektion.

\*  $P < 0.05$  vgl. mit PMA/Io. stimulierten Zellen ohne SARS-CoV Nsp1 Überexpression.

Das SARS-CoV Nsp1 modulierte deutlich die Expression NFAT-regulierter Gene (Abb. 3.6 A). In den ersten beiden Testansätzen fand keine Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin statt. Das gemessene Luciferase Signal war gering, wobei ein minimaler Anstieg der Expression NFAT-regulierter Gene durch das Volllänge Nsp1 zu erkennen war (Testansatz 2). Die Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin im dritten Testansatz führte zur Induktion der Expression NFAT-regulierter Gene. Die zusätzliche Koexpression des Volllänge Nsp1 mit paralleler Stimulation der Zellen führte zu einer Erhöhung des Luciferase-Signals um das 3,2-fache, verglichen mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen ohne SARS-CoV Nsp1 Überexpression. Die Behandlung der Zellen mit Cyclosporin A (CspA), einem Immunsuppressivum das die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade hemmt, diente als Kontrolle und zeigte, dass der Anstieg des Luciferase-Signals tatsächlich auf der Aktivierung der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade beruht. Die CspA behandelten Zellen zeigten keinerlei Expression NFAT-regulierter Gene. Auch der Anstieg der Expression, vermittelt durch das Volllänge SARS-CoV Nsp1, wurde durch CspA vollständig unterdrückt. Die Überexpressionen des N- oder C-terminalen Fragmentes des SARS-CoV Nsp1 zeigten keine Modulation der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade (Abb. 3.6 B). Die gemessenen Luciferase Signale lagen unabhängig von der Koexpression der beiden Fragmente im

Bereich der Signalstärke der stimulierten Zellen ohne SARS-CoV Nsp1 Überexpression. Wie im H2H-Screen und auch im LUMIER Bindungs-Assay gezeigt, vermittelte das N-terminale Fragment des SARS-CoV Nsp1 die Protein-Protein-Interaktion zu den Proteinen der Immunophilin-Familie, für einen funktionellen Effekt wird jedoch das Volllänge Protein benötigt.

Um den Einfluss der im H2H-Screen identifizierten Regulatoren der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade näher zu analysieren, wurden diese mittels Reporterassay untersucht. Hierfür wurden zunächst die Immunophiline CypA, CypH und FKBP1A, jeweils einzeln, zusätzlich zu den verschiedenen Komponenten des Signalwegs und dem Volllänge SARS-CoV Nsp1 in HEK293 Zellen überexprimiert. Das Immunophilin CypG wurde in den funktionellen Analysen nicht weiter verwendet, da der cDNA-Klon einige Mutationen beinhaltet.



**Abb. 3.7: Einfluss von CypA, CypH und FKBP1A auf die Expression NFAT-regulierter Gene.**

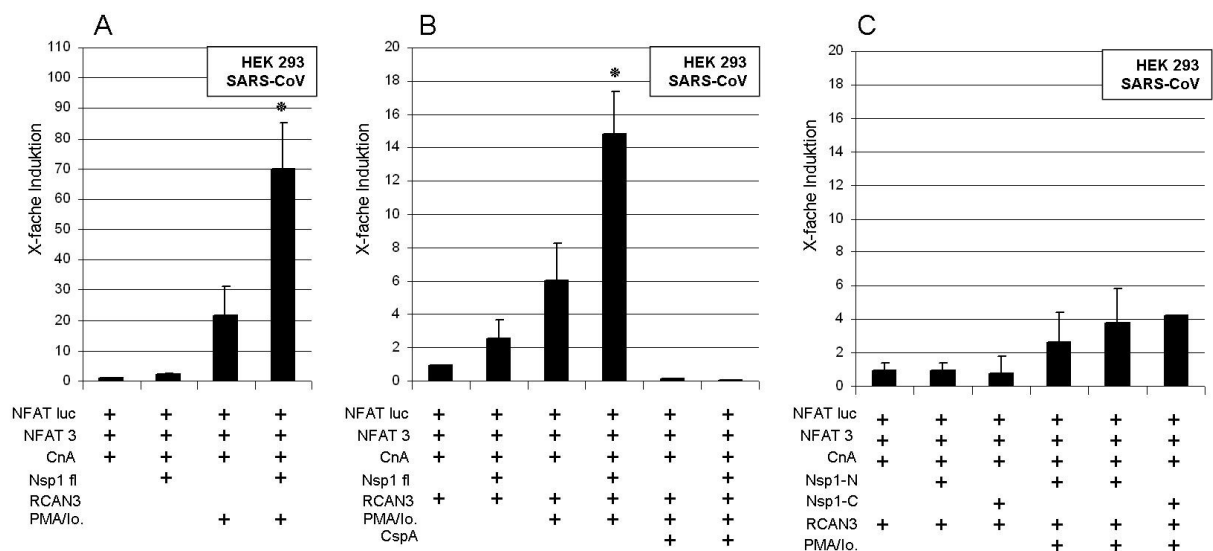
HEK293 Zellen wurden transient kotransfiziert mit NFAT luc und Expressionsplasmiden die NFAT3, CnA, SARS-CoV Nsp1 fl oder den Leervektor (n = 5) (A) und CypA (n = 3) (B) oder CypH (n = 3) (C) oder FKBP1A (n = 3) (D) kodieren. Nach der Transfektion wurden die Zellen in Abwesenheit oder mit PMA/Io. kultiviert. Die Luziferase Messung erfolgte 19 h nach Transfektion.

\*  $P < 0.05$  vgl. mit PMA/Io. stimulierten Zellen ohne SARS-CoV Nsp1 Überexpression.

Die zusätzlichen Koexpressionen der drei regulatorischen Immunophiline führten zu keinen weiteren Modulationen der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade. Die SARS-CoV Nsp1 abhängige Induktion der Expression NFAT-regulierter Gene ist in allen drei Experimenten reproduzierbar vorhanden. Weitere Einflüsse oder Funktionen der Regulatoren CypA, CypH oder FKBP1A konnten nicht festgestellt werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, gehört RCAN3 zur Familie der Calcipressine (siehe 1.3.3). Die Expression der Calcipressine steht unter der Regulation der Calcineurin/NFAT-

Signalkaskade. Ein Anstieg der Expression NFAT-regulierter Gene führt somit auch zur Anreicherung der Calcipressine im Zytoplasma. Calcipressine binden direkt an Calcineurin und unterbinden dessen Phosphatase Aktivität wodurch die Translokation von NFAT in den Kern und schließlich die Expression NFAT-regulierter Gene gehemmt wird. Calcipressine sind verantwortlich für eine negative *feedback*-Kopplung. Die zusätzliche Koexpression des Calcipressins RCAN3 zeigt einen Einfluss auf die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade.



**Abb. 3.8: Einfluss des Calcipressins RCAN3 auf die Expression NFAT-regulierter Gene.**

HEK293 Zellen wurden transient kotransfiziert mit NFAT luc und Expressionsplasmiden die NFAT3, CnA, SARS-CoV Nsp1 fl oder den Leervektor (n = 5) (A) oder SARS-CoV Nsp1 fl oder den Leervektor und RCAN3 (n = 6) (B) oder das N- oder C-terminale Fragment des SARS-CoV Nsp1 oder den Leervektor und RCAN3 (n = 3) (C) kodieren. Nach der Transfektion wurden die Zellen in Abwesenheit oder mit PMA/Io. kultiviert. Die Luziferase Messung erfolgte 19 h nach Transfektion.

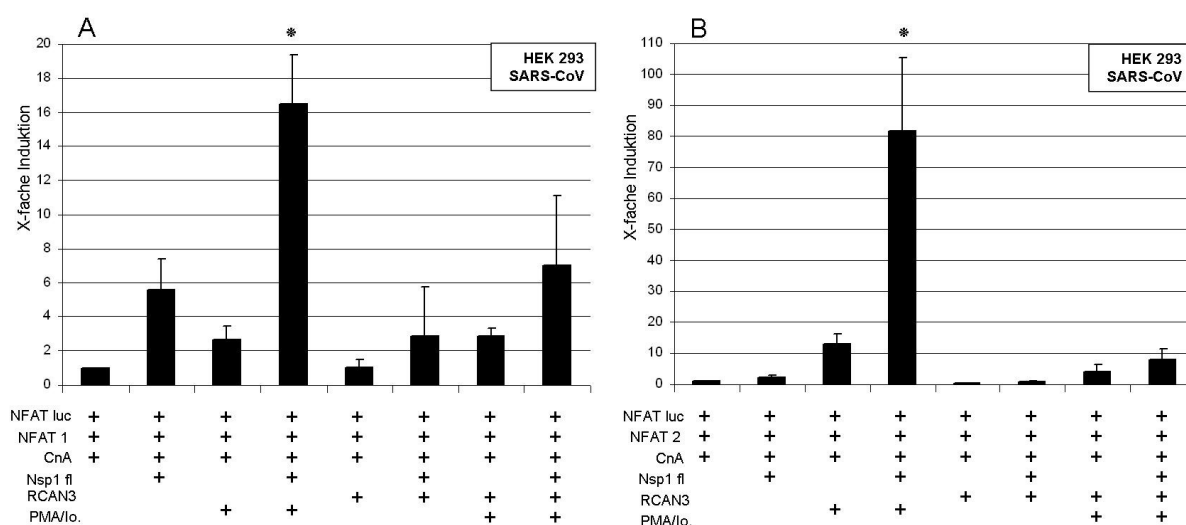
\*  $P < 0.05$  vgl. mit PMA/Io. stimulierten Zellen ohne SARS-CoV Nsp1 Überexpression.

Die Koexpression des Calcipressins RCAN3 hatte eine dämpfende Wirkung auf alle Luziferase Signale. Im Experiment ohne RCAN3 Koexpression lag der Luziferase Wert, der mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen, um das 22-fache über dem Wert der nicht-stimulierten Zellen und der Wert, der mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen bei gleichzeitiger SARS-CoV Nsp1 Koexpression, lag um das 70-fache über dem Wert der nicht-stimulierten Zellen (Abb. 3.8 A). Im Experiment mit RCAN3 Koexpression lag der Luziferase Wert, der mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen, nur noch um das 6-fache über dem Wert der nicht-stimulierten Zellen und die zusätzliche SARS-CoV Nsp1 Koexpression führte zu einem Luziferase Wert, der um das 14-fache über dem Wert der nicht-stimulierten Zellen lag. Der Anstieg der Expression NFAT-regulierter Gene durch das Volllänge SARS-CoV Nsp1 war trotz RCAN3 Expression nachweisbar. Sogar in den nicht mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen (Testansatz 1 und 2) war ein Nsp1 abhängiger Anstieg der Expression zu sehen (Abb. 3.8 B). Die Koexpressionen des N- oder C-terminalen Fragments des SARS-

CoV Nsp1 mit dem Calcipressin RCAN3 führten zu keiner Modulation der Expression NFAT-regulierter Gene (Abb. 3.8 C).

Durch die allgemeine Dämpfung aller Signale in diesem Assay wird die Aufgabe von RCAN3 als negativer Regulator des Calcineurin/NFAT-Signalwegs deutlich. Anders als bei der Behandlung der Zellen mit CspA (siehe Abb. 3.6) wird der SARS-CoV Nsp1 vermittelte Anstieg der Expression NFAT-regulierter Gene durch die Expression von RCAN3 nicht gehemmt. SARS-CoV Nsp1 ist nicht in der Lage, die negative Feedbackschleife, die RCAN3 vermittelt, zu verhindern. Wäre dies der Fall, so müsste das Signal die gleiche Stärke wie in den Versuchen ohne RCAN3 Koexpression erreichen.

In allen bisher dargestellten Reporterassays wurde NFAT3 als Vertreter der NFAT-Familie überexprimiert. NFAT3 wird nur in geringen Mengen in lymphatischen Geweben exprimiert, stattdessen eher in Zellen von Lunge, Niere oder dem Herzen (113). Aus diesem Grunde wurde das Reporterassay ebenfalls mit den beiden Vertretern NFAT1 und NFAT2 durchgeführt, um zu prüfen, ob das SARS-CoV Nsp1 auch in der Lage ist, die Expression NFAT-regulierter Gene in lymphatischen Geweben zu erhöhen.



**Abb. 3.9: SARS-CoV Nsp1 induziert die NFAT-regulierte Genexpression (NFAT1 und NFAT2).**

HEK293 Zellen wurden transient kotransfiziert mit NFAT luc und Expressionsplasmiden die NFAT1 (A) oder NFAT2 (B), Calcineurin (CnA), RCAN3 oder den Leervektor und das Volllänge SARS-CoV Nsp1fl oder den Leervektor kodieren (n = 3). Nach der Transfektion wurden die Zellen in Abwesenheit oder mit PMA/Io. kultiviert. Die Luziferase Messung erfolgte 19 h nach Transfektion.

\*  $P < 0.05$  vgl. mit PMA/Io. stimulierten Zellen ohne SARS-CoV Nsp1 Überexpression.

Die durch das SARS-CoV Nsp1 vermittelte Modulation der Expression NFAT-regulierter Gene wurde durch die Koexpression von NFAT1 oder NFAT2 verstärkt (Abb. 3.9). Im Experiment mit NFAT3 Koexpression lag der Luziferase Wert, der mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen, um das 22-fache über dem Wert der nicht-stimulierten Zellen und der Wert, der mit PMA und Ionomycin stimulierten Zellen bei gleichzeitiger SARS-CoV Nsp1

Koexpression, lag um das 70-fache über dem Wert der nicht-stimulierten Zellen. Die Expression NFAT-regulierter Gene stieg um den Faktor 3,2 an (Abb.3.8). Bei NFAT1 Koexpression lag der Wert der stimulierten Zellen nur um das 3-fache über dem Wert nicht-stimulierter Zellen und der Wert stimulierter Zellen mit gleichzeitiger SARS-CoV Nsp1 Koexpression lag um das 16-fache über dem Wert nicht-stimulierter Zellen. Die Expression NFAT-regulierter Gene stieg in diesem Experiment um den Faktor 6,3 an. Zudem stieg in diesem Experiment die Expression NFAT-regulierter Gene durch die alleinige SARS-CoV Nsp1 Koexpression, ohne Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin, stark an (Abb. 3.9 A).

Bei NFAT2 Koexpression lag der Wert der stimulierten Zellen um das 13-fache über dem Wert nicht-stimulierter Zellen und der Wert stimulierter Zellen mit gleichzeitiger SARS-CoV Nsp1 Koexpression lag um das 82-fache über dem Wert nicht-stimulierter Zellen. Die Expression NFAT-regulierter Gene stieg auch in diesem Experiment um den Faktor 6,3 an (Abb. 3.9 B).

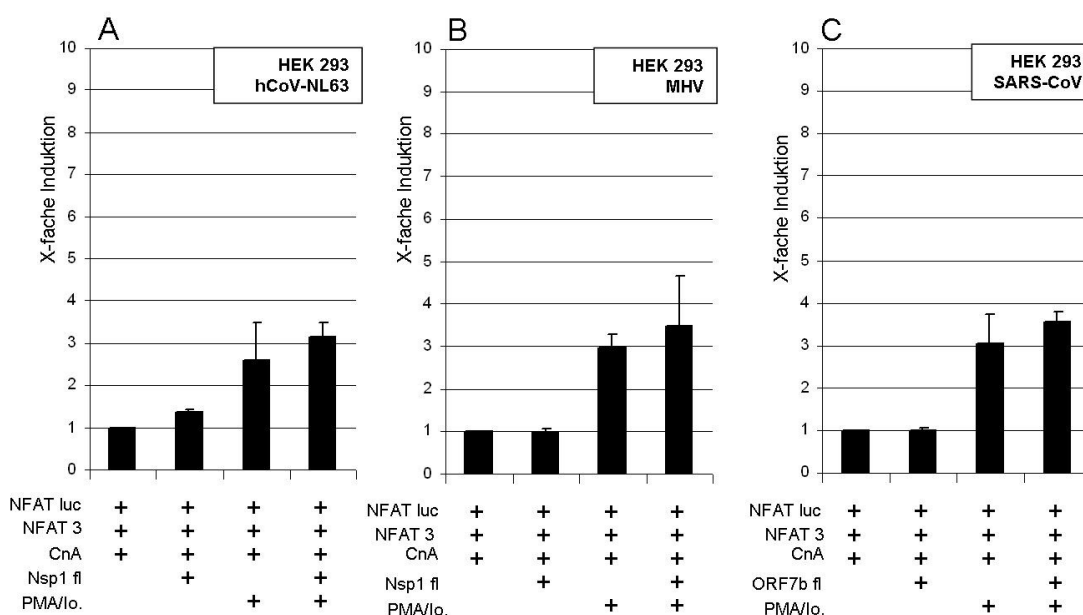
Die RCAN3 Koexpression hatte eine dämpfende Wirkung auf alle Luziferase Signale, die SARS-CoV Nsp1 vermittelte Modulation der Expression NFAT-regulierter Gene war im Experiment mit NFAT2 Koexpression durch RCAN3 beeinflusst. Ein SARS-CoV Nsp1 vermittelter Anstieg der Luziferase Signale war kaum zu erkennen (Abb. 3.9 B). Im Experiment mit NFAT1 war dieser Effekt nicht festzustellen. Die Expression NFAT-regulierter Gene stieg um den gleichen Faktor an wie im Experiment mit NFAT3 Koexpression.

Die bisher aufgeführten Experimente zeigen eine deutliche Modulation der Expression NFAT-regulierter Gene durch das SARS-CoV Nsp1. Das SARS-CoV Nsp1 wirkt nicht, wie CspA oder FK506, hemmend auf die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade. Im Gegenteil, die Expression NFAT-regulierter Gene wird stark hochreguliert.

### **3.2.3 Die Verstärkung der Expression NFAT-regulierter Gene ist SARS- spezifisch**

Um zu überprüfen, ob der Effekt des SARS-CoV Nsp1 auf die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade SARS-spezifisch ist oder eine allgemeine coronavirale Eigenschaft des Nsp1 ist, wurde das Reporterassay mit der Koexpression des Nsp1 des humanen Coronavirus NL63 (HCoV-NL63) sowie des Nsp1 des Murinen Hepatitis Virus (MHV) durchgeführt. HCoV-NL63 ist ein vergleichsweise harmloses Coronavirus, das im Menschen eine Infektion des oberen Respirationstraktes verursacht (141). Das murine Hepatitisvirus MHV infiziert hingegen Nagetiere und verursacht dort respiratorische Infektionen sowie Hepatitis, Enteritis und auch Enzephalitis (32).

Desweiteren wurde das Reporterassay noch mit der Koexpression eines zweiten SARS-CoV Proteins ORF7b durchgeführt. Das SARS-CoV ORF7b wurde zusätzlich getestet, da im H2H-Screen und im LUMIER Bindungs-Assay eine Protein-Protein-Interaktion zwischen SARS-CoV Orf7b und CAMLG, einem Protein, welches an der Kalzium-Signal-Transduktion in T-Zellen beteiligt ist, identifiziert wurde. Eine mögliche Auswirkung dieser Protein-Protein-Interaktion auf die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade sollte zusätzlich untersucht werden.



**Abb. 3.10: HCoV-NL63 Nsp1, MHV Nsp1 und SARS-CoV Orf7b zeigen keinen Einfluss auf die NFAT-regulierte Genexpression.**

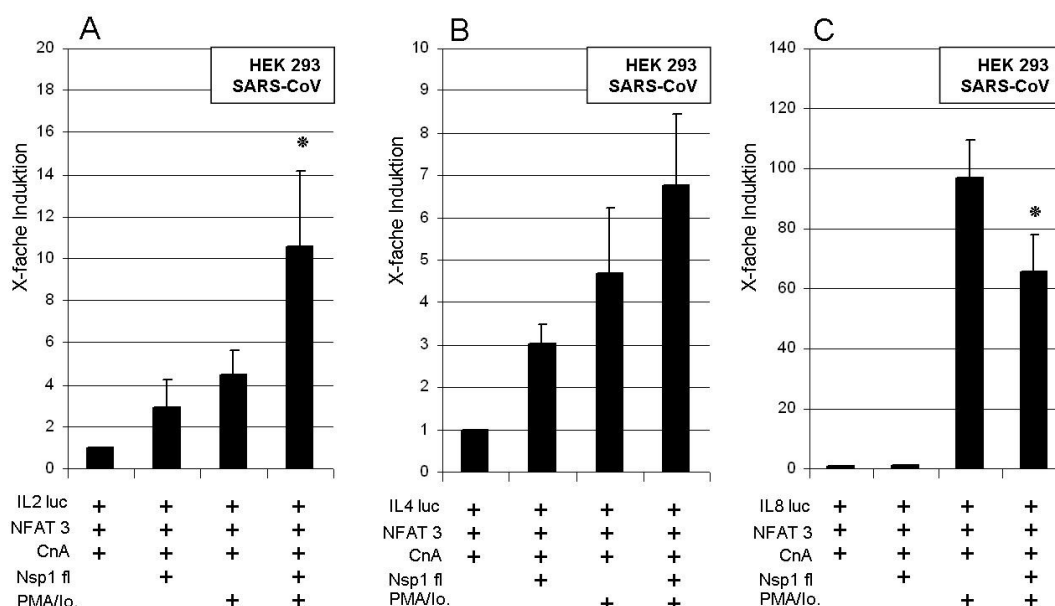
HEK293 Zellen wurden transient kotransfiziert mit NFAT luc und Expressionsplasmiden die NFAT3, CnA und das Volllänge HCoV-NL63 Nsp1 (Nsp1 fl) (n = 3) (A) oder das Volllänge MHV Nsp1 (n = 3) (B) oder das Volllänge SARS-CoV Orf7b (n = 3) (C) oder jeweils den Leervektor kodieren. Nach der Transfektion wurden die Zellen in Abwesenheit oder mit PMA/Io. kultiviert. Die Luciferase Messung erfolgte 19 h nach Transfektion.

In keinem der drei Reporterassays konnte eine Veränderung der Expression NFAT-regulierter Gene festgestellt werden. Die Überexpressionen von HCoV-NL63 Nsp1 wie auch von MHV Nsp1 zeigten mit und ohne Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin keinerlei Einfluss auf die Expression NFAT-regulierter Gene (Abb. 3.10 A und B). Die deutliche Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene durch das SARS-CoV Nsp1 ist somit eine SARS-spezifische Eigenschaft.

Auch die SARS-CoV Orf7b Koexpression hatte, mit und ohne Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin, keinen Einfluss auf die Expression NFAT-regulierter Gene (Abb. 3.10 C). Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Modulation der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade nicht nur SARS-spezifisch, sondern höchstwahrscheinlich auch Nsp1 spezifisch ist.

### 3.2.4 Einfluss des SARS-CoV Nsp1 auf die Genexpression der Interleukine-2, -4 und -8

Die Calcineurin/NFAT Signalkaskade induziert die Expression verschiedener Zytokine, die für die menschliche Immunantwort essentiell sind. In der Einleitung wurden die verschiedenen, über die Calcineurin/NFAT Signalkaskade regulierten Zytokine dargestellt, wobei der prominenteste Vertreter das Interleukin-2 (IL-2) ist (siehe 1.3.2). Da SARS-CoV Nsp1 die Expression NFAT-regulierter Gene deutlich hochreguliert, wurde untersucht, ob die Expression der Interleukine IL-2, IL-4 und IL-8 ebenfalls hochreguliert werden. Aus diesem Grund wurde das Reporterassay mit IL-2-, IL-4- und IL-8- Reporterplasmiden, die jeweils die *Firefly* Luziferase unter der Kontrolle der jeweiligen Interleukinpromotoren kodieren, durchgeführt.



**Abb. 3.11: Einfluss des SARS-CoV Nsp1 auf die Expression der Interleukine -2, -4 und -8.**

HEK293 Zellen wurden transient kotransfiziert mit IL2 luc (A) oder IL4 luc (B) oder IL8 luc (C) und Expressionsplasmiden die NFAT3, CnA und das Volllänge SARS-CoV oder den Leervektor kodieren (je n = 3). Nach der Transfektion wurden die Zellen in Abwesenheit oder mit PMA und Ionomycin kultiviert. Die Luziferase Messung erfolgte 19 h nach Transfektion.

\*  $P < 0.05$  vgl. mit PMA/Io. stimulierten Zellen ohne SARS-CoV Nsp1 Überexpression.

Die Koexpression des SARS-CoV Nsp1 führte ohne Stimulation der Zellen zur Erhöhung der IL-2 Expression. Bei gleichzeitiger Koexpression des SARS-CoV Nsp1 und Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin war eine deutliche Verstärkung des Luziferase Signals zu detektieren (Abb. 3.11 A). Die Koexpression des SARS-CoV Nsp1 führte ohne Stimulation der Zellen zu einer starken Erhöhung der IL-4 Expression. Bei gleichzeitiger SARS-CoV Nsp1 Koexpression und Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin war nur eine leichte Erhöhung der IL4 Expression zu messen (Abb. 3.11 B).

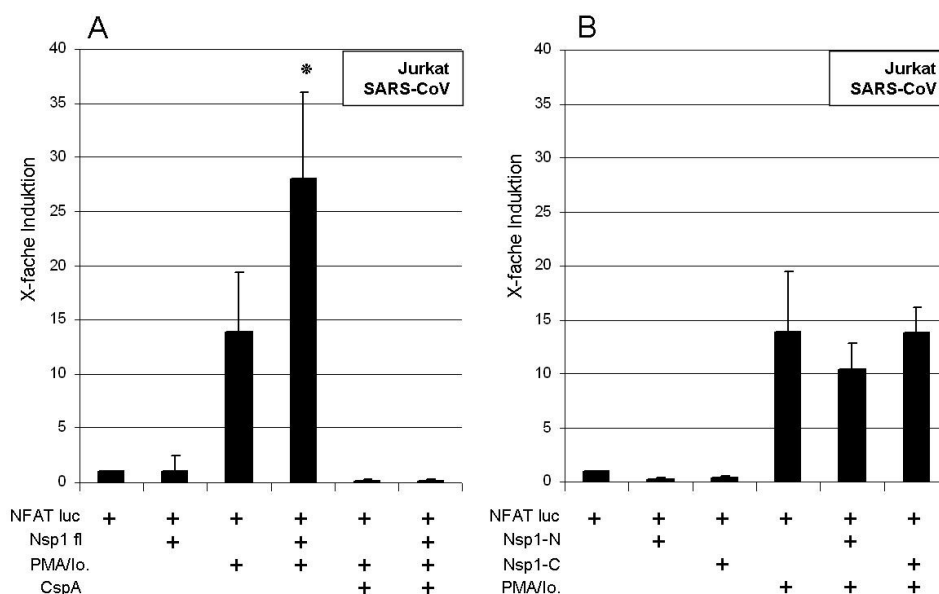


Im Gegensatz hierzu zeigte SARS-CoV Nsp1, ohne Stimulation der Zellen mit PMA und Ionomycin keinen Einfluss auf die IL-8 Expression. Bei gleichzeitiger SARS-CoV Nsp1 Koexpression und Stimulation der Zellen wurde die IL-8 Expression deutlich vermindert (Abb. 3.11 C).

Das SARS-CoV Nsp1 moduliert die Expression der Interleukine-2, -4 und -8, wobei zusammenfassend IL-2 und IL-4 hoch und IL-8 herunterreguliert wird.

### 3.2.5 SARS-CoV Nsp1 verstärkt die Expression NFAT-regulierter Gene in Lymphozyten

Die Proteine der NFAT-Familie werden hauptsächlich in lymphatischen Geweben und weniger in Epithelzellen exprimiert. Da die bisherigen Reporterassays in epithelialen HEK293 Zellen durchgeführt wurden, sollte überprüft werden, ob SARS-CoV Nsp1 die Expression NFAT-regulierter Gene auch in einer T-Zelllinie (Jurkat Zellen) verstärken kann. Um das Experiment möglichst nahe an *in vivo* Bedingungen durchzuführen, wurde nur das *Firefly* Luziferase Reporterplasmid, ein Plasmid das die konstitutiv aktive *Renilla* Luziferase kodiert sowie entweder ein Expressionsplasmid, kodierend für das SARS-CoV Nsp1 oder den Leervektor in Jurkat Zellen kotransfiziert. Die einzelnen Komponenten der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade, wie NFAT und Calcineurin, wurden in diesen Experimenten nicht zusätzlich überexprimiert.



**Abb. 3.12: SARS-CoV Nsp1 induziert die NFAT-regulierte Genexpression in Jurkat Zellen.**

Jurkat Zellen wurden transient kotransfiziert mit NFAT luc und dem Expressionsplasmid kodierend für das Volllänge SARS-CoV Nsp1 (Nsp1 fl) (n = 4) (**A**) oder das N- oder C-terminale Fragment des SARS-CoV Nsp1 (n = 3) (**B**) oder jeweils den Leervektor. Nach der Transfektion wurden die Zellen in Abwesenheit, mit PMA/Io. oder mit PMA/Io. und zusätzlich CspA kultiviert. Die Luziferase Messung erfolgte 19 h nach Transfektion.

\*  $P < 0.05$  vgl. mit PMA/Io. stimulierten Zellen ohne SARS-CoV Nsp1 Überexpression.

Das Volllänge SARS-CoV Nsp1 verstärkte die Expression NFAT-regulierter Gene auch in Jurkat Zellen um den Faktor 2. Die Behandlung der Zellen mit CspA diente als Kontrolle und zeigte, dass der Anstieg des Luciferase Signals tatsächlich auf der Aktivierung der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade beruhte. CspA hemmt die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade, so dass CspA behandelte Zellen keine Expression NFAT-regulierter Gene zeigen. Auch der Anstieg der Expression, vermittelt durch das Volllänge SARS-CoV Nsp1, wurde durch CspA vollständig unterdrückt (Abb. 3.12 A). Die Koexpressionen der N- oder C-terminalen Fragmente des SARS-CoV Nsp1 zeigten keine Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene. Die beiden Fragmente sind nicht ausreichend für einen funktionellen Einfluss auf die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade (Abb. 3.12 B).

Diese Experimente bestätigten den Einfluss des SARS-CoV Nsp1 auf die Expression NFAT-regulierter Gene in einer T-Zelllinie. Der Induktionsfaktor war etwas geringer als in epithelialen HEK293 Zellen, die Versuche in diesem System waren jedoch durch die fehlende Expression der einzelnen Komponenten der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade näher an den tatsächlichen *in vivo* Bedingungen als die vorherigen Versuche in HEK293 Zellen.

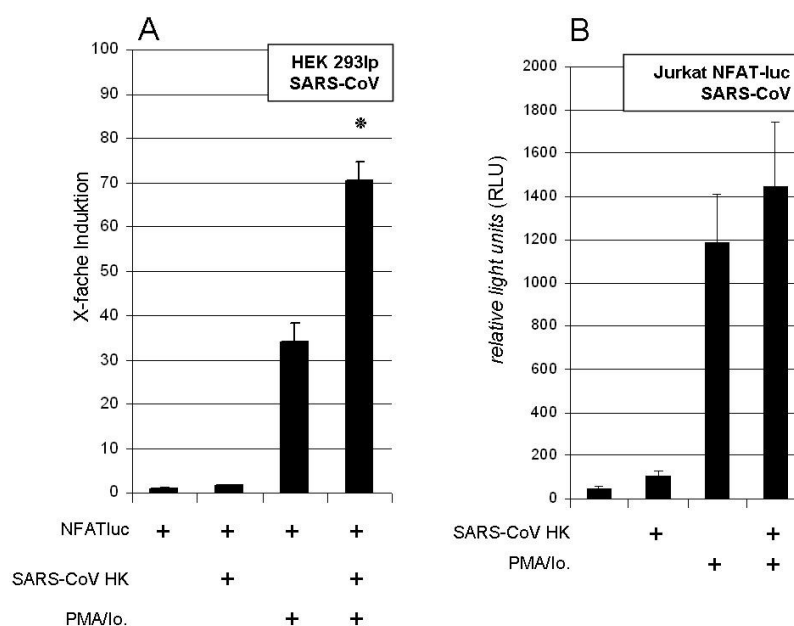
Der Einfluss des SARS-CoV Nsp1 auf die Expression der Interleukine -2, -4 und -8 wurde ebenfalls in Jurkat Zellen getestet. Der deutliche Anstieg der IL-2 Expression sowie der leichte Anstieg der IL-4 Expression in HEK 293 Zellen (siehe Abb. 3.11) konnte nicht bestätigt werden. Die Verminderung des Luciferase Signals bei Koexpression des SARS-CoV Nsp1 im IL-8 Reporterassay konnte hingegen in der T-Zelllinie bestätigt werden. Ein Grund hierfür könnte die Zelltyp-abhängige Induktion verschiedener Zytokine sein.

### 3.2.6 Erhöhte Expression NFAT-regulierter Gene im Viruskontext

Alle bisher durchgeführten Reporterassays basierten auf Überexpressionsstudien eines SARS-CoV Proteins. Hinweise über die Modulation des Calcineurin/NFAT-Signalwegs im gesamten Viruskontext standen noch nicht zur Verfügung. Da die Abläufe einer Virusinfektion sehr komplex sind und der Mechanismus der Überexpression eines einzelnen viralen Proteins zu vereinfacht ist und da bei Überexpressionsstudien häufig Artefakte auftreten war es wichtig die Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene im Viruskontext zu bestätigen.

Zum einen wurde hierfür das *Firefly* Luciferase Reporterplasmid und ein Plasmid, das die konstitutiv aktive *Renilla* Luciferase kodiert, transient in HEK293 *low passage* (lp) Zellen kotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem SARS-CoV Isolat „Hongkong“ (SARS-CoV HK) infiziert. Die Luciferase Messung erfolgte 17 Stunden nach der Infektion. Zum anderen wurde eine Jurkat Zelllinie hergestellt, die das *Firefly*

Luziferase Reporterplasmid stabil exprimiert. Diese Zelllinie wurde ebenfalls mit dem SARS-CoV HK infiziert und 17 Stunden nach der Infektion erfolgte die Luziferase Messung. Aufgrund der Sicherheitsbestimmungen wurden diese Versuche im S3-plus-Labor am Universitätsklinikum in Bonn in Zusammenarbeit mit Marcel Müller, in der Arbeitsgruppe von Christian Drosten, und in Zusammenarbeit mit Thomas Kuri aus der Arbeitsgruppe von Friedemann Weber in Freiburg durchgeführt (siehe 7.4).



**Abb. 3.13: Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene durch SARS-CoV HK.**

HEK293low passage (lp) Zellen wurden transient kotransfiziert mit NFAT luc und einem Plasmid, kodierend für eine konstitutiv aktive *Renilla* Luziferase. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit SARS-CoV Isolat Hongkong (SARS-CoV HK) mit einer MOI = 1 infiziert und die Zellen in Abwesenheit oder mit PMA/Io. kultiviert. Die Dual-Luziferase Messung erfolgte 17 h nach der Infektion. Das Ergebnis ist normalisiert auf die Transfektionseffizienz dargestellt (n = 4) (A). Jurkat Zellen, die das NFAT-luc Reporterplasmid stabil exprimieren, wurden mit SARS-CoV HK mit einer MOI = 1 infiziert und die Zellen in Abwesenheit oder mit PMA/Io. kultiviert. Die *Firefly* Luziferase Messung erfolgte 17 h nach Transfektion. Das Ergebnis ist in *relative light units* (RLU) dargestellt (n = 3) (B).

\*  $P < 0.05$  vgl. mit PMA/Io. stimulierten Zellen ohne SARS-CoV HK Infektion.

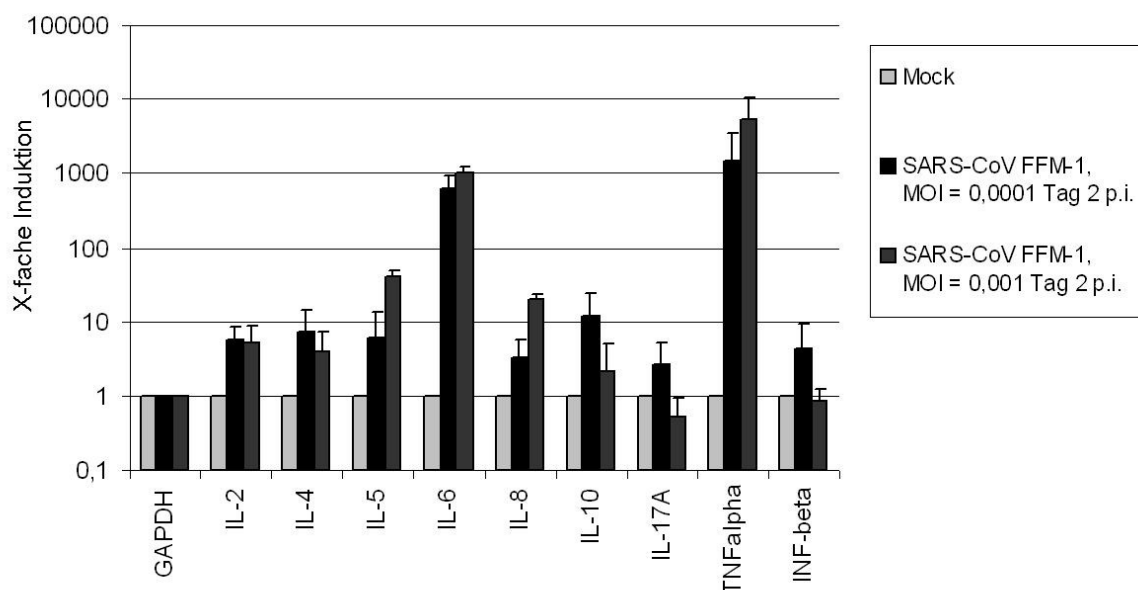
Das SARS-CoV HK modulierte deutlich die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade. Die Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene, welche bis jetzt nur durch die Überexpression des SARS-CoV Nsp1 gezeigt wurde, konnte im Viruskontext bestätigt werden (Abb. 3.13 A). Die Erhöhung der Expression im Viruskontext um den Faktor 2 war etwas geringer verglichen mit dem Faktor 3,2 in der Überexpressionsstudie (siehe Abb. 3.6 A). Die Verminderung des Induktionsfaktors kann darauf zurückgeführt werden, dass das SARS-CoV Nsp1 während der Virusinfektion verschiedene Funktionen übernimmt und somit die Induktion der Expression NFAT-regulierter Gene nicht mehr so stark detektiert werden kann wie in den Überexpressionsstudien. Ein weiterer Grund der Verminderung des Induktionsfaktors könnte eine Gegenregulierung diverser viraler Proteine sein.

In stabil transfizierten Jurkat Zellen fand kaum eine Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene statt (Abb. 3.13 B). Dies kann höchstwahrscheinlich dadurch erklärt werden, dass Jurkat Zellen nur schwer mit dem SARS-CoV HK infiziert werden können. Das Virus gelangt in Jurkat Zellen, es findet jedoch keine produktive Infektion statt und es können keine neuen Viruspartikel im Zellüberstand detektiert werden. Der ausbleibende Anstieg des Luziferase-Signals kann auf die unproduktive Infektion und fehlende Replikation des SARS-CoV HK in Jurkat Zellen zurückgeführt werden.

### 3.2.7 Das Zytokinmuster SARS-CoV infizierter CaCo-2 Zellen

In den vorangegangenen Versuchen konnte sowohl in Überexpressionsstudien wie auch im Viruskontext gezeigt werden, dass das SARS-CoV Nsp1 die Expression NFAT-regulierter Gene erhöht. Wie in der Einleitung beschrieben, steht die Expression verschiedener Zytokine unter der Regulation der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade (siehe Tab. 1.4). Aus diesem Grund wurden mittels Echtzeit-PCR-Quantifizierung von RNA Transkripten das Zytokinmuster von SARS-CoV Isolat „Frankfurt-1“ (SARS-CoV FFM1) infizierten CaCo-2 Zellen untersucht. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus infizierten und nicht infizierten Zellen isoliert, anschließend mittels Reverser Transkription cDNA synthetisiert und diese mittels TaqMan™-PCR analysiert (siehe 2.4.1 bis 2.4.3). Für die Analyse wurden spezifische Primer und Sonden für die folgenden, durch den Calcineurin/NFAT-Signalweg regulierten, Zytokine verwendet: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) und Interferon beta (INF $\beta$ ). Zur Kontrolle der eingesetzten Transkriptmenge wurde zusätzlich das konstitutiv exprimierte *housekeeping gene* Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) detektiert.

In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse der Echtzeit-PCR-Quantifizierung zusammengefasst, wobei die Ergebnisse auf die nicht infizierte Kontrolle (Mock) normalisiert wurden.



**Abb. 3.14: Zytokinmuster SARS-CoV FFM1 infizierter CaCo-2 Zellen.**

CaCo-2 Zellen wurden mit SARS-CoV Isolat „Frankfurt-1“ (SARS-CoV FFM1) mit einer MOI = 0,0001 oder MOI = 0,001 infiziert. Nach zwei Tagen wurde die Gesamt-RNA aus Zelllysaten der infizierten und nicht infizierten Kontrolle (Mock) isoliert und mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Das Zytokinmuster wurde mittels Echtzeit-PCR Quantifizierung der Interleukine -2, -4, -5, -6, -8, -10, -17A des Tumornekrose Faktors alpha (TNF $\alpha$ ) und Interferon-beta (INF $\beta$ ) analysiert. Alle Ergebnisse wurden auf die Mock Kontrolle normalisiert (n = 3).

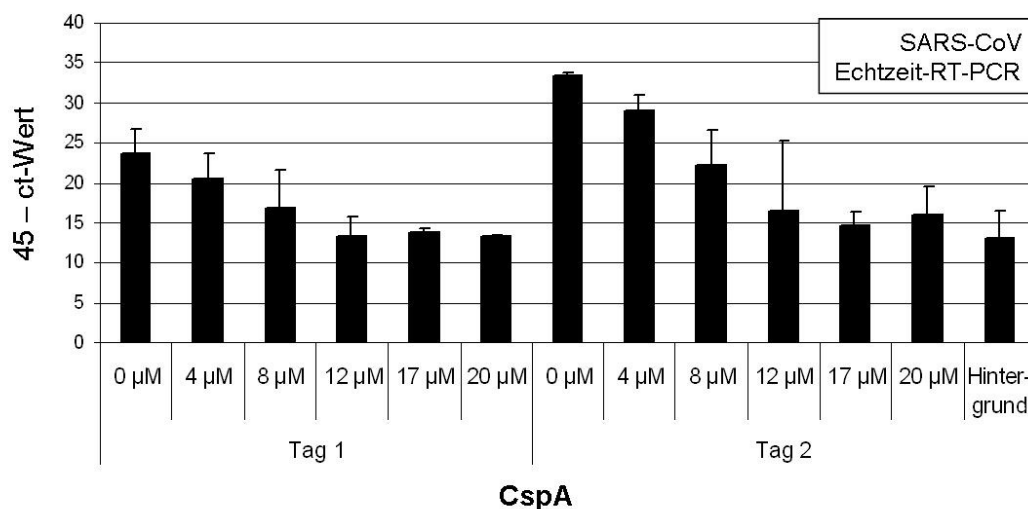
Das Zytokinmuster der SARS-CoV FFM1 infizierten Zellen verglichen mit dem Zytokinmuster der nicht infizierten Kontrollzellen (Mock) zeigte deutliche Unterschiede. Die SARS-CoV FFM1 infizierten Zellen zeigen stark angestiegene Zytokinwerte auf (Abb. 3.14). Zwischen den beiden verwendeten *multiplicity of infection* MOI = 0,0001 und MOI = 0,001 der SARS-CoV FFM1 Infektion war kaum ein Unterschied im Zytokinmuster zu detektieren. Das Zytokinmuster der SARS-CoV FFM1 infizierten Zellen zeigte einen 10-fachen Anstieg der Expression der Interleukine -2, -4, -5, -8 und -10. Die beiden Zytokine IL-17A und INF $\beta$  stiegen nur geringfügig an. Sehr drastische Effekte zeigten die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$ . Hier wurde eine 1000-fache Erhöhung der Zytokinexpression detektiert.

Der Anstieg der Expression fast aller über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade regulierten Zytokine der SARS-CoV FFM1 infizierten Zellen stimmt mit den Ergebnissen der vorangegangenen Reporterassay-Studien, in denen das SARS-CoV Nsp1 die Expression NFAT-regulierter Gene hochregulierte, überein.

### 3.2.8 Inhibition der viralen Replikation des SARS-CoV durch Cyclosporin A

Wie bereits erwähnt besitzt das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CspA) auch antivirale Eigenschaften. In Zellkultur kann die HIV-1- und HCV-Replikation durch CspA gehemmt werden (69,148). Zur Behandlung von HCV-Patienten wird CspA inzwischen in Patienten eingesetzt (45). Basierend auf diesen HIV- und HCV-Studien war es von großem Interesse einen möglichen inhibitorischen Effekt von CspA auf die Replikation des SARS-CoV zu untersuchen.

Aufgrund der Sicherheitsbestimmungen wurden diese Inhibitionsversuche im S4-Labor des Tropeninstituts in Hamburg in enger Zusammenarbeit mit Susanne Pfefferle aus der Arbeitsgruppe von Christian Drosten durchgeführt (siehe 7.4). Um einen inhibitorischen Effekt von CspA auf die SARS-CoV Replikation zu untersuchen wurden VeroE6 Zellen mit SARS-CoV FFM1 (MOI = 0,001) infiziert und die Zellen anschließend mit verschiedenen CspA Konzentrationen im Medium über zwei Tage inkubiert. Die virale Replikation wurde mittels Echtzeit-PCR-Quantifizierung des RNA-Genoms bestimmt. Hierfür wurde an Tag 1 und Tag 2 nach Infektion Proben des Zellüberstandes genommen, die virale RNA extrahiert und die Replikation mit SARS-CoV spezifischen Primern und Sonden detektiert (siehe 2.4.4 und 2.4.5).



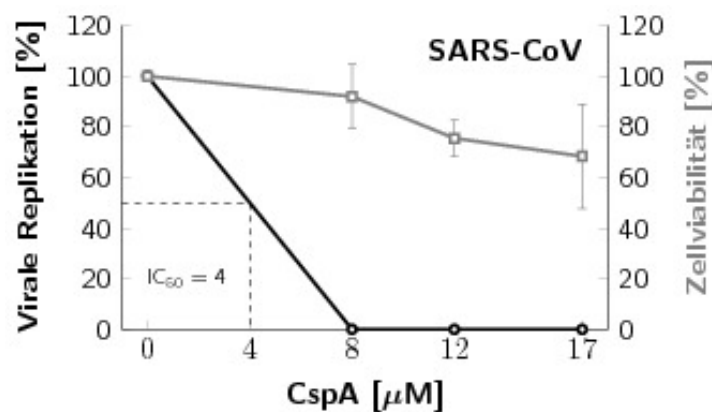
**Abb. 3.15: Inhibition der SARS-CoV Replikation durch CspA (Echtzeit-RT-PCR).**

VeroE6 Zellen wurden mit SARS-CoV FFM1 mit einer MOI = 0,001 infiziert und anschließend über zwei Tage mit verschiedenen CspA Konzentrationen im Medium inkubiert. An Tag 1 und Tag 2 nach Infektion wurden Proben des Zellüberstandes genommen, die virale RNA extrahiert und mittels Echtzeit-RT-PCR quantitativ analysiert. Zur Datenauswertung wurde der ermittelte  $C_t$ -Wert von der Gesamtanzahl der Zyklen abgezogen ( $n = 3$ ).

Die Replikation des SARS-CoV wurde konzentrationsabhängig von CspA gehemmt (Abb. 3.15). An Tag 1 nach Infektion nahm die virale RNA-Menge mit steigender CspA-

Konzentration kontinuierlich ab. An Tag 2 nach Infektion sank die detektierbare virale RNA-Menge auf das Hintergrundniveau ab.

Um den hemmenden Effekt von CspA auf die SARS-CoV Replikation über eine weitere Methode zu bestätigen, wurden VeroE6 Zellen mit SARS-CoV infiziert und mit verschiedenen CspA Konzentrationen im Medium über zwei Tage inkubiert. Zur Detektion des SARS-CoV wurden die Überstände auf frische VeroE6 Zellen titriert (siehe 2.6.7). Die mittels Plaque Assay berechneten Virustiter wurden prozentual auf CspA unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und graphisch dargestellt.



**Abb. 3.16: Inhibition der SARS-CoV Replikation durch CspA (Plaque Assay).**

VeroE6 Zellen wurden mit SARS-CoV FFM1 mit einer MOI = 0,001 infiziert und anschließend über zwei Tage mit verschiedenen CspA Konzentrationen im Medium inkubiert. Die Zellüberstände wurden auf frische VeroE6 Zellen titriert und der Virustiter mittels Plaque Assay ermittelt. Die Virustiter wurden prozentual auf CspA unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und ausgewertet (n = 3).

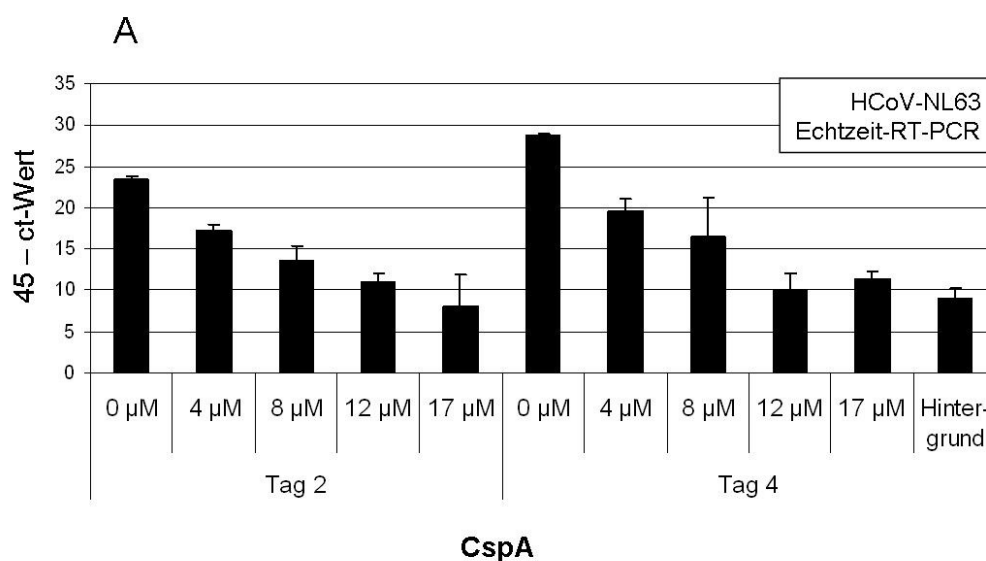
Für den Zytotoxizitäts-Test wurden VeroE6 Zellen über zwei Tage mit verschiedenen CspA Konzentrationen im Medium inkubiert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe des *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. Die einzelnen Werte wurden prozentual auf CspA unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und ausgewertet (n = 3).

Wie Abbildung 3.16 darstellt, konnte die Inhibition der viralen Replikation mittels Plaque Assay bestätigt werden. Ab einer CspA Konzentration von 8  $\mu\text{M}$  war kein Virus mehr nachweisbar. Die mittlere inhibitorische Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) des CspA, bezogen auf die Inhibition der SARS-CoV Replikation, lag bei 4  $\mu\text{M}$ . Um auszuschließen, dass die Virusreplikation aufgrund eines zytotoxischen Effektes des CspA auf VeroE6 Zellen abnahm, wurde ein Zytotoxizitäts-Test durchgeführt (siehe 2.6.9) und das Ergebnis ebenfalls in der Abbildung dargestellt. Die Zellviabilität nahm zwar mit steigender CspA Konzentration leicht ab, bei einer CspA Konzentration von 8  $\mu\text{M}$  war jedoch kein Virus mehr nachweisbar und die Zellviabilität lag noch immer bei 91 %. Die Abnahme der Virusreplikation aufgrund eines zytotoxischen Effektes des CspA auf VeroE6 Zellen konnte ausgeschlossen werden.

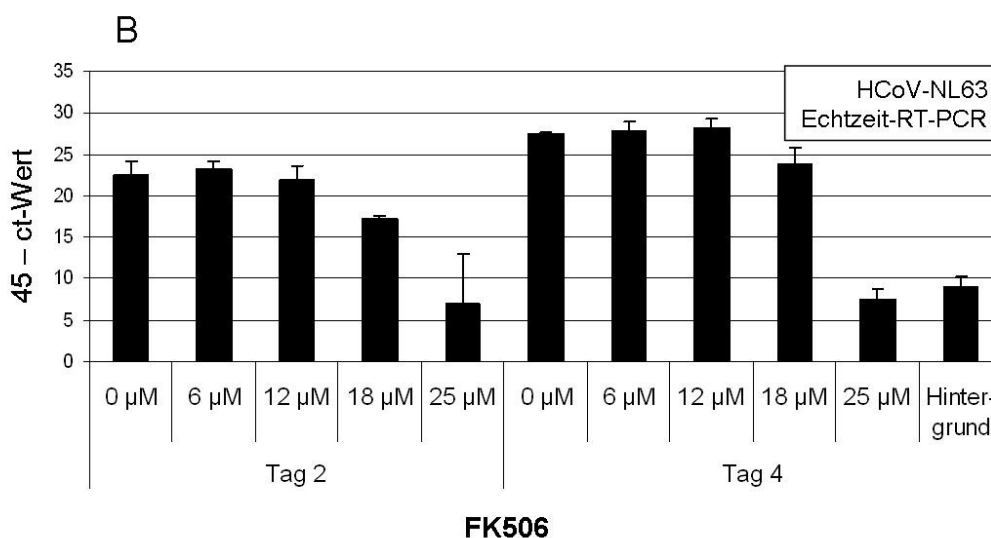
### 3.2.9 Inhibition der viralen Replikation weiterer humaner Coronaviren

Um zu klären, ob der inhibitorische Effekt des CspA ein SARS-spezifischer Effekt ist, wurden die beiden humanen Coronaviren HCoV-NL63 und HCoV-229E, welche Infektionen des oberen Respirationstraktes verursachen, auf die Inhibition durch CspA untersucht. Zusätzlich zu CspA wurde der Inhibitionsversuch mit dem Immunsuppressivum FK506 durchgeführt. Bei initialen Versuchen mit SARS-CoV zeigte FK506 jedoch keinen Einfluss auf die virale Replikation.

Zunächst wurden CaCo-2 Zellen mit HCoV-NL63 (MOI = 0,004) infiziert und mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen im Medium über vier Tage inkubiert. Die virale Replikation wurde mittels Echtzeit-PCR-Quantifizierung des RNA-Genoms bestimmt. Hierfür wurde an Tag 2 und Tag 4 nach Infektion Proben des Zellüberstandes genommen, die virale RNA extrahiert und die Replikation mit HCoV-NL63 spezifischen Primern und Sonden detektiert (siehe 2.4.4 und 2.4.5).





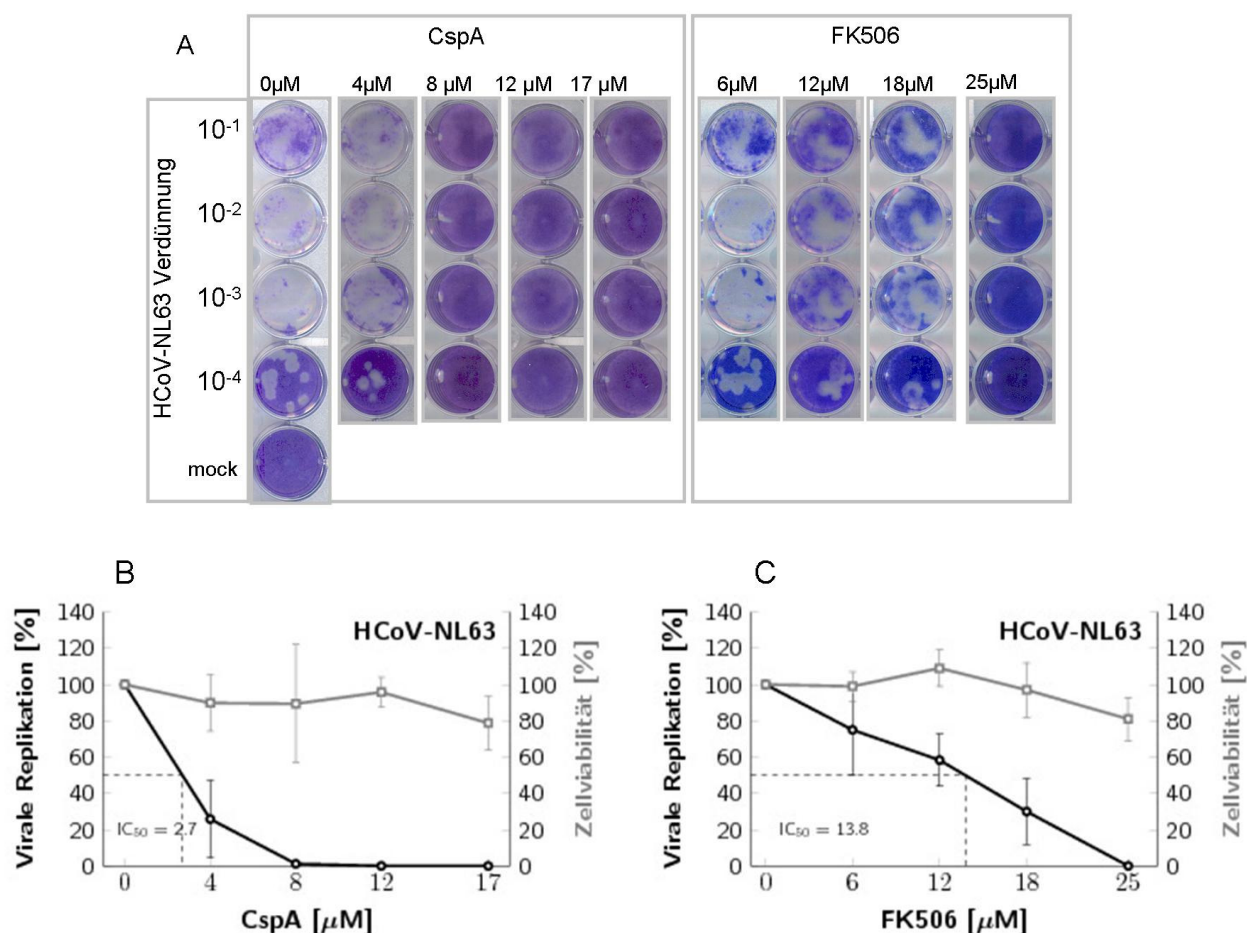


**Abb. 3.17 Inhibition der HCoV-NL63 Replikation durch CspA und FK506 (Echtzeit RT-PCR).**

CaCo-2 Zellen wurden mit HCoV-NL63 mit einer MOI = 0,004 infiziert und anschließend über vier Tage mit verschiedenen CspA (n = 3) (A) oder FK506 (n = 3) (B) Konzentrationen im Medium inkubiert. An Tag 2 und Tag 4 nach Infektion wurden Proben des Zellüberstandes genommen, die virale RNA extrahiert und mittels Echtzeit-RT-PCR quantitativ analysiert. Zur Datenauswertung wurde der ermittelte C<sub>t</sub>-Wert von der Gesamtanzahl der Zyklen abgezogen.

Die virale Replikation von HCoV-NL63 konnte ebenfalls durch CspA gehemmt werden (Abb. 3.17 A). Im Gegensatz zu SARS-CoV wurde die virale Replikation von HCoV-NL63 auch durch FK506 gehemmt (Abb. 3.17 B). Die CspA vermittelte Inhibition erfolgte konzentrationsabhängig, wohingegen die Inhibition mit FK506 erst nach Erreichen einer Schwellenkonzentration von 18 µM FK506 einsetzte. Eine weitere Analyse der Inhibition der viralen Replikation mit FK506 Konzentrationen zwischen 18 µM und 25 µM zeigte in diesem Bereich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Replikation.

Die Hemmung der viralen Replikation von HCoV-NL63 durch CspA und FK506 wurde mittels Plaque Assay bestätigt. Hierfür wurden CaCo-2 Zellen mit verschiedenen Verdünnungen von HCoV-NL63 infiziert und anschließend über 4 Tage mit entsprechenden Inhibitorkonzentrationen im *overlay*-Medium inkubiert (siehe 2.6.8). Die mittels Plaque Assay berechneten Virustiter wurden prozentual auf CspA bzw. FK506 unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und graphisch dargestellt.



**Abb. 3.18: Inhibition der HCoV-NL63 Replikation durch CspA und FK506 (Plaque Assay).**

Für das Plaque Assay wurden CaCo-2 Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des HCoV-NL63 infiziert und anschließend mit entsprechenden CspA und FK506 Konzentrationen im *overlay*-Medium inkubiert. Die Fixierung und Färbung der Zellen mit Kristallviolett erfolgte vier Tage nach Infektion. Die Virusplaques der ersten auszählbaren Virusverdünnung wurden gezählt und der Virustiter bestimmt (A). Die Virustiter wurden prozentual auf CspA ( $n = 6$ ) (B) bzw. FK506 ( $n = 6$ ) (C) unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und ausgewertet.

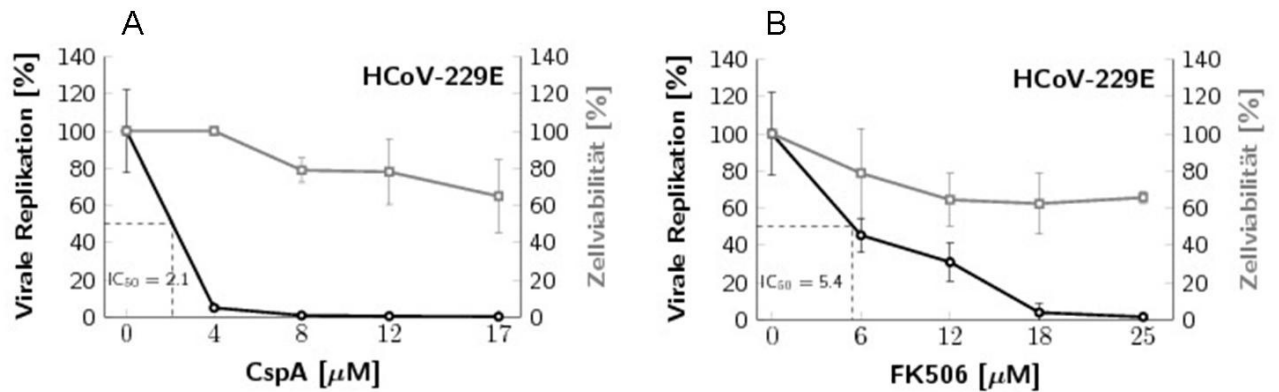
Für den Zytotoxizitäts-Test wurden CaCo-2 Zellen über vier Tage mit verschiedenen CspA bzw. FK506 Konzentrationen im Medium inkubiert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe des *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. Die einzelnen Werte wurden prozentual auf CspA bzw. FK506 unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und ausgewertet ( $n = 3$ ).

Die Inhibition der viralen Replikation von HCoV-NL63 durch CspA und FK506 konnte mit Hilfe des Plaque Assay bestätigt werden. Abbildung 3.18 A zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Plaque Assays. Der infizierte Zellrasen wurde mit einer Kristallviolett-Lösung fixiert und angefärbt. Die Vertiefungen der Virus-Verdünnungen  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$ , ohne CspA im Medium, zeigen kaum angefärbte Zellen auf, da HCoV-NL63 alle Zellen infizierte und lysierte. Ein deutlicher Zellrasen und somit klare Plaques wurden erst ab einer Virusverdünnung von  $10^{-4}$  sichtbar. Ab einer CspA Konzentration von  $8 \mu\text{M}$  waren keine Virusplaques mehr sichtbar. Der gefärbte Zellrasen war vollständig vorhanden. Die Inhibition

der Virus Replikation durch FK506 nahm mit steigender FK506 Konzentration zu, eine vollständige Hemmung erfolgte erst bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  FK506. Die graphische Darstellung der Inhibition durch CspA (Abb. 3.18 B) und FK506 (Abb. 3.18 C) zeigt, dass die Inhibition der viralen Replikation unabhängig von zytotoxischen Effekten des jeweiligen Immunsuppressivums auf die CaCo-2 Zellen war. Die virale Replikation von HCoV-NL63 konnte, ebenso wie das SARS-CoV, mit einer CspA Konzentration von 8  $\mu\text{M}$  vollständig gehemmt werden. Die  $\text{IC}_{50}$  des CspA, bezogen auf die Inhibition der viralen Replikation des HCoV-NL63, lag bei 2,7  $\mu\text{M}$ . Die  $\text{IC}_{50}$  des FK506 lag mit 13,8  $\mu\text{M}$  deutlich höher.

Der inhibitorische Effekt von CspA und FK506 auf die virale Replikation des HCoV-229E wurde mit *Renilla* Luziferase- und eGFP-Reporterviren untersucht. Die verwendeten rekombinanten Viren HCoV-229E-luc und HCoV-229E-GFP wurden uns freundlicherweise von Volker Thiel aus St. Gallen zur Verfügung gestellt. In diesen rekombinanten Viren wurde Orf 4 durch eine *Renilla* Luziferase bzw. durch ein *green fluorescent protein* (GFP) ersetzt. Mit diesen rekombinanten Viren ist es möglich, die virale Replikation entweder über die Messung der *Renilla* Luziferase Aktivität oder mittels Mikroskopie infizierter Zellen zu untersuchen.

Für das Inhibitionsexperiment wurden Huh7 Zellen mit HCoV-229E-luc infiziert und mit verschiedenen CspA bzw. FK506 Konzentrationen im Medium inkubiert. Zwei Tage nach Infektion wurde die virale Replikation mittels *Renilla* Luziferase Messung ermittelt. Die gemessenen Luziferase Werte wurden prozentual auf CspA bzw. FK506 unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und graphisch dargestellt.



**Abb. 3.19: Inhibition der HCoV-229E-luc Replikation durch CspA und FK506.**

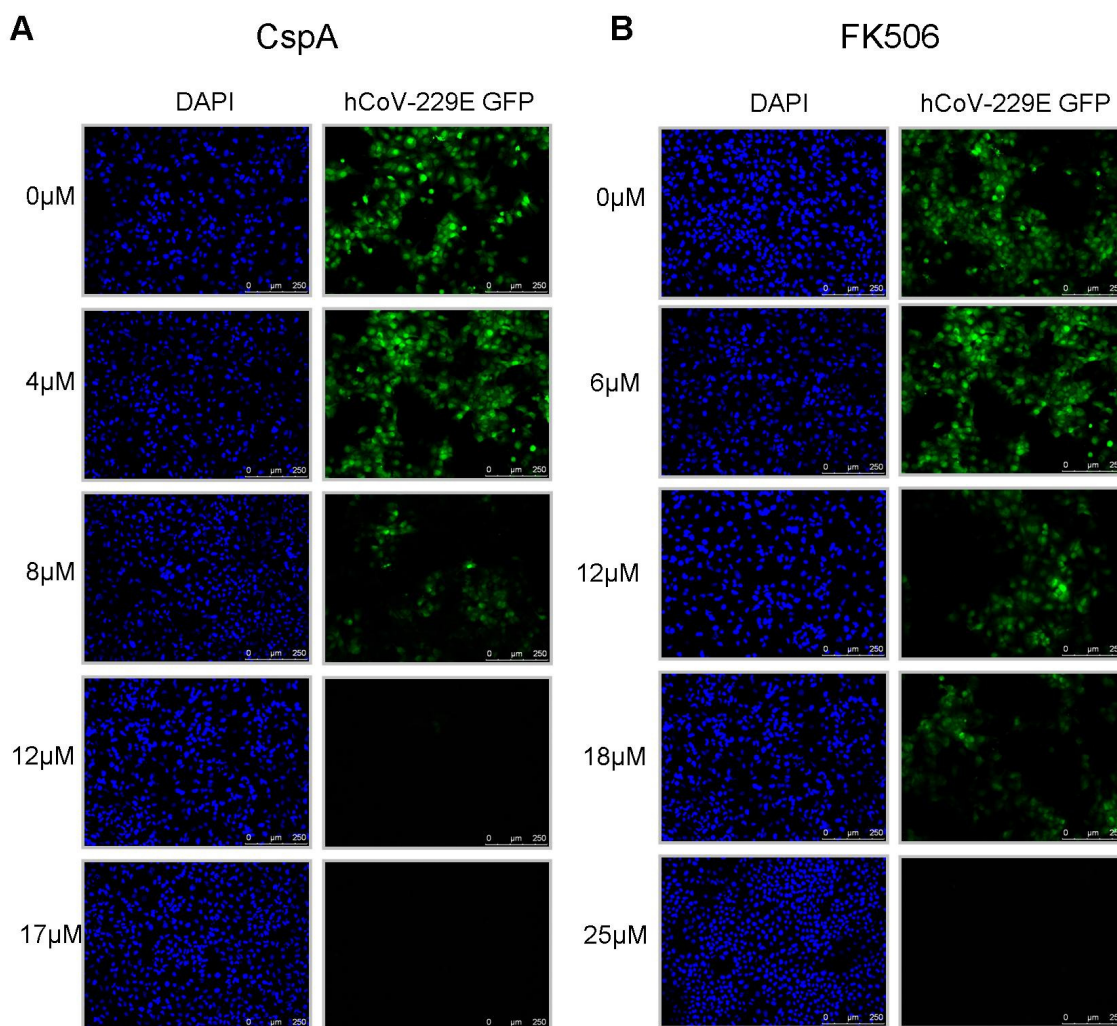
Huh7 Zellen wurden mit HCoV-229E-luc mit einer MOI = 0,1 infiziert und anschließend über zwei Tage mit verschiedenen CspA (n = 3) (A) bzw. FK506 (n = 3) (B) Konzentrationen im Medium inkubiert. Die virale Replikation wurde mittels *Renilla* Luziferase Messung ermittelt. Die Luziferase Messwerte wurden prozentual auf CspA bzw. FK506 unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und ausgewertet.

Für den Zytotoxizitäts-Test wurden Huh7 Zellen über zwei Tage mit verschiedenen CspA (A) bzw. FK506 (B) Konzentrationen im Medium inkubiert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe des *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. Die einzelnen Werte wurden prozentual auf CspA bzw. FK506 unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und ausgewertet (n = 3).

Die Replikation des zweiten humanen Coronavirus HCoV-229E konnte durch CspA und FK506 gehemmt werden (Abb. 3.19 A und B). Bei einer Konzentration von 8 µM CspA konnte, wie bei der Inhibition des SARS-CoV und des HCoV-NL63, keine virale Replikation des HCoV-229E mehr detektiert werden. Die  $IC_{50}$  des CspA lag bei nur 2,1 µM. Um eine Hemmung der viralen Replikation des HCoV-229E durch FK506 zu erreichen benötigte man, ebenso wie zur Hemmung von HCoV-NL63, wesentlich höhere Konzentrationen zwischen 18 µM und 25 µM FK506. Die  $IC_{50}$  des FK506 lag bei 5,4 µM.

Sowohl CspA wie auch FK506 hatten keinen zytotoxischen Effekt auf die verwendeten Huh7 Zellen, wodurch eine Abnahme der Virusreplikation aufgrund einer abnehmenden Zellviabilität ausgeschlossen werden konnte.

Die Hemmung der viralen Replikation des HCoV-229E durch CspA und FK506 wurde mit dem rekombinanten Virus HCoV-229E-GFP, mittels Mikroskopie, bestätigt. Hierfür wurden Huh7 Zellen mit HCoV-229E-GFP infiziert, über 2 Tage mit den entsprechenden Inhibitorkonzentrationen inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop untersucht.



**Abb.3.20: Inhibition der HCoV-229E-GFP Replikation durch CspA und FK506.**

Huh7 Zellen wurden mit HCoV-229E-luc mit einer MOI = 0,1 infiziert und anschließend über zwei Tage mit verschiedenen CspA (A) bzw. FK506 (B) Konzentrationen im Medium inkubiert. Die virale Replikation wurde mittels Mikroskopie untersucht.

Die Versuche mit Hilfe des HCoV-229E-GFP bestätigten die Inhibition der viralen Replikation durch CspA und FK506 (Abb. 3.20 A und B). Mit zunehmenden CspA Konzentrationen nahm die virale Replikation des HCoV-229E-GFP deutlich ab, wobei erst ab einer CspA Konzentration von 12 μM keine infizierte Zelle mehr zu sehen war. Im Gegensatz zum Inhibitionsexperiment mit HCoV-229E-luc konnten in diesem Experiment bei einer CspA Konzentration von 8 μM noch geringe Mengen viraler Replikation detektiert werden. Auch mit zunehmenden FK506 Konzentrationen nahm die virale Replikation des HCoV-229E-GFP ab, wobei, wie auch bei HCoV-NL63, erst die Endkonzentration von 25 μM FK506 die virale Replikation vollständig hemmte.

Durch die hier aufgeführten Inhibitionsversuche konnte gezeigt werden, dass das Immunsuppressivum CspA nicht nur die virale Replikation des SARS-CoV, sondern auch die

virale Replikation der beiden deutlich harmloseren, humanen Coronaviren HCoV-NL63 und HCoV-229E hemmt. Zusätzlich wird die Replikation dieser beiden Viren, im Gegensatz zum SARS-CoV, auch durch FK506 gehemmt. In allen Inhibitionsversuchen war die Hemmung der viralen Replikation durch CspA und FK506 unabhängig von zytotoxischen Effekten der Immunsuppressiva auf die verwendeten Zelllinien.

### 3.2.10 Cyclosporin A als Pan-Coronavirus-Inhibitor

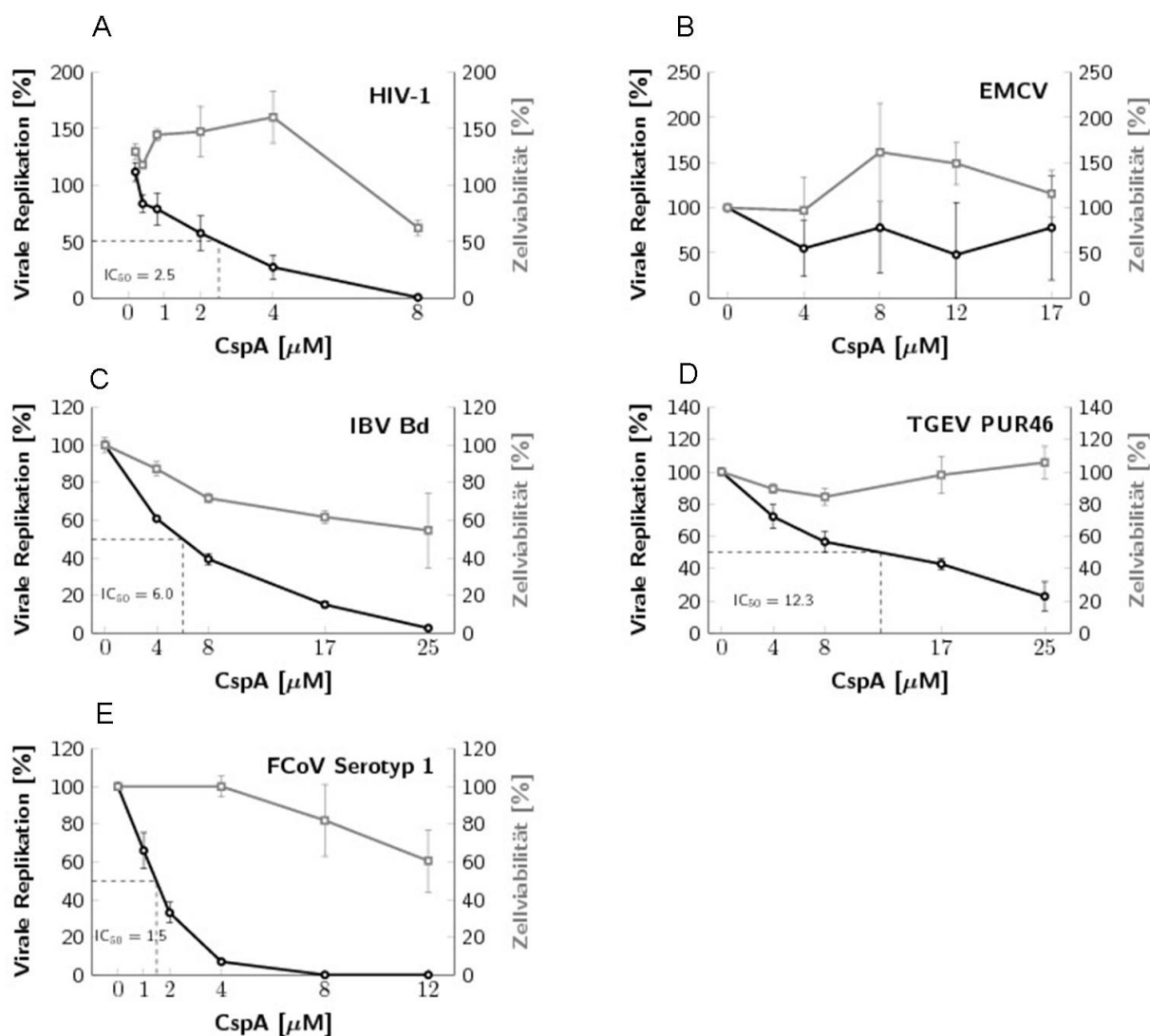
Da neben dem SARS-CoV auch die beiden humanen Coronaviren HCoV-NL63 und HCoV-229E durch CspA und FK506 gehemmt werden konnten, sollte die inhibitorische Wirkung dieser Immunsuppressiva auch an weiteren Coronaviren getestet werden. Im Rahmen des BMBF Zoonose Verbunds bestanden Kooperationen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Pöhlmann, Prof. Dr. F. Weber, Prof. Dr. G. Herrler und Prof. Dr. H.-J. Thiel, die folgende Erreger auf eine Inhibition durch CspA testeten (siehe 7.4).

Die Inhibitionsversuche wurden von jeder Arbeitsgruppe nach dem jeweiligen Standardprotokoll mittels Plaque Assay durchgeführt (siehe 2.4 und 2.6.8).

**Tab. 3. 7: Übersicht der getesteten Erreger**

Erreger	Inhibitionsexperiment	Funktion
HIV-1	Inhibition bekannt	Positivkontrolle
EMCV	keine Inhibition	Negativkontrolle
IBV Bd	Test auf Inhibition	
TGEV PUR46	Test auf Inhibition	
FCoV Serotyp1	Test auf Inhibition	

Die mittels Plaque Assay berechneten Virustiter wurden prozentual auf CspA unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und graphisch dargestellt (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21: Inhibition der HIV-1, IBV, TGEV und FCoV Replikation durch CspA.**

C8166 SEAP Zellen wurden mit HIV-1 NL4-3 infiziert und mit verschiedenen CspA Konzentrationen im Medium über 5 Tage inkubiert. Die virale Replikation wurde mittels Phospha-Light™ SEAP Reporter Gene Assay gemessen ( $n = 3$ ) (A). VeroE6 Zellen wurden mit EMCV infiziert und mit verschiedenen CspA Konzentrationen im Medium inkubiert. Die Zellüberstände wurden auf frische VeroE6 Zellen titriert und der Virustiter mittels Plaque Assay ermittelt ( $n = 3$ ) (B). VeroE6 Zellen wurden mit IBV Bd infiziert und mit verschiedenen CspA Konzentrationen im *overlay*-Medium inkubiert ( $n = 3$ ) (C). ST-Zellen wurden mit TGEV PUR46 infiziert und mit verschiedenen CspA Konzentrationen im *overlay*-Medium inkubiert ( $n = 3$ ) (D). Fcwf Zellen wurden mit FCoV Serotyp1 infiziert und mit verschiedenen CspA Konzentrationen im Medium inkubiert. Die Zellüberstände wurden auf frische Fcwf Zellen titriert und der Virustiter mittels Plaque Assay ermittelt ( $n = 3$ ) (E). Die Virustiter wurden jeweils prozentual auf CspA unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und ausgewertet.

Für den Zytotoxizitäts-Test wurden die entsprechenden Zellen mit verschiedenen CspA Konzentrationen im Medium inkubiert. Die Messung der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe des *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. Die einzelnen Werte wurden prozentual auf CspA unbehandelte Zellen gleich 100 % umgerechnet und ausgewertet (je  $n = 3$ ) (A-E).

Die bekannte Inhibition des HIV-1 durch CspA diente in diesem Experiment als Positivkontrolle (Abb. 3.21 A), wohingegen die fehlende Inhibition des Encephalomyocarditis Virus (EMCV) als Negativkontrolle eingesetzt wurde (Abb. 3.21 B). Die drei getesteten Tiercoronaviren IBV (Gruppe 3), TGEV (Gruppe 1) und FCoV (Gruppe 1) zeigten eine Inhibition der viralen Replikation durch CspA (Abb. 3.21 C bis E). Die Replikation des

Vogelcoronavirus IBV und Schweinecoronavirus TGEV wurde nicht vollständig gehemmt, eine deutliche Verminderung der viralen Replikation war jedoch deutlich, wobei hierfür hohe CspA Konzentrationen benötigt wurden. Die  $IC_{50}$  des CspA, bezüglich der Inhibition der viralen Replikation von IBV, lag bei  $6 \mu\text{M}$  CspA. Die  $IC_{50}$  von CspA, bezüglich der Inhibition der viralen Replikation von TGEV, lag mit  $12,3 \mu\text{M}$  deutlich höher.

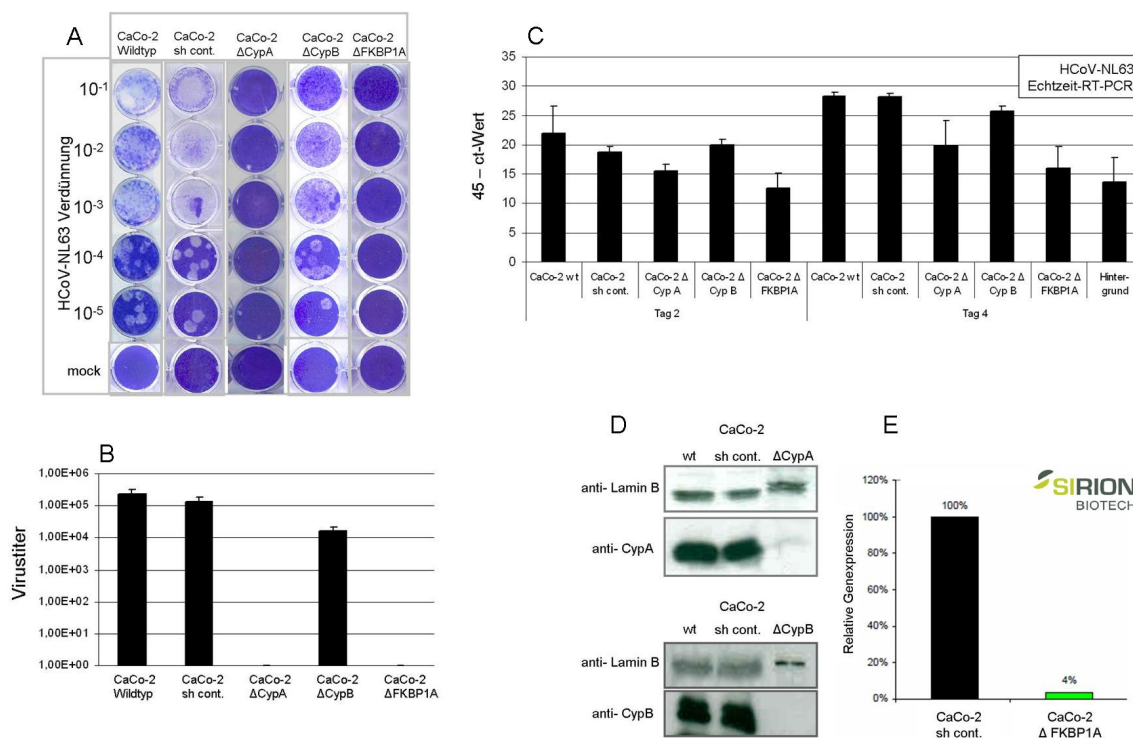
Die virale Replikation des Katzenscoronavirus FCoV wurde, wie zuvor das SARS-CoV, HCoV-NL63 und HCoV-229E, bei einer CspA Konzentration von  $8 \mu\text{M}$  vollständig inhibiert. Die  $IC_{50}$  betrug hier nur  $1,5 \mu\text{M}$  CspA.

Die dargestellten Versuche zeigen, dass CspA einen entscheidenden inhibitorischen Einfluss auf die Replikation verschiedenster Vertreter der Coronaviren hat und somit das Potential eines Pan-Coronavirus-Inhibitors.

### **3.2.11 Der Wirkmechanismus der Cyclosporin A und FK506 vermittelten Inhibition der viralen Replikation**

Um den genauen Wirkmechanismus der CspA und FK506 vermittelten Inhibition der viralen Replikation zu identifizieren, wurde das Viruswachstum auf verschiedenen *knock-down* Zelllinien untersucht. Wie in der Einleitung beschrieben, basiert die Inhibition des HIV-1 vermutlich auf einer Bindung des HIV-1 Gag-Proteins an Cyclophilin A (CypA) (89). Auch für die Inhibition der HCV Replikation ist eine Blockade der Cyclophilin-Aktivität verantwortlich (94). Aus diesem Grund wurde das Wachstum von HCoV-NL63 auf drei *knock-down* Zelllinien CaCo-2  $\Delta\text{CypA}$ , CaCo-2  $\Delta\text{CypB}$  und CaCo-2  $\Delta\text{FKBP1A}$  untersucht. Die CaCo-2  $\Delta\text{FKBP1A}$  Zelllinie wurde aufgrund der Inhibition der viralen Replikation von HCoV-NL63 durch FK506 untersucht, da FK506 an intrazelluläre Vertreter der FKBP-Proteinfamilie bindet.





**Abb. 3.22: Infektion von CaCo-2 knock-down Zelllinien mit HCoV-NL63.**

Für die Plaque Titration wurden CaCo-2 Wildtyp (wt), CaCo-2 *unrelated sh control* (sh cont.), CaCo-2  $\Delta$ CypA, CaCo-2  $\Delta$ CypB und CaCo-2  $\Delta$ FKBP1A Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des HCoV-NL63 infiziert und inkubiert. Die Fixierung und Färbung der Zellen mit Kristallviolett erfolgte vier Tage nach Infektion ( $n = 6$ ) (A). Die Virusplaques der ersten auszählbaren Virusverdünnung wurden gezählt und der Virustiter bestimmt (B). CaCo-2 wt, CaCo-2 sh cont., CaCo-2  $\Delta$ CypA, CaCo-2  $\Delta$ CypB und CaCo-2  $\Delta$ FKBP1A Zellen wurden mit HCoV-NL63 mit einer MOI = 0,004 infiziert und anschließend über vier Tage inkubiert. An Tag 2 und Tag 4 nach Infektion wurden Proben des Zellüberstandes genommen, die virale RNA extrahiert und mittels Echtzeit-RT-PCR quantitativ analysiert. Zur Datenauswertung wurde der ermittelte  $C_t$ -Wert von der Gesamtanzahl der Zyklen abgezogen ( $n = 6$ ) (C). Western Blot der CaCo-2  $\Delta$ CypA und CaCo-2  $\Delta$ CypB Zelllinien zum Nachweis des spezifischen Gen *knock-downs* auf Proteinebene. Der Nachweis des Lamin B diente als Ladekontrolle (D). Nachweis des spezifischen Gen *knock-downs* der Zelllinie CaCo-2  $\Delta$ FKBP1A auf RNA-Ebene (SIRION Biotech) (E).

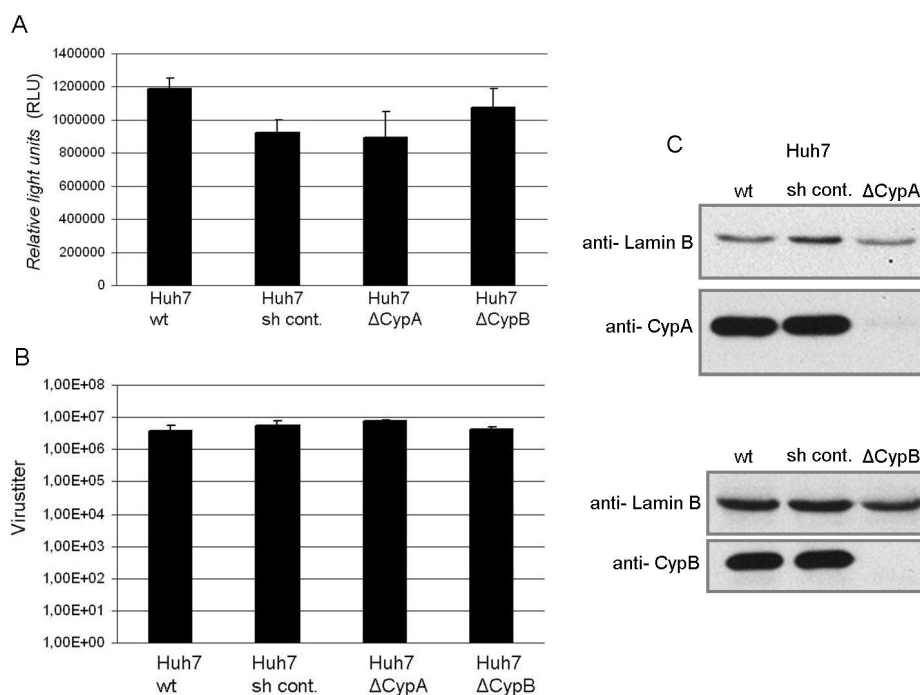
In den beiden *knock-down* Zelllinien CaCo-2  $\Delta$ CypA und CaCo-2  $\Delta$ FKBP1A fand keine Plaquebildung statt. Im Gegensatz hierzu zeigte die Plaquebildung von HCoV-NL63 in der *knock-down* Zelllinie CaCo-2  $\Delta$ CypB kaum Unterschiede zur Plaquebildung des Virus in der CaCo-2 Wildtyp (CaCo-2 wt) Zelllinie und der Kontrollzelllinie CaCo-2 *unrelated sh control* (CaCo-2 sh cont.) (Abb. 3.22 A). Somit zeigte auch der Vergleich der berechneten Virustiter kaum Unterschiede zwischen der Replikation des HCoV-NL63 in der *knock-down* Zelllinie CaCo-2  $\Delta$ CypB verglichen mit der Replikation in den beiden Zelllinien CaCo-2 wt und CaCo-2 sh cont.. HCoV-NL63 zeigte keine Replikation in den beiden Zelllinien CaCo-2  $\Delta$ CypA und CaCo-2  $\Delta$ FKBP1A, wodurch keine Virustiter berechnet werden konnten (Abb. 3.22 B).

Die virale Replikation des HCoV-NL63 wurde zusätzlich mittels Echtzeit-PCR-Quantifizierung des RNA-Genoms im Zellüberstand an Tag 2 und Tag 4 nach Infektion untersucht. Die Ergebnisse des Plaque Assays konnten durch diese Methode bestätigt werden. HCoV-NL63

replizierte an Tag 2 und Tag 4 nach Infektion in der *knock-down* Zelllinien CaCo-2  $\Delta$ CypB fast so gut wie in den beiden Zelllinien CaCo-2 wt und CaCo-2 sh cont.. In den beiden Zelllinien CaCo-2  $\Delta$ CypA und CaCo-2  $\Delta$ FKBP1A war die detektierte RNA-Menge stark vermindert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Plaque Assays, indem keine virale Replikation detektiert werden konnte, wurden mittels Echtzeit-PCR-Quantifizierung noch geringe Mengen viraler RNA detektiert, was auf die höhere Sensitivität der Methode zurückgeführt werden kann (Abb. 3.22 C).

Der Western Blot der CaCo-2  $\Delta$ CypA Zelllinie zeigte keine Expression des CypA Proteins (Abb. 3.22 D). Der *knock-down* des CypA Gens war vollständig. Die fehlende Replikation des HCoV-NL63 auf der CaCo-2  $\Delta$ CypA *knock-down* Zelllinie zeigte, dass CypA für die Replikation des HCoV-NL63 essentiell ist und vermutlich verantwortlich ist für die Inhibition der viralen Replikation durch CspA. Der Western Blot der CaCo-2  $\Delta$ CypB Zelllinie zeigte ebenfalls keine Expression des CypB Proteins (Abb. 3.22 D). Wahrscheinlich übernimmt CypB keine Schlüsselfunktion im Replikationszyklus des HCoV-NL63, da das Virus auf dieser *knock-down* Zelllinie zu gleichen Titern anwächst wie auf der Wildtyp- oder Kontrollzelllinie. Eine Western Blot Analyse der dritten Zelllinie CaCo-2  $\Delta$ FKBP1A war nicht möglich, da der verfügbare anti-FKBP1A Antikörper das, bis auf einige wenige Aminosäuren ähnliche Protein FKBP1B ebenfalls detektiert. Im Western Blot war, aufgrund der gleichzeitigen Detektion der Proteine FKBP1A und FKBP1B, kein spezifischer *knock-down* Effekt des FKBP1A nachweisbar. Aus diesem Grund ist die von Sirion Biotech durchgeführte Analyse des *knock-down* Effekts auf RNA-Ebene dargestellt. Die Analyse zeigt eine effektive Verminderung der FKBP1A-Transkriptmenge von 96 % (Abb. 3.22 E). FKBP1A ist höchstwahrscheinlich ein Schlüsselprotein bei der Inhibition der viralen Replikation des HCoV-NL63 durch FK506, da HCoV-NL63 in der *knock-down* Zelllinie CaCo-2  $\Delta$ FKBP1A nicht mehr replizieren konnte.

Um den Wirkmechanismus der CspA und FK506 vermittelten Inhibition der viralen Replikation des HCoV-229E zu untersuchen, sollte die virale Replikation in den beiden *knock-down* Zelllinien Huh7  $\Delta$ CypA und Huh7  $\Delta$ CypB untersucht werden. Diese beiden Zelllinien wurden uns freundlicherweise von R. Bartenschlager aus Heidelberg zur Verfügung gestellt. Der Nachweis der viralen Replikation des HCoV-229E in diesen beiden *knock-down* Zelllinien wurde zum einen mittels *Renilla* Luciferase Messung des rekombinanten Virus HCoV-229E-luc und zum anderen mittels Plaque Assay des Wildtyp-Virus HCoV-229E-wt durchgeführt.



**Abb 3.23: Infektion von Huh7 knock-down Zelllinien mit HCoV-229E.**

Huh7 wt, Huh7 *unrelated sh control* (sh cont.), Huh7  $\Delta$ CypA und Huh7  $\Delta$ CypB Zellen wurden mit HCoV-229E-luc mit einer MOI = 0,1 infiziert und anschließend über zwei Tage inkubiert. Die virale Replikation wurde mittels *Renilla* Luziferase Messung ermittelt und als *relative light units* (RLU) dargestellt (n = 3) (A). Für die Plaque Titration wurden Huh7 wt, Huh7 sh cont., Huh7  $\Delta$ CypA und Huh7  $\Delta$ CypB Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des HCoV-229E-wt infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die Virustiter berechnet und graphisch dargestellt (n = 3) (B). Western Blot der Huh7  $\Delta$ CypA und Huh7  $\Delta$ CypB Zelllinien zum Nachweis des spezifischen Gen *knock-downs* auf Proteinebene. Der Nachweis des Lamin B diente als Ladekontrolle (C).

Zwischen der Replikation des HCoV-229E-luc in den beiden *knock-down* Zelllinien Huh7  $\Delta$ CypA und Huh7  $\Delta$ CypB und der Replikation des Virus in der Wildtyp-Zelllinie Huh7 wt und der Kontrollzelllinie Huh7 sh cont. war keine Veränderung nachweisbar (Abb. 3.23 A). Die Plaque Titration des HCoV-229E-wt bestätigte dieses Ergebnis. Der Virus wuchs in allen vier Zelllinien zu gleichen Titern an (Abb. 3.23. B).

Der Western Blot der Huh7  $\Delta$ CypA und Huh7  $\Delta$ CypB Zelllinien zeigte keine Expression der beiden Cyclophiline. Der *knock-down* beider Gene war vollständig (Abb. 3.23 C). Da der *knock-down* der beiden Gene CypA und CypB keinen Einfluss auf die Replikation von HCoV-229E zeigte, scheint weder CypA noch CypB eine essentielle Funktion in der Replikation des HCoV-229E zu zukommen.

Die Untersuchungen der viralen Replikation des HCoV-NL63 auf den *knock-down* Zelllinien CaCo-2  $\Delta$ CypA, CaCo-2  $\Delta$ CypB und CaCo-2  $\Delta$ FKBP1A zeigten eine essentielle Funktion der beiden Proteine CypA und FKBP1A in der viralen Replikation des HCoV-NL63. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf den Wirkmechanismus der Inhibition der viralen Replikation durch CspA und FK506. Höchstwahrscheinlich liegt der Inhibition durch CspA eine Blockade der Aktivität des CypA und der FK506 vermittelten Inhibition analog eine Blockade der

Aktivität des FKBP1A-Proteins zugrunde, wodurch die beiden essentiellen Proteine nicht mehr zur Verfügung stehen und somit die Replikation des HCoV-NL63 nicht mehr möglich ist.

Die Untersuchungen der viralen Replikation des HCoV-229E auf den *knock-down* Zelllinien Huh7  $\Delta$ CypA und Huh7  $\Delta$ CypB zeigten keine Veränderung in der Replikation des Virus. Ein genauer Wirkmechanismus der Inhibition der Replikation des HCoV-229E durch CspA konnte nicht aufgeklärt werden.

## 4 Diskussion

Protein-Protein-Interaktionen zwischen jedem Virus und dessen Wirt sind für den Virus von essentieller Bedeutung. Viren haben ein außerordentlich kompaktes Genom, auf dem nicht alle notwendigen Proteine und Faktoren kodiert sind, die für eine wirtszellabhängige Replikation notwendig sind. Aus diesem Grund sind Viren obligat abhängig von einer lebenden Wirtszelle, die die fehlenden Proteine und nötigen Faktoren zur viralen Vermehrung liefert. Außerdem müssen Viren den Protein-Syntheseapparat der Wirtszelle verwenden, um ihre eigenen Proteine zu synthetisieren. Auch das SARS-CoV geht während seines Replikationszyklus viele Interaktionen mit der humanen Wirtszelle ein. Einige wenige Beispiele sind die initiale Rezeptorbindung zwischen dem Spikeprotein des Virus und dem ACE-2 Rezeptor der humanen Zelle oder auch die Translation des freigesetzten viralen (+)ssRNA Genoms durch die Wirtszellmaschinerie, wodurch erst weitere virale Replikations- und Translationszyklen ermöglicht werden. Die Untersuchung von Virus-Wirts Protein-Protein-Interaktionen tragen maßgeblich zum Verständnis der viralen Replikation und Pathogenität bei. Grundlage dieser Doktorarbeit war ein automatisierter, genomweiter Hefe-Zwei-Hybrid-Screen zwischen allen SARS-CoV Proteinen und den Genprodukten von drei humanen cDNA-Banken. Ziel der ungerichteten, genomweiten Untersuchung der Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem SARS-CoV und der humanen Wirtszelle war die Identifikation neuer Angriffspunkte zur antiviralen Intervention.

### 4.1 Die Identifikation neuer Protein-Proteininteraktionen mittels H2H-System und anderer Hochdurchsatzverfahren

Prinzipiell basieren zur Zeit alle genomweiten Hochdurchsatzmethoden zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen auf dem 1989 entwickelten H2H-System. Ein wesentlicher Fortschritt des H2H-Systems war die Einführung eines neuen *mating*-Protokolls durch Fromont-Racine *et al.* 1997 (44), wodurch eine Automatisierung, sowie das Screening einzelner *bait*-Proteine gegen die *prey*-Genprodukte ganzer cDNA-Banken ermöglicht wurde (1,37,44).

In unserem H2H-Screen wurden insgesamt 464 positive Interaktionen gefunden, von denen die meisten neue, noch nicht beschriebene Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem SARS-CoV und der humanen Wirtszelle sind. Bisher gab es noch keine Publikationen über ungerichtete, genomweite Protein-Protein-Interaktionsanalysen zwischen dem SARS-CoV und der humanen Wirtszelle. Der einzige größere, systembiologische Ansatz kam von Chen *et al.* 2009 (15). Hier wurden Daten eines H2H-Screens der SARS-CoV Helikase (Nsp13) gegen die Genprodukte einer Lungen-cDNA Bank aus der Ratte gezeigt. Es wurde nicht beschrieben, wie viele Interaktionen mit der SARS-CoV Helikase insgesamt identifiziert

wurden. Fünf Interaktionen wurden jedoch in einem weiteren Assay validiert, wohingegen unsere Arbeitsgruppe 17 SARS-CoV Helikase Interaktoren im H2H-Screen gefunden hat. In beiden Screens wurde nur ein Protein, Smarcb1 („*SWI/SNF-related, matrix associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1*“) übereinstimmend identifiziert (15). Diese geringe Überlappung der Ergebnisse spiegelt einen allgemeinen Kritikpunkt des H2H-Systems wieder. Generell ist die Überlappung der Daten in zwei vergleichenden genomweiten Hochdurchsatz-Screens nur etwa zwischen 0 - 20 %. Mehrere Arbeitsgruppen haben sich mit dieser Problematik auseinandergesetzt und sind zu dem Schluss gekommen, dass das Problem eher die Sensitivität des H2H-Systems und nicht eine niedrige Spezifität ist (1,142,156). Der geringen Sensitivität des H2H-Systems liegen viele verschiedene Faktoren zu Grunde. Zum einen konnte gezeigt werden, dass das Screening-Protokoll, die verwendeten Vektoren und Hefestämme, aber auch die Qualität und Zusammensetzung der cDNA-Banken entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute der identifizierten Protein-Protein-Interaktionen haben. Zum anderen besitzen alle Hochdurchsatz-Methoden technische Grenzen. In großen, genomweiten Screening-Ansätzen können die Bedingungen nicht für einzelne Proteine optimiert werden, Kompromisse gehen zweifelsohne zu Lasten der Sensitivität. Mehrfache, optimierte Screens der gleichen Interaktoren haben gezeigt, dass die Anzahl der positiven Hits um 30 % der möglichen Interaktionen gesteigert werden kann (1,6,142,156). Die niedrige Übereinstimmung der Ergebnisse zweier unabhängiger Screens kann durch technische Optimierung oder aber auch durch eine Kombination mit anderen Testmethoden behoben werden.

Mit Hilfe des H2H-Screens können nur direkte, binäre Interaktionen und keine Proteinkomplexe oder indirekte Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden. Im Jahr 2002 wurden Proteinkomplexe eines sogenannten *golden standards* mit Hilfe des H2H-Systems untersucht. Hierbei wurden sehr wenige Interaktionen mittels H2H-Screening identifiziert, wodurch eine schlechte Qualität der ermittelten Daten verbreitet wurde (6,145). 2008 untersuchten Yu H. *et al.* (6,156) einen *golden standard* von direkten Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des H2H-Systems und konnten eine hohe Qualität der Hochdurchsatz-H2H-Daten beweisen. Die zunächst vermutete schlechte Qualität der H2H-Screens beruhte somit darauf, dass indirekte Protein-Protein-Interaktionen, die in Proteinkomplexen häufig vorkommen, anhand des H2H-Systems nicht nachgewiesen werden können. Hierfür sollten besser Methoden, die auf der Reinigung von Proteinkomplexen mit anschließender massenspektroskopischer Analyse beruhen, verwendet werden (145,156).

Die Validierung von Protein-Protein-Interaktionen, die über das H2H-System identifiziert wurden, ist aus verschiedenen Gründen von großer Bedeutung. Zum einen ist sie notwendig, um falsch-positive Ergebnisse aufzudecken, zum anderen hat sie die Aufgabe, die biologische Bedeutung einer identifizierten Protein-Protein-Interaktion aufzudecken. Die Protein-Protein-Interaktion im H2H-System findet im Zellkern der Hefe statt, so dass alle zu

testenden Proteine in den Zellkern transportiert werden müssen. Das gleiche Problem kann auch durch die notwendige Fusion der zu testenden Proteine an die Bindedomäne oder Aktivierungsdomäne des Gal4 Transkriptionsfaktors entstehen. Die Fusionsproteine haben eventuell eine veränderte räumliche Struktur, verglichen mit den physiologisch vorliegenden Proteinen, wodurch ebenfalls verfälschte Ergebnisse entstehen können. Zudem ist die posttranslationale Modifikation der zu testenden Proteine wichtig. In der Hefe finden zwar posttranslationale Modifikationen statt, diese weichen jedoch stark von denen im Menschen ab. Somit können die fehlenden oder veränderten Modifikationen auch zu falsch positiven oder negativen Screening-Ergebnissen führen. Mit der Untersuchung der biologischen Bedeutung einer neu identifizierten Protein-Protein-Interaktion mittels des H2H-Systems ist beispielsweise die Untersuchung in der physiologischen Umgebung gemeint. So kann es sein, dass Proteine im H2H-System interagieren, diese jedoch *in vivo* nicht interagieren können, da sie nicht im gleichen Zellkompartiment oder aufgrund des Zellzyklus nicht zur gleichen Zeit exprimiert werden.

Um neu identifizierte Protein-Protein-Interaktionen zu bestätigen, können verschiedene Methoden angewandt werden. Die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) ist eine häufig verwendete Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Hierbei werden die beiden zu testenden Interaktionspartner, fusioniert mit zwei verschiedenen Tags, in Säugerzellen überexprimiert und anschließend durch die Antikörper-vermittelte Bindung eines der beiden Interaktionspartner an eine immobilisierte Matrix aus dem Lysat gereinigt. Der Nachweis der Interaktion erfolgt mittels Western Blot gegen den nicht an die Matrix gebundenen Interaktionspartner. Diese Methode ist elegant, jedoch sehr zeitaufwendig, wodurch sie für große Screening-Ansätze nicht sehr geeignet ist (140,144). Der in dieser Studie verwendete modifizierte LUMIER Bindungs-Assay ist der Co-IP methodisch sehr ähnlich. Auch hier wird ein gebildeter Proteinkomplex durch eine Antikörper-vermittelte Bindung aus Säugerzell-Lysat aufgereinigt und anschließend das nicht an die immobilisierte Matrix gebundene Protein im Komplex nachgewiesen. Der Nachweis erfolgt jedoch nicht mittels Western Blot, sondern über die sensitive Messung der fusionierten *Renilla reniformis* Luziferase, welche an einen der beiden Interaktionspartner gekoppelt ist. Durch die hohe Sensitivität der Luziferase Messung reichen sehr geringe Mengen der exprimierten Luziferase aus, so dass die Methode, im Gegensatz zur Co-IP mit anschließendem Western Blot, ohne Probleme im 96-well-Format durchgeführt werden kann (3). Ein weiteres Beispiel zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen ist das sogenannte *protein fragment complementation assay* (PCA). Hier wird zum Beispiel ein *yellow fluorescent protein* (YFP) in zwei Domänen geteilt, von denen jede alleine kein fluoreszierendes Signal mehr produzieren kann. Beide Domänen werden mit den zu testenden Interaktionspartnern fusioniert und bei einer Koexpression der beiden Hybridproteine in Säugerzellen entsteht erst aufgrund der

Protein-Protein-Interaktion zwischen den zu testenden Proteinen ein funktionales YFP, dessen Fluoreszenz gemessen werden kann (97).

Auch die hier aufgeführten Bestätigungsmethoden besitzen ihrerseits wieder diverse Nachteile. So ist bei allen drei Methoden zu beachten, dass die Proteine erneut mit verschiedenen Tags fusioniert werden müssen, wodurch eine veränderte Faltung und Struktur der Hybridproteine nicht ausgeschlossen werden kann. Für die Co-IP oder das LUMIER Bindungs-Assay werden Antikörper zur Präzipitation benötigt und gerade bei Hochdurchsatzverfahren können keine spezifischen Antikörper gegen alle zu untersuchenden Proteine hergestellt oder kommerziell gekauft werden, wodurch die Fusion der Proteine an verschiedene Tags unumgänglich ist. Die Auswirkung der Tags auf die Detektion der Protein-Protein-Interaktionen ist zum Beispiel in Abbildung 3.3 zu sehen. In dieser Studie wurden alle Protein-Protein-Interaktionen mit beiden Tags an beiden Proteinen kreuzweise getestet. Abbildung 3.3 zeigt, dass manche Interaktionen nur in einer der beiden getesteten Situationen interagierten. Dies zeigt, dass sich die Proteine aufgrund der verschiedenen Tags in ihrem Interaktionsverhalten verändern. Um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse aufgrund der getaggten Proteine zu minimieren, könnten die Protein-Protein-Interaktionen zusätzlich mit C-terminal fusionierten Tags und in allen Permutationen untersucht werden. Eine Studie des Varizella-Zoster-Virus (VZV) Proteininteraktoms zeigt, dass Permutationen der C- und N-terminalen H2H-Vektoren die Übereinstimmung der Interaktomstudien stark verbessern und somit die Anzahl falsch-negativer Ergebnisse signifikant verringern (132).

Wie unter 3.1.2 beschrieben, wurden in dieser Studie 89 Protein-Protein-Interaktionen, die mittels des H2H-Screens identifiziert wurden, mit Hilfe des modifizierten LUMIER Bindungs-Assays untersucht und dabei 37 Protein-Protein-Interaktionen bestätigt. Dies ergibt eine Bestätigungsrate von etwa 42 %.

P. Braun *et al.* (6) stellten 2009 einen Vergleich verschiedener Methoden zur Bestätigung von binären Protein-Protein-Interaktionen an. Hierbei wurde die Strategie verfolgt, alle Protein-Protein-Interaktionen, die über eine Hochdurchsatzmethode, zum Beispiel einen H2H-Screen gefunden wurden, mit einer Reihe verschiedener Interaktions-Assays zu untersuchen. Um die Bestätigungsraten der einzelnen Methoden zu berechnen wurde ein Set von 92 binären, gut dokumentierten, humanen Protein-Protein-Interaktionen (*positive reference set* PRS-Paare) mit verschiedenen Methoden auf Interaktion überprüft. Parallel wurde ebenfalls ein Set aus 92 willkürlich zusammengesetzten Interaktionen (*random reference set* RRS-Paare) als Negativkontrolle getestet. Beide Sets wurden mit dem H2H-System, dem LUMIER Bindungs-Assay, dem *protein complementation assay* (PCA), dem *mammalian protein-protein interactions trap* (MAPPIT) und mit einer modifizierten Version des *nucleic acid programmable protein array* (wNAPPA) untersucht



(3,6,35,97,112,143,146). Das Ergebnis der Untersuchungen ist in folgender Tabelle zusammengefasst.

**Tab. 4.1: Vergleich verschiedener Interaktions-Assays.**

Modifiziert nach (6)

Interaktions-Assay	PRS-Paare	RRS-Paare
H2H	25 %	0
LUMIER	36 %	4
PCA	23 %	2
MAPPIT	33 %	2
wNAPPA	21 %	7

Alle getesteten Assays zeigen eine ähnliche Bestätigungsrate in einem Bereich zwischen 20 % und 35 %. Insgesamt wurden 55 der 92 untersuchten Protein-Protein-Interaktionen (59 %) in mindestens einer der fünf Methoden gefunden, was umgekehrt bedeutet, dass etwa 40 % der schon bekannten Interaktionen in diesem methodischen Set, bestehend aus fünf Assays, nicht identifiziert werden konnten. Wie zuvor erwähnt, konnten in dieser Arbeit etwa 42 % der mittels des H2H-Screens neu identifizierten Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des modifizierten LUMIER Bindungs-Assays bestätigt werden. Somit liegt unsere Bestätigungsrate über dem von P. Braun *et al.* (6) gezeigten Bestätigungsbereich.

## 4.2 Proteininteraktionen von SARS-Coronavirus Proteinen

Die Replikation von (+)ssRNA Viren findet in komplexer Assoziation mit zellulären Membranen aus verschiedenen Wirtszellkompartimenten statt. Die Replikation in solchen Doppelmembranvesikeln verschafft dem Virus verschiedene Vorteile. Zum einen findet die Replikation so in einer geeigneten Umgebung zur optimalen RNA Replikation statt, benötigte membranassoziierte Wirtsfaktoren sind leicht zugänglich und die Doppelmembranvesikel bieten Schutz vor der Aktivierung viraler Abwehrmechanismen der Wirtszelle.

Im Falle des SARS-CoV übernimmt Nsp12, die RNA abhängige RNA Polymerase (RdRp), die Synthese neuer (-)ssRNA-Stränge (107,131). In Tabelle 3.1 sind verschiedene Interaktionen, die im H2H-Screen identifiziert wurden, zusammengefasst. Unter anderem wurde eine Interaktion zwischen dem SARS-CoV Nsp12 und dem Genprodukt der humanen cDNA C1orf142 (*chromosome 1 open reading frame 142*) identifiziert. C1orf142 ist das sogenannte *snare like protein 47* (SNAP47). SNARE-Proteine sind essentiell an intrazellulären Membranfusionen von membranumschlossenen Vesikel beteiligt. Hat sich ein neues Vesikel durch die Abknospung eines Vorläufers gebildet, so wird es entlang des

Zytoskeletts an seinen Zielort transportiert, um dort wieder mit der Zielmembran zu verschmelzen. Die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran wird durch die Proteinfamilie der SNARE-Proteine (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), zu denen auch SNAP-47 gehört, vermittelt (57). Da das SARS-CoV in Doppelmembranvesikeln im Zytoplasma der Wirtszelle repliziert, ist die Interaktion mit einem Protein der SNARE-Familie von wissenschaftlichem Interesse. Das Hepatitis C Virus (HCV) repliziert als (+)ssRNA Virus ebenfalls in Membranvesikeln. 1999 konnten H. Tu *et al.* (139) zeigen, dass der RNA-Replikationskomplex durch Protein-Protein-Interaktionen zwischen der HCV RdRp, einem weiteren HCV-Protein (NS5A) und SNARE-like Proteinen mit der Vesikelmembran assoziiert ist. Die Interaktion der SARS-CoV RdRp mit dem SNARE-Protein SNAP-47 könnte eine ähnliche Funktion haben und die Assoziation des Replikationskomplexes mit der Vesikelmembran vermitteln. Zwischen dem SARS-CoV Nsp9, dessen Funktion die Bindung und Stabilisierung der ssRNA im Replikationskomplex ist, und dem humanen Protein SNAP-47 konnte ebenfalls eine Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.1) (33). Das SARS-CoV Nsp9 könnte zusätzlich an der Assoziation des Replikationskomplexes an der Vesikelmembran beteiligt sein. Eine funktionelle Analyse dieser neu gefundenen Interaktionen ist von großem Interesse.

Eine weitere interessante Protein-Protein-Interaktion wurde zwischen der SARS-CoV RdRp und der Prefoldin Untereinheit 5 (PFDN5) identifiziert (siehe Tab.3.1). Prefoldin ist ein molekulares Chaperon, das sowohl im Zytosol von eukaryotischen Zellen als auch in Prokaryoten zu finden ist. Ein Prefoldin Hexamer besteht aus sechs verschiedenen Untereinheiten (PFDN1-6). Dieser Chaperonkomplex bindet und stabilisiert neu synthetisierte Proteine und verhilft diesen zur korrekten Faltung (5,60). Im Jahr 2009 veröffentlichten Cloutier *et al.* (23) eine Studie von Proteinkomplexen, die mit den drei eukaryotischen RNA-Polymerasen (RNAP I bis III) assoziiert sind. Hierbei wurden jeweils die verschiedenen Untereinheiten der drei RNA-Polymerasen mit einem Tag versehen und anschließend aus Zellextrakten gereinigt. Die gereinigten Proteinkomplexe wurden dann massenspektrometrisch analysiert. Über diese Methode wurde die RNAP II, welche in der Zelle für die Synthese von mRNA verantwortlich ist, in einem Komplex mit 11 Untereinheiten gereinigt. In diesem Komplex sind unter anderem Prefoldin-Untereinheiten, die wiederum mit dem Prefoldinkomplex interagieren, enthalten. Dieser vielschichtige Prefoldin-RNAPII-Komplex scheint eine wichtige Funktion im Verlauf der RNAPII-Biogenese zu haben (23,24). Die Interaktion zwischen der SARS-CoV RdRp und der Prefoldin-Untereinheit 5 könnte somit nur ein Teil eines wesentlich größeren Komplexes sein. Dieser Komplex könnte eine ähnliche Funktion besitzen und essentielle Aufgaben in der Biogenese der SARS-CoV RdRp übernehmen. Ein weiterer Hinweis auf die Existenz eines solchen Komplexes ist die ebenfalls identifizierte Interaktion zwischen PFDN5 und dem SARS-CoV Orf 3 (siehe Tab.

3.1). Interessanterweise ist auch eine Interaktion zwischen dem SARS-CoV Orf 3 und der RdRp beschrieben, wodurch die Möglichkeit einer gemeinsamen Komplexbildung verstärkt wird (144).

Eine weitere völlig andere Funktion des PFDN5, auch *c-myc binding protein mm-1* genannt, wurde von der Arbeitsgruppe H. Ariga (52,122) beschrieben. Sie zeigten, dass PFDN5 die Transkriptionsaktivität von c-myc unterdrückt und somit als neuer Tumorsuppressor fungiert. Auch diese Funktion könnte für die Replikation des SARS-CoV von Nutzen sein. Durch die Transkriptionsaktivität von c-myc werden wichtige Prozesse in der Zelle, wie zum Beispiel der Zellzyklus, die Proliferation und Apoptose reguliert. Das Virus könnte durch die Bindung an PFDN5 die Suppressionsfunktion auf die Transkriptionsaktivität von c-myc unterbinden und somit durch einen veränderten Zellzyklus oder durch eine verspätete Apoptose mehr Zeit zur eigenen Replikation gewinnen.

Die beiden hier aufgeführten Beispiele neu identifizierter Protein-Protein-Interaktionen zeigen zum einen das Potential der über den H2H-Screen generierten Daten und zum anderen wird durch Einbezug der intraviralen Protein-Protein-Interaktionen auch die Komplexität der Protein-Netzwerke aufgezeigt.

### 4.3 Das SARS-CoV Nsp1 und Zytokinstürme in SARS-Patienten

Das SARS-CoV Nicht-Strukturprotein 1 (Nsp1) wird am 5'-Ende der Replikationsregion im Genom kodiert und somit als erstes SARS-CoV Protein im Zytoplasma einer infizierten Zelle exprimiert. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass das SARS-CoV Nsp1 die Wirtszell-mRNA degradiert (66), zudem mit dem angeborenen Immunsystem, im speziellen mit dem Interferon-System, interagiert und somit eine wichtige Rolle in der Pathogenität des SARS-CoV spielt (150,160). Darüber hinaus trägt das SARS-CoV Nsp1 nach Überexpression im Lungengewebe zu einer Dysregulation der Chemokinexpression bei (80).

Wie in der Einleitung beschrieben (siehe 1.2.3), basiert die Pathogenese des SARS-CoV zum großen Teil auf einer Überreaktion des Immunsystems. Die häufig in SARS-Patienten beschriebene Dysregulation der Zytokinexpression führte zu schweren Gewebeschädigungen in der Lunge mit damit verbundener Atemnot, die schließlich in 10 % der Fälle zum Tod der Patienten führte (14,49,58). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das SARS-CoV Nsp1 spezifisch die Expression von Genen, welche über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade reguliert werden, hochreguliert (siehe Abb.3.6). Die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade wiederum ist verantwortlich für die Expression verschiedenster Zytokine, wie zum Beispiel IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 oder auch TNF $\alpha$  und INF $\gamma$  (siehe Tab.1.4). Die spezifische Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene

durch das SARS-CoV Nsp1 ist möglicherweise verantwortlich für die Zytokindysregulation in SARS-Patienten und die Pathogenese des SARS-CoV.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der deutliche Anstieg der Expression NFAT-regulierter Immunantwortgene ein SARS-spezifischer Effekt ist. Überexpressionsstudien des HCoV-NL63 Nsp1 und des MHV Nsp1 zeigten keinen Einfluss der beiden Proteine auf die Expression NFAT-regulierter Gene (siehe Abb. 3.10). Der Verlauf einer HCoV-NL63 Infektion ist weniger fulminant als die enorm aggressive SARS-CoV-Infektion und läuft ohne Zytokindysregulation ab. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass das SARS-CoV Nsp1 an der Dysregulation der Zytokinexpression in SARS-Patienten beteiligt ist.

Um spezifischere Effekte des SARS-CoV Nsp1 auf die Zytokindysregulation zu finden, wurde zusätzlich die Modulation der IL-2, IL-4 und IL-8 Promotoren durch das SARS-CoV Nsp1 untersucht (siehe Abb. 3.11). Eine Erhöhung der Expression im gleichen Maße wie die Expressionserhöhung NFAT-regulierter Gene konnte nur mit dem IL-2 Promotor in Nierenepithelzellen gezeigt werden. Die Expression des IL-4 stieg in Nierenepithelzellen nur sehr leicht und in T-Zellen gar nicht an, während die Expression des IL-8 in Nierenepithelzellen und T-Zellen herunterreguliert wurde. Dieses Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen, da ein ähnlich starker Anstieg der NFAT-abhängig regulierten Zielgene IL-2, IL-4 und IL-8 vermutet wurde. Die Promotorregionen der Interleukine -2, -4 und -8 enthalten zusätzlich AP-1-, NFkappaB- und Bindestellen für weitere Transkriptionsfaktoren (26,87,111). In einigen *in vitro* Experimenten wurde schon gezeigt, dass verschiedene SARS-CoV Proteine wie zum Beispiel das SARS-CoV N, S, ORF 3a und ORF 7a die Expression des Transkriptionsfaktors NFkappaB erhöhen (29,68,158). Die Induktion der Interleukinexpression könnte durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener SARS-CoV Proteine, die verschiedene Signalwege modulieren und somit verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, reguliert werden.

Weitere Studien der Interleukinpromotoren mit Hilfe der Koexpression der oben genannten SARS-CoV Proteine (N, S, ORF3a und ORF7a) in Kombination mit dem SARS-CoV Nsp1, könnten hier weitere Informationen über die Regulation der Interleukinpromotoren liefern. Zu den schon aufgeführten viralen Proteinen könnten auch die SARS-CoV Proteine Nsp5, Nsp15, ORF 7b und ORF 14 die Interleukinexpression zusätzlich beeinflussen. Diese Proteine interagierten im H2H-Screen mit verschiedenen zellulären Proteinen, die an immunregulatorischen Signaltransduktionswegen beteiligt sind. So interagiert das SARS-CoV Nsp5 mit dem schon detailliert beschriebenen Nsp1-Interaktor FKBP1A (FK506 Bindeprotein 1A) und Nsp15 mit dem ebenfalls beschriebenen Nsp1-Interaktor CypA (Cyclophilin A). Eine weitere Interaktion besteht zwischen dem SARS-CoV ORF14 und HGS (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*, siehe Tab. 3.1), einem Aktivator der MAP-Kinasen. Somit könnte SARS-CoV Orf 14 durch die Interaktion mit HGS

die MAPK-Signalkaskade modulieren und die Transkriptionsfaktoren Fos und Jun, die den Transkriptionsfaktor AP-1 darstellen, aktivieren (114).

SARS-CoV ORF7b interagiert nicht direkt mit einem Signaltransduktionsweg, jedoch mit CAMLG (*calcium modulating ligand*), einem Protein der Kalziumregulation, die einen entscheidenden Schritt bei der Initiation verschiedener Signaltransduktionswege darstellt. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, hat das SARS-CoV ORF7b allein keinen Einfluss auf die Expression NFAT-regulierter Gene, die Koexpression jedoch mit einem der weiteren genannten Proteine könnte zu einer funktionellen Modulation der Interleukinexpression führen (siehe Abb.3.10).

Weiterführende Untersuchungen des Zytokinmusters SARS-CoV FFM1 infizierter Kolonkarzinomzellen (CaCo-2) zeigten eine Hochregulation dieser und weiterer Interleukine um etwa das 10-fache (siehe Abb. 3.14). Zum einen könnten in diesen Untersuchungen, welche im Viruskontext stattfanden, die in der Überexpression noch fehlenden Komponenten zusätzlich vorliegen und zum anderen ist die Zytokinexpression zelltypspezifisch. Auch Spiegel *et al.* (130) haben eine zelltypspezifische Zytokinexpression beschrieben. Untersuchungen des IL-8 und des *C-X-C motif chemokines 10* (IP-10) zeigten, dass diese beiden Zytokine in SARS-CoV infizierten Nierenepithelzellen nicht detektiert wurden, in SARS-CoV infizierten Kolonkarzinomzellen jedoch schon (130).

Zur Analyse des Zytokinmusters in Abb.3.14 wurden nur Zytokine, die unter der Regulation des Calcineurin/NFAT-Signaltransduktionswegs stehen, untersucht. Ob die enorme Hochregulation dieser Zytokinexpression tatsächlich auf der durch das SARS-CoV Nsp1 vermittelten Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene beruht, konnte durch dieses Experiment noch nicht vollständig bewiesen werden. Ein weiteres Experiment, indem die infizierten Zellen zusätzlich mit den Immunsuppressiva Cyclosporin A oder FK506 behandelt werden, könnte den endgültigen Beweis liefern. In den behandelten Zellen sollten dann die Zytokine, welche unter der Regulation des Calcineurin/NFAT-Signalwegs stehen, nicht mehr hochreguliert werden. Dieses Experiment würde den Einfluss der erstmals gezeigten Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene auf das Zytokinmuster SARS-CoV infizierter Zellen bestätigen.

Eine ausbleibende Hochregulation der Zytokine, nach Behandlung der Zellen mit CspA oder FK506 hätte enormes Potential, da vor allem die in Abb.3.14 dargestellte Hochregulation der inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF $\alpha$  um das 1000-fache in SARS-Patienten schwerwiegende Auswirkungen auf den Verlauf der Krankheit hatte. So konnte gezeigt werden, dass hohe IL-6 und IL-8 Werte im Patientenserum direkt mit einer schlechten Krankheitsprognose und einer hohen Sterberate korrelierten (43,116). Eine Behandlungsmöglichkeit der Zytokindysregulation hätte enorm positive Auswirkungen auf den Verlauf der Krankheit.

Während der SARS Epidemie waren ältere Menschen wesentlich stärker von der Krankheit betroffen als Kinder. Die Mortalität von ca. 10 % in der Gesamtpopulation stieg in der älteren Population auf bis zu 50 % an. Ältere Patienten litten an deutlich schwerer verlaufenden und länger andauernden Infektionen. Eine vergleichende Studie an jungen und alten Primaten zeigte einen direkten Zusammenhang zwischen dem Alter, der SARS-Pathogenese und der proinflammatorischen Reaktion des Immunsystems auf (127). So konnte gezeigt werden, dass die Pathogenese in älteren Primaten deutlich stärkere Auswirkungen hatte als in jungen Primaten, wobei die virale Replikation in beiden Populationen gleich war. Diese Studie zeigte extreme Unterschiede in der Immunantwort der jungen Primaten verglichen mit den älteren. Ältere Primaten reagierten mit wesentlich stärkerer Expression pro-inflammatorischer Zytokine auf die SARS-CoV Infektion, die dann zu schweren Zerstörungen in der Lunge führte. Die schwerer verlaufenden Infektionen der älteren SARS-Patienten lassen sich somit auf eine deutlich heftigere Reaktion des Immunsystems auf das Virus zurückführen und nicht auf unterschiedliche Viruslasten in den Patienten. Eine Therapie mit dem Immunsuppressivum CspA könnte gerade älteren Patienten helfen, die Überreaktionen des Immunsystems und die daraus resultierenden Gewebeschädigungen zu unterbinden.

#### **4.4 Cyclosporin A als antivirale Therapiemöglichkeit**

Das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CspA) hat interessanterweise neben seiner immunsuppressiven Wirkung zusätzlich auch antivirales Potential. Sowohl die Replikation von HIV-1, wie auch die Replikation von HCV kann durch CspA unterdrückt werden (69,95,148). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass CspA auch in der Lage ist die Replikation des SARS-CoV zu unterdrücken (siehe Abb.3.15 und 3.16). Die Behandlung von SARS Patienten mit CspA würde somit zum einen die virale Replikation des SARS-CoV unterbinden und zum zweiten die Überreaktion des Immunsystems hemmen.

Neben der Inhibition der viralen Replikation des SARS-CoV konnte in dieser Arbeit auch die Inhibition der viralen Replikation zweier weiterer Coronaviren HCoV-NL63 und HCoV-229E gezeigt werden. Diese beiden Viren verursachen im Menschen nur leichte Schnupfen und Erkältungskrankheiten und würden kaum mit einem Immunsuppressivum wie CspA, welches viele toxische Nebenwirkungen im Patienten hervorruft, behandelt werden. Untersuchungen der antiviralen Wirkung des CspA führten inzwischen zur Entdeckung und Entwicklung antiviraler Analoga, denen die immunsuppressive Wirkung fehlt. Zu diesen Analoga gehört zum Beispiel DEBIO-025, NIM811 oder Cyclosporin D (CspD). DEBIO-025 ist ein synthetisches, nicht immunsuppressives Cyclosporin, dessen inhibitorische Wirkung auf die Replikation des HCV sogar um das zehnfache stärker ist als die inhibitorische Wirkung von CspA. DEBIO-025 hat keinen hemmenden Einfluss auf den Calcineurin/NFAT-Signaltransduktionsweg und wird deshalb sowohl in Tieren wie auch in Menschen gut

toleriert und zeigt kaum toxische Effekte (95,101). NIM811 ist ebenso ein Cyclosporinderivat mit fehlender immunsuppressiver Wirkung. Die Bindeaffinität von NIM811 an Cyclophiline ist deutlich höher als die von CspA und es konnte gezeigt werden, dass es die Replikation von HCV und HIV-1 inhibiert (91). Die immunsuppressive Wirkung von CspD ist im Vergleich zu CspA um 90 % verringert. Durch die dennoch vorliegende Bindung des CspD an Cyclophiline ist die Hemmung der Replikation von HCV möglich (94,119).

Die dargestellten antiviralen Medikamente mit fehlender immunsuppressiver Wirkung werden schon in Patienten zur Therapie verschiedener viraler Infektionen eingesetzt. So konnte die antivirale Wirkung von DEBIO-025 in klinischen Studien der Phase I und II bestätigt werden, wobei das Medikament sicher und gut verträglich war (25). Eine Therapie von HCoV-NL63 und HCoV-229E Infektionen mit Hilfe dieser nicht immunsuppressiven, antiviralen Medikamente könnte ebenfalls angewendet werden.

Alle CspA Derivate mit fehlender immunsuppressiver Wirkung besaßen noch die Fähigkeit an zelluläre Cyclophiline zu binden aber nicht mehr die Fähigkeit den Calcineurin/NFAT-Signalweg inhibitorisch zu beeinflussen. Die in dieser Arbeit gezeigte Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene durch das SARS-CoV Nsp1 ist mechanistisch völlig unabhängig von der ebenfalls gezeigten Inhibition der viralen Replikation des SARS-CoV durch CspA. Dies zeigt auch der Befund, dass das HCoV-NL63 Nsp1 keinen Einfluss auf die Expression NFAT-regulierter Gene hat, jedoch die Replikation des HCoV-NL63 in gleichem Maße wie die des SARS-CoV durch CspA inhibiert wird (siehe Abb.3.17 und 3.18). Auch für HIV-1 konnte dies gezeigt werden. Zum einen wird die virale Replikation des HIV-1 aufgrund der Bindung des HIV-1 Gag-Proteins an Cyclophiline gehemmt, zum anderen erhöht jedoch das HIV-1 Tat-Protein die Expression NFAT/AP-1 regulierter Gene (54,89).

Die Inhibition der viralen Replikation durch CspA oder dessen Derivate basiert bei allen Viren auf einer Bindung viraler Proteine mit verschiedenen zellulären Cyclophilinen (Cyp). So interagiert das HIV-1 Gag Protein, genauer gesagt das HIV-1 Kapsid, *in vitro* sowohl mit CypA wie auch mit CypB (89). Es konnte zudem gezeigt werden, dass CypA, nicht jedoch CypB, in infektiöse HIV-1 Partikel inkorporiert wird. Diese Inkorporation wird sowohl durch CspA wie auch durch CspA Analoga, wie NIM811, gestört. HIV-1 Partikel mit fehlender CypA Inkorporation sind deutlich weniger infektiös (40,93,136). Der mechanistische Zusammenhang zwischen der CypA Inkorporation in HIV-1 Partikel und deren Infektiosität ist bisher ungeklärt (93,133,135). 2001 konnte zwar gezeigt werden, dass CD 147, welches als Zelloberflächenrezeptor für extrazelluläres CypA identifiziert wurde, auch mit virusassoziiertem CypA interagiert und eine essentielle Aufgabe in der HIV-Replikation übernimmt. Behandlung der Zellen mit Antikörpern gegen CD 147 zeigte eine schützende Wirkung und verhinderte die HIV-Infektion der Zellen. Die genaue Aufgabe der Protein-

Protein-Interaktionen zwischen CD 147, CypA und dem HIV-1 Kapsid Protein ist jedoch noch nicht detailliert geklärt (108). Auch für das SARS-CoV konnten parallele Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Nukleokapsid Protein und CypA sowie zwischen CypA und CD147 identifiziert werden (18,90). Zum einen könnte CypA nach der Infektion der Wirtszelle an das SARS-CoV Nukleokapsid binden, anschließend während der Virus-Reifung an die Virusoberfläche gelangen und somit, an der Virus-Oberfläche exponiert, über die Bindung an CD147 die Infektion neuer Wirtszellen vermitteln. Zum anderen könnte die Protein-Protein-Interaktion des Nukleokapsids, welches während der Virus-Reifung an die virale RNA bindet, an CypA und dessen parallele Bindung an CD147 in der Membran des Endoplasmatischen Reticulums stattfinden. Diese Protein-Protein-Wechselwirkungen könnten im Endoplasmatischen Reticulum die Bindung des Nukleokapsids an das Membranprotein vermitteln und somit die Virus-Reifung und Freisetzung stabilisieren (18).

Der genaue Wirkmechanismus der Inhibition der HCV Replikation durch CspA und CspA-Analoga ist noch umstritten. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Cyclophiline A, B und C eine essentielle Funktion übernehmen. Spezifischer *knock-down* der Cyclophiline CypA, CypB und CypC resultierte in einer verminderten HCV Replikation (94). Zwei weitere Studien zeigten eine essentielle Protein-Protein-Interaktion zwischen der HCV RNA-abhängigen RNA Polymerase und dem CypB. Durch diese Interaktion wird die Bindung der RNA zur Polymerase stabilisiert (36,149). Eine dritte Studie zeigte hingegen anhand von CypA *knock-down* Analysen eine essentielle Funktion des CypA in der HCV Replikation und Virusproduktion (70).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels H2H-Screen und LUMIER Bindungs-Assay die Interaktionen zwischen dem SARS-CoV Nsp1 und den Cyclophilinen A, B, G und H gezeigt werden. Der Wirkmechanismus der Inhibition der viralen Replikation des HCoV-NL63 und HCoV-229E durch CspA und FK506 wurde anhand der Infektion verschiedener *knock-down* Zelllinien detaillierter untersucht. So konnte erstmals gezeigt werden, dass HCoV-NL63 auf Kolonkarzinomzellen mit vollständigem CypA *knock-down* nicht mehr replizieren kann, wodurch eine essentielle Funktion des CypA im Replikationszyklus des HCoV-NL63 nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.22). Auf Kolonkarzinomzellen mit CypB *knock-down* hingegen, konnte die Replikation des HCoV-NL63 gezeigt werden (Abb. 3.22). Da sowohl mittels Echtzeit-PCR-Quantifizierung des viralen RNA-Genoms wie auch mittels Plaque-Assay keinerlei Verminderung der Replikation des HCoV-NL63 auf den CaCo-2  $\Delta$ CypB Zellen festgestellt werden konnte, übernimmt CypB höchstwahrscheinlich keine essentielle Funktion im Replikationszyklus des Virus. Aufgrund der Inhibition des HCoV-NL63 durch FK506 wurde zusätzlich die Replikation des Virus auf Kolonkarzinomzellen mit FKBP1A *knock-down* getestet (Abb. 3.22). Auch auf dieser Zelllinie war keine HCoV-NL63 Replikation



nachweisbar. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass das zelluläre Protein FKBP1A ebenfalls eine essentielle Rolle in der viralen Replikation des HCoV-NL63 übernimmt.

Zwischen der Replikation des HCoV-229E in den beiden *knock-down* Zelllinien Huh7  $\Delta$ CypA und Huh7  $\Delta$ CypB und der Replikation des Virus in der Wildtyp-Zelllinie Huh7 wt war keine Veränderung nachweisbar (Abb. 3.23). Wie der Proteinnachweis zeigte, waren die jeweiligen Proteine beider Zelllinien vollständig herunterreguliert. Bei HCV scheinen mehrere Cyclophiline eine Rolle in der viralen Replikation zu übernehmen, eventuell ist bei HCoV-229E entweder CypA oder CypB für die Replikation notwendig, so dass das Fehlen des einen Proteins durch das zweite kompensiert werden kann. Ein Test der Replikationsfähigkeit des HCoV-229E auf CypA/CypB *double-knock-down* Zellen könnte hier weitere Erkenntnisse über den Wirkmechanismus der CspA vermittelten Inhibition der viralen Replikation des HCoV-229E liefern.

Die genaue Funktion der Cyclophiline in der viralen Replikation von HCV und HIV-1 ist noch ungeklärt. Bisher wurde nur beschrieben, dass die Funktion unabhängig von immunsuppressiven Eigenschaften ist und eventuell ein Zusammenhang mit der cis/trans Peptidyl-Prolyl-Isomerase- und Chaperon-Aktivität der Cyclophiline besteht (94). Sowohl Bakterien wie auch eukaryotische Zellen reagieren auf virale Infektionen mit der Produktion verschiedener Stressproteine, zum Beispiel den sogenannten *heat shock proteins* (HSP). Diese HSP wirken als Chaperone stabilisierend während der Proteinfaltung (46). Die temporäre Bindung viraler Proteine an HSP wurde auch in eukaryotischen Zellen beschrieben (65). Cyclophiline übernehmen in der Zelle teilweise ähnliche Funktionen wie HSPs und werden ebenso unter Stressbedingungen induziert. Die Frage, auf welche Art und Weise die Viren von der Funktion der Cyclophiline profitieren, ist jedoch noch nicht geklärt (133,135).

In dieser Arbeit konnte erstmals neben der Inhibition der viralen Replikation humaner Coronaviren auch die Inhibition von drei Tiercoronaviren TGEV (Schweinecoronavirus), IBV (Vogelcoronavirus) und FCoV (Katzencoronavirus) durch CspA gezeigt werden (Abb.3.18, Abb. 3.19 und Abb. 3.21).

Tiere sind sowohl Reservoir wie auch natürlicher Wirt verschiedener bedeutender zoonotischer, respiratorischer Infektionen wie zum Beispiel Influenza in Schweinen und Vögeln oder auch das SARS-CoV in Schleichkatzen und Coronaviren in einigen weiteren Tieren (17,102). Schweine sind natürlicherweise von verschiedenen Coronaviren, entweder respiratorisch durch das respiratorische Coronavirus PRCV (*porcine respiratory coronavirus*) oder enteritisch durch das transmissible gastroenteritis Virus TGEV, infiziert. Da Schweine anatomisch, physiologisch und immunologisch dem Menschen ähneln, dienen sie als Tiermodell um die Immunmechanismen und Reaktionen des Wirtes auf Influenza und

Coronavirus Infektionen zu untersuchen (12). TGEV Infektionen betreffen Schweine aller Altersgruppen und breiten sich in 2-3 Tagen auf die gesamte Herde aus. Der Grad der Erkrankung ist altersspezifisch, bei Saugferkeln liegt die Mortalitätsrate sogar bei 100 % (153). TGEV infizierte Tiere zeigen keine Überreaktion des Immunsystems, wodurch eine Therapie der TGEV Infektion durch die oben aufgeführten CspA - Analoga von Vorteil wäre.

Das Infektiöse Bronchitis Virus (IBV) infiziert Hühner und ist eine der wichtigsten Ursachen für ökonomische Verluste in der Geflügelindustrie. Betroffen ist sowohl die Fleisch- wie auch die Eierindustrie (10). IBV infiziert neben den Atemwegen auch den Gastrointestinaltrakt, führt hier jedoch zu keinen klinischen Symptomen. Es wurde gezeigt, dass wie bei einer SARS-CoV Infektion virusbedingte, zytolytische Effekte zu den Hauptmerkmalen der Pathogenese gehören. Die zelluläre Immunantwort auf das Virus ist ein entscheidender Faktor für die Entwicklung der schweren Krankheit (105). Die duale Wirkung des CspA gegen die Überreaktion des Immunsystems sowie gegen die virale Replikation des IBV öffnet neue Therapiemöglichkeiten gegen dieses Virus.

Das Katzencoronavirus FCoV ist in zwei Biotypen, das feline enterale Coronavirus (FECV) und das feline infektiöse Peritonitis Virus (FIP) unterteilt. FECV ist ubiquitär unter den Katzen verbreitet und verursacht leichte, verdeckte Enteritis. FIP hingegen führt zu einer letalen, systemischen Infektion mit gravierenden Entzündungsreaktionen (115). Ebenso wie bei einer Infektion mit dem SARS-CoV ist der Grad der Erkrankung wahrscheinlich vom Immunphänotyp der Katze und nicht von der Viruslast abhängig (71). Verschiedene Studien haben eine veränderte Zytokinexpression in FIP erkrankten Katzen im Vergleich mit gesunden Katzen gezeigt. Im speziellen wurden signifikant erhöhte Spiegel pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in FIP infizierten Katzen beschrieben (115). Da FIP eine immunvermittelte Erkrankung ist, zielt die Behandlung der Tiere, zum Beispiel mit Prednisolon, auf eine Kontrolle der Immunantwort ab, führt jedoch nicht zur Beseitigung der Infektion (53). Die Behandlung der Tiere mit dem Immunsuppressivum CspA würde somit zum einen die Immunantwort der Tiere unter Kontrolle bringen und zum anderen die virale Replikation des FCoV inhibieren und damit die Ursache der Erkrankung beseitigen.

Die durch CspA inhibierbaren Tiercoronaviren sind Vertreter aus jeder der drei Gruppen der Coronaviren (siehe Tab. 1.1). Diese Erkenntnisse deuten auf einen gruppenübergreifenden Mechanismus der Inhibition der viralen Replikation hin.

## 5 Zusammenfassung

Im November 2002 brach das Schwere Akute Atemwegssyndrom (*severe acute respiratory syndrom*, SARS) zum ersten Mal in der chinesischen Provinz Guangdong aus. Dieser Erreger verursachte aufgrund des internationalen Flugverkehrs erstmals eine weltweite Epidemie. Verschiedene Forschungseinrichtungen konnten in Zusammenarbeit mit der Weltgesundheitsorganisation (WHO) das SARS-assoziierte Coronavirus (SARS-CoV) als Erreger der schweren Krankheit identifizieren. Insgesamt wurden während der Epidemie etwa 8000 Menschen infiziert, von denen ca. 10 % verstarben. Obwohl seit Sommer 2003 keine Neuinfektionen mehr beobachtet wurden, kann ein erneutes Auftreten dieses Pathogens nicht ausgeschlossen werden. Bis heute steht keine spezifische Therapie gegen SARS-CoV zur Verfügung.

Viren haben ein sehr kompaktes Genom, in dem nicht alle notwendigen Proteine kodiert sind, die für einen kompletten Infektionszyklus benötigt werden. Aus diesem Grund sind Viren ausnahmslos abhängig von den Protein-Protein-Interaktionen mit einer lebenden Wirtszelle. Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem SARS-CoV und der humanen Wirtszelle trägt zum besseren Verständnis der viralen Replikation und Pathogenität bei. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde ein automatisierter, genomweiter Hefe-Zwei-Hybrid (H2H)-Screen zwischen allen 28 Proteinen des SARS-CoV und den Genprodukten von drei humanen cDNA-Banken durchgeführt, wobei ca. 460, zumeist völlig neue, Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem SARS-CoV und dem humanen Wirt identifiziert wurden.

Ziel dieser Arbeit war es, die neu identifizierten Protein-Protein-Interaktionen zu bestätigen und funktionelle Analysen ausgewählter Interaktionen durchzuführen, um neue Angriffspunkte für die antivirale Therapie zu finden. 89 Protein-Protein-Interaktionen, die im H2H-Screen neu identifiziert werden konnten, wurden mit Hilfe des modifizierten LUMIER Bindungs-Assays zur Bestätigung der einzelnen Interaktionen untersucht. Von diesen 89 getesteten Protein-Protein-Interaktionen waren 37 Tests positiv, wodurch sich eine Bestätigungsrate von 42 % ergab. In anschließenden funktionellen Analysen der Protein-Interaktionen zwischen dem SARS-CoV Nicht-Strukturprotein 1 (Nsp1) und Proteinen der Immunophilinfamilie konnten zwei Funktionen dieser Interaktionen aufgezeigt werden.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass das SARS-CoV Nsp1 die Expression von Genen, welche über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade reguliert werden, erhöht. Die SARS-spezifische Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene kann eine Ursache der in SARS-Patienten beschriebenen Zytokindysregulation sein. Diese Zytokindysregulation führt zu schweren Gewebeschädigungen in der Lunge und trägt maßgeblich zum schlechten Ausgang der Krankheit bei. Das weniger pathogene humane Coronavirus HCoV-NL63 und das Maus-Coronavirus MHV zeigten diese Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene nicht auf. Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass eine Behandlung der

Zytokindysregulation mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A positive Auswirkungen auf den Verlauf der Krankheit hat.

Zum zweiten konnte erstmals gezeigt werden, dass die Replikation des SARS-CoV durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A gehemmt werden kann. Anschließende Inhibitionsversuche der deutlich harmloseren humanen Coronaviren HCoV-NL63 und HCoV-229E zeigten die gleiche Hemmung der viralen Replikation durch Cyclosporin A. In Kooperation mit verschiedenen Arbeitsgruppen des SARS-Zoonose-Verbands konnten weitere Inhibitionsversuche mit den Tiercoronaviren FCoV, IBV Bd und TGEV PUR46 durchgeführt werden und ebenfalls ein inhibitorisches Potential des Cyclosporin A auf die virale Replikation dieser Tiercoronaviren gezeigt werden.

In weiterführenden Untersuchungen zum Wirkmechanismus der CspA- und FK506-vermittelten Inhibition der Replikation des humanen Coronavirus HCoV-NL63 konnten die beiden zellulären Proteine Cyclophilin A und FK506-Bindeprotein1A (FKBP1A) erstmals als essentielle Proteine für die virale Replikation identifiziert werden.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können dazu beitragen, die komplexen Interaktionen zwischen dem SARS-CoV, der infizierten Wirtszelle und der Immunabwehr besser zu verstehen. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit ein allgemeiner, coronaviraler Inhibitor in Form von Cyclosporin A identifiziert werden. Nicht-immunsuppressive Cyclosporin A Analoga wie DEBIO 025 sind deshalb mögliche Kandidaten für die Therapie coronaviraler Infektionen.

## 6 Abstract

The severe acute respiratory syndrome (SARS) was first observed in the Chinese province Guangdong in November 2002. The disease quickly spread around the globe via air travelling and caused a worldwide epidemic. Several research institutions together with the World Health Organisation (WHO) identified the SARS-coronavirus (SARS-CoV) as the causative agent of this disease. During the epidemic, about 8,000 people were infected with a mortality of approximately 10%. Although no new infections have been observed since the summer of 2003, a recurrence of the pathogen cannot be excluded. Up to now, no specific therapy against the virus have been available.

Viruses contain a very compact genome, which does not encode all proteins necessary for independent replication. Thus, viruses necessarily depend on host proteins and have to interact directly with them. The analysis of protein-protein interactions between SARS-CoV and human host cells contributes to a better understanding of the viral replication and pathogenicity. Prior to this work, an automated, genome-wide yeast-two-hybrid (Y2H) screen between all 28 proteins of SARS-CoV and the gene products of three human cDNA libraries had been performed, and approximately 460, mostly new protein-protein interactions had been identified.

The aim of this work was to confirm newly identified virus-host SARS-CoV protein interactions and to functionally analyse them to identify new targets for antiviral therapy. 89 newly identified protein-protein interactions were examined via a modified LUMIER binding-assay to confirm individual interactions. 37 out of 89 protein interactions were found to be positive, resulting in a confirmation rate of 42%. In subsequent functional analyses of protein-protein interactions between the SARS-CoV non-structural protein 1 (Nsp1) and proteins of the immunophilin family, two different functional consequences were observed.

First, it could be shown that SARS-CoV Nsp1 boosts the expression of genes regulated via the calcineurin/NFAT-signalling cascade. The increased expression of NFAT-regulated genes in SARS-CoV infection may cause the cytokine dysregulation described in SARS patients which leads to severe lung tissue destructions and which correlates with high mortality. The considerably less harmful human coronavirus HCoV-NL63 and mouse coronavirus (MHV) did not boost the expression of NFAT-regulated genes. It was thus hypothesized that the therapy of the cytokine dysregulation with the immunosuppressive drug Cyclosporine A (CspA) might improve the course of the disease.

In addition, it could be shown for the first time that the replication of the SARS-CoV can be inhibited by the immunosuppressive drug CspA. Subsequent experiments showed a similar inhibition of the viral replication of the less harmful human coronavirus HCoV-NL63 and HCoV-229E mediated by CspA. In cooperation with several groups of the "SARS-Zoonose-Verband", further inhibition experiments were performed with animal coronaviruses like

FCoV, IBV Bd and TGEV PUR46, which showed a similar antiviral effect of CspA. The two cellular proteins Cyclophilin A and FK506 binding-protein 1A were shown to be essential for viral replication of HCoV-NL63.

The findings of this work may contribute to a better understanding of the interactions between SARS-CoV and infected host cells and their innate immune response. The application of the general coronaviral inhibitor CspA identified in this study and of non-immunosuppressive CspA analogues like DEBIO-025 procures promising options for anti-coronaviral therapy.

## 7 Referenzen

### 7.1 Literatur

1. **Bailer, S. M. and J. Haas.** 2009. Connecting viral with cellular interactomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:453-459.
2. **Barnard, D. L., V. D. Hubbard, J. Burton, D. F. Smee, J. D. Morrey, M. J. Otto, and R. W. Sidwell.** 2004. Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARSCoV) by calpain inhibitors and beta-D-N4-hydroxycytidine. *Antivir. Chem. Chemother.* **15**:15-22.
3. **Barrios-Rodiles, M., K. R. Brown, B. Ozdamar, R. Bose, Z. Liu, R. S. Donovan, F. Shinjo, Y. Liu, J. Dembowy, I. W. Taylor, V. Luga, N. Przulj, M. Robinson, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, I. Jurisica, and J. L. Wrana.** 2005. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* **307**:1621-1625.
4. **Bartlam, M., H. Yang, and Z. Rao.** 2005. Structural insights into SARS coronavirus proteins 34. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**:664-672.
5. **Bigotti, M. G. and A. R. Clarke.** 2008. Chaperonins: The hunt for the Group II mechanism 1. *Arch. Biochem. Biophys.* **474**:331-339.
6. **Braun, P., M. Tasan, M. Dreze, M. Barrios-Rodiles, I. Lemmens, H. Yu, J. M. Sahalie, R. R. Murray, L. Roncari, A. S. de Smet, K. Venkatesan, J. F. Rual, J. Vandenhoute, M. E. Cusick, T. Pawson, D. E. Hill, J. Tavernier, J. L. Wrana, F. P. Roth, and M. Vidal.** 2009. An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions. *Nat. Methods* **6**:91-97.
7. **Bredenbeek, P. J., C. J. Pachuk, A. F. Noten, J. Charite, W. Luytjes, S. R. Weiss, and W. J. Spaan.** 1990. The primary structure and expression of the second open reading frame of the polymerase gene of the coronavirus MHV-A59; a highly conserved polymerase is expressed by an efficient ribosomal frameshifting mechanism. *Nucleic Acids Res.* **18**:1825-1832.
8. **Cantrell, D. A.** 1996. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Cancer Surv.* **27**:165-175.
9. **Castilletti, C., L. Bordi, E. Lalle, G. Rozera, F. Poccia, C. Agrati, I. Abbate, and M. R. Capobianchi.** 2005. Coordinate induction of IFN-alpha and -gamma by SARS-CoV also in the absence of virus replication. *Virology* **341**:163-169.
10. **Cavanagh, D.** 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet. Res.* **38**:281-297.
11. **Chan, P. K., J. S. Tam, C. W. Lam, E. Chan, A. Wu, C. K. Li, T. A. Buckley, K. C. Ng, G. M. Joynt, F. W. Cheng, K. F. To, N. Lee, D. S. Hui, J. L. Cheung, I. Chu, E. Liu, S. S. Chung, and J. J. Sung.** 2003. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:1058-1063.
12. **Charley, B., S. Riffault, and R. K. Van.** 2006. Porcine innate and adaptative immune responses to influenza and coronavirus infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1081**:130-136.
13. **Chatila, T., L. Silverman, R. Miller, and R. Geha.** 1989. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J. Immunol.* **143**:1283-1289.
14. **Chen, J. and K. Subbarao.** 2007. The Immunobiology of SARS\*. *Annu. Rev. Immunol.* **25**:443-472.

15. **Chen, J. Y., W. N. Chen, K. M. Poon, B. J. Zheng, X. Lin, Y. X. Wang, and Y. M. Wen.** 2009. Interaction between SARS-CoV helicase and a multifunctional cellular protein (Ddx5) revealed by yeast and mammalian cell two-hybrid systems. *Arch. Virol.* **154**:507-512.
16. **Chen, L., J. N. Glover, P. G. Hogan, A. Rao, and S. C. Harrison.** 1998. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* **392**:42-48.
17. **Chen, W., M. Yan, L. Yang, B. Ding, B. He, Y. Wang, X. Liu, C. Liu, H. Zhu, B. You, S. Huang, J. Zhang, F. Mu, Z. Xiang, X. Feng, J. Wen, J. Fang, J. Yu, H. Yang, and J. Wang.** 2005. SARS-associated coronavirus transmitted from human to pig. *Emerg. Infect. Dis.* **11**:446-448.
18. **Chen, Z., L. Mi, J. Xu, J. Yu, X. Wang, J. Jiang, J. Xing, P. Shang, A. Qian, Y. Li, P. X. Shaw, J. Wang, S. Duan, J. Ding, C. Fan, Y. Zhang, Y. Yang, X. Yu, Q. Feng, B. Li, X. Yao, Z. Zhang, L. Li, X. Xue, and P. Zhu.** 2005. Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Infect. Dis.* **191**:755-760.
19. **Cheng, A., W. Zhang, Y. Xie, W. Jiang, E. Arnold, S. G. Sarafianos, and J. Ding.** 2005. Expression, purification, and characterization of SARS coronavirus RNA polymerase. *Virology* **335**:165-176.
20. **Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159.
21. **Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* **1**:581-585.
22. **Cinatl, J., Jr., G. Hoever, B. Morgenstern, W. Preiser, J. U. Vogel, W. K. Hofmann, G. Bauer, M. Michaelis, H. F. Rabenau, and H. W. Doerr.** 2004. Infection of cultured intestinal epithelial cells with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Cell Mol. Life Sci.* **61**:2100-2112.
23. **Cloutier, P., R. Al-Khoury, M. Lavalley-Adam, D. Faubert, H. Jiang, C. Poitras, A. Bouchard, D. Forget, M. Blanchette, and B. Coulombe.** 2009. High-resolution mapping of the protein interaction network for the human transcription machinery and affinity purification of RNA polymerase II-associated complexes. *Methods* **48**:381-386.
24. **Cloutier, P. and B. Coulombe.** 2010. New insights into the biogenesis of nuclear RNA polymerases? *Biochem. Cell Biol.* **88**:211-221.
25. **Crabbe, R., G. Vuagniaux, J. M. Dumont, V. Nicolas-Metral, J. Marfurt, and L. Novaroli.** 2009. An evaluation of the cyclophilin inhibitor Debio 025 and its potential as a treatment for chronic hepatitis C. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **18**:211-220.
26. **Crispin, J. C. and G. C. Tsokos.** 2009. Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **8**:190-195.
27. **Davies, K. J., G. Ermak, B. A. Rothermel, M. Pritchard, J. Heitman, J. Ahnn, F. Henrique-Silva, D. Crawford, S. Canaider, P. Strippoli, P. Carinci, K. T. Min, D. S. Fox, K. W. Cunningham, R. Bassel-Duby, E. N. Olson, Z. Zhang, R. S. Williams, H. P. Gerber, M. Perez-Riba, H. Seo, X. Cao, C. B. Klee, J. M. Redondo, L. J. Maltais, E. A. Bruford, S. Povey, J. D. Molkentin, F. D. McKeon, E. J. Duh, G. R. Crabtree, M. S. Cyert, L. S. de la, and X. Estivill.** 2007. Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB J.* **21**:3023-3028.
28. **Dooley, A. J., N. Shindo, B. Taggart, J. G. Park, and Y. P. Pang.** 2006. From genome to drug lead: identification of a small-molecule inhibitor of the SARS virus. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**:830-833.



29. **Dosch, S. F., S. D. Mahajan, and A. R. Collins.** 2009. SARS coronavirus spike protein-induced innate immune response occurs via activation of the NF-kappaB pathway in human monocyte macrophages in vitro. *Virus Res.* **142**:19-27.
30. **Drosten, C., S. Gunther, W. Preiser, W. S. van der, 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**:1967-1976.
31. **Dumont, F. J.** 2000. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr. Med. Chem.* **7**:731-748.
32. **edited by Thiel, V.** 2007. *Coronaviruses; Molecular and Cellular Biology.* Caister Academic Press, Norfolk, UK.
33. **Egloff, M. P., F. Ferron, V. Campanacci, S. Longhi, C. Rancurel, H. Dutartre, E. J. Snijder, A. E. Gorbalenya, C. Cambillau, and B. Canard.** 2004. The severe acute respiratory syndrome-coronavirus replicative protein nsp9 is a single-stranded RNA-binding subunit unique in the RNA virus world  
1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:3792-3796.
34. **Enjuanes, L., F. Almazan, I. Sola, and S. Zuniga.** 2006. Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu. Rev. Microbiol* **60**:211-230.
35. **Eyckerman, S., A. Verhee, J. V. der Heyden, I. Lemmens, X. V. Ostade, J. Vandekerckhove, and J. Tavernier.** 2001. Design and application of a cytokine-receptor-based interaction trap. *Nat. Cell Biol.* **3**:1114-1119.
36. **Fernandes, F., I. U. Ansari, and R. Striker.** 2010. cyclosporine inhibits a direct interaction between cyclophilins and hepatitis C NS5A. *PLoS. ONE.* **5**:e9815.
37. **Fields, S. and O. Song.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**:245-246.
38. **Flint, S. J., L. W. Enquist, V. R. Racaniello, and A. M. Skalka.** 2009. *Principles of Virology; Volume II Pathogenesis and Control.* ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC.
39. **Fouchier, R. A., T. Kuiken, M. Schutten, A. G. van, 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.
40. **Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban.** 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**:359-362.
41. **Freundt, E. C., L. Yu, C. S. Goldsmith, S. Welsh, A. Cheng, B. Yount, W. Liu, M. B. Frieman, U. J. Buchholz, G. R. Screaton, J. Lippincott-Schwartz, S. R. Zaki, X. N. Xu, R. S. Baric, K. Subbarao, and M. J. Lenardo.** 2010. The open reading frame 3a protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus promotes membrane rearrangement and cell death. *J. Virol.* **84**:1097-1109.
42. **Frieman, M. and R. Baric.** 2008. Mechanisms of severe acute respiratory syndrome pathogenesis and innate immunomodulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**:672-85, Table.
43. **Frieman, M., M. Heise, and R. Baric.** 2008. SARS coronavirus and innate immunity. *Virus Res.* **133**:101-112.
44. **Fromont-Racine, M., J. C. Rain, and P. Legrain.** 1997. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat. Genet.* **16**:277-282.

45. **Galeazzi, M., F. Bellisai, C. Giannitti, S. Manganelli, G. Morozzi, and G. D. Sebastiani.** 2007. Safety of cyclosporin A in HCV-infected patients: experience with cyclosporin A in patients affected by rheumatological disorders and concomitant HCV infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1110**:544-549.
46. **Gething, M. J. and J. Sambrook.** 1992. Protein folding in the cell. *Nature* **355**:33-45.
47. **Gorbalenya, A. E., L. Enjuanes, J. Ziebuhr, and E. J. Snijder.** 2006. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res.* **117**:17-37.
48. **Greenough, T. C., G. J. Babcock, A. Roberts, H. J. Hernandez, W. D. Thomas, Jr., J. A. Coccia, R. F. Graziano, M. Srinivasan, I. Lowy, R. W. Finberg, K. Subbarao, L. Vogel, M. Somasundaran, K. Luzuriaga, J. L. Sullivan, and D. M. Ambrosino.** 2005. Development and characterization of a severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody that provides effective immunoprophylaxis in mice. *J. Infect. Dis.* **191**:507-514.
49. **Gu, J. and C. Korteweg.** 2007. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am. J. Pathol.* **170**:1136-1147.
50. **Guan, Y., B. J. Zheng, Y. Q. He, X. L. Liu, Z. X. Zhuang, C. L. Cheung, S. W. Luo, P. H. Li, L. J. Zhang, Y. J. Guan, K. M. Butt, K. L. Wong, K. W. Chan, W. Lim, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, J. S. Peiris, and L. L. Poon.** 2003. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* **302**:276-278.
51. **Guo, Y., C. Korteweg, M. A. McNutt, and J. Gu.** 2008. Pathogenetic mechanisms of severe acute respiratory syndrome. *Virus Res.* **133**:4-12.
52. **Hagio, Y., Y. Kimura, T. Taira, Y. Fujioka, S. M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga.** 2006. Distinct localizations and repression activities of MM-1 isoforms toward c-Myc 2. *J Cell Biochem.* **97**:145-155.
53. **Hartmann, K. and S. Ritz.** 2008. Treatment of cats with feline infectious peritonitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **123**:172-175.
54. **Hidalgo-Estevez, A. M., E. Gonzalez, C. Punzon, and M. Fresno.** 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Tat increases cooperation between AP-1 and NFAT transcription factors in T cells. *J. Gen. Virol.* **87**:1603-1612.
55. **Ho, S., N. Clipstone, L. Timmermann, J. Northrop, I. Graef, D. Fiorentino, J. Nourse, and G. R. Crabtree.** 1996. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **80**:S40-S45.
56. **Hoeffler, C. A., A. Dey, N. Sachan, H. Wong, R. J. Patterson, J. M. Shelton, J. A. Richardson, E. Klann, and B. A. Rothermel.** 2007. The Down syndrome critical region protein RCAN1 regulates long-term potentiation and memory via inhibition of phosphatase signaling. *J. Neurosci.* **27**:13161-13172.
57. **Holt, M., F. Varoqueaux, K. Wiederhold, S. Takamori, H. Urlaub, D. Fasshauer, and R. Jahn.** 2006. Identification of SNAP-47, a novel Qbc-SNARE with ubiquitous expression 1. *J Biol. Chem.* **281**:17076-17083.
58. **Huang, K. J., I. J. Su, M. Theron, Y. C. Wu, S. K. Lai, C. C. Liu, and H. Y. Lei.** 2005. An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients. *J. Med. Virol.* **75**:185-194.
59. **Hung, I. F., S. K. Lau, P. C. Woo, and K. Y. Yuen.** 2009. Viral loads in clinical specimens and SARS manifestations. *Hong. Kong. Med. J.* **15 Suppl 9**:20-22.
60. **Iizuka, R., Y. Sugano, N. Ide, A. Ohtaki, T. Yoshida, S. Fujiwara, T. Imanaka, and M. Yohda.** 2008. Functional characterization of recombinant prefoldin complexes from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. strain KS-1 1. *J Mol. Biol.* **377**:972-983.

61. **Imai, Y., K. Kuba, and J. M. Penninger.** 2007. Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Cell Mol. Life Sci.* **64**:2006-2012.
62. **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**:4933-4942.
63. Invitrogen. Gateway® Technology, A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. 2010. 28-9-2010.  
Ref Type: Internet Communication
64. **Jain, J., E. Burgeon, T. M. Badalian, P. G. Hogan, and A. Rao.** 1995. A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *J. Biol. Chem.* **270**:4138-4145.
65. **Jindal, S. and M. Malkovsky.** 1994. Stress responses to viral infection. *Trends Microbiol.* **2**:89-91.
66. **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**:12885-12890.
67. **Kang, C. B., Y. Hong, S. Dhe-Paganon, and H. S. Yoon.** 2008. FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals.* **16**:318-325.
68. **Kanzawa, N., K. Nishigaki, T. Hayashi, Y. Ishii, S. Furukawa, A. Niuro, F. Yasui, M. Kohara, K. Morita, K. Matsushima, M. Q. Le, T. Masuda, and M. Kannagi.** 2006. Augmentation of chemokine production by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 and 7a/X4 proteins through NF-kappaB activation. *FEBS Lett.* **580**:6807-6812.
69. **Karpas, A., M. Lowdell, S. K. Jacobson, and F. Hill.** 1992. Inhibition of human immunodeficiency virus and growth of infected T cells by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:8351-8355.
70. **Kaul, A., S. Stauffer, C. Berger, T. Pertel, J. Schmitt, S. Kallis, M. Zayas, V. Lohmann, J. Luban, and R. Bartenschlager.** 2009. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLoS. Pathog.* **5**:e1000546.
71. **Kipar, A., M. L. Meli, K. Failing, T. Euler, M. A. Gomes-Keller, D. Schwartz, H. Lutz, and M. Reinacher.** 2006. Natural feline coronavirus infection: differences in cytokine patterns in association with the outcome of infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **112**:141-155.
72. **Klee, C. B., H. Ren, and X. Wang.** 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.* **273**:13367-13370.
73. **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**:548-557.
74. **Krishnan, S. M. and N. M. Dixit.** 2011. Ribavirin-induced anemia in hepatitis C virus patients undergoing combination therapy. *PLoS. Comput. Biol.* **7**:e1001072.
75. **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**:1953-1966.
76. **Kuba, K., Y. Imai, S. Rao, H. Gao, F. Guo, B. Guan, Y. Huan, P. Yang, Y. Zhang, W. Deng, L. Bao, B. Zhang, G. Liu, Z. Wang, M. Chappell, Y. Liu, D. Zheng, A. Leibbrandt, T. Wada, A. S. Slutsky, D. Liu, C. Qin, C. Jiang, and J. M. Penninger.** 2005. A crucial role of

- angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **11**:875-879.
77. **Kuiken, T., R. A. Fouchier, M. Schutten, G. F. Rimmelzwaan, A. G. van, R. D. van, J. D. Laman, J. T. de, D. G. van, W. Lim, A. E. Ling, P. K. Chan, J. S. Tam, M. C. Zambon, R. Gopal, C. Drosten, W. S. van der, N. Escriou, J. C. Manuguerra, K. Stohr, J. S. Peiris, and A. D. Osterhaus.** 2003. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **362**:263-270.
78. **Lam, C. W., M. H. Chan, and C. K. Wong.** 2004. Severe acute respiratory syndrome: clinical and laboratory manifestations. *Clin. Biochem. Rev.* **25**:121-132.
79. **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**:14040-14045.
80. **Law, A. H., D. C. Lee, B. K. Cheung, H. C. Yim, and A. S. Lau.** 2007. Role for nonstructural protein 1 of severe acute respiratory syndrome coronavirus in chemokine dysregulation. *J. Virol.* **81**:416-422.
81. **Law, H. K., C. Y. Cheung, H. Y. Ng, S. F. Sia, Y. O. Chan, W. Luk, J. M. Nicholls, J. S. Peiris, and Y. L. Lau.** 2005. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* **106**:2366-2374.
82. **Lee, M. and J. Park.** 2006. Regulation of NFAT activation: a potential therapeutic target for immunosuppression. *Mol. Cells* **22**:1-7.
83. **Lemley, D. E. and P. Katz.** 1988. Therapeutic strategies in autoimmune disease: cyclosporin A as a model agent. *In Vivo* **2**:115-118.
84. **Lewis, R. S.** 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:497-521.
85. **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**:450-454.
86. **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**:676-679.
87. **Li-Weber, M. and P. H. Krammer.** 2003. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:534-543.
88. **Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, A. S. Rakeman, and A. Rao.** 1999. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:7214-7219.
89. **Luban, J., K. L. Bossolt, E. K. Franke, G. V. Kalpana, and S. P. Goff.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**:1067-1078.
90. **Luo, C., H. Luo, S. Zheng, C. Gui, L. Yue, C. Yu, T. Sun, P. He, J. Chen, J. Shen, X. Luo, Y. Li, H. Liu, D. Bai, J. Shen, Y. Yang, F. Li, J. Zuo, R. Hilgenfeld, G. Pei, K. Chen, X. Shen, and H. Jiang.** 2004. Nucleocapsid protein of SARS coronavirus tightly binds to human cyclophilin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**:557-565.
91. **Ma, S., J. E. Boerner, C. TiongYip, B. Weidmann, N. S. Ryder, M. P. Cooreman, and K. Lin.** 2006. NIM811, a cyclophilin inhibitor, exhibits potent in vitro activity against hepatitis C virus alone or in combination with alpha interferon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2976-2982.

92. **Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, and A. Rao.** 2001. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**:2476-2489.
93. **Mascarenhas, A. P. and K. Musier-Forsyth.** 2009. The capsid protein of human immunodeficiency virus: interactions of HIV-1 capsid with host protein factors. *FEBS J.* **276**:6118-6127.
94. **Nakagawa, M., N. Sakamoto, Y. Tanabe, T. Koyama, Y. Itsui, Y. Takeda, C. H. Chen, S. Kakinuma, S. Oooka, S. Maekawa, N. Enomoto, and M. Watanabe.** 2005. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* **129**:1031-1041.
95. **Neyts, J.** 2006. Selective inhibitors of hepatitis C virus replication. *Antiviral Res.* **71**:363-371.
96. **Normile, D.** 2004. Severe acute respiratory syndrome: lab accidents prompt calls for new containment program. *Science* **304**:1223-1225.
97. **Nyfeler, B., S. W. Michnick, and H. P. Hauri.** 2005. Capturing protein interactions in the secretory pathway of living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:6350-6355.
98. **Obchoei, S., S. Wongkhan, C. Wongkham, M. Li, Q. Yao, and C. Chen.** 2009. Cyclophilin A: potential functions and therapeutic target for human cancer. *Med. Sci. Monit.* **15**:RA221-RA232.
99. **Okabayashi, T., H. Kariwa, S. Yokota, S. Iki, T. Indoh, N. Yokosawa, I. Takashima, H. Tsutsumi, and N. Fujii.** 2006. Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections. *J. Med. Virol.* **78**:417-424.
100. **Oostra, M., E. G. te Lintelo, M. Deijs, M. H. Verheije, P. J. Rottier, and C. A. de Haan.** 2007. Localization and membrane topology of coronavirus nonstructural protein 4: involvement of the early secretory pathway in replication. *J. Virol.* **81**:12323-12336.
101. **Paeshuyse, J., A. Kaul, C. E. De, B. Rosenwirth, J. M. Dumont, P. Scalfaro, R. Bartenschlager, and J. Neyts.** 2006. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology* **43**:761-770.
102. **Palese, P.** 2004. Influenza: old and new threats. *Nat. Med.* **10**:S82-S87.
103. **Pang, Y. P.** 2004. Three-dimensional model of a substrate-bound SARS chymotrypsin-like cysteine proteinase predicted by multiple molecular dynamics simulations: catalytic efficiency regulated by substrate binding. *Proteins* **57**:747-757.
104. **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**:1319-1325.
105. **Perlman, S. and A. A. Dandekar.** 2005. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nat. Rev. Immunol.* **5**:917-927.
106. **Plant, E. P. and J. D. Dinman.** 2008. The role of programmed-1 ribosomal frameshifting in coronavirus propagation. *Front Biosci.* **13**:4873-4881.
107. **Prentice, E., J. McAuliffe, X. Lu, K. Subbarao, and M. R. Denison.** 2004. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *J. Virol.* **78**:9977-9986.
108. **Pushkarsky, T., G. Zybarth, L. Dubrovsky, V. Yurchenko, H. Tang, H. Guo, B. Toole, B. Sherry, and M. Bukrinsky.** 2001. CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:6360-6365.

109. **Pyrk, K., B. Berkhout, and H. L. van der.** 2007. The novel human coronaviruses NL63 and HKU1. *J. Virol.* **81**:3051-3057.
110. **Rabenau, H. F., J. Cinatl, B. Morgenstern, G. Bauer, W. Preiser, and H. W. Doerr.** 2005. Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Med. Microbiol. Immunol.* **194**:1-6.
111. **Rahman, I.** 2002. Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochem. Pharmacol.* **64**:935-942.
112. **Ramachandran, N., J. V. Raphael, E. Hainsworth, G. Demirkan, M. G. Fuentes, A. Rolfs, Y. Hu, and J. LaBaer.** 2008. Next-generation high-density self-assembling functional protein arrays. *Nat. Methods* **5**:535-538.
113. **Rao, A., C. Luo, and P. G. Hogan.** 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:707-747.
114. **Rayala, S. K., P. Hollander, S. Balasenthil, P. R. Molli, A. J. Bean, R. K. Vadlamudi, R. A. Wang, and R. Kumar.** 2006. Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) interacts with PELP1 and activates MAPK. *J. Biol. Chem.* **281**:4395-4403.
115. **Regan, A. D., R. D. Cohen, and G. R. Whittaker.** 2009. Activation of p38 MAPK by feline infectious peritonitis virus regulates pro-inflammatory cytokine production in primary blood-derived feline mononuclear cells. *Virology* **384**:135-143.
116. **Reghunathan, R., M. Jayapal, L. Y. Hsu, H. H. Chng, D. Tai, B. P. Leung, and A. J. Melendez.** 2005. Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. *BMC. Immunol.* **6**:2.
117. **Rengarajan, J., P. R. Mittelstadt, H. W. Mages, A. J. Gerth, R. A. Kroczeck, J. D. Ashwell, and L. H. Glimcher.** 2000. Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation. *Immunity.* **12**:293-300.
118. **Rothermel, B. A., R. B. Vega, and R. S. Williams.** 2003. The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc. Med.* **13**:15-21.
119. **Sadeg, N., C. Pham-Huy, P. Rucay, S. Righenzi, O. Halle-Pannenko, J. R. Claude, H. Bismuth, and H. T. Duc.** 1993. In vitro and in vivo comparative studies on immunosuppressive properties of cyclosporines A, C, D and metabolites M1, M17 and M21. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **15**:163-177.
120. **Sagoo, J. K., D. A. Fruman, S. Wesselborg, C. T. Walsh, and B. E. Bierer.** 1996. Competitive inhibition of calcineurin phosphatase activity by its autoinhibitory domain. *Biochem. J.* **320 ( Pt 3)**:879-884.
121. **Satija, N. and S. K. Lal.** 2007. The molecular biology of SARS coronavirus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1102**:26-38.
122. **Satou, A., T. Taira, S. M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga.** 2001. A novel transrepression pathway of c-Myc. Recruitment of a transcriptional corepressor complex to c-Myc by MM-1, a c-Myc-binding protein  
2. *J Biol. Chem.* **276**:46562-46567.
123. **Sawicki, S. G., D. L. Sawicki, and S. G. Siddell.** 2007. A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* **81**:20-29.
124. **Schuh, K., A. Avots, H. P. Tony, E. Serfling, and C. Kneitz.** 1996. Nuclear NF-ATp is a hallmark of unstimulated B cells from B-CLL patients. *Leuk. Lymphoma* **23**:583-592.
125. **Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, S. Chuvpilo, E. Jankevics, S. Klein-Hessling, T. Twardzik, and A. Avots.** 2000. The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1498**:1-18.

126. **Shaw, J. P., P. J. Utz, D. B. Durand, J. J. Toole, E. A. Emmel, and G. R. Crabtree.** 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**:202-205.
127. **Smits, S. L., L. A. de, J. M. van den Brand, L. M. Leijten, W. F. van IJcken, M. J. Eijkemans, A. G. van, T. Kuiken, A. C. Andeweg, A. D. Osterhaus, and B. L. Haagmans.** 2010. Exacerbated innate host response to SARS-CoV in aged non-human primates. *PLoS Pathog.* **6**:e1000756.
128. **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.
129. **Snijder, E. J., M. Y. van der, J. Zevenhoven-Dobbe, J. J. Onderwater, M. J. van der, 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**:5927-5940.
130. **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**:2079-2086.
131. **Stadler, K., V. Maignani, M. Eickmann, S. Becker, S. Abrignani, H. D. Klenk, and R. Rappuoli.** 2003. SARS--beginning to understand a new virus  
1. *Nat. Rev. Microbiol* **1**:209-218.
132. **Stellberger, T., R. Hauser, A. Baiker, V. R. Pothineni, J. Haas, and P. Uetz.** 2010. Improving the yeast two-hybrid system with permuted fusions proteins: the Varicella Zoster Virus interactome. *Proteome. Sci.* **8**:8.
133. **Takeuchi, H. and T. Matano.** 2008. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiol. Immunol.* **52**:318-325.
134. **Tang, B. S., K. H. Chan, V. C. Cheng, P. C. Woo, S. K. Lau, C. C. Lam, T. L. Chan, A. K. Wu, I. F. Hung, S. Y. Leung, and K. Y. Yuen.** 2005. Comparative host gene transcription by microarray analysis early after infection of the Huh7 cell line by severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E. *J. Virol.* **79**:6180-6193.
135. **Thali, M.** 1995. Cyclosporins: immunosuppressive drugs with anti-HIV-1 activity. *Mol. Med. Today* **1**:287-291.
136. **Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski, and H. G. Gottlinger.** 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**:363-365.
137. **Tong, T. R.** 2009. Therapies for coronaviruses. Part 2: Inhibitors of intracellular life cycle. *Expert. Opin. Ther. Pat* **19**:415-431.
138. **Tong, T. R.** 2009. Therapies for coronaviruses. Part I of II -- viral entry inhibitors. *Expert. Opin. Ther. Pat* **19**:357-367.
139. **Tu, H., L. Gao, S. T. Shi, D. R. Taylor, T. Yang, A. K. Mircheff, Y. Wen, A. E. Gorbalenya, S. B. Hwang, and M. M. Lai.** 1999. Hepatitis C virus RNA polymerase and NS5A complex with a SNARE-like protein  
1. *Virology* **263**:30-41.
140. **Uetz, P., Y. A. Dong, C. Zeretzke, C. Atzler, A. Baiker, B. Berger, S. V. Rajagopala, M. Roupelieva, D. Rose, E. Fossum, and J. Haas.** 2006. Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science* **311**:239-242.

141. **van der, H. L.** 2007. Human coronaviruses: what do they cause? *2. Antivir. Ther.* **12**:651-658.
142. **Venkatesan, K., J. F. Rual, A. Vazquez, U. Stelzl, I. Lemmens, T. Hirozane-Kishikawa, T. Hao, M. Zenkner, X. Xin, K. I. Goh, M. A. Yildirim, N. Simonis, K. Heinzmann, F. Gebreab, J. M. Sahalie, S. Cevik, C. Simon, A. S. de Smet, E. Dann, A. Smolyar, A. Vinayagam, H. Yu, D. Szeto, H. Borick, A. Dricot, N. Klitgord, R. R. Murray, C. Lin, M. Lalowski, J. Timm, K. Rau, C. Boone, P. Braun, M. E. Cusick, F. P. Roth, D. E. Hill, J. Tavernier, E. E. Wanker, A. L. Barabasi, and M. Vidal.** 2009. An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat. Methods* **6**:83-90.
143. **Vidalain, P. O., M. Boxem, H. Ge, S. Li, and M. Vidal.** 2004. Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods* **32**:363-370.
144. **von, B. 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.
145. **von, M. C., R. Krause, B. Snel, M. Cornell, S. G. Oliver, S. Fields, and P. Bork.** 2002. Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature* **417**:399-403.
146. **Walhout, A. J. and M. Vidal.** 2001. High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* **24**:297-306.
147. **Wallemacq, P. E. and R. Reding.** 1993. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. *Clin. Chem.* **39**:2219-2228.
148. **Watashi, K., M. Hijikata, M. Hosaka, M. Yamaji, and K. Shimotohno.** 2003. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* **38**:1282-1288.
149. **Watashi, K., N. Ishii, M. Hijikata, D. Inoue, T. Murata, Y. Miyanari, and K. Shimotohno.** 2005. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol. Cell* **19**:111-122.
150. **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**:11620-11633.
151. **Weiss, S. R. and S. Navas-Martin.** 2005. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:635-664.
152. **Wesselborg, S., D. A. Fruman, J. K. Sagoo, B. E. Bierer, and S. J. Burakoff.** 1996. Identification of a physical interaction between calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFATp). *J. Biol. Chem.* **271**:1274-1277.
153. **Woods, R. D.** 2001. Efficacy of a transmissible gastroenteritis coronavirus with an altered ORF-3 gene. *Can. J. Vet. Res.* **65**:28-32.
154. **Xu, X., Y. Liu, S. Weiss, E. Arnold, S. G. Sarafianos, and J. Ding.** 2003. Molecular model of SARS coronavirus polymerase: implications for biochemical functions and drug design. *Nucleic Acids Res.* **31**:7117-7130.
155. **Yoshikawa, T., T. Hill, K. Li, C. J. Peters, and C. T. Tseng.** 2009. Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus-induced lung epithelial cytokines exacerbate SARS pathogenesis by modulating intrinsic functions of monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J. Virol.* **83**:3039-3048.
156. **Yu, H., P. Braun, M. A. Yildirim, I. Lemmens, K. Venkatesan, J. Sahalie, T. Hirozane-Kishikawa, F. Gebreab, N. Li, N. Simonis, T. Hao, J. F. Rual, A. Dricot, A. Vazquez, R. R.**



- Murray, C. Simon, L. Tardivo, S. Tam, N. Svrvikapa, C. Fan, A. S. de Smet, A. Motyl, M. E. Hudson, J. Park, X. Xin, M. E. Cusick, T. Moore, C. Boone, M. Snyder, F. P. Roth, A. L. Barabasi, J. Tavernier, D. E. Hill, and M. Vidal.** 2008. High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* **322**:104-110.
157. **Zhai, Y., F. Sun, X. Li, H. Pang, X. Xu, M. Bartlam, and Z. Rao.** 2005. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**:980-986.
158. **Zhang, X., K. Wu, D. Wang, X. Yue, D. Song, Y. Zhu, and J. Wu.** 2007. Nucleocapsid protein of SARS-CoV activates interleukin-6 expression through cellular transcription factor NF-kappaB. *Virology* **365**:324-335.
159. **Zhang, Y., J. Li, Y. Zhan, L. Wu, X. Yu, W. Zhang, L. Ye, S. Xu, R. Sun, Y. Wang, and J. Lou.** 2004. Analysis of serum cytokines in patients with severe acute respiratory syndrome. *Infect. Immun.* **72**:4410-4415.
160. **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.

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1: Aufbau eines SARS-CoV Partikels.....	3
Abb.1.2: Schematische Darstellung des SARS-CoV Genoms.....	4
Abb.1.3: Replikation des SARS-CoV Genoms.....	5
Abb.1.4: Schematische Darstellung der NFAT Proteine .....	13
Abb.1.5: Schematischer Überblick über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade .....	15
Abb. 2.1: Die Gateway Rekombinations Technologie .....	20
Abb. 3.1: Schema des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.....	48
Abb. 3.2: Das modifizierte LUMIER Bindungs-Assay.....	52
Abb. 3.3: LUMIER Ergebnis der Interaktionstests zwischen SARS-CoV Nsp1 und humanen Proteinen.....	54
Abb. 3.4: Translokation des NFAT-GFP in den Kern.....	59
Abb. 3.5: Schematische Darstellung des NFAT-Reporterassays.....	60
Abb. 3.6: SARS-CoV Nsp1 induziert die NFAT-regulierte Genexpression.....	61
Abb. 3.7: Einfluss von CypA, CypH und FKBP1A auf die Expression NFAT-regulierter Gene.....	62
Abb. 3.8: Einfluss des Calcipressins RCAN3 auf die Expression NFAT-regulierter Gene.....	63
Abb. 3.9: SARS-CoV Nsp1 induziert die NFAT-regulierte Genexpression (NFAT1 und NFAT2).....	64
Abb. 3.10: HCoV-NL63 Nsp1, MHV Nsp1 und SARS-CoV Orf7b zeigen keinen Einfluss auf die NFAT-regulierte Genexpression.....	66
Abb. 3.11: Einfluss des SARS-CoV Nsp1 auf die Expression der Interleukine 2, -4 und -8.....	67
Abb. 3.12: SARS-CoV Nsp1 induziert die NFAT-regulierte Genexpression in Jurkat Zellen.....	68
Abb. 3.13: Erhöhung der Expression NFAT-regulierter Gene durch SARS-CoV HK.....	70
Abb. 3.14: Zytokinmuster SARS-CoV FFM1 vs. HCoV-NI63 infizierter CaCo-2 Zellen.....	72
Abb. 3.15: Inhibition der SARS-CoV Replikation durch CspA (Echtzeit-RT-PCR).....	73
Abb. 3.16: Inhibition der SARS-CoV Replikation durch CspA (Plaque Assay).....	74

Abb. 3.17: Inhibition der HCoV-NL63 Replikation durch CspA und FK506 (Echtzeit-RT-PCR).....	76
Abb. 3.18: Inhibition der HCoV-NL63 Replikation durch CspA und FK506 (Plaque Assay).....	77
Abb. 3.19: Inhibition der HCoV-229E-luc Replikation durch CspA und FK506 .....	79
Abb. 3.20: Inhibition der HCoV-229E-GFP Replikation durch CspA und FK506.....	80
Abb. 3.21: Inhibition der HIV-1, IBV, TGEV und FCoV Replikation durch CspA.....	82
Abb. 3.22: Infektion von CaCo-2 <i>knock-down</i> Zelllinien mit HCoV-NL63.....	84
Abb. 3.23: Infektion von Huh7 <i>knock-down</i> Zelllinien mit HCoV-229E.....	86

Alle übernommenen Abbildungen wurden für diese Arbeit modifiziert. Alle weiteren Abbildungen wurden im Rahmen dieser Arbeit selbst angefertigt.

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Die Gruppen der Coronaviren.....	2
Tab. 1.2: Übersicht aller SARS-CoV Proteine.....	6
Tab. 1.3: Vielfalt der Zytokin-Berichte von SARS-Patienten.....	10
Tab. 1.4: Überblick der über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade regulierten Gene.....	16
Tab. 2.1: Primär-Antikörper.....	23
Tab. 2.2: Sekundär-Antikörper.....	23
Tab. 2.3: Verwendete Zelllinien.....	24
Tab. 2.4: Übersicht der Erreger und Einrichtungen .....	25
Tab. 2.5: Verwendete Viren.....	25
Tab. 2.6: Verwendete Bakterienstämme.....	25
Tab. 2.7: Vorhandene Plasmide.....	26
Tab. 2.8: In dieser Arbeit neu konstruierte Plasmide.....	28
Tab. 2.9: Primer für Gateway-Klonierungen in pENTRY-Vektor.....	31
Tab. 2.10: Primer für die Quantifizierung von Transkripten (TaqMan).....	33
Tab. 2.11: Primer und Sonden für die Quantifizierung von viraler RNA.....	34
Tab. 2.12: Zelllinien und eingesetzte Puromycinkonzentrationen.....	44
Tab. 3.1: Ausschnitt der Ergebnisliste des H2H-Screens.....	49
Tab. 3.2: Übersicht der klonierten Gen-Fragmente.....	50
Tab. 3.3: Ergebnisübersicht der beiden H2H-Screens.....	50
Tab. 3.4: LUMIER Bindungs-Assays zum Nachweis von Virus-Wirt-Proteininteraktionen.....	55
Tab. 3.5: LUMIER Bindungs-Assays zum Nachweis von Virus-Wirt-Proteininteraktionen mit Proteindomänen.....	56
Tab. 3.6: Protein-Protein-Interaktionen des SARS-CoV Nsp1 mit Proteinen der Immunophilin- und Calcipressin-Familie.....	57
Tab. 3.7: Übersicht der getesteten Erreger.....	81
Tab. 4.1: Vergleich verschiedener Interaktionsassays.....	92

## 7.4 Kooperationen

### Kooperation mit Dr. M. Kögl am DKFZ in Heidelberg (siehe 3.1.2):

Die initialen Protein-Protein-Interaktionstests wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit unter Anleitung und im Labor von Dr. M. Kögl in Heidelberg durchgeführt. Zusätzliche Protein-Protein-Interaktionstests wurden dann sowohl im Rahmen dieser Doktorarbeit in München, als auch von Mitarbeitern von Dr. M. Kögl in Heidelberg durchgeführt. Nach Modifikation des Lumier-Assays und einem *Upscaling* auf ein 96-well-Format am DKFZ wurden dort nochmals alle Interaktionen automatisiert wiederholt (Ergebnisse in Abbildung 3.3.4 und Tabellen 3.4 und 3.5).

Da die sicherheitstechnischen Einrichtungen am Max-von-Pettenkofer-Institut nur Experimente mit Viren bis zur Risikogruppe 2 erlauben, mussten die Versuche mit SARS-CoV (Risikogruppe 3plus) im Rahmen folgender Kooperationen durchgeführt werden:

### Kooperation mit M. Müller der AG C. Drosten in Bonn und T. Kuri der AG F. Weber in Freiburg (siehe 3.2.6):

Der NFAT-Reporterassay im Viruskontext wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit von mir als auch von M. Müller im S3-Labor in Bonn etabliert und durchgeführt. Die unter 3.2.6 dargestellten Ergebnisse stammen von M. Müller.

Jurkat-Zellen mit stabiler Expression des NFAT-Reporterplasmids wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit erstellt und anschließend für einen Reporterassay verwendet, der von T. Kuri im S3-Labor in Freiburg durchgeführt. Die unter 3.2.6 dargestellten Reporterassay Ergebnisse wurden von T. Kuri generiert.

### Kooperation mit S. Pfefferle der AG C. Drosten in Hamburg (siehe 3.2.7):

Um das Zytokinmuster in SARS-CoV infizierten CaCo2-Zellen zu untersuchen, wurden diese Zellen von S. Pfefferle infiziert und das inaktivierte Zelllysat nach München versandt. Die Analyse der Zytokinexpression erfolgte von mir in München.

### Kooperation mit S. Pfefferle der AG C. Drosten in Hamburg (siehe 3.2.8):

Vorversuche zur Inhibition der Replikation des SARS-CoV mit Cyclosporin A und FK506 wurden von S. Pfefferle durchgeführt, die primären Daten der SARS-CoV Inhibition mit Cyclosporin A Konzentrationen von 0  $\mu$ M bis 17  $\mu$ M wurden von mir zusammen mit S. Pfefferle in Hamburg generiert. Wiederholungen dieses Experiments wurden von S. Pfefferle durchgeführt. Der Zellviabilitätstest wurde wiederum von mir in München durchgeführt.

### Kooperationen mit den Arbeitsgruppen des BMBF Zoonose Verbunds (siehe 3.2.10):

Die Daten der Inhibitionsversuche der Tiercoronaviren IBV, TGEV, FCoV sowie des HIV und EMCV wurden von den Arbeitsgruppen von Prof. G. Herrler, Prof. H.-J. Thiel, Prof. S. Pöhlmann und Prof. F. Weber durchgeführt. Der Zellviabilitätstest mit allen verwendeten Zellen wurden von mir in München durchgeführt.

## Ergebnisse H2H-Screen

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA Banken) Gensymbol	Beschreibung
"high confident"	Nsp 1	FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)
"high confident"	Nsp 1	TCEB2	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (18kDa, elongin B)
"high confident"	Nsp 1	ISCA2	iron-sulfur cluster assembly 2 homolog (S. cerevisiae)
"high confident"	Nsp 1	PDZK1	PDZ domain containing 1
"high confident"	Nsp 1	FAM29A	family with sequence similarity 29, member A
"high confident"	Nsp 1	FBLN7	fibulin 7
"high confident"	Nsp 1	EMILIN1	elastin microfibril interfacier 1
"high confident"	Nsp 1	HNRNPAB	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B
"high confident"	Nsp 1	C14orf104	chromosome 14 open reading frame 104
"high confident"	Nsp 1	OSBPL1A	oxysterol binding protein-like 1A
"high confident"	Nsp 1	HDAC2	histone deacetylase 2
"high confident"	Nsp 1	CYB5R4	cytochrome b5 reductase 4
"high confident"	Nsp 1	PTPN2	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2
"high confident"	Nsp 1	ST13	suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting protein)
"low confident"	Nsp 1	PLCG1	phospholipase C, gamma 1
"low confident"	Nsp 1	ZNF549	Zinc finger protein 549. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q6P9A3]
"low confident"	Nsp 1	PRDX4	peroxiredoxin 4
"low confident"	Nsp 1	NIP7	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog (KD93).
"low confident"	Nsp 1	NRD1	nardilysin (N-arginine dibasic convertase)
"low confident"	Nsp 1	PHKG2	phosphorylase kinase, gamma 2 (testis)
"low confident"	Nsp 1	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1 (elfin)
"low confident"	Nsp 1	SEC14L2	SEC14-like 2 (S. cerevisiae)
"low confident"	Nsp 1	SOX5	SRY (sex determining region Y)-box 5
"low confident"	Nsp 1	SPC25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
"low confident"	Nsp 1	TBRG1	transforming growth factor beta regulator 1
"low confident"	Nsp 1	RSBN1L	round spermatid basic protein 1-like
"low confident"	Nsp 1	RCAN1	regulator of calcineurin 1
"low confident"	Nsp 1	XAGE2	X antigen family, member 2
"low confident"	Nsp 1	RCAN3	RCAN family member 3
"low confident"	Nsp 1	RGS1	regulator of G-protein signalling 1
"low confident"	Nsp 1	USP14	ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase)
"low confident"	Nsp 1	TSC22D3	TSC22 domain family, member 3
"low confident"	Nsp 1	C8orf32	chromosome 8 open reading frame 32
"low confident"	Nsp 1	C3orf17	chromosome 3 open reading frame 17
"low confident"	Nsp 1	C21orf34	chromosome 21 open reading frame 34
"low confident"	Nsp 1	CROCCL2	CROCCL2 ciliary rootlet coiled-coil, rootletin-like 2 [ Homo sapiens ]
"low confident"	Nsp 1	DZIP1	Zinc finger protein DZIP1 (DAZ-interacting protein 1/2).
"low confident"	Nsp 1	ELMO1	engulfment and cell motility 1
"low confident"	Nsp 1	ADAT2	adenosine deaminase, tRNA-specific 2
"low confident"	Nsp 1	ANKFY1	Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1 (Ankyrin repeats hooked to a zinc finger motif).
"low confident"	Nsp 1	ANLN	anillin, actin binding protein
"low confident"	Nsp 1	APLN	apelin, AGTRL1 ligand
"low confident"	Nsp 1	C6orf199	chromosome 6 open reading frame 199
"low confident"	Nsp 1	FAM149A	family with sequence similarity 149, member A
"low confident"	Nsp 1	C10orf95	Uncharacterized protein C10orf95. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9H7T3]

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA Banken) Gensymbol	Beschreibung
"low confident"	Nsp 1	C19orf62	C19orf62 chromosome 19 open reading frame 62 [ Homo sapiens ];
"low confident"	Nsp 1	LOC100130729	LOC100130729 hypothetical protein LOC100130729 [ Homo sapiens ]
"low confident"	Nsp 1	LOC51149	hypothetical LOC51149
"low confident"	Nsp 1	LOC728242	CTD-2267G17.3 X antigen family, member 2-like [ Homo sapiens ]
"low confident"	Nsp 1	MACF1	microtubule-actin crosslinking factor 1
"low confident"	Nsp 1	NADK	NAD kinase
"low confident"	Nsp 1	na-Hs.540454	
"low confident"	Nsp 1	na-Hs.561342	
"low confident"	Nsp 1	KLHDC6	kelch domain containing 6 [Source:RefSeq_peptide;Acc:NP_997218]
"low confident"	Nsp 1	GPD2	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)
"low confident"	Nsp 1	FAM18B2	family with sequence similarity 18, member B2
"low confident"	Nsp 1	FLJ25770	CDNA FLJ25734 fis, clone TST05668. [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q8N7E3]
"low confident"	Nsp 1	GAGE1	G antigen 1
"low confident"	Nsp 1	IL17A	interleukin 17A
"low confident"	Nsp 1	KIAA0460	Uncharacterized protein KIAA0460. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q5VT52]
"low confident"	Nsp 1	KPTN	kaptin (actin binding protein)
"low confident"	Nsp 1	GJB6	gap junction protein, beta 6
"low confident"	Nsp 1	POLG2	polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit
"low confident"	Nsp 1	PPIG	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)
"low confident"	Nsp 1	PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)
"low confident"	Nsp 1	ORC5L	origin recognition complex, subunit 5-like (yeast)
"low confident"	Nsp 1	PI3	peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP)
"low confident"	Nsp 1	TNNT3	troponin T type 3 (skeletal, fast)
"low confident"	Nsp 1	NFIA	nuclear factor I/A
"low confident"	Nsp 1	S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1
"low confident"	Nsp 1	SCAMP2	secretory carrier membrane protein 2
"low confident"	Nsp 1	CA5B	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.1)
"low confident"	Nsp 1	CADPS2	Ca2+-dependent activator protein for secretion 2
"low confident"	Nsp 1	CAMKV	CaM kinase-like vesicle-associated
"low confident"	Nsp 1	ELAVL2	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)
"low confident"	Nsp 1	AP4S1	adaptor-related protein complex 4, sigma 1 subunit
"low confident"	Nsp 1	ASB6	ankyrin repeat and SOCS box-containing 6
"low confident"	Nsp 1	BCR	breakpoint cluster region
"low confident"	Nsp 1	MKRN2	makorin, ring finger protein, 2
"low confident"	Nsp 1	MRPL36	mitochondrial ribosomal protein L36
"low confident"	Nsp 1	na-Hs.283851	UniGene Hs.283851, Homo sapiens, CDNA FLJ39162 fis, clone OCBBF2002376
"low confident"	Nsp 1	NCL	nucleolin
"low confident"	Nsp 1	NDUFS4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4, 18kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
"low confident"	Nsp 1	FANK1	fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1
"low confident"	Nsp 1	POLR2J4	POLR2J4 polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J, 13.3kDa pseudogene
"low confident"	Nsp 1	PPIH	peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H)
"low confident"	Nsp 1	NIT1	nitrilase 1
"low confident"	Nsp 1	SFRS15	splicing factor, arginine/serine-rich 15
"low confident"	Nsp 1	SPEG	SPEG complex locus
"low confident"	Nsp 1	RPLP0	ribosomal protein, large, P0

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte (cDNA Banken) Gensymbol)	Beschreibung
"low confident"	Nsp 1	CNRIP1	chromosome 2 open reading frame 32
"low confident"	Nsp 1	ACAD8	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 8
"low confident"	Nsp 1	ATP5L	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit G
"low confident"	Nsp 1	BCL2L13	BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)
"low confident"	Nsp 1	FAM96B	family with sequence similarity 96, member B
"low confident"	Nsp 1	GOLGA4	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4
"low confident"	Nsp 1	ZNF574	zinc finger protein 574
"low confident"	Nsp 1	MAP2	microtubule-associated protein 2
"low confident"	Nsp 1	RPL37A	ribosomal protein L37a
"low confident"	Nsp 1	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa
"low confident"	Nsp 1	FLNB	filamin B, beta (actin binding protein 278)
"low confident"	Nsp 1	HK1	hexokinase 1
"high confident"	Nsp 2	DEDD2	death effector domain containing 2
"low confident"	Nsp 2	SLC46A3	solute carrier family 46, member 3
"low confident"	Nsp 2	NPHP3	nephronophthisis 3 (adolescent)
"low confident"	Nsp 2	NDRG2	NDRG family member 2
"low confident"	Nsp 2	na-Hs.650787	No description
"high confident"	Nsp 3N	FLJ20850	chromosome 19 open reading frame 60
"low confident"	Nsp 3N	ZNF74	zinc finger protein 74
"low confident"	Nsp 3N	ZNF425	zinc finger protein 425
"low confident"	Nsp 3N	ZNF410	zinc finger protein 410
"low confident"	Nsp 3N	PSMA7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7
"low confident"	Nsp 3N	GRASP	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein
"low confident"	Nsp 3N	FAM108A1	family with sequence similarity 108, member A1
"low confident"	Nsp 3N	CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
"high confident"	Nsp 3	MKRN2	makorin, ring finger protein, 2
"high confident"	Nsp 3	MKRN3	makorin, ring finger protein, 3
"high confident"	Nsp 3	ERC1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1
"high confident"	Nsp 3	RCHY1	ring finger and CHY zinc finger domain containing 1
"low confident"	Nsp 3	KCNQ2	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2
"low confident"	Nsp 3	THRA	thyroid hormone receptor, alpha (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog)
"low confident"	Nsp 3	YIPF5	Yip1 domain family, member 5
"low confident"	Nsp 3	FBXO21	F-box protein 21
"low confident"	Nsp 3	C8orf30A	chromosome 8 open reading frame 30A
"low confident"	Nsp 3	LOC728071	similar to brain protein 16
"low confident"	Nsp 3	XRCC6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6
"low confident"	Nsp 3	PAIP1	poly(A) binding protein interacting protein 1
"low confident"	Nsp 3	RNF2	ring finger protein 2
"low confident"	Nsp 4	NMB	neuromedin B
"low confident"	Nsp 4	na-Hs.655705	No description
"low confident"	Nsp 4	DNAL4	dynein, axonemal, light chain 4
"high confident"	Nsp 5	LOC56902	partner of NOB1 homolog (S. cerevisiae)
"low confident"	Nsp 5	NOMO2	NODAL modulator 2
"high confident"	Nsp 5	DNAJB6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6
"low confident"	Nsp 5	XPA	xeroderma pigmentosum, complementation group A
"low confident"	Nsp 5	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3
"low confident"	Nsp 5	Q6ZUQ1	CDNA FLJ43465 fis, clone OCBBF2036476. [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q6ZUQ1]

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA Banken) Gensymbol	Beschreibung
"low confident"	Nsp 5	PICALM	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
"low confident"	Nsp 5	PFAAP5	phosphonoformate immuno-associated protein 5
"low confident"	Nsp 5	na-Hs.688680	No description
"low confident"	Nsp 5	na-Hs.686845	No description
"low confident"	Nsp 5	na-Hs.665140	No description
"low confident"	Nsp 5	na-Hs.656378	No description
"low confident"	Nsp 5	na-Hs.639078	No description
"low confident"	Nsp 5	LOC732056	similar to oligodendrocyte transcription factor 1
"low confident"	Nsp 5	LOC728838	hypothetical protein LOC728838
"low confident"	Nsp 5	KRT222P	keratin 222 pseudogene
"low confident"	Nsp 5	HEAB	CLP1, cleavage and polyadenylation factor I subunit, homolog (S. cerevisiae)
"low confident"	Nsp 5	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa
"low confident"	Nsp 5	COX6C	cytochrome c oxidase subunit VIc
"low confident"	Nsp 5	CDH10	cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)
"low confident"	Nsp 5	C6orf120	chromosome 6 open reading frame 120
"low confident"	Nsp 5	C20orf27	chromosome 20 open reading frame 27
"high confident"	Nsp 6	LOC51255	hypothetical protein LOC51255
"low confident"	Nsp 6	SLC30A1	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1
"low confident"	Nsp 6	ISLR	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat
"high confident"	Nsp 7	DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2
"high confident"	Nsp 7	na-Hs.625564	No description
"high confident"	Nsp 7	MYO10	myosin X
"high confident"	Nsp 7	na-Hs.658915	No description
"high confident"	Nsp 7	RNF128	ring finger protein 128
"high confident"	Nsp 7	ARL4D	ADP-ribosylation factor-like 4D
"high confident"	Nsp 7	BAP1	BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)
"high confident"	Nsp 7	na-Hs.677088	No description
"high confident"	Nsp 7	na-Hs.688590	No description
"high confident"	Nsp 7	NCOA5	nuclear receptor coactivator 5
"low confident"	Nsp 7	NOMO2	NODAL modulator 2
"low confident"	Nsp 7	YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein
"low confident"	Nsp 7	YWHAE	zinc finger protein 222
"low confident"	Nsp 7	ZNF155	zinc finger protein 155
"low confident"	Nsp 7	USP37	ubiquitin specific peptidase 37
"low confident"	Nsp 7	TRIM33	tripartite motif-containing 33
"low confident"	Nsp 7	TF	transferrin
"low confident"	Nsp 7	RUTBC1	RUN and TBC1 domain containing 1
"low confident"	Nsp 7	RNASEN	ribonuclease III, nuclear
"low confident"	Nsp 7	PLEKHO1	pleckstrin homology domain containing, family O member 1
"low confident"	Nsp 7	na-Hs.675770	No description
"low confident"	Nsp 7	na-Hs.670683	No description
"low confident"	Nsp 7	na-Hs.374278	No description
"low confident"	Nsp 7	MIF4GD	MIF4G domain containing
"low confident"	Nsp 7	LOC731950	similar to slit (Drosophila) homolog 2
"low confident"	Nsp 7	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
"low confident"	Nsp 7	JMJD2C	jumonji domain containing 2C
"low confident"	Nsp 7	DNM1	dynamamin 1
"low confident"	Nsp 7	DIMT1L	DIM1 dimethyladenosine transferase 1-like (S. cerevisiae)
"low confident"	Nsp 7	CREBBP	CREB binding protein (Rubinstein-Taybi syndrome)

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte (cDNA Banken) Gensymbol)	Beschreibung
"low confident"	Nsp 7	APPBP1	amyloid beta precursor protein binding protein 1
"high confident"	Nsp 8	BZW2	basic leucine zipper and W2 domains 2
"high confident"	Nsp 8	NOMO1	NODAL modulator 1
"low confident"	Nsp 8	NOMO2	NODAL modulator 2
"low confident"	Nsp 8	TERF1	telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1
"low confident"	Nsp 8	na-ENSG00000180344	No description
"low confident"	Nsp 8	LOC91353	No description
"low confident"	Nsp 8	LOC202134	hypothetical protein LOC202134
"low confident"	Nsp 8	H2AFY2	H2A histone family, member Y2
"low confident"	Nsp 8	EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B
"low confident"	Nsp 8	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)
"high confident"	Nsp 9	FAHD1	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1
"high confident"	Nsp 9	DLG4	discs, large homolog 4 (Drosophila)
"high confident"	Nsp 9	C1orf63	chromosome 1 open reading frame 63
"high confident"	Nsp 9	NPHP3	nephronophthisis 3 (adolescent)
"high confident"	Nsp 9	PNN	pinin, desmosome associated protein
"high confident"	Nsp 9	CHMP2B	chromatin modifying protein 2B
"low confident"	Nsp 9	ENO1	enolase 1, (alpha)
"low confident"	Nsp 9	ZBTB17	zinc finger and BTB domain containing 17
"low confident"	Nsp 9	WDR52	WD repeat domain 52
"low confident"	Nsp 9	TNR	tenascin R (restrictin, janusin)
"low confident"	Nsp 9	ITGAE	integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)
"low confident"	Nsp 9	C1orf142	chromosome 1 open reading frame 142
"high confident"	Nsp 12	CHMP2B	chromatin modifying protein 2B
"high confident"	Nsp 12	CCHCR1	coiled-coil alpha-helical rod protein 1
"high confident"	Nsp 12	C1orf142	chromosome 1 open reading frame 142
"high confident"	Nsp 12	POLR2B	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B, 140kDa
"high confident"	Nsp 12	TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
"high confident"	Nsp 12	TPSAB1	trypsin alpha/beta 1
"low confident"	Nsp 12	SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b
"low confident"	Nsp 12	UTP14C	UTP14, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog C (yeast)
"low confident"	Nsp 12	TBCB	tubulin folding cofactor B
"low confident"	Nsp 12	STAMBPL1	STAM binding protein-like 1
"low confident"	Nsp 12	RAB33B	RAB33B, member RAS oncogene family
"low confident"	Nsp 12	PKP4	plakophilin 4
"low confident"	Nsp 12	PFDN5	prefoldin subunit 5
"low confident"	Nsp 12	PEX10	peroxisome biogenesis factor 10
"low confident"	Nsp 12	OR5G4P	olfactory receptor, family 5, subfamily G, member 4 pseudogene
"low confident"	Nsp 12	NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like
"low confident"	Nsp 12	NDUFA10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa
"low confident"	Nsp 12	na-Hs.666077	No description
"low confident"	Nsp 12	na-Hs.571901	No description
"low confident"	Nsp 12	MNAT1	menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (Xenopus laevis)
"low confident"	Nsp 12	MGC4172	short-chain dehydrogenase/reductase
"low confident"	Nsp 12	LOC731255	hypothetical protein LOC731255
"low confident"	Nsp 12	HOXC6	homeobox C6



Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte (cDNA Banken) Gensymbol)	Beschreibung
"low confident"	Nsp 12	GINS2	GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog)
"low confident"	Nsp 12	C1orf57	chromosome 1 open reading frame 57
"high confident"	Nsp 12	GPRASP2	G protein-coupled receptor associated sorting protein 2
"high confident"	Nsp 13	MARK2	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2
"high confident"	Nsp 13	MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
"high confident"	Nsp 13	na-Hs.131976	No description
"high confident"	Nsp 13	TMF1	TATA element modulatory factor 1
"low confident"	Nsp 13	RYBP	RING1 and YY1 binding protein
"low confident"	Nsp 13	SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b
"low confident"	Nsp 13	UBE2N	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)
"low confident"	Nsp 13	PFAAP5	phosphonoformate immuno-associated protein 5
"low confident"	Nsp 13	OCIAD2	OCIA domain containing 2
"low confident"	Nsp 13	na-Hs.638397	No description
"low confident"	Nsp 13	na-Hs.625561	No description
"low confident"	Nsp 13	na-Hs.607490	No description
"low confident"	Nsp 13	MGC4268	AMME chromosomal region gene 1-like
"low confident"	Nsp 13	CTNNA2	catenin (cadherin-associated protein), alpha 2
"low confident"	Nsp 13	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)
"low confident"	Nsp 13	C9orf39	chromosome 9 open reading frame 39
"low confident"	Nsp 13	C9orf114	chromosome 9 open reading frame 114
"low confident"	Nsp 13	AZ11	5-azacytidine induced 1
"low confident"	Nsp 13	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)
"high confident"	Nsp 14	ITIH1	inter-alpha (globulin) inhibitor H1
"low confident"	Nsp 14	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)
"low confident"	Nsp 14	DCTN2	dynactin 2 (p50)
"low confident"	Nsp 14	SMARCD2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d
"low confident"	Nsp 15	VPS72	vacuolar protein sorting 72 homolog (S. cerevisiae)
"low confident"	Nsp 15	Q6ZRV4_HUMAN	CDNA FLJ46068 fis, clone TESOP2003308. [Source:Uniprot/SPTREMBL;Acc:Q6ZRV4]
"low confident"	Nsp 15	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
"low confident"	Nsp 15	na-Hs.671913	No description
"low confident"	Nsp 15	na-Hs.645656	No description
"low confident"	Nsp 15	LRRC49	leucine rich repeat containing 49
"low confident"	Nsp 15	LOC729009	similar to Ferritin heavy chain (Ferritin H subunit)
"low confident"	Nsp 15	LOC348180	hypothetical protein LOC348180
"low confident"	Nsp 15	GNE	glucosamine (UDP-N-acetyl)-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase
"low confident"	Nsp 15	ATP6V1H	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 50/57kDa, V1 subunit H
"low confident"	Orf 3a	DCTN2	dynactin 2 (p50)
"low confident"	Orf 3a	PFDN5	prefoldin subunit 5
"low confident"	Orf 3a	YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide
"high confident"	Orf 3b	ITIH1	inter-alpha (globulin) inhibitor H1
"high confident"	Orf 3b	ALB	albumin
"high confident"	Orf 3b	DYNLL1	dynein, light chain, LC8-type 1
"low confident"	Orf 3b	SERPINA11	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 11

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA Banken) Gensymbol	Beschreibung
"low confident"	Orf 3b	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)
"low confident"	Orf 3b	DCTN2	dynactin 2 (p50)
"low confident"	Orf 6	DCTN2	dynactin 2 (p50)
"low confident"	Orf 6	BRF1	BRF1 homolog, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB
"low confident"	Orf 7a	VKORC1	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1
"low confident"	Orf 7a	SMOC1	SPARC related modular calcium binding 1
"low confident"	Orf 7a	na-Hs.668123	No description
"low confident"	Orf 7a	na-Hs.655663	No description
"low confident"	Orf 7a	na- ENSG00000203499	No description
"low confident"	Orf 7a	CEP110	centrosomal protein 110kDa
"low confident"	Orf 7b	CAMLG	calcium modulating ligand
"low confident"	Orf 7b	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1
"high confident"	Orf 8a	BAT3	HLA-B associated transcript 3
"high confident"	Orf 8a	LOC729978	similar to nuclear pore complex interacting protein
"low confident"	Orf 8a	TAX1BP3	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3
"low confident"	Orf 8a	LRP2BP	LRP2 binding protein
"low confident"	Orf 8a	EMX2	empty spiracles homeobox 2
"high confident"	Orf 9b	PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2
"low confident"	Orf 9b	MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
"low confident"	Orf 9b	RYBP	RING1 and YY1 binding protein
"low confident"	Orf 9b	RPS20	ribosomal protein S20
"low confident"	Orf 9b	RPS17	ribosomal protein S17
"low confident"	Orf 9b	na-Hs.671094	No description
"low confident"	Orf 9b	na-Hs.658201	No description
"low confident"	Orf 9b	na-Hs.611645	No description
"low confident"	Orf 9b	na-Hs.593177	No description
"low confident"	Orf 9b	FHL3	four and a half LIM domains 3
"low confident"	Orf 9b	CTNNA2	catenin (cadherin-associated protein), alpha 2
"low confident"	Orf 9b	YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein
"high confident"	Orf 14	FHL3	four and a half LIM domains 3
"high confident"	Orf 14	ITIH1	inter-alpha (globulin) inhibitor H1
"high confident"	Orf 14	HGS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
"high confident"	Orf 14	SERPINA11	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 11
"low confident"	Orf 14	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)
"low confident"	Orf 14	DCTN2	dynactin 2 (p50)
"low confident"	Orf 14	C7orf36	chromosome 7 open reading frame 36
"low confident"	E	ZNF654	zinc finger protein 654
"low confident"	E	NP_777569.1	transmembrane protein 167
"low confident"	E	MARS2	methionyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial
"high confident"	M2	TACC1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1
"high confident"	M2	TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
"high confident"	M2	RGS12	regulator of G-protein signalling 12
"high confident"	M2	NCKIPSD	NCK interacting protein with SH3 domain
"low confident"	M2	PPP1R1B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1B
"low confident"	M2	TSPAN4	tetraspanin 4
"low confident"	M2	NARFL	nuclear prelamin A recognition factor-like

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte (cDNA Banken) Gensymbol)	Beschreibung
"low confident"	M2	WDR57	WD repeat domain 57 (U5 snRNP specific)
"low confident"	M2	LOC728944	similar to THAP domain-containing protein 4
"low confident"	M2	THAP4	THAP domain containing 4
"low confident"	M2	ERAL1	Era G-protein-like 1 (E. coli)
"low confident"	M2	SSBP2	single-stranded DNA binding protein 2
"high confident"	S1	CCDC69	coiled-coil domain containing 69
"high confident"	S1	NDUFB3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3, 12kDa
"high confident"	S1	na-Hs.677088	No description
"low confident"	S1	C18orf8	chromosome 18 open reading frame 8
"low confident"	S1	THAP2	THAP domain containing, apoptosis associated protein 2
"low confident"	S1	SNAI1	snail homolog 1 (Drosophila)
"low confident"	S1	TCL1A	T-cell leukemia/lymphoma 1A
"low confident"	S1	TP53AP1	TP53 activated protein 1
"low confident"	S1	TRAFD1	TRAF-type zinc finger domain containing 1
"low confident"	S1	TXNDC9	thioredoxin domain containing 9
"low confident"	S1	WNT5B	wingless-type MMTV integration site family, member 5B
"low confident"	S1	C13orf16	chromosome 13 open reading frame 16
"low confident"	S1	PHYH	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase
"low confident"	S1	PRAF2	PRA1 domain family, member 2
"low confident"	S1	S100P	S100 calcium binding protein P
"low confident"	S1	RAB28	RAB28, member RAS oncogene family
"low confident"	S1	RCVRN	recoverin
"low confident"	S1	PRCC	papillary renal cell carcinoma (translocation-associated)
"low confident"	S1	WNT7A	wingless-type MMTV integration site family, member 7A
"low confident"	S1	PAGE1	P antigen family, member 1 (prostate associated)
"low confident"	S1	CAPZA1	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1
"low confident"	S1	CD1C	CD1c molecule
"low confident"	S1	CEP57	centrosomal protein 57kDa
"low confident"	S1	CLPS	colipase, pancreatic
"low confident"	S1	DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4
"low confident"	S1	DNPEP	aspartyl aminopeptidase
"low confident"	S1	EBI2	Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)
"low confident"	S1	EMILIN2	elastin microfibril interfacier 2
"low confident"	S1	FAM120AOS	family with sequence similarity 120A opposite strand
"low confident"	S1	FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)
"low confident"	S1	FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
"low confident"	S1	AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)
"low confident"	S1	AMHR2	anti-Mullerian hormone receptor, type II
"low confident"	S1	CALCA	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha
"low confident"	S1	B3GNT5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5
"low confident"	S1	BPGM	2,3-bisphosphoglycerate mutase
"low confident"	S1	BYSL	bystin-like
"low confident"	S1	C10orf78	Uncharacterized protein C10orf78. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q86XK3]
"low confident"	S1	C15orf39	chromosome 15 open reading frame 39
"low confident"	S1	C19orf41	chromosome 19 open reading frame 41
"low confident"	S1	na-Hs.660360	
"low confident"	S1	LOC100129138	LOC100129138 similar to THAP domain containing, apoptosis associated protein 3

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte (cDNA Banken) Gensymbol)	Beschreibung
"low confident"	S1	na-Hs.650466	
"low confident"	S1	LMCD1	LIM and cysteine-rich domains 1
"low confident"	S1	na-Hs.663938	
"low confident"	S1	na-Hs.682737	
"low confident"	S1	NGRN	neugrin, neurite outgrowth associated
"low confident"	S1	HAVCR2	hepatitis A virus cellular receptor 2
"low confident"	S1	HBG2	hemoglobin, gamma G
"low confident"	S1	HECTD3	HECT domain containing 3
"low confident"	S1	HIST1H3F	histone cluster 1, H3f
"low confident"	S1	HYAL1	hyaluronoglucosaminidase 1
"low confident"	S1	IDH3B	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta
"low confident"	S1	IL15	interleukin 15
"low confident"	S1	IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha
"low confident"	S1	ITGB3BP	integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)
"low confident"	S1	KLF6	Kruppel-like factor 6
"low confident"	S1	HIST1H4I	histone cluster 1, H4i
"low confident"	S1	ST8SIA5	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5
"low confident"	S1	STK4	serine/threonine kinase 4
"low confident"	S1	TCEB2	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (18kDa, elongin B)
"low confident"	S1	PDE6D	phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta
"low confident"	S1	PGDS	prostaglandin D2 synthase, hematopoietic
"low confident"	S1	PPP2R5E	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', epsilon isoform
"low confident"	S1	SELPLG	selectin P ligand
"low confident"	S1	PTTG1	pituitary tumor-transforming 1
"low confident"	S1	RAB5C	RAB5C, member RAS oncogene family
"low confident"	S1	RHOA	ras homolog gene family, member A
"low confident"	S1	RPL8	ribosomal protein L8
"low confident"	S1	CST6	cystatin E/M
"low confident"	S1	CALU	calumenin
"low confident"	S1	CD151	CD151 molecule (Raph blood group)
"low confident"	S1	COL6A2	Collagen alpha-2(VI) chain precursor. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P12110]
"low confident"	S1	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
"low confident"	S1	FBXO6	F-box protein 6
"low confident"	S1	ANGPT1	angiopoietin 1
"low confident"	S1	CA5B	Carbonic anhydrase 5B, mitochondrial precursor (EC 4.2.1.1)
"low confident"	S1	G3BP1	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1
"low confident"	S1	MLF1	myeloid leukemia factor 1
"low confident"	S1	MXI1	MAX interactor 1
"low confident"	S1	NCBP2	nuclear cap binding protein subunit 2, 20kDa
"low confident"	S1	NDUFA2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2, 8kDa
"low confident"	S1	NP_055483.2	GREB1 protein
"low confident"	S1	OPRL1	opiate receptor-like 1
"low confident"	S1	na-Hs.445378	Full-length cDNA clone CS0CAP008YL09 of Thymus of Homo sapiens (human)
"low confident"	S1	GLRX3	glutaredoxin 3; PKC-interacting cousin of thioredoxin
"low confident"	S1	HIGD1A	HIG1 domain family, member 1A
"low confident"	S1	HTR5B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B
"low confident"	S1	IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte (cDNA Banken) Gensymbol)	Beschreibung
"low confident"	S1	SPEG	SPEG complex locus
"low confident"	S1	UBE2J1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)
"low confident"	S1	PSMB2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2
"low confident"	S1	PPIH	peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H)
"low confident"	S1	COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb
"low confident"	S1	FN3KRP	fructosamine-3-kinase-related protein
"low confident"	S1	ANAPC11	APC11 anaphase promoting complex subunit 11 homolog (yeast)
"low confident"	S1	ASPA	aspartoacylase (Canavan disease)
"low confident"	S1	LSM2	LSM2 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)
"low confident"	S1	MAGEA3	melanoma antigen family A, 3
"low confident"	S1	MGC4172	short-chain dehydrogenase/reductase
"low confident"	S1	MRPL24	mitochondrial ribosomal protein L24
"low confident"	S1	HN1	hematological and neurological expressed 1
"low confident"	S1	HLA-DOB	major histocompatibility complex, class II, DO beta
"low confident"	S1	IIP45	invasion inhibitory protein 45
"low confident"	S1	SPAST	Spastin. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q9UBP0]
"low confident"	S1	ZCRB1	zinc finger CCHC-type and RNA binding motif 1
"low confident"	S1	TMEM70	transmembrane protein 70
"low confident"	S1	TMSB10	thymosin, beta 10
"low confident"	S1	UQCR	ubiquinol-cytochrome c reductase, 6.4kDa subunit
"low confident"	S1	PCOLCE	procollagen C-endopeptidase enhancer
"low confident"	S1	PRNP	prion protein (p27-30) (Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome)
"low confident"	S1	BANF1	barrier to autointegration factor 1
"low confident"	S1	BAT4	HLA-B associated transcript 4
"low confident"	S1	OPHN1	oligophrenin 1
"high confident"	Orf 3a	MBTPS1	membrane-bound transcription factor peptidase, site 1
"high confident"	Orf 3a	na-Hs.593067	
"high confident"	Orf 3a	FGF16	fibroblast growth factor 16
"high confident"	Orf 3a	NDUFS6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, 13kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
"low confident"	Orf 3a	na-ENSG00000214512	
"low confident"	Orf 3a	na-ENSG00000216509	
"low confident"	Orf 3a	na-Hs.607056	
"low confident"	Orf 3a	na-Hs.679512	
"low confident"	Orf 3a	MRPL39	mitochondrial ribosomal protein L39
"low confident"	Orf 3a	UPF3B	UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast)
"low confident"	Orf 3a	ECE2	endothelin converting enzyme 2
"low confident"	Orf 3a	CLDN10	claudin 10
"low confident"	Orf 3a	MT1F	metallothionein 1F
"low confident"	Orf 3a	HDHD1A	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1A
"low confident"	Orf 3a	LOC100130055	LOC100130055 similar to kinase suppressor of ras 1 [ Homo sapiens ]
"low confident"	Orf 3a	LOC729603	calcium binding protein P22 pseudogene
"low confident"	Orf 3a	MED14	mediator complex subunit 14
"low confident"	Orf 3a	DDEF1IT1	DDEF1 intronic transcript 1
"low confident"	Orf 3a	PDZK1	PDZ domain containing 1
"low confident"	Orf 3a	ANKS1B	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1B
"low confident"	Orf 3a	BAT2	HLA-B associated transcript 2

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA Banken) Gensymbol	Beschreibung
"low confident"	Orf 3a	COL6A2	Collagen alpha-2(VI) chain precursor. [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:P12110]
"low confident"	Orf 3a	ASPA	aspartoacylase (Canavan disease)
"low confident"	Orf 3a	BEX4	BEX family member 4 Homo sapiens
"low confident"	Orf 3a	MLLT10	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)
"low confident"	Orf 3a	na-Hs.134828	Transcribed locus
"low confident"	Orf 3a	GTF2F1	general transcription factor IIF, polypeptide 1, 74kDa
"high confident"	Orf 6	FATE1	fetal and adult testis expressed 1
"high confident"	Orf 6	TTC1	tetratricopeptide repeat domain 1
"high confident"	Orf 6	MAGEA3	melanoma antigen family A, 3
"high confident"	Orf 6	ATP6V1E1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E1
"high confident"	Orf 6	RAB5C	RAB5C, member RAS oncogene family
"high confident"	Orf 6	BCYRN1	brain cytoplasmic RNA 1, Bc1 analog (mouse)
"high confident"	Orf 6	EHBP1	EH domain binding protein 1
"high confident"	Orf 6	MAGEA9	melanoma antigen family A, 9
"high confident"	Orf 6	LOC728269	similar to Melanoma-associated antigen 9 (MAGE-9 antigen)
"low confident"	Orf 6	BICD2	bicaudal D homolog 2 (Drosophila)
"high confident"	Orf 7a	CRYAB	crystallin, alpha B
"high confident"	Orf 7a	SERTAD3	SERTA domain containing 3
"low confident"	Orf 7a	TCL1B	T-cell leukemia/lymphoma 1B
"low confident"	Orf 7a	NR2C2	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2
"low confident"	Orf 7a	SLC43A1	solute carrier family 43, member 1
falsch positiv	Nsp 13	ZXDC	ZXD family zinc finger C
falsch positiv	Nsp 13	GFAP	glial fibrillary acidic protein
falsch positiv	Nsp 2	KIAA1755	KIAA1755 protein
falsch positiv	Nsp 4	LAS1L	LAS1-like (S. cerevisiae)
falsch positiv	Nsp 7	DSTN	destrin (actin depolymerizing factor)
falsch positiv	Nsp 8	EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B
falsch positiv	Orf 8a	COX11	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)
falsch positiv	Nsp 7	na-Hs.615795	No description
falsch positiv	E	LOC440926	H3 histone, family 3A pseudogene
falsch positiv	Nsp 12	LOC440926	H3 histone, family 3A pseudogene
falsch positiv	Nsp 15	na-Hs.615795	No description
falsch positiv	Nsp 15	PRDX6	peroxiredoxin 6
falsch positiv	Nsp 15	SGIP1	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1
falsch positiv	Nsp 4	SNRNPB	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1
falsch positiv	Nsp 5	SGIP1	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1
falsch positiv	Nsp 8	MT2A	metallothionein 2A
falsch positiv	Orf 9b	MT2A	metallothionein 2A
falsch positiv	Orf 14	ATP6V1G1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1
falsch positiv	E	RTN1	reticulon 1
falsch positiv	E	RTN4	reticulon 4
falsch positiv	Nsp 12	ATP6V1G1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1
falsch positiv	Nsp 13	SNX3	sorting nexin 3
falsch positiv	Nsp 14	ATP6V1G1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1
falsch positiv	Nsp 3N	ATP6V1G1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G1
falsch positiv	Nsp 9	RPL10	ribosomal protein L10
falsch positiv	Orf 14	MEIS1	Meis homeobox 1
falsch positiv	Nsp 13	RING1	ring finger protein 1

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA Banken) Gensymbol	Beschreibung
falsch positiv	Nsp 5	RING1	ring finger protein 1
falsch positiv	Nsp 7	AUP1	ancient ubiquitous protein 1
falsch positiv	Orf 3a	YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein
falsch positiv	Orf 8a	HBA2	hemoglobin, alpha 2
falsch positiv	Orf 9b	YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein
falsch positiv	Orf 14	HBA2	hemoglobin, alpha 2
falsch positiv	Nsp 13	SNRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G
falsch positiv	Nsp 5	SNRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G
falsch positiv	Nsp 12	MAP1S	microtubule-associated protein 1S
falsch positiv	Nsp 13	MAP1S	microtubule-associated protein 1S
falsch positiv	Nsp 9	MAP1A	microtubule-associated protein 1A
falsch positiv	Nsp 13	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)
falsch positiv	Nsp 2	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)
falsch positiv	Nsp 8	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)
falsch positiv	Orf 6	FXYD3	FXYD domain containing ion transport regulator 3
falsch positiv	Orf 7a	ALX1	ALX homeobox 1
falsch positiv	Orf 7a	C10orf30	chromosome 10 open reading frame 30
falsch positiv	Nsp 1	C10orf30	chromosome 10 open reading frame 30
falsch positiv	Nsp 1	NOMO2	NODAL modulator 2
falsch positiv	Nsp 1	CALM2	calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)
falsch positiv	Nsp 1	POP7	processing of precursor 7, ribonuclease P subunit (S. cerevisiae)
falsch positiv	Nsp 1	NOMO3	NODAL modulator 3
falsch positiv	Nsp 1	RPL31	ribosomal protein L31
falsch positiv	Nsp 1	ALX1	ALX homeobox 1
falsch positiv	Nsp 1	AP2M1	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit
falsch positiv	S1	RPSA	ribosomal protein SA
falsch positiv	S1	POP7	processing of precursor 7, ribonuclease P subunit (S. cerevisiae)
falsch positiv	Orf 3a	TOX4	TOX high mobility group box family member 4
falsch positiv	Orf 3a	ECHS1	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial
falsch positiv	Orf 3a	FLNA	filamin A, alpha (actin binding protein 280)
falsch positiv	S1	ECHS1	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial
falsch positiv	M2	C10orf30	chromosome 10 open reading frame 30
falsch positiv	S1	GNA13	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13
falsch positiv	Nsp 1	COMMD1	copper metabolism (Murr1) domain containing 1
falsch positiv	Nsp 1	RYBP	RING1 and YY1 binding protein
falsch positiv	S1	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
falsch positiv	Orf 7a	RBM9	RNA binding motif protein 9
falsch positiv	Nsp 1	FUS	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)
falsch positiv	S1	SGTA	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, alpha
falsch positiv	S1	SNRPB	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1
falsch positiv	Orf 3a	COX7C	cytochrome c oxidase subunit VIIc
falsch positiv	Orf 3a	DNAJC7	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7
falsch positiv	S1	LOC729402	similar to 60S ribosomal protein L21
falsch positiv	S1	NDUFB7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7, 18kDa
falsch positiv	S1	GPM6B	glycoprotein M6B
falsch positiv	Nsp 1	ATP1B1	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA Banken) Gensymbol	Beschreibung
falsch positiv	Nsp 1	SNAPIN	SNAP-associated protein
falsch positiv	S1	SNAPIN	SNAP-associated protein
falsch positiv	S1	GNB2L1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1
falsch positiv	Nsp3	SNAPIN	SNAP-associated protein
falsch positiv	Orf 3a	SNAPIN	SNAP-associated protein
falsch positiv	Nsp 1	PHB2	prohibitin 2
falsch positiv	Nsp 1	TMSB4X	thymosin, beta 4, X-linked
falsch positiv	Nsp 1	STX8	syntaxin 8
falsch positiv	Nsp 1	SEPW1	selenoprotein W, 1
falsch positiv	Nsp 1	DNAJB4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4
falsch positiv	Orf 3a	CYCS	cytochrome c, somatic
falsch positiv	S1	LOC440926	H3 histone, family 3A pseudogene
falsch positiv	Nsp 1	PSAP	prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy)
falsch positiv	S1	LOC728358	similar to Neutrophil defensin 1 precursor (HNP-1) (HP-1) (HP1) (Defensin, alpha 1)
falsch positiv	Nsp 1	ZNF251	zinc finger protein 251
falsch positiv	Nsp 1	SGIP1	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1
falsch positiv	Nsp 1	SNX3	sorting nexin 3
falsch positiv	Nsp 1	ETFA	electron-transfer-flavoprotein, alpha polypeptide (glutaric aciduria II)
falsch positiv	Nsp 1	C9orf78	chromosome 9 open reading frame 78
falsch positiv	Nsp 1	NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa
falsch positiv	S1	RPL21	ribosomal protein L21
falsch positiv	Orf 3a	ZNF251	zinc finger protein 251
falsch positiv	Orf 7a	FHL2	four and a half LIM domains 2
falsch positiv	S1	MYL6	myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle
falsch positiv	S1	NU2M	NADH dehydrogenase subunit 2
falsch positiv	S1	DEFA1	defensin, alpha 1
falsch positiv	Nsp 1	EIF1B	eukaryotic translation initiation factor 1B
falsch positiv	Nsp 1	PIN1	protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1
falsch positiv	Nsp 1	SERTAD4	SERTA domain containing 4
falsch positiv	Nsp 1	TP53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
falsch positiv	Nsp 1	RPL12	ribosomal protein L12
falsch positiv	Nsp 1	UBC	ubiquitin C
falsch positiv	Nsp 1	LAS1L	LAS1-like (S. cerevisiae)
falsch positiv	Orf 3a	PIN1	protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1
falsch positiv	Orf 3a	EIF1B	eukaryotic translation initiation factor 1B
falsch positiv	S1	ATP5A1	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle
falsch positiv	Nsp 1	LOC100131438	LOC100131438 similar to Matrix-remodelling-associated protein 6 [ Homo sapiens ]
falsch positiv	Nsp 1	ATP6	ATP synthase F0 subunit 6
falsch positiv	Nsp 1	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)
falsch positiv	S1	COX11	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)
falsch positiv	Nsp 1	AUP1	ancient ubiquitous protein 1
falsch positiv	Nsp 1	LHX4	LIM homeobox 4
falsch positiv	Orf 3a	LHX4	LIM homeobox 4
falsch positiv	Nsp 1	SFRS5	splicing factor, arginine/serine-rich 5
falsch positiv	Nsp 1	C17orf37	chromosome 17 open reading frame 37
falsch positiv	S1	FTL	ferritin, light polypeptide



Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA Banken) Gensymbol	Beschreibung
falsch positiv	Nsp 1	PGM1	phosphoglucomutase 1
falsch positiv	Nsp 1	ALDOC	aldolase C, fructose-bisphosphate
falsch positiv	Orf 3a	ALDOC	aldolase C, fructose-bisphosphate
falsch positiv	S1	ALDOC	aldolase C, fructose-bisphosphate
falsch positiv	Orf 3a	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
falsch positiv	Nsp 1	MAP1B	microtubule-associated protein 1B
falsch positiv	Nsp 1	C11orf17	chromosome 11 open reading frame 17
falsch positiv	Nsp3	MAP1B	microtubule-associated protein 1B
falsch positiv	Orf 6	MAP1B	microtubule-associated protein 1B
falsch positiv	Orf 3a	C11orf17	chromosome 11 open reading frame 17
falsch positiv	Nsp3	TAF1	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 250kDa
falsch positiv	Nsp 1	TAF1	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 250kDa
falsch positiv	M2	TAF1	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 250kDa
falsch positiv	Orf 3a	ACTB	actin, beta
falsch positiv	S1	COX3	cytochrome c oxidase subunit III
falsch positiv	S1	HBB	hemoglobin, beta
falsch positiv	S1	OTX2	orthodenticle homeobox 2
falsch positiv	Orf 7a	OTX2	orthodenticle homeobox 2
falsch positiv	Nsp 1	OTX2	orthodenticle homeobox 2
falsch positiv	Nsp 1	PAX6	paired box gene 6 (aniridia, keratitis)
falsch positiv	S1	PAX6	paired box gene 6 (aniridia, keratitis)
falsch positiv	Orf 3a	OTX2	orthodenticle homeobox 2
falsch positiv	Orf 6	PAX6	paired box gene 6 (aniridia, keratitis)
falsch positiv	Nsp 1	COX1	cytochrome c oxidase subunit I
falsch positiv	S1	COX1	cytochrome c oxidase subunit I
falsch positiv	Nsp 1	PCBP1	poly(rC) binding protein 1
falsch positiv	Orf 3a	MEOX2	mesenchyme homeobox 2
falsch positiv	S1	MEOX2	mesenchyme homeobox 2
falsch positiv	Orf 7a	MEOX2	mesenchyme homeobox 2
falsch positiv	Nsp 1	MEOX2	mesenchyme homeobox 2
falsch positiv	Nsp 3	COPS5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis) [Homo sapiens]
falsch positiv	Nsp 1	COPS5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis) [Homo sapiens]
falsch positiv	S1	COPS5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis) [Homo sapiens]
falsch positiv	M2	COPS5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5 (Arabidopsis) [Homo sapiens]
falsch positiv	S1	CRX	cone-rod homeobox
falsch positiv	Orf 3a	CRX	cone-rod homeobox
falsch positiv	Nsp 1	CRX	cone-rod homeobox
falsch positiv	Orf 7a	CRX	cone-rod homeobox
falsch positiv	Orf 3a	COPS7B	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 7B (Arabidopsis)
falsch positiv	Nsp 1	ZNF84	zinc finger protein 84
falsch positiv	Nsp 1	ZFAND5	zinc finger, AN1-type domain 5
falsch positiv	Nsp 1	SYNPO	synaptopodin
falsch positiv	Nsp 1	SATB2	SATB homeobox 2

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA Banken) Gensymbol	Beschreibung
falsch positiv	Nsp 1	VAT1	vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)
falsch positiv	Nsp 1	CIAO1	cytosolic iron-sulfur protein assembly 1 homolog (S. cerevisiae)
falsch positiv	Nsp 1	DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9
falsch positiv	Nsp 1	MEIS2	Meis homeobox 2
falsch positiv	Nsp 1	CLDND1	claudin domain containing 1
falsch positiv	Nsp 1	ARMC1	armadillo repeat containing 1
falsch positiv	Nsp 1	LOC100134053	LOC100134053 similar to POLR2J4 protein [ Homo sapiens ]
falsch positiv	Nsp 1	LASP1	LIM and SH3 protein 1
falsch positiv	Nsp 1	FKBP1B	FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa
falsch positiv	Nsp 1	KCNJ9	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9
falsch positiv	S1	SGTB	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, beta
falsch positiv	S1	PID1	phosphotyrosine interaction domain containing 1
falsch positiv	Orf 3a	TP53I11	tumor protein p53 inducible protein 11
falsch positiv	Orf 3a	UQCC	ubiquinol-cytochrome c reductase complex chaperone
falsch positiv	Orf 7a	ARHGAP19	Rho GTPase activating protein 19
falsch positiv	Orf 3a	APC2	adenomatosis polyposis coli 2
falsch positiv	S1	CACNA11	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 11 subunit
falsch positiv	S1	C3orf70	C3orf70 chromosome 3 open reading frame 70 [ Homo sapiens ]
falsch positiv	S1	PALM2-AKAP2	PALM2-AKAP2 protein
falsch positiv	Nsp 1	PREPL	prolyl endopeptidase-like
falsch positiv	Nsp 1	DDX51	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 51
falsch positiv	Nsp 1	EPS15	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
falsch positiv	Nsp 1	NAP1L5	nucleosome assembly protein 1-like 5
falsch positiv	Nsp 1	LARGE	like-glycosyltransferase
falsch positiv	S1	SKP1	S-phase kinase-associated protein 1
falsch positiv	S1	TUB	tubby homolog (mouse)
falsch positiv	S1	PDE6A	phosphodiesterase 6A, cGMP-specific, rod, alpha
falsch positiv	S1	RAB1A	RAB1A, member RAS oncogene family
falsch positiv	S1	RNF44	ring finger protein 44
falsch positiv	Orf 3a	RAB26	RAB26, member RAS oncogene family
falsch positiv	Orf 3a	SLC1A2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
falsch positiv	Orf 3a	MTCH1	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans)
falsch positiv	S1	CCDC112	coiled-coil domain containing 112
falsch positiv	S1	CFL1	cofilin 1 (non-muscle)
falsch positiv	S1	PARK2	Parkinson disease (autosomal recessive, juvenile) 2, parkin
falsch positiv	S1	CADPS2	Ca <sup>2+</sup> -dependent activator protein for secretion 2
falsch positiv	S1	GNAI2	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2
falsch positiv	S1	HNRNPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)
falsch positiv	S1	KANK2	KN motif and ankyrin repeat domains 2
falsch positiv	Nsp 1	DCX	doublecortin; lissencephaly, X-linked (doublecortin)
falsch positiv	Nsp 1	MLLT10	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10
falsch positiv	Nsp 1	ITM2A	integral membrane protein 2A
falsch positiv	Orf 3a	NAPA	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha
falsch positiv	S1	FUBP3	far upstream element (FUSE) binding protein 3
falsch positiv	Nsp 3	GPM6A	glycoprotein M6A
falsch positiv	Nsp 1	CHMP2B	chromatin modifying protein 2B
falsch positiv	S1	MAP2	microtubule-associated protein 2

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA Banken) Gensymbol	Beschreibung
falsch positiv	S1	SHC2	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 2
falsch positiv	S1	PMP2	peripheral myelin protein 2
falsch positiv	S1	REEP5	receptor accessory protein 5
falsch positiv	Orf 3a	C16orf45	chromosome 16 open reading frame 45
falsch positiv	Nsp 1	KDEL2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 2
falsch positiv	Nsp 1	CALM1	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)
falsch positiv	Orf 3b	NF1	neurofibromin 1 (neurofibromatosis, von Recklinghausen disease, Watson disease)
falsch positiv	Nsp 1	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
falsch positiv	S1	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
falsch positiv	Nsp 3	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)
falsch positiv	M2	WDR42A	WD repeat domain 42A
falsch positiv	S1	WDR42A	WD repeat domain 42A
falsch positiv	M2	KIF1A	kinesin family member 1A
falsch positiv	M2	NEUROD2	neurogenic differentiation 2
falsch positiv	Nsp 1	NEUROD2	neurogenic differentiation 2
falsch positiv	Orf 3b	NEUROD2	neurogenic differentiation 2
falsch positiv	M2	TOB2	transducer of ERBB2, 2
falsch positiv	Orf 3a	KANK2	KN motif and ankyrin repeat domains 2
falsch positiv	Nsp 1	SCG3	secretogranin III
falsch positiv	Orf 3a	KIF1A	kinesin family member 1A
falsch positiv	Nsp 1	KLHL12	kelch-like 12 (Drosophila)
falsch positiv	Nsp 1	KIF1A	kinesin family member 1A
falsch positiv	Nsp 3	PHF20L1	PHD finger protein 20-like 1
falsch positiv	Nsp 1	TNS1	tensin 1
falsch positiv	Orf 3a	NEUROD2	neurogenic differentiation 2

## Ergebnisse LUMIER-Assay

- Interaktionen des H2H-Screens:

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA-Banken) Gensymbol	Beschreibung	cDNA-Bank des H2H-Screens	LUMIER z-scores	Verhältnis Signal:Hintergrund
"low confident"	NSP1	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	fötale Hirn	3,2	20,2
"low confident"	NSP1	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa	fötale Hirn	2,9	19,0
"low confident"	NSP1	PPIG	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)	Hirn	2,8	13,0
"low confident"	NSP1	PPIH	peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H)	fötale Hirn	2,7	11,5
"low confident"	NSP1	RCAN3	RCAN family member 3	ORFeome	2,5	8,3
"low confident"	NSP1	LAS1L	LAS1-like (S. cerevisiae)	fötale Hirn	1,4	5,9

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA-Banken) Gensymbol	Beschreibung	cDNA-Bank des H2H-Screens	LUMIER z-scores	Verhältnis Signal:Hintergrund
"low confident"	NSP2	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	Hirn	1,5	10,7
"high confident"	NSP2	DEDD2	death effector domain containing 2	Hirn	0,9	2,7
"low confident"	NSP2	NPHP3	nephronophthisis 3 (adolescent)	Hirn	-0,1	1,2
"low confident"	NSP2	SLC46A3	solute carrier family 46, member 3	Hirn	-0,5	1,1
"low confident"	NSP3	FAM108A1	family with sequence similarity 108, member A1	fötales Hirn	2,5	12,6
"high confident"	Nsp3	MKRN2	makorin, ring finger protein, 2	ORFeome, Hirn, fötales Hirn	1,1	3,3
"high confident"	Nsp3	MKRN3	makorin, ring finger protein, 3	ORFeome	1,1	3,4
"low confident"	NSP3	ZNF410	zinc finger protein 410	fötales Hirn	0,9	2,2
"low confident"	NSP4	NMB	neuromedin B	ORFeome	0,7	1,7
"low confident"	NSP4	LAS1L	LAS1-like (S. cerevisiae)	fötales Hirn	0,7	2,3
"low confident"	NSP5	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa	fötales Hirn	1,2	5,2
"low confident"	NSP5	N4BP2L2	phosphonoformate immuno-associated protein 5	Hirn	0,2	1,3
"low confident"	NSP5	XPA	xeroderma pigmentosum, complementation group A	fötales Hirn	0,2	2,1
"low confident"	NSP5	C20orf27	chromosome 20 open reading frame 27	fötales Hirn	0,1	1,4
"low confident"	NSP6	ISLR	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	Hirn	0,8	3,0
"high confident"	NSP7	DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	fötales Hirn	1,8	7,5
"low confident"	NSP7	MIF4GD	MIF4G domain containing	fötales Hirn	1,7	7,7
"high confident"	NSP7	RNF128	ring finger protein 128	fötales Hirn	0,6	2,4
"high confident"	NSP7	BAP1	BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)	fötales Hirn	0,6	1,8
"low confident"	NSP7	NAE1	amyloid beta precursor protein binding protein 1	fötales Hirn	0,5	2,4
"high confident"	NSP7	ARL4D	ADP-ribosylation factor-like 4D	Hirn, fötales Hirn	0,4	2,1
"low confident"	NSP7	PLEKHO1	pleckstrin homology domain containing, family O member 1	fötales Hirn	0,3	1,9
"low confident"	NSP7	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	Hirn	0,1	1,7
"high confident"	NSP7	NCOA5	nuclear receptor coactivator 5	fötales Hirn	0,0	1,5
"low confident"	NSP7	YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	fötales Hirn	-0,3	1,2
"high confident"	NSP8	NOMO3	NODAL modulator 3	Hirn	2,9	10,4
"low confident"	NSP8	H2AFY2	H2A histone family, member Y2	Hirn	1,2	7,6
"low confident"	NSP8	TERF1	telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1	fötales Hirn	1,1	2,6
"low confident"	NSP8	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	fötales Hirn	0,4	1,9
"low confident"	NSP8	EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B	fötales Hirn	0,1	2,3
"high confident"	NSP8	BZW2	basic leucine zipper and W2 domains 2	Hirn	0,1	2,3
"low confident"	NSP9	C1orf142	chromosome 1 open reading frame 142	fötales Hirn	1,7	6,1
"high confident"	NSP9	CHMP2B	chromatin modifying protein 2B	fötales Hirn	1,1	4,8
"high confident"	NSP9	C1orf63	chromosome 1 open reading frame 63	Hirn, fötales Hirn	0,9	2,8
"high confident"	NSP9	NPHP3	nephronophthisis 3 (adolescent)	fötales Hirn	0,7	2,6
"high confident"	NSP9	FAHD1	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1	Hirn, fötales Hirn	0,2	1,1

Kategorie (H2H)	Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA-Banken) Gensymbol	Beschreibung	cDNA-Bank des H2H-Screens	LUMIER z-scores	Verhältnis Signal:Hintergrund
"low confident"	NSP9	ENO1	enolase 1, (alpha)	Hirn, fötales Hirn	-0,6	0,8
"low confident"	NSP12	PFDN5	prefoldin subunit 5	Hirn	2,0	4,4
"low confident"	NSP12	NDUFA10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa	Hirn	1,7	4,4
"high confident"	NSP12	CHMP2B	chromatin modifying protein 2B	ORFeome, Hirn	1,3	4,2
"high confident"	NSP12	C1orf142	chromosome 1 open reading frame 142	fötales Hirn	1,3	3,1
"high confident"	NSP12	TPSAB1	trypsin alpha/beta 1	ORFeome	1,1	5,0
"high confident"	NSP12	POLR2B	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B, 140kDa	Hirn	0,9	4,0
"low confident"	NSP12	TBCB	tubulin folding cofactor B	fötales Hirn	0,8	2,9
"low confident"	NSP12	TPSB2	trypsin beta 2	ORFeome	0,7	1,6
"low confident"	NSP12	MNAT1	menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (Xenopus laevis)	Hirn	0,6	2,1
"high confident"	NSP12	PEX10	peroxisome biogenesis factor 10	Hirn	0,5	4,7
"low confident"	NSP12	HOXC6	homeobox C6	ORFeome	0,5	2,0
"high confident"	NSP12	CCHCR	coiled-coil alpha-helical rod protein 1	ORFeome	0,3	1,8
"high confident"	NSP12	MGC4172	short-chain dehydrogenase/reductase	ORFeome	0,3	1,5
"high confident"	NSP12	GPRASP2	G protein-coupled receptor associated sorting protein 2	Hirn	0,2	1,7
"low confident"	NSP13	RYBP	RING1 and YY1 binding protein	ORFeome	1,3	5,3
"low confident"	NSP13	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	fötales Hirn	1,1	2,5
"low confident"	NSP13	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	fötales Hirn	0,4	2,6
"low confident"	NSP13	OCIAD2	OCIA domain containing 2	Hirn	-0,3	1,0
"high confident"	NSP13	MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	Hirn	-0,4	1,1
"low confident"	NSP13	N4BP2L2	phosphonoformate immuno-associated protein 5	Hirn	-0,5	0,7
"high confident"	NSP13	MARK2	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2	Hirn	-0,6	1,2
"low confident"	NSP14	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	Hirn	1,1	3,2
"low confident"	NSP14	DCTN2	dynactin 2 (p50)	fötales Hirn	0,7	2,4
"low confident"	NSP15	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	fötales Hirn	0,3	2,1
"low confident"	ORF3	DCTN2	dynactin 2 (p50)	ORFeome	0,6	2,2
"low confident"	ORF3	YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	fötales Hirn	0,5	2,8
"low confident"	ORF3	PFDN5	prefoldin subunit 5	Hirn	0,0	1,6
"low confident"	ORF4	DCTN2	dynactin 2 (p50)	fötales Hirn	0,6	2,1
"low confident"	ORF4	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	fötales Hirn, ORFeome	0,0	1,2
"high confident"	ORF4	ALB	albumin	ORFeome, fötales Hirn	-0,2	1,0
"low confident"	ORF7	DCTN2	dynactin 2 (p50)	fötales Hirn	1,8	5,1
"low confident"	ORF7	BRF1	BRF1 homolog, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB	fötales Hirn	-0,2	1,2
"low confident"	ORF8	VKORC1	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1	fötales Hirn	1,5	4,1
"low confident"	ORF8	SMOC1	SPARC related modular calcium binding 1	fötales Hirn	0,0	1,4
"high confident"	ORF9	CAMLG	calcium modulating ligand	fötales Hirn	1,5	6,3

"low confident"	ORF9	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	fötales Hirn	-0,3	1,4
"high confident"	ORF10	BAT3	HLA-B associated transcript 3	fötales Hirn	2,0	6,7
"low confident"	ORF13	RYBP	RING1 and YY1 binding protein	ORFeome	4,9	78,4
"low confident"	ORF13	MARK3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	fötales Hirn	2,7	13,0
"low confident"	ORF13	RPS20	ribosomal protein S20	fötales Hirn	1,2	3,2
"high confident"	ORF13	PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	fötales Hirn	1,1	3,5
"low confident"	ORF13	RPS17	ribosomal protein S17	ORFeome	0,0	1,8
"high confident"	ORF14	HGS	hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	ORFeome	2,4	9,2
"low confident"	ORF14	DCTN2	dynactin 2 (p50)	Hirn	1,4	3,8
"low confident"	ORF14	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	fötales Hirn, ORFeome	0,4	1,9
"low confident"	ORF14	C7orf36	chromosome 7 open reading frame 36	fötales Hirn	-0,3	1,2

- Zusätzlich untersuchte Interaktionen:**

Bait (SARS-Proteine)	Prey (Genprodukte cDNA-Banken) Gensymbol	Beschreibung	LUMIER z-scores	Verhältnis Signal:Hintergrund
Nsp1-fl	Calcineurin	Calcineurin	1,4	24,5
Nsp1-fl	NFATc4	nuclear factor of activated T-cells, calcineurin-dependent 4	-2,2	0,5
Nsp1-fl	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	-0,8	0,5
Nsp1-fl	PPIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	-0,6	0,9
Nsp1-fl	PPIG	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)	0,9	1,3
Nsp1-fl	PPIH	peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H)	-0,7	0,6
Nsp1-fl	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa	-0,5	1,0
Nsp1-fl	RCAN3	RCAN family member 3	-0,7	0,7
Nsp1-N	Calcineurin	Calcineurin	-0,9	0,6
Nsp1-N	NFATc4	nuclear factor of activated T-cells, calcineurin-dependent 4	-0,2	1,4
Nsp1-N	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	3,2	20,2
Nsp1-N	PPIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	1,2	4,2
Nsp1-N	PPIG	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)	2,8	13,0
Nsp1-N	PPIH	peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H)	2,7	11,5
Nsp1-N	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa	2,9	19,0
Nsp1-N	RCAN3	RCAN family member 3	1,7	5,8
Nsp1-C	Calcineurin	Calcineurin	0,3	5,0
Nsp1-C	NFATc4	nuclear factor of activated T-cells, calcineurin-dependent 4	-2,1	0,3
Nsp1-C	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	0,4	1,8
Nsp1-C	PPIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	-0,4	1,2
Nsp1-C	PPIG	peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)	2,3	5,6
Nsp1-C	PPIH	peptidylprolyl isomerase H (cyclophilin H)	0,5	1,9
Nsp1-C	FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa	1,3	4,2
Nsp1-C	RCAN3	RCAN family member 3	0,5	2,0

## Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die auf ihre Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas für die Hilfsbereitschaft, die Übernahme der Aufgabe als Gutachter und für die Anregungen und Ideen zu meiner Arbeit.

Bei meiner Zweitgutachterin Frau PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl und den übrigen Gutachtern möchte ich mich für die Übernahme dieser Aufgabe bedanken.

Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Dr. Ulrich Koszinowski für die Unterstützung.

Herr Dr. Albrecht von Brunn ermöglichte mir dankenswerter Weise dieses spannende Projekt zu bearbeiten und führte die direkte Betreuung durch.

Natürlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern des BMBF-geförderten SARS-Zoonose-Verbunds, ins besondere jedoch bei Susanne Pfefferle, Petra Herzog, Thomas Kuri und Marcel Müller für die ausgiebige Unterstützung bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Manfred Kögl für die Unterstützung im modifizierten Lumier-Assay und den hilfreichen Diskussionen.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitglieder der AG J. Haas, allen übrigen Kollegen im Labor und am Max von Pettenkofer Institut, vor allem aber an die „AG Spaß“, an Maria und die Mädels Melli, Hannah und Verena, die immer tapfer mit mir durchhielten.

Mein besonderer Dank geht an meinen Eltern, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen und in jeder Situation doch noch einen Ausweg zur Hand haben.

Auch bei meinen beiden Geschwistern Uli & Babsi möchte ich mich für ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfe bedanken.

Ein riesen Dankeschön für einfach ALLES geht an Sebi und meine persönliche IT-Hotline!