

Aus der Abteilung Infektionsbiologie
(Prof. Dr. S. Pöhlmann)
des Deutschen Primatenzentrums, Leibniz-Institut für Primatenforschung
in Göttingen

**Identifikation und funktionelle Charakterisierung von TMPRSS2-
Spaltstellen im *Spike*-Protein des
SARS-Coronavirus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Lennart Michel Reinke

aus Hamburg

Göttingen 2016

Dissertationsarbeit in der Infektionsbiologie des deutschen Primatenzentrums

Betreuung: PD Dr. M. Winkler

Prof. Dr. S. Pöhlmann

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. L. Walter

Ko-Referent: Prof. Dr. Carsten Lüder

Promotor-Vertretung: Prof. Dr. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 4. Mai 2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel " Identifikation und funktionelle Charakterisierung von TMPRSS2-Spaltstellen im *Spike*-Protein des SARS-Coronavirus" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung (Abstract)	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract.....	2
2 Einleitung	3
2.1 Die SARS-Pandemie	3
2.2 Der Lebenszyklus der Coronaviren.....	4
2.3 Der Zelleintritt des SARS-CoV.....	6
2.4 TMPRSS2 als SARS-CoV-aktivierende Protease	9
2.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	11
2.6 Vorarbeiten.....	12
3 Material und Methoden	13
3.1 Material.....	13
3.2 Methoden.....	27
4 Ergebnisse	46
4.1 Klonierung und Sequenzierung von SARS-S-Mutanten.....	46
4.2 Analyse der TMPRSS2-abhängigen Spaltung des SARS-S-Proteins	50
4.3 Analyse von Spaltfragmenten der SARS-S-Mutanten im Immunoblot.....	56
4.4 Lokalisationsanalyse der SARS-S-Mutanten mittels Immunhistochemie.....	60
4.5 Analyse der Spike-Mutanten im Zell-Zellfusionstest.....	64
4.6 Analyse der Spike-Mutanten im Virus-Zellfusionstest.....	66
4.7 Analyse der TMPRSS11a-abhängigen Spaltung und Aktivierung von SARS-S	73
5 Diskussion	77
5.1 Spaltungsanalysen.....	77
5.2 Konfokalmikroskopie.....	81
5.3 Zell-Zellfusionen	81
5.4 Virus-Zellfusionen.....	83
5.5 Ausblick.....	85

6	Literaturverzeichnis	87
7	Anhang.....	95
7.1	Weitere Abbildungen.....	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Coronavirus-Partikels.....	5
Abbildung 2: SARS-S-Protein mit N-terminaler S1-Untereinheit.....	7
Abbildung 3: SARS-S-vermittelter Zelleintritt.....	8
Abbildung 4: Der Aufbau der TTSPs.....	10
Abbildung 5: Schema der cis-Spaltung.....	38
Abbildung 6: Schema der trans-Spaltung.....	39
Abbildung 7: Kriterien für die quantitative Auswertung der Konfokal-Bilder.....	41
Abbildung 8: Schemazeichnung der Zell-Zellfusion.....	43
Abbildung 9: Schemazeichnung der Pseudotypen-Transduktion.....	45
Abbildung 10: Aufbau des Oligonukleotids.....	46
Abbildung 11: Klonierungsschema.....	48
Abbildung 12: Beispiel einer Kolonie-PCR.....	49
Abbildung 13: TMPRSS2 spaltet SARS-S.....	52
Abbildung 14: Analyse der Spaltfragmente.....	55
Abbildung 15: Mutationsstellen.....	56
Abbildung 16: Cis-Spaltung von N-terminalen Aminosäuremutanten.....	57
Abbildung 17: Cis-Spaltung der Aminosäuremutanten in der Nähe des S1/S2-Übergangs.....	58
Abbildung 18 : Cis- Spaltung der Mutanten der Cathepsin-Schnittstelle.....	59
Abbildung 19: Cis-Spaltung der C-Terminalen Mutanten.....	60
Abbildung 20: SARS-S-Mutationen führen zu einem veränderten intrazellulären Transport.....	62
Abbildung 21: SARS-S-Mutationen führen zu einem veränderten intrazellulären Transport.....	63
Abbildung 22: Zell-Zellfusion der SARS-S-Mutanten.....	65
Abbildung 23: Inkorporation der Glykoproteine in die Virus-Partikel.....	67
Abbildung 24: Effizienz des SARS-S-vermittelten Zelleintritts.....	68
Abbildung 25: R667 ist essentiell für die Inaktivierung von SARS-S durch Trypsin.....	70
Abbildung 26: R797 und nicht R667 ist essentiell für den TMPRSS2-vermittelten Zelleintritt.....	72
Abbildung 27: Cis-Spaltung von SARS-S durch TMPRSS11a.....	73
Abbildung 28: TMPRSS11a-abhängige Zellfusion.....	74
Abbildung 29: TMPRSS11a aktiviert die Virus-Zellfusion, ermöglicht jedoch keinen Cathepsin- Bypass.....	76
Abbildung 30: Kumulative Auswertung der Pseudotypen-basierten Virus-Zellfusionen.....	95
Abbildung 31: Sequenzierung der SARS-S-Mutanten.....	97
Abbildung 32: Sequenzierung über den C-Terminus von SARS-S.....	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Strukturproteine von Coronaviren.....	5
Tabelle 2: Die SARS-S Mutanten, die als Grundlage dieses Projektes dienten.....	12
Tabelle 3: Bakterien.....	13
Tabelle 4: Zelllinien.....	13
Tabelle 5: Für die PCR genutzte <i>primer</i>	14
Tabelle 6: Für die Sequenzierung genutzte <i>primer</i>	14
Tabelle 7: Genutzte Expressionsplasmide.....	15
Tabelle 8: Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen.....	17
Tabelle 9: Nährmedien und Zusätze für eukaryote Zellkulturen.....	17
Tabelle 10: Primärantikörper.....	18
Tabelle 11: Sekundärantikörper.....	19
Tabelle 12: Geräteliste.....	19
Tabelle 13: Kommerzielle Reagenzsysteme.....	20
Tabelle 14: Verbrauchsmaterial.....	21
Tabelle 15: Enzyme.....	22
Tabelle 16: Selbstangestellte Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 17: PAGE-Gele.....	25
Tabelle 18: Chemikalien.....	26
Tabelle 19: Reaktionsansatz für die standardmäßige PCR-Reaktion.....	28
Tabelle 20: Reaktionsprogramm für den Thermocycler.....	28
Tabelle 21: Allgemeiner Reaktionsansatz für Restriktionsspaltungen.....	29
Tabelle 22: Eingesetzte Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenz und Schnittstelle.....	30
Tabelle 23: Standardreaktionsansatz für Ligationsreaktionen.....	30
Tabelle 24: Standardreaktionsansatz für eine Kolonie-PCR.....	32
Tabelle 25: Reaktionsansatz für die Sequenzierungen.....	33
Tabelle 26: Zellkultur-Formate.....	34
Tabelle 27: Versuchsschema einer Calcium-Phosphat-Transfektion.....	35
Tabelle 28: Die verschiedenen Mutationen führen zu Unterschieden in der Lokalisation des SARS-Spike.....	64

Abkürzungsverzeichnis

hACE2	Humanes Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
bp	Basenpaare
c.p.s	Anzahl pro Sekunde (<i>counts per second</i>)
C-terminal	Carboxy-terminal
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DiL	2-[3-(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-octadecyl-2H-indol-2-ylidene)-1-propenyl]-3,3-dimethyl-1-octadecyl-perchlorat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
SARS-E	SARS- <i>envelope</i> -Protein
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
E.Coli	<i>Escherichia Coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HAT	<i>Human Airway Tryptase</i>
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HE	Hämagglutinin-Esterase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazin-1-Ethanesulfonsäure
HR	<i>Heptad Repeats</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish-Peroxidase</i>)
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LDL-R	<i>Low-Density-Lipoprotein</i> -Rezeptor
SARS-M	SARS- <i>membrane</i> -Protein
MERS-CoV	<i>Middle east respiratory syndrome Coronavirus</i>
mM	Millimolar

MLV	Murines Leukämievirus
mRNA	<i>Messenger</i> -Ribonukleotinsäure
N-Glykosylierung	Glykosylierung an der Aminosäure Asparagin
N-terminal	Aminosäure-terminal
SARS-N	SARS- <i>nuclear</i> -Protein
ORF	Offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PNGase F	Peptid N Glykosidase F
R ₀	Reproduktionszahl
RBD	Rezeptor-Binde-Domäne
RT	Raumtemperatur
S1	S1-Untereinheit
S2	S2-Untereinheit
SARS	Schweres akutes Atemwegssyndrom (<i>severe acute respiratory syndrome</i>)
SARS-CoV	SARS-Coronavirus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SARS-S	SARS- <i>spike</i> -Protein
siRNA	<i>Short interfering</i> RNA
SV 40	<i>Simian-Virus 40</i> , Affenvirus 40
TEMED	Tetraethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TMPRSS2	Transmembranprotease vom Serintyp Typ II
TPCK	Tosyl phenylalanyl chloromethyl keton
TTSPs	<i>Type two serin proteases</i>
U	<i>Units</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
VLP	Virus-ähnliches Partikel (<i>Virus-Like-Particle</i>)
VSV	Virus der vesikulären Stomatitis

1 Zusammenfassung (Abstract)

1.1 Zusammenfassung

Das *severe acute respiratory syndrome*-Coronavirus (SARS-CoV) ist ein neu aufgetretenes Pathogen, das eine erhebliche Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellt. Das virale Oberflächenprotein *spike* (SARS-S) vermittelt die Bindung und den Eintritt des Virus in Wirtszellen. Die Aktivierung des S-Proteins durch Wirtszellproteasen ist essentiell für dessen Funktion. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass Trypsin und die zelluläre Protease TMPRSS2 das S-Protein durch Spaltung aktivieren. Die Spaltstelle für Trypsin, R667, ist bekannt. Spaltstellen der TMPRSS2 hingegen sind noch nicht gefunden. Sie scheinen sich jedoch von der Trypsin-Spaltstelle zu unterscheiden, da Trypsin und TMPRSS2 Spaltfragmente von unterschiedlichem Molekulargewicht erzeugen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die TMPRSS2-Spaltstelle(n) im SARS-CoV S-Protein zu identifizieren und ihre Bedeutung für die proteolytische Aktivierung des S-Proteins zu charakterisieren.

Für die Identifizierung der TMPRSS2-Spaltstellen in SARS-S wurden Aminosäuren mutiert, für die auf der Basis von vorangegangenen Arbeiten und von Sequenzanalysen eine Rolle in der S-Protein-Spaltung vermutet wurde. Anschließend wurden die SARS-S-Expression, zelluläre Lokalisation, Spaltung und der S-Protein-getriebene Wirtszelleintritt untersucht. Für die Herstellung der Mutanten wurde PCR-basierte Mutagenese eingesetzt. Zum Nachweis der Expression wurden die Mutanten mit einem V5-antigenen *tag* ausgestattet. Die Mutation der Aminosäuren K543/R544 oder R563/K566 verhinderte die Prozessierung des S-Proteins durch Trypsin, die Mutationen R563/K566 unterdrückte zusätzlich die Spaltung durch TMPRSS2. Dieser Effekt war jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine veränderte zelluläre Lokalisation dieser SARS-S-Mutanten zurückzuführen. Es konnte bestätigt werden, dass die Aminosäure R667 für die Spaltung des S-Proteins durch Trypsin wichtig ist und dass Trypsin und TMPRSS2 unterschiedliche Spaltfragmente erzeugen (100 kDa versus 85 kDa). Die Unterschiede im Molekulargewicht der Fragmente konnten jedoch durch Behandlung mit dem Enzym PNGase F auf ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster zurückgeführt werden. Obwohl R667 für die SARS-S-Spaltung durch Trypsin und TMPRSS2 essentiell war, konnte kein klarer Beitrag dieser Aminosäure zur S-Protein-Aktivierung durch diese Proteasen gezeigt werden. Die umgekehrte Beobachtung wurde für R797 gemacht, einen Aminosäurerest, für den publizierte Arbeiten ebenfalls eine Rolle in der S-Protein-Aktivierung durch Trypsin postulieren. R797 war für die S-Protein-Aktivierung durch Trypsin und TMPRSS2 essentiell, jedoch für die Spaltung durch diese Proteasen verzichtbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass R667 für die SARS-S-Spaltung durch TMPRSS2 und Trypsin wichtig ist. Sie zeigen aber auch, dass die Aktivierung des S-Proteins durch proteolytische Spaltung komplexer ist als ursprünglich angenommen.

Stichwörter: SARS-Coronavirus, *spike*, TMPRSS2

1.2 Abstract

The severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is an emerging pathogen, which poses a substantial threat to human health. The viral surface protein spike (SARS-S) mediates viral entry into target cells. The activation of the S-protein by host cell proteases is essential for its function. Previous studies have shown that trypsin and the cellular protease TMPRSS2 activate SARS-S by cleavage. The cleavage site for trypsin, R667, has been identified while the cleavage site for TMPRSS2 is unknown. However, the observation that trypsin and TMPRSS2 produce SARS-S fragments of different size suggests that these proteases cleave SARS-S at different sites. The aim of this study was the identification of the TMPRSS2 cleavage site(s) within SARS-S and the characterization of their role in the proteolytic activation of the S protein.

For the identification of TMPRSS2 cleavage sites amino acids were mutated, which presumably play a role in S-protein-cleavage, based on sequence analysis and previous studies. Subsequently, SARS-S expression, cellular localization, cleavage and S-protein mediated cellular entry were investigated. The mutants were produced by PCR-based mutagenesis. For detection of expression, the mutants were equipped with a V5-antigenic tag. Mutation of amino acids K543/R544 or R563/K566 abrogated SARS-S processing by trypsin and, in case of K563/K566, TMPRSS2. However, this effect was most likely due to an altered cellular localization of these mutants. It could be confirmed that R667 is important for SARS-S processing by trypsin and that S protein cleavage by trypsin and TMPRSS2 generates different fragments (100 kDa versus 85 kDa). This difference in molecular weight was due to differential glycosylation of the cleavage fragments, as demonstrated by PNGase F digest. Although R667 was essential for cleavage by trypsin and TMPRSS2, this amino acid was dispensable for SARS-S activation. The opposite effect was detected for R797, an amino acid residue, which has been described to play an important role in SARS-S activation by trypsin. R797 was essential for S protein activation by trypsin and TMPRSS2 but was dispensable for cleavage by these proteases. The results of the present work show that R667 is important for the SARS-S cleavage by TMPRSS2 and trypsin. However, they also indicate that the activation of the S protein by proteolytic cleavage is more complex than assumed.

Keywords: SARS-coronavirus, spike, TMPRSS2

2 Einleitung

2.1 Die SARS-Pandemie

Im Jahr 2002 brach die erste Pandemie des 21. Jahrhunderts in der chinesischen Provinz Guangdong aus. Der Auslöser war ein bisher noch nicht aufgetretenes Virus, das *severe acute respiratory syndrome* Coronavirus (SARS-CoV) (Ksiazek et al. 2003; Kuiken et al. 2003). Nach Erkrankungen in 32 Ländern konnte die weitere Ausbreitung bis Juli 2003 durch Hygiene- und Isolationsmaßnahmen unterbunden werden (WHO 2003). Das Auftreten des *middle east respiratory syndrome* (MERS), das durch ein SARS-ähnliches Coronavirus ausgelöst wird (Bermingham et al. 2012), und der Nachweis von verwandten Coronaviren in Fledermäusen (Lau et al. 2005; Annan et al. 2013; Wacharapluesadee et al. 2015) zeugen von der andauernden Gefahr für den Menschen und damit der Notwendigkeit, dieses Pathogen besser zu verstehen.

Eine Infektion mit dem SARS-CoV kann im Menschen zu einer atypischen Pneumonie mit Lungenversagen führen. Die mittlere Inkubationszeit der Infektion beträgt 4-6 Tage. Sie kann jedoch in einigen Fällen über 10 Tage andauern, was den Infizierten das Reisen und dadurch eine pandemische Ausbreitung des Virus durch den Flugverkehr ermöglicht. Nach plötzlich einsetzendem, hohem Fieber tritt nach 1-3 Tagen eine respiratorische Symptomatik mit unproduktivem Husten und Atemnot auf. Bei 30-60% der Patienten kommt es zu Diarrhöen. Zudem kann es zu einem Anstieg der Leber- und anderer Organparameter, selten auch zu neurologischen Ausfällen kommen. Während es bei 70% der Erkrankten nach 7-14 Tagen zu einem Abklingen der Krankheitssymptome kommt, verschlimmert sich bei den anderen die respiratorische Situation und eine maschinelle Beatmung kann vonnöten sein (WHO 2003; Marre und Battegay 2008).

Das SARS-CoV wird durch Tröpfcheninfektion, also direkten Schleimhautkontakt mit infektiösem Material, wie Sputum und Fäzes, übertragen. Von einer Übertragung durch Aerosole, wie bei Influenza, wurde nicht berichtet, was sich in der vergleichsweise niedrigen Basisreproduktionszahl (R_0) von drei widerspiegelt, welche die statistische Zahl von Personen darstellt, die ein Infizierter ansteckt (WHO 2003; Mikolajczyk et al. 2009). Der Ausbruch von 2003 hatte bei 8422 Erkrankten und 916 Todesfällen eine Letalität von 11 %, wobei insbesondere über 60-Jährige schwerer betroffen waren (WHO 2003).

Da es bisher keine für den Menschen zugelassene Therapie gibt, die gezielt das Virus inhibiert, wird eine symptomatische Behandlung empfohlen (Luyt et al. 2011). In Tierversuchen zeigte eine Therapie mit pegyliertem Interferon-Alpha einen antiviralen Effekt (Marre und Battegay 2008). Auch Antikörper und siRNAs gegen SARS-CoV-Oberflächenproteine, das Virostatikum Ribavirin, Inhibitoren des SARS-CoV-Rezeptors und die Gabe von Mannose-bindendem Lectin werden als Therapie-Option diskutiert und untersucht (Hayden 2013). Jedoch sind alle diese Ansätze noch weit von einem Einsatz im Menschen entfernt.

Um im Fall eines erneuten Ausbruchs des SARS-CoV oder nah verwandter Viren eine Pandemie zu verhindern, müssen die genauen Pathogenitätsmechanismen geklärt und entsprechende Therapien entwickelt werden.

2.2 Der Lebenszyklus der Coronaviren

Zu der Familie der *Coronaviridae* gehören neben dem SARS-Coronavirus eine Reihe umhüllter RNA-Viren, die in Säugetieren und Vögeln teilweise schwere Erkrankungen auslösen können (Modrow 2010). Der Name Coronaviren rührt von dem strahlenkranzartigen Aussehen der Virionen im Elektronenmikroskop her, das durch die *spike*-Proteine (S) auf der Virusoberfläche hervorgerufen wird.

Die ersten Coronaviren wurden in den 1930ern aus Geflügel isoliert. Bis zum Ausbruch des SARS-CoV waren Coronaviren vor allem für die Landwirtschaft von Bedeutung, da die bekannten humanpathogenen Vertreter zumeist nur zu einer milden Erkrankung führten (Masters und Perlman 2013). So sind die humanen Coronaviren HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 und HCoV-OC43 für saisonale Infektionen des oberen und seltener des unteren Respirationstraktes verantwortlich. Antikörper gegen diese Erreger können in 80-90% der Erwachsenen nachgewiesen werden (Modrow 2010; Masters und Perlman 2013). Bis zu 20% der ambulant erworbenen Pneumonien werden durch respiratorische Viren verursacht, welche neben den Coronaviren auch Influenza-, Metapneumo-, Picorna, Adeno- und *respiratory syncytial* (RS)-Viren umfassen. Die tatsächliche Bedeutung viraler Atemwegsinfektionen ist vermutlich größer, was dem insensitiven und oft nicht durchgeführten Erregernachweis geschuldet ist. Besonders bei Patienten mit Asthma Bronchiale, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung und Immunsuppression kann es zu lebensbedrohlichen Verläufen kommen (vgl. Rohde et al. 2009; Niedersächsisches Landesgesundheitsamt 2014; Nguyen et al. 2015).

Coronaviren gehören zusammen mit den Arteri- und Raniviren zur Ordnung der Nidoviren (Modrow 2010). Die Familie der Coronaviren wird in die drei Gattungen Alpha-, Beta- und Gammacoronaviren unterteilt. Während Alpha- und Betacoronaviren vor allem Säugetiere als Wirt haben, infizieren Gammacoronaviren Vögel. Das SARS-CoV gehört zu den Betacoronaviren (Masters und Perlman 2013).

Die Coronaviren haben ein einzelsträngiges, nicht segmentiertes RNA-Genom positiver Orientierung. Sie gleichen sich in ihrer Replikationsstrategie, der „*nested*“ (lat. Nidus: Nest) RNA-Transkription und Genomstruktur (siehe Abbildung 1). Sie haben die größten Genome aller RNA-Viren (Masters und Perlman 2013). Beim SARS-CoV wird eine Größe von 29.727 (Rota et al. 2003) bis 29.751 (Marra et al. 2003) Basen angegeben. Das Genom des SARS-CoV hat 11 offenen Leserahmen (ORF), die für den Replikase-Komplex (ORF1a/b), vier Strukturproteine (SARS-M, -N, -S und -E) und mehrere akzessorische Proteine kodieren (Marra et al. 2003; Rota et al. 2003). Die Strukturproteine, die in Tabelle 1 aufgeführt sind, nehmen essentielle Aufgaben im Lebenszyklus des Erregers wahr. Ein weiteres Strukturprotein, Hämagglutinin-Esterase (HE), wird nur in einigen Betacoronaviren gefunden und fungiert als Kofaktor bei der Zielzellbindung. Hierbei ähnelt es sehr dem Hämagglutinin von Influenzaviren, was auf einen gemeinsamen Vorfahren von Corona- und Influenzaviren hinweisen könnte (Masters und Perlman 2013). Die Nichtstrukturproteine, zu denen auch der Replikasekomplex gehört, haben vielfältige, noch nicht vollständig verstandene Aufgaben, die eine Regulation der Replikation und die Modulation der Wirtszelle und somit die Umgehung der Immunabwehr beinhalten (Modrow 2010; McBride und Fielding 2012).

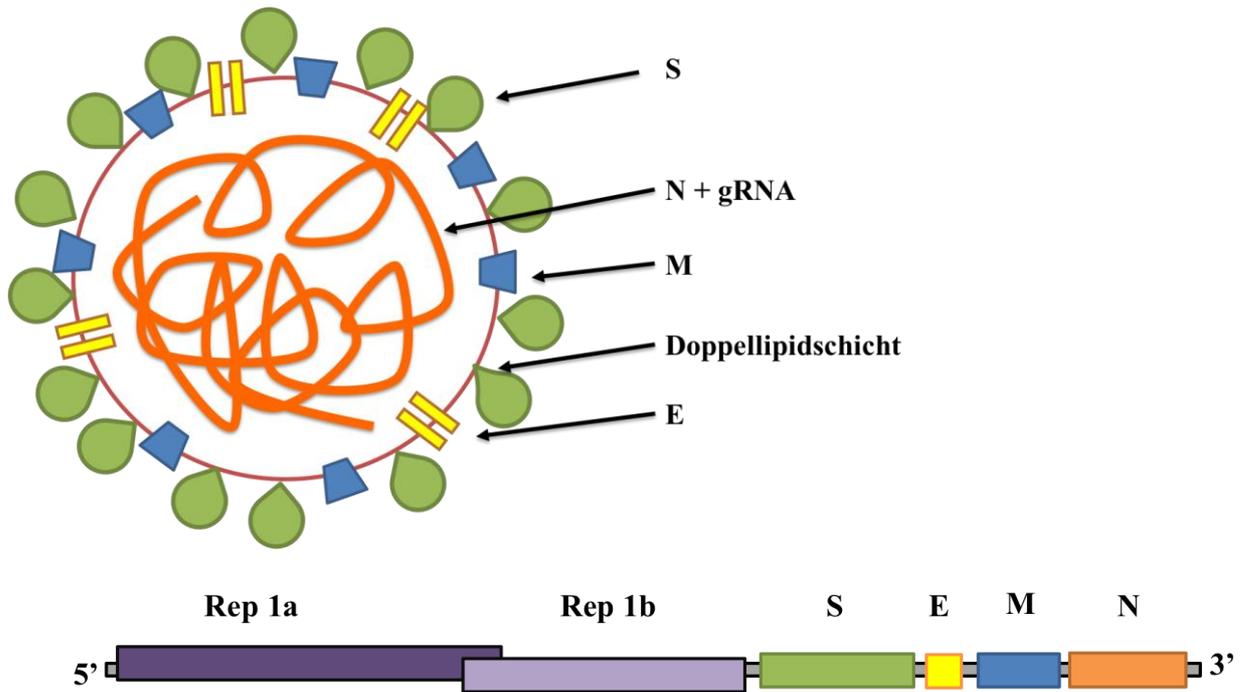


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Coronavirus-Partikels und des SARS-CoV RNA-Genoms mit den beiden für die Replikase-Komplex-kodierenden offenen Leserahmen Rep 1a und Rep 1b und den Strukturproteinen Spike (S), Envelope (E), Membrane (M), Nuclear (N). Das Membranprotein HE und die Nicht-Struktur-Proteine sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt (modifiziert nach Masters und Perlman 2013, S. 828, 831).

Tabelle 1: Strukturproteine von Coronaviren (vgl. Masters und Perlman 2013, S. 828).

Strukturprotein	Funktion	Molekulargewicht
Spike (S)	Rezeptorbindung und Zelleintritt	128-160 kDa
Envelope (E)	Membranprotein, Funktion unklar	8-12 kDa
Membrane (M)	Virus- <i>Assembly</i> , Membranformung	25-30 kDa
Nuclear (N)	Bildet mit RNA das Nucleokapsid	43-50 kDa
Hämagglutinin-Exterase (HE)	Nur in wenigen Coronaviren vorhanden; dient dem S-Protein als Kofaktor	48 kDa

Der erste Schritt der Infektion, der Zelleintritt, wird hauptsächlich durch das S-Oberflächenprotein vermittelt und im nachfolgenden Abschnitt 2.3 im Detail beschrieben. Nachdem die virale Membran mit der Zellmembran verschmolzen ist, wird das Genom in das Zytoplasma abgegeben und im endoplasmatischen Retikulum (ER) repliziert (Stertz et al. 2007). Das RNA-Genom nimmt mehrere Aufgaben wahr (Ziebuhr 2004; Modrow 2010): Zum einen dient es direkt als mRNA, indem es durch eine Cap-Struktur am 5' Ende des Genoms an Ribosomen bindet. Die Bindung des Genoms führt zur

Translation des ersten Leserasters Rep1a und durch einen ribosomalen Leserastersprung zur Translation des größeren Rep1ab. Diese Polyproteine enthalten virale Proteasen, die das Translationsprodukt in 16 Nichtstrukturproteine teilt, aus denen sich der sogenannte „virale Replikase-Transkriptase-Komplex“ mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase bildet. Diese synthetisiert von der genomischen RNA nun einen Gegenstrang negativer Orientierung, der als Grundlage für die Bildung neuer viraler Genome und mehrerer unterschiedlicher mRNA-Spezies dient. Diese kodieren als polycistronische mRNA für verschiedene virale Proteine, gleichen sich jedoch in einer *leader*-Sequenz am 3' Ende, die wahrscheinlich ihre Synthese reguliert. Sie werden auch als „*nested*“-Transkripte bezeichnet und binden abhängig von einer 5' Cap-Struktur an Ribosomen, was zur Translation der Virusproteine führt.

Nach der Translation im ER werden die viralen Oberflächenproteine SARS-S, -M und -E im sekretorischen Stoffwechselweg weiter transportiert. N formt das helikale Nukleocapsid, welches das RNA-Genom verpackt (Masters und Perlman 2013). Anschließend bewirkt SARS-M durch Interaktion mit SARS-N und -E die Bildung neuer Viruspartikel, während SARS-S passiv in diese inkorporiert wird. Die neu geformten Virionen werden in Vesikel verpackt und zur Zelloberfläche transportiert (de Haan et al. 1998; Tseng et al. 2010; Masters und Perlman 2013). Schon drei Stunden nach der Infektion kann dieses „*budding*“ neuer Virionen im Golgi-Apparat und *Endoplasmatic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment* (ERGIC) beobachtet werden (Klumpermann et al. 1994; Stertz et al. 2007).

2.3 Der Zelleintritt des SARS-CoV

Ein zentraler Schritt des viralen Lebenszyklus ist der Eintritt in die Zielzelle. Dieser ermöglicht es dem Virus, der humoralen Immunabwehr zu entgehen und den zelleigenen Stoffwechsel und Replikationsapparat zu nutzen. Der Zelleintritt ist ein hochgradig regulierter Prozess, der aus mehreren Schritten besteht (folgende Absätze nach Masters und Perlman 2013, S. 77ff): Der Zelleintritt wird bei umhüllten Viren durch deren Oberflächenproteine vermittelt, die dadurch für die medizinische Forschung interessant sind. Sie bestimmen durch Rezeptor- und in einigen Fällen Korezeptorbindung den Zelltropismus des Virus und so die Zielorgane und die Symptomatik einer Infektion. Sie sind oft Angriffspunkte der adaptiven humoralen Immunabwehr. Antivirale Medikamente, die sich gegen die Fusionsproteine richten, verhindern den Zelleintritt und unterbinden so die Infektion in einem sehr frühen Stadium. Nach der Bindung des Virus an seinen Rezeptor aktiviert sich die Fusionsmaschinerie des viralen Oberflächenproteins. Diese Aktivierung kann durch Konformationsänderungen im Zuge der Rezeptorbindung, durch Korezeptorbindung oder auch nach einer proteolytischen Spaltung durch zelluläre Proteasen ausgelöst werden. Es kommt zur Annäherung und schließlich zur Verschmelzung von Virus- und Wirtszellmembranen. Nun kann das virale Genom in das Zytoplasma abgegeben werden, wo dieses je nach Virus direkt seinen Replikationszyklus durchlaufen kann oder zuvor weiter in den Zellkern transportiert wird.

Die viralen Oberflächenproteine, die den Zelleintritt vermitteln, werden in drei Klassen (I, II und III) eingeteilt. Zu den Klasse I-Fusionsproteinen zählen unter anderem das Influenza-Virus Hämagglutinin und SARS-S (Bosch et al. 2003). Hier werden die Fusionsproteine als Vorläuferproteine gebildet, die für ihre volle Funktionalität eine proteolytische Spaltung benötigen. Die Klasse II-Fusionsproteine, die bei Alphaviren, Flaviviren und Bunyaviren vorkommen, zeichnen sich durch mehrere Untereinheiten aus, deren hydrophobe Untereinheit, sogenannte *fusion loops*, durch eine virales „Chaperon“-Protein blockiert wird. Dieses kann durch proteolytische Spaltung entfernt werden, was die Membranfusion auslöst.

Rhabdoviren wie das Vesikuläre-Stomatitis-Virus (VSV), Herpesviren und Baculoviren haben ein Klasse III-Fusionsprotein, welches keine proteolytische Spaltung benötigt. Hier wird die Fusion durch pH-Änderung oder Konformationsänderungen nach der Rezeptorbindung ausgelöst.

Bei dem SARS-Coronavirus ist das Klasse I-Fusionsprotein SARS-S für Rezeptorbindung und Zellfusion zuständig. SARS-S besteht aus 1255 Aminosäuren und besitzt 23 potentielle und 12 nachgewiesene N-Glykosylierungsstellen, an denen das Protein mit Zuckerketten modifiziert wird (Krokhin et al. 2003; Marra et al. 2003). Nach der Translation wird es im endoplasmatischen Retikulum an diesen Stellen mit einer *high mannose*-Glykosylierung versehen, deren Produkt bei ca. 170 kDa detektierbar ist. Anschließend folgt im Golgi-Apparat die Umwandlung der *high mannose*-Glykosylierung zu einem komplexen Glykosylierungsmuster, welches zu einem molekularen Gewicht von 180 kDa führt. Eine O-Glykosylierung findet nicht statt (Nal et al. 2005). Die vollständig prozessierten S-Proteine lagern sich schließlich zu nicht kovalent verbundenen Trimeren zusammen (Nal et al. 2005).

SARS-S ermöglicht den Eintritt in Zielzellen, indem es an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche bindet und danach die Zellfusion induziert. Die unterschiedlichen Aufgaben werden von zwei Untereinheiten in SARS-S übernommen (s. Abbildung 2): Die S2-Untereinheit ist unter Coronaviren hochkonserviert und beinhaltet die Fusionsmaschinerie. Die N-terminale S1-Untereinheit ist sehr viel variabler und für die Bindung an Zielzellen vonnöten (Masters und Perlman 2013). Sie enthält die Rezeptor-Bindungs-Domäne (RBD) zwischen den Aminosäuren 318-510 (Babcock et al. 2004; Wong et al. 2004), die an das *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2), den Rezeptor des SARS-CoV, bindet (Li et al. 2003; Wang et al. 2004). ACE2 wird auf Typ II-Pneumozyten exprimiert, die wichtige Zielzellen der SARS-Infektion sind (Kuiken et al. 2003).

Nach der Bindung an den Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung der SARS-S-Trimere (Beniac et al. 2007). Anschließend spaltet eine Wirtszellprotease die S1- von der S2-Untereinheit. Diese trennen sich dadurch, was das Fusionspeptid in der S2-Einheit aktiviert. Die abgetrennte S1-Einheit könnte möglicherweise im Extrazellularraum als *decoy*-Rezeptor Antikörper abfangen und somit zur hohen Pathogenität beitragen (Glowacka et al. 2011). Das Fusionspeptid fügt sich nun in die Wirtszellmembran ein und in der S2-Einheit führt die Interaktion von *heptad repeats*, Wiederholungen von sieben Aminosäuren, zu einer Annäherung von Zell- und Virusmembran, was schlussendlich in der Zellfusion mündet (Hofmann und Pöhlmann 2004). So kann die RNA ins Zytoplasma abgegeben werden und ein neuer Replikationszyklus wird ermöglicht.

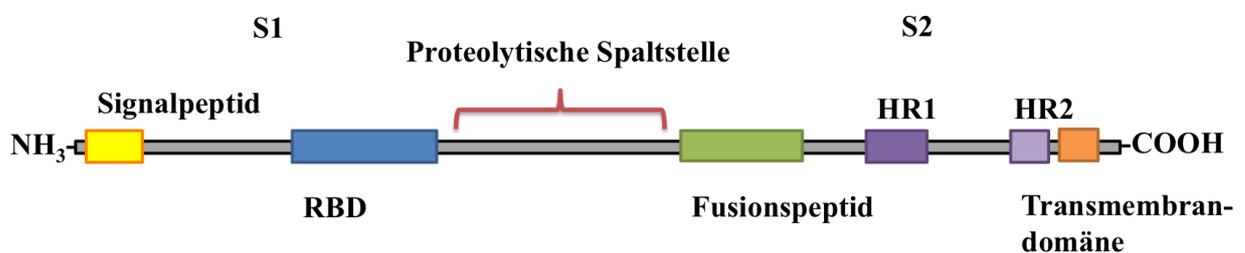


Abbildung 2: SARS-S-Protein mit N-terminaler S1-Untereinheit mit Signalpeptid und Rezeptor-Binde-Domäne (RBD), durch proteolytische Spaltung abgetrennte S2-Untereinheit mit Fusionspeptid, zwei *heptad repeats* (HR) und der Transmembrandomäne mit C-terminalem zytoplasmatischen Anteil (vgl. Masters und Perlman 2013, S. 829).

Während die Aktivierung von SARS-S durch Wirtszellproteasen essentiell für die Infektion von Zielzellen ist, kann das Virus, wie in Abbildung 3 gezeigt, über zwei unterschiedliche Wege in die Zelle gelangen. Findet der Zelleintritt über den endosomalen Weg statt, spaltet die Protease Cathepsin L SARS-S pH-abhängig am Threonin 678 (Bosch et al. 2008). Darüber hinaus kann SARS-S durch Proteasen bereits an der Zelloberfläche aktiviert werden und dort die Membranfusion vermitteln. Das S-Protein lässt sich *in vitro* durch diverse Proteasen spalten: Elastase schneidet SARS-S an Threonin 795 (Belouzard et al. 2010), während Trypsin, die Transmembranprotease vom Serin-Typ 11a (TMPRSS11a), Plasmin und die *human airway tryptase* (HAT) an Lysin 667 spalten (Kam et al. 2009; Bertram et al. 2011). Auch durch den Faktor Xa ließ sich SARS-S in die S1- und S2-Untereinheit spalten (Du et al. 2007). Zudem wurde die Gruppe der Proprotein Convertasen, zu denen Furin gehört, als SARS-S spaltend und aktivierend identifiziert (Bergeron et al. 2005). Die Aminosäure Lysin 797 in der Nähe des Fusionspeptids wurde als weitere für die Spaltung und Aktivierung durch Trypsin, TMPRSS11a und Plasmin bedeutsame S2-Schnittstelle identifiziert (Belouzard et al. 2009; Kam et al. 2009).

Die Relevanz dieser Proteasen und Spaltstellen *in vivo* ist noch nicht vollständig verstanden. Viele Arbeiten weisen jedoch darauf hin, dass nur die Typ II-Serinprotease TMPRSS2 der entscheidende Faktor in einer Infektion ist (Matsuyama et al. 2010; Glowacka et al. 2011; Bertram et al. 2012).

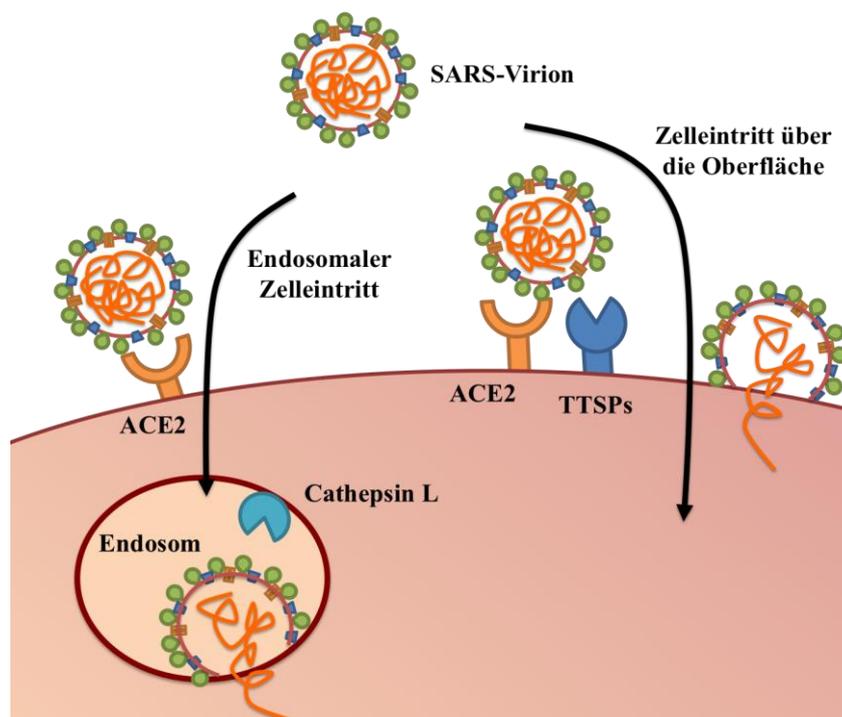


Abbildung 3: SARS-S-vermittelter Zelleintritt: Links ist der endosomale Weg zu sehen: Nach Rezeptorbindung wird das Virion in ein Endosom internalisiert. Dort aktiviert Cathepsin L SARS-S und es kommt zur Membranfusion. Rechts ist der direkte, durch *type two transmembrane proteases* (TTSP) vermittelte Weg über die Zelloberfläche zu sehen. Nach Rezeptorbindung wird SARS-S durch TTSPs aktiviert und es kommt ohne Internalisierung zur Zellfusion (modifiziert nach Simmons et al. 2013, S.19).

2.4 TMPRSS2 als SARS-CoV-aktivierende Protease

Proteasen werden nach ihrem Angriffspunkt im Peptid in Endo- und Exoproteasen und nach ihrem katalytischen Zentrum in Serin-, Cystein-, Aspartat-, und Metalloproteasen unterteilt (Lottspeich und Engels 2009). Die Typ II Serinproteasen (TTSPs) sind eine Familie von membranassoziierten Proteasen mit einem Serin im katalytischen Zentrum (siehe Abbildung 4). Im aminoterminalen zytoplasmatischen Anteil befindet sich ein Signalpeptid, an das sich eine hydrophobe Transmembrandomäne anschließt, die das Enzym in der Zellmembran verankert (Antalis et al. 2011). Es folgt eine variable Stamm-Domäne, nach der die TTSPs in vier Untergruppen unterteilt werden: 1. HAT / *differentially expressed in squamous cell carcinoma* (DESC), 2. Hepsin-*transmembrane protease/serine* (TMPRSS), 3. Matriptase und 4. Corin (Bugge et al. 2009; Choi et al. 2009). Am C-Terminus befindet sich die katalytische Domäne, die innerhalb der TTSPs konserviert ist (Antalis et al. 2011). Die Struktur der in dieser Arbeit untersuchten TTSPs ist in Abbildung 4 dargestellt. In den Fokus der Wissenschaft sind die TTSPs gerückt, da ihre fehlerhafte Expression zur Entstehung von Krebs führen kann (Szabo et al. 2003). Bisher wurde außerdem ihre Relevanz für die Funktion von Epidermis, Gehör und Thymus, für die embryonale Entwicklung und vor allem als proteolytischer Aktivator viraler Infektionen gezeigt (Choi et al. 2009; Antalis et al. 2011). Die in dieser Arbeit untersuchte Transmembranprotease vom Serintyp zwei (TMPRSS2) aktiviert neben SARS-S die Glykoproteine des MERS-Coronavirus (Gierer et al. 2013; Shirato et al. 2013), sowie von Influenza (Bertram et al. 2010), humanem Parainfluenza- und Sendavivirus (Abe et al. 2013), humanem Metapneumovirus (Shirogane et al. 2008) und Hepatitis C Virus (Esumi et al. 2015).

TMPRSS2 wurde 1997 von Paoloni-Giacobino et al. erstmalig beschrieben. Das zugrundeliegende Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 21 lokalisiert und kodiert ein Protein von 492 Aminosäuren Länge. Das Molekül besteht, wie in Abbildung 4 gezeigt, aus einer Transmembrandomäne, einer *low-density-lipoprotein-type-A*-Domäne (LDLA) und einer *scavenger*-Rezeptor-Domäne, für die eine regulatorische Funktion vermutet wird. Am C-Terminus liegt die Proteasedomäne mit einem katalytischen Zentrum aus Histidin, Aspartat und Serin, welches voraussichtlich zur Spaltung der Substrate hinter Arginin oder Lysin führt (Paoloni-Giacobino et al. 1997). TMPRSS2 ist auf eine autokatalytische Aktivierung angewiesen (Afar et al. 2001) und wird anschließend auf der Zelloberfläche exprimiert (Böttcher et al. 2006; Shulla et al. 2011). Sie wird vor allem im Dünndarm und in geringerem Umfang in Leber, Herz, Prostata, Thymus und Lunge exprimiert (Paoloni-Giacobino et al. 1997). Entdeckt und erforscht wurde TMPRSS2 vor allem als wichtiger Faktor in der Progression von Prostatakarzinomen (Afar et al. 2001; Ko et al. 2015). So ist in ca. 50% der Prostatakarzinome ein TMPRSS2-Fusionsprotein nachweisbar (Antalis et al. 2011). Die physiologische Funktion ist bisher unklar. *Knock-out* Mäuse ohne das *tmprss2* Gen zeigen keinen klar erkennbaren Phänotyp (Kim et al. 2006).

Die Infektion mit Coronaviren in Zellkultur und Mausmodell kann durch Serinproteaseinhibitoren effektiv verhindert werden (Kawase et al. 2012; Zhou et al. 2015). Bei Expression auf Zielzellen ermöglicht TMPRSS2 den Zelleintritt über die Zellmembran und die Synzytienbildung weitaus effizienter als andere Wirtszellproteasen (Glowacka et al. 2011). In der Lunge überschneiden sich die Expressionsmuster von TMPRSS2 und ACE2 auf Typ zwei Pneumozyten, den Zielzellen des SARS-CoV (Bertram et al. 2010; Glowacka et al. 2011; Bertram et al. 2012). Außerdem bildet TMPRSS2 Komplexe mit ACE2 und spaltet dieses (Shulla et al. 2011; Heurich et al. 2014).

Wegen der hohen Relevanz für die SARS-CoV-Infektion ist TMPRSS2 ein viel versprechendes Ziel für eine gezielte Therapie. Erste Schritte bei der Suche nach spezifischen Inhibitoren sind bereits gemacht

(Meyer et al. 2013). Gerade die fehlenden Konsequenzen eines Gen-*knock-out* versprechen geringe Nebenwirkungen bei Therapien, die TMPRSS2 als Ziel haben. Die Spaltung und Aktivierung von SARS-S durch die TMPRSS2 ist jedoch nicht vollständig verstanden. TMPRSS2 kann SARS-S in *cis* und in *trans* Bedingungen spalten: *trans* bedeutet, dass Protease und Glykoprotein auf verschiedenen, benachbarten Zellen exprimiert werden. In der *cis*-Konfiguration dagegen sind beide in derselben Zelle zu finden. Es ist bekannt, dass die *cis*-Spaltung des S-Proteins durch TMPRSS2 zu mindestens fünf Spaltprodukten führt: einem 160 kDa-Fragment, das sowohl von S1-, als auch von S2-spezifischen Seren erkannt wird, einem N-terminalen Fragment von 110 kDa und C-terminalen Fragmenten von 45 kDa, 55 kDa und 85 kDa. Es wird jedoch nur ungespaltenes SARS-S in Viruspartikel eingebaut (Glowacka et al. 2011). Während der *trans*-Spaltung von SARS-S auf künstlichen Viruspartikeln wurde bisher nur das 85 kDa-Fragment detektiert (Glowacka et al. 2011).

Der Bereich direkt N-terminal zum SARS-S-Fusionspeptid wurde bereits als potentiell wichtige Spaltstelle für die Aktivierung von SARS-S auf der Zelloberfläche identifiziert (Watanabe et al. 2008; Belouzard et al. 2009). Eindeutige Spaltstellen wurden bisher jedoch nicht beschrieben. Ein näheres Verständnis der Interaktion von TMPRSS2 und SARS-S in der viralen Infektion kann als Basis für neue Therapien dienen.

Während die Bedeutung von TMPRSS2 in viralen Infektionen schon relativ gut verstanden ist, ist die Rolle von TMPRSS11a bisher kaum untersucht worden. TMPRSS11a gehört zur HAT/DESC-Unterfamilie, die sich neben der Serinprotease-Domäne durch eine *Sea Urchin Sperm Protein/Enteropeptidase/Agrin* (SEA)-Domäne auszeichnet (Bugge et al. 2009). Die physiologische Funktion der TMPRSS11a ist unklar, da ein Gen-*knock-out* in Mäusen analog zur TMPRSS2 zu keinem Phänotyp führt (Sales et al. 2011).

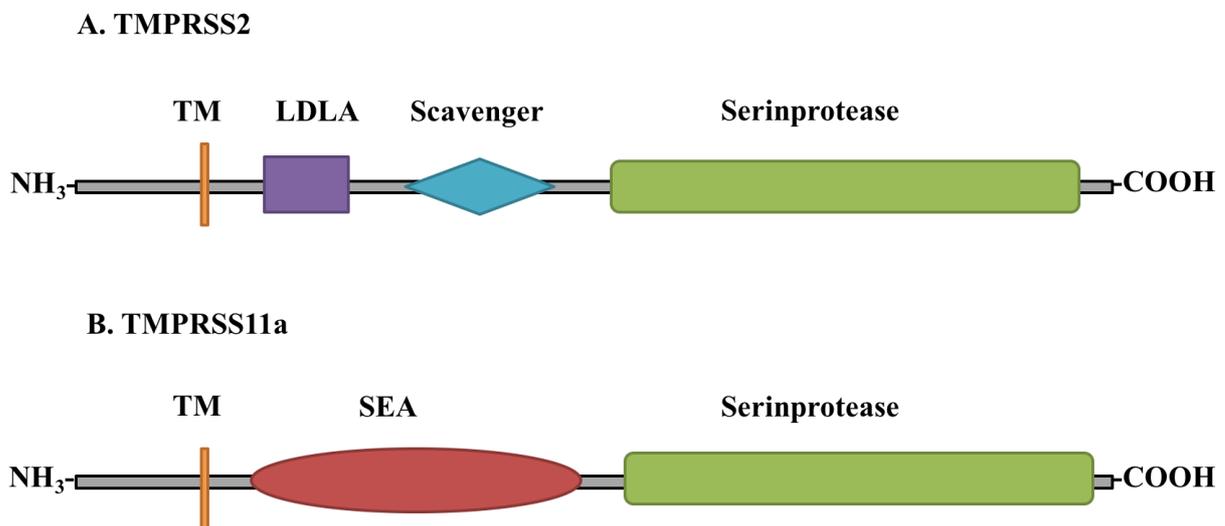


Abbildung 4: Der Aufbau der TTSPs TMPRSS2 (A.) und TMPRSS11a (B.) mit ihren Transmembrandomänen (TM), Low Density Lipoprotein TypA-Domäne (LDLA), der *Scavenger*-Rezeptor-Domäne (Scavenger), der *Sea Urchin Sperm Protein/Enteropeptidase/Agrin* Domäne und der Serinprotease-Domäne (nach Bugge et al. 2009, S. 23178).

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das *S-Protein* des *SARS-CoV* wird in die virale Membran inseriert und vermittelt den infektiösen Eintritt des Virus in Wirtszellen. Dafür muss das S-Protein durch Wirtszellproteasen gespalten und aktiviert werden. Die Serinprotease Trypsin spaltet und aktiviert das S-Protein von SARS-CoV (SARS-S) an der Aminosäure R667 und ist ein wichtiges Werkzeug für die Analyse der SARS-S-Aktivierung. Im infizierten Wirt erfolgt die Aktivierung jedoch durch andere Serinproteasen. Besonders der TMPRSS2, einem Mitglied der Familie der Typ II Transmembran Serinproteasen, wird dabei eine zentrale Rolle zugesprochen. Die Identifizierung der Spaltstelle(n) von TMPRSS2 in SARS-S ist für das Verständnis der TMPRSS2-vermittelten S-Protein-Aktivierung wichtig und war das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Zur Kartierung der TMPRSS2-Spaltstellen in SARS-S sollten zunächst mit Hilfe von PCR-basierter Mutagenese SARS-S-Varianten hergestellt werden, die Aminosäureaustausche in R667 und anderen Stellen enthalten, die möglicherweise für die SARS-S-Aktivierung wichtig sind. Anschließend sollte geprüft werden, wie diese Mutationen die Expression, die zelluläre Lokalisation und die proteolytische Spaltung des S-Proteins beeinflussen. Die Expressions- und Spaltungsanalysen sollten mittels Immunoblot durchgeführt werden, während die zelluläre Lokalisation durch konfokale Mikroskopie bestimmt werden sollte. Der Einfluss der Mutationen auf die S-Protein-Aktivierung sollte schließlich mit Hilfe von Zell-Zellfusionstests und SARS-S abhängiger Transduktion von Zielzellen durch S-Protein tragende retrovirale Vektoren bestimmt werden. Zusammenfassend sollten diese Analysen wichtige Einblicke in die molekularen Prozesse liefern, die der S-Protein-Aktivierung durch TMPRSS2 zugrunde liegen.

2.6 Vorarbeiten

Als Grundlage dieser Arbeit dienten die in Tabelle 2 aufgeführten Mutanten, die weitestgehend im Labor vorhanden waren und bis auf R667A noch mit der Sequenz für einen antigenen *tag* ausgestattet werden mussten. Erste Versuche mit diesen Mutanten hatten gezeigt, dass R543A/K544A die S-Protein-Spaltung durch Trypsin blockiert während die Mutation R563A/R566A die S-Protein-Spaltung durch TMPRSS2 und Trypsin verhindert.

Tabelle 2: Die SARS-S-Mutanten, die als Grundlage dieses Projektes dienten. Der erste Buchstabe gibt die Aminosäure des Wildtyp-Proteins im Einbuchstaben-Code wieder, die Zahl in der Mitte ihre Aminosäureposition. Die rechte Zahl zeigt die Aminosäure, die das mutierte Produkt an dieser Stelle trägt. So ist z.B. R667A eine Mutante, in der die Nukleotide so mutiert sind, dass das Arginin an Aminosäurestelle 667 in SARS-S zu einem Alanin wird.

Mutation	Charakteristika	Beschrieben in
K543A/R544A		S. Gierer, unpublizierte Daten
R554A		S. Gierer, unpublizierte Daten
R563A/K566A		S. Gierer, unpublizierte Daten
R620A		S. Gierer, unpublizierte Daten
L665R		T. Walter, unpublizierte Daten
R667A	Zerstört Trypsin-Spaltstelle	(Bertram et al. 2011; Simmons et al. 2011)
R667A/R672G		(Bertram et al. 2011; Simmons et al. 2011)
R672L		(Bergeron et al. 2005)
T678A	Zerstört potentielle Cathepsin L -Spaltstelle	(Bosch et al. 2008)
T678S	Zerstört potentielle Cathepsin L -Spaltstelle	(Bosch et al. 2008)
R758-AXXA-761R	Zerstört mögliche Spaltstelle für Proprotein-Convertasen	
T760R	Optimiert mögliche Spaltstelle für Proprotein-Convertasen	(Simmons et al. 2011)
R797N	Zerstört potentielle Trypsin-Spalt/Aktivierungsstelle	(Belouzard et al. 2009)

3 Material und Methoden

3.1 Material

Im Folgenden werden die eingesetzten Materialien tabellarisch aufgeführt.

3.1.1 Biologisches Material

Es wurden für diese Arbeit verschiedene menschliche und tierische Zelllinien sowie Bakterien verwendet, die in den folgenden Tabellen aufgeführt werden.

Tabelle 3: Bakterien

Bakterien	Genotyp	Transformationmethode
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F- araDJ39 Δ (ara, leu) 7697 Δ lacX74 galU galK rpsL deoR 48 Φ dlacZAM15 endAI nupG recAI mcrA Δ (mrr hsdRMS mcrBC) (Grant et al. 1990)	Chemische Kompetenz

Tabelle 4: Zelllinien

Zelllinien	Ursprung	Hersteller	Charakteristika	Verwendete Transfektionsmethode
293T	Humane Niere	ATCC, Manassas USA	Standardzelllinie, immortalisiert durch Adenovirus 5 E1A- und E1B-Proteine, exprimiert das SV40 T-Antigen	Calcium-Phosphat: HBS pH7.11
BHK	Hamsterniere	Laborinterne Charge	Kein humanes <i>Angiotensin Converting Enzyme</i> (ACE2)	Lipofectamin
Cos7	Affenniere	Laborinterne Charge	Bessere Untergrundhaftung als 293T-Zellen	Calcium-Phosphat HBS pH7.11

3.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die für die PCRs und die Sequenzierungen genutzt wurden, sind in den folgenden Tabellen aufgelistet. Die *primer* wurden mit der Software Vektor-NTI konstruiert.

Tabelle 5: Für die PCR genutzte *primer*

Zielgen	Firma	Nukleotid-Sequenz (in 5'-3' Richtung)
p3-SARS-S V5 XhoI	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	gataCTCGAGTTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTT AGGGAT- AGGCTTACCTGTGTAATGTAATTTGACACCCTTGAGAAC TGGC
SARS-S Sequencing #25	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	TCAACTGCATTGGGCAAG
3' V5-only	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGC TTACC

Tabelle 6: Für die Sequenzierung genutzte *primer*

Zielgen	Firma	Nukleotid-Sequenz (in 5'-3' Richtung)
SARS-S Sequencing #25	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGC TTACC
pCAGGS- 3'Seq	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	CAGAAGTCAGATGCTCAAGGG

3.1.3 Plasmide

Die in nachfolgender Tabelle aufgelisteten Plasmide wurden in der Arbeit verwendet.

Tabelle 7: Genutzte Expressionsplasmide

Plasmid	Charakteristika	Resistenzgen	Vektor	Referenz
pCAGGS-MCS	Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV Enhancer/beta-Aktin-Promotor	Ampicillin	pCAGGS	
pcDNA3.1 Zeo	Eukaryoter Expressionsvektor mit CMV-Enhancer/Promotor	Ampicillin	pcDNA3.1 Zeo(+)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pCA7-TMPRSS2	Eukaryotisches Expressionsplasmid für die humane TMPRSS2	Ampicillin	pCA7	Von der KYUSHU University, Japan, bereitgestellt
hACE2	Eukaryotes Expressionsplasmid für das humane Angiotensin Converting Enzyme (hACE2)	Ampicillin	pcDNA3.1 Zeo(+)	(Hofmann et al. 2004b)
SARS-S-Wt-V5	Eukaryotes Expressionsplasmid für das SARS-CoV Glykoprotein mit C-terminalem V5-Tag, Stamm Frankfurt	Ampicillin	pCAGGS	Zur Verfügung gestellt von Prof. Graham Simmons
VSV-G-Glykoprotein	Eukaryotes Expressionsplasmid für das Oberflächenprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV)	Ampicillin	pCMV Δ R9	(Naldini et al. 1996; Simmons et al. 2003)

Plasmid	Charakteristika	Resistenzgen	Vektor	Referenz
MLV-Gag-Pol	Eukaryotes Expressionsplasmid für das Oberflächenprotein und die Polymerase des murinen Leukämievirus (MLV)	Ampicillin	Wahrscheinlich pTG5349	Zur Verfügung gestellt von Prof. Graham Simmons, wohl (Bartosch et al. 2003)
MLV-Luziferase	Eukaryotes Expressionsplasmid für Luziferase, ein Enzym, das Luziferin unter Lichtemission prozessiert	Ampicillin	Wahrscheinlich pTG13077	Zur Verfügung gestellt von Prof. Graham Simmons
pmaxGFP	Eukaryotes Expressionsplasmid für das „ <i>green fluorescence protein</i> “ (GFP), als Transfektionskontrolle genutzt	Ampicillin	Nicht angegeben	Amara GmbH Köln, Deutschland
pGAL4-VP16	Eukaryotes Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktor GAL4 von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und der Transaktivierungsdomäne des VP16 des Herpes Simplex Virus (HSV)	Ampicillin	pSCTEV	(Stamminger et al. 2002)
pGal5-luc	Eukaryotes Expressionsplasmid für Luziferase unter der Kontrolle von 5 GAL4-Bindungsstellen	Ampicillin	pcDNA3	(Stamminger et al. 2002)

Plasmid	Charakteristika	Resistenzgen	Vektor	Referenz
SARS-S-Mutanten	SARS-S mit Mutationen in Aminosäuren in der Nähe des S1/S2-Übergang; in pCAGGS	Ampicillin	pCAGGs	hergestellt von Stefanie Gierer bzw. bereitgestellt von Prof. Graham Simmons (s. Tabelle 3)

3.1.4 Medien

Für die Kultur der eu- und prokaryotischen Zellen wurden die in folgenden Tabellen beschriebenen Medien genutzt.

Tabelle 8: Nährmedien und Zusätze für Bakterienkulturen

Name	Firma
LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin (100 µg/ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar (Luria-Bertani-Agar für Kultur-Platten)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 9: Nährmedien und Zusätze für eukaryote Zellkulturen

Name	Firma
DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium), wurde mit 10% FCS und PS versetzt	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
FCS (Fötale Kälberserum, 10%)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
PS (Penicillin/Streptomycin, je 1%)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

3.1.5 Antikörper

Die in folgenden Tabellen aufgelisteten Antikörper wurden in dreiprozentigem Milchpulver in PBS-Tween verdünnt eingesetzt.

Tabelle 10: Primärantikörper

Antikörper	Epitop	Herkunft	Verwendung	Verdünnung	Firma
Anti-V5-Ak, Referenz- Nummer: R960-25	V5	Maus	Immunoblot und Konfokal- mikroskopie	1:5000 (WB), 1:1000 (Konfokal- mikroskopie)	Novex, Waltham, USA
A5441-	beta-Aktin	Maus	Ladekontrolle Immunoblot	1:1000	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
4B2	MLV-gag p30	Maus	Immunoblot	1:1000	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
S1-Serum	SARS-S1 AS: 19-49	Kaninchen	Immunoblot	1:1000	Referenz s. (Glowacka et al. 2011)
IMG-557	SARS-S2	Kaninchen	Immunoblot	1:1000	Imgenex, Littleton, USA

Tabelle 11: Sekundärantikörper

Antikörper	Epitop	Herkunft	Verwendung	Verdünnung	Firma
Anti-mouse-IgG-HRP 115-035-003	Anti-Maus	Ziege	Immunblot	1:10.000	Dianova GmbH, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Anti-rabbit-HRP 111-035-003	Anti-Kaninchen	Ziege	Immunoblot	1:10.000	Dianova GmbH, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Alexa Fluor 488 anti mouse	Anti-Maus	Ziege	Konfokal-mikroskopie	1:1000	Dianova GmbH, Schwäbisch Gmünd, Deutschland

3.1.6 Eingesetzte Geräte

Die für die Experimente standardmäßig eingesetzten Geräte werden in der folgenden Tabelle genannt.

Tabelle 12: Geräteliste

Gerät	Firma
UV-Mikroskop: Axiovert 40CFL mit HBO50 UV-Licht	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
PAGE/Western-Blot-Kammersystem: Bio-Rad Laboratories GmbH	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kühlzentrifuge: Heraeus Fresco 7	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge: Heraeus Pico 17	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Kühlzentrifuge: Multizentrifuge X3R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Pipetten	Gilson Inc., Middleton, USA
Vortexer: Reax Control	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

Gerät	Firma
Heizblock: MBT250	ETG – Entwicklungs- und Technologie Gesellschaft mbH, Ilmenau, Deutschland
Pipetus: Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Sterilbank: Hera Safe 2020	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Zell-Inkubator: BDD 6220	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Western-Blot-Imager: Chemo-Cam	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
-20 °C Kühlschrank: Premium	Liebherr Group, Bulle, Schweiz
4 °C Kühlschrank	Siemens AG, Berlin und München, Deutschland
PCR-Cycler: Thermal Cycler, My Cycler	Bio - Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bakterien-Schüttler: Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
UV-Kamera	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Luminometer; Plate Chameleon	Hidex, Turku, Finnland
LSM 5 laser scanning microscope	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

3.1.7 Verbrauchsmaterial

Das Einmalmaterial, das während des Projektes verwendet wurde, wird in folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 13: Kommerzielle Reagenzsysteme

Reagenzsystem	Firma
Midi- und Maxipräparation: Nucleobond plasmid purification kit PC-100 und PC-500	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Gel-Extraktion: Nucleo Spin Gel and PCR-clean up kit	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

Reagenzsystem	Firma
Western-Blot-Detection Reagent: Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE-Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Luziferase-Kit	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland

Tabelle 14: Verbrauchsmaterial

Name	Firma
Whatman Papier	GE-Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Nitrozellulose Membran: Amersham Protran 0,2 µm NC	GE-Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
6-Loch-Platten (6 Wells)	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
24-Loch-Platten (24 Wells)	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
48-Loch-Platten (48 Wells)	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
96-Loch-Platten (96 Wells): Nunclon Delta Surface	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
T-175er Flaschen	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
T-25er Flaschen	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Weißer 96-Loch-Platten	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Pipetten-Spitzen	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich
Plastik Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml): SafeSeal-Gefäß	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Cryo-Gefäße	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße: Multiply-µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
0,45 µl Filter: Minisart, Syringe Filter	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
falcon-Röhrchen: Cellstar-Tubes	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich

Name	Firma
Einmal-Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml: Serologische Pipette	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Objektträger: Menzel-Gläser	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

3.1.8 Enzyme

Folgende Enzyme wurden während des Projektes eingesetzt:

Tabelle 15: Enzyme

Enzym	Firma
Restriktionsenzyme	Fermentas, Waltham, USA
T4-Ligase	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Pfx-Polymerase: Accu-Prime-Pfx-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Taq-Polymerase	Laborintern hergestellt
PNGase F	New-England Bio-Labs inc., Ipswich, USA
Trypsin: TPCK-Trypsin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas, Waltham, USA
DpnI	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

3.1.9 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen, die nach laborinternen Rezepten angesetzt wurden, sind mit genauer Zusammensetzung in folgender Tabelle gelistet.

Tabelle 16: Selbstangesezte Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Mini-Prep-Solution Buffer, P1 (100 ml)	50 mM Tris-HCL pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Mini-Prep-Lysis-Buffer, P2 (100 ml)	200 mM NaOH 1% SDS
Mini-Prep-Neutralization-Buffer, P3 (500 ml)	3 M Kaliumacetat pH 5,5 294,5 g Kaliumacetat in 500ml H ₂ O und auf pH 5,5 einstellen
2x HBS	280 mM NaCl 50 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid) 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH mit NaOH auf 7,08 - 7,13 einstellen anschließend sterilfiltrieren
2,5M CaCl₂	2.5 M CaCl ₂ anschließend sterilfiltrieren
10-fach Elektrophorese-Puffer	250 mM TrisHCl 1,92 M Glycin 35 mM SDS
Blotting-Puffer	100 ml 10-Fach Elektrophorese-Puffer 200 ml Methanol 700 ml ddH ₂ O

Puffer	Zusammensetzung
2x SDS-AP (LD)	1,5 ml 1M TrisHCl pH 6,8 6 ml 80% Glycerol (>10%) 10 ml 10 % SDS (>2 %) 2,5 ml beta-Mercaptoethanol (> 0,1%) 5 ml 1% Bromphenolblau 50 µl 1M EDTA pH 8.0 (>1mM) Auf 50 ml mit ddH ₂ O auffüllen, aliquotieren
PBS-Tween (PBS_T)	1L 10x PBS 10 ml Tween 20 auf 10 L mit ddH ₂ O auffüllen
Luziferase-Lyse-Puffer	<u>2x Lysis-Puffer (für 500 ml):</u> <i>Stocklösung ansetzen</i> 2 ml 1M DTT 0,6928 g 1,2-Diaminocyclohexantetraessigsäure (CDTA) 10 ml Triton X-100 100 ml Glycerol <i>pH auf 7,8 mit NaOH justieren, sodass CDTA vollständig gelöst ist;</i> <i>mit H₂O auf 500 ml auffüllen, Sterilfiltration</i>
WB-Entwicklung Solution A (Lagerung bei 4 °C)	<i>Für 200ml</i> 20 ml 1M Tris-HCl pH 8,6 180 ml Millipore H ₂ O 50 mg Luminol Natrium-Salz
WB-Entwicklung Solution B (Lagerung bei RT)	<i>Für 50ml</i> 55 mg Hydroxycomarinsäure 50 ml DMSO

Puffer	Zusammensetzung
Stripping-Puffer	31,25 ml 1M Tris HCl pH 6,8 100 ml 10% SDS <i>Auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen</i> <i>Vor Verwendung auf 100 mM β-Mercaptoethanol einstellen</i>

Tabelle 17: PAGE-Gele, Zusammensetzung für Trenngel (*Separation-Gel*) und Sammelgel (*Stacking-Gel*)

Polyacrylamidgele	Trenngel (10% AA)	Sammelgel (5% AA)
30 % Acrylamid	2,5 ml	0,425 ml
2 % Bisacrylamid	0,5 ml	0,0175 ml
10 % SDS (sodium dodecyl sulfate)	0,075 ml	Ø
2 M TrisHCl pH 8,8	1,4 ml	Ø
1M TrisHCl pH 6,8	Ø	0,3 ml
ddH ₂ O	3,15 ml	1,575 ml
Für die Polymerisation		
10 % APS	28,1 μ l	12,5 μ l
TEMED (Tetraethylethylendiamin)	5,625 μ l	5 μ l

Chemikalien

Weitere Chemikalien, die eingesetzt wurden, sind in folgender Tabelle gelistet:

Tabelle 18: Chemikalien

Chemikalie	Firma
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Vybrant DiI- Cell labeling solution	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Lipofectamin	Invitrogen, Carlsbad, USA
DABCO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Moviol 40-88	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
MDL-28170	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Agarose für Gelelektrophorese	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.2 Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die in diesem Projekt eingesetzten Methoden beschrieben. Zuerst werden die Klonierungstechniken beschrieben, anschließend zellbiologische Verfahren und zuletzt die Experimente für die funktionelle Untersuchung der Mutanten.

3.2.1 Klonierungen

Für die experimentelle Analyse potentieller Proteaseschnittstellen im SARS-Glykoprotein wurden Expressionsplasmide für S-Mutanten mit einem C-terminalen V5-tag erzeugt, die in eukaryotischer Zellkultur exprimiert werden können.

Für die Herstellung dieser Expressionsvektoren wurden rekombinante DNA-Techniken angewandt, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden. Im Rahmen dieser Methode wird ein Zielgen manipuliert, in einen Expressionsvektor eingefügt und auf gewünschte Merkmale hin selektiert. Anschließend erfolgt eine Vervielfältigung in Bakterien (Corley 2005).

3.2.1.1.1 Polymerase Kettenreaktion

Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine thermische zyklische Vermehrung von DNA-Sequenzen. (Saiki et al. 1986; Saiki et al. 1988). Zu Beginn wird die doppelsträngige *template*-DNA durch Erhitzen auf 94 °C in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Dadurch werden die DNA-Stränge für die Bindung komplementärer Oligonukleotide (*primer*) zugänglich. Dieses sogenannte *annealing* geschieht an einem Temperatur-Optimum, das von der Länge und dem GC-Gehalt der *primer* abhängt. Im nächsten Schritt synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase durch Anfügen von dNTPs an die freien OH-Enden der *primer* einen neuen DNA-Strang. Diese Elongation geschieht am Aktivitätsoptimum der Polymerase, das für die eingesetzte Pfx-Polymerase aus einer Thermokokkenspezies 68 °C ist. Diese Reaktion endet, sobald das *template* endet oder die Temperatur zur Einleitung einer neuen Denaturierungsphase angehoben wird. Durch Wiederholen dieser Schritte kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnitts, wobei auch die an den *primern* neu gebildeten DNA-Fragmente als *template* dienen (Alberts et al. 2008; accuprimepfx_man.pdf). Der Reaktionsansatz enthält jeweils die *template*-DNA, spezifische 5' und 3' Oligonukleotid-*primer*, eine thermostabile DNA-Polymerase und einen Puffer, der dNTPs und Magnesiumionen als Kofaktor der Polymerase enthält (Reaktionsansatz siehe Tabelle 19, Reaktionsprogramm siehe Tabelle 20).

Tabelle 19: Reaktionsansatz für die standardmäßige PCR-Reaktion

PCR-Reaktionsmix	Menge
Oligonukleotid 3' (50 pmol)	1 μ l
Oligonukleotid 5' (50 pmol)	1 μ l
Template-DNA (10 pg)	1 μ l
PCR-Puffer (10x)	5 μ l
Pfx-DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l)	2 μ l
ddH ₂ O	40 μ l

In diesem Projekt wurde eine Variation der Standard-PCR durchgeführt. In diesem Fall bestehen die Oligonukleotid-*primer* aus überlappenden, zur *template*-DNA komplementären Bereichen und angehängten nichtkomplementären Sequenzen (*V5-tag*). In der PCR bindet der komplementäre Teil an die *template*-DNA. Im nächsten Amplifizierungsschritt werden zusätzlich zu den komplementären Sequenzen die angehängten Sequenzen mitamplifiziert. Auf diese Weise ist eine Verlängerung der Ursprungs-DNA möglich (Higuchi et al. 1988).

Tabelle 20: Reaktionsprogramm für den Thermocycler

Temperatur	Dauer	Phase
94 °C	2 min	Erste Denaturierung
94 °C	30 s } 40x	Denaturierung
45 °C		<i>annealing</i>
68 °C		Elongation
68 °C	10 min	Elongation
14 °C	Halten	

3.2.1.2 Restriktionsspaltung und Ligation

Restriktionsenzyme sind bakterielle Nukleasen, die spezifische, oft palindromische DNA-Sequenzen erkennen und der Degradierung von Fremd-DNA aus Bakteriophagen dienen. In der Molekularbiologie lassen sich durch Kombination von Restriktionsenzymen zueinander passende DNA-Fragmente schaffen, die in einem nachfolgenden Ligationsschritt zu rekombinanter DNA verbunden werden (Alberts et al. 2008). Die in diesem Projekt verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 22 aufgeführt. In dieser Arbeit wurden jeweils PCR-Produkte und Plasmide parallel mit denselben Restriktionsenzymen behandelt und anschließend durch Ligation zusammengeführt. Die Reaktion wurde den Angaben des Herstellers entsprechend nach dem folgenden Reaktionsansatz durchgeführt:

Tabelle 21: Allgemeiner Reaktionsansatz für Restriktionsspaltungen

Restriktionsspaltung	Menge
PCR-Produkt oder Plasmid-DNA	5 µl (entspricht 1 - 5 µg)
Restriktionsenzym 1 (10U/µl)	1 µl
Restriktionsenzym 2 (10U/µl)	1 µl
SAP (bei <i>blunt-end</i> Reaktionen)	1 µl
DpnI (zur Behandlung des PCR-Produkts)	1 µl
Passender 10x Puffer	3 µl
ddH ₂ O	Bis auf 30 µl hinzufügen

Weitere für die Restriktionsspaltung eingesetzte Enzyme sind DpnI aus *Diplococcus pneumoniae*, das nur in methylierter DNA schneidet und so die methylierte *template*-DNA aus dem Reaktionsansatz entfernt, während das PCR-Produkt aufgrund fehlender Methylierung nicht beeinflusst wird (Lacks und Greenberg 1975). Außerdem wurde die *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) genutzt, die 5' OH-Enden dephosphoryliert und somit bei *blunt-end*-Ligationen eine Religation verhindert. Durch Erhitzen auf 65 °C für 15 min lässt sich die SAP irreversibel inaktivieren (Affymetrix 2015).

Die Restriktionsspaltung wurde nach dem in Tabelle 21 beschriebenen Reaktionsansatz mit dem passenden Probenpuffer bei 37 °C für mindestens 90 min durchgeführt.

Tabelle 22: Eingesetzte Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenz und Schnittstelle

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Enden
XhoI	C/TCGAG	<i>sticky-ends</i>
EcoRV	GAT/ATC	<i>blunt-ends</i>
NheI	G/CTAGC	<i>sticky-ends</i>
DpnI	GA/TC <i>methylierte DNA</i>	<i>blunt-ends</i>

Im Anschluss wurde das Reaktionsprodukt in einem Agarosegel (1%) entsprechend der Fragmentgröße aufgetrennt (50 min bei 130V). Der Laufpuffer enthält Ethidiumbromid, das zwischen den Basen interkaliert und dadurch die DNA unter niederwelligem UV-Licht sichtbar macht. So lassen sich Fragmente der gewünschte Größe im Gel identifizieren und können herausgeschnitten werden (Corley 2005). Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte nach Angaben des Herstellers mit einem kommerziellen Kit (Nucleospin, Macherey & Nagel), der auf einer Anionenaustauscher-Säule basiert. Dieser Schritt entfernt Agarose, Ethidiumbromid und DNA-Fragmente unter ca. 150 Nukleotiden (*primer*). Anschließend erfolgte die Insertion der isolierten PCR-Produkte in Plasmide.

Die durch die Restriktionsspaltung entstandenen Fragmente haben zueinander passende Enden, an denen sich temporär nicht kovalente Bindungen ausbilden können. Durch die Ligationsreaktion mit der T4-Ligase werden diese in kovalente Bindungen überführt. Dieses Enzym stammt aus dem T4-Bakteriophagen und schließt ATP-abhängig Doppelstrangbrüche (Fareed und Richardson 1967). Die Ligasereaktion wurde dem folgenden Reaktionsansatz entsprechend bei Raumtemperatur für mindestens 90 min durchgeführt:

Tabelle 23: Standardreaktionsansatz für Ligationsreaktionen

Ligasereaktions-Ansatz	Menge
T4-DNA-Ligase (5 U/ μ l)	1 μ l
10x T4-Ligase-Puffer	1 μ l
Plasmid	1 μ l
Insert	2,5 μ l
ddH ₂ O	4,5 μ l

3.2.1.3 Transformation

Als Transformation wird die Aufnahme von DNA durch kompetente Bakterien bezeichnet. Für Klonierungen und Produktion von Plasmiden wurden DH10B *E. coli*-Bakterien genutzt (Grant al. 1990). Zur Ausbildung einer chemischen Kompetenz wurden sie wie folgt behandelt: 250 ml LB-Medium wurden mit 7 ml aus einer 50 ml Übernachtskultur von *E. coli* DH10B angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert (1-1,5 h). Durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 Umdrehungen pro Minute (upm) wurden die Zellen abgetrennt. Die Sedimente von je zwei Flaschen wurden anschließend in 10 ml 0,1 M MgCl₂-Lösung gelöst. Durch erneute Zentrifugation für 5 min bei 4000 upm wurden die Bakterien wieder pelletiert, in 6 ml 50 mM CaCl₂-Lösung sowie 15% Glycerol gelöst. Aliquots für die weitere Verwendung wurden bei -80 °C gelagert.

Die Bakterien wurden unter leicht abgewandelten Bedingungen nach Hanahan (Hanahan, 1983) transformiert. Hierzu wurden 5 µl des Ligationsprodukts zu den kompetenten Bakterien hinzugefügt. Nach einer Inkubationsphase auf Eis wurden die Proben im Heizblock (2 min, 42 °C) erhitzt. Durch diesen Hitzeschock wird die bakterielle Zellwand instabil und eine Aufnahme von DNA durch die Bakterien ist möglich. Nach einer Erholungsphase auf Eis (2 min) wurde den Proben 200 µl LB-Medium zugefügt und geschüttelt (45 min, 37 °C), sodass die Bakterien das auf den Plasmiden kodierte Resistenzgen exprimieren konnten.

Anschließend wurde das Probenvolumen durch Zentrifugation (3 min, 3000 upm) und Lösen des Zellsediments in 150 µl LB-Medium reduziert und die Suspension auf vorbereiteten LB_{Amp}-Platten ausgestrichen. Über Nacht wurden die Proben im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, sodass sich nach 2-15 h Bakterienkolonien bilden konnten, die durch Plasmid-Präparation (Mini-Präparation) und Kolonie-PCR wie im Folgenden beschrieben auf das Vorhandensein des Plasmids mit dem gewünschten Insert hin untersucht werden konnten.

3.2.1.4 Mini-Präparation

Die Mini-Präparation ist ein Verfahren zur schnellen Aufreinigung von DNA (Zagursky et al. 1985). Da sie im Vergleich zur Maxi- und Midi-Präparation zu einer geringeren DNA-Menge und Reinheit führt, eignet sich diese Methode primär für Screening-Untersuchungen.

Für die Aufreinigung wurde eine Übernachtskultur der *Escherichia Coli* (*E. Coli*)-Bakterien in 5 ml LB_{Amp}-Medium angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien geerntet, durch Zentrifugation sedimentiert und in 300 µl „Solution“-Puffer aufgenommen. Nach dem Transfer in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß wurden die bakteriellen Membranen durch Zugabe des „Lysis“-Puffer alkalisch aufgeschlossen. Diese Reaktion wurde nach 5 min durch Zugabe des „Neutralizations“-Puffer gestoppt. Anschließend wurden größere zelluläre Bestandteile, wie Proteine und das bakterielle Genom, durch Zentrifugation (10 min, 14.000 upm) abgetrennt. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde nun durch Zugabe von 450 µl Isopropanol ausgefällt und durch Zentrifugation (15 min, 14.000 upm) pelletiert. Nach einem Waschschriff mit 70% Ethanol wurden die Proben bei 56 °C getrocknet und anschließend in 30 µl ddH₂O für Sequenzierungen und Restriktionsspaltung gelöst.

3.2.1.5 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Methode, um viele Klone in relativ kurzer Zeit auf eine spezifische Sequenz hin zu untersuchen. Das Prinzip ähnelt einer Standard-PCR, bei der allerdings anstatt gereinigter DNA eine Bakterienkultur als *template* genutzt wird (Hofmann und Brian 1991, Abstract). Die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) erhöht die Sensitivität, vermutlich indem es die Sekundärstruktur der DNA auflöst (Winship 1989). Durch die hohe Temperatur und das DMSO wird die Plasmid-DNA freigesetzt und eine Amplifikation ermöglicht. Hierfür waren 25 Amplifikationsschritte notwendig, die mithilfe der *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* ausgeführt wurden (Reaktionsansatz s. Tabelle 24). Diese hat eine höhere Fehlerquote als die *Pfx*-Polymerase, welche jedoch für diese diagnostische Reaktion ausreichend ist.

Das Produkt der PCR-Reaktion wurde auf ein mit Ethidiumbromid versetztes Agarose-Gel (1%) aufgetragen und durch Elektrophorese (50 min, 90 V) aufgetrennt. Anschließend wurde unter der UV-Kamera überprüft, ob das Amplifikat die erwartete Größe hatte. Eine Positiv- und Negativkontrolle wurden analog zu den Proben mitgeführt.

Tabelle 24: Standardreaktionsansatz für eine Kolonie-PCR

Kolonie-PCR	Menge
Oligonukleotid 3' (50 pmol)	1 µl
Oligonukleotid 5' (50 pmol)	1 µl
<i>template</i>	Eine Kolonie oder 1 µl DNA
PCR-Puffer (10x)	5 µl
DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0,5 µl
DMSO (100%)	1 µl
ddH ₂ O	40 µl

3.2.1.6 Sequenzierung

Zur abschließenden Verifizierung der erfolgreichen Klonierung wurden die S-Mutanten mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert (Sanger et al. 1977). Die Proben wurden wie in Tabelle 25 beschrieben vorbereitet. Im Anschluss wurden diese für die Aufreinigung und Sequenzierung der Sektion Primatengenetik übergeben.

Die Sequenzdaten der Mutanten wurden mit den Programmen Vektor-NTI und ContigExpress (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) visualisiert und auf Übereinstimmung mit der komplementären Sequenz und der Sequenz des Wildtyps (Wt) überprüft.

Tabelle 25: Reaktionsansatz für die Sequenzierungen

Sequenzierproben	Menge
DNA-Template	1 µl
Sequenzierprimer	1 µl
ddH ₂ O	3 µl

3.2.1.7 DNA-Extraktion aus Bakterienkulturen

Die für die Zellkulturexperimente eingesetzten Plasmide wurden mit kommerziell erhältlichen Kits nach Anleitung des Herstellers aus Kulturen transformierter DH10B-*E. coli* im Midi- und Maxi-Format gereinigt (Nucleobond Plasmid Midi/Maxi Kit, Macherey & Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland).

3.2.2 Zellbiologische und proteinbiochemische Verfahren

3.2.2.1 Zellkulturtechniken

Die Zelllinien wurden in einer Atmosphäre mit hoher Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5% bei 37 °C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), das mit Penicillin/Streptomycin (1%) und fötalem Kälberserum (10%) versetzt wurde, kultiviert. Alle Tätigkeiten an der Zellkultur wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Umsetzung der Zellen erfolgte bei 70-80 prozentiger Dichte. Nach einmaligem Waschen mit sterilem PBS wurden die Zellen durch Inkubation mit Trypsin (1 ml, 10 min) von den Zellkulturflaschen abgelöst und in 10 ml DMEM resuspendiert. Ein Zehntel wurde zurück in die Zellkulturflasche gegeben und mit DMEM auf 10 ml aufgefüllt. Die übrigen suspendierten Zellen wurden für Transfektionsexperimente in den in Tabelle 26 aufgeführten Mengen und Formaten eingesetzt.

Tabelle 26: Zellkultur-Formate. Die Bezeichnung „Well“ (Englisch für Wanne) steht für die Anzahl der Probenbehältnisse auf einer Kulturplatte.

Kulturformat	Menge Medium/ <i>well</i>	an	Zellzahl	Einsatzgebiet
96-Well	50-200 µl		200.000 Zellen/ml	Virus-Zellfusion
48-Well	0,5 ml		80.000 Zellen/ml	Zell-Zellfusion
24-Well	1 ml		20.000-30.000 Zellen/ml	Konfokalmikroskopie
6-Well	2 ml		150.000 Zellen/ml	Zell-Zellfusion, <i>cis</i> und <i>trans</i> - Spaltungen, Pseudotypen- Zielzellen
T-25er Flasche	5 ml		150.000 Zellen/ml	Pseudotypen
T-175er Flasche	10 ml		Je nach Anzahl der benötigten Zellen	Erhaltungskultur

3.2.2.2 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert. Hierfür wurden sie zuerst 5-10 min bei 20 °C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein steriles 15-ml-*falcon*-Röhrchen überführt und mit 5 ml frischem DMEM aufgefüllt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1500 upm für 5 min abgetrennt und das Zellpellet anschließend in 10 ml DMEM gelöst und in einer T-75er Zellkulturflasche bei 37 °C inkubiert. Nach sechs Stunden wurde das Medium gewechselt, um Zelldebris abzutrennen.

3.2.2.3 Calcium-Phosphat-(CaPh)-Transfektion

Für Transfektionsexperimente wurde, wenn nicht explizit genannt, die Zelllinie 293T verwendet, die aus menschlichen Nieren stammt und durch adenovirale Gene transformiert ist. Diese Zellen verfügen außerdem über das SV40 T-Antigen, das die Amplifikation von Plasmiden ermöglicht, die den SV40 *origin of replication* enthalten, z.B. pCAGGS oder pcDNA3.

Für die Transfektion wurden 293T Zellen abgelöst, in der Neubauer-Zählkammer gezählt, die jeweils passende Anzahl in neuen Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten ausgesät und im Brutschrank inkubiert (15h, 37 °C). Am nächsten Tag wurden Expressionsplasmide durch chemische Transfektion in die Zellen eingebracht (s. Tabelle 27). Bei dieser Methode bildet die DNA mit zugesetztem Calciumchlorid und Phosphat-Puffer (HBS) ein Calcium-Phosphat-Präzipitat. Dieses setzt sich auf der Plasmamembran der Zellen ab und kann durch Endozytose in die Zellen gelangen (Strachan und Read 2005; Lottspeich und Engels 2009).

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz dienten Kontrolltransfektionen mit einem Plasmid, das für das grünfluoreszierende Protein (GFP) aus biolumineszierenden Quallen kodiert, welches nach Anregung durch UV-Licht sichtbares Licht einer Wellenlänge von 509 nm emittiert (Lottspeich und Engels 2009).

Tabelle 27: Versuchsschema einer Calcium-Phosphat-Transfektion. Die Reihenfolge der Einzelschritte ist von oben nach unten aufgeführt.

Calcium-Phosphat-Transfektion		
Nacheinander in ein Eppendorf-Gefäß	Plasmid DNA	Gewünschte Menge
	ddH ₂ O	Auf 40% des Gesamtvolumen
	CaCl ₂	10% des Gesamtvolumen
	HBS (pH 7,11)	50% des Gesamtvolumen
Bis zu 5 Minuten warten		
Mischen		
Auf die Zellen geben		
Nach 6-20 Stunden Medienwechsel		

3.2.2.4 Lipofektion

Bei Zelllinien, die sich mit der CaPh-Methode nicht effizient transfizieren lassen, können andere chemische Verfahren, wie die Lipofektion, angewendet werden. Hierbei wird die DNA mit Lipidvesikeln gemischt und es bilden sich DNA-Lipid-Komplexe. Diese werden von Zellen durch Endozytose aufgenommen, was im Endeffekt die Expression eines Transgens ermöglicht (Strachan und Read 2005).

Für die Transfektion der BHK Zellen wurde auf Grund der reduzierten Effizienz der CaPh-Methode Lipofectamin (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers genutzt.

3.2.2.5 Immunoblotting

Das Immunoblotting ist eine Methode, bei der Proteine aus Lysaten durch Gelelektrophorese aufgetrennt, dann im Western-Blotting-Verfahren auf Membranen fixiert und schlussendlich mit Antikörpern sichtbar gemacht werden.

3.2.2.5.1 SDS-PAGE

Für die Analyse von Expression und Schnittmuster der viralen Proteine wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli genutzt.

Hierfür wurden die Zellen nach einmaligem Waschen in 1ml PBS gelöst und durch Zentrifugation (5 min, 4000 upm) abgetrennt. Das Sediment wurde in 2x SDS-Probenpuffer (SDS-LD) gelöst und aufgeköcht (10-15 min, 95 °C). Durch die thermische Energie und die Disulfid-Bindungen-reduzierende Wirkung des β -Mercaptoethanol im Probenpuffer werden Tertiär- und Quartärstrukturen aufgelöst. Das SDS im Puffer bewirkt als anionisches Detergens eine gleichmäßige, zur Proteinmasse äquivalente negative Ladung der Probe, sodass die Laufgeschwindigkeit im Gel ausschließlich von der Proteinmasse abhängt. Glykosylierte Proteine laufen aufgrund einer geringeren Beladung mit SDS langsamer als nicht glykosylierte Proteine gleicher Größe (s. Lottspeich und Engels 2009).

Die gelösten Proben wurden durch diskontinuierliche Gelelektrophorese separiert. Nach der Vorbereitung der im Materialteil beschriebenen Zusammensetzung erfolgte die Polymerisation der Gele durch Zugabe der Radikalbildner Ammoniumpersulfat (APS, 10%) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED). Das Sammelgel mit 5% Acrylamid dient der Zonenschärfung und im Trenngel mit 10% Acrylamid werden die Proteine aufgetrennt (Corley 2005; Lottspeich und Engels 2009). Die Gelelektrophorese wurde gestoppt, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

3.2.2.5.2 Western Blot

Die Proteine wurden im Tankblotting-Verfahren elektrophoretisch vom Gel auf eine Membran aus Nitrozellulose übertragen (300 mA, 90 min). Durch das Anlegen eines vertikal zum Gel liegenden elektrischen Feldes bewegen sich die geladenen Proteine aus dem Gel durch die Membran in Richtung der Kathode. Durch Wechselwirkungen mit der Membranoberfläche werden die Proteine gebremst und verlieren das schneller wandernde SDS und damit auch dessen Ladung als Antriebskraft, sodass die Proteine auf der Nitrozellulosemembran verbleiben (s. Corley 2005; Lottspeich und Engels 2009).

Nach dem Transfer wurden die Membranen in 5% Milchpulver in PBS-Tween unter Rütteln geblockt (20 min, 20 °C), um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Anschließend inkubierten die Membranen für 60 min in 5 ml Primärantikörper der angegebenen Konzentration unter Drehen in einem 50 ml *falcon*-Röhrchen. Nach dreimaligem Waschen in PBS-Tween wurden die Membranen für eine weitere Stunde mit einem Sekundärantikörper gefärbt, an den das Enzym *horseradish-peroxidase* (HRP) gekoppelt ist. Nach erneutem Waschen wurden die Antikörper unter einem Chemielumineszenz-Detektor (Western-Blot-Imager) durch Zugabe der Entwicklungslösung sichtbar gemacht. Diese bestand pro Membran aus 1 ml der Solution A (s. Materialteil), 100 μ l der Solution B und 1,5 μ l Wasserstoffperoxid (3%). Die *horseradish-peroxidase* katalysiert die Oxidierung des Luminols in der Entwicklerlösung, was zu

einer Lichtemission einer Wellenlänge von 425 nm führt, die mit der CCD-Kamera des Imagers detektiert werden kann (Alegria-Schaffer et al. 2009).

Für die nachfolgende Färbung mit einem weiteren Antikörper wurden die Membranen durch Stripping entfärbt. Hierfür wurden diese im Stripping-Puffer inkubiert (30-60 min, 50 °C) und anschließend unter mehrmaligem Pufferwechsel mit PBS-Tween gewaschen (1-12 h). Danach wurden die Membranen wie oben beschrieben neu eingefärbt.

3.2.3 Versuche zur Untersuchung der Spike-Mutanten

Die bisher beschriebenen allgemeinen Methoden dienten vor allem der Generierung, Präparation und Expression von Plasmiden für die folgenden Experimente. In diesen wurden die *cis*- und *trans*-Spaltung, die Glykosylierung, die Lokalisation, die Zell-Zellfusion und die Virus-Zellfusion untersucht.

3.2.3.1 *cis*-Spaltung

Bei der Expression viraler Glykoproteine in infizierten Zellen werden diese durch Wirtszellproteasen prozessiert. Die Prozessierung durch Proteasen in der Glykoprotein-exprimierenden Zelle lässt sich mithilfe der in Abbildung 5 dargestellten *cis*-Spaltung simulieren.

Für die Analyse der *cis*-Spaltung wurden im 6-Well-Format 300.000 293T Zellen/Well ausgesät. Nach 24 h wurden diese mit der Calcium-Phosphat-Methode mit 2 µg des S-Glykoprotein kodierenden Plasmids und unterschiedlichen Mengen an Expressionsvektor für humanes TMPRSS2 transfiziert. Nach 15 h erfolgte ein Medienwechsel und 40 h nach der Transfektion wurden die Zellen nach Waschen mit PBS in 1 ml PBS gelöst, zentrifugiert (1200 upm, 5 min) und das Zellsediment in 200 µl 2x SDS-LD gelöst. Nach Aufkochen (10-15 min, 95 °C) wurden die Lysate im Immunoblot, wie oben beschrieben, aufgetrennt und mit Antikörpern gegen den V5-tag, SARS-S-Untereinheiten und β-Aktin als Ladekontrolle detektiert.

Für eine Kontrollspaltung wurde die Typ-S1-Serinprotease Trypsin verwendet (Antalis et al. 2011). Hierbei wurde vor der Zellernte das Medium abgesaugt und durch PBS mit 10 µM bovinem TPCK-Trypsin ersetzt. Nach Inkubation (5-10 min, 37 °C) wurde das Trypsin durch PBS mit derselben Konzentration an Trypsin-Inhibitor ersetzt. Anschließend wurden die Zellen entsprechend den anderen Proben prozessiert.

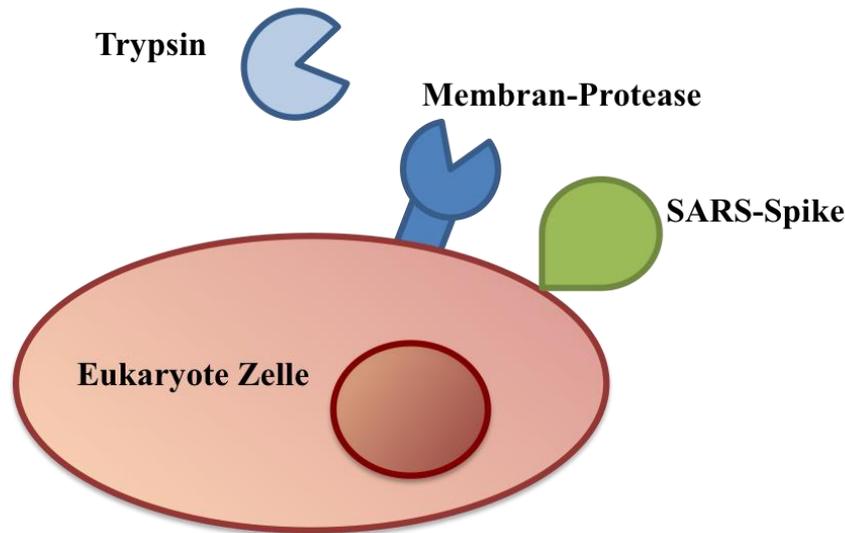


Abbildung 5: Schema der cis-Spaltung. Protease und Glykoprotein werden auf derselben Zelle exprimiert. Für eine Kontrollspaltung wird die Protease Trypsin dem Medium zugefügt.

3.2.3.2 PNGase F-Behandlung

Das Enzym PNGase F aus dem *Flavobacterium meningosepticum* spaltet N-glykosylierte Zuckerketten direkt am Ankermolekül Asparagin ab und ändert dieses dabei zu Asparaginsäure (Lottspeich und Engels 2009). Da SARS-S ein Protein mit 23 potentiellen N-Glykosylierungsstellen ist (Krokhin et al. 2003), wurde deren Einfluss auf die Größe der Schnittfragmente untersucht. Hierfür wurden SARS-S und/oder TMPRSS2 in 293T-Zellen wie bei der *cis*-Spaltung beschrieben mit einem Expressionsplasmid für das Wildtyp Glykoprotein transfiziert und ein Teil der Zellen nach 48 h als Kontrolle mit der Protease Trypsin inkubiert. Nach der Ernte in PBS wurden 100 µl der Zellsuspension mit dem Enzym PNGase F nach Angaben des Herstellers behandelt und die Fragmente im Immunoblot mit dem anti-V5-Antikörper und β -Aktin als Ladekontrolle detektiert.

3.2.3.3 *trans*-Spaltung

Neben der *cis*-Spaltung, bei der Protease und Glykoprotein in derselben Zelle exprimiert werden, gibt es auch die Möglichkeit der *trans*-Spaltung. Hierbei befinden sich Oberflächenprotein und Protease auf zwei unterschiedlichen, benachbarten Zellpopulationen. (Glowacka et al. 2011, Abbildung 6). Die oben beschriebene *cis*-Spaltung gleicht eher der Situation, dass Viruspartikel in infizierten Zellen produziert werden. Die *trans*-Spaltung wiederum spiegelt die Situation während der Infektion wider, in der in einer infizierten Zellen neu synthetisierte und auf der Zelloberfläche exponierte S-Proteine mit Proteasen auf benachbarten, nicht-infizierten Zellen interagieren können. Die verwendeten 293T-Zellen exprimieren endogen den humanen SARS-CoV Rezeptor (hACE2) und so ist es nicht auszuschließen, dass es unter *trans*-Bedingungen zur Bildung von Synzytien kommt. Deshalb wurden für die *trans*-Spaltung zusätzlich

Baby-Hamster-Nierenzellen (BHK-Zellen) verwendet, die durch den nicht humanen Ursprung andere ACE2-Rezeptoren tragen und somit ohne exogene Expression des Rezeptors kaum Synzytien bilden können (Li et al 2011).

Die Zellen wurden in 6-Wells mit 260.000 Zellen/Well ausgesät und nach 24h mit einem kommerziellen Kit entsprechend der Angaben des Herstellers mit Lipofectamin (BHKs) oder Calcium-Phosphat (293Ts) transfiziert. Es wurden drei Zellpopulationen mit je 2 µg SARS-S-V5 Expressionsplasmid, 1 µg TMPRSS2-Vektor oder der gleichen Menge Leerplasmid (pCAGGS) transfiziert. Nach 15 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in 1 ml frischem Medium gelöst und von jeder Zellpopulation 500 µl mit 500 µl aus den anderen in den drei möglichen Kombinationen gemischt. Diese Zellen wurden nun für weitere 24 h kultiviert und anschließend geerntet. Die Lysate wurden, wie in 3.2.2.5 beschrieben, im Western-Blot auf ihr Spaltmuster hin untersucht.

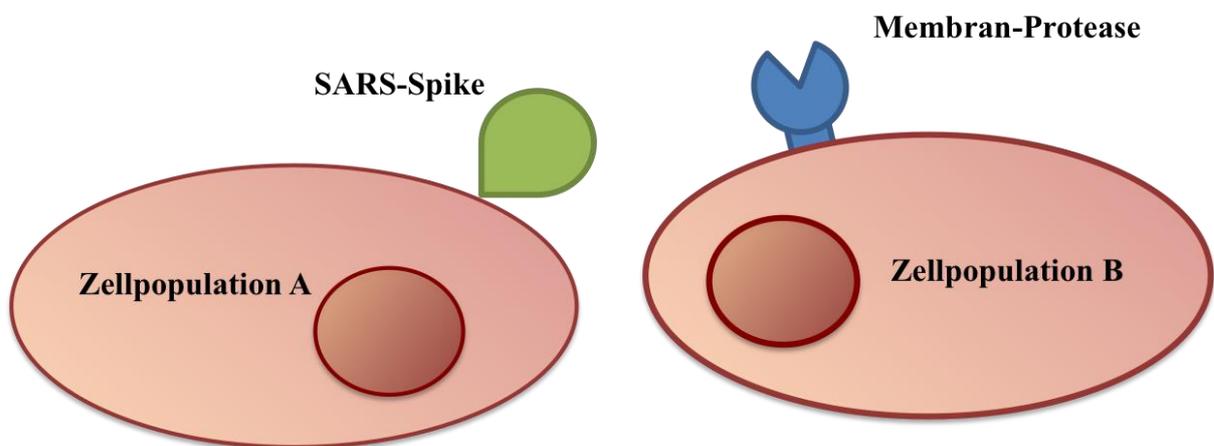


Abbildung 6: Schema der trans-Spaltung. Glykoprotein und Protease werden auf zwei unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert, die anschließend gemeinsam inkubiert werden.

3.2.3.4 Konfokalmikroskopie

Die Lokalisation der einzelnen S-Mutanten hat einen großen Einfluss auf die Funktion und die Erreichbarkeit durch Proteasen. Diese wurde anhand von fluoreszenz-gefärbten Präparaten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) analysiert. Hierbei wird Laserlicht durch ein Objektiv in einem Punkt auf der Probe fokussiert, wo es fluoreszierende Farbstoffe anregen kann. Durch einen Spiegel, der nur Licht einer bestimmten Wellenlänge reflektiert, teilt sich der emittierte vom anregenden Strahl und wird, nachdem er durch eine Lochblende fokussiert wurde, von einem Photomultiplier detektiert. Durch dieses Prinzip lassen sich andere Fokusebenen der Probe unterdrücken und nach Scannen der gesamten Ebene sehr genaue Bilder erstellen (Lottspeich und Engels 2009) .

Für diese Versuche wurde wegen der im Gegensatz zu 293T-Zellen stärkeren Oberflächenhaftung auf Deckgläschen und des größeren Zytoplasmas die Nierenzelllinie Cos7 genutzt.

Zur Färbung der Zellen wurde der Carbocyanin-Farbstoff 2-[3-(1,3-dihydro-3,3-dimethyl-1-octadecyl-2H-indol-2-yliden)-1-propenyl]-3,3-dimethyl-1-octadecyl-perchlorat (DiI) genutzt, dessen lipophiler Anteil sich in Plasmamembranen einbaut, ohne deren biologische Eigenschaften zu beeinflussen. Die

aromatischen Funktionsgruppen dieses Farbstoffes absorbieren Licht der Wellenlänge 549 nm und emittieren Licht der Wellenlänge 565 nm (Honig und Hume 1986; Molecular Probes 2011).

20.000-30.000 Zellen/Well wurden im 24-Well Format auf Deckgläschen ausgesät und nach 24 h mit der Calcium-Phosphat-Methode mit 1 µg der jeweiligen S-Expressionsplasmide oder eines Leervektors transfiziert. Nach 15 h erfolgte ein Medienwechsel. 40 h nach der Transfektion wurden die Zellen eingefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µl PBS erfolgte die Permeabilisierung der Membranen durch Inkubation (10 min, RT) der Zellen in 200 µl 4% Paraformaldehyd (PFA), dreimaligem Waschen mit PBS und anschließend einer Inkubation in PBS mit 0,2% Triton X-100 (2 min, RT). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 200 µl Blocking-Puffer inkubiert (30 min, 37° C) und wiederum dreifach mit PBS gewaschen. Nach jedem weiteren Färbeschritt wurden die Zellen mehrfach mit 500 µl PBS unter sanftem Schütteln gewaschen. Nun wurden diese mit 150 µl des anti-V5-Primärantikörper (1:1000, in Blocking-Puffer) inkubiert (30 min, 37 °C) und anschließend mit 150 µl des Sekundärantikörpers Anti Maus Alexa Fluor 488 (1:1000, in Blocking-Puffer) gefärbt (30 min, 37 °C). Danach wurden die Zellmembranen mit Hilfe des DiI-Farbstoff nach Angaben des Herstellers eingefärbt und die Deckgläser mit der Oberseite nach unten durch 4 µl Moviol+DABCO auf Objektträgern fixiert und bei 4 °C für die Mikroskopie gelagert.

Bilder der Zellen wurden unter Laseranregung der Farbstoffe mit einem 63-fachen Objektiv angefertigt und mit der Distribution FIJI für ImageJ visualisiert. Es wurden jeweils zwischen 16 und 22 Bilder aus zwei unabhängigen Experimenten mit gut und deutlich eingefärbten Zellen jeder der verschiedenen SARS-S-Mutanten gescannt. Auf diese Weise sollte ein möglichst repräsentativer Querschnitt der verschiedenen Phänotypen abgebildet werden. Anschließend wurden die einzelnen Bilder auf die folgenden Kriterien hin untersucht, um einen objektiven Eindruck zu erlangen:

Zellmembran

- Ist das Glykoprotein bis zu den erwarteten oder durch die DiI-Färbung erkennbaren Zellgrenzen ausgebreitet? Ist hier eine Signalverdichtung erkennbar?

Golgi-Apparat

- Ist im Bereich um den Zellkern ein intensiveres Signal als im restlichen Zytoplasma zu finden? (Dieser Bereich wurde bei (Nal et al. 2005) als Golgi-Apparat definiert.)

Homogene Färbung

- Ist das Zytoplasma gleichmäßig eingefärbt oder sind freie Bereiche und intensiver eingefärbte Strukturen erkennbar?

Gitterfärbung

- Ist im Zytoplasma eine charakteristische Gitterfärbung erkennbar?

Zellkern nicht abzugrenzen

- Ist in der anti-V5-Färbung keine Aussparung für den Zellkern sichtbar oder dieser erst durch die zusätzliche DiI-Färbung erkennbar?

„Fäden“ an der Oberfläche

- Sind an der Zelloberfläche charakteristische fadenförmige, stark eingefärbte Membranausstülpungen erkennbar?

Für jedes diese Kriterien zeigt die Abbildung 7 Beispiele. Bezüglich dieser Aspekte wurden die Zellen begutachtet und der Zellanteil gezählt, der für einzelne Mutanten diese Kriterien erfüllte.

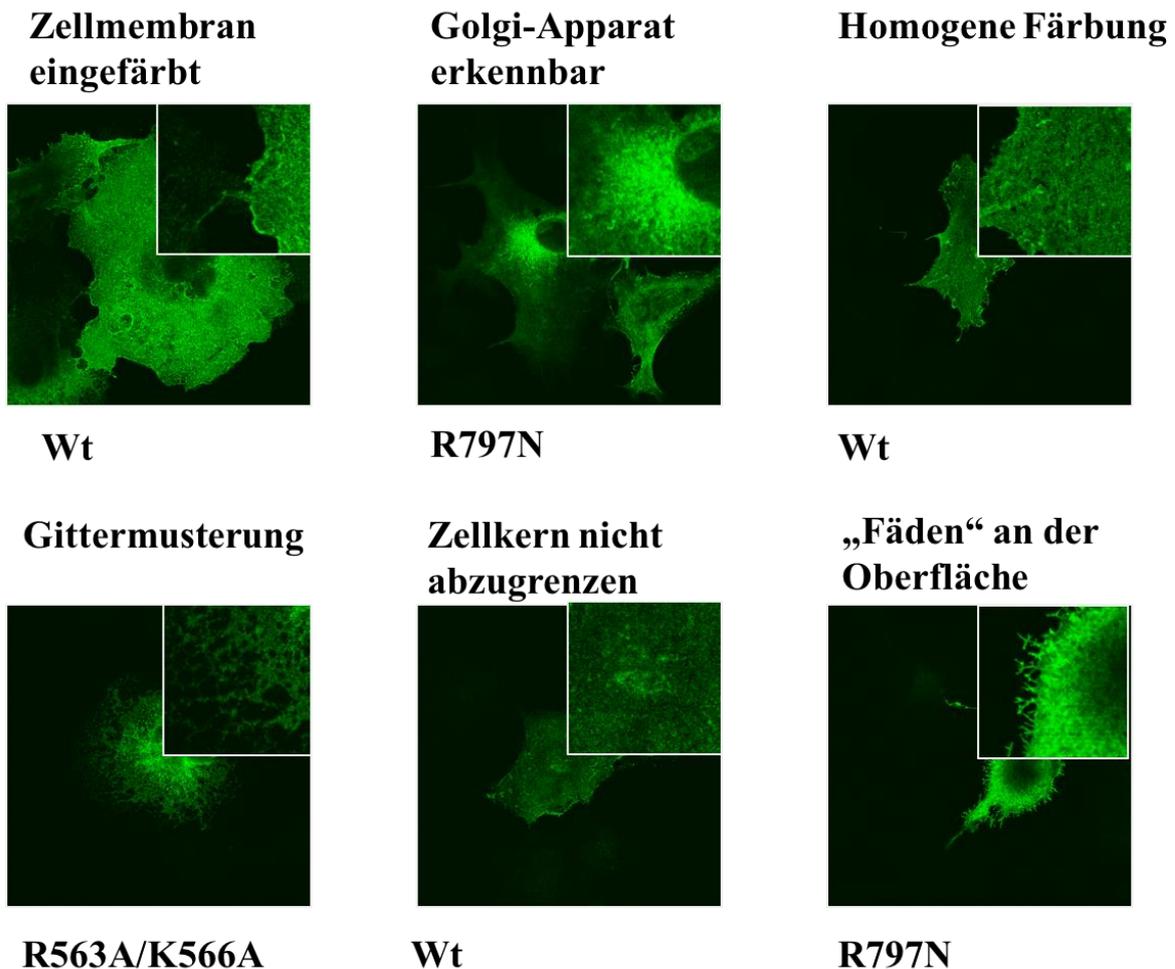


Abbildung 7: Kriterien für die quantitative Auswertung der Konfokal-Bilder mit anti-V5-eingefärbten Beispielbildern und einer dreifachen Vergrößerung der charakteristischen Details. Die Beschriftung unter den Bildern nennt das exprimierte Glykoprotein.

3.2.3.5 Zell-Zellfusionstest

Eine Infektion der Lunge mit dem SARS-CoV führt zur Bildung von Synzytien, mehrkernigen Zellkomplexen (Ksiazek et al. 2003; Kuiken et al. 2003). TMPRSS2 kann dies *in vitro* induzieren (Matsuyama et al. 2010). Der Zell-Zellfusionstest, wie er in Abbildung 8 gezeigt wird, bildet diesen Vorgang *in vitro* nach und wurde wie bei Bertram und Glowacka beschrieben durchgeführt (Bertram et al. 2011; Glowacka et al. 2011). Zur Quantifizierung diente, wie beim Virus-Zellfusionstest, die Luziferaseaktivität. Der Zellfusionstest beruht auf zwei definierten Zellpopulationen, den Effektor- und Zielzellen. Effektorzellen exprimieren das zu untersuchende virale Glykoprotein und stellen so die Virusmembran nach; die Zielzellen tragen einen spezifischen Rezeptor. Mischt man beide Zellpopulationen, kann das Glykoprotein einer Effektorzelle mit seinem Rezeptor auf der Zielzelle interagieren, und es kommt durch die Verschmelzung beider Zellmembranen zu einem Syncytium. Um dies zu quantifizieren, enthalten die Effektorzellen zusätzlich das pGAL4VP16-Plasmid, welches für ein Fusionsprotein aus der Bindedomäne des Transkriptionsfaktor GAL4 des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* und der Transaktivierungsdomäne des VP16-Proteins des Herpes Simplex Virus kodiert und zu einer Bildung des Transkriptionsfaktors in dieser Zellpopulation führt. In den Zielzellen befindet sich ein Plasmid mit einem Luziferase-Gen unter der Kontrolle von fünf gal4-Bindungsstellen. Kommt es zur Zellfusion, kann der Transkriptionsfaktor aus den Effektorzellen dort binden und so die Synthese von Luziferase induzieren, deren Aktivität anschließend, wie in 3.2.3.6 beschrieben, gemessen werden kann.

Für dieses Experiment wurden $1,2 \cdot 10^6$ /ml 293T Zellen pro Well als Effektorzellen in 6-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurde per Calcium-Phosphat-Transfektion entweder 3 µg des S-Expressionsvektors oder als Negativkontrolle die gleiche Menge des Leerplasmids pCAGGS gemeinsam mit 3 µg des pGAL4VP16-Plasmids in die Zellen eingebracht.

Die Zielzellen wurden parallel mit 40.000 293T-Zellen/Well in 48-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden bei 37 °C kultiviert. Diese wurden nun mit 0,2 µg pGal5-luc-Plasmid transfiziert. Außerdem wurde 1,8 µg des für hACE2 kodierenden Plasmids oder des Leerplasmids pcDNA3 als Negativkontrolle kotransfiziert. Zur Untersuchung der proteolytischen Aktivierung für die Zellfusion wurde in entsprechenden Ansätzen zudem 0,2 µg des TMPRSS2 Plasmids in diese Zellen eingebracht. Nach 8-20 h wurde das Medium gewechselt und je 100 ml der im Verhältnis 2:3 mit DMEM verdünnten Effektorzellen zugegeben. Bei einigen Ansätzen wurde eine Konzentration von 100 µM bovinem TPCK-Trypsin im Medium eingestellt. Bei diesen Proben fand nach 24 h erneut ein Mediumwechsel statt. 48 h nach der Fusion wurden alle Zellen in 100 µl Luziferase-Lysispuffer lysiert und anschließend mit einem kommerziellen Kit die Luziferaseaktivität gemessen.

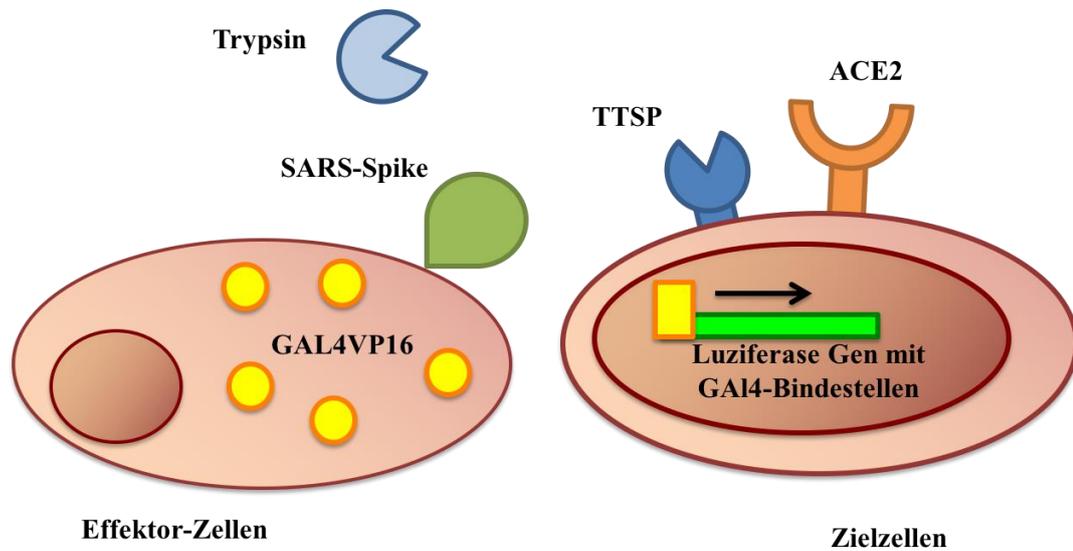


Abbildung 8: Schemazeichnung der Zell-Zellfusion. Effektorzellen, die das SARS-S Glykoprotein und den Transaktivator GAL4VP16 exprimieren, fusionieren mit Zielzellen, die hACE2 und/oder eine Protease tragen. Nach erfolgreicher Fusion induziert GAL4VP16 die Expression von Luziferase in den Synzytien. Als Kontrollprotease dient Trypsin.

3.2.3.6 Lentivirale Pseudotypisierung

Der Einfluss von Punktmutationen in SARS-S auf den Zelleintritt wurde mittels lentiviraler Pseudotypen untersucht. Das SARS-Coronavirus fällt aus gentechnischer Sicht in die biologische Sicherheitsstufe S3 und darf daher nur unter erhöhten Sicherheitsvorkehrungen in einem Speziallabor bearbeitet werden.

Ein wesentlich geringeres Sicherheitsrisiko stellen künstliche Viruspartikel dar, in denen das zu untersuchende Glykoprotein in der Membran eines heterologen Virus lokalisiert ist. Diese Viruspartikel, sogenannte Pseudotypen, können darüber hinaus die genetische Information für ein Reportergen wie Luziferase verpacken, die ihrerseits in der durch den Pseudotypen transduzierten Zielzelle exprimiert wird. Auf diese Weise ist eine Quantifizierung des Zelleintritts möglich. Hierfür wurde ein retrovirales System genutzt, das auf dem Oberflächenprotein des murinen Leukämie-Virus (MLV), MLV-Gag, beruht. MLV-Gag-Transfektion in Zellen bewirkt in die Bildung und Abschnürung von virus-ähnlichen Partikeln und die Inkorporation zugefügter viraler Oberflächenproteine in diese. Mit den gebildeten Pseudotypen können anschließend Zielzellen transduziert werden. Eine Schemazeichnung der Pseudotypen-Transduktion ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der *firefly*-Luziferase. Dies ist ein Enzym, das in der Natur in Glühwürmchen vorkommt und ATP-, Mg^{2+} - und O_2 -abhängig das Molekül Luziferin in Oxyluziferin umwandelt, wobei es zur Emission von Licht der Wellenlänge 562 nm kommt. Die Intensität des emittierten Lichts ist proportional zur Menge an produzierter Luziferase im Zellysate, die wiederum mit der Anzahl der fusionierten Pseudotypen korreliert (Lottspeich und Engels 2009). Als Positivkontrolle diente das Glykoprotein des vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV-G), dessen Rezeptor, der *Low Density Lipoprotein*-Rezeptor (LDL-R), auf vielen Zelltypen vorkommt und somit zu einem von anderen Faktoren unabhängigen Zelleintritt führt (Finkelshtein et al. 2013).

Für die Produktion der Pseudotypen wurden 1.000.000 293T Zellen/Flasche in T-25 Flaschen ausgesät und nach 24 h mit der Calcium-Phosphat-Methode mit 6 µg des MLV-*firefly*-Luziferase-Vektors, 3 µg des MLV-Gag-Plasmids und entweder 3 µg SARS-S Mutanten-kodierenden Plasmids, eines Leerplasmids oder des VSV-G Expressionsvektors transfiziert. Nach 15 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen anschließend für weitere 48 h kultiviert. Dann wurden die Überstände durch einen Filter mit der Porengröße 0,45 µm filtriert und bei -80 °C gelagert.

Für die anschließende Transduktion wurden 400.000 293T Zellen/Well als Zielzellen in 6-Well ausgesät und nach 15 h mit der Calcium-Phosphat-Methode mit entweder 1,8 µg hACE2-Vektor, einem Leerplasmid, oder 1,8 µg hACE2 plus 0,2 µg TMPRSS2-Plasmid transfiziert. Nach 6-8 h erfolgte ein Mediumwechsel und 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert, mit weiteren 2 ml frischem Medium verdünnt und je 50 µl der Zellsuspension im 96-Well Format ausgesät. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C jeweils in Triplikaten entweder mit 50 µl 50 µM MDL 28170, einem Cathepsin-B-Inhibitor, in Medium oder in der gleichen Konzentration des Lösungsmittels DMSO inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Zielzellen mit 50 µl der Pseudotypen transduziert. Nach 6 h wurden 150 µl Medium hinzugegeben und die Zellen für 60 h inkubiert. Nach Abnahme der Überstände wurden die Zellen für mindestens 20 min bei Raumtemperatur in 50 µl Lysis-Puffer lysiert und 30 µl des Lysats wurden mit einem kommerziellen Kit nach Angaben des Herstellers bezüglich der Luziferaseaktivität analysiert.

Die Inkorporation der Glykoproteine in die Pseudotypen wurde überprüft, indem je 120 µl der gelösten Pseudotypen durch 40 µl 20% Sucrose zentrifugiert (1-2 h, 12.000 upm, 4 °C) wurden. Das Pellet wurde anschließend in 20 µl 2x SDS-LD gelöst, im Western-Blot aufgetrennt und mit anti-V5 und anti-MLV Gag-Antikörpern eingefärbt.

Für die Trypsin-Präinkubation wurden die Pseudotypen mit 100 µg/ml bovinem TPCK-Trypsin präinkubiert (20 min, 20 °C) und anschließend dieselbe Menge an Trypsin-Inhibitor zugefügt. Die anschließende Transduktion wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt.

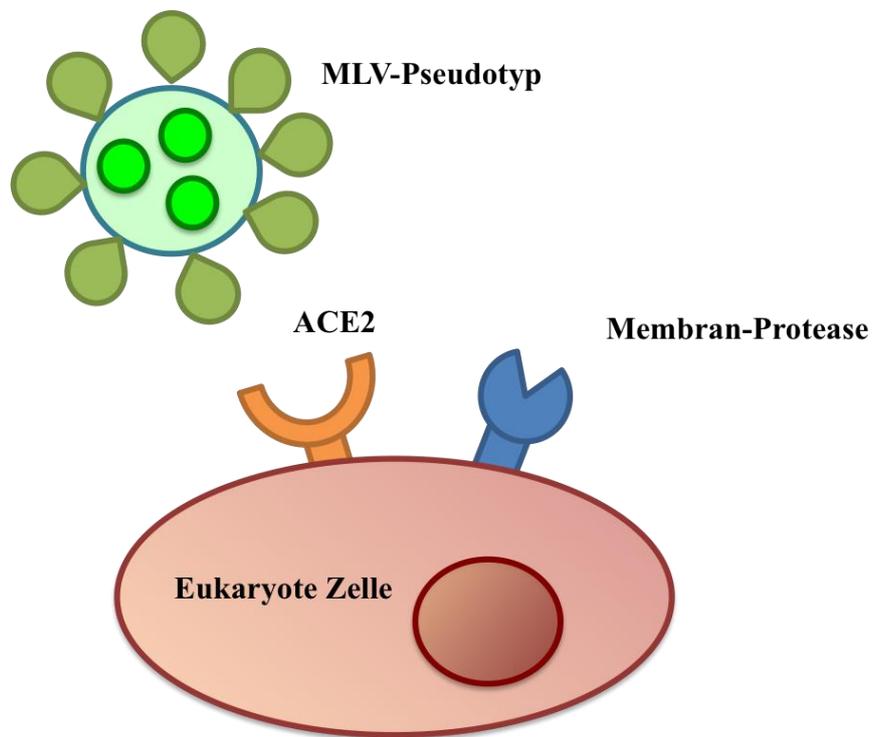


Abbildung 9: Schemazeichnung der Pseudotypen-Transduktion. Partikel, die SARS-S auf ihrer Oberfläche tragen und die genetische Information für *firefly*-Luziferase verpackt haben, werden mit Zielzellen inkubiert, die wahlweise hACE2 und/oder eine Membranprotease exprimieren.

4 Ergebnisse

Das Ziel dieses Projektes war es, durch Mutagenese Spaltstellen der Protease TMPRSS2 im SARS-S-Glykoprotein zu identifizieren und deren Bedeutung für die SARS-S-Funktion zu bestimmen. Im Ergebnisteil wird zunächst die Klonierung der SARS-S-Mutanten beschrieben und die Spaltungsanalysen werden vorgestellt. Schließlich werden die Ergebnisse beschrieben, die nach funktioneller Analyse jener SARS-S-Mutanten erhalten wurden, für die ein interessantes Spaltmuster beobachtet wurde.

4.1 Klonierung und Sequenzierung von SARS-S-Mutanten

Die Aussagekraft der im Rahmen vorangegangener, nicht veröffentlichter Studien durchgeführten Spaltungsanalysen von SARS-S Mutanten ohne antigenen *tag* wurde teilweise durch störende Hintergrundsignale limitiert, da die eingesetzten Antikörper Kreuzreaktivität mit zellulären Proteinen zeigten. Auch war die genaue Position der durch die Antikörper erkannten Epitope nicht bekannt, sodass die Lokalisation der Spaltfragmente im intakten S-Protein nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Aus diesen Gründen war der Einsatz eines Antikörpers mit bekanntem Epitop für eine erfolgreiche Spaltungsanalyse von SARS-S und SARS-S-Mutanten wichtig. Dieses Ziel lässt sich durch die Fusion des zu untersuchenden Proteins mit einem Epitop-*tag* erreichen, der mit hoher Spezifität von einem monoklonalen Antikörper erkannt wird (Uhlén et al. 1983; Uhlén 2008). Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe rekombinanter DNA-Techniken SARS-S-Sequenzen generiert, die für Proteine kodieren, die an ihrem C-terminalen Ende einen V5-*tag* tragen. Der V5-*tag* besteht aus 14 Aminosäuren und entstammt einem Epitop des Paramyxovirus *Simian Virus 5* (SV5) (Quelle: Anleitung V5 Epitope Tag Antibody Monoclonal (E10/V4RR) (MA5-15253)).

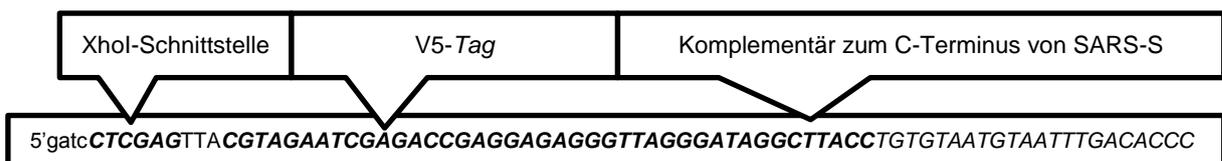


Abbildung 10: Aufbau des Oligonukleotids, welches für das Anfügen der V5-Sequenz an SARS-S mittels PCR verwendet wurde.

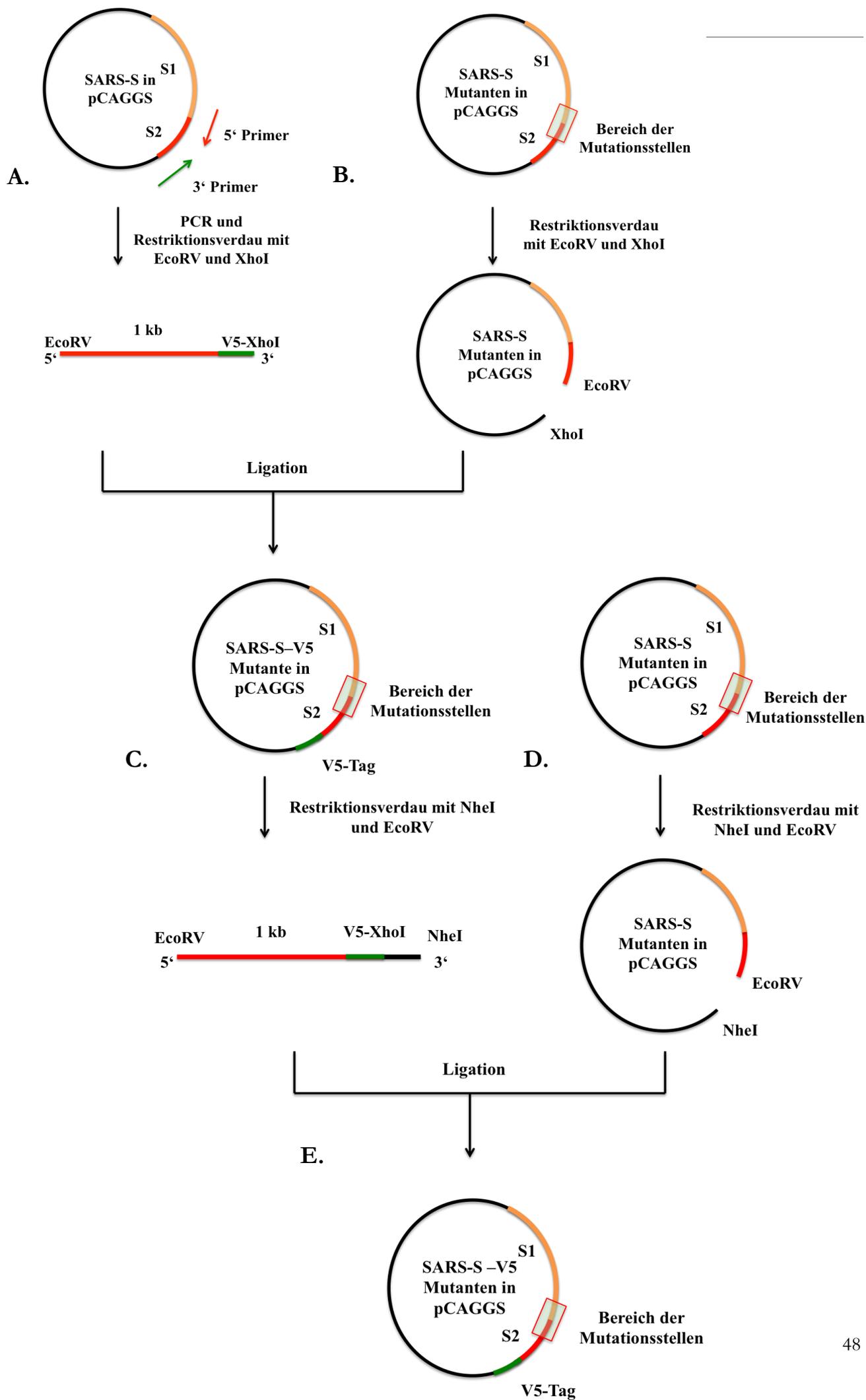
Eine Schemaübersicht über die Klonierung ist in Abbildung 11 zu sehen. Als erster Schritt wurde eine *Overlap-Extension-PCR* mit den Oligonukleotiden (*primern*) „SARS-S Sequencing #25“, als interner *primer* im SARS-S Leserahmen, und „p3-SARS-S V5 XhoI“ (s. Abbildung 10) als Verlängerung der Sequenz um die für den V5-*tag* kodierenden Nukleotide und eine XhoI-Restriktionsstelle zur weiteren Klonierung, durchgeführt (Abbildung 11; A). Das entstandene Fragment wurde über die Restriktionsenzyme XhoI, welches im Expressionsplasmid schneidet, und EcoRV, welches im SARS-S Leserahmen schneidet, in die bereits im pCAGGS-Plasmid vorhandenen SARS-S Mutanten eingefügt, denen jedoch die für den V5-*tag* kodierende Sequenz fehlte. Anschließend erfolgte eine Transformation in *E. coli* und eine klonale

Vermehrung der Bakterien auf LB_{Amp}-Platten (Abbildung 11; B. und C.). Die Kolonien wurden durch Kolonie-PCR mit einem *V5-primer* und einem *spike-internen primer* auf das Vorhandensein der *V5*-Sequenz hin überprüft. Bei positiven Klonen wurde eine Mini-Plasmid-DNA-Präparation durchgeführt und anschließend die Präsenz der Mutation durch Sequenzanalyse bestimmt. Ein *Alignment* mit dem Programm Contig-Express zeigte den Erfolg der Klonierung.

Nachdem durch die oben beschriebene Methode die Mutanten L665R und T760R in der gewünschten Form (die kodierende Sequenz für SARS-S und *V5-tag* im pCAGGS-Plasmid) vorlagen, wurden die übrigen SARS-S Mutanten durch Umklonieren in dieselbe Form gebracht (Abbildung 11 C.-E.). So konnte für diese auf eine PCR-Reaktion verzichtet werden. Für die Umklonierung wurden die Plasmide von Mutanten mit *V5-tag*, L665R und T760R, und solche ohne den *tag* mit den Restriktionsenzymen EcoRV und NheI behandelt. Hierdurch entstanden je ein 1000 bp-Fragment mit dem Übergang vom pCAGGS Plasmid zum Leserahmen von SARS-S, das bei den Mutanten L665R und T760R den *V5-tag* beinhaltete, und ein größeres Fragment, das die Mutationsstellen der anderen Mutanten enthielt.

Das 1000 bp-Fragment wurden nun als Insert in die Plasmide mit den Mutationsstellen ligiert, sodass jede Mutante in der gewünschten Form mit dem *V5-tag* vorlag, was durch eine *V5*-spezifische Kolonie-PCR überprüft wurde (Beispiel in Abbildung 12). Anschließend wurden die einzelnen Mutationsstellen sequenziert (s. Anhang). Hier zeigte sich bei der Mutante L665R eine Aminosäureänderung an H640, einer anderen Stelle als erwartet, sodass mit dieser Mutante keine weiteren Experimente durchgeführt wurden. Die übrigen SARS-S-Varianten waren an den gewünschten Stellen verändert und trugen keine unerwünschten Mutationen, die für Austausch in der Aminosäuresequenz kodierten. Die Mutanten wurden daher für funktionelle Analysen eingesetzt (siehe unten).

Abbildung 11: Klonierungsschema (Abbildung auf Folgeseite, mit dem Programm Powerpoint (Microsoft) visualisiert) Die Reihenfolge ist von oben nach unten zu sehen, die einzelnen Schritte sind mit Buchstaben gekennzeichnet (A.-E.). Plasmide sind kreisförmig, Inserts als Striche abgebildet. Alle für die Klonierung wichtigen Bereiche sind farblich hervorgehoben und beschriftet.



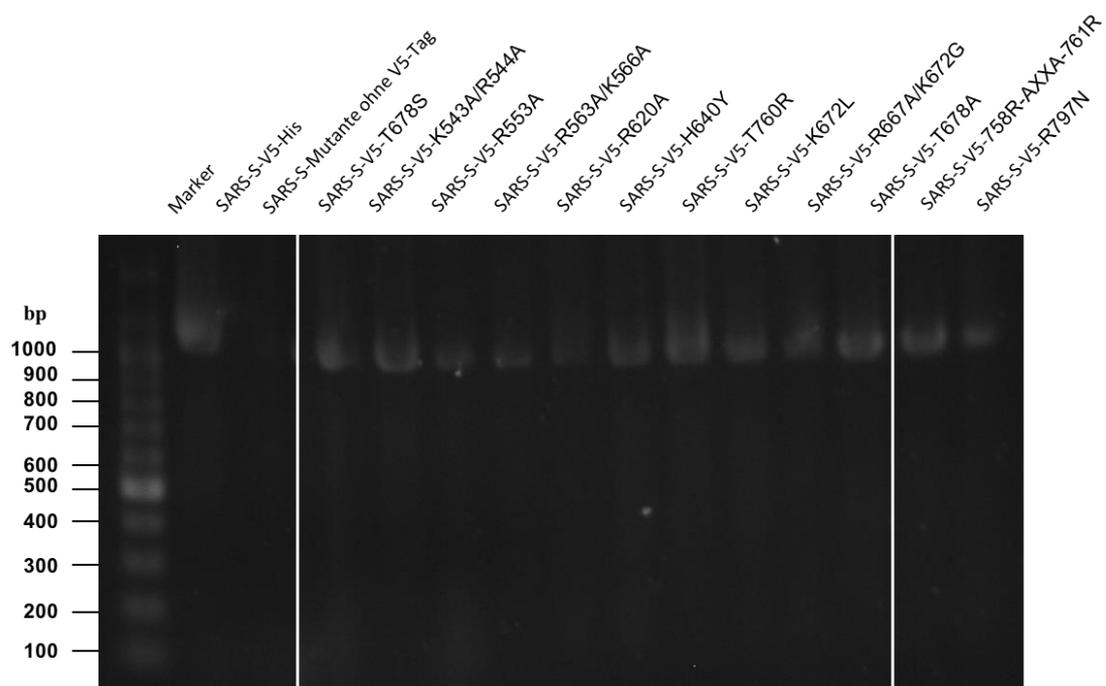


Abbildung 12: Beispiel einer Kolonie-PCR der Mutanten mit einem V5-spezifischen *primer*. Das amplifizierte Fragment läuft bei 1000 bp. Die Positivkontrolle zeigt dieses Fragment leicht höher laufend. Dies ist auf das Vorhandensein von zusätzlichen, für einen His-*tag* kodierenden Basen zurückzuführen.

4.2 Analyse der TMPRSS2-abhängigen Spaltung des SARS-S-Proteins

4.2.1 Etablierung der Bedingungen

Für die Analyse der Spaltung der SARS-S-Mutanten durch TMPRSS2 wurden zunächst Bedingungen etabliert, die den deutlichen Nachweis der Spaltung von SARS-S-Wildtyp erlaubten. Dazu wurden Antikörper gegen die SARS-S-Untereinheiten S1 und S2 mit dem Antikörper gegen den V5-tag im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität verglichen.

Es wurden 10 ng Plasmid für die Expression von TMPRSS2 zusammen mit 2 µg SARS-S-Expressionsplasmid in 293T-Zellen transfiziert und die SARS-S-Expression in Zellysaten im Immunoblot analysiert (Abbildung 13; A.). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit leerem Plasmid transfiziert (Mock) bzw. mit leerem Plasmid und SARS-S-V5-Expressionsplasmid kotransfiziert wurden. Als Positivkontrolle für die SARS-S-Spaltung wurden die intakten Zellen mit Trypsin inkubiert, das nach Matsuyama et al. 2005 SARS-S in ein 100 kDa C-terminales Fragment spaltet. Die SARS-S-Expression wurde mit Hilfe eines V5-spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Zusätzlich wurde ein Serum für den Nachweis von SARS-S verwendet, das durch Immunisierung von Kaninchen mit der Oberflächeneinheit S1 von SARS-S gewonnen wurde (Glowacka et al. 2011). Außerdem wurde ein kommerzieller Antikörper für die Detektion der S2-Untereinheit eingesetzt. Nach Detektion mit SARS-S-spezifischen Antikörpern wurden auch in der Negativkontrolle Signale beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde bei Detektion mit dem anti-V5-Antikörper ausschließlich Signale in Lysaten von SARS-S-transfizierten Zellen detektiert. Der Einsatz des anti-V5-Antikörpers erlaubt also einen spezifischeren Nachweis von SARS-S als die Antikörper gegen die SARS-S-Untereinheiten.

4.2.1.1 SARS-S Spaltung durch Trypsin und TMPRSS2

Die Analyse der Spaltmuster von Zellen, die weder mit Trypsin behandelt wurden noch TMPRSS2 exprimierten, ergab folgenden Befund: In Zellen, die nur mit dem SARS-S-Expressionsplasmid transfiziert wurden, konnten zwei prominente Banden mit einem Molekulargewicht von 170 kDa und 180 kDa nachgewiesen werden. Dieses Signal wurde unabhängig vom eingesetzten Antikörper detektiert und entspricht dem Molekulargewicht, das für ungespaltenes SARS-S erwartet wird (Hofmann 2004a). Zusätzlich wurden in den Zellen schwache Banden von 110 kDa (bei Nachweis mit S1-spezifischem Serum) bzw. 100 kDa (bei Nachweis mit anti-V5-Antikörper) detektiert, die der Oberflächeneinheit S1 und der Transmembraneinheit S2 entsprechen. Dies zeigt, dass SARS-S in 293T-Zellen bereits ineffizient gespalten wird, wenn keine Protease koexprimiert wird. Diese Beobachtung deckt sich mit publizierten Arbeiten (Simmons et al. 2004).

Nach Trypsin-Behandlung oder TMPRSS2-Expression wurde Folgendes beobachtet (Abbildung 13; A.): Nach Behandlung der intakten Zellen mit Trypsin verloren die 170/180 kDa-Banden an Intensität und bei Nachweis mit S1-spezifischem Serum wurde ein deutliches Signal bei 110 kDa detektiert, das der S1-Untereinheit entspricht. Bei Nachweis mit dem S2-spezifischen Antikörper wurden Fragmente von 115 kDa und 100 kDa beobachtet. Das 100 kDa-Signal wurde für die S2-Untereinheit erwartet, der Ursprung des 115 kDa-Fragments ist unklar. Nach Detektion mit dem anti-V5-Antikörper wurde ausschließlich das

100 kDa-Signal beobachtet, das für die S2-Untereinheit erwartet wurde. Bei Koexpression von TMPRSS2 und Nachweis von SARS-S mit dem anti-V5-Antikörper wurden neben dem 100 kDa-Fragment auch ein 85 kDa-Fragment detektiert, das ein durch TMPRSS2 generiertes Spaltprodukt von SARS-S darstellt. Ein entsprechendes Fragment wurde dagegen bei Nachweis mit S1- und S2-spezifischen Antikörpern nur in Ansätzen detektiert, was für die höhere Sensitivität des anti-V5-Antikörpers spricht. Der Antikörper gegen das V5-Epitop ist daher geeignet um mit hoher Spezifität und Sensitivität das komplette SARS-S sowie C-terminale Spaltprodukte nachzuweisen.

4.2.1.2 Abhängigkeit des Spaltmusters von der Stärke der TMPRSS2-Expression

Der Einfluss der Expressionsstärke von TMPRSS2 auf die SARS-S-Spaltung war nicht bekannt und wurde untersucht. Dazu wurde eine Titration des TMPRSS2-Plasmids bei der Transfektion durchgeführt. Es wurden 2 µg SARS-S Plasmid mit 100 ng, 30 ng und 10 ng TMPRSS2-Plasmid in 293T-Zellen kotransfiziert und die Spaltfragmente im Immunoblot mit dem anti-V5-Antikörper analysiert (Abbildung 13; B).

In diesen Experimenten zeigten sich nach Transfektion von 100 ng TMPRSS2-Plasmid mehrere Signale bei 170 kDa, 110 kDa und 60 kDa, die sich von der Kontrolle ohne Protease unterschieden. Das Signal bei 180 kDa wurde bei Transfektion steigender Mengen an TMPRSS2-Plasmid schwächer. Die Expressionsstärke der übrigen SARS-S-Fragmente war ebenfalls abhängig von der Menge an kotransfiziertem TMPRSS2-Plasmid: Nach Transfektion von 10 ng TMPRSS2-Expressionsplasmid wurde hauptsächlich das Spaltprodukt mit einem Molekulargewicht von 85 kDa gebildet, während die Banden bei 110 kDa und 60 kDa verblassten. Da vermutlich unter physiologischen Konditionen nur geringe Mengen an TMPRSS2 exprimiert werden, konzentrierte sich die weitere Analyse der SARS-S-Mutanten auf dieses 85 kDa-Fragment.

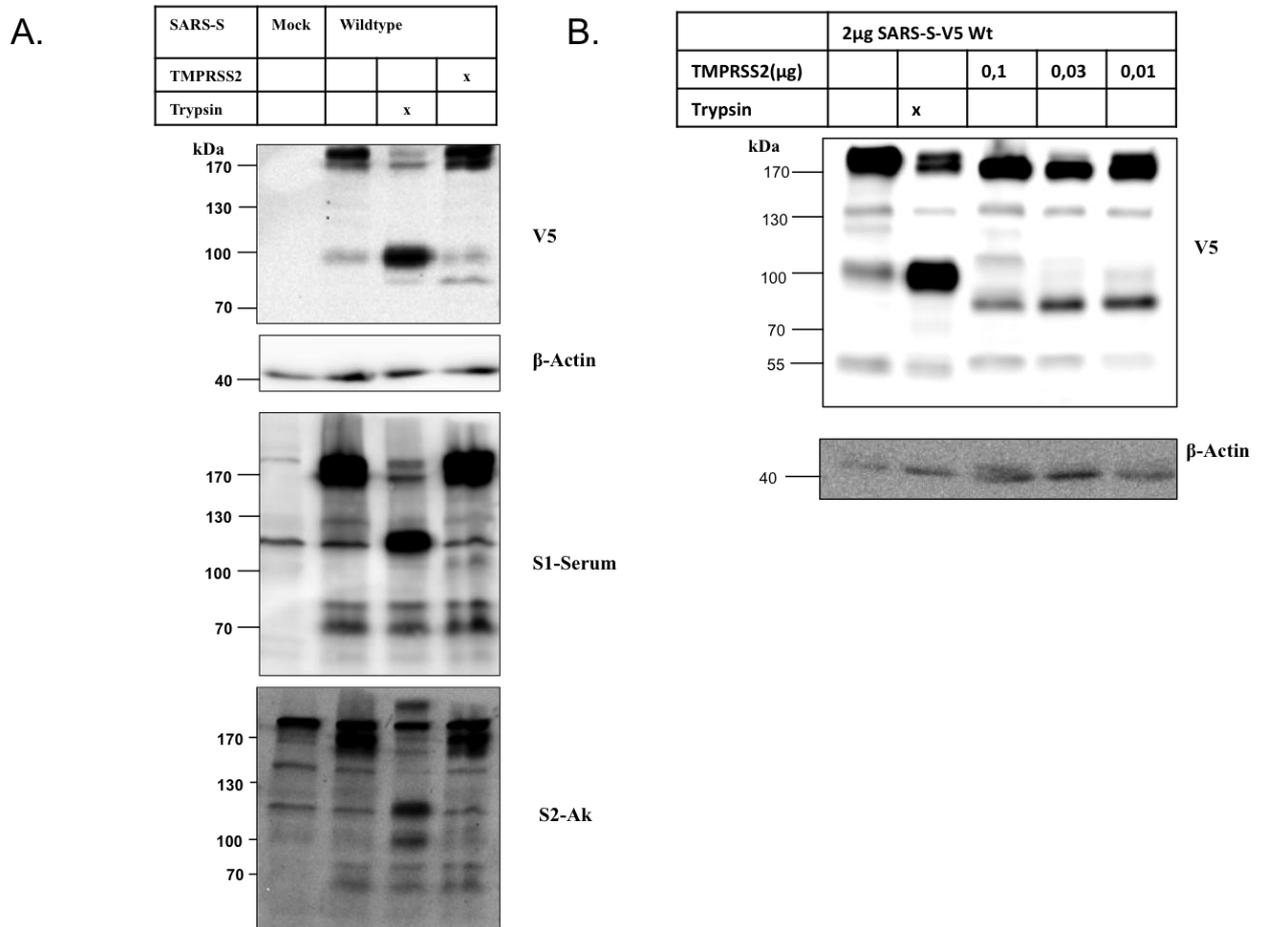


Abbildung 13: TMPRSS2 spaltet SARS-S (A): 293T Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für SARS-S-V5 (2 µg) TMPRSS2 (0,01 µg) und/oder Leerplasmid (pCAGGS, ad 2 µg) kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin (10 µM) oder PBS behandelt und lysiert. Die SARS-S-Expression in den Zelllysaten wurde mit Hilfe von Immunoblot unter Einsatz der in der Abbildung angegebenen Antikörper analysiert. **(B):** Das Experiment wurde wie für (A) beschrieben durchgeführt, allerdings wurden ansteigende Mengen an TMPRSS2-Expressionsplasmid kotransfiziert. Für die Detektion von SARS-S wurde der anti-V5-Antikörper eingesetzt. Gezeigt ist eines von zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

4.2.1.3 Einfluss der SARS-S-Glykosylierung auf die proteolytische Spaltung

Das SARS-S-Protein wird in Wirtszellen intensiv glykosyliert (Krokhin et al. 2003). Daher wurde untersucht, ob die prominente 85 kDa-Bande, die nach TMPRSS2-Spaltung beobachtet wurde, und die 100 kDa-Bande, die nach Trypsin-Behandlung auftrat, unterschiedliche SARS-S-Spaltprodukte repräsentieren oder auf identische Spaltfragmente zurückgehen, die sich in ihrem Glykanbesatz unterscheiden. Zur Klärung dieser Frage wurden die Lysate von SARS-S exprimierenden Zellen mit dem Enzym PNGase F behandelt, das alle N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten abtrennt, und die SARS-S-Expression mit dem anti-V5-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 14; A.). In unbehandelten Zellen

wurde, wie in vorangegangenen Experimenten, hauptsächlich eine Doppelbande von 170/180 kDa beobachtet (die auf ungespaltenes SARS-S zurückgeht) sowie eine schwache Bande bei 100 kDa, die durch Spaltung von SARS-S durch eine unbekannte zelluläre Protease mit derselben Spezifität wie Trypsin erklärt werden kann. Nach Behandlung mit Trypsin wurde, wie erwartet, zusätzlich zu ungespaltenem SARS-S eine 100 kDa-Bande detektiert, während nach Koexpression von TMPRSS2 eine 85 kDa-Bande auftrat. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen war nach PNGase F-Behandlung die Doppelbande bei 170/180 kDa nicht mehr nachweisbar. Stattdessen wurde in allen Zelllysaten ein einzelnes Signal bei ungefähr 140 kDa detektiert. Weiterhin wurde bei allen Proben nach PNGase F-Behandlung eine zweite Bande bei 70 kDa detektiert, unabhängig davon, welche SARS-S-Fragmente vor der Deglykosylierung vorhanden waren. Dieses Ergebnis wurde in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt und weist darauf hin, dass die 100 kDa (nach Trypsin-Behandlung) und 85 kDa (nach TMPRSS2-Spaltung) Bande dieselbe Aminosäuresequenz aufweisen, also nach proteolytischer Prozessierung von SARS-S an jeweils derselben Stelle entstehen, sich jedoch in ihrer N-Glykosylierung unterscheiden. Dieser Befund ist wichtig, da die Trypsin-Spaltstelle in SARS-S bekannt ist – Arginin 667 (Simmons et al. 2011) – aber man bis jetzt davon ausging, dass SARS-S durch TMPRSS2 an einer anderen Stelle gespalten wird (Bertram et al. 2011).

4.2.1.4 Vergleich der Spaltung in *cis* und in *trans*

Die meisten der bis dato beschriebenen Spaltungsanalysen wurden in *cis* durchgeführt, d.h. SARS-S und TMPRSS2 wurden in denselben Zellen exprimiert. Unter diesen Bedingungen sollte die SARS-S-Spaltung hauptsächlich durch TMPRSS2-Moleküle erfolgen, die in derselben Zelle wie SARS-S exprimiert werden. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Spaltprodukte detektiert werden, die auf Prozessierung von SARS-S durch TMPRSS2 auf der Oberfläche benachbarter Zellen zurückzuführen sind (man spricht von Spaltung in *trans*). Die *cis*-Konditionen bilden die Spaltung von SARS-S in produktiv infizierten Zellen ab, während die *trans*-Spaltung die Prozessierung von SARS-S während des viralen Eintritts in Zielzellen repräsentiert.

Zunächst wurde gefragt, ob die 85 kDa-Bande, die nach SARS-S-Spaltung durch TMPRSS2 in *cis* beobachtet wurde, auch nach Spaltung in *trans* entsteht. Dazu wurden zwei Zellpopulationen separat mit Expressionsplasmiden für SARS-S bzw. TMPRSS2 transfiziert. Anschließend wurden die Zellpopulationen kokultiviert und die Produktion von SARS-S Spaltprodukten untersucht. Diese Experimente wurden sowohl mit 293T als auch mit BHK-Zellen durchgeführt. BHK-Zellen sind für den SARS-S-getriebenen Eintritt nicht empfänglich. Es ist daher unwahrscheinlich, dass in diesen Zellen die mögliche Bindung von SARS-S an den zellulären Rezeptor ACE2 die Effizienz oder Spezifität der nachfolgenden Spaltung durch TMPRSS2 moduliert (Li et al. 2011).

Die Analyse der SARS-S-Spaltung in 293T-Zellen im *trans*-Format zeigte, dass nach Expression von TMPRSS2 ein Spaltprodukt von 85 kDa entsteht, das auch unter *cis*-Bedingungen beobachtet wurde (Abbildung 14; B.). Der analoge Versuch wurde mit BHK-Zellen durchgeführt (Abbildung 14; C.). In *cis*-Konditionen wurde dasselbe Bild wie mit 293T-Zellen beobachtet (Abbildung 14; C.), während unter *trans*-Bedingungen in BHK-Zellen kein Spaltprodukt beobachtet wurde. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das 85 kDa-Fragment nur nach einer Interaktion von SARS-S mit hACE2 gebildet wird. Alternativ könnte die Expressionsstärke von SARS-S und/oder TMPRSS2 in BHK-Zellen nicht ausgereicht haben, um *trans*-Spaltung nachzuweisen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Transfektion von 10 ng an TMPRSS2-Plasmid und Detektion der SARS-S-Fragmente mit dem anti-V5-Antikörper die besten Ergebnisse liefert. Nach *cis*- und *trans*-Spaltung von SARS-S durch TMPRSS2 wird ein 85 kDa-Fragment erzeugt, während die Spaltung durch Trypsin ein 100 kDa-Fragment generiert. Die Behandlung der Fragmente mit PNGase F zeigte jedoch, dass sich diese Fragmente lediglich in ihrem Glykanbesatz unterscheiden.

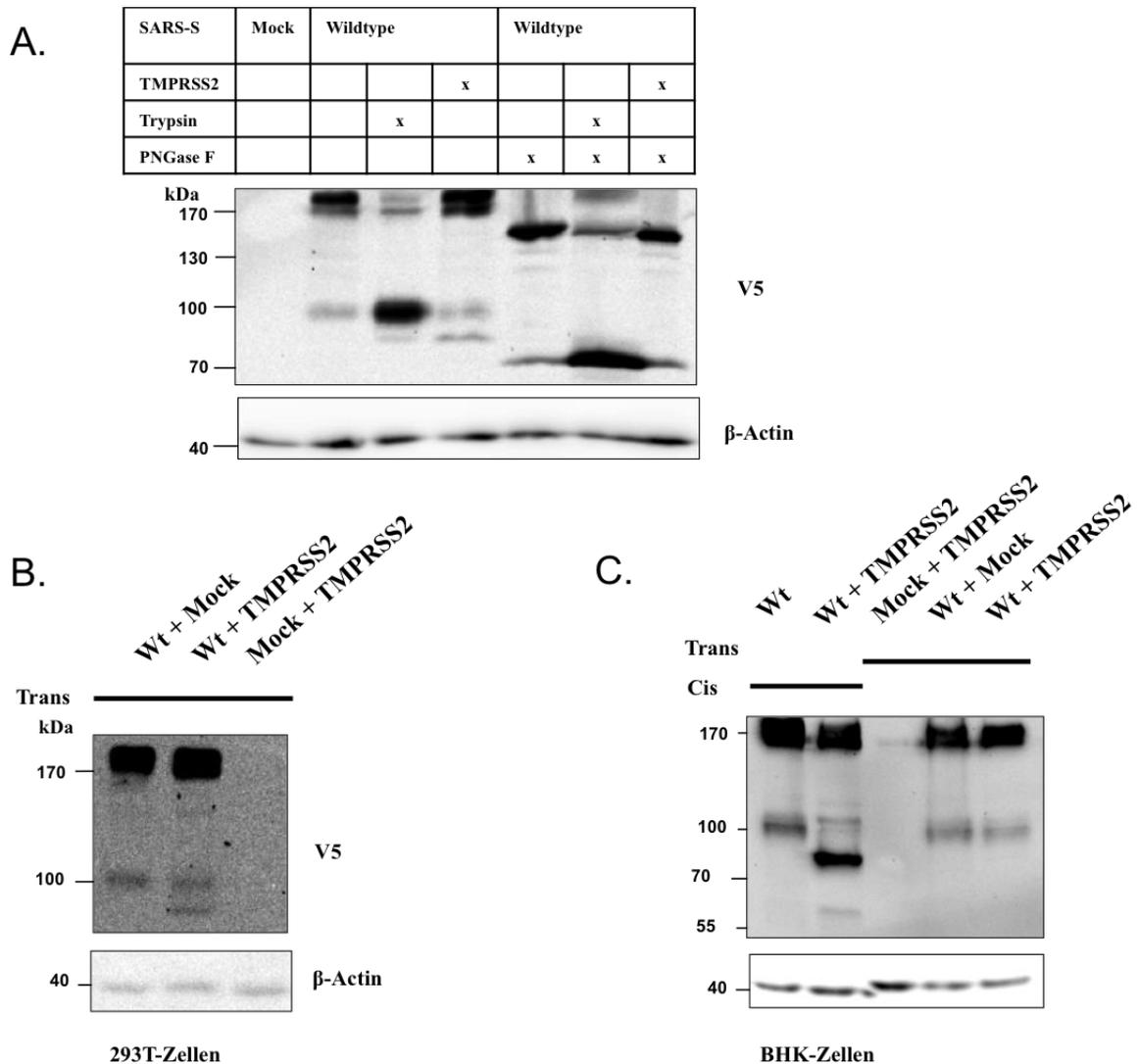


Abbildung 14: Analyse der Spaltfragmente. (A): Deglykosylierung hebt den Größenunterschied von Spaltfragmenten auf: transiente Kotransfektion von Expressionsplasmiden für SARS-S-V5 (2 μ g), TMPRSS2 (0,01 μ g) und/oder entsprechender Menge an Leerplasmid (pCAGGS). Behandlung mit Trypsin (10 μ M) oder PBS. Anschließend Behandlung mit PNGase F oder Parallelbehandlung ohne Enzym. Western-Blot Analyse der Spaltfragmente und Färbung mit anti-V5-Antikörper. (B): *Trans*-Spaltung in 293T-Zellen ergibt das 85 kDa-Fragment, transiente Kotransfektion unterschiedlicher Zellpopulationen mit SARS-S-V5 (2 μ g), pCAGGS-Leerplasmid (2 μ g) oder TMPRSS2-Plasmid (1 μ g). Nach 15 h Medienwechsel und Zellernte in Medium. Anschließend Mischen der Zellen 1:1, weitere 24 h Inkubation, dann Untersuchung der Lysate im WB mit angegebenen Antikörpern. (C): *Trans*-Spaltung in BHK-Zellen ergibt kein 85 kDa-Fragment, transiente Kotransfektion unterschiedlicher Zellpopulationen mit SARS-S-V5 (2 μ g), pCAGGS-Leerplasmid (2 μ g) oder TMPRSS2-Plasmid (1 μ g). Nach 15 h Medienwechsel und Zellernte in Medium. Anschließend Mischen der Zellen 1:1, weitere 24 h Inkubation, dann Untersuchung der Lysate im WB mit angegebenen Antikörpern; daneben *cis*-Spaltung: transiente Kotransfektion in von Expressionsplasmiden für SARS-S-V5 (2 μ g), TMPRSS2 (0,01 μ g) und/oder entsprechender Menge an Leerplasmid (pCAGGS). Western-Blot Analyse der Spaltfragmente und Färbung mit angegebenen Antikörpern.

4.3 Analyse von Spaltfragmenten der SARS-S-Mutanten im Immunoblot

Es ist davon auszugehen, dass die aktivierende Spaltung von SARS-S durch TMPRSS2 zwischen der Rezeptor-Binde-Domäne (RBD) und dem Fusionspeptid stattfindet und das Spaltmotiv basische Aminosäuren enthält. Daher wurden in diesem Bereich basische Aminosäuren durch PCR-basierte Mutagenese verändert. Die genauen Positionen sind in Abbildung 15 gekennzeichnet: Die Aminosäure R797 wurde als essentiell für Trypsin-vermittelte Zell-Zell- und Virus-Zellfusion identifiziert (Belouzard et al. 2009; Kam et al. 2009). Die Mutanten R758-AXXA-761R und T760R liegen an einem möglichen Furin-Motiv. T760R wurde bereits in (Simmons et al. 2011) beschrieben. T678A und T678S sind Mutationen einer möglichen Cathepsin L Spaltstelle (Bosch et al. 2008). Die Mutation R667A verhindert die Spaltung durch Trypsin (Simmons et al. 2011). In dieser Arbeit wurde auch die Mutante K672L als mögliche weitere Trypsin-Spaltstelle untersucht und als für Trypsin irrelevant beschrieben. Die Mutante L665R ist eine Verstärkung der multibasischen Spaltstelle am S1/S2-Übergang. Die N-terminalen Mutanten R620A, R563A/K566A, R554A und K543A/R544A sind Modifikationen, die von S. Gierer im Rahmen ihrer Promotionsarbeit hergestellt wurden.

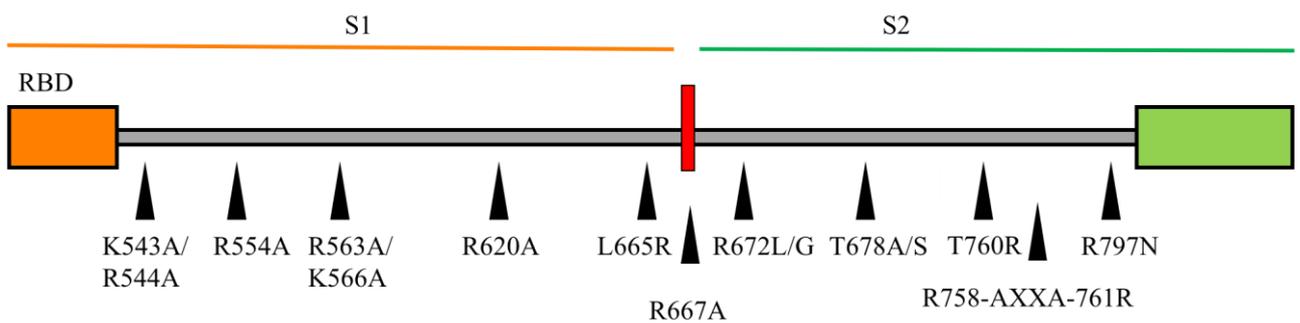


Abbildung 15: Mutationsstellen; Die Abbildung zeigt den Bereich zwischen Rezeptor-Binde-Domäne (orange) und Fusionspeptid (grün). Die jeweiligen Aminosäureaustausche sind angegeben und die Spaltstelle zwischen S1 und S2 (rot) markiert.

Um die Relevanz der mutierten Aminosäuren für die SARS-S-Spaltung zu untersuchen, wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden entweder alleine oder in Kombination mit dem TMPRSS2-Expressionsplasmid transfiziert und die Zellysate im Immunoblot analysiert. Als Kontrollen dienten die Spaltung durch Trypsin und die Analyse von SARS-S Wildtyp, die für jeden Blot mitgeführt wurden. Der Fokus der Analysen lag auf dem 85 kDa-Fragment, das im Rahmen dieser Arbeit (Abbildung 13; B.) als zentrales Spaltfragment identifiziert wurde.

Die Mutanten R553A, R620A, K672L, T678S, T678A, R758-AXXA-761R, T760R und R797N wiesen dasselbe Spaltmuster wie SARS-S-Wildtyp auf (Abbildungen 16-19). Es ist daher davon auszugehen, dass diese potentiellen Spaltstellen unter den gewählten Bedingungen für die TMPRSS2-Spaltung nicht relevant sind. Für die Doppelmutante K543A/R544A wurde eine stark abgeschwächte Expression der 180 kD-Bande detektiert. Nach Spaltung mit TMPRSS2 konnte eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte

Prozessierung zum 85 kDa-Fragment beobachtet werden. Die für Trypsin-Spaltung charakteristische 100 kDa-Bande konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 16; A.). Die Mutante scheint daher resistent gegenüber der Spaltung durch Trypsin zu sein. Die Mutation der Aminosäuren R563A/K566A unterdrückte die Spaltung durch Trypsin und TMPRSS2. Die Expressionsstärke des 180 kDa-Fragments war stark reduziert (Abbildung 16; C.).

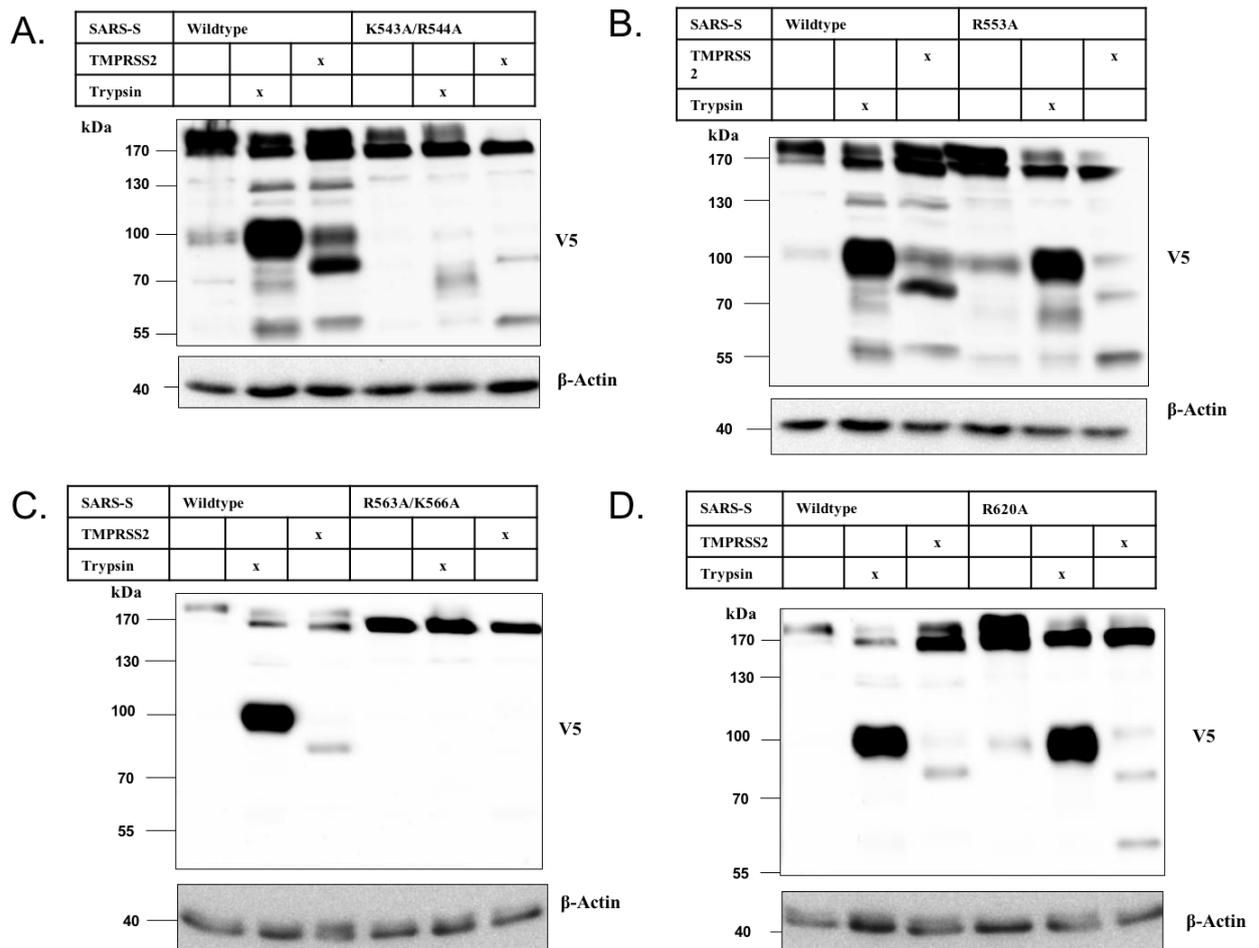


Abbildung 16: Cis-Spaltung von N-terminalen Aminosäuremutanten; transiente Kotransfektion der angegebenen Expressionsplasmide für SARS-S-V5 Wildtyp (2 µg) und Mutanten (2 µg), TMPRSS2 (0,01) oder der entsprechenden Menge an pCAGGS-Leerplasmid in 293T-Zellen. Behandlung mit TPCK-Trypsin (10 µM) oder PBS vor Lyse. Anschließend Western-Blot Analyse der Lysate und Färbung mit anti-V5-Antikörper (A-D).

An der Grenze zwischen S1- und S2-Fragment liegt die Trypsin-Schnittstelle (R667). In diesem Bereich wurden die Mutationen R667A, K672L und R667A/K672G eingeführt. Während K672L die SARS-S-Spaltung nicht beeinflusste (Abbildung 17; C.), veränderte die Mutation R667A das Spaltmuster (Abbildung 17; A.): Die Mutante war erwartungsgemäß resistent gegenüber der Spaltung durch Trypsin (Bertram et al. 2011), und TMPRSS2. Der letztgenannte Befund deckt sich nicht mit publizierten Daten

(Bertram et al. 2011). Auffällig war, dass der Spaltung mit TMPRSS2 die Intensität der 180 kDa-Bande abnahm, obwohl keine Prozessierung zum 85 kDa-Fragment beobachtet werden konnte. Die Doppelmutante R667A/K672G zeigte den gleichen Phänotyp wie R667A (Abbildung 17; B.).

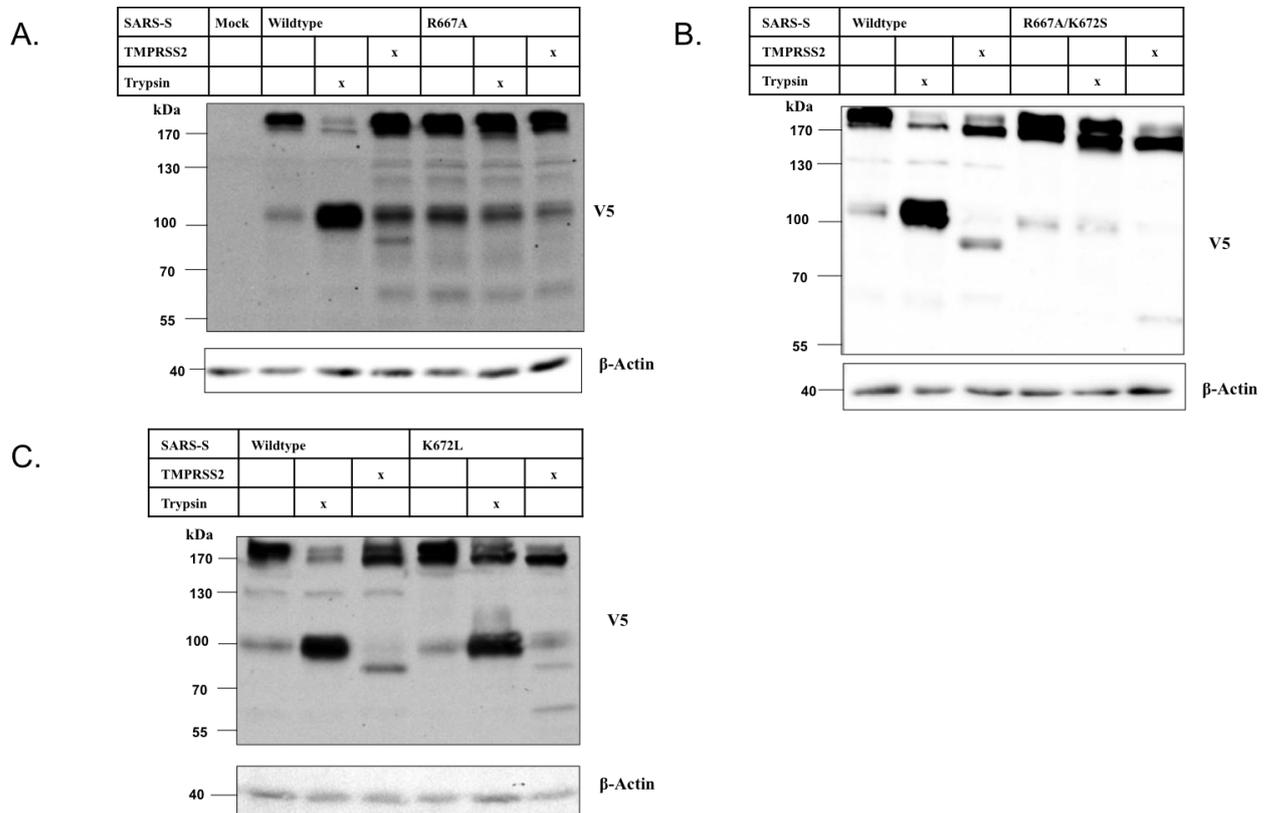


Abbildung 17: Cis-Spaltung der Aminosäuremutanten in der Nähe des S1/S2-Übergangs: transiente Kotransfektion der angegebenen Expressionsplasmiden für SARS-S-V5 Wildtyp (2 µg) und Mutanten (2 µg), TMPRSS2 (0,01) oder entsprechender Menge pCAGGS-Leerplasmid in 293T-Zellen. Behandlung mit TPCK-Trypsin (10 µM) oder PBS vor Lyse. Anschließend Western-Blot Analyse der Lyrate und Färbung mit anti-V5-Antikörper (A-C).

Die endosomale Cysteinprotease Cathepsin L aktiviert das SARS-Glykoprotein im Zuge des endosomalen Zelleintritts und es wurde postuliert, dass die Spaltung durch Cathepsin L an Threonin 678 erfolgt (Simmons et al. 2005; Bosch et al. 2008). Die Mutation dieser Aminosäure (Mutanten T678S und T678A) hatte jedoch keinen Einfluss auf die SARS-S-Spaltung durch TMPRSS2 und Trypsin (Abbildung 18; A. und B.).

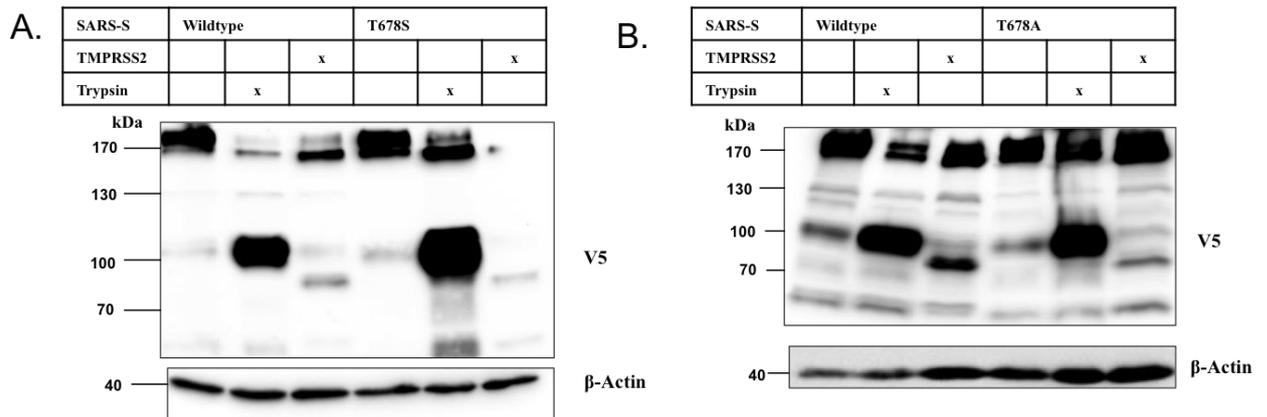


Abbildung 18 : Cis- Spaltung der Mutanten der Cathepsin-Schnittstelle; transiente Kotransfektion von angegebenen Expressionsplasmiden für SARS-S-V5 Wildtyp (2 μ g) und Mutanten (2 μ g), TMPRSS2 (0,01) oder entsprechender Menge pCAGGS-Leerplasmid in 293T-Zellen. Behandlung mit TPCK-Trypsin (10 μ M) oder PBS vor Lyse. Anschließend Western-Blot Analyse der Lysate und Färbung mit anti-V5-Antikörper (A-B).

Auch die Mutation einer möglichen Furinschnittstelle (Mutante R758-AXXA-761R und T760R) modulierte nicht die SARS-S-Spaltung durch Trypsin und TMPRSS2 (Abbildung 19; A. und B.). R797 ist wichtig für die SARS-S-Aktivierung durch Trypsin (Belouzard et al. 2009). Die Mutation R797N hatte jedoch keinen Einfluss auf die Prozessierung von SARS-S durch TMPRSS2 und Trypsin (Abbildung 19; C.). Zusammenfassend beeinflussten die Mutationen R543A/K544A, K563A/R566A, R667A und R667A/K672G die SARS-S-Spaltung durch Trypsin und/oder TMPRSS2. Diese SARS-S-Mutanten sowie die Mutanten R797N, T678A und T678S wurden daher weiter untersucht.

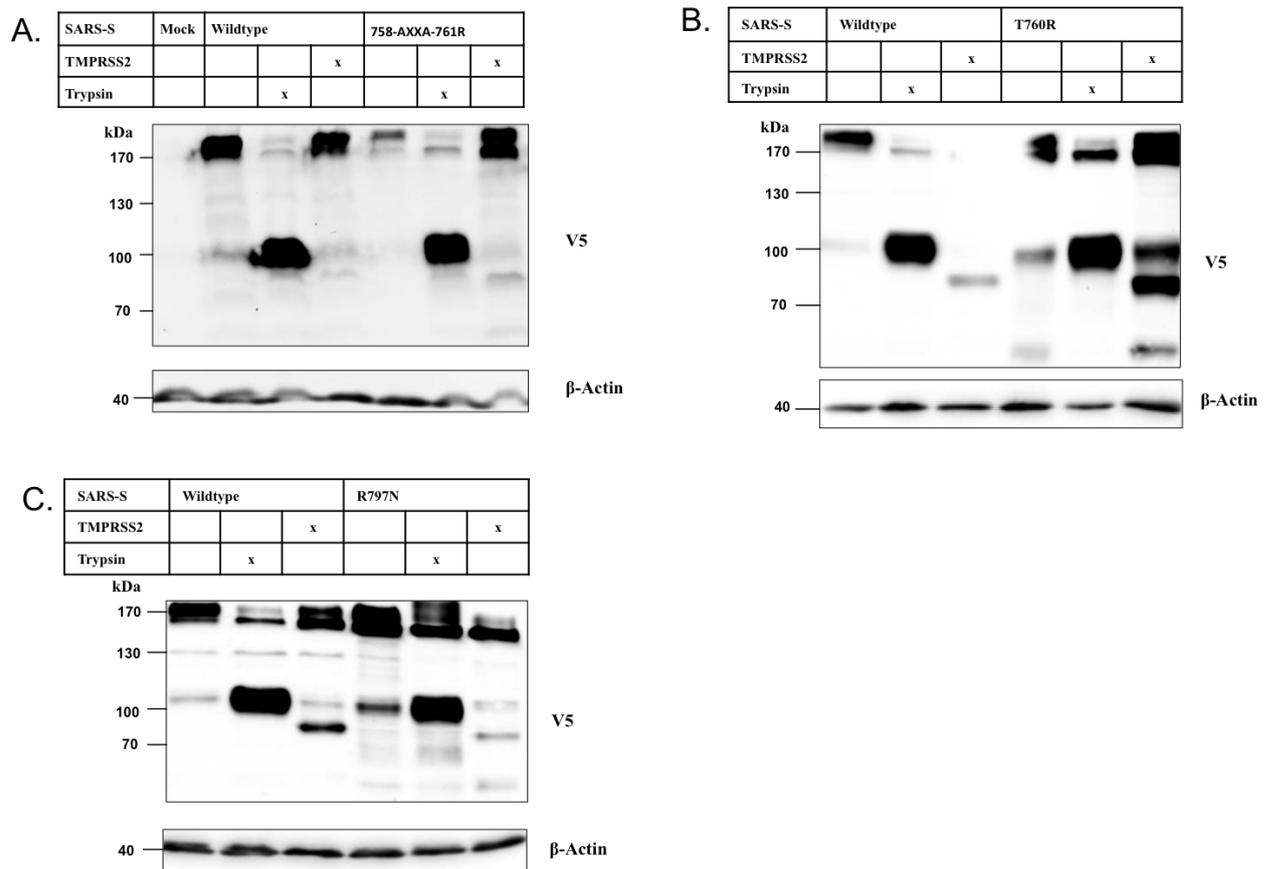


Abbildung 19: *Cis*-Spaltung der C-Terminalen Mutanten; transiente Kotretransfektion in 293T-Zellen der angegebenen Expressionsplasmide für SARS-S-V5 Wildtyp (2 μ g) und Mutanten (2 μ g), TMPrSS2 (0,01) oder entsprechender Menge an pCAGGS-Leerplasmid. Behandlung mit TPCK-Trypsin (10 μ M) oder PBS vor Lyse. Anschließend Western-Blot-Analyse der Lysate und Färbung mit anti-V5-Antikörper (A-C).

4.4 Lokalisationsanalyse der SARS-S-Mutanten mittels Immunhistochemie

Da die Lokalisation von Glykoproteinen innerhalb der Zelle die Prozessierung durch zelluläre Proteasen beeinflussen kann, wurde die Lokalisation der SARS-S-Mutanten mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Hierfür wurden die Mutanten in Cos7-Zellen exprimiert, da diese Zellen im Vergleich zu 293T-Zellen ein größeres Zytoplasma aufweisen, welches die Beurteilung der subzellulären Lokalisation erleichtert. Anschließend wurden die zellulären Membranen mit dem fluoreszierenden Farbstoff DiI und das SARS-S-Protein mit Antikörpern gegen den V5-tag eingefärbt.

Mit einem Leerplasmid (pCAGGS) transfizierte Cos7-Zellen dienten als Negativkontrolle und zeigten bis auf einen schwachen Hintergrund kein Signal nach Färbung mit V5-spezifischen Antikörpern. In der DiI-Färbung wurden die zellulären Membranen markiert. So ließen sich die Zellränder darstellen, wogegen der

Zellkern als Aussparung zu erkennen war. Neben dem Zellkern lag meist der stark gefärbte Bereich des endoplasmatischen Retikulums (ER)/Golgi-Apparates (Abbildung 20; Mock).

Für die Analyse der SARS-S-Mutanten wurden deren Expressionsmuster beurteilt. Hierfür wurden die in Material und Methoden beschriebenen Kriterien aufgestellt (Abbildung 7). Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Lokalisation der Glykoproteine im sekretorischen Stoffwechselweg, welcher durch Anfärbung des Kerns, des Golgi-Apparates und/oder der Zellmembran verfolgt werden konnte. Auch für die allgemeine Expressionsstärke wurden Marker definiert: Zellen, die viel SARS-S auf der Oberfläche exprimieren, sehen homogen eingefärbt aus, da die Signale an der Zelloberfläche bei den flachen Cos7-Zellen intrazelluläre Unregelmäßigkeiten überstrahlen. Ein anderer Phänotyp war, dass innerhalb der Zelle eine gitterartige Färbung zu sehen war. Dies wurde als starke Färbung des endoplasmatischen Retikulums bei schwacher Oberflächenfärbung interpretiert. Da einige Zellen charakteristische fadenförmige Ausstülpungen an der Zelloberfläche zeigten, wurde auch dieses als Kriterium gewählt.

Neben der Mutante R797N, die als funktionell relevant beschrieben wurde (Belouzard et al. 2009), wurden die Mutanten für die weitere Analyse ausgewählt, für die in der Spaltungsanalyse ein interessanter Phänotyp beobachtet wurde. Repräsentative Ergebnisse sind in Abbildung 20 und Abbildung 21 sowie Tabelle 28 gezeigt. SARS-S-Wildtyp zeigte als häufigsten Phänotyp homogen eingefärbte Zellen, bei denen die Zellmembran durch die starke Färbung gut zu erkennen war. Der Zellkern war oft nicht oder erst durch die DiL-Färbung zu lokalisieren. Es fiel auf, dass der Golgi-Apparat fast nie zu erkennen war. Auch ein Gittermuster war nicht zu sehen. Bei einigen Zellen fielen charakteristische SARS-S-reiche fadenartige Strukturen an der Zelloberfläche auf. Die Mutation K543A/R544A führte zu einem gänzlich anderen Phänotyp. Hier war die Zellmembran oft nicht zu erkennen und die Färbung beschränkte sich auf das Zellinnere rund um den Kern. Besonders die zusätzliche DiL-Färbung zeigte, dass die Zellmembran oft nicht eingefärbt war. Innerhalb des Zytoplasmas ließ sich immer wieder ein Gittermuster erkennen. Die Mutante R563A/K566A ähnelte K543A/R544A in den meisten Charakteristika. Das Gittermuster und der Golgi-Apparat waren hier jedoch auffallend häufig zu erkennen. Die Mutation R797N führte zu einem Wildtyp-ähnlichen Phänotyp. Ein Unterschied war jedoch die häufiger mögliche visuelle Abgrenzung des Golgi-Apparates. Der Phänotyp der Mutante R667A glich dem Wildtyp. Nur war hier zum Teil eine Gitterfärbung im Zytoplasma zu erkennen, welche der Wildtyp nicht gezeigt hatte.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass für die Mutanten K543A/R544A und R563A/K566A nicht eine Veränderung in den Schnittstellen, sondern im Membrantransport den Zugang für die Proteasen erschwert und so zu einer Variation im Spaltmuster führt. Die anderen Mutanten wurden im Wesentlichen auf der Zelloberfläche exprimiert, sodass Unterschiede in der Membranfusionsaktivität auf unterschiedliche Proteinspaltung zurückzuführen sein sollten. Alle Mutanten zeigen jedoch eine stärkere Golgi-Einfärbung als der SARS-S-Wildtyp, was auf eine verstärkte Akkumulation in diesem Zellkompartiment hinweist.

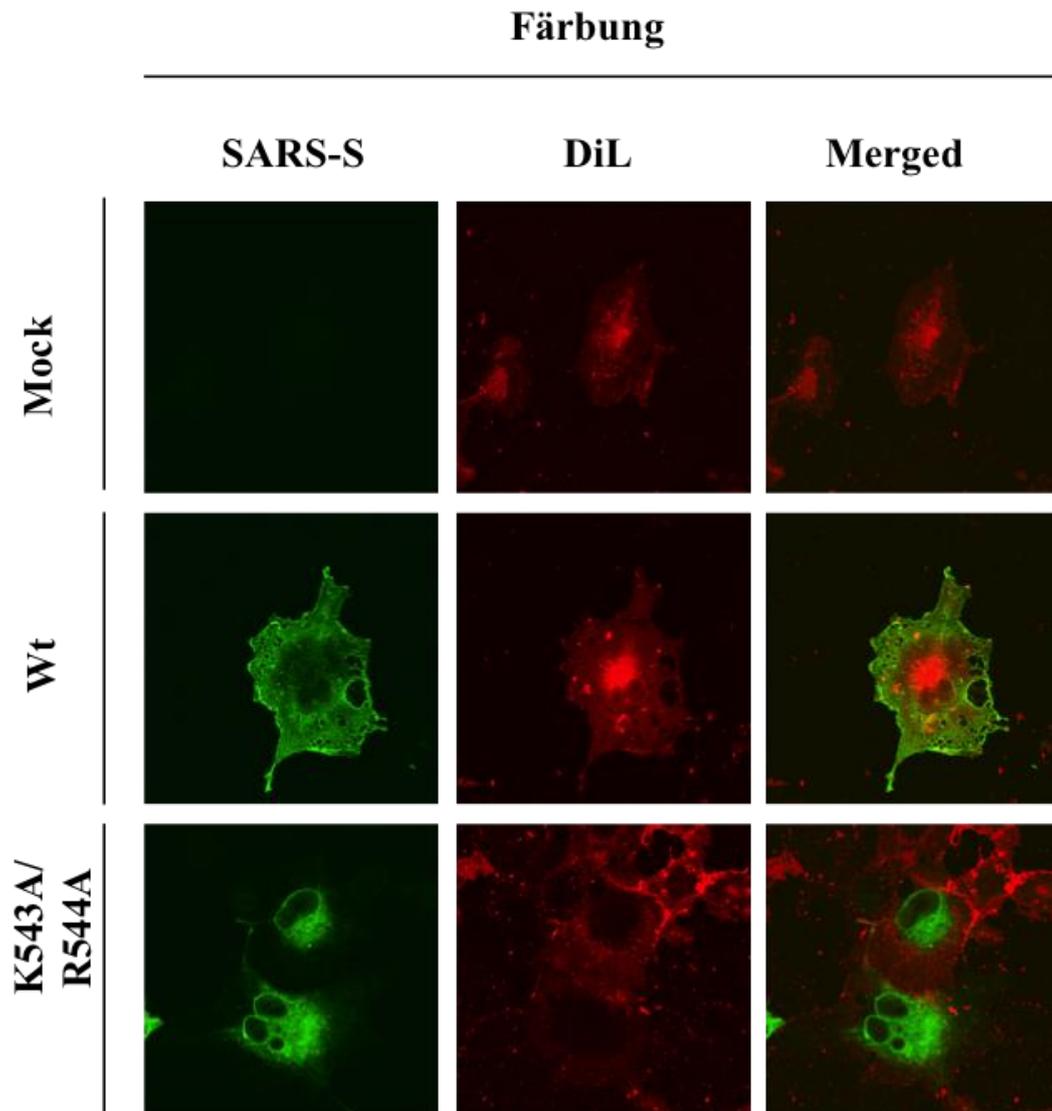


Abbildung 20: SARS-S-Mutationen führen zu einem veränderten intrazellulären Transport: Transiente Koftransfektion von Cos7-Zellen (20.000-30.000 in 24-Well) mit SARS-S-Wildtyp oder Mutanten (1 μ g) oder pCAGGS-Leervektor (1 μ g), Färbung nach Permeabilisierung mit anti-V5-Antikörper und Anti-Maus-Alexa Fluor 488, außerdem mit dem Farbstoff DiI, der Membranen einfärbt. Analyse im Konfokalmikroskop mit 63-fachem Objektiv. Die Bilder sind jeweils repräsentativ für 13-23 Aufnahmen jeder Mutante in zwei unabhängigen Experimenten. Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale ist in der äußeren rechten Spalte dargestellt.

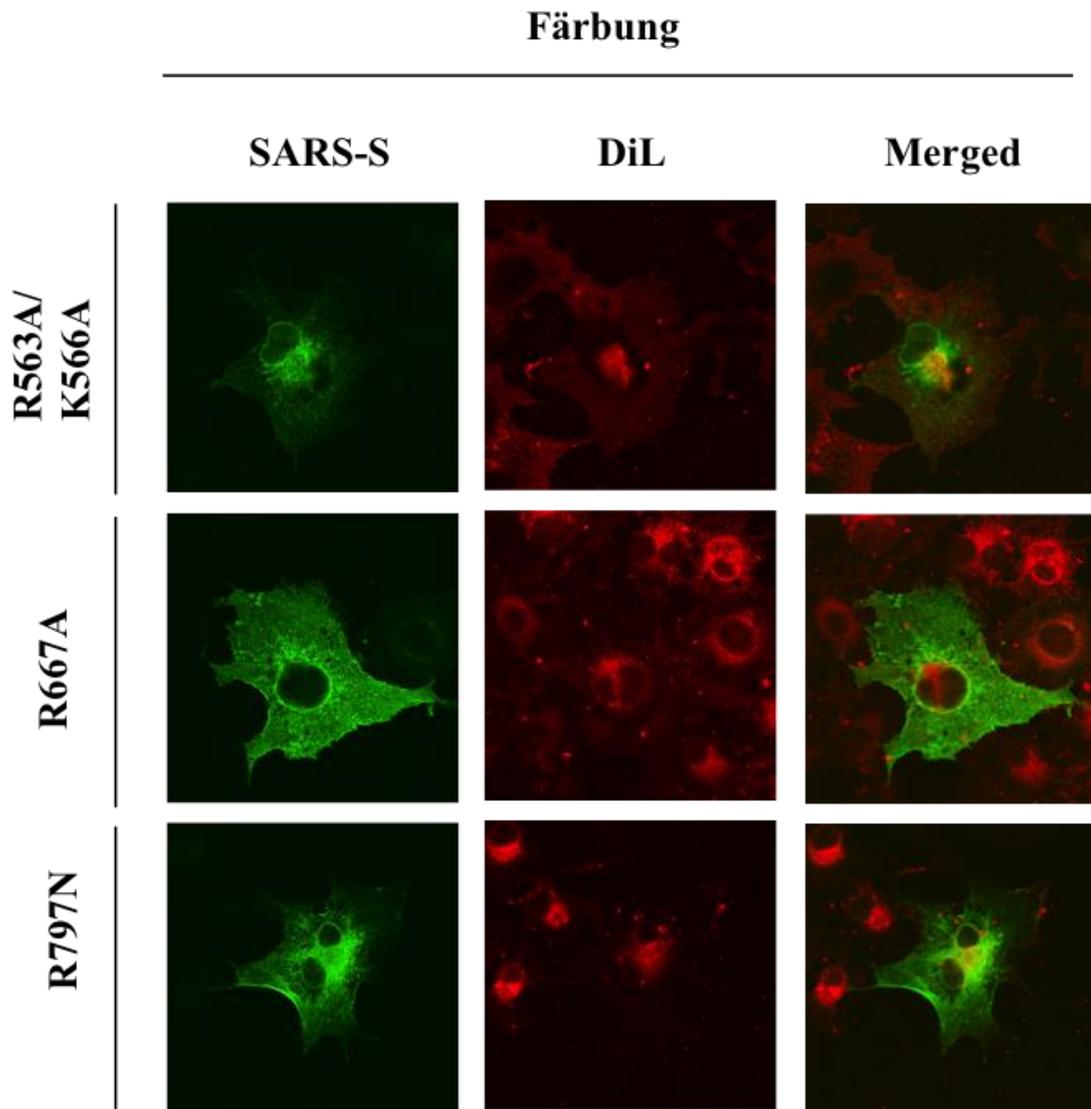


Abbildung 21: SARS-S-Mutationen führen zu einem veränderten intrazellulären Transport: Transiente Koftransfektion von Cos7-Zellen (20.000-30.000 in 24-Well) mit SARS-S-Wildtyp oder Mutanten (1 μ g) oder pCAGGS-Leervektor (1 μ g), Färbung nach Permeabilisierung mit anti-V5-Antikörper und Anti-Maus-Alexa Fluor 488, außerdem mit dem Farbstoff DiI, der Membranen einfärbt. Analyse im Konfokalmikroskop mit 63-fachem Objektiv. Die Bilder sind jeweils repräsentativ für 13-23 Aufnahmen jeder Mutante in zwei unabhängigen Experimenten. Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale ist in der äußeren rechten Spalte dargestellt.

Tabelle 28: Die verschiedenen Mutationen führen zu Unterschieden in der Lokalisation des SARS-Spike. Die Tabelle zeigt den Anteil der Zellen, die den im Methodenteil (3.2.3.4) beschriebenen Kriterien entsprechen. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt, je 13-23 Bilder für jede Mutante aufgenommen und diese auf die beschriebenen Kriterien hin analysiert.

	Zellmembran eingefärbt	Klare Abgrenzung des Golgi-Apparates	Homogene Färbung	Gittermusterung	Zellkern nicht abzugrenzen	„Fäden“ an der Zelloberfläche
Wildtyp	73%	5%	45%	0%	36%	23%
K543A/R544A	43%	52%	19%	19%	5%	5%
R563A/K566A	48%	76%	10%	43%	0%	0%
R797N	81%	87%	38%	13%	13%	13%
R667A	78%	28%	56%	17%	22%	22%

4.5 Analyse der Spike-Mutanten im Zell-Zellfusionstest

Die Fähigkeit der Mutanten, die Bildung großer, mehrkerniger Zellen, Synzytien, zu induzieren, wird im Zell-Zellfusionsassay abgebildet. Das Ziel dieser Experimente war es zu prüfen, ob Mutationen, welche die SARS-S-Spaltung verändern, auch die SARS-S-getriebene Zell-Zellfusion beeinflussen. Zur Klärung dieser Fragen wurden Zielzellen, die mit Expressionsplasmiden für hACE2 und/oder TMPRSS2 transfiziert wurden, mit Effektor-Zellen kokultiviert, in die Plasmide für SARS-S-Wildtyp bzw. Mutanten eingebracht wurden. Eine Quantifizierung der Zell-Zellfusion erfolgte über die Luziferaseaktivität.

Aus den vorhandenen Daten wurden nur jene Experimente ausgewertet, bei denen die Negativkontrolle (Effektorzellen transfiziert mit pcDNA) keine ungewöhnlich hohen Werte zeigte. Die Variation zwischen den einzelnen Experimenten erwies sich als hoch, sodass nur eine vorsichtige Interpretation der Ergebnisse möglich ist.

Abbildung 22 zeigt die Zell-Zellfusionsaktivität von SARS-Wildtyp und SARS-S-Mutanten. Die Negativkontrolle – die Fusion mit Effektorzellen die kein S-Protein exprimieren (Kontrolle) – wurde für jede Bedingung auf eins gesetzt. Es zeigte sich, dass SARS-S und die meisten SARS-S-Mutanten nach Trypsin-Behandlung oder TMPRSS2-Expression mit grob vergleichbarer Effizienz die Zell-Zellfusion vermitteln. Lediglich die Mutanten R563A/R566A und R797N zeigten eine reduzierte Aktivität. Leider konnte jedoch nicht bestimmt werden, ob die verminderte Aktivität dieser Mutanten auf eine reduzierte S-Protein-Aktivierung zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden Zielzellen mitgeführt, die nur mit hACE2-Expressionsplasmid transfiziert wurden und mit deren Hilfe Trypsin/TMPRSS2-unabhängige Zell-Zellfusion gemessen werden sollte. Im Gegensatz zu publizierten Daten wurden jedoch für diese Zielzellen keine spezifischen Signale detektiert, möglicherweise da diese Charge an 293T keine endogene

Expression einer Protease aufweist, die SARS-S aktivieren kann. Zusammenfassend kann auf der Basis der Zell-Zellfusionsaktivität keine Aussage zum Einfluss der Mutationen auf die SARS-S-Aktivierung durch Trypsin und TMPRSS2 getroffen werden.

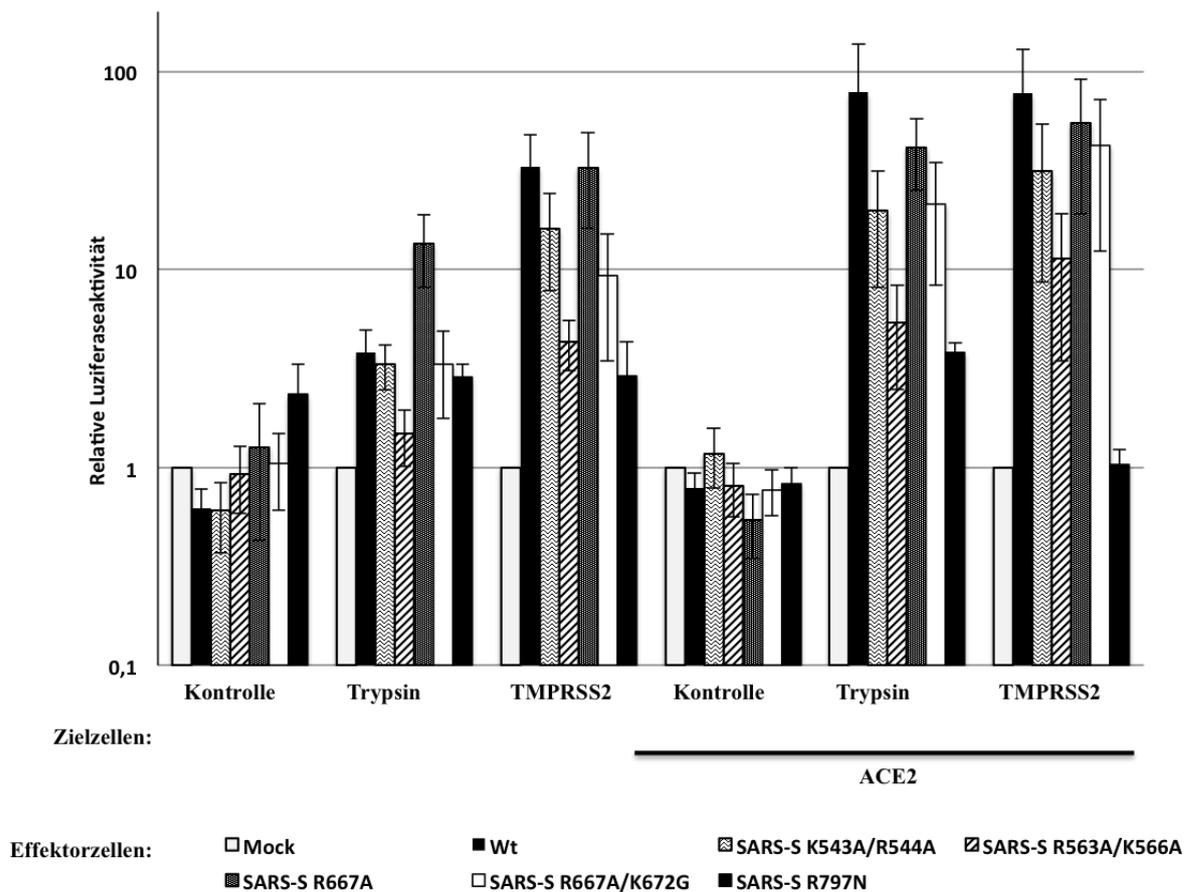


Abbildung 22: Zell-Zellfusion der SARS-S-Mutanten; transiente Kotransfektion von 293T-Zellen als Zielzellen (40.000 Zellen in 48-Well-Platte) mit Expressionsplasmiden für hACE2 (1,8 µg) und/oder TMPRSS2 (0,2 µg) und/oder entsprechender Menge pCDNA3-Leerplasmid und pGal5-luc (0,2 µg); und 293T-Zellen als Effektorzellen (250.000; 6-Well-Platte) mit Expressionsplasmiden für SARS-S Wildtyp (3 µg) oder Mutante (3 µg) oder entsprechende Menge pCAGGS-Leerplasmid und pGAL4VP16 (3 µg); Bei Trypsin-Proben Einstellung des Medium auf 100 µM TPCK-Trypsin; Lyse nach 48 h und anschließend Messung der Luziferaseaktivität (c.p.s.). Gezeigt werden auf die Negativkontrolle normalisierte Mittelwerte der gemessenen Luziferaseaktivitäten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, ausgeführt in Triplikaten.

4.6 Analyse der Spike-Mutanten im Virus-Zellfusionstest

Für den Zelleintritt muss das Virus an Zielzellen binden und mit der zellulären Membran fusionieren. Diese Aufgaben werden durch S-Protein vermittelt und durch den Virus-Zellfusionstest abgebildet. Für diesen Test wurden MLV-Vektoren eingesetzt, die mit SARS-S pseudotypisiert waren, also SARS-S in ihrer Hüllmembran tragen und Zielzellen in Abhängigkeit des S-Proteins transduzieren. Es wurde untersucht, ob die SARS-S-Mutanten sich im Zelleintritt unter verschiedenen Bedingungen abweichend vom Wildtyp verhalten. Alle Experimente, die mindestens in Triplikaten ausgeführt wurden, sind im Anhang zu sehen (Abbildung 30). Für die bessere Übersicht wurden die gemessenen Effekte und Teilaspekte in einzelnen Diagrammen dargestellt.

4.6.1 Inkorporation von SARS-S in retrovirale Partikel

Vor der Durchführung von Transduktionsversuchen wurde die Inkorporation der S-Proteine in die Virus-Partikel überprüft. So war es möglich zu prüfen, ob eine Änderung in der Transduktionseffizienz durch Mutationen im S-Protein auf eine schwächere Virion-Inkorporation zurückzuführen ist. Hierfür wurden die mit SARS-S pseudotypisierten MLV-Partikel („Pseudotypen“) durch Zentrifugation durch ein Sucrosekissen konzentriert und anschließend im Immunoblot mit einem MLV-Gag-p30-Antikörper und dem anti-V5-Antikörper gegen SARS-S analysiert (Abbildung 23). Das MLV-Gag-p30-Signal bei 30 kDa war bei allen SARS-S-tragenden Pseudotypen vergleichbar stark. Auch die Pseudotypen mit dem VSV-G-Oberflächenprotein zeigten ein Signal für MLV-Gag-p30. Nur in der Negativkontrolle ohne SARS-S ließ sich auch nach längerer Belichtung und wiederholten Versuchen kein Signal erfassen. Dieses könnte an einer reduzierten Produktion der Pseudotypen ohne Glykoprotein in der Hüllmembran liegen oder andere, technische Ursachen haben. In anderen Pseudotypen-Systemen ist das Gag-Protein auch in den Negativkontrollen zu detektieren (Kam et al. 2009). Die SARS-S-spezifische Bande wurde bei 170 kDa detektiert. Dieses Signal war bei der Mutante R797N abgeschwächt. Die Mutanten K543A/R544A und R563A/K566A zeigten bei kurzen Belichtungszeiten kein Signal für das Spike-Protein. Erst nach langer Belichtungsdauer ließ sich je eine schwache Bande detektieren, die bei Mutante K543A/R544A etwas stärker als bei R563A/K566A ausgeprägt war. Die reduzierte Inkorporation dieser S-Protein Mutanten korrespondiert mit ihrer hauptsächlich intrazellulären Lokalisation, die mit effizientem Einbau in MLV-Partikel nicht kompatibel ist, da MLV-Partikel von der Plasmamembran abgeschnürt werden. Die übrigen Mutanten glichen in ihrer Signalstärke dem SARS-S Wildtyp. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die getesteten SARS-S-Mutanten in Pseudopartikel eingebaut werden. Die Mutante R797N und insbesondere die Mutanten K543A/R544A und R563A/R566A weisen jedoch einen im Vergleich zu SARS-S Wildtyp reduzierten Einbau auf.

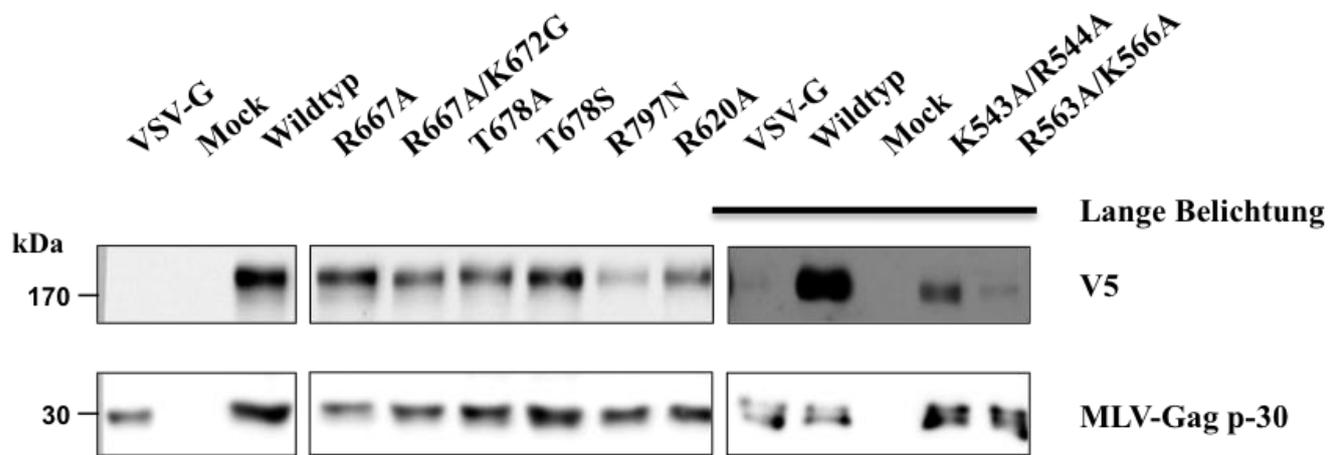


Abbildung 23: Inkorporation der Glykoproteine in die Virus-Partikel. Zellkulturüberstände, die Pseudotypen enthalten, wurden durch ein Sucrosekissen (20% in TNE-Puffer) zentrifugiert und anschließend im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Membranen für die Mutanten K543A/R544A und R563A/K566A wurden länger belichtet.

4.6.2 Aktivität der SARS-S-Mutanten

Als nächstes wurde untersucht, ob die Mutationen die Effizienz des SARS-S-getriebenen Zelleintritts beeinflussen (Abbildung 24). Dazu wurde die Transduzierbarkeit von kontrolltransfizierten 293T Zellen mit 293T Zellen verglichen, die zuvor mit einem Expressionsplasmid für hACE2 transfiziert wurden. 293T Zellen exprimieren endogen geringe Mengen an hACE2 und sind daher für den SARS-S-vermittelten Eintritt empfänglich, die Eintrittseffizienz kann jedoch durch die gerichtete Expression von hACE2 deutlich gesteigert werden (Hofmann et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass 293T Zellen unabhängig von der hACE2-Expression durch VSV-G-tragende Pseudotypen hocheffizient transduziert werden, während nach Transduktion mit Kontrollpseudotypen ohne Glykoprotein deutlich geringere Signale gemessen wurden. Nach Transduktion von Kontrollzellen durch SARS-S-tragende Pseudotypen wurden Signale gemessen, die nur knapp über dem Hintergrund lagen, während hACE2-transfizierte Zellen effizienter transduziert wurden. Alle getesteten SARS-S-Mutanten waren nicht in der Lage, die Transduktion von Kontrollzellen zu vermitteln. Die Transduktion von hACE2-transfizierten Zellen war dagegen deutlich effizienter: Für die Mutanten R667A, R667A/K672G, T678A, T678S und R797N wurden ähnliche Signale wie für SARS-S-Wildtyp gemessen. Dagegen waren die Mutanten K543A/R544A und R563A/K566A weitgehend inaktiv.

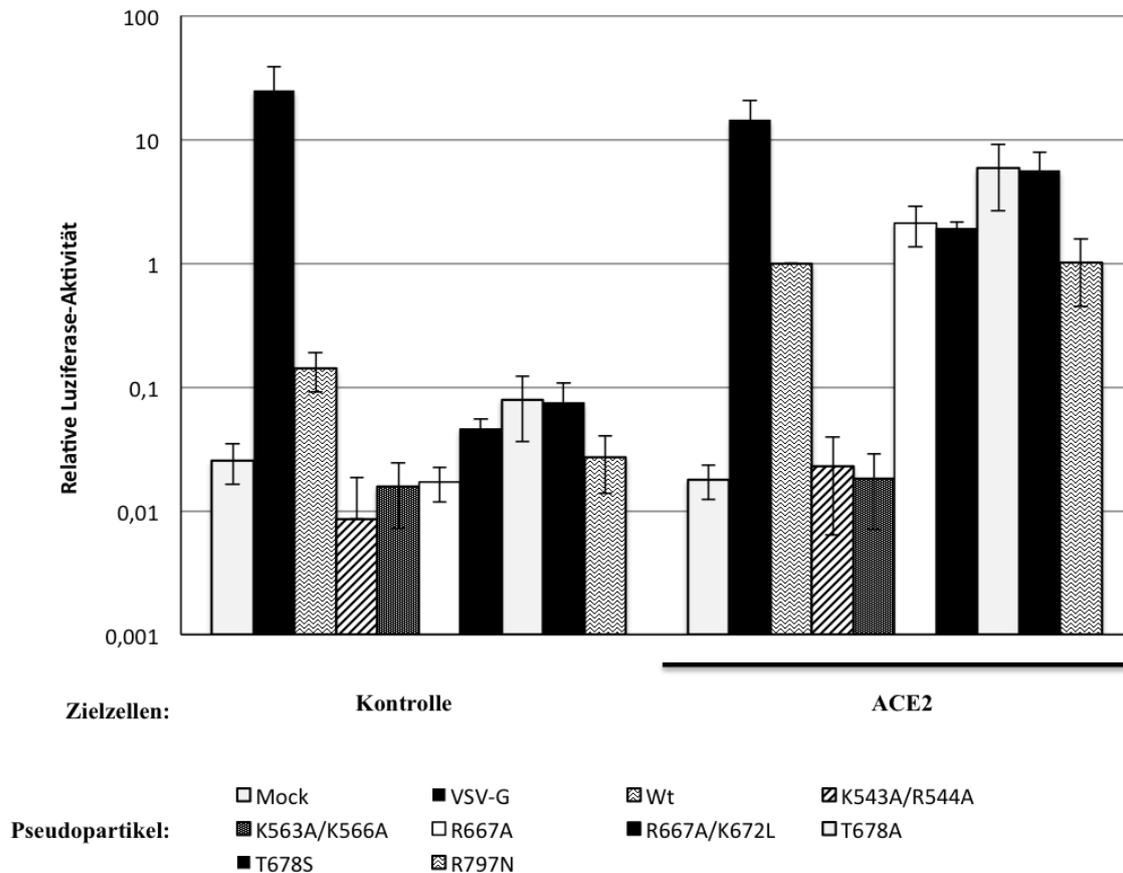


Abbildung 24: Effizienz des SARS-S-vermittelten Zelleintritts. Kotransfektion von 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für MLV-*firefly*-Luziferase (6 µg), MLV-Gag (3 µg) und SARS-S Wildtyp oder Mutanten (3 µg) oder VSV-G (3 µg) oder pCAGGS-Leerplasmid (3 µg); Ernte und Filtration (0,45 µm-Filter) des Überstandes 72 h nach Transfektion und Lagerung bei -80 °C. Anschließend transiente Kotransfektion von 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für hACE2 (1,8 µg) oder entsprechender Menge Leerplasmid. Nach 24 h Ablösen der Zellen in 1 ml DMEM und Aussaat in 96-Well-Platte, 24 h später Präinkubation mit DMSO (1 h, 37 °C, 50 µM); Infektion mit je 50 µl Pseudotypen; nach 6-8 h Zugabe von DMEM (150 µl) und weitere 72 h Inkubation; anschließend Lyse und Messung der Luziferaseaktivität; gezeigt werden Durchschnittswerte aus je mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Der SARS-S Wildtyp vermittelte Eintritt in hACE2 transfizierte Zellen wurde gleich 1 gesetzt.

4.6.3 *Die Mutation R667A schützt SARS-S auf Pseudotypen vor der Inaktivierung durch Trypsin*

Präinkubation mit Trypsin verringert die Aktivität von SARS-S-tragenden Pseudotypen, wahrscheinlich aufgrund der Spaltung des S-Proteins an R667 und anschließender Dissoziation der S1- und S2-Untereinheiten (Simmons et al. 2004; Kam et al. 2009; Simmons et al. 2011). Es sollte überprüft werden, ob dieser Befund reproduzierbar ist. Hierfür wurden SARS-S Wildtyp und R667A Pseudotypen vor der Transduktion mit Trypsin behandelt. Anschließend wurde die Transduktion wie oben beschrieben durchgeführt. Die Trypsin-Behandlung der Pseudotypen vor der Bindung an die Zielzellen führte zu einer Reduktion der durch SARS-S Wildtyp vermittelten Virus-Zellfusion (Abbildung 25). Im Gegensatz dazu verstärkte die Vorbehandlung mit Trypsin den Zelleintritt von Partikeln, die SARS-S R667A auf ihrer Oberfläche trugen. Der Zelleintritt blieb jedoch weitgehend abhängig von der Cathepsin B/L-Aktivität. Diese Beobachtungen belegen, dass R667 für Inaktivierung von freien SARS-S-tragenden Virionen durch Trypsin essentiell ist. Doch es scheint eine andere Stelle in SARS-S zu geben, an der Trypsin-Behandlung die Aktivität von Pseudotypen mit einer Mutation an R667 erhöhen kann.

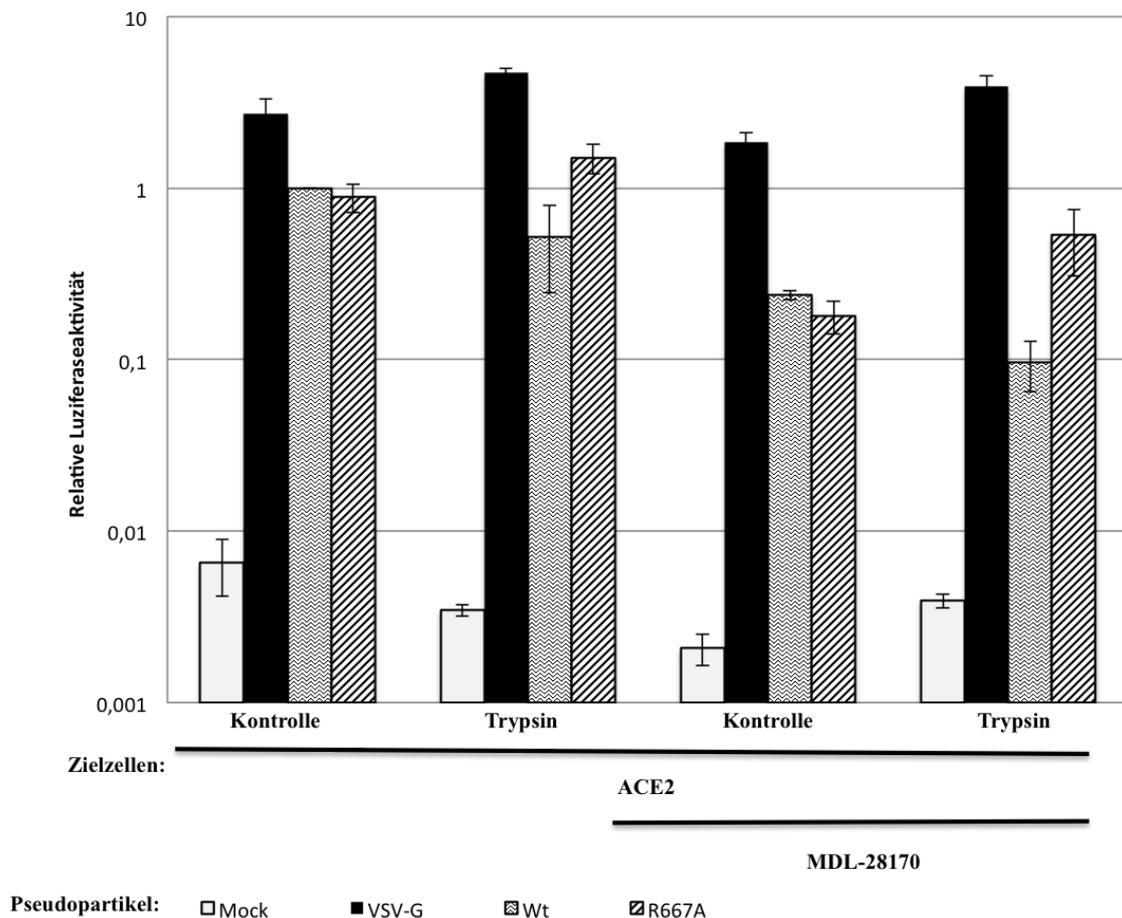


Abbildung 25: R667 ist essentiell für die Inaktivierung von SARS-S durch Trypsin. Kotransfektion von 293T-Zellen (ca. 1000.000 Zellen in T-25-Flasche) mit Expressionsplasmiden für MLV-*firefly*-Luziferase (6 µg), MLV-Gag (3 µg) und SARS-S Wildtyp oder Mutanten (3 µg) oder VSV-G (3 µg) oder pCAGGS-Leerplasmid (3 µg); Ernte und Filtration (450 µm-Filter) der Überstandes 72 h nach Transfektion und Lagerung bei -80 °C. Zielzellen transiente Kotransfektion von 293T-Zellen (ca. 300.000 Zellen, 6-Well) mit Expressionsplasmiden für hACE2 (1,8 µg). Trypsin-Präinkubation von Pseudotypen durch Zugabe von TPCK-Trypsin (100 µg/ml, 20 °C, 20 min), anschließend Inaktivierung mit gleicher Menge an Trypsin-Inhibitor. Nach 24 h Ablösen der Zellen in 1 ml DMEM und Aussaat in 96-Well-Platte (je 50 µl), nach 24h Präinkubation mit MDL-28170 oder DMSO (1 h, 37 °C, 50 µM). Infektion mit je 50 µl Pseudotypen; nach 6-8 h Zugabe von DMEM (150 µl) und weitere 72 h Inkubation; anschließend Lyse und Messung der Luziferaseaktivität; gezeigt werden Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten ausgeführt wurden. Der durch SARS-S Wildtyp vermittelte Eintritt in hACE2-exprimierende Zellen wurde gleich eins gesetzt.

4.6.4 R797 aber nicht R667 ist für die SARS-S-Aktivierung durch TMPRSS2 wichtig

Die Expression von TMPRSS2 in Zielzellen vermittelt den Cathepsin B/L-unabhängigen Zelleintritt (Bertram et al. 2011). Durch Blockade der Aktivität von Cathepsin B/L kann daher die SARS-S-Aktivierung durch TMPRSS2 sichtbar gemacht werden. Dieser experimentelle Aufbau wurde gewählt, um die Aktivierung der SARS-S-Mutanten durch TMPRSS2 und durch Cathepsin B/L sichtbar zu machen. Das Wildtyp S-Protein und die SARS-S-Mutanten R667A und R797N vermittelten den effizienten Eintritt in hACE2- bzw. hACE2/TMPRSS2-exprimierende Zellen. Im Gegensatz dazu war der Eintritt in kontrolltransfizierte Zellen ineffizient (Abbildung 24). Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen. Die Vorbehandlung der hACE2-exprimierenden Zellen mit dem Cathepsin B/L-Inhibitor MDL-28170 reduzierte den Eintritt aller Pseudotypen um etwa 80%. Dagegen wurde nach Vorbehandlung von hACE2/TMPRSS2-exprimierenden Zellen mit dem Inhibitor unterschiedliche Effekte für SARS-S Wildtyp und Mutanten beobachtet: Der SARS-S Wildtyp- und SARS-S R667A-getriebene Eintritt wurde durch MDL-28170 nicht verringert und ähnliche Effekte wurden für die Mutanten R667A, R667A/K672G, T678A und T678S beobachtet (siehe Abbildungen 30 und 26). Im Gegensatz dazu wurde der SARS-S R797N-getriebene Eintritt nicht durch TMPRSS2-Expression vor der Inhibition durch MDL-28170 geschützt. Diese Beobachtungen zeigen, dass R667 für die SARS-S-Aktivierung durch TMPRSS2 verzichtbar ist, während R797 eine essentielle Rolle in diesem Prozess spielt.

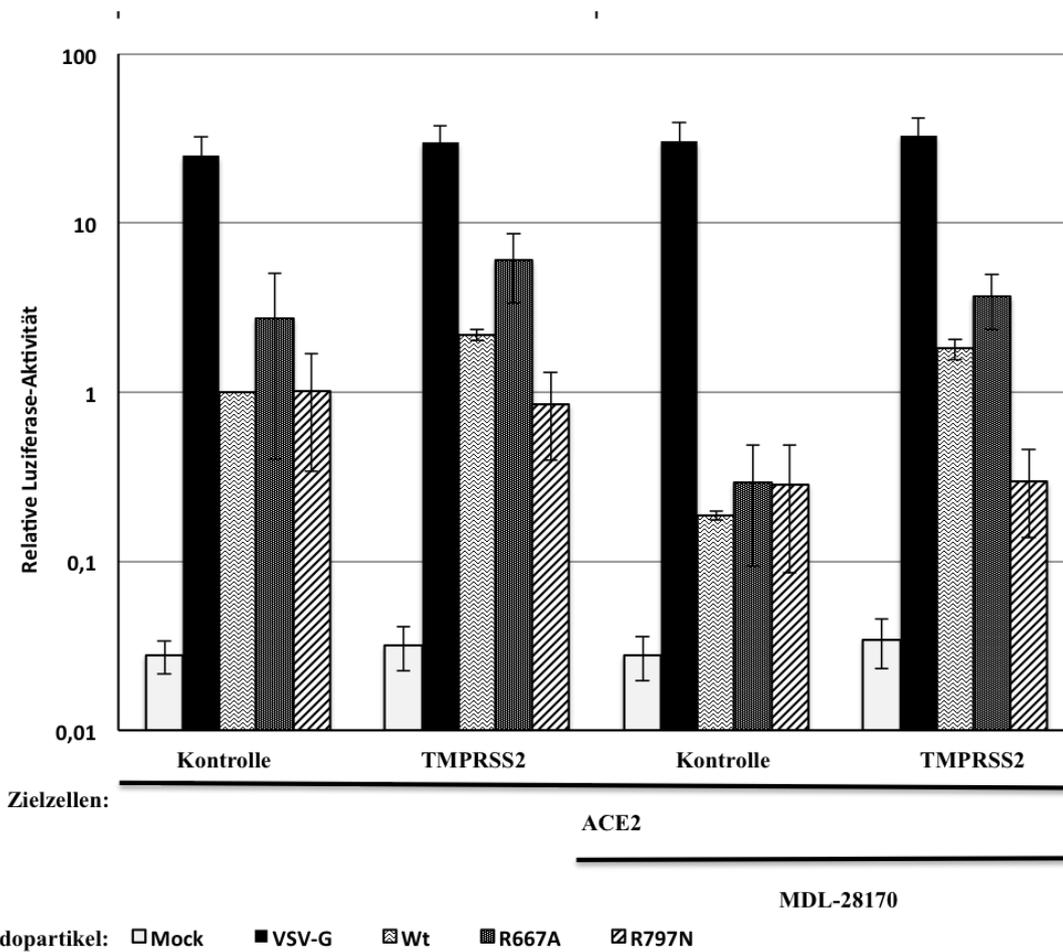


Abbildung 26: R797 und nicht R667 ist essentiell für den TMPRSS2-vermittelten Zelleintritt: Kotransfektion von 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für MLV-*firefly*-Luziferase (6 µg), MLV-Gag (3 µg) und SARS-S Wildtyp oder Mutanten (3 µg) oder VSV-G (3 µg) oder pCAGGS-Leerplasmid (3 µg); Ernte und Filtration (450 µm-Filter) der Überstandes 72 h nach Transfektion und Lagerung bei -80 °C. Ziellzellen transiente Kotransfektion von 293T-Zellen mit Expressionsplasmiden für hACE2 (1,8 µg) und/oder TMPRSS2 (0,2 µg) und/oder entsprechender Menge Leerplasmid. Nach 24 h Ablösen der Zellen in 1 ml DMEM und Aussaat in 96-Well-Platte, nach 24 h Präinkubation mit MDL 28170 oder DMSO; Infektion mit Pseudotypen; nach 6-8 h Zugabe von DMEM (150 µl) und weitere 72 h Inkubation; anschließend Lyse und Messung der Luciferaseaktivität; gezeigt werden nach SARS-S Wildtyp-Zelleintritt in hACE2 exprimierenden Zellen normalisierte Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten ausgeführt wurden.

4.7 Analyse der TMPRSS11a-abhängigen Spaltung und Aktivierung von SARS-S

Die Aktivität von Serinproteasen, vermutlich von TMPRSS2, ist essentiell für die Ausbreitung und Pathogenese von SARS-CoV im Mausmodell (Zhou et al. 2015). In Zellkultur können jedoch neben TMPRSS2 auch weitere TTSPs das S-Protein von SARS-CoV aktivieren. Eine dieser Proteasen ist TMPRSS11a (Pawel Zmora, Abteilung Infektionsbiologie, DPZ, unveröffentlichte Ergebnisse). Es wurde daher analysiert, ob die Spaltung und Aktivierung von SARS-S durch TMPRSS11a und TMPRSS2 durch die gleichen Aminosäuren in SARS-S kontrolliert werden.

Zunächst wurde die Spaltung der Spike-Mutanten nach Koexpression von 10 ng Expressionsplasmid für TMPRSS11a untersucht (*cis*-Format, Abbildung 27). Bei der Spaltung des Wildtyp-Proteins zeigte sich als deutlichstes Produkt eine Doppelbande knapp unter 100 kDa. Die einzelnen Signale ließen sich in der Spaltanalyse bestimmten Schnittstellen zuweisen. Die Mutation R620A unterdrückte die Produktion der oberen Bande während bei Mutanten, die den Austausch R667A enthielten, die untere Bande nicht mehr detektiert werden konnte.

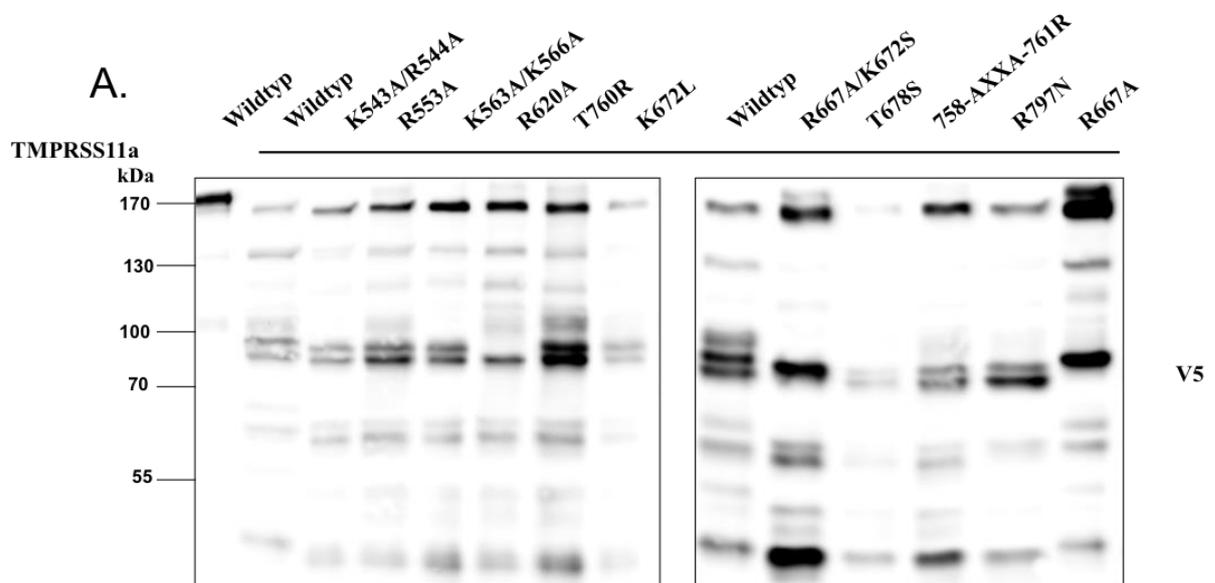


Abbildung 27: Cis-Spaltung von SARS-S durch TMPRSS11a; transiente Kotransfektion in 293T-Zellen der angegebenen Expressionsplasmide für SARS-S-V5 Wildtyp (2 µg) und Mutanten (2 µg), TMPRSS11a (0,01 µg) oder entsprechender Menge pCAGGS-Leerplasmid. Nach 40 h Inkubation Lyse der Zellen und Analyse der Lysate im Western Blot mit anti-V5-Antikörper.

Die Aktivierung von SARS-S für die Zell-Zellfusion wurde im *trans*-Format untersucht, d.h. Zielzellen wurden mit Plasmiden für hACE2 und/oder Protease transfiziert und mit Effektorzellen gemischt, in die Plasmide für SARS-S Wildtyp oder Mutanten eingebracht wurden. Nach 48 h wurden die Kokulturen lysiert und die Luziferaseaktivität in den Lysaten gemessen. Die mit kontrolltransfizierten Effektorzellen (pcDNA) gemessenen Werte wurden als eins gesetzt.

Es zeigte sich, dass die Expression von TMPRSS11a allein die SARS-S-getriebene Zell-Zellfusion induzieren konnte, jedoch schwächer als die Expression von TMPRSS2. Im Gegensatz dazu wurde nach hACE2-Expression allein kaum SARS-S-getriebene Zell-Zellfusion gemessen. Die Gründe dafür sind unklar: Schließlich verstärkte die Koexpression von hACE2 und TMPRSS11a die Zell-Zellfusion relativ zu Zellen, die nur Protease exprimierten. Nach Koexpression von hACE2 und TMPRSS2 wurde die stärkste Zell-Zellfusion gemessen. Die Mutationen R620A und R667A reduzierten sowohl die TMPRSS2 als auch die TMPRSS11a-getriebene Zell-Zellfusion (siehe Abbildung 28). Es ist daher möglich, dass die gleichen Determinanten in SARS-S die Spaltung durch diese Proteasen kontrollieren. Aufgrund der moderaten Effekte und hohen Standardabweichungen können jedoch keine klaren Aussagen gemacht werden.

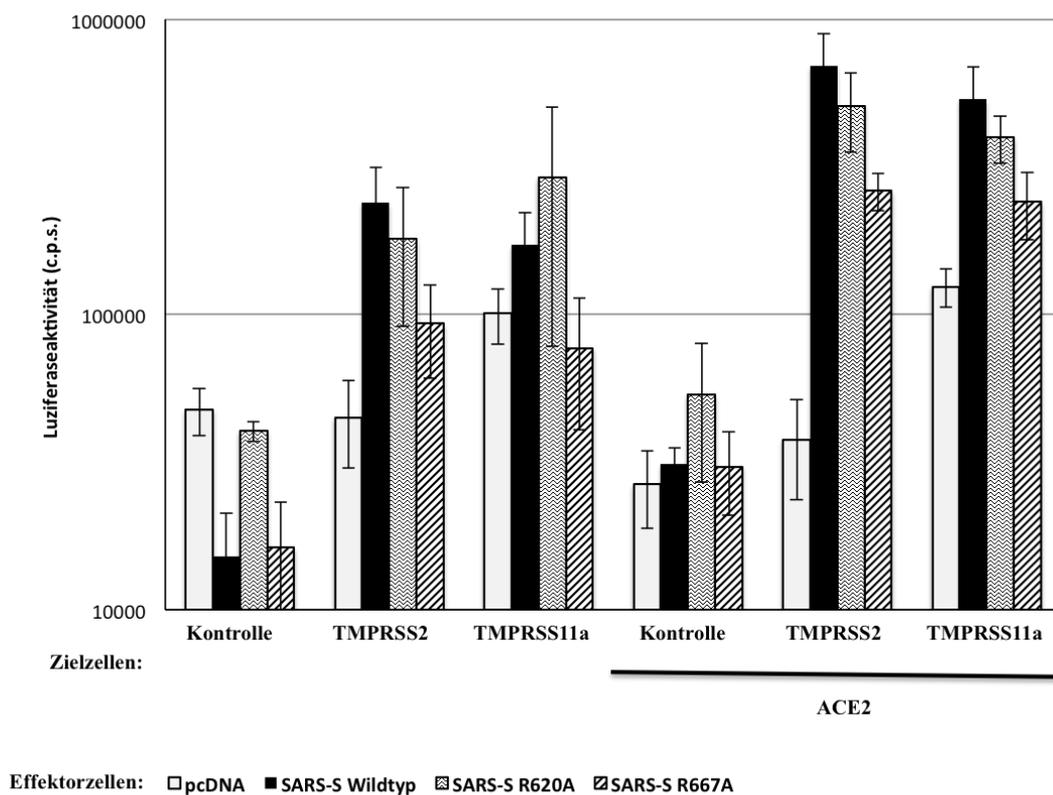


Abbildung 28: TMPRSS11a-abhängige Zellfusion: Das Experiment wurde, wie in Abb. 24 beschrieben, durchgeführt. Gezeigt ist der Mittelwert der Luziferaseaktivität eines Experimentes aus Triplikaten.

Anschließend wurde auch ein Experiment zur TMPRSS11a-vermittelten Virus-Zellfusion mit Pseudotypen, analog zu den in 4.6 beschriebenen Experimenten, durchgeführt. Dazu wurden Pseudotypen, die entweder VSV-G als Positivkontrolle oder SARS-S Wildtyp bzw. SARS-Mutanten auf der Oberfläche trugen, mit Zellen inkubiert, die vorher mit Expressionsvektoren für hACE2 und/oder TMPRSS2 oder TMPRSS11a transfiziert wurden. Zusätzlich wurden die Zielzellen mit DMSO (Negativkontrolle) oder Cathepsin B/L-Inhibitor MDL 28170 inkubiert, bevor die Pseudotypen zugegeben wurden.

Der Zelleintritt der VSV-G-tragenden Pseudotypen war unabhängig von der hACE2- oder Proteaseexpression. Die Expression von TMPRSS2 zeigte den in 4.6 beschriebenen Effekt auf den SARS-S-vermittelten Eintritt: Sie erhöhte den SARS-S-getriebenen Zelleintritt und hob die Inhibition durch MDL 28170 auf. Auch die TMPRSS11a-Expression verstärkte den SARS-S-getriebenen Eintritt, allerdings weniger effizient als die Expression von TMPRSS2. Eine Umgehung des durch MDL 28170 blockierten endosomalen Zelleintritts konnte nicht beobachtet werden. Schließlich wurden keine klaren Unterschiede zwischen dem Zelleintritt von Pseudotypen mit SARS-S Wildtyp und den SARS-S Mutanten R667A und R620A gemessen. Zusammenfassend zeigen diese Analysen, dass TMPRSS11a das SARS-S-Protein für die Zell-Zell-, aber nicht für Virus-Zellfusion aktivieren kann. Warum die TMPRSS11a-Expression den Eintritt in kontrollbehandelte Zellen leicht verstärkte, ist gegenwärtig unklar.

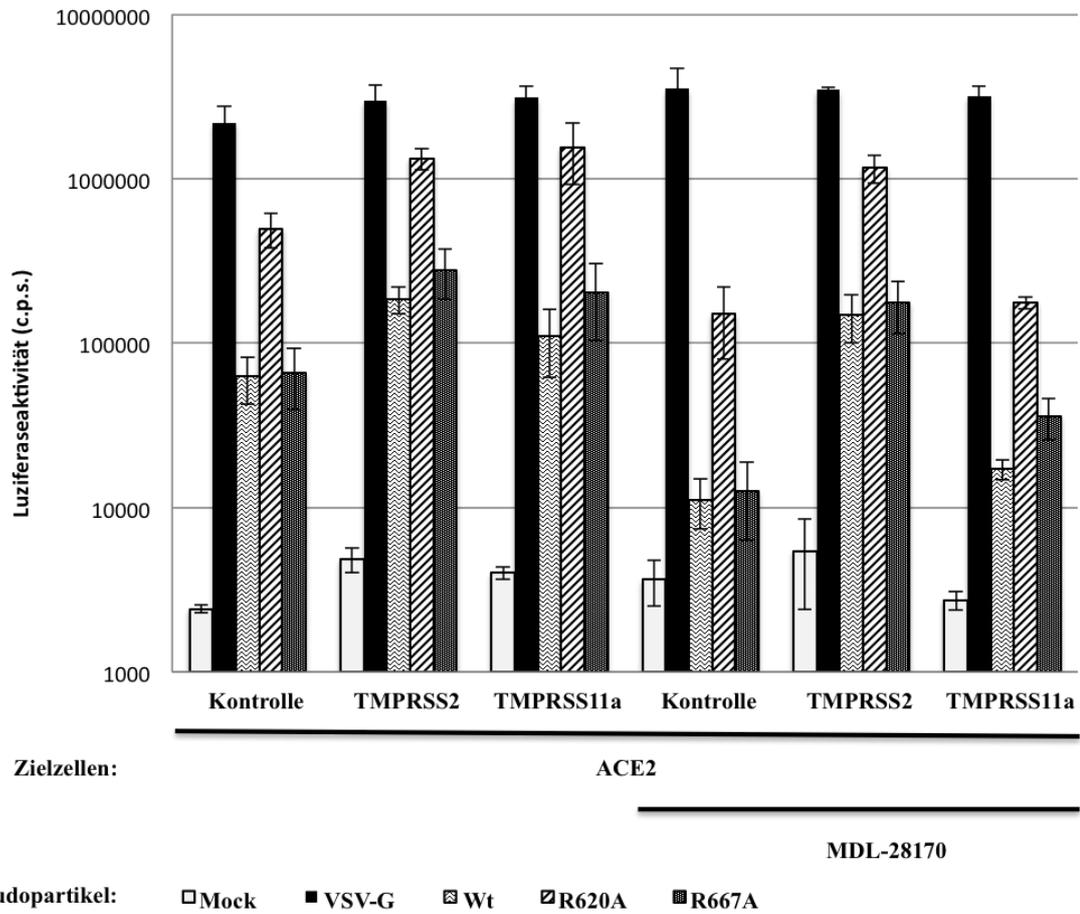


Abbildung 29: TMPRSS11a aktiviert die Virus-Zellfusion, ermöglicht jedoch keinen Cathepsin-Bypass. Das Experiment wurde wie in Abb. 27 beschrieben in Triplikaten durchgeführt. Gezeigt wird der Mittelwert der Luciferaseaktivität.

5 Diskussion

Das Spike-Protein (S) des SARS-Coronavirus (SARS-CoV) vermittelt den Eintritt des Virus in Wirtszellen. Die proteolytische Aktivierung des SARS-CoV S-Proteins (SARS-S) durch eine Wirtszellprotease ist für die SARS-S-induzierte Verschmelzung der viralen Membran mit der zellulären Membran essentiell. Die Typ II Transmembran-Serinprotease TMPRSS2 kann SARS-S aktivieren (Matsuyama et al. 2010; Glowacka et al. 2011; Shulla et al. 2011; Bertram et al. 2012; Heurich et al. 2014), die Spaltstelle von TMPRSS2 in SARS-S ist jedoch unbekannt und wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Mutagenese potentiell relevanter Aminosäuren untersucht. Dabei wurden zwei zentrale Befunde erhoben: 1) Die Aminosäure R667 in SARS-S ist für die Spaltung durch TMPRSS2 wichtig. 2) Aminosäuren, die für die Spaltung von SARS-S wichtig sind, können für die Aktivierung des S-Proteins verzichtbar sein und umgekehrt. Der erste Befund wurde in Spaltungsanalysen ermittelt, die jedoch als experimentelles System weit von den Konditionen einer natürlichen Infektion entfernt sind. Der zweite Befund stammt aus den funktionellen Experimenten, die für eine Infektion bedeutsame Eigenschaften der Mutanten untersuchen.

5.1 Spaltungsanalysen

Die Spaltungsanalysen sind das Fundament dieser Arbeit. Sie sind ein sehr reduziertes System, das mit Proteasen und SARS-S-Mutanten nur wenige Komponenten und somit mögliche Störfaktoren enthält. Hier war das dominierende Ziel, die Mutanten herauszufiltern, die für weitere Analysen von Interesse sind.

Für die korrekte Interpretation der Daten zur S-Protein-Spaltung müssen folgende Punkte berücksichtigt werden: Bei den Spaltungsanalysen zeigte sich eine relativ hohe Schwankung der Expression einzelner SARS-S-Fragmente, was auf einen starken Einfluss der TMPRSS2-Expressionsstärke auf die Spaltungseffizienz zurückzuführen sein könnte. Außerdem wurden die experimentellen Bedingungen wie Proteasemenge, Belichtungszeit, Gelzusammensetzung für die Detektion des 85 kDa Spaltprodukts optimiert. Für solide Aussagen zu anderen SARS-S-Fragmenten müssen die Versuchparameter angepasst werden.

5.1.1 SARS-S wird durch geringe Mengen an TMPRSS2 gespalten

Es ist bekannt, dass TMPRSS2 auch in geringen Konzentrationen virale Glykoproteine spaltet. So ist für die effiziente Spaltung von Influenza-Virus HA und dem F-Protein des humanen Metapneumovirus die Transfektion von Zellen mit weniger als 10 ng TMPRSS2-Expressionsplasmid ausreichend (Shirogane et al. 2008). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der nach Transfektion von 10 ng TMPRSS2-Expressionsplasmid ein starkes Signal für das Fragment bei 85 kDa beobachtet wurde. Die effiziente Spaltung viraler Glykoproteine durch geringe Mengen an TMPRSS2 bildet wahrscheinlich die Situation in der Lunge infizierter Patienten ab, da dort - wie von Afar et al. 2001 gezeigt - nur geringe Mengen der TMPRSS2 exprimiert werden. Die effiziente Spaltung durch niedrige Menge an Protease könnte auf eine evolutionäre Anpassung der Viren an TMPRSS2 oder eine TMPRSS2-ähnliche Protease im tierischen Reservoir als Wirtszellfaktor hindeuten.

5.1.2 *Nach SARS-S-Spaltung durch TMPRSS2 wird hauptsächlich ein 85 kDa-Fragment generiert*

In der vorliegenden Arbeit wurde die SARS-S-Spaltung durch TMPRSS2 hauptsächlich unter *in vitro*-Bedingungen analysiert. Hierfür wurden Zellen mit Expressionsplasmiden für SARS-S- und TMPRSS2 kotransfiziert und die Spaltung von SARS-S im Western-Blot-Verfahren untersucht. Unter diesen Bedingungen sollte die Spaltung von SARS-S hauptsächlich durch TMPRSS2-Moleküle erfolgen, die in derselben Zelle wie SARS-S exprimiert werden. Damit wird die SARS-S-Spaltung in infizierten Zellen abgebildet. Nach Spaltung von SARS-S durch TMPRSS2 im *in vitro*-Format wurden C-terminale SARS-S-Fragmente von 170 kDa, 110 kDa, 85 kDa und 60 kDa detektiert. Diese Fragmente decken sich im Wesentlichen mit den Fragmenten, die von Glowacka et al. 2011 beschrieben wurden. Allerdings sind auch Unterschiede festzustellen: Glowacka und Kollegen erhielten nur ein schwaches Signal für das 85 kDa Fragment, auf das sich die vorliegende Analyse konzentrierte. Das 110 kDa Fragment konnte von Glowacka und Kollegen nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde von Glowacka und Kollegen ein 45 kDa-Fragment detektiert, das in dieser Studie nicht beobachtet wurde. Diese Unterschiede könnten zum Teil auf die Auflösung der SDS-Gelelektrophorese zurückzuführen sein, die in der vorliegenden Arbeit mit 10-prozentigem Acrylamid eher für größere Moleküle optimiert war und so möglicherweise den Unterschied zwischen 45 kDa und 55 kDa-Fragmenten nicht klar darstellen konnte. Auch kann das Signal bei 45 kDa durch ein internes Spaltprodukt bedingt sein, das keinen C-terminalen *tag* trägt und so durch den genutzten Antikörper nicht detektiert wird. Zudem wurden von Glowacka und Kollegen Virus-ähnliche Partikel (VLPs) untersucht, während in der vorliegenden Arbeit Zelllysate analysiert wurden. Schließlich wurden in der Arbeit von Glowacka und Kollegen höhere Mengen an TMPRSS2 exprimiert als in der vorliegenden Arbeit.

5.1.3 *TMPRSS2 und Trypsin haben eine gemeinsame Spaltstelle in SARS-S*

Aufgrund publizierter Arbeiten wurde angenommen, dass SARS-S durch TMPRSS2 und Trypsin an unterschiedlichen Stellen gespalten werden (Bertram et al. 2011; Simmons et al. 2011). Eine Behandlung mit dem Enzym PNGase F, das alle N-verknüpften Glykane von Proteinen entfernt, zeigte jedoch, dass die Hauptprodukte nach Spaltung mit Trypsin (100 kDa) und TMPRSS2 (85 kDa) nach Deglykosylierung das gleiche Molekulargewicht aufweisen. Dieses weist stark darauf hin, dass die Fragmente sich nicht in der Aminosäuresequenz, sondern im Glykosylierungsmuster unterscheiden. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist, dass es neben der proteolytischen auch eine deglykosylierende Aktivität in der Protease TMPRSS2 gibt. Dafür gibt es jedoch keinen Beleg. Eine andere Möglichkeit ist, dass TMPRSS2 die posttranslationale Modifikation von SARS-S im sekretorischen Weg verändert. So ist es denkbar, dass die Spaltung von SARS-S durch TMPRSS2 vor der vollständigen Prozessierung der Glykane auf der Oberfläche des S-Proteins erfolgt und den weiteren Ablauf dieses Prozesses stört. Dazu würde auch die Beobachtung passen, dass die Doppelbande bei 170 kD und 180 kDa auf Glykoformen von ungespaltenem SARS-S zurückzuführen ist: Nach PNGase F-Behandlung verschwindet die Doppelbande und wird durch eine einzelne, tiefer laufende Bande ersetzt. Ein Abbau des 180 kDa-Signals, der teilweise bei der Kotransfektion mit der TMPRSS2 beobachtet wurde, deutet somit eher auf ein Prozessieren von SARS-S an einer zellulären Lokalisation zwischen der Bildung der *high-mannose* Form (170 kDa) und der Form mit komplexen Glykanen (180 kDa) hin. Die schrittweise Bildung dieser beiden Glykoformen wurde bei Nal et al. 2005 beschrieben. So wird das 180 kDa-Fragment aus Mangel an Substrat in geringerem Maße gebildet. Ein Einfluss von TMPRSS2 auf die Glykosylierung von Proteinen wurde bereits für Influenza-Virus HA (Bertram et al. 2010) und ACE2 (Shulla et al. 2011) gezeigt.

5.1.4 Ursprung des 85 kDa-Fragmentes

Die *trans*-Spaltung zeigte bei Durchführung mit 293T-Zellen das 85 kDa-Fragment, mit BHK-Zellen wurde jedoch kein Signal detektiert, das auf *trans*-Spaltung zurückzuführen war. Dieses Ergebnis wirft mehrere Fragen auf:

Warum kann im BHK-Zellsystem keine *trans*-Spaltung beobachtet werden? Die einfachste Erklärung wäre, dass die Expressionsstärke von SARS-S und/oder TMPRSS2 in diesem System nicht ausreichte, um eine *trans*-Spaltung sichtbar zu machen. Alternativ könnte die Bindung von SARS-S an hACE2 für die nachfolgende *trans*-Spaltung von SARS-S durch TMPRSS2 notwendig sein. Die hACE2-Bindung wäre in 293T-Zellen möglich, da diese Zellen geringe Mengen an endogenem hACE2 exprimieren, das für die Zell-Zellfusion genutzt werden kann. Das Hamster-ACE2, das auf der Oberfläche von BHK-Zellen exprimiert wird, ermöglicht keine oder nur eine geringe Infektion mit dem SARS-CoV, wohl aufgrund einer fehlender Bindung an SARS-S (Hofmann et al. 2006; Li et al. 2011). Diese Hypothese kann untersucht werden, indem die BHK-Zellen mit hACE2 und TMPRSS2-Plasmiden kotransfiziert und anschließend die *trans*-Spaltung von SARS-S untersucht wird. Weiterhin werfen die Ergebnisse die Frage auf, warum nach *trans*-Spaltung von SARS-S in 293T Zellen ein 85 kDa-Fragment (charakteristisch für Spaltung im sekretorischen Weg, siehe oben) und nicht ein 100 kDa-Fragment (charakteristisch für die Spaltung an der Zelloberfläche) generiert wird, obwohl die SARS-S-getriebene Zell-Zellfusion nur auf die Interaktion von Zelloberflächenstrukturen zurückzuführen ist. Die Antwort könnte wieder in der endogenen Expression von hACE2 in 293T Zellen liegen: Sie ist, wie im Zell-Zellfusionstest gezeigt, für die SARS-S-vermittelte Verschmelzung von Zellen ausreichend, was dazu führt, dass TMPRSS2 und SARS-S in denselben Zellen vorliegen - die *trans*-Konditionen wären daher aufgehoben. Diese Möglichkeit kann untersucht werden, indem die hACE2-Expression in 293T-Zellen reduziert (z.B. durch siRNA) oder ausgeschaltet wird (CRISPR/Cas System). Schließlich muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass Shulla et al. 2011 bei Analyse der TMPRSS2-vermittelten *trans*-Spaltung von Virion-assoziiertem SARS-S ein 85 kDa-Fragment detektieren. Dies spricht gegen die Hypothese, dass das 85 kDa-Fragment durch Prozessierung von SARS-S im sekretorischen Weg entsteht. Alternative Mechanismen müssen daher in Betracht gezogen werden.

5.1.5 R667 ist eine Spaltstelle für TMPRSS2

Die Mutation R667A verhinderte die Prozessierung von SARS-S durch Trypsin und TMPRSS2. Da die Expressionsstärke und zelluläre Lokalisation der Mutante R667A im Vergleich zu SARS-S Wildtyp nicht verändert war, ist die fehlende Spaltung dieser Mutante sehr wahrscheinlich nicht auf indirekte Effekte (z.B. fehlende Kollokalisierung mit der Protease), sondern auf eine Entfernung der Proteaseschnittstelle zurückzuführen. Die unterschiedliche Größe der durch Trypsin und TMPRSS2 generierten SARS-S Spaltfragmente (100 kDa bzw. 85 kDa) ist, wie oben diskutiert, auf einen unterschiedlichen Glykanbesatz der Fragmente zurückzuführen. Bergeron und Kollegen konnten zeigen, dass die gleichen Spaltprodukte nach Prozessierung von SARS-S mit löslichem (100 kDa) und membranengebundenem (85 kDa) Furin detektiert werden (Bergeron et al. 2005). Ob die Unterschiede jedoch auf unterschiedliche Glykosylierung zurückzuführen sind, wurde nicht untersucht. Es ist denkbar, dass lösliches und membranständiges Furin, analog zu Trypsin und TMPRSS2, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Einschleusen von SARS-S in den sekretorischen Weg mit dem S-Protein in Kontakt kommen und daher unterschiedliche Glykovarianten von SARS-S spalten kann. Bertram und Kollegen berichteten, dass Spaltung von SARS-S durch HAT, eine mit TMPRSS2 eng verwandte Protease, das 100 kDa-Fragment generiert (Bertram et al.

2011). HAT wird jedoch sehr viel stärker an der Zelloberfläche exprimiert als TMPRSS2 (Böttcher et al. 2006) und es ist daher nicht unerwartet, dass HAT das S-Protein später im sekretorischen Weg spaltet als TMPRSS2. In der Spaltungsanalyse nach Koexpression von SARS-S mit TMPRSS11a konnte ein Fragment von 85 kDa der Spaltung an R667 zugeordnet werden (Abbildung 27). Dies passt zu der Vermutung, dass TMPRSS11a, ähnlich wie TMPRSS2, SARS-S an einem sehr frühen Zeitpunkt im sekretorischen Stoffwechselweg prozessiert. Zusammenfassend konnte R667 als Spaltstelle von TMPRSS2 in SARS-S identifiziert und für TMPRSS11a bestätigt werden. In welchem Bereich des sekretorischen Weges die Spaltung von SARS-S durch TMPRSS11a, TMPRSS2 und HAT stattfindet, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Kollisionsstudien mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie sowie *pulse-chase* Experimente kombiniert mit einer EndoH- und PNGase F-Behandlung könnten diese Frage beantworten. Schließlich ist festzustellen, dass wahrscheinlich nicht nur die Sequenz möglicher Spaltstellen in SARS-S sondern auch der SARS-S-Transport in der Zelle sowie die Konzentration und die posttranslationale Modifikation von Protease und Substrat die Spaltungseffizienz beeinflussen können.

Glowacka und Mitarbeiter konnten zeigen, dass nach SARS-S-Spaltung durch TMPRSS2 S-Protein-Fragmente entstehen, die von den Zellen in den Überstand abgegeben werden (*shedding*) (Glowacka et al. 2011). Die Anwesenheit dieser Fragmente reduzierte die Neutralisation des SARS-S vermittelten Zelleintritts durch Immunsereen. Es ist möglich, dass Spaltung bei R667 zur Produktion löslicher SARS-S-Fragmente führt, die als sogenannte *decoy*-Rezeptoren die Wirkung der humoralen Immunantwort des Wirtes herabsetzen und so die Ausbreitung des SARS-CoV in infizierten Personen fördern. Dieser Mechanismus wird für die Genom-freien Viruspartikel des Hepatitis B Virus diskutiert (Chai et al. 2008). Auch bei einer Infektion mit dem Ebola-Virus wird eine lösliche Form des Glykoproteins in großen Mengen freigesetzt. Für diese Fragmente werden eine Funktion als *decoy*-Rezeptor und weitere immunmodulatorische Effekte diskutiert (Escudero-Pérez et al. 2014; de La Vega et al. 2015). Im Kontext der SARS-CoV-Infektion gibt es jedoch bis jetzt keine Beweise dafür, dass SARS-S-Fragmente von infizierten Zellen freigesetzt werden.

5.1.6 Mutationen im Bereich der Aminosäuren 540-570 verändern das Spaltmuster

Die Analyse der *cis*-Spaltung der SARS-S-Mutanten zeigte, dass Aminosäure-Austausche an mehreren Stellen die Spaltung beeinflussen können. Die Doppelmutante K563A/R566A war unempfindlich gegenüber der Aktivität von Trypsin und TMPRSS2. Dabei fiel jedoch auf, dass von dieser Mutante nur die 170 kDa „*high-mannose*“-Form, die bei Nal et al. 2005 beschrieben wird, nicht aber die 180 kDa-Form mit komplexen Glykanen gebildet wird. Diese Mutante scheint also entweder aufgrund eines fehlenden Transports im Golgi-Apparat den Ort der komplexen N-Glykosylierung nicht zu erreichen oder wird aus anderen Gründen nicht prozessiert. Die Konfokalmikroskopie zeigte eine - im Vergleich zum SARS-S Wildtyp - verstärkte Lokalisation der Mutante im Golgi-Apparat sowie eine reduzierte Expression an der Plasmamembran. Die fehlende Spaltung durch TMPRSS2 und Trypsin ist daher vermutlich auf Defekte im intrazellulären Transport der Mutante zurückzuführen. Interessanterweise wird die Mutante noch immer durch TMPRSS11a geschnitten. Entweder unterscheidet sich der Ort der SARS-S-Prozessierung durch TMPRSS11a vom Ort der SARS-S-Spaltung durch TMPRSS2 und Trypsin oder TMPRSS11a kann eine Glykoform von SARS-S als Substrat nutzen, die nicht durch TMPRSS2 und Trypsin erkannt wird. Schließlich ist anzumerken, dass SARS-S Prozessierung durch TMPRSS11a zur Bildung von sechs bis sieben Fragmenten führt, von denen nur die beiden um 100 kDa bei allen Proben robust und deutlich zu erkennen waren. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Doppel-Mutation K563A/R566A zu einem

leicht veränderten Schnittmuster führt, das unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht deutlich zu erkennen ist.

Die Doppelmutante R543A/K544A war resistent gegen die Spaltung durch Trypsin, sie konnte jedoch noch durch TMPRSS2 und TMPRSS11a prozessiert werden. In Kontrollzellen wurde ein schwaches 180 kDa Signal beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Mutante den sekretorischen Weg weitgehend durchlaufen kann. Es fällt zusätzlich auf, dass das 110 kDa-Fragment bei dieser Aminosäuremutante im Gegensatz zu den meisten anderen Mutanten nicht detektierbar ist. Dieses Fragment entspricht dem erwarteten Molekulargewicht nach einer Spaltung in diesem Bereich. Versuche mit höheren Konzentrationen der Protease, welche verstärkt zum 110 kDa-Fragment führen (siehe Abbildung 13), sollten Gewissheit bringen, ob R543A/K544A eine Spaltstelle ist. Allerdings zeigte die Konfokalmikroskopie eine Akkumulation der Mutante im Golgi-Apparat, was auf einen Faltungs- oder Transportdefekt hindeutet. Da jedoch die 180 kDa-Bande mit dem komplexen Glykosylierungsmuster und das 85 kDa Produkt nach TMPRSS2-Spaltung mit schwacher Intensität detektiert wurde, scheint diese Mutante den sekretorischen Weg in geringen Mengen vollständig zu durchlaufen und den Ort der Prozessierung durch die hier getesteten Proteasen zu erreichen.

5.2 Konfokalmikroskopie

Mit der Konfokalmikroskopie als Verfahren zur Lokalisationsanalyse von zellulären Proteinen gab es in unserer Arbeitsgruppe bisher noch wenig Erfahrung, sodass valide Kriterien für die Auswertung fehlten.

Da der genutzte DiI-Farbstoff alle Membranen und keine definierten Kompartimente anfärbt, sollte der Nachweis des Golgi-Apparates durch eine gezielte Immunfärbung von Golgi-spezifischen Markern verifiziert werden. Für die Messung der Oberflächenexpression sollten die Ergebnisse durch andere, etablierte Verfahren wie die Durchflusszytometrie oder einen Biotinylierungsassay (Böttcher et al. 2006) validiert werden.

Nal und Kollegen haben in Experimenten die Lokalisation von SARS-S mittels Konfokalmikroskopie untersucht (Nal et al. 2005). Hierbei wurde gezeigt, dass SARS-S zeitabhängig entlang des sekretorischen Wegs zu detektieren ist: erst diffus verteilt im ER, wo eine Qualitätskontrolle stattfindet. Anschließend erfolgte der Transport über den Golgi-Apparat zur Zellmembran. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen dieser Studie. Es ist möglich, dass die Mutanten, die eine verstärkte Färbung im Golgi-Apparat vorweisen, langsamer intrazellulär transportiert werden, da sie die Qualitätskontrollen schwieriger durchschreiten oder ihnen Transportsignale fehlen. Dies dürfte insbesondere für die Doppelmutanten R543A/K544A und K563A/R566A zutreffen, für die eine starke intrazelluläre Akkumulation beobachtet wurde. Viele Ergebnisse der Lokalisationsanalyse lassen sich im Kontext anderer Experimente besser einordnen und werden direkt dort beschrieben.

5.3 Zell-Zellfusionen

Die Zell-Zellfusionsassays zeigten eine sehr hohe Varianz zwischen den einzelnen Experimenten. Es waren immer wieder Ausreißer auch in den Kontrollproben zu finden, sodass in die abschließende Beurteilung nur Experimente eingeflossen sind, in denen die Kontrollen dem bisherigen Stand der

Wissenschaft entsprechen. So wird erwartet, dass effiziente, S-Protein-getriebene Zell-Zellfusion nach Expression von hACE2 und/oder TMPRSS2 in Zielzellen beobachtet wird. Die Expression der einzelnen Proteine ist ausreichend für Zell-Zellfusion, da 293T Zellen endogen geringe Mengen an hACE2 und eine bis jetzt nicht identifizierte S-Protein-aktivierende Serin-Protease exprimieren (Bertram et al. 2012). Außerdem wird erwartet, dass die Trypsin-Behandlung von S-Protein-exprimierenden Effektorzellen die Zell-Zellfusion auslöst, da das S-Protein durch Trypsin für die Fusion an der Zelloberfläche aktiviert wird (Simmons et al. 2004). Nach Expression von TMPRSS2 in Zielzellen bzw. nach Trypsin-Behandlung wurde in der vorliegenden Studie wie erwartet S-Protein-abhängige Zell-Zellfusion beobachtet. Allerdings war, im Gegensatz zu Arbeiten von Bertram und Kollegen, die hACE2-Expression in Zielzellen nicht ausreichend für die S-Protein-getriebene Zell-Zellfusion. Es ist möglich, dass die in der vorliegenden Arbeit genutzten 293T-Zellen die bis dato unbekannte, S-Protein-aktivierende Protease nicht exprimieren. Diese Beobachtung sowie eine mögliche Toxizität der TMPRSS2-Expression (Shulla et al. 2011) verkomplizieren zusätzlich zur hohen Variabilität der Ergebnisse die Interpretation der Daten.

5.3.1 Die Fusionsaktivität der Mutanten R543A/K544A und K563A/R566A korreliert mit ihrer Oberflächenexpression

Die N-terminalen Mutanten R543A/K544A und K563A/R566A zeigen in der Zellfusion eine geringere, jedoch nicht vollständig aufgehobene Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die für die Zellfusion relevante Form von SARS-S scheint die Form mit komplexen Glykanen und einem Molekulargewicht von 180 kDa zu sein. Diese ist bei der Mutante, die eine stärkere Zellfusion induziert (R543A/K544A), im Immunoblot zumindest schwach zu detektieren, bei der Doppelmutante mit beinahe aufgehobener Fusionsaktivität (K563A/R566A) gar nicht. So scheint der Hauptgrund für die Unterschiede zum Wildtyp SARS-S für diese beiden Mutanten in der Oberflächenexpression und nicht in der Aktivierbarkeit zu liegen. Dies steht, wie in den Lokalisationsanalysen am Konfokalmikroskop beobachtet, im Einklang mit einer Retention im Golgiapparat und der damit verbundenen verringerten Färbung der Zelloberfläche (siehe Abbildungen 21 und 22).

5.3.2 R667 und R797 beeinflussen die Zellfusion

Die Aminosäure R667 war für die Spaltung von SARS-S durch Trypsin und TMPRSS2 essentiell. Im Gegensatz dazu zeigte sich R667 für die Aktivierung der SARS-S-getriebenen Zell-Zellfusion durch Trypsin und TMPRSS2 weitgehend verzichtbar. Die Mutation dieser Schnittstelle verringerte die Aktivierung im Zell-Zellfusionsassay durch Trypsin und TMPRSS2 nur leicht. Der konträre Phänotyp wurde für R797 beobachtet: Die Mutation dieser Aminosäure zeigte keinen Einfluss auf die S-Protein-Spaltung (siehe oben), sie reduzierte jedoch deutlich die S-Protein Aktivierung durch Trypsin und TMPRSS2 für die Zell-Zellfusion. Die Ergebnisse für Trypsin decken sich mit den Daten, die Belouzard und Kollegen erhielten (Belouzard et al. 2009). Von Belouzard und Kollegen wurde postuliert, dass SARS-S zuerst an der Aminosäure R667 und anschließend an R797 aktiviert wird. Diese These für die Protease Trypsin, die wohl nur *in vitro* SARS-S aktiviert, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt und auf die *in vivo* entscheidende TMPRSS2 erweitert. Die erste Spaltung kann durch verschiedene zelluläre Proteasen an R667 oder einer anderen Stelle zwischen RBD und Fusionspeptid geschehen. Dadurch wird eine weitere Spaltung, die zwingend an R797 stattfinden muss, induziert und schlussendlich die Fusionsmaschinerie in Gang gesetzt. Eine Redundanz der ersten Spaltung kann den nur leichten Effekt aller Mutationen außer an R797 erklären. Es ist auch möglich, dass die erst Konformationsänderung, die

durch Bindung der SARS-S Trimere an hACE2 induziert wird (Beniac et al. 2007), den Proteasen Zugang an der bisher verdeckten Spaltstelle R797 ermöglicht. Dies können Gründe dafür sein, dass unter den genutzten experimentellen Bedingungen keine veränderte Spaltung nach der Mutation von R797 erkannt wurde.

5.4 Virus-Zellfusionen

Bei den Virus-Zellfusionsversuchen wurden im Vergleich zu Zell-Zellfusionen konsistentere Ergebnisse erhalten. Ein kritischer Punkt ist jedoch die fehlende Detektion des MLV-Gag p30 Proteins in den Pseudotypen, die in der Abwesenheit eines viralen Hüllproteins produziert wurden (siehe Abbildung 23). Dies war für mehrere unabhängig hergestellte Pseudotypen-Präparationen der Fall und deutet auf eine fehlende Bildung von Pseudopartikeln hin, was ist für retrovirale Partikel unerwartet ist (Kam et al. 2009). Eine überzeugende Erklärung steht gegenwärtig nicht zur Verfügung. Schließlich ist anzumerken, dass retrovirale Vektoren, die mit SARS-S pseudotypisiert wurden, nicht alle Aspekte des Eintritts von SARS-CoV in Wirtszellen abbilden können. So tragen SARS-CoV-Partikel weitere Strukturproteine in ihrer Hülle, die mit SARS-S und zellulären Faktoren interagieren (McBride und Fielding 2012) und den Eintrittsprozess beeinflussen könnten.

5.4.1 R667 ist verzichtbar für den TMPRSS2-vermittelten Zelleintritt

Die SARS-S-Mutanten R667A und R667A/K672G wurden effizient in die retroviralen Partikel eingebaut (Abbildung 23) und im Virus-Zellfusionstest mit 293T Zielzellen wiesen diese Mutanten eine dem Wildtyp S-Protein vergleichbare Aktivität auf. Auch konnte die Aktivierung dieser Mutanten durch TMPRSS2 die Hemmung des SARS-S-vermittelten Zelleintritts durch Inhibition endosomaler Cysteinproteasen unwirksam machen (siehe Abbildung 25). Das ist insofern bemerkenswert, als dass R667 für die SARS-S-Spaltung essentiell ist (siehe oben) und zur Aktivierung von SARS-Pseudopartikeln durch Trypsin zumindest beitragen kann (Belouzard et al. 2009).

5.4.2 T678 ist nicht wichtig für die SARS-S-Aktivierung durch endosomale Cystein-Proteasen und TMPRSS2

T678 wurde von Bosch et al. 2008 als Schnittstelle der Protease Cathepsin L identifiziert. Da gezeigt wurde, dass Cathepsin L-Aktivität essentiell für den Zelleintritt über den endosomalen Weg ist, wurden die zwei Mutanten T678A und T678S im Virus-Zellfusionsassay getestet. Beide SARS-S Mutanten wurden effizient in retrovirale Partikel eingebaut und wiesen eine dem Wildtyp S-Protein entsprechende Transduktionseffizienz auf. T678 scheint daher für die SARS-S-Aktivierung durch Cathepsin L verzichtbar zu sein. Allerdings ist es auch möglich, dass eine zweite, noch nicht entdeckte Spaltstelle existiert, die nur eine geringe Menge an Spaltprodukt liefert oder erst nach Rezeptorbindung für die Protease zugänglich ist. Ebenfalls denkbar ist, dass Cathepsin L nur als Kofaktor der Aktivierung dient, zum Beispiel durch die Mobilisation einer proteolytischen Kaskade aus mehreren Proteasen. Auch kann es sein, dass die aktivierende Protease nicht Cathepsin L, sondern eine nah verwandte Protease ist, die auch durch die Inhibitoren beeinflusst wird, jedoch an einer anderen Position in SARS-S schneidet.

5.4.3 R797 ist wichtig für die TMPRSS2-vermittelte Aktivierung des spike-Proteins

Kam und Kollegen konnten zeigen, dass die Mutation R797A die Inkorporation dieser SARS-S-Mutante in Pseudotypen aufhebt (Kam et al. 2009). Die in der hier durchgeführten Studie verwendete SARS-S Mutante R797N konnte, im Gegensatz dazu, inkorporiert werden und die Transduktion von hACE2 exprimierenden Zellen vermitteln. Die etwas schwächere Inkorporation scheint ihre Ursache in einem veränderten intrazellulären Transport zu haben, da in den Lokalisationsexperimenten die Mutante R797N auffällig stark im Golgi-Apparat zu detektieren war. Die in einigen Experimenten beobachtete geringere Transduktionseffizienz der Partikel mit SARS-S-Mutante R797N ist wahrscheinlich auf den veränderten Transport zurückzuführen. Es ließ sich kein aktivierender Einfluss von TMPRSS2 auf diese Mutante nachweisen. Auch konnte bei dieser Mutante die Expression von TMPRSS2 auf Zielzellen den Cathepsin-Block nicht mehr umgehen (siehe Abbildung 25). Diese Befunde, sowie die Beobachtungen von Belouzard und Kollegen für die Aktivierung dieser Mutante durch Trypsin, sprechen für eine entscheidende Relevanz dieser Aminosäureposition in der Aktivierung des Zelleintritts an der Zelloberfläche.

5.4.4 Nur die Trypsin-Spaltung an R667 führt zu einer Dissoziation der spike-Untereinheiten

Der fehlende Phänotyp der Mutante R797 in den Spaltungsanalysen wirft die Frage auf, ob an dieser Stelle eine Spaltung stattfindet, die bisher nicht detektiert werden konnte. Durch Vorbehandlung der Pseudotypen mit Trypsin konnte gezeigt werden, dass eine Trypsin-Präinkubation die Infektiosität von SARS-S Pseudopartikeln senkt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Simmons et al. 2004 und Kam et al. 2009 und kann durch die Trypsin-vermittelte Spaltung und anschließender Dissoziation der S1 von der S2 Untereinheit erklärt werden. Das Unterbinden dieser Spaltung durch eine Mutation an R667 schützte vor dem Verlust der Infektiosität und zeigte keine Wirkung auf die Cathpesin L-Abhängigkeit des SARS-S-vermittelten Eintritts. Dieser Versuch lässt darauf schließen, dass es entweder zu keiner zweiten Spaltung an R797 und einer damit verbunden Dissoziation von S1 und S2 kommt, oder dass eine Spaltung an R797 nicht zu einer Dissoziation der beiden Untereinheiten führt. Es ist jedoch auch möglich, dass die von Belouzard et al. 2009 und Kam et al. 2009 postulierte Spaltung an R797 erst nach Rezeptorbindung, Konformationsänderung und anschließender erhöhter Zugänglichkeit dieser Position für Proteasen stattfinden kann. Das wäre insofern für das Virus von Vorteil, dass diese Stelle nur kurz dem Immunsystem preisgegeben wird. Diese These wird dadurch unterstützt, dass in bisherigen Studien nur Sequenzen abseits der Schnittstellen als Immunogene identifiziert wurden (He 2004). Die SARS-S Varianten mit dem V5-tag sollten es ermöglichen in experimentellen Systemen wie der Pseudotypen-Transduktion oder einer Echtviren-Produktion selbst geringe Spaltfragmente zu detektieren und somit Unterschiede in der Spaltung von der Mutante R797N und dem Wildtyp aufzuzeigen.

5.4.5 TMPRSS11a weist nur eine untergeordnete Rolle in der Aktivierung von SARS-S auf

In Spaltungsanalysen wurden die Aminosäuren R620 und R667 als Schnittstellen von TMPRSS11a in SARS-S identifiziert. Die Relevanz dieser Protease und der Spaltstellen für die Aktivierung von SARS-S wurde anschließend auch in funktionellen Experimenten charakterisiert:

Die Expression von TMPRSS11a in Zielzellen führte zu einer leichten Verstärkung des SARS-S-getriebenen Eintritts. Ähnliche Beobachtungen wurden durch Shulla et al. 2011 dokumentiert. Eine Aufhebung der MDL-vermittelten Blockade des S-Protein-getriebenen Zelleintritts, wie sie nach

Expression von TMPRSS2 gemessen wird, war jedoch nicht zu beobachten. R667 wurde bereits bei Kam et al. 2009 als Spalt- und Aktivierungsstelle der Protease TMPRSS11a identifiziert. Zusätzlich wurde dort eine Spaltung bei R797 beobachtet. In der vorliegenden Studie konnten keine Erkenntnisse zum Beitrag von R797 zur SARS-S-Spaltung durch TMPRSS11a gewonnen werden, da die Banden im Bereich der möglichen Spaltprodukte nur sehr schwach ausgeprägt waren. Weitere Versuche mit anderen Protease-Konzentrationen sollten zu einem klareren Bild führen. Die Beobachtung, dass die Aktivierung durch TMPRSS11a keinen Cathepsin L-unabhängigen Eintritt erlaubt, weist darauf hin, dass TMPRSS11a keine größere Rolle in der SARS-CoV-Ausbreitung im Wirt spielt. Dies wird auch durch Versuche von Shulla et al. 2011 mit dem nativen SARS-CoV bestätigt. Die SARS-S-Mutanten R620A und R667A konnten nicht durch TMPRSS11a gespalten werden, zeigten jedoch in der Zell-Zellfusion und in der Virus-Zellfusion keine auffälligen Unterschiede zum SARS-S-Wildtyp. Diese Diskrepanz zwischen Spaltung und Aktivierung deckt sich mit den Ergebnissen der TMPRSS2-Experimente.

5.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit hergestellten Glykoprotein-Mutanten mit V5-tag und die erzielten Ergebnisse sind eine Aufforderung, weiter in diesem Feld zu arbeiten. Eine der Kernfragen, die dieses Projekt aufwirft, ist, inwieweit effiziente SARS-S-Spaltung in *zis* mit Aktivierung korreliert. Insbesondere folgende Aminosäure-Positionen in SARS-S illustrieren diese Problematik:

R667 ist eine Spaltstelle für unterschiedliche Proteasen. Für die Aktivierung von SARS-S durch TMPRSS2, Trypsin und TMPRSS11a ist sie jedoch entbehrlich. Möglicherweise erhält sie jedoch als „Sollbruchstelle“ für die Produktion von löslichem *spike*, das der Immunabwehr des Wirtes entgegenwirkt, eine besondere Bedeutung für die virale Pathogenität.

R797 ist keine offensichtliche Spaltstelle, hat jedoch einen großen Einfluss auf den Zelleintritt. Die Beobachtung, dass die Mutation von R667 Partikel vor der Inaktivierung durch Trypsin schützt, weist darauf hin, dass eine weitere Spaltung von SARS-S in Viruspartikeln nur unter besonderen Umständen möglich ist. Die Vielzahl von Spaltprodukten durch die Protease TMPRSS2 scheint eher eine Besonderheit der *zis*-Konditionen zu sein. R797 könnte eine Spaltstelle sein, die nur unter geeigneten Bedingungen wie z.B. nach Rezeptorbindung als solche fungiert und so die Aktivierung der Fusionsmaschinerie streng reguliert. Eine frühe Spaltung schon bei der Produktion der Viruspartikel wäre aufgrund der möglichen Dissoziation der *spike*-Untereinheiten von Nachteil.

Ein gänzlich anderer Ansatz beruht darauf, dass TMPRSS2 als Initiator einer katalytischen Kaskade andere Proteasen wie Matriptase aktiviert (Ko et al. 2015). Sollte eine durch TMPRSS2 aktivierte Protease wiederum SARS-S spalten und aktivieren, wird die Mutation von TMPRSS2-spezifischen Spaltstellen keinen Einfluss haben, eine Inhibition der Protease jedoch schon. Diese Möglichkeit ist im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen und kann die Diskrepanz zwischen Spaltung an R667 und Aktivierung an R797 erklären. Eine experimentelle Verifizierung ist jedoch nicht einfach.

Diese Erklärungsmodelle müssen nun in zielgerichteten Experimenten untersucht werden. Das in dieser Studie genutzte experimentelle System ist durch Einflussfaktoren, wie die Lokalisation und Konzentration der Proteasen, das Fehlen eines Immunsystems und die Nutzung einer Laborzelllinie, sehr artifiziell. So sollten Experimente mit dem vollständigen Virus an Lungenepithelien durchgeführt werden, welches als experimentelles System die Situation *in vivo* besser abbildet. Hier können die V5-getaggen SARS-S-Mutanten hilfreich sein, um Spaltfragmente mit hoher Effizienz nachweisen zu können.

Zusätzlich kann auch die variable Stamm-Domäne der TTSPs mit in die Betrachtung einbezogen werden. Die Funktionen der dort lokalisierten Untereinheiten sind nur zu einem geringen Teil verstanden. Die Beobachtung, dass die Stamm-Domäne die Internalisierung von Makromolekülen induziert (Choi et al. 2009), ließe eine Funktion im viralen Zelleintritt abseits der proteolytischen Spaltung zu. So scheint auch eine proteolytisch inaktive Form der TMPRSS2 die Progression von Prostata-Karzinomen zu induzieren (Vaarala et al. 2001). Eine proteolytisch inaktive TMPRSS2 wäre ein nützliches System, um zu ergründen, ob die Proteasedomäne der TMPRSS2 entscheidend für die Aktivierung von SARS-S ist. Doch ohne diese Domäne ist die TMPRSS2 nicht zur autokatalytischen Aktivierung fähig und verbleibt als inaktive Vorstufe (Shulla et al. 2011), deren Funktion auch Abseits der Proteolyse von der aktiven Form abweichen könnte. Die Beobachtung, dass TMPRSS2 den SARS-CoV-Rezeptor ACE2 spaltet und dies die Infektion mit dem Virus verstärkt (Shulla et al. 2011; Heurich et al. 2014), ist ein Hinweis auf weitere Mechanismen abseits der Aktivierung des Fusionsproteins, in welche TMPRSS2 involviert ist.

5.5.1 Mögliche Konsequenzen für die antivirale Therapie

TMPRSS2 wird als Ziel für antivirale Therapie diskutiert. Die hohe Anzahl an ganz unterschiedlichen Viren, die durch diese Protease aktiviert werden, insbesondere im respiratorischen Bereich, verspricht ein breites Wirkungsspektrum für einen spezifischen Inhibitor. Da die TMPRSS2 ein Wirtsmolekül ist, sind dem Entstehen von Resistenzen hohe Hürden gesetzt. Auch ist bisher noch keine physiologische Funktion der TMPRSS2 bekannt bzw. zeigen *knock-out*-Mäuse für das *tmprss2*-Gen keinen Phänotyp, was geringe Nebenwirkungen verspricht (Kim et al. 2006). So wäre ein Medikament, das auf der Inhibition von TMPRSS2 basiert, ein sehr vielversprechender Therapieansatz. Für den Serinprotease-Inhibitor Camostat Mesylat, der im asiatischen Raum gegen chronische Pankreatitis eingesetzt wird (Motoo 2007; Nagashio und Otsuki 2007) konnte im Tiermodell ein starker Effekt auf das Überleben von mit SARS-CoV infizierten Mäuse gezeigt werden (Zhou et al. 2015). Zudem hat die Suche nach spezifischeren Inhibitoren der TMPRSS2 bereits begonnen (Meyer et al. 2013).

Da das SARS-CoV nicht mehr auftritt, sind klinische Studien am Menschen schwer möglich. Die Entwicklung und Serienreife von Medikamenten, die auf der Inhibition von TMPRSS2 basieren, gegen andere, häufigere Infektionen wie Hepatitis C, RSV und Influenza, ist jedoch wahrscheinlicher. Grundlagenforschung, wie in dieser Arbeit durchgeführt, ist essentiell, um die Nutzung solcher Medikamente auch für das SARS-Coronavirus zu evaluieren und auch neue Therapie-Konzepte zu finden. Ein Beispiel für die Nutzung etablierter Medikamente gegen seltene Pathogene auf Grundlage von *in-vitro*-Experimenten ist der erfolgreiche Einsatz von Malariamedikamenten gegen eine Infektion mit dem Ebolavirus (Gignoux et al. 2016). Für die Entwicklung spezifischer Medikamente ist es wichtig zu verstehen, an welchem Punkt des viralen Vermehrungszyklus TMPRSS2 mit dem S-Protein interagiert und die Virusvermehrung durch TMPRSS2-Inhibitoren gestoppt werden kann. Die Lösung folgender grundsätzlicher Fragen, die durch dieses Projekt aufkommen, sind auch für die Therapie von Relevanz: Unter welchen Konditionen ist R797 eine Spaltstelle? Welche Funktion hat die von vielen Proteasen erkannte Position R667, wenn nicht die Aktivierung an der Zelloberfläche? Wo und wie genau aktiviert TMPRSS2 das Fusionsprotein? Gibt es Mechanismen neben der proteolytischen Aktivierung, durch welche TMPRSS2 die Ausbreitung des Virus im infizierten Wirt unterstützt?

Ein tieferes Verständnis der Biologie ermöglicht es, die Schwachstellen eines Virus zu finden und therapeutisch zu nutzen. Dieses Grundlagenwissen kann bei Ausbrüchen in der Größenordnung des SARS-CoV einen Zeitgewinn geben und Leben retten.

6 Literaturverzeichnis

- Abe M, Tahara M, Sakai K, Yamaguchi H, Kanou K, Shirato K, Kawase M, Noda M, Kimura H, Matsuyama S, et al. (2013): TMPRSS2 Is an Activating Protease for Respiratory Parainfluenza Viruses. *J Virol* 87, 11930–11935
- Afar DEH, Vivanco I, Hubert RS, Kuo J, Chen E, Saffran DC, Raitano AB, Jakobovits A (2001): Catalytic Cleavage of the Androgen-regulated TMPRSS2 Protease Results in Its Secretion by Prostate and Prostate Cancer Epithelia. *Cancer Res* 61, 1686–1692
- Affymetrix (2015): USB® Shrimp Alkaline Phosphatase.
- Alberts B, Wilson J, Hunt T, Johnson A: *Molecular biology of the cell: 5. Auflage*; Garland Science, New York, NY [u.a.] 2008
- Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K: Performing and Optimizing Western Blots with an Emphasis on Chemiluminescent Detection. In: Burgess RR, Deutscher MP (Hrsg.): *Methods in Enzymology*. Band 463, Kapitel 33. Academic Press 2009, 573–599
- Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah EE, Badu EK, Anti P, Agbenyega O, Meyer B, et al. (2013): Human Betacoronavirus 2c EMC/2012–related Viruses in Bats, Ghana and Europe. *Emerg Infect Dis* 19, 456–459
- Antalis TM, Bugge T, Wu Q (2011): Membrane-anchored serine proteases in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 99, 1–50
- Babcock GJ, Eshshaki DJ, Thomas WD, Ambrosino DM (2004): Amino Acids 270 to 510 of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Are Required for Interaction with Receptor. *J Virol* 78, 4552–4560
- Bartosch B, Dubuisson J, Cosset F-L (2003): Infectious Hepatitis C Virus Pseudo-particles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J Exp Med* 197, 633–642
- Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR (2009): Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5871–5876
- Belouzard S, Madu I, Whittaker GR (2010): Elastase-mediated Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein at Discrete Sites within the S2 Domain. *J Biol Chem* 285, 22758–22763
- Beniac DR, deVarenes SL, Andonov A, He R, Booth TF (2007): Conformational Reorganization of the SARS Coronavirus Spike Following Receptor Binding: Implications for Membrane Fusion. *PLoS ONE* 2, e1082
- Bergeron E, Vincent MJ, Wickham L, Hamelin J, Basak A, Nichol ST, Chrétien M, Seidah NG (2005): Implication of proprotein convertases in the processing and spread of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Biochem Biophys Res Commun* 326, 554–563
- Bermingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, Hoschler K, Brown K, Galiano M, Myers R, et al. (2012): Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 17, 20290

- Bertram S, Glowacka I, Blazejewska P, Soilleux E, Allen P, Danisch S, Steffen I, Choi S-Y, Park Y, Schneider H, et al. (2010): TMPRSS2 and TMPRSS4 Facilitate Trypsin-Independent Spread of Influenza Virus in Caco-2 Cells. *J Virol* 84, 10016–10025
- Bertram S, Glowacka I, Müller MA, Lavender H, Gnirss K, Nehlmeier I, Niemeyer D, He Y, Simmons G, Drosten C, et al. (2011): Cleavage and activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by human airway trypsin-like protease. *J Virol* 85, 13363–13372
- Bertram S, Heurich A, Lavender H, Gierer S, Danisch S, Perin P, Lucas JM, Nelson PS, Pöhlmann S, Soilleux EJ (2012): Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts. *PloS One* 7, e35876
- Bosch BJ, Zee R van der, Haan CAM de, Rottier PJM (2003): The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J Virol* 77, 8801–8811
- Bosch BJ, Bartelink W, Rottier PJM (2008): Cathepsin L Functionally Cleaves the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Class I Fusion Protein Upstream of Rather than Adjacent to the Fusion Peptide. *J Virol* 82, 8887–8890
- Böttcher E, Matrosovich T, Beyerle M, Klenk H-D, Garten W, Matrosovich M (2006): Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium. *J Virol* 80, 9896–9898
- Bugge TH, Antalis TM, Wu Q (2009): Type II Transmembrane Serine Proteases. *J Biol Chem* 284, 23177–23181
- Chai N, Chang HE, Nicolas E, Han Z, Jarnik M, Taylor J (2008): Properties of Subviral Particles of Hepatitis B Virus. *J Virol* 82, 7812–7817
- Choi S-Y, Bertram S, Glowacka I, Park YW, Pöhlmann S (2009): Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections. *Trends Mol Med* 15, 303–312
- Corley RB: A guide to methods in the biomedical sciences. Springer, New York, NY 2005
- Du L, Kao RY, Zhou Y, He Y, Zhao G, Wong C, Jiang S, Yuen K-Y, Jin D-Y, Zheng B-J (2007): Cleavage of spike protein of SARS coronavirus by protease factor Xa is associated with viral infectivity. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 174–179
- Escudero-Pérez B, Volchkova VA, Dolnik O, Lawrence P, Volchkov VE (2014): Shed GP of Ebola Virus Triggers Immune Activation and Increased Vascular Permeability. *PLoS Pathog* 10, e1004509
- Esumi M, Ishibashi M, Yamaguchi H, Nakajima S, Tai Y, Kikuta S, Sugitani M, Takayama T, Tahara M, Takeda M, Wakita T (2015): Transmembrane serine protease TMPRSS2 activates hepatitis C virus infection. *Hepatology* 61, 437–446
- Fareed GC, Richardson CC (1967): Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. II. The structural gene for polynucleotide ligase in bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58, 665–672
- Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M (2013): LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 7306–7311
- Gierer S: Functional analysis of the MERS-coronavirus spike protein, Dissertation, Göttingen (2014)

- Gierer S, Bertram S, Kaup F, Wrensch F, Heurich A, Krämer-Kühl A, Welsch K, Winkler M, Meyer B, Drosten C, et al. (2013): The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J Virol* 87, 5502–5511
- Gignoux E, Azman AS, de Smet M, Azuma P, Massaquoi M, Job D, Tiffany A, Petrucci R, Sterk E, Potet J, et al. (2016): Effect of Artesunate–Amodiaquine on Mortality Related to Ebola Virus Disease. *N Engl J Med* 374, 23–32
- Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, Steffen I, Tsegaye TS, He Y, Gnirss K, et al. (2011): Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol* 85, 4122–4134
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4645–4649
- de Haan CAM, Kuo L, Masters PS, Vennema H, Rottier PJM (1998): Coronavirus Particle Assembly: Primary Structure Requirements of the Membrane Protein. *J Virol* 72, 6838–6850
- Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580
- Harrison SC: Principles of Virus structure. In: *Fields Virology*. Section I: General Virology. 6. Auflage; Lippincott, Williams&Wilkins, Philadelphia 2013, 52-86
- Hayden FG (2013): Advances in antivirals for non-influenza respiratory virus infections. *Influenza Other Respir Viruses* 7, 36–43
- Heurich A, Hofmann-Winkler H, Gierer S, Liepold T, Jahn O, Pöhlmann S (2014): TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Virol* 88, 1293–1307
- Higuchi R, Krummel B, Saiki RK (1988): A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16, 7351–7367
- Hofmann H, Pöhlmann S (2004): Cellular entry of the SARS coronavirus. *Trends Microbiol* 12, 466–472
- Hofmann H (2004a): S Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Mediates Entry into Hepatoma Cell Lines and Is Targeted by Neutralizing Antibodies in Infected Patients. *J Virol* 78, 6134–42
- Hofmann H, Geier M, Marzi A, Krumbiegel M, Peipp M, Fey GH, Gramberg T, Pöhlmann S (2004b): Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 1216–1221
- Hofmann H, Simmons G, Rennekamp AJ, Chaipan C, Gramberg T, Heck E, Geier M, Wegele A, Marzi A, Bates P, Pöhlmann S (2006): Highly Conserved Regions within the Spike Proteins of Human Coronaviruses 229E and NL63 Determine Recognition of Their Respective Cellular Receptors. *J Virol* 80, 8639–8652

- Hofmann MA, Brian DA (1991): Sequencing PCR DNA amplified directly from a bacterial colony. *BioTechniques* 11, 30–31
- Honig MG, Hume RI (1986): Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol* 103, 171–187
- Kam Y-W, Okumura Y, Kido H, Ng LFP, Bruzzone R, Altmeyer R (2009): Cleavage of the SARS Coronavirus Spike Glycoprotein by Airway Proteases Enhances Virus Entry into Human Bronchial Epithelial Cells In Vitro. *PLoS ONE* 4 e7870
- Kawase M, Shirato K, van der Hoek L, Taguchi F, Matsuyama S (2012): Simultaneous Treatment of Human Bronchial Epithelial Cells with Serine and Cysteine Protease Inhibitors Prevents Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry. *J Virol* 86, 6537–6545
- Kim TS, Heinlein C, Hackman RC, Nelson PS (2006): Phenotypic Analysis of Mice Lacking the Tmprss2-Encoded Protease. *Mol Cell Biol* 26, 965–975
- Klumperman J, Locker JK, Meijer A, Horzinek MC, Geuze HJ, Rottier PJ (1994): Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding. *J Virol* 68, 6523–6534
- Ko CJ, Huang CC, Lin HY, Juan CP, Lan SW, Shyu HY, Wu SR, Hsiao PW, Huang HP, Shun CT, Lee MS (2015): Androgen-induced TMPRSS2 activates matriptase and promotes extracellular matrix degradation, prostate cancer cell invasion, tumor growth and metastasis. *Cancer Res*, 75, 2949-2960
- Krokhin O, Li Y, Andonov A, Feldmann H, Flick R, Jones S, Strocher U, Bastien N, Dasuri KVN, Cheng K, et al. (2003): Mass Spectrometric Characterization of Proteins from the SARS Virus A Preliminary Report. *Mol Cell Proteomics* 2, 346–356
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, et al. (2003): A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348, 1953–1966
- Kuiken T, Fouchier RA, Schutten M, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, Laman JD, de Jong T, van Doornum G, Lim W, et al. (2003): Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet* 362, 263–270
- Lacks S, Greenberg B (1975): A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *J Biol Chem* 250, 4060–4066
- Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, Wong SS, Leung SY, Chan KH, Yuen KY (2005): Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14040–14045
- de La Vega M-A, Wong G, Kobinger GP, Qiu X (2015): The Multiple Roles of sGP in Ebola Pathogenesis. *Viral Immunol* 28, 3–9
- Li KK, (2011): Characterisation of animal angiotensin-converting enzyme 2 receptors and use of pseudotyped virus to correlate receptor binding with susceptibility of SARS-CoV infection. *Hong Kong Med J* 2012;18(Suppl 3):S35-8
- Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, et al. (2003): Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426, 450–454
- Lottspeich F, Engels JW: *Bioanalytik. 2., aktualisierte und erw. Aufl*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, Nachdruck 2009

- Luyt C-É, Combes A, Trouillet J-L, Nieszkowska A, Chastre J (2011): Virus-induced acute respiratory distress syndrome: Epidemiology, management and outcome. *Presse Médicale* **40**, e561–e568
- Marra MA, Jones SJM, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YSN, Khattri J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, et al. (2003): The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **300**, 1399–1404
- Marre R, Battegay M: *Klinische Infektiologie: Infektionskrankheiten erkennen und behandeln ; mit 253 Tabellen. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage*; Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.] 2008
- Masters PS, Perlman S: Coronaviridae. In: *Fields Virology. Section II: Specific Virus families. 6. Auflage*; Lippincott, Williams&Wilkins, Philadelphia 2013, 825-858
- Matsuyama S, Ujike M, Morikawa S, Tashiro M, Taguchi F (2005): Protease-mediated enhancement of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12543–12547
- Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F (2010): Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol* **84**, 12658–12664
- McBride R, Fielding BC (2012): The Role of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)-Coronavirus Accessory Proteins in Virus Pathogenesis. *Viruses* **4**, 2902–2923
- Meyer D, Sielaff F, Hammami M, Böttcher-Friebertshäuser E, Garten W, Steinmetzer T (2013): Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease TMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation. *Biochem J* **452**, 331–343
- Mikolajczyk R, Krumkamp R, Bornemann R, Ahmad A, Schwehm M, Duerr HP (2009): Influenza-Insights From Mathematical Modelling. *Dtsch Aerzteblatt Online*.
<http://www.aerzteblatt.de/int/archive/article?id=66816> [Zugriff 04.07.2016]
- Modrow S: *Molekulare Virologie. 3. Auflage*; Spektrum Akad. Verl., Heidelberg 2010
- Molecular Probes, inc. (2011): *Vybrant Cell-Labeling Solutions. Product Information*, revised 08-February-2011. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp22885.pdf> [Zugriff am 04.07.2016]
- Motoo Y (2007): Antiproteases in the treatment of chronic pancreatitis. *JOP J Pancreas* **8**, 533–537
- Nagashio Y, Otsuki M (2007): Action of antiproteases on fibrosis in experimental chronic pancreatitis. *JOP J Pancreas* **8**, 495–500
- Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, Kam J, Staropoli I, Crescenzo-Chaigne B, Escriou N, et al. (2005): Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. *J Gen Virol* **86**, 1423–1434
- Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263–267
- Nguyen C, Kaku S, Tutera D, Kuschner WG, Barr J (2015): Viral Respiratory Infections of Adults in the Intensive Care Unit. *J Intensive Care Med* 0885066615585944

- Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (2014): Surveillance für Influenza und andere akute respiratorische Erkrankungen in Niedersachsen 2013/2014
http://www.nlga.niedersachsen.de/download/90167/Saison_2013_2014.pdf [Zugriff 06.07.2016]
- Paoloni-Giacobino A, Chen H, Peitsch MC, Rossier C, Antonarakis SE (1997): Cloning of the TMPRSS2 Gene, Which Encodes a Novel Serine Protease with Transmembrane, LDLRA, and SRCR Domains and Maps to 21q22.3. *Genomics* **44**, 309–320
- Rohde G, Drosten C, Borg I, Hauptmeier B, Ringshausen F, Schultze-Werninghaus G, Überla K (2009): Nachweis von Atemwegsviren – Wie, warum, wann und wo? *Pneumologie* **63**, 14–22
- Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Peñaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen M-H, et al. (2003): Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**, 1394–1399
- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1986): Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**, 163–166
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491
- Sales KU, Hobson JP, Wagenaar-Miller R, Szabo R, Rasmussen AL, Bey A, Shah MF, Molinolo AA, Bugge TH (2011): Expression and Genetic Loss of Function Analysis of the HAT/DESC Cluster Proteases TMPRSS11A and HAT. *PLoS ONE* **6**, e23261
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463–5467
- Shirato K, Kawase M, Matsuyama S (2013): Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Mediated by the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *J Virol* **87**, 12552–12561
- Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro N, Takeuchi H, Nakatsu Y, Tahara M, Kikuta H, Yanagi Y (2008): Efficient Multiplication of Human Metapneumovirus in Vero Cells Expressing the Transmembrane Serine Protease TMPRSS2. *J Virol* **82**, 8942–8946
- Shulla A, Heald-Sargent T, Subramanya G, Zhao J, Perlman S, Gallagher T (2011): A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *J Virol* **85**, 873–882
- Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, et al. (2003): DC-SIGN and DC-SIGNR Bind Ebola Glycoproteins and Enhance Infection of Macrophages and Endothelial Cells. *Virology* **305**, 115–123
- Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, Amberg SM, Piefer AJ, Bates P (2004): Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4240–4245
- Simmons G, Gosalia DN, Rennekamp AJ, Reeves JD, Diamond SL, Bates P (2005): Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11876–11881
- Simmons G, Bertram S, Glowacka I, Steffen I, Chaipan C, Agudelo J, Lu K, Rennekamp AJ, Hofmann H, Bates P, Pöhlmann S (2011): Different host cell proteases activate the SARS-coronavirus spike-protein for cell-cell and virus-cell fusion. *Virology* **413**, 265–274

- Simmons G, Zmora P, Gierer S, Heurich A, Pöhlmann S (2013): Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral Res* 100, 605–614
- Stamminger T, Gstaiger M, Weinzierl K, Lorz K, Winkler M, Schaffner W (2002): Open Reading Frame UL26 of Human Cytomegalovirus Encodes a Novel Tegument Protein That Contains a Strong Transcriptional Activation Domain. *J Virol* 76, 4836–4847
- Stertz S, Reichelt M, Spiegel M, Kuri T, Martínez-Sobrido L, García-Sastre A, Weber F, Kochs G (2007): The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. *Virology* 361, 304–315
- Strachan T, Read AP: *Molekulare Humangenetik*. 3. Auflage; Elsevier, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg 2005
- Szabo R, Wu Q, Dickson RB, Netzel-Arnett S, Antalis TM, Bugge TH (2003): Type II transmembrane serine proteases. *Thromb. Haemost.* 2003; 90: 185–93
- Tseng Y-T, Wang S-M, Huang K-J, Lee AI-R, Chiang C-C, Wang C-T (2010): Self-assembly of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Membrane Protein. *J Biol Chem* 285, 12862–12872
- Uhlén M (2008): Affinity as a tool in life science. *BioTechniques* 44 Supplement, 649–654
- Uhlén M, Nilsson B, Guss B, Lindberg M, Gatenbeck S, Philipson L (1983): Gene fusion vectors based on the gene for staphylococcal protein A. *Gene* 23, 369–378
- Vaarala MH, Porvari K, Kyllönen A, Lukkarinen O, Vihko P (2001): The TMPRSS2 gene encoding transmembrane serine protease is overexpressed in a majority of prostate cancer patients: Detection of mutated TMPRSS2 form in a case of aggressive disease. *Int J Cancer* 94, 705–710
- Wacharapluesadee S, Duengkae P, Rodpan A, Kaewpom T, Maneeorn P, Kanchanasaka B, Yingsakmongkon S, Sittidetboripat N, Chareesaen C, Khlangsap N, et al. (2015): Diversity of coronavirus in bats from Eastern Thailand. *Virol J* 12, 57
- Wang P, Chen J, Zheng A, Nie Y, Shi X, Wang W, Wang G, Luo M, Liu H, Tan L, et al. (2004): Expression cloning of functional receptor used by SARS coronavirus. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 439–444
- Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, Maejima M, Fukushi S, Morikawa S, Taguchi F (2008): Entry from the Cell Surface of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus with Cleaved S Protein as Revealed by Pseudotype Virus Bearing Cleaved S Protein. *J Virol* 82, 11985–11991
- WHO (2003): Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS). <http://www.who.int/csr/sars/en/WHOconsensus.pdf> [Zugriff am 05.07.2016]
- Winship PR (1989): An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res* 17, 1266
- Wong SK, Li W, Moore MJ, Choe H, Farzan M (2004): A 193-Amino Acid Fragment of the SARS Coronavirus S Protein Efficiently Binds Angiotensin-converting Enzyme 2. *J Biol Chem* 279, 3197–3201
- Yuxian He YZ (2004): Identification of Immunodominant Sites on the Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus: Implication for Developing SARS Diagnostics and Vaccines. *J Immunol Baltim Md 1950* 173, 4050–7

- Zagursky RJ, Baumeister K, Lomax N, Berman ML (1985): Rapid and easy sequencing of large linear double-stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. *Gene Anal Tech* 2, 89–94
- Zhou Y, Vedantham P, Lu K, Agudelo J, Carrion R, Nunneley JW, Barnard D, Pöhlmann S, McKerrow JH, Renslo AR, Simmons G (2015): Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Res* 116, 76–84
- Ziebuhr J (2004): Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Curr Opin Microbiol* 7, 412–419
- Accuprimepfx_man.pdf. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/accuprimepfx_man.pdf
[Zugriff am 04.09.2015]
- V5 Epitope Tag Antibody Monoclonal (E10/V4RR) (MA5-15253). <http://www.pierce-antibodies.com/V5-Epitope-Tag-antibody-clone-E10V4RR-Monoclonal--MA515253.html>
[Zugriff am 31.08.2015]

7 Anhang

7.1 Weitere Abbildungen

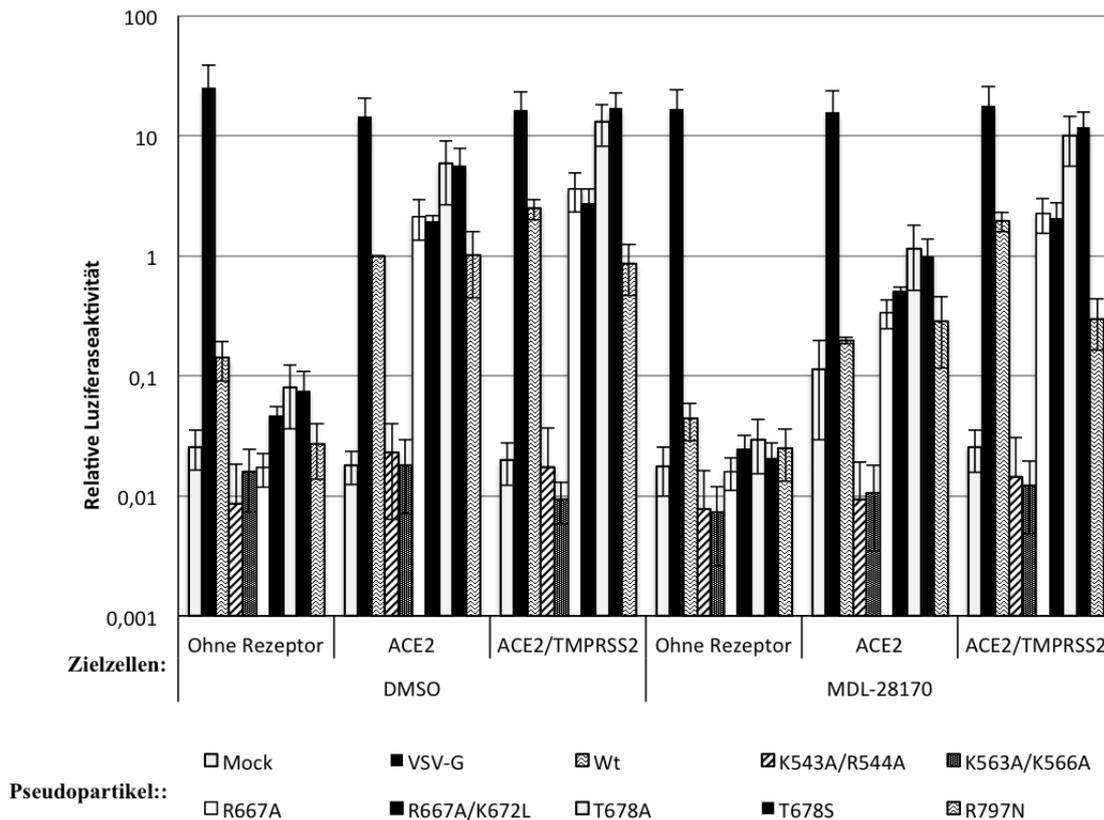
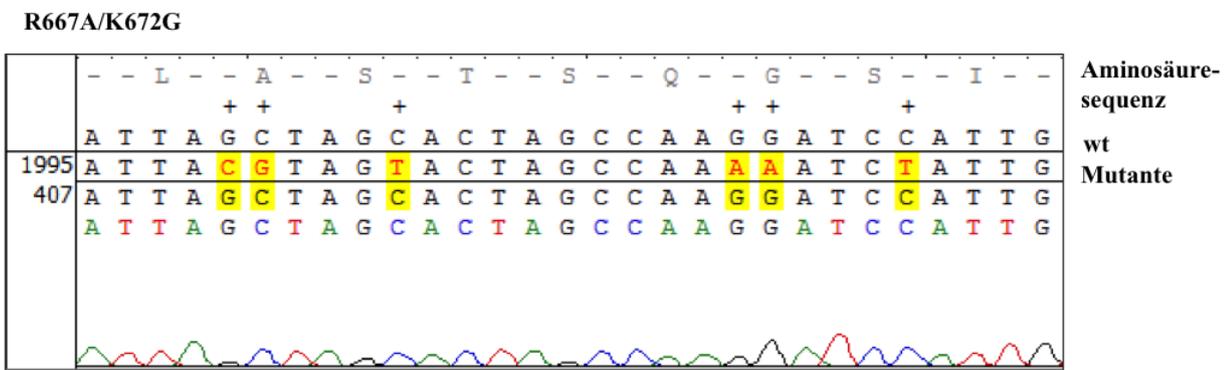
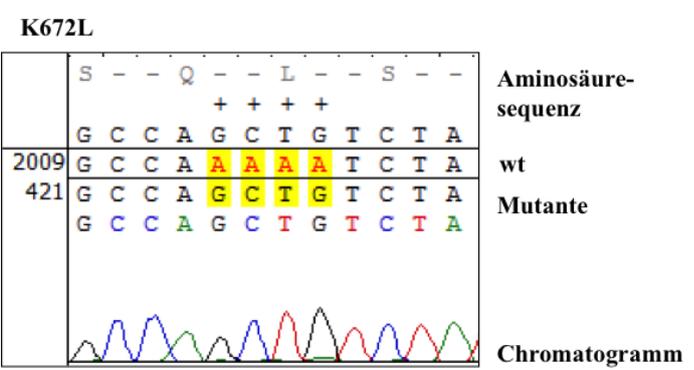
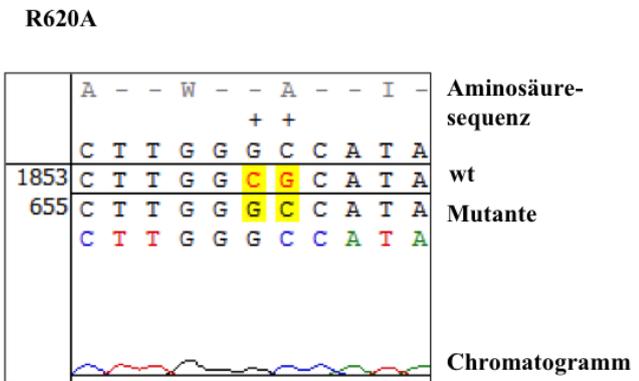
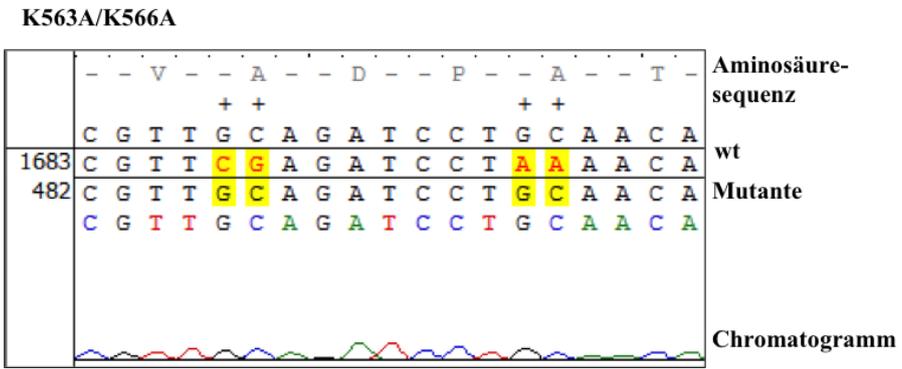
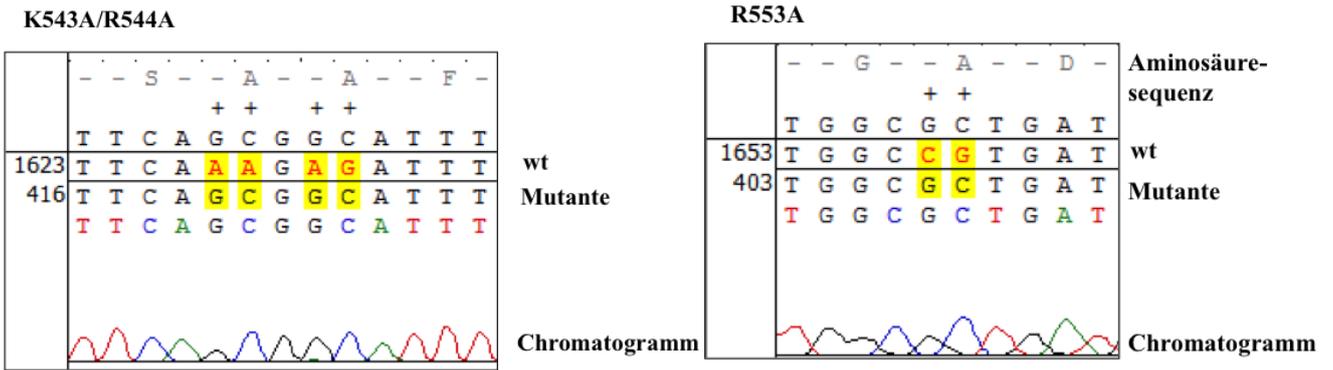


Abbildung 30: Kumulative Auswertung der Pseudotypen-basierten Virus-Zellfusionen, im Ergebnisteil sind für eine bessere Übersichtlichkeit nur Teilaspekte gezeigt. Für jede Mutante wurden mindestens drei unabhängige Experimenten in Triplikaten durchgeführt. Infektion von hACE2 exprimierenden Zellen mit SARS-S Wildtyp wurde als eins gesetzt. Versuchsaufbau siehe Abbildungen 24 und 26.



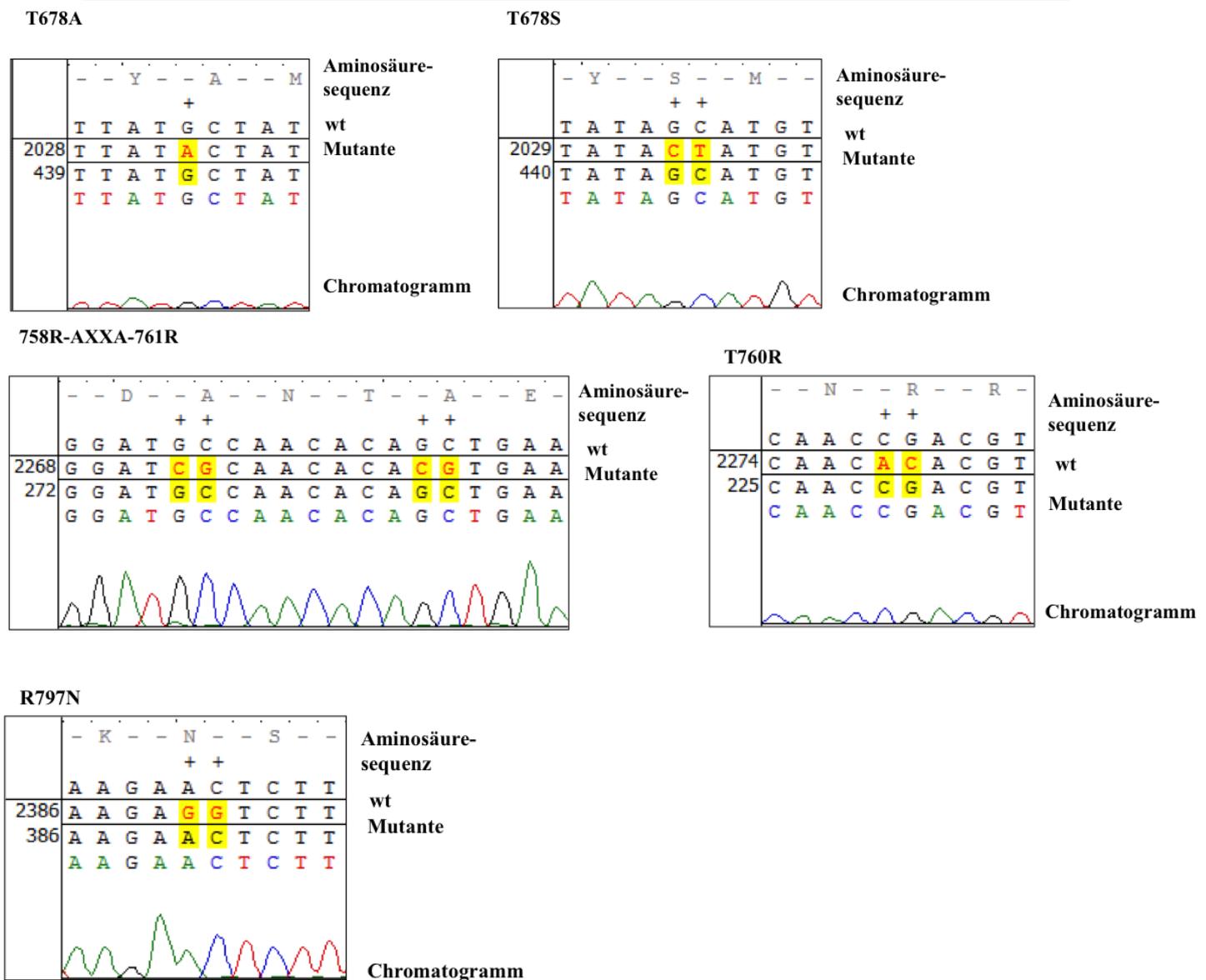


Abbildung 31: Sequenzierung der SARS-Spike-Mutanten mit dem Programm ContigExpress visualisiert. Oben in den Diagrammen ist die aus der Sequenzierung hervorgehende Aminosäuresequenz zu sehen. Darunter neben der Konsensus-Sequenz die Sequenz des Wildtyp-Spike-Proteins und die ermittelte der jeweiligen Mutante. Änderungen zum Wildtyp sind gelb hervorgehoben und zuunterst ist das Chromatogramm der Sequenzierung zu sehen.

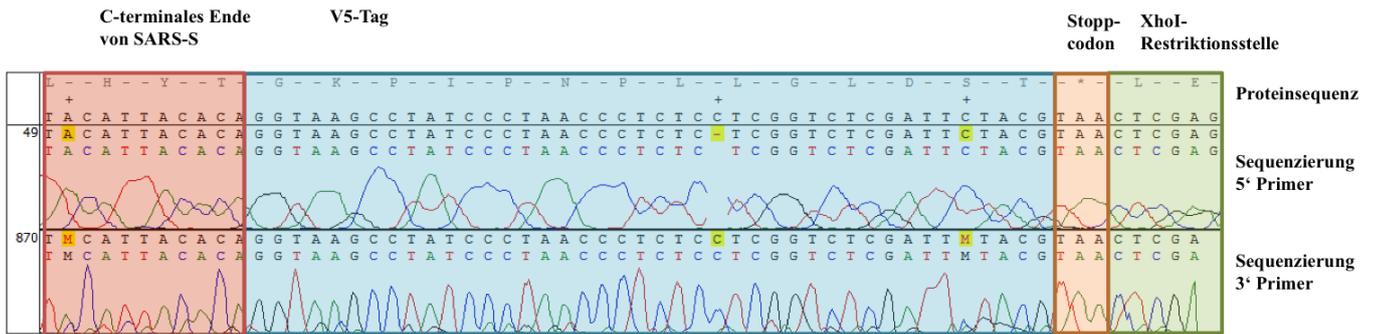


Abbildung 32: Sequenzierung über den C-Terminus von SARS-S und den V5-Tag mit Contig-Express visualisiert

Danksagung

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Frau Dr. Heike Hofmann-Winkler danken, die das Experiment eines Humanmediziners in einem Labor voller Biologen initiiert hat und mir in der ersten Phase des Projektes persönlich und auch weiterhin immer mit Rat, Tat und Verständnis zur Seite stand. Im weiteren Verlauf des Projektes gilt ein großer Gesamt-Dank, der aus unzähligen Einzel-Danken besteht, PD Dr. Michael Winkler, Professor Dr. Pöhlmann und jedem Mitarbeiter der Sektion Infektionsbiologie, insbesondere Florian und Sabine aus dem Labor drei, die allesamt meine Betreuung übernommen haben und mich mit geduldigen Erklärungen, inspirierenden Diskussionen, tatkräftiger Hilfe, peniblen Korrekturen, manchem Vortrag und auch Kaffee durch den Promotionsprozess geführt haben. Zu guter Letzt möchte ich mich bei den außerinstitutlichen Korrektoren Christopher, Cynthia, Olaf, Ronja und Svenja bedanken, die so manchen Rechtschreib-, Inhalts- und Verständnisfehler aufgespürt haben.

